

Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky I.

Vypracoval: Martin Kříž, Vít Marek.

Dne: 15.12.2002

Úloha: 4

Základy kultivace buněčných kultur a jejich charakterizace

Úkol:

1. Charakterizujte růst kultury kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* *RXII* v tekutém médiu pomocí měření absorbance (O.D.) kultury v pravidelných časových intervalech od jejich zaočkování (tzv. růstová křivka). Průběh růstu kvasinkové kultury stanovte při dvou různých koncentracích glukózy (0,2% a 2%) v růstovém médiu.
2. Pro vybrané hodnoty O.D. stanovte počet buněk pomocí počítací komůrky a stanovte převodní koeficient mezi počtem buněk a O.D.

Teoretický úvod:

Při spočítání buněk v počítací komůrce můžeme určit jejich počet vztažený na objem pomocí vztahu

$$c = \Phi \cdot R \times 10^6 [\text{buněk/ml}] \quad (1)$$

kde Φ je průměrný počet buněk korigovaných na velikost pole, ve kterém buňky počítáme, R je ředění roztoku a c je počet buněk na ml.

Výsledky měření:

1. Namíchali jsme 2 roztoky glukózy, které jsme zaočkovali kvasinkovou kulturou. Pomocí destilované vody jsme zkalibrovali absorpční spektrometr (na vlnové délce $\lambda = 579 \text{ nm}$). Změřili jsme O.D. obou roztoků (pro měření jsme použili 10 krát zředěný vzorek) a nechali je promíchávat. Měření O.D. jsme opakovali přibližně po hodině a výsledky zapisovali do tabulky 1 (hodnoty pro neředěný vzorek).

Tabulka 1: Časová závislost O.D. pro 2% a 0.2% roztoky glukózy s kvasinkovou kulturou

Měření	t [h]	O.D.	
		2% glukóza	0.2% glukóza
1	0,00	0,21	0,20
2	0,67	0,17	0,15
3	1,67	0,32	0,29
4	2,58	0,28	0,31
5	4,55	0,65	0,64
6	22,08	6,46	3,98

2. Při třetím měření jsme vzorek s 2% glukózou dali do počítací komůrky a spočítali počet buněk v obdélnících (2). Díky tomu je průměrný počet napočítaných buněk Φ ve vztahu (1) roven (3). Velká chyba určení počtu buněk je dána velkým rozptylem počtu buněk v jednotlivých obdélnících. Do statistiky bylo spočítáno 542 buněk.

$$\Phi = (6,9 \pm 4,0) \quad (2)$$

$$c = (6,9 \pm 4,0) \times 10^6 \text{ [buněk/ml]} \quad (3)$$

Započítali jsme při tom jen buňky dotýkající se dvou stran, aby byla statistika správná. Je-li O.D. přímo úměrné počtu buněk, můžeme určit převodní vztah mezi O.D. a počtem buněk.

$$O.D. = konst \cdot c \quad (4)$$

$$konst = (46 \pm 27) \times 10^{-9} \quad (5)$$

Na základě dat z tabulky 1 jsme vytvořili graf 1 závislosti počtu buněk na čase. Z grafu je vidět, že první 3 hodiny jsou kvasinky ve stavu lag fáze, teprve pak nastupuje exponenciální fáze.

