

# Úloha: Využití bioluminiscence v přípravě bakteriálních vakcín

- 1.1. Sledování růstu biomasy v čase turbidimetrickým stanovením
- 1.2. Sledování průběhu intenzity bioluminiscence v čase
- 1.3. Korelace růstových fází bakteriální kultury s intenzitou bioluminiscence
2. Vytvoření kalibrační přímky pro stanovení koncentrace bakterií
3. Výpočet buněčného obsahu ATP kultury *E. coli*

## Teoretická příprava

### 1. Vakcíny

Vakcína (imunizační agens) je látka, která má po vpravení do organismu zajistit navození imunity proti specifické chorobě. Vakcíny mohou obsahovat celé organismy (celobuněčné), nebo jen její část - toxin zbavený toxického účinku (toxoid). Moderní věda přinesla velký pokrok ve výrobě vakcín. Zejména díky metodám molekulární biologie a dalších biotechnologiím vznikly zcela unikátní, účinné a bezpečné vakcíny, které využívají purifikované makromolekuly, kombinované antigeny, rekombinantní vektory, syntetické peptidy, nebo DNA. Při tvorbě rekombinantních vakcín se vezme konkrétní gen z viru, bakterie či parazita, který je kóduje vznik specifického antigenu. Tento gen se inkorporuje do jiného organismu (např. bakterie *Escherichia coli*), jež poté produkuje specifický antigen.

Bakteriální vakcíny byly vytvořeny Louisem Pasteurem v letech 1880, včetně vakcín proti choleře kuřat a anthraxu, které obsahovaly oslabené bakteriální kultury. Zhruba ve stejné době byla vyvinuta vakcína na tuberkulózu. Vakcína proti černému kašli, licencovaná 1918, byla první vakcína využívající celých inaktivovaných bakteriálních buněk.

Bakterie *E. coli* představuje typický subjekt veterinárních vakcín, proto byla vybrána jako modelový organismus pro navrhovanou úlohu. Praktické provedení úlohy představuje universální přístup k produkci všech bakteriálních vakcín.

### 2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* byla objevena německým pediatrem Theodorem Escherichem v roce 1885. *E. coli* patří k přirozené střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, včetně člověka, proto slouží jako indikátor fekální kontaminace. Je to gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, která obsahuje patogeny jako jsou *Salmonella*, *Shigella* a

*Yersinia*. Ačkoliv je většina kmenů *E. coli* považována za patogeny, případná patogenita je vždy odvozena od konkrétního kmene.

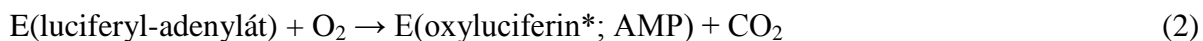
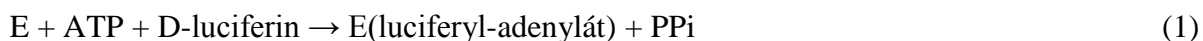
*E. coli* patří k nejlépe prostudovaným známým bakteriím, což je důvodem jejího využití v biotechnologiích a genovém inženýrství. Mezi její klady patří rychlý růst a levná kultivační media.

### 3. Chemiluminiscence

Chemiluminiscence je emise fotonů vyvolaná exergonickou chemickou reakcí. Vzniká excitací atomu a následným návratem do základního stavu. Bioluminiscence je luminiscence vyvolaná živými organismy.

#### 3.1. Reakční systém luciferin - luciferasa

V živých buňkách slouží ATP jako univerzální donor energie pro metabolické reakce. ATP bioluminiscence se používá od roku 1960 jako technika k zjištění mikrobiální aktivity. Jedním z nástrojů k měření ATP bioluminiscence je systém luciferin-luciferasa. Luciferasa ze světlušky katalyzuje reakci mezi ATP, D-luciferinem a O<sub>2</sub> za tvorby AMP, pyrofosfátu (PPi), oxyluciferinu, CO<sub>2</sub> a světla. Reakce probíhá v několika krocích (rovnice 1 až 4).



Množství emitovaného světla je úměrné koncentraci přítomného ATP.

#### 3.2. Využití bioluminiscence

Tohoto principu je využíváno v mnoha oblastech, jako kvalitativní zjišťování přítomnosti bakterií v moči, testování sterility povrchů, monitorování hygieny potravin a nápojů, testování citlivosti na antibiotika, stanovení enzymů a metabolitů, zjišťování přítomnosti bakterií v životním prostředí, hodnocení cytotoxicity a dopadu v imunologii.

## Návod k úloze

### **použité zkratky:**

ATP = adenosintrifosfát

RLU = relativní luminiscenční jednotka

### **1.1. Růst bakteriální kultury *E. coli***

#### **Materiál a vybavení:**

LB medium

zásobní nepatogenní bakteriální kultura *E. coli*

sterilní destilovaná voda

*100ml sterilní baňka (uzavřená alobalem), rukavice, pipety, zkumavky, fotometr, plastové kyvety*

#### **Postup:**

*Kultivace bakteriální kultury *E. coli*: 25 ml LB media ve 100ml baňce zředíte 1:1 sterilní destilovanou vodou na objem 50 ml. Za zásobní bakteriální kultury *E. coli* napipetujte do baňky 5 ml, tj. 10% inokulace. Odeberte 1 ml připravené bakteriální kultury pro turbidimetrické stanovení počáteční koncentrace bakterií. Hrdlo baňky zakryjte zpět alobalem a baňku dejte kultivovat na inkubovanou třepačku při teplotě 37°C a míchání 200 rpm.*

*Turbidimetrické stanovení růstu biomasy: Měřte absorbanci při 600 nm sterilně odebraných vzorků (1 ml) kultivované bakteriální kultury proti LB mediu naředěnému 1:1 destilovanou vodou (½ LB medium). Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek vhodně naředíte ½ LB mediem. Vzorky odebírejte a měřte po 30 min, hodnoty zapisujte do tabulky.*

čas (h)	RLU	RLU <sub>st</sub>	A <sub>600</sub>	čas (h)	RLU	RLU <sub>st</sub>	A <sub>600</sub>
0				3			
0,5				3,5			
1				4			
1,5				4,5			
2				5			
2,5				5,5			

### **1.2. Průběh intenzity bioluminiscence**

#### **Materiál a vybavení:**

bakteriální kultura *E. coli*

Komerční kit ATP Biomass Kit HS (BioThema, Švédsko). Jedna sada kitu obsahuje:

- ATP Reagent HS - lyofilizovaný reagent obsahující luciferasu a luciferin

- Diluent B - pufr k rozpouštění ATP reagentu
- Extraktant B/S - extraktant uvolňující ATP z buněk
- Standard ATP (100 nmol/l)

**Pozn.: Mezi měřeními je třeba uchovávat ATP kit v lednici, aby se zamezilo degradaci přítomného enzymu!**

*rukavice, pipety, zkumavky, luminometr, plastové kyvety*

### Postup:

U vzorků (1 ml) odebraných pro turbidimetrické stanovení koncentrace bakterií nejprve měřte intenzitu luminiscence (vyjádřenou v jednotkách RLU) a intenzitu bioluminiscence po přidavku známého množství vnitřního standardu ATP (100 nmol/l) (v tabulce  $RLU_{st}$ ).

Do plastové kyvety pipetujte následující reakční směs:

- 20  $\mu$ l bakteriální kultury
- 20  $\mu$ l extraktantu B/S
- 160  $\mu$ l ATP reagentu HS

Reakční směs před vlastním měřením řádně promíchejte. Po odečtení a zapsání do tabulky nejvyšší hodnoty v sérii získaných RLU, přidejte 10  $\mu$ l standardu ATP a pipetou promíchejte. Nejvyšší hodnotu RLU zapište do tabulky.

**Pozn: Pracujte rychle, aby byly získané hodnoty intenzity bioluminiscence blízké fyziologickým hodnotám.**

### 1.3. Korelace růstových fází kultury s intenzitou bioluminiscence

Vyplňte podle růstové křivky a průběhu intenzity bioluminiscence dobu trvání (např. 0. h až 0,5. h) jednotlivých fází růstu do tabulky:

Růstová fáze bakteriální kultury	doba trvání
lag	
aktivní růst	
stacionární fáze	

### Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte vyplněnou tabulku naměřených hodnot  $A_{600}$ , RLU a  $RLU_{st}$ .

Sestrojte růstovou křivku kultury *E. coli* v 1/2 LB mediu.

Sestrojte graf průběhu intenzity bioluminiscence během růstu.

Sestrojte graf závislosti intenzity bioluminiscence na koncentraci buněk v reakční směsi v aktivní fázi růstu bakteriální kultury.

Dále uveďte tabulku doby trvání jednotlivých fází růstu bakteriální kultury.

Vysvětlete vztah průběhu intenzity bioluminiscence k jednotlivým růstovým fázím bakteriální kultury:

## 2. Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bakterií

### Materiál a vybavení:

LB medium  
zásobní nepatogenní bakteriální kultura *E. coli*  
sterilní destilovaná voda

*rukavice, pipety, zkumavky, fotometr, plastové kyvety, mikroskop, Cyrusova komůrka II*

### Postup:

V intervalech mezi měřeními v úkolu jedna, nasbírejte data pro sestavení kalibrační přímky pro stanovení koncentrace bakterií.

*Fotometrické stanovení optické density bakteriální kultury:* Ze zásobní bakteriální kultury připravte sadu 6 vzorků s objemem 2 ml. Měřte jejich absorbanci při 600 nm proti slepému vzorku (vzorek 1 - LB medium neobsahující bakteriální buňky) a naměřené hodnoty uveďte do tabulky. Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek vhodně nařed'te LB médiem.

Do zkumavek pipetujte podle rozpisu:

zkumavka č.	ml zásobní bakteriální kultury <i>E. coli</i>	ml LB media	A <sub>600</sub>	mikroskopicky zjištěná koncentrace bakterií (buňky/ml)
1	0,0	2,0	0,000 (slepý vzorek)	
2	0,4	1,6		
3	0,8	1,2		
4	1,2	0,8		
5	1,6	0,4		
6	2,0	0,0		

*Mikroskopické stanovení bakteriálních počtů:* Vzorky připravené pro fotometrické stanovení optické density bakteriální kultury podrobte přímému mikroskopickému počítání. Nařed'te vzorky tak, aby čtvercové pole Cyrusovy komůrky II obsahovalo cca 20 bakterií. Spočítejte bakterie vždy v 5 polích a udělejte průměr.

Koncentraci bakterií spočítejte podle vzorce:  
 $\text{počet bakteriálních buněk/ml} = \text{průměr} \times 10^6 \times \text{ředění}$   
Vypočítané hodnoty uveďte do tabulky.

### Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte vyplněnou tabulku.

Sestrojte kalibrační přímku pro turbidimetrické stanovení koncentrace bakterií.

Dále uveďte rovnici směrnice přímkou:

### 3. Výpočet buněčného obsahu ATP kultury *E. coli*

K výpočtům použijte data naměřená v úkolu 1, a doplňte následující tabulku:

čas (h)	koncentrace bakterií (buňky/ml)	ATP ve 20 $\mu$ l (pmol)	ATP v 1 ml (pmol)	ATP/buňka (pmol)	ATP/buňka (amol)
0					
0,5					
1					
1,5					
2					
2,5					
3					
3,5					
4					
4,5					
5					
5,5					

Koncentraci bakterií (buňky/ml) vypočítejte pomocí kalibrační přímkou zjištěné v úkolu 2.

Množství ATP ve vzorku (20  $\mu$ l) v pmol vypočítejte podle následujícího vztahu:

$$\text{ATP} = \text{RLU} / (\text{RLU}_{\text{st}} - \text{RLU})$$

### Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte vyplněnou tabulku.

Sestrojte graf průběhu buněčného obsahu ATP během růstu.

Sestrojte graf závislosti celkového obsahu ATP v lineární fázi růstu na celkovém počtu buněk (objem 50 ml).