

OBSAH

PREDHOVOR	17
1. PRINCÍPY KULTIVÁCIE (ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ)	19
1.1. Príprava skla a jeho sterilizácia	19
1.1.1. Umývanie nádob a ich úprava	21
1.1.2. Druhy sterilizácie	22
1.2. Živné pôdy	26
1.2.1. Destilovaná, redestilovaná a deionizovaná voda	29
1.2.2. Oligobiogénne prvky	30
1.2.3. Rastové látky	30
1.2.4. Predpisy pro živné pôdy	31
1.3. Dezinfekcia a iný spôsob odstraňovania kontaminantov	33
1.3.1. Účinok dezinfekčných prostriedkov	33
1.4. Očkovanie a jednoduché pestovanie kultúr	37
1.4.1. Kultúry v kvapalnom prostredí	37
1.4.2. Kultúry na spevnených pôdach	38
1.4.3. Rozpestúvanie kultúry	38
1.5. Úschova kultúr	38
1.5.1. Metódy založené na obmedzení metabolismu	39
1.5.2. Metódy vysušania kultúr	39
1.5.3. Metódy úschovy pri veľmi nízkych teplotách	40
1.5.4. Kvantitatívne hodnotenie prežívania uschovaných kultúr	41
LITERATÚRA	41
Príloha ku kapitole 1	42
2. ZÍSKAVANIE NOVÝCH KMEŇOV Z PRÍRODNÝCH STANOVÍŠŤ (ERICH MINÁRIK)	46
2.1. Odber vzoriek	46
2.1.1. Z pôdy	46
2.1.2. Z listov a kvetov rastlín	48
2.1.3. Z priemyslových a iných substrátov	48

2.2. Nahromadovacie kultúry .	49
2.2.1. Z pôdy .	50
2.2.2. Z kvetov, listov a plodov rastlín .	51
2.2.3. Z iných substrátov .	51
2.3. Izolačné metódy .	52
2.3.1. Kochova zriedovacia metóda .	53
2.3.2. Böttcherova vlhká komôrka .	54
2.3.3. Lindnerova kvapková metóda .	54
2.3.4. Hansenova metóda .	55
2.3.5. Monosporický izolátor .	56
2.3.6. Izolácia mikromanipulátorom .	56
2.3.7. Odtlačková metóda .	58
2.3.8. Membránová filtrácia .	58
2.4. Selektívna kultivácia kvasiniek .	60
2.4.1. S vylúčením baktérií .	60
2.4.2. S vylúčením hýfovitých húb .	61
2.4.3. Potlačenie kvasiniek .	61
2.5. Kultivačné prostredie pre nové izoláty .	62
2.5.1. Prirodzené živné prostredia .	62
2.5.2. Umelé živné prostredia .	63
2.5.3. Selektívne živné pôdy .	64
LITERATÚRA .	64
3. MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI (ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ) .	66
3.1. Posúdenie základných tvarov buniek v dosledku rôznych spôsobov bunko- vého množenia .	66
3.1.1. Konidiácia .	66
3.1.2. Sexuálna fruktifikácia .	75
3.2. Meranie rozmerov buniek a posudzovanie tvarov .	77
3.3. Morfológia kolónií .	79
3.4. Rast v kvapalnom prostredí .	81
LITERATÚRA .	82
4. MIKROSKOPICKÉ TECHNIKÝ (OLDŘICH NEČAS, EVA STREIBLOVÁ, MARIE HAVELKOVÁ, MARIE KOPECKÁ) .	82
4.1. Světelná mikroskopie .	82
4.1.1. Seřízení světelného mikroskopu .	82
4.1.2. Fázově kontrastní mikroskopie .	84

4.1.3. Mikroskopie v temném poli	85
4.1.4. Fluorescenční mikroskopie	86
4.2. Barvicí metody	87
4.2.1. Barvení nefixovaných preparátů	87
4.2.2. Barvení fixovaných buněk	88
4.2.2.1. Základní postupy používané pro kvasinky	88
4.2.2.2. Barvení jader	89
4.2.3. Fluorochromování kvasinkových buněk	90
4.2.3.1. Vybrané metody založené na sekundární fluorescenci	91
4.2.3.2. Imunofluorescenční techniky	92
4.3. Elektronová mikroskopie	94
4.3.1. Ultratenké řezy	94
4.3.1.1. Fixace kvasinkových buněk	94
4.3.1.2. Fixace kvasinkových protoplastů	97
4.3.1.3. Odvodnění a zalévání	97
4.3.1.4. Příprava ultratenkých řezů a kontrastování řezů	98
4.3.1.5. Elektronoptická cytochemie	98
4.3.2. Stínění kovem a negativní kontrastování	101
4.3.2.1. Preparáty stíněné kovem	102
4.3.2.2. Preparáty negativně kontrastované	102
4.3.3. Freeze-etching	103
4.3.4. Řádkovací elektronová mikroskopie	106
LITERATURA	107
5. PRÁCE S PROTOPLASTY (AUGUSTIN SVOBODA, OLDŘICH NEČAS)	110
5.1. Příprava protoplastů	110
5.1.1. Charakteristika některých preparátů	112
5.1.2. Zajištění osmotické stability protoplastů	112
5.2. Regenerace protoplastů	113
5.2.1. Regenerační média	113
5.2.2. Sklíčkové kultury	114
5.2.3. Velkokapacitní kultury	114
5.2.4. Kritéria regenerace	114
5.2.5. Izolace revertovaných buněk	116
5.2.6. Příčiny neúspěchu při regeneraci protoplastů	117
5.3. Fúze protoplastů	117
5.3.1. Podmínky fúze	119
5.3.2. Regenerace a selekce fúzovaných protoplastů	119
LITERATURA	120
6. STANOVENÍ POČTU BUNĚK A JEJICH SUŠINY (DAGMAR VRANÁ, LUDMILA ŠILHÁNKOVÁ)	121
6.1. Stanovení počtu buněk	121

6.1.1. Přímá stanovení	121
6.1.2. Kultivační stanovení	123
6.1.3. Rozlišení živých a mrtvých buněk kvasinek	125
6.2. Stanovení sušiny buněk	126
6.2.1. Stanovení sušiny vázkovou metodou v centrifugačních zkumavkách	126
6.2.2. Stanovení sušiny vázkovou metodou po filtraci filtračními kelímky	126
6.2.3. Stanovení sušiny turbidimetrickou metodou	126
LITERATURA	127
Příloha ke kapitole 6	128
7. GENETICKÉ PRÁCE (LUDMILA ŠILHÁNKOVÁ, VLASTA KOVÁČOVÁ, JÚLIUS ŠUBÍK)	129
7.1. Úvod	129
7.2. Zjišťování mutantů v populaci a jejich izolace	130
7.2.1. Auxotrofy	131
7.2.1.1. Zjišťování auxotrofů replikační metodou	131
7.2.1.2. Zjišťování auxotrofů na půdě s magdalskou červení (floxinem B)	132
7.2.1.3. Zjišťování mutantů vyžadujících adenin	133
7.2.1.4. Nahromadění auxotrofů pomocí nystatinu nebo 2-deoxyglukózy	133
7.2.2. Revertanty k prototrofi	134
7.2.3. Mutanty rezistentní k antibiotikům nebo jiným jedům	135
7.2.4. Mutanty se zvýšenou citlivostí k nepříznivým podmínkám	136
7.2.5. Respiračně deficitní mutanty	137
7.2.5.1. Zjišťování respiračně deficitních mutantů z neschopnosti růstu na nezkrasitelných substrátech	138
7.2.5.2. Zjištění respiračně deficitních mutantů pomocí různých barviv	138
7.3. Mutageneze	138
7.3.1. Získávání mutantů pomocí ultrafialového světla	140
7.3.2. Mutageneze pomocí alkylačních činidel	141
7.3.3. Mutageneze pomocí kyseliny dusité	142
7.3.4. Mutageneze mitochondriální DNA (mtDNA)	143
7.3.4.1. Indukce delečních mutací mtDNA	143
7.3.4.2. Indukce bodových mutací mtDNA	143
7.3.5. Kvalitativní důkaz mutagenních účinků	143
7.4. Charakterizace získaných mutantů	144
7.4.1. Genetické metody charakterizace mutantů	144
7.4.2. Biochemické metody charakterizace mutantů	145
7.5. Křížení a sporulace	145
7.5.1. Křížení a sporulace u heterothalických kmenů <i>S. cerevisiae</i>	145
7.5.1.1. Replikační křížení kmenů s komplementárními markery	145
7.5.1.2. Křížení s izolací zygot	147
7.5.1.3. Křížení v tekutém prostředí	147

7.5.1.4. Sporulace	147
7.5.2. Křížení a sporulace u <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	148
7.6. Genetická analýza spór	148
7.6.1. Tetrádová analýza	148
7.6.1.1. Technika izolácie spór mikromanipulátorom	148
7.6.1.2. Analýza usporiadaných tetrád	149
7.6.1.3. Analýza neusporiadaných tetrád	150
7.6.1.4. Mapovanie génov	152
7.6.1.5. Mapovanie trizomickou analýzou	153
7.6.1.6. Interakcia génov	154
7.6.2. Analýza jednotlivých spór v populácii (hromadná analýza)	154
7.7. Polyploidia	155
7.8. Sledovanie mitotických rekombinácií	156
7.8.1. Mitotický crossing-over	156
7.8.2. Mitotická génová konverzia	157
7.9. Mimojadrová dedičnosť	158
7.9.1. Genetická charakterizácia cytoplazmatických mutantov	158
7.9.1.1. Mitotická segregácia	158
7.9.1.2. Meiotická segregácia	159
7.9.1.3. Eliminácia cytoplazmatickej mutácie	159
7.9.1.4. Rekombinácia mitochondriálnej DNA a vzájomný vzťah mitochondriálnych mutácií	160
LITERATURA	163
Seznam pŕd ke kapitole 7	167
8. RŮST A MNOŽENÍ BUNĚK (KAREL BERAN, JAN ŘIČICA, MIROSLAV SOBOTKA, JITKA LIEBLOVÁ, DAGMAR VRANÁ)	169
8.1. Úvod	169
8.1.1. Charakteristiky kultivačních metod	169
8.1.2. Kontrolní metody růstu	172
8.2. Jednorázová kultivace	172
8.2.1. Kinetika růstu buněk v jednorázové kultivaci	173
8.2.2. Výtěžek	175
8.3. Kontinuální kultivace	177
8.3.1. Kinetika růstu v jednostupňové kontinuální kultivaci	179
8.3.2. Vícetupňová kontinuální kultivace	180
8.3.3. Předpověď parametrů růstu pro kontinuální kultivaci	180
8.4. Metody růstu kvasinek	180
8.4.1. Synchronizované a synchronní kultury	180
8.4.2. Kultivace v baňkách na třepacích strojích	181

8.4.3. Kultivace v laboratorních fermentorech	182
8.4.3.1. Úvod	182
8.4.3.2. Laboratorní fermentor	184
8.4.3.2.1. Fermentor	184
8.4.3.2.2. Sterilizace fermentoru	189
8.4.3.3. Transport kyslíku do živného média	190
8.4.3.3.1. Úvod	190
8.4.3.3.2. Teorie přenosu kyslíku	190
8.4.3.3.3. Modely přenosu kyslíku	191
8.4.3.3.4. Metody stanovení aerační kapacity	192
8.4.3.4. Přístrojová část kultivačního zařízení	195
8.4.3.4.1. Měřicí a regulační přístroje	195
8.4.3.4.2. Využití samočinného počítače	198
8.4.3.5. Kultivace v laboratorním fermentoru	199
8.4.3.5.1. Jednorázová kultivace	201
8.4.3.5.2. Kultivace za doplňování kultury živným médiem	201
8.4.3.5.3. Kultivace nepřetržitě průtokové, kontinuální	203
LITERATURA	204

9. ANALÝZY KVASINKOVÝCH BUNĚK (OLGA BENDOVÁ, ARNOŠT KOTYK, GABRIELA BASAŘOVÁ, MIROSLAV KAHLER) 208

9.1. Stanovení dusíkatých látek	208
9.1.1. Stanovení celkových dusíkatých látek	208
9.1.2. Stanovení aminokyselin	208
9.1.3. Stanovení bílkovin	209
9.1.3.1. Metoda Folin-Lowryho	209
9.1.3.2. Metoda biuretová	210
9.2. Stanovení sloučenin fosforu	210
9.2.1. Stanovení anorganického fosfátu	210
9.2.1.1. Metoda podle Martina a Dotyho	210
9.2.1.2. Metoda podle Siglera a Kotyka	211
9.2.2. Extrakce fosfátů z kvasinek	211
9.2.3. Stanovení polyfosfátů frakcionační extrakční metodou	212
9.2.4. Stanovení anorganického difosfátu v přítomnosti anorganického monofosfátu	212
9.2.5. Stanovení nukleotidů	213
9.2.6. Stanovení ATP	214
9.2.7. Stanovení ATP, ADP a AMP a výpočet energetického náboje	214
9.2.8. Stanovení ADP a AMP vedle ATP	214
9.3. Stanovení polysacharidů	215
9.3.1. Metoda s použitím anthronu	216
9.3.2. Metoda s použitím kyseliny fenolsírové	217
9.4. Stanovení nukleových kyselin	217
9.4.1. Stanovení RNA	217
9.4.2. Stanovení DNA	218

9.5. Stanovení lipidů	218
9.5.1. Extrakce lipidů a jejich stanovení	218
9.5.2. Stanovení mastných kyselin	219
9.5.3. Stanovení sterolů	220
9.6. Stanovení dýchacích a jiných pigmentů	220
9.6.1. Analýza cytochromů v buněčných homogenátech a mitochondriích	220
9.6.1.1. Kvantitativní stanovení cytochromů	221
9.6.1.2. Extrakce cytochromu c z buněk a mitochondrií	221
9.6.2. Stanovení ubichinonů	222
9.6.3. Stanovení karotenoidů	223
9.6.4. Stanovení melaninu	223
9.7. Stanovení vitamínů	223
9.7.1. Fluorometrické stanovení vitamínu B ₁	224
9.7.2. Fluorometrické stanovení vitamínu B ₂	224
9.8. Stanovení popela	225
LITERATURA	225
10. BIOCHEMICKÉ PRÁCE (ARNOŠT KOTYK, PETER BIELY, OSKAR MARKOVIČ, KAREL BERAN, ZDENĚK HOLAN)	229
10.1. Manometrické metody	229
10.1.1. Příprava manometrů a nádobek	229
10.1.2. Konstanta nádoby	230
10.1.3. Měření výměny O ₂ a CO ₂	230
10.2. Dezintegrace buněk	232
10.2.1. Úvod	232
10.2.2. Výběr metod	233
10.2.3. Hodnocení průběhu dezintegrace	236
10.2.4. Popis metod	237
10.2.4.1. Skleněný homogenizátor	237
10.2.4.2. Dezintegrace ve zkumavce	237
10.2.4.3. Rotační dezintegrátor	237
10.2.4.4. Vertikální deskový dezintegrátor	239
10.2.4.5. Kontinuální dezintegrátor	239
10.2.4.6. Frenchův lis	240
10.2.4.7. Hughesův lis	240
10.3. Izolácia organel	241
10.3.1. Metodický úvod	241
10.3.2. Bunkové steny	245
10.3.2.1. Frakcionácia a analýza bunkovej steny	246
10.3.3. Plazmatická membrána	247
10.3.4. Vakuoly	248
10.3.5. Mitochondrie	248

10.3.6. Jadro	249
10.3.7. Mikrozomálna frakcia a cytozol	250
10.4. Izolácia enzýmov	251
10.4.1. Úvod	251
10.4.2. Stanovenie enzýmovej aktivity	251
10.4.3. Koncentrácia enzýmových roztokov	252
10.4.3.1. Frakčná precipitácia	252
10.4.3.2. Frakčná adsorpcia	252
10.4.3.3. Dialýza, ultrafiltrácia, mrazová sublimácia	253
10.4.4. Chromatografické metódy purifikácie	254
10.4.4.1. Gélová filtrácia	254
10.4.4.2. Chromatografia na iónomeničoch	256
10.4.4.3. Chromatografia na hydroxyapatite	257
10.4.4.4. Afinitná chromatografia	257
10.4.5. Elektroforetické preparatívne postupy	258
10.4.6. Kritéria homogenity enzýmov	259
LITERATÚRA	260

11. IMUNOLOGIE A PATOGENITA (ALENA TOMŠÍKOVÁ, JOZEF ŠANDULA) 265

11.1. Úvod	265
11.2. Antigen	265
11.2.1. Štruktúra antigenů a determinanťných skupín	266
11.2.2. Příbuzenské vztahy antigenů – křížové reakce	268
11.2.3. Získávání antigenů korpuskulárních, nekorpuskulárních, frakcí bílkovinných a polysachridových	268
11.2.4. Kultivační metody	271
11.2.5. Inaktivace	271
11.2.6. Standardizace	272
11.2.7. Titrace	272
11.3. Protilátka	272
11.3.1. Získávání hyperimunních sér zvířecích a lidských	273
11.3.2. Imunizační metody	273
11.3.2.1. Intravenózní imunizace	273
11.3.2.2. Depotní imunizace subkutánní	274
11.3.2.3. Získávání lidských imunních sér	274
11.3.3. Odběr krve	275
11.3.4. Konzervace a uchovávání imunních sér	275
11.3.5. Titrace séra	275
11.4. Sérologické metody	275
11.4.1. Sklíčková aglutinace	275
11.4.1.1. Orientační	275
11.4.1.2. Titrační	275

11.4.2. Zkumavková aglutinace s kompletním antigenem	276
11.4.2.1. Rychlá centrifugační metoda	276
11.4.3. Aglutinace s nosiči antigenu	276
11.4.3.1. Hemaglutinace	276
11.4.3.2. Koloidová aglutinace	277
11.4.3.3. Latexová aglutinace	277
11.4.4. Coombsova reakce	278
11.4.4.1. Pouzdrná reakce Neufeldova u <i>Cr. neoformans</i>	278
11.4.5. Precipitace	278
11.4.5.1. Kvantitativní precipitace	278
11.4.5.2. Jednoduchá imunodifúze	279
11.4.5.3. Dvojitá imunodifúze	280
11.4.6. Imunoelektroforéza	282
11.4.6.1. Imunoelektroforéza podle Grabara a Williamse (1953)	282
11.4.6.2. Raketová imunoelektroforéza	283
11.4.6.3. Protisměrná imunoelektroforéza	284
11.4.6.4. Dvojrozměrná imunoelektroforéza	284
11.4.7. Fotografování a barvení imunoprecipitátů	284
11.4.8. Imunoadsorbenty	285
11.4.9. ELISA	285
11.4.10. S-PRIA	286
11.4.11. Průkaz IgG- a IgM- antikandidových protilátek pomocí 2-merkaptetanolu	287
11.4.12. Fluorescenční test	287
11.4.13. Vazba komplementu	288
11.4.14. Fungistatický účín séra	290
11.4.15. Neilův test	291
11.4.16. Hodnocení sérologických reakcí	291
11.5. Alergie	291
11.5.1. Alergie časná	292
11.5.2. Alergie pozdní	292
11.5.3. Příprava alergenu	294
11.5.4. Hodnocení	294
11.6. Antigenní analýza	294
11.6.1. Technika antigenní analýzy	294
11.6.2. Příprava specifických antisér	294
11.6.3. Vysycování	295
11.6.4. Antigenní příbuznost	295
11.7. Ochranné očkování	295
11.7.1. Příprava antigenu	295
11.7.2. Metody aplikace	296
11.7.3. Zhodnocení	296
11.8. Patogenita	296
11.8.1. Faktory podmiňující patogenitu kvasinek	297
11.8.2. Experimentální důkaz patogenity	297
11.8.3. Selektivní metody důkazu patogenních kvasinek	298
11.8.4. Histologický důkaz patogenity	298

LITERATURA	298
Seznam pŕd	302
Pŕloha ke kapitole 11	303
12. IDENTIFIKAČNÉ TESTY A SKRÍNINGY (ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ)	305
12.1. Úvod	305
12.2. Kvasenie sacharidov (fermentácia)	305
12.3. Rast v prŕtomnosti rôznych zdrojov uhlíka a dusíka	310
12.3.1. Asimilácia zdrojov uhlíka a dusíka	311
12.3.2. Hydrolýza škrobu	312
12.3.3. Dôkaz redukcie dusičnanu na dusitan	312
12.3.4. Stanovenie prchavých kyselín mikrodifúznou metódou	312
12.4. Potreba rastových látok	312
12.4.1. Rast v prostredí bez vitamínov	313
12.4.2. Potreba jednotlivých vitamínov	313
12.4.3. Vitamínogramy	313
12.5. Vplyv prostredia	313
12.5.1. Vplyv organických kyselín	313
12.5.2. Vplyv aktidiónu a iných antibiotík	314
12.5.3. Tolerancia voči etanolu	316
12.5.4. Tolerancia voči vyšším koncentráciám sacharidov	316
12.5.5. Halofília	317
12.6. Výsledky enzýmového pôsobenia	317
12.6.1. Proteolytická aktivita	318
12.6.2. Dôkaz ureázy	319
12.6.3. Dôkaz katalázy	319
12.6.4. Dôkaz extracelulárnej DNAázy a RNAázy	320
12.6.5. Hydrolázy	321
12.6.6. Štiepenie arbutínu, eskulínu a salicylínu	325
12.6.7. Dôkaz lipáz	325
12.6.8. Stanovenie aktivity fosfatáz	325
12.7. Tvorba povrchových polysacharidov	326
12.7.1. Polysacharidy amylózového typu	327
12.7.2. Meranie hrúbky polysacharidového pŕzdra	327
12.8. Dôkaz smrtiacich kmeňov (killers)	327
12.9. Metódy špeciálnej klasifikácie	328
12.9.1. Stanovenie obsahu G + C v DNA	328

12.9.2. Stanovenie koenzýmu Q	330
12.10. Kľúč na určovanie rodov kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov	331
LITERATÚRA	339
 13. IZOTOPOVÁ TECHNIKA (VLADIMÍR FARKAŠ)	 340
13.1. Úvod	340
13.1.1. Použitie rádioaktívnych žiaričov v biochemických experimentov	340
13.1.2. Zásady práce s rádioaktívnymi žiaričmi	341
13.1.3. Meranie rádioaktivity	341
13.1.4. Príprava vzoriek biologického materiálu na meranie rádioaktivity	342
 13.2. Príklady použitia rádioizotopov v biochemických experimentoch s kvasin-	
kami	344
13.2.1. Meranie rýchlosti proteosyntézy	345
13.2.2. Meranie rýchlosti syntézy nukleových kyselín	345
13.2.2.1. Meranie rýchlosti syntézy RNA	345
13.2.2.2. Meranie rýchlosti syntézy DNA	345
13.2.3. Sledovanie tvorby polysacharidov bunkovej steny.	347
13.2.3.1. Meranie celkovej rýchlosti tvorby bunkovej steny	347
13.2.3.2. Meranie rýchlosti tvorby jednotlivých stenových polymérov	347
13.2.3.3. Selektívne rádioaktívne značkovanie jednotlivých polysacharidov bunkovej steny	350
 LITERATÚRA	351
 14. PRÁCE S ANTIBIOTIKAMI (MILENA BETINOVÁ, VLADIMÍR BETINA)	 353
14.1. Základné možnosti	353
 14.2. Inhibícia rastu antibiotikami	 353
14.2.1. Difúzne platňové testy v skriningu antibiotík	353
14.2.2. Kvantitatívne a semikvantitatívne testy citlivosti	354
14.2.2.1. Skúmavková zriedovacia metóda	354
14.2.2.2. Platňová zriedovacia metóda	354
14.2.2.3. Platňová disková metóda	355
14.2.3. Stanovenie hodnot ID ₅₀ (ED ₅₀)	355
 14.3. Kvantitatívne stanovenie antibiotík	 356
14.3.1. Difúzne platňové metódy	357
14.3.1.1. Nystatín	357
14.3.1.2. Iné antibiotiká	359
14.3.2. Turbidimetrické metódy	360
14.3.2.1. Amfotericín B	360
14.3.3. Iné metódy	361
 14.4. Bioautografická detekcia chromatogramov antibiotík	 361

14.4.1. Papierová chromatografia	362
14.4.2. Tenkovrstvová chromatografia	362
14.4.3. Kvapalinová chromatografia	362

14.5. Selekcia mutantov pomocou antibiotík	363
--	-----

LITERATÚRA	363
------------	-----

Zoznam pôd	365
------------	-----