Příprava roztoků:

1. LB medium autoklávovat
2. MSM medium

MgSO4.7H2O 0,1 g/l

NH4NO3 0,2 g/l

Fosfátový pufr (0,5 mol.l-1, pH 7) 100 ml

Destilovaná voda 900 ml

Odvážené množství látek se rozpustí v příslušném množství destilované vody a přidá se odměrným válcem odměřené objem fosfátového pufru a autoklávuje se.

1. Roztok stopových prvků:

MgO 10 g/l

CaCl2 2,94 g/l

ZnSO4.7H2O 1,44 g/l R 1

CuSO4.5H2O 0,39 g/l

H3BO3 0,062 g/l

Na2MoO4.2H2O 0,53 g/l

FeCl3.6H2O 5,4 g/l

Nejprve se naváží MgO a H3BO3 a přidá se 96 ml destilované vody a poté 4 ml kyseliny chlorovodíkové (z důvodu špatné rozpustnosti MgO ve vodě – tvoří se bílá sraženina) čímž se upraví na pH 2 (může být pomocí pH papírku). Po rozpuštění sraženiny se do roztoku přidají ostatní stopové prvky = R1. FeCl3.6H2O, se připravuje zvlášť (z důvodu usazování červeného zákalu tvořeného nerozpuštěným FeCl3.6H2O).

1. Do autoklávovaného 1 litru MSM (připraveného podle 2)) se ve sterilním boxu přistříkne přes stříkačku s filtrem (Milipore 0,2 um) roztok R1 0,1 ml a roztok FeCl3 rovněž 0,1 ml. Nakonec se zkontroluje pH pH metrem, případně se upraví přídavkem malého množství NaOH nebo HNO3 (konc. obvykle 1M)
2. Noční kultůra (v pondělí odpoledne nasaadit): Do 250 ml Erlenmayerové baňky s 50 ml sterilního LB média s kanamycinem (10 g/l, dávkovaní 0,25 ml na 50 ml suspenze) se zaočkuje nalitím jedné vialky zamražené kultury TVA8 v glycerolu. Kultivuje se přes noc na třepačce (dopsat rpm, teplotu). Ráno se změří OD. Do nové250 ml Erlenmayerové baňky s 50 ml sterilního LB média s kanamycinem (10 g/l, dávkovaní 0,25 ml na 50 ml suspenze) se zaočkuje 5 ml noční kultury a nechá narůst na OD mezi 0,3 a 0.5.
3. Narostlá kultura TVA8 se odstředí 2x promyje (jednou může být fyziologickým roztokem, podruhé MSM). Podle změřeného OD se spočítá počet buněk a připraví se suzpenze buněk v MSM o koncentraci 109  = **A1**, 108  = **A2** a **A3** = 107.
4. Připraví se roztoky toluenu z nasyceného roztoku toluenu (**N**) ten musí být při teplotě laboratoře nejlépe přes noc. Odebere se nejlépe jehlou a skleněnou stříkačkou nebo skleněnou pipetou:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Roztoky toluenu | **T1** | **T2** | **T3** |
| z nasyceného roztoku **N** | 1 ml N zředit do celkového objemu 5 ml destil. vody | 1 ml N zředit do celkového objemu 10 ml destil. vody | 1 ml N zředit do celkového objemu 100 ml destil. vody |

1. Pipetování do destičky: Opakování v destičce je vždy v miskách A - D a E –H.

Layout:

Kontrola **pouze MSM**.

Růst a svícení buněk **A3 pouze na toluenu konc.T3,T2, T1.**

Růst a svícení buněk **A2 pouze na toluenu konc. T3,T2,T1**.

Růst a svícení buněk **A1 pouze na toluenu konc. T3,T2,T1**.

Růst a svícení na **LB mediu buňky konc. A1, A2, A3**.

Růst a svícení buněk **A2 na LB a toluenu konc.T3,T2, T1.**

Růst a svícení buněk **A1 na LB a toluenu konc.T3,T2, T1.**

.

Růst a svícení buněk **A1 na toluenu konc. T1. znečištěné vodě V1.**

Růst a svícení buněk **A3 na LB a toluenu konc.T3,T2, T1.**

Růst a svícení buněk **A1 na znečištěné vodě V1.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 |  | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** | MSM 200ul | MSM 100 ul +50 ul LB + 50 ul A1 |  | MSM 100 ul +50 LB ul+50 ul A2 | MSM 100 ul +50 ul LB + 50 ul A3 | MSM 100 ul + 50 ul A1+ 50ul T3 | MSM 100 ul+ 50 ul A1+ 50 ul T2 | MSM 100 ul + 50 ul A1+ 50 ul T1 | MSM 100 ul + 50 ul A2+ 50 ul T1 | MSM 100 ul+ 50 ul A2+ 50ul T2 | MSM 100 ul+ 50 ul A2+ 50ul T3 | MSM 100 ul + 50 ul A3+ 50ul T3 | MSM 100 ul+ 50 ul A3+ 50ul T2 |
| **B** | MSM |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **C** | MSM |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **D** | MSM |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **E** | MSM 100 ul + 50 ul A3 + 50 ul T1 | MSM 50 ul +50 ul LB + 50 ul A1 + 50 ul T1 |  | MSM 50 ul +50 ul LB + 50 ul A1 + 50 ul T2 | MSM 50 ul +50 ul LB + 50 ul A1 + 50 ul T3 | MSM 50 ul +50 ul LB + 50 ul A2 + 50 ul T3 | MSM 50 ul+50 ul LB + 50 ul A2+ 50 ul T2 | MSM 50 ul+50 ul LB + 50 ul A2+ 50 ul T1 | MSM 50 ul+50 ul LB + 50 ul A3+ 50 ul T1 | MSM 50 ul+50 ul LB + 50 ul A3+ 50 ul T2 | MSM 50 ul+50 ul LB + 50 ul A3+ 50 ul T1 | MSM 100 ul + 50 ul A1+ 25 ul T1 + 25 ul V**1** | MSM 100 ul+ 50 ul A1+ 50 ul **V1** |
| **F** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **G** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **H** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Layouty jednotlivých složek:**

**Layout MSM:**

100 μl

50 μl

200 μl

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **A** | 200 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul |
| **B** | 200 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul |
| **C** | 200 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul |
| **D** | 200ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul | 100 ul |
| **E** | 100 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 100 ul | 100 ul |
| **F** | 100 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 100 ul | 100 ul |
| **G** | 100 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 100 ul | 100 ul |
| **H** | 100 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 100 ul | 100 ul |

50 μl

**Layout LB:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **B** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **C** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **D** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **E** |  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **F** |  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **G** |  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **H** |  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  |

**Layout A1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |
| **B** |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |
| **C** |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |
| **D** |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |
| **E** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **F** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **G** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **H** |  | 50 | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |

**Layou A2**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **B** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **C** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **D** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **E** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **F** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **G** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **H** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |

**Layout A3**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **B** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **C** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **D** |  |  |  | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |
| **E** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **F** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **G** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |
| **H** | 50 |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 | 50 |  |  |

**Layout T1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |  |  | 50 |  |
| **B** |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |  |  | 50 |  |
| **C** |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |  |  | 50 |  |
| **D** |  |  |  |  |  |  | 50 | 50 |  |  | 50 |  |
| **E** | 50 | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  | 50 | 50 |  |
| **F** | 50 | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  | 50 | 50 |  |
| **G** | 50 | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  | 50 | 50 |  |
| **H** | 50 | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  | 50 | 50 |  |

**Layout T2**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 |
| **B** |  |  |  |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 |
| **C** |  |  |  |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 |
| **D** |  |  |  |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 |
| **E** |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 25 |  |
| **F** |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 25 |  |
| **G** |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 25 |  |
| **H** |  |  | 50 |  |  | 50 |  |  | 50 | 50 | 25 |  |

**Layout T3**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  |  | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  |
| **B** |  |  |  |  | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  |
| **C** |  |  |  |  | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  |
| **D** |  |  |  |  | 50 |  |  |  |  | 50 | 50 |  |
| **E** |  |  |  | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |
| **F** |  |  |  | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |
| **G** |  |  |  | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |
| **H** |  |  |  | 50 | 50 |  |  |  |  |  |  |  |

**Layout V1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| **A** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **B** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **C** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **D** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **E** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 25 | 50 |
| **F** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 25 | 50 |
| **G** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 25 | 50 |
| **H** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 25 | 50 |