

Fyziologie hmyzu – cvičení – ZS 2018/2019

1. den

1. Odběr hemolymfy ze zavíječe voskového *Galleria mellonella* a ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus*
2. Stanovení hladiny glycidů v hemolymfě ruměnice pospolné *P. apterus* a zavíječe voskového *G. mellonella*
3. Stanovení hladiny lipidů v hemolymfě *P. apterus* a *G. mellonella*
4. Stanovení hladiny bílkovin v hemolymfě hmyzu BCA metodou
5. Rozpouštění hedvábí (kokonů) na stanovení aktivity inhibitorů proteáz (viz další den)

2. den

6. Pokračování úlohy z předešlého dne: rezorufin-kaseinová assay - stanovení aktivity inhibitorů proteáz v hedvábí hmyzu
7. Pitvy - mozku, corpora cardiaca, corpora allata *P. apterus*
 - pitva orgánů zavíječe voskového *G. mellonella*
 - pitva orgánů švába amerického *Periplaneta americana*
8. Stanovení aktivity amyláz ve střevě *P. apterus* a *P. americana*

Protokol:

Vypracovává každý sám za sebe

uveďte (jméno, datum, název úlohy)

výsledky: přiložte náčrty s popisy k pitevním úlohám, kalibrační křivky a naměřené hodnoty u experimentálních stanovení

závěr: zhodnocení výsledků, komentáře

Pokusné druhy hmyzu:

- ruměnice pospolná *Pyrrhocoris apterus* – ploštice živící se převážně lipovými semínky, které nabodává sosačkem a vysává jejich ztekucený obsah
- zavíječ voskový *Galleria mellonella* – známý škůdce včel, jeho housenky se živí včelím dílem, kde žerou hlavně med, ale dokáží strávit i vosk
- šváb americký *Periplaneta americana* – u nás nežijící šváb, velmi odolný, živí se rostlinnou i živočišnou potravou

Úloha 1. Odběr hemolymfy ze zavíječe voskového *Galleria mellonella* a ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus*

Cílem úlohy je zvládnout odběr hemolymfy, která je výchozím bodem řady fyziologických stanovení i následujících úloh.

1. Odběr hemolymfy u larev zavíječe voskového.

Larvy zavíječe krátce narkotizujeme (několik minut) ponořením do vody (autonarkotizace vlastním CO₂ v tracheálním systému). Poté larvy vylovíme, osušíme a nůžkami odstříháme jednu hrudní panožku - nejlépe na prothoraxu nebo mezothoraxu. Vytékající hemolymfu jímáme do pipety a pak ji přeneseme do eppendorfky, do které jsme předtím připravili 1 zrníčko thiomočoviny - ta zabraňuje melanizaci hemolymfy.

2. Odběr hemolymfy u ploštice *P. apterus*

U ploštice *P. apterus* ustříháme poslední článek tykadla a vytékající hemolymfu jímáme na kousek parafilmu - z vytvořené kapky odebereme pipetou hemolymfu a pak ji přeneseme

do eppendorfky se zrníčkem thiomocoviny.

Úloha 2. Stanovení glycidů v hemolymfě ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus a zavíječe voskového *Galleria mellonella**

Princip metody: zahříváním glukózy v prostředí silných kyselin vzniká hydroxymetylfuran, který vytváří s anthronem produkt vhodný pro fotometrické stanovení.

Reagencie:

Příprava reagens - 150 mg anthronu +100 ml 72% H₂SO₄

Postup:

1. Do 50μl 5% TCA v eppendorfce přidáme 0.5 μl hemolymfy a protřepeme – děláme 5 paralelních měření
2. Odcentrifugujeme (asi 2 min při 11000 ot.) a přepipetujeme do eppendorfky
3. Pak přidáme 250 μl anthonového reagens a rychle zamícháme na vortexu. Souběžně připravujeme kalibrační křivku (viz níže).
4. Inkubujeme 8 minut při 100⁰ C, ochladíme a měříme absorbanci proti slepému vzorku (50 μl 5% TCA + 250μl anthronového reagens) při 620 nm.

Hemolymfu ze zavíječe voskového a z ruměnice pospolné odebereme, jak bylo popsáno v úloze č. 2.

Kalibrační křivka - glukóza:

1% roztok glukózy naředíme 25x (tedy např. 0,1ml roztoku + 2,4ml dest. vody). Z něj pak odebíráme dávky podle následující tabulky:

zkumavka č.	25x naředěný roztok glukózy (μl)	dest. voda (μl)	dávka glukózy (μg)
1.	5	45	2
2.	12,5	37,5	5
3.	25	25	10
4.	37,5	12,5	15
5.	50	0	20

Na reakci bereme 50 μl standardu (viz tabulka) + 250μl anthronového reagens

Protokol – úlohu vyhodnořte (tabulka příp. graf), vypočítejte průměrnou hodnotu množství glycidů u obou pokusných druhů, porovnejte statisticky a výsledek vysvětlete.

Úloha 3. Stanovení lipidů v hemolymfě ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus a zavíječe voskového *Galleria mellonella**

Princip metody: lipidické sloučeniny v prostředí silných kyselin odštěpují mastné kyseliny, jejichž dvojně vazby pak reagují s vanilinem za vzniku barevných sloučenin. Reakce není specifická jen pro lipidy, ale pro látky s dvojnými vazbami obecně. Hmyzí lipidy jsou ale většinou nenasyčené, takže metoda je pro tento materiál velmi citlivá.

Vanilinová reagencie: 1,98 g vanilinu se rozpustí v 668 ml kyseliny fosforečné p.a. (H₃PO₄), zahřeje na 60°C, ochladí a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Vytvoří se žlutý roztok, který se nechá stát v temnu a chladnu alespoň 1 týden.

Postup:

1. Do 5 zkumavek si napipetujeme po 100 µl koncentrované kyseliny sírové a přidáme 0,5 µl hemolymfy.
2. Opatrně promícháme a zároveň si připravíme slepý vzorek (100 µl kyseliny sírové) a standardní vzorky (viz níže) a všechno zahříváme 10 min při 100°C.
3. Necháme vychladnout a do studených vzorků přidáme 1 ml vanilinové reagencie. Rychle, ale opatrně promícháme.
4. Po 30 minutách měříme absorbanci při 546 nm proti slepému vzorku.

Standardní křivka: kyselinu olejovou (m.w.= 282.5) naředíme v hexanu na 10mM, 1mM a 100µM roztoky. Do připravených zkumavek pak odebereme z každého základního ředění dávku podle následující tabulky:

zkumavka č.	roztok kys. olejové	dávka kys. olejové (µg)
1.	100µM 10µl	0.282
2.	100µM 20µl	0.565
3.	1mM 5µl	1.412
4.	1mM 10µl	2.825
5.	1mM 20µl	5.650
6.	10mM 5µl	14.125
7.	10mM 10µl	28.250
8.	10mM 20µl	56.500

Hexan necháme ve zkumavkách odpařit (za pokojové teploty trvá odpaření několik minut). Když je hexan odpařen (**ne dříve!!!**) přidáme 100 µl kyseliny sírové a dále postupujeme stejně jako u pokusných vzorků (zahřívání, vanilinová reagencie). Ze získaných hodnot sestrojíme kalibrační křivku tak, že na osu x nanese dávkou kyseliny olejové a na osu y naměřené absorbance.

Protokol – úlohu vyhodnoťte (tabulka příp. graf), vypočítejte průměrnou hodnotu množství lipidů u obou pokusných druhů, porovnejte statisticky a výsledek vysvětlete.

Úloha 4. Stanovení bílkovin BCA metodou v hemolymfě ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* a zavíječe voskového *Galleria mellonella*

Princip metody: proteiny redukuje alkalický Cu(II) na Cu(I) úměrně svoji koncentraci. Bicinchoninová kyselina je specifické chromogenní reagens s Cu(I) tvořící nachový komplex s absorbančním maximem 562nm. Absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů.

Reagencie:

A. Sodium bicinchoninate (BCA)	1g	
Na ₂ CO ₃	2g	
sodium tartrate	0.16g	
NaOH	0.4g	
NaHCO ₃	0.95g	Reagencie A i B jsou stálé roztoky!
voda do	100ml	

Upravit pH na 11.25 pomocí 10M NaOH

B. CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.4g
voda do	10ml

Postup:

1. Reakční směs připravíme smícháním 50 dílů reagentie A a jednoho dílu reagentie B (4% CuSO₄) - dbáme na to, aby používané sklo bylo velmi čisté.

2. Poté si připravíme vzorky hemolymfy, BSA standardy (viz níže) a slepý vzorek (1 ml reakční směsi). Hemolymfu odebereme podle výše popsaného způsobu a 1 µl hemolymfy naředíme ve 400 µl fyziologického Ringerova roztoku - děláme 5 paralelních měření.

3. Ve zkumavce pak smícháme 50 µl standardu BSA nebo 50 µl vzorku s 1 ml reakční směsi a dobře promícháme.

4. Inkubujeme - 30 min/30⁰ C (standard)
 2h/pokožová teploty
 30 min/60⁰ C (enhanced)

5. Po ukončení inkubace zkumavky ochladíme a měříme absorbanci při 562 nm.

Kalibrační křivka - BSA (bovine serum albumin):

Zásobní roztok BSA - 1mg/ml

zkumavka č.	BSA (µl)	dest. voda (µl)	dávka BSA (µg)
1.	1	49	1
2.	2	48	2
3.	5	45	5
4.	10	40	10
5.	20	30	20
6.	30	20	30
7.	40	10	40
8.	50	0	50

Pozn.:

1. Reakční směs je po smíchání A a B stabilní 1 týden
2. Po ukončení inkubace dochází k posunu absorbance (v % za 10 min) - 2.3% (pro standard a pokojová teplota) a 0.1% (pro enhanced)

Protokol – úlohu vyhodnořte (tabulka příp. graf), vypočítejte průměrnou hodnotu množství bílkovin u obou pokusných druhů, porovnejte statisticky a výsledek vysvětlete.

Úloha 5+6. Stanovení aktivity inhibitorů proteáz v hedvábí hmyzu - rezorufin-kaseinová assay

Aktivitu inhibitorů proteáz stanovíme v kokonech *G. mellonella*. Kokony jemně nastříháme a zalejeme 0.1% TFA (kyselina trifluoroctová) v poměru - 25mg kokonů/400 µl TFA. Kokony necháme eluovat asi 24 hodin a vzniklý eluát použijeme na test. Jako základní dávku bereme 100 µl eluátu - tu postupně celkem 7 krát naředíme 1:1 (ředění dvojkovou řadou), takže získáme 8 vzorků, ve kterých bude postupně vždy poloviční dávka eluátu. S těmito vzorky (plus kontroly) provádíme test podle návodu.

Rezorufin-kaseinová assay:

Princip metody: proteáza (trypsin) odštěpuje ve vhodném pufru z kaseinu rezorufin vázaný na bílkoviny; komplex lze poté fotometricky stanovit při 490nm. Přidáním inhibitoru proteázy štěpení zabráníme a na základě změny intenzity zbarvení roztoku můžeme sledovat účinnost inhibitoru.

Roztoky:

1. Substrátový roztok - 0.4 % resorufin kasein ve vodě
2. 0.2 M Tris, pH 7.8
3. 0.02 M CaCl₂
4. Blokovací roztok - 5% kyselina trichloroctová (TCA)
5. Proteáza - zásobní roztok 2.5mg/ml ředíme 1000x v roztoku trisu (bod 2) tj. na koncentraci 2.5 µg/ml

Postup:

1. Do eppendorfek napipetujeme:
 - 20 µl resorufin kaseinu (bod 1)
 - 20 µl 0.2 M trisu (bod 2)
 - 20 µl 0.02 M CaCl₂ (bod 3)
 - 20 µl proteázy tj. 50 ng (bod 5)
 - 20 µl inhibitoru (testovaný roztok)
 - Kontrola K1
 - 20 µl resorufin kaseinu (bod 1)
 - 20 µl 0.2 M trisu (bod 2)
 - 20 µl 0.02 M CaCl₂ (bod 3)
 - 20 µl proteázy tj. 50 ng (bod 5)
 - 20 µl pufru (ve kterém je rozpuštěn inhibitor)
 - Kontrola K2
 - 20 µl resorufin kaseinu (bod 1)
 - 20 µl 0.2 M trisu (bod 2)
 - 20 µl 0.02 M CaCl₂ (bod 3)
 - 20 µl pufru 0.2 M trisu (bod 2)
 - 20 µl pufru (ve kterém je rozpuštěn inhibitor)
2. Inkubujeme podle potřeby - standardně 1 hod - při 37°C (možno až 24 hod)
3. Přidáme 240 µl TCA (bod 4) a inkubujeme dalších 10 min při 37°C
4. Centrifugujeme 3 min (10-15 tisíc otáček) a odebereme vzorek (300 µl), který

přepipetujeme do ELISA destiček na měření absorbance při **490 nm**

5. Po odečtení kontrolní absorbance K2 od každého vzorku přepočítáme aktivitu na procenta rozdílu uvedených kontrol (= 100 %)

Protokol – úlohu vyhodnoťte (tabulka příp. graf) a výsledek vysvětlete.

Úloha 7. Pitva mozku a dalších orgánů larev *Galleria mellonella*, *Pyrrhocoris apterus* a *Periplaneta americana*

Další ze základních metod studia hormonální regulace hmyzu mimo ligatur a biochemických stanovení jsou různé chirurgické zákroky do endokrinního systému hmyzu. Jsou to především transplantace nebo extirpace (-tektomie).

1. Pitva mozku a dalších orgánů larev zavíječe.

Larvy narkotizujeme výše popsaným způsobem a osušené je přeneseme na pitevní misku. Nejprve vypitváme mozek - larvu přidržíme jednou pinzetou na dorzální straně za hlavou a druhou pinzetou promáčkne proximální část hlavové schránky, rozevřeme a vyjmeme mozek. Pak larvu připevníme ventrální stranou dolů pomocí špendlíků na proximálním a distálním koncem těla na pitevní misku. Podélně rozstříháme kutikulu od distálního konce těla k hlavě a postupně preparujeme tukové těleso, trávicí trubici, Malpighické trubice a nervovou soustavu.

2. Pitva mozku, corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA) u ploštice *P. apterus*

Dospělé ploštice narkotizujeme ve vodě, poté je osušíme, odstříháme přední část hlavy před očima a celou hlavu oddělíme od těla v hrudní části. V dalším kroku postupně po obou stranách hlavy natrháme kutikulu, nejprve na obou stranách hlavy od její přední části k očím a pak od zadního konce hlavy opět k očím. Volným tahem otevřeme hlavu. Na dorzální straně mozku po obou stranách jícnového otvoru leží CC a nad jícnem mezi CC kulovitá CA. Jinou ploštici pomocí špendlíků upevníme na voskovou pitevní misku ventrální stranou nahoru, nůžkami rozstříháme kutikule a vyjmeme střední střevo pro stanovení aktivity amyláz (viz úloha 8).

3. Pitva střeva u švába *P. americana*

Dospělce narkotizujeme na ledu, poté pomocí špendlíků upevníme na voskovou pitevní misku ventrální stranou nahoru, nůžkami rozstříháme kutikulu a vyjmeme střední střevo pro stanovení aktivity amyláz (viz úloha 8).

Protokol – do protokolu přiložte nákresy vnitřních orgánů pitvaného hmyzu

Úloha 8. Stanovení aktivity amyláz ve střevě *P. apterus* a *P. americana* pomocí rozpustného škrobu:

Střevo švába zvážíme, sonikujeme v 200 μ l fosfátového pufru, centrifugujeme a na stanovení bereme 1 μ l extraktu; střevo ploštice zvážíme, sonikujeme v 200 μ l fosfátového pufru, centrifugujeme a na stanovení bereme 10 μ l extraktu. Od každého zvířete děláme 3 paralelky.

A. Reagencie

1. DNS (kyselina 3,5-dinitrosalicylová) reagent (25ml)

- DNS 0,0125 g
- K-Na tartare x 4H₂O 7,5 g
- NaOH 0,4 g
Rozpustit v 10 ml destilované H₂O a pak doplnit do 25 ml

2. 2% škrob (rozpuštěný ve vodě)

3. Fosfátový pufr pH 5,7 + 20,0 mM NaCl

A KH₂PO₄ (2,722g/100 ml)

B Na₂HPO₄ (0,716g/100 ml)

Smícháme 93,5 ml A + 6,5 ml B

K 100 ml vzniklému roztoku přidáme 2,05 ml 1M NaCl (0,584g/10ml)

B. Postup

1. 2% škrob zředíme v poměru 1:1 s fosfátovým pufrem s 20 mM NaCl
2. v eppendorfci smícháme 25 µl tohoto roztoku a 25 µl vzorku: pro švába 1 µl extraktu + 24 µl fosfátového pufru; pro plošnici 10 µl extraktu + 15 µl fosfátového pufru
3. inkubujeme 1 hod ve 30°C a reakci zastavíme přidáním 200 µl DNS reagentu
4. eppendorfku vaříme 5 min/100°C a poté centrifugujeme 10 min při 10 000 ot.
5. 200 µl roztoku z eppendorfky přepipetujeme do destičky a měříme při 550 nm na ELISA čtečce

C. Blank

Místo vzorku dáme 25 µl pufru tj. celkem 50 µl pufru se škrobem (viz bod B 2) a postupujeme stejně jako se vzorky

Protokol – úlohu vyhodnoťte (tabulka příp. graf), porovnejte statisticky a výsledek vysvětlete.