

Postup č. 8: Izolácia antibiotika a jeho detekcia pomocou TLC metódy

- Po skončení fermentácie streptomycét bude potrebné izolovať a detegovať prítomné antibiotikum

Metóda A: z tekutej živnej pôdy

- Z tekutej živnej pôdy odoberieme 1 ml živného média a vložíme do eppendorfovej skúmavky
- Vzorku scentrifugujeme
- Supernatant o objeme 500 ul oddelíme a preniesieme do druhej eppendorfky
- K supernatantu pridáme 100 ul extrakčného činidla (chloroform:metanol:acetón:1%amoniak)
- Vzorku vortexujeme aby antibiotikum prešlo do extrakčného činidla
- Následne vzorku centrifugujeme

Metóda B: z petriho misky

- Z petriho misky odoberieme korkovrtom 2 výseky a preniesieme ich do eppendorfovej skúmavky
- Pridáme extrakčné činidlo v objeme 100 ul a s pomocou pripravenej špičky rozdrvíme agar aj s mikroorganizmami
- Po rozdrvení ešte vortexujeme vzorku
- Následne vzorku centrifugujeme

Pokračovanie pre všetkých rovnakým postupom:

- Pripravíme si už vopred upravenú hliníkovú fóliu s naneseným EDTA na povrchu, EDTA sa používa v prípade látok, ktoré dokážu na seba viazať kovy, aby sa naše ATB nenaviazalo na hliníkovú fóliu, je potrebné naniesť tenkú vrstvu EDTA na povrch hliníkovej fólie
- Asi 1,5 cm od začiatku stripu si ceruzkou urobíme čiaru
- Na ňu nanesieme 2 ul so vzniknutého supernatantu v bodoch
- Je potrebné aj použitie kontroly, v našom prípade sa bude jednať o čistý tetracyklín, rozpustený v rovnakých rozpúšťadlách (extrakčné činidlo)
- Vzorky umiestnime vedľa seba na strip v primeraných rozstupoch do stĺpcov
- Strip po usušení vzorky umiestnime do mobilnej fázy (rovnaké extrakčné činidlo) vo vyvíjacej komore (v našom prípade uzatvárateľné flaše) s objemom činidla 5 ml vertikálne
- Mobilná fáza bude postupovať smerom hore a v bode jej zastavenia si urobíme čiaru
- Necháme usušiť a vizualizujeme pod UV lampou

Nasledujúci schéma je vizualizácia postupu:

A., príprava TLC platne (stripu)

B., ceruzou si vyznačiť líniu nanášania vzoriek

C., Nanesené a usušené vzorky + štandard (kontrola) čisté ATB

D., TLC platna vložená v chromatografickej komore v mobilnou fázou v objeme 5 ml

E., Vztlávaním mobilnej fázy do platne sa vzorka separuje, skončiť asi 1 cm od vrchnej hrany TLC platne

F., po skončení vztlákania vybrať TLC platňu z komory a koniec mobilnej fázy označiť čiarou a nechať ju usušiť

G., vizualizovať pod UV lampou pri 366 nm a označiť čiarou presný stred metabolitu

H., odmerať vzdialenosť A a B a dosadiť do vzorca $R_f = B/A$

