Sráţení, extrakce a centrifugace

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

VSTUPNÍ MATERIÁL

DEZINTEGRACE

PURIFIKAČNÍ TECHNIKY S NÍZKÝM ROZLIŠENÍM:
- srážení síranem amonným
- srážení organickými rozpouštědly
- srážení organickými polymery a sloučeninami
- srážení selektivní denaturací
- afinitní precipitace, imunoprecipitace
- extrakce

CENTRIFUGACE:
- diferenciální
- gradientová

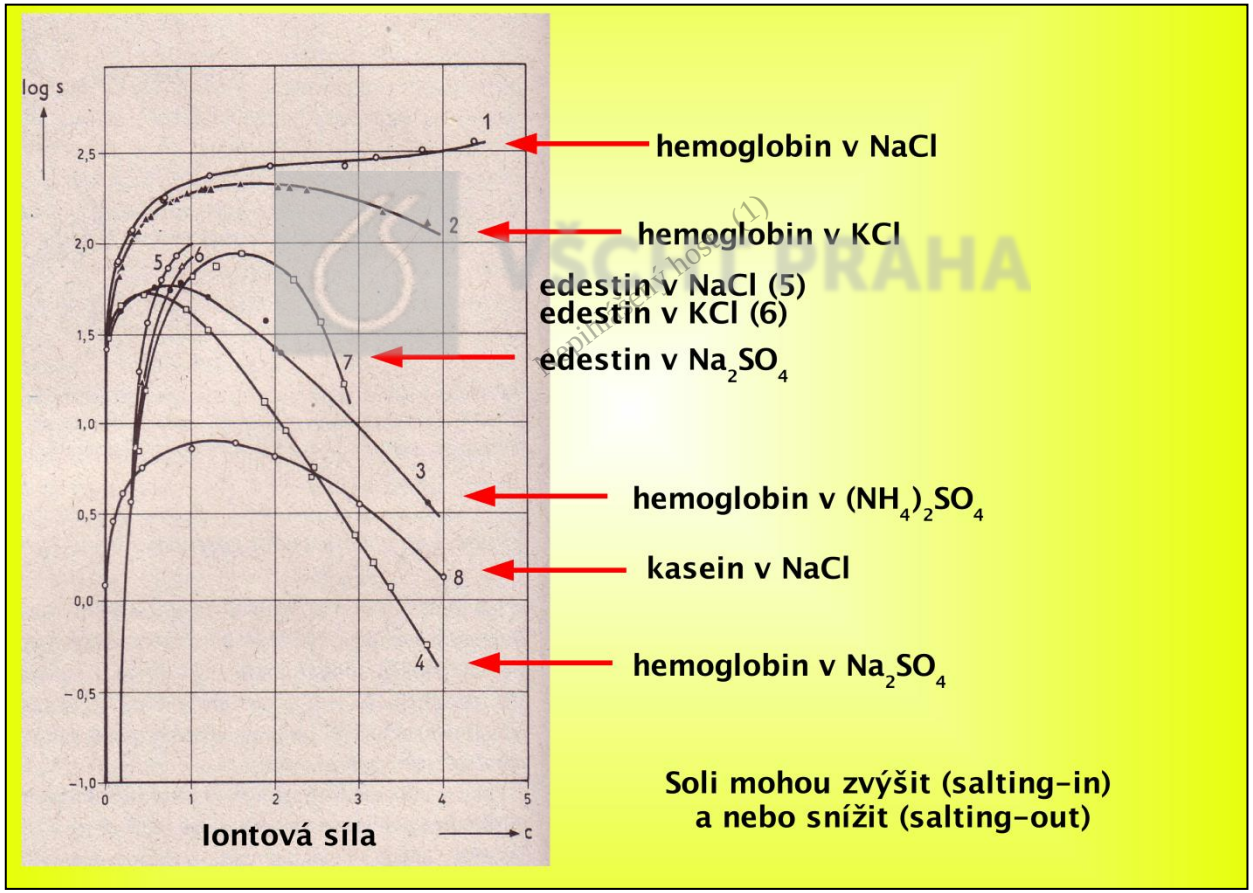
PURIFIKAČNÍ TECHNIKY S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM:

Technika	Vlastnost
•ionexová chromatografie	náboj
•chromatofokusace	náboj, pI
•reversní fáze	hydrofobicita
•hydrofobní interakce	relativní hydrofobicita
•gelová chromatografie	molekulová hmotnost, tvar
•afinitní chromatografie	biospecifické interakce

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Frakcionace biomakromolekul na základě rozdílů v rozpustnosti

- Nezaměňovat s denaturací – bílkoviny zůstávají v nativním stavu!!!



Denaturace x Koagulace x Srážení

Denaturace - podstatná změna prostorového uspořádání molekuly, při níž dochází ke ztrátě její biologických funkcí. Za určitých podmínek může být denaturace vratná - po odstranění denaturačního vlivu biopolymer opět zaujme nativní konformaci, většinou je však denaturace nevratná. Vratné bývají denaturace menších jednodoménových bílkovin.

VŠCHT PRAHA
Neprihlásený host (1)

Koagulace - shlukování molekul - pravděpodobně přeuspořádáním iontových sloučenin po expozici jiným iontovým sloučeninám

Srážení - stejně jako koagulace s tím rozdílem, že výsledný komplex již „nechce“ interagovat se zbytkem roztoku, ve kterém původně byl a „vypadne“ z roztoku

Franz Hofmeister (1850-1922)



vysolování **vsolování**

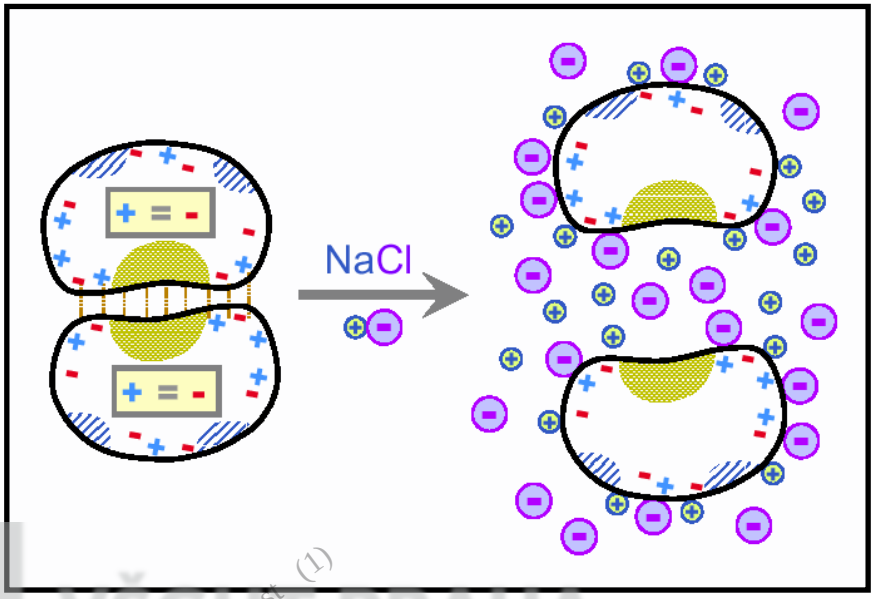
pro anionty: $SO_4^{2-} > F^- > IO_3^- > NO_2^- > Br^- > NO_3^- > I^- > CNS^-$

pro kationty: $Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Cs^+$

princip: rozdíl v solvatační energii mezi ionty a okolními molekulami vody

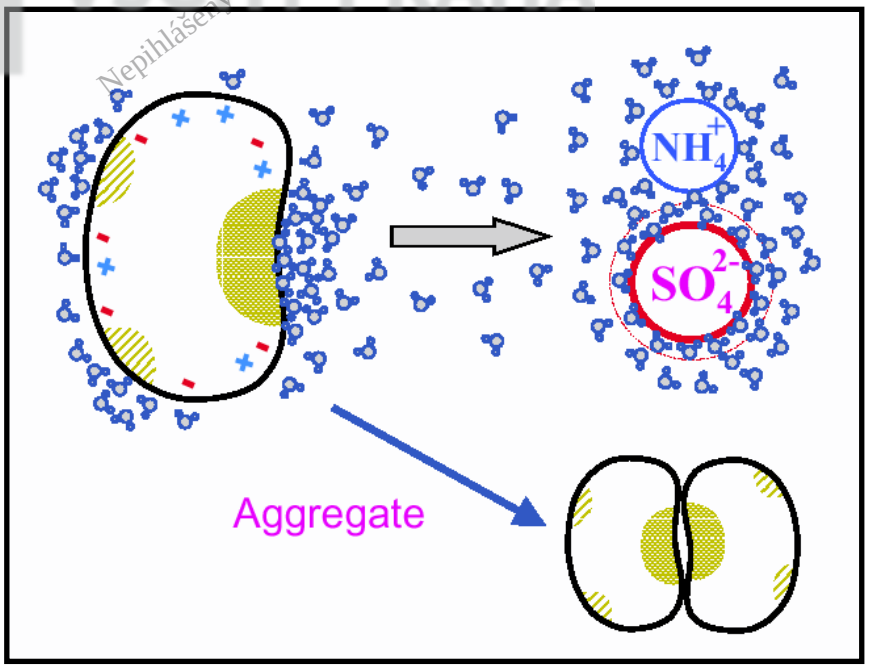
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

vsolování



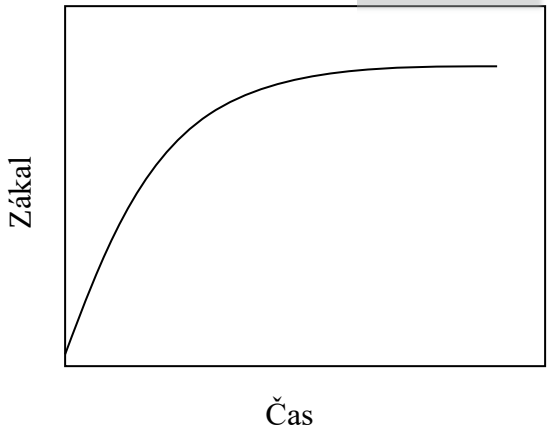
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

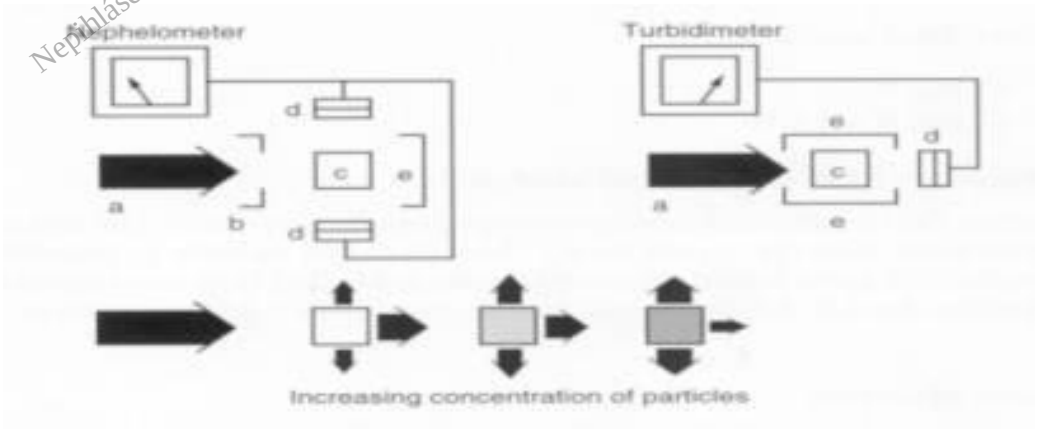
vysolování



Mechanismus tvorby precipitátu

- tvorba precipitátu je proces závislý na čase
- zahrnuje tvorbu malých částic, které vznikají asociací makromolekul
- precipitace může být sledována turbidimetricky





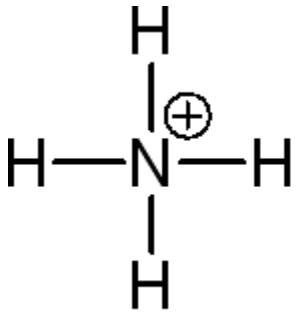
a: vstupující světlo, b: štěrbina,
c: reakční kyveta, d: fotodetektory,
e: zařízení pro pohlcení světla

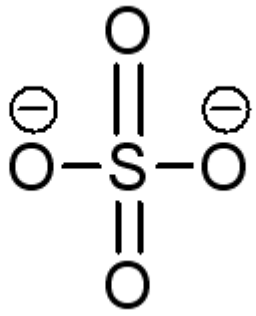
VŠCHT PRAHA
Nepublikovaný hodnocení

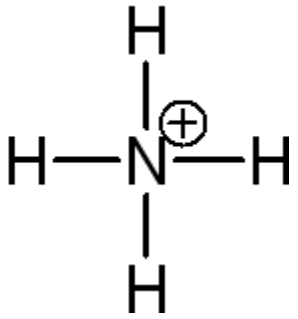
Srážení síranem amonným

- Mimořádně velká rozpustnost
- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

VŠCHT PRAHA
Přihlášený host (1)







množství $(NH_4)_2SO_4$ (g/l roztoku) potřebného pro změnu koncentrace v roztoku z původních procent saturace na požadované nasycení při 0 °C

Initial percentage saturation	Target percentage saturation																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

Nepřihlášený host (1)

teplota	Rozpustnost $(NH_4)_2SO_4$
0 °C	70,21 g/100 ml
20 °C	75,16 g/100 ml
40 °C	80,83 g/100 ml
60 °C	87,21 g/100 ml
80 °C	94,30 g/100 ml

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

$$m = w_{sat} \cdot (c_2 - c_1)/(c_{sat} - (V_{spec}/1000 \cdot 132{,}14 \cdot c_{sat} \cdot c_2))$$

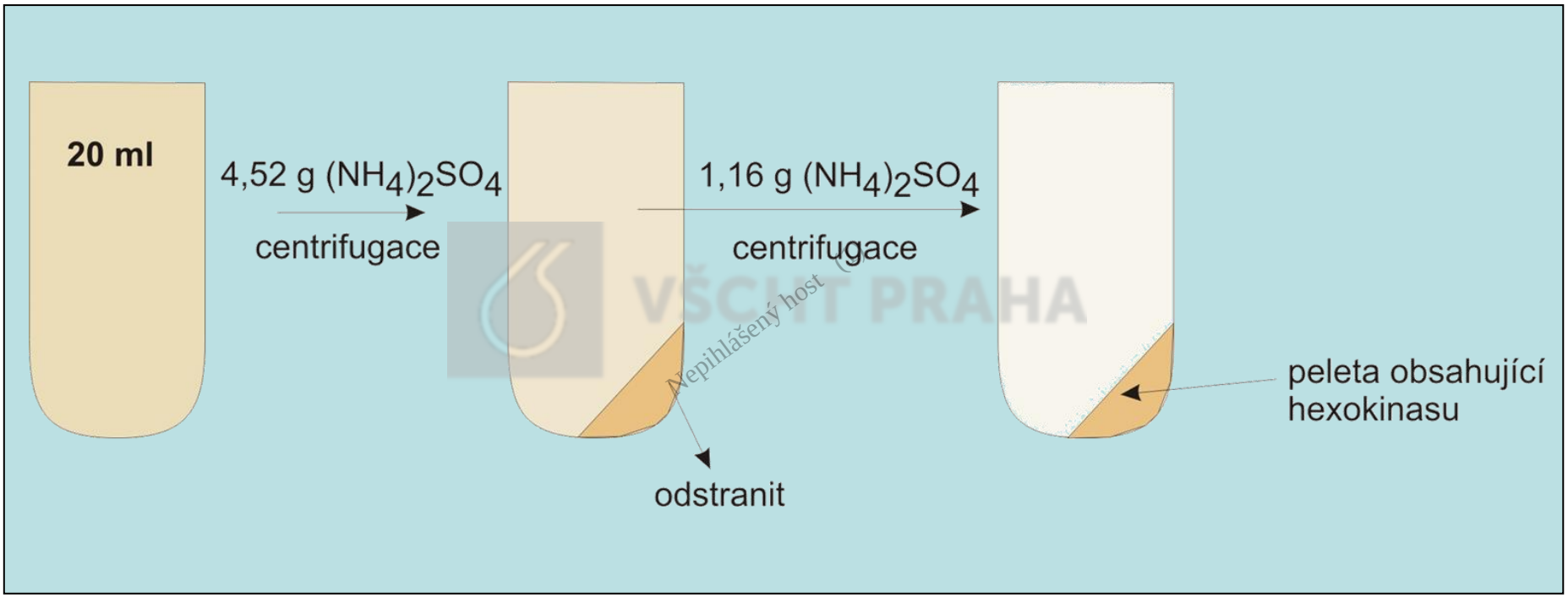
w_{sat}	kolik g/l síranu amonného v nasyceném roztoku při dané teplotě
c_2	molarita síranu amonného, kterou chceme mít
c_1	molarita síranu amonného, kterou máme na začátku
c_{sat}	molarita nasyceného roztoku síranu amonného
V_{spec}	specifický objem síranu amonného, což je změna objemu po přídavku 1 g síranu amonného do vodného roztoku ~ 0,54 ml

http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm

Příklad:

1. Po dezintegraci jste získali 20 ml extraktu o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml. Jako první krok purifikace hexokinasy si zvolíte srážení síranem amonným (Mr 132,14). Zjistili jste, že se sráží až při 50 % koncentraci síranu. Proto jste se rozhodli udělat dvoukrokové srážení (40 %, 50 %). Jak byste postupovali (konkrétní navážky a postup)?

Initial percentage saturation	Target percentage saturation																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host

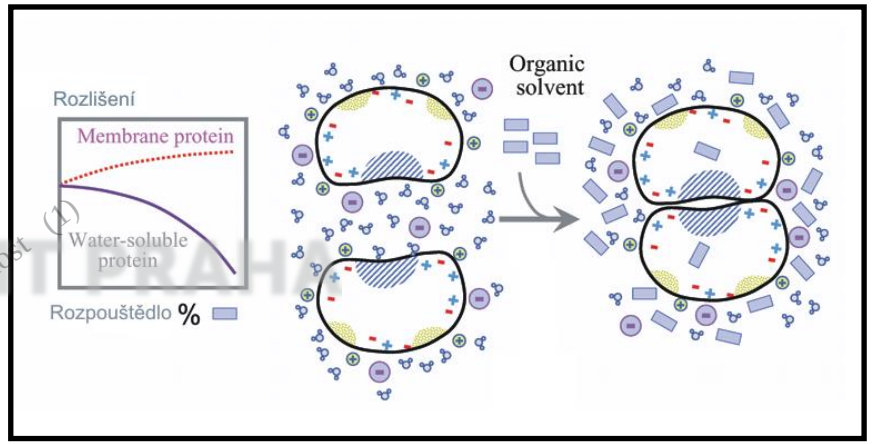
Příklad:

2. Pokud chcete zabránit lokálnímu zvýšení koncentrace, budete při srážení přidávat rozpuštěný síran amonný. Spočítejte kolik ml 5M síranu amonného musíte přidat k 40 ml extraktu, aby výsledné nasycení bylo do 20 %. (Mw 132,14 g/mol)

Initial percentage saturation	Target percentage saturation																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

Srážení organickými rozpouštědly

- nepolární vodou mísitelná rozpouštědla
- srážení za nízké teploty (< 0 °C)!!!



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

aceton, EtOH, isopropanol, MetOH, propanol, diethyleter

Srážení acetonem (< 1μg/ml)

- přidat 5 objemů vychlazeného (– 20°C) acetonu ke vzorku a vortexovat.
- nechat 30 min při – 20°C.
- centrifugace 5 min, 6,000 – 10,000 g.
- odstranit supernatant a peletu nechat vysušit na vzduchu
- resuspendovat peletu

Srážení organickými polymery a sloučeninami

- PEG 4000 – 6000 – nedenaturující, ve vodě rozpustný polymer, lze kombinovat se srážením síranem amonným
- tichloroctová kyselina – nukleové kyseliny > 20 nukleotidů, příprava vzorků proteinů na SDS-PAGE (>5μg/ml)
  - přidat 1 objem 100 % TCA do vzorku a vortexovat
  - nechat 20 min na ledu nebo 15 min při – 20 °C
  - centrifugace 5 min, 6000 – 10000 g
  - odstranit supernatant
  - resuspendovat peletu v 0,1 M NaOH nebo opláchnout peletu směsí ethanol/ether (1/1) a resuspendovat peletu v pufru

VŠCHT PRAHA
Neprodávejte dál

Selektivní denaturace

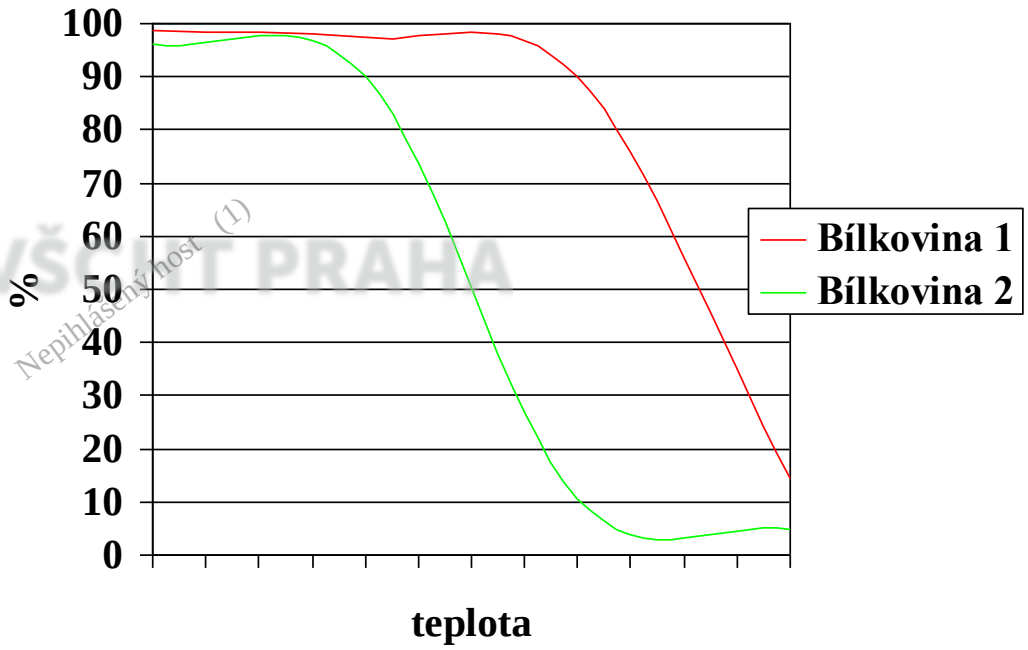
- Při této metodě denaturace balastní bílkoviny, cílová bílkovina (enzym) musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.

- Denaturační vlivy – T, pH
- Balastní bílkovina musí nejen denaturovat, ale i precipitovat

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Vliv teploty

- Přídavky některých látek (substráty, koenzymy, inhibitory) zvyšují stabilitu cílových bílkovin
- pH při tepelné denaturaci musí být přesně definováno



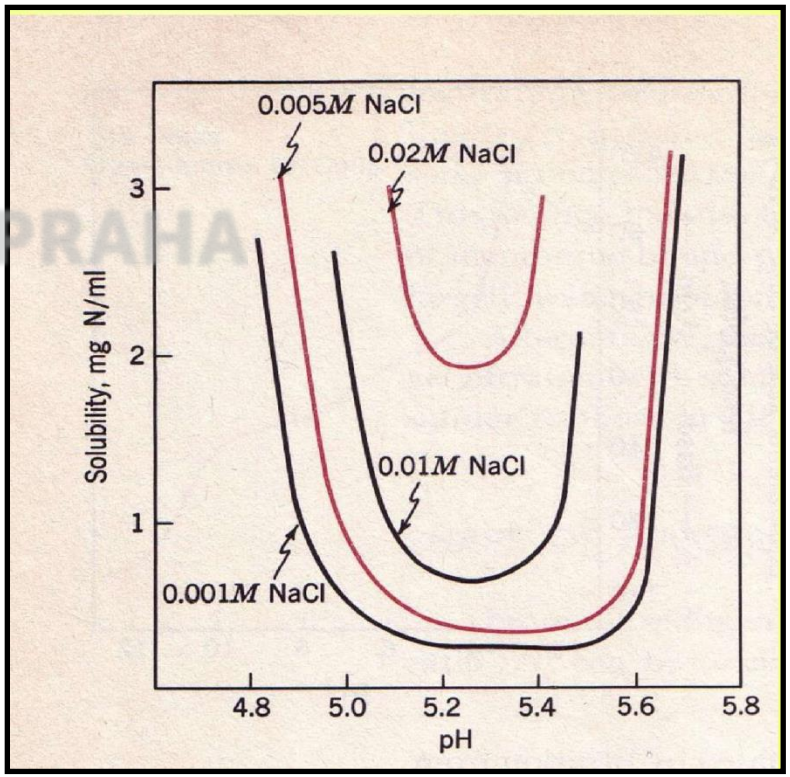
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Vliv pH

•mnoho proteinů se sráží z roztoku v pH, které odpovídá pI

•je dobré znát pI proteinu
(chromatofokusace, isoelektrická fokusace)



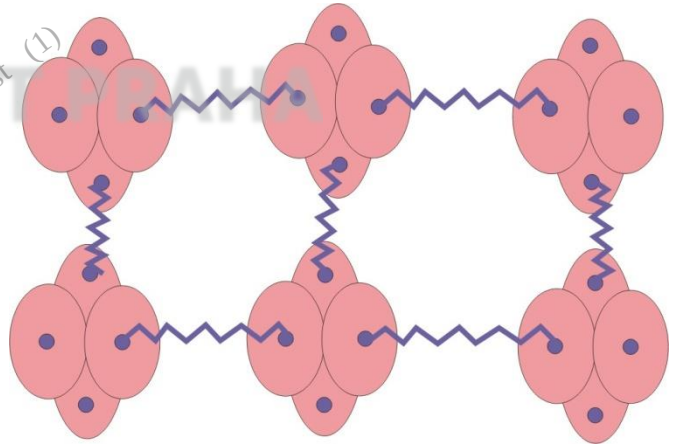


VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Afinitní precipitace

bifunkční ligandy – bis-NAD, bis-AMP, barevné ligandy

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



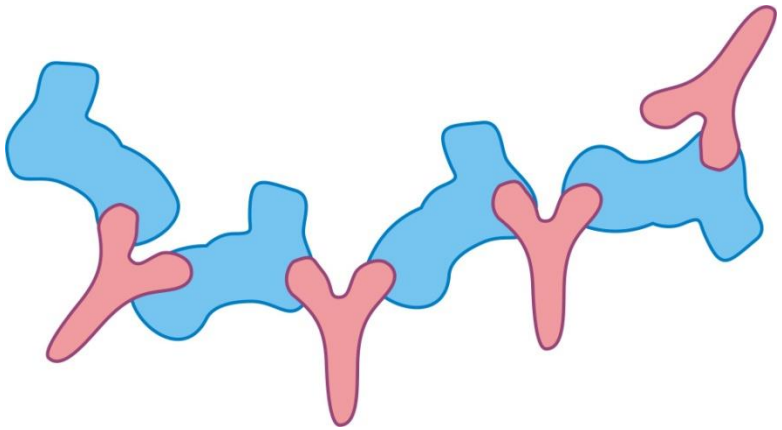
polymer – ligand – PEG- ligand

Imunoprecipitace

•antigeny mohou být precipitovány použitím odpovídajících protilátek

•protilátky mohou být precipitovány použitím odpovídajících antigenů

•antigeny mohou být precipitovány použitím nerozpustné formy protilátky



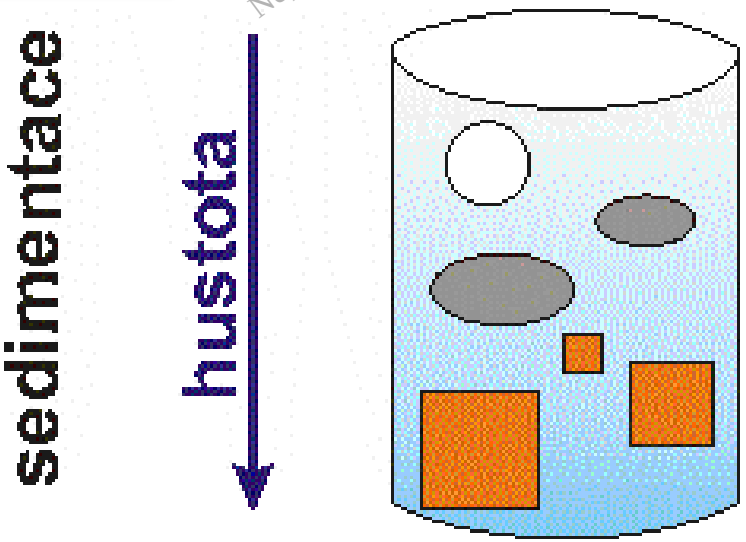
VSCHT PRAHA
přihlášený host (1)

Centrifugace

Při centrifugaci se separují částice od roztoku na základě jejich velikosti, tvaru, hustoty, viskozity media a rychlosti otáčení rotoru



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host



Rychlost sedimentace částic

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_l)}{18\mu}\ g$$

v = rychlost sedimentace *d = průměr částice*

ρ_p = hustota částice *ρ_l = hustota kapaliny*

g = centrifugační rychlost *μ = viskozita kapaliny*

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

- Rychlost sedimentace částic je úměrná velikosti částic
- Rychlost sedimentace je úměrná rozdílu v hustotě mezi částicemi a médiem
- Sedimentační rychlost je nulová, pokud je hustota částic stejná jako střední hustota
- Rychlost sedimentace se snižuje, jak se zvyšuje střední viskozita
- Rychlost sedimentace se zvyšuje s rostoucí centrifugační rychlostí

Centrifugace - rozdělení

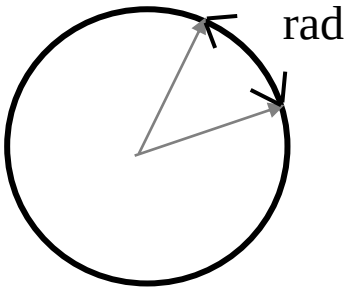
Centrifugace

- **Pomalootáčková** — 5 000 ot/min
- **Rychlootáčková** — 25 000 ot/min
- **Ultracentrifugace** — 80 000 ot/min

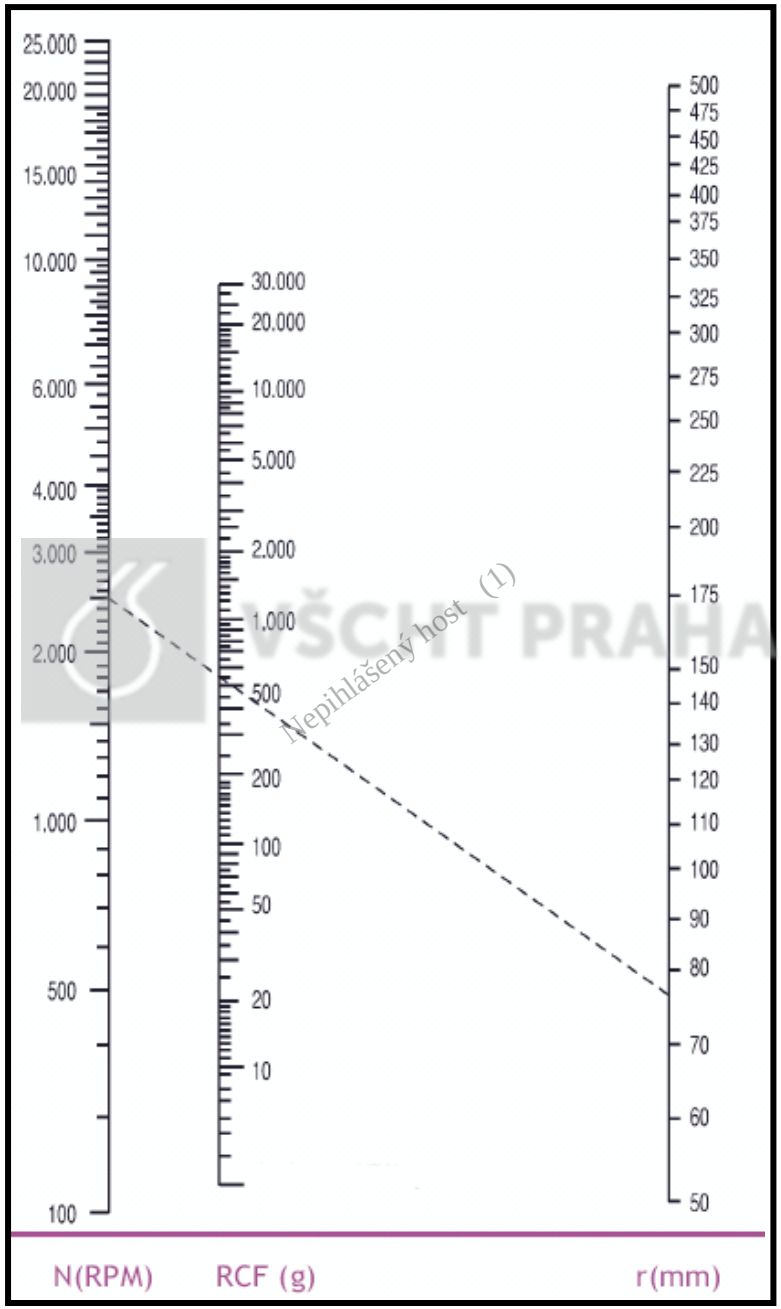
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

RPM x RCF

rychlost: počet otáček za minutu (**rpm** = revolutions per min.)
odstředivá síla: relativní odstředivé zrychlení (**RCF** = relative centrifugal force)



RCF = **f** x **r** x **(rpm)^2**
f = přepočítavací faktor – $1{,}118.10^{-5}$
r - poloměr rotoru centrifugy (cm)
jednotky: **g** (RCF udává, kolikrát je zrychlení centrifugy větší, než je normální tíhové zrychlení **g = 9,81 m/s^2**)



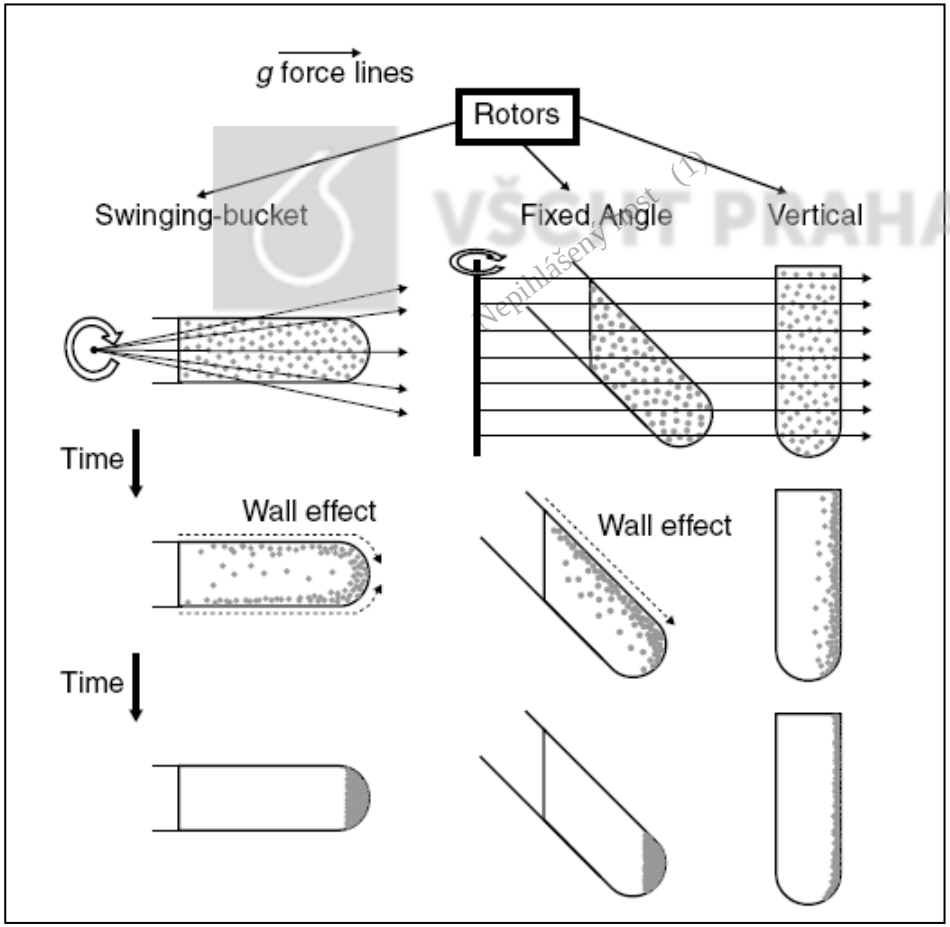
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Centrifugace - rotory

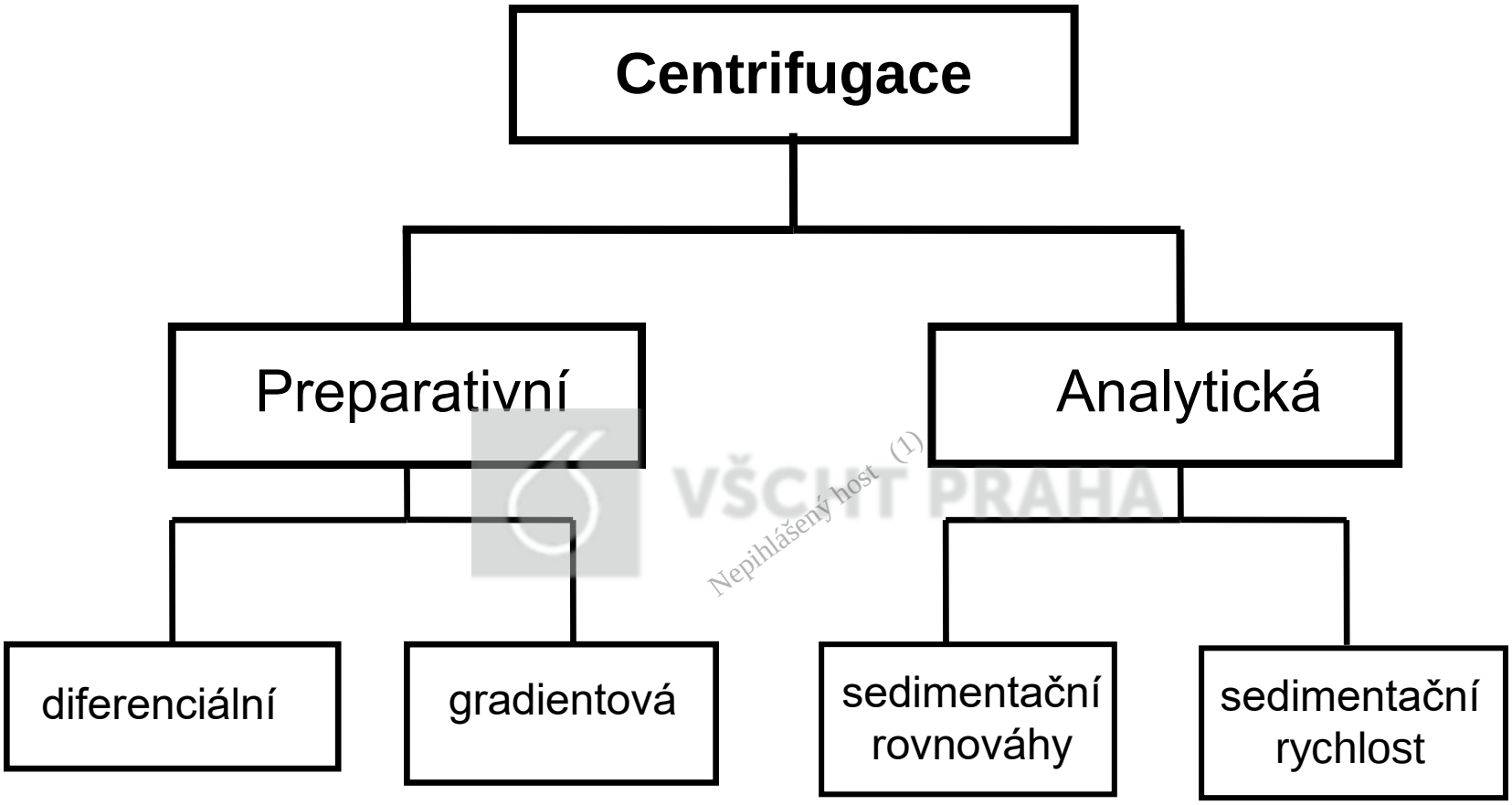
- Úhlové – diferenciální centrifugace, kratší doba centrifugace
- Výkyvné – gradientová centrifugace, lepší separace







VŠCHT PRAHA
Vepilášeny, Jost (1)



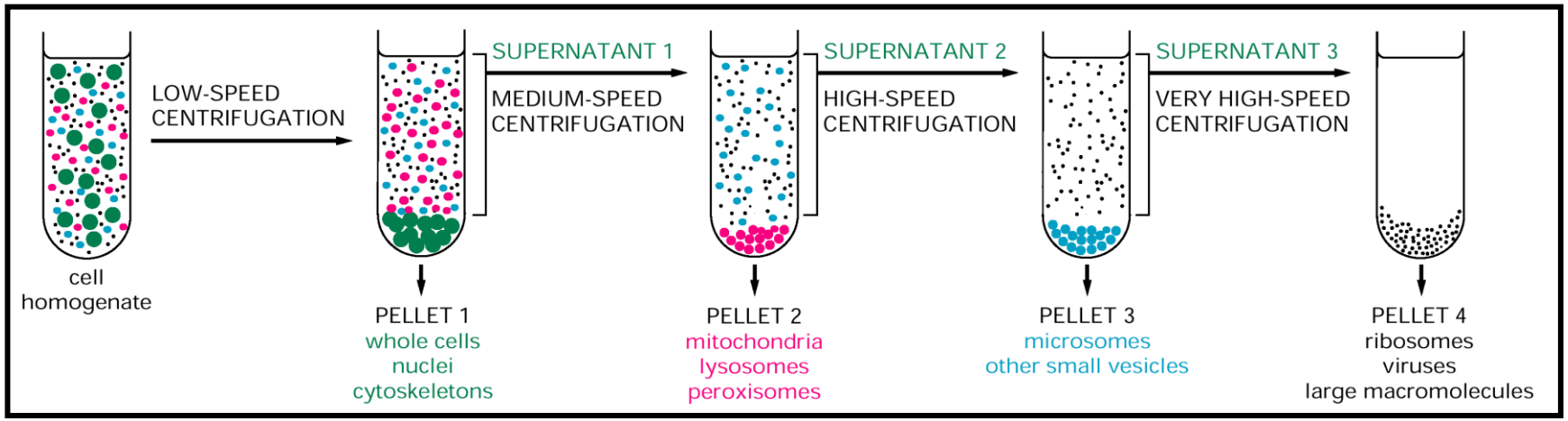
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Diferenciální centrifugace:

•opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí
•na základě hustoty a velikosti částic

buněčná komponenta	RCF [x g]	čas [min]
buňky (eukaryotické)	1 000	5
chloroplasty, buněčné membrány, jádra	4 000	10
mitochondrie	15 000	20
lysosomy, bakteriální membrány	30 000	30
ribosomy	100 000	180

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



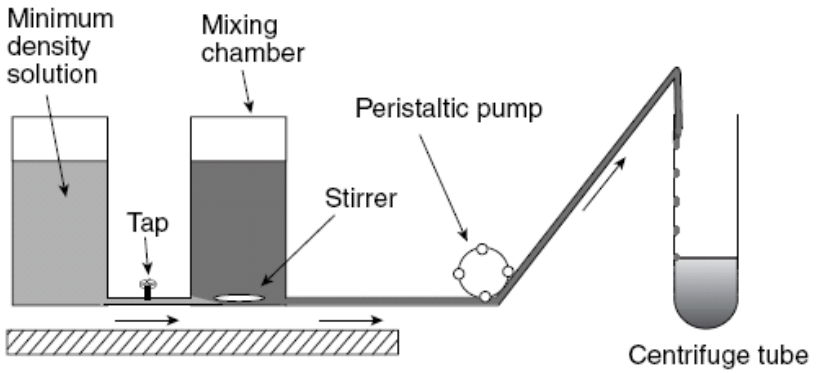
Gradientová centrifugace

Kritéria pro výběr centrifugačního media:

•musí v roztoku tvořit gradient
•nesmí interferovat se vzorkem
•musí být lehce odstranitelné ze vzorku
•nesmí být hypotonické, ani hypertonické pro částice citlivé na osmotický tlak

- **Jednoduché cukry** – **sacharosa**, sorbitol, glycerol
- **Polysacharidy** – Ficoll, dextran, glykogen
- **Anorganické soli** – **CsCl**, Cs_2SO_4
- **Koloidní oxid křemičitý**
- **Jodované sloučeniny**



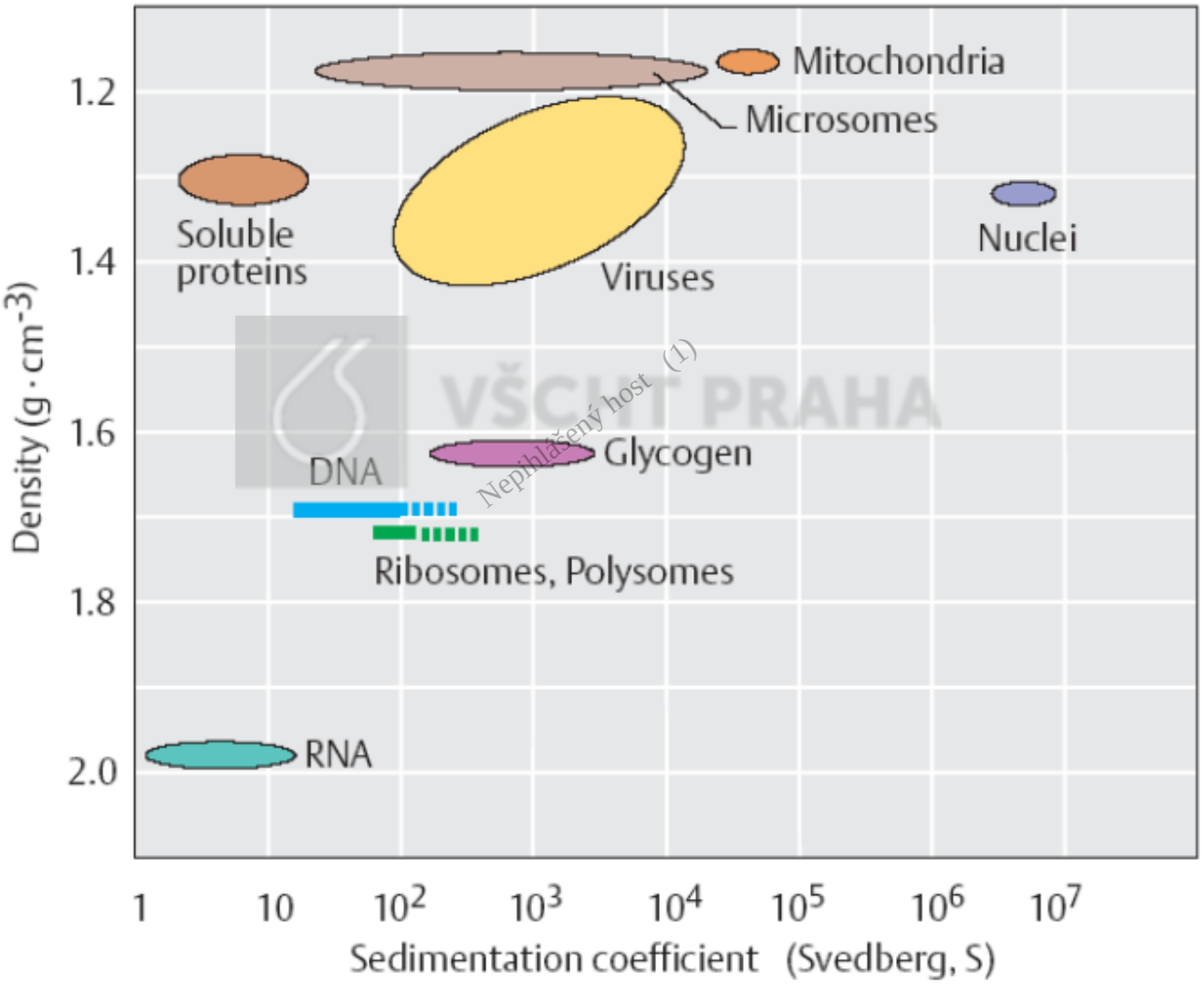


Gradient medium type	Principle uses
Polyhydric alcohols	
Sucrose	Sucrose Organelles, membrane vesicles, viruses, proteins, ribosomes, polysomes
Glycerol	Mammalian cells (infrequent), proteins
Sorbitol	Sorbitol Nonmammalian subcellular particles
Polysaccharides	
Ficoll®, polysucrose and dextrans	Mammalian cells (sometimes in combination with iodinated density gradient media), mammalian subcellular particles (infrequent)
Inorganic salts	
CsCl	DNA, viruses, proteins
Cs_2SO_4	DNA, RNA
KBr	Plasma lipoproteins
Iodinated gradient media	
Diatrizoate	Mainly as a component of commercial lymphocyte isolation media
Nycodenz®, Histodenz™	Mammalian cells, organelles, membrane vesicles, viruses
Iodixanol	Mammalian cells, organelles, membrane vesicles, viruses, plasma lipoproteins, proteins, DNA
Colloidal silica media	
Percoll®	Mammalian cells, organelles, membrane vesicles (infrequent)

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html

Hustoty a sedimentační koeficienty biomakromolekul, buněčných organel a virů

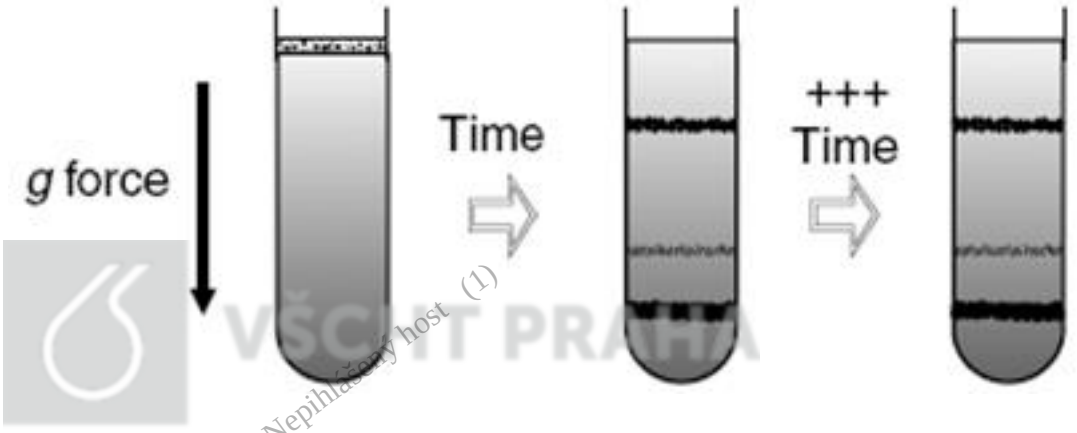


VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Koolman, Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition © 2005 Thieme

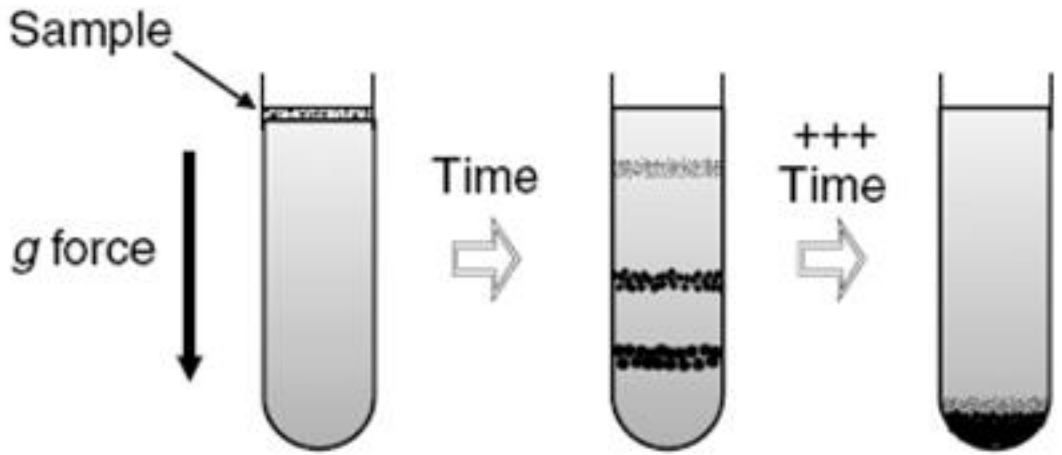
Gradientová centrifugace

A. Izopyknická



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

B. zonální (sedimentační, nerovnovážná)

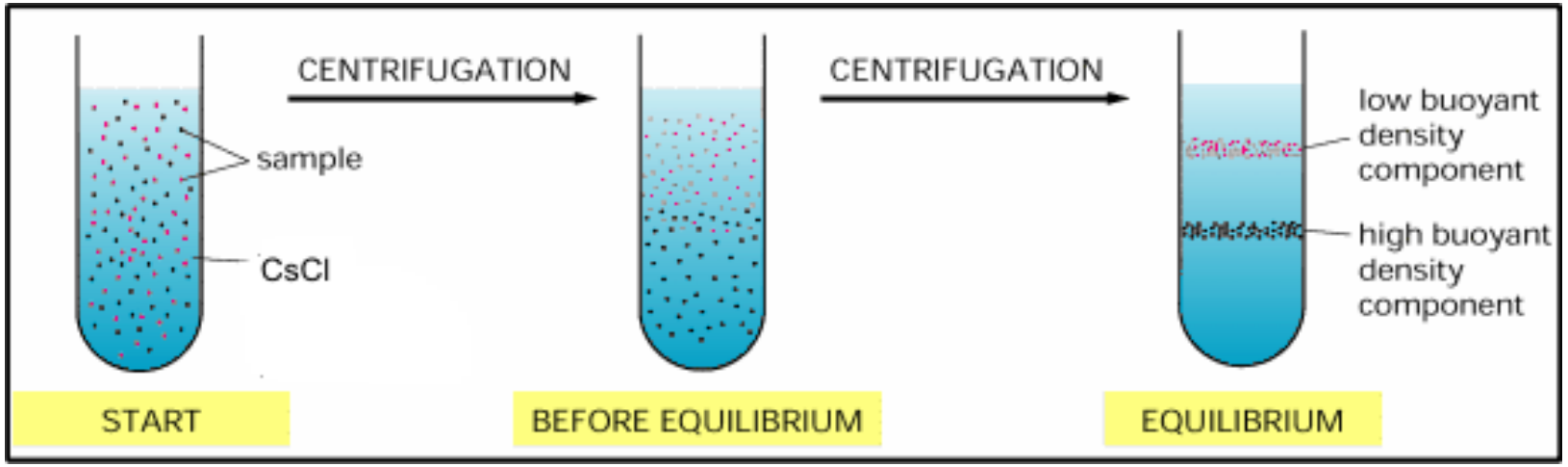


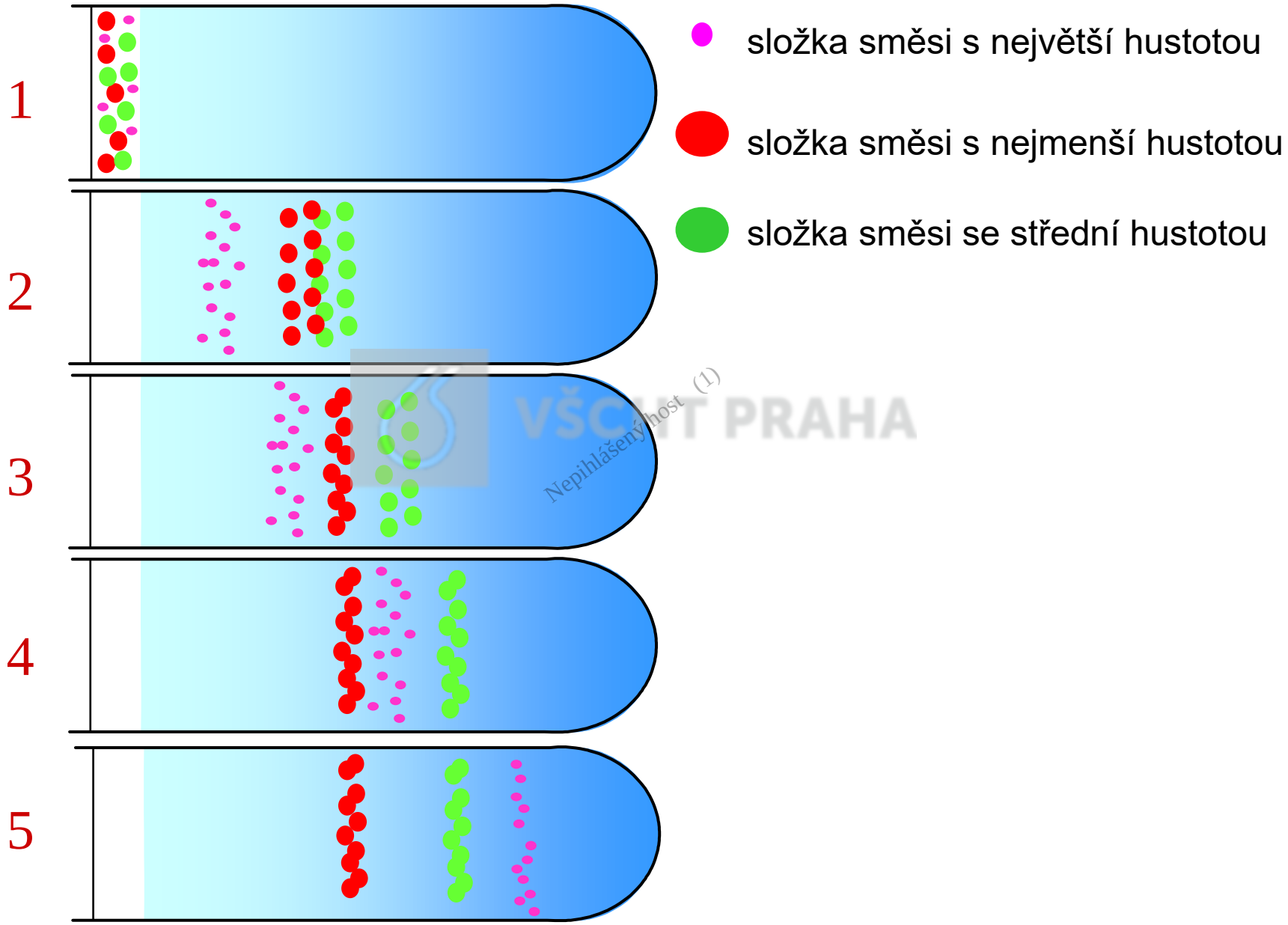
Gradientová centrifugace

A. Izopyknická

- separace na základě různých hustot, nezávisle na jejich velikosti a molekulové hmotnosti
- molekuly separovány do rovnováhy, ne podle rychlosti sedimentace
- rychlost např. 270000 x g, 18 hod

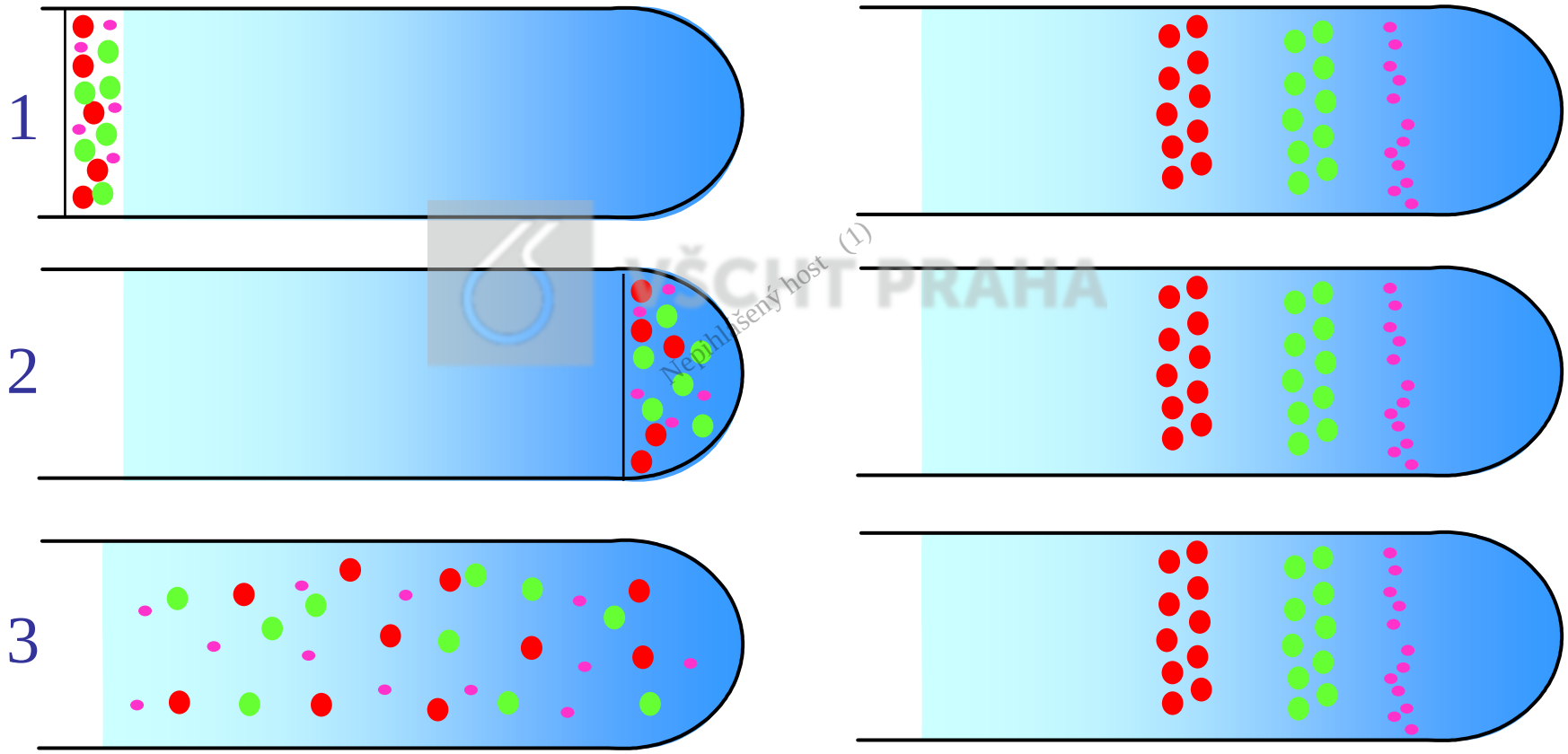
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



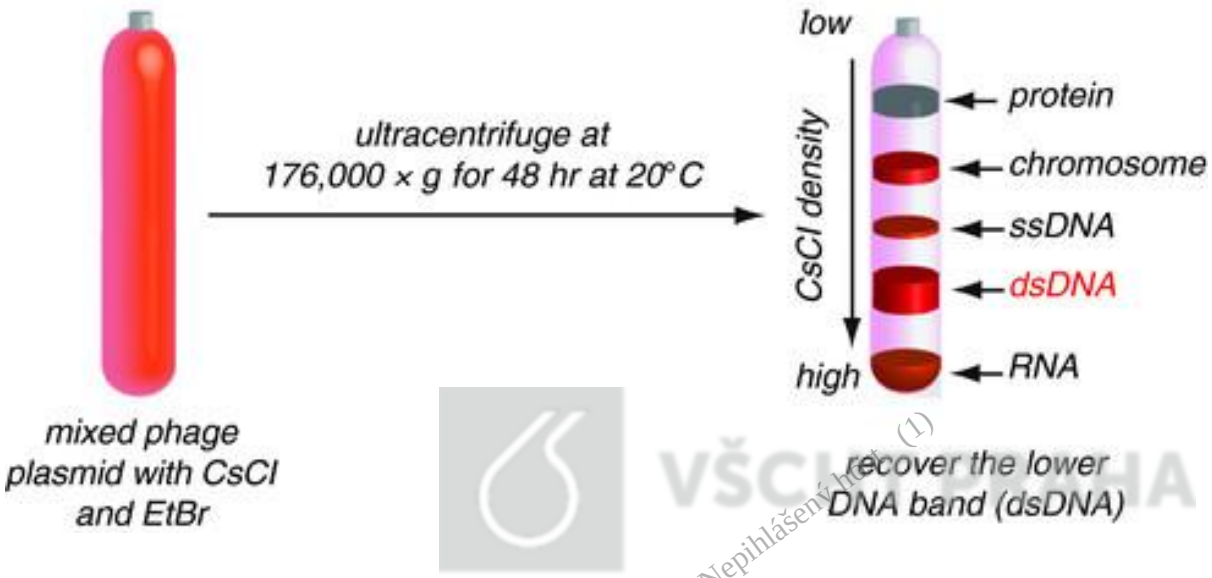


VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Možnosti uspořádání izopyknicné centrifugace



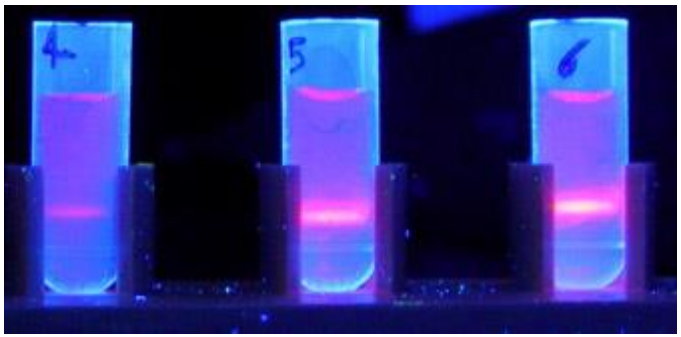
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)



Nepihlášený host (1)

Phage vector (f88-4, fUSE5, and iPhage) purification by CsCl. For maximum phage plasmid purity, perform a CsCl/EtBr gradient. After ultracentrifugation, the lower plasmid band (dsDNA band) is recovered and precipitated by addition of isoamyl alcohol into the DNA mix.

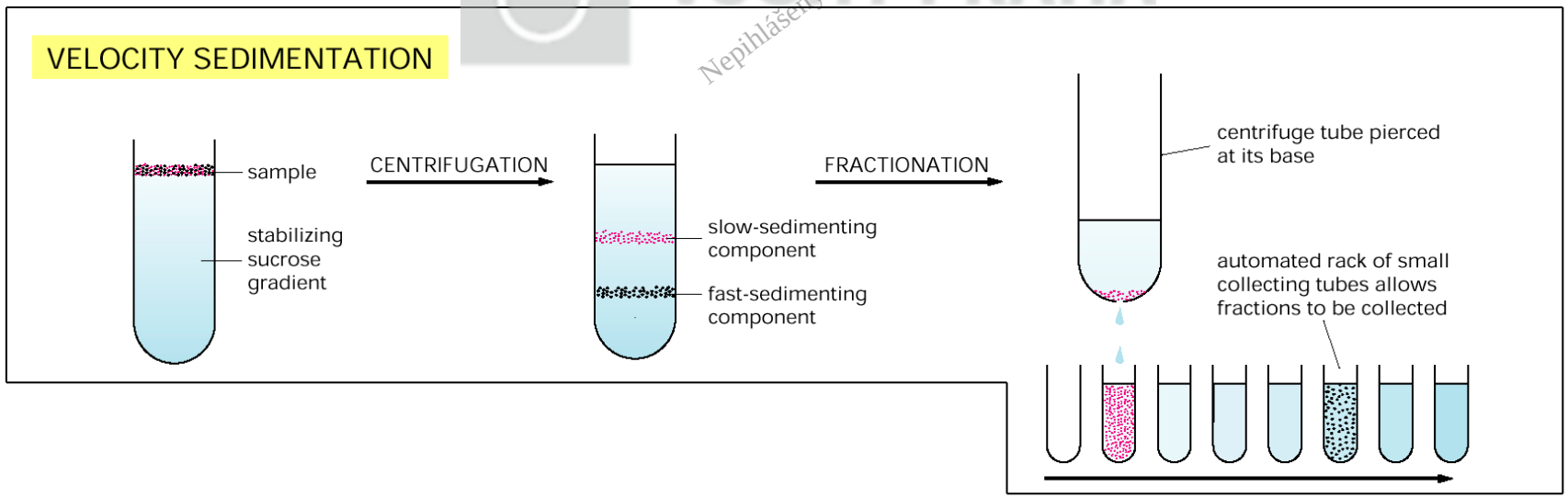
Feb 2015 · Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]



B. zonální (sedimentační, nerovnovážná)

- hustota gradienu musí být **menší** než hustota dělených látek
- vzorek se nanáší nad gradient
- nejčastěji sacharosový gradient (5-20%)
- gradient stabilizuje zóny

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



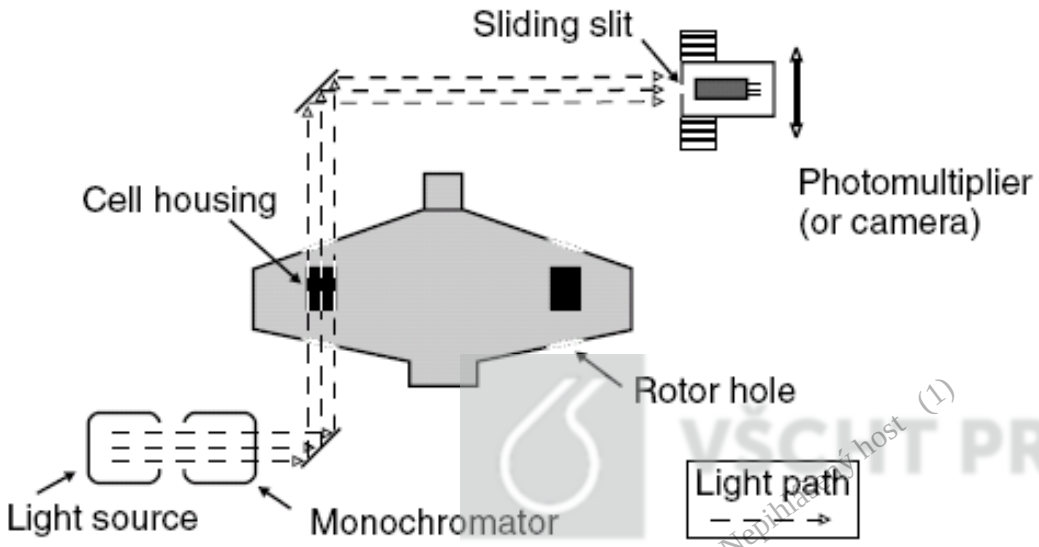
Porovnání gradientových metod

	Zonální centrifugace	Izopyknicná centrifugace
Centrifugace	nižší rychlost	vysoká rychlost
	ukončení před kompletní sedimentací	Sedimentace do rovnováhy, dlouhý čas
	Sedimentační **rychlost**	Sedimentační **rovnováha**
Vzorek	Obdobná hustota, různá Mw/tvar	Podobná Mw, různá hustota
	Proteiny (podobná hustota, různá Mw)	Nukleové kyseliny, buněčné organely

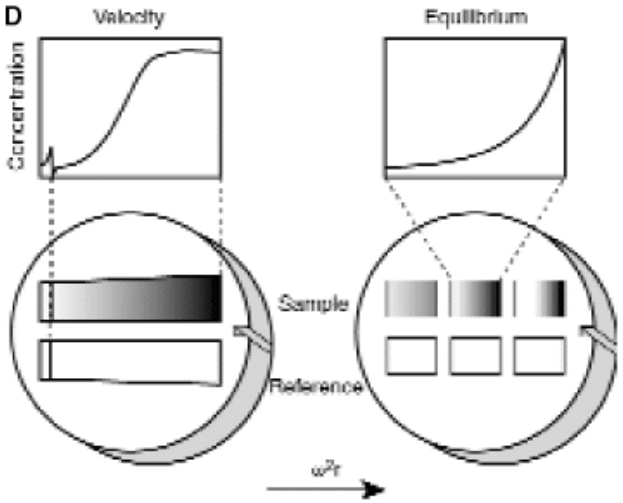
VSCHT PRAHA
Nepihlášený host (11)

Analytická centrifugace





VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

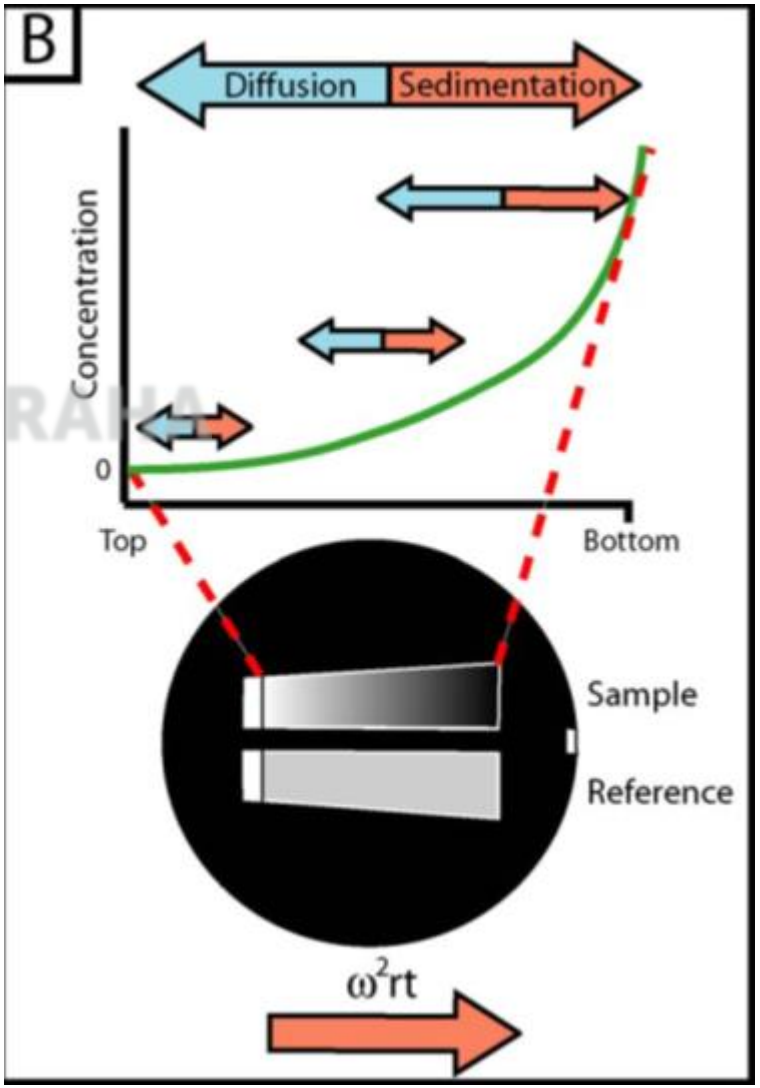


sedimentační rovnováha

- měření molekulové hmotnosti
- studium protein-protein interakcí

- určování nativního stavu proteinu (monomer, dimer, trimer, atd.)
- měření rovnovážné konstanty
- měření stechiometrie komplexů dvou nebo více různých proteinů (antigen-protilátka, receptor-ligand)

$$M = 2RT/[(1 - \tilde{v}\rho)\omega^2]\, d(\ln c)/dr^2$$



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

sedimentační rychlost

- měření rychlosti sedimentace v závislosti na centrifugační rychlosti
- závisí jak na molekulové hmotnosti, tak i na tvaru molekul

sedimentační koeficient - rychlost sedimentace v poli o jednotkovém zrychlení

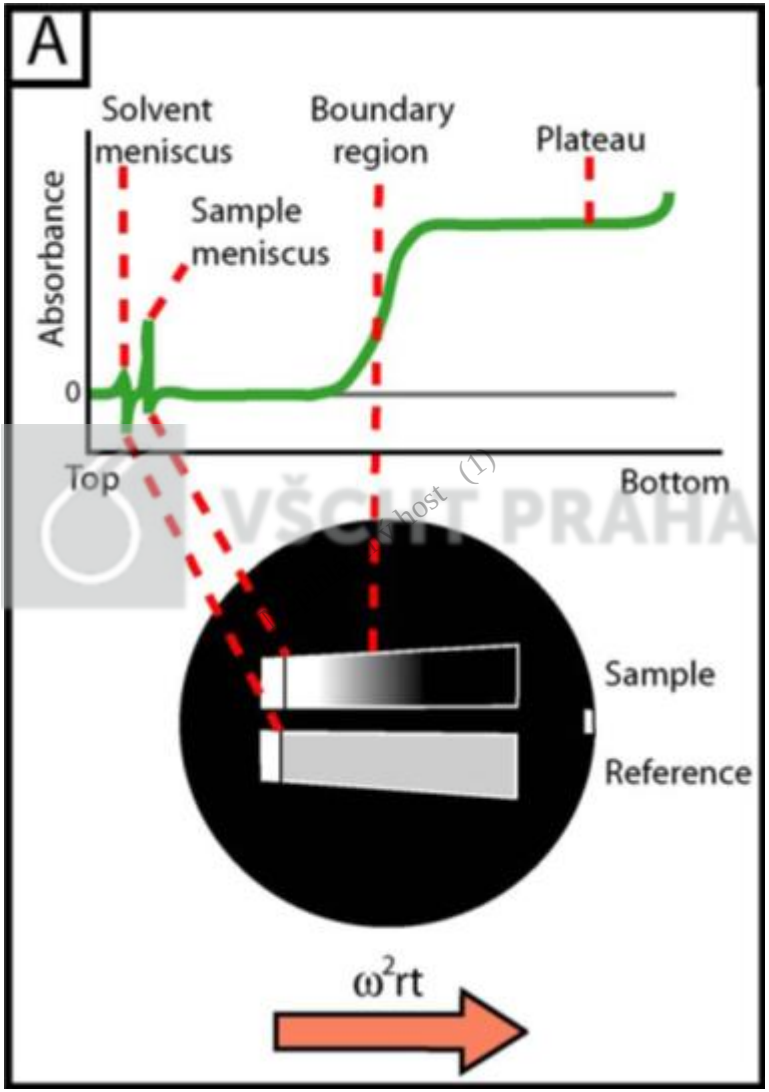
$$s = u/\omega^2 r = M(1 - \tilde{v}\rho)/N_A f = MD(1 - \tilde{v}\rho)/RT$$

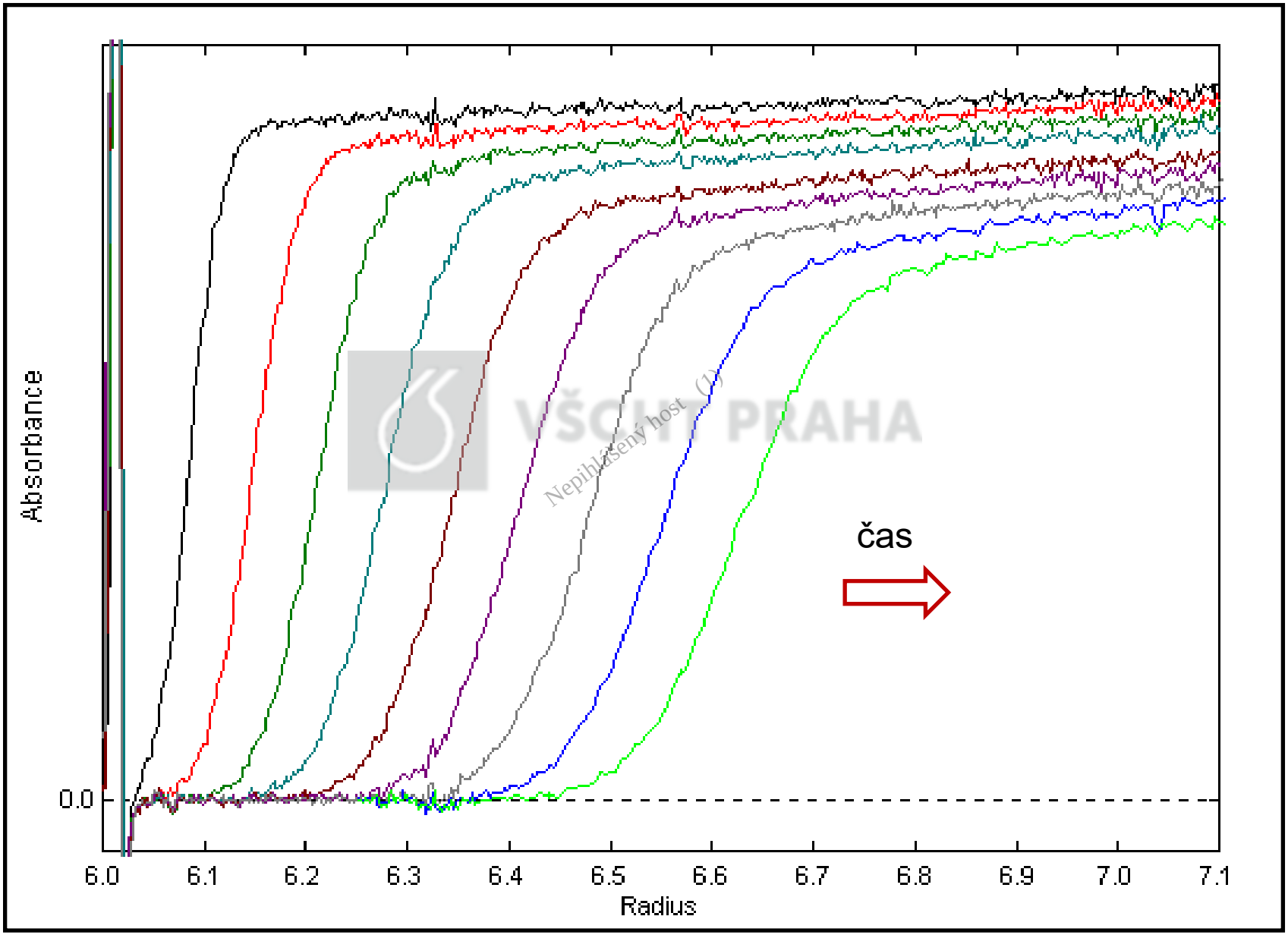
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Svedberg (S), 1 S = 10^{-13} s

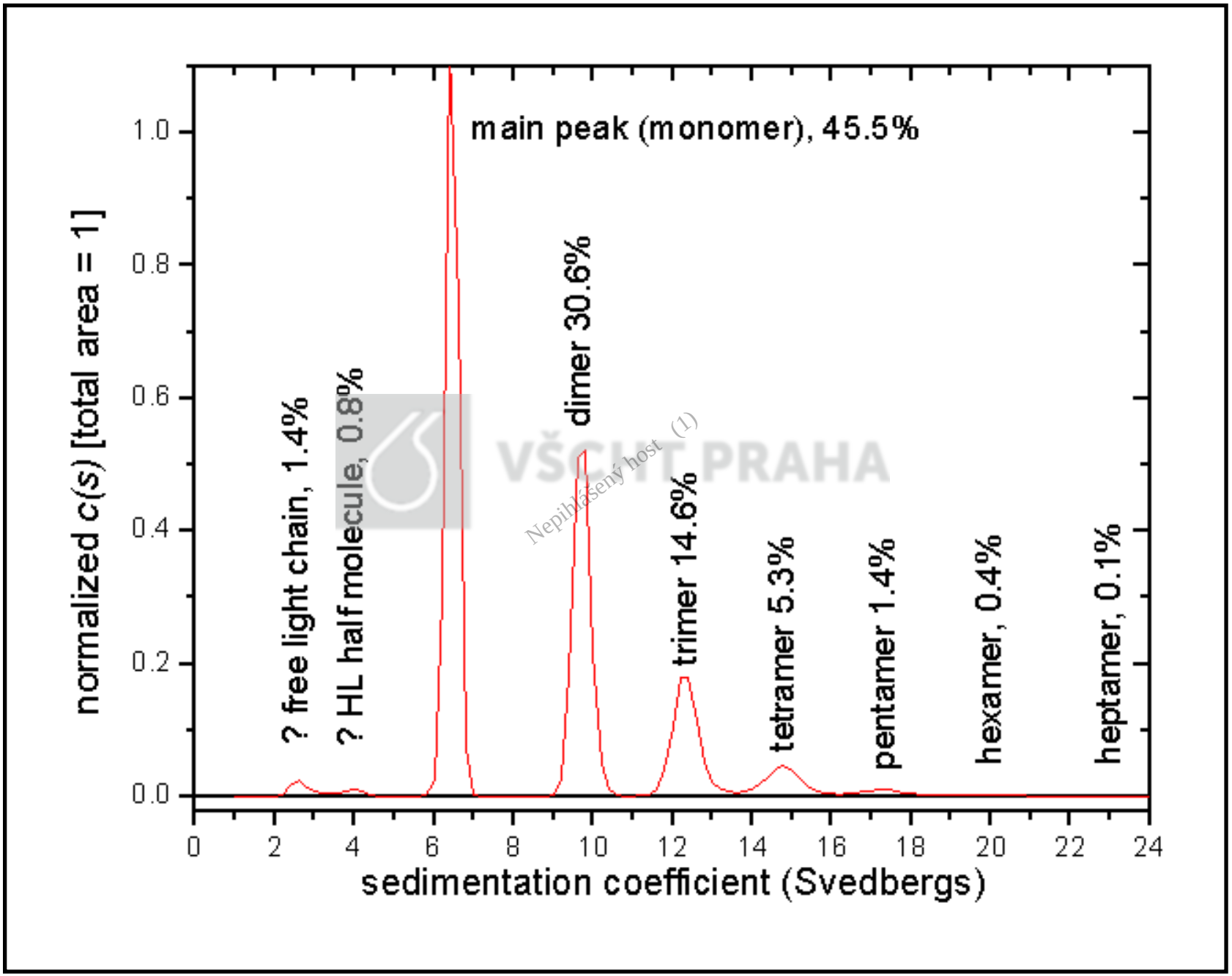
u - radiální rychlost pohybu makromolekuly
ω^2 - úhlová rychlost rotoru
r - vzdálenost od osy otáčení
$\omega^2 r$ - odstředivá síla
M - molekulová hmotnost
v - parciální specifický objem molekuly
ρ - hustota roztoku
N_A - Avogadrova konstanta
f - frikční koeficient
D - difuzní koeficient
R - univerzální plynová konstanta




A
Solvent meniscus
Boundary region
Plateau
Sample meniscus
Absorbance
0
Top
Bottom
Sample
Reference
ω^2rt



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Isolace nukleových kyselin

RNA

- Messenger RNA (mRNA): 1-5 %
  slouží jako templát pro syntesu proteinů

- Ribosomální RNA (rRNA): > 80 %
  tvoří součást ribosomů

- Transferová RNA (tRNA): 10-15 %
  „překlad“ informace z mRNA do aminokyselinové sekvence

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

DNA

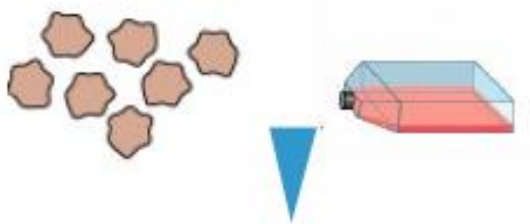
- genomová (chromosomální)

- organelová

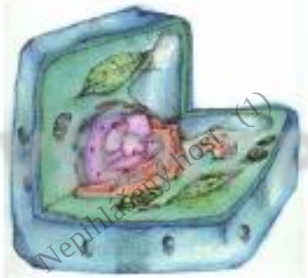
- plasmidová

- fágová/virová (ds nebo ss)

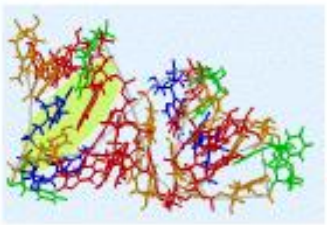
Postup izolace nukleových kyselin



kultivace buněk



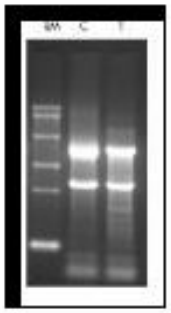
lyse - „otevření“ buněk



purifikace DNA nebo RNA

stanovení koncentrace





stanovení velikosti a kvality

Cíle purifikace

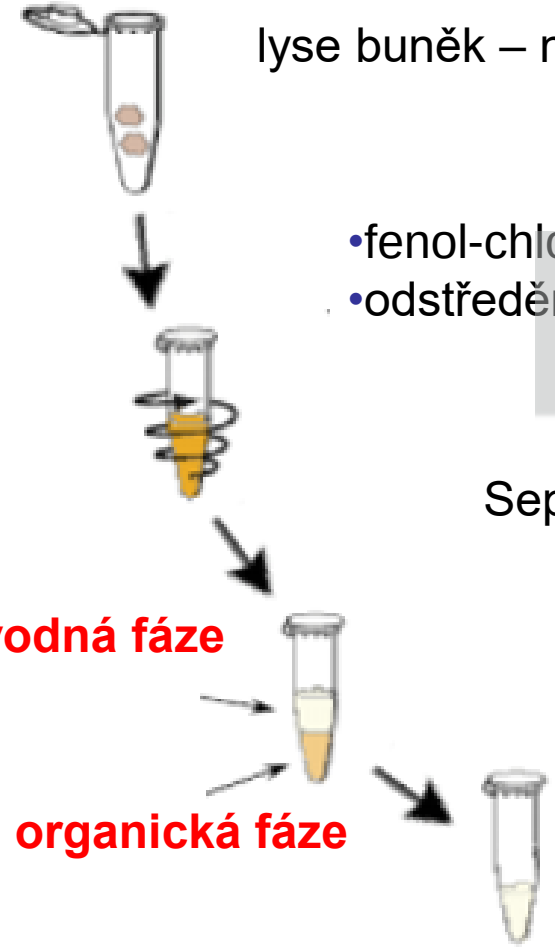
- odstranění proteinů
- odstranění DNA nebo RNA

Metody:

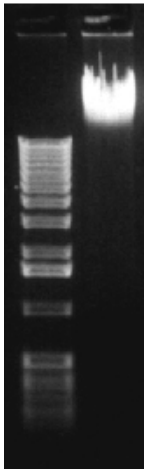
- rozdílná rozpustnost
- adsorpční metody
- hustotní gradient

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Isolace a purifikace genomové DNA



lyse buněk – např. SDS, CTAB, sarkosyl + proteinasa K (55 ^{o}C, 1hod), RNasa



- fenol-chloroform-isoamylalkoholová extrakce
- odstředění

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Separace organické fáze od vodné fáze

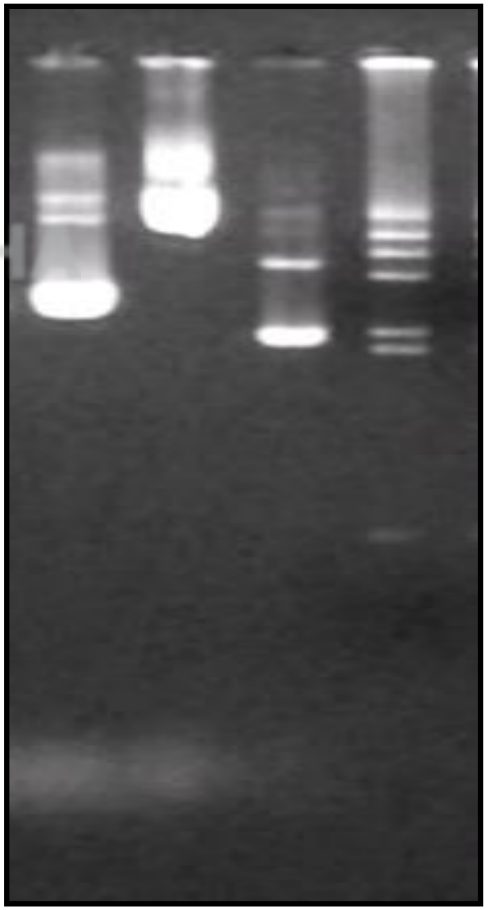
- Organické rozpouštědlo dole
- Vodná fáze nahoře (obsahuje DNA)
- Buněčné zbytky a proteiny jako tenký film na rozhraní mezi dvěma fázemi

- precipitace isopropanolem
- opláchnutí ethanolem
- rozpuštění ve vodě nebo TE pufru

Isolace plasmidové DNA

Alkalická lyse

- resuspendace buněk
- lyse buněk (SDS, **NaOH**)
- neutralizace (CH_3COOK, pH 5,2)
- chloroformová extrakce
- precipitace isopropanolem
- precipitace ethanolem



VŠCHT PRAHA
nepřihlášený host (1)

Isolace a purifikace RNA

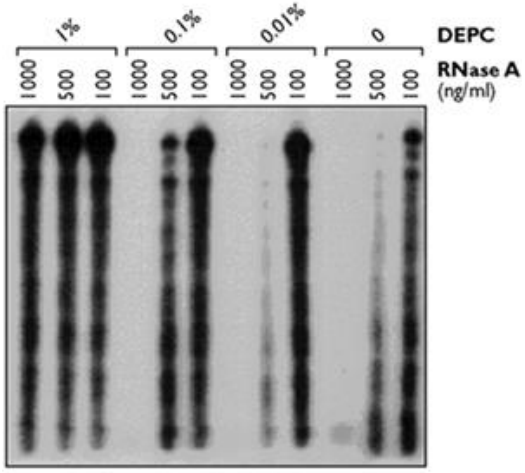
Komplikace - Ribonukleasy

- Enzymy, které degradují RNA
- Běžné kontaminanty laboratoří (lidský i mikrobiální původ)
- Také se uvolňují během isolace RNA ze vstupního materiálu
- Je obtížné je inaktivovat

ochrana před ribonukleasami

- používání RNase-free zkumavek, pipet, špiček, atd.
- ochranné rukavice
- používání RNase-free roztoků
- přídavek inhibitorů RNas (guanidin isothiokyanát, diethylpyrokarbonát)

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



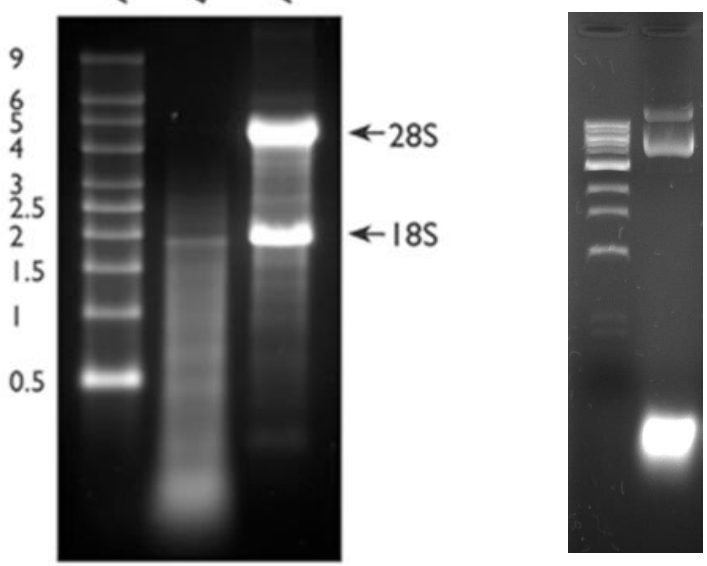
Effects of Varying Percentages of Diethyl pyrocarbonate (DEPC) on Increasing Concentrations of RNase. Various concentrations of RNase A were added to aliquots of water, shaken vigorously for one minute, incubated for one hour at room temperature and autoclaved for 25 minutes. 1 µl of each solution was mixed with 1 ng of a 5 x 104 cpm RNA 304 nt probe and incubated at 37°C for one hour. 5 µl of the reaction was assessed on a 5% acrylamide/8 M urea gel and exposed overnight to film.

Isolace RNA

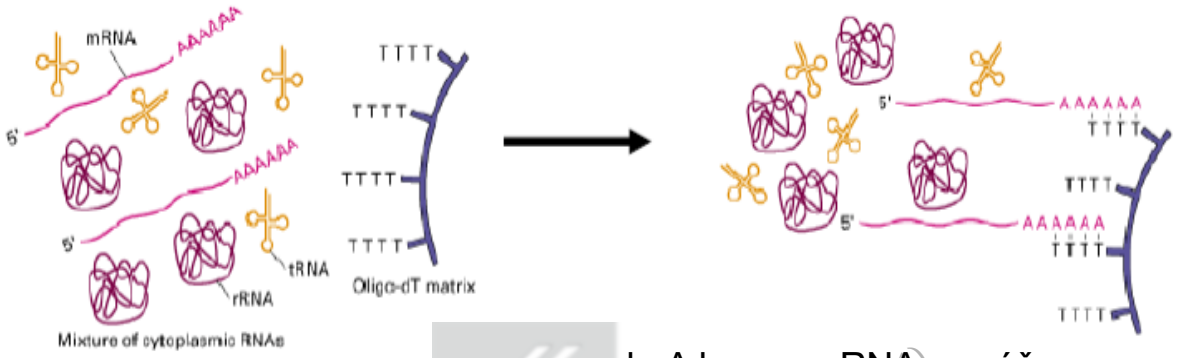
Klasický postup obdobný isolaci DNA

- inhibitor RNas
- nižší pH fenolu (4-6)
- ošetření DNasou (RNase free)
- selektivní precipitace LiCl (rRNA, mRNA)

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (2)



Isolace mRNA

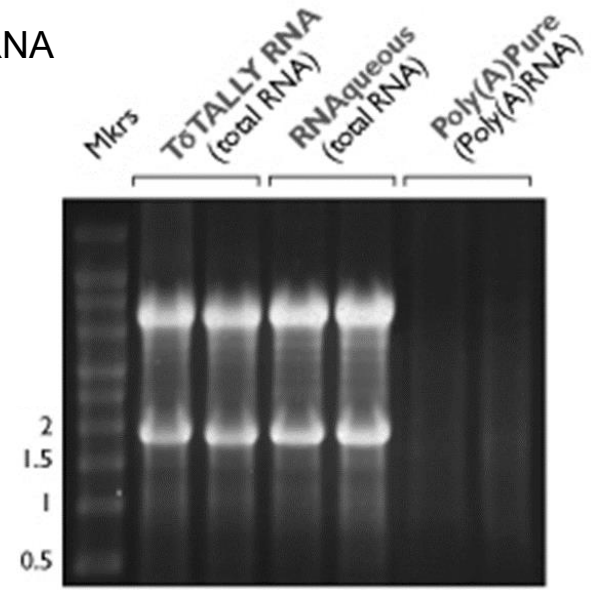


•nanesení totální RNA

•poly-A konec mRNA se váže na oligo(dT) nosiče

•odmytí rRNA a tRNA

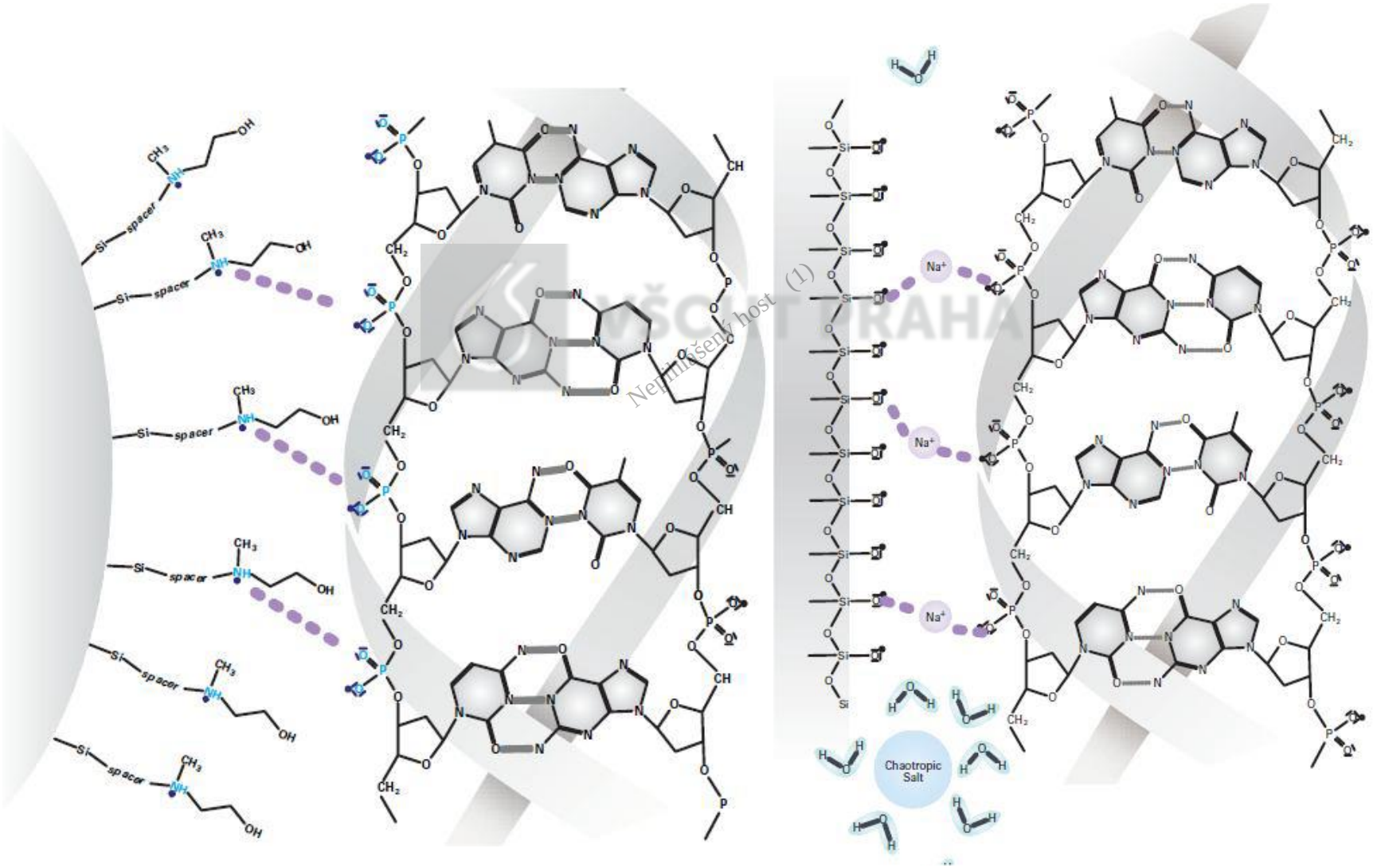
•eluce mRNA z oligo(dT) nosiče



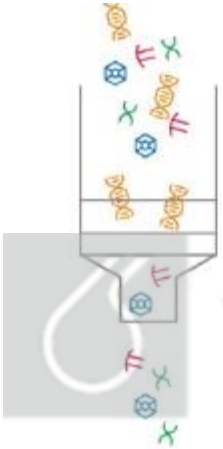
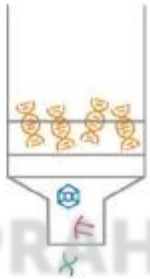
VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host

Purifikace NK pomocí kitů

ionexová chromatografie nebo kolony s křemičitým nosičem



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Lýze	Navázání	Promytí	Eluce
			
Detergenty, chaotropní sůl	Soli, alkoholy	Soli, alkoholy	TE pufr, H_2O

VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

eppendorf



Place fresh leaf or seed sample in 96 deep-well plate in the presence of Lysis Buffer A. Add 1 or 2 grinding beads.

Grind. Centrifuge.

Transfer supernatant to a clean plate. Add Lysis Buffer B/MagneSil® Paramagnetic Particle mixture and mix well. Incubate.

Place the plate on the MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device. Discard liquid.

Add Wash Buffer and mix. Place the plate on the MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device. Discard liquid. Repeat the wash. Dry the particles.

Add Nuclease-Free Water. Place the plate on the MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device.

Remove purified DNA to a fresh plate.

VŠCHT PRAHA
přihlášený host (1)

3220MA01_1A

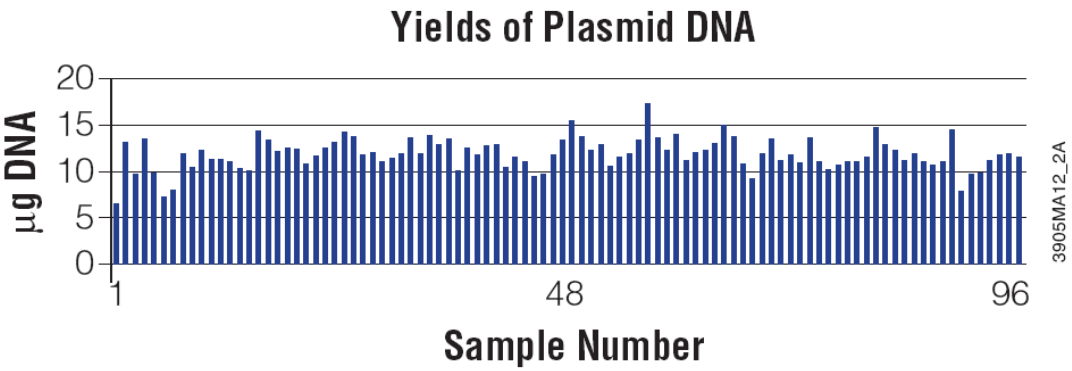
Promega



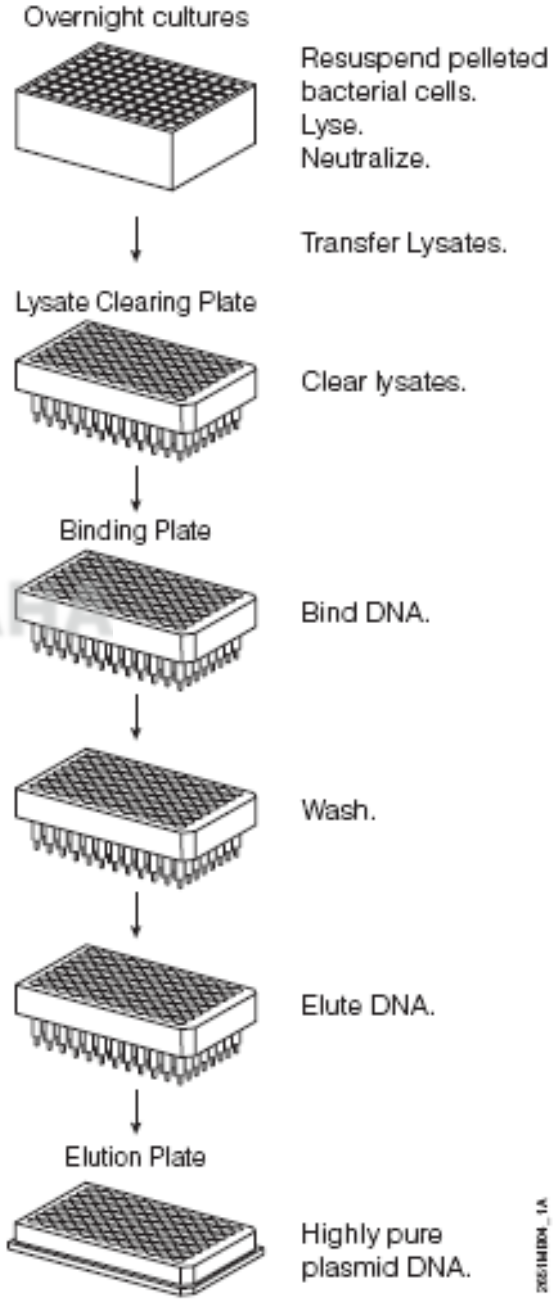
3758CA06_2A

The Wizard® SV 96 System operates as a true "walkaway" system on automated purification platforms such as the Beckman Coulter Biomek® FX laboratory automation workstation. It can also be used in a manual format.

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

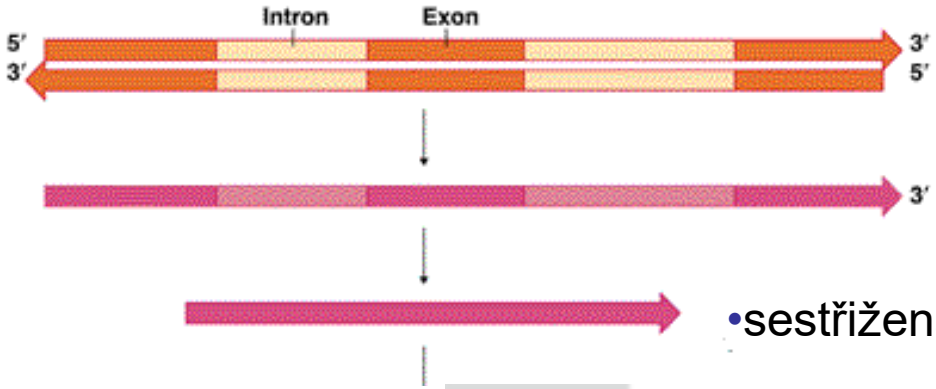


3905MA12_2A



Promega

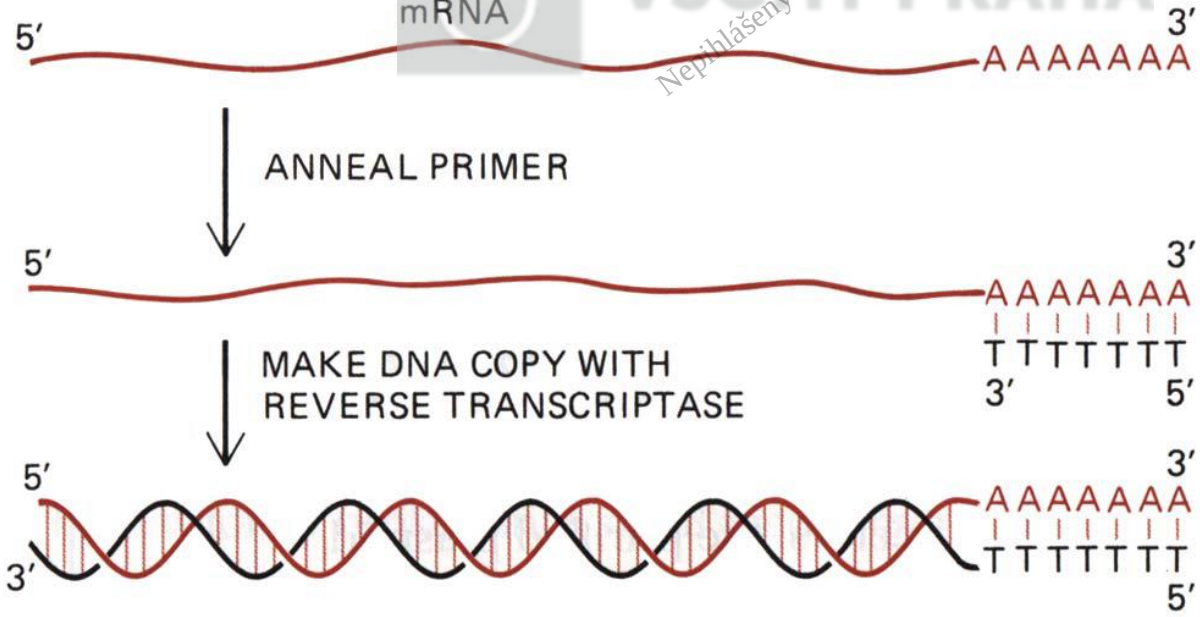
Příklad využití mRNA



- DNA
- primární transkript - hnRNA
- sestřižená RNA – mRNA

ZÍSKÁME IZOLACÍ

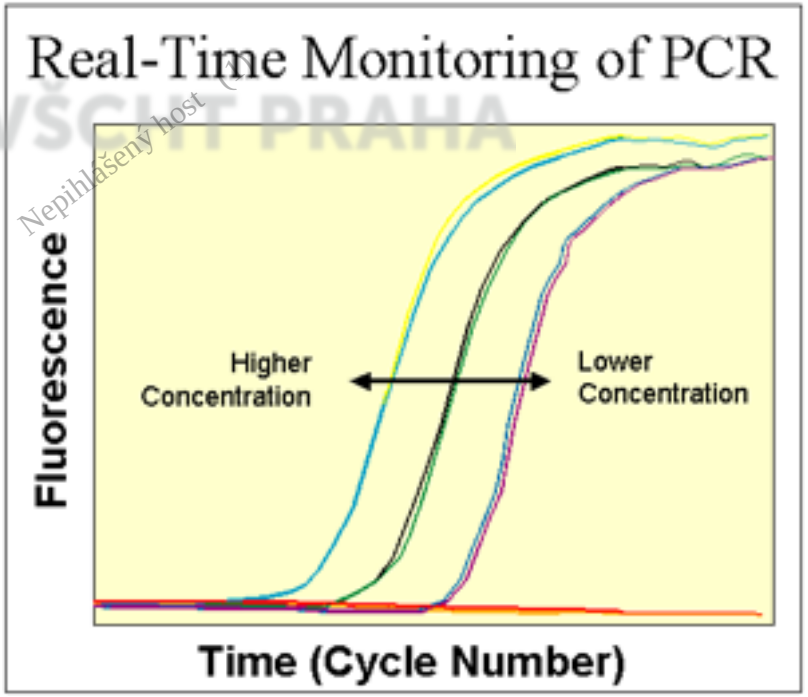
VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)



- **příprava rekombinantních eukaryotických proteinů**

- **qPCR – kvantitativní PCR**

  Zjišťování hladiny transkripce různých genů



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host

- **biočipy**