

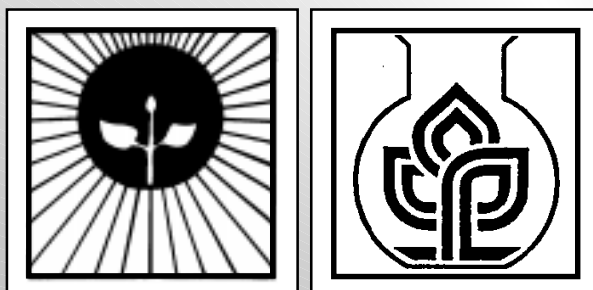
**SPOLEČNOST EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN
A
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AVČR**

**METHODS
IN
PLANT SCIENCES**

**Symposium o metodách používaných
v Česku a na Slovensku při studiu rostlin**

Vranovská Ves u Znojma

3.-6. listopadu 1997



Sborník příspěvků

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

vítejte ve Vranovské Vsi na sympoziu věnovaném metodám, které se u nás používají v rostlinné experimentální biologii. Byly bychom rádi, kdyby se podařilo založit novou tradici setkávání odborníků v této oblasti nad metodickými postupy. První ročník není zaměřen na konkrétní metodický problém, naším cílem je spíše “zmapovat” zájem o podobnou akci a spektrum používaných metod.

Sborník, který dostáváte do rukou, je souhrnem příspěvků, které budou na sympoziu prezentovány. Snažili jsme se seřadit je zhruba podle strategie přístupu ke studovanému materiálu. V budoucnosti plánujeme knihu abstrakt rozšířit a ustavit jakousi stálou edici, zřejmě v elektronické podobě, prezentovanou na stránkách Internetu. Bude tak možná její průběžná aktualizace. Při nevelké rozloze našeho státu by se takto dala postupně podchytit všechna pracoviště na našem území, která se (byť třeba jen nepřímo) rostlinami zabývají. Další setkání by se pak konala v podobě jakýchsi “workshopů” cílených na určitou metodickou oblast. Jsme přitom vedeni snahou vylepšit vzájemnou informovanost o práci kolegů, která bude jistě přínosem pro nás všechny.

Přejme si společně, abychom odcházeli z tohoto setkání obohaceni o nové poznatky a inspirování k další práci.

V Praze dne 17.10.1997

.. . . .

Za organizační výbor
Jan Petrášek

Vědecká rada:

Věra Čapková (ÚEB AVČR, Praha)
Miroslav Kamínek (ÚEB AVČR, Praha)
Aleš Kovařík (BFÚ AVČR, Brno)
Ivana Macháčková (ÚEB AVČR, Praha)
Jan Martinec (ÚEB AVČR, Praha)
Jan Petrášek (ÚEB AVČR, PřF UK, Praha)
Olga Votrubová (PřF UK, Praha)

Organizační výbor:

Tomáš Feltl, Jan Martinec, Jan Petrášek, Olga Štajnrtová



Informace z této konference, včetně abstrakt, budou zpřístupněny na internetové stránce:

www.ueb.cas.cz/methods

Symposium se koná díky finanční podpoře následujících firem:

| | |
|---------------------------------------|---|
| ALIT, s. r. o. | Španielova 1302, 163 00 Praha 6 |
| ALPHA DIALAB, s. r. o. | Kralická 910, 153 00 Praha 5 |
| BIO-CONSULT | Božejovická 145, 142 00 Praha 4 |
| B.M.-COMP, s. r. o. | Za nádražím 58/V, 290 01 Poděbrady |
| CHROMSPEC, s. r. o. | Janáčkovo nábřeží 15, 150 00 Praha 5 |
| ČS-OPTOTEAM, s. r. o. | Kyjevská 6, 169 00 Praha 6 |
| EAST PORT scientific, s. r. o. | Oválná 3, 160 00 Praha 6 |
| HELAGO, s. r. o. | Na okrouhlíku 1156, Hradec Králové |
| INGOS, s. r. o. | K Nouzovu 2090, 143 16 Praha 4 |
| Laboratory Imaging, s. r. o. | Nad úpadem 901/63, 149 00 Praha 4 |
| MANEKO | Na Pískách 71, 160 00 Praha 6 |
| MARKETING-CONSULTING, s. r. o. | Geologická 995/9, 152 00 Praha 5 |
| MEDESA | Kolovratská 1476, 251 01 Říčany u Prahy |
| MEGA BOOK INTERNATIONAL | Moldavská 5, 150 00 Praha 5 |
| METTLER TOLEDO, s. r. o. | Římská 24, 120 00 Praha 2 |
| M.G.P., s. r. o. | Kvítková 1575, 760 00 Zlín |
| Olympus C&S, s. r. o. | V jirchářích 10, 110 00 Praha 1 |
| Sigma-Aldrich, s. r. o. | Pobřežní 46, 186 00 Praha 8 |
| TOSAN, s. r. o. | Za Nádražím 58/V, 290 01 Poděbrady |
| TRIGON PLUS, a. s. | Čestlice 93, 251 70 Dobřejšovice |

Obsah sborníku:

| | |
|--|------------|
| Program: | 8 |
| Biochemické přístupy ke studiu rostlinné buňky | 13 |
| Použité metody stanovenia Peroxizomicinu A1 | 14 |
| Extrakce, čištění a stanovení cytokininů | 16 |
| Metody subcelulárnej frakcionácie a ich využitie při štúdiu vnútrobunečnej kompartimentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie b-glukozidázy Zm-p60 | 18 |
| Patch-Clamp as a Tool in Plant Physiology | 20 |
| Detekce PR-proteinů po jejich elektroforetickém dělení | 21 |
| Strategie elektroforetického dělení bílkovin | 24 |
| SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek | 26 |
| Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism | 28 |
| Frakcionace bílkovin z vegetativních částí rostlin na základě jejich rozdílné rozpustnosti | 31 |
| Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán | 34 |
| Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla | 39 |
| Jak studovat receptory pro rostlinné hormony? | 41 |
| Stanovení kyseliny abscisové RIA metodou | 44 |
| Metody analýzy fotosyntetických pigmentů v jehlicích smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.)KARST. ... | 46 |
| Metody stanovení rostlinných hormonů | 49 |
| Elektroforetická analýza isoenzymů | 53 |
| Kapilární elektroforetické metody ve fytochemii a fyziologii rostlin | 55 |
| Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy | 58 |
| Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu | 60 |
| Izolace protoplastů, inokulace fytovirů a jejich imunodetekce | 61 |
| Měření katalytické aktivity sacharosynthasy v in vitro pěstovaných mikrolízkách bramboru | 63 |
| Imunoafinitní chromatografie cytokininů | 65 |
| Molekulárně-genetické přístupy ke studiu rostlinné buňky | 69 |
| Fluorescenční in situ hybridizace | 70 |
| Detekce repetitivních DNA sekvencí na chromozómech <i>Melandrium album</i> metodou fluorescenční in situ hybridizace | 74 |
| Analýza struktury DNA a chromatinu | 75 |
| Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování | 77 |
| Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA | 81 |
| Syntéza a purifikace oligonukleotidů | 85 |
| Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy | 87 |
| Zkušenosti s genetickým analyzátozem ABI PRISM 310 | 90 |
| Metody transformace rostlin pomocí agrobacteria | 92 |
| Cílená a náhodná mutagenese DNA v podmínkách in vitro. Příklady a použití | 95 |
| Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů | 98 |
| Izolace transgenních buněčných linií u modelové dvoudomé rostliny <i>Melandrium album</i> | 101 |
| Klonování diferencielně exprimovaných mRNA | 102 |
| Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii | 107 |
| Cytologické a obecně fyziologické přístupy ke studiu rostlinné buňky | 111 |
| Užití fluorescenčních sond pro in vivo stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk | 112 |
| Metody izolácie eukaryotických fotobiontov z lišajníkov | 116 |
| Metody cytochemie in situ | 118 |
| Histochemical localization of aluminium and cell wall substances in maize roots | 121 |

| | |
|--|------------|
| Sample preparation for microsporogenesis observation in <i>Karwinskia parvifolia</i> (<i>Rhamnaceae</i>), plant with a high content of secondary metabolites, in TEM | 123 |
| Studium průduchového aparátu listů analýzou obrazu | 125 |
| Studium fotosyntézy kyslíkovou elektrodou a PAM fluorometrem | 126 |
| Stereologické hodnocení ultrastruktury rostlinných buněk | 128 |
| Analýza obrazu v rostlinné fyziologii | 129 |
| Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů. | 132 |
| Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů. | 136 |
| Biostat na pôsobenie galaktoglukomanánových oligosacharidov v predĺžovacom raste indukovanom rastovou látkou | 138 |
| Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného | 140 |
| Aplikace konfokální mikroskopie při studiu prostorového uspořádání rostlinného pletiva | 145 |
| Konfokální laserová skenovací mikroskopie | 147 |
| Studium struktury chromatinu <i>Gagea lutea</i> pomocí konfokální laserové mikroskopie | 150 |
| Nový typ víček pro fotoautotrofní in vitro kultury rostlin | 152 |
| Synchronizace buněčného cyklu u smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.) Karst./ | 153 |
| Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů | 154 |
| Studium struktury a funkce pohlavních chromozómů <i>Melandrium album</i> pomocí imunocytoologických metod | 157 |
| Jmenný rejstřík | 159 |
| Seznam účastníků symposia: | 160 |
| Inzeráty firem | 165 |
| M.G.P., s. r. o. | 166 |
| COMPLEX, s. r. o. | 167 |
| ČS - Optoteam, s. r. o. | 168 |
| ChromSpec, s. r. o. | 169 |
| MANEKO | 170 |
| SPEKTRONEX, s. r. o. | 171 |
| Trigon-Plus, s. r. o. | 172 |
| Medesa, s. r. o. | 173 |
| HELAGO, s. r. o. | 174 |
| Sigma-Aldrich, s. r. o. | 175 |

Program:

Pondělí 3.11.1997

- 16.00 - 20.00 Příjezd a registrace účastníků, instalace plakátových sdělení a firemních stánků
 18.30 - 19.00 Večeře
 19.45 - 19.55 **Zahájení**
Večerní sekce
 19.55 - 21.00 **Analyza obrazu v rostlinné fyziologii**
 Jana Opatrná (VÚRV, Praha) a LIM (Laboratory Imaging, s. r. o.)

Úterý 4.11.1997 Biochemické přístupy ke studiu rostlinné buňky

- 8.00 - 9.00 Snídaně
Dopolední sekce (Předsedající: Jan Martinec, ÚEB AVČR Praha)
 9.00 - 10.30 **Patch - Clamp as a Tool in Plant Physiology**
 Bert de Boer (Vrije Universiteit, Faculty of Biology, Amsterdam, Holandsko)
Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán
 Tomáš Feltl (ÚEB AVČR, Praha)
 10.30 - 11.00 Přestávka na kávu, prezentace firem
 11.00 - 12.30 **Metódy subcelulárnej frakcionácie a ich využitie při štúdiu vnútrobuněčnéj glukozidázy**
kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie β -Zm-p60.
 Eva Benková (BFÚ AVČR, Brno)
Strategie elektroforetického dělení bílkovin
 Věra Čapková (ÚEB AVČR, Praha)
Možnosti 2-D SDS PAGE
 Iva Kůrková (ÚEB AVČR, Praha)
 12.30-14.00 Oběd
Odpolední sekce (Předsedající: Tomáš Feltl, ÚEB AVČR, PřF UK, Praha)
 14.00 - 16.00 **Metody stanovení rostlinných hormonů**
 Ivana Macháčková (ÚEB AVČR, Praha)
Jak studovat receptory pro rostlinné hormony?
 Miroslav Kamínek, Eva Zažimalová (ÚEB AVČR, Praha)
Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism
 Petr Dobrev (ÚEB AVČR, Praha)
Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu
 Petr Šimek (EU AVČR, České Budějovice)
 16.00 - 16.30 Přestávka na kávu, prezentace firem
 16.30 - 18.00 **Monoklonální protilátky proti cytokininům, jejich příprava a využití**
 Petra Bartošková (PřF UP, Olomouc)
Imunoafinitní chromatografie cytokininů
 Radomíra Vaňková (ÚEB AVČR, Praha)
Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy
 Danuše Sofrová (PřF UK, Praha)
Kapilárně-elektroforetické metody ve fytochemii a rostlinné fyziologii
 Jiří Snopek (PřF UK, Praha)
SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek
 Tomáš Moravec, Noemi Čeřovská (ÚEB AVČR, Praha)
 18.30 - 19.30 Večeře
Večerní sekce
 20.00 - 20.30 **GCG Package and Database Search**
 Pavel Kovařík (Universita Vídeň)
 20.30 **Diskuse u plakátových sdělení, občerstvení**

Středa 5.11.1997 Molekulárně-genetické přístupy ke studiu rostlinné buňky

| | |
|---------------|--|
| 8.00 - 9.00 | Snídaně |
| | Dopolední sekce (Předsedající: Aleš Kovařík, BFÚ AVČR) |
| | Metody manipulace DNA |
| 9.00 - 10.30 | Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování Jaroslav Fulneček (BFÚ AVČR, Brno) |
| | Cílená a náhodná mutagenese DNA v podmínkách in vitro. Příklady a použití. Vladimír Rotrekl (PřF MU, Brno) |
| | Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů Karel Říha (BFÚ AVČR, Brno) |
| 10.30 - 11.00 | Přestávka na kávu, prezentace firem |
| 11.00 - 12.30 | Metody transformace rostlin pomocí Agrobacteria Daniela Pavingerová (ÚMBR AVČR, České Budějovice) |
| | Syntéza a purifikace oligonukleotidů Hana Konečná (PřF MU, Brno) |
| | Zkušenosti s genetickým analyzátozem ABI PRISM 310 Eliška Nejedlá (PřF MU, Brno) |
| | Metody mapování rostlinného genomu |
| | Analýza struktury DNA a chromatinu Jiří Fajkus (BFÚ AVČR, Brno) |
| 12.30 - 14.00 | Oběd |
| | Odpolední sekce (Předsedající: Jaroslav Doležel, ÚEB AVČR, Olomouc) |
| 14.00 - 15.30 | Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy Aleš Kovařík (BFÚ AVČR, Brno) |
| | Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii Helena Štorchová (BÚ AVČR, Praha) |
| | Metody studia genové exprese |
| | Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA David Honys (ÚEB AVČR, Praha) |
| | Klonování diferenciallyně exprimovaných mRNA Petr Smýkal (PřF UK, Praha) |
| 15.30 - 16.00 | Přestávka na kávu, prezentace firem |
| | Cytologické a obecně fyziologické metody |
| 16.00 - 18.00 | Průtoková cytometrie Jaroslav Doležel (ÚEB AVČR, Olomouc) |
| | Non invasive monitoring of rhythmic behaviour of Chenopodium sp. Edgar Wagner (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, SRN) |
| | Použití fluorescenčních sond pro stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk Jolana Albrechtová (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, SRN; ÚEB AVČR) |
| 18.30 - 19.30 | Společná večeře |
| 20.00 | Ochutnávka moravských vín |

Čtvrtek 6.11.1997 Cytologické a obecně fyziologické přístupy ke studiu rostlinné buňky

| | |
|---------------|--|
| 8.00 - 9.00 | Snídaně |
| | Dopolední sekce (Předsedající: Jan Petrášek, ÚEB AVČR, PřF UK) |
| 9.00-10.30 | Metody cytochemie in situ Karel Beneš (BF JU, České Budějovice) |
| | Konfokální laserová mikroskopie Jiří Široký (BFÚ AVČR Brno) |
| 10.30 - 11.00 | Přestávka na kávu, prezentace firem |
| 11.00 - 12.30 | Fluorescenční in situ hybridizace Jiří Bůžek (BFÚ AVČR, Brno) |
| | Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů Boris Vyskot (BFÚ AVČR, Brno) |
| 12.30 - 14.00 | Oběd |

Odpolední sekce (Předsedající: Karel Beneš, BF JU České Budějovice)

14.00 - 16.00 ***Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů***

Zdeněk Opatrný (PřF UK, Praha)

Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů

Ilja Prášil, Pavla Prášilová (VÚRV, Praha)

Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného

Aleš Soukup (PřF UK, Praha)

Metody neradioaktivního značení nukleových kyselin

Petr Žák (B.M.Comp.)

16.00

Zakončení

Úterý 4.11.1997

Biochemické přístupy ke studiu rostlinné buňky

| | |
|--|---|
| Argalášová, K. <i>et al.</i> | Použité metody stanovenia Peroxizomicinu A ₁ |
| Balla, J. <i>et al.</i> | Extrakce, čištění a stanovení cytokininů |
| Benková, E. | Metódy subcelulárnej frakcionácie a ich využitie pri štúdiu vnútrobunečnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie β-glukozidázy Zm-p60. |
| de Boer, A.H. | Patch - clamp as a tool in plant physiology |
| Burketová, L., Šindelářová, M. | Detekce PR-proteinů po jejich elektroforetickém dělení |
| Čapková, V. | Strategie elektroforetického dělení bílkovin |
| Čeřovská, N., Moravec, T. | SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek |
| Dobrev, P., Kamínek, M. | Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism |
| Faltus, M. | Fracionace bílkovin z vegetativních částí rostlin na základě jejich rozdílné rozpustnosti |
| Feltl, T. | Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán |
| Grospietch, M. | Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla |
| Kamínek, M., Zažimalová, E. | Jak studovat receptory pro rostlinné hormony ? |
| Klemš, M. <i>et al.</i> | Stanovení kyseliny abscisové RIA metodou |
| Krpeš, V. | Metody analýzy fotosyntetických pigmentů v jehličích smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.)KARST. |
| Macháčková, I. | Metody stanovení rostlinných hormonů |
| Pospíšková, M. a Vacková, K. | Elektroforetická analýza isoenzymů |
| Snopek, J. | Kapilární elektroforetické metody ve fytochemii a fyziologii rostlin |
| Sofrová, D. | Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy |
| Šimek, P. | Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu. |
| Šindelářová, M., Šindelář, L. | Izolace protoplastů, inokulace fytovirů a jejich imunodetekce |
| Vaňková, R. et al. | Imunoafinitní chromatografie cytokininů |
| Vojtěchová, M. | Měření katalytické aktivity sacharosasyntasy v <i>in vitro</i> pěstovaných mikrohřízkách bramboru |

Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.

Použité metódy stanovenia Peroxizomicinu A₁

Argalášová, K., Lux, A., Bovanová, L., Mikuš, M., Brandšteterová, E., Piňeyro, A. L.

Katedra fyziológie rastlín, Universita Komenského, Mlynská dolina B-2, 136, Bratislava
tel: (0421) 07/79 66 47, e-mail: argalasova@fns.uniba.sk

Cieľom práce bolo stanoviť a porovnať prítomnosť Peroxizomicinu A₁ v rastlinnom druhu *Karwinskia humboldtiana* (čeľ. *Rhamnaceae*). Peroxizomicin A₁ (3,3'-dimetyl-3,3',8,8',9,9'-hexahydroxy-3,3',4,4'-tetrahydro-(7,10')-biantracen-1,1'-(2H,2'H)-dion), na základe molekulovej hmotnosti označovaný aj ako T-514 je charakteristický selektívnou *in vitro* toxicitou na živočíšnych tumorálnych bunkách (PIŇEYRO 1994).

Na stanovenie Peroxizomicinu A₁ boli použité dve chemické metódy:

- a) metóda TLC
- b) metóda HPLC

a) V prípade stanovenia Peroxizomicinu A₁ metódou TLC, Peroxizomicín A₁ bol chloroformom (10 ml/g č.h.) extrahovaný z čerstvého, odváženého rastlinného materiálu *Karwinskia humboldtiana* získaného z podmienok *in vivo* a vysušený pod znížený tlakom. Vysušený chloroformový extrakt bol rozpustený v 1 ml chloroformu a nanášaný na TLC platne 8 x 10 cm (SILICA GEL 60F-254 Division of EM Industries 0623 RGTH), ktoré boli vyvíjané v zmesi benzén - acetón (2 : 1). Prítomnosť Peroxizomicinu A₁ na platni bola sledovaná pomocou UV svetla a porovnávaná so štandardom získaným z laboratória Dr. Waksmanovej z Mexika. Silica gel bol zoškrabaný z podložky a niekoľkokrát opakovane extrahovaný v chloroforme, vysušený vo vákuu a rozpustený opäť v 1 ml chloroformu. Čistota získanej frakcie bohatej na Peroxizomicin A₁ bola sledovaná opakovanou kochromatografiou jednotlivých vzoriek so štandardom (Peroxizomicin A₁). Kvantifikácia Peroxizomicinu A₁ bola uskutočnená spektrofotometricky (spektrofotometer: SPEKOL - K - 20). Zásobný roztok Peroxizomicinu A₁ (680 mg · 10 ml⁻¹ chloroformu) bol rozriedený na nasledujúce koncentrácie: 0,68; 2,04; 3,4; 6,8; 10,2; 20,4 (mg · ml⁻¹) a spektrofotometrom boli zaznamenané hodnoty absorbie jednotlivých koncentrácií pri vlnovej dĺžke 425 nm. Z nameraných hodnôt absorbie bola vytvorená kalibračná krivka s typickou lineárnou funkciou:

$$x \text{ [mg]} = \frac{\text{ABS} - 0,0038}{0,039}$$

a regresným koeficientom 0,9985.

Frakcie bohaté na Peroxizomicin A₁ izolované pomocou TLC z chloroformových extraktov boli zriedené 5, 25, 125 alebo 725 x a spektrofotometricky boli zmerané hodnoty absorbie pri vlnovej dĺžke 425 nm.

b) V prípade stanovenia Peroxizomicinu A₁ HPLC metódou, Peroxizomicín A₁ bol etylesterom kyseliny octovej (10 ml/g č.h.) extrahovaný z čerstvého, odváženého rastlinného materiálu *Karwinskia humboldtiana* získaného z podmienok *in vivo* a vysušený pod znížený tlakom. Vysušený extrakt bol rozpustený v 1 ml metanolu a stanovený HPLC metódou na kolóne Waters C₁₈ (150 x 3,9 mm, 4mm) s mobilnou fázou metanol - tlmivý roztok McIlvaine v pomere 60 : 40 pri pH 4 s prietokom mobilnej fázy 0,7 ml/min za laboratórnej teploty 23°C. Dávkovaný objem bol 20 ml. Detekcia bola určená pri vlnovej dĺžke 269 nm.

Porovnaním oboch použitých metód stanovenia Peroxizomicínu A₁ sa metóda TLC javí finančnej vhodnejšia, ale pri kvantifikácii uvedenej látky je nutné uprednostniť metódu presnejšiu a účinnejšiu metódu HPLC.

Ďalšia časť výskumu bude zameraná na stanovenie Peroxizomicínu A₁ z rastlinných druhov *Karwinskia humboldtiana* a *Karwinskia parvifolia*, ktoré sa z hľadiska percentuálneho podielu a chemickej dostupnosti práve Peroxizomicínu A₁ javia najzaujímavejšie (WAKSMAN a kol. 1990).

Literatúra:

- GUERRERO, M., WAKSMAN, N.: Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). In *Farmacologia Karwinskia humboldtiana* Ingles, 10, 1981-1992 (1996)
- PIÑEYRO, A.L., MARTINEZ DO VILLARREAL, L., GONZALEZ, A. R.: *Toxicol.* 92, 217-227 (1994).
- SALAZAR, M.L., PIÑEYRO, A., WAKSMAN, N.: A reverse phase HPLC method for quantification of Peroxisomicine and other anthracenonic compounds. In *J.Liq.chrom. & rel. technol.*, 19(9), 1391 - 1403 (1996)
- TOUCHSTONE, J.C.: *Practice of thin layer chromatography*. Third Edition, Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, 14-69, 264-290, 1992
- WAKSMAN, N., RAMÍREZ, D.R.: *Chemical and toxicological investigation of K. humboldtiana*. Congress of Natural Products Res., Park City, USA, 1990

Extrakce, čištění a stanovení cytokininů

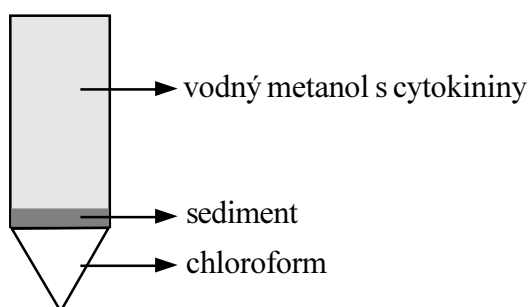
Balla, J., Klemš, M., Blažková, J., Procházka, S.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, AF MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno
tel: 05/45 13 30 23, e-mail: maci@dahlia.vszbr.cz

Abstrakt

Významnou skupinou rostlinných hormonů jsou cytokininy. Cytokininy stimulují dělení buněk a na úrovni integrity rostliny podporují např. větvení. Tvoří velmi početnou skupinu fytohormonů chemicky odvozených od adeninu. Nejčastěji se cytokininy v rostlinách vyskytují jako volné báze, ribosidy, ribotidy a glukosidy a to ve velmi malých množstvích, v ng/g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

Vzhledem k jejich malému množství v pletivech a snadné oxidaci izoprenoidních cytokininů jsou extrahovány organickými rozpouštědly s antioxidantem. Purifikace probíhá v několika krocích. Nejprve jsou odstraněny lipidy a lipofilní barviva (chlorofyl) při centrifugaci homogenátu v Bieleškiho fixáži (metanol : chloroform : kyselina mravenčí : voda = 12 : 5 : 1 : 2). Doplněním extraktu o polovinu objemu vodou dosáhneme při centrifugaci oddělení supernatantu (vodný metanol



s kyselinou mravenčí) od chloroformu (chlorofyl, tuky atd.), ve kterém není žádná ztráta cytokininů (zjištěno pomocí radioaktivního standardu).

Vodný metanol je pak odpařen na rotační vakuové odparce do sucha. Pro případnou potřebu štěpení ribotidů kyselou fosfatázou jsou vyfoukány zbytky kyseliny mravenčí v digestoři. Další purifikace probíhá v acetátamonném pufru na kolonách iontoměníčů. Na koloně P-celulózy dochází k pozitivní sorpci cytokininů, z této kolony jsou pak eluovány hydroxidem amonným. Na DEAE-celulóze jsou zachyceny nečistoty se záporným nábojem. Poslední krok čištění je chromatografie na reverzní fázi - cytokininy jsou zachyceny na kolonce hydrofobního C18 materiálu (Sep-pak). Eluovány jsou ze C18 kolony metanolem. (MACHÁČKOVÁ et al. 1983).

Po separaci cytokininů pomocí HPLC na báze a ribosidy zeatinu, izopentenyladeninu a benzyladeninu následuje kvantitativní stanovení jednotlivých cytokininů ELISA testem (STRNAD et al. 1992) jehož citlivost je v pmol. Principem ELISA stanovení je kompetice cytokininu z rostlinného extraktu a cytokininu značeného enzymem (alkalická fosfatáza) ve vazbě na specifickou protilátku. Substrátem sloužícím k vlastnímu stanovení fosfatázy je pak *p*-nitrofenylfosfát a absorbance se odečítá při 405 nm na readru Uniscan.

Test se provádí v jamkách mikrotitračních destiček. Postup začíná navázáním protilátek na stěny jamek. Po inkubaci se přebytečné protilátky vymyjí a pipetuje se standardní cytokinin a cytokinin izolovaný z rostlinného extraktu. Po navázání cytokininu se destička opět promyje a přidává se cytokinin konjugovaný s alkalickou fosfatázou. Přidá se konstantní množství substrátu. Po krátkodobé inkubaci (15 - 60 minut) je enzymatická reakce zastavena hydroxidem sodným. Po měření absorbance a sestavení kalibrační křivky se odečítá přesné množství cytokininů ve vzorcích.

Čištění cytokininů začíná přípravou materiálu a homogenizací vzorků první den, další den probíhá vlastní purifikace, následující den separace přečištěných extraktů na HPLC, další den následuje příprava materiálu na ELISA stanovení a poslední den vlastní ELISA.

Ke zjištění ztrát cytokininů během čištění extraktů je vhodné přidat do extraktů radioaktivní standart o známé aktivitě ihned po homogenizaci vzorků. Výtěžek se zjišťuje po posledním odpaření vzorku do sucha (před nástřikem na HPLC).

K nezbytnému laboratornímu vybavení patří centrifuga, rotační vakuová odparka, peristaltická pumpa nebo separátor Dorcus, HPLC, zařízení pro měření radioaktivity, čtečka pro ELISA-test, uvedené chemikálie.

Metódy subcelulárnej frakcionácie a ich využitie pri štúdiu vnútrobunečnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie β -glukozidázy Zm-p60

Benková, E.

Biofyzikálny ústav AVČR, Královopolská 135, Brno
tel: 05/41517184, fax: 05/41211293, e-mail: benkova@ibp.cz

Metabolické deje, ktoré sa v bunke odohrávajú, majú nielen svoj časový, ale aj priestorový priebeh. Vnútna štrukturalizácia je pre bunku zároveň určitou kompartmentalizáciou funkcií. Hlavné fyziologické procesy sa odohrávajú v špecializovaných bunečných organelách (s chloroplastami spojená fotosyntéza, respirácia typická pre mitochondrie, proteosyntéza na ribozómoch, genetická knižnica v jadre). Pre takéto funkčné členenie bunky je dôležitá vzájomná komunikácia medzi bunečnými kompartmentami, prenos látok a signálov. Priestorová kompartmentalizácia tak môže byť významným prvkom riadiaceho mechanizmu bunky.

Jedným z metodických prístupov k štúdiu priestorovej kompartmentalizácie látok a metabolických procesov v bunke je subcelulárna frakcionácia; separácia bunečných organel a izolácia čistých, morfolologicky a fyziologicky intaktných štruktúr bez kontaminácie inými bunečnými partikulami. Šetrná a účinná homogenizácia materiálu je predpokladom úspešnej separácie neporušených organel. Výber spôsobu homogenizácie závisí na charaktere východzieho pletiva, vlastnostiach izolovanej bunečnej organely a študijných cieľoch, na ktoré má byť použitá. Mechanické spôsoby homogenizácie materiálu (rozotrením s pieskom v trecej miske, krájaním a mixovaním materiálu, sonikáciou) sú prístupy invazívnejšie, vyžadujúce si väčšie množstvo východzieho materiálu s menším výťažkom. Ich výhoda je však v rýchlosti, s ktorou je možné organely izolovať a vyhnúť sa tak rozsiahlejším metabolickým zmenám, s ktorými je spojená 10-15 hodinová kultivácia pletív v enzymatických roztokoch. Uvoľnenie buniek enzymatickým natrávením a ich následné rozbitie osmotickým šokom je jeden z najšetrnejších prístupov, ktorým možno získať organely s vysokou intaktnosťou a čistotou. V tomto prípade je ale nutné počítať s metabolickými zmenami, ku ktorým dochádza počas dlhodobej kultivácie v tráviacom médiu. Rozbitím buniek sa dostávajú organely do priameho kontaktu s toxickými látkami, ktoré sa uvoľňujú z detoxifikačných oddielov bunky. Homogenizačné médium preto musí obsahovať látky, ktoré ich chránia proti fenolom, chinónom, oxidázam ťažkých kovov a zabraňujú povrchovej denaturácii. Separácia organelárnej frakcie z homogenizovaného materiálu môže byť prevedená - centrifugáciou, elektroforetickou, fázovou separáciou, špecifickou adsorpciou. Výber adekvátnej metódy je nutné posudzovať vzhľadom k materiálu a bunečnej partikule, ktorá je izolovaná.

Kritériom čistoty izolovanej subcelulárnej frakcie je aktivita markerových enzýmov viazaná na konkrétny typ bunečnej organely (napr. cytochróm-c-reduktáza pre endoplazmatické retikulum, cytochróm-c-oxidáza pre mitochondrie, kataláza pre mikrozosomálne telieska, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza pre chloroplasty, a-mannozidáza pre vakuoly, či fruktózo-6-fosfát fosfotransferáza pre cytoplazmu). Morfologická a fyziologická intaktnosť je hodnotená mikroskopicky, alebo na základe aktivity markerového enzýmu.

Každý nový objekt, ktorý sa stane predmetom subcelulárnej frakcionácie si vyžaduje modifikáciu a optimalizáciu protokolu na izoláciu príslušnej bunečnej organely.

Pre účely štúdia subcelulárnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie β -glukozidázy Zm-p60, enzýmu s významným postavením v metabolizme cytokinínov, bol optimalizovaný protokol na izoláciu chloroplastov *Nicotiana tabacum* SR1 z rastlín pestovaných *in vivo* a protokol na izoláciu vakuol *Nicotiana tabacum* SR1 z rastlín pestovaných *in vitro*.

Pre izoláciu chloroplastov bolo listové pletivo homogenizované krájaním a mixovaním vysokootáčkovým homogenizátorom v homogenizačnom pufrý obsahujúcom polyvinylpyrolidon, kyselinu izoaskorbovú, EDTA a bovinný sérum-albumin (BSA), ako hlavné ochranné látky. Chloroplasty boli purifikované centrifugáciou na gradiente Percol. Intaktné chloroplasty sa koncentrovali na medzivrstve 40-80% Percolu. Získaná bola chloroplastová frakcia s 98-99% intaktnosťou, bez kontaminácie cytozolom a mikrozosomálnymi telieskami, s menej ako 2% kontamináciou mitochondriami a 4-5% kontamináciou endoplazmatickým retikulom.

Mechanická homogenizácia nie je pre izoláciu vakuol dostatočne šetrná metóda. K získaniu intaktnej vakuolárnej frakcie boli preto najprv izolované protoplasty (podľa modifikovanej metódy Nagy a Maliga, 1976). K uvoľneniu vakuol z protoplastov došlo po tepelno-osmotickom šoku a ich separácia od ostatných bunčných kompartmentov bola prevedená flotovaním. Intaktné vakuoly sa koncentrovali na interfáze 5% roztoku Ficol a 0,6% betaínu (Dombrowski J.E. at al., 1993). Úspešnosť izolácie vakuol z protoplastov mezofylu listov bola hodnotená ako zvýšenie aktivity vakuolárneho markerového enzýmu α -mannozidázy vo vakuolárnej frakcii oproti jeho aktivite v protoplastoch. Izolovaná vakuolárna frakcia mala 4-5x vyššiu aktivitu α -mannozidázy v porovnaní s protoplastami.

Literatúra:

Nagy J.I., Maliga P., (1976), *Zpflanzenphysiol* 78: 453-455.

Dombrowski J.E., Gomez L., Chrispeels M.J., Raikhel N.T., (1993), *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Patch-Clamp as a Tool in Plant Physiology

de Boer, A.H.

Vrije Universiteit, Faculty of Biology, Department of Genetics, Section Plant Physiology
De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands
tel.: (31) 20 4447162, fax: (31) 20 4447155, e-mail: ahdeboer@bio.vu.nl

An important function of biological membranes is to create and maintain gradients in ion and solute concentrations. Proteins embedded in the membranes control which ions/solutes are accumulated and which are excluded. These transport proteins can be divided in three categories: 1. Primary pumps (using ATP, redox energy or light as energy source), 2. carriers (transport coupled to the gradient of another ion) and 3. Ion channels (transport driven by electrochemical gradient). Transport is important for many aspects of plant growth and development: cell expansion, mineral nutrition, long distance transport in phloem and xylem, cellular and whole-plant responses to environmental signals and in hormonal signal transduction.

Electrophysiology is the study of transport carrying a net charge across membranes and the proteins that are responsible for that. The patch-clamp technique is the highest-resolution method and since its introduction by Neher and Sakmann in the early 1980s it has been applied successfully to plants.

In this seminar an overview will be given of the transport proteins identified thus far. It will be explained what the patch-clamp technique is and what kind of equipment is necessary to set-up a work station. Then the isolation of cells suitable for patch-clamp measurements and the methods to make a so-called 'giga-seal' will be discussed. After the seal has been formed, the experimenter must decide on which configuration (e.g. whole cell, excised inside-out or outside-out patch) and which computer protocol to use, depending on what the experimenter is interested in. Once the measurements have been made, the data must be interpreted and presented in the right format. Examples of measurements will be given and it will be explained how to 'read' the figures. In the end some 'new' methods which will be indispensable in future patch-clamp studies will be briefly introduced; e.g. expression cloning, heterologous expression and reverse genetics.

Detekce PR-proteinů po jejich elektroforetickém dělení

Burketová, L., Šindelářová, M.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha
tel: 02/24 31 01 09, fax: 02/24 31 01 13, e-mail: elsindel@site.caz.cz

Označení skupiny nově syntetizovaných proteinů v rostlinách infikovaných viry či houbovými patogeny jako PR-proteiny (pathogenesis-related proteins) - proteiny související s patogenezí, bylo na základě pozdějších poznatků rozšířeno též na proteiny indukované dalšími biotickými či abiotickými faktory. Mezi tyto další induktory PR-proteinů patří zejména některé chemické látky (kyselina salicylová, akrylová, 2,6-dichloroisoinikotinová, těžké kovy), mechanické poškození pletiv, osmotický stres, solný stres, stárnutí rostlin atd. Při studiu indukce, vlastností a funkce těchto nově syntetizovaných proteinů byla potvrzena jejich role v indukované rezistenci k následnému patogenu, na které se v případě superinfikujících hub a bakterií podílí glukanasová a chitinasová aktivita některých z nich (skupiny PR-2, PR-3).

Zatímco kyselé PR-proteiny jsou extracelulárně vylučovány, bazické se akumulují ve vakuolách. Kyselé PR-proteiny se většinou analyzují v extracelulární tekutině získané odstředěním po vakuové infiltraci příslušného roztoku. K rozdělení proteinů se používá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních a denaturujících podmínek. Enzymové aktivity jednotlivých bandů jsou detekovány v překrývacím gelu (chitinasy) nebo přímo v PAGE gelu (glukanasy).

Extrakce extracelulární kapaliny (Parent and Asselin, 1984)

Listové čepele se nastříhají na menší části o velikosti asi 5x6cm nebo se v případě malých lístků ponechají celé. Takto upravené listy ponořené v roztoku: 25mM tris-HCl, pH 7,8 obsahující 0,5M sacharózu; 10mM MgCl₂; 10mM CaCl₂; 0,5mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF); 5mM 2-merkaptoetanol, se vakuově infiltrují, jemně osuší a svinou tak, aby je bylo možno bez poškození vložit do květy nebo upravené injekční stříkačky. Infiltrát získaný následnou centrifugací při 1000g 10 min, 4°C se může bezprostředně použít pro analýzu proteinů PAGE nebo uložit při -18°C.

- * Pro centrifugaci vakuově infiltrovaných listů jsou vhodné centrifugační květy o objemu 30-50 ml s malým množstvím skleněných kuliček nebo jiného inertního materiálu. Srolované listy se vloží na vrstvu kuliček v květetě. Jinou možností je použití upravené injekční stříkačky (zkrátit, vyjmout píst, na dno stříkačky vložit sítko) umístěné ústím v mikrokvětetě eppendorf ve větší (30-50ml) centrifugační květetě.
- * Při manipulaci s listy je nutné se vyvarovat zbytečného poškození pletiv, jinak se vzorek kontaminuje intercelulárními proteiny.
- * Někteří autoři používají místo výše uvedeného roztoku pro infiltraci pouze deionizovanou vodu. Vynechání sacharózy umožňuje snadné zakoncentrování vzorku lyofilizací.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Molekulové váhy extracelulárních proteinů jsou stanovovány pomocí PAGE za denaturujících podmínek (SDS) podle obvyklého postupu (.....), spektrum kyselých proteinů v nativních PAGE gelech podle Laemmliho (1970). V obou postupech se používají ploché polyakrylamidové gely: 4% zaostřovací a 7,5-10% rozlišovací.

- * Před nanášením vzorků je potřeba stanovit obsah proteinů ve vzorcích např. podle Bradfordové (.....) a upravit koncentraci zředěním.

Barvení gelů

Gely mohou být barveny Coomassie R-250

při slabší koncentraci proteinů je vhodnější obarvit gely stříbrem. V naší laboratoři používáme modifikovaný postup podle Marcinky:

Příslušnost jednotlivých bandů k molekulovým vahám a relativní mobilitu nativních proteinů vyhodnocujeme pomocí elfomodulu videoimagingu Lucia (LIM).

Stanovení glukanasové aktivity v gelech

Izoenzymy b-1,3-glukanas rozkládají substrát laminarin na glukózu a redukující oligomery, které vytvářejí barevnou reakci s triphenylterazoliovým reagens.

PAGE gel po elektroforéze za nativních podmínek se nejprve promývá deionizovanou vodou (3x 5 min, 200ml vody na každé promytí) a ekvilibruje v 0,05 M acetátovém pufru (pH 5,0) (5 min), poté se gel přenesse do roztoku 2% laminarinu ve stejném pufru a inkubuje při 40C 40-60 min. Po skončení inkubace se gel opět opláchne deionizovanou vodou, ustálí v roztoku obsahujícím 25% metanolu a 10% kyseliny octové a znovu krátce opláchne vodou. Bandy s glukanasovou aktivitou se vizualizují v roztoku 1M NaOH obsahujícím 0,1% 2,3,5-triphenylterazolium chloridu v horké vodní lázni (65-70 C) za neustálého pohybování gelem v lázni. V průběhu 10 minut by se měly v místě glukanasové aktivity objevit tmavě červené bandy. Gely se uchovávají v roztoku: 25% metanolu, 10% kyseliny octové a 5% glycerolu nebo je lze obarvit Coomasie R-250 či stříbrem.

* Pro vyloučení falešných pozitivit se připraví blank: gel se stejnými vzorky se inkubuje v acetátovém pufru bez substrátu (laminarinu), jinak je postup zcela stejný.

* Použitý roztok substrátu laminarinu je možno zmrazit (-18C) a po určitou dobu uchovávat, roztok 2,3,5-triphenylterazolium chloridu je potřeba připravit vždy čerstvý.

* Přílišné pozadí je obvykle důsledkem nedostatečného promytí gelu vodou nebo příliš vysokou teplotou vodní lázně při vyvolávání reakce.

Stanovení chitinasové aktivity v gelech

Metoda využívá skutečnosti, že se glykolchitin, který je substrátem chitinas, afinitně váže na Fluorescent brightner 28. V místě bandů s chitinasovou aktivitou je substrát rozložen a k vazbě na Fluorescent brightner 28 (calcofluor) nedochází. Tato místa se na UV transiluminátoru jeví jako tmavé nefluoreskující bandy na fluoreskujícím pozadí.

PAGE gel po nativní elektroforéze se 5min ekvilibruje v 0,1 M (pH 5,0) acetátovém pufru, poté se překryje překrývacím akrylamidovým gelem obsahujícím glykolchitin(.....) a inkubuje ve vlhké komoře 1-2 hodiny při 38 C. Po ukončení inkubace se překrývací gel sejme s rozlišovacího gelu a inkubuje 5 min ve tmě s ...roztokem Fluorescent Brightneru. Dále se gel promývá deionizovanou vodou nejméně 2 hodiny nebo přes noc při 4 C. Bandy jsou viditelné na UV transiluminátoru jako tmavá místa na fluoreskujícím gelu.

* V případě blanku se postupuje stejně s tím rozdílem, že se do překrývacího gelu nepřidává glykolchitin.

* Je nutné zajistit dokonalý kontakt obou gelů po celé ploše, např. vytlačení případných vzduchových bublin válením skleněné pipety.

* Bandy s chitinasovou aktivitou se označí propíchnutím gelu nebo se překreslí na transparentní fólii a porovnají s rozlišovacím gelem po jeho obarvení.

* Někteří autoři doporučují stanovovat glukanasovou aktivitu v rozlišovacím gelu po jeho inkubaci s překrývacím gelem obsahujícím glykolchitin. V naší laboratoři jsme však s tímto postupem neudělali dobrou zkušenost.

Potřebné vybavení

* vertikální elektroforéza

* kývačka - shaker na barvení gelů

- * centrifugy
- * termostat
- * vákuová pumpa
- * mrazicí box (-18C)

Literatura:

- Parent, J.G. a Asselin, A. 1984. Detection of pathogenesis-related proteins (PR or *b*) and of other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can.J.Bot.* 62:564- 569.
- Pan, S.Q., Ye, X.S., Kuc, J. 1991. *Phytopathology* 81:970-974.
- Shimoni, M. 1994. A method for activity staining of peroxidase and b-1,3-glucanase isozymes in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal.Biochem.* 220: 36-38.

Strategie elektroforetického dělení bílkovin

Čapková, V.

Ústav experimentální botaniky AVČR, odd. biologie pylu, Ke dvoru 15, Praha 6 166 30
e-mail: capkova@site.cas.cz

Elektroforetické dělení bílkovin (elfo) patří mezi běžně používané postupy a přesto často získané výsledky zaostávají za možnostmi této metodiky. Před vlastními analýzami se vyplatí vzít uvažu řadu faktorů, které mohou velmi výrazně ovlivnit konečný výsledek dělení bílkovin.

- 1) možnosti dělení: a) celých funkčních komplexů (Blue PAGE)
 - b) nativních bílkovin (IEF)
 - c) denaturovaných bílkovin (SDS-PAGE)
 - d) kombinací a-c získat komplexní obrázek (2-D-SDS-PAGE)
- 2) možnosti buněčné frakcionace na:
 - a) rozpustné (cytosolické bílkoviny)
 - b) nekovalentně vázané bílkoviny
 - c) bílkoviny buněčných kompartmentů: ER, Golgi, mitochondrií, chloroplastů, buněčné stěny
- 3) možnost modifikovat homogenizace a extrakce, možnost volby osmotické hodnoty, molarity a pH pufru, typu a koncentrace neiontových i iontových detergentů a solí
- 4) možnost identifikovat určité, známé bílkoviny jejichž zviditelnění je možné i na pozadí směsi ostatních bílkovin (enzymatické reakce, imunodetekce)
- 5) identifikovat a charakterizovat bílkoviny, které se objevují jako odraz vývojových nebo indukovaných procesů v rostlinných buňkách.

Jaké otázky je možno řešit pomocí elfo:

- 1) ukázat změnu bílkovinného spektra jako funkční odpověď buňky
- 2) ukázat syntézu bílkovin v daném časovém rozmezí a za daných podmínek
- 3) ukázat poločas rozpadu nově syntetizované bílkoviny
- 4) ukázat putování a translokaci bílkovin v buňce
- 5) ukázat posttranslační modifikace typu glykosylace a fosforylace
- 6) využít N-glykosylace bílkovin ke studiu jejich funkce pomocí inhibitorů glykosylace
- 7) ukázat produkty translace in vitro a glykosylace (kotranslance) in vitro
- 8) spojit metodu transkripce in vitro, translace a kotranslance in vitro k zviditelnění nascentního a posttranslačně modifikovaného bílkovinného produktu analyzovaného genu

Z méně obvyklých metod se chci zmínit o izolaci buněčných stěn a o posttranslačních modifikacích, o N-glykosylacích.

Izolace buněčných stěn

Cílem práce je získání stěnové frakce bez kontaminace cytozolem. Metoda je založena na plasmolyze a následném oddělení stěnové frakce centrifugací přes cukerný polštářek při nízkých hodnotách rpm (Fry 1991). Metoda je vhodná pro izolaci stěn somatických i gametofytických buněk. Minimální navážka čerstvé hmoty je 10 mg.

Postup práce:

Homogenizaci pufrům (40% sacharóza, 10mM DTT, 20 mM HEPES pH 7,5 /NaOH/) je třeba dělat ve třence, bez dusíku a bez písku. Po homogenizaci probíhá plasmolýza po 30' při 0°C. Dalším krokem je sonikace, kdy počet 1/2 minutových sonikací je nutno stanovit na základě průběžné mikroskopické kontroly a analýzy cytozolických bílkovin uvolňovaných z homogenátu.

Očistěné stěny jsou odděleny centrifugací přes polštářek: 50% sacharoza, 10mM DTT, 20mM Hepes pH 7,5. Podíl polštářku a homogenátu je 1:1. Následuje centrifugace - 15' / 14 000g / 3°C . Sedimentované stěny se smíchají s 2mM merkptoetanolem a uchovávají se při -20°C. Před dalším zpracování je merkptoetanol pečlivě vymyt vodou a stěny jsou zmrazeny v tekutém dusíku. Zmražené stěny jsou homogenizovány pufrem bez detergentů a soli a po centrifugaci je hladina bílkovin v supernatantu testována kvantitativně i kvalitativně a tím stanovena čistota preparace. Supernatant takto získaný by neměl obsahovat žádné bílkoviny. Nekovaletně i kovalentně vázané bílkoviny stěn jsou příslušnými pufrý extrahovány a děleny na 1-D či 2-D SDS PAGE.

Analýza glykoproteinů pomocí inhibitorů N-glykosylace.

Metoda je použitelná pro N-glykosylované a de novo syntetizované bílkoviny (ověřeno lektinem ConA na W-blotu a fluorograficky po aplikaci značených aminokyselin). Při studiu N-glykoproteinů je možno použít inhibitorů glykosylace, tunikamycinu a castanosperminu (Elbein 1987).

Tunicamycin v rozsahu 200ng-200ug/1ml může zcela zablokovat navazování glykanového řetězce na nascentní bílkovinu syntetizovanou na ER. Objevují se tak plně glykosylované a deglykosylované formy příslušné bílkoviny. Molekulová hmotnost nascentní podoby bílkoviny je prvním důležitým údajem. Sledování translokace obou forem studované bílkoviny do vyisolovaných buněčných kompartmentů ukáže roli glykanu při ochraně proti proteázám a při putování buňkou. Vzhledem ke specifčnosti reakce tunikamycinu je možno z poruchy buněčných funkcí po jeho aplikaci usuzovat na funkci příslušného glykoproteinu.

Castanospermin je nutno dodávat ve vyšší koncentraci, od 250ug-900ug/1ml . Tento inhibitor blokuje glukozidázu I a II , takže nově syntetizovaný glykoprotein odchází z ER nadbytečně glykosylován a glykoprotein má vyšší molekulovou hmotnost. Tato forma glykanu nedovoluje pokračovat v dalších, funkčně nejdůležitějších glykosylacích, které probíhají na Golgi. Kombinací obou inhibitorů je možno získat důležité informace o roli glykanů a tím i o roli glykoproteinu v buňce.

SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek

Čeřovská, N., Moravec, T.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6
tel: 02/243 101 08

Princip metody:

V současné době existují dva rozdílné přístupy k vytvoření kolekce peptidových sekvencí sloužících pro studium vazebných interakcí peptid-protein, genetický a syntetický. Genetický přístup zahrnuje klonování: a bakteriální expresi náhodných DNA fragmentů jako fúzních proteinů a následný imunochemický rozbor produkovaných proteinů a sekvenční analýzu pozitivních klonů.

Druhý, syntetický přístup, je reprezentován metodou syntézy peptidů na pevné fázi. Repräsentantem tohoto přístupu je např. systém SPOTs dodávaný firmou Cambridge Research Biochemicals. SPOTs je nová technika, která umožňuje syntézu stovek peptidů na pevné fázi ve formě vhodné pro systematickou analýzu epitopů protilátek. Systém je jednoduchý, rychlý a relativně ekonomický ve spotřebě reagentů. Pevný nosič s navázaným peptidem je možno po regeneraci (odvázání protilátek) použít opakovaně, a tak jedna syntéza poslouží pro otestování vazebných vlastností více protilátek.

SPOTs je metoda, pomocí které mohou být simultánně syntetizovány peptidy na derivatizované celulózoové membráně a následně analyzována jejich imunologická reaktivita. Membrána je derivatizována tak, že nese volné aminoskupiny. Tyto volné aminoskupiny jsou uspořádány v malých kruhových skvrnách (spotech) v matici 8x12.

Pentafluorophenyl nebo N-hydroxy-oxo-dihydro-benzotriazin (Dhbt) estery aminokyselin chráněných pomocí skupiny Fmoc (9-fluorenylmetoxykarbonyl) se v prvním kroku naesterifikují na volné hydroxylové skupiny celulózoové membrány do spotů, které byly označeny výrobcem již před navázáním první aminokyseliny pomocí bromfenolové modři (BPB). Po promytí a acylaci všech zbývajících volných aminoskupin se membrána inkubuje v piperidinu, který uvolní Fmoc chráněné funkční alfa aminoskupiny. Ty se opět vybarví BPB. Tato volná aminoskupina pak umožňuje peptidové vazby s další aminokyselinou.

Po ukončení syntézy se peptidy navázané na membráně analyzují nepřímým imunologickým tasterem za užití chromogenního substrátu. Pozitivní reakce protilátek s nasyntetizovanými peptidy se projeví vybarvením spotu. Po ukončení imunochemického testu může být membrána regenerována, protilátky odváznány a nasyntetizované peptidové determinanty lze použít pro další imunoreakce.

Laboratorní vybavení:

Pro první použití si je nejlépe opatřit SPOTs kit od firmy od Cambridge Research Biochemicals, který obsahuje i vše potřebné, včetně programu pro generování sekvencí syntetizovaných peptidů. Mimo speciálních chemikálií (např. chráněné estery aminokyselin, membrány, rozpouštědla, molekulová síta, protilátky) je nutné mít funkční digestoř, třepačku, automatické pipety na odměření různých objemů, teflonovou misku se skleněným víčkem pro provedení syntézy. Dále je nutné mít zajištěnou odbornou likvidaci použitých organických rozpouštědel.

Pracovní postup:

Nejprve se musí připravit a otestovat používaná rozpouštědla na nepřítomnost volných aminů, které by interferovaly s reakcí BPB. a alfa aminoskupiny aminokyselin. . Nevyhovují-li komerčně dodávaná rozpouštědla (N, N-dimethylformamid (DMF), 1-Methyl 2-pyrrolidon (NMP)) je nutné je přecistit přes molekulová síta 4A.

Po té si musíme rozvrhnout počet vazebných kroků v pracovním dnu, jeden cyklus trvá přibližně 90 min.

Navážíme estery aminokyselin, rozpustíme v NMP a rozdělíme na několik dávek, uskladníme je při -70°C , alikvoty používané tentýž den stačí uchovat při -20°C . (Pozor na nestabilitu argininového derivátu, musí se odvažovat pro každý krok čerstvý!)

Aminokyseliny nanášíme podle schématu generovaného počítačovým programem, který je součástí kitu, nebo dle vlastního schématu do modrých spotů na membránu. Přidáním acetanhydridu dochází k acylaci všech nezreagovaných aminoskupin. Dále se působením roztoku piperidinu v DMF odštěpí Fmoc chránící skupina z alfa aminoskupiny.

Posledním krokem syntézy je vybarvení spotu reakcí BPB s alfa aminoskupinou. Mezi jednotlivými kroky je membrána několikrát promývána DMF a dalšími rozpouštědly. Po skončení kteréhokoliv cyklu lze syntézu přerušit, tj. membránu vysušit metanolem a uschovat vakuově zatavenou v igelitovém sáčku při -20°C a kdykoli pokračovat v reakci. Po skončení posledního cyklu syntézy se musí odstranit ochranné skupiny na postranních řetězcích aminokyselin v peptidu kyselinou trifluoroctovou v dichlormetanu. Po následném vymytí a vysušení je membrána připravena pro imunochemickou reakci. Její podstata spočívá ve vazbě příslušné protilátky se specifickou aminokyselinovou sekvencí (nasyntetizovaným peptidem), reprezentující spojitý konformačně nezávislý epitop. Jde v podstatě o formu ELISA testu na celulózové membráně. Jako sekundární protilátka se používá protilátka značená beta galaktosidázou, jejíž chromogen se snadněji odstraňuje z membrány při regeneraci.

Výsledky imunoreakce se vyhodnocují vizuálně podle zbarvení skvrn.

Metoda je velmi elegantní, rychlá (stovky peptidů v průběhu několika dnů), finálně náročnější.

Uskalí metody:

Metoda je velmi náročná na soustředění, na každý z téměř stovky spotů se nanáší jiná aminokyselina, jediné překápnutí zcela mění syntetizovanou sekvenci. Dále je třeba přísně dodržovat pravidla pro práci s rozpouštědly (při kontaktu odpadní TFA s DMF může dojít k prudké exotermní reakci či explozi).

Tipy a triky:

Naším vylepšením metody je používání N, N -dimethylacetamidu místo N, N-formamidu. Dimethylacetamid je mnohem stabilnější po otevření, neobsahuje volné aminoskupiny a tím odpadá příšerná a zdouhavá práce při přípravě molekulových sít (žihání sít při vysoké teplotě) a následné časově náročné čištění rozpouštědel. DMF, komerčně dodávaný v deklarované čistotě se ukázal jako velmi nestabilní a po ve velmi krátké době otevření obsahoval volné aminy.

Srovnání s alternativními metodami:

Podobná metoda syntézy peptidů (pin method,) pro tyto účely byla navržena Geysenem et al., (1984). Její podstata spočívá v syntéze peptidů na špicích polyakrylátem potažených polyetylenových hrotů. Výhodou SPOTs metody je možnost opětovného použití regenerované membrány pro několik protilátek.

Vedle zde uvedené metody SPOTscan lze uvedenou metodu použít i pro syntézu analogických peptidů (SPOTsalogue) a též pro určení velikosti epitopu (SPOTsize) nebo pro namnožení určité proteinové sekvence (SPOTsalot).

Literatura:

Blankenmeyer-Menge B. and Frank, R., (1990). New methods for the simultaneous multiple synthesis of protected peptide fragments on cellulose disc supports. In "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis"- 1989, (Epton, R., ed.), Chapman and Hall Medical, London pp, 1-10.

Blankenmeyer-Menge B., Nimtz M. and Frank R. (1990). An efficient method for anchoring Fmoc-amino acids to hydroxyl-functionalised solid supports. Tetrahedron letters, 31, No. 12, 1701-1704.

Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism

Dobrev, P., Kamínek, M.

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha 6
tel: 02/36 83 05, 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59 , e-mail: dobrev@ueb.cas.cz

1. General considerations

Biosynthesis of compounds is a part of plant metabolism in which the product of biosynthesis is simultaneously metabolite of its precursor(s). However, the approach to biosynthesis and metabolism studies of particular substance is different. Biosynthesis studies are focused on investigation of biochemical pathways leading to synthesis of compound(s) of interest. On the other hand in metabolism studies the fate of compound of interest in biological system is analyzed. Several important aspects have to be considered before beginning of studies of biosynthesis and metabolism :

- *Choice of biological material.* Ideally, a biological system rich in investigated compounds which have already been qualitatively and quantitatively characterized should be used.
- *Choice of precursor.* In *in vivo* biosynthesis studies substances suspected to be precursors of investigated compound(s) are fed to the tissue. The right precursor should be specific for investigated compound(s), i.e. with high rate of conversion. Good permeability of precursor into tissue is also necessary. Precursor has to be available in radioactive or heavy labeled form.
- *Choice of detection mode of products and intermediates.*

a) Heavy atom labeled precursor

Advantages: Identification of products by mass spectrometric(MS) detector is the most unambiguous, allowing work without radioactivity.

Disadvantages: Limiting factor is the sensitivity of MS-detector. If the rate of conversion of substrate(s) to product(s) is low, the tissue must be fed with high amounts of precursor to obtain detectable amounts of product(s). This, however, can be expensive and nonphysiological. The heavy labeled products are "visible" only if their molecular masses are known, in other words one must have an idea what products to expect.

b) Radioactivity labeled precursor

Advantages: Precursor of high specific activity can be applied in low (physiological) concentration. All products are radioactively "visible".

Disadvantages: Identification, based only on chromatographic properties is questionable, identity of products should be confirmed by additional enzymatic and chemical conversions. Work with radioactivity.

2. Cytokinins as object of biosynthesis and metabolism studies

In general, studies of biosynthesis and metabolism of cytokinins are hampered by the extremely low levels of these compounds in plant tissues. As with other plant hormones, levels found are 10^{-9} up to 10^{-6} mol.(kgFW)⁻¹. Use of plant material with high cytokinin content and turnover, such as actively dividing tissues, is preferable. Another difficulty is caused by the central role of the most likely cytokinin precursors (adenine, adenosine or its nucleotides, mevalonic acid) in plant metabolism. Thus, a major part of the precursor is incorporated into common purine metabolites, and only very small part is incorporated into cytokinins. Due to this low conversion rate the use of radiolabeled precursor is preferred. Most of investigations in which mevalonic acid (precursor of isoprenoids- constituents of side chain of cytokinins) was used as precursor of cytokinins, were unsuccessful.

3. Procedures in study of cytokinin biosynthesis and metabolism

- Application of the precursor.

Solution containing radioactive precursor (most often ^3H - or ^{14}C -Ade) can be (1) directly applied on the surface of the tissue, (2) introduced in well, from which is sucked by an organ or (3) added to incubation mixture in which tissue is submersed.

Appropriate incubation conditions, such as optimal temperature (25-30°C), buffered pH and shaking can improve the uptake of precursor. Incubation time should be neither very short to allow uptake of enough radioactivity by cells, nor too long to prevent further metabolite conversions (usually 1-10 hours).

- Extraction and purification of metabolites.

Extraction proceeds at low temperatures (Ł -20°C) with extractant minimizing activities of phosphatases, e.g. 60% methanol, 5% formic acid, 35% water(v/v).

Metabolites can be purified by standard procedure for determination of endogenous cytokinins, as e.g.:

Extract is passed through C18 column to remove most of lipophilic contaminants.

After evaporation and redissolving in acidic buffer (pH=3), the sample is applied to cation exchange resin SP-Sephadex. This exchanger shows very good retention and high recoveries for cytokinin bases, ribosides and glucosides.

Cytokinin nucleotides are purified by anion exchange chromatography on DEAE-Sephadex.

-Identification of products.

Unambiguous identification of the radioactive products is only possible by applying of combination of chromatographic, enzymatic and chemical methods.

a) Chromatographic methods

Chromatographic identification is based on the coincidence of retention times of radioactive products with standards. The metabolites are run on two or more chromatographic systems with different mobile and stationary phases. No shift of the retention times of product from the standard should occur when changing to other chromatographic system. Column chromatography (including IAC), paper chromatography, 1D and 2D-TLC, and HPLC are used.

b) Enzymatic methods

Cytokinin nucleotides are identified enzymatically by treatment with nucleotidase. The released riboside is identified chromatographically. 5'-Nucleotidase is used for determination of 5'-phosphates. Cytokinin 3- and O-glucosides are deglycosylated by b-glucosidase and identified as corresponding aglucons.

c) Chemical methods

Treatment with diluted acids (HCl or TFA) removes ribose moiety and hydrolyzes the double bond of the side chain.

Sodium periodate with subsequent addition of cyclohexamine removes the ribose and cleaves the side chain.

Diluted aqueous permanganate at neutral pH and room temperature oxidizes the double bond and cleaves the side chain.

The identification usually proceeds in this sequence:

First, the products are fractionated chromatographically. Then fractions of interest are treated enzymatically and/or chemically and are again chromatographed. Shifts of retention times should be observed depending on the treatment.

Literature:

Hall R.H., (1970) N⁶-(D²-Isopentenyl)adenosine: Chemical reactions, biosynthesis, metabolism, and significance to the structure and function of tRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 10, pp 57-86

- Horgan R., Palni L.M.S., Scott I., and McGaw B. (1981) Cytokinin biosynthesis and metabolism in *Vinca rosea* crown gall tissue. In: *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Eds. Guern J. and Péaud-Lenoël C. Springer-Verlag, Berlin, pp 56-65
- Letham D.S. (1994) Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: *Cytokinins Chemistry, Activity and Function*. Eds. Mok, D. and Mok, M. CRC Press, Boca Raton, pp. 57-80.
- Letham D.S. and Palni L. M. S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, vol. 34, pp 163-197

Frakcionace bílkovin z vegetativních částí rostlin na základě jejich rozdílné rozpustnosti

Faltus, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, oddělení šlechtitelských metod, Drnovská 507, 16106 Praha 6 Ruzyně.

tel: (420) 02/36 08 51-9, fax: (420) 02/36 52 28, 02/36 52 29, 02/36 58 84, e-mail:

faltus@hb.vurv.cz

Tato metoda představuje postupnou chemickou extrakci bílkovin z vegetativních částí rostlin pomocí pufrů o různé iontové síle a různých detergentů. Frakcionace bílkovin je založena na jejich rozdílné rozpustnosti, která je ovlivněna způsobem a silou vazby bílkovin. Podmínkou při vypracování tohoto postupu bylo zachování molekul bílkovin při extrakci v nativním stavu, aby bylo možné stanovit tepelnou stabilitu bílkovin v jednotlivých frakcích a izolovat subfrakce tzv. "heat-stable" (nebo také "boiling-soluble") bílkovin. To znamená bílkovin, které při teplotě varu (100°C) nedenaturují a zůstávají rozpustné.

Při extrakci bílkovin jsou postupně získány čtyři frakce. První frakce, získaná pomocí pufru o nízké iontové síle, obsahuje rozpustné bílkoviny. Druhá frakce je získána puftrem o vysoké iontové síle a obsahuje bílkoviny vázané v pletivech převážně polárními interakcemi. Třetí frakce je získána puftrem o vysoké iontové síle obsahujícím neiontový detergent. Bílkoviny této frakce jsou vázány hydrofobními silami. Ve všech těchto frakcích nedochází při extrakci k denuraci bílkovin, a proto je u nich možné izolovat subfrakce tepelně stabilních bílkovin. Čtvrtá frakce je extrahována puftrem o vysoké iontové síle obsahujícím iontový detergent. Při extrakci dochází ke ztrátě nativního charakteru molekul bílkovin, a proto zde není možné izolovat subfrakce tepelně stabilních bílkovin. Tento krok extrakce byl zařazen pro stanovení a izolaci bílkovin, jejichž vazba nebyla překonána v prvních třech krocích extrakce.

Chemikálie: Tris, HCl, NaOH, sacharosa, EDTA, PMSF, 2-merkaptoethanol, nerozpustný PVP, Triton X-100, SDS, aceton, redestilovaná voda, tekutý dusík.

Přístroje: Chlazená centrifuga (16000g), laboratorní mixer, mrazák, pH-metr, teplotně regulovaná vodní lázeň, analytické váhy, předvážky.

Pracovní postup: V předem vychlazené třecí misce rozetřeme 1g rostlinného materiálu v tekutém dusíku. Přidáme 0,05g nerozpustného PVP a 5ml homogenizačního pufru o nízké iontové síle (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 10%(w/v) sacharosa, 5 mM EDTA, 1%(w/v) PMSF, 1%(v/v) 2-merkaptoethanol). Homogenát centrifugujeme 20 minut při 16000 g v chladu. Supernatant obsahuje frakci rozpustných bílkovin. Sediment přelijeme 5ml extrakčního pufru o vysoké iontové síle (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 10%(w/v) sacharosa, 5 mM EDTA, 1%(w/v) PMSF, 1%(v/v) 2-merkaptoethanol). Sediment rozsuspendujeme skleněnou tyčinkou a po 10 minutách extrakce v ledové lázni třepeme 1 minutu. Po dalších 10 minutách extrakce v ledové lázni třepeme další minutu a opět necháme 10 minut extrahovat v ledové lázni. Centrifugace probíhá za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Supernatant obsahuje frakci bílkovin vázaných polárními interakcemi. Extrakce další frakce bílkovin i centrifugace probíhají obdobným způsobem jako v předchozím případě; extrakční pufr o vysoké iontové síle obsahuje navíc neiontový detergent Triton X-100 (3% v/v). Získaná frakce obsahuje bílkoviny vázané hydrofobními silami. Poslední frakce je extrahována a centrifugována obdobným způsobem jako předchozí dvě frakce, ale při laboratorní teplotě. Extrakční pufr o vysoké iontové síle obsahuje v tomto případě iontový detergent SDS (1% w/v), který způsobí denuraci extrahovaných bílkovin. Izolované frakce

bílkovin rozpipetujeme po 200 ml do mikrozkušavek a přelijeme 1 ml vychlazeného acetonu s 1% (v/v) 2-merkptoethanolem a uchováme v mrazáku při teplotě minimálně -20°C .

Izolované frakce bílkovin jsou dále rozděleny pomocí 1D SDS-PAGE (Čapková et al., 1987). Elektroforetická spektra bílkovin jsou vyhodnocena pomocí softwaru Elfoman 2.0-BETA.

Cena chemikálií potřebných na zpracování jednoho vzorku, tzn. 1g rostlinného materiálu činí asi 50 Kč. Jeden vzorek (1g rostlinného materiálu) se zpracuje asi za 4 hodiny a získají se čtyři frakce a z nich případně další tři subfrakce tepelně stabilních bílkovin.

Měření obsahu bílkovin pomocí běžně užívaných metod (Lowry et al., 1951, Bradford, 1976 a Warburg a Christian, 1942) ruší složení extrakčních pufrů a přítomnost detergentů. Část extrahovaných bílkovin, které zůstávají v sedimentu po slítí supernatantu, se dostává do následné frakce bílkovin. To se může projevit v elektroforetickém spektru zejména u bílkovin, které jsou silně zastoupené.

Tento postup byl odzkoušen pro zelené listy obilovin. Velikost zpracovávaného vzorku je v tomto postupu ovlivněna paralelní izolací tepelně stabilních subfrakcí bílkovin prováděnou v naší laboratoři. Pokud nepotřebujeme získat tyto subfrakce lze použít jen čtvrtinu vzorku. Pro stanovení obsahu bílkovin lze doporučit metodu podle Schaffnera a Weissmanna (1973). Pro dokonalé oddělení bílkovin do jednotlivých frakcí je třeba po každé extrakci provádět promývání sedimentu pomocí pufru se stejným složením jako při její extrakci. Použití neiontového detergentu Triton X-100 se ukázalo výhodnější než použití "zwitterionic" detergentu CHAPS. Triton X-100 byl účinnější při extrakci hydrofobně vázaných bílkovin než CHAPS. Vyšší iontová síla extrakčních pufrů a použití sacharosy v tomto postupu zlepšuje následné rozlišení bílkovin rozdělených pomocí elektroforézy.

Dunbar (1988) uvádí čtyři základní způsoby frakcionace bílkovin. Frakcionaci organel pomocí centrifugace a elektroforézy, frakcionace na základě rozpustnosti ve vodě, metody chemické extrakce pro analýzu bílkovin a diferenciální adsorpci bílkovin na nabitých maticích. Frakcionace organel pomocí centrifugace vyžaduje poměrně drahé vybavení (ultracentrifuga) a také je časově dosti náročná. Při frakcionace podle rozpustnosti bílkovin ve vodě dochází při získání ve vodě nerozpustné frakce k denaturaci bílkovin a není možné zjistit u nich jejich tepelnou stabilitu. Metody chemické extrakce jsou založeny na odolnosti a citlivosti buněčných bílkovin k použitým extrakčním činidlům. Při extrakci se obvykle užívá pro každou frakci samostatný vzorek. Diferenciální adsorpce bílkovin na nabitých maticích neřeší otázku extrakce bílkovin, ale jejich následné dělení na základě fyzikálně chemických a biologických vlastností.

Zde uváděná metoda chemické frakcionace spočívá v postupné extrakci bílkovin z jednoho vzorku na základě různého způsobu a různé síly vazby bílkovin. Není náročná na přístrojové vybavení (centrifuga do 16000g). Výhodou této metody je získání tří různě definovaných frakcí bílkovin v nativním stavu z jednoho vzorku a možnost izolace subfrakcí tepelně stabilních bílkovin.

Literatura:

- Bradford, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Čapková, V., Hrabětová, E. a Tupý, J., 1987: Protein changes in tobacco pollen culture; a newly synthesised protein related to pollen tube growth. *J. Plant Physiol.* 130: 307-314.
- Dunbar, B.S., 1988: Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York, 372 p.p., ISBN 0-306-42839-3.

- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. a Randall, H.J., 1951: Protein measurement with the Folin fenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Schaffner, W. a Weissmann, P.C., 1973: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56: 502-514.
- Warburg, O. a Christian, W., 1942: Isolierung und krystalisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421.

Další doporučená literatura:

- Bollag, D.M. a Edelstein, 1991: *Protein methods*. Wiley-Liss, Inc., New York, 230 p.p., ISBN 80-200-0180-8.
- Králová, M., Draždák, K., Pospíšil, Hadačová, V., Klozová, E., Luštinec, J., Kutáček, M. a Sahulka, J., 1994: *Vybrané metody chemické analýzy půd a rostlin*. Studie ČSAV, č. 12, Academia, 160 p.p., ISBN 80-200-0180-8.

Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán

Feltl, T.

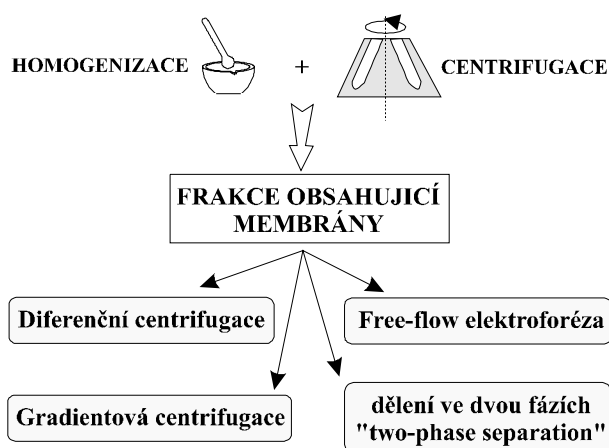
Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 16/15, 166 30 Praha 6
tel: 02/36 81 56, fax: 02/36 81 59, e-mail: feltl@ueb.cas.cz

Při studiu funkcí jednotlivých proteinů (např. enzymů, receptorů, membránových kanálů, přenašečů, apod.) dříve nebo později narazíme na otázku lokalizace daného proteinu. Je zřejmé, že kompartmentace metabolických procesů je nezbytnou součástí jednotlivých procesů a regulačních mechanismů a bez informace, kde v buňce se studovaný protein nachází nelze sestavit funkční schéma studovaného procesu.

Zásadně lze rozdělit proteiny na cytosolické a membránové (k membránovým proteinům budu v tomto přehledu počítat i proteiny pevně asociované s membránami). Možná je ještě třetí varianta a to, že studovaný protein se nachází uvnitř některé z organel. Prvním a nezbytným krokem studia těchto proteinů je izolace dané organely v intaktním stavu.

Jde-li o membránový protein, je nutné zjistit v membráně které organely se protein nachází. K tomu je potřeba rozdělit směs membránových vezikul získaných při homogenizaci (viz. dále). Následující přehled by měl ukázat možné přístupy a postupy používané při takovémto dělení.

(Je též možné při získávání určitých membránových frakcí vycházet z izolovaných organel, např. z izolovaných vakuol při získávání tonoplastu. Nevýhodou tohoto postupu je však poměrně náročná izolace dané organely v prvním kroku a s tím spojená malá výtěžnost celého postupu. Výhodou je naopak vysoká čistota výsledné frakce. Podrobněji se zde o tomto postupu nebudu zmiňovat).



Obr.č.1: Některé metody použitelné při dělení vnitrobuněčných membrán.

Některé z možných přístupů (viz.obr.č.1)

Diferenční centrifugace

Nejhrubší, i když někdy postačující, rozdělení vnitrobuněčných komponent dosáhneme pomocí diferenční centrifugace. Tato metoda je založena na rozdílné hodnotě sedimentačního koeficientu složek směsi. V tabulce č.1 jsou uvedeny podmínky pro sedimentaci různých částí rostlinné buňky. Pro některé složky, jako jádra, chloroplasty a mitochondrie je tato metoda dobře použitelná. Dělení membránových

| buněčné části | $\times g_{max}$ | čas (min) | g/min |
|----------------------------------|------------------|-----------|---------|
| celé buňky | 500 | 5 | 2 500 |
| jádra | 500 | 7 | 3 500 |
| chloroplasty | 2 000 | 2 | 4 000 |
| mitochondrie | 6 000 | 15 | 90 000 |
| Golgiho aparát | 10 000 | 20 | 200 000 |
| plasmatická membrána | | | |
| tonoplast | 16 000 | 20 | 320 000 |
| peroxisómy | 17 500 | 20 | 350 000 |
| endoplazmatické retikulum | 17 500 | 20 | 350 000 |
| opláštěné vesikly (mikrovesikly) | 20 000 | 20 | 400 000 |

Tab.č.1: Parametry sedimentace některých buněčných částí v 0,25M sacharose.

veziklů ostatních typů je však většinou značně nedokonalé. Znečištění frakcí ostatními membránami stoupá, zejména pokud jde o endoplazmatické retikulum (ER), tonoplast a Golgiho aparát.

Protože pomocí diferenciální centrifugace nezískáme frakce vysoce obohacené o určitou složku, je využívána především pro přípravu hrubých frakcí, které jsou dále děleny pomocí některé z níže popisovaných metod (Prosser et al., 1989).

Tipy, triky, náročnost: Pokud jsme začali studovat lokalizaci určitého proteinu, přináší nám tato metoda prvotní informaci o přibližné lokalizaci proteinu. Na základě této informace můžeme volit další postup (např. rozsah sacharózového gradientu). Náročnost této metody závisí na počtu provedených centrifugací (viz.tab.č.1).

Příprava frakce membránových veziklů (mikrozomální frakce-MF)

Frakci obsahující vezikly vnitrobuněčných membrán připravíme pomocí dvou centrifugací, z přefiltrovaného homogenátu našeho materiálu. První centrifugací (5000 x g R_{av} , 15 min.) odstraníme nezhomogenizované buňky, fragmenty buněčných stěn, jádra, mitochondrie a chloroplasty. Supernatant obsahuje z velké části membránové vezikly a rozpustné látky. Pomocí druhé centrifugace (150 000 x g R_{av} , 45 min.) získáme sediment obsahující pouze membránové vezikly. Supernatant obsahuje rozpustné látky. Rehomogenizovaný sediment vnitrobuněčných membránových veziklů, mikrosomální frakce (MF), je výchozím materiálem pro další dělení.

Mikrosomální frakci tvoří směsná populace veziklů o velikosti 0,2 μm -0,8 μm (deDuve, 1964; Sze, 1985). Každý z veziklů je zpravidla tvořen pouze jedním typem membrány (Morre *et al.*, 1987). Membránové vezikly se mohou vyskytovat ve dvou formách, buď je zachována původní orientace membrány (“outside-out”), nebo je převrácená (“inside-out”).

Gradientová centrifugace

Pomocí gradientové centrifugace dosáhneme mnohem lepších výsledků, než v případě diferenční centrifugace. K dělení membránových veziklů dochází podle jejich vznášivé hustoty, která více či méně odpovídá určitému membránovému typu. Gradientovou centrifugaci můžeme rozdělit dle typu gradientu na kontinuální (hustota gradientu se mění postupně, příprava pomocí spojených nádob) a diskontinuální (hustota se mění krokově, příprava navrstvením určitého počtu roztoků o různé hustotě). Centrifugaci je možné také dělit na centrifugaci izopyknickou (částice sedimentují do vrstvy gradientu se stejnou vznášivou hustotou (r) a zastaví se) a izokinetickou (částice sedimentují určitou rychlostí úměrnou svým sedimentačním koeficientům (S), nedochází k dosažení hustotní rovnováhy). Maximálního rozlišení je možné dosáhnout postupnou kombinací dělení podle S a následně podle r . Konkrétní volba podmínek (použitá sloučenina pro tvorbu gradientu [nejčastěji sacharóza, pokud je na závalu vysoký osmotický tlak - hydrofilní sacharidy jako dextran nebo Ficoll], rozsah gradientu) centrifugace závisí na zpracovávaném materiálu. Problémem je oddělení PM od chloroplastových membrán, které mají velmi blízké vznášivé hustoty (Poole, 1984).

V případě izolace ER lze využít postupu, který kombinuje diskontinuální sach. gradienty s vysokým a s nízkým obsahem iontů Mg^{2+} (Lis a Weiler, 1994), které mají vliv na dělení ER (přechos sER na rER a zpět).

Tipy, triky, náročnost: Pokud nepracujeme s celými buňkami (resp. protoplasty) a nejde nám o zachování nízké hodnoty osmotického tlaku, je výhodné (zejména finančně) použít sacharózového gradientu. Nutné je použití sacharózy určené speciálně pro gradientové centrifugace. V průběhu experimentů nedoporučuji zaměřovat výrobce chemikálií (např. Sigma x Beckman - v obohacení výsledných frakcí určitými membránami byl prokazatelný rozdíl při použití sach. od uvedených firem). Včetně homogenizace materiálu je časově zvládnutelný celý postup během 2 dnů. Pokud použijem pro centr. gradientu ultracentrifugu (260 000 x g R_{av} , 2,5 hod. - nutno experimentálně stanovit, údaj pro MF z listů *Ch. rubrum*), je možné získat finální frakce během jednoho dne! Nevýhodou je nutnost vlastnit ultracentrifugu, kterou nezbytně potřebujeme pro přípravu MF.

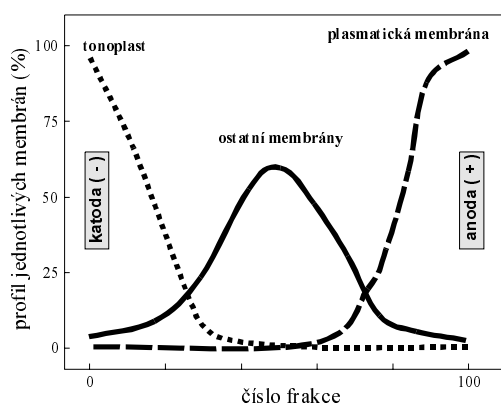
Př.: Pro dělení MF z listů *Ch. rubrum* bylo použito lineárního sacharózového gradientu 18-38% (hm./hm., v suspenzním pufru- 1,1 M glycerol, 5 mM DTT, 10 mM Tris-MES (pH 8,0)), izopyknická centrifugace (30 000 x g R_{av} , 15 hod.). Došlo k dobrému rozdělení membrán ER (rER x sER), PM, tonoplastu, mitochondrií. Ostatní membrány nebyly sledovány.

Free-flow elektroforéza

Kontinuální free-flow elektroforéza (obr.č.2) je šetrná, relativně rychlá a efektivní separační metoda, použitelná k separaci proteinů, k dělení a izolaci živých buněk, buněčných organel a membránových systémů. Teoretickými aspekty použití této metody v biologii se zabývá práce Hanniga a Heidricha (1977). Fyzikální teorie metody je důkladně probrána v práci Hanniga a spolupracovníků (1975) a Zeillera a spolupracovníků (1975). Z hlediska preparace jednotlivých vnitrobuněčných membrán je zajímavá například možnost rozlišit membránové vezikly orientované “outside-out” a “inside-out”. Uplatnění bylo též nalezeno v separaci plazmatické membrány od tonoplastu (Auderset *et al.*, 1986), v přípravě vysoce čisté plazmatické membrány a tonoplastu (Canut *et al.*, 1988; Sandelius *et al.*, 1986; Canut *et al.*, 1990), popř. v separaci jiných vnitrobuněčných membrán (Klingler *et al.*, 1991). Pro purifikaci PM se dnes spíše častěji používá postup dělení ve dvou fázích, označovaný jako “two-phase” systém.

Vlastní metoda je založena na existenci “částic” s různou hustotou povrchového náboje, který je udílen “částici” jejími funkčními skupinami. Takováto “částice” je od ostatních “částic” více či méně separována působením elektrického pole v dělicí komoře.

Při typickém průběhu dělení (obr.č.3) získáme frakci vysoce obohacenou o tonoplast (blíže katody) a frakci vysoce obohacenou o PM (blíže anody). Ostatní membrány zůstávají uprostřed separačního pole.



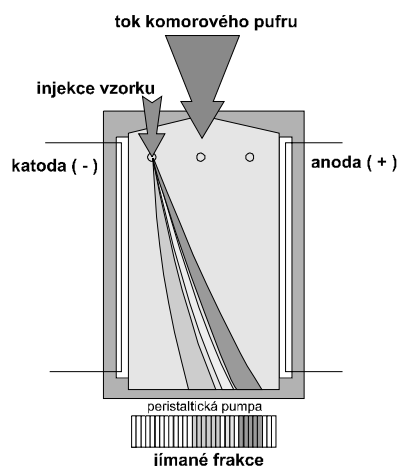
Obr.č.3: Typický průběh dělení membránových veziklů pomocí free-flow elektroforézy.

MF 3ml/hod., teplota komory 4°C. Složení pufrů komorový pufr-(vodivost 0,90 mS/cm), 15 mM trietanolamin, 4 mM octan draselný, 10 mM glukóza, 30 mM sacharóza, 240 mM glycin, pH 7,5 (upraveno ledovou kys.octovou), elektrodový pufr-(vodivost 1,93 mS/cm), 45 mM trietanolamin, 12 mM octan draselný, 720 mM glycin, pH 7,5.

Dělení ve dvou fázích “two-phase separation”

Systém dělení ve dvoufázovém systému vodných polymerů se používá ke získání frakce vysoce obohacené o PM. Tato metoda, obdobně jako free-flow elektroforéza, dovoluje oddělit vezikly PM od chloroplastových membrán (což není dokonale možné pomocí centrifugace).

Dělení probíhá na základě různého povrchového náboje membrán. MF se smísí s dextranem T-500 (dex) a polyetylglykolem 3350 (PEG) obsahujícím NaCl nebo KCl (obr.č.4). Povrchový náboj se může u různých

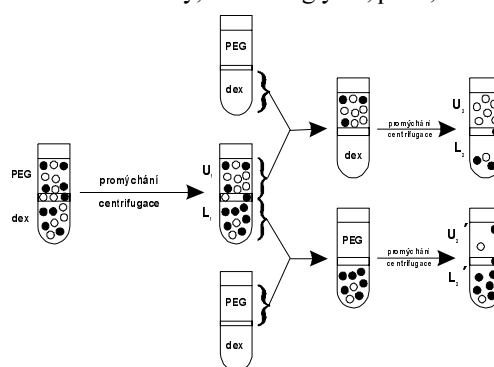


Obr.č.2: Schéma free-flow elektroforézy

Tipy, triky, náročnost: Pokud chceme oddělit tonoplast od membrán ER, nebo získat PM, je velmi výhodné využít této metody. Protože se vzorek pohybuje ve velmi úzkém prostoru mezi dvěma deskami, je důležité precizní resuspendování MF. Časově náročné je zejména odladění aplikace metody na určitý materiál. Postup, počínaje homogenizací materiálu, je možné zvládnout během dvou dnů. Doba vlastního dělení je závislá na rychlosti průtoku komorového pufru a rychlosti průtoku děleného vzorku.

Nevýhodou této metody je nutnost vlastnit free-flow elektroforézu. Přístroj, použitelný pro dělení rostlinného materiálu, se dle mých informací nenachází v naší republice.

Př.: Pro dělení MF z listů *Ch. rubrum* byla použita Free-flow elektroforéza Elphor VAP 22 (Bender & Hobein, Munich, Germany). Dělení probýhalo za těchto podmínek: proud 120mA, (napětí 1200V), průtok KP 4,5ml/frakci/hod., průtok

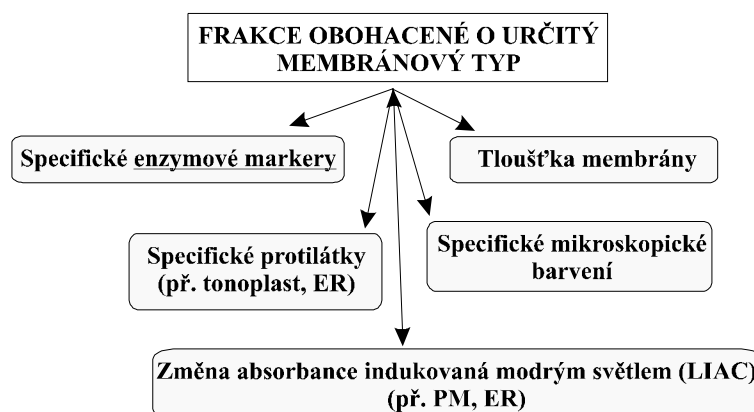


Obr.č.4: Znázornění separace PM pomocí “two-phase” systému (PM-bílá kolečka)

rostlinných druhů lišit, je nutné vyzkoušet různé koncentraci dex, PEG, a soli (Morre *et al.*, 1987; Briskin *et al.*, 1987).

Tipy, triky, náročnost: PM připravená tímto způsobem vykazuje vysokou čistotu, a je ideální pro její studium. Důležité je použít centrifugačních kyvet z kvalitního skla (Corex, USA), nebo použít silikanizované sklo. Velkou výhodou metody je její rychlost. Celý postu je zvládnutelný během 4 hodin. Důležité je “nepřeloudovat” systém! Na 16 g směsi lze pro úspěšnou izolaci nanést MF z 12 g čerstvých listů špenátu, avšak pouze MF z 8 g čerstvých listů *Ch. rubrum*.

Př.: Pro získání frakce vysoce obohacené o PM z MF listů *Ch. rubrum* byl použit tento systém: 5,7 % (hm./hm.) dextran T-500, 5,7 % (hm./hm.) polyethylenglykol 3350, 3mM KCl, 0,5mM fosfátový pufr (pH 7,8), 0,22M sacharosa. Směs byla 20x promýchána a centrifugována ($1500 \times g R_{av}$, 5 min.). Tento krok byl opakován do frakce U_3 (viz. obr.č.4). Tato frakce byla vysoce obohacena o PM.



Obr.č.5: Některé z možností identifikace vnitrobuněčných membrán

| Část buňky (b. membrána) | přibližná tloušťka | příklad markeru |
|----------------------------------|--------------------|---|
| Plazmatická membrána (PM) | 10 nm | -glukansyntasa II -vanadáten inhibovaná K^+ -ATPasa -vazba N-1-naftylftalimové kys. |
| Tonoplast | 7-9 nm | -nitratem inhibovaná K^+ -ATPasa -pyrofosfatáza |
| Mitochondrie | 6 nm | -cytochrom c oxidasa (necitlivá k antimycinu A a k iontům N_3^-) |
| Chloroplasty | 6 nm | -chlorofyl |
| Golgiho aparát | 5-9 nm | -latentní IDPasa -glukansyntasa I |
| Endoplazmatické retikulum (ER) | 6 nm | -NAD(P)H-cytochrom c reductasa |
| Peroxisomy | 6-7 nm | -katalasa, enzymy produkující H_2O_2 |
| Jádra | 6 nm | -DNA |
| Opláštěné vezikly (mikrovesikly) | ----- | -klatrin (SDS-PAGE, 180-190 kDa) |
| Cytosol | ----- | -laktát dehydrogenasa |

Tab.č.2: Příklady markerů a přibližná tloušťka některých buněčných částí.

Identifikace vnitrobuněčných membrán (obr.č.5)

1) specifické enzymové markery (Morre *et al.*, 1987; Widell a Larsson, 1990)

Principem je měření aktivity enzymu, jehož výskyt je vázán na určitý membránový typ. Příklady některých těchto markerů jsou v tabulce č.2.

2) měření tloušťky membrány (Morre *et al.*, 1987) viz. tabulka č.2

3) specifické mikroskopické barvení

Pro identifikaci PM se používá např. barvení pomocí kys. fosforečnanowolframové (PTA) nebo kys. křemičitanowolframové (STA) (Widell a Larsson, 1990)

4) specifické protilátky

Byly připraveny protilátky např. proti membránám ER a tonoplastu.

5) Změna absorpance indukovaná modrým světlem (LIAC) (Widell a Larsson, 1990)

Změna absorbance indukovaná modrým světlem souvisí s redukcí cytochromu typu b, a je používána jako marker PM. Světlem redukovatelný cytochrom je přítomný též v membráně ER.

Literatura:

- Auderset, G., Sandelius, A.S., Penel, C., Brightman, A., Greppin, H., Morre, D.J. (1986): Isolation of plasma-membrane and tonoplast fractions from spinach leaves by preparative free-flow electrophoresis and effect of photoinduction. *Physiol Plant* 68: 1-12.
- Briskin, D.P., Leonard, R.T., Hodges, T.K. (1987): Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods Enzymol* 148: 542-68.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A.M., Morre, D.J. (1988): Plasma membrane vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 86: 631-7.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A.M., Morre, D.J. (1990): Tonoplast vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by preparative free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 94: 1149-56.
- de Duve, C. (1964): Principles of tissues fractionation. *J Theor Biol* 6: 33-59.
- Hannig, K., Wirth, H., Meyer, B.H., Zeiller, K. (1975): Free-flow electrophoresis I (Theoretical and experimental investigations of the mechanical and electrokinetic variables on the efficiency of the method). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 356: 1209-23
- Hannig, K., Heidrich, H.G. (1977): Continuous free-flow electrophoresis and its application in biology. *In Cell separation methods*. Bloenidal, H. (ed.), 95-115, North Holland Publishing Company.
- Klingler, H., Frosh, S., Wagner, E. (1991): In vitro effects of monoterpenes on chloroplast membranes. *Photosynth Res* 28: 109-18.
- Lis, H., Weiler, E.W. (1994): Ion-translocating ATPases in tendrils of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* 194: 169-80.
- Morre, D.J., Brightman, A.O., Sandelius, A.S. (1987): Membrane fractions from plant cells. *In Biological membranes a practical approach*. Findlay, J.B.C., Evans, W.H. (ed.), 37-68, IRL Press, Washington.
- Poole, R. J., Briskin, D. P., Krátký, Z., Johnston, R. M. (1984): Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. *Plant Physiol* 74:549-556.
- Prosser, V. a kolektiv (1989): Preparativní a analytické metody: Sedimentace (centrifugace). *In Experimentální metody biofyziky*. 74-77, Academia, Praha
- Sandelius, A.S., Penel, C., Auderset, G., Brightman, A., Millard, M., Morre, D.J. (1986): Isolation and highly purified fractions of plasma-membrane and tonoplast from the same homogenate of soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 81: 177-85.
- Sze, H. (1985): H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 175-208.
- Widell, S., Larsson, C. (1990): A critical evaluation of markers used in plasma membrane purification. *In The plant plasma membrane*. Larsson, C., Moller, I.M. (ed.), 17-40, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Zeiller, K., Löser, R., Pascher, G., Hannig, K. (1975): Free-flow electrophoresis II (Analysis of the method with respect to preparative cell separation). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 356: 1225-44.

Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla

Grospietsch, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, Praha 6 - Ruzyně, 161 06
tel: 02/36 08 51 1.362, fax: 02/36 52 28, e-mail: grospietsch@hb.vurv.cz

Při stanovování obsahu škrobu v rostlinném materiálu bývá největším problémem jeho extrakce. Nejčastěji se pro jeho převedení do roztoku používá kyselé, nebo zásadité hydrolyzy pomocí kyseliny chlorovodíkové, chloristé, nebo hydroxidu draselného. Jinou, poměrně málo známou látkou, která velice dobře rozpouští škrob (a nikoli celulózu a další polysacharidy) je chloralhydrát (1). Níže uvedená metodika je původní právě použitím chloralhydrátu jako extrakčního činidla ve spojení s následným kolorimetrickým stanovením škrobu pomocí antronu. Podstatou antronové metody, vypracované na přelomu 40. a 50. let (2,3,4), je tvorba barevného komplexu furfural-antron v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci zkoumaného sacharidu (nejčastěji glukózy) a může být měřena spektrofotometricky.

Metodika

- **stroje a nástroje:** z přístrojového vybavení je nutno vlastnit, nebo mít alespoň přístup k spektrofotometru, stolní centrifuze a vodní lázni (v nouzi stačí vařič). Pipety, třecí miska s tloučkem a zkumavky (nejlépe se zábrusovým špuntem), bývají obvyklým vybavením každé laboratoře. Z chemikálií je potřeba koncentrovaná kyselina sírová, antron, chloralhydrát, 80% etanol a destilovaná voda.

- vlastní postup:

- 1) namícháme potřebné množství antronového roztoku o koncentraci 0,2% (w/v), rozpuštěním naváženého množství antronu v koncentrované kyselině sírové. Roztok musí být jasně žlutý, jestliže zelená, máme nejspíš špinavé sklo.
- 2) asi 50-100mg rostlinného materiálu rozetřeme v třecí misce s 2ml 80% etanolu a slijeme do centrifugační zkumavky. Misku poté dvakrát vypláchneme 1,5 ml 80% etanolu a vše rovněž slijeme do centrifugačky.
- 3) centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g.
- 4) opatrně slijeme supernatant a pelet roztřepeme ve 4ml destilované vody.
- 5) centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g.
- 6) ještě jednou zopakujeme body 4) a 5).
- 7) slijeme supernatant. Nyní jsme se zbavili rozpustných cukrů a zůstal nám pelet, obsahující škrobová zrna a zbytky buněčných stěn.
- 8) k peletu v centrifugační zkumavce napipetujeme 1ml 1M roztoku chloralhydrátu a vzorky umístíme na 15 minut do vroucí vodní lázně. Během procedury se rozpustí amyloplasty a škrob přejde do roztoku.
- 9) vzorky vyjmeme z lázně a centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g. Zbytky buněčných stěn sedimentují, zatímco škrob zůstane ve vodné fázi.
- 10) pipetou odsajeme 0,2 - 0,5ml supernatantu a zředíme v poměru 1:10 (nebo jiném, záleží na škrobnatosti konkrétního materiálu).
- 11) mezitím do čistých zkumavek se zábrusem napipetujeme 3ml připraveného antronového roztoku.
- 12) antron opatrně převrstvíme 1ml naředěného vzorku z bodu 10) a zkumavku dáme chladit do studené vody.
- 13) rychlým, ale důkladným protřepáním smísíme obě fáze pod proudem studené vody. Chlazení je nutné vzhledem k velkému množství tepla, které se uvolňuje při mísení vody s kyselinou.

Rovněž je třeba mít v této fázi zkumavku odšpuntovanou, jinak hrozí nebezpečí vystřelení zátky a vystříknutí kyseliny s následnými neblahými účinky.

14) promíchané vzorky se inkubují 5 minut ve vroucí vodní lázni, kde dojde k vytvoření barevného komplexu a roztok změní zabarvení ze žluté na zelenou.

15) po vyjmutí z lázně se vzorky ochladí na pokojovou teplotu a změří se absorbance při vlnové délce 625nm.

-vyhodnocení dat: obsah škrobu se odečte z kalibrační křivky glukózy, kterou je nutno si předem sestrojít, nejlépe v rozsahu koncentrací 0 - 100mgml⁻¹, kdy je závislost lineární a absorbance nepřesahuje 1,5. Přítomnost chloralhydrátu ve vzorku neovlivňuje absorbanci, ani neposouvá absorpční maximum. Metoda umožňuje detekovat už řádově jednotky mg glukózy v mililitru vzorku.

Úskalí, tipy a triky

- základním požadavkem je maximální čistota, zvláště laboratorního skla, které má přijít do styku s antronovým roztokem. Vzhledem ke značné citlivosti metody stačí i nepatrné znečištění prachem, stopami celulózy a pod., aby došlo k chybám.

- pokud jde o stabilitu antronového roztoku, někteří autoři doporučují nepoužívat zcela čerstvý roztok, ale nechat ho alespoň 4 hodiny "uzrát". Rovněž příliš starý roztok není vhodný, neboť se časem rozkládá (za 5-10 dní, podle kvality chemikálií a podmínek prostředí) a mění zbarvení z jasně žlutého na žlutohnědé. Optimální je používat roztok do jednoho dne po namíchání.

- 1M roztok chloralhydrátu lze bez problémů uchovávat v zábrusové lahvi v chladničce. Při práci s ním je třeba dbát jisté opatrnosti, neboť dráždí pokožku a sliznice.

- dle osobních zkušeností není radno objednávat chloralhydrát u Sigmy, neboť se jedná o látku, která nesmí být vyvážena z Německa. Lze ho však získat bez problémů od firmy Fluka.

- při práci s rostlinným materiálem obsahujícím pryskyřice, jako například jehlice konifer, je nutné v úvodní extrakci nahradit etanol 80% acetonem a použít ho nejméně ve dvou stupních.

Finanční a časová náročnost, srovnání s alternativními metodami

Pokud jde o finanční náklady, vyjde zpracování 100 vzorků na 250-350,- Kč, přičemž většina této částky padne na vrub etanolu a kyseliny sírové. Doba zpracování 8 vzorků (počet míst v centrifúze) činí 2-2,5 hodiny, což umožňuje teoreticky zpracovat až 32 vzorků během osmi hodin. V porovnání s metodami, využívajícími k extrakci škrobu kyseliny chloristé (doba extrakce až 12 hodin), místo chloralhydrátu (doba extrakce 15 minut), je zde výrazná úspora času. Rovněž odpadá práce s další agresivní kyselinou.

Ve srovnání s postupy, využívajícími enzymatických, nebo chromatografických metod stanovení obsahu škrobu je hlavní výhodou až o řád nižší cena zpracování jednoho vzorku.

Literatura:

1. Bourne, E.J., Weigel, H. Bacterial Polysaccharides - Extraction with Chloral Hydrate. in *Methods in Carbohydrate Chemistry, vol.V- General Polysaccharides* Edited by Roy L. Whistler, Academic Press New York and London, 78-80 (1965)
2. Scott, T.A., Melvin, E.H. Determination of Dextran with Anthrone. *Analytical Chemistry* **25**, 1656-1661 (1953)
3. Viles, F.J., Silverman, L. Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical Chemistry* **21** 950-953 (1949)
4. Yemm, E.W., Willis A.J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal* **57**, 508-514 (1954)

Jak studovat receptory pro rostlinné hormony ?

Kamínek, M., Zažímalová, E.*

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6

tel: 02/36 83 05, 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59

e-mail: kaminek@mbox.cernet.cz, zazim@site.cas.cz.

Koncept hormonální regulace růstu a vývoje rostlin předpokládá (1) přenos chemického signálu reprezentovaného fytohormonem, (2) jeho rozpoznání v cílovém místě a (3) jeho “překlad” ve formě fyziologické odpovědi. Hormonální signály jsou rozpoznávány a přijímány specifickými receptory, které k tomu, aby mohly plnit svoji specifickou funkci, musí splňovat řadu kritérií. Ideální receptor se vyznačuje (1) vysokou afinitou k ligandu ($K_d < 10^{-8}$ M) umožňující vazbu významného množství ligandu přítomného obvykle v extrémně nízkých koncentracích, (2) nízkou kapacitou nutnou pro nasycení vazby při vysokém zředění ligandu, (3) vysokou specifitou, (4) dynamickou rovnováhou mezi vázaným a volným ligandem a (5) fyziologickou “smysluplností” vazby, tzn. vazba ligandu musí po přenosu signálu kaskádou navazujících procesů vést k odpovídající fyziologické odpovědi (viz Barbier-Brygoo 1994, Libbenga a Mennes 1995, Venis a Napier 1995). Tato přísná kritéria splňuje řada receptorů živočišných hormonů, zatímco v rostlinách bylo identifikováno pouze několik bílkovin vázajících auxin (přehledy Jones 1994, Napier a Venis 1995, Venis a Napier 1995, Macdonald 1997, Zažímalová et al. 1997), kyselinu abscisovou (přehled Assmann 1994) a etylén (přehled Harpham 1996), které lze považovat za hormonální receptory. Ostatní bílkoviny vázající fytohormony, u kterých nebyla doložena fyziologická významnost vazby fytohormonu, označujeme jako “vazebné bílkoviny” (VB) či “vazebná místa”.

VB jsou většinou vázány na buněčné membrány a vyskytují se velmi malých koncentracích. Vzhledem k této skutečnosti a dále k jejich citlivosti vůči prostředí a k nutnosti uchovat jejich specifické vlastnosti (viz výše) je třeba při jejich studiu používat specifických šetrných metod, které zahrnují:

- (1) Extrakci, čištění a izolaci VB
- (2) Biochemickou charakterisaci VB (*molekulární*: stanovení molekulové hmotnosti nativního proteinu a jeho podjednotek, glykosylace proteinu, pI, imunologické příbuznosti s jinými proteiny, sekvence aminokyselin, vymezení vazebného místa, identifikaci genů kódujících VB a s nimi spřažených promotorů, aj.; *kinetickou*: určení vazebné kapacity, afinity k fytohormonu a specifity vazby, počtu vazebných míst).
- (3) Lokalisaci vazebného místa na úrovni orgánu, pletiv a buněk.

1. Metody extrakce, čištění a izolace VB

Metody používané pro extrakci a čištění rozpustných a na membrány vázaných VB se částečně liší. Obecně se jedná o standardní postupy pro izolaci a čištění bílkovin.

1.1. **Rozpustné VB** jsou extrahovány po homogenisaci rostlinného materiálu v pufoch o vhodné molaritě a pH (většinou 0.01-0.1 M, pH 5-7). V průběhu izolace a purifikace je třeba potlačit aktivitu proteas s použitím vhodných inhibitorů (sojový inhibitor trypsinu aj.). Pro čištění supernatantu se osvědčila iontově výměnná sloupcová chromatografie a afinitní chromatografie s použitím derivátů fytohormonů a protilátek jako afinantů a agarosy jako pevného nosiče. Pro izolaci glykoproteinů je velmi účinná chromatografie na sloupci imobilisovaného concanavalinu A. Pro hodnocení homogenity a čistoty je používána elektroforéza nativního a denaturovaného preparátu na polyakrylamidu. Pro jednotlivé VB lze použít specifických metod, jako např. precipitace proteinů v kyselém prostředí (Brinegar et al. 1985).

*Oba autoři se na přípravě příspěvku podíleli stejně.

1.2. **Membránové VB.** Prvním krokem v izolaci VB tvořících součásti buněčných membrán je podobně jako u rozpustných VB homogenisace rostlinného materiálu - ultrazvukem nebo klasicky ve třecí misce tloučkem. Ve srovnání s rozpustnými VB se zpravidla používají pufrы o nižší molaritě (0,01-0,05 M) a vyšším pH (okolo 8). Dalším krokem je rozdělení hrubého homogenátu diferenciací centrifugací a následné zpracování peletů resp. supernatantů odpovídajících žádané buněčné frakci. K preciznějšímu rozdělení těchto frakcí lze použít centrifugaci gradientovou nebo metody rozdělovací (např. dělení ve dvou fázích “two-phase separation”). Podle dalších požadavků se lze dále soustředit buď na práci s částečně zachovanými membránami (např. vesikly plasmatické membrány), nebo získané preparáty solubilisovat a dále s nimi pracovat jako s rozpustnými VB.

Metody extrakce a čištění rozpustných i membránových VB budou demonstrovány na příkladech VB pro cytokininy a auxiny.

2. Biochemická charakterisace VB

Pro stanovení molekulové hmotnosti nativního VB se osvědčila sloupcová chromatografie na molekulárních sítích (gelech) typu Sephacrylu s použitím molekulárních standardů. Při detekci VB v elučním profilu chromatogramu pomocí vazebného testu lze molekulovou hmotnost VB stanovit i u méně čistých preparátů. V aktivních frakcích lze určit molekulovou hmotnost podjednotek po denuraci proteinu pomocí PAGE. Glykosylace proteinu může být stanovena na základě jeho chování vůči concanavalinu A. K detekci vlastního vazebného místa v molekule VB lze použít fotoafinitního značení proteinu pomocí radioaktivně značeného derivátu fytohormonu modifikovaného navázáním fotoreaktivní azidoskupiny v místech, která neinterferují s vazbou hormonu na VB. Po osvětlení kovalentně navázaný ligand může být snadno detekován na základě radioaktivity jak na úrovni celistvé molekuly nativní VB, tak na úrovni vazebného místa odštěpeného působením specifických proteas (Brinegar et al. 1988). Fotoafinitně značených proteolytických štěpů VB lze použít pro stanovení sekvence aminokyselin, jíž může být dále využito pro (1) stanovení sekundární struktury vazebného místa, (2) určení klíčových strukturálních faktorů rozhodujících o vazbě a orientaci ligandu a tím následně určujících i specifitu vazebného místa (s pomocí molekulárního modelování, např. Fox 1992) a pro (3) konstrukci sond pro izolaci cDNA kódující VB (např. Hesse et al. 1989).

Pro charakterisaci kinetických parametrů VB je využívána řada vazebných testů založených na *in vitro* vazbě značeného ligandu o vysoké molární radioaktivitě; tyto testy umožňují stanovení poměru vázaného a volného ligandu a tím vymezení tzv. “specifické” a “nespecifické” vazby fytohormonu na základě výměnných reakcí při jeho přebytku. Tyto tzv. přímé vazebné testy jsou založeny na reversibilitě vazby a vzájemně se liší způsobem oddělení volného a na VB vázaného ligandu. Budou popsány a charakterisovány vazebné testy založené na (1) rovnovážné dialýze, (2) precipitaci VB síranem amonným po navázání ligandu (pro rozpustné a solubilisované VB), (3) ultrafiltraci a (4) centrifugací. Těmito testy lze stanovit kapacitu VB, počet vazebných míst v molekule VB nebo hmotnostní jednotce VB, afinitu VB k fytohormonu a jeho derivátům a následně specifitu VB. Účinnost, spolehlivost a přesnost jednotlivých testů lze dobře hodnotit pomocí VB pro cytokininy (CBF-1), kterou lze izolovat v dostatečném množství a čistotě z obilok pšenice (Kamínek a Fox 1990).

3. Lokalizace VB.

Lokalizace VB může být studována na různých úrovních: v rámci celé rostliny, jednotlivých orgánů a pletiv i na úrovni vnitrobuněčné. Tomu odpovídá i spektrum používaných metod. Zatímco pro distribuci určité VB v rámci celé rostliny jsou zpravidla používány klasické přímé vazebné studie a “markerem” výskytu VB je její kapacita v jednotlivých částech rostliny (např. Walton a Ray 1981, Zažímalová a Kutáček 1985, Zažímalová et al. 1997), jsou pro lokalisaci konkrétních

VB v pletivech či subcelulárních strukturách používány přístupy imuno-cytochemické (Brinegar 1994, Henderson et al. 1997).

Poděkování: Některé z výše uvedených metod byly vypracovány a optimalisovány v rámci řešení projektů 206/96/1032 Grantové agentury ČR a A6038706 Grantové agentury AVČR.

Literatura:

- Assmann, S.M.: Ins and outs of guard cell ABA receptors. - *The Plant Cell* 6: 1187-1189, 1994.
- Barbier-Brygoo, H.: Tracking auxin receptors using functional approaches. - *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 1-25, 1994.
- Brinegar, C.: Cytokinin binding proteins and receptors. - In: *Cytokinins. Chemistry, Activity and Function.* (D.W.S. Mok, M.C. Mok, eds.). Pp. 217-232, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Brinegar, A.C., Stevens, A., Fox, J.E.: Biosynthesis and degradation of wheat embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. - *Plant Physiol.* 79: 706-710, 1985.
- Brinegar, A.C., Cooper, G., Stevens, A., Hauer, C., Shabanovitz, J., Hunt, D.F., Fox, J.E.: Characterisation of a benzyladenine binding site peptide isolated from a wheat cytokinin-binding protein: sequence analysis and identification of a single affinity-labelled histidine residue by mass spectrometry. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5927-5931, 1988.
- Fox, J.E.: Molecular modeling of cytokinins and the CBF-1 receptor. - In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants.* (M. Kamínek, D.W.S. Mok, E. Zažímalová, eds.). Pp. 127-132, SPB Academic Publishing bv., The Hague, 1992.
- Harpham, N.V.J., Berry, A.W., Holland, M.G., Moshkov, I.E., Smith, A.R., Hall, M.A.: Ethylene binding sites in higher plants. - *Plant Growth Regul.* 18: 71-77, 1996.
- Henderson, J., Baully, J.M., Ashford, D.A., Oliver, S.C., Hawes, C.R., Lazarus, C.M., Venis, M.A., Napier, R.M.: Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. - *Planta* 202: 313-323, 1997.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshüsemann, Bauw, G., Puype, M., Vaderkerckhove, J., Löbler, M., Klämbt, D., Shell, J., Palme, K.: Molecular cloning and structural analysis of gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. - *EMBO J.* 8: 2453-2461, 1989.
- Jones, A.M.: Auxin-binding proteins. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 393-420, 1994.
- Kamínek, M., Fox, J.E.: Comparison of the sensitivity and reliability of cytokinin-binding assays using highly purified soluble binding protein. - In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants.* (M. Kamínek, D.W.S. Mok, E. Zažímalová, eds.). Pp. 461-467, SPB Academic Publishing bv., The Hague, 1992.
- Libbenga, K.R., Mennes, A.M.: Hormone binding and signal transduction. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (P.J. Davies, eds). Pp. 272-297, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.
- Macdonald, H.: Auxin perception and signal transduction. - *Physiol. Plant.* 100: 423-430, 1997.
- Napier, R.M., Venis, M.A.: Auxin action and auxin-binding proteins. - *New Phytol.* 129: 167-201, 1995.
- Venis, M.A., Napier, R.M.: Auxin receptors and auxin binding proteins. - *Critical Rev. Plant Sci.* 14: 27-47, 1995.
- Walton, J.D., Ray, P.M.: Evidence for receptor function of auxin binding sites in maize - red light inhibition of mesocotyl elongation and auxin binding. - *Plant Physiol.* 68: 1334-1338, 1981.
- Zažímalová, E., Kutáček, M.: In vitro binding of auxin to particulate fractions from the shoots of dark-grown wheat seedlings. - *Plant Growth Regul.* 3: 15-26, 1985.
- Zažímalová, E., Březinová, A., Petrášek, J.: Putative auxin receptors and their possible role in plant development. - *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 41: 259-272, 1997.

Stanovení kyseliny abscisové RIA metodou

Klemš, M., Balla, J., Flores-Solís, J., Procházka, S.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, AF MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno
tel: 05/45133296, e-mail: klems@dahlia.vszbr.cz

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon regulující v rostlinách vývojové a metabolické procesy abscise a dormance. Důležitou regulační funkci má kyselina abscisová i při zvýšení své endogenní hladiny v rostlinách za stresových podmínek, sucha, chladu, nevhodných osmotických podmínek a imisí. V explantátových kulturách je zkoumána její role v somatické embryogenezi. V rostlinách se ABA vyskytuje v nepatrných množstvích 10 - 50 ng/g čerstvé hmotnosti.

Chemicky je kyselina abscisová seskviterpen a v rostlinách vzniká z kyseliny mevalonové a z karotenoidů. Má 2 optické izomery, přičemž v rostlinách se vyskytuje jen (+)-(S)-enantiomer. Chemicky vyrobená (-)-(R)-ABA tvoří racemickou směs. Geometrická izomerie molekuly ABA eliminuje fyziologickou aktivitu ABA v případě, že karboxylová skupina je v *trans* konfiguraci.

Pro analytické stanovení je ABA extrahována z rostlinného materiálu vytřepáním homogenátu do vodného roztoku po dobu 24 hodin při +4°C. Volná ABA se oddělí centrifugací - zůstává v supernatantu. Do analýzy se ze vzorku odebírá 2 x 50 ml supernatantu.

Radioimunoanalytické stanovení (RIA) kyseliny abscisové je vysoce citlivá kvantitativní (detekční limit ABA v pg) imunochemická metoda stanovení ABA využívající schopnosti rozpoznání molekuly ABA protilátkou MAC 252 (QUARRIE et al. 1988) s velmi vysokou specifitou. Princip metody spočívá v kompetici nativní nebo standartní ABA (hapten) a radioaktivně značené ³H-ABA (radioligand) ve vazbě na protilátku MAC 252. Za předpokladu konstantního množství protilátky MAC 252 a radioaktivně značené ³H-ABA a přebytku nativní ABA, dochází k vytěšňování radioligandu z vazby s protilátkou a k vazbě haptenu s protilátkou. Tvorby komplexů hapten-protilátka a hapten-radioligand je dosaženo po inkubaci za nízké teploty (+4°C). Jejich separace je provedena vysrážením v síranu amonném a oddělením následnou centrifugací. Radioaktivita sedimentu je měřena technikou kapalné scintilace na scintilačním spektrofotometru Packard 2000 CA. Kalibrační křivka je sestrojena za použití standartní ABA (+/- *cis,trans*-ABA, Sigma).

ÚBFR pomocí radioimunoanalytického stanovení ABA studuje dynamiku endogenního obsahu ABA v průběhu dormance sladovnického ječmene, při indukci chladuvzdornosti ozimého ječmene jako markeru snížené teploty a při studiu dynamiky endogenní ABA v procesu somatické embryogeneze v *in vitro* kulturách.

Klíčová slova

kyselina abscisová, radioimunoanalýza, hapten, radioligand, monoklonální protilátka

Příloha

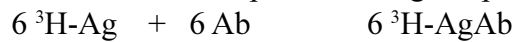
komponenty radioimunoanalýzy:

- monoklonální protilátka MAC 252 (Cambridge)
- radioligand (³H-ABA, Amersham)
- standart (hapten, +/- *cis,trans*-ABA, Sigma)

- extrahovaná volná ABA z rostlinného materiálu (hapten)

schéma precipitace (symboly):

tvorba komplexu radioligand-protilátka



tvorba obou typů komplexů



Literatura:

QUARRIE, S. A., WHITFORD, P. N., APPLEFORD, N. E. J., WANG, T. J., COOK, S. K., HENSON, L. E. and LOVEYS, B. R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 183, 330-339.

Metody analýzy fotosyntetických pigmentů v jehlicích smrku ztepilého *Picea abies* (L.)KARST.

Krpeš, V.

Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, Bráfova 7, 702 00 Ostrava,
e-mail: krpes.kbio@prfl.osu.cz

1. Metoda extrakce fotosyntetických pigmentů

Veškeré práce a manipulace se vzorky jsou prováděny při zeleném světle vlnové délky v rozpětí 510-530 nm. K 200 mg jehlic zbavených listových polštářků a řapíků se přidá 5 ml bezvodého acetonu a na vodní lázni se zahřívá na bod varu acetonu (60⁰ C) po dobu 1 minuty. Potom následuje ochlazení v ledové tříšti a uchování ve tmě a chladu do dalšího zpracování.

Homogenizace se provádí s přidáním Mg CO₃ a křemenné drtě (zrno 0,3 mm). Po dokonalém rozmělnění se homogenát extrahuje 5x5 ml acetonem. Jednotlivé extrakty se shromažďují do dělicí nálevky. Po přidání petroléteru a protřepání 25 ml nasyceného roztoku Na Cl následuje další protřepání a oddělení vodní vrstvy s nečistotami a vysokomolekulárními látkami, které by zkreslovaly měření a TLC analýzu. Epifázický roztok obsahující pigmenty se třikrát promyje destilovanou vodou a převádí se kvantitativně do vakuového odpařovače. Odpařováno ve vakuu na 22⁰ C v teplé vodní lázni do sucha. Suchý odparek se rozpuští v 1 ml bezvodého acetonu. Extralce pro HPLC analýzu pigmentů se provádí bez promývání a zahušťování přímo do 100 % čistého acetonu.

2. Spektrofotometrické stanovení směsi

Při spektrofotometrickém stanovení směsi chlorofylových pigmentů se jejich absorpční křivky překrývají v rozsahu absorbance, kde platí LAMBERTŮV-BEERŮV zákon vyjadřující závislost absorbance světla při průchodu tloušťkou homogenní látky.

Ke stanovení obsahu chlorofylu *a* a *b* a celkových karotenoidů se používá jejich extrakt ve 100 % acetonu. Ten se zpracovává jako trojkomponentní systém na spektrofotometru Zeiss-Jena. K vyhodnocení jsou použity matematické vztahy odvozené VERNONEM (1960), jak je uvádějí LICHTENTHALER a WELLBURN (1983). Získané hodnoty se přepočítávají na 1 g suché hmotnosti. Rovnice pro výpočet chlorofylu jsou rovněž používány v pracích zabývajících se fotosyntetickou tematikou (ZVOLSKÝ, 1986). Zpřesnění výpočtových vztahů k stanovení fotosyntetických pigmentů provedl LICHTENTHALER (1987) a následně PORRA a kol. (1989), kteří také určili nové extinkční koeficienty pro chlorofyl *a* a *b* ve čtyřech různých rozpouštědlech. Upravené rovnice pro výpočet koncentrace chlorofylů v 80 % acetonu (mg. ml⁻¹). vypadá následovně:

$$\begin{aligned} \text{Chl}a &= 12,25A_{663,6} - 2,55A_{646,6} \\ \text{Chl}b &= 20,31A_{646,6} - 4,91A_{663,6} \end{aligned}$$

3. Metoda tenkovrstvé chromatografie a zpětná eluce

Pro identifikaci fotosyntetických pigmentů a pro kvantitativní anlyzu je používána rychlá a jednoduchá metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Největší předností této techniky je její tvárnost, což v mnoha případech umožňuje rychlé vyřešení analytického problému a nalezení optimálních podmínek pro kapalinovou sloupcovou chromatografii. Směs fotosyntetických

pigmentů je pro svou složitost nevhodná pro jakékoliv přímé analýzy. Pro kvalitní rozdělení detekovaných pigmentů z analyzovaných asimilačních orgánů je zapotřebí takového absorbendu a takových organických rozpouštědel, aby došlo k dokonale vyvinutým skvrnám (bez závoje). Fotosyntetické pigmenty se dělí na silikagelu, který je nanesen pomocí vhodného neutrálního pojidla na hliníkových deskách (Silufolu UV 254). Nejlépe se osvědčila vyvíjecí směs ve složení 5d. petroleter - 2d. aceton - 2,5d. éter. Pásky jednotlivých barviv byly eluovány příslušnými elučními činidly způsobem jak jej uvádí ERDELSKÝ, FRIČ (1979). b-karoten je eluován *n*-hexanem, chlorofyly a feofytiny acetonem, lutein, violaxantin, zeaxantin a neoxantin alkoholem.

Pro spektrální měření se používá absorpčního spektrofotometru. Hodnoty koncentrací jsou vypočítávány podle příslušných specifických koeficientů absorbance. Identifikace jednotlivých pigmentů je prováděna na přístroji PU 8800 a SPECORD M40. Dále je sledován charakteristický průběh křivek a příslušná maxima absorbancí. Kvantita pigmentů se stanoví podle matematických vztahů odvozených MACKINNEYEM, SMAKULOU in ERDELSKÝ a FRIČ (1979). Výsledky jednotlivých pigmentů se získávají tak, že hodnota absorbance *A* daného pigmentu se dosazuje do příslušného vztahu. Následuje výpočet množství pigmentu nalézajícího se ve 2 cm³ květe spektrometru a přepočet na 1 g suchého materiálu (jehlic).

4. Kapalinová chromatografie (HPLC)

Zavedení HPLC metody pro stanovení zejména xantofylů je velmi citlivým postupem zpřesňující analytickou část studia fotosyntetických pigmentů. Pigmenty se analyzují na přístroji tsp 3200 SPECTRA SERIES P100 s detektorem Chanel 3. Pro jejich rozlišení se provádí separace na koloně NUCLEOSIL 120-5C18 (4 x 150 mm) s použitím gradientové mobilní fáze A aceton-voda (80 : 20), fáze B aceton s UV detekcí při 440 nm. Obsah pigmentů je vypočítáván z jednotlivých píků v pořadí jak uvádí BRAUMANN a GRIMME (1979): neoxantin neo A, neoxantin, anteraxantin, violaxantin, violeoxantin, lutein, lutein-5,6-epoxid, chlorofyl *b*, chlorofyl *a'*, chlorofyl *a*, feofytin, b-karoten.

5. Odběr vzorků

Zvláštní pozornost je třeba věnovat odběru asimilačních orgánů. V úvahu přichází:

- ◆ určení gradientu poškození odběrového materiálu
- ◆ expozice koruny s rozlišením na jižní (prosluněnou) a severní část
- ◆ určení doby odběru v denním režimu (vzhledem k fotosyntetické aktivitě)
- ◆ uchování odběrového materiálu, po tepelné inaktivaci enzymů
- ◆ podrobná charakteristika biotopu.

6. Program kauzálních závislostí

K vyhodnocení výsledků analýz je používán grafický program kauzálních závislostí naměřených hodnot koncentrací a klimatických podmínek včetně škodlivin SO₂ a tuhých znečišťujících látek. Program podává operativní informace o stavu a sezonním průběhu změn fotosyntetických pigmentů sledovaných populací pokusných smrků a jejich závislosti na abiotických podmínkách. Program má dvě části:

- ◆ Zpracování a výpočet koncentrací fotosyntetických pigmentů a jejich vzájemných poměrů
- ◆ Grafické vyhodnocení fotosyntetických pigmentů v závislosti na abiotických podmínkách

Souhrn

Asimilační orgány smrku obsahují mnoho sekundárních metabolitů, což způsobuje analytické problémy při stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů, zejména při screeningovém vyšetřování metodou TLC. Proto je nutné věnovat maximální pozornost při čištění extraktů. Analýza metodou HPLC podává přesnější obraz o kvalitativním zastoupení jednotlivých fotosyntetických pigmentů, stále je problematická identifikace piků xantofylové řady a dalších deepoxidantů. Metoda má význam při diagnostice poškození lesních porostů antropogenní činností.

Literatura:

- Braumann T, Grimme LH** 1979. Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by HPLC. -J.Chromatogr.**170**, 264-268
- Erdelský K, Frič K** 1979. Praktikum a analytické metody vo fyziologii rastlín. SPN Bratislava
- Krpeš V**, 1990. Vývoj fotosyntetických pigmentů. In: Dynamika změn vybraných charakteristik lesních ekosystémů pod vlivem průmyslových emisí a vápnění půdy.- Závěrečná výzkumná zpráva SPZV VI-5-3/05, 10-105
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR** 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents.- Biochemical Society Transactions **603**, 591-592
- Lichtenthaler HK** 1987. Chlorophylls and Carotenoids (34), Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology.- Acad. Press. **148**, 351-382
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy.- Bichim. Biophys. Acta **975**(3), 384-394
- Vernon LP** 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts.- Anal.Chem. **32**, 1144-1150
- Zvolský Jiří, Zvolský Jakub** 1986. Stanovení rostlinných pigmentů a jejich degradantů.- Acta.Fac.paedag. Ostrava **98**, 9-22

Metody stanovení rostlinných hormonů

Macháčková, I.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6
tel: 02/36 81 56, fax: 02/36 81 59, e-mail: i.machackova@ueb.cas.cz

Metody stanovení rostlinných hormonů zaznamenaly v průběhu posledních dvou desetiletí významný rozvoj. Dříve byla většina stanovení prováděna biotesty, které jsou ve velké většině případů vysoce citlivé, ale jejich specifita není dostatečná. Dnes se převážně používají vysoce specifické a citlivé metody fyzikální či fyzikálně-chemické, jako jsou plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (GC, HPLC), nejlépe s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS, LC/MS) a metody imunochemické.

1. Odběr materiálu

Co je potřeba v laboratoři? Kapalný dusík, příp. suchý led, termosky, mrazicí pult na -70°C, příp. lyofilizace

Obecné zásady. Pokud nezpracováváme materiál ihned, pak jej uchováváme v mrazicím pultu při -70°C. Trvá-li odběr materiálu déle, je nutné již odebraný materiál držet v kapalném dusíku. Je-li odebíraný materiál vlhký, je třeba jej v nejvyšší možné míře osušit. Případný transport materiálu musí probíhat v suchém ledu, nebo lze materiál lyofilizovat a uchovávat a transportovat lyofilizovaný, v nádobě či sáčku se silikagelem, který jímá vzdušnou vlhkost. Materiál k analýzám nesmí nikdy rozmrznout!

Je třeba věnovat pozornost denní době odběru materiálu. Hladina hormonů se v průběhu denního cyklu může výrazně měnit, a proto při déletrvajících pokusech či při opakování pokusů je třeba materiál odebírat vždy ve stejnou denní dobu.

2. Extrakce a čištění extraktů

Co je potřeba v laboratoři? Kapalný dusík, třecí misky, u starších metod dělicí nálevky, vakuová odparka, případně Speed-Vac, rozpouštědla (metanol, aceton, etanol, éter-viz dále), radioaktivní (či deuterovaný) standard na sledování výtěžnosti, chromatografické kolony, Polyclar AT (nerozpustný polyvinylpyrolidon), iontoměničové materiály, Sep-Paky nebo podobné kolonky s C-18 materiálem, desky na tenkovrstevnou chromatografii, scintilační počítač

Postup- obecné zásady Rostlinné hormony jsou organické látky snadno rozpustné v polárních rozpouštědlech. Vyskytují se však v pletivech ve stopových množstvích a před vlastním stanovením je musíme nahromadit a extrakt zbavit interferujících látek, na které jsou rostlinná pletiva velmi bohatá (barviva, fenolické látky apod.). Při extrakci musíme okamžitě s co nejvyšší účinností omezit enzymové aktivity (výběrem rozpouštědla, antioxidanty, nízkou teplotou). Před extrakcí provádíme pro zvýšení účinnosti homogenizaci. Jediným univerzálním způsobem homogenizace rostlinných pletiv je rozetření ve třecí misce po zmrazení kapalným dusíkem. Extrakční činidla, nejčastěji vodný (70-80%) metanol, etanol či aceton, užíváme 1-2krát destilovaná a vychlazená; extrakci 1-2krát opakujeme. Do rozpouštědla přidáváme antioxidanty, např. butylhydroxytoluen (BHT), dithiotreitol (DTT), merkaptóetanol či dietyldithiokarbamát (DIECA). Po extrakci rozpouštědlo odpaříme za sníženého tlaku a vodnou fázi dále čistíme. Ke zjištění ztrát v průběhu extrakce a čištění přidáváme na začátku extrakčního postupu izotopy značený interní standard, což je absolutní nutnost, neboť v různých extraktech se hormony různě rychle rozkládají. K čištění extraktů se používá s výhodou různých chromatografických technik: chromatografie papírové a tenkovrstevné (dnes spíše již jen k dělení metabolitů - nevýhodou tenkovrstevné chromatografie bývá nízká výtěžnost) a sloupcové chromatografie na různých nosičích. Nejčastěji

se užívají různé Sephadexy a materiály iontoměničové. K odstranění fenolických látek je nejvhodnější Polyclar AT (je třeba najít podmínky, kdy se neváže i hormon). Vůbec nejčastěji se dnes používají kolony s C-18 materiálem typu Sep-Pak, na kterých volbou pH a rozpouštědla lze dosáhnout vysokého přečištění. Starší metody využívaly u hormonů, které jsou organické kyseliny (IAA, ABA, gibbereliny), vytřepávání z vodného roztoku do organického rozpouštědla (nejčastěji éteru) při různé hodnotě pH. K minimalizaci ztrát se doporučuje silylovat používané sklo a s výjimkou posledního kroku před stanovením neodpařovat extrakt do sucha.

Zvláštnosti jednotlivých hormonů. Indolové sloučeniny, zejména kyselina indolyl-3-octová (IAA), jsou dosti nestálé. Při jejich extrakci a čištění extraktu je třeba postupovat velmi opatrně (nízká teplota, antioxidanty) a navíc zamezit v nejvyšší možné míře přístupu světla, které vyvolává rozklad IAA. Gibbereliny jsou labilní při extrémních hodnotách pH a teplotách a je proto nutné pracovat v rozmezí pH 2,5-8,5 a při teplotě do 40 °C. Při manipulaci s extrakty ABA je třeba vyvarovat se zdroji záření obsahující silnější složku UV, neboť toto záření izomerizuje přirozeně se vyskytující *cis*-ABA na její *trans*-izomer. Při práci s glukózoesterem ABA nelze použít alkalické prostředí. U cytokininů nacházíme v pletivech volné báze, ribozidy, ribotidy a konjugáty, zejména glukozidy. Ribotidy lze převést na ribozidy působením fosfatázy (lépe je použít fosfatázu alkalickou). Chceme-li zamezit působení endogenních nespecifických fosfatáz, provádíme extrakci ve směsi metanol:chloroform:7N kyselina mravenčí (12:5:5,v/v)(tzv. roztok Bieleškého). K hydrolyze glukozidů a ribozidů se doporučují enzymatické metody. Příklad purifikačního postupu (včetně chromatografických technik) je na obr.1. U etylénu ve většině sledování měříme pouze etylén vydávaný do atmosféry - rostliny po nějakou dobu inkubujeme v uzavřeném prostoru a z něj přímo odebíráme vzorek k analýze. Chceme-li znát obsah etylénu v mezibuněčných prostorech, provádíme extrakci v nasyceném roztoku síranu amonného za sníženého tlaku. Často místo etylénu měříme hladiny jeho prekurzoru kyseliny aminocyklopropankarboxylové (ACC) a jeho konjugátu (N-malonyl-ACC, MACC). MACC lze převést na ACC kyselou hydrolyzou a ACC stanovujeme jako etylén po oxidaci chlornanem či bromnanem sodným v alkalickém prostředí.

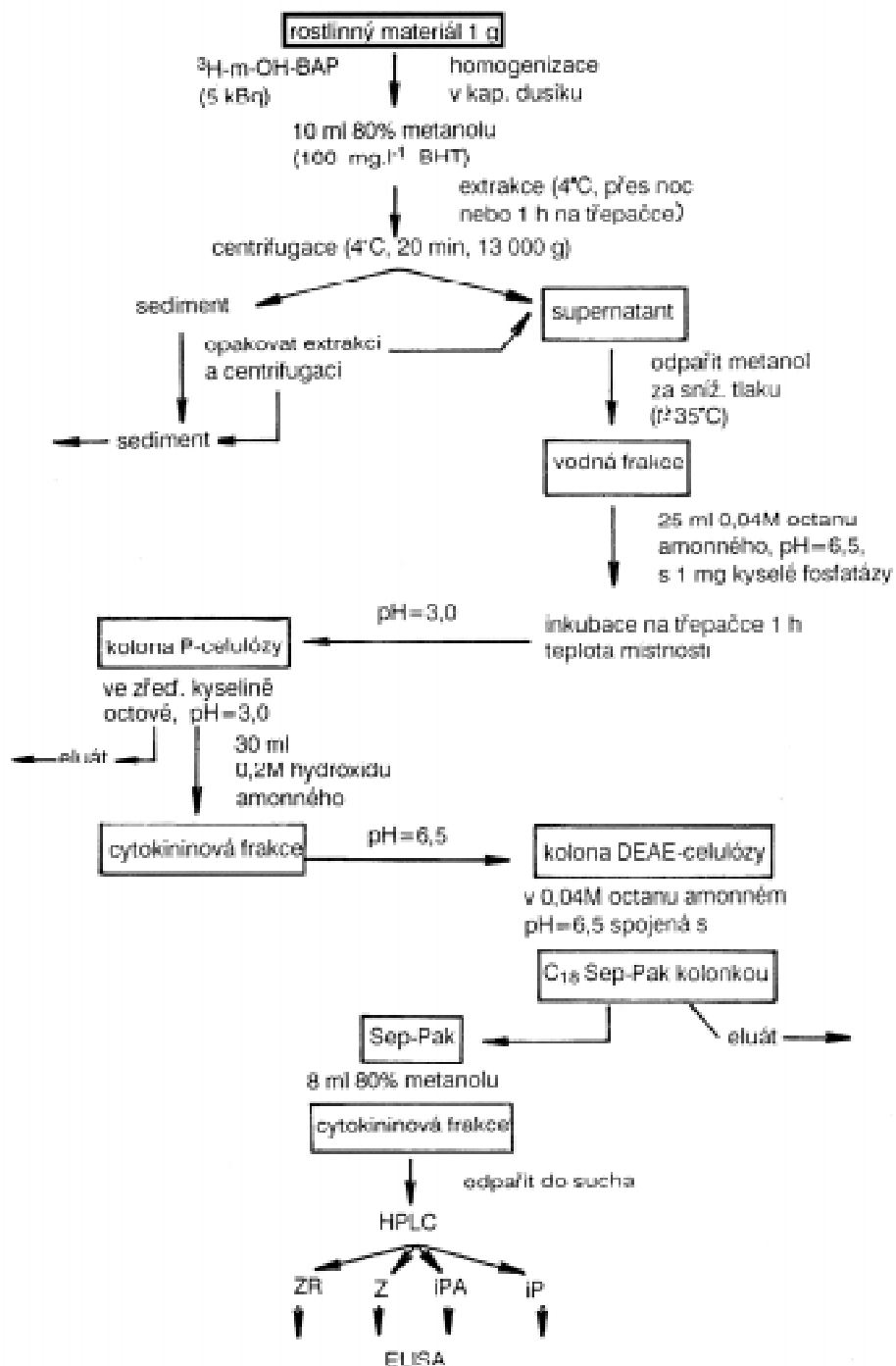
3. Biotesty

Biotesty využívají snadno kvantifikovatelné růstové či metabolické odezvy na daný hormon. Jejich využití vděčíme za objev většiny růstových regulátorů. Jejich výhodou je jednoduchost, dostupnost i vysoká citlivost (detekční limit bývá 10^{-7} - 10^{-10} mol.l⁻¹), nevýhodou pak nízká specifita a interakce a dalšími látkami v extraktech. Přes nesporné výhody exaktních fyzikálních a fyzikálně-chemických metod zůstanou biotesty neocenitelným pomocníkem pro první orientaci. Nenahraditelné jsou pak při hledání nových regulátorů růstu. Většina auxinových biotestů je založena na schopnosti auxinů stimulovat dlouhivý růst, např. u segmentů koleoptilí ovsu nebo pšenice, stonků hrachu a hypokotylů okurky. Gibberelinové biotesty využívají většinou zakrslé mutanty rýže, kukuřice či hrachu s nedostatečnou syntézou gibberelinů, u kterých měříme intenzitu dlouhivého růstu po aplikaci gibberelinů. Využívá se také schopnosti gibberelinů zvyšovat syntézu a sekreci α -amylázy v obilkách ječmene při klíčení. Pro stanovení cytokininů biotesty se nejvíce využívá jejich schopnosti brzdít stárnutí (rozklad chlorofylu v segmentech listů) či aktivovat buněčné dělení (v *in vitro* systémech např. u kalusů tabáku a sóji nebo explantátů mrkve). Často se používá tzv. amarantový test, který využívá schopnosti cytokininů stimulovat v klíčících rostlinách *Amaranthus caudatus* tvorbu červenofialového pigmentu amarantinu. Biotesty na kyselinu abscisovou využívají uzavření průduchů v segmentech listů nebo inhibici růstu segmentů koleoptilí ovsu a pšenice. Pro snadnost stanovení etylénu plynovou chromatografií se biotesty v podstatě neuvžívají.

4. Metody stanovení

Co je potřeba v laboratoři? Plynový chromatograf, kapalinový chromatograf, ELISA reader, případně scintilační počítač

Obecné zásady. K finálnímu stanovení fytohormonů lze použít plynové či kapalinové chromatografie nebo metod imunochemických. Plynovou chromatografií lze stanovit látky plynné a takové, které lze bez rozkladu za normálního tlaku převést do plynné fáze. Proto se stálé látky před stanovením převádějí na těkavější deriváty, např. trimetylsilylderiváty. Detekci provádíme ionizací látek za vysoké teploty (plamenově ionizační detektor, FID) nebo zářením (fotoionizační detektor, PID), na základě rozdílu teplot (TCD), vychytáváním elektronů emitovaných izotopem ^{63}Ni (ECD) a analýzou molekulárních iontů fokusovaných a urychlovaných v elektrickém nebo magnetickém poli (hmotová spektrometrie, MS). Známe i detektor specifický pro látky obsahující dusík a fosfor (NPD). Plynová chromatografie je využívána zejména pro stanovení etylénu a kyseliny abscisové. Daleko širšího použití dosahuje kapalinová chromatografie (HPLC). Kolony obsahují nejčastěji silikagelovou matrix s navázanými C_8 nebo C_{18} uhlovodíkovými zbytky, tedy vysoce hydrofobní materiál. Jsou k dispozici i náplně iontoměničové, chirální a hydrofilní.



Detekujeme na základě absorbance v UV světle, fluorescence, redox potenciálu , optických vlastností, značení radioizotopy nebo hmotovou spektrometrií.

Imunochemické metody jsou založeny na vysoce specifické interakci antigen-protilátka. Stanovení lze provést dvěma způsoby: radioimunotestem (RIA) a enzymovým imunotestem (ELISA, EIA). Při radioimunotestu probíhá reakce v roztoku a je založena na vzájemném vytěšňování hormonu a jeho radioaktivně značeného analogu (traceru) z vazby na protilátku . V případě ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jsou protilátky navázány na povrch jamek speciálních destiček a na ně se váže hormon nebo jeho konjugát se snadno kolorimetricky stanovitelným enzymem (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza). Tyto testy jsou vysoce citlivé a specifické, ale je nutné, zejména pro ELISA test, použít vysoce přečištěné extrakty.

Literatura:

- HEDDEN, P., 1993: *Annu.Rev. Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 44: 107-129.
- PROCHÁZKA, S., ŠEBÁNEK, J. et al. 1997. *Regulátory růstu rostlin.* Academia, Praha.
- RIVIER, L., CROZIER, A. (eds.), 1987: *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*, Vol.1 a 2, Academic Press, London.
- SEMBDNER, G., SCHNEIDER, G., SCHREIBER, K., 1988, *Methoden zur Pflanzenhormonanlyse*, VEB G. Fischer Verlag, Jena.
- YOKOTA, T., MUROFUSHI, N., TAKAHASHI, N, 1980: V *Hormonal Regulation of Dvelopment. I. Molecular Aspects of Plant Hormones.* *Encycl. Plant Physiol., New Ser., Vol.9* (ed. MACMILLAN, J.), Springer Verlag, Berlin.

Elektroforetická analýza isoenzymů

Pospíšková, M., Vacková, K.

Výzkumný ústav okrasného zahradnictví, 252 43 Průhonice

tel: 02/67 75 00 38, fax: 02/67 75 00 23, e-mail: martin@mail.natur.cuni.cz

Isoenzymová analýza je moderní metoda používaná od 60. let v oblasti populační genetiky, vývojové biologie, taxonomie a nově i při šlechtění rostlin. Variabilita enzymů byla poprvé popsána koncem 50. let (Hunter a Markert, 1957; Markert a Moller, 1959). Isoenzymy jsou enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale liší se aminokyselinovým složením a svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi (při analýze využíváme jejich různou elektroforetickou pohyblivost). Po specifickém barvení dostaneme na gelu spektrum isoenzymů daného jedince. Nástin možných komplikací a problémů, které je nutno při definování isoenzymů i při samotné analýze brát v úvahu, uvádějí Hadačová a Ondřej (1972).

Elektroforéza je separační technika pro dělení směsí elektricky nabitých látek. Elektroforéza na gelu využívá rozdílů ve velikosti náboje dělených molekul (čím větší je náboj, tím rychleji se molekula pohybuje v elektrickém poli), gel může také fungovat jako molekulové síto a rychlost pohybu pak odpovídá i velikosti a tvaru molekuly. Náboj proteinu závisí na pH, při nízkém pH se ionizují bazické skupiny, molekula získá kladný náboj a poputuje v elektrickém poli ke katodě; při vyšším pH budou naopak disociovat kyselé skupiny, molekuly proteinu ponesou záporný náboj a budou se pohybovat směrem k anodě.

Elektroforéza probíhá v různých typech nosného media, pro dělení enzymů se většinou užívají škrobové a polyakrylamidové gely. U polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) lze snadno změnou koncentrace monomerů měnit porositu gelu v závislosti na velikosti dělených proteinů. Další předností PAGE je dobrá reprodukovatelnost gelů, lepší dělicí schopnost, krátký časový průběh elektroforézy a ostré proužky na gelu. Elektroforéza na škrobovém gelu (SGE) se užívá častěji tam, kde analyzujeme velký počet jedinců z hlediska několika různých enzymů. SGE nemá tak dobrou dělicí schopnost jako PAGE, její výhodou je ale netoxičita potřebných chemikálií (akrylamid je neurotoxin), nižší finanční náročnost, snadnost přípravy a nanášení. Škrobové gely lze horizontálně nařezat a každý řez použít pro stanovení jiného enzymu. Podrobný popis přípravy gelů lze nalézt v literatuře (Kirschner a kol. 1994, Shields a kol. 1983 a Wendel a Weeden 1989).

Kromě obvyklého vybavení laboratoře (přístroj na přípravu vody, váhy, pH metr, centrifuga, termostat, digestoř, mrazák, chladnička) je pro elektroforézu isoenzymů nezbytná elektroforetická jednotka s možností chlazení gelů, el. zdroj (1000V a 100mA) a termostatický cirkulátor vody. Elektroforéza bývá horizontální pro škrobové gely a vertikální pro gely polyakrylamidové, hlavně z důvodu odlišného způsobu odlévání gelů a manipulace s nimi. V naší laboratoři pracujeme s horizontální elektroforézou Multiphor II firmy Pharmacia, která umožňuje práci s oběma druhy gelů.

K analýze jsou vhodné jak vegetativní tkáň (mladé listy, listové pupeny, kořenové špičky, klíčící rostliny), tak tkáň generativní (pyl, části semen). Tkáň se rozdrtí a přidá se extrakční pufr, jehož složení se liší podle rostlinného druhu, druhu použité tkáňe a obsahu interferujících látek v ní. Existující receptury (např. Wendel a Weeden, 1989) je nutné doladit empiricky. Extrakt je nutno udržovat stále v chladu (4°C), aby nedošlo k destrukci enzymů. Je možné ho uložit v mrazáku a uchovat delší dobu - několik týdnů (-20°C) nebo měsíců (-80°C). Pro analýzu v polyakrylamidovém gelu je extrakt nutné centrifugovat a supernatant pak nanášíme do jamek v gelu mikropipetou, u škrobového gelu tento krok odpadá, extrakt hned nasajeme do knotů z filtračního papíru a klademe do řezu v gelu. Pracovní postup popisují podrobně např. Kirschner a kol. (1994), Shields a kol. (1983) a Wendel a Weeden (1989).

Rozdělené isoenzymy vizualizujeme specifickým barvením, kdy detekce enzymů je založena na reakci, kterou enzym katalyzuje. V případě pozitivního barvení jde o srážení a změnu barvy původně rozpustné indikační látky v místě enzymové aktivity - na bezbarvém gelu se vytvoří barevné proužky. Méně často se využívají metody negativního barvení založené na destrukci nebo inhibici tvorby barevných složek v místě aktivity enzymu, zatímco zbytek gelu je barevný. Návody pro barvení jednotlivých enzymů uvádí např. Vallejos (1983).

Po obarvení získáme gel s různě uspořádanými proužky - zymogram. Poloha a počet proužků závisí na typu organismu, jeho stáří, druhu použité tkáně a na tom, jaký enzym byl barven. Počet proužků je určen počtem genů kódujících daný enzym, jejich alelickým stavem (homozygotní nebo heterozygotní), kvartérní strukturou funkčního enzymu (složení z podjednotek) a lokalizací enzymu v různých kompartmentech buňky. Při hodnocení zymogramu předpokládáme, že rozdílná pohyblivost enzymu v elektrickém poli odráží přímo rozdíly v kódujících genech a exprese genů kódujících enzymy je kodominantní, tzn. v organismu jsou přítomny produkty všech alel daného lokusu (Kirschner a kol., 1994); dále předpokládáme, že následné úpravy produktů genů jinými enzymy neovlivňují polymorfismus daný změnami sekvencí DNA.

Pro efektivní zhodnocení získaných výsledků se doporučuje vyhodnotit dědičnost klasicky - analýzou vyštěpování vloh v potomstvu hybridu. Pokud je enzym kódován jen jedním genem v jednom lokusu, při křížení homozygotních rodičů s různými alelami daného genu vznikne F1 generace, jejíž genotyp je heterozygotní. V případě monomerního enzymu najdeme na gelu dva proužky, z nichž každý je produktem jedné alely daného lokusu, v případě dimeru se funkční enzym může skládat z podjednotek třemi různými způsoby a na gelu najdeme tři proužky (dva homodimerické a jeden heterodimerický), v případě trimeru čtyři atd. V F2 generaci se při křížení hybridů vyštěpují jednak původní rodičovské homozygotní fenotypy, jednak fenotypy heterozygotní. Pokud je enzym kódován ve více než jednom lokusu, je interpretace složitější. Může docházet ke vzniku intergenických heterodimerů (při kombinaci podjednotek vzniklých přepisem genů v různých lokusech), jejichž zóna aktivity leží mezi produkty obou lokusů. Výše uvedené platí pro diploidní organismy, u rostlin je poměrně často situace komplikovaná polyploidii. Někdy se vyskytnou tzv. nulové alely, což jsou alely s potlačenou či nulovou aktivitou, nebo se mohou objevit sekundární isoenzymy, vzniklé při posttranslačních úpravách produktů genů nebo degradací proteinů při laboratorním zpracování vzorků (Kirschner a kol., 1994).

Metoda je finančně (hlavně chemikálie pro barvení enzymů) i časově (elektroforéza běží až 6 hodin) dosti náročná.

Literatura:

- Hadačová, V. - Ondřej, M.: Izoenzymy. *Biologické listy*, 37, 1972: 1-25.
- Hunter, R. L. - Markert, C. L.: Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1957: 1294-1295.
- Markert, C. L. - Moller, F.: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 1959: 753-763.
- Kirschner, J. - Kirschnerová, L. - Štěpánek, J. - Tichý, M.: Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin. Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, 1994. Průhonice.
- Shields, C. R. - Orton, T. J. - Stuber, C. W.: An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (Eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, Part A*. 1983. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Vallejos, C. E.: Enzyme activity staining. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (Eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, Part A*. 1983. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Wendel, J. F. - Weeden, N. F.: Visualization and interpretation of plant isozymes. In: D. E. Soltis and P. S. Soltis (Eds.), *Isozymes in plant biology*. 1989. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Kapilární elektroforetické metody ve fytochemii a fyziologii rostlin

Snopek, J.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2

tel: 02/21 95 31 55 , fax: 02/21 95 33 06, e-mail: snopek@prfdec.natur.cuni.cz

V biochemii rostlin, fytochemii a v oborech s nimi souvisejícími se při řešení výzkumných úkolů setkáváme s problémy, které lze úspěšně studovat elektromigračními metodami. Kromě všeobecně známých aplikací těchto metod v “klasickém provedení” ke sledování a purifikaci bílkovin (enzymů, izoenzymů apod.) či nukleových kyselin, tedy především makromolekulárních látek, se dají využívat i novější varianty těchto metod prováděných v kapilárách k dělení podstatně širšího spektra sloučenin.

Pojem “kapilární“ lze v oblasti separačních analytických metod považovat za synonymum pojmů “nový”, “zdokonalený”, “..se značně zvýšenou účinností”.

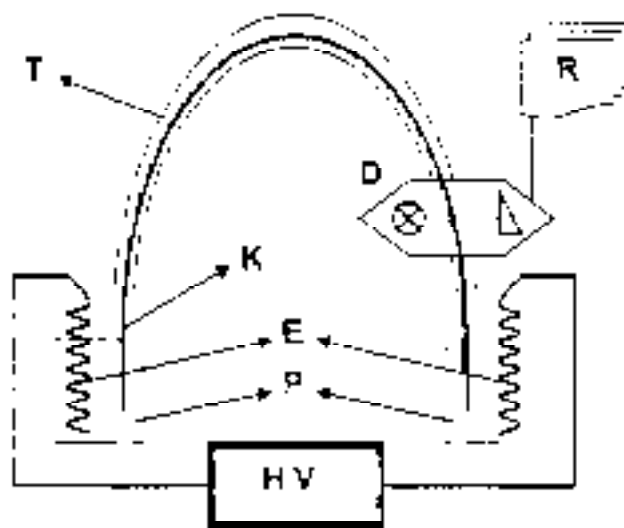
Toto tvrzení lze dokumentovat na analytických kapilárních metodách dnes již ve světě široce využívaných, jako jsou kapilární plynová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie i vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ve všech jejich modifikacích. Převedení separační metody do “kapilární“ modifikace přináší zvýšení rozlišovací schopnosti i rychlosti této metody a značně redukuje potřebné množství dávkovaného vzorku při analýzách. Kapiláry o průměru desítek až stovek mikrometrů tvoří vysoce účinné stabilizační prostředí pro elektroforetické separace.

Kapilární elektroforéza (CE) (Hjerten, 1967; Jorgenson et al., 1981, 1981a) využívá kromě separačních mechanismů konvenčních elektroforetických metod ještě efektů, které přináší aplikace elektrického pole v prostředí kapilár. Toho je např. využíváno v modifikacích CE i k separacím látek, které nenesou vlastní náboj. Tato metoda nabízí rychlost, snadnost ovládání a možnost on-line kvantifikace i automatizace podobné vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). Detekce je prováděna v průběhu analýzy, a tak odpadá časově náročný “barvící krok” po vlastní separaci, známý z konvenčních elektroforetických metod. Výsledky analýz jsou získány řádově v minutách, u velmi složitých separací v několika desítkách minut. To opět favorizuje tyto metody při srovnání s konvenčními, které obvykle vyžadují nejméně hodiny i dny k získání konečných výsledků separací.

Metodami CE lze provádět většinu separací realizovatelných HPLC. Na rozdíl od ní vyžaduje pouze nanolitrové objemy dávkovaných vzorků, z čehož vyplývá, že je možné s typickým objemem vzorku potřebným pro jednu HPLC separaci provést stovky CE analýz. Další obrovskou výhodou, jak z hlediska metodického tak i ekonomického, oproti HPLC je obrovská flexibilita separační selektivity. Lze jí dosáhnout jednoduše pouhou změnou složení pufru použitého k dělení analytů v jednom typu kapiláry. Objem pufru může být i menší než 10 ml. Takto je možné provádět dělení látek založená na mnoha charakteristických vlastnostech analyzovaných molekul (např. velikosti, náboji, hydrofobity, ale i chiralitě). Stejně či podobné separace v případě HPLC vyžadují desetitisícové investice do speciálních chromatografických kolon.

Kapilárními elektroforetickými metodami lze dělit široké spektrum látek, zahrnující např. peptidy, proteiny, oligonukleotidy, aminokyseliny, vitamíny, organické kyseliny a báze, anorganické ionty, izomerní sloučeniny různých typů, včetně optických izomerů. Vzhledem k tomu, že CE metody nabízejí rozdílnou separační selektivitu, v případě analýz složitých směsí látek nebo při ověřování čistoty analyzovaných látek (např. při analýze léčiv) , ji lze považovat za komplementární k HPLC (a naopak).

Schema instrumentace pro provádění CE separací je znázorněno na obrázku



Obr.1 – Schema přístroje pro kapilární elektroforézu

(HV = zdroj vysokého napětí, 30 kV; P = nádoby s pufrem; E = Pt elektrody; K = kapilára; T = termostatování kapiláry; D = detektor; R = záznamové zařízení n. PC)

č. 1. ; skládá se ze stabilizovaného zdroje napětí (obvykle 30 kV), detektoru (UV/VIS nebo Laserový det.), záznamového zařízení nebo počítače uzpůsobeného ke sběru dat, dvou elektrodových nádobek naplněných vhodným pufrem, do kterých jsou ponořeny

konce kapiláry (obvykle i.d. 25 – 75 mm), která může být ještě celá umístěna do temperovacího/chladicího bloku či obalu.

Molekuly jsou separovány na základě různé rychlosti migrace kapilárou plněnou vhodným pufrem, případně s dalšími aditivami upravujícími podmínky separace. Rozdělené komponenty vzorku jsou monitorovány detektorem, jak migrují malým segmentem kapiláry umístěným v detektoru. Detekční signál je zaznamenáván v podobě píků na elektroforeogramech, podobně jako na HPLC chromatogramech. Avšak na rozdíl od HPLC, kde všechny komponenty nadávkované směsi migrují průtokovou celou detektorem stejnou rychlostí, integrovaná plocha píků v případě elektroforeogramů je funkcí koncentrace analytu a migrační rychlosti.

V instrumentaci pro CE lze provádět několik typů separací. Nejjednodušší jsou separace prováděné v jednoduchých roztocích pufřů. Tento typ CE je nazýván kapilární zónová elektroforéza (CZE) a dala by se přirovnat k elučnímu módu HPLC.

Přidáme-li k základnímu elektrolytu vhodný lineární polymer nebo naplní-li se kapilára porézním gelem (např. polyakrylamidem) mohou se v tomto CE uspořádání provádět dělení např. nukleových kyselin na základě rozdílné velikosti molekul (“sieving effect“). Obvykle získáme stejná pořadí separovaných komponent vzorku jako při konvenční gelové elektroforéze.

Lze dokonce v CE provádět dělení látek metodou isoelektrické fokusace. Provádí se v kapilárách s chemicky modifikovaným vnitřním povrchem. Typická kapilární isoelektrická fokusace je provedena za méně jak 10 minut. Někdy však mohou nastat problémy při detekci separovaných zón.

Modifikace CE umožňující současná dělení aniontů, kationtů i neutrálních látek se nazývá micelární elektrokinetická chromatografie (MECC) (Terabe et al., 1984; 1985). Těchto dělení je dosahováno díky kombinaci elektroforetických migrací látek a jejich interakci s micelami tenzidů přidávaných do roztoků elektrolytů (o pH 1-7) v nadkritických micelárních koncentracích.

K limitním faktorům určujícím citlivost metody pro konkrétní separované analyty patří vlnová délka detektoru, koncentrace a extinkční koeficient vzorku, délka dávkování vzorku a

aplikované elektrické pole při separaci (souvisí i s případným efektivním chlazením kapiláry). V případě biomolekul se obvykle připravuje několik mikrolitrů vzorku o koncentraci 5-50 mg/ml. Dávkovaný objem roztoku bývá 1-2 nl, a z toho plyne, že pouze několik pikogramů vzorku prochází detektorem. Extrémní citlivosti lze dosáhnout použitím detekce založené na přímé či nepřímé fluorescenci indukované lasery. Dnes je možná i on-line kombinace CE metody s hmotnostní spektrometrií. Tyto metody jsou ale poněkud finančně náročnější.

Do skupiny CE metod patří i kapilární izotachofóza (ITP) (Everaerts et al., 1976). Jedná se o elektroforetickou metodu, při níž se všechny nabitě molekuly pohybují v elektrickém poli stejnou (=iso) rychlostí (=tacho). Může být využita k separaci kationtů i aniontů, ale ne současně.

Princip metody spočívá v tom, že se nejbližší katody (při dělení kationtů; dále= K), či anody (při dělení aniontů; dále = A) umístí elektrolyt, jehož kation (K) či anion (A) má v celém systému nejvyšší elektroforetickou pohyblivost [tzv. "vodící ion"]. Naproti tomu u anody (K), či katody (A), se umístí elektrolyt s nejnižší pohyblivostí kationtu (K) či aniontu (A) [tzv. koncový ion]. Oba ionty, vodící i koncový, mají stejný protion, který má významnou funkci pufru. Je-li mezi uvedené elektrolyty (vodící a koncový), umístěn vzorek s intermediální pohyblivostí iontů, pak se tyto ionty seřadí podle své efektivní pohyblivosti od nejrychlejšího až po nejpomalejší. Šířka zón je úměrná celkovému množství příslušných iontů, ale lze ji ovlivnit koncentrací vedoucího iontu. Přestože se jedná především o analytickou metodu, lze ji využít i v preparativním měřítku, případně jako předseparační stupeň, před jinou CE metodou.

Na příkladech CE separací polohových izomerů methoxyfenyloctových kyselin a 3-indolylderivátů karboxylových kyselin (= auxin a strukturně příbuzné látky či metabolity) bude v přednášce demonstrována separační účinnost výše zmiňovaných metod a uvedeny i možnosti optimalizace dělení. Možnosti zjišťování optických čistot enantiomerů, patřící mezi nejobtížnější separační úkoly, budou prezentovány na příkladech ITP separací optických izomerů efedrinových alkaloidů a CE separacích enantiomerů chloramfenikolu. (Snopek et al. 1988, 1992, 1996).

Literatura:

- Everaerts F.M., Beckers J.L. & Verheggen Th.P.E.M.(1976): In *Isotachopheresis, The Journal of Chromatography Library*, Vol.6, Elsevier, Amsterdam.
- Hjerten S. (1967): Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.* 9,122.
- Jorgenson J.W. & Lukacs K.D. (1981): *Anal.Chem.*, 53, 1298.
- Jorgenson J.W. & Lukacs K.D. (1981a): 218, 209.
- Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. & Ando T. (1984): *Anal. Chem.*, 56, 113.
- Terabe S., Otsuka K. & Ando T. (1985): *Anal. Chem.*, 57, 834.
- Snopek J., Smolková-Keulemansová E., Cserhádi T., Gahm K.H. & Stalcup A. (1996): In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Lehn J.-M. (Chr. Ed.), Vol.3, Pergamon, Elsevier Sci., Oxford, N.Y., Yushima, 515, a citace tam uvedené.
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E. (1988): *J.Chromatogr.*, 438, 211.
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E. (1992): *J.Chromatogr.*, 609, 1, a citace tam uvedené.

Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy

Sofrová, D.

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Albertov 2030, 128 43 Praha
tel: 02/21 95 23 27, fax: 02/21 95 23 31, e-mail: photosyn@natur.cuni.cz

Předmětem studia biochemie fotosyntézy jsou děje na molekulární úrovni, které probíhají hlavně v chloroplastech, v tylakoidních membránách a jejich submembránových částicích. Biochemie fotosyntézy zahrnuje jednak pochody spojené s přenosem elektronů a protonů, včetně fotolýzy vody; výsledkem je tvorba ATP, NADPH a O₂, jednak děje probíhající ve stromatu chloroplastů, obecně mimo tylakoidní membrány a to fixaci CO₂ a tvorbu sacharidů. (Následující příspěvek nebude vyčerpávajícím přehledem všech metod. Cílem je seznámit zájemce s běžnými, poměrně jednoduchými a dostupnými metodami.)

Celé téma lze rozdělit na:

I. Izolace (chloroplastů, tylakoidních membrán, subtylakoidních částic, event. některých enzymů).

II. Fotochemické aktivity (fotosystému II /PS II/ a fotosystému I /PSI/).

III. Další identifikační postupy a ostatní metody.

I. Izolace.

1. Podstata metody: rozrušení buněčných stěn, oddělení chloroplastů od ostatních částí buňky, získání chloroplastů s vysokou biologickou aktivitou.

2. Shrnutí základních postupů.

A. Homogenizační postupy, jako i používaná média jsou dosti různorodá. Homogenizace rostlinného pletiva obvykle mechanicky (třecí miska, homogenizátory). Homogenizační a resuspendační média "povinně" obsahují osmotikum (sacharidy, cukerné alkoholy, méně často NaCl), pufr (obvykle 5 a 100 mM, pH mezi 6,3 a 8,5), MgCl₂ (5 - 10mM). Další složky jsou věci názoru a "víry".

B. Pracovní postup. Homogenizace v příslušném médiu, rychlá a krátká centrifugace (do 2000xg, 60 sekund), resuspendace sedimentu, účinnější centrifugace (cca 2000xg, do 10 minut), konečná resuspendace.

3. Zhodnocení finanční a časové náročnosti.

Velmi nenáročná: jakákoliv běžná, i stolní, centrifuga, běžné chemikálie. Čas: max. 30 minut.

4. Úskalí metody: žádné.

Literatura:

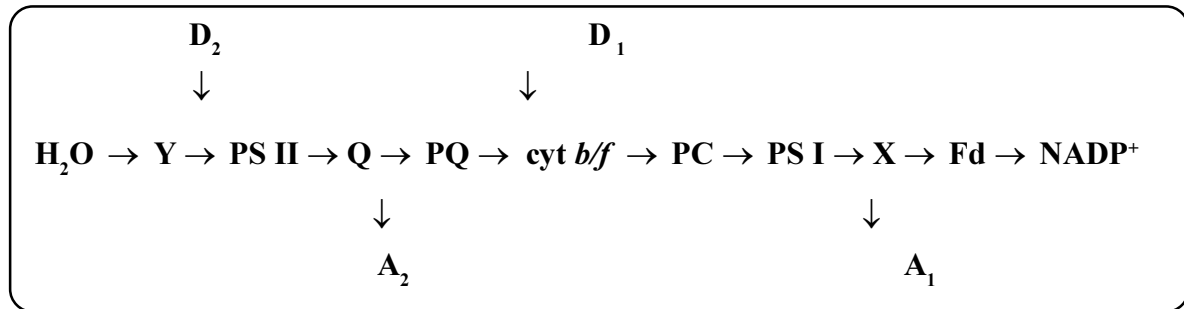
D.A. Walker (1971): Methods Enzymol. 23, 211 - 220

J.Barthová, D.Sofrová, M.Tichá (1980): Základní praktikum z biochemie, SPN Praha, str. 171 - 179.

Izolace tylakoidních membrán z chloroplastů znamená resuspendaci v hypotonickém médiu a následnou centrifugaci.

Poznámka: Izolace tylakoidních membrán z jiných typů fotosyntetických organismů (bakterie, sinice) se od výše popsaného standardního postupu vhodného pro vyšší rostliny obsahující chloroplasty liší.

Subtylakoidní částice, obvykle částice PS II a PS I, komplex cytochromů typu *b* a *f* či ATPsyntáza, vyžadují dezintegraci membrán a to nejčastěji tenzidy (detergenty). Nejvhodnější jsou: amfifilní tenzidy nebo tenzidy typu glykosidů.



Isolace rozpustných enzymů stromatu chloroplastů využívají běžných enzymologických postupů (dezintegrace pletiva, separace, čištění enzymu, enzymová aktivita, studium aktivního místa, regulační mechanismy).

II. Fotochemické aktivity

1. Fotochemické aktivity PS II a PS I představují vhodnou identifikaci těchto fotosystémů a v chloroplastech anebo v subtylakoidních částicích.
2. Často se používá nefyziologických donorů (D_2 před PS II, D_1 před PS I) a akceptorů (A_2 za PS II a A_1 za PS I) elektronů:

A. Chemikálie (difenylkarbazid jako příklad D_2 , dichlorfenolindofenol /DCPIP/ jako př. A_2 , chinony či redukovaný DCPIP jako př. D_1 a bipyridiniové soli jako př. A_1) nepatří mezi běžné chemikálie, ale jsou dostupné.

Přístroje: jakýkoliv spektrofotometr, včetně typu Spekol, lépe tzv. kyslíková elektroda Clarkova typu.

B. a **C.** Postup a vyhodnocení bude rozvedeno v přednášce.

Literatura:

A. Trebst (1972): *Methods Enzymol.* 24, 146 -164.

J. Barthová a spol.(1980): viz odstavec I.7.

III. Další postupy a ostatní metody jsou jednak metodickou nadstavbou postupů uvedených v odstavcích I a II, jednak představují další "demontáž" tylakoidních supramolekulárních komplexů. Bez další diferenciacce do bodů 1 a 8 lze sem zařadit:

Důkaz a stanovení fotosyntetických pigmentů spektrofotometricky (A.R. Wellburn /1994/: *J.Plant Physiol.* 144, 307 - 313).

Disociace pigmentoproteinů a separace jednotlivých polypeptidů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Jejich imunochemická identifikace.

Isolace některých polypeptidů, jejich aminokyselinová analýza, určení sekvence, eventuální použití mutantů s odlišným aminokyselinovým složením anebo sekvencí aminokyselin některých proteinů, sekvenování genů.

Krystalizace některých pigmentoproteinů, jejich rentgenostrukturní analýza, určení konformace a trojrozměrný model proteinů a pigmentů - je-li to ještě arzenál biochemie?

Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu

Šimek, P.

Entomologický ústav AVČR, Laboratoř analytické chemie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
tel: 038/777 52 86, fax: 038/436 25, e-mail: psimek@entu.cas.cz

V příspěvku je podán přehled současných metod hmotnostní spektrometrie a pracovišť v ČR, jež tuto techniku používají k analýze přírodních látek v rostlinných matricích. Pozornost bude zaměřena na nové způsoby ionizace biomolekul (ionizace za atmosferického tlaku, laserem) a na nové možnosti spojení metody MS se separačními technikami, zejména s kapalinovou chromatografií (LC/MS). Dále budou diskutovány principy, technické přednosti a omezení moderních hmotnostních spektrometrů z hlediska jejich využití v biochemické laboratoři. Zkušenosti s metodou MS budou doloženy aplikacemi z praxe Laboratoře analytické biochemie Entomologického ústavu a Laboratoře LC/MS Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Literatura:

Application of Modern Mass Spectrometry in Plant Science Research.
Russell, P.N., Terence, J.W. (ed.), Clarendon Press, Oxford (1996)

Izolace protoplastů, inokulace fytoviry a jejich imunodetekce

Šindelářová, M., Šindelář, L.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6,
tel: 02/24 31 01 09, fax: 02/24 31 01 13, e-mail: elsindel@site.cas.cz.

Podstata metod: Podstata přípravy mesofylových protoplastů tabáku spočívá v enzymatické degradaci buněčné stěny a tím k uvolnění protoplastů. Jejich inokulace kompletním virionem TMV je založena na skutečnosti, že jak virus, tak plasmalema protoplastu mají záporný povrchový náboj. Proto se na virové částice naváže polykationt (poly-L-ornithin) a tento komplex se stejným mechanismem naváže na plasmalemu; virová částice pak prochází přes membránu pinocytosou. Stanovení obsahu viru v protoplastech a procenta infikovaných protoplastů je založeno na metodě ELISA, při které se na antigen (virus) naváže protilátka značená alkalickou fosfatasou. Při použití vhodného substrátu se pak uvede do chodu specifická enzymová reakce, jejíž měřitelný barevný produkt odpovídá koncentraci enzymu a ta zase koncentraci antigenu (viru).

Mesofylové protoplasty připravujeme z listů tabáku o stáří 60 dní od vysetí, ze kterých vyřežeme mezi žilkami proužky šířky 1 mm. Proužky podrobíme plasmolyse při 25° C v 10 mM MES-KOH pufru o pH 5.5, který obsahuje 0.45 M manitol, 1 mM KNO₃, 10 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.2 mM KH₂PO₄, 1 nM KI a 0.1 nM CuSO₄ (CPW medium, [1]). Medium pak vyměníme za stejné obsahující 1 % (v/o) celulasy (Onozuka R-10, SERVA) a 0.25 % macerasy (Macerozyme R-10, SERVA) a vakuově infiltrujeme (na 1 g proužků používáme 10 ml media). Po 15 min při 30 ° C medium odlijeme, centrifugujeme 10 min při 2 000 g (odstranění většiny protoplastů houbového parenchymu) a znovu vrátíme k proužkům. Po 2 - 3 hod při 30° C odstraníme zbytky rostlinných pletiv filtrací přes nylonovou síťku 100 mm a protoplasty shromáždíme centrifugací (10 min 1 500 g). Protoplasty resuspendujeme v CPW mediu v kyvetách s úzkým hrdlem, přidáme stejný objem 1.4 M sacharosy v CPW mediu a centrifugujeme 2 min při 100 g. Za těchto podmínek zbytky buněk sedimentují a protoplasty vyflotují do zúženého hrdla kyvety. Protoplasty se odeberou pipetou, zředí 35 ml CPW media, v kyvetě podvrství 3 ml roztoku 10 mM MES-KOH pH 5.5 (obsahujícího 0.6 M sacharosu a 5 mM CaCl₂), převrství 3 ml 0.2 M CaCl₂ v 10 mM MES-KOH pufru, a centrifugují 3 min při 100 g. Horní vrstva obsahuje převážně protoplasty epidermis, spodní vrstva protoplasty palisádového parenchymu [2]. Tyto protoplasty odebereme pipetou a zředíme do 10 ml 0.45 M manitolem.

Takto získané protoplasty používáme po jejich rozbití na síťce s otvory 20 mm pro izolaci buněčných organel. Pokud používáme připravené protoplasty ke kultivaci, sterilizujeme použité listy 2 % přípravkem SAVO a pracujeme důsledně za sterilních podmínek ve flow-boxu. Roztoky sterilizujeme v autoklávu, enzymy pro izolaci protoplastů nejprve centrifugujeme (10 min 20 000 g), a pak sterilizujeme za chladu filtrací přes filtr s póry 0,45 mm. Stejným způsobem sterilizujeme i suspenzi TMV a roztok poly-L-ornithinu.

Při **inokulaci protoplastů virem mosaiky tabáku** (TMV) používáme čerstvě izolovaný virus [3] (40 mg TMV/5 ml 2 mM citrátového pufru pH 5.4 obsahujícího 0.45 M manitol). Tato suspenze se smíchá s 5 ml stejného pufru obsahujícího 40 mg poly-L-ornithinu (PLO, MW 118 000), po 20 min se přidá do 10 ml čerstvě připravených protoplastů (cca 10⁶ ptpl/ml) a nechá reagovat 30 min při 25° C. Protoplasty se oddělí od neadsorbovaného viru centrifugací (10 min 100 g), třikrát promyjí 0.45 M manitolem s 0.1 mM CaCl₂ a resuspendují v CPW mediu na výslednou koncentraci cca 10⁵ ptpl/ml. Takto získané protoplasty inkubujeme v objemech po 10 ml ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách za konstantního osvětlení při 40 mmol . m⁻².s⁻¹ a teplotě 25° C. Kontrolní neinokulované (mock-inoculated) protoplasty připravujeme přesně stejným způsobem bez aplikace TMV. Vzhled a kvalitu protoplastů kontrolujeme mikroskopicky (zvětšení 200x)

v Bürkerově komůrce, kde rovněž stanovujeme jejich *viabilitu* pomocí methylenové modře [4] (živé protoplasty se nebarví modře).

Při stanovení *obsahu TMV v protoplastech* používáme standardní metody DAS-ELISA s použitím králíčích polyklonálních protilátek připravených proti izolátu TMV-vulgare a protilátek s navázanou alkalickou fosfatasou. Obsah viru byl stanoven z kalibrační křivky purifikovaného TMV pomocí softwaru popsáno v "Metodách enzymové imunanalýzy" [5].

Při imunoenzymatickém stanovení *procenta inokulovaných protoplastů* centrifugujeme inkubované protoplasty 10 min při 160 g, sediment dvakrát promyjeme 5 ml vychlazeného (0-4°C) roztoku 0.35 M KCl v 10 mM MES-KOH pufru pH 5.5, třikrát 3 ml vychlazeného 96 % ethylalkoholu a dvakrát PBS (0.15 M NaCl v 50 mM draselném fosfátovém pufru pH 7.0) při standardním centrifugačním postupu (2 min při 100 g). Protoplasty resuspendujeme v 1 ml PBS pufru obsahujícím 2 ml anti-TMV IgG konjugované s alkalickou fosfatasou a inkubujeme 16 h při 4°C. Po zředění PBS vzorek centrifugujeme 5 min při 160 g, protoplasty resuspendujeme ve 2 ml TNM pufru (0.1 M tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5) a centrifugujeme 5 min při 160 g. Získané protoplasty resuspendujeme v 0.1 ml TNM pufru a přidáme 2 - 5 ml roztoku BCIP a NBT (0.5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu a 7.5 mg nitroblue tetrazolium se rozpustí v 1 ml dimethylformamidu, a pak se přidají 2 ml TNM pufru). Reakce probíhá 1.5 - 3 hod při 37°C. Infikované protoplasty se zbarví černomodře a jejich počet se určí v Bürkerově komůrce. Relativní chyba stanovení není vyšší než 2 %.

Největší *technické problémy* jsou dány již samotnými vlastnostmi protoplastů, jejich relativní nestabilitou, křehkostí a snadnou evakuací vlivem používaných osmotik. Další problémy vznikají při zachování sterilních podmínek při přípravě a kultivaci protoplastů. Je nutné nalézt kompromis mezi intenzitou a délkou sterilizace listových pletiv přípravkem SAVO, což ovlivňuje viabilitu. Dalším problémem je flotace protoplastů, které se nelze vyhnout. V tomto případě je nutné měnit osmolaritu přidávaných sacharosů, dokud nedojde k flotaci protoplastů. A asi největším a zcela obecným problémem je závislost kvality a vlastností připravených protoplastů měnící se v závislosti na stáří rostlin, prostředí kultivace a ročním období). Při sledování počtu infikovaných protoplastů je důležité odzkoušet množství přidávaného roztoku BCIP s NBT (2-5 ml). Při nižším množství se infikované protoplasty nedostatečně obarví, při vyšším množství může docházet k nespecifickému barvení, nutno provést kontrolu na neinfikovaných protoplastech.

Literatura:

- [1] **Cocking E.C., Peberdy J.F.:** The Use of Protoplasts from Fungi and Higher Plants as Genetic Systems. University of Nottingham, Nottingham, 1974.
- [2] **Fannin F.F., Shaw J.G.:** Plant Sci **51**,305-310,1987.
- [3] **Gooding G.V., Hebert T.T.:** Phytopathology **57**,1285,1967.
- [4] **Hooley R., McCarthy D.:** Physiol.Plant Pathol.**16**,25-38,1980.
- [5] **Mančal P.:** Metody Enzymové Imunanalýzy - Ústav sér a očkovacích látek, Praha 1987

Měření katalytické aktivity sacharosynthasy v *in vitro* pěstovaných mikrohřízkách bramboru

Vojtěchová, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, Praha 6-Ruzyně
tel: 02/36 08 51 1. 445, e-mail: vojtech@genbank.vurv.cz

Sacharosynthasa (UDP-glukosa D-fruktosa 2-glukosyl transferasa, E.C. 2.4.1.13.) katalysuje zvratnou reakci :



pH optimum reakce ve směru štěpení je 6.6, pH optimum ve směru syntézy sacharosy je 8.8. V podmínkách *in vivo* je rovnováha posunuta ve prospěch štěpení sacharosy (1,2). Aktivita enzymu se stanovuje jako mmol produktu vzniklého za minutu. Principem metody je kolorimetrická analýza produktů (sacharosy nebo fruktosy) přítomných v reakční směsi po zastavení enzymové reakce. Z přístrojového vybavení je nutná centrifuga (nejlépe chlazená), spektrofotometr měřící ve viditelné části spektra, termostat na inkubaci vzorků a vodní lázeň na zahřívání zkumavek.

Vzorek může být čerstvý, nebo zmrazený v tekutém dusíku a uchovávaný při -80°C . Cca 200 mg vzorku přesně se homogenisuje ve vychlazené porcelánové mističce se 3x 2.0 ml studeného extrakčního pufru (20 mM MES pH 6.5 + 0.5 mM DTT), centrifuguje se 5' při cca 2000 x g a supernatant se odsolí do stejného pufru podle Penefského (3).

Na přípravu odsolovacích kolonek podle Penefského používáme plastické špičky k pipetám 1000 ml které ucpeme ve špičce malým kouskem vaty. Kolonky Sephadexu G-25 Medium se nalijí a ekvilibrují jako normální kolony na chromatografii. Pak se nasadí na malou zkumavku nebo se prostrčí proděravěným víčkem eppendorfy, odcentrifuguje se přebytečný pufr, vymění se spodní nádobka, nanese se vzorek a vše se znovu zcentrifuguje. Ve spodní nádobce se sebere odsolený vzorek. Kapacita vzorku je 20% objemu kolony. Maximální použitelná rychlost je 1000 x g. Je možno použít i úhlový rotor.

Měření aktivity ve směru syntézy sacharosy:

Enzymový preparát (1/10 celkového objemu reakční směsi) se inkubuje s 10mM Fru a 10 mM UDPG v 50 mM Tris-Cl pH 7.5. Do reakční směsi je možno přidat aktivátory 15 mM MgCl_2 a 1 mM DTT a 5 mM NaF (jako inhibitor UDPG- a ADPG-pyrofosforylas; nutné pouze u hrubých extraktů a částečně purifikovaných vzorků). Jako slepý pokus inkubujeme obsahuje vzorek enzymu, který byl předem tepelně denaturován. Reakce se ukončí přidáním stejného objemu 5N NaOH a 10 min. zahříváním ve vroucí vodní lázni (inaktivace enzymu a rozložení se nezreagované fruktosy). Stanovení sacharosy se provádí anthronovou metodou (4).

Měření aktivity ve směru štěpení sacharosy:

Enzymový preparát (1/10 celkového objemu reakční směsi) se inkubuje s 100mM sacharosou a 5mM UDP v 20 mM HEPES-KOH 7.0. Do reakční směsi je možno přidat 5 mM NaF jako inhibitor pyrofosforylas. Jako slepý pokus inkubujeme obsahuje vzorek enzymu, který byl předem tepelně denaturován. Je nutné mít kromě slepého vzorku také kontrolu bez UDP - pozadí invertasy. Reakce se ukončí zahříváním 1 - 2 minuty na vroucí vodní lázni nebo tři minuty při 95°C . Fruktosu stanovíme metodou podle Somogyiho-Nelsona (4)

Anthronová metoda stanovení sacharidů: (4):

do 15 ml zábrusové zkumavky se napipetují 3 ml anthronového činidla (2 mg anthronu/ml konc. H_2SO_4 , nutno připravovat denně čerstvý) a převrství se 1 ml vodného roztoku vzorku. Opatrně se protřepe za chlazení v ledové lázni, aby nedošlo k přílišnému zahřátí směsi. Zahřívá se na vroucí

vodní lázni 5 minut a potom se ochladí vodou. Měří se absorbance při 625 nm. Současně se měří kalibrační křivka o koncentracích mezi 10 a 80 mg/ml sacharosy.

Stanovení redukcujících cukrů podle Somogyiho a Nelsona (4):

Činidlo I: v 800 ml H₂O se rozpustí 24 g Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 12 g vianu sodno-draselného a 144 g Na₂SO₄

Činidlo II: ve 200 ml H₂O se rozpustí 4 g CuSO₄.5 H₂O a 36 g Na₂SO₄

Pracovní činidlo se připravuje těsně před použitím smícháním 4 dílů činidla I a 1 dílu činidla II. Arsenomolybdatové činidlo: ve 450 ml H₂O se rozpustí 25 g bezvodého molybdenanu amonného, za chlazení a míchání se přidá 21 ml konc. H₂SO₄ a 3 g Na₂HAsO₄.7 H₂O rozpuštěné ve 25 ml H₂O. Nechá se stát 24 hodin při 37°C, zfiltruje se a uchovává se v temnu. 1 ml vodného roztoku vzorku se smíchá s 1 ml pracovního činidla a 10 min. se vaří na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml arsenomolybdatového činidla, dobře se promíchá a naředí se H₂O na 10 ml. Odečítá se absorbance při 550 nm. Současně se měří kalibrační křivka o koncentracích mezi 10 a 80 mg/ml glukosy nebo fruktosy.

Kolorimetrické metody používané pro analýzu produktů reakce jsou relativní metody, které vyžadují kalibraci, a to pokud možno současně s měřením vzorků. Pro výpočet katalytické aktivity je nutno experimentálně ověřit, že závislost koncentrace produktů na čase je v daném intervalu za daných podmínek (teplota, pH, koncentrace substrátů a enzymu) lineární. Pro výpočet koncentrací cukrů pomocí kalibrační křivky lze použít libovolný počítačový program, schopný provádět matematické výpočty.

Obě použité metody jsou finančně a přístrojově nenáročné, zato jsou poměrně náročné na čas a manipulaci.

Anthronová metoda je dost nepříjemná tím, že se pracuje s koncentrovanou kyselinou sírovou, a pokud se do směsi dostane další voda (např. při měření), dojde ke vzniku bílého zákalu, který vzorek znehodnotí. U obou stanovení dochází při delším stání k samovolným změnám zbarvení (a tedy ke změnám v molárních absorpčních koeficientech) a u stanovení podle Somogyiho a Nelsona se v roztoku po naředění tvoří bublinky CO₂, které ruší při odečítání absorbance. Se stanovením podle Somogyiho a Nelsona rovněž interferuje přítomnost redukčních činidel.

Pro měření lze použít široké spektrum pufrů a aktivita není významně ovlivněna ani iontovou silou. Enzym není absolutně specifický pro UDP, aktivita s ADP dosahuje asi 70% aktivity s UDP a s TDP asi 30% aktivity s UDP (1). Enzymová reakce ve směru syntézy sacharosy je inhibována produktem UDP, ve směru štěpení sacharosy produkty fruktosou a UDP-glukosou (2). Pro měření aktivity ve směru štěpení sacharosy v hrubých extraktech *in vitro* rostoucích bramborových hlízek nelze pracovat v oblasti pH blízké pH optimu kvůli vysoké aktivitě kyselých invertasy. Pro měření ve směru syntézy sacharosy zase může interferovat vysoká aktivita pyrofosforylas.

Kolorimetrická stanovení nejsou příliš specifická, proto se nehodí pro měření enzymové aktivity v neodsolených hrubých extraktech. Specifické stanovení UDP-glukosy pomocí UDP-glukosadehydrogenasy a stanovení fruktosy spřaženou reakcí fosfoglukoisomerasa-hexokinasa-glukosa 6-fosfátdehydrogenasa jsou sice velmi specifická, ale jsou poměrně nákladná, a i zde je potřeba brát v úvahu možnou interferenci některé ze složek vzorku s enzymovým stanovením. Analýzu produktů je rovněž možno provést pomocí HPLC, nebo je možno použít značených substrátů a následně separace a analýzy produktů reakce scintilačním počítačem; pro rutinní stanovení aktivity se však tyto metody pro svou nákladnost a komplikovanost nepoužívají.

Bibliografie:

1. Pressey,R (1969): Potato sucrose synthase: purification, properties and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764.
2. Wolosiuk,RA; Pontis,HG (1974): The role of sucrose and sucrose synthase in carbohydrate plant metabolism. *Mol.Cell.Biochem.* 4, 115-123.
3. Penefsky,H(1977) Reversible binding of inorganic phosphate by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252, 2891 - 2899.
4. Ashwell,G (1957): Colorimetric Analysis of Sugars. In: *Methods of Enzymology*. 1st ed. Vol. 3. (Eds: Colowick,SP; Kaplan,NO) Academic Press Inc, New York, 73-105.

Imunoafinitní chromatografie cytokininů

Vaňková, R., Gaudinová, A., Süssenbeková, H., Dobrev, P., Strnad, M., Holík, J.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha 6
tel: 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59, e-mail: vankova@ueb.cas.cz

1. PRINCIP IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE (IAC)

Principem IAC je izolace látek na základě jejich interakce se specifickou protilátkou navázanou na pevném nosiči. Většina sloučenin ve vzorku projde IAC kolonou nezadržena, nespecificky nasorbované sloučeniny se vymyjí pufrům a specificky zachycené sloučeniny se eluují vhodným činidlem (např. methanolem). Tímto způsobem se dosáhne v jednom chromatografickém kroku takového stupně vyčištění vzorku, kterého lze jen stěží dosáhnout chromatografií na fyzikálně-chemickém základě.

2. METODIKA

2.1. Nezbytné vybavení

IAC není náročná na přístrojové vybavení. Plně postačuje klasické zařízení chemické laboratoře (centrifuga, třepačka, spektrofotometr, radiometr). Jejím nezbytným předpokladem je ovšem dostatečně velké množství protilátek (řádově desítky mg) o vhodné specifitě. Nosiče pro vazbu protilátek jsou komerčně snadno dostupné, a to i v aktivované formě.

2.2. Příprava imunosorbentu

Protilátky. Pokud jsou pro přípravu imunosorbentu používány monoklonální protilátky, pak při vysokém titru stačí jejich několikanásobné (3x) přesrážení síranem amonným (50% nasycení). Pokud jsou používány polyklonální protilátky, je nezbytné jejich afinitní vyčištění. Protilátky jsou selektovány a testovány pomocí kompetitivní RIA. Protilátky proti cytokininům nesmí vykazovat křížovou reakci s adeninem ani s adenosinem, které se vyskytují v rostlinných vzorcích v koncentracích řádově vyšších než stanovované cytokininy. Pro přípravu imunosorbentu je výhodnější použít protilátky se širší, tzv. skupinovou specifitou (např. protilátky proti isopentenyladenosinu s výraznou interakcí s *trans*-zeatin ribosidem a dihydrozeatinem). Skupinově specifické sorbenty umožňují zachytit ze vzorku celou skupinu příbuzných látek, v našem případě všechny isoprenoidní cytokininy (s výjimkou 7N- a O-glukosidů, které vyžadují vlastní protilátky). Obecně platí, že protilátky připravené proti nepolárním N⁶-substituovaným haptenum (např. isopentenyladenosinu) vykazují širší specifitu (Strnad et al., 1990). V případě úzce specifických protilátek lze použít směs dvou nebo více protilátek.

Vazba na nosič. Tradiční způsob vazby protilátek na nosič využívá funkčních skupin proteinu (např. volných aminoskupin). Ve velké srovnávací studii imunosorbentů pro cytokininy (Davis et al., 1986) se jako nejlepší ukázal Affi-Gel 10 (zesíťovaná agarosa s desetihlíkatým oddalovacím ramínkem - "spacerem"). Výhodou této metody je velmi snadné provedení; orientace protilátek navázaných na nosič je ovšem náhodná ("random"). Zvláště v případě vysokomolekulárních substrátů je pak řada vazebných míst na protilátkách stericky nepřístupná. Hoffman a O'Shanessy (1988) zavedli orientovanou imobilizaci protilátek. Využili skutečnosti, že pouze na Fc fragmentu protilátky (krystalická, konstantní část) jsou cukerné zbytky. Ty lze oxidovat buď jodistanem sodným nebo enzymaticky (v závislosti na typu cukerného zbytku galaktosaoxidasou, příp. kombinací neuraminidasy a galaktosaoxidasou). Vzniklé aldehydické skupiny velmi snadno a pevně reagují s hydrazidovými skupinami. Tento postup vyžaduje odsolení protilátek po jejich oxidaci,

protože přítomnost jodistanu ruší vazbu na nosič. Množství navázaných protilátek se v obou případech stanovuje spektrofotometricky (z rozdílu koncentrace ve vzorku před vazbou a po ní).

2.3. *Imunoafinitní chromatografie*

Po získání imunosorbentu se stanoví jeho maximální kapacita pro jednotlivé cytokininy. Na IAC kolonu se aplikuje směs radioaktivně značeného a neznačeného cytokininu, tak aby bylo dosaženo vhodného hmotového zatížení při dostatečné aktivitě. Po promytí pufrům a vodou je specificky navázaný cytokinin eluován vychlazeným methanolem. Kolona musí být okamžitě promyta vodou a pufrům. Je zapotřebí stanovit kapacitu imunosorbentu a výtěžnost pro jednotlivé cytokininy ve směsi, v koncentrační oblasti mírně převyšující hodnoty cytokininů ve vzorcích. Rozdílná afinita jednotlivých cytokininů vůči protilátkám se totiž může projevit v jejich maximální kapacitě (příp. výtěžnosti) až při kompetici s ostatními cytokininy.

2.4. *Porovnání orientované a neorientované vazby protilátek*

Orientovaná imobilizace, která umožnila značně zvýšit kapacitu imunosorbentů u řady vysokomolekulárních látek (např. Petkov et al. 1990), v případě cytokininů nevykázala výrazný účinek. Je možné, že protilátky navázané přes spacer (C_{10}) na Affi-Gel 10, mají dostatek konformační volnosti umožňující cytokininům dobrý přístup. Maximální kapacity imunosorbentů získaných oběma přístupy byly v podstatě stejné (Vaňková et al., podáno do tisku).

3. FINANČNÍ NÁROČNOST

Finanční náročnost metody je dána dostupností vhodných protilátek (v dostatečném množství). Cena sorbentů od renomovaných firem (např. Bio-Rad: Affi-Gel 10, Affi-Gel Hz) sice rovněž není zanedbatelná, ale lze s úspěchem použít i sorbenty vyrobené v tuzemsku (např. perlová celulóza Perloza MT 200 - Hz). Oba typy nosičů vykazovaly při přípravě imunosorbentů pro cytokininy velmi podobné vlastnosti (Perloza měla dokonce o něco vyšší vazebnou kapacitu).

4. POTENCIÁLNÍ ZDROJE POTÍŽÍ

Protilátky, stejně jako jiné proteiny, jsou citlivé na napětí. Proto je třeba se vyhnout nadměrnému třepání apod. Citlivost jednotlivých protilátek vůči jodistanu se liší. Je proto lépe volit alespoň zpočátku sníženou teplotu (4°C) a kratší dobu inkubace (30 min). Při vazbě protilátek na nosič je zapotřebí dosáhnout co nejlepšího kontaktu s nosičem, ale zároveň šetrně (lepší než třepačka je kývačka nebo rotační odparka). Při IAC je někdy vhodné nanést vzorek opakovaně nebo zastavit na určitou dobu průtok. Methanol pro eluci by měl být dobře vychlazený. Životnost kolony lze výrazně prodloužit zařazením předkolony s nespecifickými protilátkami. Dobře udržované kolony si uchovávají svou kapacitu až několik let, pokud nedojde k jejich mikrobiální kontaminaci (musí být skladovány v pufru obsahujícím azid).

5. UPLATNĚNÍ

V poslední době se IAC stále více uplatňuje ve standardním analytickém postupu stanovení CK. Ionexové chromatografie by měly předcházet IAC, vzhledem k tomu, že by vzorky měly být pokud možno zbaveny fenolů a barviv. Přechištění na IAC výrazně zpřesní analýsu a zlepší detekční limit, protože při následné HPLC nedochází k případnému nekontrolovatelnému posunu retenčních časů vlivem přítomnosti velkého množství jiných látek ve vzorku a i konečné imunostanovení (ELISA, RIA) není rušeno nežádoucími interferenčními látkami.

Literatura:

Davis, G.C., Hein, M.B. a Chapman, D.A. (1986) Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules. *J.Chromatogr.* 366: 171-189.

- Hoffman, W.L. a O'Shannessy, D.J. (1988) Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports. J. Immunol. Methods 112: 113-120.
- Petkov, L., Sajdok, J., Rae, K., Suchová, M., Káš, J. a Turková, J. (1990) Activation of galactose-containing glycoprotein and solid supports by galactose oxidase in presence of catalase for immobilization purposes. Biotechnol. Techniques 4(1): 25-30.
- Strnad, M., Vaněk, T., Binarová, P., Kamínek, M. a Hanuš, J. (1990) Enzyme immunoassays for cytokinins and their use for immunodetection of cytokinins in alfalfa cell culture. V Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development. (Kutáček, M., Elliott, M.C. and Macháčková, I., eds.) str. 41-54. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Vaňková, R., Gaudinová, A., Sussenbeková, H., Dobrev, P., Strnad, M., Holík, J. a J. Lenfeld. (podáno do tisku) Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. Plant Cell Physiol.

Středa 5.11.1997

Molekulárně-genetické přístupy ke studiu rostlinné buňky

| | |
|------------------------------|---|
| Bůžek, J. | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (přesunuto na čtvrtek) |
| Bůžek, J. <i>et al.</i> | Detekce repetitivních DNA sekvencí na chromozómech <i>Melandrium album</i> metodou fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| Fajkus, J. | Analýza struktury DNA a chromatinu |
| Fulneček, J. | Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování |
| Honys, D. | Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA |
| Konečná, H. | Syntéza a purifikace oligonukleotidů |
| Kovařík, A. | Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy |
| Nejedlá, E. | Zkušenosti s genetickým analyzátozem ABI PRISM 310 |
| Pavingerová, D. | Metody transformace rostlin pomocí <i>Agrobacteria</i> |
| Rotrekl, V. | Cílená a náhodná mutagenese DNA v podmínkách <i>in vitro</i>. Příklady a použití. |
| Říha, K. | Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů |
| Říha, K. <i>et al.</i> | Izolace transgenních buněčných linií u modelové dvoudomé rostliny <i>Melandrium album</i> |
| Smýkal, P. | Klonování diferenciólně exprimovaných mRNA |
| Štorchová, H. | Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii |

Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.

Fluorescenční *in situ* hybridizace

Bůžek, J.

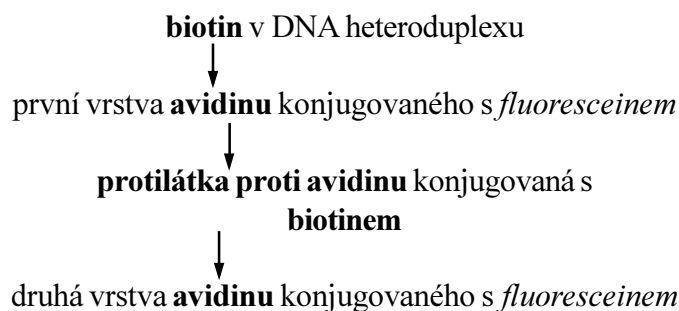
Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: buzek@ibp.cz

Historie a princip metody

Koncem šedesátých let bylo zjištěno, že hybridizaci nukleových kyselin lze úspěšně provádět i tehdy, je-li cílová nukleová kyselina obsažena ve strukturách cytologického preparátu, například v chromozómech (Pardue a Gall 1969). Tím byl položen základ zcela novému, přímému způsobu mapování genomů. První značkou, která byla používána v sondách nukleových kyselin, byly izotopy (^3H , ^{14}C , ^{35}S), jejichž výhodou je vysoká citlivost detekce, nevýhodou však nepřesně lokalizovaný signál na chromozómech. Po autoradiografii preparátů je někdy nutno statisticky zhodnotit distribuci stříbrných zrn podél chromozómu a teprve na základě tohoto hodnocení lze rozhodnout o umístění dané sekvence (např. Ambros *et al.* 1986).

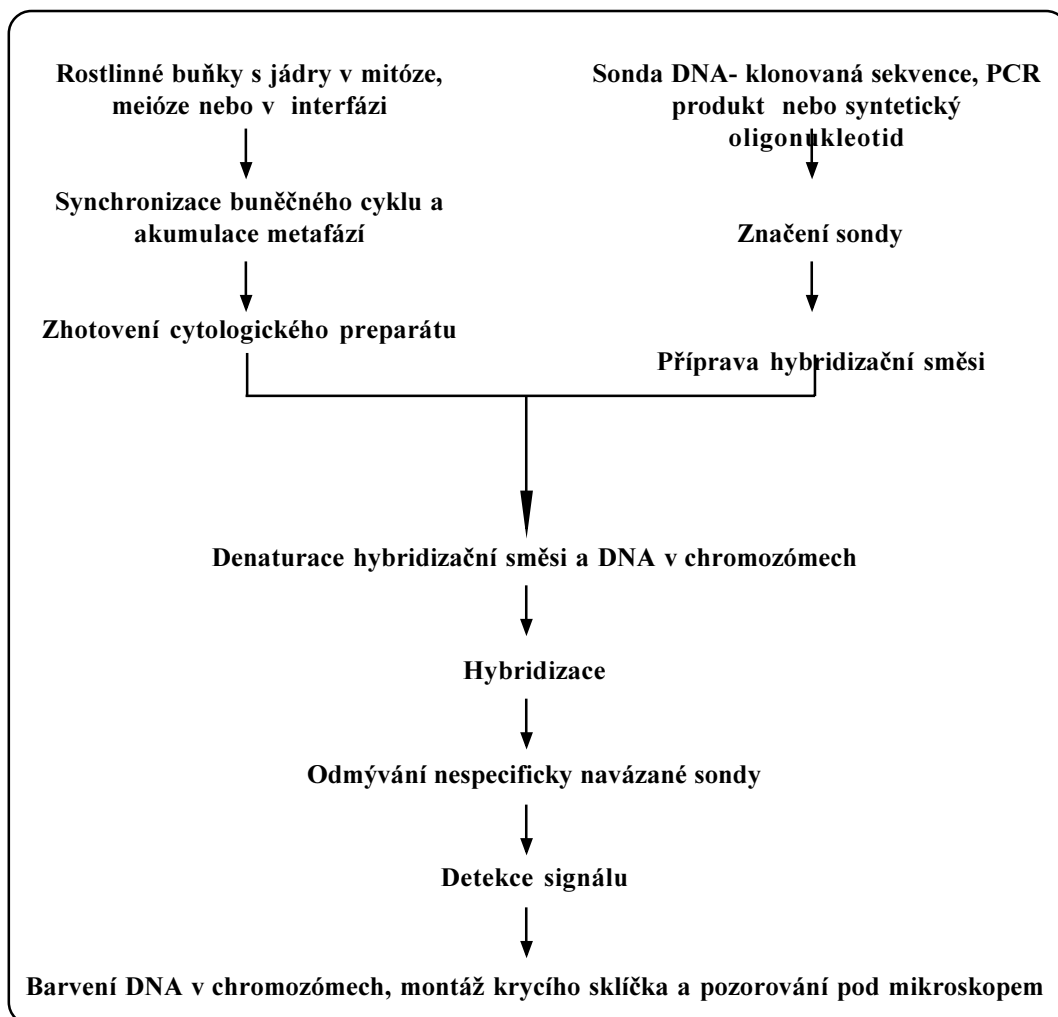
Posléze se přešlo na značení pomocí jednoduchých organických molekul (biotin, digoxigenin) a heteroduplexy DNA v chromozómech se detekovaly pomocí příslušných protilátek nebo jiných proteinových ligandů, konjugovaných s molekulami umožňujícími jejich vizualizaci v mikroskopu. Nejprve to byly enzymy (peroxidáza, alkalická fosfatáza) přeměňující určitý substrát v barevný nerozpustný produkt. Pravou revoluci způsobilo však zavedení fluorescenčního značení, které s sebou přineslo řadu výhod (Jiang a Gill 1994), například výrazné zvýšení citlivosti nebo možnost užití více sond najednou. Fluorescenční značka (nejčastěji fluorescein, rhodamin nebo nověji např. cyaninová barviva) může být buďto přímo navázána k nukleotidu, např. dUTP, a inkorporována do sondy NK (přímé značení, např. Reader *et al.* 1994) nebo může být konjugována k proteinovému ligandu proti biotinu nebo digoxigeninu. Podle toho, jaký zvolíme postup značení a detekce, bude procedura různě rychlá a citlivá. Přímé značení se používá tam, kde je žádoucí rychlost (imunodetekce se neprovádí), ale není třeba vysoké citlivosti (značení celých chromozómových sad pomocí genomové *in situ* hybridizace, Anamthawat-Jónsson a Reader 1995).

Při použití sondy značené biotinem nebo digoxigeninem a následné detekci signálu pomocí protein-fluorescenčního konjugátu lze vhodně zvolenou kaskádou reakcí dosáhnout vysoké citlivosti. V posledních asi třech letech se díky tomu již poměrně často objevují práce o detekci velmi krátkých a unikátních sekvencí na rostlinných chromozómech (např. Hoopen *et al.* 1996), ačkoli je to mnohem náročnější úkol nežli u živočichů (rostlinné chromozómy jsou velmi kontrahované a buněčná stěna často ztěžuje penetraci proby i pozorování výsledku v mikroskopu). Způsobů amplifikace signálu je celá řada. V naší laboratoři se používáme následující postup, jenž využívá afinity avidinu k biotinové značce (systém firmy Vector, viz též Bůžek *et al.* 1997).



Fluorescenční značka je excitována světlem rtuťové výbojky o takové vlnové délce, kterou propustí příslušný filtr zabudovaný v mikroskopu. Emitovanou fluorescenci daného fluorochromu pak pozorujeme jako signál (fluorescein - zelená fluorescence, rhodamin - červená fluorescence), DNA v chromozómech se barví látkou s odlišnou fluorescencí (DAPI - modrá, propidium jodid - červená).

Obecné schéma postupu :



Poznámky:

Pokusný materiál a příprava preparátů: Nejrozšířenější je fluorescenční *in situ* hybridizace na mitotických chromozómech. Klasická metoda jejich přípravy je akumulace metafází v meristému kořenových špiček (např. ledovou vodou, kolchicinem, monobromnaftalenem atd.), fixace, macerace celulázami a pektinázami a roztlak. Tento postup se (s výjimkou synchronizace a akumulace metafází) užívá i při přípravě preparátů meiotických chromozómů z pylových mateřských buněk. Dokonalejší odstranění buněčných stěn představuje metoda izolace mitotických protoplastů. Spočívá v působení celulólytických enzymů na nefixované kořenové meristémy obsahující jádra v mitóze. Do izotonického roztoku se pak uvolní protoplasty, které se nechají mírně nabotnat přidáním destilované vody, fixují se a kapou na preparát. Lze tak docílit velmi čistých preparátů s dobře rozprostřenými metafázními figurami, vhodných pro různé účely (*in situ* hybridizace-Bůžek *et al.* 1997, *in situ* nick translace-Vyskot *et al.* 1993). Preparáty se mohou

ještě ošetřit ribonukleázou a proteolytickými enzymy pro snížení pozadí a lepší penetraci probe. V jistých specifických případech se používají pletivové řezy s jednou nebo více vrstvami buněk s intaktními, neroztlačenými jádry. Tento materiál se uplatňuje při studiu prostorové lokalizace DNA sekvencí (repeticí, telomer) v interfázi. K vyhodnocení preparátů se obvykle užívá konfokální laserový skenovací mikroskop (CLSM, Rawlins *et al.* 1991).

Značení sondy: Provádí se výhradně pomocí kitů od různých firem (Amersham, Boehringer), buďto extenzí náhodných primerů připojených k denaturované DNA, nebo nick translací (vytvoří se jednořetězcový zlom - nick - v cukrfosfátové kostře DNA a následně probíhá výměna nukleotidů v daném řetězci). Značka je většinou připojena na raménku (C_{11}) k dUTP, kterým se nahrazuje část tymidinů v nově syntetizované DNA. Do značených oligonukleotidů se biotin-dUTP vkládá již při jejich syntéze. Po značení je vhodná kontrola inkorporace značeného dUTP, např. nanesením několika ředění sondy na membránu a detekcí konjugátem avidin-alkalická fosfatáza nebo anti-digoxigenin-alkalická fosfatáza. Stupeň inkorporace se stanoví pomocí intenzity štěpení chromogenního substrátu (NBT- BCIP).

Technika fluorescenční *in situ* hybridizace umožňuje detekovat polohu více různých DNA sond zároveň na jednom preparátu, pokud použijeme pro každou sondu jinou značku, např. fluorescein-dUTP a rhodamin-dUTP (přímé značení), nebo biotin a digoxigenin-dUTP s příslušně odlišnými detekčními systémy aplikovanými postupně (nepřímé značení). Tato metoda se nazývá multicolour FISH (viz např. Jiang a Gill 1994).

Denaturace a hybridizace: Někteří autoři doporučují společnou denaturaci sondy a preparátu na vyhřívané ploché destičce (např. upravený termocykler pro PCR - Heslop-Harrison *et al.* 1991). V naší laboratoři se nejlépe osvědčila denaturace oddělená. Sonda se denaturuje ve vroucí vodní lázni v mikrozkumavce a posléze se rychle zchladí v ledové lázni. Chromozómové preparáty se denaturují krátce (cca 1-2 minuty) v 70% formamidu (snižuje T_m DNA) při cca 70°C. Poté se rychle zchladí ve vzestupné ethanolové řadě (50, 70, 100 %) při

-20°C a vysuší se proudem vzduchu. Delší denaturace při vyšší teplotě by vedla k poškození struktury chromozómů. Hybridizační směs obsahuje mimo denaturované DNA sondy ještě nosičovou DNA (sonikovaná denaturovaná DNA připravená ze spermií lososa), formamid, roztok solí (SSC) a dextranulfát. Po aplikaci hybridizační směsi a krycího sklíčka se preparát zarámuje (používáme gumové lepidlo) a nechá inkubovat nejčastěji přes noc ve vlhké komůrce při 37°C.

Odmývání a detekce: Odmývání nespecificky navázané sondy ve formamidu a SSC je analogické odmývání při membránových hybridizacích. Při použití krátkého oligonukleotidu jako sondy je třeba stringenci snížit. Při hybridizaci s přímo značenou sondou následuje po tomto kroku již jen barvení DNA v chromozómech a pozorování. Je-li sonda značena biotinem nebo digoxigeninem, je nutno provést kaskádu amplifikačních a vizualizačních reakcí. Nejdříve je třeba provést vysycení povrchu preparátu (např. proteiny příslušného séra), aby nedocházelo k nespecifické vazbě daných ligandů a tím ke zvýšení pozadí. Několik desítek mikrolitrů roztoku fluorescenčně značené protilátky nebo avidinu v příslušném inkubačním pufu se nakape na preparát a inkubace probíhá ve vlhké komůrce pod kouskem plastické fólie. Mezi jednotlivými kroky musí následovat důkladné odmývání v PBS (ve skleněných kyvetách, tzv. Coplin jar).

Barvení chromozómů, montáž a pozorování: Pro barvení DNA v chromozómech užíváme většinou roztoku barviv DAPI (DNA specifické) nebo PI (DNA a RNA specifické) v komerčně vyráběném médiu (Vectashield, Vector, VB), které snižuje zhášení fluorescence při pozorování. Po aplikaci několika desítek mikrolitrů roztoku se přiloží krycí sklíčko, preparát se zarámuje a po cca 15 minutách je připraven k pozorování. K vyhodnocení preparátů užíváme fluorescenční mikroskop Olympus AX-70 a vybraná jádra nebo mitózy buď fotografujeme (na citlivý film o 400 ISO) nebo častěji snímáme CCD kamerou připojenou k počítači. K vytvoření obrázků pak užíváme systému analýzy obrazu ISIS (MetaSystems, SRN), vyvinutého speciálně pro cytogenetické účely. Obrázky se dají fotografovat z obrazovky nebo tisknout na speciální barevné tiskárně (např. Mitsubishi CP-D1E).

Poděkování: Tato práce byla finančně podporována grantem 521/96/1717 GA ČR.

Literatura:

- Ambros PF, Matzke MA, Matzke AJM (1986) Detection of a 17-kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* **94** : 11-18
- Anamthawat-Jónsson K, Reader SM (1995) Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous *in situ* hybridization. *Genome* **38** : 814-816
- Bůžek J, Koutníková H, Houben A, Říha K, Janoušek B, Šíroky J, Grant S, Vyskot B (1997) Isolation and characterization of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Res* **5**: 57-65
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* **37** : 717-725
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* **3** : 109-116
- Hoopen, RT, Robbins TP, Fransz PF, Montijn BM, Oud O, Gerats AGM, Nanninga N (1996) Localization of T-DNA insertions in *Petunia* by fluorescence *in situ* hybridization: Physical evidence for the suppression of recombination. *Plant Cell* **8** : 823-830
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA on cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**: 600-604
- Rawlins DJ, Highett MI, Shaw PJ (1991) Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. *Chromosoma* **100** : 424-431
- Reader SM, Abbo S, Purdie, KA, King IP, Miller TE (1994) Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. *Trends Genet* **10** : 265-266
- Vyskot B, Araya A, Veuskens J, Negrutiu I, Mouras A (1993) DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* **239** : 219-224

Další doporučená literatura:

- Gosden, JR (ed.) Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 29. Humana Press, Totowa, NJ, 1994
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ: *In Situ* Hybridization : A Practical Guide. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks, Vol. 27. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1994
- Katalogy firem Amersham, Boehringer Mannheim, Vector, Molecular Probes atd.

Detekce repetitivních DNA sekvencí na chromozómech *Melandrium album* metodou fluorescenční *in situ* hybridizace

Bůžek, J., Široký, J., Říha, K., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: buzek@ibp.cz

Modelový dvoudomý druh knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*) je charakteristický dobře rozlišitelnými pohlavními chromozómy (konstituce XY v samčích a XX v samičích buňkách). Chromozómy *M. album* byly studovány pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s různými DNA sondami: vnitřním *EcoRI* fragmentem z 25S-rDNA rajčete (2478 bp), šesti netranskribovanými repetitivními sekvencemi (získanými DOP-PCR amplifikací DNA z izolovaného X chromozómu, 208-750 bp) a se syntetickým oligonukleotidem (TTTAGGG)₅ homologním s telomerovou repetitivní sekvencí *Arabidopsis thaliana*. Hybridizační signály X-repetitivních sekvencí byly lokalizovány v konstitutivním heterochromatinu (pozitivních C-proučcích) v distálních, subtelomerových oblastech chromozómových ramen. 25S-rDNA byla lokalizována na autozómech 5, 7, 9 a 10 a netranskribované repetice na většině autozómů i na obou pohlavních chromozómech X a Y. Ačkoli byly netranskribované repetitivní sekvence izolovány z chromozómu X, žádná z nich nebyla pro tento chromozóm specifická. Hybridizační signál repetitivních sekvencí na chromozómu Y se vyskytoval pouze v heterochromatinovém bloku na konci jednoho ramene. Pomocí analýzy meiotických bivalentů v pylových mateřských buňkách bylo zjištěno párování této oblasti s homologním úsekem chromozómu X, což umožnilo ztotožnit ji s dříve již klasicky lokalizovanou pseudoautozomální oblastí. Signály po *in situ* hybridizaci s telomerově specifickým oligonukleotidem byly patrné jako body na koncích chromatid. Tyto body byly různě intenzivní, případně se nevyskytovaly vůbec. Variabilita síly signálu byla sledována u některých vybraných chromozómů (X, Y, autozomy 1 a 7) na více metafázích, avšak žádné pravidelně se vyskytující rozdíly v intenzitě signálů nebyly nalezeny. Zmíněná různá intenzita byla tedy zřejmě zapříčiněna relativní krátkostí cílové sekvence pro FISH. Délka telomerových repetic u *M. album* je asi 2-4 kb, což představuje téměř dolní limit detekce nejcitlivějších FISH technik u rostlinných chromozómů.

Poděkování: Uvedené výsledky byly získány při řešení grantu A5004601 GA AV ČR.

Analýza struktury DNA a chromatinu

Fajkus, J.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno.
tel: 05/41 51 71 99, fax: 05/41 21 12 93, e-mail: fajkus@ibp.cz

Významnou charakteristikou sekvencí DNA je jejich pravděpodobná konformace v prostoru (tvar osy dvojšroubovice DNA, *DNA curvature*) a nukleozómová struktura (určení části sekvence, která tvoří komplex s dřevnými histony, a části, která tvoří spojovník (linker) mezi nukleozómy, a je relativně přístupná (*nucleosome positioning*)).

Obě tyto charakteristiky významně závisí na primární sekvenci DNA a byly vysloveny domněnky, že právě ony představují strukturální kód skrytý v primární sekvenci DNA.

V současné době máme k dispozici počítačové programy umožňující predikci ohybů v DNA (software *Curvature*) i polohu nukleozómů (software *Nucleosome*) přímo ze zadané sekvence DNA. Oba programy nám byly laskavě poskytnuty partnerským pracovištěm (Prof. E. Trifonov, Weizmann Inst. Sci., Israel). Program *Curvature* je založen na "wedge" modelu zakřivení DNA, podle něhož výsledná deformace osy je vektorovým součtem příspěvků mezi každými dvěma sousedními páry bází. Program *Nucleosome* predikuje polohu nukleozómu z ohýbatelnosti (*bendability*) sekvence, která je dána charakteristickým rozložením dinukleotidů, především AA a TT.

Experimentálně lze ohyby v DNA lokalizovat a kvantifikovat pomocí ligačního-cyklizačního testu (u velmi krátkých sekvencí, zjišťuje se počet opakování dané sekvence, které je již schopno uzavření do kruhu) a univerzálnější permutační analýza. Při ní se připraví dimer dané sekvence, z něhož se vyštěpují restričními enzymy v různých místech stejně dlouhé, avšak vzájemně permutované, monomery. Mobilita těchto monomerů v polyakrylamidovém gelu za nízké teploty je pak maximální u monomeru, u něhož ke štěpení došlo uvnitř ohybu, a minimální u monomeru, který má ohyb lokalizován ve svém středu.

V dosavadních experimentech bylo dosaženo velmi dobré shody experimentu s predikcí.

Polohu nukleozómu můžeme analyzovat ze dvou hledisek: tzv. rotační usazení, které určuje, které nukleotidy dané sekvence jsou (přibližně s 10,5 bp periodicitou) obráceny směrem ke komplexu histonů, kolem nichž se DNA ovívá, a které naopak vyčnívají směrem do okolí - ty jsou pak dostupnější štěpení nebo modifikaci (např. štěpení DNázou I). Translační polohou nukleozómu se rozumí přesné určení počátku a konce té části sekvence, která je navinuta na histonovou dřev. Je zřejmé, že jednomu rotačnímu usazení může vyhovovat více translačních poloh, vzájemně se lišících o jeden a více závitů dvojšroubovice DNA. Dost často se reálně vyskytuje několik translačních poloh nukleozómu, např. na různých kopiích jednoho typu repetitivní sekvence. Translační polohu nukleozómu je možno určit přibližně (± 10 bp) pomocí restričního štěpení mononukleozómové, resp. dřevné frakce DNA, extrahované z chromatinu štěpeného Mikrokokovou nukleázou (štěpí v úseku mezi nukleozómy) současně s Exonukleázou III (provede degradaci mezinukleozómové DNA od jejího 3' konce až k místu jejího vstupu do nukleozómu). Po ukončení reakce, odbourání proteinů a extrakci DNA následuje ještě štěpení jednovláknového převisu DNA, zbývajícího po ExoIII-štěpení pomocí Mung Bean nebo S1 nukleázy. Z kontrolní elektroforézy sady nukleázových štěpení můžeme prostřednictvím blotování a hybridizace stanovit periodu fázování nukleozómů na zkoumané sekvenci - ta závisí na délce spojovníkové DNA mezi nukleozómy. Mononukleozómová, resp. dřevná frakce (délka cca 146 bp) získaná z preparativní polyakrylamidové nebo agarózové elektroforézy vybraného nukleázového štěpení je dále štěpena paralelně alespoň dvěma restričními enzymy, následuje separace fragmentů na 6-8 % polyakrylamidovém gelu, blotting a hybridizace se značenou sondou pro zkoumanou sekvenci. Velikost hybridizujících fragmentů pak udává polohu restričního místa vzhledem k hranicím

nukleozómové DNA. Přesnější určení translační polohy nukleozómu se provede pomocí extenze primeru, umístěného uvnitř nukleozómové DNA, opět na templátu dřeňové frakce DNA. Přitom je použit buď koncově značený primer, nebo [α - ^{32}P]-dNTP. K ukončení syntézy dojde zákonitě na konci templátového fragmentu. Přesnou polohu terminace určíme porovnáním se sekvenačními reakcemi ve kterých byl použit stejný primer, souběžně nanesenými na stejném sekvenačním gelu. Je vhodné výsledek ověřit na druhém vlákně v opačném směru, druhou hranici lze však i vypočítat díky konzervativní délce dřeňové DNA (146 bp). I v tomto případě existuje dobrá shoda predikce a experimentu, odchylky byly zjištěny jen v posunu translační polohy o ± 1 otáčku DNA v rámci stejné rotační polohy nukleozómu.

Nároky na vybavení laboratoře: termostat, aparatury pro agarózovou, polyakrylamidovou a sekvenační elektroforézu, termocykler, UV trasiluminátor.

Chemikálie: kromě běžných jde především o výše zmíněné enzymy, primery a kit pro sekvenování a cyklickou extenzi primerů (např. CircumVent thermal cycle sequencing kit -NEB), značené dNTP.

Finanční a časová náročnost: *analýza ohybu na cca 200 bp sekvenci:* obnáší přípravu, event. klonování dimeru v uspořádání "hlava k patě", jeho restriční štěpení na základě známé sekvence, PAGE za konstantní nízké teploty (≤ 20 °C), grafické vyhodnocení retardace, kontrolní PAGE za konstantní zvýšené teploty (50 °C) při níž je vliv ohybu potlačen.

Celkem 2-4 týdny, 30.000 Kč za materiál.

analýza chromatinové struktury včetně přesné translační polohy nukleozómů na 200 bp sekvenci: 4 týdny, 40.000 Kč za materiál.

Úskalí a tipy: při permutační analýze je bezpodmínečně nutné dodržení konstantní teploty při PAGE. Lze analyzovat sekvence v délkovém rozmezí přibližně 60-400 bp, podmínkou je přítomnost vhodně rozmístěných restričních míst. Čím kratší je analyzovaná sekvence, tím koncentrovanější nebo hustěji zesíťovaný polyakrylamid je nutno použít. Při analýze struktury chromatinu je třeba nalézt vhodný postup přípravy buněčných jader nebo chromatinu (bez nespecifické degradace DNA), nukleázové štěpení provádět v souboru alespoň čtyř reakcí lišících se množstvím Mikrokokové nukleázy nebo dobou štěpení, každá z reakcí musí obsahovat dostatečné množství materiálu pro následné experimenty (110 mg). V průběhu přípravy jader a nukleázového štěpení je třeba zabránit degradaci proteinů prostřednictvím inhibitorů proteináz (např. PMSF). Předběžné restriční stanovení hranic nukleozómové DNA umožňuje při extenzi primerů odlišit nespecifické terminační signály od více skutečných, různě zastoupených poloh nukleozómu na dané sekvenci.

Literatura:

- Ioshikhes, I., Bolshoy, A., Trifonov, E.N., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9, 1111 (1992)
- Ioshikhes, I., Bolshoy, A., Derenshteyn, K., Borodovsky, M., Trifonov, E.N., *J. Mol. Biol.* 262, 129 (1996)
- Královics, R., Fajkus, J., Kovařík, A., Bezděk, M., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 12, 1103 (1995)
- Matyášek, R., Fulneček, J., Fajkus, J., Bezděk, M., *Chromosome Res.* 4, 340 (1996)
- Shpigelman, E.S., Trifonov, E.N., Bolshoy, A., *CABIOS* 9, 435 (1993)
- Wu, H.-M., Crothers, D.M., *Nature* 308, 509 (1984)

Mapování 5-metylcytosinů pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování

Fulneček, J.

Biofyzikální ústav Akademie Věd České Republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, Česká Republika
tel: (0420) 05/41 51 71 75, fax: (0420) 05/41 21 12 93, e-mail fulnecek@ibp.cz

1. Podstata metody

Hydrogensířičitanové genomové sekvenování má ve srovnání s dříve používanými metodami dvě základní výhody:

- a) Poskytuje informace o rozmístění 5-metylcytosinů (5-mC) v celé délce studovaného úseku DNA.
- b) Vysoká citlivost PCR kroku umožňuje analyzovat metylaci DNA v několika desítkách buněk.

Metoda je založena na chemické reakci, při níž na jednořetězcové DNA dochází pomocí HSO_3^- k hydrolytické deaminaci cytosinů na uracily, kdežto 5-mC nereaguje.

V prvním kroku reakce, sulfonaci, interaguje hydrogensířičitanový anion s dvojnou vazbou mezi 5 a 6 uhlíkem cytosinu a tvoří se sulfonát cytosinu na 6 uhlíku. Tento krok je reversibilní a pomalejší u oligonukleotidů než u nukleotidů. Reakce přímá probíhá při nízkém pH. Ve druhém kroku reakce, hydrolytické deaminaci, se ve vodném prostředí deaminuje aminoskupina na 4 uhlíku a vzniká sulfonát uracilu. Tento krok je nevratný a je katalysován basickými látkami, sířičitanovými, hydrogensířičitanovými nebo acetátovými anionty, a probíhá při pH nižším než 7. V posledním kroku reakce se sulfonát uracilu alkalicky desulfonuje na uracil.

Původně komplementární vlákna se po reakci stanou nekomplementárními a proto se dále analysují samostatně pomocí PCR. K těmto vzájemně nekomplementárním vláknům se navrhnou čtyři oligonukleotidové primery umožňující amplifikovat obě vlákna studovaného úseku DNA. Na 5' konci primerů se nachází cílové sekvence pro restriční endonukleázy vhodné pro klonování do běžných plasmidových vektorů. Naklonované PCR produkty se poté sekvenují. Na sekvenačních gelech všechny proužky odpovídající cytosinu znamenají přítomnost 5-mC v původní genomové DNA.

2. Shrnutí základních praktických postupů

A) Co je potřeba v laboratoři (chemikálie, přístroje, atd.)

Metodu lze provést v běžné laboratoři molekulární biologie, je třeba PCR-cyklér, elektroforetická zařízení pro agarosové a akrylamidové gely, sekvenátor a syntetizér primerů (formou služby).

Jako reakční činidlo se používá hydrogensířičitan sodný (SIGMA S-8890 sodium bisulfite), což je obvykle směs asi 1:1 hydrogensířičitanu sodného NaHSO_3 a disířičitanu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ($\text{HS}_2\text{O}_5^- = \text{HSO}_3^- + \text{SO}_2$). Použije se několik restričních endonukleáz na štěpení genomové DNA a úpravu PCR produktů před ligací. Jsou zapotřebí také kolonky "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Quiagen) nebo podobné, ligáza, kompetentní buňky (Stratagene), oligonukleotidové primery, sekvenování lze provést pomocí kitu "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) a $\text{a}[32]\text{P-dATP}$.

B) Pracovní postup

Isolovaná rostlinná nebo živočišná genomová DNA se naštěpí restriční endonukleásou, která nemá cílové místo ve studovaném úseku. Štěpená DNA, po inkubaci s Rnásou A a poté s Proteinásou K, se přečistí fenolovou a chloroformovou extrakcí.

Nejdříve se 2 mg takto připravené DNA v 90 ml destilované vody zdenaturuje přidáním 10 ml čerstvě připraveného 3 M NaOH a inkubací 15 minut při 37°C. Těsně před použitím se připraví nasycený roztok (při 20°C) hydrogensířičitanu sodného, asi 3.6 M (5.29 g v 10 ml H₂O). pH 4.8 - 5.0 roztoku hydrogensířičitanu se upraví pomocí 10 M NaOH. Je velice důležité hydrogensířičitan rozpouštět a upravovat jeho pH opatrně v zazátkované zkumavce s minimálním provzdušněním tak, aby byl roztok co nejvíce nasycen SO₂ (SO₂+2H₂O=HSO₃⁻+ H₃O⁺, bublinky plynu pod vrstvou oleje po inkubaci). 1 000 ml 3.6 M roztoku hydrogensířičitanu a 5.8 ml čerstvého 10 mM hydrochinonu se přidá k denaturované DNA. Roztok se opatrně promíchá a ihned převrství 150 ml minerálního oleje, po 16 ti hodinové inkubaci při 55°C ve tmě se vzorky odeberou bez oleje a dialysují ve tmě při 4°C v a)3X2 litrech 0.5 mM hydrochinonu/5 mM octanu sodném pH 5.2 po jedné hodině, b)3X2 litrech 0.5 mM octanu sodném pH 5.2 po jedné hodině, c)3X2 litrech destilované vody po jedné hodině a 1X2 litrech destilované vody přes noc. Poté se objem vzorku sníží lyofilizací na 100-200 ml a DNA se izoluje z roztoku pomocí kitu "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Quiagen), kolonky se promyjí promývacím roztokem, 80% ethanolem a vysuší se na vzduchu. DNA se rozpustí v 3X30 ml redestilované vody. Desulfonace se provede přidáním 11 ml čerstvě připraveného roztoku 3 M NaOH a inkubací 15 minut při 37°C. Roztok se poté neutralizuje přidáním octanu amonného pH 7 na koncentraci 3 M, DNA se precipituje ethanolem, vysuší, rozpustí v 100 ml TE pufru a uchová při -20°C.

Následuje PCR, ve které se amplifikují transkribující se a netranskribující se vlákna studovaného úseku DNA odděleně pomocí dvou navržených dvojic oligonukleotidových primerů, které obsahují cílová místa restričních endonukleás pro snazší ligaci. Použije se asi 4 ml templátové DNA v 50 ml směsi (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 9.0, 0.14% TRITON X-100, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP a 0.5 mM primery). Po denuraci 5 min. při 96°C se amplifikuje pomocí 1.5U *Taq* DNA polymerázy (Promega) v 35 cyklech, ve kterých je teplota denaturace 94°C 20 s, teplota nasednutí primerů závisí na jejich sekvenci a teplota polymerace 72°C 20 s.

Teplota nasedání primerů by se měla zvolit taková, aby produkt vznikal selektivně na DNA modifikované hydrogensířičitanem a nevznikal na původní genomové DNA.

Konce produktu se před ligací upraví sestřížením pomocí restričních endonukleás, produkt se přečistí elektroforésou a izolací z gelu a liguje se do předem připraveného plasmidového vektoru. Poté se transformuje do kompetentních *E. coli* buněk (Stratagene), plasmidová DNA se izoluje a insert se sekvenuje pomocí "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" (USB) a a[32]P-dATP.

C) Vyhodnocení experimentálních dat

Je třeba sekvenovat alespoň 5 zástupců naklonovaného PCR produktu.

Ze sekvencí přečtených z autoradiogramů sekvenačních gelů se zjistí přesné polohy 5-mC, neboť tam, kde se vyskytne cytosin byl původně 5-mC. Vyhodnocuje se zvlášť netranskribující se a transkribující se vlákno studovaného úseku DNA.

3. Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Provést metodu není příliš finančně náročné (hydrogensířičitan sodný 100g asi 700 Kč, oligonukleotidový primer asi 90 Kč/basi, *Taq* DNA polymeráza asi 15 Kč/U, T4 DNA ligasa asi 13 Kč/U, restriční endonukleasy asi 0.17-35 Kč/U, jedna izolace DNA na kolonce 50 Kč, sekvenační kit pro radioaktivní značení 120 Kč/reakci, a[32]P-dATP asi 70 Kč/reakci, kit pro automatický sekvenátor asi 300 Kč/reakci a další laboratorní materiál).

Pokud všechno probíhá v pořádku a nestane se během postupu žádná chyba, tak je metodu možné provést během jednoho měsíce (příprava a modifikace připravené DNA hydrogensířičitanem trvá asi jeden týden, PCR, úprava produktů, jejich ligace a transformace trvá také asi jeden týden, kultivace bakterií, izolace plasmidové DNA a zjištění přítomnosti insertu trvá také asi jeden týden a sekvenace také týden).

Mohou se však vyskytnout problémy se získáním PCR produktu a poté je nutné použít jiné oligonukleotidové primery nebo zopakovat modifikaci hydrogensířičitanem, ale zkušený pracovník, který by tuto metodu chtěl použít, by ji měl zvládnout během tří měsíců, maximálně půl roku.

4. Úskalí metody

Metoda je založena na konverzi všech cytosinů na uracily v jednořetězcové DNA hydrogensířičitanem. Zde tkví nebezpečí získání artefaktů v pozitivním smyslu (5-mC se vyskytne i tam, kde není přítomen). Během konverze musí být DNA stále denaturovaná, nesmí tedy docházet k renaturaci. K renaturaci došlo tehdy, pokud se nalezne delší úsek DNA obsahující 5-mC bez přerušení cytosiny.

Jedná se o běžnou chemickou reakci, která je vždy v určité rovnováze a i když se snažíme o co největší konverzi a docílíme toho, že 99.99% cytosinů se změnilo na uracily, zbylé původní molekuly se mohou selektivně amplifikovat v PCR, pokud se použijí nevhodně navržené oligonukleotidové primery.

Všechna tato úskalí se dají bez problémů ověřit použitím plasmidové DNA s insertem totožné sekvence studovaného úseku DNA a se známou pozicí 5-mC, po metylaci *in vitro* (viz. 5), nevýhoda je ale v tom, že se správnost výsledků ověří až po posledním kroku metody - sekvenování.

Další nepříjemnost je v tom, že DNA je poměrně dlouho vystavena pH kolem 5 a může docházet k depurinaci a tudíž ke znehodnocení DNA jako templátu PCR. Proto je vhodné vybírat si ke studiu úseky krátké, maximálně do 300 bp, aby nedošlo k problémům při získávání PCR produktu.

5. Tipy a triky

Kontrola správnosti provedené reakce se provede tak, že se modifikace genomové DNA provede paralelně s modifikací linearisované plasmidové DNA nesoucí insert stejné sekvence jako je analyzovaný úsek. Přitom se použije takové množství plasmidu a nosičové DNA aby se zachovalo množství celkové DNA v reakci a množství plasmidového insertu odpovídalo zastoupení této sekvence v genomové DNA. Je možné plasmidovou DNA použít bez 5-mC nebo ji před modifikací *in vitro* metylovat pomocí *Msp* I, *Hpa* II nebo *Sss* I metylás. Takto simuluje použitá kontrola co do množství a délek fragmentů použitou genomovou DNA, a tak lze ověřit správnost výsledků.

K zabránění renaturace lze během reakce s hydrogensířičitanem zvyšovat teplotu v pulsech na 90°C nebo lze reakci provést v 50% roztoku močoviny.

Velice záleží na použitých oligonukleotidových primerech. Měly by se navrhnout tak, aby co nejvíce odpovídaly modifikované DNA a lišily se od původní DNA, což znamená, že by měly obsahovat co nejvíce změněných míst cytosinů. Pokud se předpokládá přítomnost 5-mC, lze zvolit takové primery, které “si vybírají” buď metylované nebo nemetylované zástupce studované sekvence DNA. Tento přístup umožňuje analyzovat jednotlivé zástupce genové rodiny s různým stupněm metylace. Další možnost je použití primerů, které “si nevybírají”. Získají se zkouškou a výběrem po amplifikaci směsi modifikované DNA a nemodifikované DNA v poměru 1:1, přičemž vhodné primery tyto sekvence amplifikují nezávisle a výsledný poměr molekul po amplifikaci a sekvenování je opět 1:1.

Existuje celá řada zjednodušených verzí s obejitím sekvenování (použijí se primery, které nasedají jen na takovou modifikovanou DNA, kde buď původně byl a nebo nebyl 5-mC; modifikovaná DNA se inkubuje s restriktásou s cílovým místem v oblasti mezi primery, pokud se

její cílové místo nezměnilo, tak se DNA štěpí, nevznikne PCR produkt a tak cytosin v cílovém místě restriktázy byl metylovaný), ale tyto metody mají celou řadu technických problémů a navíc se zabývají jen určitými místy. Existuje také možnost obejít klonování sekvenováním PCR produktu, což se nedá doporučit, neboť tento způsob je založen na vyhodnocení intenzity proužků (plochy píků) a je zřejmé, že polymeráza použitá při sekvenování se nezastavuje na všech místech stejně často, navíc pokud je v dráze C jen několik proužků.

Celá procedura, i včetně izolace genomové DNA, denaturace, modifikace hydrogensířičitanem, PCR, se dá provést s použitím LMP-agarosy a má řadu výhod. Jednak je možné analýzu provést s minimálními ztrátami DNA, zabránit renaturaci, poškození DNA a tak je možné získat PCR produkt i z delších úseků modifikované DNA.

6. Srovnání s alternativními metodami

Ke studiu 5-mC se většinou používá isoschisomerů restriktás, které jsou buď citlivé a nebo necitlivé k 5-mC v jejich cílové sekvenci. Tato metoda je nenáročná, levná a rychlá, ale dokáže analyzovat 5-mC jen v určitých místech v určitých sekvencích. Je založena na štěpení genomové DNA těmito restriktásami, elektroforéze v agarosovém gelu, přenosem na membránu a hybridisací s označeným specifickým úsekem DNA.

Ke studiu 5-mC v delších úsecích se používá klasické genomové sekvenování s použitím chemických činidel, která odlišně modifikují cytosiny a 5-mC. Zmodifikovaná DNA se poté štěpí piperidinem, rozdělí se sekvenační elektroforésou, přeneše na membránu a hybridisuje s označeným specifickým úsekem DNA. Tato metoda má celou řadu nevýhod, je velice náročná a pracná a nedosahuje zdaleka takové citlivosti a přesnosti.

Celkové zastoupení 5-mC v DNA lze určit pomocí HPLC, neposkytuje však žádné informace o jejich poloze.

Literatura:

- Wang, R.Y.H., Gehrke, C.W. and Ehrlich, M.: Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research* 8, 20, 4777-4790 (1980).
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831 (1992).
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. and Frommer M.: High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 22, 15, 2990-2997 (1994).
- Grigg, G. and Clark, S.: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *BioEssays* 16, 6, 431-436 (1994).
- Rother, K.I., Silke, J., Georgiev, O., Schaffner, W. and Matsuo, K.: Influence of DNA sequence and methylation status on bisulfite conversion of cytosine residues. *Analytical Biochemistry* 231, 263-265 (1995).
- Selker, E.U., Fritz, D.Y. and Singer, M.J.: Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. *Science* 262, 1724-1728 (1993).
- Codón, A.C., Lee, Y.S. and Russo, V.E.A.: Novel pattern of DNA methylation in *Neurospora crassa* transgenic for the foreign gene *hph*. *Nucleic Acids Research* 25, 12, 2409-2416 (1997).
- Grigg, G.W.: Sequencing 5-methylcytosine residues by the bisulphite method. *DNA Sequence* 6, 189-198 (1996).
- Olek, A., Oswald, J. and Walter, J.: A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Research* 24, 24, 5064-5066 (1996).
- Herman, A.G., Graff, J.R., Myhr, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B.: Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9821-9826 (1996).

Další doporučená literatura:

- Saluz, H.P. and Jost, J.P.: Genomic sequencing and *in vivo* footprinting. *Analytical Biochemistry* 176, 201-208 (1989).

Způsoby izolace translačně aktivní a neaktivní RNA

Honys, D.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 16/15, 166 30 Praha 6
tel: 02/36 80 10, fax: 02/361 52 30, e-mail: honys@site.cas.cz

1. O co jde

Molekuly RNA neplují v cytoplasmě osamocené či lépe řečeno nahé, ale jsou po celou dobu své existence obklopeny množstvím bílkovin na ně navázaných, je chránících a výrazně ovlivňujících jejich životní dráhu. Takto vzniklé ribonukleoproteinové částice, krátce RNP, mají mimo své funkce charakteristickou molekulovou hmotnost danou druhu a množstvím bílkovin asociovaných s molekulou RNA.

Právě na rozdílné molekulové hmotnosti translačně aktivních a neaktivních RNP je založena metoda jejich separace. Translačně neaktivní mRNA se v buňkách nacházejí ve formě volných RNP, které jsou lehčí než ribonukleoproteinové komplexy, na nichž probíhá translace, známé polysomy (Spirin a Nemer 1965). Aby nebyla situace tak jednoduchá, ne na všech polysomech musí v daném okamžiku docházet k translaci, některé mohou být translačně neaktivní. Tyto struktury byly popsány zejména ve stresových podmínkách (Crosby a Vayda 1991, Davies 1993) a jedna z možností, jak je rozpoznat, bude diskutována níže.

Na počátku izolace se oba typy RNP komplexů, volné RNP i polysomy, nacházejí ve směsi a k jejich oddělení dochází během centrifugace díky jejich odlišným sedimentačním charakteristikám. Běžně se používají dva typy separací, a to centrifugace postmitochondriálního supernatantu přes sacharosový polštářek či v lineárním sacharosovém gradientu. Při centrifugaci přes sacharosový polštářek oddělíme obě populace RNA tak, že za konkrétních podmínek sedimentují pouze polysomy, zatímco volné RNP setrvávají v supernatantu. Pomocí centrifugace v sacharosovém gradientu získáme tzv. polysomální profil, t.j. distribuci ribonukleoproteinových komplexů podle hmotnosti a pro další izolaci větší množství frakcí.

2. Co potřebujeme

Při separaci vystačíme s běžnými chemikáliemi, laboratorním sklem a porcelánem. Jediným omezením je fakt, že veškeré použité pomůcky musí být prosty RNAs, jak nás poučí v každém molekulárně biologickém manuálu (Sambrook et al. 1989). V praxi to znamená, že laboratorní sklo a porcelán před použitím pečeme 3 hodiny ve 200°C, méně odolné pomůcky autoklávueme nebo povaříme v 70% ethanolu. Roztoky, u nichž je to možné, před autokláfováním ošetříme DMDC (Fluka). Roztoky obsahující Tris ošetřovat DMDC nemůžeme, připravíme je tedy čerstvé ve sterilní vodě i nádobí.

Jediné speciální vybavení, bez něhož se neobejdeme, jsou centrifugační zkumavky a rotory. Pro polštářkovou metodu potřebujeme rotor Beckman 75Ti a odpovídající zkumavky Beckman (#355630), při separaci v sacharosovém gradientu užijeme rotor Beckman NVT 90 a zkumavky Beckman OptiSeal (#362185).

3. Jak to uděláme

Prvním krokem obou popisovaných metod je příprava postmitochondriálního supernatantu. Nejprve homogenisujeme přibližně 100 mg rostlinné tkáně v homogenizačním pufru (sacharosa, Tris-Cl, KCl, MgOAc, EGTA, PTE, β -merkapt ethanol) v tekutém dusíku ve sterilní třecí misce s tloučkem a převedeme do centrifugační zkumavky. Poté je nutno nechat vzorek odpočinout 15 minut na ledu. Desetiminutovou centrifugací při 300 g odstraníme těžké buněčné součásti a po další desetiminutové centrifugací supernatantu při 20 000 g získáme kýžený postmitochondriální supernatant.

3.1 Separace pomocí sacharosového polštářku

Je-li naším cílem centrifugace přes sacharosový polštářek, převrstvíme postmitochondriální supernatant přes předem připravený polštářek 60% sacharosy v pufru KTM (Tris-Cl, KCl, MgOAc, EGTA, PTE, β -merkaptoethanol) a hodinu centrifugujeme při 320 000 g. Pellet je tvořen polysomální frakcí, zatímco supernatant musíme znovu centrifugovat přes noc za stejných podmínek, abychom sedimentovali i frakci volných RNP.

Po uvedené separaci nejčastěji následuje izolace celkové RNA z obou frakcí (Chomczynski a Sacchi 1987). Pellet rozpustíme ve vzorkovém pufru (guanidinium thiokyanát, citrát sodný, β -merkaptoethanol), roztok okyselíme přidáním NaOAc a extrahujeme směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol. Celkovou RNA přítomnou ve vodné fázi precipitujeme pomocí 2-propanolu, sedimentujeme a po propláchnutí 75% ethanolem rozpustíme v destilované vodě. Z celkové RNA můžeme pomocí afinitní chromatografie přečistit mRNA (Promega 1992a). Principem metody je hybridizace poly(A) řetězců molekul mRNA k oligo(dT) řetězcům navázaným na pevný paramagnetický nosič (Whitesides et al. 1983). Magnetických vlastností nosičů se využívá při promývání a eluci mRNA.

Již mimo rámec této kapitoly patří další použití izolované RNA. Informační obsah každé frakce mRNA a rozdíly mezi nimi je lze zjistit po provedení *in vitro* translace v heterologním systému z králíčích retikulocytů (Promega 1992b). Přítomnost konkrétních transkriptů může být odhalena pomocí Northern blot hybridizace či RNase protection assay.

Učiníme jedinou výjimku a podrobněji popíšeme metodu run-off translace polysomů bez předchozí izolace RNA (Vayda 1995), neboť tento postup nám umožní rozeznat mRNA aktivně translatované *in vivo* od polysomálních messengerů t.č. translačně inaktivních (viz. výše). Obecně, při *in vitro* translaci smícháme nebuněčný translační systém, vyrobený na basi lysátu z králíčích retikulocytů (Promega, #L4960), s námi dodanou mRNA a radioaktivně značenými aminokyselinami a necháme proběhnout translační reakci. Tak získáme radioaktivně značené bílkoviny syntetizované *de novo* na základě matric naší mRNA. Zjistíme jednak inkorporaci, tedy množství nově vytvořených polypeptidů a jednak spektrum bílkovin na elektroforese, tedy informační obsah vnesené mRNA. V našem případě vycházíme z bodu, kdy jsme po první centrifugaci při 320 000 g sedimentovali polysomy. Tyto rozpustíme ve sterilní destilované vodě a část z nich použijeme namísto roztoku celkové RNA nebo mRNA při míchání reakční směsi. Tím vneseme do původně heterologního translačního systému mimo molekul RNA i na ně navázané bílkoviny regulující jejich translaci, čímž vytvoříme systém semihomologní, který přesněji odráží situaci v námi zkoumané tkáni.

Z obou sedimentů, polysomálního i tvořeného frakcí volných RNP, můžeme také izolovat a analyzovat bílkoviny (Madjar 1994).

3.2 Separace v sacharosovém gradientu

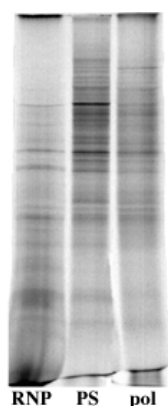
Hodláme-li rozdělit ribonukleoproteinové komplexy podle jejich hmotnosti v lineárním sacharosovém gradientu, převrstvíme postmitochondriální supernatant přes předem připravený gradient 10-60% sacharosy v centrifugačních zkumavkách. Gradient získáme naplněním jedné poloviny objemu zkumavky 60% roztokem sacharosy v gradientovém pufru (Tris-Cl, KCl, MgOAc, DTT, PTE, β -merkaptoethanol) a jeho převrstvením stejným objemem 10% roztoku sacharosy v gradientovém pufru. Zkumavku poté uzavřeme, velice opatrně převrátíme na bok a necháme sacharosu v lednici difundovat po dobu 3 hodin potřebnou k utvoření lineárního gradientu (Davies a Abe 1995). Vzorky poté centrifugujeme 3 hodiny při 100 000 g. Následně rozebereme gradient (BioRad, Econo System), na zapisovači získáme kvantitativní vyhodnocení distribuce ribonukleoproteinů v jednotlivých vrstvách gradientu a nasbíráme frakce. Z jednotlivých frakcí můžeme podobně jako v předešlém případě izolovat RNA (Chomczynski a Sacchi 1987, Promega 1992a), či bílkoviny (Madjar 1994).

4. Jak zjistíme, co jsme udělali

První podmínkou úspěchu je přesně kvantifikovat izolovanou RNA. Spektrofotometrické měření absorbance roztoku RNA při 260 nm, běžně užívané pro celkovou RNA se v případě mRNA ukazuje být nedostatečným. Důvodem je malý výtěžek, s tím související nedostačující rozlišovací schopnost

spektrofotometru a zejména jiný poměr mezi mRNA a celkovou RNA v získaných frakcích. Mnohem přesnější je odhadnout množství mRNA dot blot hybridisací s oligo(dT) nebo oligo(rU) probou a porovnáním se standardem o známé koncentraci.

Spektra bílkovin syntetisovaných při *in vitro* translaci zviditelníme pomocí SDS-PAGE (Obr. 1). Takto máme možnost porovnat informační obsah jednotlivých populací RNA.



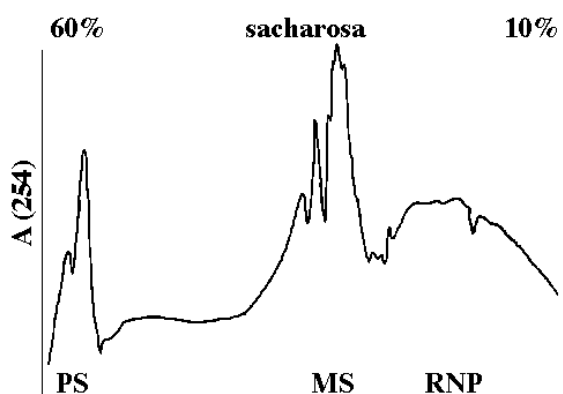
Obr. 1

Spektrum bílkovin syntetisovaných *in vitro* v heterologním translačním systému na základě matrice mRNA obsažené ve frakci volných RNP (RNP), v polysomální frakci (PS) a v semihomologním systému s použitím celých polysomů (pol). Jako výchozí materiál byl použit nezralý pyl tabáku (*Nicotiana tabacum*).

Druhý obrázek nám ukazuje zápis distribuce RNP částic v lineárním sacharosovém gradientu. Peaky odpovídají zvýšené koncentraci komplexů obsahujících RNA v jednotlivých vrstvách gradientu. Obvykle jsme schopni rozlišit tři skupiny peaků odpovídající volným RNP, monosomům a polysomům.

5. Máme na to?

Ve srovnání s jinými molekulárně biologickými postupy nepatří popisované metody k finančně nejnáročnějším. Nejnákladnější položku představují centrifugační zkumavky, firmou Beckman patřičně ohodnocené. To platí pochopitelně pouze v případě, že není nutno předem investovat do rotoru nebo nedej bože do centrifugy. Jeden člověk může bez problémů zpracovat čtyři vzorky najednou a celý



Obr. 2

Polysomální profil získaný ze stadia 3 nezralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum*). Distribuce ribonukleoproteinových částic byla zjišťována v lineárním gradientu 10-60% sacharosy. (PS-polysomy, MS-monosomy, RNP-volné RNP)

protokol je lze zvládnout za jeden den v případě sacharosových gradientů či za dva dny, používáme-li polštářkovou metodu.

6. Čeho bychom se měli vyvarovat

Polysomy jsou velice citlivé na přítomnost RNAs, vyšší teplotu, koncentraci solí a mají tendenci se časem rozpadat. Proto je nutné držet vzorky neustále na ledu a minimalisovat dobu mezi jednotlivými kroky. Za samozřejmost považujeme přísné dodržování prostředí prostého RNAs, bez něhož nemůžeme očekávat uspokojivé výsledky.

Jinak jsme při používání popsanych metod nenalezli vážnějších úskalí. Pouze považujeme za vhodné upozornit na nutnost důkladné homogenisace vzorku s tekutým dusíkem a následné dodržení

jeho přibližně patnáctiminutového odpočínutí na ledu, kdy dochází k uvolňování ribonukleoproteinových částic z buněčných struktur.

Literatura:

- Chomczynski P. a Sacchi N. (1987): *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
Crosby J.S. a Vayda M.E. (1991): *Plant Cell* **3**, 1013-1023.
Davies E. (1993): *Seminars Cell. Biol.* **4**, 139-147.
Davies E. a Abe S. (1995): *Methods Cell. Biol.*, **50**, 209-222.
Madjar J.J. (1994): *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, pp 657-661.
Promega (1992a): PolyAtract mRNA isolation systems. Technical manual, #TM021.
Promega (1992b): Rabbit reticulocyte lysate system, Technical manual, #TM232.
Sambrook J., Fritsch E.F. a Maniatis T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Spirin A.S. a Nemer M. (1965): *Science* **150**, 214.
Vayda M.E. (1995): *Methods Cell Biol.*, **50**, 349-359.
Whitesides G.M., Kazlauskas R.J. a Josephson L. (1983): *Trends Biochem. Sci.* **1**, 144-148.

Syntéza a purifikace oligonukleotidů

Konečná, H.

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37

Brno

tel: 05/41 12 93 71, fax: 05/41 12 93 72, e-mail: hanak@sci.muni.cz

Pokrok v mnoha oblastech molekulární biologie by nebyl možný bez existence automatických syntetizátorů oligonukleotidů. Jejich produkty mají nespočet aplikací, zejména v oblasti rekombinantní DNA (PCR, sekvenování, konstrukce duplexů, hybridizační próby, místně cílená mutagenéza aj.). Analoga oligonukleotidů jsou intenzivně studována jako potenciální protirakovinná a antivirová léčiva. Miligramová množství oligonukleotidů vyžadují strukturální rentgenové analýzy a NMR spektroskopická studia.

DNA je chemicky syntetizována obráceně než *in vivo*, tedy od 3' k 5' konci. Cyklickým procesem, který se odvíjí od 3' terminální báze zakotvené na kolonce nebo membráně, jsou postupně připojovány jednotlivé monomery podle zadané sekvence. Celý cyklus se skládá z připojení aktivovaného monomeru k rostoucímu řetězci, deaktivace nezreagovaných 5' konců, oxidace labilního třívalentního fosforu na pentavalentní a odblokování ochranné skupiny na 5' konci. Tím je řetězec připraven na další cyklus, který se opakuje tak dlouho, až je zadaná sekvence kompletní. Pak je produkt odštěpen z pevné fáze a podroben finální deprotekcí obvykle přes noc.

Kvalitní syntéza probíhá s účinností 98 - 99% na jeden cyklus, což pro běžný 20-mer znamená, že očekávaný oligonukleotid bude ve výsledném produktu tvořit 67 - 82 %. Během syntézy se spektrofotometricky nebo konduktometricky sledují odštěpené tritylové skupiny, které fungují jako markery účinnosti připojení následující báze. Výtěžek syntézy se stanovuje měřením absorbance při 260 nm. Kvalita oligonukleotidů se nejčastěji kontroluje elektroforeticky (PAGE nebo kapilární elektroforéza), chromatograficky, event. se využívá hmotnostní spektrometrie.

Surový produkt po syntéze obsahuje nejenom očekávaný oligonukleotid, ale také jisté procento kratších nedosyntetizovaných řetězců, minoritní frakci delších řetězců, amonné soli, benzamid, isobutyramid a stopová množství dalších organických látek. Koncentrace nežádoucích látek vždy závisí na kvalitě syntézy a délce oligonukleotidu. Kvalitní produkt běžné délky nepotřebuje pro většinu dalších aplikací žádné dodatečné čištění. Každá purifikace zvyšuje náklady a uživatel vždy musí vzít v úvahu příslušnou aplikaci. Pro sekvenování a PCR mohou být obvykle použity surové primery mající 80% čistotu, event. primery po odsolení. Odstranění nízkomolekulárních nečistot se provádí etanolovou precipitací nebo gelovou filtrací na kolonce Sephadexu G-25. Pokud je pro některé aplikace nutné odstranit kratší nedosyntetizované řetězce (např. pro antisense hybridizace), používá se purifikace na OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge). Finančně nejnáročnějším způsobem čištění je HPLC.

Na trhu je řada vysoce efektivních syntetizátorů, které často pracují v režimu několika syntéz běžících současně. V tomto oboru se zejména angažují firmy Perkin-Elmer, PerSeptive Biosystems, Pharmacia, Beckman a Cruachem. Běžný lyofilizovaný oligonukleotid lze dokončit ve 24 hodinách. Existují i speciální (dražší) postupy, jak zkrátit postsyntetické procesy, aby mohl být oligonukleotid dokončen během několika hodin po zadání. Syntetizátory umožňují syntézu nejrůznějších modifikací oligonukleotidů - fosforothioáty, značení biotinem, fluorescenčními značkami, užití inosinu, degenerované oligonukleotidy, amino deriváty užívané pro postsyntetické derivatizace oligonukleotidu (připojení digoxigeninu aj). Většina syntetizátorů je schopna syntetizovat kromě

DNA též RNA, produkt je však několikanásobně dražší než DNA. Pouze syntetizátor Expedite 8909 firmy PerSeptive Biosystems umožňuje navíc i syntézu PNA (Peptide Nucleic Acid). To je nová skupina informačních molekul, které obsahují neutrální, peptidu podobný řetězec s bázemi dovolujícími hybridizaci s komplementární DNA nebo RNA.

Praktické rady pro uživatele:

Rozsah syntézy (scale), kterou zadáváte, není finální koncentrace budoucího oligonukleotidu. Je to koncentrace 3' báze, zakotvené na kolonce či membráně. Skutečný výtěžek závisí na kvalitě syntézy, délce oligonukleotidu, sekvenci a použité purifikační metodě. Koncentrace surového produktu stanovená měřením absorbance při 260 nm zahrnuje i přítomné nečistoty, je proto pouze přibližná. Přesnější odečet je možný po odsolení. Každý syntetizátor umožňuje výběr z několika koncentračních rozsahů, náš Expedite např. nabízí pro DNA 50 nmol, 200 nmol, 1 m mol a 15 mmol syntézu. Požadujete-li purifikaci na OPC kolonce, musí být oligonukleotid syntetizován s poslední tritylovou skupinou ponechanou na 5' konci. Na základě hydrofobicity této skupiny se pak na reverzní fázi zachytí pouze kompletní produkt, všechny ostatní nečistoty jsou odmyty. Tento typ purifikace nelze, na rozdíl od gelové filtrace a etanolového srážení, provést dodatečně. Stejně to platí pro HPLC čištění na reverzní fázi.

Degenerované pozice v oligonukleotidu je možné navrhnout jako kombinaci bazí v příslušné pozici, nebo použít 2' deoxyinosinu, který má nízkou, ale nesejnou vaznost k ostatním bazím. Lze též využít univerzálního nukleosidu, který nehybridizuje se žádnou ze čtyř bazí.

Počítačové programy jako **Oligo** (National Biosciences), **Primer Designer** (Scientific and Educational Software), **Primer Detective** (Clontech Laboratories) vám pomohou vybrat optimální primer pro vaši konkrétní aplikaci. Hlavní zásady pro navrhování PCR primeru: sekvence unikátní pro danou oblast, nejdůležitější je 3' konec. Na 3' konec zařaďte jeden až dva G/C nukleotidy, které zajistí kvalitní "annealing". Vyberte primer s náhodnou distribucí bazí, s obsahem GC obdobným jako ve fragmentu, který má být amplifikován. Nepoužívejte řady purinů nebo pyrimidinů jdoucích za sebou. Vyhněte se primerům se stabilními sekundárními strukturami, zvláště na 3' konci. Zvláště se vyhněte primerům, které tvoří "hairpins" a jsou vzájemně komplementární. Nespolehejte slepě na počítač. Primery, které jsou programem zavrženy jako nepoužitelné, někdy fungují a tzv. dobře navržené primery občas nefungují.

Literatura:

Manuály a aplikační protokoly firem **PerSeptive Biosystems**, **Perkin-Elmer**, **Beckman**, **Cruachem**, **Pharmacia**

Analýza rostlinného genomu pomocí pulzní gelové elektroforézy

Kovařík, A.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel: 05/41 51 71 78, fax: 05/42 21 12 93, e-mail: kovarik@ibp.cz

Teoretický princip pulzní gelové elektroforézy (PFGE)

Pulzní elektroforéza je analytická metoda, pomocí níž lze analyzovat velké úseky DNA o délce 50-5000 kb. Nejčastěji používaná konvenční agarózová elektroforéza je v nejjednodušším uspořádání schopna separovat molekuly o velikosti 0.2 - 20 kb. Molekuly nad 20 kb při konvenční elektroforéze zaujmají přibližně stejnou konformaci (mají srovnatelný gyrační poloměr) a tudíž migrují stejnou rychlostí. Výsledkem je ztráta dělivosti gelu a rozmazaný obraz heterogenní, málo rozdělené populace molekul. V roce 1984 Cantor a Schwarz přišli s revoluční myšlenkou použít pro separaci dlouhých úseků DNA elektroforézu s dvěma elektrickými poli orientovanými kolmo na sebe. Elektrická pole se navzájem periodicky zapínají a vypínají, což indukuje reorientaci každé molekuly DNA v gelu. Rychlost reorientace ve směru nového pole je závislá na velikosti molekuly, přičemž platí, že čím je větší velikost (délka DNA v kb) tím pomalejší je její reorientace pravděpodobně vlivem sterických interakcí s agarózovou maticí. Čas strávený orientací molekuly ve směru nového pole je rozhodujícím parametrem pro separaci molekul DNA v PFGE. Na molekulární úrovni je pohyb DNA v gelu "plazivý" a připomíná klikatou čáru. Poněvadž však velikost a čas sepnutí obou elektrických polí jsou shodné výsledná celková dráha DNA fragmentů je přímá.

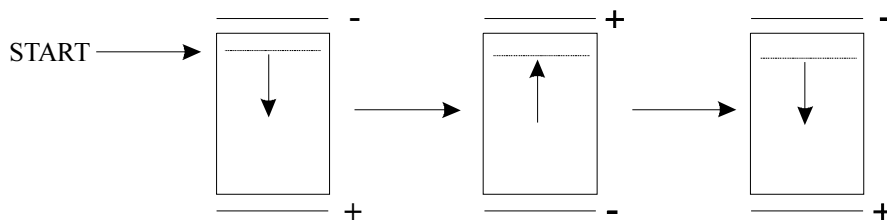
Kritické parametry PFGE

1. Uniformita elektrického pole. Vlivem nehomogenity elektrického pole dochází k nerovnoměrné migraci molekul a pokřivení dráhy.
2. Délka časových pulzů. Variací délky elektrických pulzů lze dosáhnout optimálního rozdělení molekul v požadované oblasti délek. U většiny komerčních systémů je délka pulzů programovatelná.
3. Poměr délek elektrických pulzů v obou polích.
4. Vektor elektrického pole. Uspořádání elektrod v podélném směru určuje úhel, pod kterým se molekuly DNA reorientují. Jako optimální bylo zjištěno střídání 60 a 120° v CHEF systému.
5. Relativní intenzita obou polí. Vyšším napětím lze zkrátit urychlit pohyb molekul a tím i zkrátit dobu běhu elektroforézy, avšak vzrůstají požadavky na chlazení systému.

Technické zabezpečení

Elektroforetická aparatura představuje nejdůležitější část zařízení nezbytného pro uskutečnění elektroforézy.

Technické uspořádání elektrod PFGE prodělalo během uplynulých let značný vývoj a v současné době je z literatury známo až 7 různých systémů. V běžných laboratořích však převládají systémy FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) a CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis). Systém FIGE periodicky přepíná elektrické pole v jednom směru, takže se molekuly orientují o 180° při každém přepnutí:



Systém FIGE je schopen separovat fragmenty v rozmezí 20-700 kb, což postačuje pro značnou část genomových analýz. Cena zařízení je rovněž výrazně nižší (až 3 x) než u ostatních systému a představuje investici ca. 120 000 Kč. Systém CHEF zejména ve spojení s počítačem řízenými pulzy představuje nejdokonalejší uspořádání umožňující v optimálních podmínkách separaci molekul až do 5 Mb. Systém je složen z celkem 24 elektrod a jimi vytvořené vektorové elektrické pole střídavě orientuje molekuly o 60° resp. 120° . Nejběžněji používaný je systém CHEF-DRII-III firmy Biorad v ceně ca 200 000 Kč. Počítačem řízeným CHEF-MAPPER systém je až 3x dražší.

Pulzní elektroforéza se obvykle provádí při teplotách 12-16 $^\circ$ C, a proto je nezbytné elektroforetický pufr recirkulovat přes chladicí lázeň nebo kryostat. Pro fluorescenční detekci fragmentů DNA (pomocí ethidium bromidu) je zapotřebí transiluminátor.

Příprava vzorků pro PFGE

Vzhledem k tomu, že velikost analyzovaných fragmentů se běžně pohybuje od 50 - 1000 kb, je třeba při přípravě DNA dbát na to aby připravená DNA byla nejméně 1000 kb dlouhá. Při klasických postupech izolace DNA zpravidla délka DNA molekul nepřesahuje 50-100 kb. Zkracování je způsobeno mechanickým poškozením vlivem střížných sil, působící v roztoku například při míchání. Proto se při izolaci vysokomolekulární DNA vyhýbáme manipulaci v roztoku a celou proceduru purifikace provádíme v agarózových bločkách, které zabraňují mechanickému poškození. Všechny kroky jsou prováděny v prostředí vysoké koncentrace EDTA, která inhibuje většinu buněčných nukleolytických enzymů. Výchozím materiálem jsou nejlépe izolované protoplasty (buňky zbavené celulozové stěny) nebo izolovaná jádra v množství ca 2×10^6 buněk na jeden bloček. K suspensi protoplastů v koncentraci 4×10^7 buněk/ml přidáme stejný objem 1.5% nízkotuhnoucí agarózy v 0.4M manitolu zahřáté na 50 $^\circ$ C, opatrně rozmícháme a suspensi zalijeme od formy. Formu poté umístíme do ledničky, kde agaróza ztuhne. Po zatuhnutí agarózové bločky se vzorky opatrně vyjmeme a přeneseme do zkumavky s předem připraveným roztokem obsahujícím Proteásu-K (400 ug/ml), 1% laurylsarkosin, 0.5 M EDTA. Bločky inkubujeme při 37 $^\circ$ C přes noc. Poté vyměníme lyzační roztok a inkubaci opakujeme. Po 48-ti hodinové deproteinaci by vzorky již neměly být zelené - což je důkaz, že došlo k lýze protoplastů a uvolnění chlorofylu. Proteasu-K poté inaktivujeme 1mM PMSF a bločky uchováváme v 0.5M EDTA při 4 $^\circ$ C. Velmi čisté preparáty vysokomolekulární DNA jsou stabilní i několik let.

Manipulace DNA v agarózových bločkách

Prakticky většina DNA analýz využívá restrikčních endonukleáz. Enzymová manipulace DNA v agarózových bločkách je zpravidla mnohem obtížnější než v roztoku a obecně vyžaduje vyšší koncentrace enzymu. Rovněž ne všechny enzymy jsou schopny pracovat v prostředí agarózy a jejich seznam je možno nalézt například v katalogu firmy NEB. Pro totální štěpení vysokomolekulární DNA restrikčními enzymy je zapotřebí alespoň 5 násobně vyšší aktivity enzymu než při štěpení stejného množství DNA v roztoku, což celou proceduru výrazně prodražuje. Vzhledem k labilitě některých enzymů doporučujeme opakované štěpení dvěma dávkami enzymu. Před přidáním enzymu agarózový bloček preinkubujeme opakovaně (2 x 30 min) s restrikčním

pufrém. Na jedno štěpení použijeme zhruba 50-100 jednotek enzymu, což představuje finanční zatížení ca 100-200 Kč. Enzym se po štěpení DNA inaktivuje pomocí EDTA a bloček se umístí do komůrky gelu a eventuálně zalije nízkotuhnoucí agarózou v elektroforetickém pufru.

Vyhodnocení průběhu elektroforézy

Vlastní elektroforetická separace probíhá nejčastěji po dobu alespoň 16 hod, jsou však popsány běhy i 48 hod. Důležitou otázkou je programování pulzního zdroje. Pulzní zdroj napětí naprogramujeme tak, aby se postupně pulzní časy prodlužovaly, přičemž platí čím delší fragmenty požadujeme separovat, tím delší pulzní čas nastavíme. Například pro separaci molekul 50-800 kb na CHEF-DRII systému volíme na počátku 10 sekundové pulzy, na konci běhu 60s. Jako elektroforetický pufr se nejčastěji používá Tris-borátový pufr, pH 8.0 (0.045 M Tris-borát, 0:001 M EDTA) a je vhodné si tento ještě před vlastním během předchladit na 12-16 °C. Napětí přiváděné na elektrody se pohybuje v rozmezí 160-200 V. Po skončení běhu gel barvíme roztokem ethidium bromidu (1 ug/ml H₂O) a proužky DNA vizualizujeme pomocí UV světla. V případě, že připravená DNA je intaktní, pohybuje se jako proužek v zóně komprese t.j. v oblasti limitního dělení elektroforetického systému (obvykle >800 kb). Gel lze poté blotovat na nylonovou membránu a provést molekulární hybridizaci se specifickou sondou. Jako standarty pro porovnání délek používáme ligované konkatemery fága λ (50-1000 kb), pro větší délky pak chromozomy *Sacharomyces cerevisiae* (225-2500 kb).

Úskalí metody

Při použití komerčních elektroforetických aparatur zpravidla odpadají problémy spojené s vlastní elektroforézou. Nejčastějším úskalím bývá příprava vysokomolekulární DNA. Připravená DNA má často následující nedostatky, které znemožňují její další analýzu: 1. *DNA není intaktní, ale je již degradovaná na nízkomolekulární fragmenty.* Na gelu se takový vzorek projeví jako šmouha směrem k čelu gelu. Znamená to, že během přípravy nebo často již v samém výchozím materiálu došlo k mechanickému nebo nukleolytickému štěpení DNA. Doporučujeme proto při přípravě protoplastů vycházet z mladých listů, ze světlých částí kalusů a suspensí kultur v exponenciální fázi růstu. Ve starších nebo nekrotických tkáních bývá DNA často poškozena. Doba inkubace tkáně v protoplastovacím roztoku by měla být co nejkratší - pro deproteinaci často postačuje jen částečná degradace celulosové stěny. 2. *DNA není štěpitelná restričními enzymy.* Pro kontrolu štěpitelnosti doporučujeme zařadit štípání enzymy, které poskytují krátké restriční fragmenty (v průměru < 5 kb). Na gelu by tato dráha neměla obsahovat žádnou viditelnou stopu DNA, neboť krátké fragmenty vymigrují z gelu. Pokud DNA není dobře štěpitelná použijeme větší množství enzymů Proteasy, eventuálně Celulasy pro dokonalejší purifikaci. Rovněž je třeba dbát na důsledné odstranění EDTA ze vzorku.

Aplikace PFGE

PFGE je unikátní, vysoce citlivá metoda určená pro separaci vysokomolekulární DNA. Poskytuje informace o vzájemné poloze genů, repetitivních sekvencí v úsecích, které jsou příliš velké pro detailní sekvenování nukleotidů nebo naopak příliš malé pro analýzu pomocí hybridizace in situ. Spojením sekvenačních technik, pulzní gelové elektroforézy a hybridizace in situ lze dosáhnout přesné charakterizace genových oblastí na chromozomu. Z tohoto důvodu se všechny tři metody uplatňují ve velkých komplexních projektech, jako je mapování genomů různých biologických druhů. Praktického využití se PFGE dočkala v rostlinné aplikované genetice, kdy pomocí restričních polymorfismů lze charakterizovat příbuzné biologické druhy nebo jednotlivé kultivary hospodářsky významných plodin.

Literatura:

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Zkušenosti s genetickým analyzátozem ABI PRISM 310

Nejedlá, E.

Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 61137 Brno
tel: 05/41 12 93 71, fax: 05/41 12 93 72, e-mail: nejedla@sci.muni.cz

Genetický analyzátoř ABI PRISM 310 firmy Perkin-Elmer, divize Applied Biosystems byl na trh uveden v roce 1995. V současnosti je to jediný přístroj, který umožňuje provádět i menším laboratořím plně automatizovanou sekvenační a fragmentační analýzu DNA. Analyzátoř pracuje na principu elektroforetického dělení fragmentů ve velmi tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Je vybaven automatickým dávkovačem na 48 (resp. 96) vzorků. Pro každý vzorek je kapilára naplněna čerstvým polymerem, poté je automaticky nanesen přesný objem vzorku. Tento postup zaručuje vysokou reprodukovatelnost analýz a zároveň se snižuje pracnost, protože odpadá potřeba nalévání gelů. Materiál a reagentie se využijí jen pro daný počet vzorků. Sekvenování probíhá podle Sangerovy metody. Analýza je založena na patentovaném procesu ABI PRISM - detekce vícebarevné fluorescence ze značených primerů, terminátorů (ddTNP) nebo inkorporovaných nukleotidů (dUTP, dCTP) po excitaci argonovým laserem (excitační spektrum 488 - 514 nm). Detekce emitovaného záření je prováděna pomocí citlivého CCD chipu s maximální citlivostí ve spektrálním pásmu 525 - 650 nm. Při jediném průchodu kapilárou je proto možné při sekvenování stanovit pořadí všech čtyř bází, nebo při analýze fragmentů analyzovat 3 vzorky současně (3 vzorky + délkový standard). Řízení celého procesu i zpracování dat probíhá současně za použití výkonného počítače Apple Power Macintosh a speciálního software.

Správná příprava vzorku je prvním předpokladem úspěšného sekvenování. Ačkoliv existují různé (levnější) postupy, jak získat čistou DNA, pro fluorescenční sekvenování je nejvhodnější izolace DNA pomocí produktů firmy Qiagen nebo alkalickou lyzou s PEG precipitací. Sekvenovat lze plazmidovou DNA a PCR produkty. U PCR produktů je nutné před sekvenováním velmi pečlivě odstranit všechny zbytky primerů a dNTP, protože by se změnilo složení reakční směsi a značení by neproběhlo!

Dalším důležitým faktorem je správné **určení koncentrace DNA** (nejlépe pomocí spektrofotometrické metody, protože stanovení z gelu není příliš přesné) a volba správné sekvenační strategie. Doporučené koncentrace templátů: ssDNA 50-100 ng/ul, 300-600 ng na reakci, ds DNA 100 - 200 ng/ul, 0,6 - 1,2 ug na reakci, PCR DNA 10 - 30 ng/ul, 60 - 180 ng na reakci..

Některé typy templátů (zejména GC, resp. AT - rich, templáty s dlouhou homopolymerní sekvencí, templáty s dlouhými repeats nebo templáty, které tvoří sekundární struktury) jsou obecně hůře sekvenovatelné a je nutno upravovat sekvenační strategii.

Příprava značených fragmentů probíhá pomocí cyklického (PCR) sekvenování a to buď za použití značených primerů nebo terminátorů. Značení probíhá za použití ready-reaction cycle sequencing kits, které obsahují AmpliTaq DNA polymerázu FS, směs d/ddNTP a pufr ve stabilním složení, které zaručuje pohodlnou práci a reprodukovatelnost metody. Po skončení PCR sekvenování je nutné vzniklé fragmenty přesrážet a odstranit všechny nezreagované složky kitu. Tento krok je důležitý zejména při práci se značenými terminátory. DNA se pak rozpustí v TSR (Template suppression reagent), provede se závěrečná denaturace a vzorek se vloží do analyzátoř.

Celý postup přípravy značených fragmentů probíhá podle protokolu optimalizovaného firmou Perkin Elmer. Trvá 3,5 - 4 hodiny, vlastní analýza vzorku (600 bází) 2,75 hod., pro kratší PCR produkty asi 90 minut (při přesnosti sekvenování 98,5 %).

Softwarové zpracování dat trvá pouze necelou minutu!

Náklady na 1 analýzu : přibližně 500 Kč.

Výhody: odpadá náročné nalévání gelů, reagentie se spotřebovávají pouze pro daný počet vzorků, automatické provádění operací zaručuje stále stejné podmínky pro všechny analýzy (čímž se zvyšuje reprodukovatelnost stanovení), přístroj může pracovat přes noc bez dozoru, takže se efektivně využívá i nejcennější deviza - tj. čas!!!

Literatura:

The Qiagen Guide to Template Purification and DNA Sequencing - možno objednat u firmy Qiagen jako FREE Literature

ABI PRISM 310 - User's manual Perkin - Elmer

DNA Sequencing - Chemistry guide Perkin - Elmer

ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Protocol

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Protocol

ostatní firemní literatura Perkin - Elmer

Metody transformace rostlin pomocí agrobacteria

Pavingerová, D.

Ústav molekulární biologie rostlin AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
tel.: 038/777 55 05, fax: 038/414 75, e-mail: daniela@umbr.cas.cz

Principem všech metod transformace rostlinných pletiv pomocí agrobacteria je zabezpečit kontakt poraněných rostlinných buněk s buňkami bakterie rodu *Agrobacterium*, což odstartuje přenos T-DNA do rostlinného genomu. K tomuto účelu byla vyvinuta řada metod, z nichž se na pracovišti ÚMBR nejčastěji používají tři: disková metoda, transformace semen a infiltrace.

Disková metoda:

Metoda transformace listových disků představuje ideální kombinaci vysoké transformační frekvence se snadnou a rychlou selekcí regenerovaných transformantů. Poprvé ji popsal Horsch et al. (1985) a postupně byla modifikována v mnoha laboratořích tak, že je použitelná na jakoukoli část rostliny (kořen, hypokotyl, internodia, stonkové segmenty atd).

Metoda je velmi jednoduchá a nevyžaduje žádné speciální vybavení. Zvolenou část *in vitro* kultivované rostliny rozstříháme na segmenty asi 1 cm dlouhé, u listů na terčíky asi 5x5 mm, a ty ponoříme do připravené bakteriální suspenze tak, aby všechny řezné plochy přišly s touto suspenzí do styku. Po určité době kokultivace částí rostliny s bakteriemi se transformované segmenty přenesou na médium, které eliminuje růst bakterií, umožňuje proliferaci jen transformovaným buňkám a navozuje kalogenezi s následnou regenerací stonků.

Jak připravit bakteriální suspenzi?

Baktérie kultivujeme přes noc v LK médiu (Langley and Kado, 1972) na třepačce ve tmě při 28°C. Před vlastní transformací je vhodné bakterie stočit (2 minuty při 10000 rpm), supernatant odstranit a bakterie rozředit ve stejném množství 10 mM MgSO₄. Je rovněž možné přímo naředit bakteriální suspenzi stejným množstvím tekutého kultivačního média (např. MS). Nedoporučuji používat bakteriální suspenzi přímo bez předchozího ředění, jelikož může v některých případech působit na rostlinná pletiva toxicky.

Jakou část rostliny použít?

Pro transformaci používáme tu část rostliny, ze které spolehlivě umíme získat v podmínkách *in vitro* dostatečný počet regenerantů. Výhodné je zajistit jednobuněčný původ regenerované rostliny, např. využitím somatické embryogeneze a pod.

Jak dlouhá kokultivace?

Vyzkoušená optimální doba kokultivace bakteriální suspenze s rostlinnými segmenty je 15 - 30 minut. Po této době se transformované části rostliny přenesou na některé základní agarové médium (např. MS) bez antibiotik, kde se ponechají 24 - 48 hod. Při 24 hod kultivaci není nutné osušení segmentů filtračním papírem, jak se často uvádí. U některého rostlinného materiálu je možné nahradit kultivaci na agarovém médiu kultivací v tekutém médiu (segmenty se třepou 24 hod při laboratorní teplotě). Až po této době se aplikují antibiotika pro vyhubení bakterií a selekční činidla.

Jak eliminovat bakterie?

Baktérie eliminujeme pomocí vhodného antibiotika (podle použitého kmene agrobacteria), které přidáváme do kultivačního média. Antibiotikum neklávujeme, používáme sterilizaci filtrem nebo autosterilizaci (antibiotikum rozpustíme ve sterilní vodě ve sterilní kádince a necháme 2 - 3

hodiny stát). Na médiu s antibiotikem kultivujeme rostliny i několik měsíců, aby eliminace bakterií byla dokonalá. Často je vhodné použít směs dvou antibiotik.

Nejběžněji používaná antibiotika nejčastěji používaná koncentrace

| | |
|------------------------|----------|
| Ticarcillin (Ticarpen) | 500 mg/l |
| Carbenicillin | 500 mg/l |
| Vancomycin | 500 mg/l |
| Cefotaxime (Claforan) | 200 mg/l |
| Augmentin | 300 mg/l |
| Timentin | 300 mg/l |

Jak stanovit koncentraci selekčního antibiotika?

K selekci se v současné době využívá především gen pro neomycinofosfotransferázu II (*nptII*), který vnáší do rostlin rezistenci ke kanamycinu a gen pro hygromycinofosfotransferázu (*hpt*), který navozuje rezistenci k hygromycinu. Poněvadž tato antibiotika mají zabránit růstu netransformovaných rostlin, musíme nejprve otestovat, na jakou koncentraci antibiotika dané rostliny reagují. To snadno zjistíme kultivací kontrolních rostlin na médiu s koncentrační řadou příslušného antibiotika. Významným a často rozhodujícím znakem bývá fakt, zda rostlina koření, či nikoli. Je si však třeba uvědomit, že koncentrace antibiotika použitá pro selekci regenerovaných rostlin, nemusí souhlasit s koncentrací aplikovanou těsně po transformaci rostlinných segmentů. Ta se často musí snížit, případně úplně vynechat, a antibiotikum využít až pro selekci regenerovaných rostlin. Zde neexistuje jednotný návod, koncentraci selekčního antibiotika je u každého rostlinného druhu nutné vyzkoušet. Rozdíly se mohou vyskytnout i mezi odrůdami téhož druhu.

Transformace semen:

Tuto zajímavou metodu transformace zavedli v roce 1987 Feldmann a Marks u *Arabidopsis thaliana*. Semena *A. thaliana* se nechají v 50 ml vody předklíčit (třepat při laboratorní teplotě) po dobu 12 - 16 hod. Poté se k nim přidají 3 ml přes noc narostlé bakteriální suspence a společně se kultivují dalších 24 hod. Po této době se semena několikrát propláchnou vodou a vysejí na perlit provlhlý živným roztokem. Získané rostliny se označují jako T1 generace. U T2 generace provádíme selekci na příslušném antibiotiku.

Výhody:

- 1) Možnost získání velkého počtu transgenních rostlin při práci v nesterilních podmínkách.
- 2) Není nutná eliminace bakterií pomocí antibiotik (finanční přínos).
- 3) Nedochozí k tvorbě kalusu, čímž je vyloučena somaklonální variabilita.

Nevýhody:

- 1) Velká variabilita výsledků.
- 2) Metoda zatím použitelná pouze u *Arabidopsis thaliana*.

Infiltrace:

Jedná se o novou metodu transformace, kterou publikoval Bechtold et al. v roce 1993 a stejně jako předchozí metoda se úspěšně používá zatím jen u *Arabidopsis thaliana*. Spočívá v transportu bakteriálních buněk do rostlinných pletiv vlivem podtlaku. Rostliny ve stádiu kvetení, kdy se již začínají objevovat první plody se ponoří (otočením květináče) do infiltračního média. Infiltrace probíhá ve vakuu (10^4 Pa) po dobu 15 - 20 min. Rostliny se pak opláchnou pod tekoucí vodou a nechají odkvést. T2 semena se vysévají na selekční médium.

Předpokládá se, že bakterie proniknou do vodivých pletiv rostliny, kterými se dostanou až k meristémům květních základů, kde se může T-DNA začlenit do genomu gamet. Výhodou této metody je rovněž vyloučení somaklonální variability.

Příprava infiltračního média: Bakteriální suspenzi (OD = 1,2) stočíme a ředíme do 1/3 původního objemu tekutým MS médiem s 5% sacharózou a s 10 mg/l BAP. Uvádí se, že ve dvou litrech bakteriální suspenze je možné infiltrovat 100 - 500 rostlin.

Literatura:

Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences 316:1194-1199, 1993.

Feldmann, K.A., Marks, M.D.: *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. Mol. Gen. Genet. 208:1-9, 1987.

Langley, R.A., Kado, I.: Studies on *Agrobacterium tumefaciens* conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine and relationships of *A. tumefaciens* mutants to crown-gall tumor induction. Mut. Res. 14:227-286, 1972.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.: A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231, 1985.

Cílená a náhodná mutagenese DNA v podmínkách *in vitro*. Příklady a použití

Rotrekl, V.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno
tel: 05/41 32 13 74, e-mail: rotrekl@chemi.muni.cz

Laboratorní technika prošla v posledních desetiletích obdobím bouřlivé revoluce, jejímž výsledkem jsou přístroje, které nám umožňují studovat vztah struktury a funkce DNA a proteinů. Existují dva směry, kterými je možné k tomuto studiu přistupovat. Je možné indukovat *in vivo* náhodné mutace a izolovat následně jedince s určitým fenotypem a studovat na molekulární úrovni změny, které k danému fenotypu vedly. V opačném směru se pak dá vnést buď náhodná nebo řízená mutace do určitého úseku DNA *in vitro* a studovat buď změny ve struktuře proteinu kódovaného tímto úsekem DNA nebo přímo vliv této mutace na organismus po zpětném vnesení DNA do organismu. Díky tomu, že se ve druhém uvedeném přístupu dá do jisté míry vynechat závěrečný krok studia *in vivo*, a že tento přístup umožňuje studium změn přímo na molekulární úrovni (struktura a funkce proteinů kódovaných DNA nesoucí mutaci), těší se tato technika v poslední době ve světě velké obliby.

Místně řízená mutagenese je technika, s jejíž pomocí můžeme vnášet, deletovat či zaměňovat nukleotidy v rámci nám známého segmentu DNA. Na rozdíl od jiných technik mutagenese, kde jsou výsledkem většinou velká množství nejrůznějších mutantů, respektuje místně řízená mutagenese (alespoň většinou) názor experimentátora na polohu a strukturu mutované DNA. Vzhledem k přesnosti jakou lze od této techniky očekávat, lze ji využívat ke specifické změně individuálních kodonů aminokyselin v rámci kódujících úseků DNA, nebo k vnášení definovaných mutací majících regulační funkci. Místně řízená mutagenese tak mohla vnést v mnohých případech světlo a poznání do našeho chápání vztahů struktury a funkce proteinů. V jiných případech tak mohla být využita ke konstrukci nových vektorů, či chimerních genů. Přes zdánlivou dokonalost této techniky je si však třeba uvědomit také její omezení. Proteiny jsou nesmírně komplexní struktury a mnohdy by bylo třeba příliš mnoho jednotlivých mutantů k porozumění konkrétní funkce konkrétní oblasti proteinu. Jinými slovy, ke srozumitelnému výkladu výsledku mutagenese je také třeba velké představitosti autora které, jak minulost již ukázala, není vždy dostatek.

V současné době existuje celá řada variací a technik, které je možné použít k místně řízené mutagenese. Všechny tyto techniky mají však společného jmenovatele. Je to oligonukleotid nesoucí mutaci, který nám umožňuje zavedení mutace. Tento oligonukleotid, který je až na limitovaný počet pozměněných bazí komplementární, hybridizuje k jednořetězcové templátové DNA. *In vitro* je poté dosyntetizován komplementární řetězec s použitím uvedeného oligonukleotidu jako primeru. V tuto chvíli je možné odušit existenci několika principů, kde je možná aplikace výše uvedeného principu. Mutaci nesoucí oligonukleotid (primer) je možné použít k PCR amplifikaci námi požadovaného úseku DNA. Ten pak může být například použit k tzv. kazetové mutagenese. Při této technice je využito rozpoznávacích sekvencí restričních endonukleáz na koncích mutovaného úseku DNA. Celý úsek je pak možné použít jako kazetu, která se zamění za homologní úsek DNA divokého typu. Jiným velmi užitečným příkladem techniky využívající výše zmíněného principu je použití vektoru, který je schopen existovat jak v jednořetězcové, tak ve dvojřetězcové formě DNA. DNA, která má být pozměněna, je naklonována do tohoto vektoru. Oligonukleotid nesoucí mutaci je použit opět jako primer, tentokrát však k syntéze komplementárního řetězce. Tento řetězec je dále zacelen pomocí ligázy. Dvojřetězcová molekula DNA je následně amplifikována *in vivo*, nejčastěji s použitím bakteriálního hostitelského kmene *E. coli*. Původně byla tato metoda popsána s použitím vektoru M13. V současné době jsou však komerčně dostupné vektory

kombinující výhodné vlastnosti klasických plazmidů a fágové DNA. Tyto vektory jsou známy jako fágemidy, z nichž snad nejznámějším (avšak zdaleka ne jediný) příkladem je pBluescript.

Je jasné, že výsledkem popsaných mutagenezních postupů bude vždy směs původní nezmutované DNA s její mutovanou formou. Proto jejich výsledkem bylo možné dosáhnout v ideálním případě padesátiprocentní účinnosti metody. Vzhledem k faktu, že v reálných podmínkách je prakticky nemožné takového výsledku dosáhnout byla vynalezena celá řada modifikací uvedených postupů vedoucích ke zvýšení jejich účinnosti. Příkladem nám může být T.A. Kunklem popsaná modifikace poskytující velmi silnou selekci proti templátovému řetězci neobsahujícímu mutaci^{1,2}. Metoda je založena na syntéze templátové DNA v bakteriálním kmenu *E.coli* obsahujícím mutace *dut* a *ung*³. Tato bakterie je deficitní v enzymové aktivitě enzymů dUTPázy a uracil-N-glykozylázy. V důsledku těchto mutací se zvyšuje pravděpodobnost zabudování uracilu na místo thyminu do nascentního řetězce DNA. Jednořetězcový templát je z syntetizován s použitím pomocného fága, odvozeného z fága M13⁴. Syntéza komplementárního řetězce nesoucího mutaci následně probíhá *in vitro* za standardních podmínek tak, aby nascentní řetězec neobsahoval žádný uracil. Taková hybridní molekula je posléze amplifikována v normálním kmenu *E.coli*, což vede k degradaci řetězce obsahujícího uracil. Výsledkem celého procesu je tedy DNA nesoucí mutaci, v ideálním případě bez kontaminací DNA mutaci neobsahující. Jiným příkladem systému selekce řetězce DNA nesoucího mutaci (opět komerčně dostupným) je použití vektoru, obsahujícího bodovou mutaci v oblasti b-laktamázové rezistence proti antibiotiku. V průběhu hybridizace mutaci nesoucího oligonukleotidu je současně hybridizován i oligonukleotid komplementární s původní sekvencí divokého typu b-laktamázové rezistence. Se zavedením námi požadované mutace je tedy v tomto systému možné očekávat vzrůst rezistence vůči antibiotiku. Selekcí tlak je tedy vyvíjen pomocí antibiotik při amplifikaci DNA v *E.coli*⁵.

Navzdory existenci modifikací původní metodiky místně řízené mutageneze je však nutné přiznat, že pouze málo případů se svojí účinností vyšplhá nad padesát procent. Velmi důležitým krokem je proto při provádění řízené mutageneze účinný skrínig. K vyhodnocení výsledku máme z praktického hlediska tři přístupy. Nejjednodušší a nejrychlejší metodou je restriktázová analýza. Při navrhování oligonukleotidu je v některých případech možné zavést či vymazat současně se zavedením mutace také rozpoznávací sekvenci restriktázní endonukleázy. Ověření zavedení mutace pak spočívá v analýze štěpů námi vytvořené DNA. Tato metoda je velmi výhodná především proto, že je možné analyzovat velkou skupinu potenciálních mutantů. Přes snadnost provedení a ekonomičnost metody ji mnohdy není možné aplikovat. V takovýchto případech máme k dispozici další velmi jednoduchou metodu. K jejímu provedení potřebujeme další oligonukleotid, který je homologní buď s původní molekulou divokého typu, nebo s mutantem. 3'-konec tohoto oligonukleotidu musí pak být v místě, které bylo podrobena mutaci. Pakliže poté použijeme tento oligonukleotid k amplifikaci úseku DNA pomocí PCR, záleží výsledek amplifikace na komplementaritě 3'-konce oligonukleotidu a templátové molekuly⁶. Tento postup nám opět umožňuje analyzovat velké množství mutantů a navíc mnohdy je možné použít k amplifikaci přímo bakteriální kolonii, bez nutnosti izolovat DNA. Ani tato metoda však není aplikovatelná vždy. Ne každá kombinace bazí poskytuje při aplikaci této metody spolehlivý výsledek. Proto je v mnohých případech nutné přistoupit k metodě sice trochu těžkopádné, zato však velmi přesné, jakou je sekvenace úseku DNA obsahujícího mutaci. Omezeními této metody jsou její finanční náročnost a menší kapacita týkající se množství vyhodnocených mutantů (ve srovnání se dvěma předchozími metodami).

Jelikož naše znalosti o vztazích struktury a funkce regulačních úseků DNA a proteinů nejsou zdaleka ucelené, není možné abychom vždy mohli předpovědět jaká změna struktury by mohla mít za výsledek námi požadovanou změnu funkce. Pro tento případ byly vyvinuty a zdokonaleny metodiky náhodné mutageneze. Výsledkem aplikace této techniky je knihovna mutantů, s různě (více méně náhodně) pozmeněnou strukturou DNA. Existuje celá řada technik (zahrnujících především různá mutagenní chemická činidla) poskytující v různé míře (spíše ne)kompletní

knihovnu mutantů. Velmi dobré výsledky byly dosaženy s pomocí enzymové metody⁷. Prvním krokem této metody je hybridizace DNA s oligonukleotidem pod místem určeným k mutagenese. Druhým krokem je in vitro syntéza komplementárního řetězce za různě limitujících podmínek jednotlivých dNTP. V průběhu této části experimentu je vyrobena sada všech možných 3'-koneců (prodlužujícího se primeru) v úseku DNA, který chceme mutovat. V dalším kroku dochází k zavedení tří nesprávných bazí na 3'-konec každé sady oligonukleotidů za podmínek ve kterých neprobíhá kontrola čtení. Posledním krokem je zkompletování řetězce do formy, která může podstoupit další selekci a amplifikaci. Selekcce proti nezmutovanému (templátovému) řetězci může probíhat Kunkelovou metodou (viz výše). Na závěr je však třeba si uvědomit, jednu z hlavních limitací této techniky. K úspěšnému použití a interpretaci této techniky v rámci experimentu je nutné mít k dispozici účinný skrínigový, respektive selekční mechanismus s jehož pomocí můžeme vybrat námi požadovaného mutantu.

Literatura:

- ¹ Kunkel, T.A. (1985). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **82**, 488.
- ² Kunkel, T.A.; Roberts, J.D.; Zakour, R.A. (1987). In Methods in Enzymology (ed. R. Wu), Vol. 154, p. 367.
- ³ Yuckenberg, P.D.; Witney, F.; Geisselsoder, J.; McClary, J. (1991). In Directed mutagenesis: A practical aproach (ed. M.J. McPherson), IRL Press, Oxford.
- ⁴ Vieira, J.; Messing, J. (1987). In Methods in Enzymology (ed. R. Wu, and L. Grossmann), Vol. 153, p.3
- ⁵ Andrews, C.; Lesly, S. (1997) Promega Notes **61**, 12
- ⁶ Kwok, S.; Kellog, D.E.; McKinney, N.; Spasic, D.; Goda, L.; Levenson, C.; Sninsky, J.J. (1990) Nucleic Acids Research, Vol. 18, 4
- ⁷ Knowles, J.; Lehtovaara, P. (1991). In *Directed mutagenesis: A practical aproach* (ed. M.J. McPherson), IRL Press, Oxford.

Vnášení genů do rostlin prostřednictvím agrobakteriálních vektorů

Říha, K.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: riha@ibp.cz

Genově upravené rostliny se uplatňují nejen v základním výzkumu, ale v posledních několika letech se transgenozе rostlin stále více používá pro šlechtění nových odrůd hospodářských plodin. S prohlubujícími se znalostmi molekulárních mechanismů fyziologických a vývojových procesů rostlin se zvyšuje i počet znaků, které je možné pomocí transgenozе cíleně upravovat či měnit. Proto také vyvstává potřeba zvládnout proces transformace nejen u několika modelových rostlin, ale také u celé řady druhů a kultivarů zemědělsky významných plodin. Bylo vytvořeno mnoho postupů umožňujících začlenění cizorodé DNA do rostlinného genomu, téměř všechny však lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupina metod využívá přímé introdukce DNA do buněk, jejichž membrány, popřípadě buněčné stěny, byly přechodně narušeny buď mechanicky (mikroinjekce, particle bombardment, silikonová vlákna), elektrickým pulsem (elektroporace), či chemickými činidly (polyetylénglykol). Druhou možností je využít bakterií rodu *Agrobacterium*, které jsou schopné konjugovat s rostlinnými buňkami a vnášet do nich část své DNA.

Princip přenosu DNA do rostlin pomocí agrobakterií

Půdní bakterie *A. tumefaciens* způsobuje v místě napadení rostlin tvorbu kalusovitých nádorů, tzv. crown galls. Během infekce se přenáší část *Ti* plazmidu nazývaná T-DNA do rostlinného genomu. T-DNA je ohraničena krátkými repeticemi. Obsahuje geny pro syntézu metabolitů, které vyživují bakterie, a dále pak onkogeny (*onc*) kódující tvorbu auxinů a cytokininů. To způsobuje hormonální disbalanci v napadených buňkách a vede ke vzniku crown galls. Přenos T-DNA do rostlinné buňky zajišťují geny virulence (*vir*), které se také nacházejí na *Ti*-plazmidu. *Vir* operon je aktivován chemickými látkami - acetosyringony, které se uvolňují z poraněných buněčných stěn rostlin. Vazbou acetosyringonu na membránový receptor VirA dochází k aktivaci transkripčního faktoru VirG, jenž spouští přepis ostatních *vir* genů. Po aktivaci dochází k naštěpení hraničních sekvencí T-DNA a uvolnění jednořetězcového T-vlákna. Na tomto procesu se podílejí proteiny VirD2, VirD1 a VirC, přičemž VirD2 zůstává kovalentně navázaný na 5' konec T-řetězce a nese signály pro směřování do rostlinného jádra. Jednořetězcová T-DNA je stabilizována proteiny VirE2, které ji chrání před rostlinnými nukleázami. T-DNA je z bakteriální do rostlinné buňky transferována proteinovým kanálem, který je tvořen produkty genů *virB*. Zatímco přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky je plně řízen bakteriálními geny, integrace T-DNA do rostlinného genomu je s největší pravděpodobností zprostředkovávána reparačními mechanismy hostitelské buňky. Zdá se, že T-DNA se preferenčně začleňuje do transkribujících se oblastí genomu ilegálními rekombinacími.

Pro přenos DNA z agrobakterií do rostlin jsou důležité dvě oblasti *Ti*-plazmidu: hraniční sekvence vymezující T-DNA a *vir* geny. Bylo zjištěno, že transformační účinnost není nijak ovlivněna, jsou-li deletovány *onc* geny a nachází-li se T-DNA na jiném plazmidu než *vir* geny. Na základě těchto poznatků byly vyvinuty dva typy vektorů: (a) kointegrativní vektory, které nesou na *Ti* plazmidu modifikovanou T-DNA bez *onc* genů a do které se transgeny začleňují homologní rekombinací. (b) binární vektory, což jsou relativně malé plazmidy nesoucí upravenou T-DNA, do které jsou transgeny klonovány v *E. coli* a poté je celý plazmid přenesen do vhodného agrobakteriálního kmene, jenž obsahuje *Ti* plazmid s upravenou nebo úplně deletovanou T-DNA.

Pro snadnější manipulovatelnost a větší univerzálnost se ve většině laboratoří používají vektory binární.

Metoda kokultivace listových disků

Nejrozšířenější metodou transformace rostlin je tzv. kokultivace listových disků. Při této metodě se rostlinné explantáty kokultivují s agrobakteriálním vektorem nesoucím v T-DNA gen selektovatelný v rostlinách, poté se explantáty přenesou na médium, které umožňuje regeneraci a obsahuje látku umožňující selekci transformantů. Agrobakterium se nakultivuje v tekutém médiu (např. YEB, LB), připravené explantáty se na několik minut ponoří do bakteriální suspenze a poté přenesou na misky s kokultivačním médiem - tím je "rostlinné" médium, většinou bez fytohormonů. Následuje několikadenní kokultivace, při níž je nutné kontrolovat, zda agrobakterium příliš nepřerůstá. Odstranění bakterií po kokultivaci je asi technicky nejobtížnější krok celé metody. Většinou nestačí pouhé přenesení explantátů na médium s antibiotiky, která eliminují růst agrobakterií (cefotaxim, vancomycin). Důležité je několikrát důkladně omýt explantáty ve vodě, osušit na filtračním papíře a potom teprve přenést na médium, jež obsahuje fytohormony pro regeneraci rostlin, antibiotikum pro selekci transformantů a antibiotikum potlačující růst agrobakterií. Tento postup je velice účinný při transformaci snadno regenerujících rostlin citlivých k agrobakteriální infekci - např. rostlin čeledi *Solanaceae*. Mnoho rostlinných druhů je však málo citlivých k agrobakteriální infekci a celý transformační protokol je třeba krok za krokem optimalizovat.

Optimalizace metody

Stojíme-li před úkolem transformovat druh nebo kultivar, u kterého doposud nebyl vypracován transformační protokol a rozhodneme se použít metodu kokultivace listových disků, je nezbytné najít vhodné podmínky pro účinnou regeneraci celých rostlin. U většiny druhů se využívá indukce prýtů, a to buď přímo nebo přes stádium kalusu. Velice účinným se zdá být postup, při němž se po kokultivaci nejdříve indukuje tvorba kořenů a z těchto po selekci následuje regenerace celých rostlin. Kořeny jsou více citlivé k selekčním antibiotikům, což snižuje chimérizmus a množství netransformovaných regenerantů, jenž unikly selekci (Zhan et al., 1997). Jako selekční markery se nejčastěji používají neomycin fosfotransferáza (rezistence ke kanamycinu), hygromycin fosfotransferáza (rezistence vůči hygromycinu) nebo fosfinotricin acetyltransferáza (rezistence k fosfinotricinu). Jelikož různé druhy mají odlišnou rezistenci vůči výše uvedeným látkám, je nutné zjistit koncentraci selekčního činidla vhodnou pro selekci transgenních rostlin - příliš nízká koncentrace dovoluje regenerovat i netransformované rostlinám, zatímco příliš vysoká koncentrace brzdí i růst transformantů. Vedle selektovatelných genů je výhodné začlenit do T-DNA i geny reportérové, jejichž expresi lze snadno sledovat jak kvantitativně, tak i histochemicky. Nejrozšířenějším reportérovým genem u rostlin je *uidA* gen kódující beta-glukuronidázu. Pomocí substrátu X-Gluc je možné histochemicky detekovat expresi transgenů již několik dní po kokultivaci. Místa exprese transgenů na explantátu reprezentují jednotlivé transformační události, a tak se dá předběžně vyhodnotit účinnost transformace, aniž by bylo nutné čekat několik měsíců na tvorbu rezistentních kalusů nebo regenerujících prýtů. Takto je možné relativně rychle testovat vliv různých faktorů na účinnost transformace a v krátké době optimalizovat celý transformační postup pro daný rostlinný druh. Tímto způsobem byly například nalezeny optimální podmínky pro transgenozu u hrachu a karafiátu (de Kathen a Jacobsen, 1995; van Altvorst et al., 1995).

Prvním krokem při optimalizaci metody by měl být výběr agrobakteriálního kmene virulentního pro transformovanou rostlinu. Rozsah virulence určitého kmene je determinován geny na *Ti*-plazmidu. Byla odvozena celá řada odzbrojených vektorů, které se liší v typu *Ti*-plazmidu (GV3101, LBA4404, EHA101, GV2206). Jsou dvě možnosti jak vybrat nejvhodnější kmen pro transformaci dané rostliny: buď se explantáty kokultivují s divoký kmenem a sleduje se tvorba crown gallů, nebo se použije odzbrojený kmen nesoucí binární vektor s *uidA* genem a

detekuje se exprese transgenů. Nejenom virulence agrobakteriálního vektoru, ale i kompetence rostlinných buněk rozhoduje o úspěchu transgenozie. Typ explantátu je do značné míry předurčen jeho schopností regenerace: hypokotyly se používají u brukve (Mukhopadhyay et al., 1992), kořenové explantáty u huseníčku (Clarke et al., 1992), korunní plátky se osvědčily u karafiátu (Lu et al., 1991). Bylo zjištěno, že kompetenci buněk je možným zvýšit přidáním auxinu do kokultivačního média (de Kathe a Jacobsen, 1995). Frekvenci transformace ovlivňuje mnoho dalších faktorů, jako je délka kokultivace, hustota bakteriální suspenze, přídavek acetosyringonu nebo stáří a fyziologický stav rostliny. U některých rostlin méně senzitivních k agrobakteriální infekci může nalezení optimálních podmínek výrazně zvýšit efektivnost transgenozie.

Jiné metody využívající agrobakteriálního přenosu DNA

Nevýhodou metody kokultivace listových disků je nutnost regenerace transformantů v podmínkách *in vitro*. Ne všechny rostlinné druhy jsou schopny *in vitro* regenerace a často také tento krok vede k somaklonální variabilitě. Proto byla u *Arabidopsis thaliana* vypracována metoda *in planta* transformace pomocí agrobakterií. Principem je inokulace bakterií na poraněná místa nebo infiltrace bakteriální suspenze do celých rostlin. F1 generace takto transformovaných rostlin je vystavena selektivnímu antibiotiku a přežívající rostliny by měly nést integrovanou T-DNA (Bechtold et al., 1993; Katavic et al., 1994). Agrobakteriální vektory jsou velice účinné při transformaci dvouděložných rostlin, zatímco jednoděložné rostliny jsou k agrobakteriální infekci odolnější. Zde se uplatňuje tzv. biolistická metoda (particle bombardment), při níž se DNA váže na mikroskopické částičky zlata, které jsou vstřelovány do rostlinných pletiv. Dochází k integraci cizorodé DNA do rostlinného genomu a poté je možné izolovat transgenní rostliny. Nevýhodou je, že transformanty často nesou více kopií transgenů a dochází k jejich nestabilní expresi. Hansen a Chilton (1996) spojili výhody biolistické a agrobakteriální metody: do buněk tabáku vstřelili selekční gen umístěný mezi hraniční sekvence T-DNA a současně plazmid nesoucí agrobakteriální geny *virD1* a *virD2* řízené promotorem CaMV35S. Byl zde využit biolistický transfer DNA do buněk a k začlenění cizorodé DNA došlo stejným způsobem jako po agrobakteriální infekci. Tato práce byla vypracovaná v rámci projektů GAČR (521/96/1717) a GA AV ČR (A5004601).

Literatura:

- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199, 1993
- Clarke, M.C., Wei, W., Lindsey, K.: High-frequency of transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 10: 178-189, 1992
- Hansen, G., Chilton, M.D.: "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T- strands generated in planta. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 4978-4983, 1996
- de Kathe, A., Jacobsen, H.: Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L., Transgenic Res. 4: 184-191, 1995
- Katavic, V., et al.: *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 245: 363-370, 1994
- Lu, C., et al.: *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus*). Bio/Technology, 9: 864-868, 1991
- Mukhopadhyay, A., et al.: *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. Plant Cell Rep. 11: 506-513, 1992
- van Altvorst, A., Riksen, T., Koehorst, H., Dons, H.J.M.: Transgenic carnations obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf explants. Transgenic Res. 4: 105-113, 1995
- Zhan, X., Kawai, S., Katayama, Y., Morohoshi, N.: A new approach based on the leaf disc method for *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of aspen. Plant Sci. 123: 105-112, 1997

Izolace transgenních buněčných linií u modelové dvoudomé rostliny *Melandrium album*

Říha, K., Hladilová, R., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: riha@ibp.cz

Knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*, čeleď *Caryophyllaceae*) je oblíbeným dvoudomým modelem ke studiu determinace pohlaví i struktury a funkce heteromorfních pohlavních chromozómů. Z hlediska schopnosti regenerace *in vitro* i transgenoze však patří mezi výrazně rekalcitrantní rostlinné druhy. Cílem této práce bylo proto: (a) vypracovat podmínky k regeneraci rostlin z různých typů explantátů samičích i samčích rostlin odlišného stupně ploidie, (b) izolovat kořenové buněčné linie typu hairy-roots k cytologickým účelům a (c) vnést do rostlin reportérové transgeny, které by sloužily ke sledování genové exprese v semenném potomstvu v závislosti na pohlaví výchozího rodiče (gametický imprinting). Z řady testovaných ekotypů našeho i zahraničního původu se úspěšná regenerace z explantátů zdařila pouze u samičích genotypů původem z Francie a Belgie (získány laskavostí prof. I. Negrutia). Fragmenty řapíků, listových čepelí a kořenů, extirpované z rejuvenilizovaných axenických kultur, vyvábely četné regeneranty na agarových médiích typu B5 s nízkými koncentracemi NAA a BAP. Tyto genotypy (díplodní, triploidní a tetraploidní) byly dále využity k transformačním studiím kokultivací s agrobaktériemi. Několik onkogenních kmenů *Agrobacterium rhizogenes* bylo použito k izolaci kultur hairy-roots, které jsou ideálním materiálem k přípravě mitotických protoplastů a analýze pohlavních chromozómů. Z řady testovaných kmenů *A. rhizogenes* se podařilo připravit stabilní kořenové kultury prostřednictvím kmenů A₄R₅ II a AR12. Na bezhormonovém médiu B5 regenerovaly kořeny především z fragmentů listových čepelí. Frekvence tvorby hairy-root kultur však byla výrazně nižší než u kontrolních pokusů s tabákem. Karyologická analýza kořenových kultur *M. album* prokázala jejich vysokou stabilitu u všech typů ploidie (samičí linie 2n, 3n a 4n, samčí linie 2n a 3n). Kořenové a listové explantáty odvozené z axenických kultur vyselektované díplodní samičí rostliny byly kokultivovány s odzbrojeným kmenem *A. tumefaciens* AGLO (nesoucím reportérový gen *gus* s intronem) a selektovány na médiu s kanamycinem. Histochemické analýzy regenerujících kultur s pomocí substrátu X-gluc prokázaly expresi vneseného transgeny. V obou typech experimentů (infekce *A. rhizogenes* a *A. tumefaciens*) aplikace acetosyringonu zvyšovala frekvenci transformací.

Poděkování: Tento výzkum byl prováděn za finanční podpory GA ČR (521/96/1717).

Klonování diferenciálně exprimovaných mRNA na modelu indukce mikrospórové embryogenese řepky (*B. napus* L.)

Smýkal, P.

Katedra fyziologie rostlin, PřF UK, Viničná 5, 128 44 Praha
tel: 02/21 95 32 87, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: smykal@prfdec.natur.cuni.cz

Identifikace diferenciálně exprimovaných mRNA je velmi často používaný postup, pro studium molekulárních mechanismů daného biologického systému. Rozdíly ve fenotypu buněk popř. pletiv, jak anatomické tak funkční jsou na molekulární úrovni určeny změnami v genové expresi.

Termín diferenciální zahrnuje jednak prostorové tak časové změny v genové expresi tj. mezi různými pletivy, různými vývojovými stádii, nebo během různých fyziologických podmínek.

Pro porozumnění diferenciální genové exprese daného biologického systému, je důležité určit jaký podíl tvoří a na jaké úrovni citlivosti dané metody budou diferenciálně exprimované mRNA identifikovány. Pro vhodnost zvolené metody je proto nutné znát, zda-li a v jaké míře identifikuje celé spektrum abundantních a vzácných mRNA. Parametr abundance určuje počet klonů potřebných k vyhledávání v cDNA knihovnách a ten je dále ovlivněn zvolenou hladinou pravděpodobnosti. Pomocí saturačních a kinetických studií bylo zjištěno, že jednotlivé typy buněk exprimují 20 - 30 000 různých druhů RNA, z nichž 99% je vzácných. Těchto 99% představuje pouze 50% z celkového množství mRNA, proto zbývajících 50% představuje poměrně malý počet (cca 300) abundantních mRNA. Optimální metoda musí identifikovat diferenciálně exprimované mRNA nezávisle na jejím zastoupení. Úspěšnost metody závisí proto na zvolení vhodných dostatečně odlišných experimentálních systémů.

Vyhledávání genů na základě homologie k již existujícím genům/proteinům z jiných organismů. Je možné postupovat pomocí vyhledávání v cDNA knihovnách pomocí DNA hybridizačních sond popř. v expresních knihovnách pomocí existujících protilátek. V současnosti je velmi populární PCR postup pomocí vhodně zvolených primerů.

Hlavní pozornost věnuji vyhledávání nových genů popř. pro komplexní charakterizaci biologických systémů. Na začátku je nutné si uvědomit, jaké množství definovaného materiálu budeme mít k dispozici, jakou hladinu citlivosti zvolené metody budeme požadovat a jak komplexně budeme daný systém chtít popsat. Nejdříve používaná, ale nejméně citlivá technika je **diferenciální screening cDNA knihoven** (Sambrook et al., 1989). cDNA knihovna zhotovená z jednoho typu pletiva nebo buněk je prohledávána pomocí značených sond z jiného typu pletiv nebo buněk. Autoradiografický signál každé kolonie pak představuje zastoupení odpovídající sekvence v dané tkáni. Pomocí označených cDNA sond celkové mRNA je možné detekovat jednotlivou mRNA představující kolem 0,1% v populaci. Citlivost této metody je možné zvýšit použitím subtrahovaných cDNA sond. Tímto způsobem je možné detekovat jednotlivou mRNA představující 0,005% z celkové populace.

Klasická subtrakční hybridizace (Duguid a Dinauer, 1990, Sargent a David, 1983, Sambrook et al., 1989) je založena na srovnání dvou mRNA populací, z nichž jedna představuje tester (mRNA pletiva jehož exprese nás zajímá) a druhá jenž je v přebytku představuje driver (mRNA pletiv jenž chceme eliminovat). Z izolované mRNA testeru se získá pomocí reverzní transkripce ss-cDNA a ta je v roztoku hybridizována s 10 - 30 násobným přebytkem driver mRNA. Reverzní transkripce je nutná pro získání komplementárního řetězce a přebytek driveru pro účinné vyčytání společných mRNA. Nezhybridizovaná ss-cDNA je pomocí hydroxyapatitové chromatografie oddělena od DNA-RNA hybridů a použita pro syntézu ds-cDNA s následným naklonováním do vhodného vektoru. Získá se **subtrahovaná cDNA knihovna**, nebo se radioaktivně/neradioaktivně označí a použije jako **subtrahovaná cDNA sonda**. Existuje

elegantnější možnost využívající afinity streptavidinu k biotinu a magnetických částic (firma Dynal).

Touto technikou je možné obohatit transkripty, jež nás zajímají, přibližně 10 krát a následně tak snížit počet prohledávaných klonů. Nevýhodou této metody je velké množství potřebného výchozího materiálu, přibližně 5 mg polyA mRNA, vyšší pravděpodobnost vyhledání abundantnějších mRNA a její jednosměrnost tj. detekce přítomných, chybějících mRNA - typu ano, ne.

Elektronická subtrakce (Adams et al., 1993, Franco et al., 1995, Itoh et al., 1994, Okubo et al., 1992), zahrnující rozšířenou sériovou analýzu genové exprese (SAGE), představuje metodu, jež je využívána pouze velkými laboratořemi, vybavenými automatickými sekvenátory. Spočívá totiž v sekvenování náhodně vybraných cDNA klonů (řádově několika tisíců) a ve srovnání jejich četností s jinou cDNA knihovnou. Pomocí modifikované metodiky bylo takto identifikováno několik desítek tisíc EST - expressed sequence tags. U všech zmíněných metod následuje ověření diferenciální exprese pomocí RNA blotu, jež obvykle představuje časově nejnáročnější část, ale nezbytnou pro vyloučení falešných pozitivů. Pro zachycení vzácných sekvencí s 95% pravděpodobností je nutné analyzovat 120 000 až 500 000 klonů v závislosti na komplexitě systému. **Technika SAGE (serial analysis of gene expression)** využívající restrikce získaných cDNA a ligace do jednoho řetězce, zredukuje tento počet, ale stále je časově a pracovním příliš náročná (Velculescu et al., 1995).

Nedávno zavedené techniky diferenciálního PCR - **differential display PCR** (Liang, Pardee, 1992) a velmi příbuzná technika náhodně primerovaného PCR - **RNA arbitrary primed PCR** (Wetsh, et al., 1992) jsou založeny na přepisu izolované celkové RNA popř. mRNA pomocí specifických primerů a následně sady PCR reakcí s náhodnými primery. Primery jsou zvoleny tak, aby byla amplifikována pouze část cDNA, která je radioaktivně označena a následně rozlišena pomocí gelové elektroforézy.

Existuje mnoho modifikací základní metodologie:

1. Odlišnost v délce a typu použitých PCR primerů, nejčastěji byly používány krátké decamery, které jsou nejčastějším zdrojem nespecifických PCR fragmentů, vzhledem k nízké teplotě nasednutí na templát. Proto se přešlo k užívání delších 20merů.

Celková RNA reverzně přepsaná pomocí oligo dT primeru a následně amplifikovaná poskytuje pouze 3'-UTR. Při použití mRNA přepsané pomocí směsi náhodných hexamerů je větší pravděpodobnost získání kódující sekvence.

2. Vzhledem k citlivosti PCR je třeba zbavit RNA přítomných zbytků genomové DNA, nejlépe pomocí DNázy I.

3. Stringentností PCR reakce v závislosti na délce použitých primerů. Volbou primerů je možné zacílit PCR reakci k izolaci specifických transkriptů určitých genových rodin, popř. homologů.

4. Velmi důležitý je typ enzymu pro PCR, nejčastěji různé druhy Taq polymeráz, nejvíce doporučovaný je Stoffel fragment (Perkin-Elmer), který je procesivnější a méně citlivý ke koncentraci Mg^{2+} a optimalizaci průběhu PCR.

5. Největší odlišnosti jsou pak ve způsobu separace a detekce získaných PCR fragmentů. Původní metoda využívá sekvenační gel a radioaktivní značení, nevýhodou je však příliš vysoká citlivost, projevující se velkým počtem falešných pozitivů a obtížnost vyříznutí daného fragmentu na základě autoradiogramu.

Proto v jednodušších verzích se využívá agarózové elektroforézy a fluorescenční detekce pomocí EtBr nebo citlivějších barviv, popř. přenos digoxigeninem značených fragmentů na membránu s následnou detekcí pomocí protilátek.

Vzhledem k možnosti dlouhodobého uchování a přímé vizualizace fragmentů je nejzajímavější využití citlivého barvení DNA stříbrem.

Existuje množství podobných technik, ale doporučuji postup používanou firmou Promega ve spojení s využitím speciálních fólií firmy FMC (Gel Bond PAGE + AcrylAide), umožňující polymerizaci polyakrylamidového gelu k této fólii s velmi snadnou manipulací. Osvědčilo se mi jednodušší uspořádání formátu proteinových elektroforéz.

6. Atraktivní je využití magnetických afinitních částic (Dynal), umožňující práci s mnohem menším množstvím materiálu a optimalizaci všech enzymatických kroků, vzhledem ke snadnějšímu přenosu.

Nejdůležitější je opět ověření exprese pomocí RNA blotu. Tato analýza je materiálově a časově nejnáročnější. V mnoha případech se ukázalo, že vyříznutý a reamplifikovaný fragment obsahoval více délkově stejných DNA fragmentů, popř. nebyla potvrzena diferenciální exprese.

Hlavní výhody DD-PCR:

1. Velmi malé množství potřebného výchozího materiálu, řádově několik nanogramů mRNA popř. 1 mg celkové RNA.
2. Unikátní možnost srovnání několika vzorků najednou, limitující je pouze kapacita gelu.
3. Teoretická závislost pouze na sekvenci primeru a ne na abundanci daných mRNA.
4. Možnost detekce up - down regulovaných genů.

Hlavní nevýhody DD-PCR:

1. Poměrně vysoký počet falešných pozitivů.
2. Deklarovaná systematičnost studia genové exprese je dosažitelná pouze za cenu vysokého počtu PCR reakcí a následných gelů.
3. Přítomnost více fragmentů v jednom PCR fragmentu detekovaném na gelu ztěžuje následné ověření exprese.
4. Diskutovatelná detekovatelnost nízké abundančních transkriptů.
5. Krátká délka naklonovaných fragmentů, v případě originální metodiky představující pouze nekódující 3' konec.
6. Diskutovatelná je rovněž snadnost a reprodukovatelnost provedení postupu. Byla demonstrována závislost na množství výchozího materiálu a tedy na abundanci RNA.

Doporučení :

- používat jako výchozí materiál izolovanou mRNA a přepisovat ji pomocí směsi náhodných hexamerů pomocí reverzní transkriptázy postrádající Rnázovou H aktivitu (např. SuperScript II, BRL), neboť takto je možné získat delší cDNA s větší pravděpodobností kódující sekvence.
- jako další krok je nutné odstranit RNA templát pomocí Rnázy H, tento krok doporučuji provést v každém případě.
- použitý typ PCR enzymu je velmidůležitý, doporučuji nešetřit a použít např. Stoffel fragment (Perkin-Elmer), Expand High Fidelity (Boehringer).
- používat nejlépe 20mery pro PCR reakci, umožňující nasednutí při teplotě 55°C.
- použít nejdříve jeden méně stringentní PCR krok, 95°C 1min, 45-50°C 5 min., 72°C 2min., a následně 30 cyklů 95°C 1min., 55°C 1 min., 72°C 1min.
- při daném uspořádání je možné amplifikovat fragmenty o délce 0,5 - 2 kbp (5-30 fragmentů v závislosti na použitém primeru) s následným rozlišením na 5% Gel Bond PAGE a detekcí pomocí stříbra.

Závěrem bych se chtěl zmínit o nové metodice subtrakční hybridizace využívající PCR technologie. Tato technologie byla vyvinuta několika autory (Diatchenko et al., 1996, Gurskaya et al., 1996) a na trh uvedena v kompletní formě **PCR-Select cDNA Subtraction Kitu** firmou Clontech.

Metoda spočívá v syntéze cDNA dvou populací testeru a driveru, přičemž driver může být složen z několika různých pletiv, jejichž mRNA chceme ve vzorku testeru eliminovat. Přepsané ds - cDNA jsou enzymaticky štěpeny pomocí Rsa I, pro získání kratších lépe amplifikovatelných a klonovatelných zatupených fragmentů. Populace testerové cDNA je rozdělena do dvou frakcí, jimž jsou naligovány odlišné adaptory. Poté jsou provedeny dvě následné hybridizace za přebytku driverové cDNA. Koncentrace vysoce a níže abundantních cDNA jsou tak normalizovány a zastoupení ss-cDNA je významně zvýšeno. Během druhé hybridizace jsou tyto hybridizační mixy spojeny bez denaturace a poté je přidána denaturovaná cDNA driveru. Během tohoto kroku tak vzniknou nové molekuly ds-cDNA testeru mající různé adaptory na koncích. Během PCR molekuly driveru nemající odpovídající sekvence adaptorů nejsou amplifikovány vůbec, molekuly testeru mající jen jeden typ adaptoru na jednom svém konci jsou amplifikovány pouze lineárně, molekuly testeru mající stejný typ adaptoru na obou svých koncích jsou sice amplifikovány, ale následně díky efektu suprese (Siebert et al., 1995, U.S. patent # 5,565,340), kdy se vytvoří forma vlásenky vzhledem ke stejné koncové sekvenci a zamezí se tak amplifikaci, pouze molekuly testeru mající po hybridizaci dva různé adaptory na svých koncích jsou amplifikovány exponenciálně.

Během sekundárního PCR, použitím nested primerů je dále eliminováno pozadí a dále obohaceny diferenciatně exprimované cDNA. Takto získané fragmenty je možné přímo klonovat do vhodného vektoru nebo je zároveň použít jako hybridizační sondu pro vyhledávání v takto vytvořené popř. jiných DNA knihovnách.

Pro přesnost a eliminaci falešných pozitivů se doporučuje provést paralelní reverzní subtrakti, kdy jsou zaměněny úlohy testeru a driveru. Vybrané klony je vhodné uspořádat v 96 jamkovém formátu na duplikáty filtru a provést jednu hybridizaci s forward (pozitivně) a druhou s reverse (negativně) subtrahovanou sondou. Poté je již možné přistoupit k ověření exprese pomocí Northern blotu.

Metoda umožňuje :

1. použít malé množství výchozího materiálu, v optimálním případě je třeba 0,5 - 2 mg mRNA, popř. je možné při nedostatku vhodného materiálu provést PCR amplifikaci.
2. Účinně obohatit frakci níže exprimovaných mRNA.
3. Není třeba provádět fyzickou separaci ss- a ds-cDNA molekul, jenž vede k jisté ztrátě části populace.
4. Tato metoda je velmi rychlá, v optimálním provedení je třeba jen 2-3 dnů pro naklonování a společně s hybridizací je možné během jednoho týdne znát výsledek.
Při použití původního kitu firmy Clontech, je možná průběžná kontrola všech kroků postupu vzhledem k použití kontrolního setu.
5. Umožňuje provádět rovněž vyhledávání down-regulovaných genů, vzhledem k provedení reverzní subtrakce.

Literatura :

- Adams, M.D.**, Soares, M.B., Kerlavage, A.R., Fields, C., Venter, J.C.: Rapid cDNA sequencing (EST) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genetics* 4: 373-380, 1993
- Bassam, B.J.**, Caetano-Anolés, G., Gresshoff, P.M.: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83, 1991
- Bauer, D.**, et al.: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) . *NAR* 18: 4272-4280, 1993
- Chen, J.J.W.**, Peck, K.: Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential bands on nylon membrane. *NAR*, 24: 793-794, 1996

- Diatchenko, L.**, et al.: Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030, 1996
- Duguid, J.R., Dinauer, M.C.**: Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *NAR* 18: 2789-2792, 1990
- Franco, G.R.**, et al.: Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by EST strategy using a directional cDNA library. *Gene* 152: 141-147, 1995
- Gurskaya, N.G.**, et al.: Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of PCR: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240: 90-97, 1996
- Itoh, K.**, Matsubara, K., Okubo, K.: Identification of an active gene by using large-scale cDNA sequencing. *Gene* 140: 295-296, 1994
- Liang, P.**, et al.: Analysis of Altered Gene Expression by Differential Display. *Methods in Enzymology*, Vol. 254, 304-321, 1995 Academic Press
- Liang, P.**, Pardee, A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992
- Lukyanov, K.A.**, Launer, G.A., Tarabykin, V.S., Zaraisky, A.G., Lukyanov, S.A.: Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by PCR. *Anal. Biochem.* 229: 198-202, 1995
- Perucho, M.**, Welsh, J., Peinado, A., Ionov, Y., McClelland, M.: Fingerprinting of DNA and RNA by Arbitrary Primed PCR: Application in Cancer Research. *Methods in Enzymology*, Vol. 254, 275-290, 1995
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989
- Siebert, P.D.**, Chenchik, A., Kellog, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A.: An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *NAR* 23: 1087-1088, 1995
- Sokolov, B.P.**, Prockop, D.J.: A rapid and simple PCR based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *NAR*, 19: 40009-4015, 1994
- Velculescu, V.E.**, Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487, 1995
- Wan, J.S.**, et al.: Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology* 14: 1685-1691, 1996
- Welsh, J.**, et al.: Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acid Research* 20: 4965-4970, 1992
- Zhao, S.**, Loon, S., Pardee, A.B.: New primer strategy improves precision of differential display. *BioTechniques*, 18, 5: 843-850, 1995

Analýza DNA v rostlinné taxonomii a ekologii

Štorchová, H.

Botanický ústav AVČR, 252 43 Průhonice u Prahy
tel: 02/67 75 01 88 l. 285, e-mail: storch@ibot.cas.cz

Poměrně novou oblastí molekulární biologie je využití analýzy DNA v rostlinné taxonomii a evoluční biologii. Druhá polovina osmdesátých let přinesla pokrok v laboratorních metodikách, a tak byl splněn základní požadavek - analýza velkého množství vzorků v rozumném čase. Rozsáhlého využití se dočkal revoluční objev polymerázové řetězové reakce. Řada komerčně dostupných chemikálií, enzymů a tzv. kitů (reakčních souprav) zpřístupnila molekulárně biologické techniky i terénním přírodovědcům.

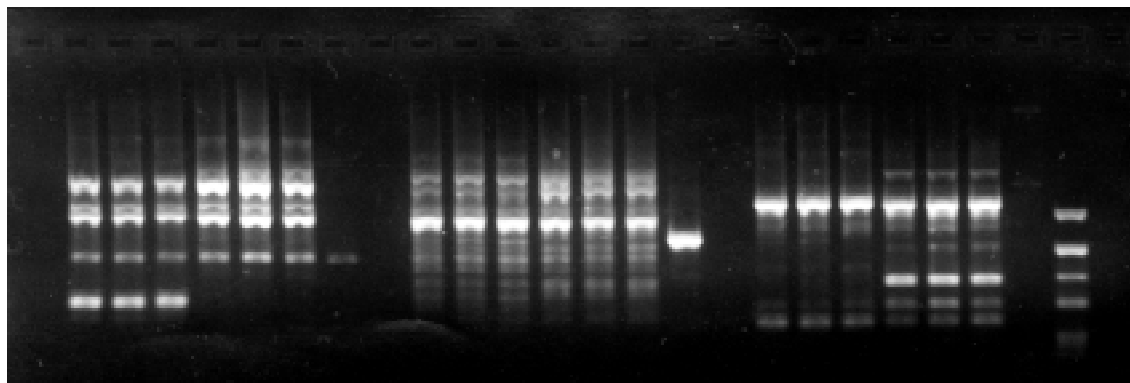
Historicky starší jsou práce využívající porovnání restričních map či prostě jen souboru restričních fragmentů daného úseku genomu u dvou různých jedinců. Tyto postupy jsou založeny na DNA:DNA hybridizaci (Southernova metoda). Potřebujeme specifické sondy - naklonované úseky sledovaného génomu. Tyto sondy musí být vybrány tak, aby cílová místa byla dostatečně polymorfni a aby hybridizace byla jednoznačná. Ke značení sond se zpravidla používá radioizotopů, a tak je nutná radioizotopová laboratoř. Proto se RFLP (restriction fragment length polymorphism) uplatnil zejména při studiu ekonomicky významných plodin - kukuřice, pšenice, rýže, tabáku, rajčat. Vítané zjednodušení přineslo využití nespecifických sond - náhodně vybraných úseků DNA, zpravidla kratších. Tyto sondy můžeme použít i u rostlin, u nichž nemáme k dispozici znalost jakékoliv sekvence. Empiricky byly nalezeny takové sondy, které dávají rozumné výsledky u většiny rostlin. Příkladem je 15 nukleotidů dlouhý úsek fága M 13. Tento bakteriofág ovšem s rostlinami nemá nic společného. Krátké nespecifické sondy jsou zpravidla protějškem středně repetitivních sekvencí - tzv. minisatelitů. Cílových míst je v genomu mnoho, a tak je výsledkem tohoto typu DNA analýzy "žebříček" podobající se čárkovému kódu na zboží v samoobsluze. Protože repetitivní sekvence jsou velmi proměnlivé, může být "žebříček" individualně specifický, může charakterizovat jedince podobně jako označuje konkrétního člověka otisk prstu. Proto hovoříme o DNA fingerprintingu.

Možnost odlišení morfologicky zcela shodných jedinců nabízí terénní biologii nepřeberné množství aplikací. Můžeme stanovit otcovství vajíček v ptačím hnízdě, rozlišit jednotlivá mycelia prorůstající trouchnivějící pařez, stopovat historii šíření rostlinných druhů. Ochrana přírody pomáhá znalost genetické variability ohroženého druhu. Jen zdánlivě futuristická, ve skutečnosti žhavě aktuální, je možnost identifikace uniklých transgenů.

Objev PCR (polymerázová řetězová reakce) na sklonku osmdesátých let vnesl do rozvoje DNA fingerprintingu neočekávanou dynamiku. Náročné techniky se velmi zjednodušily a staly se dostupné i pracovištím např. muzejního typu (v Německu). Podstata PCR spočívá v selektivním namnožení vybraného místa v genomu. Potřebujeme znát sekvenci bezprostředně sousedních míst a dle této informace si nechat nasynetizovat homologní primery. Tyto primery poslouží jako očka termorezistentní DNA polymeráze, která žádaný úsek opakovaně replikuje. Výsledek replikace se pak stává matricí následujícího cyklu, a tak žádaný úsek DNA přibývá exponenciální rychlostí. PCR probíhá v termocyklu, který časově přesně definovanými změnami teplot reakci řídí.

Analogií klasického DNA fingerprintingu se stal PCR fingerprinting, využívající krátkých náhodných primerů. Jakákoliv znalost sekvencí studovaného organismu není rovněž nutná. Tímto krátkým primerem může být třeba výše zmíněný oligonukleotid odvozený od M 13. Zvláštním případem PCR fingerprintingu, který si od svého objevu v roce 1991 získal nesmírnou popularitu, je RAPD (random amplification of polymorphic DNA). Jak tomu bývá, zprvu vystupovaly do popředí výhody tohoto přístupu, později se počalo upozorňovat na různá úskalí. Největší výhodou je jednoduchost. K provedení RAPD analýz potřebujeme pouze termocykler, obyčejnou horizontální elektroforetickou aparaturu, agarózu, transiluminátor, a fotoaparát (osvědčil se starý vyřazený Pentacon na svitkové filmy). Z chemikálií je nejdůležitější Taq polymeráza, dostupná nyní z českých zdrojů za nižší ceny. RAPD metodika používá

jediný primer (nikoliv dva různé, jak je tomu u klasické PCR), dlouhý deset nukleotidů. Teplota přisednutí primeru je nižší, dovoluje méně specifickou hybridizaci. Počet replikačních cyklů je naopak vyšší než u klasické PCR. Výsledkem takového postupu je, že některé fragmenty DNA zreplikujeme téměř u jakéhokoliv studovaného organismu. Naopak se velkým problémem stává míra reprodukovatelnosti, a to v téže laboratoři. Mezi různými laboratořemi nejsou RAPD “žebříčky” reprodukovatelné vůbec, můžeme porovnávat jen interpretace. Na řadě obrázků z naší laboratoře je dokumentována závislost výsledků RAPD na koncentraci hořčíku, primeru a DNA, dále na čistotě vložené DNA, typu DNA polymerázy a teplotě přisednutí primerů (annealing). Významným činitelem je použitý termocykler (toto



Obr.1. Dva různí jedinci dubu pýřitého (*Quercus pubescens*). RAPD analýza byla provedena postupně třemi primery (OPA-02, OPA-03, OPA-04) ve třech provedeních. Zcela vpravo standard molekulových vah pBR 322/Alu.

ukázáno není, protože máme jenom jeden). Naopak obr.1 ukazuje, že přes všechny obtíže lze dosáhnout rozumné reprodukovatelnosti výsledků a rozdíly v RAPD “žebříčkách” odrážejí různost dvou genomů.

V naší laboratoři užíváme RAPD k identifikaci klonů tří druhů trav z krkonošské louky pro potřeby ekologů, dále se RAPD osvědčily při porovnávání různých apomiktických populací jestřábníků a ke studiu vnitro- a mezipopulační variability u pomněnek. Pro posuzování fylogenetické příbuznosti či dokonce ke konstrukci vývojových diagramů se RAPD příliš nehodí. Odhalují variabilitu na příliš nízké taxonomické úrovni. Pro tyto potřeby bude nutno sáhnout k jiným variantám PCR. Rozšířeně je v poslední době použítí univerzálních primerů replikujících vhodné úseky DNA. Namnožené fragmenty DNA se následně štěpí vhodnými restričními enzymy.

Molekulární biologie však nemusí sloužit jen popisu evolučních událostí, může přinést nečekaná odhalení týkající se podstaty evoluce génómu. Posledních pět let přináší překvapivá zjištění o přítomnosti velkého množství neaktivních retrozomů u rostlin. Tyto deriváty retrovirů se ve větším rozsahu u rostlin nepředpokládaly. Ukazuje se však, že jsou odpovědné za velkou délku a extrémně vysokou proměnlivost rostlinné mitochondriální DNA. Naše znalosti jsou dosud omezeny na laboratorní modely. Studium vhodných rostlin nasbíraných v terénu může objasnit případnou roli retrozomů v evoluci rostlin i jako mediátorů horizontálního přenosu genetické informace.

Práce je umožněna díky podpoře grantů 202/94/0660 GAČR a A6005602/1996 GA AV ČR.

Literatura:

- McPherson M.J., Hames B.D., Taylor G.R., Eds (1995): PCR 2. A practical Approach.- IRL Press. Oxford,, New York, Tokyo.
- Soltis P.J., Soltis D.E., Doyle J.J., Eds (1992): Molecular systematics of Plants.-Chapman and Hall. New York.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W., Eds (1995): DNA fingerprinting in plants and fungi.- CRC Press.

Čtvrtek 6.11.1997

Cytologické a obecně fyziologické přístupy ke studiu rostlinné buňky

| | |
|--|--|
| Albrechtová, J. | Užití fluorescenčních sond pro in vivo stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk (přesunuta na středu) |
| Bačkor, M. <i>et al.</i> | Metody izolácie eukaryotických fotobiontov z lišajníkov |
| Beneš, K. | Metody cytochemie <i>in situ</i> |
| Budíková, S. | Histochemical localization of aluminium and cell wall substances in maize roots |
| Hanáčková, Z. | Sample preparation for microsporogenesis observation in <i>Karwinskia parvifolia</i> (<i>Rhamnaceae</i>), plant with a high content of secondary metabolites, in TEM |
| Hanáčková, B., <i>et al.</i> | Studium průduchového aparátu listů analýzou obrazu |
| Kadleček, P. <i>et al.</i> | Studium fotosyntézy kyslíkovou elektrodou a PAM fluorometrem |
| Kutík, J. | Stereologické hodnocení ultrastruktury rostlinných buněk |
| Opatrná, J. | Analýza obrazu v rostlinné fyziologii (přesunuto na pondělí) |
| Opatrný, Z. | Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů |
| Prášil, I., Prášilová, P. | Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů |
| Sadloňová, K. <i>et al.</i> | Biotest na pôsobenie galaktoglukomanánových oligosacharidov v predĺžovacom raste indukovanom rastovou látkou |
| Soukup, A., Votrubová, O. | Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného |
| Soukup, A., Votrubová, O. | Aplikace konfokální mikroskopie při studiu prostorového uspořádání rostlinného pletiva |
| Široký, J. | Konfokální laserová skenovací mikroskopie |
| Široký, J. <i>et al.</i> | Studium struktury chromatinu <i>Gagea lutea</i> pomocí konfokální laserové mikroskopie |
| Tichá, I. | Nový typ víček pro fotoautotrofní <i>in vitro</i> kultury rostlin |
| Überall, I. <i>et al.</i> | Synchronizace buněčného cyklu u smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.) Karst./ |
| Vyskot, B. | Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů |
| Vyskot, B. <i>et al.</i> | Studium struktury a funkce pohlavních chromozómů <i>Melandrium album</i> pomocí imunocytoologických metod |

Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.

Užití fluorescenčních sond pro *in vivo* stanovení fyziologických charakteristik rostlinných buněk

Albrechtová, J.T.P.

Albert-Ludwigs-Universität, Biologie II./Botanik, Schänzlestr.1, D-79104, Freiburg, Deutschland

tel: (049) 761/203 26 37, fax: (049) 761/203 28 40, e-mail: jolana@ruf.uni-freiburg.de

Adresa českého pracoviště: ÚEB AVČR, Ke dvoru 16, 16630, Praha 6-Vokovice

Fluorescenční sondy jsou fluorescenční barviva, která mění své fluorescenční vlastnosti (intenzitu, excitační a/nebo emisní vlnovou délku) v závislosti na okolí. Detekovat lze tímto způsobem koncentrace iontů (pH, vápník, hořčík, železo, apod. - spektrum indikátorů se neustále rozšiřuje), membránový potenciál a průchodnost membrán - např. jako test vitality buněk. V dalším textu se zaměřím především na stanovení pH, vápníku a membránového potenciálu, což jsou jednak nejčastěji užívané aplikace, jednak s nimi sama pracuji.

Sondy lze do buněk injikovat, což omezuje použití na dostatečně velké a stabilní buňky. Kromě toho je nutno počítat s ranovou reakcí, která ovlivní aktivitu iontových kanálů. Podle toho, zda injikujeme do cytoplasmy či do vakuoly, dostaneme různou distribuci sondy v buňce. Druhá možnost (popsána dále v tomto textu) je použití modifikované sondy, vybavené transportní skupinou (nejčastěji acetoxymethylester). V buňce je tato skupina buněčnými esterázami odštěpena, a teprve potom sonda reaguje na daný iont. Pro sondy indikující vlastnosti membrán a membránový potenciál problém transportu odpadá.

U sond vykazujících posun spektra při vazbě na iont lze určit kvantitativně koncentraci iontu, pokud dělíme vzájemně obrázky (mapy intenzity fluorescence) snímané při dvou nastaveních filtru. Vyloučíme tak vliv distribuce sondy v buňce a koncentrace sondy v dané buňce na výslednou mapu intenzity. Nejlépe je k tomu účelu použít konfokální mikroskop s možností současného snímání ve dvou kanálech. U konfokálního mikroskopu rovněž odpadá vliv tloušťky objektu. Pokud sonda nemění vlnovou délku, lze aplikovat současně druhou sondu s opačnou reakcí na daný iont v dostatečně odlišné vlnové délce, nebo sondu na daný iont nereagující a použít její mapu fluorescence jako konstantní "referenční" obrázek.

Prakticky všechny použitelné pH-indikátory jsou deriváty fluoresceinu, pro detekci vápníku existuje celá řada barviv na nejrůznější bázi. Pro měření membránového potenciálu jsou v podstatě dvě možnosti: jednak "pomalé" distributivní sondy (např. na bázi oxonolu), distribuující se na obou stranách plasmalemy v závislosti na gradientu náboje přes membránu. Je ovšem značný problém kvantifikovat výsledky. Jednak "rychlé" sondy (např. ANEPPS), jejichž molekuly jsou pomocí lipofilního konce zakotveny v membráně a v závislosti na elektrickém náboji v okolí mění konformaci opačného, fluorescenčního, konce, a tím i intenzitu fluorescence. Tyto sondy ale po určité době prostupují membránou, čímž se mění jejich koncentrace na plasmalemě. Lze je tedy použít jen pro krátkodobé experimenty.

Chceme-li používat fluorescenční sondy, potřebujeme:

1: Vybrat vhodnou sondu. Prakticky jediná firma, která se cíleně zabývá vývojem nových sond a jejich uváděním na trh, je Molecular Probes se sídlem v Eugene (USA) a evropskou pobočkou Molecular Probes Europe Inc. v Leidenu v Holandsku. Sondy se liší citlivostí k danému iontu, dále citlivostí k dalším faktorům v buňce (jiným iontům, apod.), fluorescenčními vlastnostmi (excitační a emisní vlnové délky, typ změny v reakci na daný iont - např. jen změna intenzity, či zároveň i posun spektra, atd.), podmínkami transportu přes membránu, distribuci v buňce (např. jinou sondu potřebujete pro detekci v cytoplasmě, jinou pro chloroplasty, jinou pro

mitochondrie...), toxicitou, a mnoha dalšími parametry. Výběr tedy závisí např. na tom, zda chcete detekovat rychle výrazné změny (signály), nebo spíše malé změny v distribuci (změny v rámci steady state). Dále na pokusném materiálu, a technických možnostech (zda máte možnost použít UV, jaké filtry máte k dispozici, kvalita mikroskopu...), a zda případně chcete aplikovat více sond současně či barvit nějaké struktury pro lepší orientaci v materiálu. V neposlední řadě, jak dlouho má pokus trvat - některé sondy jsou vhodné jen pro okamžité použití, jiné reagují pomaleji, ale je možno sledovat změny v průběhu několika hodin. Autofluorescence chloroplastu je detekovatelná už od cca 600nm. Spektrum sondy pro měření v zeleném pletivu tedy nesmí překročit tuto hranici. Autofluorescence buněčných stěn (v modré oblasti) je relativně slabá a tudíž při měření neruší. Často je nutno vyzkoušet více sond, zvláště pokud pro daný materiál či danou problematiku není dost údajů v literatuře. Citace k jednotlivým sondám jsou uvedeny v katalogu Molecular Probes.

2: Dobrý fluorescenční mikroskop. Nejlépe konfokální, s možností vícekanálového snímání - zejména pokud chcete kvantitativní data (viz výše).

3: Analýzu obrazu. U konfokálního mikroskopu obvykle součást vybavení, bývá však výhodnější neblokovat mikroskop, a zpracovávat na samostatné analýze. Někdy je třeba případně speciální vybavení analýzy (konkrétně aritmetické dělení dvou obrázků vzájemně musí mít nadprůměrnou úroveň). Poněkud problematické bývá použití analýz zaměřených původně na použití v průmyslu či na nerosty. Je lépe vybrat firmu specializovanou na biologické aplikace. Z tuzemských lze akceptovat Laboratory Imaging, je však nutno přizpůsobit základní program konkrétním požadavkům, případně části doprogramovat. Cenově srovnatelná, kvalitou nejlepší ze všech (mně známých) produktů je obrazová analýza německé firmy Visitron Systems. O něco dražší a téměř stejně kvalitní je BioRad, rovněž velmi kvalitní (ale velmi drahá) je firma Zeiss. Je však možno (po přizpůsobení programu) použít i některý z mnoha dalších systémů. Pro déletrvajících pokusy s nutností kontinuální detekce znám jen analýzu Visitron Systems v On-line verzi.

Postup práce:

Objekt používáme zásadně nefixovaný. Připravíme pracovní roztok sondy v pufru (viz pozn.), objekt inkubujeme v tomto roztoku asi dvacet minut. U některých objektů nutno barvit déle. Po barvení objekt přeneseme do čistého pufru, a ihned snímáme obrázky (viz dále).

Pozn.: Koncentraci sondy a druh pufru je nutno vyzkoušet, přičemž lze vycházet z návodu pro jednotlivé sondy, dodávány Molecular Probes při zásilce. Je nutno dodržet popsané zásady práce (např. zmrazit, či nechat v pokojové teplotě, jak dlouho lze uchovávat pracovní roztoky, apod.), jinak sonda ztrácí požadované vlastnosti. Zpravidla se připravuje zásobní roztok sondy v DMSO, který lze zmrazený uchovávat několik měsíců. Pracovní roztok v pufru se připravuje až těsně před použitím, nechává v pokojové teplotě, a je stabilní několik hodin. Doporučuje se použít pufr, který dobře uchovává strukturu membrán. Užívá se fosfátový pufr, MES, pro basičtější pH HEPES. Pufr má mít před přípravou pracovního roztoku pokojovou teplotu, při jiné teplotě má jiné pH! Obvykle se používá pH pracovního roztoku v rozmezí 6.0-7.0.

Příklad protokolu pro měření pH:

Materiál: merlík červený (*Chenopodium rubrum* L.)

Roztoky: MES pufr (25mM, pH 6) - uchovávat v chladničce
 carboxy SNARF-1 (zásobní roztok: 50mg SNARF v 100ml DMSO - lze uchovávat několik dní v chladničce, nejlépe je nechat asi den rozpustit a pak zmrazit v alikvótech po 1ml)

Postup práce:

Nejméně den před měřením připravíme pufr a zásobní roztok sondy. Před začátkem práce necháme oba roztoky vytemperovat na pokojovou teplotu. Připravíme pracovní roztok sondy (1ml zásobního roztoku v 500ml pufru). Na vibratomu zhotovíme čerstvé podélné řezy apikálního meristému. Řezy přeneseme na podložní sklíčko do pracovního roztoku sondy, inkubujeme 20 minut. Pak

překryjeme krycím sklíčkem a ihned snímáme obrázky. Snímáme simultánně ve dvou kanálech. Nastavení filtru např.: excitace 488nm, detekce v prvním kanálu 520-600 nm, ve druhém kanálu 610-660nm. Ve druhém kanálu lze detekovat od 610nm bez horního omezení, účelem uvedené horní hranice je odstínit autofluorescenci chloroplastů v zelených pletivech sousedících s apikálním meristémem. Obrázky z obou kanálů zkorigujeme na všechny nepřesnosti a artefakty (viz dále - “Vyhodnocení výsledků” a “Tipy”). Obrázky pak vzájemně vydělíme a podle kalibrace určíme pH v jednotlivých buňkách.

Časová náročnost: po získání zběhlosti lze jeden výše popsany experiment zvládnout asi za dvě hodiny. Při jednom experimentu můžete zpracovat až čtyři objekty. Při následném zpracování obrázků záleží na kvalitě obrázků získaných při experimentu, množství nutných korekci, a požadavcích na kvalitu výsledků. Záleží také na kvalitě a rychlosti vaší obrazové analýzy.

Vyhodnocení výsledků:

Tato část práce je nejnáročnější (na čas i zkušenosti), a prakticky rozhoduje o kvalitě výsledků. V podstatě lze použít pro měření i horší mikroskop, pokud získané obrázky korigujete na všechny artefakty zanesené použitím daného mikroskopu a daného postupu (viz dále - “Tipy”). K analýze obrazu viz výše. Obecně se obrázky musí korigovat na hladinu šumu (intenzita fluorescence prázdného obrázku), výsledky se přepočítávají podle kalibrační křivky. Kalibraci lze provádět *in vitro* nebo *in vivo*, u některých sond jen *in vivo*. Je nutno provést kalibraci pro každý mikroskop, a pro každé nastavení filtru. Při práci na konfokálním mikroskopu bývá problém fotonásobič - zesiluje lineárně obvykle jen v určitém úseku. Buď musíte kalibrovat při nastavení citlivosti fotonásobičů, které používáte při experimentech, nebo lze zvláště “zkalibrovat” fotonásobič v celém rozsahu, a výsledné obrázky pak korigovat na nelineárnost fotonásobiče. Při dvoukanálovém snímání je poměr nastavení citlivosti fotonásobiče pro oba kanály závislý na použitých filtrech, musí však zůstat konstantní pro danou kalibraci i experimenty.

Dalsi zpracovani vysledku - statistika, vytisknuti obrazku apod. - zalezi na vasich pozadavcich. Pokud potrebujete zvlast kvalitni obrazky, napr. pro prezentaci, je nejlepsi ofotografovat obrazky primo z obrazovky. I pro bezne pouziti vsak potrebujete velmi kvalitni tiskarnu. Pri nekvalitni reprodukcii jsou obrazky “necitelne”. Pro prezentace je vhodne prevest obrazky do pseudobarev - tj. na zaklade kalibrace si vytvorit kontrastni barevnou skalu, aby rozdily pH v rozsahu ocekavanych hodnot co nejlepe vynikly.

Tipy:

K přípravě zásobních roztoků: Doporučuji zmrazit zásobní roztok rozdělený do eppendorfek na alikvoty nutné vždy k přípravě jedné dávky pracovního roztoku. Vyhněte se tím nutnosti zásobní roztok mnohokrát rozmrazovat a znovu zmrazovat. Zásobní roztok skladovat v exikatoru. K přípravě použít raději bezvodý DMSO. Přítomnost molekul vody snižuje stabilitu roztoku.

Ke koncentraci: Koncentrace sondy v DMSO je určena co nejmenší konečnou koncentrací DMSO v pracovním roztoku (DMSO je pro buňky toxické). Sondy je nejlépe objednat ve formě “special packaging”, tj. 20 balení po 50 mg (=jedna dávka pro přípravu zásobního roztoku). Je o něco dražší, ale lze pracovat daleko přesněji, a vyhněte se plýtvání sondou. Minimální koncentrace sondy v pracovním roztoku je určena dostatečnou viditelností fluorescence v buňce, maximální koncentrace je omezena zhasením fluorescence molekul sondy při jejich častém kontaktu a toxicitou pro buňku - je lépe volit poněkud nižší při déletrvajících experimentech.

K transportu do buněk: Při transportu přes membránu pomocí AM-skupin zejména u rostlinných buněk je častá komplikace s extracelulárními esterázami. Jejich vlastnosti se liší u různého materiálu. Pomoci může změna pH pracovního roztoku - lze ovšem jen v rozsahu akceptovatelném buňkou. Může být použito vakuum (nebezpečí poškození buněk), nebo krájení pletiv na menší části (esterázy často nejaktivnější v epidermis, a stačí pak obnažit další b. vrstvy). Ranová reakce je v případě šetrného krájení minimální. Potřebujeme čerstvé řezy. Nejvhodnější pro krájení je

vibratom (speciální mikrotom, určený původně k řezání mozkové tkáně), a krájet pletivo přímo v pufru. Krájet pletivo je třeba rovněž v případě, že chcete monitorovat i buňky umístěné v pletivu ve větších odstupech. Limit hloubky detekce je u různých typů konfokálních mikroskopů různý. V rámci tohoto limitu zjistíte potřebné parametry pomocí 3D-rekonstrukcí.

K pozorování pod mikroskopem: Příliš velký leakage sondy z buněk, tj. intenzita fluorescence v buňkách slábne a v pozadí se zvyšuje: pozorovat objekt přímo v pracovním roztoku (nepřenesený do čistého pufru). Obvykle se ustaví rovnováha mezi sondou v buňce a v roztoku. Nevýhoda je silnější pozadí, a nebezpečí postupného zvyšování koncentrace sondy v buňkách. Dále lze leakage omezit např. změnou koncentrace DMSO v pracovním roztoku (DMSO ovlivňuje propustnost membrán a různé objekty jsou různě citlivé na jeho působení), změnou koncentrace sondy, změnou pH, změnou typu pufru. Pokud žádný způsob nepomáhá: provést korekci na slábnutí fluorescence, tj. snímat změnu fluorescence v čase a spočítat křivku snižování intenzity fluorescence v buňce. Touto křivkou pak korigovat všechny výsledky.

Pokud se snižuje intenzita fluorescence v buňkách, ale v pozadí se nemění, jde spíše o zhašení - v tom případě je třeba volit nižší koncentraci sondy, nebo blednutí preparátu - pak je třeba snížit intenzitu excitačního světla.

Nerovnoměrně osvětlené obrázky (často světelný gradient nebo rozdílné osvětlení středu a okrajů zejména při použití klasického fluorescenčního mikroskopu a snímání obrázků přes kameru, ale může se objevit i u méně kvalitních konfokálních mikroskopů): nutno sejmout "slepý" obrázek, a tím pak všechny získané obrázky korigovat.

Pro tlustší objekty je lépe používat objektivy s delší pracovní vzdáleností ("long distance" objektivy) a podložní sklička s komůrkou. Objekty při pozorování překrýt krycím skličkem, omezíte tím vysychání roztoku a pohyblivost objektu. Pokud povrch objektu není rovný, lze sejmout sérii obrázků a složit maximální hodnoty intenzit těchto obrázků - získáte tím zaostřený obrázek po celé ploše objektu.

K vyhodnocování obrázků: Obrázky nesmí být příliš slabé, musí se dostatečně odlišovat od pozadí, a nesmí být přesvětlené. Zpravidla je k dispozici na konfokálním mikroskopu i na obrazové analýze 255 stupňů šedi, a tuto škálu má obrázek optimálně využít. Kontroluje se na histogramu. V optimálním případě nemá křivka rozložení intenzity fluorescence začínat už na nule (je pak nebezpečí ztráty bodů pod hranici detekovatelnosti), lépe je spektrum posunout o několik jednotek. Toho lze docílit u klasických mikroskopu zesílením intenzity excitačního světla, u konfokálních mikroskopu lze přímo nastavit. Před dalším zpracováním pak každý obrázek posuneme na nulu. Stejně tak má končit níž, než u 255 - u přesvětlených bodů už nelze rozlišit rozdíly intenzity. Jinak má křivka optimálně vyplňovat celé spektrum. Je výhodné, liší-li se obrázky z obou kanálů v umístění maxim (tj., je-li obrázek z jednoho kanálu vždy trochu slabší než ze druhého). Dá se pak po jejich vzájemném vydělení přesněji určit výsledné pH.

Alternativní metody

Jediná alternativní metoda jsou mikroelektrody. Vždy přitom buňku poraníte (při srovnání relativní velikosti buňky a špičky vaší elektrody, nemůžete očekávat od buňky žádné nadšení). Ranová reakce je v tomto případě lokální - právě v místě, kde je vaše elektroda. Kromě toho nemůžete měřit distribuci, tj. váš výsledek je závislý na tom, kam právě mikroelektrodu umístíte. Prave vnitřní distribuce daného iontu může být pro daný stav klíčová. Nelze také měřit v celém pletivu, ani v malých buňkách.

Pro měření vápníku se slibně rozvíjí metoda užívající genetickou transformaci materiálu a detekci pomocí fluorescenčního proteinu aquaporinu.

Literatura:

Albrechtová J.T.P., Slavík J., Wagner E.: Confocal pH-topography in the shoot apex of *Chenopodium rubrum* in relation to photoperiodic flower induction. *Endocyt. Cell Res.* 12: 83-94, 1997.

Haugland R.P. (ed.): Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes, Leiden, 1996.

Metódy izolácie eukaryotických fotobiontov z lišajníkov

Bačkor, M.^{1,2}, Hudák J.¹, Bačkorová, M.¹

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, SK- 842 15 Bratislava, Slovak republic

e-mail: Backor@fns.uniba.sk

²Department of Experimental Botany and Genetics, Faculty of Natural Sciences, Šafárik University, Mánesova 28, SK- 041 67 Košice, Slovak republic

e-mail: Mbackor@kosice.upjs.sk

Predložená práca sumarizuje viaceré protokoly, ktoré boli použité pri izolácii fotobiontov z lišajníkov (symbiotických eukaryotických rias), pri štúdiu ich fyziológie a biochémie, mimo interakcií s mykobiontom (hubová zložka lišajníka). Keďže pri všetkých protokoloch sa dodržiava viac-menej rovnaký sled logicky jednoznačných krokov, autori tohto príspevku ich spojili do jednej “metódy” s alternáciami čiastkových krokov, podľa možností jednotlivých pracovísk. Izolačná metóda je nenáročná na materiálne vybavenie.

Výber materiálu a jeho príprava

Na izoláciu fotobiontov z lišajníkov nepotrebujeme často ani čerstvo nazbieraný materiál. Pri izolácii fotobiontov *Trebouxia* sp. (symbiont väčšiny Európskych druhov lišajníkov) sa použili viac ako jeden rok staré herbárové položky lišajníkov *Cetraria islandica* a *Cladonia mitis* (Bačkor, nepublikované údaje).

Pri vizuálnom pozorovaní odstránime všetky nečistoty zachytené na povrchu stielky (odumreté zbytky organizmov, pôdu, iné druhy lišajníkov ...) jemným štetcom, alebo preparačnou ihlou. Veľa mikroorganizmov a spór húb môžeme odstrániť energickým premytím destilovanou vodou, alebo tečúcou vodou. Pri izolácii je tiež výhodné nastrihať stielku lišajníka (v prípade tzv. makrolišajníkov) na menšie kusy. Yamamoto a kol. (1993) na izoláciu použili približne 1 cm² stielky lišajníkov s lupeňovitou morfológiou stielky, resp. 1 cm stielky odobratej s koncovej časti lišajníkov s kríčkovitou morfológiou stielky. Ascaso (1980) použil približne 2 g vlhkej stielky.

Homogenizácia

Pripravená stielka lišajníka sa musí (okrem tzv. “thallus fragment method”, kde sa malé fragmenty navlhčenej stielky priamo prenesú na minerálne agarové médium) mechanicky rozrušiť. Jedna z možností je homogenizácia stielky v trecej miske, so sterilným morským pieskom (napr. Yamamoto a kol., 1993). Ascaso (1980) stielku následne homogenizoval niekoľkými ťahmi v Elvehjem-Potterovom homogenizátore. Prikláňame sa k tejto alternatíve homogenizácie, pretože je mimoriadne jednoduchá, pričom veľmi ľahko dosiahneme sterilitu prostredia (pri práci v očkovačom boxe) a tak významne znížime kontamináciu cudzorodými mikroorganizmami. Vo všetkých nasledujúcich krokoch pracujeme v sterilnom prostredí!

Pri použití tzv. “micropipette method” (Ahmadjian, 1967; Ahmadjian, 1993) sa kúsky odobratej vrstvy fotobiontov zo stielky lišajníka jemne rozťlačia medzi mikroskopickými sklíčkami. Pri tejto metóde sa zo zelenej suspenzie dajú izolovať jednotlivé bunky fotobiontov mikropipetou.

Čistenie homogenátov a selekcia fotobiontov

Homogenát obsahuje zmes rôznych buniek (bunky fotobiontu ako aj hýfy mykobiontu). V prípade použitia Elvehjem-Potterovho homogenizátora odporúčame hrubý homogenát filtrovať

cez niekoľko vrstiev naskladanej sterilnej gázy. Následná selekcia fotobiontov závisí od úvahy experimentátora.

a) Yamamotova metóda

Táto metóda (Yamamoto, 1993) využíva filtráciu homogenátu cez filter, s veľkosťou pórov 500 nm a následne cez druhý filter, s veľkosťou pórov 150 nm. Zvyšok, na druhom filtri, sa 3 krát premýva sterilnou vodou. Po následnej selekcii (kontrola mikroskopicky) sa riasy preniesú do kvapalného, resp. ešte lepšie na pevné, agarové minerálne médium.

b) Mikropipetová metóda

Pomocou mikropipety (ideálna veľkosť otvoru je 50-75 μm) sa bunky prenášajú cez sterilné kvapky na podložnom mikroskopickom sklíčku dovedy, pokiaľ nezískame zriedenú suspenziu jednotlivých buniek fotobiontov, ktoré prenášame na agarové médium. Táto metóda je náročná na manuálnu zručnosť. Detaily uvádza Ahmadjian (1967; 1993).

c) Centrifugačné metódy

Z centrifugačných metód sa najčastejšie využívajú techniky diferenciačnej centrifugácie a gradientovej centrifugácie. Pre väčšinu fotobiontov sa využívajú empiricky získané poznatky. Napr. malé fotobionty, tak ako *Coccomyxa* sp. sa centrifugujú pri nízkych otáčkach (menej než 500 rpm), ale veľa buniek zostáva v supernatante. Pri izolácii rias *Trebouxia* sp. sa testovali viaceré kombinácie. Nižšie otáčky (okolo 100 x g) sa využívajú na odstránenie veľkých fragmentov stielky, vyššie zase na zber neporušených buniek z bunkových fragmentov pletiva. Často sa centrifugácia kombinuje s filtráciou cez rôzne filtre s definovanou veľkosťou pórov.

Gradientová centrifugácia je osvedčená metóda na izoláciu buniek fotobiontov. Ascaso (1980) po následnej homogenizácii stielky lišajníkov bunky resuspendoval v 0,25 M sacharóze (2 ml) a opatrne ich navrstvil na roztok CsCl₂ (densita 1,550 g.cm⁻³, ml). Po 10 min. centrifugácie pri 4 500 rpm (g nie je udané) zbieral bunky fotobiontov v interfáze. Rovnako úspešne sa dá použiť aj roztok KI, hoci pri dlhšej aplikácii môže byť škodlivý.

Množstvo inokula sa vo väčšine prác neudáva. Pri mikropipetovej metóde sa do jednej banky umiestňuje asi 15 buniek. Pri použití centrifugačných techník odporúčame výtazok fotobiontov postupne riediť v pomeroch 1: 10 a automatickou pipetou preniesť niekoľko ml na pevné agarové médium. Infikované banky vyradíme obzvlášť v prvých dňoch kultivácie. Niektoré fotobionty (napr. *Trebouxia*) rastú veľmi pomaly a možno ich vizuálne pozorovať po 4 až 6 týždňoch po úspešnej inokulácii. Pri izolácii fotobiontov sa vyžaduje zvládnutie základov rutinných mikrobiologických techník. Podmienky kultivácie (teplota, svetlo, zloženie a pH používaných médií) z priestorových dôvodov neuvádzame, ale možno ich nájsť vo viacerých prácach (Ahmadjian, 1967; Ahmadjian a Hale, 1973; Ahmadjian, 1993).

Literatúra:

Ahmadjian, V. 1967: A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6: 127-160.

Ahmadjian, V. 1993: The lichen symbiosis. John Wiley & Sons, inc.

Ahmadjian, V., Hale, M. E. 1973: The lichens. Academia Press, New York.

Ascaso, C. 1980: A rapid method for the quantitative isolation of green algae from lichens. *Ann. Bot.* 45: 483.

Yamamoto, Y., Miura, Y., Higuchi, M., Kinoshita, Y., Yoshimura, I. 1993: Using lichen tissue cultures in modern biology. *Bryologist* 96: 384-393.

Metody cytochemie *in situ*

Beneš, K.

Biologická fakulta Jihočeské university, Branišovská 31, Č.Budějovice,
tel: 038/777 55 04, fax: 038/459 85

V tomto referátě bych rád splnil dva záměry. 1. Nejprve bych chtěl charakterizovat cytochemické metody vcelku a pak 2. bych chtěl podrobněji pojednat o jednom jejich typu - průkazu enzymů na řezech pomocí barevných reakcí.

Pokud jde o první téma, máme zde na mysli sledování lokalizace látek, metabolických dějů a odpovídajících regulačních systémů na úrovni buněčné, ale i subcelulární a supracelulární. Jistě je si třeba uvědomit, na jaké úrovni hierarchie biologických systémů pracujeme. Za podstatnější však zde považuji jiný aspekt - lokalizaci.

Mějme nějaký objekt, v němž 99% objemu příp. masy představují buňky typu A a 1% buňky typu B. Budeme sledovat aktivitu nějakého enzymu, např. v závislosti na čase. Víme, že sledovaný enzym je pouze v buňkách typu B. Třebaže v těchto buňkách dochází k dramatickým změnám v aktivitě, půjde jen o malé rozdíly, uvažujeme-li náš objekt jako celek.

Druhý příklad bude analogický. Budeme sledovat aktivitu nějakého enzymu přítomného např. v mitochondriích. Máme-li k dispozici údaje, získané studiem suspenze vyzolovaných mitochondrií, nic to nevypovídá o tom, zda jsou v buňkách daného objektu všechny mitochondrie stejné, anebo zda se v sledované aktivitě liší. Může jít přitom i o rozdílnost populací mitochondrií v jednotlivých buňkách.

V prvním i druhém případě se jedná o to, do jaké míry a jakým způsobem můžeme lokalizovat, t.j. nakolik se v našich závěrech uplatní princip zobrazení. To je kritérium, jímž rozlišíme metody *in situ* a *extra situ* (= *in vitro*). V obou případech jde o lokalizaci. Buď můžeme pracovat s řezy a strukturní hledisko aplikovat přímo, anebo musíme daný materiál nějak frakcionovat, t.j. rozlišit a izolovat jeho strukturní komponenty a ty pak analyzovat. Zde je pak strukturní hledisko - zobrazení - respektováno pouze nepřímou a opírá se o příslušné morfologické studie. Přehled o situaci v této oblasti podávají obr. 1, 2 a 3.

Tématem, kterého jsme se zde dotkli, se zabýval Beneš 1968 a nověji pak Beneš a Pilný in Prosser et al. 1989, kde lze nalézt i charakteristiky jednotlivých *in situ* metod a další literaturu. Rovněž Vitha et al. v manuálu Gartland a Davey 1995 probírají tuto problematiku.

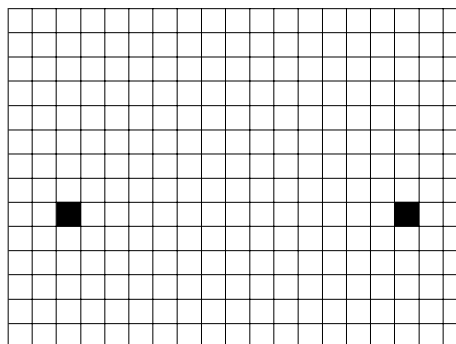
Druhým naším záměrem bylo popsat postup průkazu enzymů na řezech jako ukázkou barevné reakce *in situ*. Celý proces lze rozdělit na tři fáze:

1. fáze předinkubační, 2. vlastní inkubace a 3. postinkubační fáze.

Předinkubační fáze zahrnuje zpracování materiálu (patří sem tedy otázka fixovat:nefixovat, řezání materiálu atd.). Postinkubační fázi bývá obvykle věnována malá pozornost, i zde však jde o závažné otázky, jako je rozpustnost a krystalizace výsledného reakčního produktu. Protože předinkubační a postinkubační fázi se zde zabývat nebudeme, je třeba zdůraznit, že na výsledku se podílejí všechny tři fáze. Sebelepší inkubace nestačí, když je objekt před a po ní nevhodně zpracován.

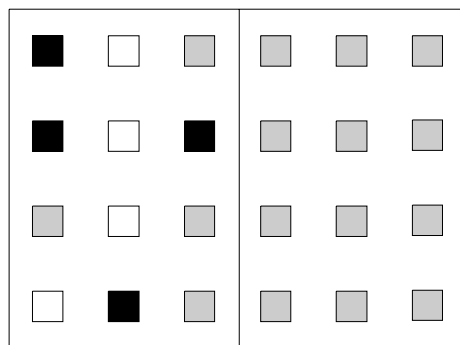
Uvedeme zde postup při lokalizaci karboxylové esterázy (KE) v kořenové špičce.

Princip. Lokalizace KE je zde prováděna na základě její katalytické aktivity azokopulační technikou. Jako substrát je použit ester kyseliny octové a naftolu, resp. jeho derivátu - a - naftylacetát



Obr.1. Organ sestávající ze dvou typů buněk. Buňky minoritního zastoupení jeví pozitivní reakci.

a naftol AS acetát. Inkubační fáze, kterou zde sledujeme, má dvě etapy: 1. štěpení substrátu aktivitou KE; rozštěpením esterové vazby dojde k uvolnění naftolu, 2. vizualizační reakce; azokopulací uvolněného naftolu s diazoniovou solí vzniká nerozpustná barevná látka. Tento výsledný produkt je lokalizován v místech (buňkách), kde je aktivní KE. V našem případě probíhají obě etapy v témže inkubačním mediu, neboť to obsahuje jak substrát, tak diazoniovou sůl. Jde tedy o tzv. simultánní azokopulaci. Diazoniová sůl reaguje nejenom s naftolem, uvolněným aktivitou KE, ale také s fenolickými látkami v buňkách a v pletivu. Tato nespecifická reakce může vést k falešně pozitivním nálezům. Proto výsledky porovnááme s řezy, které byly inkubovány v kontrolním mediu bez substrátu (diazoniová sůl samotná)



Obr.2. Srovnání dvou buněk, z nichž jedna má heterogenní a druhá homogenní populaci sledovaných organel.

Bezpečnostní opatření. Substráty jsou deriváty aromatických uhlovodíků, je podezření na karcinogenní účinky. Vyvarovat se kontaktu s kůží. Diazoniová sůl má podobné a navíc dráždivé účinky. V práškovém stavu je trřaskavá.

Rostlinný materiál. Kořenové špičky bobu *Vicia Paba L.* byly fixovány 1 hodinu v ledové lázni v Bakerově fixáži (1 g CaCl₂, 90 ml H₂O, 10 ml formalínu neutralizovaného pomocí CaCO₃), pak vypírány ve vyměňovaném 5% ethanolu opět v ledové lázni a uloženy v 5% ethanolu v lednici při +4°C.

Chemikálie a roztoky. Pufr fosfátový, pH 6.0 (připraven smísením 1,1 M NaH₂PO₄ a 0,1M NaHPO₄).

Substráty: a - naftyl acetát, nebo naftol AS acetát. Zásobní roztok je připraven rozpuštěním 25 mg substrátu v 5 ml ethanolu. Vydrží několik dní.

Diazoniová sůl buď Fast Blue BB salt nebo Fast Blue RR salt. Připravit vždy čerstvý roztok.

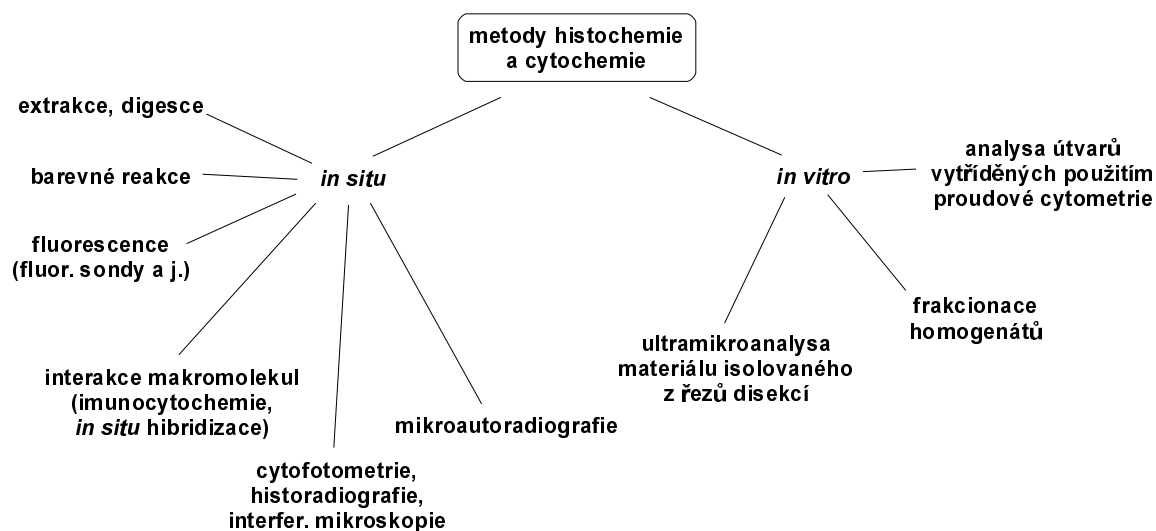
Inkubační medium: Ke 4 mg diazoniové soli přidat 3,8 ml pufru, po rozpuštění přidat 0,2 ml zásobního roztoku substrátu. (Pokud dojde k prudké barevné změně, znamená to, že substrát je částečně rozložen - v tom případě nutno inkubační medium přefiltrovat).

Kontrolní medium (bez substrátu): Ke 4 mg diazoniové soli přidat 3,8 ml pufru, po rozpuštění přidat 0,2 ml ethanolu.

- Postup.**
1. Na zmrazovacím mikrotomu zhotovit příčné řezy kořenovou špičkou. Lze použít i ručních řezů z nefixovaných objektů. Ruční řezy pak fixovat a vyprat jak uvedeno. Řezy přenášet do epruvet opatřených na jednom konci gázou, které jsou umístěny ve vychlazeném 5% ethanolu.
 2. Některé epruvety s řezy inkubovat v plném inkubačním mediu, jiné (z téhož objektu) v inkubačním mediu bez substrátu. Obě media se připravují čerstvá. Po několika minutách se na řezech v plném mediu začnou projevovat barevné změny. Nechat reakci probíhat tak dlouho, až je zbarvení řezů dostatečně intenzivní.
 3. Vypírat ve vodě asi 5 minut.
 4. Řezy montovat do vody, mikroskopovat. Srovnat řezy inkubované v plném mediu a v mediu bez substrátu.

Vyhodnocení. V případě použití a- naftylacetátu je výsledné zbarvení černé a je pozitivní celý řez. U naftol AS acetátu je výsledný produkt modrý, je pozitivní periferie řezu, t.j. čepička (pokud je ještě řezem zasažena) a zejména pak střední válec, hlavně jeho lýkové póly.

K průkazu daného enzymu, v našem případě KE, lze použít rovněž metody jiných typů. Takovéto - různé - metody lze pak použít k lokalizaci řady dalších hydroláz. Samozřejmě lze na řezech



Obr.3. Tabelární přehled cytochemických metod *in situ* a *in vitro*

lokalizovat i enzymy jiných tříd. Zde se pak ovšem používá příslušných jiných technik. Protože enzymy jsou proteiny, lze je také lokalizovat imunocytochemicky. Jsou k dispozici metody pro průkaz enzymů na úrovni elektronmikroskopické.

Pro naše účely bohatě postačí přehled metod k průkazu hydroláz Beneš 1972, kde je citována další literatura, dostupná dnes většinou v nových vydáních.

Literatura:

Beneš, K.: Biol.listy 33: 324, 1968

Beneš, K.: Biol. listy 37: 113, 1972

Gartland, K.M.A., Davey, M.R. eds.: Agrobacterium protokols, Humana Press, Totowa N.J., 1995

Prosser, V. et al.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha, 1989

Histochemical localization of aluminium and cell wall substances in maize roots

Budíková, S.

Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, SK
fax: (0421) 07/37 19 48, e-mail: botubud@savba.savba.sk

Solutions:

- * morin (2',3',4',5,7-pentahydroxyflavonone), Sigma: 0.0015 g dissolved in a little amount of DMSO and final volume made up to 50 ml with distilled water; should be stored in the darkness at the room temperature
- * 0.05% aqueous solution of aniline blue, Sanitas Bratislava
- * hematoxylin stain: 200 mg hematoxylin + 20 mg sodium iodate NaIO₃ dissolved in 100 ml of deionized water
- * 100 mM DDG (2-deoxy-D-glucose), Sigma
- * 0.1 M DMSO (dimethyl sulfoxide)

Devices:

- * fluorescence microscope with UV filter combination for callose (excitation 398 nm, emission 495 nm) and aluminium (excitation 440 nm, emission 515 nm) detection
- * light microscope for Al dye hematoxylin

Methods:

Seeds of maize *Zea mays* L., cv. TO 360 were germinated for 72 h in darkness at 25 °C. Seedlings with mean root length 4.5 cm were grown in 0.1 mM CaCl₂ (control solution), 50 mM AlCl₃, 100 mM DDG or 50 mM AlCl₃ + 100 mM DDG in control solution (pH 4.5) for 24 h.

For callose detection free-hand sections of fresh roots were stained in aniline blue and immediately observed.

Various methods from Al indicators - hematoxylin (Polle et al. 1978, Rincón and Gonzales 1992, de Andrade et al. 1997, Moon et al. 1997), morin (Tice et al. 1992, Larsen et al. 1996, Vitorello and Haug 1996) and aluminon (Haridasan et al. 1986) - to more sophisticated techniques including EDX-analysis (Marienfeld et al. 1995), atomic absorption spectrophotometry (Rincón and Gonzales 1992) and pyrocatechol violet colorimetry (Ishikawa et al. 1996) have been used for Al detection in plant material. The fluorescence staining for Al was performed according to modified technique of Vitorello and Haug (1996). Intact roots were stained in 100 mM morin, rinsed in 0.1 M DMSO and cut with a razor blade. Aluminium localization with hematoxylin which serves as a mordant for Al³⁺ ions was performed as previously described by Polle et al. (1978). Roots incubated with hematoxylin for 40 minutes were rinsed in distilled water for 10 minutes and sectioned for light microscopic examinations. The method is based on the colorimetric property of hematoxylin to give a blue-purple stain when complexed with Al³⁺ and has been commonly used to screen Al-tolerant cultivars of wheat.

Results:

Treatment with 50 mM Al³⁺ for 24 h induced occurrence of cracks in peripheral root cell layers within the distances of 2 to 15 mm behind the root tip and swelling of proximal 5 mm to this region.

The primary maize root that was not exposed to Al but stained with hematoxylin showed a lack of staining in all tissues along the whole axis. The hematoxylin staining result of Al-treated roots revealed Al³⁺ accumulation in the 1/ apical region including outer cap cells and rhizodermis

of meristem, 2/ cracked region (all peripheral tissues up to the fifth cortical layer) and 3/ rhizodermis of the transition zone between the cracked and swollen regions. The negative results were obtained in more proximal root parts.

Hand sections from control roots stained in morin solution revealed only weak blue autofluorescence. In Al-treated roots the intensive green fluorescence confirming the positive Al localization was observed in outer root cap cells and rhizodermal cells of meristem and in epidermis, hypodermis and outer cortical cells of the cracked region. The rhizodermis of the transition zone fluoresced also intensively green. More basal root parts including the swollen region showed no positive staining for Al. It can be concluded that the staining pattern of both dyes is very similar. When free hand sections were stained for Al detection, many artifacts, such as intensive fluorescence of central cylinder, were observed.

In control roots, fluorescent callose deposits were present in cell walls of sieve elements. After 24 h of Al-treatment callose could be found also in rhizodermal cell walls and all cortical layers including endodermis in apical 2 cm. Recently, the callose deposits were observed after staining with Sirofluor in root cap, rhizodermis and outer cortical walls of soybean (Wissemeier et al. 1987) and a sensitive wheat line (Schreiner et al. 1994), the regions which are considered to have a close association with stress perception. Using DDG (callose synthase inhibitor) fewer deposits of callose and almost no deposits with callose degradating enzyme were detected (Schreiner et al. 1994). In our work, the DDG treatment alone caused the diminished callose fluorescence in sieve elements. The pattern of staining for callose was similar also for roots treated with both DDG and Al.

Acknowledgement:

This work was supported with grant N. 1180, Grant Agency Vega, Slovak Republic.

References:

- de Andrade, L.R.M. , Ikeda, M., Ishizuka, J., 1997. - *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 41: 151 - 156.
Haridasan, M., Paviani, T.I., Schiavini, I., 1986. - *Plant and Soil* 94: 435 - 437.
Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Ikarashi, T., 1996. - *Soil Sci. Plant Nutr.* 42: 613 - 625.
Larsen, P.B., Tai, C.Y., Kochian, L.V., Howell, S.H., 1996. - *Plant. Physiol.* 110: 743 - 751.
Marienfeld, S., Lehmann, H., Stelzer, R., 1995. - *Plant and Soil* 171: 167 - 173.
Moon, D.H., Ottoboni, L.M.M., Souza, A.P., Sibov, S.T., Gaspar, M., Arruda, P., 1997 - *Plant Cell Reports* 16: 686 - 691.
Polle, E., Konzak, C.F., Kittrick, J.A., 1978. - *Crop Sci.* 18: 823 - 827.
Rincón, M., Gonzales, R.A., 1992. - *Plant Physiol.* 99, 1021 - 1028.
Schreiner, K.A., Hoddinott, J., Taylor, G.J., 1994. - *Plant and Soil* 162: 273 - 280.
Tice, K.R., Parker, D.R., DeMason, D.A., 1992. - *Plant Physiol.* 100: 309 - 318.
Vitorello, V.A., Haug, A., 1996. - *Phys. Plant.* 97: 536 - 544.
Wissemeier, A.H., Klotz, F., Horst, W.J., 1987. - *J. Plant Physiol.* 129: 487 - 492.

Sample preparation for microsporogenesis observation in *Karwinskia parvifolia* (Rhamnaceae), plant with a high content of secondary metabolites, in TEM

Hanáčková, Z.

Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, SK
fax: (421) 07/37 19 48, e-mail: botuhan@savba.savba.sk

Solutions:

fixation

- 1: 2.8% glutaraldehyde (v/v) in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.2) and 0.02% (v/v) Triton X-100
- 2: 2% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde, 0.2% tannic acid, 0.5mg/ml saponin in 10 mM PIPES/ 3 mM EGTA buffer, pH 7.4
- 3: 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 0.2% tannic acid (w/v) and 0.05% Triton X-100 (v/v) in 10 mM Hepes/ 3 mM EGTA buffer, pH 7.4.

post-fixation

- 1: 1% aqueous OsO₄
- 2: 2% aqueous OsO₄
- 3: 1.5% aqueous OsO₄

dehydration

1. acetone series (10% increments)
2. graded ethanol series (10% increments)

- propylene oxide (PO)
- Spurr's embedding medium
- 2% collodion in amyl acetate

staining:

1. 0.5% aqueous uranyl acetate and lead citrate
2. saturated solution of uranyl acetate in 50% ethanol and 2% aqueous lead citrate
3. 2% uranyl acetate in 50% ethanol and 2% aqueous lead citrate

Devices:

rotator, ultramicrotome, vacuum pump, thermostat, TEM

Methods:

1. Method according to Owen, Makaroff (1995)

Whole buds of *Arabidopsis thaliana* were fixed overnight in fixative solution 1. Buds were rinsed twice in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.2) for 15 min each wash and post-fixed in solution 2 overnight. Tissue was dehydrated in a graded acetone series and embedded in Spurr's resin (Spurr 1969). Ultrathin sections were stained with 0.5% aqueous uranyl acetate and lead citrate.

2. Method according to Pérez-Muñoz et al. (1993)

Anthers of *Vigna vexillata* were fixed overnight at room temperature in buffered aldehydes (fixative solution 2), postfixed for up to 12 hr in post-fixative solution 2, dehydrated through an

acetone series, infiltrated for about 1 week in Spurr's resin and embedded. Silver sections were stained with staining solution 2.

3. Modified method

Whole buds of *Karwinskia parvifolia* were fixed 18 hours at the room temperature in fixative solution 3. Buds were rinsed several times in buffer and postfixed for 24 hr in post-fixative 3. Tissue was dehydrated (2 days) in a graded ethanol series, infiltrated in ethanol/ propylene oxide mixture (3:1, 1:1, 1:3 and pure PO, 45 min. each) and then for 10 days in Spurr's resin (PO: resin 7:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, pure resin, 24 hr each), embedded and polymerized 8 hr at 69-70°C. For transmission electron microscopy, silver to gold sections (LKB Nova ultramicrotome) were mounted on collodion-coated copper grids, stained with solution 3, and observed with Zeiss transmission electron microscope operating at 60 kV mode.

Results:

1. Many artifacts occurred in our specimens elaborated according to Owen and Makaroff (1995) because of poor infiltration of both fixatives and Spurr's resin. Although the cell walls were sufficiently preserved, the cytoplasm was degenerated. Since many artifacts were observed in tapetal and other cells, the mature pollen stage was satisfactorily preserved, the problem resulted likely from the high content of secondary metabolites which was confirmed by chemical analysis of specimens (Hanáčková, Waksman, unpublished results).

2. Fixation was effective but the specimens were not sufficiently infiltrated by embedding medium resembling the results obtained by method 1. Problems with accessibility of chemicals and financial demands occurred too.

3. From experiences with the specimen elaboration of vegetative organ of *Karwinskia parvifolia* we found out that the ethanol dehydration should be used to wash off at least a part of secondary metabolites (dissolvable in ethanol) which restrained the specimen preparation. Propylene oxide is a useful intermediate stage for the medium-infiltration. We combined this knowledge with method 2 which is advantageous for microsporogenesis of other species and prolonged the time of fixation, dehydration and infiltration. The specimens were increasingly rotated. In spite of saponin which was not accessible in our laboratory other detergent, Triton X-100, was added to improve fixative penetration. Tannic acid was used to increase the contrast. Similarly, uranyl acetate in ethanol was applied for ultrathin section staining because aqueous solution did not stain sufficiently in the case of microsporogenesis in *K. parvifolia*. Measurement of pH is important for EGTA solubility. It would be suitable not to fix whole buds but extracted anthers only. In our case it is less the technical than methodological problem because the bud size of *K. parvifolia* before anthesis is 2 mm.

References:

- Owen, H.A., Makaroff, C.A., 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185: 7-21
- Pérez-Muñoz, C.A., Jernstedt, J.A., Webster, B.D., 1993. Pollen wall development in *Vigna vexillata*. I. Characterization of wall layers. *Am. J. Bot.* 80(10): 1183-1192
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31-42

Studium průduchového aparátu listů analýzou obrazu

Hanáčková, B., Snopek, J., Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2

tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: barbora@prfdec.natur.cuni.cz

1. Počítačová analýza obrazu je moderní metoda pro měření a hodnocení makroskopických a mikroskopických objektů. Našla široké uplatnění např. v lékařství, kriminalistice, potravinářství, materiálové analýze, ale i v rostlinné anatomii a fyziologii (Frey et al. 1996, Opatrná 1997, Tichá *et al.* 1997). Podstata metody spočívá v nahrávání obrazů pomocí televizní kamery a dalšího nezbytného HW vybavení do počítače. Obrazy se zpracovávají speciálním SW. Touto metodou lze měřit parametry objektů nebo polí.
2. Pro studium průduchového aparátu listů používáme mikroskop OLYMPUS BX 40 a systém pro analýzu obrazu LUCIA G (verze 3.51), který se skládá z TV kamery COHU, obrazového procesoru COMET RGB, řídicího počítače PENTIUM 100 (32 MB RAM) a programu LUCIA. Prvním krokem je příprava otiskových preparátů listového povrchu. Na střed čepele (mimo střední žilku) se nanese tenká vrstva bezbarvého laku, která se po zaschnutí stáhne za pomoci proužku průhledné lepící pásky. Preparát lze pozorovat téměř okamžitě. Místa vybraná v zorném poli mikroskopu se nasnímají a načtou do paměti počítače. Je třeba mít dostatečnou kapacitu paměti i HDD (na jeden barevný obraz asi 850 kB). Z barevného obrazu se vytvoří obraz binární, který se dále upravuje funkcemi matematické morfologie. Z upraveného binárního obrazu se pomocí programu LUCIA získají požadované parametry průduchů: např. délka, šířka, plocha, obvod, počet na jednotku plochy. Program LUCIA počítá i základní statistické údaje.
3. Časová náročnost metody je relativně veliká, i když ve srovnání s proměřováním průduchů mikroskopem má značné přednosti. Z finančního hlediska je systém LUCIA nákladná investice.
4. Problémem při měření průduchů analýzou obrazu je skutečnost, že systém označuje objekty podle zvolené typické barvy, která je u epidermálních a průduchových buněk na otiskových preparátech stejná, tzn. označí se nejen průduchy, ale i epidermální buňky. Ty však lze z měření vyloučit vhodně zvoleným omezením, tj. pro měřený parametr stanovíme rozmezí, ve kterém se objekt musí nacházet, jinak není do měření zařazen. Vyloučení epidermálních buněk lze dosáhnout díky jejich značné tvarové odlišnosti od buněk průduchů.
5. Při označování typické barvy objektů je vhodnější označit si buněčné stěny než vlastní buňky. Binární obraz buněk pak lze získat inverzí obrazu buněčných stěn. Je to vhodnější z důvodu dalších úprav binárního obrazu funkcemi matematické morfologie, neboť pouhým označením nelze získat vhodný obraz k měření.
6. Průduchové charakteristiky lze stanovovat také mikroskopem. Je to však mnohem pracnější, méně přesné a objem získaných dat je menší.

Literatura:

- Frey, B., Scheidegger, C., Günthardt-Goerg, M. S., Matyssek, R.:** The effect of ozone and nutrient supply on stomatal response in birch (*Betula pendula*) leaves as determined by digital image-analysis and X-ray microanalysis. *New Phytol.* 132: 135-143, 1996.
- LUCIA verze 3.-** Uživatelská příručka. Laboratory Imaging.
- Opatrná, J.:** Analýza obrazu v rostlinné fyziologii. In: *Methods in Plant Sciences*: in press. Vranovská Ves u Znojma 1997.
- Tichá, I., Obermajer, P., Snopek, J.:** Stomata density and sizes in vitro grown tobacco plantlets. *Acta Fac. Rer. Nat. Univ. Comen. - Physiol. Plant.* : in press, 1997.
- Shotton, D. (ed.):** *Electronic Light Microscopy: Techniques in Modern Biomedical Microscopy.* Wiley-Liss, New York 1993.

Studium fotosyntézy kyslíkovou elektrodou a PAM fluorometrem

Kadleček, P., Kubelková, M., Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2,

tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: iticha@prfdec.natur.cuni.cz

Po dopadu záření na list se část záření odrazí, část listem projde a část se absorbuje. Energie záření absorbovaného fotosyntetickými strukturami se může využívat ve fotosyntetických procesech nebo vydávat ve formě fluorescence či tepla. Pro studium energetických přeměn absorbovaného záření v intaktních tylakoidních membránách chloroplastů se v dnešní době často používá aparatura, kterou lze současně měřit fotosyntézu jako výdej kyslíku a fluorescenci chlorofylu *a* ve fotosystému II (PS II) využitím tzv. metody saturačních pulzů. Princip metody spočívá v tom, že se na list aplikují velmi silné světelné pulzy, kterými se nasatí fotochemická konverze energie v PS II. Tím se přechodně kvantový výtěžek PS II potlačí na nulovou hodnotu a kvantové výtěžky fluorescence a nezářivé disipace energie vzrostou na maximální hodnoty. Tento přístup umožňuje získat údaje o fotosyntetické účinnosti a fotosyntetické kapacitě, o kvantovém výtěžku PS II a kvantovém výtěžku fluorescence, o rychlosti transportu elektronů, o stupni fotoinhibice apod. (např. WALKER 1990, KRAUSE a WEIS 1991, SCHREIBER et al. 1995).

Pro měření produkce kyslíku během fotosyntézy a spotřeby kyslíku během temnotního dýchání používáme na PŘF UK kyslíkovou elektrodu Clarkova typu (LD2/2, Hansatech, Kings Lynn, UK). Tato elektroda je tvořena platinovou katodou a stříbrnou anodou, které jsou zasazeny do disku z epoxidové pryskyřice. Jako elektrolyt se používá nasycený roztok KCl. Po připojení ke zdroji napětí se elektroda polarizuje. Jestliže elektrický potenciál na katodě dosáhne 600-700 mV, začne se na jejím povrchu redukovat kyslík. Na anodě současně probíhá oxidace stříbra a vznikající chlorid stříbrný se zde usazuje. Proud, který v tomto okamžiku prochází obvodem, je stechiometricky přímo úměrný množství kyslíku spotřebovaného na katodě. Tento proud se převádí na výstupní signál a zaznamenává připojeným zapisovačem (WALKER 1990).

Elektroda Clarkova typu tvoří střední část měřicí komory temperované vodou na 25 °C. Nad elektrodu se vkládá listový terčík o maximální ploše 10 cm² a vložka ze savého materiálu napuštěná 200 ml 2M roztoku KHCO₃ a 20 ml roztoku enzymu karboanhydrázy. Tento enzym zajišťuje saturační koncentraci oxidu uhličitého pro fotosyntézu v měřicí komoře rozkladem KHCO₃. Nad měřicí komoru se upevňuje Björkmanova halogenová lampa (LS2H, Hansatech, Kings Lynn, UK) jako zdroj aktinického záření pro fotosyntézu, jehož intenzita se reguluje neutrálními šedými filtry.

K měření fluorescence používáme PAM fluorometr (Walz, Effeltrich, SRN). V naší aparatuře je tvořena dvěma jednotkami, PAM 101 a PAM 103, a světlovodnými vlákny. Jednotka PAM 101 obsahuje emitor a detektor záření, jednotka PAM 103 řídí spuštění a dobu trvání saturačního pulzu světelného záření (zdroj KL 1500, Schott, SRN).

Princip PAM fluorometru je možné vysvětlit následujícím způsobem (SCHREIBER et al. 1986): Fluorescence v listovém terčíku se budí pulzy světelného záření o délce jedné mikrosekundy, které jsou emitovány LED diodami ("light emitting diode") s frekvencí 1,6 nebo 100 kHz. Tyto pulzy světelného záření s maximem ve vlnové délce 650 nm procházejí cestou k povrchu listu přes optický filtr, který nepropouští záření delších vlnových délek než 680 nm. Fluorescenční signál emitovaný listem jako odpověď na každý budící pulz se monitoruje fotodiodovým detektorem. Cestou k tomuto detektoru však ještě prochází přes ochranný filtr, který propouští pouze záření delší než 700 nm. Z tohoto rozmístění optických filtrů vyplývá, že nemůže dojít k chybné detekci budícího pulzu či rozptýleného záření místo záření fluorescenčního. Zachycený

fluorescenční signál, který má vzhledem k pulzní povaze budícího záření rovněž nespojitý charakter, je selektivně zesilován výkonným dvoustupňovým zesilovačem.

Nejproblematictější fází při práci s aparaturou je čištění a potahování kyslíkové elektrody. Před začátkem vlastního měření je nutné z elektrody velmi pečlivě odstranit usazený chlorid stříbrný, k čemuž používáme kancelářskou pryž (lze použít také zubní pastu). Katoda a anoda se spojí cigaretovým papírkem, který je napuštěn elektrolytem. Přes cigaretový papírek se přetáhne tenká teflonová membrána, která je propustná pouze pro molekuly plynů (WALKER 1990). Je třeba dávat pozor, aby pod teflonovou membránou nezůstaly bublinky vzduchu a aby nedošlo k jejímu protržení. Elektroda se nechá polarizovat. Měřicí komora se propláchne dusíkem. Kyslíková elektroda se kalibruje 0,5 ml vzduchu o teplotě 25 °C.

Vlastní měření probíhá např. podle schematu: pokusnou rostlinu zatemníme na 20 - 30 minut (úplné zoxidování neboli "otevření" všech reakčních center PS II). Vykrojíme listový terčík a umístíme ho do měřicí komory. Ve tmě současně s rychlostí temnotního dýchání (R_D) měříme F_0 (základní fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem) a F_M (maximální fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem po aplikaci saturačního pulzu). Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) měříme při dvou hladinách (velmi nízké a saturační) ozáření současně s F_S (ustálená hladina fluorescence emitovaná listem při dané ozáření) a F_M' (maximální fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem při dané ozáření po aplikaci saturačního pulzu). Po každém měření P_N následuje měření R_D , F_0 a F_M . Změření jednoho listu trvá zhruba jednu hodinu. Po odečtení hodnot z grafického záznamu slouží tato data k výpočtům dalších parametrů (např. maximální fotochemické účinnosti PS II, aktuální fotochemické účinnosti PS II či stupně redukce primárního chinonového akceptoru elektronů - viz GENTY et al. 1989, KRAUSE a WEIS 1991). Velkou výhodou pro vyhodnocování experimentálních dat je připojení počítače přímo k aparatuře.

Pořízení této aparatury vyžaduje velkou investici (ca 33.000,- DM), ale provozní náklady jsou relativně nízké. Aparatura je prostorově nenáročná a její obsluha je po zapracování poměrně jednoduchá.

Aparatura byla PřF UK darována nadací Volkswagen (grant č. I/68918).

Literatura:

- GENTY, B., BRIANTAIS, J.-M., BAKER, N. R.: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. - *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87 - 92, 1989.
- KRAUSE, G. H., WEIS, E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant molec. Biol.* 42: 313 - 349, 1991.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C.: Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: SCHULZE, E.-D., CALDWELL, M. M. (ed.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Pp 49 - 70. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1995.
- SCHREIBER, U., SCHLIWA, U., BILGER, W.: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. - *Photosynth. Res.* 10: 51 - 62, 1986.
- WALKER, D. A.: *The Use of Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis (2nd impression)*. Oxygraphics, Sheffield 1990.

Stereologické hodnocení ultrastruktury rostlinných buněk

Kutík, J.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2
tel: 02/21 95-31 71, fax: 02/21 95-33 06

1. Ultrastruktura rostlinných buněk je pozorována a fotografována v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) a získané snímky jsou stereologicky hodnoceny.
2. A/ Je třeba TEM, ultramikrotom, knifemaker pro přípravu nožů a běžné laboratorní vybavení. B/ Používám standardního postupu přípravy preparátů pro TEM (Kutík et al. 1984, 1993): fixace (např. kousků listové čepele) glutaraldehydem ve fosfátovém pufru, vyprání pufrům, postfixace kyselinou osmičelou v téže pufru, odvodnění ve vzestupné alkoholové řadě, zalití (přes propylénoxid) do epoxidové pryskyřice (Spurrova nízkoviskozitního média), kontrastování ultratenkých řezů (skleněné nože) uranylacetátem a citrátem olova. Na pozitivních snímků z TEM stanovuji objemové hustoty (relativní parciální objemy) buněčných struktur (např. složek chloroplastů) pomocí bodových rastrů (Gundersen a Jensen 1987) a skutečné rozměry organel. C/ K vyhodnocení získaných dat postačí jednoduchý počítačový program: výpočet základních statistických parametrů doplněný například Studentovým t-testem.
3. TEM, ultramikrotom a knifemaker jsou nákladné investice (dohromady nejméně 2,5 mil. Kč). Příprava preparátů pro TEM trvá v zásadě čtyři dny. Časově náročné a pracné je stereologické hodnocení - zatím se je nedaří (alespoň pro chloroplasty) převést na automatickou analýzu obrazu.
- 4., 5., 6. Pro stereologické hodnocení musí být ultratenké řezy dobře orientované a kontrastní. Metoda dává poměrně komplexní obraz o ultrastruktuře studovaných objektů.

Literatura:

- Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.- *Journal of Microscopy* 147: 229 - 263, 1987. Kutík, J., Šesták, Z., Volfová, A.: Ontogenetic changes in the internal limitations to bean- leaf photosynthesis 8. Primary leaf blade characteristics and chloroplast number, size and ultrastructure.- *Photosynthetica* 18: 1 - 8, 1984. Kutík, J., Činčerová, A., Dvořák, M.: Chloroplast ultrastructural development during the ontogeny of the second leaf of wheat under nitrogen deficiency.- *Photosynthetica* 28: 447 - 453, 1993.
- Hall, J. L., Hawes, C. (ed.): *Electron Microscopy of Plant Cells*.- Academic Press (Harcourt, Brace Jovanovich Publishers), London - San Diego - New York - Boston - Sydney - Tokyo - Toronto 1991.

Analýza obrazu v rostlinné fyziologii

Opatrná, J.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 160 00 Praha 6,
tel: 02/36 08 56, fax: 02/36 52 28, 02/36 52 29

Nejvýznamnější přínos obrazové analýzy pro rostlinnou fyziologii souvisí s vývojem metod pro získání kvantitativních údajů a z nich odvozených morfologických charakteristik umožňujících popis, porovnání a hodnocení rostlinných orgánů, pletiv a buněk, ale i barevných reakcí, fluorescence, elektroforeogramů, autoradiogramů, a pod. Principy metod obrazové analýzy budou podrobně uvedeny na tomto semináři v prezentaci firmy Laboratory Imaging. Zde tedy stručně uvedu jen základní údaje týkající se metody.

Prvním předpokladem práce je získání kvalitního digitálního obrazu studovaného objektu. K tomu účelu může být použit scanner nebo TV kamera s příslušným objektivem nebo připojením na mikroskop. Obraz barevný nebo černobílý dostatečně vysokého rozlišení, může být pořízen při svrchním osvětlení objektu nebo při prosvícení světlem bílým, UV, atd.. Podobně lze snímat i fotografie, diapositivy nebo xerokopie rostlinných objektů. Ve stejném uspořádání jako snímáme objekty je třeba sejmout i reálné měřítko, které nám umožní kalibraci systému a tím měření v reálných jednotkách. Druhou částí práce je zpracování obrazu, kalibrace a měření zvolených charakteristik studovaných objektů. Je otázkou kvality obrazového procesoru, počítačového vybavení a použitého softwaru jaká měření nám umožní. Archivace získaných obrazů a dat a jejich zpracování podle požadavků následné prezentace (protokol, zpráva, publikace, plakátové sdělení) záleží na výběru příslušenství a možnostech každého uživatele.

V další části uvedu příklady a zkušenosti s použitím obrazové analýzy systémů LUCIA M a LUCIA D (Laboratory Imaging, s.r.o.) ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, kde toto zařízení pracuje 3 roky.

ARCHIVACE OBRAZU je používána pro uchování obrazu pro dokumentaci výsledků pozorování, charakteristických objektů a pod. Kvalitu ukládaného obrazu lze zvýšit úpravou kontrastu, barevného tónu, výřezem, doplnit textem, šipkami, měřítkem a pod. Zároveň lze uložit legendu a popis. Archivace je používána také jako součást experimentální práce pro průběžné ukládání souborů během pokusu či pozorování. To umožňuje jejich měření a hodnocení jedním standardním postupem až v době po ukončení experimentu.

Úskalím archivace je poměrně značná potřeba paměti. Je tedy nutné zvážit jak veliký soubor lze uložit na hard disk nebo zda je třeba použít komprese dat nebo některý z dostupných vnějších paměťových systémů (na př. Syquest s výměnnými disky na 270MB).

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

V našem ústavu byly připraveny archivy obrazů do různého stupně poškozených listů, hlíz, plodů, semen rostlinným škůdcem doplněné kvantitativním údajem % zasažené plochy. Jsou významnou pomůckou pro vyškolení personálu na hodnocení projevů choroby v porostech v polních podmínkách nebo pro práci inspekčních pracovníků.

Na několika vysokých školách jsou připravovány soubory obrazů pro didaktické účely, obsahují grafy, ilustrace, ale i originálně nasnímané obrázky makroskopické i mikroskopické vztahující se k předmětu výuky. Mohou být použity při výuce, opakování i zkoušení studentů. .

Významné urychlení práce při studiu vlivu chladového stresu na frekvenci mitos v kořenových špičkách přineslo uložení souboru obrazů jednotlivých zorných polí roztlakových preparátů na externí disk Syquest. Frekvence mitos a velikost jader byla hodnocena automaticky vždy pro všechna zorná pole jednoho roztlaku pomocí makra (viz dále).

Hodnocení in vitro probíhajících selekčních testů na kanamycinovou resistenci u transgenních brambor je náročné na rychlost provedení (rychlé zavádání nodálních segmentů) a přesnost měření délky úzlabních pupenů (0,5 - 30mm). Nasnímáním souboru jednotlivých vzorků a následné interaktivní měření pupenů (viz dále) při odpovídající kalibraci systému značně zjednoduší a zpřesní práci.

MĚŘENÍ lze rozdělit na interaktivní a automatické.

Měření interaktivní spočívá v měření délek nebo profilů po trajektorii (nejčastěji přímce), kterou si sám uživatel zvolí. Soubory naměřených hodnot lze exportovat do statistického programu (Excel, Quatro Pro) k dalšímu zpracování.

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

Měření délky stonku, výšky rostlin (stromů), rozměrů listů, plodů, růstové analýzy. Pro orientační a rychlou dokumentaci průběhu densit v elektroforeogramu lze použít funkci "Profil". Densita je měřena v místech kudy prochází proložená přímka. Tento způsob byl postačující na př. pro dokumentaci odchylných spekter zásobních proteinů při testování čistoty osiv (ÚKZÚZ). Pro přesné vyhodnocení densit v celé šířce proužku, včetně korekcí na tvar a délku stopy, jsou distribuovány speciální programy (na př. Elfo, Gel Manager).

Měření automatické předpokládá v prvním kroku vytvoření binárního obrazu - uživatel pomocí kursoru označí struktury, které mají být měřeny. Po odkliknutí jsou označena umělou barvou (overlay) všechna místa stejné intensity, resp., barvy (prahování, segmentace, threshold). Pokud pracujeme s černobílým systémem je prahování založeno na kontrastu požadovaného objektu vůči pozadí, u barevného systému pak probíhá prahování na základě barevné odlišnosti hodnocených struktur vůči okolí. Informace je tím redukována na dva stupně: ano - ne. Vytvořený binární obraz je pak v dalším kroku měřen.

Úskalí: V mnoha případech je však kontrast požadovaných struktur málo zřetelný, při prahování v celé ploše obrazu se označují i nežádoucí objekty nebo nerovnoměrnosti pozadí. Zde pak nastupuje celý systém úprav, které umožní vytvoření binárního obrazu co nejméně poškozené skutečnosti. Systémy LUCIA mají k dispozici rozsáhlou škálu úprav kontrastu, zaostření, barevných charakteristik reálného obrazu, způsoby prahování na základě odvozených programů z matematické morfologie a konečně škálu úprav binárního obrazu (erose, dilatace, close, open, fill holes..) a možnost aritmetických operací mezi jednotlivými obrazy. Optimalizovaný sled příkazů (makra) lze uložit a použít jako program pro zcela automatické, na experimentátoru nezávislé, měření rozsáhlých souborů obrazů.

Nicméně, při rozhodování co a jakým způsobem chceme měřit by v první řadě měla být věnována velká pozornost optimalizaci způsobu snímání obrazu (osvětlení svrchní či prosvícení, zaclonění, barevný filtr, obarvení objektu, kvalita preparátu, nastavení mikroskopického obrazu a pod.) tak, aby požadovaný objekt, struktura, byla zobrazena jasně, a kontrastně. Kvalitní obraz ušetří mnoho práce programátorské a umožňuje rychlé zpracování.

Před vlastním měřením je třeba nejprve zvolit parametry (na př. plocha, délka, šířka, cirkularita, densita,...) které budou měřeny a zvolit způsob měření (celé pole, objekty, označené jednotlivé objekty). Dále je třeba vytvořit kalibraci systému tak, aby měření probíhalo v reálných jednotkách.

PŘÍKLADY POUŽITÍ:

Měření délky kořenového systému a počtu postranních kořenů je jednou z nejběžnějších úloh. U jednoduchých kořenů (na př. kořenový systém 2 týdenních rostlin pšenice) se provádí měření přímo na rozprostřených kořenech při prosvícení. U větších lze použít na př. metodu rozřezání kořenů na segmenty konstatní délky a rychlé stanovení jejich počtu na obrazové analýze nebo kombinaci s metodami stereologickými na př. stanovení počtu průsečíků se sítí rovnoběžných přímek.

Stanovení listové plochy je úloha jednoduchá, nicméně konvenčními metodami zejména při členitých tvarech, časově náročná. Určení plochy jehlic smrku na letorostech dává další možnosti

při posuzování fyziologických charakteristik poškození lesů (na př. referenční hodnota k měření fotosyntézy). V posledních letech byly publikovány práce zabývající se využitím obrazové analýzy pro získání tvárových charakteristik listu. Zpravidla se jedná o vytvoření matematického vzorce sestaveného z naměřených parametrů (na př. délka, šířka, obvod, poloměr kružnice vepsané a pod.), který co nejlépe vystihuje ten který morfologický typ.

Řada aplikací byla vyvinuta pro posuzování velikosti, tvaru a povrchu semen. Ty byly použity na př. pro posuzování projevů genetické příbuznosti jednotlivých genotypů, ale též pro určení čistoty, vyrovnanosti osiva nebo potravinářských kontrolách kvality potravin.

Široké použití má obrazová analýza v oblasti fytopatologie. Jako příklady uveďme alespoň : stanovení rozsahu lézí na listech po napadení listů brambor fuzariem, stanovení počtu sklerocií rzi na listech trav, stanovení procenta plochy listu poničené požerem hmyzím škůdcem, stanovení rozsahu poškození povrchu hlíz houbovou chorobou, atd.

Na mikroskopické úrovni uvedeme příklady několika typických úloh: při dostatečně kontrastním obarvení preparátu lze prahovat protoplasty (resp. stěny buněk + invertovat binární obraz) a pak stanovit počet, velikost a tvarové charakteristiky buněk. S výhodou lze použít nastavení “masky”, kterou můžeme vymezit měřenou oblast či funkce “restrikcí”, kdy měřené parametry můžeme rozřídít na několik kategorií a na obrazovce je zpětně vizualizovat (na př. tři velikostní skupiny). Úskalím jsou materiály, které se obtížně barví nebo se navzájem překrývají, jako na př. preparáty buněčných suspenzí. Při stanovení počtu buněk může být řešením na př. obarvení jader na př. DAPI a v odpovídající fluorescenci stanovit počet zářících objektů, které se snadno naprahují a minimálně překrývají.

Zcela nové možnosti dává obrazová analýza pro histochemické studie. Při prahování na barevný odstín výsledného produktu reakce, je možné určit plochu pozitivně reagujícího pletiva a při vhodné kalibraci a respektování příslušných kontrol, získat i kvantitativní údaje o intenzitě histochemické reakce. Podobně lze i počítat množství partikulí zlata (immocytochemické metody) nebo stříbra (autoradiografie).

Záměrně vynechám použití obrazové analýzy pro cytogenetická studia, protože jim budou věnovány samostatné referáty a také použití obrazové analýzy pro gelové elektroforézy je otázka speciálních programů.

PREZENTACE. Digitální obraz pořízený obrazovou analýzou a upravený pro prezentaci (kontrast, popis textem, šipkami a pod.) lze vytisknout na tiskárně. Velmi se nám osvědčil termoprinter Mitsubishi P66 D, který tiskne ve velmi dobré kvalitě levné obrázky (cena asi 2Kč), takže je dostupný i jako protokolová dokumentace. Obrázky lze exportovat přímo do textu psaném na př. ve Wordu a podle našich zkušeností jsou akceptovány i redakcemi časopisů. Je třeba upozornit, že tisky z černobílého termoprintru na ostrém světle časem blednou (xerokopie, nový tisk). Pro tisk barevných obrázků lze použít na př. barevný printer Mitsubishi CP 52E. Při správném nastavení je kvalita zcela srovnatelná s barevnou fotografií a je stabilní.

Obrazová analýza je významným metodickým přínosem pro řešení mnoha fyziologických problémů. Nejen, že práci významně zrychluje, ale v mnoha aplikacích získává údaje dosud nedostupné. Metoda je ve velkém progresu. Před třemi lety na konferenci FESPP byla prezentována sdělení ze tří pracovišť. V tomto roce bylo již do podzimu publikováno několik desítek prací používajících obrazovou analýzu. Troufám si odhadnout, že do dvou let mohou být kvantitativní údaje získané objektivním měřením na obrazové analýze podmínkou pro publikovatelnost výsledků.

Rostlinné HeLa buňky? Buněčné linie jako alternativa klasických rostlinných modelů.

Opatrný, Z.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2

tel: 02/21 95 32 79, fax: 02/ 21 95 33 06, e-mail : opat@mail.natur.cuni.cz

Linie *in vitro* pěstovaných buněk vyšších organizmů patří již neodmyslitelně mezi biologické materiály významné a nezastupitelné jak z hlediska aplikace v experimentálním výzkumu, tak v medicínské praxi. Navzdory srovnatelné historii existence výzkumných oblastí rostlinných (Haberlandt 1902) a živočišných (Roux 1892) *in vitro* kultur je prozatím nejen praktické, ale též experimentální využití rostlinných buněčných linií výrazně omezenější. Není to způsobeno jen tradičně menším obecným impaktem rostlinných věd oproti živočišným, důvodem je i řada technických či metodických nevýhod, které většinou rostlinné buněčné linie oproti živočišným mají. Prvým problémem je již sama možnost jejich cílené přípravy a standardisace, dalšími jejich nízká cytologická a fyziologická homogenita, stabilita, růstová rychlost, omezené možnosti jejich konservace a j. Srovnatelnost s parametry obecně používaného modelu živočišných HeLa buněk (“nesmrtelná” buněčná linie, odvozená v 60-tých letech z cervikálního tumoru Heleny Langové, U.S.A.) je, navzdory reklamnímu titulku publikace Nagata *et al.* 1992, samozřejmě pouze částečná. Rostlinná linie tabákových buněk BY-2 je sice též “nesmrtelná” *sensu lato*, vyznačuje se vysokou růstovou rychlostí a viabilitou, je fenotypově stabilní za standardních kultivačních podmínek. Není však samozřejmě nadána kontaktní inhibicí, neadheruje k podkladům srovnatelně s příslušnými kmeny HeLa, neroste na nich v podobě monolayeru, není totálně a spontánně disociovatelná na jednotlivé buňky, má podstatně nižší plotnovací efektivitu atd. V řadě parametrů však podstatně převyšuje dosud používané rostlinné buněčné kultury, vyjma snad jediné, t.j. linie VBI-0 (Opatrný 1971, Opatrný a Opatrná 1976). Proč je tomu tak, je to dáno jen malou pílí či zájmem badatelů či odlišnostmi rostlinného materiálu oproti živočišnému?

Příspěvek si klade za cíl seznámit posluchače v první řadě se základními technickými úskalími přípravy různých typů rostlinných buněčných kultur, možností selekce vhodných buněčných populací, způsoby klonování jednotlivých somatických buněk. Budou posouzeny účinky různých faktorů na takové vlastnosti buněčných kultur, jež bezprostředně ovlivňují jejich experimentální využitelnost, zejména pak na rozpadavost (friabilitu), odolnost k různým typům stresu, celkovou růstovou rychlost a výtěžnost, životaschopnost a stárnutí, cytologickou i genetickou homogenitu, synchronnost jednotlivých fází buněčného i růstového cyklu.

Typy buněčných kultur, kultivace jednotlivých buněk, kultivace buněčných populací

V podmínkách *in vitro* lze pěstovat jak tělní (somatické) buňky, tak buňky podílející se v generativním rozmnožování, zejména mikro- případně megaspory. Zvláštní typ kultur pak představují buňky dočasně zbavené buněčné stěny, t.j. izolované protoplasty. Ve všech těchto případech je možné pěstovat buňky buď jednotlivě (mikrokultury) nebo v podobě buněčných populací nejrůznějšího objemu. Každá z technik má samozřejmě své nároky a limity, úspěšnost pěstování jednotlivých buněk je mj. podmíněna dodržením vhodného poměru mezi objemem kultivačního media a objemem biomasy. Densita inokulí nižší než 10^4 buněk na ml media je většinou kritická nejen pro jejich další dělení, ale též přežití. Pro klonování buněk (přípravu “single cell clones” fyziologicky a geneticky potenciálně homogenních) je tak nutno aplikovat techniku t.zv. nanokultur (pěstování jednotlivých buněk resp. protoplastů v kapkách objemu desítek nl). Alternativu představuje použití t.zv. kondiciovaných (conditioned) medií, t.j. půd, v nichž krátkodobě roste vhodná kultura či různé techniky “chůvy” (nurse culture), při nichž tato pomocná

kultura produkuje esenciální látky difundující ke klonovaným buňkám. Fenomén “conditioningu” je blíže studován i v souvislosti s výzkumem chemické signalisace u rostlin v různých fázích vývoje (ku př. v rané embryogenezi, zygotické i somatické).

Rozpadavost a růstová rychlost

Předpokladem vzniku buněčných kultur je dostatečná spontánní rozpadavost pěstovaných pletiv, t.j. odlučitelnost životaschopných dceřinných buněk následných generací. V přírodě se takový jev vyskytují jen zřídka (tekuté endospermy, zrání plodů a p.), v podmínkách *in vitro* kultury je podpořen složením kultivačního media a úměrným mechanickým pohybem tekuté půdy (třepání či probublávání na třepačkách, rollerech, ve fermentorech). Odvození vysoce rozpadavých buněčných linií je až na výjimky výsledkem dlouhodobé (i víceleté) selekce buněčných subpopulací s pravděpodobným defektem syntézy mezibuněčné centrální lamely. Techniky analogické trypsinisaci živočišných tkání (ku př. aplikace pektináz, celuláz, hemiceluláz), právě tak jako mechanická frakcionisace kultur nevedou k úspěchu: výsledkem je většinou opakovaná tvorba kompaktních buněčných agregátů. Takové kultury lze jen s rozpaky nazývat “buněčnými liniemi” - v mikroprostředí velkých agregátů se diferencují buňky fyziologicky i morfologicky velmi různorodé, výrazně se lišící průběhem buněčného cyklu, biologickou odpovědí na vnější faktory a p. Nízce rozpadavé kultury jsou nevhodné pro cytologické práce a mimoto mají většinou jen nízkou růstovou rychlost. Získání vysoce rozpadavé buněčné linie od konkrétního rostlinného materiálu může mít tedy pro daný typ pokusů klíčový význam.

Taxonomická / genotypová/ orgánová specifita rozpadavosti linií

Mechanismus fenoménu rozpadavosti buněčných linií nebyl dosud hlouběji studován. Je nicméně zřejmé, že kromě níže uvedených faktorů (medium, zejména jeho hormonální složení, kultivační režim) hraje podstatnou roli sám původ materiálu. Existují taxony, od nichž navzdory soustavnému úsilí nebyly dosud vhodné buněčné linie odvozeny (ku př. některé hospodářsky významné druhy čel. bobovitých - jako hrách či koňský bob). Dělicí čarou přitom není ku př. původ bylinný či dřevinný, kultury typu “Paul’s Scarlet Rose” (růže - viz ku př. *Weinstein et al. 1962*) či “sycamore cell line” (*Acer pseudoplatanus* - viz ku př. *Gould et al. 1974*) patřily již před řadou let k oblíbeným modelovým materiálům.

Vliv kultivačních podmínek: medium, kultivační režim

Klíčovou roli v navození a udržení rozpadavosti, právě tak jako růstové rychlosti a fenotypové stability kultur hrají (zřejmě) růstové látky. Dosud známé, obecněji využívané buněčné linie (viz níže) byly vesměs pěstovány v mediích s poměrně vysokým obsahem ($10^{-5}M$) syntetických auxinů typu 2,4-D či NAA, při současné absenci cytokininů. Přídavek cytokininů má obecně za následek zvýšení kompaktnosti i rozměrů buněčných agregátů. Snad proto téměř neexistují kvalitní cytokinin - dependentní buněčné linie.

Spontánní rozpadavost materiálu se většinou mění v průběhu subkultivačního intervalu (SBI). Je nejnižší v průběhu exponenciální fáze růstu kultur, během níž se buňky původního inokula do různé míry synchronně dělí a vytvářejí řetízkoité či sférické agregáty, stoupá s nástupem stationární fáze, během níž se buňky dluží resp. rostou. Buněčná linie během obvyklého SBI tak do jisté míry imituje chování buněk a pletiv *in vivo*: stárnutí některých orgánů může být následováno abscisí či autolysou pletiv. Vhodným subkultivačním režimem - zvolenou délkou SBI, densitou inokula atd. můžeme tyto procesy do jisté míry ovlivnit. Velmi nízká densita inokula tak v příp. modelových linií (VBI-0, BY-2, HBY-2) má za následek tvorbu kompaktních, mnohabuněčných, většinou sferisujících agregátů. Při subkultivaci pomocí vysoce densitních inokulů (až 10^5 buněk / ml) lze naopak průběžně udržovat linii v podobě velkých, často volných buněk, jež jsou vhodné pro cytologické či cytochemické analýzy.

Genotyp, stabilita

Dosud existuje jen velmi málo údajů o genetické vyrovnanosti modelových dlouholetých linií typu SCL, BY-2, VBI-0. Jejich karyologický obraz by bylo možno definovat jako “dynamickou

nestabilitu" v níž jsou extrémní odchylky průběžně spontánně eliminovány. V případě linie VBI-0 přetrvává tetraploidie (cca $4n = 48$ chromosomů) s občasnými výkyvy $\pm 2-4$ chromosomů, tedy stav blízký zřejmě situaci somatických pletiv tabáku. Pro práce fyziologického charakteru takové kultury tedy představují velice vyrovnaný pokusný model.

Buněčný cyklus, synchronisace

I z těchto důvodů vykazují kvalitní buněčné linie poměrně značnou spontánní synchronnost buněčného dělení v průběhu standardního SBI. V případě linie VBI-0 (a také BY-2, za určitých kultivačních podmínek) může tato hodnota aktuálního mitotického indexu dosahovat úrovně až 12-15%, tedy srovnatelné s hodnotami kořenových meristémů. Výsledky biochemických analýz lze tak poměrně dobře korelovat s určitou fází životního až buněčného cyklu buněk (přínejmenším s porovnáním mitotické buňky: interfázni buňky, viz *Zažímalová et al. 1995, 1996*) a naměřené hodnoty (enzymových aktivit/ hladin hormonů, cukrů, škrobu/ kapacity vazebných míst/ posttranslačních modifikací proteinů/ inkorporovaných těžkých kovů atd.) vztahovat nikoliv na jednotku biomasy či proteinu, ale na jedinou buňku. Informace běžně skryté v "šumu" průměrných výsledků tak náhle poskytují zcela nový logický pohled na zkoumaný děj (viz příklady uvedené v přednášce).

Významný metodický pokrok samozřejmě představují práce s buněčnými liniemi dočasně cíleně synchronizovanými. V případě linie BY-2 byla již úspěšně vypracována technika kombinované synchronizace pomocí aphidicolinu (inhibitor DNA polymerázy alfa) a některých mikrotubulárních jedů, blokujících funkci dělicího vřeténka (oryzalin či propizamid) - blíže viz *Nagata et al. 1992, Shibaoka 1993*. Výsledkem může být až 90-95% kumulace buněk v metafázi, již lze zrušit odstraněním inhibitorů a navodit další, podstatně však již nižší "mitotickou vlnu". Takto synchronizované linie slouží k nejrůznějším typům analýz strukturálních (ku př. stav cytoskeletu - *Shibaoka 1993*) či biochemických (histony - *Reichheld et al. 1995*, růstové látky - *Redig et al. 1996*, cAMP - *van Onckelen et al., unpublished a. j.*) v různých fázích buněčného cyklu. Výsledkem pak mohou být zjištění zásadního významu: tak ku př. analýza asynchronní populace buněk rostlinných orgánů doposud poskytovala zcela rozporné či spíše negativní údaje o roli cAMP. Výsledky týmu prof. van Onckelena dosažené s pomocí synchronizované linie BY-2 vykazují zásadní rozdíly hladin cAMP v různých fázích cyklu, jež by při "zprůměrování" materiálu samozřejmě unikly pozornosti.

U linie VBI-0 nebyla zatím tato synchronizační technika aplikována: částečného zvýšení MI bylo dosaženo aplikací hydroxymočoviny, veškeré další doporučené postupy (hladovění, teplotní stres aj.) byly téměř neúčinné.

Fenotyp, stabilita

Významným, experimentálně využitelným znakem buněčných linií mohou být vedle biochemických charakteristik i jejich morfologie. Rostlinné kultury se samozřejmě nevyznačují takovou mírou morfologické stability jako některé buněčné linie živočišné, jejich fenotyp není *a priori* určen histogenetickým původem. Buněčné linie odvozené z nejrůznějších orgánů resp. pletiv mohou mít takřka totožný vzhled, naopak z téhož výchozího explantátu lze cíleně či nahodile odvodit linie kontrastního fenotypu. Za standardních kultivačních podmínek však mohou být růstové schopnosti, tvar a velikost buněk, stavba buněčných agregátů dané linie velmi stabilní - a naopak vysoce citlivé k různým vnějším faktorům. Buněčná linie tak slouží jako spolehlivý biotest účinku ku př. stresových faktorů, xenobiotik, růstových látek aj. (příklady). Na buněčné úrovni lze tak studovat fenomény polarity, regulace buněčného dělení a růstu, primitivní stadia organogeneze či embryogeneze, projevy a mechanismy mezibuněčné komunikace, interakce rostlinných buněk s mikroorganismy, mechanismy programované buněčné smrti (apoptosy) ap.

Buněčné linie jako alternativa komplexních modelů: výhody, omezení, perspektivy

Není jisté sporu o tom, že v podmínkách *in vitro* kultury lze simulovat jen část "normálního chování" intaktních rostlin žijících v přirozených společenstvech a pomocí buněčných linií jen zlomek životních procesů komplexní rostliny. Přesto již nyní představují unikátní doplňkový

pokusný model. Vedle běžně uváděných předností (přesně definované kultivační podmínky, vysoce fyziologicky (?) a morfoloogicky homogenní materiál, snadná a synchronní aplikace studovaného regulačního faktoru) poskytují možnost simultánní analytické práce na řadě úrovní (biochemie, standardní cytologie, cytochemie, *in situ* hybridisace), bezprostředního sledování široké buněčné populace, studia jejích adaptačních reakcí. Použitelné je spektrum mikrotechnik (mikroinjekce či jiné mikromanipulace) a technik obrazové dokumentace (časosběrná fotografie, mikrokinematografie, videozáznam, pulsní záznam pomocí analýzy obrazu, včetně uplatnění konfokální mikroskopie - příklady).

Prozatím neúspěšné byly pokusy o dlouhodobější udržení synchronně se dělících (a vyvíjejících) buněčných populací - i při vysoké úrovni první vlny mitotických buněk již následná klesá nejméně na polovinu, synchronizační účinek dále rychle odeznívá. Lze si tedy zatím klást otázku, nakolik "normální" metabolické děje stanovujeme v buňkách oné první, umělé vlny.

Možná bezvýchodné je i úsilí o vyvolání buněčného (či opakovaně jaderného) dělení v izolovaných protoplastech, tedy bezblanných buňkách vyšších rostlin, tuto schopnost zatím vykazuje pouze jeden mutantní kmen *Chlamydomonas*.

Velmi obtížná je i nadále kultivace fenotypově vyrovnaných buněčných linií za extrémních podmínek - a to jak v podobě "single cells", tak ve velkých objemech, potřebných pro preparativní analýzu. Teprve další úsilí ukáže, zda příčinou je sama podstata rostlinného materiálu, či pouze naše dosavadní neznalost zákonitostí, řídících chování rostlinných buněk.

Literatura:

- Gould, A.R., Bayliss, M.W., Street, H.E.: J. Exptl. Bot. 25: 468 (1974)
 Opatrný, Z.: Kand. dis. práce ÚEB ČSAV (1971)
 Opatrný, Z., Opatrná, J.: Biol. Plant. 18: 381 (1976)
 Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S.: Intern. Rev. Cytol. 132: 1-30 (1992)
 Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., van Montagu, M., van Onckelen, H.: FEBS Lett. 391: 175 (1996)
 Reichheld, J.-P., Sonobe, S., Clément, B., Chaubet, N., Gigot, C.: Plant J. 7: 245 (1995)
 Weinstein, L.H., Tulecke, W., Nickell, L.G., Laurencot, H.J.: Contrib. Boyce Thompson Inst. 21: 371 (1976)
 Zažímalová, E., Březinová, A., Holík, J., Opatrný, Z.: Plant Cell Rep. 16: 76 (1996)
 Zažímalová, E., Opatrný, Z., Březinová, A., Eder, J.: J. Exptl. Botany 46: 1205 (1995)

Testy životnosti a poškození rostlinných pletiv po působení mrazů.

Prášil, I.T., Prášilová, P.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 16106 Praha,
tel: 02/36 08 51, e-mail: prasil@hb.vurv.cz

| Typ | Otužování | Působení mrazů | Testy životnosti | Výsledky |
|---------|--|--|--|--|
| Přímý | v přirozených nebo regulovaných podmínkách | přirozené nebo navozené v laboratoři | - růstový - vodivostní - stanovení Rd , Pn - chl. fluorescence - TTC | absolutní jednotky, procenta, letální teplota LT50 |
| Typ | Otužování | - Markery - | | Výsledky |
| Nepřímý | v přirozených nebo regulovaných podmínkách nebo bez otužení | morfologické fyziologické biofyzikální ... genetické | - tvar růstu... - obsah vody... - permitivita pletiv.. - gliadiny | relativní stupnice genová mapa? |

Metody určení odolnosti rostlin vůči mrazu lze rozdělit na přímé a nepřímé (Prášil et al. 1994, upraveno):

Při nepřímém stanovení odolnosti nejsou rostliny vystaveny mrazu, nemusí ani projít fází otužování rostlin, která je spojena s indukci odolnosti. Přímé metody jsou založeny na přímém vystavení rostlin resp. jejich pletiv mrazu. Potom následuje fáze stanovení životnosti a poškození

| Podstata testu | Druh testu |
|---|--|
| - schopnost růst a vyvíjet se | - růstový test - tvorba kalusu - regenerace nadzemních i podzemních částí |
| - funkce plazmalemy a tonoplastu - schopnost osmózy - propustnost barviv - rozdílný výtok látek - porušenost membrán - udržení turgoru | - plazmolýzový frekvenční test - barvení vakuoly - vodivostní metoda - ninhydrínový test - měření impedance pletiv - vizuální metoda, infiltrace pletiv |
| - funkce cytoplazmy a organel - enzymatické funkce - fluorescence chlorofylu - schopnost výdeje O ₂ resp. Příjmu CO ₂ - schopnost metabolizovat látky - schopnost barvit struktury | - aktivita enzymů - TTC test - měření fluorescence - měření rychlosti dýchání resp. fotosyntézy - značení látek - barvení (testy s fluorescenčními barvivy) |

pletiv (testy životaschopnosti), na jejíž přesnosti závisí možnost kvantifikace poškození a odolnosti pletiv vůči mrazu.

V následující tabulce uvádíme nejčastější testy životnosti používané při stanovení odolnosti pletiv vůči mrazu (zpracováno podle Palta et al. 1978, Calkins et Swanson 1990 a další):

Testy lze dále dělit podle toho jestli jimi stanovíme nepoškozené či mrtvé části, nebo vratné či nevratné poškození. V naší laboratoři jsme užili nebo užíváme tyto testy: růstový (dlouživého růstu), regenerační, stanovení rychlosti dýchání, fotosyntézy, fluorescence chlorofylu, TTC, udržení turgoru, barvení cytoplazmy, impedance pletiv a vodivostní měření výtoku elektrolytů. Naměřené hodnoty jednotlivých charakteristik vyjadřujeme obvykle v procentech kontrolní varianty z 0 °C. Při užití několika odstupňovaných intenzit mrazu a vyhodnocení dat vhodnými statistickými metodami (probitová analýza nebo logistická křivka) vypočítáme pro každou charakteristiku letální nebo-li kritickou teplotu LT50 (Janáček et Prášil 1991). Ta udává teplotu mrazu, která vede k 50% poškození dané charakteristiky a slouží jako kvantitativní ukazatel její odolnosti. Z našich prací vyplývá rozdílná úroveň mrazuvzdornosti jednotlivých charakteristik v závislosti na růstu a vývoji rostlin.

Bližší uvádíme metodu měření elektrické vodivosti vyplavených iontů. Tato metoda, nazývaná také jako konduktometrická, je široce užívána při hodnocení škod způsobených různými stresovými faktory (např. chladem, horkem, suchem). Založena je na měření množství uvolněných iontů z poškozeného pletiva do vody a vychází z předpokladu, že vyteklé množství iontů je úměrné stupni poškození pletiv mrazem. Množství vyteklých iontů je ovšem ovlivněno dalšími faktory jako jsou množství a obsah iontů a vody v pletivu, velikost, tvar a struktura užitých segmentů při přípravě vzorků a doba výtoku iontů. Snaha oddělit tyto rušící faktory od přesného stanovení poškození vzorků mrazem vedla postupně k řadě modifikací vodivostní metody. Poslední úpravy jsou uvedeny v naší práci (Prášil et Zámečník 1997) a v základě spočívají na současném stanovení tzv. relativní vodivosti vzorků kontrolních (nezmrazených) R_0 a vzorků usmrcených mrazem R_f . Relativní vodivost udává množství vyplavených iontů ze vzorku v poměru k maximálnímu množství iontů vyplavených z těchto vzorků po varu. Poškození pletiv způsobené mrazem vyjadřujeme v hodnotách indexu poškození $I_t = (R_t - R_0) / (R_f - R_0)$, kde R_t = relativní vodivost vzorku vystaveného mrazu t . Index poškození nabývá hodnot 0 až 100%. Takto upravenou metodou lze porovnávat mrazové poškození různých druhů vzorků, např. listů, kořenů, jehlic, větévek, pupenů, jednotlivých šupin, vzrostných vrcholů, různých tkání, jejich kultur a podobně. Touto metodou lze hodnotit nevratnost nebo vratnost (reparaci) poškození rostlinných pletiv v poststresové době. Uvádí se, že konduktometrická metoda umožňuje měřit změny v semipermeabilitě plazmalemy.

Literatura:

- CALKINS J B, SWANSON B T, 1990. *The distinction between living and dead plant tissue - viability tests in cold hardiness research*. Cryobiology 27: 194-211.
- JANÁČEK J, PRÁŠIL I, 1991. *Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting of an S-shaped function* Cryo-Letters 12: 42-42.
- PALTA J P, LEVITT J, STADELMANN E J, 1978. *Plant viability assay*. Cryobiology 15: 249-255.
- PRÁŠIL I., PRÁŠILOVÁ P, PAPAISIS K, VALTER J: *Evaluation of freezing injury and dynamics of freezing resistance in cereals*. In: eds. Dorffling K, Brettchneider B, Tantau H, Pithan K "Crop adaptation to cool climates", ECSP-EEC-EAEC, Brussels, Belgium, 1994, 37-48.
- PRÁŠIL I, ZÁMEČNÍK J: *The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury*. Environmental and Experimental Botany, 1997, v tisku.

Biotest na pôsobenie galaktoglukomanánových oligosacharidov v predĺžovacom raste indukovanom rastovou látkou

Sadloňová, K., Lišková, D., Kákoniová, D., Kubačková, M., Karácsonyi, Š.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, SK
tel: (0421) 07/378 26 55, fax: (421) 07/37 38 11, e-mail: chemkari@savba.sk

Metóda umožňuje sledovať predĺžovací rast rastlín ovplyvnený rôznymi rastovými regulátormi a ich vzájomné porovnanie.

Materiál a prístroje: semená hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Tyrkys od firmy Selgen Slovakia), hrubozrnný perlit, SAVO, tlmivý roztok, roztoky galaktoglukomanánových oligosacharidov (GGMO) a rastových regulátorov (2,4-D), strojček na sekanie segmentov z koleoptíl, sušiareň, autokláv, trepačka, flow box v tmavej komore, tmavá rastová komora, fotografický zväčšovací prístroj

Pracovný postup:

Semená hrachu sa pestujú v tmavej komore na jedencentimetrovej vrstve dobre navlhčeného sterilizovaného perlitu a prikryté 1-2 cm vrstvou zľahka utlačeného perlitu. Semená sa nakličujú pri teplote 23 ± 1 °C 8 dní, počas ktorých kľúčne rastliny vytvoria tri internódia a dosahujú výšku 10-15 cm.

Všetky nasledujúce kroky pokusu treba robiť pri zelenom svetle. Pokusy je potrebné robiť so všetkými roztokmi sterilnými a pracovať v sterilných podmienkach. Z približne rovnako veľkých kľúčnych rastlín sa odstrihne tretie internódium hneď za rastovým vrcholom a nasekajú sa pomocou strojčeka segmenty 6 mm dlhé, ktoré sa hneď vkladajú do základného inkubačného roztoku (10 ks/3ml roztoku). Robia sa dve paralelné vzorky, aby bolo možné porovnanie. Sleduje sa rast v kontrole, auxínovej kontrole a oligosacharidovej vzorke.

Základný inkubačný roztok (ZIR): K - fosfátový tlmivý roztok 5 mM, pH = 6,1, 1% sacharóza
látky pridávané do ZIR: 2,4-D (0,9 mM), oligosacharidy galaktoglukomanánového typu, DP 4-8 (10-5 - 10-10 M)

Kontrola obsahuje ZIR.

Auxínová kontrola obsahuje ZIR a auxín (2,4-D) pridávaný po 90 min.

Oligosacharidová vzorka obsahuje ZIR, auxín (2,4-D pridávaný po 90 min.), oligosacharidy (DP 4-8) pridávané na začiatku pokusu.

Kinetika rastu sa zaznamenáva v krátkodobých pokusoch od 2. do 6. hodiny inkubácie a pri dlhodobých pokusoch od 6. do 24. hodiny (prípadne 48. h).

Výhodnotenie pokusu:

Segmenty sa ukladajú na platňu a pomocou fotografického zväčšovacieho prístroja pri zv. 1,4 sa segmenty fotografujú. Na fotografiách sa meria dĺžka segmentov milimetrovým pravítkom.

Výhodnotenie experimentálnych dát:

$$\frac{L(AUX) - L(AUX + GGMO)}{L(AUX) - L(K)} \times 100$$

Výpočet percenta inhibície sa robí pomocou vzorca:

kde L (AUX) je dĺžka segmentu inkubovaného v auxínovej kontrole (0% inhibícia)

L (K) je dĺžka segmentu inkubovaného v kontrole bez auxínu (100% inhibícia)

L(AUX + GGMO) je délka segmentu inkubovaného v oligosacharidovej vzorke s auxínom

Časová náročnosť:

Dĺžka klíčenia je 8 dní, realizácia a vyhodnotenie pokusu trvá dva dni.

Úskalia metódy:

Rast klíčnych rastlín je často nerovnomerný a pri pokuse je potrebné vybrať rastliny rovnakej dĺžky, čo znižuje množstvo použiteľného materiálu. Rast nie je možné zaznamenávať kontinuálne pri uvedenom mechanickom meraní. Na meranie kontinuálneho rastu je potrebný špeciálny merací prístroj.

Tipy:

Pri sadení sa semená hrachu prikryjú 1 až 2 cm vrstvou perlitu, ktorý sa zľahka utlačí, čím sa dosiahne približne rovnaký rast klíčnych rastlín. Pokiaľ nie je k dispozícii fotografický zväčšovací prístroj, môžeme meranie robiť aj priamo pomocou milimetrového papiera.

Literatúra:

- Aldington S, Fry SC: *Adv. Bot. Res.* 19, 1-101 (1993)
Auxtová O, Lišková D, Kákoniová D, Kubačková M, Karácsonyi Š, Bilisics L: *Planta* 196, 420-424 (1995)
Branca C, De Lorenzo G, Cervone F: *Physiol Plantarum* 72, 499-504 (1988)
Emmerling M, Seitz HU: *Planta* 182, 174-180 (1990)
McDougall GJ, Fry SC: *Planta* 175, 412-416 (1988)
McDougall GJ, Fry SC: *J. Exp. Bot.* 40, 233-238 (1989)
McDougall GJ, Fry SC: *Plant Physiol.* 93, 1042-1048 (1990)
McDougall GJ, Fry SC: *J. Plant Physiol.* 137, 332-336 (1991)
Priem B, Morvan H, Hafez AMA, Morvan C: *C.R. Acad. Sci. Paris Sér. III*, 311, 411-416 (1990)
York WS, Darvill AG, Albersheim P: *Plant Physiol.* 75, 295-297 (1984)

Odporúčaná literatúra:

- Albersheim P, Darvill AG: *Sci. Am.* 253, 58-64 (1985)
Albersheim P, Darvill AG, Augur C, Cheong J, Eberhard S, Hahn M, Marfá V, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD, York WS: *Accounts Chem. Res.* 25, 77-83 (1992)
Côté F, Hahn MG: *Plant Mol. Biology* 26, 1379-1411 (1994)
Hoson T, Masuda Y: *Plant Cell Physiol.* 32, 777-782 (1991)

Histochemické metody při charakterizaci materiálu výplní vodivých pletiv rákosu obecného

Soukup, A. a Votrubová, O.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha
tel: 02/21 95 31 48, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: votrub@prfdec.natur.cuni.cz

Při anatomickém zpracování objektu lze použitím histochemických metod získat výsledky nepostížitelné standardními biochemickými postupy. Mikroskopická histochemie používá řez pletivem, na němž jsou aplikovány a hodnoceny jednotlivé chemické reakce. Stává se tak užitečným nástrojem, poskytujícím informaci o některých kvalitativních charakteristikách a jejich lokalizaci. Tato výhoda se projeví zvláště ve chvíli, kdy je zkoumaná látka omezena pouze na minoritní část orgánu nebo pletiva (např. cévní elementy). Naopak výhodou biochemického přístupu je možnost separace jednotlivých chemických látek a jejich spolehlivá determinace, která je velmi obtížná a často i nemožná v materiálu řezu, kde je směs látek potenciálně schopných dávat stejný, nebo obdobný výsledek. Z tohoto důvodu nemusí také být postupy běžně používané v biochemii relevantní při histochemické aplikaci na pletivo,

Ve své práci jsme využili histochemické metody pro studium struktur, které uzavírají vodivé dráhy rákosu po poškození podzemních orgánů, čímž snižují riziko průniku fyto toxinů a patogenů do celé rostliny. Tyto struktury mají u rákosu charakter gum a jejich tvorba je spolehlivě indukovatelná například mechanickým poškozením. Přestože je tvorba obdobných útvarů známa u různých rostlinných taxonů, je málo prací zabývajících se podrobněji jejich látkovým složením.

S pomocí anatomických a histochemických metod byl sledován časový průběh vývoje gum a povaha materiálu jímž jsou tvořeny. Na řezy čerstvým nefixovaným pletivem byly aplikovány důkazové reakce (viz tabulka), a to buď přímo nebo po předchozí extrakci, která měla umožnit do určité míry selektivní odstranění některých složek materiálu gum (viz. níže).

| | Vývojové stádium gumy | |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | Časné | Pozdní |
| <i>Původní zbarvení</i> | Bezbarvé | Světle žluté – tmavě hnědé |
| <i>Použitý test:</i> | | |
| PAS | XXX | XXX |
| Schiffovo činidlo | 0 | 0 |
| Alciánová modř | XXX | 0 – X |
| Toluidinová modř – (metachrom.) | XXX | 0 – X |
| Fast green | 0 | 0 – XXX |
| HCl – floroglucinol | 0 | 0 – XXX |
| Mäuleho reakce | 0 | 0 – XXX |
| Anilin sulfát | 0 | 0 – XXX |
| Reakce HNO ₂ (H-V test) | 0 | 0 – XXX |
| HCl – Vanilin | 0 | 0 – X |
| Sudan 7B (PEG) | 0 | 0 |
| Millonova reakce | 0 | 0 – XXX |
| Ninhydrin – Schiffovo činidlo | 0 | 0 |
| Coomassie brilliant blue | | 0 – XXX |
| Amido čern B | | 0 – XXX |
| Resorcinolová modř (pH3,5) | 0 | 0 |
| Fluorochrom anilínové modři | 0 | |
| Autofluorescence | 0 | 0 – XXX |
| Pozitivní reakce | - | xxx |
| Negativní reakce | - | 0 |

Výsledky:

Bezbarvý materiál který se nachází v cévách na začátku vývoje gumy je silně chromotropní při barvení toluidinovou modří. Pozorovaná pozitivní metachromazie je způsobena přítomností

volných elektronegativních povrchových nábojů (polyaniontů) o určité hustotě, v živých organismech obvykle představovaných skupinami $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_4$ (Pearse 1968, Baker 1958). Přítomnost polyaniontů potvrzuje také dobrá barvitelnost alcianovou modří (Beneš 1968), kterou lze právě tak jako metachromazii zvrátit metylací a následně obnovit demethylací.

Vzhledem k umístění materiálu v apoplastu lze podle analogie k známým extracelulárním materiálům rostlinné buňky usuzovat, že detekované karboxylové skupiny jsou velmi pravděpodobně součástí uronových kyselin polysacharidů. Pro tento předpoklad svědčí také pozitivní PAS (Periodic acid – Schiff) reakce. Protože jsou v tomto období vývoje gum negativní testy na polyfenolické látky, je malá pravděpodobnost interference s nesacharidovými složkami (Geier 1980).

Gumy jsou na počátku svého vývoje relativně dobře extrahovatelné chelatačním činidlem (EGTA), a při barvení toluidinovou modří se nad nimi může vytvářet sraženina. pH roztoku toluidinové modří bylo v tomto případě stabilizováno citrátovým pufrům, který může také působit jako chelatační činidlo. Zdá se tedy, že molekuly vyextrahovaného materiálu byly mezi sebou vázány, alespoň do určité míry, přes Ca^{2+} ionty. Tento způsob vazby je dobře známý u pektinů buněčné stěny (Fry, 1986; Carpita & Gibeau 1993) a lze jej tedy očekávat i zde. Zda se skutečně jedná o pektiny, popřípadě o jiný typ kyselého polysacharidu, nelze na základě zde používaných histochemických metod jednoznačně určit. Pomůžeme-li si opět modelem buněčné stěny vyšších rostlin, která je stejně jako guma extracelulárním materiálem buněk vyšších rostlin, pak lze na základě extrahovatelnosti chelatačním činidlem (EGTA) odhadovat, že by se mohlo jednat o málo větvené typy pektinů (homogalakturonan). Tuto domněnku podporuje poměrně jednotné složení frakcí získaných při tomto způsobu extrakce u buněčných stěn pocházejících z různých zdrojů a rostlinných druhů (Redgwell & Selvedran, 1986; McDougall, 1993; Chesson et al., 1995; Javris et al., 1981). Charakteru pektinů odpovídá také silná hydratace a výrazné smrštění při vyschnutí. McCann et al., (1992) spojuje toto chování s větvenými pektiny (ramnogalakturonany) a jejich konformační změnou při vyschnutí. V jeho práci jsou pektiny tohoto charakteru extrahovány působením Na_2CO_3 (0,05M), aplikovaným v sekvenci extrakční řady, která byla také použita v našich pokusech (Redgwell & Selvedran, 1986).

Interpretace výsledků a jejich srovnání s pracemi jiných autorů komplikuje příslušnost rákosu k čeledi Poaceae, u nichž se matrix buněčné stěny složením a strukturou liší od jiných rostlinných taxonů (Carpita, 1996). Pro její matrix je typický nízký obsah pektinů (zde představovaný převážně homogalakturonanem) a těsná asociace těchto pektinů s GAX (glukuronoarabinoxylany), které mají silně substituované postranní řetězce (Carpita, 1996). GAX provázejí pektiny i ve frakci polysacharidů uvolněných z buněčné stěny po chelataci Ca^{2+} iontů (Schibuya & Nakane, 1984; Carpita, 1989).

S časem mění gumy svůj charakter a jejich materiál ztrácí atributy kyselých polysacharidů. Klesá podíl gum s pozitivní metachromazií, objevuje se ortochromazie a metachromazie negativní; klesá i barvitelnost alcianovou modří. Je tedy patrné, že se snižuje množství volných karboxylů, které pravděpodobně v této fázi vývoje gum reagují s dalšími složkami tohoto extracelulárního materiálu. Současně se zvyšuje procento gum tvořených acidofilním materiálem, tj. barvitelných kyselými barvivy. Gumy se stávají obtížně hydrolyzovatelné v alkalickém prostředí a při vyschnutí u nich nedochází k patrnému smrštění a k vizuálně detekovatelnému poškození.

Tyto změny časově souvisí s kumulací fenolických látek. Lze ji pozorovat jako zvýšení autofluorescence gum, které nemizí ani po vystavení řezů PAW (phenol – acetic acid – water), SDS, 4M KOH + 0,2M NaBH_4 . Proto je vysoce pravděpodobné, že zdroj fluorescence je v materiálu gumy pevně, kovalentně, vázaný (Selvedran, 1975; Fry, 1982). Po extrakci NaClO_2 mizí pozitivní reakce na fenolické látky a gumy se stávají snadno rozpustnými v alkalickém prostředí. Je známo, že tento způsob extrakce delignifikuje pletivo a štěpí izodityrozinové “můstky“ mezi extenzinovými molekulami (Biggs & Fry, 1990, Fry, 1982) a některé další bifenylické vazby mezi složkami buněčné stěny (Fry, 1986). Silný oxidační účinek NaClO_2 může ale ovlivnit i další typy

vazby (např. glykosidické, Fry, 1986). V literatuře je popsáno přímé uvolnění (Saulnier, 1995) i snažší extrahovatelnost (Carpita, 1984) polysacharidů matrix buněčné stěny po této proceduře. Tyto výsledky by mohly nasvědčovat přítomnosti kovalentní vazby polysacharidů přes fenolické látky, známé z buněčné stěny vyšších rostlin (Iiyama et al., 1994; Lam et al., 1992; Grabber et al., 1995). Autofluorescence je u rákosu zřetelná ve všech buněčných stěnách na řezu, tedy i ve stěnách nelignifikovaných. To je typické pro buněčné stěny trav, bohaté na jednoduché aromatické látky (kys. ferulovou a kys. p-kumarovou) (Harris & Hartley, 1976; Rudall & Caddick, 1994), které tvoří vazby mezi jednotlivými složkami matrix buněčné stěny (Lam et al., 1992; Scalbert et al., 1985; Grabber et al., 1995). Uvedené práce dokumentují schopnost fenolické kyseliny tvořit mezi karboxylem jednoho z pólů své molekuly a hydroxylovou skupinou polysacharidu esterickou vazbu. Fenolická část molekuly se může estericky (ev. estericky přes karboxyl) vázat k ligninu. Vznikají tak jakési "můstky" propojující jednotlivé složky matrix. Vzhledem k tomu, že tato esterická vazba je labilní v alkalickém prostředí (Hartley & Morrison, 1991; Scalbert et al., 1985; Saulnier, 1995), nelze takto vysvětlit odolnost gum vůči extrakci v 4M KOH. Přesto je patrné, že skořicové kyseliny v matrix buněčných stěn po ošetření 4M KOH zůstávají, jak o tom svědčí přetrvávající fluorescence ve složených středních lamelách nelignifikovaných buněčných stěn, která je těmto kyselinám připisovaná (Harris & Hartley, 1976).

Dalším potenciálním zdrojem autofluorescence by mohla být strukturní, kovalentně vázaná bílkovina. Poranění nebo infekce může vyvolávat zvýšenou syntézu extracelulárních strukturních proteinů - extenzinů (Schowalter, 1993; Bradley, 1992), právě tak jako jejich urychlenou vestavbu do buněčné stěny (Bradley, 1992). Při imobilizaci proteinu v buněčné stěně vznikají vazby k ostatním složkám matrix (Iiyama et al., 1994; Schowalter, 1993) a velmi pravděpodobně také vazby mezi jednotlivými molekulami proteinů (Fry, 1982; Biggs & Fry, 1990; Qui & Mort, 1995). Biggs & Fry (1990) považují právě izodityrozinové "můstky" mezi molekulami extenzinu za vazbu způsobující vysokou stabilitu těchto proteinů v buněčné stěně. Přítomnost bílkoviny by mohla vysvětlit acidofilii gumy a pozitivní Millonova reakce by pak mohla být způsobena (alespoň částečně) přítomností tyrozinu. Do jaké míry lze tuto představu aplikovat na rákos však není zcela jasné. Ačkoliv byly v buněčné stěně trav nalezeny extenzinům homologní proteiny (Kieliszewski et al., 1990; Schowalter, 1993), jejich obsah se zdá být obvykle nižší než je tomu u jiných taxonů. Zároveň se předpokládá se, že jejich funkce by měla být do značné míry nahrazena fenolickými látkami (Carpita, 1996). Přítomnost aminoskupiny, která by prokazovala přítomnost bílkovin, se v gumách histochemicky prokázat nepodařilo. Po hydrolyze extracelulárního materiálu v HCl (6M, 110°C) je však v roztoku možné detekovat aminokyseliny. Zda pocházejí z gum a zda jsou zodpovědné za jejich vlastnosti bude vyžadovat další sledování.

Materiál gum může dávat pozitivní reakci s HCl-Floroglucinolem, Anilin sulfátem a rovněž pozitivní Mäuleho reakci. Tyto reakce jsou v buněčných stěnách považovány za důkaz výskytu ligninu. Tuto kladnou odezvu lze potlačit extrakcí 4M KOH s 0,2M NaBH₄ a to jak v gumách, tak i v lignifikovaných buněčných stěnách. Výskyt pozitivní reakce přičítané lignifikaci je však v gumách nepravidelný a lze ji těžko spojovat s odolností vůči alkalické hydrolyze. V gumách s pozitivní reakcí na lignin byla často pozorována i pozitivní Millonova reakce. Protože tato reakce může být způsobena nejen přítomností tyrozinu, ale i jinými látkami (např. prekurzory ligninu), lze předpokládat, že obě skupiny reakcí detekovaly v některých případech shodný substrát. Millonova reakce však byla pozitivní i na gumách s negativní reakcí na lignin a po extrakci 4M KOH. Lze tedy říci, že není způsobena pouze ligninem a jeho prekurzory.

Interpretace výše uvedených a podobných výsledků je komplikována přítomností širokého spektra různorodých látek, často sekundárních metabolitů. Právě tento faktor, odlišující rostliny od živočichů, je třeba brát v úvahu při výkladu výsledků. Některé z použitých metod byly původně vypracovány pro živočišný materiál a z toho vychází i jejich tradiční interpretace, jejíž užití pro

rostlinný materiál však může vést k mylným závěrům. Žádná z použitých důkazových reakcí není stoprocentně specifická a může tedy docházet i k různým interferencím. Je proto třeba užívat širšího spektra reakcí různého typu. Interpretace výsledků v takovémto širším kontextu pak zvyšuje jejich výpovědní hodnotu. Pravděpodobnost chybné interpretace lze snížit také kombinací s vhodně volenými biochemickými metodami.

Literatura:

- Baker JR (1958) Principles of biological microtechnique (a Study of Fixation and Dyeing). London: Methuen and Co. Ltd.
- Beneš K (1968) On the stainability of plant cell walls with alcian blue. *Biol Plant* 10: 334-346.
- Biggs KJ, & Fry SC (1990) Solubilization of covalently bound extensin from *Capsicum* cell walls. *Plant Physiol* 92: 197-204.
- Bradley DJ, Kjellbom P, & Lamb C (1992) Elicitor- and wound- induced oxidative cross - linking of a proline - rich plant cell wall protein : A novel, rapid response. *Cell* 70: 21-30.
- Carpita NC, & Gibeaut DM (1993) Structural model of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- Carpita NC (1989) Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.
- Carpita NC (1996) Structure and Biogenesis of the Cell-Walls of Grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Carpita NC (1984) Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentration of alkali. *Phytochemistry* 23: (5). 1089-1093.
- Chesson A, Gordon A, & Scorbbie L (1995) Pectic polysaccharides of mesophyll cell walls of perennial ryegrass leaves. *Phytochemistry* 38: 579-583.
- Fry SC (1982) Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell - wall glycoprotein. *Biochem J* 204: 449-455.
- Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in growing cell wall of angiosperms. *Ann Rev Plant Physiol* 37: 165-86.
- Geier T (1980) PAS - positive reactions of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. *Histochemistry* 65: 167-171.
- Grabber JH, Haltfield RD, Ralph J, Zon J, & Amrhein N (1995) Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry* 40: 1077-1082.
- Harris PJ, & Hartley RD (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Graminae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508
- Hartley RD, & Morrison III WH (1991) Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell wall of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *J Sci Food Agric* 55: 365-375.
- Iiyama K, Lam TB, & Stone BA (1994) Covalent cross - links in the cell wall. *Plant Physiol* 104: 315-320.
- Javris MC, Hall MA, Threlfall DA, & Friend J (1981) The polysaccharide structure of potato cell walls: Chemical fractionation. *Planta* 152: 93-100.
- Kieliszewski MJ, Leykam JF, & Lamport DTA (1990) Structure of the threonine-rich extensin from *Zea mays*. *Plant Physiol* 92: 316-326.
- Lam TBT, Iiyama K, & Stone BA (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* 31: 1179-1183.
- McCann MC, Wells B, & Roberts K (1992) Complexity in the spatial localisation and length distribution of plant cell wall matrix polysaccharides. *J Microscopy* 166: 123-136.

- Pearse AGV (1968) *Histochemistry (Theoretical and Applied)*. London: J. and A. Churchill Ltd.
- Qi XY, Behrens BX, West PR, & Mort AJ (1995) Solubilization and Partial Characterization of Extensin Fragments from Cell-Walls of Cotton Suspension-Cultures -Evidence for a Covalent Cross-Link Between Extensin and Pectin. *Plant Physiol* 108: 1691-1701.
- Redgwell RJ, & Selvedran RR (1986) Structural features of cell wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carb Res* 157: 183-199.
- Rudall PJ, & Caddick LR (1994) Investigation of the presence of phenolic compounds in monocotyledonous cell walls, using UV fluorescence microscopy. *Ann Bot* 74: 483-491.
- Saulnier L, Thibault J, Chanliaud C, & Marot C (1995) Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydr Polym* 26: 279-287.
- Scalbert A, Monties B, Lallemand JY, Guittet E, & Rolando C (1985) Ether linkages between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24: 1359-1362.
- Schibuia N, & Nakane R (1984) Pectic polysaccharides of rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* 23: 1425-29.
- Schowalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Selvedran RR (1975) Analysis of cell wall material from plant tissues : extraction and purification. *Phytochemistry* 14: 1011-1017.

Aplikace konfokální mikroskopie při studiu prostorového uspořádání rostlinného pletiva

Soukup, A., Votrubová, O.

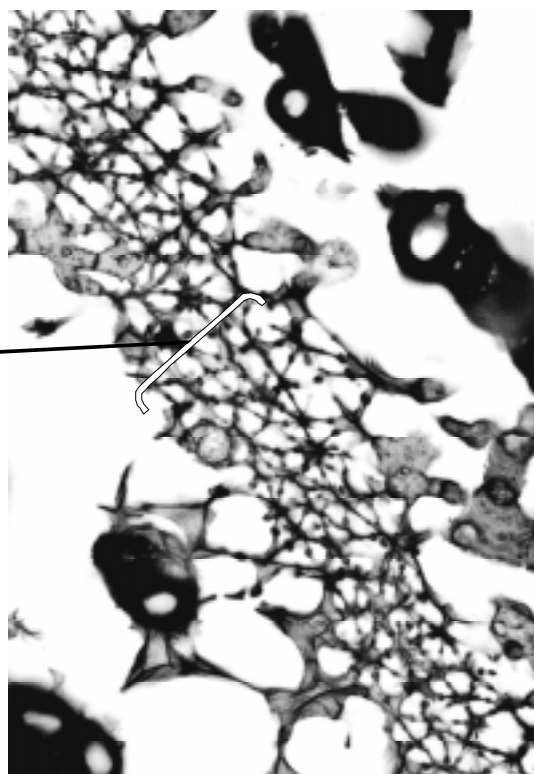
Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha
tel: 02/21 95 31 48, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: votrub@prfdec.natur.cuni.cz

Studium prostorového uspořádání rostlinných pletiv je často velmi důležité pro pochopení jejich funkce v rostlinném těle. Orientaci v komplikované prostorové struktuře může v některých případech usnadnit použití konfokální mikroskopie. Objekt lze být tímto způsobem vizualizovat jako jednotlivé tenké optické řezy, počítačem vytvořenou projekci série takových řezů, či jejich prostorovou rekonstrukci poskytující celkový přehled o uspořádání pletiva.

Příkladem použití může být studium struktury nodálních sept rákosu a jejich funkce. U rákosu obecného, stejně jako u ostatních mokřadních rostlin, je nezbytnou anatomickou adaptací pro život v zaplaveném a často anaerobním substrátu existence vzájemně propojených mezibuněčných prostor, které umožňují zásobování rostlinných orgánů pod vodní hladinou kyslíkem z nadzemní části. Nadzemní orgány jsou propojeny s oddenky a kořeny provzdušňovacími kanály, začínajícími v listových pochvách, kde komunikují s vnějším prostředím prostřednictvím průduchů. Kanály neprocházejí prýtem kontinuálně, ale jsou v nodech děleny septy o vysoké porositě, která umožňuje objemový tok vzduchu, ale zároveň brání průchodu vody a tím zaplavení celého podzemního systému v případě poškození některého z podzemních orgánů. Čelo kapaliny, která byla aplikována do oddenku pod nízkým tlakem (10kPa), se ve vrstevnaté struktuře nodálního septa zastavila po průchodu jemným aktinenchymem, na jeho hranici. Je to tedy právě tato střední vrstva (obr.1;2), která zastaví průchod fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem. Pro vysvětlení funkce těchto



obr.1 – septum – jemný aktinenchym, trvalý preparát (safranin – anilínová modř) (50x2,5)



obr.2 – detail jemného aktinenchymu LSCM (60x) optický řez

sept bylo nutné získat představu o trojrozměrném uspořádání pletiva a o velikosti jednotlivých intercelulárních prostor. Pro studium struktury sept byly použity tenké optické řezy získané konfokálním mikroskopem (LSCM, Bio Rad MRC 600). Jednotlivé optické řezy umožnily správnou orientaci v komplikované prostorové struktuře, která je jen obtížně sledovatelná tradičními metodami světelné mikroskopie. Malá tloušťka optického řezu zajistila, že jsme bezpečně odlišili hranice buněk a intercelulár (obr. 1;2), což umožnilo další zpracování analyzátozem obrazu (Lucia G, LIM), s jehož pomocí byly odhadovány velikosti pórů mezi buňkami. Takovéto rozlišení bylo značně obtížné a nepřesné u obrazu s velkou hloubkou ostrosti, kde se překrývají a splývají průměty těchto hranic. Bohužel tato metoda je jen obtížně použitelná pro kompaktnější pletiva se silnější buněčnou stěnou, kde lze získat čitelný obraz pouze v povrchové vrstvě.

Na základě znalosti anatomie septa se domníváme, že síť drobného aktinenchymu slouží jako matrice, na jejíž hranici se v intercelulárních prostorech vytvoří menisky fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem. Povrchové napětí fázového rozhraní může zabránit za daného tlaku dalšímu toku kapaliny. Tuto představu podporuje dobrá shoda naměřených tlaků, potřebných pro protlačení vody septem, a hodnot, které byly po anatomickém zpracování septa a odhadu velikosti intercelulárních prostor dopočítány s ohledem na předpokládaný mechanismus funkce. Dále pro ni svědčí i ztráta této schopnosti septa po zrušení fázového rozhraní mezi vodou a vzduchem, kterého bylo dosaženo po protlačení vody septem nebo zavodněním intercelulár v nodu za sníženého tlaku.

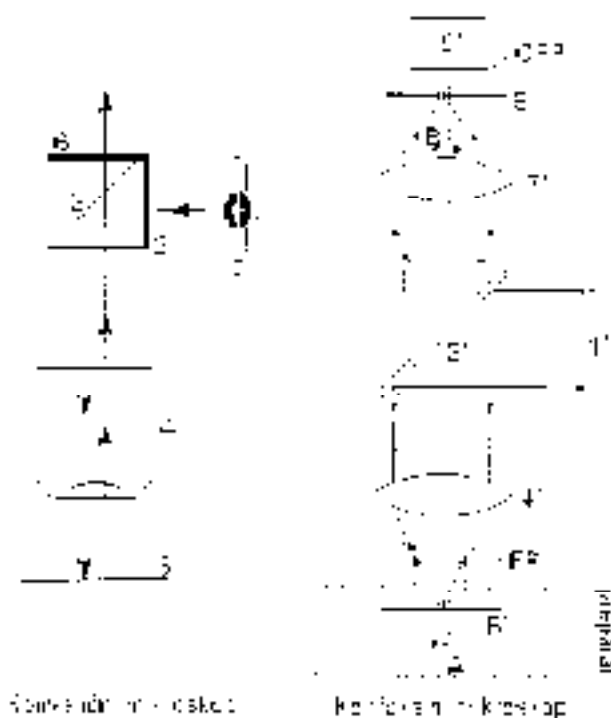
Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Široký, J.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: siroky@ibp.cz

Použití konvenčního fluorescenčního mikroskopu při studiu biologických struktur je často limitováno jednak tloušťkou pozorovaného objektu, jednak následující skutečností: Zaostříme-li ve fluorescenčním mikroskopu na nějaké buněčné struktury obarvené patřičným fluorochrómem, výsledný obraz je do jisté míry tvořen světlem emitovaným z fokální roviny i vrstev, nalézajících se nad a pod rovinou zaostření. To přispívá k více či méně “rozmazanému” obrazu v němž je identifikace jemných struktur obtížná. Naproti tomu, konfokální mikroskopie (pro přehled viz Pawley, 1995) umožňuje získání obrazu z jediné definované fokální roviny; struktury ležící mimo tuto rovinu se nezobrazí. Navíc je možno získat řadu po sobě následujících konfokálních obrazů z předem definovaných fokálních rovin (t.zv. optická tomografie). Vzhledem k tomu, že jednotlivé obrazy se ukládají v elektronické formě na disku výkonné pracovní stanice, je možné z takových obrazů rekonstruovat trojrozměrný obraz pozorovaných struktur či dále tyto komplexní obrazy manipulovat.

Princip konfokálního mikroskopu. Konfokální efekt může být dosažen na základě různých optických principů, většina z nich však vychází z původního patentu Minskyho z r. 1957 (viz. Minsky 1988). Zde se zaměříme na konstrukci tzv. konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM). Objektem budou např. buněčná jádra obarvená současně dvěma fluorochrómy: jaderná DNA propidium iodidem (PI), jaderné histony pak po protilátkové reakci (viz Vyskot, B., Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů, tento sborník) fluoresceinem (FITC). Srovnání konvenčního fluorescenčního a konfokálního laserového skenovacího mikroskopu znázorňuje obr. 1. Ve fluorescenčním mikroskopu je zdrojem světla rtuťová výbojka (1), jejíž světlo dopadá na excitační filtr (2), který dále propouští pouze světlo určitých vlnových délek. Světlo se dále odráží od polopropustného dichromatického zrcadla (3), prochází objektivem (4) k preparátu (5). Zde dochází k excitaci fluorochrómů a tyto emanují světlo následujících vlnových délek: 615 nm, červené (PI) a 520 nm, zelené (FITC). Světlo obou vlnových délek pak můžeme po průchodu dichromatickým zrcadlem a bariérovým filtrem (6) současně pozorovat jako různě zbarvené jaderné struktury. V konfokálním mikroskopu je zdrojem excitačního světla laser (1'), jehož paprsek se po odražení dichromatickým zrcadlem (3') v daném okamžiku soustředí objektivem (4') na velmi malou oblast (fokální bod - FP) plochy ve fokální rovině (5'). Zmíněné fluorochrómy opět emitují červené a zelené světlo. Paprsky obou vlnových délek po průchodu dichromatickým zrcadlem jsou soustředěny achromatickou optikou (7') do ohniska, tzv. konfokálního bodu (CFP). V konstrukci mikroskopu je dále umístěna clona (8') s velmi malým otvorem (desítky μm) v konfokálním bodu. Tato clona nepropustí žádné světlo, které by vycházelo z oblastí jiných, než je fokální bod. Například, místo (A) v preparátu mimo fokální rovinu se zobrazí jako (B) mimo konfokální rovinu a jeho obraz není mikroskopem registrován. Konfokální clona však podstatně sníží intenzitu světla, takže by nebylo pozorovatelné pouhým okem. Proto je světlo registrováno fotonásobičem (9'). Protože v našem příkladu současně sledujeme emisi jak červeného, tak zeleného světla, je vhodné obě vlnové délky oddělit sekundárním dichromatickým zrcadlem a jejich intenzity zaznamenat zvlášť. Výsledkem je tedy informace o intenzitě světla emitovaného fluorochrómem v jediném pixelu fokální roviny našeho preparátu. Tato informace se uloží do počítače spolu se souřadnicemi pixelu, x , y . Celý děj trvá přibližně mikrosekundu. Během další mikrosekundy získáme podobnou informaci ze sousedního pixelu a tedy během sekundy skenovacím způsobem z plochy maximálně 1024 x 1024 pixelů. Na obrazovce počítače se tak objeví dvojbarevný obraz DNA a histonů v námi předem definované fokální



Obr. 1:
Srovnání uspořádání konvenčního fluorescenčního a konfokálního mikroskopu

rovině analyzovaného jádra. Stejně můžeme získat obraz další fokální roviny, která může být od předchozí vzdálena pouhý zlomek mikrometru. Postupně tak lze naskenovat celé jádro v rozměrech x , y , z a následně tyto obrazové informace využít.

Konfokální software. Různí výrobci konfokálních mikroskopů používají kromě jistých modifikací vlastního mikroskopu rovněž různé programy pro zpracování obrazových informací, tyto programy jsou provozovány na různých počítačích. Obecně platí, že manipulace s množstvím dat, která jsou generována systémem CLSM, je možná pouze na velmi výkonných pracovních stanicích. Programy některých výrobců obsahují rovněž důležité utility pro import či export dat mezi různými systémy, tak se dají zpracovat data přenesená z jiných konfokálních mikroskopů.

Programové vybavení počítače spojeného s konfokálním mikroskopem většinou umožňuje nastavení parametrů mikroskopu a řízení vlastního skenování. Dále takové aplikace zahrnují utility, které jsou obsaženy v běžných programech známých jako "obrazová analýza". Jedná se především o různé filtrace obrazu, zdůrazňování vybraných struktur, měření intenzity jednotlivých barev v definovaných oblastech, měření délek a ploch a počítání objektů. Zatímco obecná obrazová analýza pracuje s dvourozměrným obrazem, software konfokálního mikroskopu umožňuje provádět tyto analýzy v prostoru: k typickým úlohám patří měření délek prostorové křivky nebo výpočet objemů vizualizovaných struktur - např. buněčných organel. Soubor dat (dataset) získaný optickou tomografií tkáňových nebo buněčných struktur je možno dále využít k tvorbě tzv. projekcí a projekčních sekvencí. Projekcí rozumíme dvojrozměrné znázornění obrazů z různých fokálních rovin v jednom společném obrazu. Projekce používají pro tvorbu výsledného obrazu různé algoritmy, takže výsledkem mohou být obrazy které spíše znázorňují povrch struktur, jindy zdůrazňují intenzivněji obarvené struktury, jindy lze generovat obrazy "průhledné". K dosažení maximálního prostorového vjemu je možno generovat stereoskopické obrázky. Projekce můžeme vytvářet v jakémkoli naklonění prostoru x , y , z a tudíž nahlížet na analyzované struktury z jakéhokoli úhlu. Série projekcí s mírně pozměněnými úhly náhledu pak dovolí struktury na obrazovce počítače naklánět či rotovat - vizuální informace z pozorovaného objektu je natolik komplexní, že ji jen těžko můžeme srovnávat se statickým obrazem konvenčního mikroskopu.

Biologický vzorek pro konfokální analýzu. Vzhledem k uvedenému principu konfokálního zobrazení je možno analyzovat živé nebo fixované vzorky o tloušťce až do několika stovek nm, mohou to tedy být malé organismy, tkáňové řezy, malé orgány, buňky nebo buněčné organely. Vzorky je nutno obarvit fluorochómem, který je excitovatelný světlem vlnové délky, kterou poskytuje laser. Zajímá-li nás interakce struktur preparátu s nějakou sondou (protilátka, DNA při *in situ* hybridizaci, proba pro membránový transport), je třeba sondu naznačit jiným fluorochómem emitujícím světlo odlišné vlnové délky (Suzuki *et al.* 1997). V takovém případě je při přípravě preparátu nutné zajistit penetraci proby v celém objemu vzorku. Kromě různých způsobů fixace k tomu může přispět permeabilizace preparátu detergenty, metanolem či acetonem. Při studiu prostorového uspořádání heterochromatinu jader endospermu *Gagea lutea* a stanovení oblastí bohatých na 5-metylcytosin pomocí anti-5mC protilátky se nám podařilo zajistit průchod protilátky do vnitřních struktur jader o průměru větším než 40 nm (Bůžek *et al.* 1997).

Závěrem lze shrnout, že konfokální mikroskopie se stává nepostradatelnou metodou v biologickém či medicínském výzkumu nejen pro svoji schopnost zaznamenat prostorové uspořádání zkoumaného materiálu, ale především pro svoji vysokou hodnotu analytickou. Uložíme-li totiž digitalizovanou obrazovou informaci do počítače, je nasnadě zpracování dat nejen do podoby pěkných obrázků, ale také nasazení pokročilého matematického instrumentária.

Poděkování: Tato práce vznikla při řešení projektu 521/96/K117 Grantové agentury ČR

Literatura:

- Bůžek J, Ebert I, Ruffini-Castiglione M, Široký J, Vyskot B, Greilhuber J, (1997) Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei of *Gagea lutea* (Liliaceae). *Planta*, in press
- Minsky M, (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**: 128-138
- Pawley J B, (ed.), (1995) Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, New York
- Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K, (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **45**: 49-53

Studium struktury chromatinu *Gagea lutea* pomocí konfokální laserové mikroskopie

Široký, J., Bůžek, J., Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41240500, e-mail: široky@ibp.cz

Popsaným typickým příkladem fakultativní heterochromatinizace u rostlin je inaktivace tří sad chromozómů v pentaploidních jádrech endospermu jednoděložné rostliny křivatce žlutého (*Gagea lutea*, Bůžek et. al 1997). Pentaploidní jádra vznikají po druhém oplození fúzí triploidního chalazálního a haploidního mikropylárního jádra zárodečného vaku. Tak vznikne pentaploidní endosperm obsahující jeden paternální a čtyři maternální genomy. Romanov (1961) předpokládá, že jsou to právě ony tři ze čtyř maternálních genomů, pocházející původně z chalazálního polárního jádra zárodečného vaku, které vytvářejí později během vývinu osemení v jádrech denzní heterochromatinovou strukturu.

Uspořádání heterochromatinu v jádrech endospermu bylo studováno pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM). Bylo zjištěno, že během zrání endospermu prochází heterochromatin výraznými morfologickými změnami: V jádrech mladých buněk byl heterochromatin soustředěn do denzní rozvětvené masy jak v centrálních oblastech jádra, tak i na jeho periferii. V pozdějších vývinových stádiích byl pomocí CLSM zjištěn signifikantně menší objem jader a měnila se i lokalizace heterochromatinu směrem k periferním oblastem jádra. Studium mitotických preparátů bylo zjištěno, že heterochromatin se přeměňuje v metafázní chromozómy až v pozdní profázi, narozdíl od euchromatinu, kde je možno pozorovat normální spirální chromozómy v časně profázi.

DNA v heterochromatinových oblastech bývá často výrazně hypermetylována (Lewis and Bird 1991). Předpoklad, že fakultativní heterochromatin tvořený třemi sady inaktivních chromozómů bude u *G. lutea* extenzivně metylován, nás vedl k analýze distribuce 5-metylcytosinu (5-mC) v jádrech pomocí značení protilátkou anti-5-mC (Podestá et al. 1993). Intenzita značení anti-5-mC v heterochromatinových oblastech byla velmi nerovnoměrná: některé oblasti heterochromatinu byly hypermetylovány zatímco jiné, podobně jako euchromatin, nevykazovaly téměř žádný signál 5-mC. Podobně nebyly detegovány ani celé hypermetylované chromozómy v metafázi; jediné rozdíly ve stupni metylace na chromozómech vykazovaly 5-mC pozitivní pruhy, které představují konstitutivní heterochromatin s obsahem vysoce repetitivních, netranskribovaných sekvencí DNA.

Odlišné výsledky poskytla nepřímá imunofluorescence po značení jader endospermu protilátkami rozpoznávajícími formy histonů H4 s acetylovaným lyzinem v různých pozicích (Jeppesen and Turner 1993). Jednotlivé protilátky specificky rozeznávají vnější lyzinové zbytky (Lys 5, Lys 8 a Lys 12) histonu H4 se nevázály v doménách fakultativního heterochromatinu, ale naopak hyperacetylace H4 byla prokázána v oblastech euchromatinových. To je plně v souladu s předpokládanou transkripční aktivitou euchromatinu. Podobné výsledky byly získány při studiu fakultativní heterochromatinizace u savců, jmenovitě v případě inaktivace jednoho pohlavního chromozómu X v samičích buňkách konstituce XX (Jeppesen and Turner 1993). Pomocí Ag-NOR techniky a *in situ* hybridizace u *G. lutea* jsme dále zjistili, že rDNA lokusy z heterochromatinizovaných sad chromozómů jsou aktivní.

Poděkování: Práce vznikla při řešení projektů A5004601 GA AV ČR a 521/96/1717 GA ČR.

Literatura:

- Bůžek J, Ebert I, Ruffini-Castiglione M, Široký J, Vyskot B, Greilhuber J, (1997) Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei of *Gagea lutea* (Liliaceae). *Planta*, in press
- Jepessen P, Turner B, (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytological marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289
- Lewis J, Bird A, (1991) DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* **285**: 155-159
- Podestá A, Ruffini-Castiglione M, Avanzi S, Montagnoli G, (1993) Molecular geometry of antigen binding by a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Int J Biochem* **25**: 929-933
- Romanov ID, (1961) The origin of the unique structure of endosperm nuclei in *Gagea*. *Dokl Bot Sci Sect* **141**: 188-190

Nový typ víček pro fotoautotrofní *in vitro* kultury rostlin

Tichá, I.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2

tel: 02/21 95 31 71, fax: 02/21 95 33 06, e-mail: iticha@prfdec.natur.cuni.cz

K uzavírání rostlinných explantátových kultur se obvykle používá alobal, vatové zátky, umělohmotná víčka, hliníkové čepičky apod. Nedostatkem těchto druhů víček je omezená propustnost pro plyny (CO_2 , vodní páru), což se projevuje vysokou relativní vzdušnou vlhkostí (RH) v kultivačních nádobkách (někdy téměř 100 % RH oproti 40 - 60 % RH ve vzduchu *ex vitro*) a velkými výkyvy v obsahu CO_2 . Během noci sice obsah CO_2 dýcháním rostlinek velmi vzroste, ale po rozsvícení se během tří až čtyř hodin koncentrace CO_2 fotosyntetickou činností rostlinek prudce sníží až na hodnotu kompenzačního bodu CO_2 , na které se udržuje po celý zbytek fotoperiody. Rostlinky rostou po většinu dne za nedostatku CO_2 .

Stále širší využívání rostlin pěstovaných *in vitro* v mikropropagaci, genovém inženýrství, genové manipulaci, kryoprezervaci atd. stimulovalo rovněž zájem o fotoautotrofní pěstování rostlinek *in vitro* za nepřítomnosti cukrů v médiu (levnější média, menší riziko infekce). Tyto rostlinky ale potřebují dostatek světla a CO_2 , aby mohly plně využívat své fotosyntetické schopnosti.

Proto byl vyvinut nový typ víček k uzavírání kultivačních nádob s rostlinnými *in vitro* kulturami, který je vysoce propustný pro plyny. Jedná se o japonský patent, který dodává firma Sigma (katalogové číslo C6920) pod jménem **suncaps** v rolích po 500 kusech, cena jedné role bez DPH je 3840,- Kč. Víčko ve tvaru čtverce se skládá z průsvitné polymethylpentenenové fólie, jejíž střed je tvořen polypropylenovým filmem s mikropóry o velikosti 0,2 až 0,02 mm, který propouští CO_2 i vodní páru. Víčka se sterilizují mezi navlhčenými filtračními papíry a upevňují na kultivační nádobky nastříhanými proužky parafilmu. Víčka **suncaps** se dají používat opakovaně. Procento infekcí je minimální. Průsvitná víčka zlepšují světelný požitek kultur. Díky propustnosti víček pro plyny se uvnitř kultivačních nádobek snižuje vysoká RH a rostlinky jsou dostatečně zásobeny oxidem uhličitým. Požadované koncentrace CO_2 v kultivačních nádobkách se docílí umístěním směsi karbonát/bikarbonátových pufrů do kultivačních boxů.

Porovnávala jsem růst rostlinek tabáku pěstovaných *in vitro* na médiu Murashige-Skoog (Sigma M 5519) bez sacharózy v nádobkách uzavřených alobalem nebo víčky **suncaps** (ozářenost 180 mmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ během 16hodinové fotoperiody, 2M karbonát/bikarbonátový pufr, teplota den/noc 25/18 °C). Po 21 a 54 dnech (d) kultivace byly rozdíly v nárůstu listové plochy a sušiny u rostlinek tabáku vysoce průkazné. Celková listová plocha po 21 d kultivace byla u rostlinek s víčky **suncaps** zvýšená o 126 %, po 54 d kultivace o 445 % v porovnání s kulturami s alobalovými víčky. Celková sušina rostlinek (nadzemní část a kořeny) se zvýšila po 21 d kultivace s víčky **suncaps** o 153 %, po 54 d kultivace o 504 % ve srovnání s kulturami s alobalovými víčky (Tichá 1996).

Literatura:

Tichá, I.: Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of **suncaps** closures on plantlet growth. - *Photosynthetica* 32: 475-479, 1996.

Synchronizace buněčného cyklu u smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst./

Überall, I.¹⁾, Havel, L.¹⁾, Kubaláková, M.²⁾

¹⁾ Ústav botaniky a fyziologie rostlin MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
tel: 05 45133023, e-mail: ivo@vszbr.cz

²⁾ Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 2, 772 00 Olomouc.

Jednou z metod ke studiu genomu rostlin jsou metody postavené na bázi *in situ* hybridizací. Některé modifikace těchto metod se provádějí přímo na metafázních chromozómech. Základním předpokladem úspěšné práce je dosažení dostatečného počtu nepoškozených metafázních chromozómů.

Pro získání maximálního množství nepoškozených metafázních chromozómů z kořenových meristémů smrku ztepilého byl použit kolchicin. Účinky kolchicinu na buňky kořenového meristemu se projevily hromaděním metafází mitotického dělení.

Nejdříve bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci a dobu působení kolchicinu. Jinak docházelo k jeho negativnímu působení na stav chromatinu (chromozómy byly příliš kondenzovány). U smrku byla zjištěna jako optimální koncentrace kolchicinu 0,05 % a doba působení 32 hodin. Za těchto podmínek se nachází 26,82 % buněk v metafázi mitózy. V kontrolní variantě bez kolchicinu bylo za stejných podmínek zjištěno 1,95 % metafází. Po uplynutí 32 hodin dochází i za přítomnosti kolchicinu ke snižování počtu metafází vlivem přechodu buněk do anafáze mitotického dělení.

Další zvýšení počtu metafází je možno dosáhnout reverzibilním zablokováním buněčného cyklu pomocí hydroxymocoviny nebo jiných látek (nejčastěji na přechodu fází G1 a S). Při využití tohoto postupu lze očekávat další zvýšení počtu metafází.

Imunochemické metody studia rostlinných chromozómů

Vyskot, B.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: vyskot@ibp.cz

Metody využívající protilátek vůči nejrůznějším antigenům na cytologických preparátech se stávají velmi cenným nástrojem ke studiu struktury a funkce eukaryotických genomů. Jedním z klíčových bodů těchto metod je vhodná příprava preparátů. Cytologické vzorky by měly mít zachovány původní buněčnou organizaci, měly by umožňovat reprodukovatelnou penetraci protilátek a konečně fixace vzorků a další manipulace s nimi musí zachovávat antigenitu studovaných epitopů (Jeppesen 1994). Vypracování optimálního pracovního protokolu vždy vyžaduje najít rozumný kompromis, aby každý z uvedených bodů byl alespoň do přijatelné míry splněn. Největším problémem rostlinné molekulární cytologie je asi přítomnost buněčné stěny, která významně znesnadňuje vstup protilátek (a samozřejmě i dalších makromolekulárních sond, zejména enzymů a nukleových kyselin) a navíc se vyznačuje silnou autofluorescencí. Tento problém bývá obvykle řešen přípravou tkáňových řezů nebo chemickou degradací stěn aplikací celuláz a pektináz. Pro studium DNA epitopů může být obvykle použita kyselá fixace, která významně permeabilizuje buněčný materiál. Kyselá fixace však není vhodná ke studiu většiny proteinových antigenů: tehdy se nahrazuje aplikací neextračních, méně toxických fixází (zejména formaldehyd nebo glutaraldehyd).

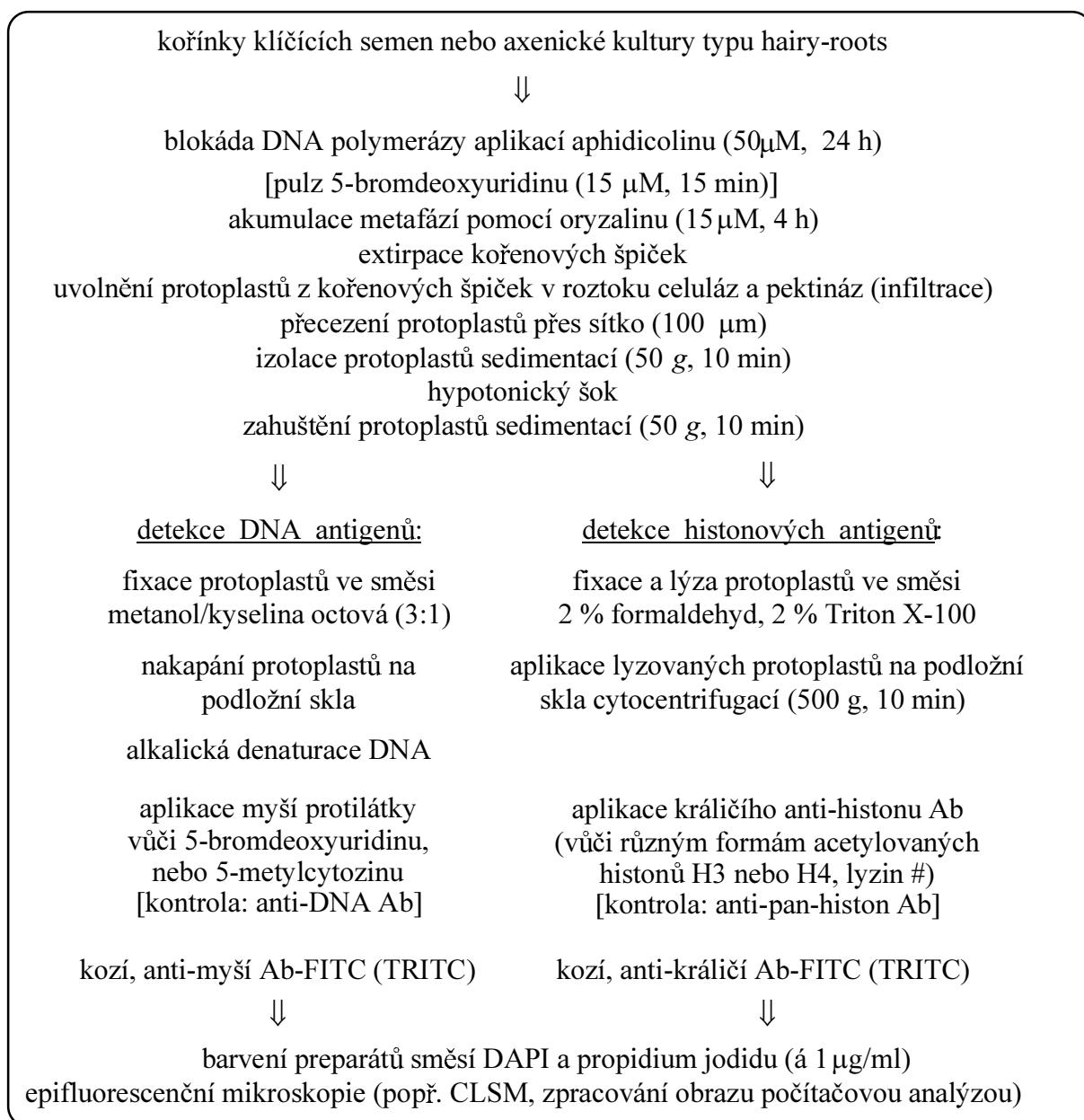
Ještě obtížnější je detekce proteinových antigenů na rostlinných chromozómech. Roztlakové preparáty bez kyselé fixace obvykle neposkytují ani reprodukovatelný vstup protilátek do buňky, ani dostatečnou kvalitu a rozložení metafázních chromozómů. Dosavadní studia acetylace nukleozomálních histonů byly proto prováděny v suspenzích chromozómů (Houben et al. 1996) nebo na částečně enzymaticky opracovaných roztlacích (Houben et al. 1997) i s pomocí konfokální laserové mikroskopie (Idei et al. 1996). V naší laboratoři jsme vyvinuli techniky přípravy metafázních chromozómů a interfázních jader z modelové dvoudomé rostliny knotovky bílé (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*), které jsou vhodné k nejrůznějším molekulárně-cytologickým účelům, jako jsou *in situ* nick-translace (Vyskot et al. 1993), autoradiografické studium replikace chromozómů (Široký et al. 1994), *in situ* hybridizace (Bůžek et al. 1997), nebo imunologické detekce 5-metylcytosinu (5-mC), 5-bromdeoxyuridinu (5-BrdU) a histonů (Vyskot et al. 1997).

Tyto techniky (přehledně uvedené na obr. 1) jsou založeny na synchronizaci buněčného cyklu v kořenových špičkách, následné akumulaci metafází a enzymatické izolaci protoplastů (modifikováno podle Veuskense et al. 1995). Protoplasty jsou purifikovány filtrací a sedimentací, podrobeny hypotonickému šoku a posléze fixovány. Pokud je záměrem pokusu detekovat určitou sekvenci DNA (př. fluorescenční *in situ* hybridizací) nebo lokalizovat přirozené (př. 5-mC) nebo experimentálně aplikované (př. 5-BrdU) modifikované nukleotidy, protoplasty jsou fixovány ve směsi metanol:kyselina octová (3:1, v/v, minimálně 2 h, při -20°C) a volně kapány na podložní skla. K detekci DNA epitopů je třeba materiál denaturovat (obvykle ve směsi 50 mM NaOH, 30% etanol, 2 min, RT); koncentraci NaOH a dobu denaturace je nutné empiricky ověřit. Po blokování možných nespecifických vazeb (obvykle sérem z příslušného živočišného druhu nebo telecím sérum-albuminem) je aplikována protilátka: komerčně dostupné jsou monoklonální anti-BrdU IgG1 (př. Sigma) ke studiu kinetiky replikace DNA a monoklonální ss- plus ds-anti-DNA imunoglobulin (př. Boehringer) jako nutná pozitivní kontrola. Po důkladném odmytí primární protilátky (obvykle v 1xPBS s 0,5% Tween 20) je aplikována sekundární protilátka (podle živočišného zdroje primární protilátky) konjugovaná například s fluorescenčním barvivem (nejčastěji FITC nebo TRITC). Ředění protilátek udává výrobce, je však žádoucí je empiricky

optimalizovat. Po důkladném promytí jsou preparáty barveny (př. DAPI plus propidium jodid, rozpuštěné ve Vectashieldu) a přiložené krycí sklíčko je rámováno lepidlem (“rubber cement”).

Ke studiu histonů je třeba použít neextrakční fixáže, která má též za cíl navodit šetrnou lýzu protoplastů. 100 ml protoplastové suspenze (obsahující asi 10^4 protoplastů) v hypotonickém prostředí je pipetováno na podložní sklo pokryté poly-L-lyzinem do plastické komůrky “cytoseť” vyráběné k přípravě živočišných cytologických preparátů (př. MPW Med-Instruments, Warszawa). Do komůrky se bezprostředně přidá 500 μ l fixáže (2 % neutrální formaldehyd, 2 % Triton X-100) a vzorky jsou přichyceny a lyzovány na skle odstředivou silou ve speciálním výkyvném rotoru (500 g, 10 min). Zatímco pro živočišné buňky je doporučována centrifugace “na sucho” (přebytek tekutiny se vsákne do okolního filtračního papíru na podložním skle), pro rostlinné protoplasty se zdá být lepší centrifugace “na mokro” (přebytek fixáže zůstává na skle a po skončení centrifugace automaticky steče do přisazené mikrozkuhavky). Preparáty jsou ihned ponořeny do metanolu (-20°C , 10 min; ke zvýšení permeability) a dle potřeby skladovány v 50 % glycerinu v chladničce. Asi jedinou komerčně dostupnou protilátkou vůči histonům je myší monoklonální protilátka anti-histon-pan (př. Boehringer), která rozpoznává antigenní determinanty na všech

Obr. 1. Schéma experimentů k detekci DNA (ss- a ds-DNA, 5-BrdU, 5-mC) a proteinových (acetylované histony) antigenů na rostlinných chromozómech:



typech histonů (H1, H2A, H2B, H3 a H4). Jako nejvhodnější odmyvací i permeabilizující roztok je používán KCM ("potassium chromosome medium", podle Jeppesena 1994). Sekundární protilátka bývá obvykle opět konjugována s fluorescenčním barvivem.

Hlavní předností výše uvedených technik je kvalita a četnost kompletních mitotických figur a jejich relativně dobře reprodukovatelné reakce s protilátkami. Mezi nevýhody patří určitá pracnost, velká spotřeba rostlinného materiálu a asi i finanční náročnost (zejména ceny aphidicolinu a Pectolyasy Y-23). Preparáty připravené bez fixace kyselinou octovou jsou obecně nižší kvality (obdobně jako u živočišných vzorků): ne všechny protoplasty lyzují a ne všechny mitotické figury jsou dobře rozloženy a umístěny v rovině podložního skla. U buněčného materiálu, který se vyznačuje silnou autofluorescencí se doporučuje využívat možnosti jiné detekce (př. sekundární protilátka značená koloidním zlatem, které je posléze zesíleno stříbrem; AuroProbe LM a IntenSE M, Amersham). Pokud nastávají problémy s penetrací protilátky přes zbytky cytoplazmy, je možné zvýšit permeabilitu aplikací mikrovlnného záření (viz Lu et al. 1997). Hlavním mementem všech imunochemických experimentů je absolutní nezbytnost provedení všech možných pozitivních a negativních kontrolních reakcí (preparátů), bez kterých je možné pozorovat, a posléze i opublikovat, nesčetnou řadu zajímavých artefaktů a na jejich základě formulovat velmi originální hypotézy a teorie.

Poděkování: Výše uvedené metodiky byly vypracovány v rámci řešení projektu A5004601 Grantové agentury AV ČR.

Literatura:

- Bůžek J, Koutníková H, Houben A, Říha K, Janoušek B, Široký J, Grant S, Vyskot B (1997) Isolation and characterisation of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Res* **5**: 57-65.
- Frediani M, Giraldi E, Ruffini-Castiglione M (1996) Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the metaphase chromosomes of *Vicia faba*. *Chromosome Res* **4**: 141-146.
- Houben A, Belyaev ND, Turner BM, Schubert I (1996) Differential immunostaining of plant chromosomes by antibodies recognising acetylated histone H4 variants. *Chromosome Res* **4**: 191-194.
- Houben, A., Belyaev, ND, Leach CR, Timmis JN (1997) Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosome Res* **5**: 233-237.
- Idei S, Kondo K, Turner BM, Fukui K (1996) Tomographic distribution of acetylated histone H4 in plant chromosomes, nuclei and nucleoli. *Chromosoma* **105**: 293-302.
- Jeppesen P (1994) Immunofluorescence techniques applied to mitotic chromosome preparations. In: Gosden JR, ed. *Chromosome Analysis Protocols*. Totowa, Humana Press, pp 253-285.
- Lu Y-J, Cheng SJ, Ning J, Dong X-Y (1997) An accelerated *in situ* hybridisation procedure using microwave irradiation. *Chromosome Res* **5**: 147-149.
- Southgate, J., Trejdosiewicz, L.K. (1997) Immunolabelling of cells and tissues: approaches and pitfalls. *Hum Reprod* **12**: 65-75.
- Široký J, Janoušek B, Mouras A, Vyskot B (1994) Replication pattern of sex chromosomes in *Melandrium album* female cells. *Hereditas* **120**: 175-181.
- Veuskens J, Marie D, Spencer SC, Jacobs M, Negrutiu I (1995) Flow sorting of the Y sex chromosome in the dioecious plant *Melandrium album*. *Cytometry* **21**: 363-373.
- Vyskot B, Araya A, Veuskens J, Negrutiu I, Mouras A (1993) DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* **239**: 219-224.
- Vyskot B, Široký J, Hladilová R (1997) A cytospin technique for the spreading of plant metaphases suitable for immunofluorescence studies. *Chromosome Res*, submitted.
- Yanagisawa T, Tano S, Fukui K, Harada K (1993) Analysis of replication pattern in soybean chromosomes by indirect immunofluorescence method. *Jap J Genet* **68**: 119-125.

Studium struktury a funkce pohlavních chromozómů *Melandrium album* pomocí imunocytologických metod

Vyskot, B., Široký, J., Hladilová, R.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
tel/fax: 05/41 24 05 00, e-mail: vyskot@ibp.cz

Knotovka bílá (*Melandrium album*, syn. *Silene latifolia*) představuje modelový dvoudomý druh s heteromorfními pohlavními chromozómy: samičí rostliny ($2n = 22 + XX$) jsou homogametické, zatímco samčí rostliny ($2n = 22 + XY$) jsou heterogametické. Chromozóm Y nese nejen geny, jejichž produkty potlačují vývin pestíků, ale i geny nezbytné ke tvorbě tyčinek. Úloha chromozómu X v determinaci pohlaví je dosud nejasná. Pohlavní chromozómy jsou u knotovky výrazně delší než autozómy, a jsou proto snadno rozlišitelné. Jelikož typ determinace pohlaví je analogický systému savčímu, vzniká otázka, zda v samičích somatických buňkách knotovky též dochází ke kompenzaci dávky genů nesených chromozómem X (fakultativní heterochromatinizace). Pomocí techniky *in situ* nick translace jsme prokázali určité rozdíly v metylaci cytozinu mezi dvěma samičími chromozómy X. Tyto rozdíly korelovaly s autoradiografickou analýzou kinetiky replikace, stupněm kondenzace i transkripční aktivitou. V předložené práci jsme sledovali kinetiku replikace DNA, metylace DNA a acetylace nukleozomálních histonů pomocí protilátkových reakcí na mitotických preparátech. Synchronizované kořenové špičky byly v průběhu S-fáze značeny krátkými pulzy 5-bromdeoxyuridinu (BrdU), který byl posléze vizualizován s pomocí primární myši anti-BrdU Ab a sekundární anti-myši Ab konjugované s fluoresceinem. Výsledky ukazují, že replikace DNA obecně začíná v subtelomerických oblastech chromozómů a pozdní replikací se vyznačují centromerické domény. Srovnání dvou chromozómů X na samičích metafázích pak potvrdilo výrazné rozdíly na kratším i delším ramenu; podstatná část delšího ramene jednoho z chromozómů X se replikuje až v pozdní S-fázi. S pomocí monoklonální protilátky vůči 5-metylcytozinu (anti-mC) jsme detekovali hypermetylované oblasti genomu. Na interfázních jádrech bylo možné prokázat pozitivní korelaci mezi konstitutivním heterochromatinem (chromocentra) a metylací DNA. Metylační obrazy na mitotických figurách vykazovaly nejsilnější signály v bezprostřední blízkosti telomerických oblastí. Rozdíly mezi dvěma chromozómy X byly markantní na obou ramenech. Kontrolní preparáty (s použitím anti-DNAAb) prokázaly homogenní značení celých chromozómů. Vzhledem k tomu, že inkorporovaný BrdU výrazně mění denaturační parametry DNA, nebylo možné provádět simultánní dvojistou imunodetekci BrdU a 5-mC. Na preparátech fixovaných formaldehydem a nanášených na skla pomocí cytocentrifugace byly prováděny pokusy o analýzu acetylace nukleozomálních histonů H4. Kontrolní preparáty (s pomocí anti-histon-pan Ab) prokázaly vhodnost použité metodiky: interfázová jádra (mimo oblast jadérek) a chromozómy dávaly reprodukovatelné, homogenní signály. První výsledky prokázaly, že nejvyšší stupeň acetylace lyzinových reziduí v pozicích 5, 8 a 12 u histonů H4 se nachází v subtelomerických oblastech chromozómů, což koreluje s časnou replikací DNA v těchto doménách.

Poděkování: Tento výzkum byl prováděn za finanční podpory Grantové agentury AV ČR (A5004601).

Jmenný rejstřík

A

Albrechtová, J.T.P. 112
Argalášová, K. 14

B

Bačkor, M. 116
Bačkorová, M. 116
Balla, J. 16, 44
Beneš, K. 118
Benková, E. 18
Blažková, J. 16
Bovanová, L. 14
Brandšteterová, E. 14
Budíková, S. 121
Burketová, L. 21
Bůžek, J. 70, 74, 150

Č

Čapková, V. 24
Čeřovská, N. 26

D

de Boer, A.H. 20
Dobrev, P. 28, 65

F

Fajkus, J. 75
Faltus, M. 31
Feltl, T. 34
Flores-Solís, J. 44
Fulneček, J. 77

G

Gaudinová, A. 65
Grospietsch, M. 39

H

Hanáčková, B. 125
Hanáčková, Z. 123
Havel, L. 153
Hladilová, R. 101, 157
Holík, J. 65
Honyš, D. 81
Hudák, J. 116

K

Kadleček, P. 126
Kákoniová, D. 138
Kamínek, M. 28, 41
Karácsonyi, Š. 138
Klemš, M. 16, 44
Konečná, H. 85
Kovařík, A. 87
Krpeš, V. 46
Kubačková, M. 138

Kubaláková, M. 153
Kubelková, M. 126
Kutík, J. 128

L

Lišková, D. 138
Lux, A. 14

M

Macháčková, I. 49
Mikuš, M. 14
Moravec, T. 26

N

Nejedlá, E. 90

O

Opatrná, J. 129
Opatrný, Z. 132

P

Pavingerová, D. 92
Piňeyro, A. L. 14
Pospíšková, M. 53
Prášil, I. 136
Prášilová, P. 136
Procházka, S. 16, 44

R

Rotrekl, V. 95

Ř

Říha, K. 74, 98, 101

S

Sadloňová, K. 138
Smýkal, P. 102
Snopek, J. 55, 125
Sofrová, D. 58
Soukup, A. 140, 145
Strnad, M. 65
Süssenbeková, H. 65

Š

Šimek, P. 60
Šindelář, L. 61
Šindelářová, M. 21, 61
Široký, J. 74, 147, 150, 157
Štorchová, H. 107

T

Tichá, I. 152, 125, 126

Ü

Überall, I. 153

V

Vacková, K. 53
Vaňková, R. 65
Vojtěchová, M. 63
Votrubová, O. 140, 145
Vyskot, B.
74, 101, 150, 154, 157

Z

Zažímalová, E. 41

Seznam účastníků sympozia:

| | |
|-------------------------------|---|
| Dr. Albrechtová Jolana | Albert-Ludwigs-Universität Institut für Biologiell./Botanik, Schänzlestr 1, 79104 Freiburg, jolana@ruf.uni-freiburg.de |
| Mgr. Argalášová Kartarina | Katedra fyziologie rostlin, Universita Komenského, Mlynská dolina B-2, 136, Bratislava, argalaso@fns.uniba.sk |
| Mgr. Bačkor Martin | Universita Komenského, Katedra fyziologie rostlin, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, backor@fns.uniba.sk |
| Ing. Balla Jozef | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, maci@dahlia.vszbr.cz |
| Mgr. Baránek Miroslav | Mendeleum, Fakulta zahradnická MZLU, Valtická 354, 691 44 Lednice na Moravě, baranek@vszbr.cz |
| Mgr. Bartošková Petra | Universita Palackého, Fakulta přírodovědecká, laboratoř růstových regul., Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Molice, bartoskp@risc.upol.cz |
| Prof. RNDr. Beneš Karel | Jihočeská universita, Fakulta biologie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, tel.038/777 55 04 |
| Mgr. Benková Eva | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, benkova@ibp.cz |
| Berková Klára | Koliště 11, 60200 Brno |
| Mgr. Budíková Sylvia | Slovenská akademie věd, Botanický ústav, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, botubud@savba.savba.sk |
| Ing. Burketová Lenka Csc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6, elsindel@site.cas.cz |
| Mgr. Bůžek Jiří | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, buzek@ibp.cz |
| RNDr. Čapková Věra | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, capkova@site.cas.cz |
| RNDr. Čeřovská Noemí CSc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6, tel.24310108 |
| Dr. de Boer Bert | Vrije Universiteit, Faculty of Biology, Department of Genetics, Section Plant Physiology, De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam ,Netherlands, ahdeboer@bio.vu.nl |
| RNDr. Dobrev Petr | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, dobrev@ueb.cas.cz |
| Dr.Ing. Doležel Jaroslav CSc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc, dolezel@risc.upol.cz |
| RNDr. Fajkus Jiří | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, fajkus@ibp.cz |
| Ing. Faltus Miloš | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Laboratoř fyziologie rostlin, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, faltus@hb.vurv.cz |
| Mgr. Feltl Tomáš | Ústav experimentální botaniky AVČR, PřF UK, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, feltl@ueb.cas.cz |
| Mgr. Feltlová Marcela | Ústav experimentální botaniky AVČR, PřF UK, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, feltlova@ueb.cas.cz |
| Filipová Veronika | Luzánecká 4A, 602 00 Brno, tel.05/67 46 03 |
| Dr.Ing. Fišerová Helena | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, tel.05/45133015 |
| Mgr. Fojtová Miloslava | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, tel. 05/41517179 |
| Mgr. Fulneček Jaroslav | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno 12, fulnecek@ibp.cz |
| Mgr. Fulnečková Jana | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 136, 612 65 Brno 12 |
| Mgr. Grospietsch Martin | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, grospietch@hb.vurv.cz |
| Mgr. Hájek Tomáš | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, hajek@ueb.cas.cz |
| Mgr. Hanáčková Zora | Slovenská akademie věd, Botanický ústav, Dúbravská cesta 14, 842 23 Bratislava, botuhan@savba.savba.sk |
| Hanzelka Petr | Závišická 582, 742 66 Nový Jičín |
| Holub Jan | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, jan@risc.upol.cz |
| Holubová Hana | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc |
| Mgr. Honys David | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, honys@site.cas.cz |
| Mgr. Hulánová Mirka | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 61265 Brno, mirka@zoncna.ibp.cz |
| Mgr. Jiřinová Klára | Bulharská 12 , 10100 Praha 10, klarka@cesnet.cz |
| Mgr. Kadlecová Zuzana | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Laboratoř fyziologie rostlin, Drnovská 507, 161 01 Praha 6, kadlecova@hb.vurv.cz |
| Ing. Kamínek Miroslav Csc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, kaminek@mbox.cernet.cz |
| RNDr. Karlovská Lenka Csc. | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, tel.05/45133015 |
| Ing. Klemš Marek | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, klemš@dahlia.vszbr.cz |
| Mgr. Kolář Jan | Ústav experimentální botaniky AVČR, PřF UK, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, kolar@ueb.cas.cz |
| RNDr. Konečná Hana | Moravská universita, Fakulta přírodovědecká, Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Kotlářská 2, 611 31 Brno, lfmr@sci.muni.cz |
| RNDr. Kovařík Aleš Csc. | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, kovarik@ibp.cz |
| RNDr. Kutík Jaromír CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, |

| | |
|--------------------------------------|--|
| Dr. Kovařík Pavel | tel.2195-3171 |
| RNDr. Kraus Igor | Universita Vídeň |
| Ing. Krpeš Václav | Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Mostecká 7, 614 00 Brno, tel.578703 |
| Kryštof Vladimír | Ostravská universita, Fakulta přírodovědecká, Katedra biologie, Bráfova 7, Ostrava 1, krpes.kbio@prfl.osu.cz |
| Mgr. Kůrková Iva | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, krystof@risc.upol.cz |
| Mgr. Lenobel René | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 160 00 Praha 6, tel.368010 |
| Mgr. Mužátková Ilona | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, lenobel@risc.upol.cz |
| RNDr. Macháčková Ivana CSc. | Bohdalov 173, 592 13, tel.0616/97259 |
| RNDr. Martinec Jan CSc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 160 00 Praha 6, voko@mbox.cesnet.cz |
| Bc. Mašek Tomáš | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 160 00 Praha 6, marty@ueb.cas.cz |
| Mgr. Mazáčová Hana | Moskevská 3114, 272 04 Kladno, tel.21953287 |
| Mgr. Moravec Tomáš | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, lenobel@risc.upol.cz |
| RNDr. Nejedlá Eliška CSc. | Rooseveltova 5/444, 160 00 Praha 6, tel.3118263/24310108 |
| Mgr. Neumannová Kamila | Moravská universita, Fakulta přírodovědecká, Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Kotlářská 2, 611 37 Brno, nejedla@sci.muni.cz |
| Ing. Nováková Barbora | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 16106 Praha 6, neumannova@genbank.vurv.cz |
| RNDr. Opatrná Jana Csc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, baruska@prfdec.natur.cuni.cz |
| RNDr. Opatrný Zdeněk CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, tel.02/36 08 56 |
| Mgr. Patočka Marek | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, opat@mail.natur.cuni.cz |
| Ing. Patzak Josef | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, kolej Voršilská 1, 110 00 Praha 1, tel.21953179 |
| RNDr. Pavingerová Daniela CSc. | Chmelařský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, svoboda@telecom.cz |
| Mgr. Petrášek Jan | Ústav molekulární biologie rostlin AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, daniela@umbr.cas.cz |
| RNDr. Pospíšková Markéta | Ústav experimentální botaniky AVČR, PřF UK, Ke dvoru 15, 160 00 Praha 6, petrasek@ueb.cas.cz |
| RNDr. Prášil Ilja T. CSc. | Šrámkova 315, 251 01 Říčany, martin@mail.natur.cuni.cz |
| Prof. Ing. Procházka Stanislav DrSc. | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Laboratoř fyziologie rostlin, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Suchdol, prasil@rlb.vurv.cz |
| Mgr. Reinöhl Vilém | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, tel.0545136070 |
| Mgr. Rolčík Martin | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, martin@vszbr.cz |
| Mgr. Rotrekl Vladimír | Universita Palackého Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, rolcikj@risc.upol.cz |
| Mgr. Říha Karel | Přírodovědecká fakulta MU, Katedra biochemie, Kotlářská 2, 611 37, rotrekl@chemi.muni.cz |
| Mgr. Sadloňová Karin | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, riha@ipb.cz |
| Mgr. Sedlářová Michaela | Akademie věd SR, Chemický ústav, Dúbravská cesta 14, 842 38 Bratislava, chemkari@savba.sk |
| RNDr. Seidlová Frideta CSc. | Vsetínská 475, 75101 Valašské Meziříčí |
| Ing. Smýkal Petr | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 160 00 Praha 6, seidlova@ueb.cas.cz |
| RNDr. Snopek Jiří CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, smykal@prfdec.natur.cuni.cz |
| Prof. RNDr. Sofrová Danuše CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, snopek@prfdec.natur.cuni.cz |
| Mgr. Soukup Aleš | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, photosyn@natur.cuni.cz |
| Soukupová Hana | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, votrub@prfdec.natur.cuni.cz |
| Ing. Stejskalová Iva | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2 Česká zemědělská universita, Katedra genetiky a šlechtění-LRE, Kamýčká 957, 165 21 Praha 6-Suchdol, stejskalova@af.czu.cz |
| RNDr. Strnadová Zdeňka | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke Dvoru 15, 166 30 Praha 6, tel.368604 |
| Ing. Svoboda Petr CSc. | Chmelařský institut, s.r.o., 438 46 Žatec, svoboda@telecom.cz |
| Mgr. Šebestová Martina | Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, sebest@risc.upol.cz |
| RNDr. Šimek Petr CSc. | Jihočeská universita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, psimek@entu.cas.cz |
| RNDr. Šindelářová Milada CSc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6, tel.24310109 |
| RNDr. Široký Jiří Csc. | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, široky@ipb.cz |
| Mgr. Štajnrtořová Olga | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, bubak@ueb.cas.cz |
| RNDr. Štorchová Helena CSc. | Botanický ústav AVČR, Průhonice, 252 43 Průhonice u Prahy, storch@ibot.cas.cz |

| | |
|---|---|
| Doc. RNDr. Tichá Ingrid CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 6, iticha@prfdec.natur.cuni.cz |
| RNDr. Tomášková Dagmar CSc. Ing. Trávníčková Alena | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 03 Praha 6, tel.360851,1.325 Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, travnickova@ueb.cas.cz |
| Ing. Truksa Martin | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, martin@vszbr.cz |
| Ing. Überall Ivo | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ivo@vszbr.cz |
| Ing. Vachůn Miroslav | Mendeleum, Fakulta zahradnická MZLU, Valtická 354, 691 44 Lednice na Moravě, vachun@vitis.bv.anet.cz |
| RNDr. Vaňková Radomíra | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, vankova@ueb.cas.cz |
| Ing. Vlašínová Helena | Mendelova zemědělská a lesnická universita, Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno |
| RNDr. Vojtěchová Martina | Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 03 Praha 6, vojtech@genbank.vurv.cz |
| RNDr. Votrubová Olga CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie a anatomie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, tel.21953185 |
| Doc.RNDr. Vyskot Boris Csc. Ing. Vyvadilová Miroslava CSc. Prof. Dr. Wagner Edgar Werner Tomáš | Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, vyskot@ipb.cz Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 03 Praha 6, tel.360851,1.325 Albert-Ludwigs-Universität, Institut für Biologie II./Botanik, Schänzlestr 1, 79104 Freiburg Universita Palackého, Laboratoř růstových regulátorů, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc |
| RNDr. Zažimalová Eva Csc. | Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6, zazimalova@ueb.cas.cz |
| RNDr. Zelenková Sylva CSc. | Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, tel.:21953279 |

GCG Sequence Analysis Software Package - an Overview

Kovařík, P.

Universita Víděň, e-mail:
pavel@gem.univie.ac.at

Fast development of new techniques in molecular biology during last ten years caused a dramatic increase in available sequence data. The management of sequence data was from several reasons a big challenge for the field of bioinformatics. First, general access to and easy analysis of sequences kept in the databases are required for ongoing evaluation of the informations stored within the sequences. Second, for the addition of new informations to the databases, a scientifically sound and widely recognized sequence analysis by the submitting research group is of great importance. Third, an easy to use software is crucial for routine techniques such as cloning and PCR, which in turn facilitate a fast progress in collecting new crude data. The GCG software package

Non-invasive monitoring of rhythmic behavior of *Chenopodium spp.*

Wagner, E., Normann, J., Albrechtová, J. T. P.
Albert-Ludwigs-Universität, Biologie II./
Botanik, Schänzlestr. 1, D-79104 Freiburg

Scientific objectives of the investigations:

Photoperiodic control of flowering is under investigation as a systemic response of photoperiod-sensitive plants. The experimental analysis aims at understanding integration of activity of the organs (root, shoot, leaves) of higher plants as they determine development in general and adaptation to specific environmental conditions. To study the inter-organ communication between the signal-perceiving organ (leaf) and the target tissue (stem/apex) implied in the control of flowering, rhythmic kinetics of stem extension rate (SER) and leaf movement (LM) were investigated in the short-day plant *Chenopodium rubrum* (*C.r.*) and in the long-day plant *Chenopodium murale* (*C.m.*).

Method used:

SER was continuously monitored using an auxanometric system while simultaneously analyzing LM via a video system. Time lapse photography clearly shows rhythmic integration of the main shoot axis and side branches in rhythmic growth as well as in leaf movements. Cytoplasmic pH at the apical meristem was analyzed using confocal laser-scanning microscopy and fluorescent dyes (presentation by J.T.P.Albrechtová).

I - Stem extension rate (SER) measurements:

Hardware: integrating stem auxanometer consisting of linear voltage differential transformer (LVDT) and generator demodulator unit (GDU)

The stem-elongation measuring and analyzing system presented here is based on LVDTs. These devices consist of a cylindrical case with a central bore in which an iron core moves freely in the direction of its longitudinal axis. Inside of the case there is an assembly consisting of one primary and two secondary electrical coils. The primary coil is supplied with modulated current (2000 Hz, 20 mA_{eff}) by the GDU. As a consequence of the electromagnetic field generated by the primary coil, voltage is induced in the secondary coils. This voltage depends in a very precise mode linearly upon the position of the iron core. Since the two secondary coils are wound in opposite direction the tension reaches zero if the core is positioned exactly between the two secondary coils, ranging from negative to positive values at the extreme positions of the core. Finally, the electrical signal is demodulated, filtered and amplified by the GDU.

Electronic signal generation

In order to achieve low costs the necessity of installing one GDU per LVDT was circumvented by using a multiplexer connecting ten LVDTs to only one GDU. The multiplexer switches in programmable time intervals from one LVDT channel to another. After half the time span between two measurements the multiplexer additionally activates the so-called signal storage unit (SSU). Since the state of the SSU is continuously registered by the running program via an analog digital converter (ADC), the status switch is used to trigger the data acquisition procedure. This behavior ensures that measurements can only be taken in a time frame outside the switching process. Thereafter, the SSU is inactivated by the program via a digital analog converter (DAC), and the cyclic data acquisition procedure is performed.

The resolution of the measuring system is increased by interposing an additional amplifier between GDU and ADC amplifying the measured voltage up to the input range of the ADC. In the last step of signal generation a 14-bit ADC converts the analog signals to digital signals to allow electronic data processing. The 14-bit ADC resolves the 20-mm measuring range of the LVDTs into 16,384 digits. Thus, the theoretical resolution of the system amounts to 1.22 mm.

Mechanical components

The link between the LVDT core and the plant consists of a polyfilamentous metal thread which ends in a hook. The latter is fixed below an internode of the stem. The temperature-dependent extension was minimized, first, by using low temperature-dependent extension metal threads instead of materials like polyester threads with a large temperature coefficient, and second by positioning the LVDT as near as possible to the plant. Friction problems, which are common to roll and balances, were avoided by using springs to provide the necessary mechanical tension to the plants.

Self adjustment of the LVDT

To allow for automatic repositioning of the LVDT core before leaving its measuring range - a prerequisite for long-term measurements - an electrical motor connected to a spindle, which moves the construction holding the LVDT, was integrated into the device. The motor is software controlled.

Light and temperature measurement

The measuring system also integrates a photo- and thermosensor unit (PTSU) which is necessary for an adequate interpretation of the plant growing behavior.

Software: on-line analyzer (OLA)

The software package OLA was designed to take full advantage of the hardware and to provide an easy-to-use tool for the experimenter.

Quality criteria of the measurement device:

The quality criteria must include every subsystem beginning with the analog digital converter (ADC) and ending with the simulation of growth by purely physical processes.

Linearity of the ADC

The analysis of the linearity of ADC revealed that the standard deviation of the residuals from the regression line amounts to 1.3 digits. With the overall measuring range of 16,364 digits, this value represents less than 0.01 % and can be completely neglected.

Stability of the ADC

The analysis of the stability of the ADC shows a standard deviation of 2 digits, which can be completely neglected.

Linearity of the LVTD

The standard deviation of the residuals of ten LVTDs from the regression line amounts to 9.4 ± 2.2 mm. This represents less than 0.02 % as compared with the measurement range of 20 mm.

Electronical noise

The next tests relate to measurement of the output tension of the LVTD with fixed, i.e. immobilized cores, thus allowing conclusions about the quality of the electronic parts of the measurement system. The precision of the ten LVTDs used amounts to 0.84 ± 0.22 mm.

Simulated growth

It is necessary to test the system under realistic, i.e. dynamic conditions. To simulate such a situation, *Sinapis alba* seeds weighing 2.7 g were put in a metal tube with a diameter of 17 mm. The seeds in the tubes were covered with a 0.137 M PEG 2000 solution in order to slow down the process of imbibing. After an initial phase of about 4 h, which seems to be related to the time span the seeds need to rearrange themselves in the tube, the noise of the measurement was of the same order as with non-growing hypocotyls. This demonstrates that the static characteristics of this device do not change significantly in the dynamic test situation.

Growth rate of synchronous and asynchronous plant populations

We could show that plants grow in a fascinatingly consonant way if one takes into consideration the endogenous rhythmic organization of behavior. Submitting the plants to a synchronization prior to the

experiment results in a very homogeneous growth response of a population of ten individual plants.

II - Leaf movements:

Leaf movements are recorded fully automatic via a video imaging system. Small convex markers from aluminum foil are fixed with a little drop of silicone grease at the leaf tips as point reflectors for the video camera. The camera is mounted on a platform which can be vertically adjusted via a software-controlled motor to assure optimal conditions for monitoring of a growing plant. The video recordings are processed by a custom-made image analysis software parallel to the SER measurements. The brightness of the picture on the computer screen is reduced to leave only the reflections of the aluminum markers as white dots. Around the white dots measuring windows are defined to register the horizontal and vertical positions of the dots.

To monitor the leaf movements continuously in light-dark cycles, the aluminum markers are illuminated with light of 950 nm from light emitting diodes (LEDs). The video camera is equipped with a 950 nm interference filter to keep out the white light from the xenon lamps (which have very low emission at 950 nm) and to permit use of only the LED light for monitoring. The level of reflection from the aluminum markers can be adjusted by changing the intensity of the LEDs.

III - Physiological results:

Our measuring system based on LVTDs allows on-line, long-term and high-resolution stem elongation measurement of ten individual plants and in addition of environmental variables like light fluence rate and temperature. Stem extension rate (SER) of *Chenopodium* plants, monitored with the described fully automated auxanometric system displays a circadian rhythm in continuous light. Under daily light-dark-cycles the pattern of SER kinetics is modulated and responds in a specific way to photoperiodic conditions which induce flowering. *Chenopodium rubrum* and *Chenopodium murale* exhibit circadian rhythms in SER with period length of 24.3 ± 0.54 h (*C.r.*) and 27.5 ± 0.5 h (*C.m.*). Flowering plants show a significantly shorter period length in SER of 23.44 ± 0.75 h (*C.r.*) and 26.6 ± 0.66 h (*C.m.*). The period length of LM reflects the kinetics in SER, displaying similar increases of frequency in the flower-induced state. While in vegetative plants of *C. murale* the kinetics of SER and LM are 180° out of phase, this phase relationship is shifted after flower induction. Both parameters display clear movement and growth patterns with photoperiod-specific reactions to 'light-on' and 'light-off' signals. Flower induction correlates to a threshold value of 0.6 (*C.r.*) and 4.0 (*C.m.*) for the ratio of integral growth during the dark span over the integral growth in the light span. Two hours after the end of the critical dark period the pattern of cytoplasmic pH at the apical meristem is changed, possibly indicating the arrival of the inductive signal.

Summary

It is proposed that leaf-apex communication involves frequency-coded (electrical) signals. Rhythmic integration over the whole plant possibly involves modulation of turgor pressure via stretch-activated ion channels and concomitant changes in membrane potential. Signal arrival at the apex might trigger changes in cytoplasmic pH as secondary messenger in photoperiodic signal transduction.

Literatur:

- LECHARNYA., WAGNER E. (1984) Stem extension rate in light-grown plants. Evidence for an endogenous circadian rhythm in *Chenopodium rubrum* L. *Physiologia Plantarum*, **60**, 437-443.
- NORMANN J. (1996) Kinetische Studien zur Analyse von Spross-Blatt Beziehungen bei der photoperiodischen Regelung der Blütenbildung von *Chenopodium rubrum* L. und *Chenopodium murale* L. Dissertation. University of Freiburg.
- RUIZ FERNANDEZ S., WAGNER E. (1994) A new method of measurement and analysis of the stem extension growth rate to demonstrate complete synchronisation of *Chenopodium rubrum* plants by environmental conditions. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 362-369.
- WAGNER E., RUIZ FERNANDEZ S., NORMANN J., BONZON M., GREPPIN H. (1993) Chronobiology: Spatio-temporal organization of living systems. In: H. Greppin, M. Bonzon, R. Degli Agosti (eds.) *Some Physicochemical and Mathematical Tools for Understanding of Living Systems*. Geneva: University of Geneva. 109-124.
- WAGNER E., KIEFER S., PENEL C., NORMANN J., RUIZ FERNANDEZ S., BONZON M. (1995) Circadian rhythms, membranes and susceptibility to environmental factors. In: T. Vanden Driessche, J.-L. Guisset, G.M. Petiau-deVries (eds.) *Membranes and Circadian Rhythms*. Springer. 187-200.
- WAGNER E., BONZON M., NORMANN J., ALBRECHTOVÁ J.T.P., MACHÁCKOVÁ I., GREPPIN H. (1996) Signal transduction and metabolic control of timing in photoperiodism. The case of flower initiation. In: H. Greppin, R. Degli Agosti, M. Bonzon (eds.) *Vistas on Biorhythmicity*. Geneva: University of Geneva. 3-23.