

- D.W.S., Mok M.C. (eds.): Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. S. 155. CRC Press, Boca Raton.
- Turner, J.E., Mok, D.W.S., Mok, M.C., Shaw, G. 1987. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 3714.
- Vaňková, R. 1999. - In: Strnad M., Peč P., Beck E. (eds.): Advances in Regulation of Plant Growth and Development. S. 67. Peres Publ., Prague, Czech Republic.
- Veatch, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W.S., Malbeck, J., Vaňková, R., Mok, M.C. 2003. - Plant Physiol. **131**: 1374.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GA AV ČR (A6038002), GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (Kontakt ME 505).

Od mikrodisekce k mapování struktury genomu

ROMAN HOBZA

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: hobza@ibp.cz)

Podstata metody

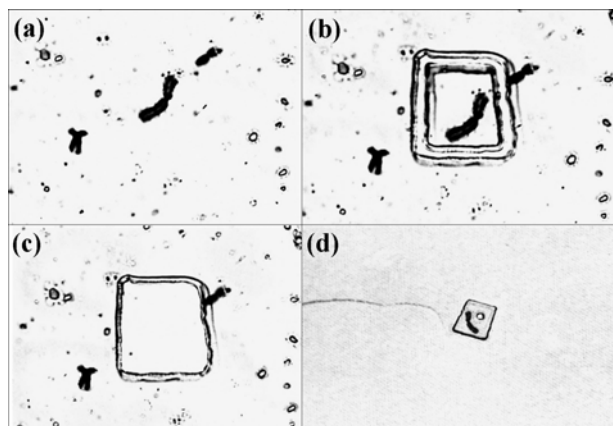
Jedna z možností, jak studovat molekulární strukturu jednotlivých chromosomů je jejich separace pro další analýzy od ostatních chromosomů genomu. Obecně lze užít buď mechanickou mikrodisekcí požadovaného chromosomu, mikrodisekcí prostřednictvím laserového zařízení nebo průtokovou cytometrií. Pro naše účely byla zvolena laserová mikrodisekce, jejíž hlavní výhodou je úplná kontrola nad disektovaným materiálem a nevýhodou omezené množství materiálu (chromosomů), jež lze touto metodou získat. Tuto nevýhodu lze ovšem prakticky obejít pomocí amplifikačního kroku za použití degenerovaných oligonukleotidů, DOP-PCR (Telenius *et al.* 1992). Touto metodou lze získat soubor fragmentů DNA o velikostech řádově od stovek bází až po více jak deset kilobází v závislosti na reakčních podmínkách PCR (Kittler *et al.* 2002).

Dalším krokem k analýze získaných sekvencí je jejich ligace s vhodným vektorem a transformace bakterií legační směsí, čímž získáme chromosomově specifickou knihovnu fragmentů DNA. Pro další charakterizaci této knihovny je vhodné ji přenést pomocí robotického zařízení do mikrotitračních destiček a následně vytvořit *array* bakteriálních kolonií přenesených definovaným způsobem na hybridizační membránu. Po imobilizaci bakteriálních klonů na membráně lze tuto membránu použít k hybridizaci s vhodnou DNA sondou, k následnému dohledání hybridizujících klonů a popřípadě jejich sekvenování a dalším analýzám. Robotická technologie, která umožňuje manipulaci s bakteriemi je v tomto případě nezbytná. Pro pokrytí celého chromosomu je totiž potřeba řádově desetitisíce klonů (v případě, že uvažujeme průměrný chromosom rýže, která má poměrně malý genom).

Pokud nechceme provádět podrobnou analýzu chromosomově specifické knihovny, lze použít DOP-PCR DNA produkt přímo jako komplexní sondu pro FISH (fluorescenční

in situ hybridizaci). Tímto přístupem je možné zjistit globální zastoupení sekvencí daného chromosomu v celém genomu.

V naší laboratoři byl pro výše uvedené analýzy zvolen rostlinný dvoudomý model *Silene latifolia* (knotovka bílá), který se vyznačuje přítomností pohlavních chromosomů X a Y (u samečka; samičky mají dva chromosomy X), jež jsou snadno od sebe i od ostatních autosomů odlišitelné a tudíž vhodné k mikrodisekci. Celá procedura začíná samotnou přípravou chromosomů. Buněčné dělení meristému kořenových špiček *Silene latifolia* je synchronizováno a poté zastaveno v metafázi, kdy jsou jednotlivé chromosomy v kondenzované podobě. Kořenový meristéum je dále působením enzymů odstraněn a izolované protoplasty fixovány (Hladilová *et al.* 1998). Metafázní protoplasty jsou nakapány na upravenou polyetylenovou membránu, která je umístěna na podložním sklíčku a pro následnou mikroskopickou analýzu obarveny (v našem případě bylo použito Giemsovo barvivo). Takto připravený preparát je umístěn do inverzního mikroskopu, který je spojen s vlastním laserovým mikrodisekčním systémem (The PALM MicroLaser system). Pomocí mikroskopu je dohledán požadovaný chromosom (obr. 1a), který je slabým laserovým paprskem ($1,5 \mu\text{J.puls}^{-1}$) ohraničen (obr. 1b) a pomocí silnějšího laserového paprsku ($2 \mu\text{J.puls}^{-1}$) katapultován do víčka mikrozkušavky (obr. 1c), kde může být úspěšnost procedury mikroskopicky ověřena (obr. 1d). Pro účely DOP-PCR je v podstatě možné použít i jediný chromosom. V našem případě jsme do každé mikrozkušavky takto převedli alespoň deset chromosomů, aby v případě částečného poškození některých z nich, například při laserové manipulaci, byla zachována komplexita vzorku.



Obr. 1. Laserová mikrodisekce chromosomu Y *Silene latifolia*. Metafázní chromosomy byly nakapány na modifikovanou polyetylenovou membránu a obarveny Giemsou. (a) Po nalezení chromosomu Y byl (b) tento chromosom pomocí laserového paprsku ohraničen a následně (c) katapultován do (d) připraveného víčka mikrozkušavky.

Příprava a využití chromosomově specifické bakteriální knihovny *Silene latifolia*

DOP-PCR DNA původem z chromosomu Y byla ligována s pGEM-T *easy* vektorem (Promega) a ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* (kmen DH5 α). Bakterie byly vysety na pevné agarové medium a jednotlivé klony roboticky přeneseny do mikrotitračních destiček (jednotlivé jamky destičky obsahovaly tekuté

kultivační medium s glycerolem). Bakterie byly přes noc inkubovány při 37 °C a následně zamraženy (-70 °C). Bakteriální knihovnu lze v této podobě dlouhodobě skladovat a současně každý klon má svoji stálou „adresu“. Jednotlivé klony byly přeneseny roboticky na hybridizační membránu (do předem definovaných seskupení), kde byly imobilizovány alkalickou lyzí. V našem případě bylo na membránu 20 × 20 cm přeneseno 20 000 klonů. Následná hybridizační analýza byla zaměřena na odhalení sekvencí specifických pro samčí chromosom Y. Toho lze dosáhnout dvěma následnými hybridizacemi, kdy se nejdříve jako sonda použije samčí genomická DNA. Pokud je bakteriální knihovna připravena reprezentativně, získáme hybridizací genomové DNA s různými klony signály různé intenzity. Následná hybridizace se samičí DNA již odhalí zajímavé klony ve vztahu k chromosomu Y. Ty, které se samičí sondou hybridizují slabě, či vůbec ne, zatímco se samčí silně, obsahují DNA, která je akumulována na chromosomu Y, popřípadě se na tomto chromosomu vyskytuje unikátně. Izolace takových DNA sekvencí je zásadní pro pochopení evoluce tohoto chromosomu, ale potažmo i pro pochopení obecných mechanismů evoluce nerekombinující DNA vůbec. Tato studie může být dále prohloubena po srovnávací hybridizaci se samčí a samičí cDNA, jež by vedla k odhalení genů specificky exprimovaných v samčích rostlinách, či k přímému dohledání konkrétního genu či sekvence v příslušné knihovně.

Obecné použití metody

Pokud zaměníme samčí a samičí genom knotovky a chromosom X a Y za zdravou a rakovinou buňku, potažmo za standardní a aberantní chromosom, je jasné, že tento přístup má širší uplatnění, než je studium evoluce pohlavních chromosomů rostlin.

FISH s komplexní DOP-PCR sondou

Pokud nás zajímá, jakým způsobem se DNA daného chromosomu podílí na stavbě ostatních chromosomů, či jak je distribuována na chromosomech příbuzného druhu, je jedním z nejrychlejších způsobů provedení fluorescenční *in situ* hybridizace s DOP-PCR (chromosomově specifickou) sondou.

Tento přístup je široce používán u živočichů k odhalování přestaveb genomů během evolučních procesů (Stanyon *et al.* 1999; Kubíčková *et al.* 2002). Zvláště významné uplatnění našla tato metoda v klinické cytogenetice, kde lze tímto způsobem dohledat typy a rozsah aberací, jež vedou k různým chorobným stavům často spojených s karcinogenesí (Pinkel *et al.* 1988). Převzít výše zmíněný přístup a použít ho u rostlinných druhů se ale neosvědčilo (Fuchs *et al.* 2001). Jako hlavní problém je zmiňována vysoká homogenizace rostlinných genomů daná jejich častými přestavbami během evoluce a všudypřítomností různých typů repetitivní DNA.

V našem případě jsme pro FISH s chromosomově specifickou DNA jako sondou opět použili DOP-PCR produkty z chromosomu X a Y knotovky bílé. Poněvadž je u knotovky známo, že se geny nacházejí pouze ve shlucích v oblastech poblíž konců chromosomů a zbytek chromosomu je převážně tvořen repetitivní DNA (Matsunaga *et al.* 2002), bylo nutné pro tzv. „*chromosome painting*“ využít komplexní DOP-PCR sondu bez odstranění této DNA, či její suprese během hybridizace, jak je obecně prováděno. Podmínky hybridizační reakce (DOP-PCR DNA byla značena Cy3-dUTP metodou *nick-translace*) byly

upraveny tak, aby během ní nedocházelo k hybridizacím s oblastmi na chromosomech, jež nemusí být zcela komplementární se sondou. Ukázalo se, že toho lze nejlépe dosáhnout zkrácením vlastní hybridizační reakce (řádově desítky minut místo hodin, či desítek hodin) za současného snížení koncentrace sondy v hybridizačním roztoku (řádově nanogramy místo stovek nanogramů). Přesto se po hybridizaci signál vyskytoval nejenom na chromosomu, ze kterého byla odvozena sonda, ale také na ostatních chromosomech. Pouze chromosom původu sondy byl ale signálem pokryt homogenně, po celé jeho délce. Ostatní chromosomy měly distribuovány signál nerovnoměrně a slaběji. Tento výsledek byl dosažen jak při použití DOP-X, tak DOP-Y sondy a zvolená metoda se tedy ukazuje jako vhodná pro studium distribuce sekvencí daného chromosomu v rámci rostlinného genomu.

Úskalí a náročnost metody

Výše zmíněné přístupy jsou v porovnání s množstvím dat, které můžeme získat, relativně časově nenáročné, ale závislé na složitém přístrojovém vybavení. Část našich experimentů byla provedena díky technické spolupráci s laboratorii Dr. Doležela (ÚEB, Olomouc) a Dr. Rubeše (VÚVL, Brno).

Při přípravě chromosomů je nutné minimalizovat dobu působení kyseliny octové ve fixáži. Tato kyselina degraduje DNA, což se může negativně projevit při DOP-PCR.

Optimalizace DOP-PCR je klíčový krok pro všechny další experimenty. Při amplifikaci vzniká často PCR produkt i v negativní kontrole bez templátu. To je dáno vzájemným nasedáním degenerovaných oligonukleotidů na sebe během reakce. Tento jev, stejně jako případnou kontaminaci cizorodou DNA lze odhalit pomocí kontrolní Southernovy hybridizace DOP-PCR DNA s vlastní genomickou DNA.

Zmíněných 20 000 bakteriálních klonů přenesených na hybridizační membránu o velikosti 20 × 20 cm je množství přibližně na hranici rozlišitelnosti lidským (autorovým) okem. Přesto je pro rychlejší zpracování lépe použít počítačové programy na analýzu obrazu.

Značení DNA pro hybridizaci na membráně bylo prováděno několika způsoby, ale jednoznačně nejlepší výsledky byly dosaženy při použití radioaktivního nukleotidu (³²P) a *nick*-translační značící reakce.

Literatura

- | | |
|---|--|
| <p>Fuchs, J., Houben, A., Brandes, A., Schubert, I. 1996. - <i>Chromosoma</i> 104: 315.</p> <p>Hladilová, R., Šíroky, J., Vyskot, B. 1998. - <i>Biotech. Histochem.</i> 73: 150.</p> <p>Kittler, R., Stoneking, M., Kayser, M. 2002. - <i>Anal. Biochem.</i> 300: 237.</p> <p>Kubičková, S., Černohorská, H., Musilová, P., Rubeš, J. 2002. - <i>Chrom. Res.</i> 10: 571.</p> <p>Matsunaga, S., Yagisawa, F., Yamamoto, M., Uchida, W., Nakao, S., Kawano, S. 2002. - <i>Genome</i> 45: 745.</p> | <p>Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J. 1988. - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85: 9138.</p> <p>Stanyon, R., Yang, F., Cavagna, P., O'Brien, P.C.M., Bagga, M., Ferguson-Smith, M.A., Wienberg, J. 1999. - <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> 84: 150.</p> <p>Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A.J., Tunnacliffe, A. 1992. - <i>Genomics</i> 13: 718.</p> |
|---|--|

Poděkování. Tato práce byla podporována GAČR (grant číslo 522/02/1485).