

od klasického modelu Watsona a Cricka. Studium konformačních vlastností trinukleotidových opakování přispívá k poznání mechanismu jejich expanze v genomech.

Literatura

- Ashley, C.T., Jr., Warren, S.T. 1995. - *Annu. Rev. Genet.* **29**: 703.
Fojtík, P., Vorlíčková M. 2001. - *Nucleic Acids Res.* **29**: 4684.
Johnson, B.B., Dahl, K.S., Tinoco, I., Jr., Ivanov, V.I., Zhurkin, V.B. 1981. - *Biochemistry* **20**: 73.
Kejnovská, I., Tůmová, M., Vorlíčková, M. 2001. - *Biochim. Biophys. Acta* **1527**: 73.

Poděkování. Tato práce byla podporována granty A 4004201 GA AVČR a 204/01/0561 GAČR.

Nové metody fyzikálního mapování genomů rostlin

EDUARD KEJNOVSKÝ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 194, e-mail: kejnovsk@ibp.cz)

Úvod

Potřeba účinnější analýzy vysoce komplexních genomů rostlin a živočichů, představovaná často genomovými projekty, vede k zavádění stále nových sofistikovaných metod umožňujících sledovat genomy jako celek a v širších souvislostech, především evolučních. Zde bude pojednáno o některých moderních technikách používaných v naší laboratoři při studiu struktury a evoluce pohlavních chromosomů rostlin, které jsou však použitelné obecně při studiu genomů rostlin. Jedná se o (i) konstrukci a využití BAC knihoven a dále techniky fyzikálního mapování genomů pomocí (ii) FISH s využitím BAC klonů a (iii) lokalizaci genů pomocí PCR na tříděných chromosomech.

Rostlinné BAC knihovny

Pilířem současné stukturní genomiky je existence systémů umožňujících klonování dlouhých fragmentů DNA. Patří sem jednak kosmidové vektory dovolující klonovat fragmenty o délce desítek kb, jednak vektory typu YAC (*yeast artificial chromosome*), BAC (*bacterial artificial chromosome*) a PAC (*P1-derived artificial chromosome*) s fragmenty o velikosti stovek kb. V současné době se staly klonovacím systémem první volby vektory typu BAC (Schizuya *et al.* 1992), vyznačující se oproti dříve používaným vektorům YAC řadou výhod vyšší stabilitou inzertu, nízkým chimerismem, snadnější manipulací. Většina současných genomových projektů je na bázi BAC knihoven. Základní kroky při konstrukci a využití rostlinných BAC knihoven jsme popsali dříve (Kejnovský 2000). BAC klony umožňují studovat organizaci sekvencí DNA v širším kontextu, např. geny s jejich regulačními oblastmi. Lze izolovat často dlouhé intaktní elementy,

např. retroelementy. Studium celých shluků tandemových repeticí v dlouhých úsecích může vypovídat o mechanismech jejich evoluce.

V naší laboratoři jsme konstruovali částečnou BAC knihovnu *Silene latifolia*. Byly použity samčí rostliny obsahující pohlavní chromosomy X a Y. Při konstrukci knihovny je kritickým faktorem integrity izolované genomové DNA. Osvědčila se nám izolace DNA z jader v agarosových bločcích, v nichž byla DNA rovněž štěpena restriktasami. Restrikční fragmenty byly extrahovány z agarosy elektroelucí a ligovány s vektorem pBeloBAC11. Alternativní přístup izolace DNA pomocí štěpení agarosy enzymem gela-sou vedl k nižším délkám klonovaných fragmentů, což bylo zřejmě způsobeno tvorbou zlomů v DNA během tavení agarosy při vyšší teplotě. Zjistili jsme také, že DNA musí být ligována s vektorem bezprostředně po její izolaci z agarosy, aby nedocházelo k její degradaci v roztoku. Analýza klonů BAC knihovny spočívala především ve stanovení délky inzertů pomocí pulzní elektroforézy. Průměrná délka inzertů naší knihovny byla 125 kb, což v případě rostlinné BAC knihovny svědčí o její dobré kvalitě.

Skríníng BAC knihovny

Jednotlivé BAC klony byly uspořádány na membrány pomocí robotu (spolupráce s dr. Macasem, ÚMBR, České Budějovice) a poté byl proveden skríníng klonů různými sondami pomocí metody hybridizace bakteriálních kolonií (*colony hybridisation*). Byly použity sondy s cílem najít BAC klony obsahující geny (sondou byla cDNA), retroelementy (sondou byla sekvence DNA kódující konzervativní doménu reversní transkriptasy) a sekvence specifické nebo akumulované na pohlavních chromosomech X a Y (hybridizující s DOP-X nebo DOP-Y sondami, nebo silněji se samčí než se samičí genomovou DNA). Sondy DOP-X a DOP-Y byly připraveny pomocí DOP PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*) na tříděných chromosomech X (spolupráce s doc. J. Doleželem, ÚEB, Olomouc) a na mikrodisektovaných chromosomech Y (spolupráce s doc. J. Ruběšem, VÚVL, Brno).

Testovali jsme rovněž použitelnost techniky DNA *microarrays* pro skríníng BAC knihovny (spolupráce s prof. Heslop-Harrisonem, Norwich, UK). Pomocí souprav (Oia-gen a Machery Nagel) byla izolována BAC DNA paralelně vždy po 96 vzorcích. BAC DNA byla robotem natištěna na speciálně upravená skla a provedena FISH. Výpovědní hodnota a reprodukovatelnost výsledků získaných technikou DNA *microarrays* byla v našich experimentech nižší ve srovnání s hybridizacemi bakteriálních kolonií.

FISH s použitím BAC klonů (BAC-FISH)

Současné studie ukazují, že BAC klony jsou také nadějnými nástroji fyzikálního mapování genomů pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) umožňující přímou vizualizaci distribuce sekvencí DNA v chromosomech. U rostlin totiž, na rozdíl od živočichů, není FISH se sondami kratšími než 10 kb (jedinečné sekvence) dostatečně spolehlivá. To si vynutilo použití delších sond. Nedávné práce ukázaly použitelnost BAC klonů obsahujících 40 - 100 kb inzerty pro lokalizaci unikátních sekvencí u rostlin pomocí FISH (Lapitan *et al.* 1997). Repetitivní sekvence DNA často přítomné v BAC klonech mohou být suprimovány během hybridizace, což umožní detekci jedinečných sekvencí. Tuto metodu – „BAC-FISH“ – lze použít nejen k lokalizaci genů na chromosomech, ale i k po-

rovnání jejich pořadí na chromosomech u příbuzných druhů (Zweig *et al.* 1998). Protože je pořadí genů na chromosomech často konzervováno (tzv. syntenie či kolinearita), mohou být sondy vytvořené z jednoho druhu použity u druhu jiného. To může urychlit mapování genomů, obzvláště tehdy, pokud jsou použity BAC klonů z druhu s malým genomem, např. rýže, k identifikaci homologických oblastí příbuzného druhu s velkým genomem, např. pšenice a ječmen (Keller a Feuillet 2000).

Naše BAC-FISH experimenty ukázaly, že značná část testovaných BAC klonů „malovala“ celé chromosomey, zřejmě v důsledku přítomnosti repetitivních obsažených v těchto BAC klonech a vysoké homogenizace sekvencí DNA v rostlinných genomech ve srovnání s genomem živočichů (Schmidt a Heslop-Harrison 1998). Druhou nejpočetnější skupinu BAC klonů tvořily ty, které hybridizovaly do subtelomerických oblastí všech chromosomech. Zde se nacházejí i tandemové repetice popsané dříve v naší laboratoři (Bůžek *et al.* 1997). Jiné BAC klonů naopak hybridizovaly podél celých chromosomech s výjimkou centromerů a konců chromosomech. Několik klonů obsahovalo 45S rDNA a hybridizovalo do míst rDNA klastrů. Podařilo se získat i BAC klonů dávající diskrétní FISH signály na pohlavních chromosomech. Zde se nabízí možnost jejich využití jako markerů k identifikaci homologického páru autosomů u hermafroditických druhů rodu *Silene*, které nemají pohlavní chromosomey (ale mají stejný počet chromosomech), a testovat hypotézu vzniku pohlavních chromosomech z páru autosomů. Dva BAC klonů hybridizovaly přednostně na chromosomech Y. Jejich analýza vedla k izolaci repetitivních sekvencí akumulovaných na chromosomech Y. Amplifikace sekvencí DNA v nerekombinujících oblastech chromosomech Y zřejmě představuje hlavní mechanismus jeho zvětšování v porovnání s autosomy.

Lokalizace genů pomocí PCR na tříděných chromosomech

K lokalizaci genů na chromosomech lze použít jak genetické tak fyzikální techniky. U genetických metod není lokalizace v případě pohlavních chromosomech jednoznačná, neboť nelze rozlišit mezi jejich lokalizací na autosomech a v pseudoautosomální oblasti pohlavních chromosomech. Fyzikální techniky zahrnují *in situ* hybridizaci a PCR na tříděných nebo mikrodisektovaných chromosomech. *In situ* hybridizace u rostlin však není dostatečně spolehlivá pro mapování krátkých sekvencí DNA, tedy i genů, a mikrodisekce je příliš pracná a vede k získání pouze malého počtu chromosomech. PCR na tříděných chromosomech tak představuje vysoce citlivou a spolehlivou metodu lokalizace genů či jiných sekvencí DNA (Macas *et al.* 1993).

V naší laboratoři využíváme uvedenou techniku k lokalizaci genů na pohlavních chromosomech *Silene latifolia*. Třídění pohlavních chromosomech pomocí průtokové cytometrie u *S. latifolia* je umožněno podstatnými rozdíly ve velikostech pohlavních chromosomech a autosomů, kde pohlavní chromosomey jsou přibližně dvojnásobné oproti autosomům, a chromosomech Y je $1,4 \times$ větší než chromosomech X. Čistotu tříděných frakcí jsme sledovali tak, že paraleleně s tříděním chromosomech do zkumavek na PCR byly chromosomey tříděny také na podložní skla a prováděna FISH se sondou specifickou pro autosomy, čímž se stanovila míra kontaminace pohlavních chromosomech autosomy. S cílem zvýšit čistotu frakcí jsme prováděli biparametrické třídění, kdy jsme současně sledovali obsah DNA a délku chromosomech a navíc jsme prováděli *resorting*. Takto tříděné chromosomey jsme používali jako templát pro PCR k přímé lokalizaci genů. Po urči-

tých modifikací PCR vedoucích k vyšší citlivosti jsme byli schopni získat specifický PCR produkt již při použití pouhých 5 chromosomů. Zjistili jsme, že geny specificky exprimované v samčích pohlavních orgánech se nacházejí jak na pohlavních chromosomech, tak i na autosomech (Kejnovský *et al.* 2001). Dále jsme prokázali duplikativní přenos homeotického rostlinného genu na chromosom Y u *S. latifolia* (Matsunaga *et al.* 2003).

Literatura

- Bůžek, J., Koutníková, H., Houben, A., Říha, K., Janoušek, B., Šíroky, J., Grant, S., Vyskot, B. 1997. - *Chromosome Res.* **5**: 57.
 Kejnovský, E. 2000. - *Biol. listy* **65**: 181.
 Kejnovský, E., Vrána, J., Matsunaga, S., Souček, P., Šíroky, J., Doležel, J., Vyskot, B. 2001. - *Genetics* **158**: 1269.
 Keller, B., Feuillet, C. 2000. - *Trends Plant Sci.* **5**: 246.
 Lapitan, N., Brown, S.E., Kennard, W., Stephens, J.L., Knudson, D.L. 1997. - *Plant J.* **11**: 149.
 Matsunaga, S., Isono, E., Kejnovský, E., Vyskot, B., Doležel, J., Kawano, S., Charlesworth, D. 2003. - *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1062.
 Macas, J., Doležel, J., Lucretti, S., Pich, U., Meister, A., Fuchs, J., Schubert, I. 1993. - *Chromosome Res.* **1**: 107.
 Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. 1998. - *Trends Plant Sci.* **3**: 195.
 Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiri, Y., Simon, M. 1992. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794.
 Zweick, M.S., Islam-Faridi, M.N., Czeschin, D.G., Wing, R.A., Hart, G.E., Stelly D.M., Price H.J. 1998. - *Genetics* **148**: 1983.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována GAČR (521/02/0427).

Fluorometrická metoda pro *in vitro* měření ligandem otevíraných iontových kanálů pro Ca^{2+} v rostlinách

ONDŘEJ KRINKE¹, ZUZANA NOVOTNÁ¹, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, ²Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, (tel.: 296 780 416, e-mail: martinec@ueb.cas.cz)

Úvod

Přenos signálů založený na změnách cytosolické koncentrace Ca^{2+} je dobře popsán v živočišných (Bootman *et al.* 2001) i v rostlinných buňkách (Sanders *et al.* 1999). Aktivitou enzymů signálních drah vznikají v buňce molekuly druhých posílů, např. *D-myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát (InsP_3), který pak otevírá specifické iontové kanály pro Ca^{2+} a zvyšuje tak koncentraci Ca^{2+} v cytosolu, která dále ovlivňuje enzymy v signální kaskádě.

Pro *in vitro* studium iontových kanálů pro Ca^{2+} na rekonstituovaných membránových váčcích existuje několik principiálně odlišných metod. Relativně jednoduchá provedením a nenáročná na vybavení je filtrační radiometrická metoda (Brosnan a Sanders 1990), kde je v odebíraných vzorcích reakční směsi měřen obsah $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uvnitř rekonstituovaných membránových váčků. Velkou nevýhodou tohoto uspořádání je jeho diskontinualita, která