

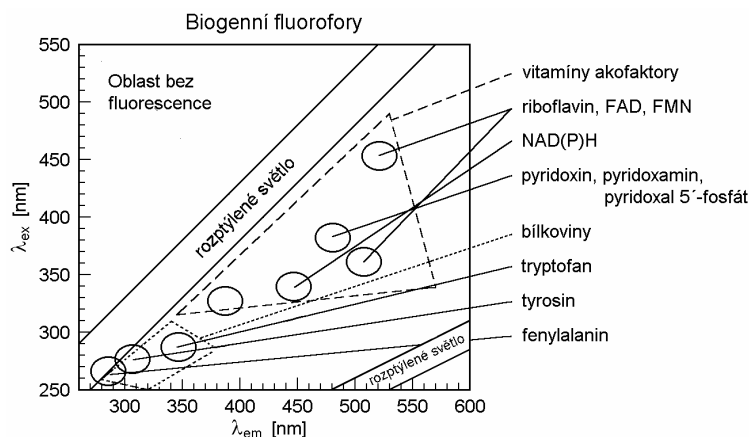
Využití dvourozměrné fluorescenční spektroskopie pro stanovení množství a viability buněk tabáku

RADOMÍRA VAŇKOVÁ, ALENA GAUDINOVÁ

Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6,
(e-mail: vankova@ueb.cas.cz)

Podstata metody

Podstatou dvourozměrné fluorescenční spektroskopie (2-D FS) je měření intenzity fluorescence v širokém rozmezí excitačních a emisních vlnových délek. Tato metoda umožňuje stanovení excitačního a emisního maxima více fluoroforů zároveň. Poloha excitačního a emisního maxima charakterizuje daný fluorofor, přičemž intenzita fluorescence odpovídá jeho koncentraci. Vzhledem k tomu, že fluorofory nemohou vyzářit větší energii než pohlí, platí pro oblast fluorescence, že emisní vlnová délka (λ_{em}) je větší než excitační vlnová délka (λ_{ex}). Oblast fluorescence je ohraničena diagonálou rozptýleného světla, kdy λ_{em} se rovná λ_{ex} . V oblasti λ_{ex} 250 - 300 nm a λ_{em} 270 - 360 nm fluoreskují aromatické aminokyseliny, zejména tryptofan (obr. 1). Oblast λ_{ex} 310 - 460 nm a λ_{em} 380 - 530 nm je charakteristická pro vitaminy a kofaktory.



Obr. 1. Excitační a emisní maxima přirozených fluoroforů.

Pomocí 2-D FS byla měřena hladina tryptofanu, na jejímž základě byl sledován nárůst biomasy u *Saccharomyces cerevisiae* (Marose *et al.* 1998). Hladina NAD(P)H se osvědčila jako nejlepší kritérium při sledování množství biomasy mikrobiálních buněk *Pseudomonas sp.* (Podrazký *et al.* 2003). Dále byla tato metoda použita pro sledování fluorescenčních látek, ať již jejich tvorby (např. ergotových alkaloidů u *Claviceps purpurea*) nebo rychlosti jejich katabolismu (degradace fenantrenu u *Sphingomonas yanoikuyae*) (Marose *et al.* 1998). 2-D FS je možno využít také k měření nejrůznějších enzymových aktivit, pokud je k dispozici vhodný fluorogenní substrát.

Stanovení viability buněk

Možnosti stanovení viability

Životnost buněk lze posuzovat podle řady kritérií. Mezi nejběžnější patří stanovení intaktnosti membrány (vitálním barvením trypanovu modří) nebo enzymové aktivity (oxidoreduktasa - pomocí trifenylnitroimidazoliumchloridu nebo esterasa - pomocí diacetátu fluoresceinu, FDA). Fluorescein, který vzniká z FDA působením esteras, patří k nejsilněji fluoreskujícím látkám. Obvyklé vyhodnocování podílu živých a mrtvých buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu je ovšem velmi zdlouhavé a namáhavé, navíc je hodnocení založeno na principu „ano/ne“. Stanovení hladiny fluoresceinu pomocí 2-D FS umožňuje kvantifikaci esterasové aktivity. Protože stanovená hodnota závisí jak na metabolické aktivitě buněk, tak na jejich množství, je při stanovení viability pomocí fluorescence fluoresceinu, jako jediného parametru, nezbytné udržovat ve všech vzorcích stejný počet buněk.

Vlastní postup

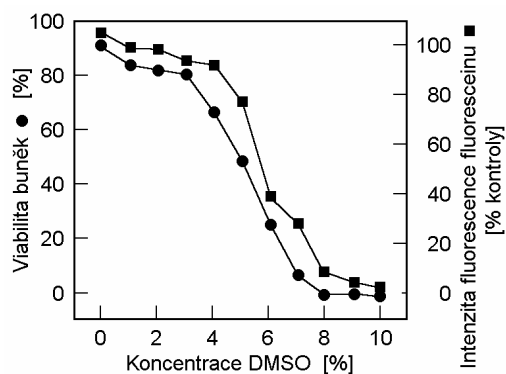
Při měření viability pomocí 2-D FS byly volné buňky nebo alginátové částice s imobilizovanými buňkami odsáty, promyty vodou a inkubovány 10 minut ve vodném roztoku FDA, fluorescence fluoresceinu obvykle narůstá 3 minuty a pak je stabilní asi 40 minut (Vaňková 2000). Zásobní roztok FDA v acetonu (0,5 % w/v) byl uchováván zamraženým po malých dávkách a bezprostředně před měřením byl zředěn (1 : 1000) příslušným objemem vody. Fluorescenční spektra byla měřena buď v klasickém uspořádání, kdy je vzorek umístěn v křemenné kyvetě a k měření je použit horizontální paprsek, za použití světlovodných vláken (vnitřní průměr 3 mm, LUMATECH GmbH, Německo) nebo v ploché kyvetě umístěné v úhlu 45 ° vůči excitačnímu paprsku.

Experimentální uspořádání

V případě rostlinných buněk dochází v horizontálním uspořádání při použití hustší suspence ke stínění (nad 2×10^5 buněk.ml⁻¹). Další komplikací jsou změny fluorescence způsobené relativně rychlou sedimentací buněk. Z důvodu minimalizace experimentálních chyb je nutné používat nižší koncentrace buněk a dodržovat standardní postup (rozmíchat a ihned změřit). Použití světlovodných vláken umožňuje odstranit negativní vliv sedimentace (možnost vertikálního uspořádání), ale zase dochází ke značným ztrátám záření, bohužel hlavně v oblasti 200 - 350 nm. Toto uspořádání je možné využít pro měření obsahu fluoresceinu (při vysoké esterasové aktivitě buněk), ale nikoliv při sledování přirozených fluoroforů. Jako optimální uspořádání se ukázala plochá kyveta umístěná v úhlu 45 ° vůči excitačnímu paprsku. V případě buněk imobilizovaných v lginátu stačí standardní 1 cm kyveta naplněná jednou kompaktní vrstvou alginátových kuliček.

Ověření použitelnosti 2-D FS pro stanovení viability

2D-FS byla použita pro stanovení viability buněk tabáku (BY-2) inkubovaných v DMSO (0 – 10 % v/v) (Vaňková *et al.* 2001). Velmi dobrá korelace výsledků získaných 2-D FS a mikroskopickým stanovením počtu živých a mrtvých buněk po obarvení trypanovou modří prokázala použitelnost 2-D FS pro měření viability buněk (obr. 2).



Obr. 2. Srovnání stanovení viability buněk tabáku pomocí fluorescence fluoresceinu a mikroskopickým vyhodnocením po barvení trypanovou modří (podle Vaňková *et al.* 2001).

Stanovení množství buněk

Nárůst biomasy pomocí 2-D FS může být sledován buď prostřednictvím měření fluorescence fluoresceinu nebo přirozených fluoroforů - proteinů a NAD(P)H. Velmi dobrá korelace fluorescence fluoresceinu a čerstvé hmoty, resp. sušiny, buněk byla získána při měření nárůstu biomasy buněk BY-2 uvnitř částic alginátu při použití ploché kyvety (v oblasti nad 15 mg sušiny/100 kuliček). Čerstvá hmota a sušina buněk byla stanovena po rozpuštění alginátových částic v 0,5 M citrátu. Nezbytným předpokladem je konstantní metabolická aktivita buněk. Viabilita buněk BY-2 během kultivace byla sledována barvením trypanovou modří a pohybovala se v rozmezí +/- 5 %.

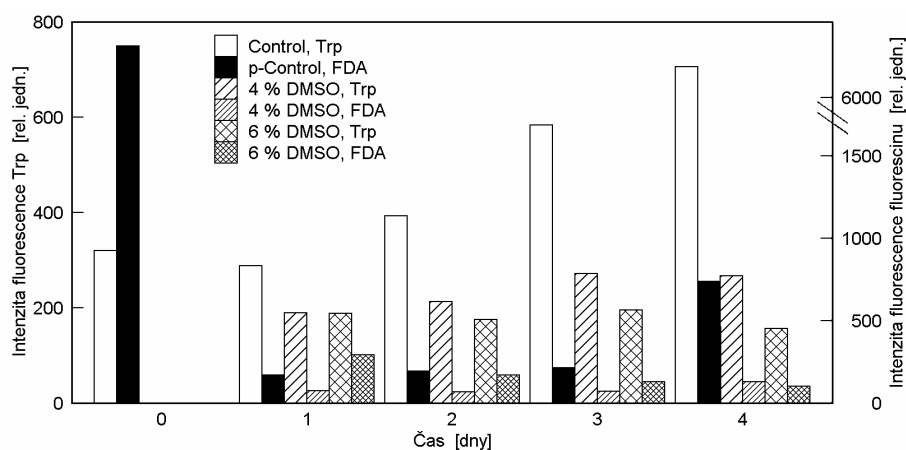
Dobrá korelace mezi fluorescencí a čerstvou hmotou, resp. sušinou, buněk tabáku byla zjištěna při měření fluorescence tryptofanu, ale nikoliv u NAD(P)H, na rozdíl od situace u mikrobiálních buněk *Pseudomonas sp.* U buněk tabáku je hladina NAD(P)H tak nízká, že její změny lze jen obtížně detegovat.

Simultánní stanovení nárůstu biomasy a metabolické aktivity

V řadě experimentů může docházet současně ke změně počtu buněk a jejich metabolické aktivity. V takových případech je nutné měřit fluorescenci fluoresceinu a tryptofanu současně. Průběh fluorescence tryptofanu poskytuje informace o množství biomasy a porovnání průběhu fluorescence fluoresceinu a tryptofanu umožňuje vyhodnotit příspěvek zvýšeného počtu buněk a určit část fluorescence, která odpovídá případné změně metabolické aktivity. Tímto způsobem byl sledován vliv koncentrace DMSO na růst a metabolickou aktivitu buněk tabáku imobilizovaných v pektátu (obr. 3). Zatímco v plném mediu došlo po prodloužené *lag*-fázi k nárůstu množství buněk a jejich aktivity, 4 % DMSO byl buňkami tolerován a 6 % DMSO již měl letální účinky.

Závěr

Pomocí 2-D FS lze současným stanovením hladiny tryptofanu a fluoresceinu sledovat změny viability buněk a jejich množství, a to jak v suspensi, tak i v imobilizovaných buňkách (za předpokladu, že použitý nosič je průhledný nebo alespoň průsvitný).



Obr. 3. Fluorescence tryptofanu a fluoresceinu v buňkách BY-2 imobilizovaných v pektátu a inkubovaných v plném mediu nebo v mediu s přidavkem DMSO (4 % nebo 6 %).

Literatura

- Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T. 1998. - *Biotechnol. Prog.* **14**: 63.
 Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, A. 2003. - *Folia Microbiol.* **48**: (2) 189.
 Vaňková, R. 2000. - *Biol. listy* **65**: 299.
 Vaňková, R., Kuncová, G., Opatrná, J., Šusenbeková, H., Gaudinová, A., Vaněk, T. 2001. - *Plant Cell Rep.* **20**: 41.

Poděkování. Tento projekt vznikl za podpory grantů MŠMT COST OC 840.20 a 840.10.

Modely vývojové biologie rostlin

BORIS VYSKOT

Biofyzikální ústav AV ČR, Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel./fax: 541 240 500, e-mail: vyskot@ibp.cz, www.ibp.cz/labs/PDG/)

Syntetický charakter a historie vědního oboru

Vývojová biologie (*developmental biology*) je poměrně novým syntetickým oborem, pokud se týká tradice termínu a jeho zařazení mezi ostatními biologickými disciplínami. Vývojem máme na mysli ontogenesi neboli individuální vývoj od splývání gamet, přes embryogenesu a dospívání, po stárnutí až smrt jedince. Individuální vývoj se vymezuje od vývoje historického, či evolučního. Oba tyto distinktní typy vývoje (pro které máme v češtině v podstatě jen tento jediný akceptovaný termín) však spolu zákonitě souvisejí. Reiterací dynamického procesu ontogenese a jeho modifikací v historickém časovém makrozměru můžeme dospět k pochopení evoluční biologie. Určitá, někdy i formální podobnost obou procesů vedla v minulosti k mnohým filosofisujícím úvahám, z nichž nejznámější jsou „rekapitulační“ teze Ernsta Haeckela (1834-1919) a „fylotypové“ zákony Karl Ernsta von Baera (1792-1876). Ještě v nedávné době (zhruba do poloviny 20.