

Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

1. Historie objevu modelu protoplastů
2. Metody přípravy protoplastů
3. Metody regenerace buněčné stěny u protoplastů
4. Fuze protoplastů
5. Genetická transformace kvasinek na modelu protoplastů
6. Sexuální hybridizace u protoplastů

1. Historie objevu

- Protoplasty rostlinných buněk (Klebs 1887, Townsend 1897)
- Sféroplasty, L-formy a protoplasty bakterií (Weibull 1953, Dienes 1939, Kandler, 1954)
- O. Nečas a plasmatické koule kvasinek (Nečas 1954)
- Autolytické protoplasty (Nečas 1955)
- Protoplasty připravené lýzou b. stěny helikázou (Eddy a Williamson, 1959)
- Regenerace protoplastů v gelech

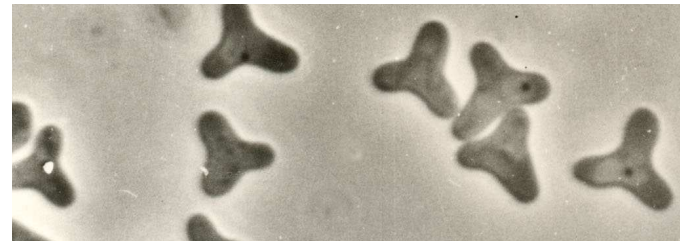
2. Metody přípravy protoplastů

- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
 - Výběr osmotika - sorbitol, mannitol, KCl, MgSO₄ a koncentrace
 - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol aj

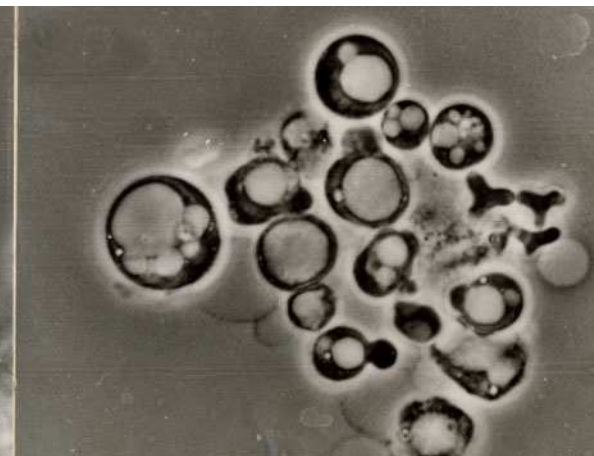


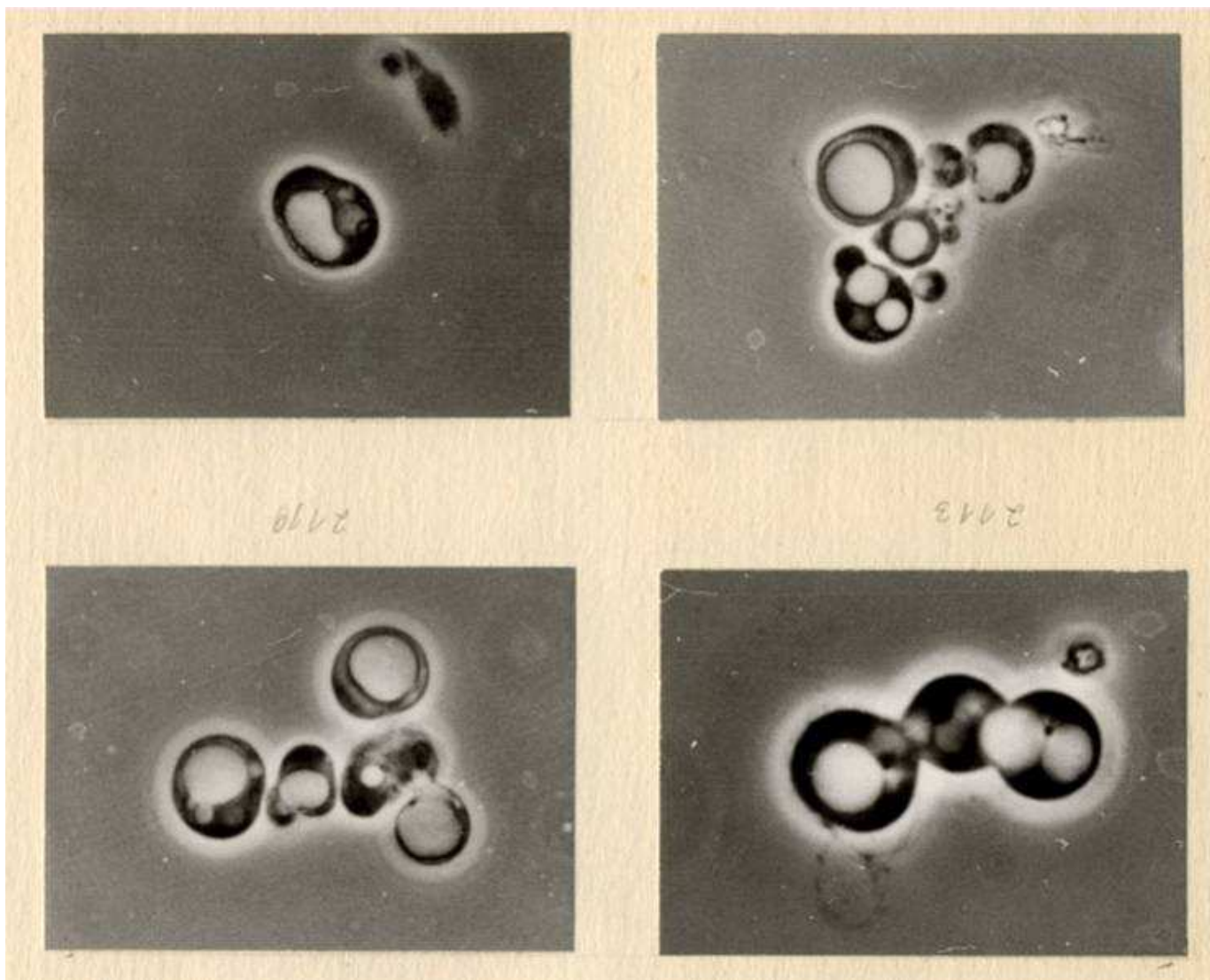
Saccharomyces cerevisiae

Trigonopsis variabilis



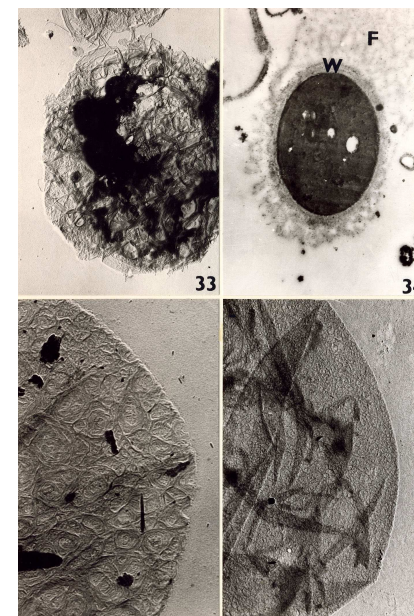
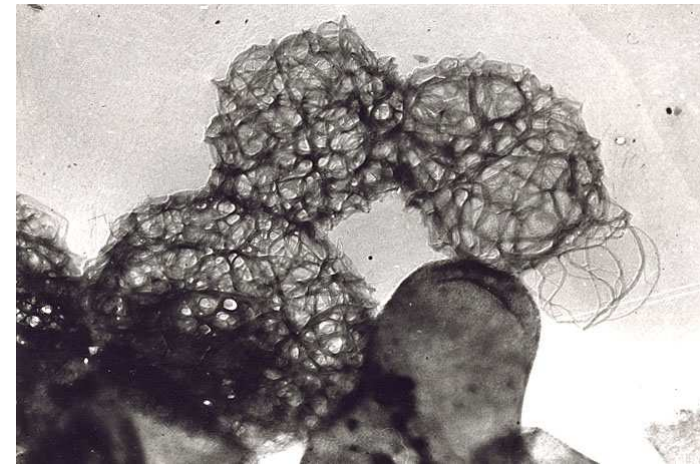
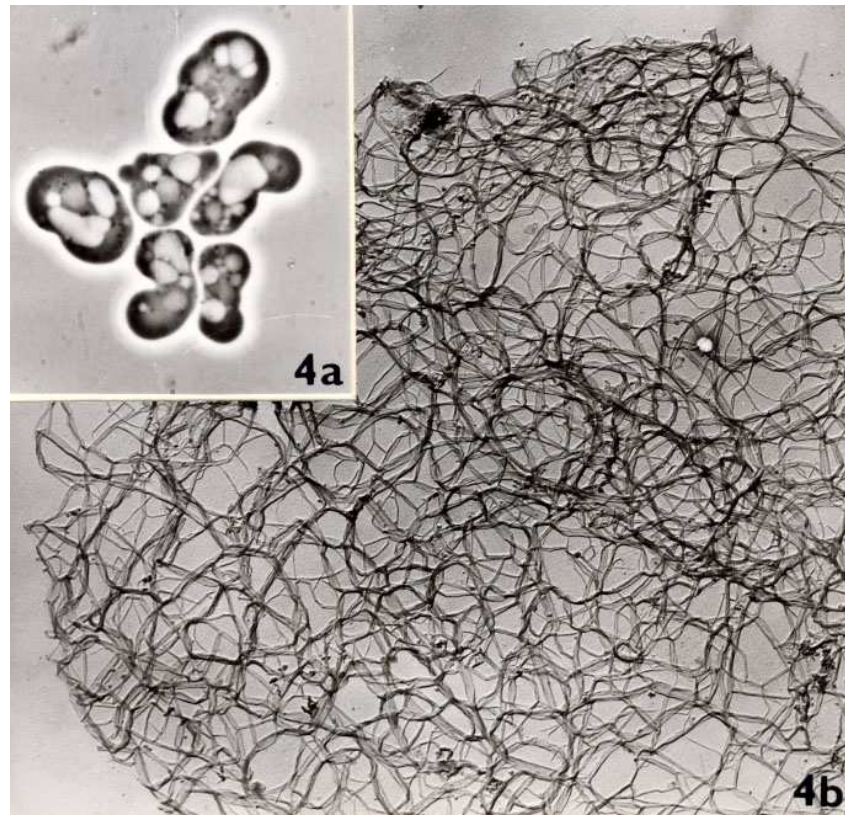
Buňky a čerstvě vytvořené protoplasty





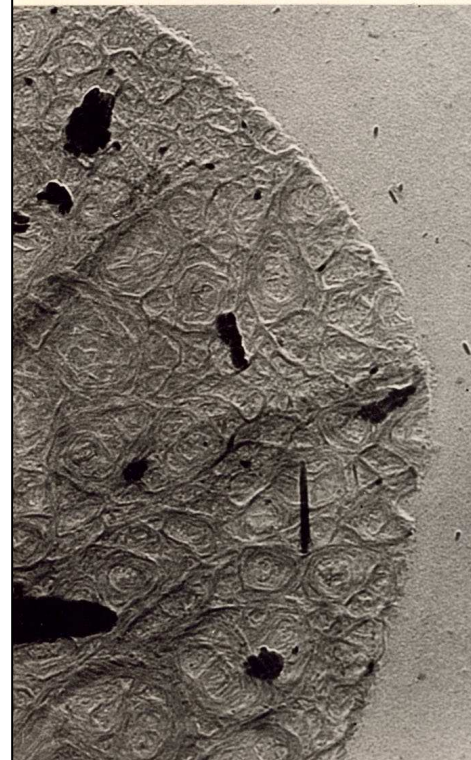
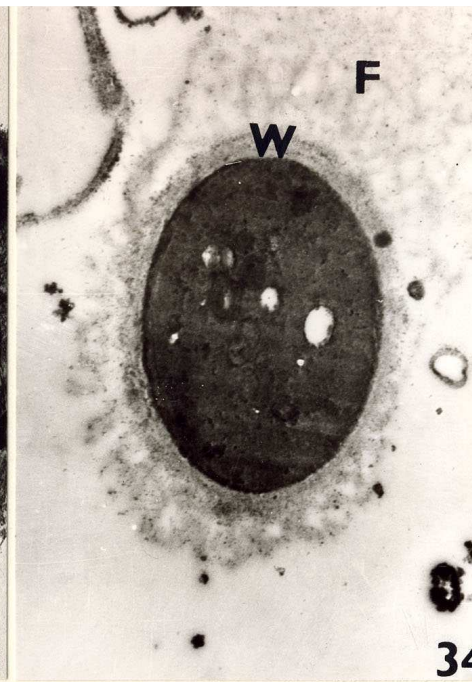
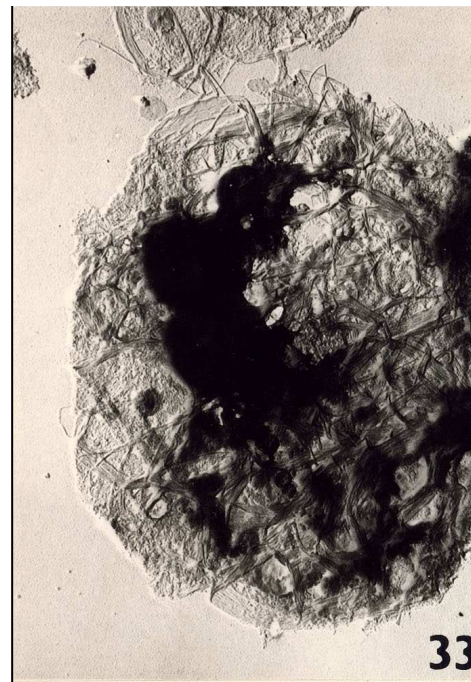
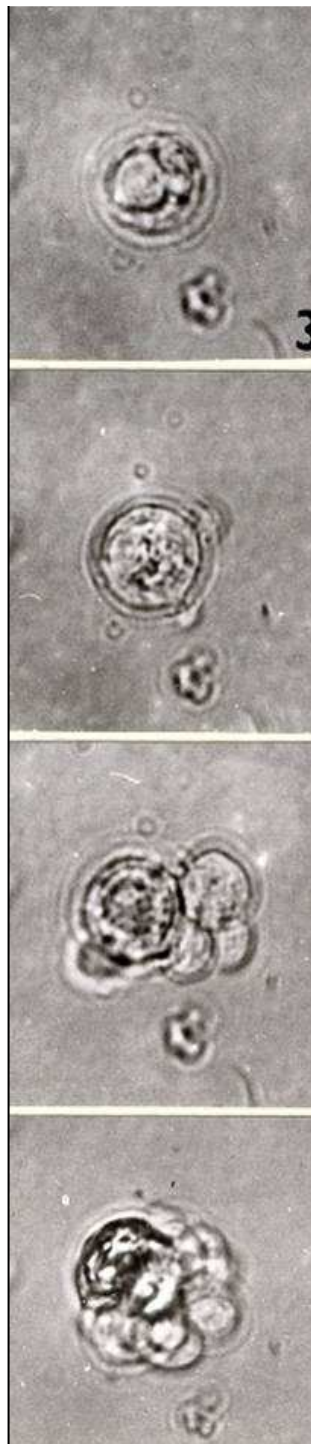
Růst protoplastů v tekutém mediu nebo na povrchu agarových filmů: jádra se dělí, cytoplasma vytváří vakuolizované útvary.

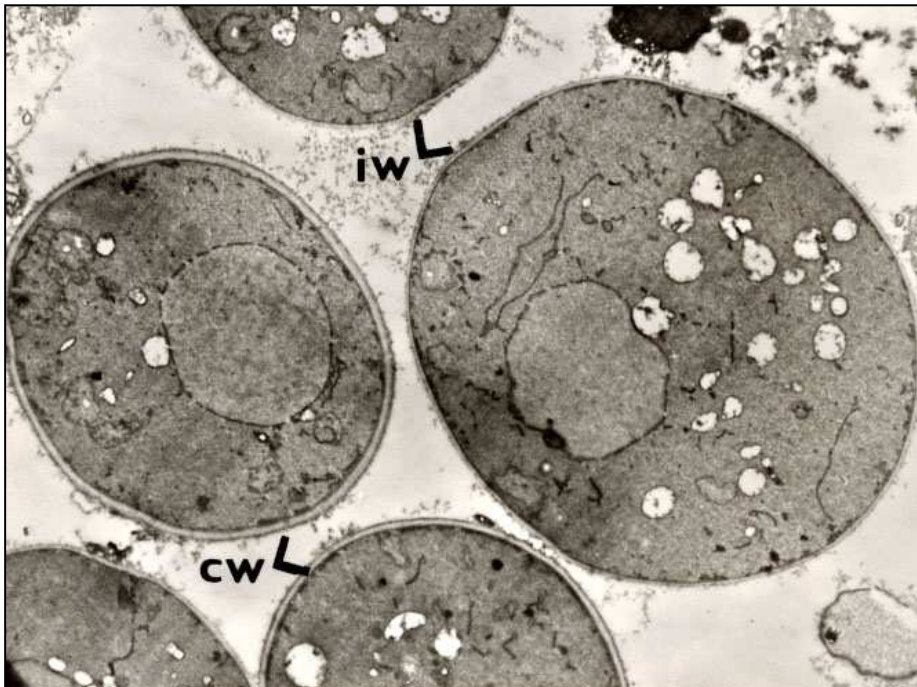
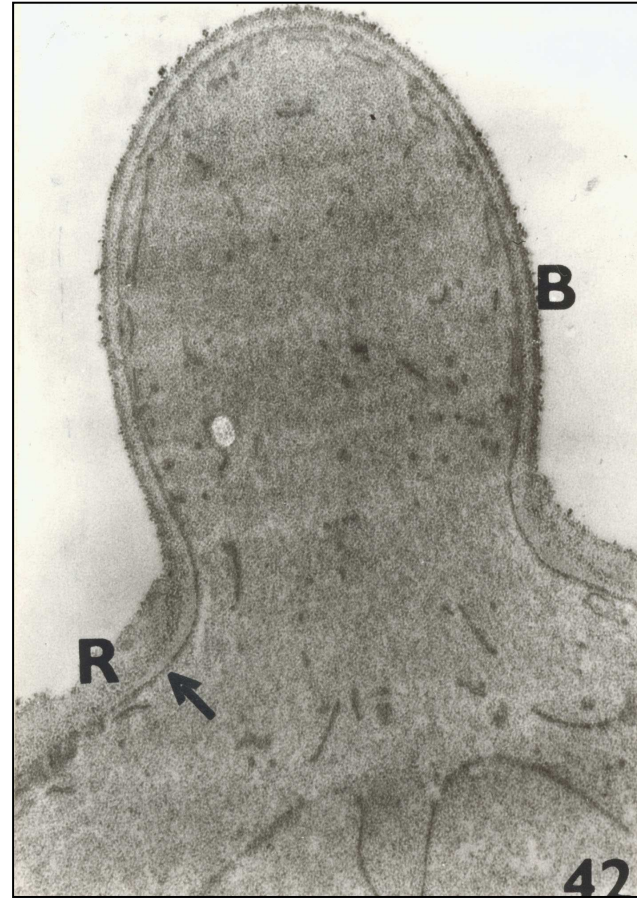
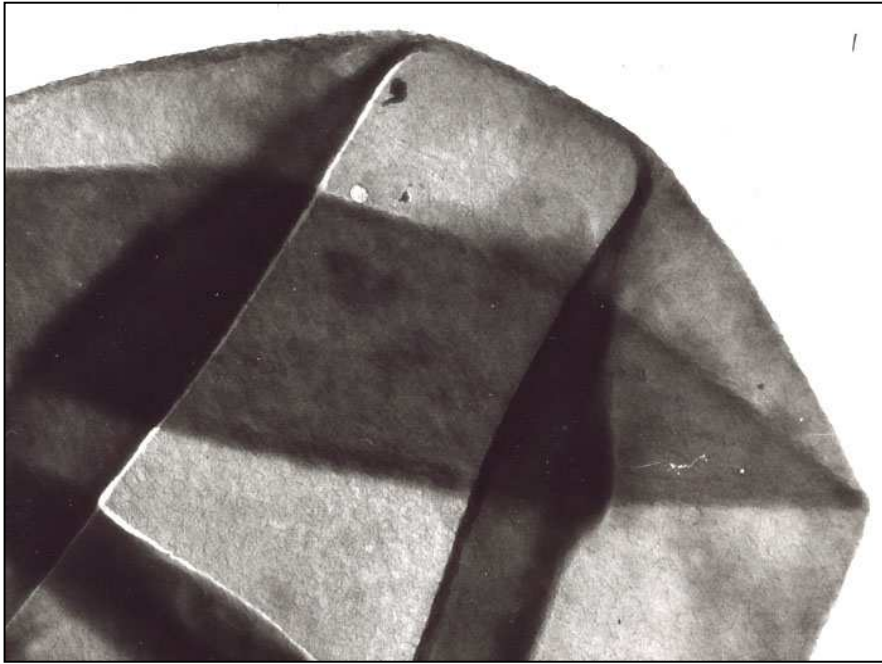
Regenerace buněčné stěny na povrchu protoplastů při kultivaci v tekutém mediu a v gelu



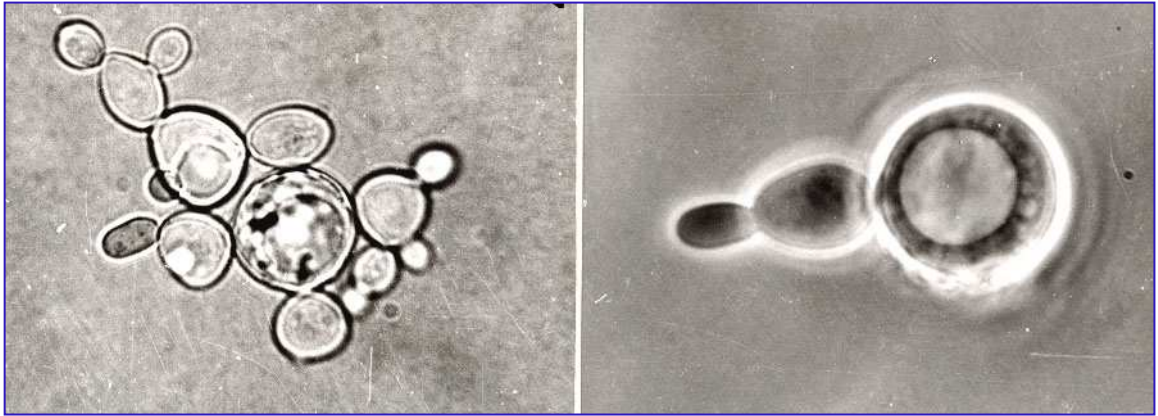
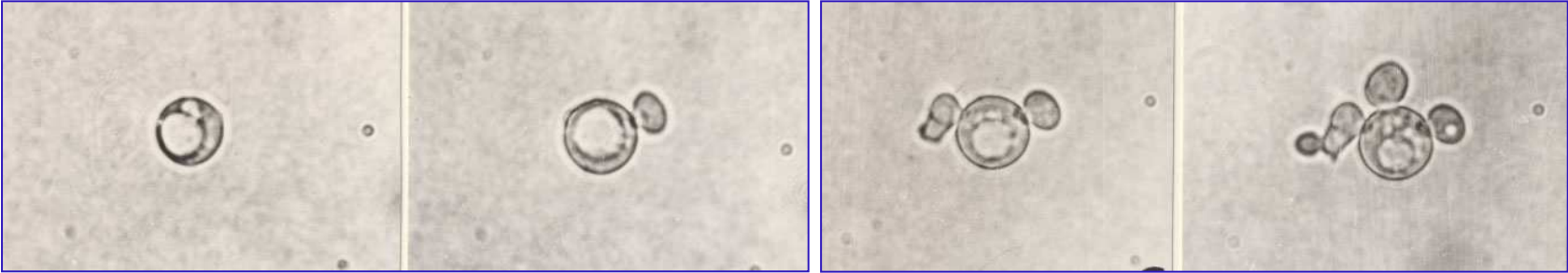
Tvar rostoucího protoplastu je není určován regenerující buněčnou stěnou, ta jen modifikuje morfologii rozpínající se cytoplasmy

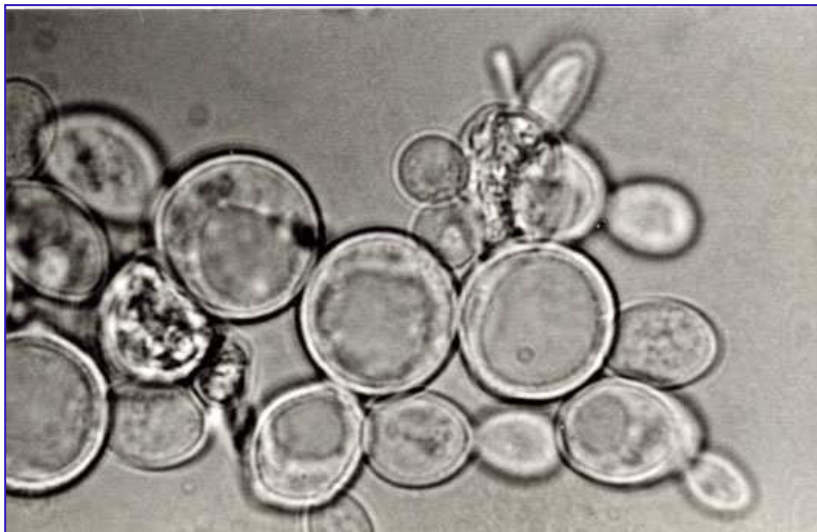
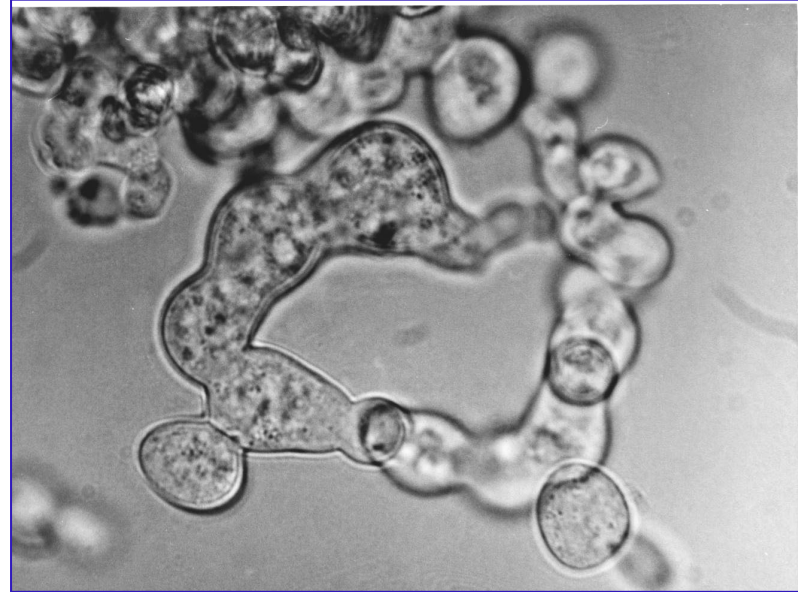
Regenerace
protoplastů v
želatinovém
gelu



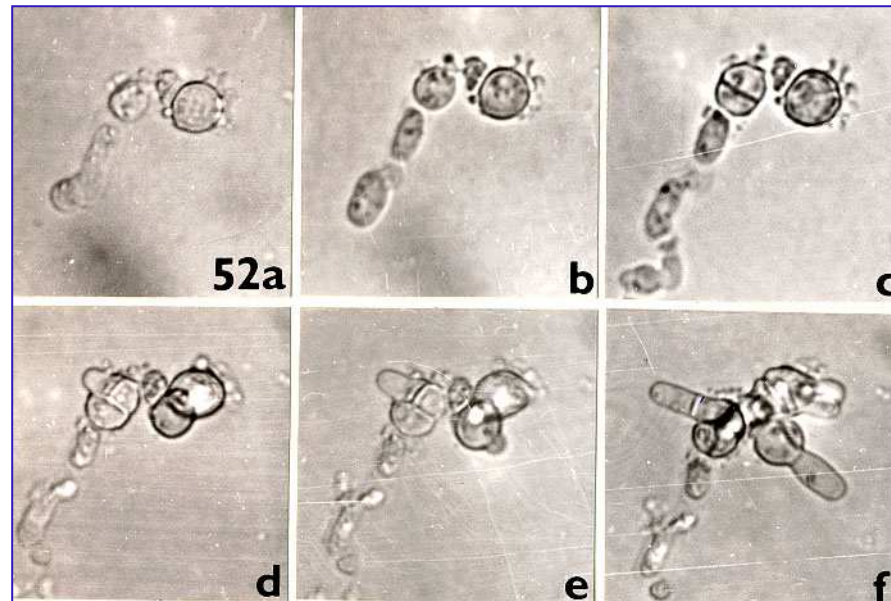


Morfologie regenerace protoplastů v agarovém gelu



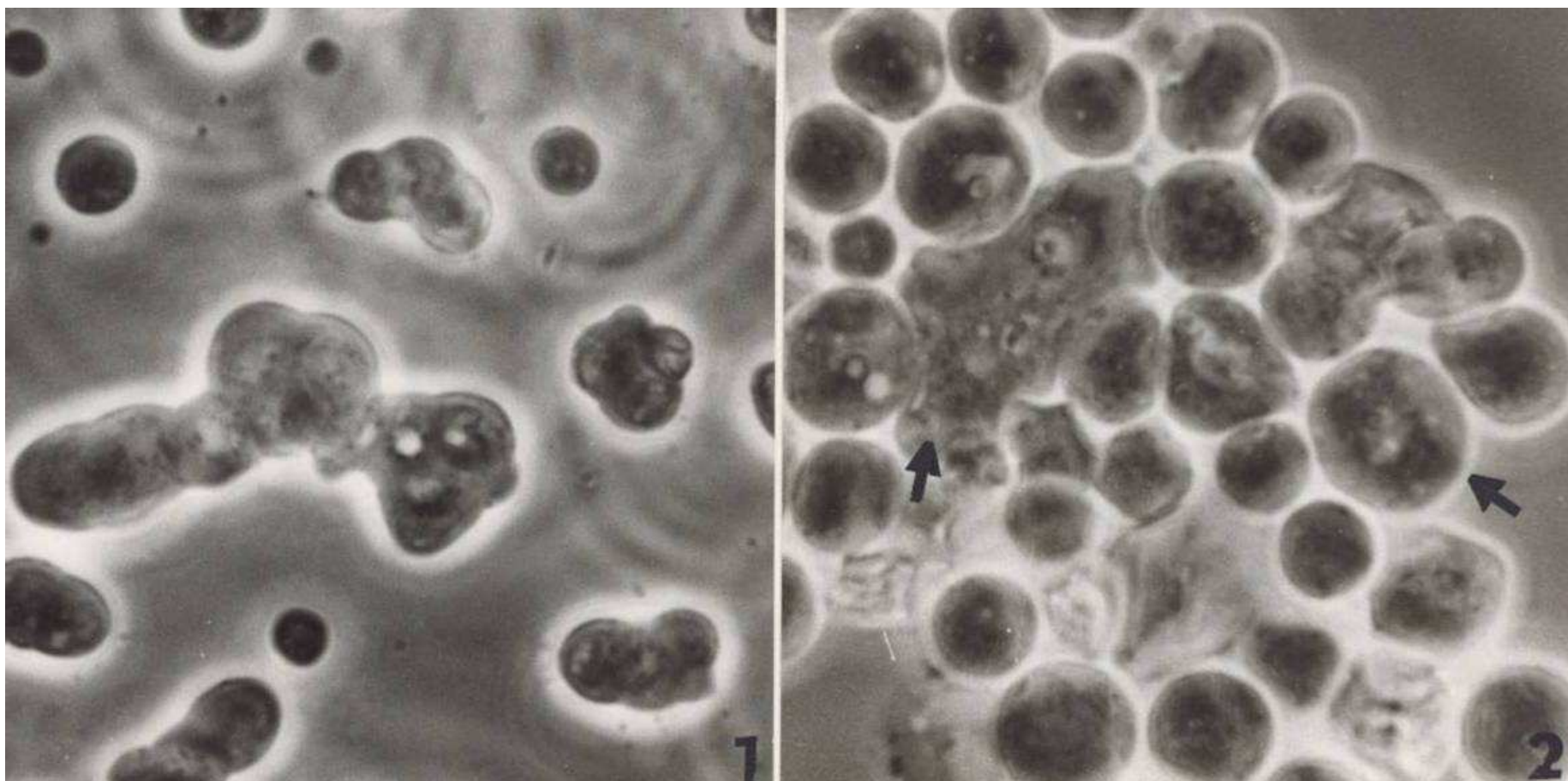


Regenerace protoplastů v polyethylenglykolovém mediu

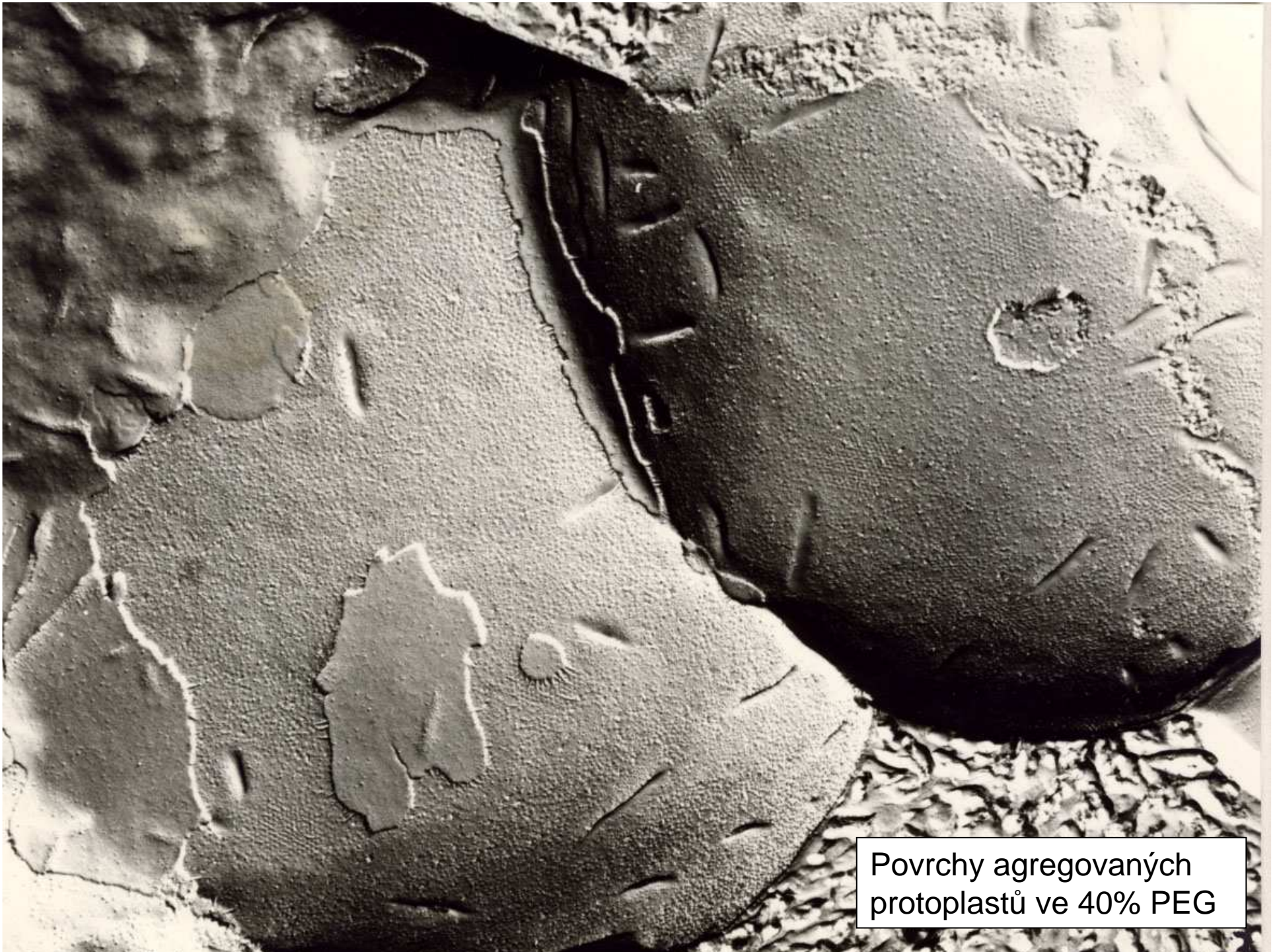


Protoplasty některých kvasinek mohou regenerovat na agarových filmech nebo i v tekutém mediu





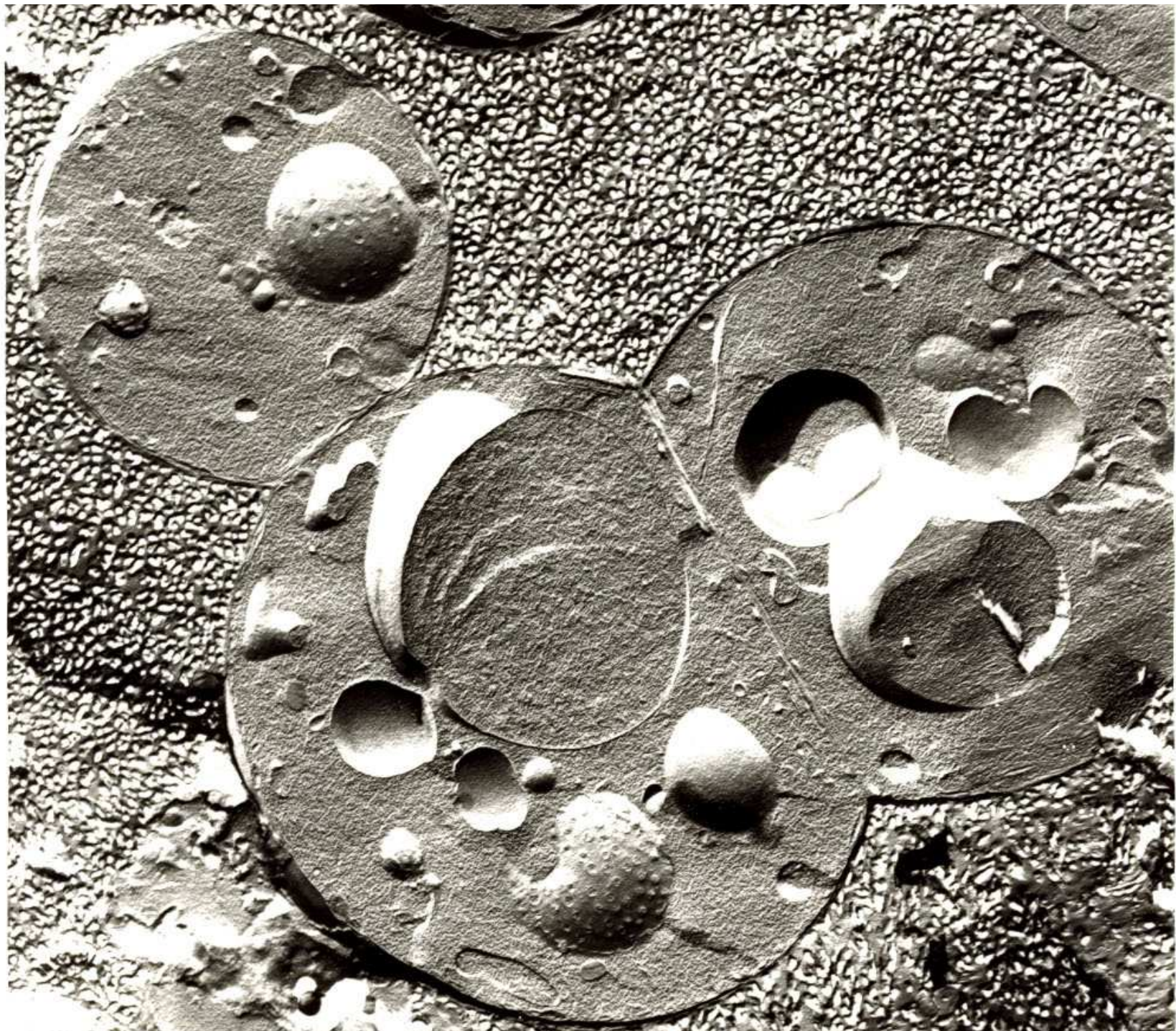
Aglutinace protoplastů ve 40% polyethylenglykolu a vytváření polyprotoplastů po zředění živným médiem



Povrchy agregovaných
protoplastů ve 40% PEG

Lokální poruchy struktury
plasmatické membrány po
inkubaci protoplastů ve
40% PEG 30 min při 37° C

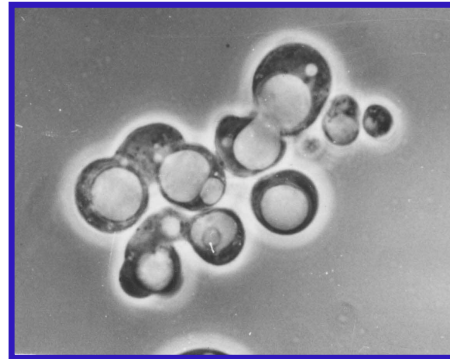




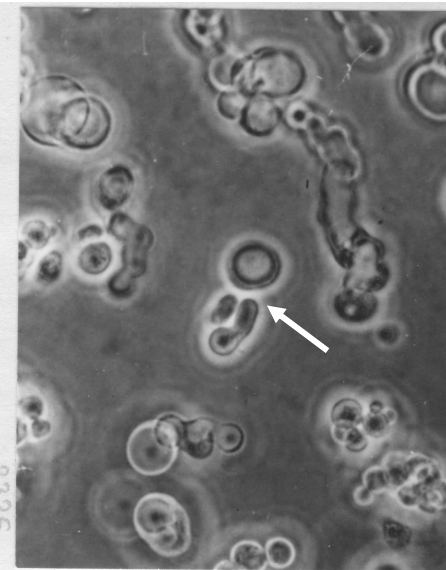
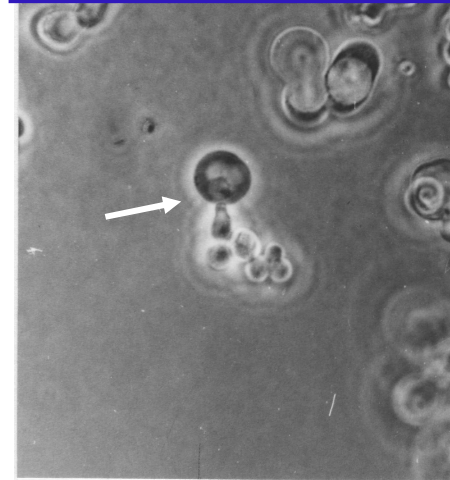
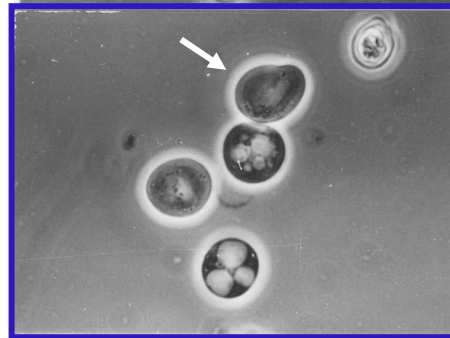
Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

- 1. Studium funkce buněčné stěny
 - mechanická bariéra
 - signální funkce – recepce stresových faktorů, feromonů aj
 - regenerační schopnosti buňky
 - syntéza komponent buněčné stěny
- 2. Studium struktury plasmatické membrány
- 3. Studium nepohlavní hybridizace kvasinek
 - vnitrodruhová a mezidruhová hybridizace
- 4. Transformace kvasinek

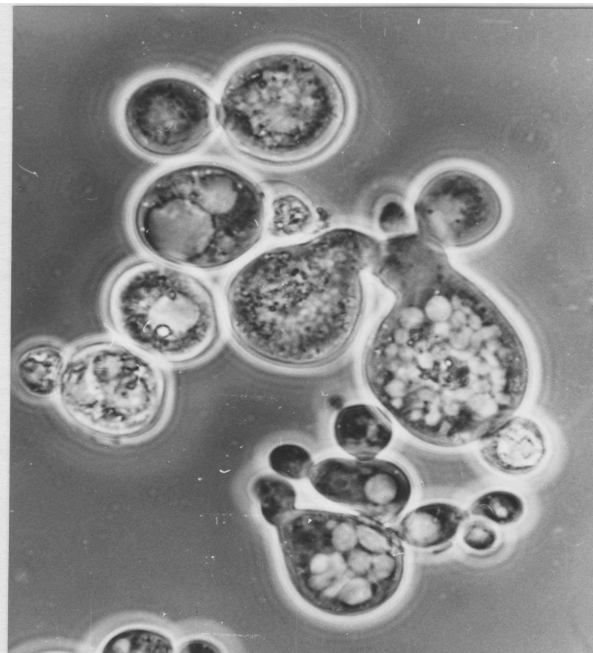
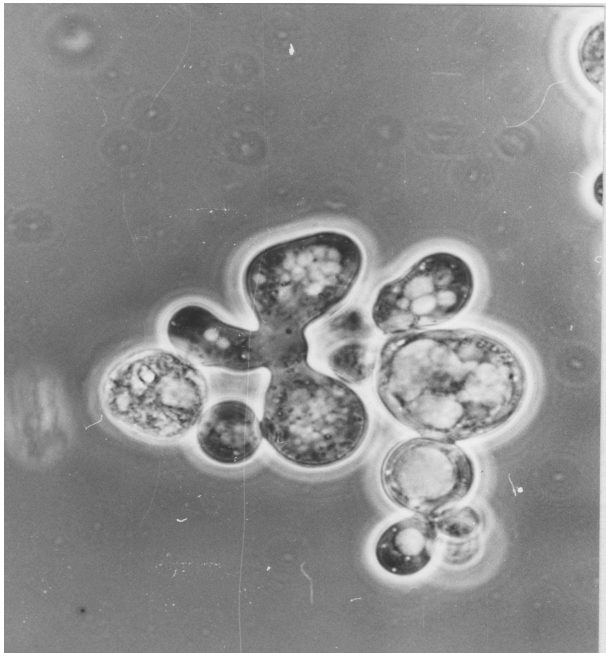
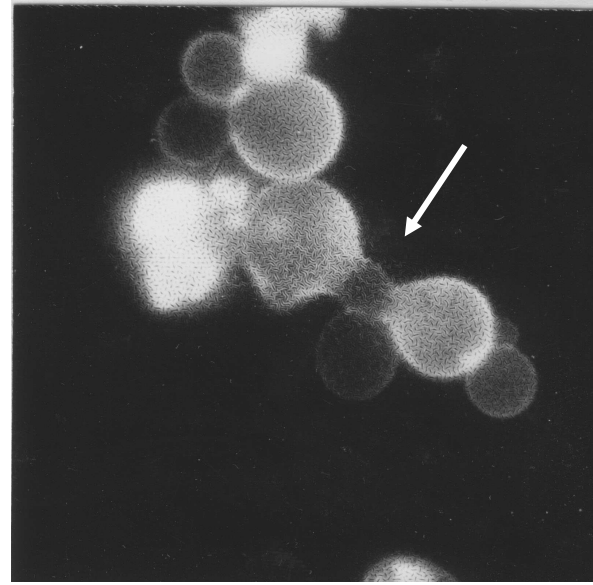
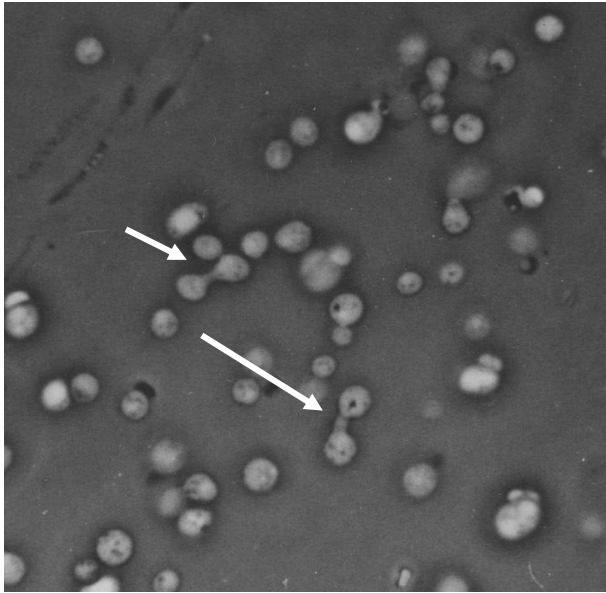
Protoplasty S.c.
 $\alpha + a$, pouze
neorientovaný
růst, žádná fuze



α protoplasty +
a buňky:
párovací
výběžky tvoří
pouze buňky



Orientovaný růst
buněk směrem k
rostoucímu
protoplastu –
žádná fuze



Mezidruhová fuze *S.cerevisiae his⁻* x *S.pombe trp⁻*

