

# Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

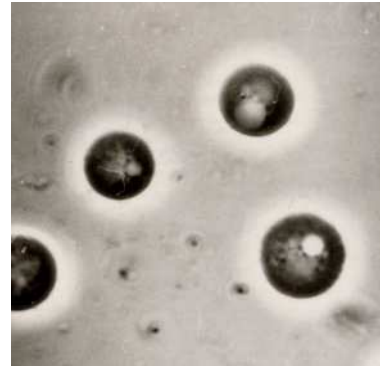
1. Historie objevu modelu protoplastů
2. Metody přípravy protoplastů
3. Metody regenerace buněčné stěny u protoplastů
4. Fuze protoplastů
5. Genetická transformace kvasinek na modelu protoplastů
6. Sexuální hybridizace u protoplastů

# 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 (Nečas, 1962, Svoboda 1966)

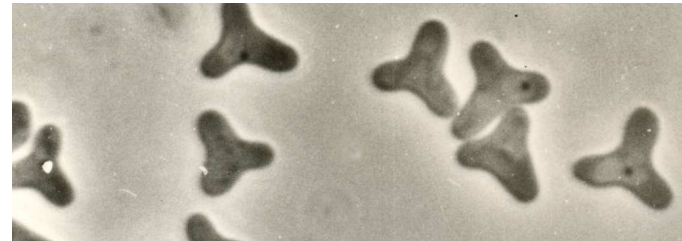
## 2. Metody přípravy protoplastů

- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
  - Výběr osmotika - sorbitol, mannitol, KCl, MgSO<sub>4</sub> a koncentrace
  - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol aj

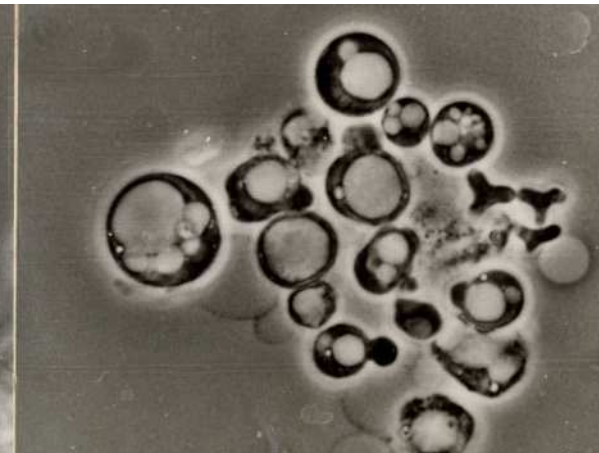
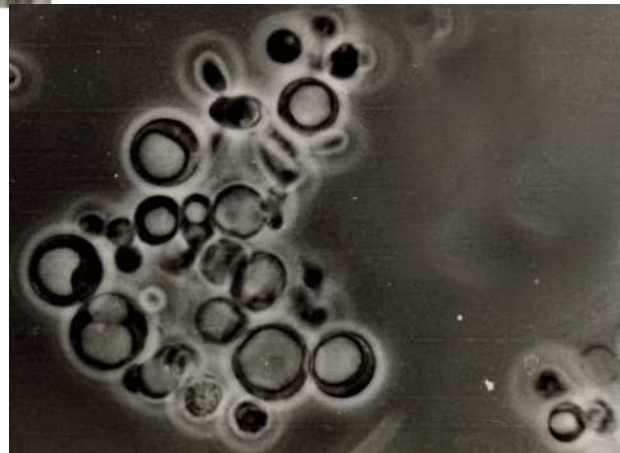


Saccharomyces cerevisiae

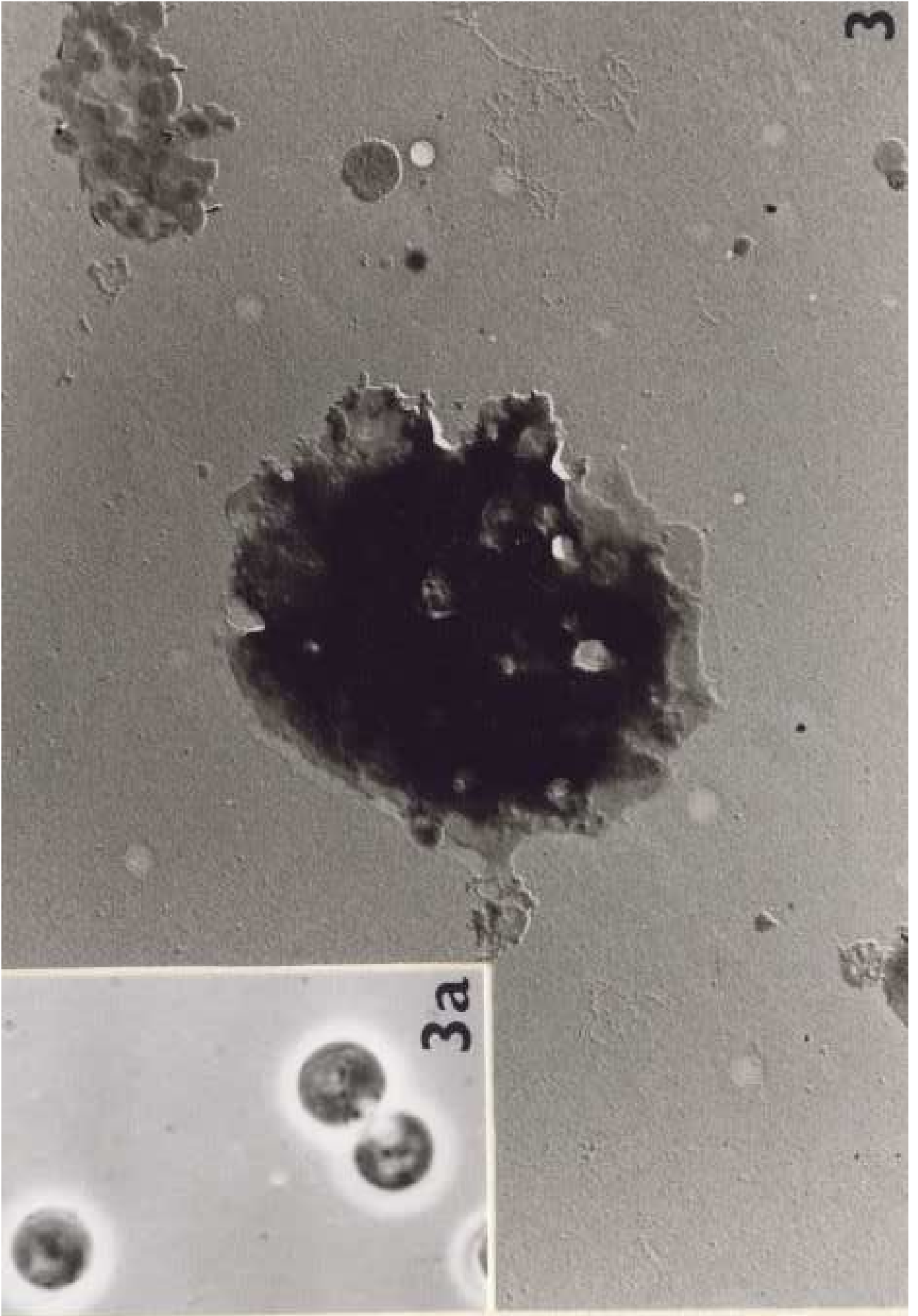
Trigonopsis variabilis

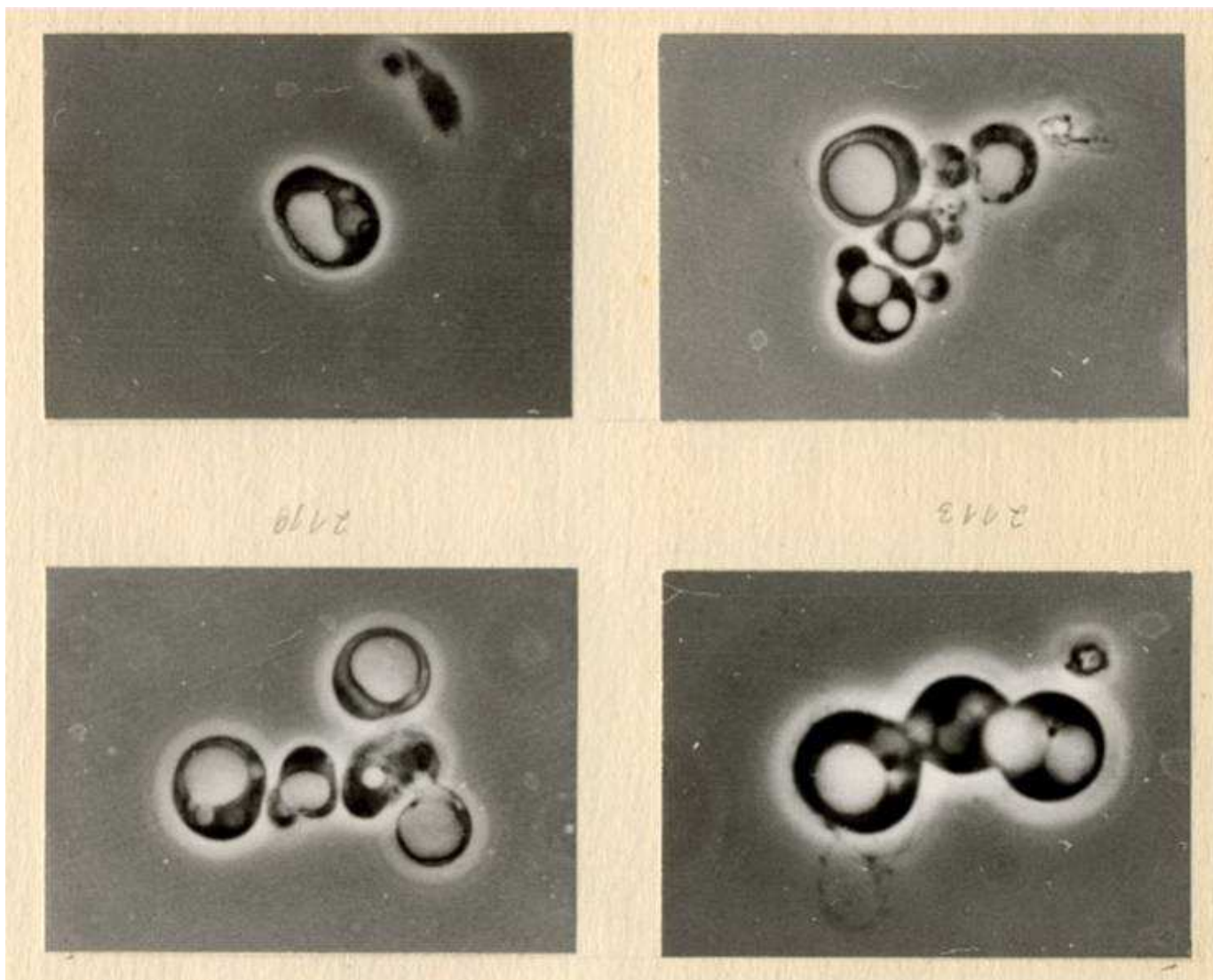


Buňky a čerstvě vytvořené protoplasty



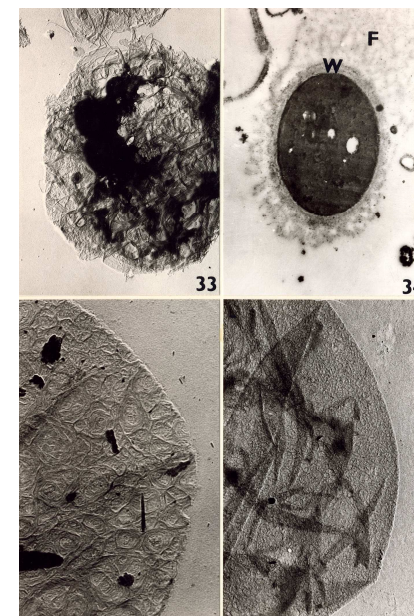
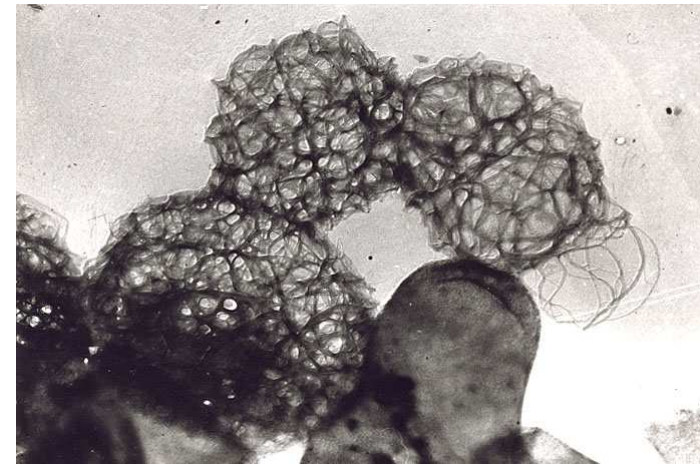
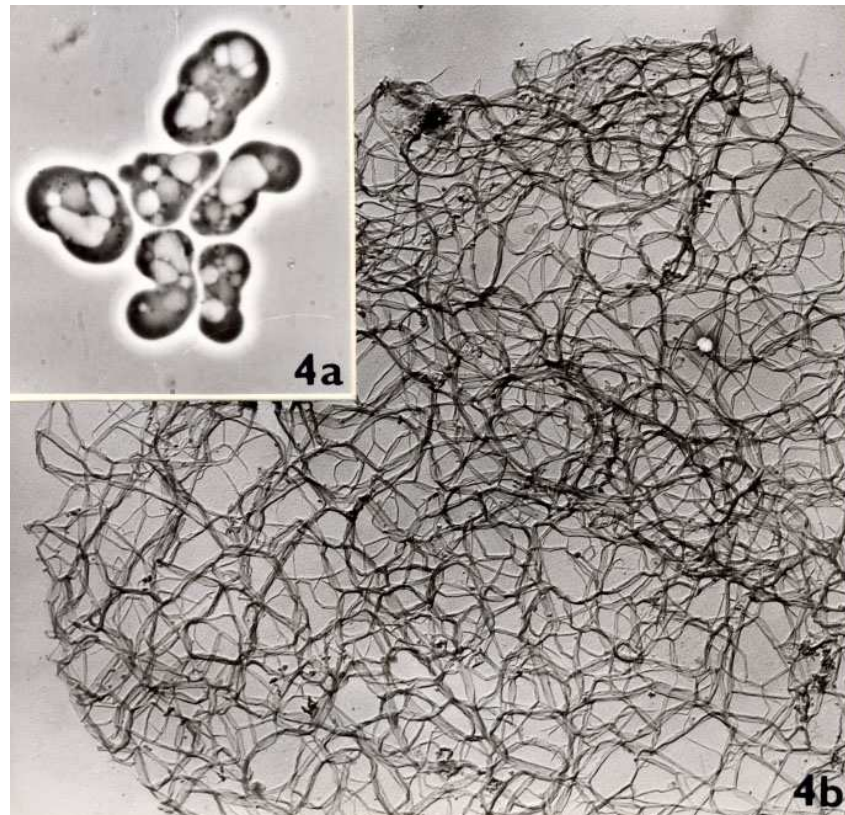
3





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

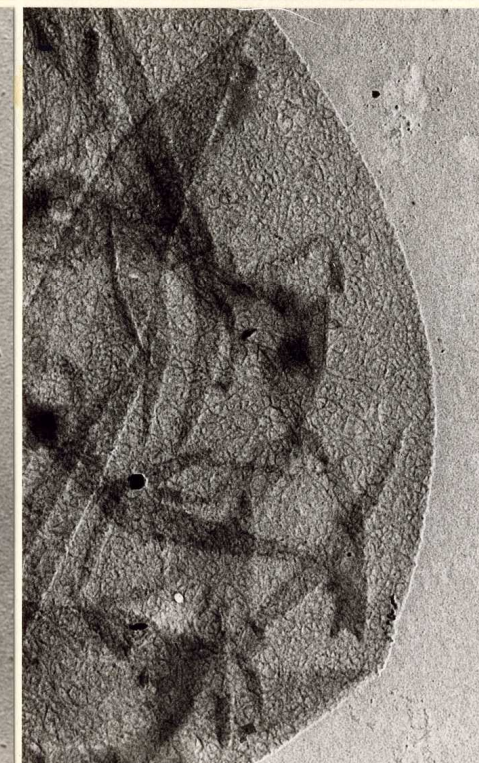
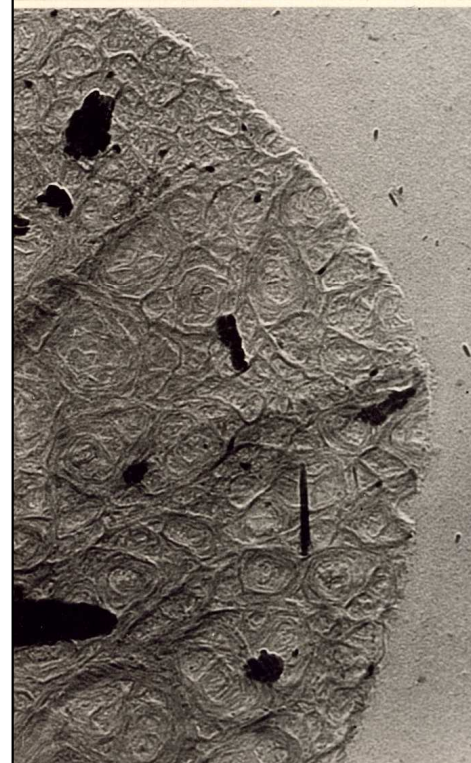
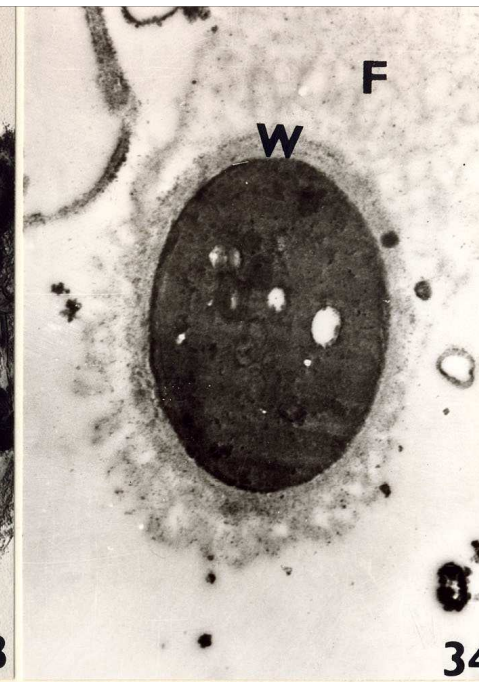
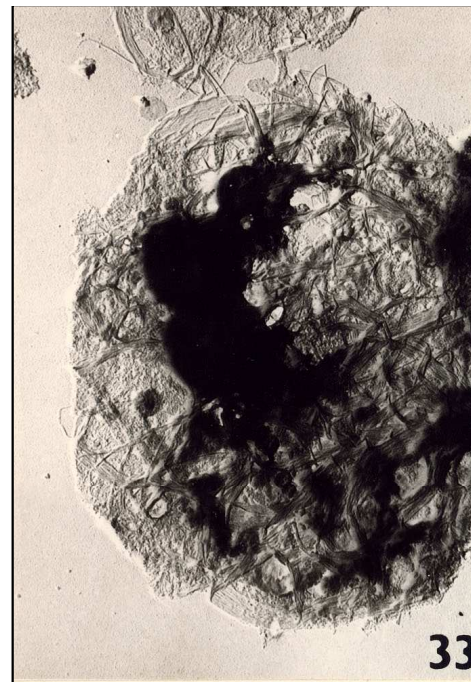
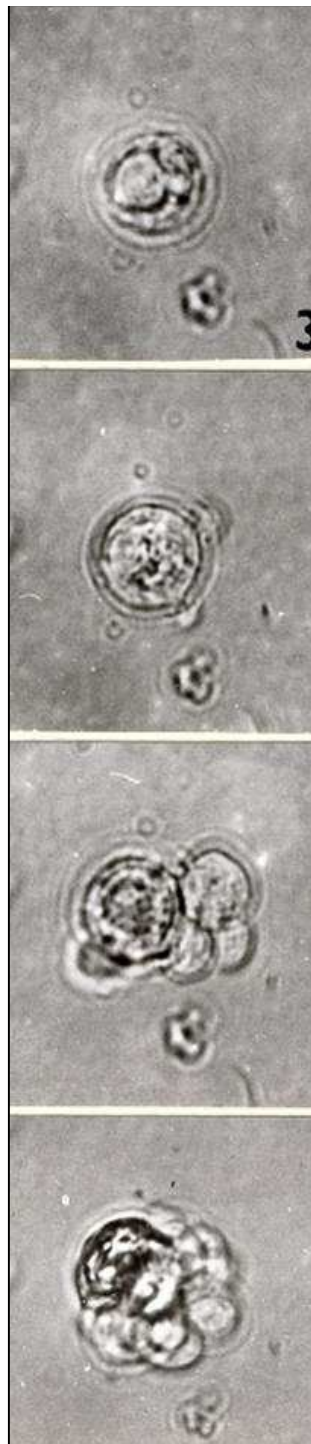


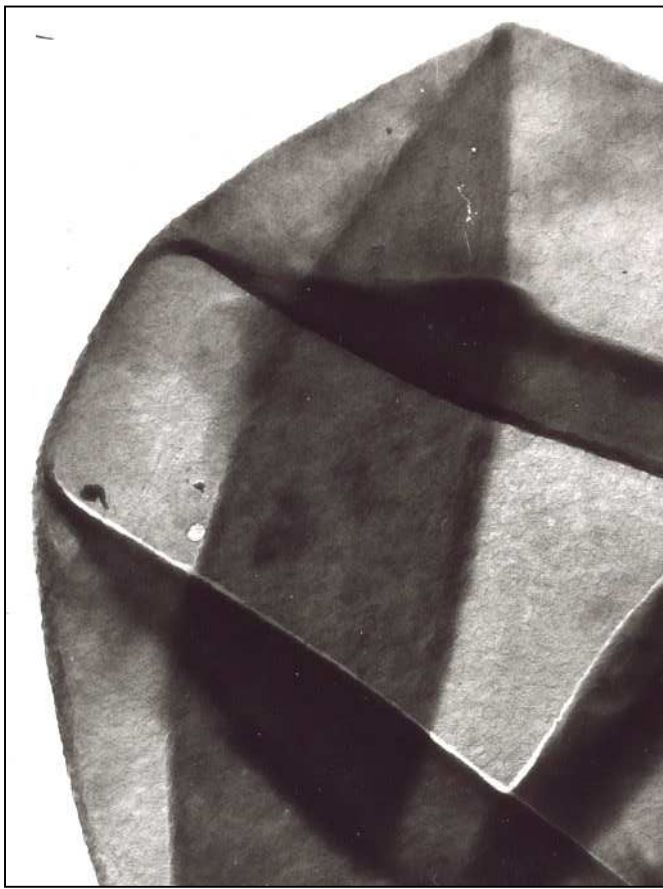
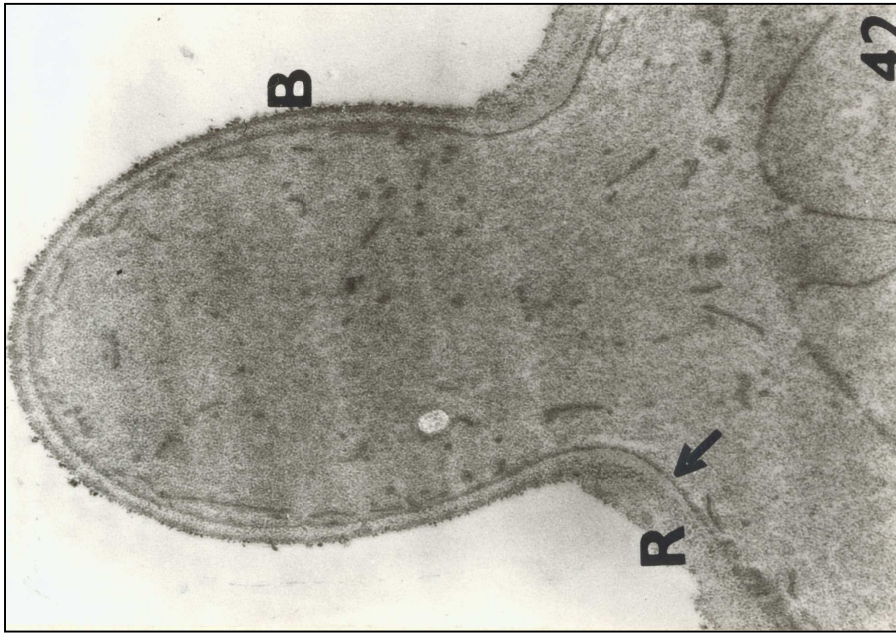
Tvar rostoucího protoplastu je není určován regenerující buněčnou stěnou, ta jen modifikuje morfologii rozpínající se cytoplasmy



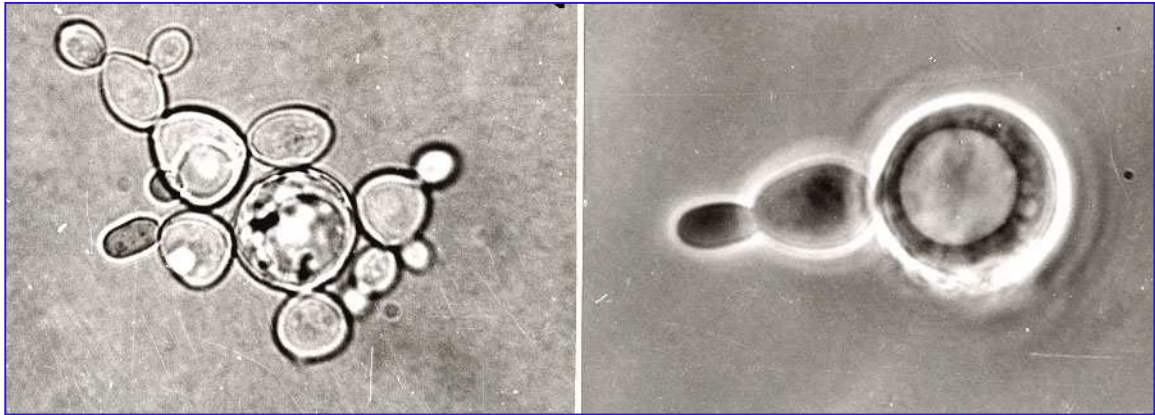


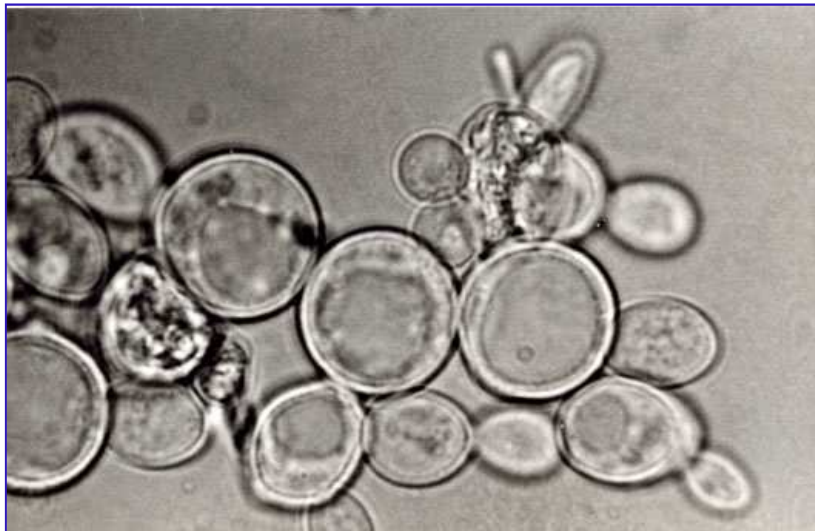
Regenerace  
protoplastů v  
želatinovém  
gelu



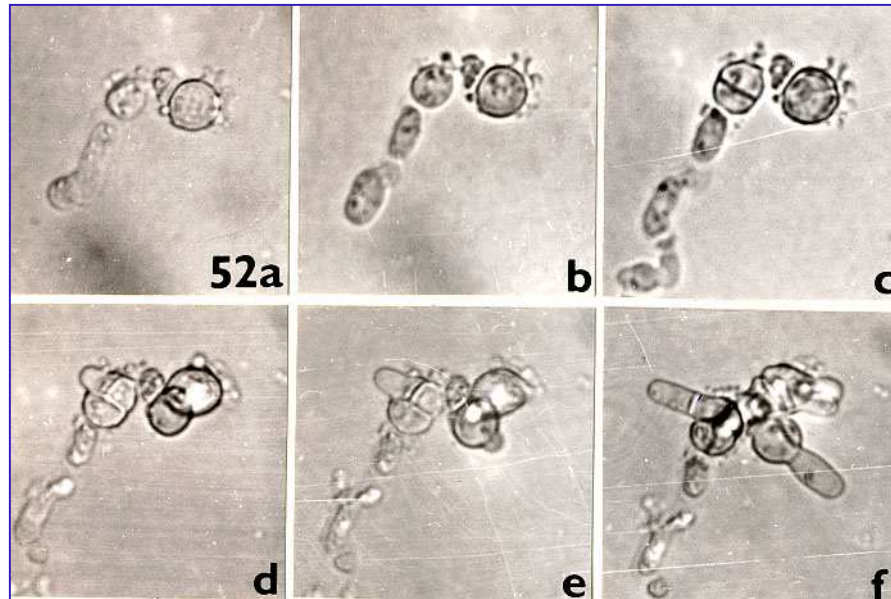


# Morfologie regenerace protoplastů v agarovém gelu



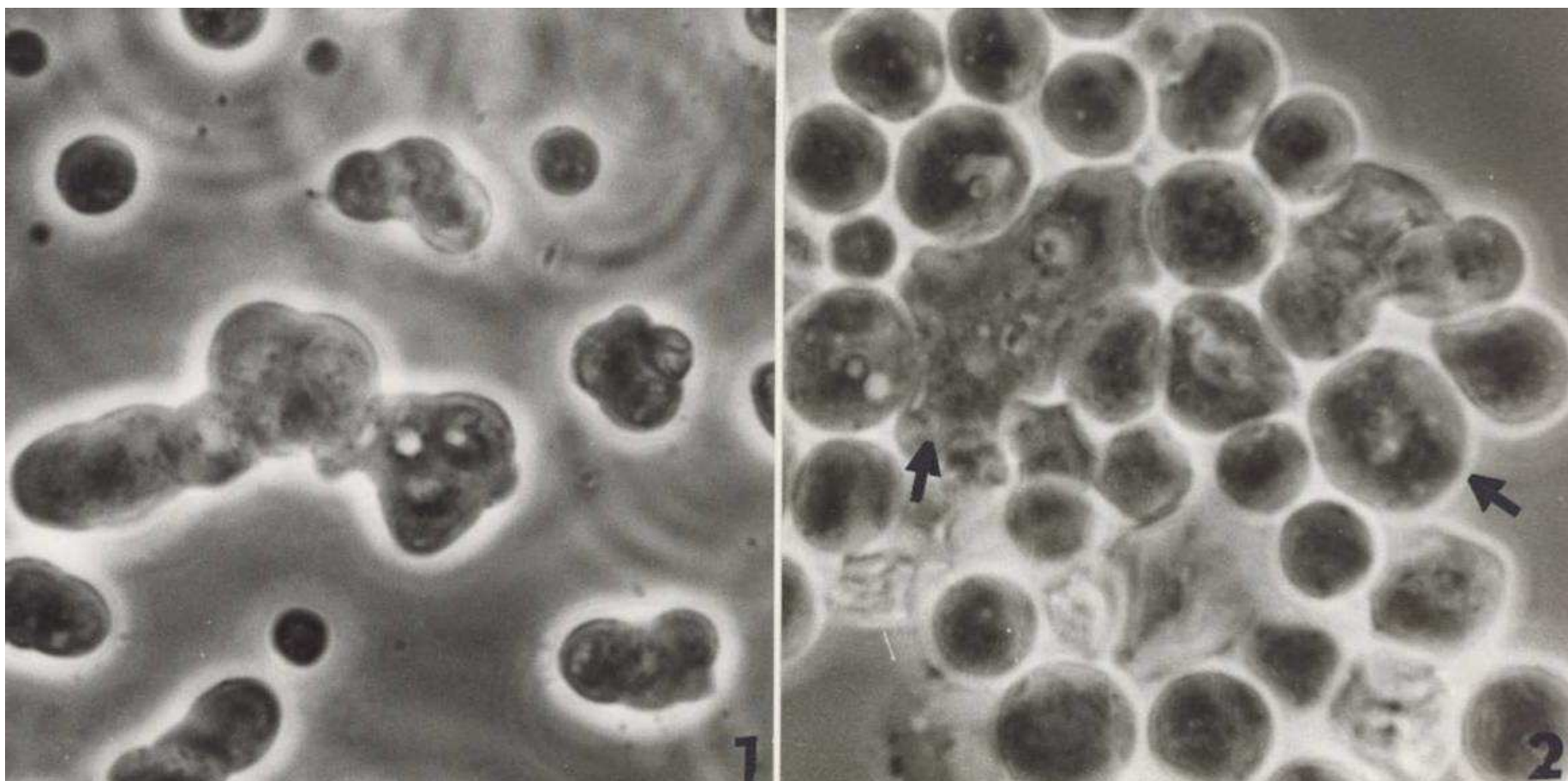


Regenerace protoplastů v polyethylenglykolovém mediu

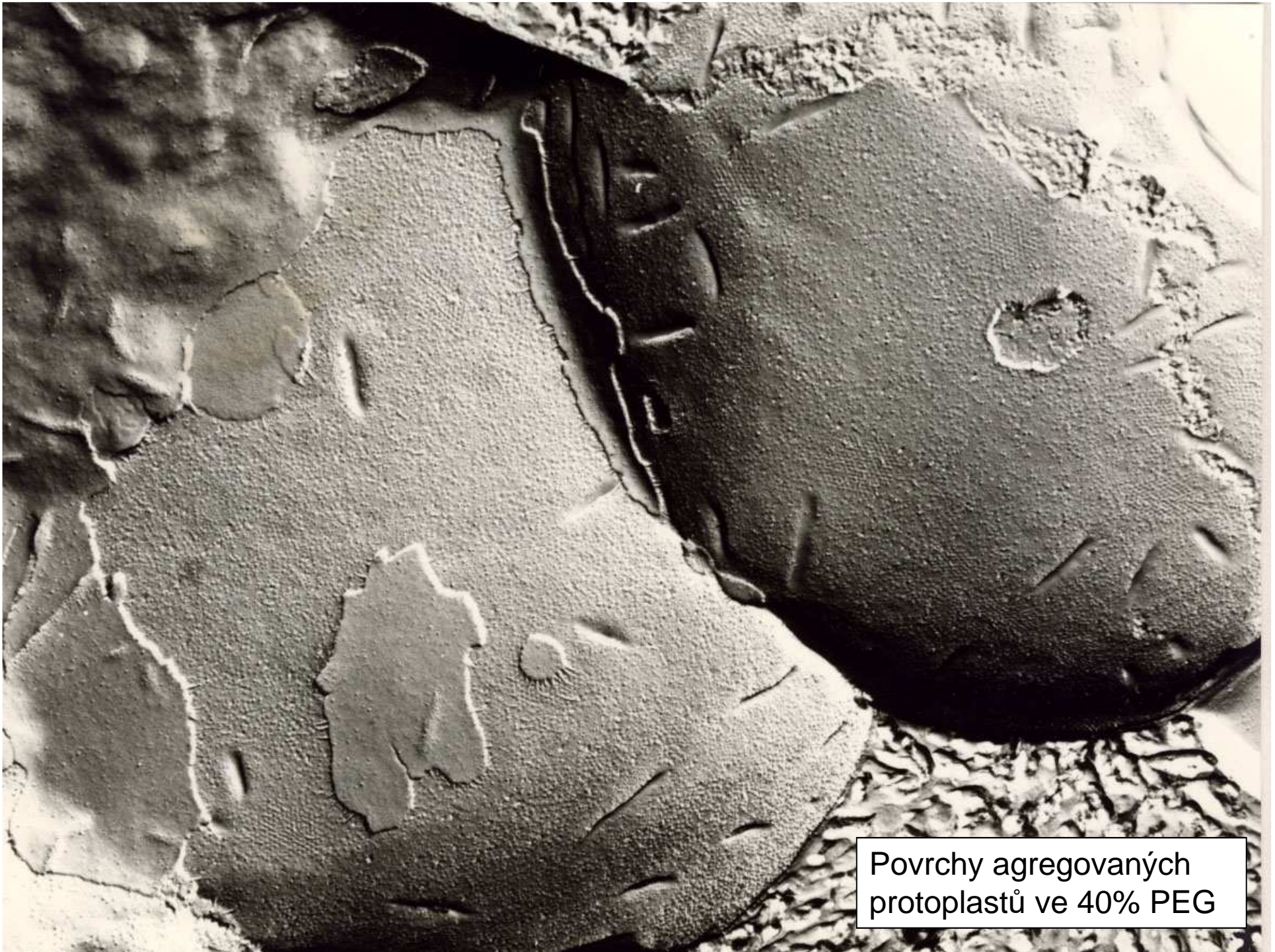


Protoplasty některých kvasinek mohou regenerovat na agarových filmech nebo i v tekutém mediu





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

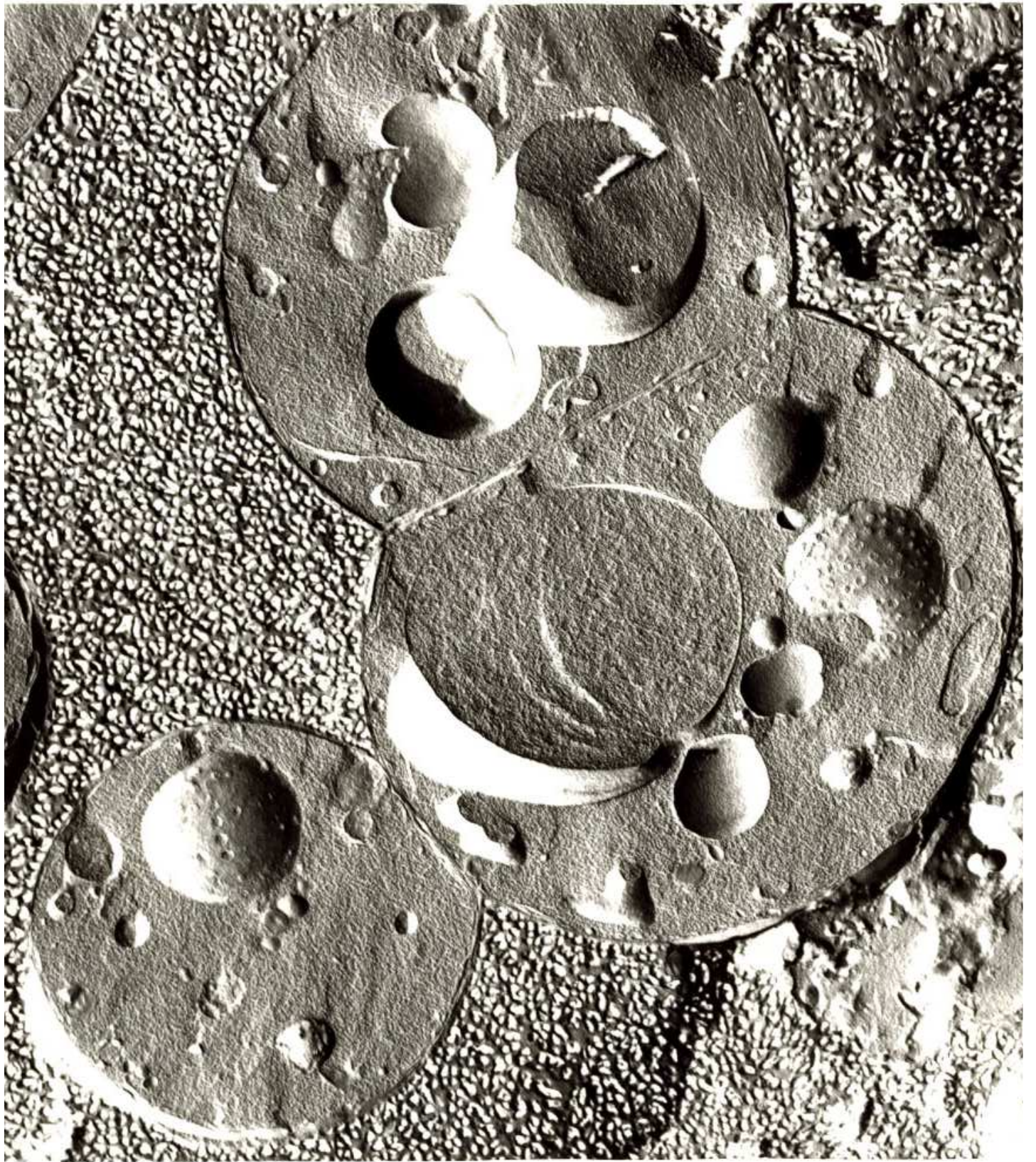


Povrchy agregovaných  
protoplastů ve 40% PEG

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



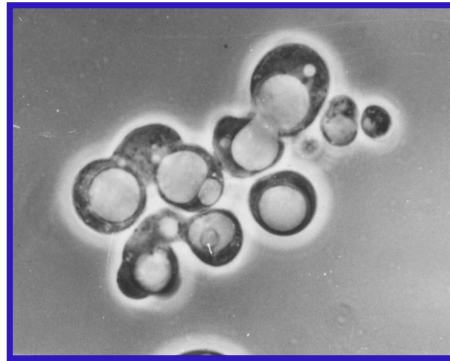




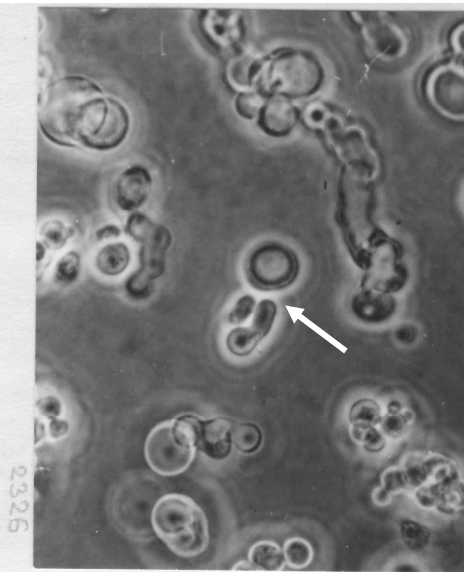
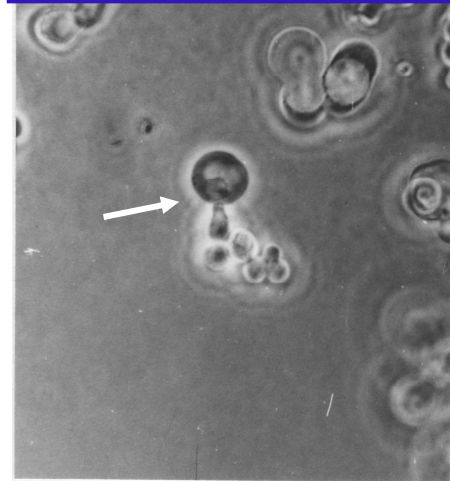
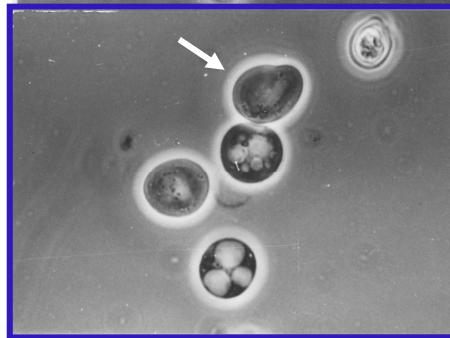
# Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

- 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

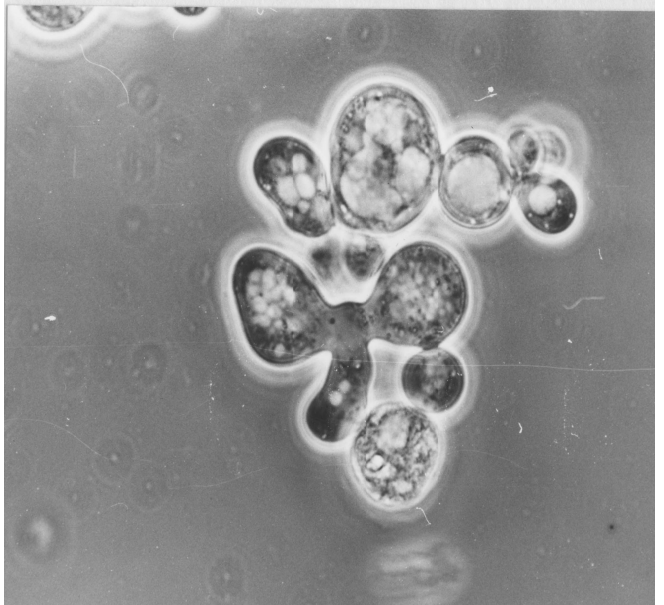
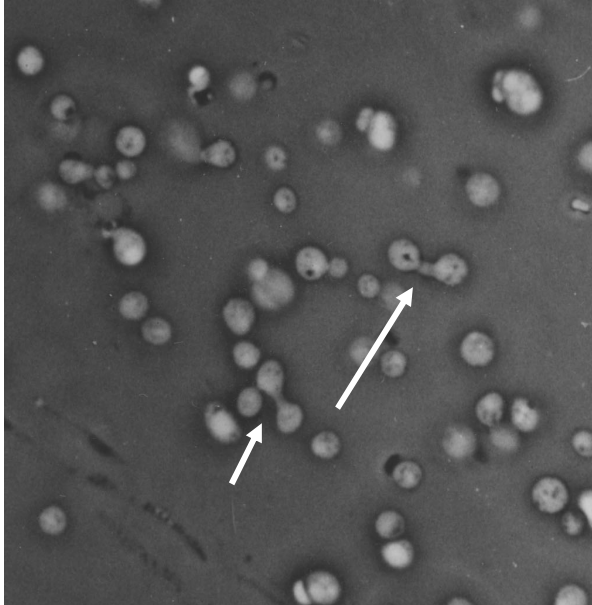
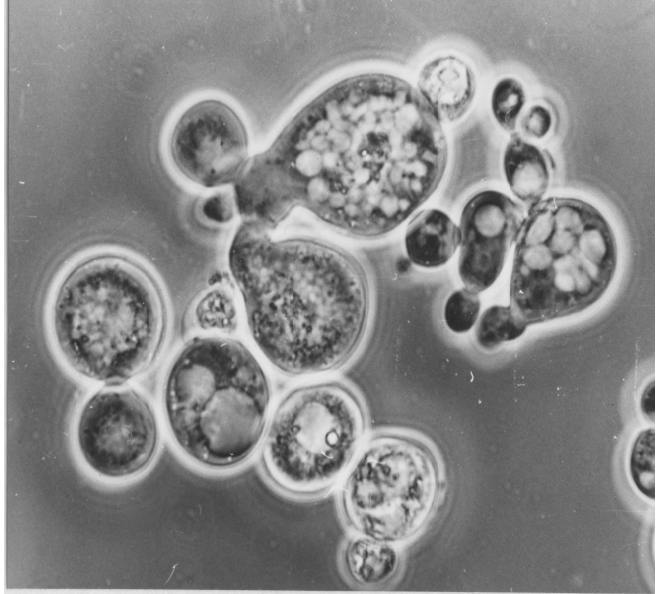
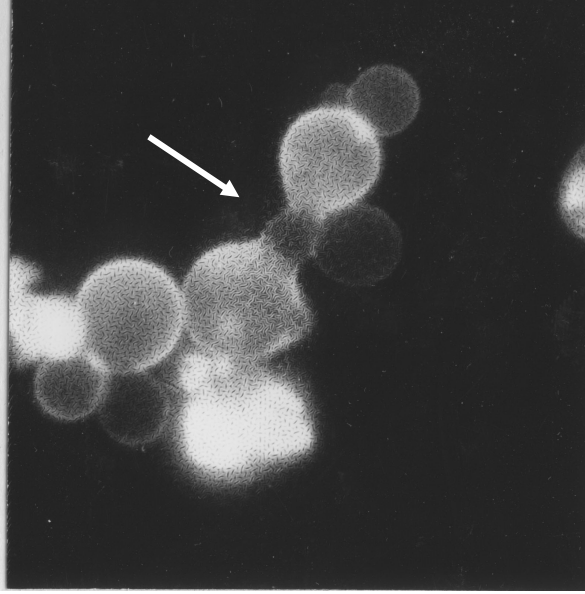
Protoplasty S.c.  
 $\alpha + a$ , pouze  
neorientovaný  
růst, žádná fuze



$\alpha$  protoplasty +  
a buňky:  
párovací  
výběžky tvoří  
pouze buňky



Orientovaný růst  
buněk směrem k  
rostoucímu  
protoplastu –  
žádná fuze



Mezidruhová fuze *S.cerevisiae his<sup>-</sup>* x *S.pombe trp<sup>-</sup>*

