

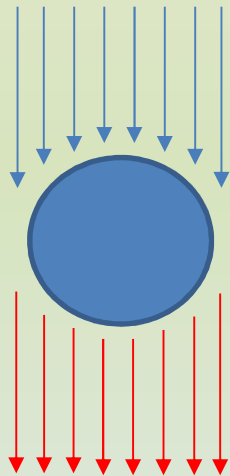
Průtoková cytometrie flow cytometry (FCM)

**Bi6589 Laboratorní a bioinformatické metody rostlinné
biosystematiky**

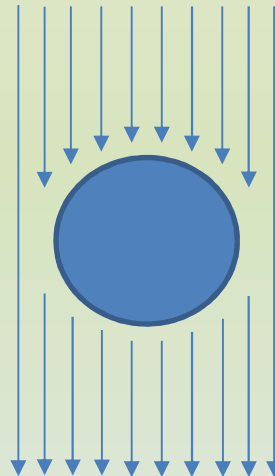
Průtoková cytometrie

Měření optických vlastností malých částic, které jsou uvedeny do pohybu.

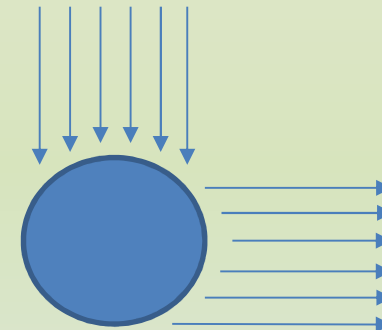
Optické vlastnosti částic



Fluorescence
(Excitace/emise)



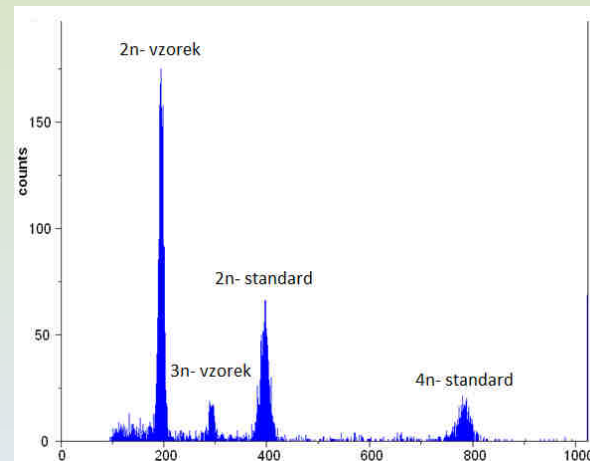
Zástin paprsku;
Rozptýlené světlo =
Forward scatter



Odras paprsku;
Boční světlo =
Side scatter

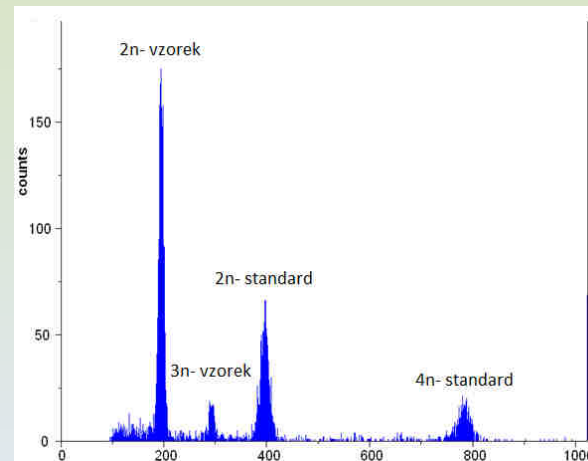
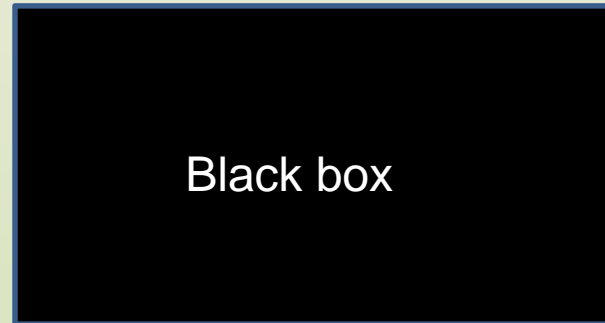
Částice: pylová zrna, mikroorganismy, buňky, buněčná jádra, apod.

Průtoková cytometrie



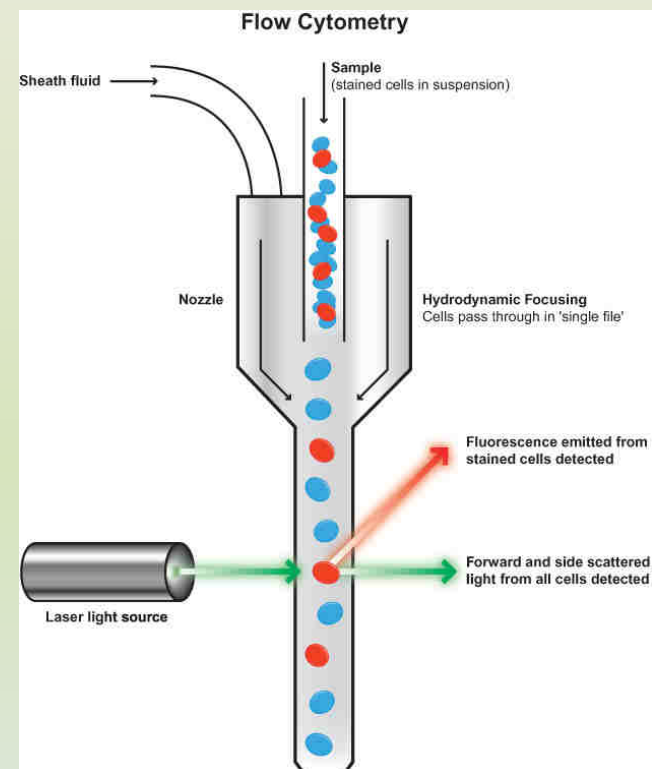
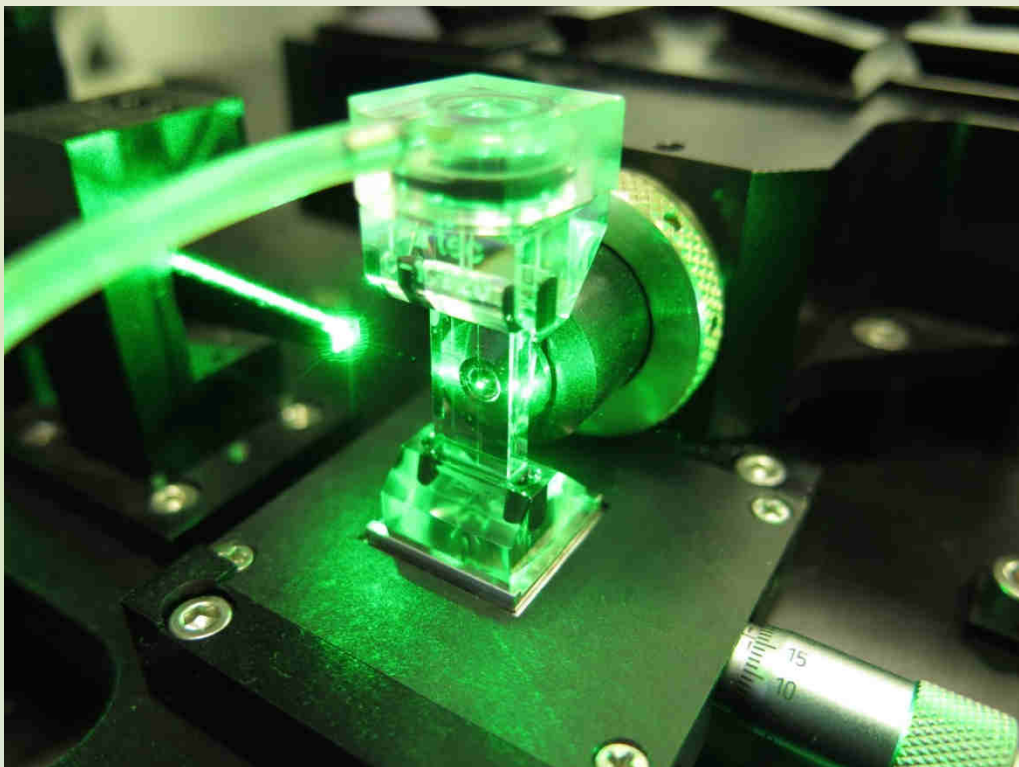
→ Informace

Průtoková cytometrie



Informace

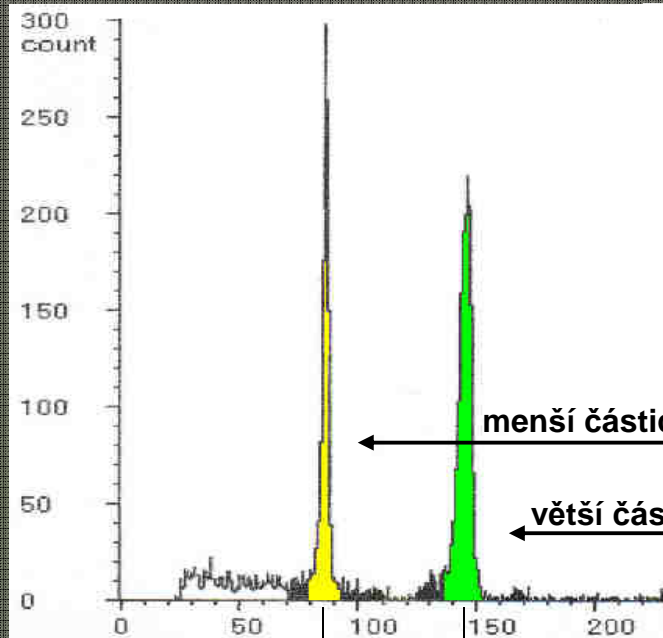
Srdce cytometru = průtoková kyveta



Funkce průtokové kyvety

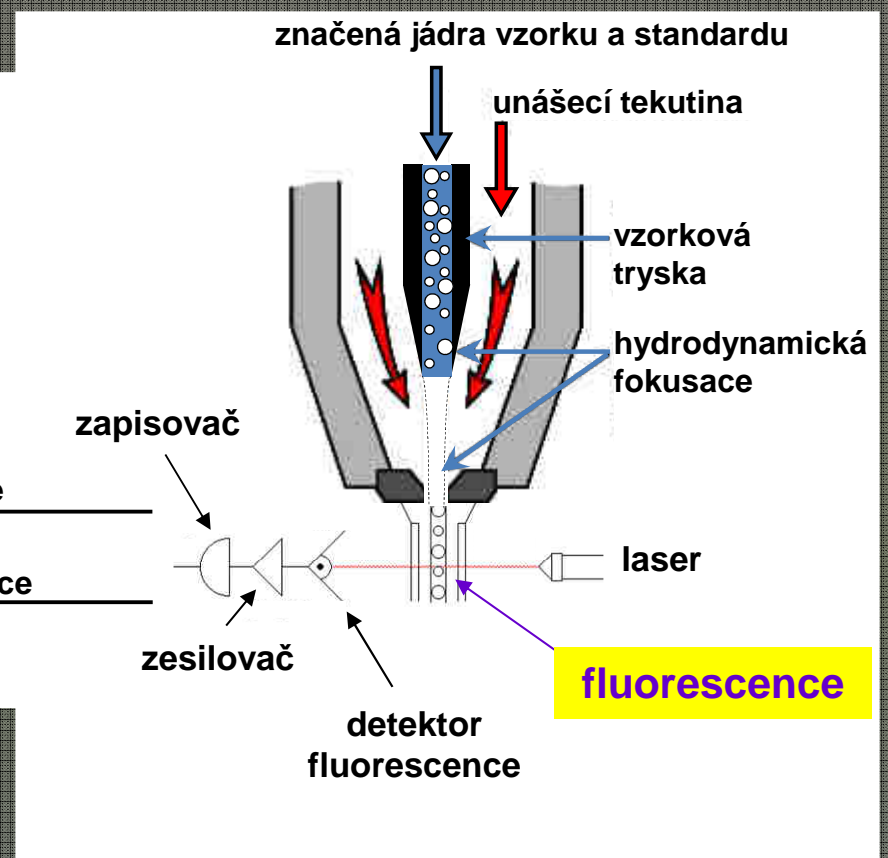
- Separace částic v proudu unášecí kapaliny
- Počátek měření optických vlastností částic
- Velikost částic: 0,2-200 μ m

Co se děje v průtokové kyveta?



Osa x \approx intenzita fluorescence

pozice standardu pozice vzorku

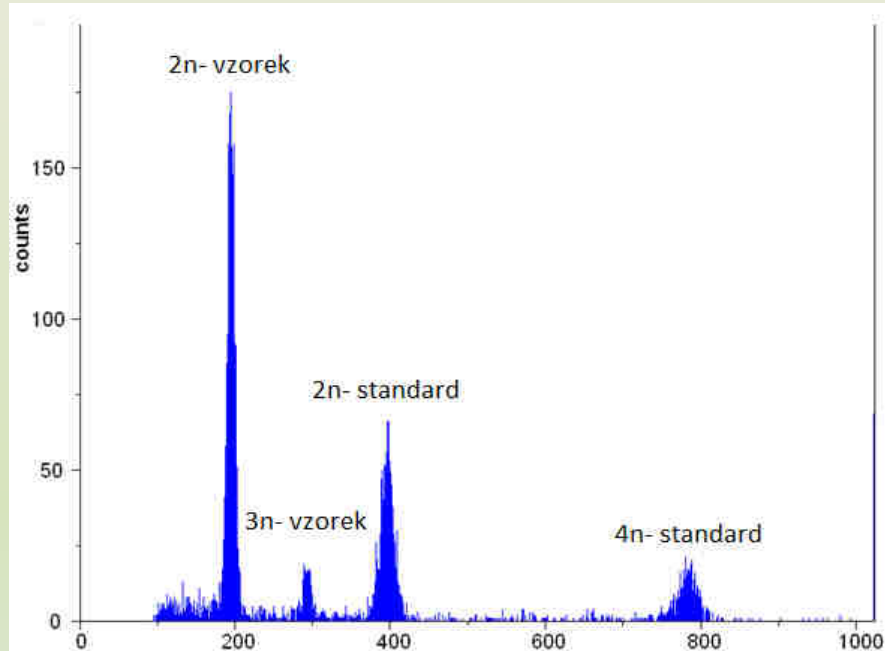


$$\text{hmotnost jádra vzorku (pg)} = \frac{\text{pozice vzorku} \times \text{hmotnost jader standardu (pg)}}{\text{pozice standardu}}$$

Základní výhoda cytometru: rychlá analýza velkého množství částic

Pojmy

Osa Y = počet částic



Osa X = optické vlastnosti částic

Standard = organismus se známou velikostí stanovovaných hodnot (velikost genomu, GC obsah, atd.)

Přesnost měření je stanovovaná pomocí **variačního koeficientu (CV)**.

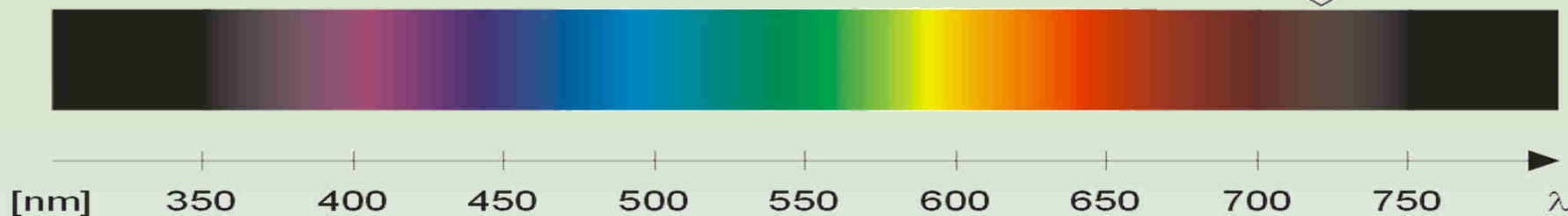
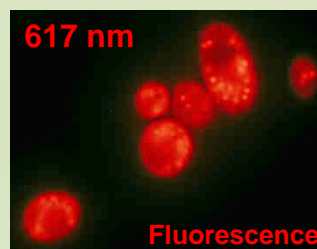
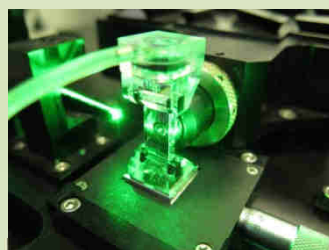
$$CV = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměrná pozice píku}} \times 100$$

Pojmy

Fluorescenční barvy

- Způsob navázání: neselektivní (PI, EB); selektivní na AT báze (DAPI, DIPI, Hoechst); preferující GC báze (některá antibiotika)
- Excitační a emisní vlnová délka

Propidium iodide (PI)



Day Factor (DF)

- Důležitý pro výpočet GC obsahu; poměr poměrů (vzorek/standard(DAPI) ku vzorek/standard(PI))

Pojmy

Hodnoty velikosti genomu

- Holoploidní velikost genomu
 - 1C – v buňkách s n chromozomy (mechorosty, pyl)
 - 2C – v buňkách s 2n chromozomy (somatické buňky)
- Monoploidní velikost genomu
 - 1Cx – průměrná velikost jedné chromozomové sady

Jednotky: 1pg = 978 Mpb

Standardy

Druh	2C (Mbp)	2C (pg)	GC %
Carex acutiformis	799,9	0,817	36,4
Bellis perennis	3089,8	3,159	39,5
Pisum sativum 'Ctirad'	7841,2	8,017	41,7
Vicia faba 'Inovec'	23272,8	23,796	41,1

Jak se připravuje vzorek pro cytometrické stanovení velikosti genomu?

Příprava rostlinného materiálu k měření

Co odebírat

- Živý materiál (nejčastěji list)
- Semena
- Vzorky ze silikagelu/herbáře
- Pyl

K čemu přihlížet při odběru

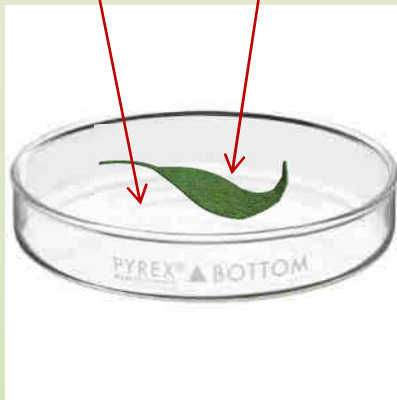
- ontogenetické stáří
- intenzita oslunění a množství sekundárních metabolitů
- způsob uchování vzorku (semena vs. pletivo)

Volitelné

- Extrakční pufr
- Standard

Velikost genomu – příprava vzorku

1. pufr + kousek listu



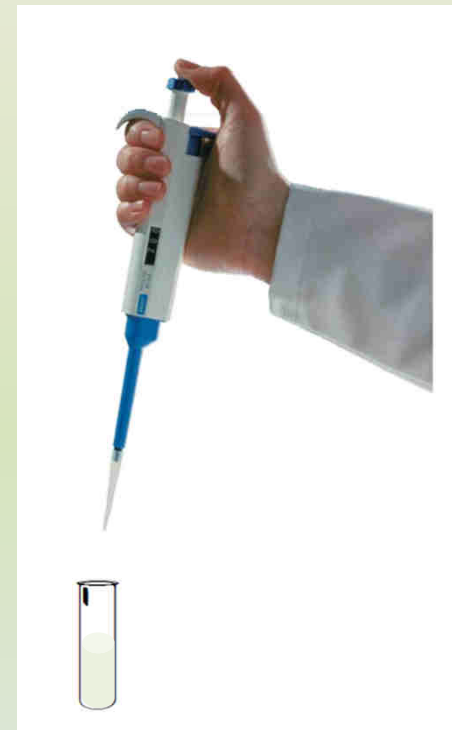
2. posekáme žiletkou



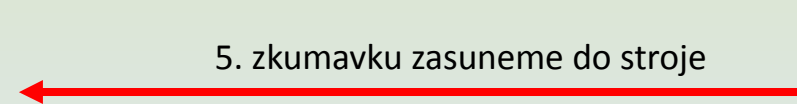
3. zfiltrujeme do zkumavky



4. přidáme fluorochrom



5. zkumavku zasuneme do stroje



Doba přípravy a měření vzorku: 10 minut
Cena měření: 15 Kč

Jak hmotnost DNA v jádře změřit?

**Sekvenace celého
genomu**

zdlouhavá

drahá

složitá

**živý/sušený/zamražený
materiál**

**Průtoková
cytometrie**

rychlá

levná

jednoduchá

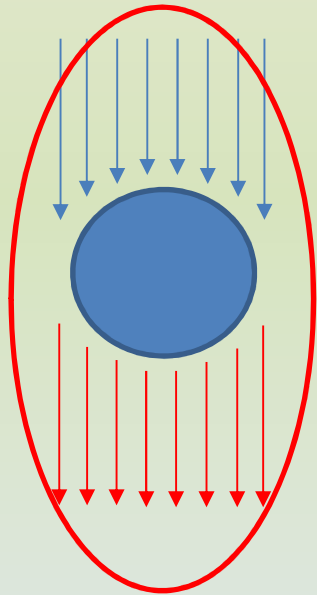
živý materiál

K čemu je to dobré?

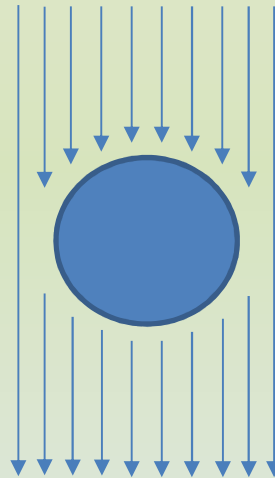
Průtoková cytometrie

Měření optických vlastností malých částic, které jsou uvedeny do pohybu.

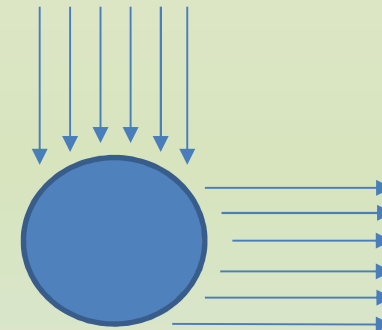
Optické vlastnosti částic



Fluorescence
(Excitace/emise)



Zástin paprsku;
Rozptýlené světlo =
Forward scatter



Odras paprsku;
Boční světlo =
Side scatter

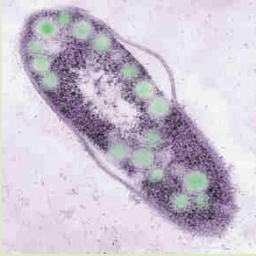
Částice: pylová zrna, mikroorganismy, buňky, buněčná jádra, apod.

K čemu je to dobré?

Zdroj taxonomických znaků (stálé; k dispozici i ve sterilním stavu; mitoticky neaktivní chromozomy)

- Velikost genomu
- GC obsah
- Ploidní úroveň (cca karyotyp)
- Endopolyploidizace (zásobní orgány)
- Vnitrodruhová variabilita (aneuploidie; B-chromozomy vs. zvětšení/zmenšení chromozomů)
- Identifikace holocentrických vs. monocentrických chromozomů

Trpaslík



Střevní parazit
Encephalitozoon intestinalis

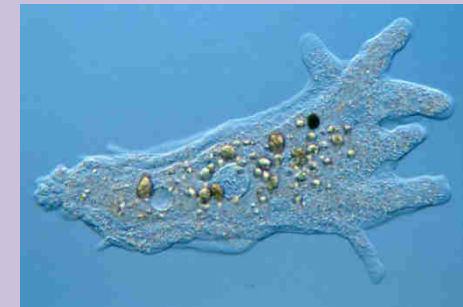
Jádro váží
0,0023 pg



Jádra se liší 600 000 krát !!!

Jádro váží
1400 pg

půdní měňavka
Chaos chaos



Slunce a Země se hmotnostně liší
„jen“ 330 000 krát !



○ approximate size of Earth

🌍 Země

Obr

U mnohobuněčných organismů rozdíly často menší

Ptáci

pštros dvouprstý



kolibřík černobradý



2,4x

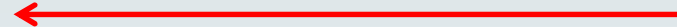
Existují i opačné případy – extrémních rozdílů krytosemenné rostliny



3000x

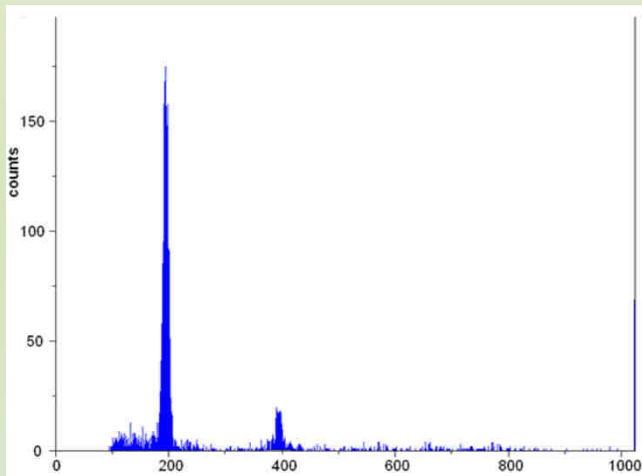


0,1 pg

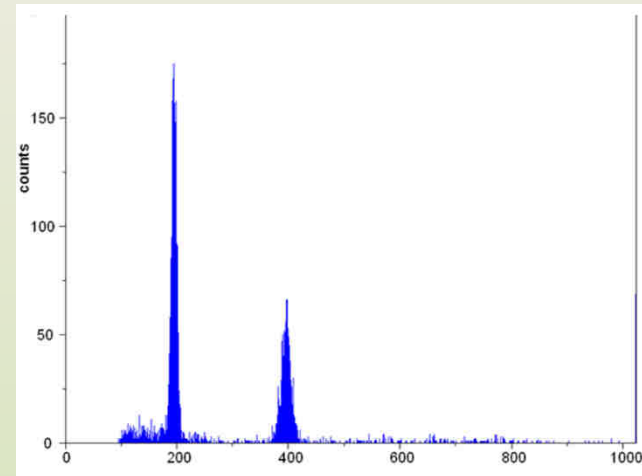


Holocentrický vs. monocentrický chromozom?

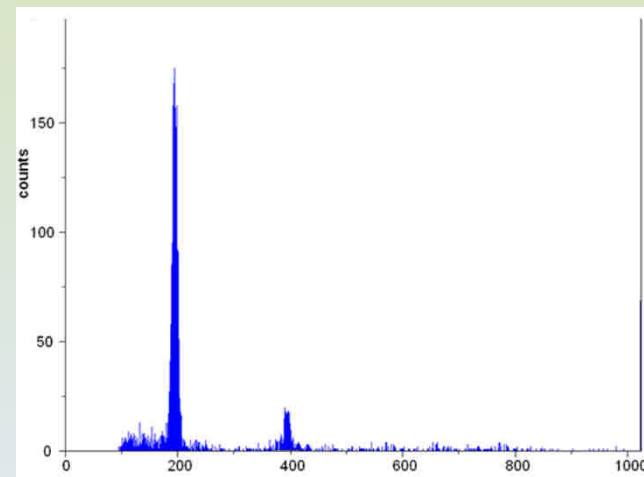
UV záření



Rostoucí nestresovaná rostlina



Monocentrické chromozomy



Holocentrické chromozomy

**Rozrůznily se velikosti genomu náhodně
nebo adaptivní evolucí?**

Velikost genomu ovlivňuje vlastnosti organizmů



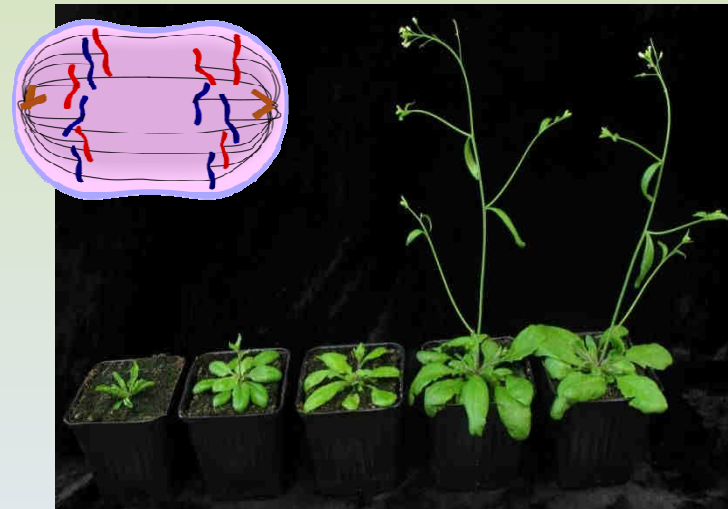
velké jádro se do malé buňky nevejde



velké průduchy se nemohou rychle zavřít

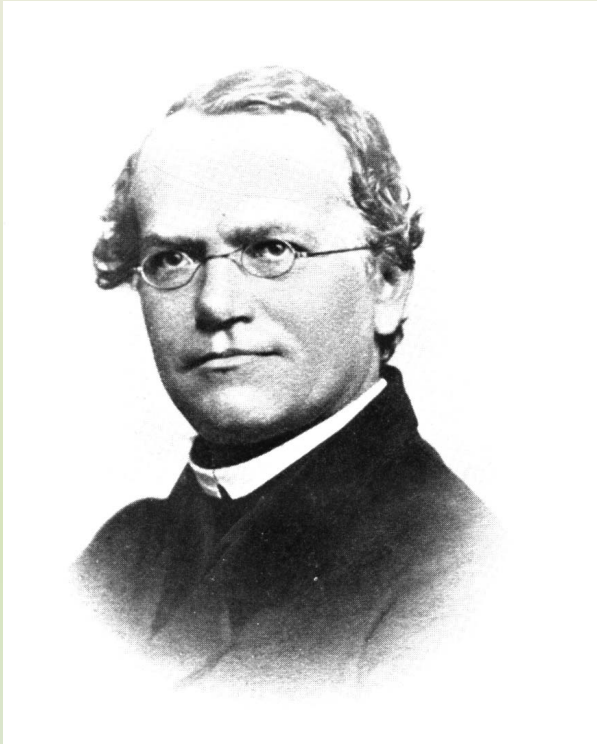


velký pyl se se hůř transportuje



velká jádra se pomalu dělí

Znalost velikosti genomu má i metodické důsledky



Druh s malým genomem = ideální model pro genetiku !

Proč se Mendelův hrách nestal modelem současných genetiků ?

Má genom moc velký !!! 9 pg

Arabidopsis thaliana



K čemu je to dobré?

Zdroj taxonomických znaků (stálé; k dispozici i ve sterilním stavu; mitoticky neaktivní chromozomy)

- Velikost genomu
- GC obsah
- Ploidní úroveň (cca karyotyp)
- Endoreduplikace (zásobní orgány)
- Vnitrodruhová variabilita (aneuploidie; B-chromozomy vs. zvětšení/zmenšení chromozomů)
- Identifikace holocentrických vs. monocentrických chromozomů

Souvislosti

- Ekologické (odolnost k mrazu, rychlost ontogeneze, pravděpodobnost invazibility)
- Fenologické (nástup kvetení)
- Fyziologické (velikost buněk)
- Metodické (vytypování organismů pro sekvenování)

SEX? Koho to zajímá?!

K čemu je to dobré?

Zdroj taxonomických znaků (stálé; k dispozici i ve sterilním stavu; mitoticky neaktivní chromozomy)

- Velikost genomu
- GC obsah
- Ploidní úroveň (cca karyotyp)
- Endoreduplikace (zásobní orgány)
- Vnitrodruhová variabilita (aneuploidie; B-chromozomy vs. zvětšení/zmenšení chromozomů)
- Identifikace holocentrických vs. monocentrických chromozomů

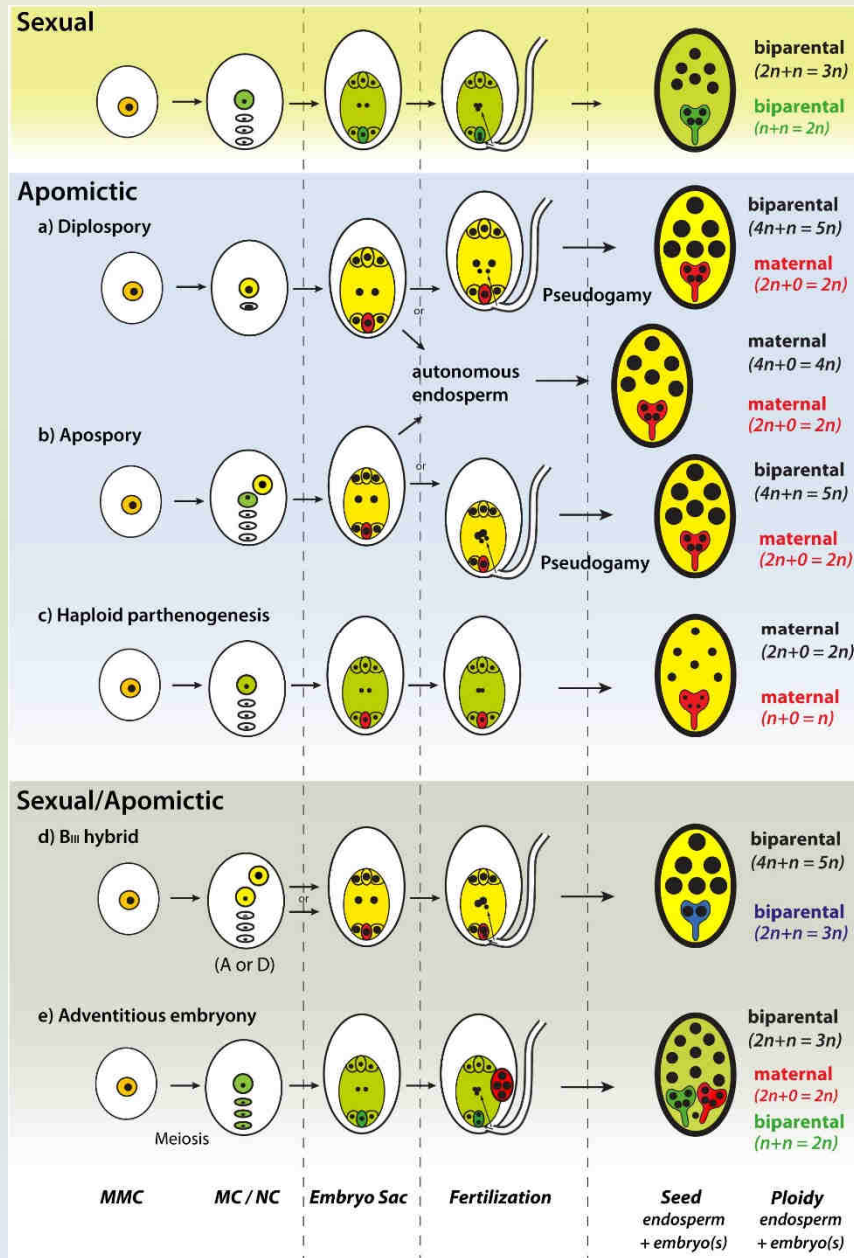
Souvislosti

- Ekologické (odolnost k mrazu, rychlost ontogeneze, pravděpodobnost invazibility)
- Fenologické (nástup kvetení)
- Fyziologické (velikost buněk)
- Metodické (vytipování organismů pro sekvenování)

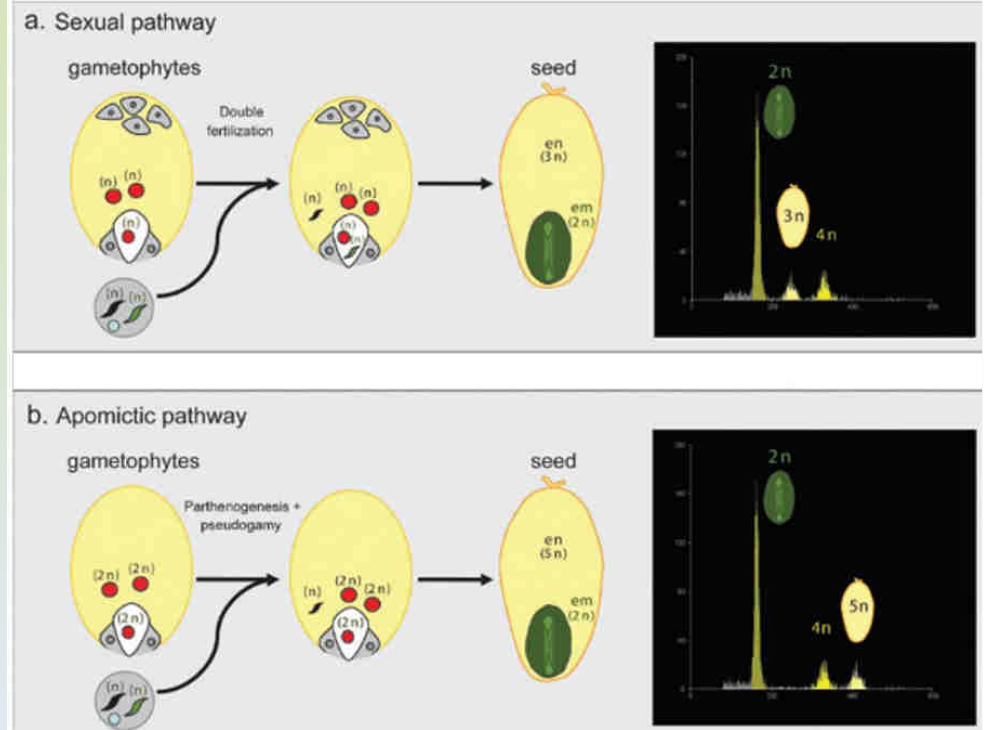
Sex

- Způsob rozmnožování (sexuálové vs. apomikti)
- Mezidruhová hybridizace (identifikace hybridů; rozdíl mezi rodiči >10%)
- Šlechtění (experimentální hybridizace a polyploidizace; výběr a pěstování hybridních jedinců)

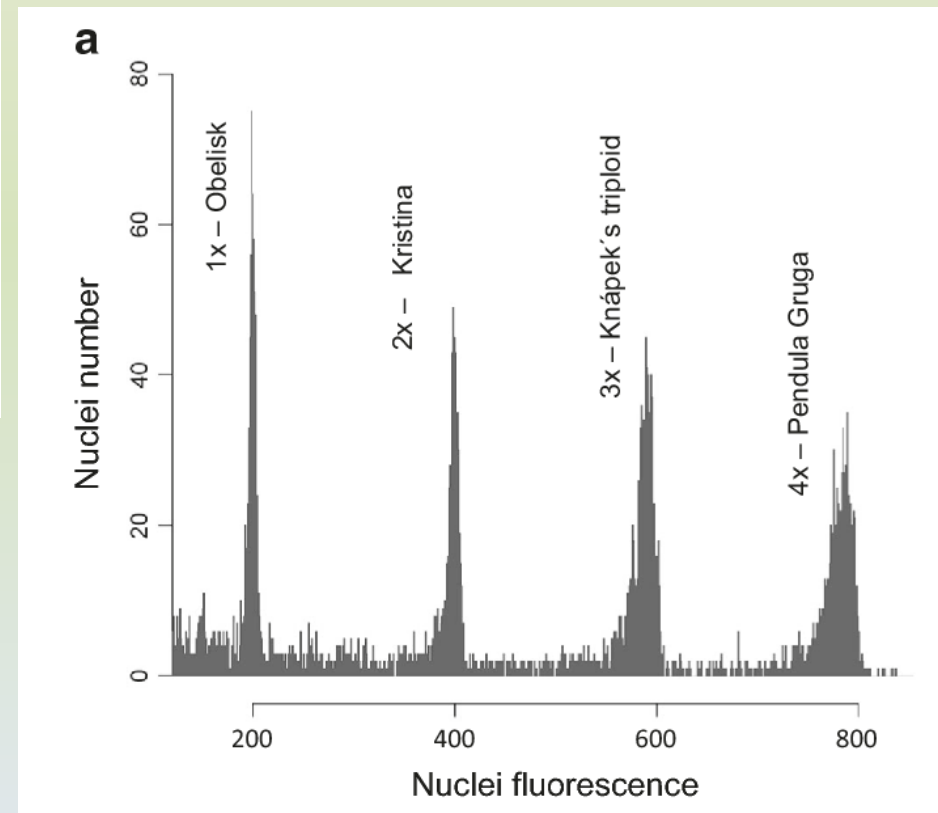
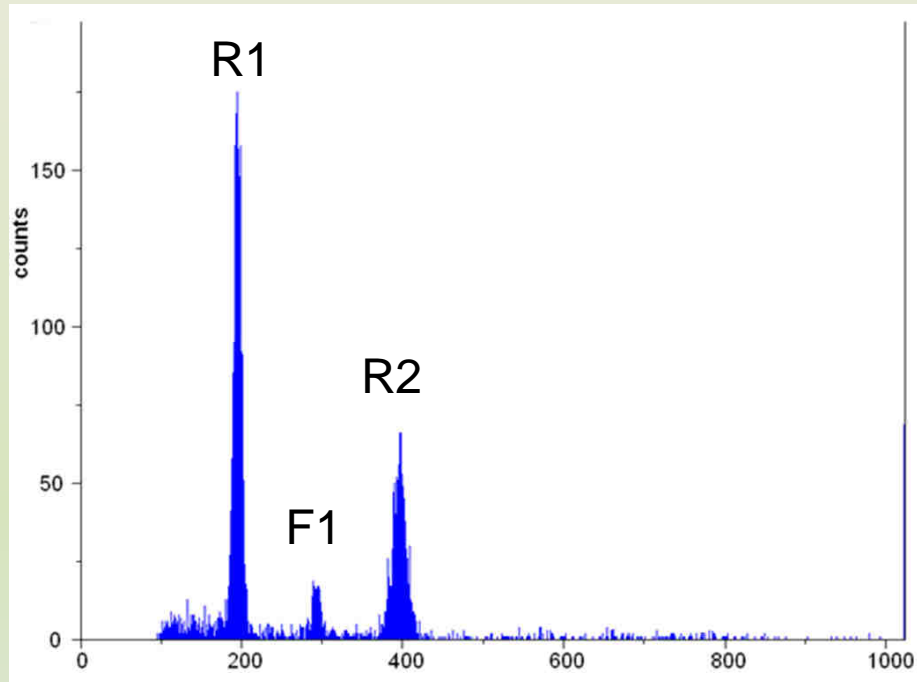
Způsob rozmnožování



Apomixie = nepohlavní rozmnožování pomocí semen

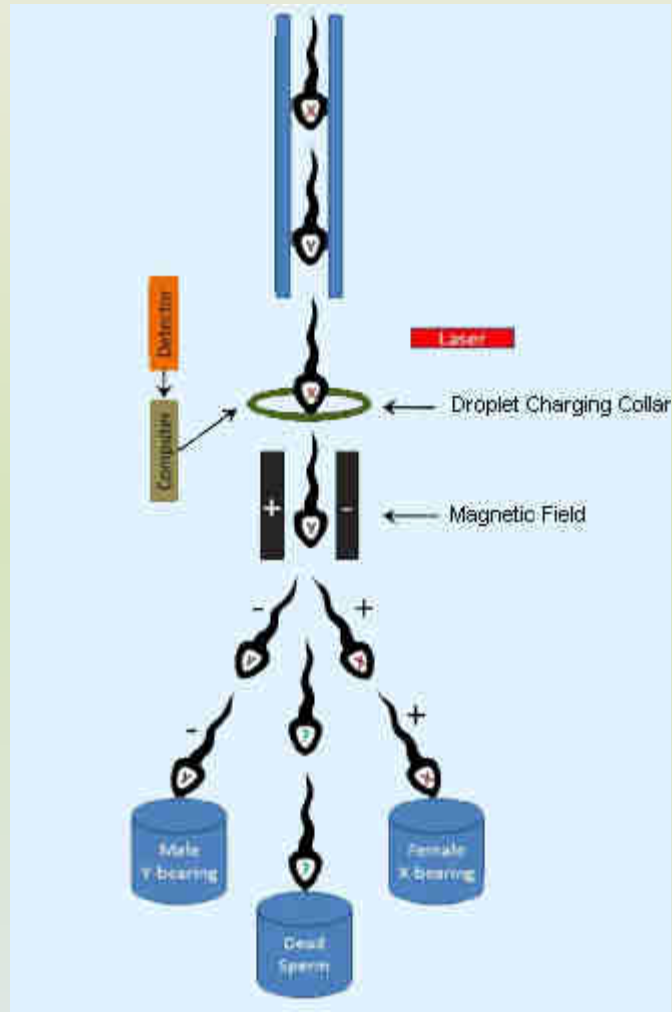


Mezidruhová hybridizace a polyploidizace



Šmarda et al. 2018; *Ginkgo biloba*

Další aplikace průtokové cytometrie



- třídění spermií
- diagnostika leukémie a jiných hematologických chorob
- diagnostika AIDS
- pylová viabilita