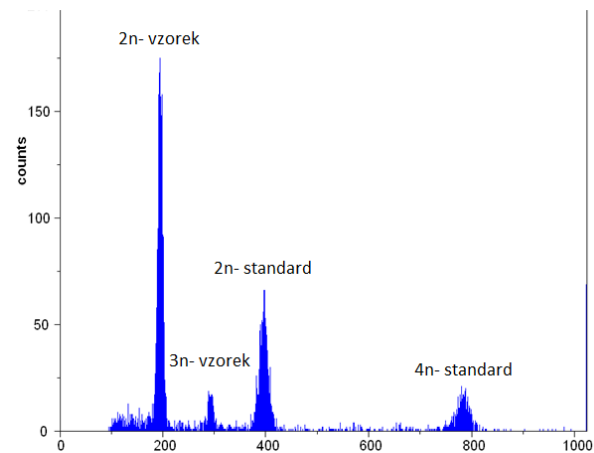
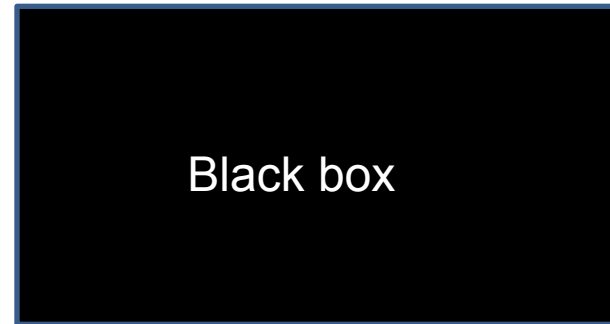


# **Průtoková cytometrie flow cytometry (FCM)**

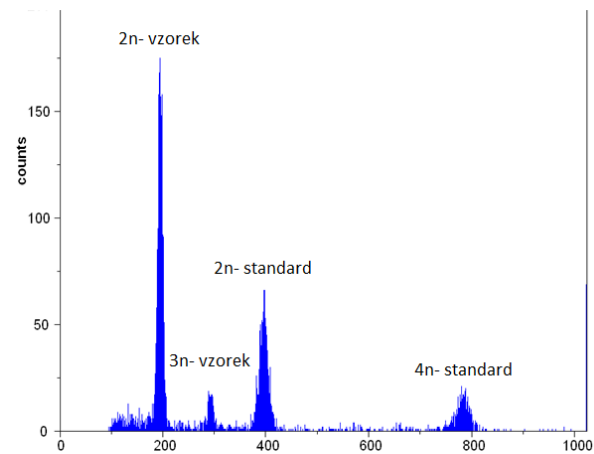
**Bi6589 Laboratorní a bioinformatické metody rostlinné  
biosystematiky**

# Průtoková cytometrie



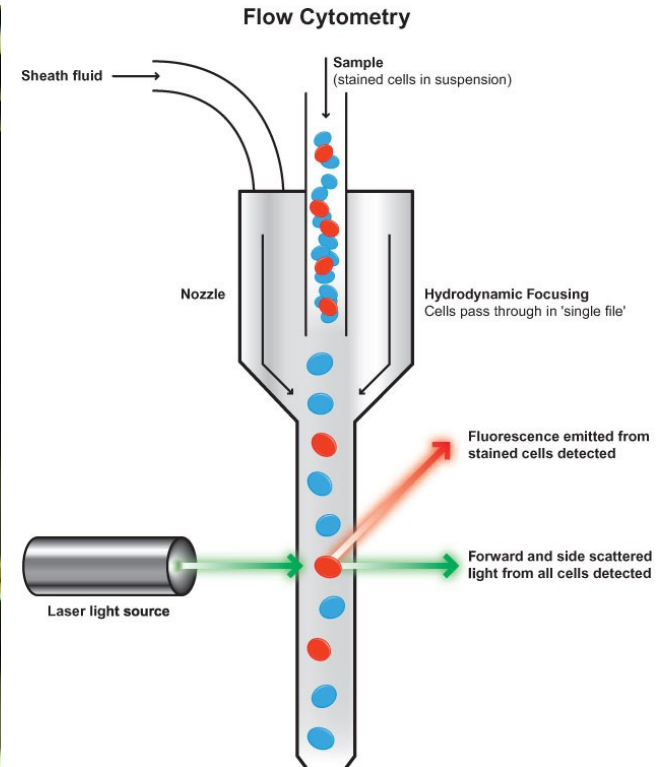
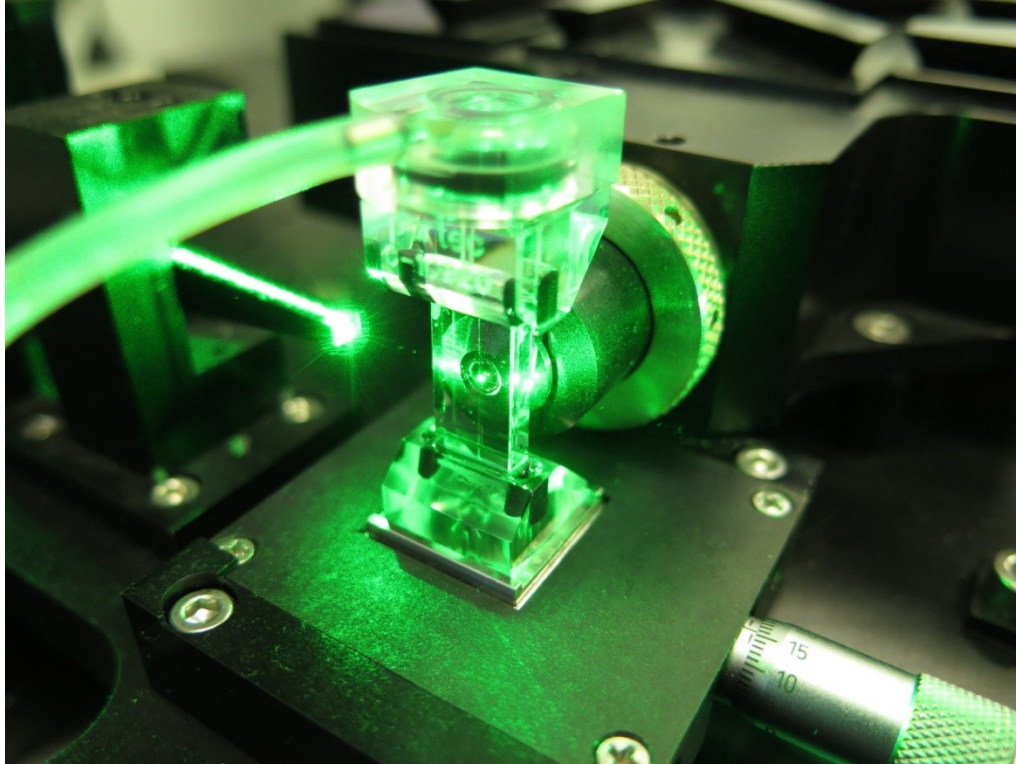
→ Informace

# Průtoková cytometrie



→ Informace

# Srdce cytometru = průtoková kyveta



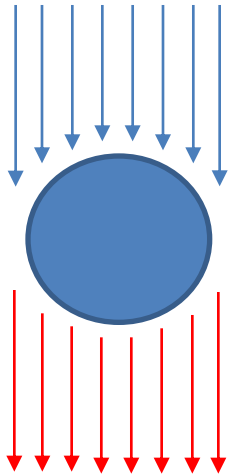
## Funkce průtokové kyvety

- Separace částic v proudu unášecí kapaliny
- Počátek měření optických vlastností částic
- Velikost částic: 0,2-200 $\mu\text{m}$

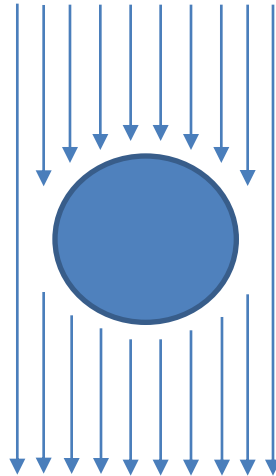
# Průtoková cytometrie

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

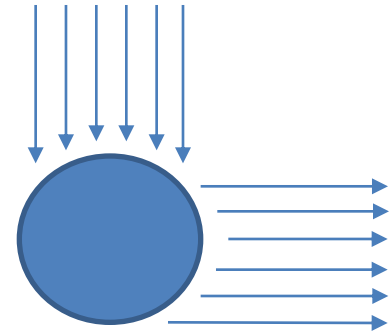
## Optické vlastnosti částic



Fluorescence  
(Excitace/emise)



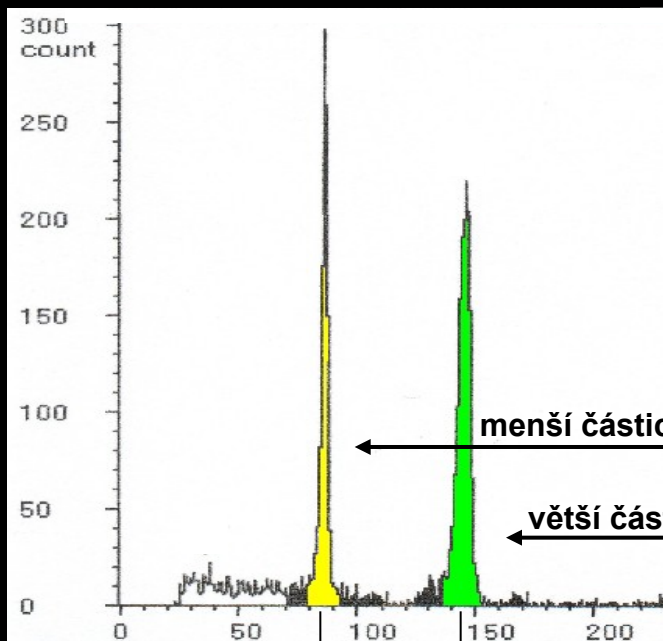
Zástin paprsku;  
Rozptýlené světlo =  
Forward scatter



Odráz paprsku;  
Boční světlo =  
Side scatter

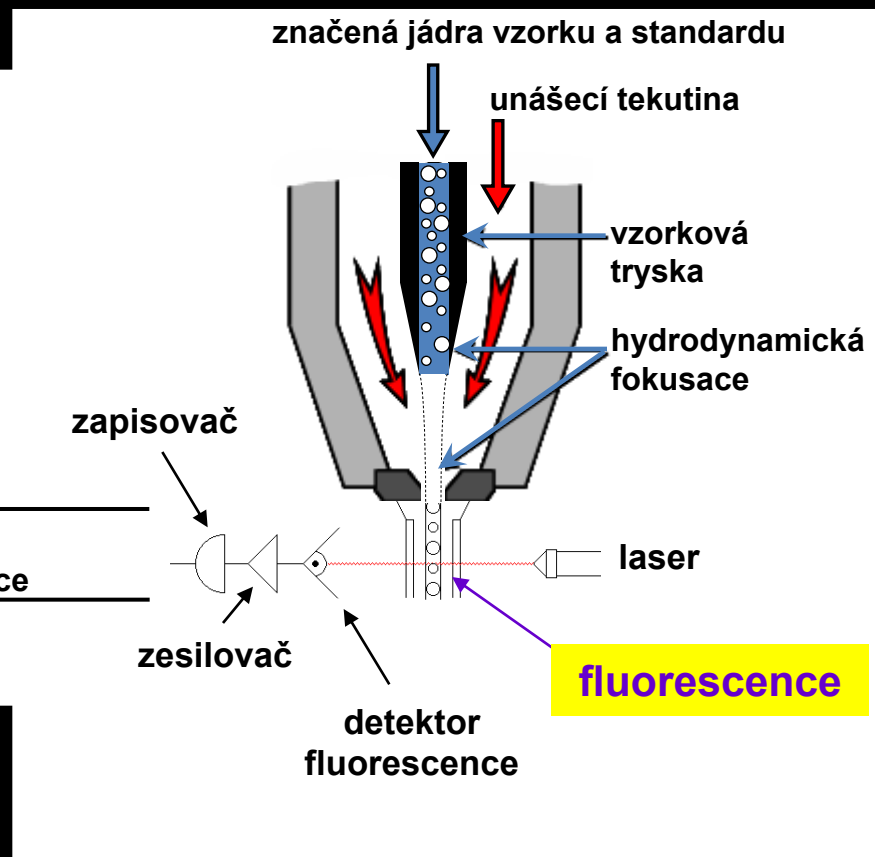
Částice: pylová zrna, mikroorganismy, buňky, buněčná jádra, apod.

# Co se děje v průtokové kyveta?



Osa x  $\approx$  intenzita  
fluorescence

pozice standardu    pozice vzorku



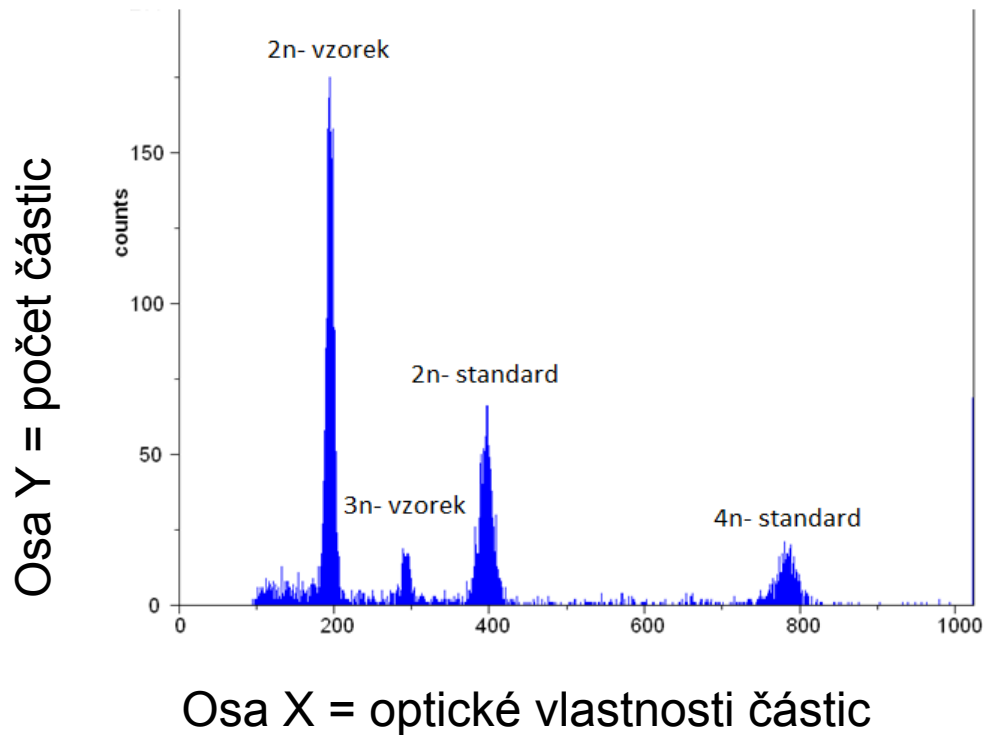
pozice vzorku  $\times$  hmotnost jader standardu (pg)

hmotnost jádra vzorku (pg) = -----

pozice standardu

**Základní výhoda cytometru: rychlá analýza velkého množství částic**

# Pojmy



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

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

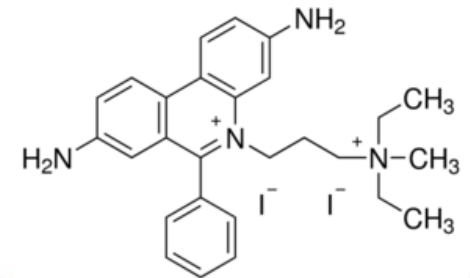
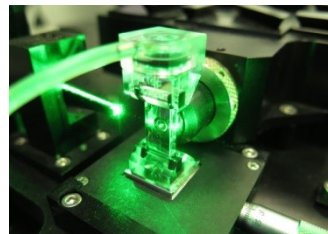
$$CV = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměrná pozice píku}} \times 100$$

# 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))



**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

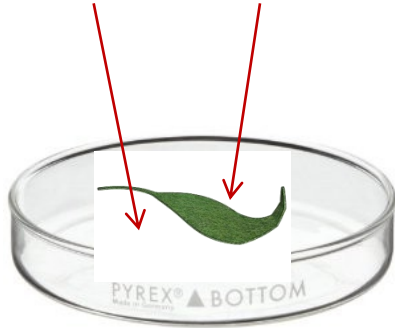
- ontogenetické stáří
- intenzita oslunění a množství sekundárních metabolitů
- způsob uchování vzorku (semena vs. pletivo)

## Volitelné

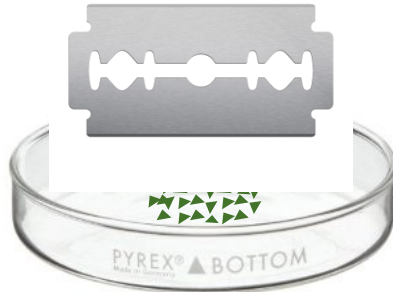
- Extrakční pufr
- Standard

# 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?

```
graph TD; A["Jak hmotnost DNA v jádře změřit?"] --> B["Sekvence celého genomu"]; A --> C["Průtoková cytometrie"]; B --- B1["zdlouhavá"]; B --- B2["drahá"]; B --- B3["složitá"]; B --- B4["živý/sušený/zamražený materiál"]; C --- C1["rychlá"]; C --- C2["levná"]; C --- C3["jednoduchá"]; C --- C4["živý materiál"];
```

**Sekvence celého  
genomu**

**zdlouhavá**

**drahá**

**složitá**

**živý/sušený/zamražený  
materiál**

**Průtoková  
cytometrie**

**rychlá**

**levná**

**jednoduchá**

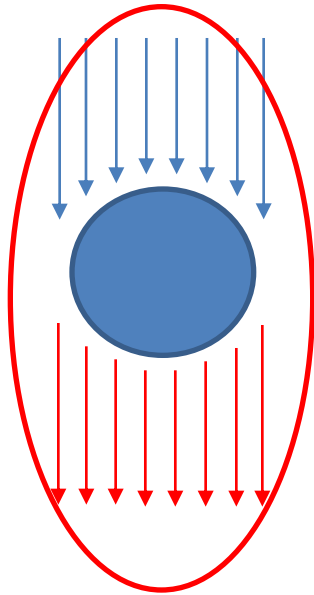
**živý materiál**

**K čemu je to dobré?**

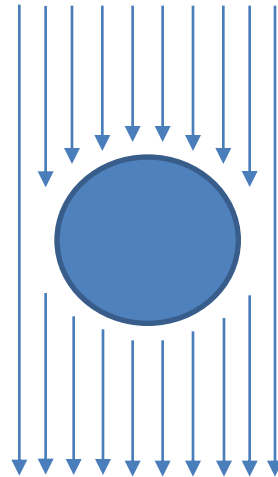
# Průtoková cytometrie

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

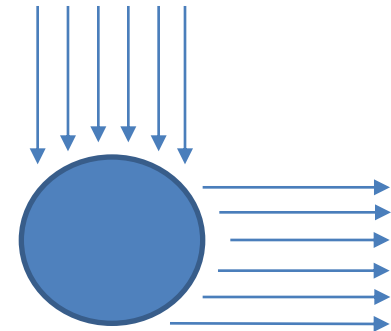
## Optické vlastnosti částic



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

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

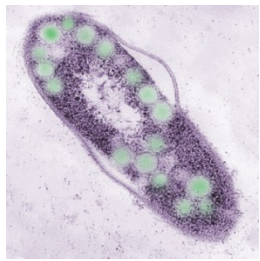


Slunce

○ approximate size of Earth

🌍 Země

# Trpaslík



Střevní parazit  
*Encephalitozoon intestinalis*

Jádro váží  
0,0023 pg



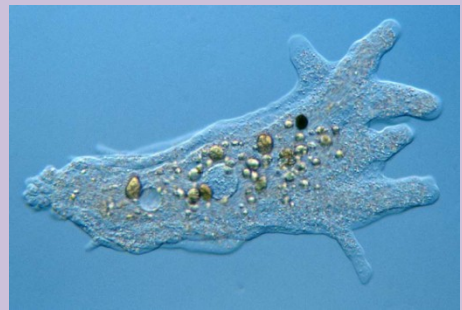
Jádra se liší 600 000 krát !!!

Jádro váží  
1400 pg



půdní měňavka  
*Chaos chaos*

# Obr

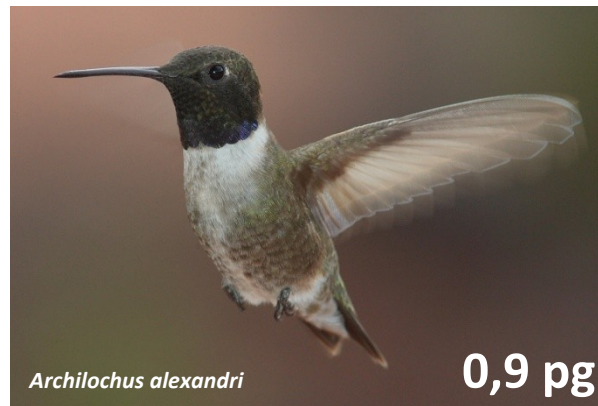




# U mnohobuněčných organismů rozdíly často menší

**Ptáci**

**pštros dvouprstý**



**kolibřík černobradý**

**2,4x**

# Existují i opačné případy – extrémních rozdílů krytosemenné rostliny



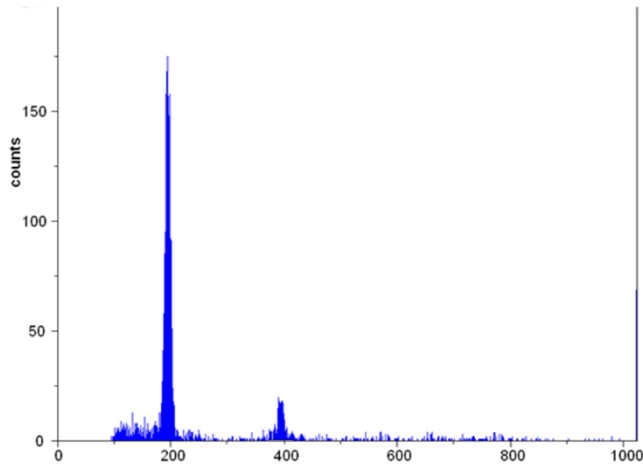
**3000x**



**0,1 pg**

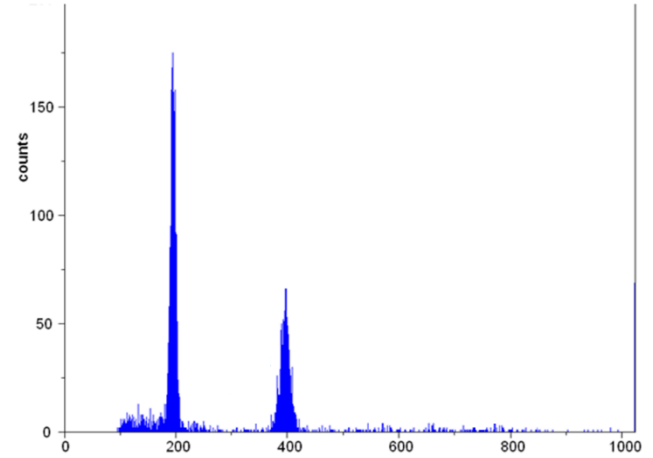
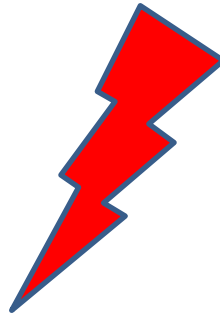


# Holocentrický vs. monocentrický chromozom?

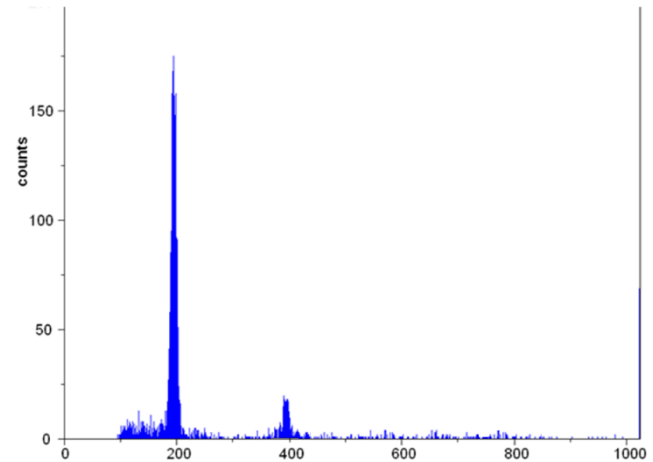


Rostoucí nestresovaná rostlina

UV záření



Monocentrické chromozomy



Holocentrické chromozomy

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

# Velikost genomu ovlivňuje vlastnosti organismů



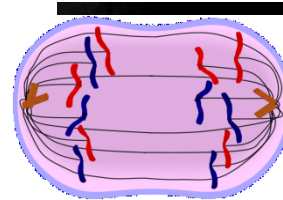
velké jádro se do malé buňky nevejde



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

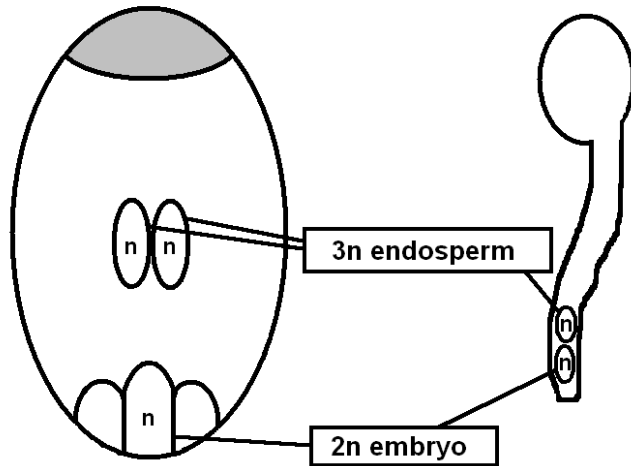
- Ekologické (odolnost k mrazu, rychlost ontogeneze, pravděpodobnost invazibility)
- Fenologické (nástup kvetení)
- Fyziologické (velikost buněk)
- Metodické (vytipování organismů pro sekvenování)

## Sex

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

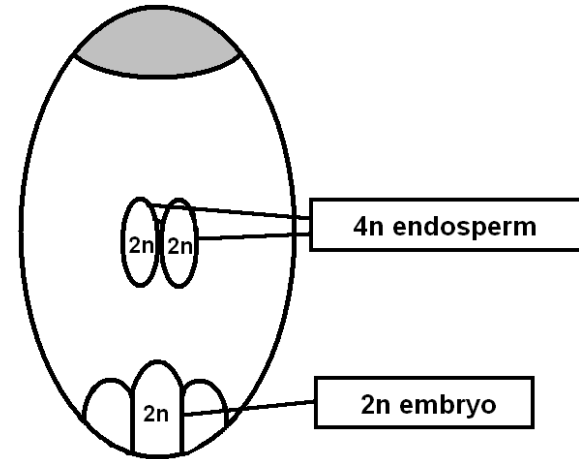
# Způsob rozmnožování – detekce reprodukčních systémů

reduced (sexual) embryo sac



reduced sperm cell

unreduced (apomictic) embryo sac

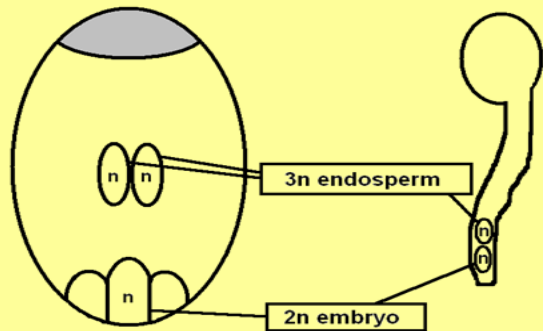


sperm cells		embryo sacs		reduced		unreduced	
				egg cell C	polar nuclei 2C	egg cell 2C	polar nuclei 4C
reduced	C	C	2C	3C	3C	5C	
unreduced	2C	2C	3C	4C	4C	6C	
reduced	0	C	C	3C	2C	5C	
unreduced	0	2C	C	4C	2C	6C	
	0	0	C	2C	2C	4C	
				embryo	endosperm	embryo	endosperm

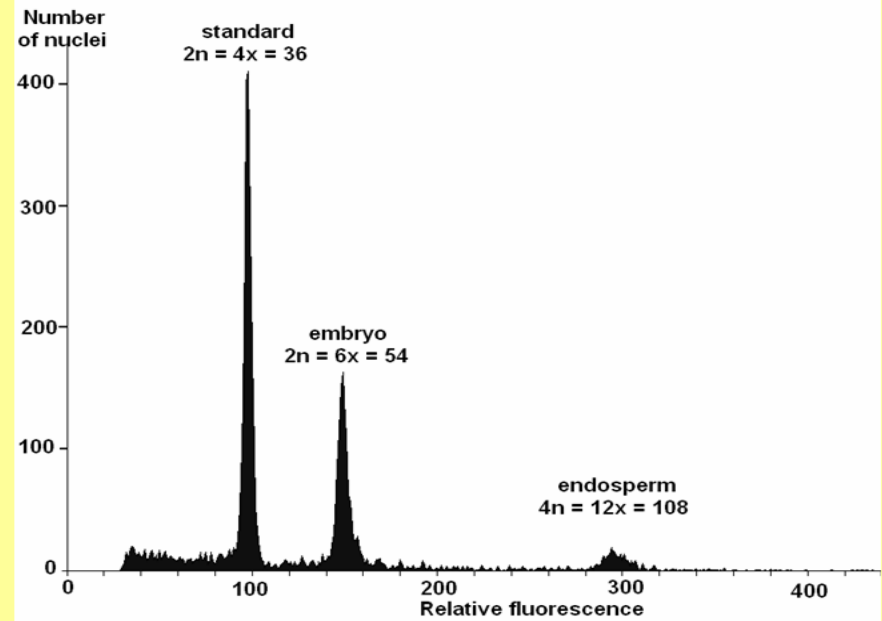
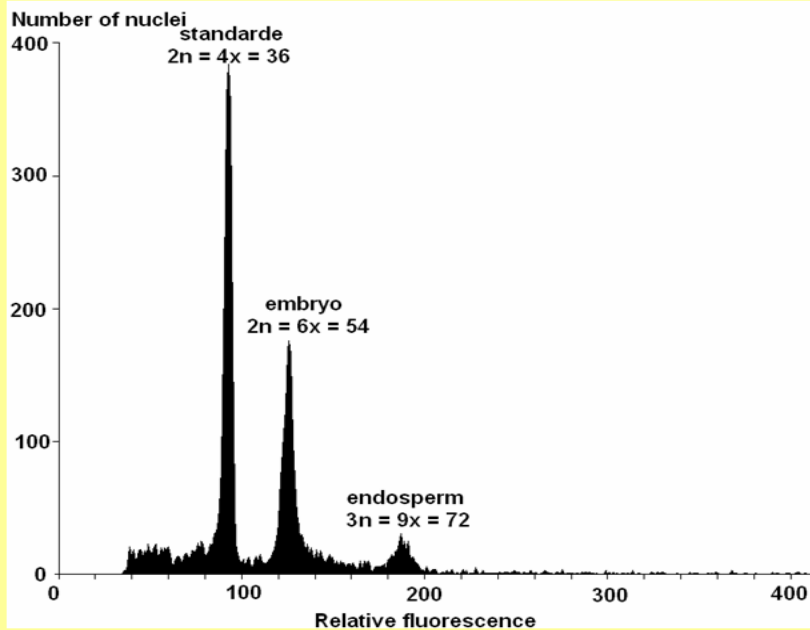
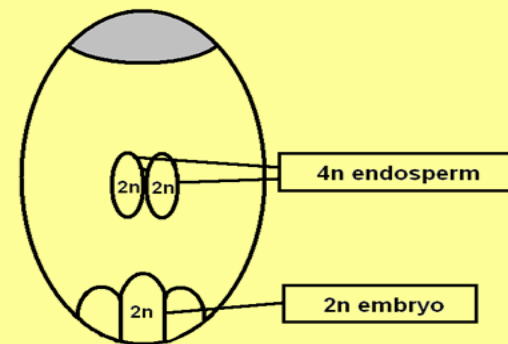
Apomixie = nepohlavní rozmnožování pomocí semen

# Způsob rozmnožování

reduced (sexual) embryo sac

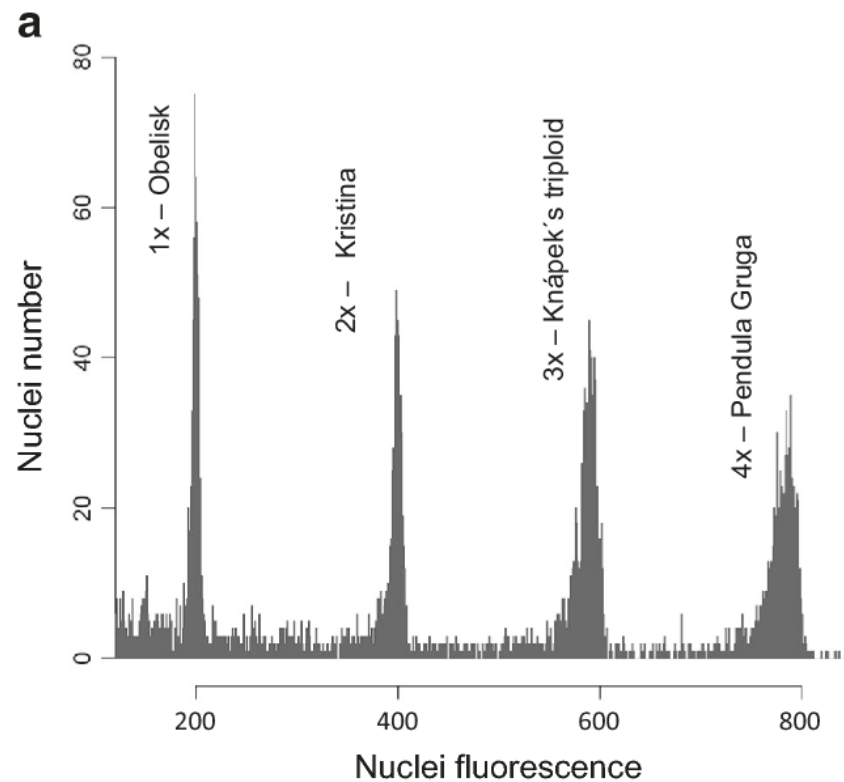
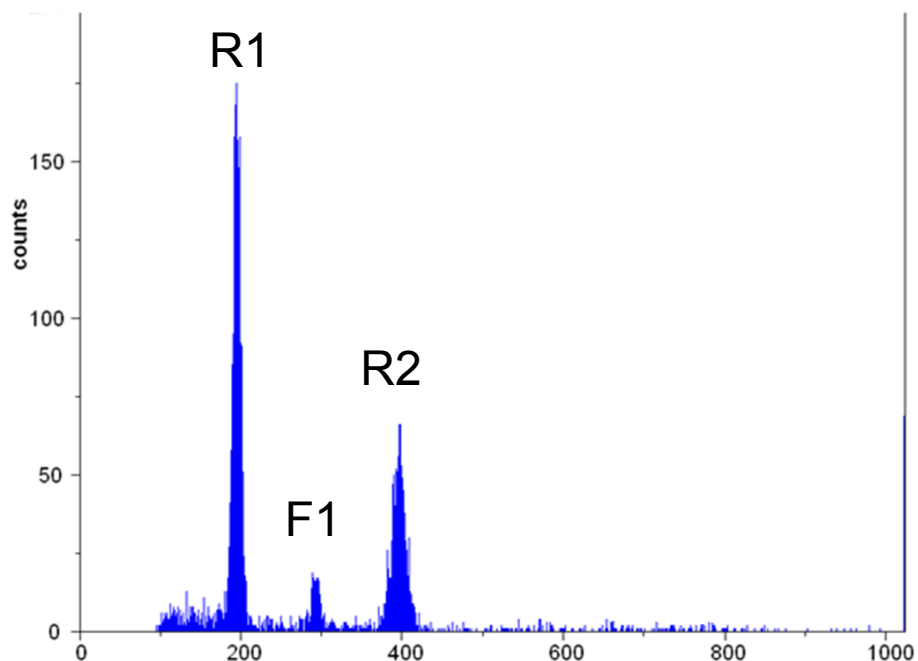


unreduced (apomictic) embryo sac

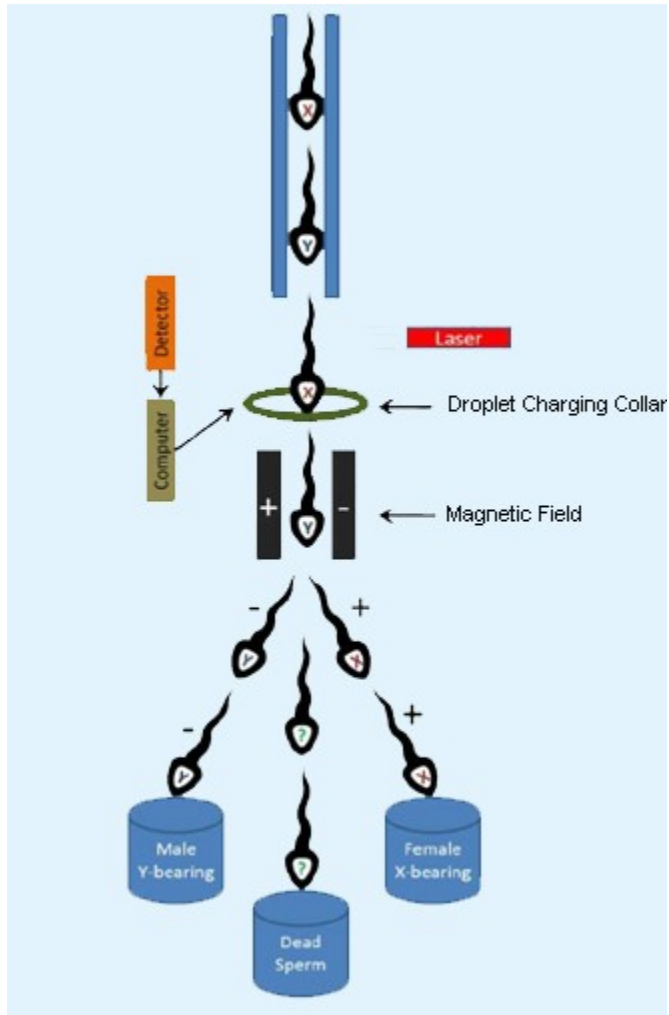


Matzk F., Meister A. & Schubert I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – *PI Journ* 21: 97–108.

# Mezidruhová hybridizace a polyploidizace



# Další aplikace průtokové cytometrie



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