

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Radim Svačina

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Studium organizace genomu v buněčném jádře protoplastů *A. thaliana*

Bakalářská práce

Radim Svačina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele
doc. RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne 5.5.2014

.....

(podpis)

Souhrn

Genom eukaryotních buněk je rozdělen mezi jednotlivé chromozomy nacházející se v buněčném jádře. V interfázním jádře vyšších eukaryot však chromozomy nejsou rozmístěny náhodně, ale jsou uspořádány do tzv. chromozomálních teritorií. Studium těchto teritorií se provádí technikou fluorescenční *in situ* hybridizace metodou tzv. barvení chromozomů a je obvyklá u savců, ptáků, plazů a hmyzu, u rostlin je z důvodu většího výskytu repetitivních sekvencí a větší velikosti genomu tato technika mnohem složitější.

V posledních 14 letech se tato technika začala přenášet na genetický model *Arabidopsis thaliana* z důvodu jeho malého genomu a nízkému počtu repeticí. Zdrojem fluorescenčních sond byla v tomto případě DNA izolovaná z BAC knihoven, nesoucí v jednotlivých liniích *Escherichia coli* fragmenty studovaného chromozomu.

Cílem této bakalářské práce bylo na tuto studii navázat a sestrojít celochromozomovou sondu komplementární k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*. To obnáší klonování a izolaci DNA z BAC knihoven, fluorescenční značení próby a její hybridizaci na chromozom 1 v buněčném jádře protoplastů *Arabidopsis thaliana* a poté sledovat změny v uspořádání chromozomálního teritoria 1 v závislosti odpovědi na stres.

Celochromozomová próba byla sestavena a nepřímo fluorescenčně označena. Byla provedena hybridizace na cílovou strukturu v buněčném jádře protoplastů *Arabidopsis thaliana*, avšak signál nebyl pozorován.

Summary

The genome of eukaryotic cells is divided among the individual chromosomes located in the nucleus. In the interphase nuclei of higher eukaryotes, chromosomes are not randomly distributed but are in so-called chromosome territories. The study of these territories is carried by technique of fluorescence *in situ* hybridization by method called “chromosome painting” and is common in studies of mammals, birds, reptiles and insects. This technique is much more complicated in plants due to higher presence of repetitive sequences.

In the last 14 years, this technique has begun to permeate to the genetic model plant *Arabidopsis thaliana*, because of its small genome and low number of repetitive sequences. In this case, the source of probes was DNA isolated from a BAC library, which was carried by a number of clones of *Escherichia coli*.

The objective of this work is to construct whole-chromosome probe complementary to chromosome 1 of *Arabidopsis thaliana* built on this study. It involves cloning and isolating DNA from BAC libraries, fluorescent labeling of this probe and its hybridization to chromosome 1 in the cell nucleus of *Arabidopsis thaliana* protoplasts and consequent monitoring of changes in the structure of the chromosome territory 1 depending on the response to a stress.

The whole-chromosome probe was constructed and indirectly fluorescently labeled. It was let to hybridize to the target structure in the cell nucleus of *Arabidopsis thaliana* protoplasts, but the signal was not observed.

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce, doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D., za odborné vedení a ochotu. Za vstřícnost bych rád poděkoval všem pracovníkům katedry Botaniky a Buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci, kteří byli vždy ochotni pomoci.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky.....	10
2.1	Chromozomální teritoria.....	10
2.1.1	Struktura chromozomálních teritorií	11
2.1.2	Mechanismy uspořádání chromozomů do teritorií.....	11
2.1.3	Vliv chromozomálních teritorií na genovou regulaci	12
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.1	Studium chromozomálních teritorií v <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.2	Protoplastové kultury	15
2.3	In-situ hybridizace	17
2.4	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	18
2.4.1	Typy sond pro FISH.....	21
2.4.2	Značení sond pro FISH	22
2.4.3	Využití a varianty FISH	25
2.5	DNA knihovny.....	26
2.5.1	Typy knihoven DNA.....	27
2.5.2	Typy vektorů	28
2.5.3	Využití DNA knihoven	31
3	Cíl práce	32
4	Přístrojové vybavení, materiál a metodika.....	33
4.1	Přístrojové vybavení a materiál	33
4.1.1	Biologický materiál	33
4.1.2	Přístroje	33
4.1.3	Chemikálie	34
4.1.4	Roztoky	36
4.2	Metodika	40
4.2.2	Izolace DNA z BAC knihovny.....	41
4.2.3	Příprava DNA sond pro FISH	43
4.2.4	Kontrolní agarózová elektroforéza.....	44
4.2.5	Izolace protoplastů	45
4.2.6	FISH	46

5	Výsledky.....	48
6	Diskuze.....	55
7	Závěr.....	57
8	Seznam použité literatury.....	58
9	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	64

1 Úvod

Studium struktury a organizace genomu je velice důležité pro pochopení mnohých jeho vlastností a funkcí, jako regulace genové exprese, transkripce nebo replikace. Jednou ze struktur, do které se chromozomy vyšších eukaryot skládají, jsou chromozomální teritoria. Tato teritoria představují vymezené oblasti, které jednotlivé chromozomy zastávají a v rámci možností také udržují. Jejich funkce by mohla napomáhat již zmíněné genové regulaci a jsou ovlivňována stupněm diferenciaci buněk.

Studium chromozomálních teritorií probíhá zejména v živočišné říši, jelikož se do poslední doby nedařilo tuto techniku přenést do studií rostlinného buněčného jádra. Technikou, kterou se tato teritoria studují, je fluorescenční *in situ* hybridizace, konkrétně metoda barvení chromozomů. Rostlinný genom často obsahuje velké množství repetitivních sekvencí DNA, a proto je pravděpodobně tuto techniku tak obtížné přenést do rostlinné říše. Lysák M. A. *et al* (2001) však úspěšně hybridizoval celochromozomovou sondu na chromozom 4 genetického modelu *Arabidopsis thaliana*, za použití DNA z BAC knihoven.

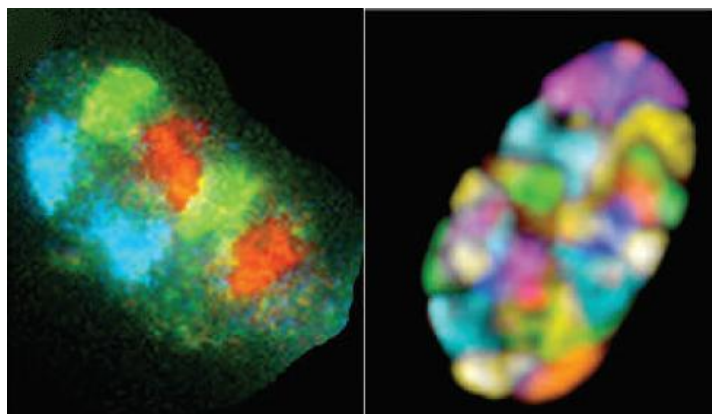
Hlavním záměrem této práce je navázání na tuto studii, sestavením sondy pro chromozom 1 *Arabidopsis thaliana* a její následná hybridizace v buněčném jádře protoplastů. Posledním cílem této práce je sledování a hodnocení změn chromozomálního teritoria 1 v závislosti na stresujících podmínkách.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Chromozomální teritoria

Genom eukaryotní buňky se nachází v buněčném jádře a je rozdělen mezi lineární molekuly DNA, chromozomy. Chromozomy v interfázním jádře však obvykle nejsou náhodně rozmístěny, ale zastávají vlastní pozice uvnitř jádra neboli chromozomální teritoria. Předpokládá se, že většina vyšších eukaryotických organismů nese tato teritoria, avšak některé nižší eukaryotní organismy, jako např. *Saccharomyces cerevisiae*, je nemají. Bylo pozorováno, že teritoria některých buněk si zachovaly svou individualitu i během buněčného cyklu, kdy žádný chromozom nepřesahoval prostorově vymezenou oblast, až na hraniční linie teritorií, kdy občasné docházelo k překryvům (Meaburn J. K., Misteli T., 2007).

Pro ověření, zda se chromozomální teritoria vyskytují v jádrech všech eukaryotních buněk, byla použita metoda barvení chromozomů neboli „chromosome painting“ (Obrázek č. 1). Výsledky se různily od výskytu vysoce uspořádaných chromozomálních teritorií, přes téměř žádné uspořádání chromozomů po uspořádání teritorií podle stupně diferenciacce buněk jednoho organismu (Cremer T., Cremer C., 2001).



Obrázek č. 1 - Chromozomální teritoria buněk myších jater a lidského fibroblastu

Obrázek podle K. J. Meaburn a T. Misteli (1997).

2.1.1 Struktura chromozomálních teritorií

Vnitřní struktura chromozomálních teritorií je prostoupena silně větvenou a propojenou sítí kanálů. Tato síť kanálů umožňuje přístup transkripčních aparátů a regulačních faktorů. Dále bývají ramena chromozomů vzájemně od sebe oddělena v závislosti na poměru kódujících k nekódujícím sekvencím, kdy genově bohaté oblasti se udržují společně a mimo od oblastí na geny chudých. Tento fenomén by mohl napomáhat genové regulaci (Meaburn J. K., Misteli T., 2007). Strukturu chromozomálních teritorií navíc obohacuje přítomnost oblastí bez chromatinu, či dutin, které v nejrozšířenějších místech dosahují průměru až několika μm . Tyto prostory obsahují nechromatinové domény, jako flíčky, svinuté částice a PML částice, jejichž funkce nebyla dosud objasněna (Matera A. G., 1999).

Pod vnější strukturou chromozomálních teritorií si představujeme jejich vzájemné uspořádání uvnitř buněčného jádra a jejich interakce. Chromozomy nižších eukaryot mívají telomerickou část obou ramen na jedné straně jádra, přičemž centromerická část bývá na straně opačné. U vyšších eukaryot, jako u savců, je však uspořádání chromozomů mnohem složitější, kdy rozhoduje např. velikost chromozomu nebo poměr kódujících oblastí k nekódujícím oblastem, všechny aspekty tohoto uspořádání však stále nejsou objasněny (Meaburn J. K., Misteli T., 2007).

2.1.2 Mechanismy uspořádání chromozomů do teritorií

Mechanismy uspořádání chromozomů do chromozomálních teritorií nejsou zatím plně objasněny, existují však dvě odlišné hypotézy. První z nich předpokládá, že jsou chromozomy uspořádávány pomocí pevných jaderných elementů podobných cytoskeletu. Tato možnost by vysvětlovala stabilitu chromozomů během buněčného cyklu, musela by však

být podmíněna kódovanou informací, která by byla pro každý chromozom specifická. Atraktivnější hypotéza představuje model sebeuspořádání, kdy pozici, kterou chromozom zaujímá, určuje celková aktivita jeho genů. Aktivní geny jsou uloženy v rozvolněném euchromatinu a umlčené geny v kondenzovaném heterochromatinu, což způsobuje, že každý chromozom má trochu jiné fyzikální vlastnosti, které by mohly napomoci k jeho uspořádání. Tato hypotéza také vysvětluje, proč mají jednotlivé tkáně či pletiva odlišná chromozomální teritoria (Meaburn J. K., Misteli T., 2007).

2.1.3 Vliv chromozomálních teritorií na genovou regulaci

Faktory ovlivňující genovou regulaci obsahují široké spektrum mechanismů, jejichž výsledkem je snížení či zvýšení exprese určitých genů. Tato regulace zasahuje do tvorby produktů v mnoha krocích, od transkripce, přes zpracování RNA až po post-translační úpravu proteinů. Čím je organismus složitější, tím dokonalejší regulaci genové exprese potřebuje. Mnohobuněčné organismy potřebují pro svou existenci specializované typy buněk, které tvoří jejich pletiva či tkáně, což umožňuje proces zvaný diferenciací. Tento proces je řízen právě regulací genové exprese (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

Je čím dál jasnější, že genová regulace by se neměla vnímat pouze na základě výše popsaných mechanismů, ale i na úrovni uspořádání chromatinu vzhledem k buněčnému jádru. Bylo pozorováno velké množství lokusů genů na povrchu teritorií, které vykazovaly velmi vysokou transkripční aktivitu, což by mohlo napovídat o korelaci mezi lokalitou genu a jeho aktivitou. Mezi nimi se však vyskytovaly i takové geny, jejichž zvýšená exprese byla indukována procesem diferenciací. Není jasné, zda je tato jaderná organizace následkem transkripční aktivace genů, nebo zda je transkripční aktivace příslušných genů následkem reorganizace chromatinu. Geny ovšem mohou prokazovat aktivitu i z vnitřních částí teritorií, což umožňuje již zmíněná síť kanálků (Heard E., Bickmore W., 2007).

2.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana patří do čeledi *Brassicaceae*, je to jednoletá až dvouletá rostlina, dosahující výšky 5 – 40 cm. Jedná se o dvouděložnou rostlinu, jejíž lodyha je přímá, jednoduchá a nahoře větvená. Přízemní růžice listů je tvořena vejčitými, celokrajnými, nebo zubatými listy nesoucí vidličnaté trichomy. Listy dosahují velikosti až 3 cm. Její květ se skládá ze 4 vzpřímených kališních a 4 korunních lístků, celý květ má průměr 4 – 7 mm. Tato rostlina tvoří šešule o průměru 10 – 20 mm. Jedná se o druhotně kosmopolitní druh, který se obvykle vyskytuje na otevřených plochách chudých na vápník, v chudých trávnících, cestách a polích. Jedná se o pionýrskou rostlinu, kterou lze hojně najít od nížin až po hory (Dostál J., 1989), (Spohn M., Golte-Bechtle M., 2010).

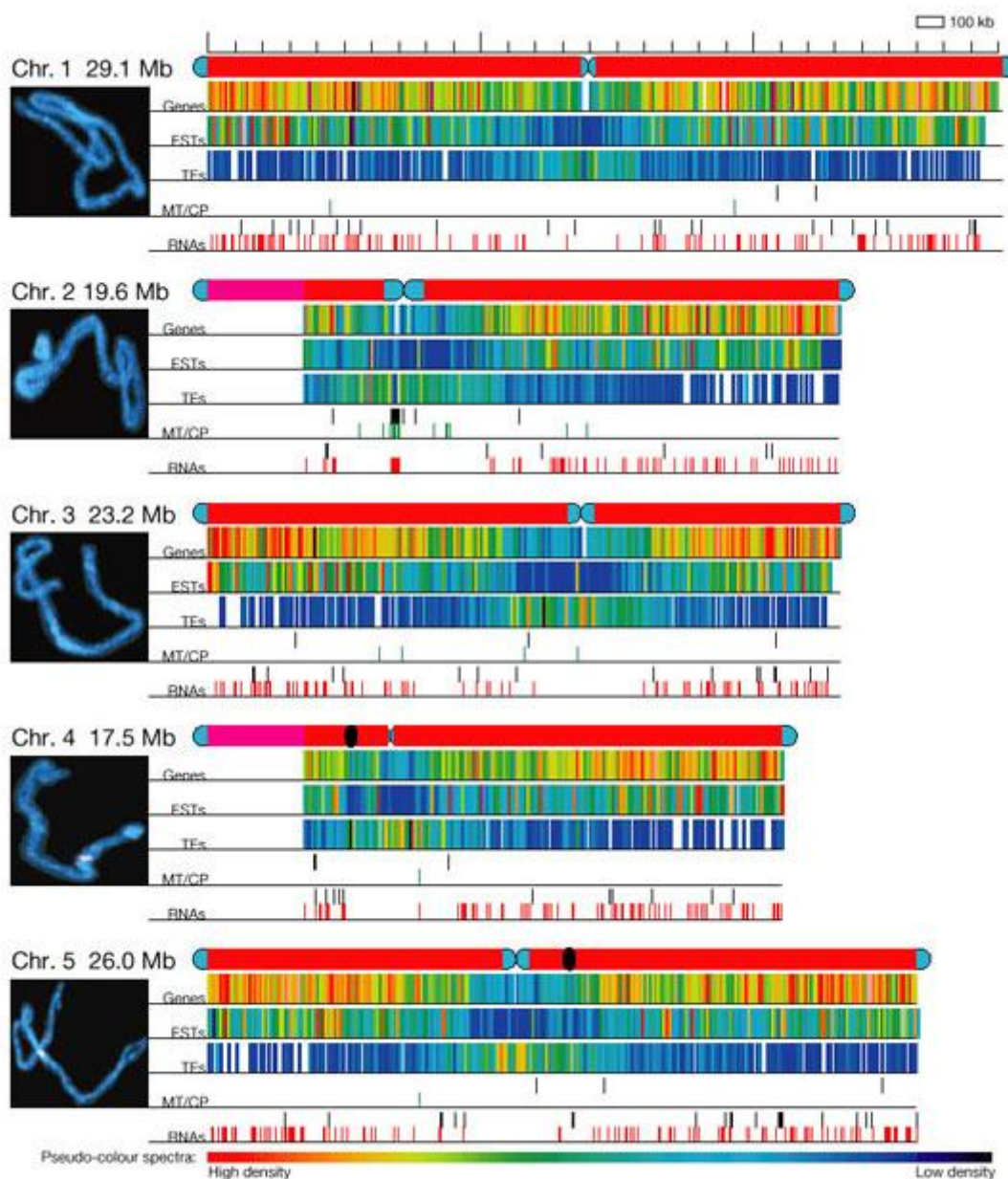
Arabidopsis thaliana je často využívanou rostlinou jako genetický model z mnoha důvodů. Mezi prakticky využitelné výhody této rostliny nepochybně patří malá velikost rostliny, tudíž lze dobře pěstovat v *in vitro* podmínkách. Další výhodou je rychlý životní cyklus, který umožňuje vypěstování mnoha generací během jednoho roku. Malý a jednoduchý genom rozdělený pouze do 5 chromozomů, nesoucích jen malé množství rozptýlených repetitiv, se dá považovat za další z mnoha výhod. Umožňuje tím mnohá studia, mezi která patří právě i zkoumání chromozomálních teritorií (Hays J. B., 2002).

2.2.1 Studium chromozomálních teritorií v *Arabidopsis thaliana*

Studium chromozomálních teritorií se provádí pomocí techniky barvení chromozomů, kdy se na jeden nebo několik chromozomů váže specifická fluorescenční próba, jejíž signál se následovně detekuje pomocí fluorescenčního mikroskopu přímo v buněčném jádru (více o fluorescenční *in situ* hybridizaci v kapitole 2.4).

Barvení chromozomů v živočišných buňkách vyvolalo rapidní postup v cytogenetice. Tato technika se však nedařila aplikovat u euploidních rostlin. Toto je nejpravděpodobněji způsobeno velkým množstvím rozptýlených repetit, které jsou rozšířeny mezi chromozomy rostlin. *Arabidopsis thaliana* (jak bylo zmíněno v minulé kapitole) však nese jen malý genom a nízký počet rozptýlených repetit, čehož využil Lysák *et al* (2001), kdy za použití genomických DNA knihoven (konkrétně BAC klony), poprvé fluorescenčně obarvil chromozom 4 *Arabidopsis thaliana* (Lysák *et al*, 2003).

Obrázek č. 1 vyobrazuje detailní schéma chromozomů *Arabidopsis thaliana*. Sekvenované pozice jsou znázorněny červeně, centromerické a telomerické oblasti jsou označeny světle modře, jinde lokalizovaný heterochromatin černě a rDNA repete purpurově. Jednotlivé chromozomy barveny pomocí DAPI jsou zobrazeny v levé části obrázku. Frekvence jednotlivých vlastností chromozomů jsou označeny pseudobarvou od červené (vysoká hustota) do modré (nízká hustota). Řádek „Genes“ vyobrazuje hustotu genů a liší se od počtu 38 genů na 100 kb do 1 genu na 100 kb. „ESTs“ řádek zobrazuje expresní úroveň jednotlivých chromozomů. Řádek „TEs“ vyobrazuje hustotu transpozibilních elementů. „MT/CP“ řádku byla přidělena černá a zelená barva a ukazuje, v jakých částech chromozomů se nachází inzerty pocházející z mitochondrií nebo chloroplastů. Řádek „RNAs“ zobrazuje hustotu sekvencí kódujících tRNA a snRNA a byla jim přidělena černá a zelená barva. Podle tohoto obrázku je zřejmé, že chromozom 1 má velikost 29,1 Mb, chromozom 2 19,6 Mb a nese NOR oblast, chromozom 3 má 23,2 Mb, chromozom 4 taktéž nese NOR a má 17,5 Mb a chromozom 5 má 26,0 Mb (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).



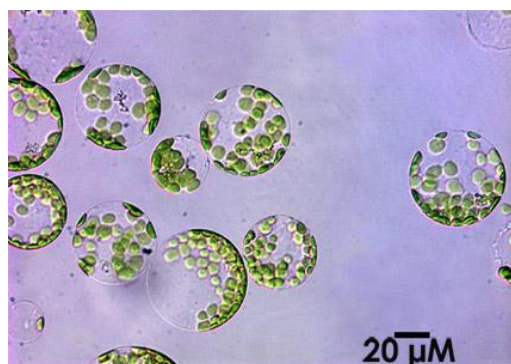
Obrázek č. 2 - Detailní vyobrazení chromozomů *Arabidopsis thaliana*

Obrázek podle The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000).

2.2.2 Protoplastové kultury

Protoplasty jsou rostlinné (Obrázek č. 3), bakteriální či houbové buňky zbaveny své buněčné stěny, za použití enzymatické nebo mechanické metody. Rostlinná buněčná stěna je z velké části složena z polysacharidů, tudíž při enzymatickém odstranění je nutné použití

směsi enzymů, které tyto polysacharidy degradují (celuláza, hemiceluláza, pektináza, xylanáza, apod.). Po odstranění buněčné stěny je však buňka velice citlivá na osmotický tlak, tudíž je nutné izolaci provádět v isotonickém roztoku, aby nedošlo k poškození plazmatické membrány (Yoo *et al*, 2007).



Obrázek č. 3 - Protoplast izolovaný z mezofylových buněk

Zdroj obrázku: <http://www.autom8.com/nanion/application/Others/mesophyll-cells.jpg>

Protoplastové kultury se nejčastěji kultivují v tekutém nebo polotekutém médiu. Toto médium musí obsahovat složky nezbytné pro buněčný metabolismus (rostlinné hormony, minerální látky, energeticky významné látky, apod.). Dokud protoplasty nedokončí stavbu nové buněčné stěny, je taktéž nutná přítomnost látek udržujících isotonické prostředí roztoku. Stavba buněčné stěny začíná obvykle po několika minutách od založení protoplastové kultury (M. R. Dawey *et al*, 2004).

Protoplastizace rostlinné buňky způsobuje dediferenciaci. Tento proces provází silná dekondezace jaderného genomu, jejímž výsledkem jsou změny v uspořádání genetického materiálu, morfologii buňky a dává jí schopnost diferenciaci na kterýkoliv buněčný typ rostlinného pletiva. Diferenciaci z protoplastu na jiný buněčný typ provází rekondenzace. Pěstování protoplastů v *in vitro* kulturách způsobuje zvýšení hladiny stresu, tudíž ji provází zvýšená tvorba reaktivních oxidačních radikálů (ROS). Schopnost buňky vyrovnávat

se s takovými radikály obstarávají antioxidační mechanismy, které nemusí být dostatečné, kvůli již zmíněné zvýšené hladině stresu v protoplastových kulturách. Bylo pozorováno, že hladina oxidativního stresu koreluje se schopností buňky dekondezace a rekondenzace chromatinu a proliferace (Ondřej *et al*, 2010).

2.3 In-situ hybridizace

Technika *in situ* hybridizace umožnila detailnější pochopení uspořádání genomu v buňkách, a proto se objevení této techniky považuje za milník cytogenetiky. Poprvé byla použita roku 1969 při vytváření hybridních molekul mezi DNA a RNA, kdy pro vizualizaci byla použita autoradiografie (Gall G. J., Pardue M. L., 1969).

Principem této techniky je konstrukce DNA sondy, která se v denaturovaném stavu váže na komplementární sekvence v cílové struktuře. Aby byla umožněna jakákoliv detekce, sonda musí být fyzikálně nebo chemicky značena. K úplně prvnímu typu značení se využívalo radioaktivních izotopů J. G. Gallem a M. L. Pardue roku 1969. Detekce takto značené sondy se prováděla pomocí radiosenzitivních materiálů. Citlivost metody byla uspokojivá, avšak špatné rozlišení snímků a zdlouhavá složitá manipulace vyústila k postupnému přecházení od izotopně značených sond ke značení fluorescenčnímu nebo enzymatickému. Principem je navázání takových látek na próbu, které umožní detekci signálu. Enzymatické značení sond se detekuje kolorimetricky, kdy vázaný enzym přeměňuje jeho substrát na barevný produkt, což umožňuje lokalizaci cílové sekvence. Kolorimetricky detekovaný signál je sice silný, ale jeho rozlišení není, stejně jako u radioaktivního značení, příliš přesné. Enzymaticky značené próby se v dnešní době nejčastěji využívají v technice RNA *in situ* hybridizace (Schwarzacher T., Heslop-Harrison P., 2000). Další skupina látek, která je využívána pro značení prób, se nazývá fluorochromy. Fluorochromy jsou vázány

na sondu, kdy detekce probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu. Využitelnost této skupiny látek pro značení je založena na jejich schopnosti excitace při vystavení UV záření. Po jejich excitaci se získaná energie uvolňuje emisí elektromagnetického vlnění o vyšší vlnové délce, než jaké byla vystavena - vyzařuje fluorescenci, a proto se tato technika nazývá fluorescenční *in situ* hybridizace. První použitá látka pro fluorescenční značení se nazývá FITC (fluoresceinisothiokyanát) (Langer-Safer *et al.*, 1982). Fluorescenční *in situ* hybridizace je díky vysokému rozlišení výsledků a rychlosti techniky často používanou metodou molekulární cytogenetiky.

Jednotlivé odvozené techniky DNA *in situ* hybridizace jsou používány k fyzickému mapování, diagnostice strukturních i početních aberací chromozomů a dále ve fylogenetických studiích. RNA *in situ* hybridizace je nejčastěji používána při studiu genové exprese (Schwarzacher T., Heslop-Harrison P., 2000).

2.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

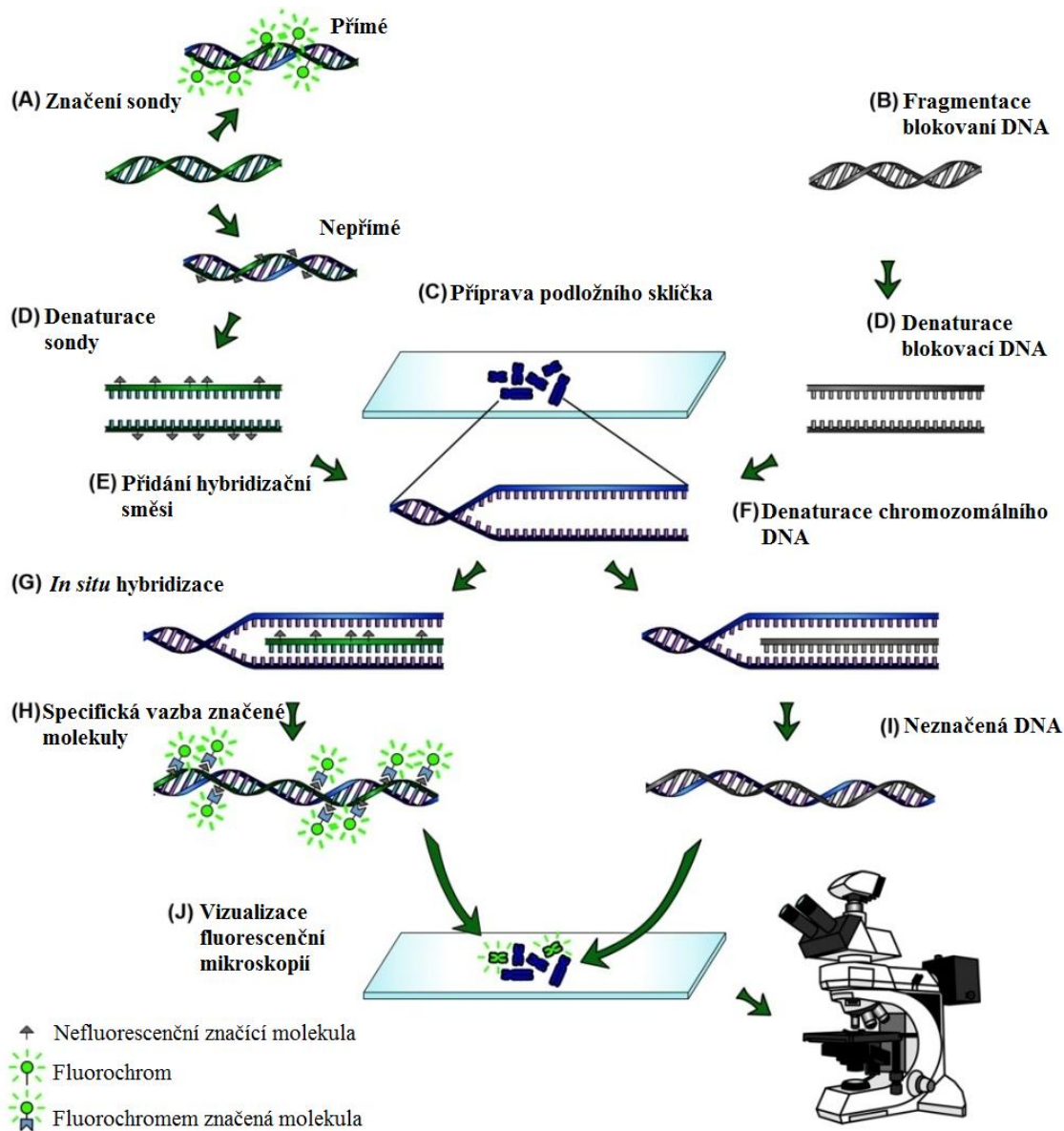
Jak bylo uvedeno v minulé kapitole, fluorescenční *in situ* hybridizace je široce využívanou technikou. Tento fakt je podložen svými mnohými výhodami oproti ISH s jinými typy značení sond. FISH technika umožňuje hybridizaci fluorescenčně značených práb na cílovou sekvenci DNA studované struktury. Vázané fluorochromy na sondě dále umožňují detekci signálu pomocí fluorescenční mikroskopie.

Klíčovým faktorem pro správnou hybridizaci sondy s komplementárním místem na chromozomu je tzv. stringence. Stringence udává procentuální zastoupení správně párovaných bází mezi sondou a cílovou sekvencí. Její hodnota se určuje na základě teploty tání (T_m) a je ovlivňována některými faktory, jako jsou koncentrace formamidu a kationtů,

dále reakční teplota, délka a poměrové zastoupení AT a CG bází v sondě (Schwarzacher T., Heslop-Harrison P., 2000).

Pokud sonda mimo jiné obsahuje repetitivní sekvence, může docházet k nespecifickému vázání próby na jiné, nežádoucí struktury (například při studiu chromozomálního teritoria chromozomu 1 je neakceptovatelné, aby se sonda vázala i na ostatní chromozomy). Tomuto fenoménu lze zabránit přidáním blokovací DNA. Tento přídatek obsahuje neoznačenou repetitivní DNA, která hybridizuje s repetitivními cílovými strukturami, tudíž zabraňuje vázání próby. Pro efektivnější blokadu nespecifického signálu vyvolaného repetitivními sekvencemi se však často využívá COT-DNA, která obsahuje vyšší koncentrace těchto sekvencí. Vzhledem k tomu, že rostliny obecně obsahují více repetitivních sekvencí v chromozomech, se tyto prostředky nejčastěji využívají při fluorescenční *in situ* hybridizaci v rostlinách (Zwick M. S. *et al.*, 1997).

Na Obrázek č. 4 je vyobrazen schematický postup fluorescenční *in situ* hybridizace. V prvním kroku je zřetelné, že existují dva typy značení sondy, a to buď přímý, kdy jsou značeny jednotlivé deriváty nukleotidů, anebo nepřímý, kdy se na sondu pouze váže hapten (např. digoxigenin), nebo jiná molekula se specifitou k jiné látce (např. biotin), která je následně detekována protilátkou (anti-digoxigenin k digoxigeninu), nebo látkou s afinitou k již zmíněné vázané molekule (extravidin k biotinu). V dalších krocích se fixuje testovaný materiál na podložní sklíčko, dochází k denaturaci a hybridizaci značené sondy a blokovací DNA, a nakonec dochází k vizualizaci signálu pomocí fluorescenční mikroskopie (podrobnější popis viz kapitola 4.2.6).



Obrázek č. 4 - schematický postup fluorescenční *in situ* hybridizace

Obrázek podle: Brammer S. P. *et al* (2013).

Hlavním problémem fluorescenční *in situ* hybridizace je tzv. vysvěcování signálu. K tomu dochází při vystavení fluorochromů elektromagnetickému záření o určitých vlnových délkách během manipulace nebo pozorování. Při rychlé a opatrné práci lze však jeho účinek do určité míry omezit.

2.4.1 Typy sond pro FISH

Sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci musí být vytvořeny z komplementárního vlákna DNA, aby byla umožněna vazba. Z tohoto důvodu je nutné zvážit, jaký zdroj pro tuto próbu zvolit. Faktory, které musí být zváženy, se liší od délky studovaného fragmentu po prostorovou organizaci vlákna aj. Právě délka studované oblasti chromozomu bývá často limitující faktor. Počet bází sondy by se měl pohybovat mezi 200 až 600 bp, tudíž při izolaci ze zdroje, který nám poskytne delší vlákno, je nutné toto vlákno fragmentovat na kratší úseky. Tento krok způsobí efektivnější hybridizaci na cílové místo v chromozomu (Trask B., 1999).

Zdroje DNA pro konstrukci sondy se různí, mohou to být PCR produkty, genomová DNA, syntetické oligonukleotidy, nebo může jít také o DNA klonovanou ve vektorech, přičemž právě tato varianta je díky obecně rozšířeným DNA knihovnám nejpoužívanější. Mezi tyto vektory patří umělé chromozomy (YAC, BAC), vektory odvozené z bakteriofágů, kosmidy nebo plazmidové vektory (více v kapitole 2.5.2). Podle velikosti fragmentu, který je potřeba pro konstrukci próby je nutné zvolit jeden z těchto vektorů, protože se liší zejména vlastnostmi, jako jsou délka inzertu, které jsou schopny pojmout, jeho stabilita apod. (Schwarzacher T., Heslop-Harrison P., 2000).

Sondy pro jednokopiové sekvence hybridizují na geny nebo regulační místa. **Tytonukleotidové** sekvence se v genomu nacházejí pouze jednou, tudíž jde o velice specifickou vizualizaci, při které lze přesně určit, na jakém chromozomu a na jaké jeho části se taková sekvence nachází. Takovým typem sondy například Khrusthaleva *et al* (2001) lokalizovala T-DNA transgenních jedinců druhu cibule kuchyňské (*Allium cepa*). Próby pro jednokopiové sekvence lze například vytvořit pomocí BAC knihoven.

Repetitivní sekvence se v genomu vyskytují ve vysokém počtu kopií, kdy mohou být buď roztroušené, nebo uspořádané tandemově za sebou. Vzhledem k jejich vysokému

počtu bývá hybridizace mnohem rychlejší a zejména u tandemově uspořádaných repetitivních sekvencí vykazují intenzivnější signál. Cílové struktury repetitivních sekvencí bývají především v mitotických chromozomech a interfázním jádru (Trask B., 1999).

Chromozomové próby obsahují komplementární sekvence celého chromozomu, tudíž se dají využít při diagnostice chromozomových mutací, jako například strukturních a početních aberací. Bohaté využití však nalézá i ve výzkumu fylogeneze a chromozomálních teritorií, kde je využíváno techniky barvení chromozomů. Tato technika je rozšířenější v živočišné říši, kvůli nižšímu počtu repetitivních sekvencí, avšak využitím linií BAC klonů (Lysák M. *et al.*, 2001) a blokovací DNA (Zwick M. S. *et al.*, 1997) se začíná dařit přenos této techniky do rostlin s nižším obsahem repetitivních sekvencí jako je *Arabidopsis thaliana*.

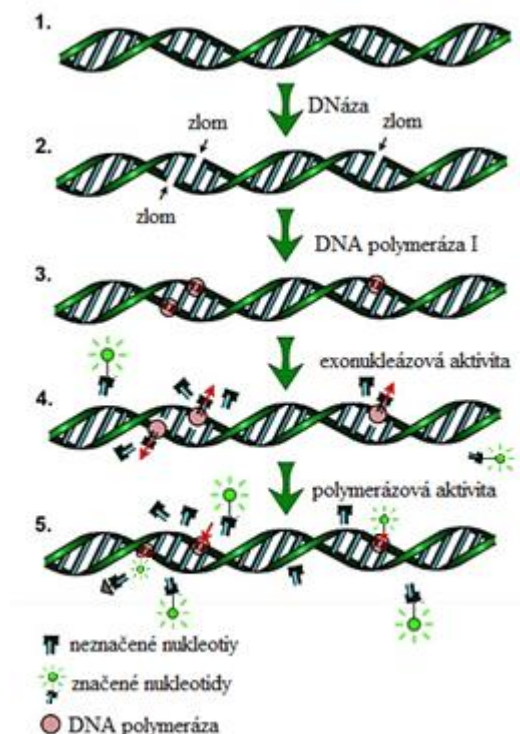
Konstrukce sondy z genomové DNA se nejčastěji využívá při fylogenetických studiích. Sestavením genomových prób z předpokládaných rodičovských druhů a jejich následnou aplikací v genomové *in situ* hybridizaci (GISH) hybridního druhu, lze určit jeho původ (Zwierzykowski Z. *et al.*, 1998).

2.4.2 Značení sond pro FISH

Aby bylo možné vizualizovat hybridizované sondy na cílovou sekvenci DNA, musí být detekovatelně značeny, kdy při fluorescenční *in situ* hybridizaci jsou využívány fluorochromy. Sondy mohou být značeny buď přímě, nebo nepřímě, kdy oba postupy mají své výhody i nevýhody.

Při přímém značení se inkorporují deriváty nukleotidů, často uridin, které nesou vázané fluorochromy. Značení probíhá takovým způsobem, že se nejdříve vytvoří pomocí DNázy I jednovláknové zářezy do připravované sondy. Do těchto míst následovně nasedá DNA polymeráza I, která má 5' - 3' exonukleázovou aktivitu. V reakční směsi jsou přítomny značené analogy bází pomocí fluorochromů, které za současného vyštěpování původních bází,

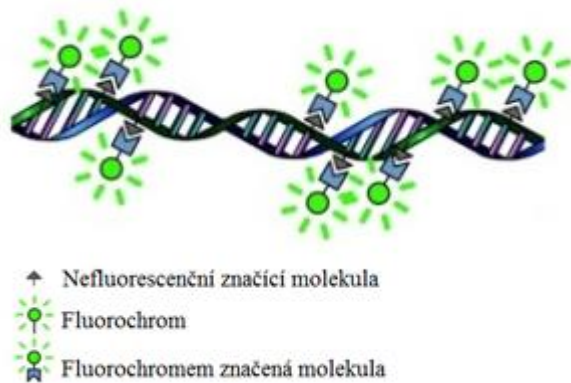
DNA polymeráza I do řetězce inkorporuje (schéma viz Obrázek č. 5). Nevýhodou tohoto značení je, že signál bývá slabší a nelze amplifikovat (Kočárek E., Pánek M., 2010).



Obrázek č. 5 - Schéma postupu přípravy přímo značené sondy

Obrázek podle: Brammer S. P. *et al* (2013).

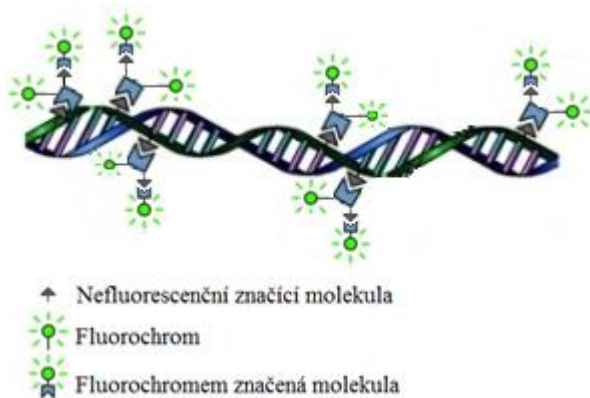
V případě nepřímého značení nejsou značeny jednotlivé nukleotidy, ale na vlákno DNA se váže reportérová molekula (např. biotin nebo digoxigenin), na kterou se po hybridizaci, v kroku detekce, váže látka s afinitou k této molekule (například k biotinu avidin nebo protilátka proti digoxigeninu k digoxigeninu). Látka, která se váže na reportérovou molekulu, je značena fluorochromy, aby byla umožněna její detekce (schéma viz Obrázek č. 6). Mezi používané fluorochromy například patří Alexa 488, fluorescein isothiokyanát (FITC), Cyanine 3 (Cy3) a Cyanine 5 (Cy5). Nevýhodou tohoto způsobu značení sondy je složitější příprava, avšak silnější signál, který je možno navíc amplifikovat, tuto nevýhodu vyvažuje (Kočárek E., Pánek M., 2010).



Obrázek č. 6 - Schéma nepřímo značené próby

Obrázek podle: Brammer S. P. *et al* (2013).

Pokud však sonda nevykazuje dostatečně silný signál ani při nepřímém značení (tato situace může nastávat při detekci jednokopiových sekvencí DNA), naskytuje se možnost tzv. amplifikace signálu. Při amplifikaci signálu dochází k tomu, že na značenou látku afinitní k reportérové molekule je vázána další reportérová molekula. Tato situace tudíž umožňuje vazbu další značené afinitní látky, což způsobuje zesílení signálu (Not F. *et al*, 2002). Schéma se nachází na Obrázek č. 7.



Obrázek č. 7 - Schéma amplifikace signálu

Obrázek podle: Brammer S. P. *et al* (2013).

2.4.3 Využití a varianty FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace nachází využití jak v klinické praxi, tak ve výzkumné činnosti. Mezi tato využití například patří studium buněčného cyklu, kdy FISH umožňuje sledování chování chromatinu na základě změn fází. Dále umožňuje detekci chromozomálních přestaveb, nebo také změny v ploidii, čehož se zejména využívá ve fylogenetických studiích. Mezi důležité využití FISH dále patří cytogenetické mapování a také studium chromozomálních teritorií. Ke všem těmto účelům se využívá různých variant fluorescenční *in situ* hybridizace, které budou dále popsány (Trask, 1999).

Nejrozšířenější variantou FISH je technika genomové *in situ* hybridizace (GISH). Tato technika využívá celé genomové DNA, jako sondy. Jedná se o velmi cennou variantu, zejména při studium allopolyploidních druhů, rekombinantních linií nebo hybridů, kdy díky této technice lze zjistit jejich původ, změny v průběhu speciace, odlišení jednotlivých genomů druhu, detekci introgresí apod.

GISH lze také využít při komparativní genomové *in situ* hybridizace, kdy lze detekovat delece a inzerty jednotlivých částí chromozomů, kdy je připravena sonda z kontrolní buňky a sonda z buňky studované, obě próby jsou značeny jiným fluorochromem, které dohromady způsobují detekci odlišné barvy. Místa kde jsou inzerty nebo delece proto budou vykazovat pouze barvu charakteristickou jen pro původní fluorochrom (Manoir S. *et al*, 1993).

Další z modifikací fluorescenční *in situ* hybridizace je M-FISH, neboli vícebarevná FISH. Jelikož neexistuje dost fluorochromů, které by emitovaly elektromagnetické záření, dostatečně odlišné na to, aby bylo možno rozdíly detekovat pouhým okem, byla vymyšlena modifikace, která umožňuje použití menšího množství fluorochromů pro detekci většího množství cílových struktur. Jednotlivé chromozomy jsou barveny různými kombinacemi sond. Obraz poté počítač, pomocí fluorescenčního mikroskopu, sleduje různými optickými

filtry, kdy každá kombinace různých chromozomů dává vznik tzv. pseudobarvě (Schröck E. *et al*, 1996).

Mezi další modifikace fluorescenční *in situ* hybridizace se řadí Tyr-FISH. Je to amplifikační postup, který mnohonásobně zvyšuje detekovatelný signál. Toho lze dosáhnout vazebnou kombinací protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a fluorescenčně značeného tyramidinu, který funguje jako substrát pro tuto peroxidázu. Detekční citlivost se takto zvýší až 100x, což umožňuje sledování sondy pouze o 1 kb (Khrustaleva *et al.*, 2001).

3D-FISH je technika, kdy jsou jednotlivé buňky zality do polyakrylamidového gelu. Tyto buňky jsou následovně barveny a pozorovány. Při této metodě je však nutné použití konfokálního mikroskopu, což zhoršuje cenovou dostupnost. Výhodou je přesná lokalizace sond v buněčných jádrech buněk (Bass H.W. *et al*, 1997).

ZOO-FISH je varianta používaná při evolučních studiích živočichů. Tato technika využívá rozříděných a značených chromozomů, které následovně hybridizují na chromozomy druhu jiného. To umožňuje sledování homologních částí chromozomů mezi jednotlivými druhy (Dixkens C. *et al*, 1998).

2.5 DNA knihovny

DNA knihovny nesou soubory fragmentů DNA, které se udržují replikací v klonovacích vektorech. Do těchto vektorů byly fragmenty vneseny uměle, tudíž se jedná o rekombinantní molekuly DNA. Knihovny nesou genetickou informaci různých organismů, nebo pouze jejich částí. Vzhledem k tomu, že genomová a chromozomální DNA je příliš dlouhá, než aby byla vpravena pouze v jednom inzertu do jedné linie vektoru, jsou DNA knihovny jednotlivých druhů udržovány ve velkém množství linií tohoto vektoru, kdy každá nese jen určitý fragment

původní molekuly DNA. Vytvoření vektorů nesoucí pouze fragment z původně mnohem delší molekuly DNA umožnil objev restričních endonukleáz a využití malých samostatně se replikujících genetických elementů. Mezi tyto elementy patří plazmidy, virové chromozomy, umělé chromozomy apod. (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

2.5.1 Typy knihoven DNA

Knihovny DNA se dají rozdělit do dvou velkých kategorií, a to na genomové knihovny DNA a komplementární knihovny DNA (cDNA knihovny). V případě genomových knihoven se DNA, které chceme klonovat, rozštípe restričními endonukleázami za vzniku náhodných fragmentů, které se dále vkládají do jednotlivých linií klonovacích vektorů. Vzhledem k tomu, že jsou tyto fragmenty náhodné, jsou do vektorů vloženy kódující i nekódující oblasti, geny mohou být přerušeny, a proto se tyto knihovny využívají např. pro sekvenaci, jelikož se pro některé jiné techniky tento postup nehodí. V případě komplementárních knihoven DNA je k získání vkládaných segmentů DNA přistupováno odlišným způsobem. Do těchto knihoven se vkládají fragmenty získány z mRNA izolované ze studované buňky, tudíž se předpokládá, že se jedná o kódující sekvence DNA. Vyizolovaná mRNA hybridizuje s poly-T primerem, pomocí nějž reverzní transkriptáza dosyntetizuje komplementární vlákno DNA. Zbývající vlákno RNA je degradováno RNázou H a DNA polymeráza dosyntetizuje jednovláknovou DNA, čímž je získáno dvouřetězcové molekuly DNA, odpovídající sekvenci mRNA. Tento fragment je dále klonován v klonovacích vektorech nebo exprimován ve vektorech expresních. Tento typ knihoven nachází využití např. při sekvenaci genů a studiích jejich funkcí, nebo také k výrobě produktů, které tyto geny kódují např. v bioreaktorech (Alberts B. *et al*, 2007).

2.5.2 Typy vektorů

Obecně lze rozdělit vektory na klonovací a expresní, kdy DNA knihovny jsou udržovány pomocí vektorů klonovacích. Jednotlivé fragmenty DNA udržují pomocí replikace. Aby se rekombinantní molekuly DNA vektorů dokázaly replikovat, musí obsahovat počátek replikace, nutný k nasednutí replikačního aparátu. Rekombinantní molekula dále musí obsahovat dominantní selekční marker (nesoucí např. rezistenci k léčivům), aby nedocházelo k akumulaci linií vektorů, které tuto molekulu ztratily, nebo u kterých nedošlo k úspěšné transformaci. Jako poslední nezbytnou součástí klonovacího vektoru je alespoň jedno unikátní restrikční místo, aby bylo možné cizí fragment DNA vnést do vektoru. Expresní vektory bývají využívány v jiných technologiích, než jsou DNA knihovny. Tyto vektory nejen takové fragmenty udržují, ale také vytváří produkty, které jsou touto molekulou DNA kódovány (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

Jako klonovacích samostatných replikačních elementů lze využít vektorů odvozených z bakteriofágů, plazmidových, kosmidových, fagomidových a kyvadlových vektorů nebo umělých chromozomů (BAC, PAC a YAC).

Bakteriofágy jsou viry specificky napadající bakterie. Infekce bakterií těmito viry může probíhat buď lyticky nebo lyzogenně. Lytický cyklus však bývá velice rychlý, doprovází jej rozpad bakteriální částice a navíc molekula DNA lytického fága není v hostitelské buňce stabilní, a proto se nejedná o vhodné výchozí struktury pro odvození vektoru. Lyzogenní infekci však provází fáze retence fágové molekuly DNA, která může trvat až několik tisíc buněčných dělení, kdy se tato molekula stabilně udržuje v potomstvu. Z množství různých lyzogenních bakteriofágů se však jako klonovací vektory uplatnily pouze fág λ a M13. Tyto vektory nejsou schopny nést dlouhé inzerty, kdy fág λ má omezenou velikost insertu pouze od 10 do 15 kb (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009). Vektory odvozeny

od bakteriofágu M13 jsou strukturně velmi odlišné od fágu λ . Klonováním segmentů DNA pomocí tohoto vektoru umožňuje získání jednovláknových molekul DNA, což je využitelné v mnohých metodách (Brown T. A., 2007).

Plazmidy jsou kruhové molekuly DNA, které se vyskytují v bakteriálních buňkách mimo jejich hlavní chromozom. Plazmidové vektory jsou molekuly DNA, do kterých byl rekombinantně vložen cizí fragment DNA a pomocí replikačních aparátů bývá udržován v dalších generacích. Replikace plazmidů probíhá různě. Menší plazmidy využívají replikační mechanismy kódované hlavním chromozomem hostitelské buňky, kdežto některé větší plazmidy nesou genové sekvence, kódující jejich vlastní replikační enzymy. Integrační plazmidy se zase replikují pomocí včlenění do bakteriálního chromozomu, kdy dojde k jejich replikaci společně s chromozomem. Integrace může přetrvávat i po několik dělení. U vybírání vhodného plazmidu pro klonování hrají největší roli dvě vlastnosti, a to počet kopií plazmidu a jeho velikost. Pro klonování vnesených segmentů DNA jsou vhodné plazmidy do velikosti 10 kb, protože práci s většími plazmidy mohou provázet komplikace, jako jejich lámání apod. Pod počtem jejich kopií se rozumí množství plazmidů, které hostitelská buňka udržuje, kdy větší počet kopií znamená větší výnos klonovaných rekombinantních molekul DNA (Brown T. A., 2007).

Při klonování fragmentů DNA, které jsou pro plazmidy příliš velké, lze využít kosmidových vektorů. Jedná se o hybrid mezi plazmidem a chromozomem fága λ , kdy nese schopnost autonomní replikace v hostitelské buňce *Escherichia coli* a je jej možné *in vitro* sbalit, což usnadňuje transformaci bakteriálních buněk. Kosmidové vektory jsou schopny pojmout fragmenty DNA o délce 35 – 45 kb, a přesto jsou schopny se sbalit do fágové hlavičky (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

Fagomidové vektory taktéž obsahují složky fágových chromozomů i plazmidů. V buňkách *Escherichia coli* se replikuje jako klasická dvouřetězcová molekula plazmidu v případě absence tzv. pomocného fága. Po jeho dodání se díky jeho virových replikačním enzymům replikace fagomidového vektoru přepne do jednořetězcového režimu. Samotný pomocný fág je mutantní a svou DNA replikuje jen neúčinně (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

Všechny předchozí popsané klonovací vektory jsou replikovány v buňkách *Escherichia coli*. Vzhledem k tomu, že různé organismy využívají odlišných replikačních počátků a signálů, musí být u různých druhů použito různých vektorů. Proto byly vyvinuty kyvadlové vektory. Ty jsou schopny replikovat se nejen v buňkách *Escherichia coli*, ale i v některých eukaryotních organismech jako např. *Saccharomyces cerevisiae*. Tato vlastnost je zejména užitečná při zkoumání vlivu jednoho genu na různé organismy (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

Knihovny DNA, nesoucí sekvenci celého genomu organismu, musí využívat vektorů se schopností pojmout co největší inzerty. Proto k těmto účelům bývají využívány umělé chromozomy jako kvasinkové (YAC), bakteriální (BAC) a odvozené od bakteriofága P1 (PAC). Tyto vektory jsou schopny pojmout cizí fragmenty DNA o délce 200 až 500 kb. Vektory BAC a PAC mají však mnohem jednodušší strukturu, a proto nahrazují složitější YAC vektor, protože je lze jednodušeji konstruovat. BAC a PAC vektory se replikují v liniích *Escherichia coli*, v posledních letech však byly upraveny tak, aby byly schopné se replikovat i v buňkách savců, což z těchto upravených vektorů dělá vektory kyvadlové (Snustad D. P., Simmons M. J., 2009).

2.5.3 Využití DNA knihoven

Varianty aplikace DNA knihoven jsou velice bohaté a liší se dle typu použité DNA knihovny. Obecně lze říci, že tyto techniky nacházejí využití v biotechnologiích, výzkumu i klinické praxi. V následujícím textu bude zmíněno jen několik způsobů využití této techniky.

Genomové knihovny DNA nacházejí nejčastější využití v sekvenaci genomu nebo jeho částí, a tudíž byly hojně využívány během projektu sekvenace lidského genomu (Venter J. C. *et al*, 2001). Dále je lze využít během genetického a fyzického mapování, jako použil Barker C. L. *et al* (2005), kdy mapoval gen pro resistenci vůči padlí révy vinné (*run1*). Nezbytná část studia chromozomálních teritorií u rostlin také využívá genomových knihoven, kdy izolovanou DNA z jednotlivých linií klonovacích vektorů využívá jako zdrojový materiál pro tvorbu sond na fluorescenční *in situ* hybridizaci (Lysák *et al*, 2003).

Komplementární knihovny DNA jsou často využívány při screeningu exprese proteinů (Büssow K. *et al*, 2000). Jelikož cDNA knihovny nesou pouze funkční část genu (bez intronů, regulačních faktorů apod.), bývají často používány při studiu jeho funkce a taktéž jeho působení na různé organismy použitím kyvadlových vektorů, kdy je např. sledován dopad exprese eukaryotního genu v prokaryotní buňce. Jako poslední zmíněná metoda bude použití cDNA knihoven jako způsobu studia genové regulace na úrovni RNA. Tyto regulační systémy obsahují srRNA, miRNA apod. Tyto molekuly jsou izolovány, přeneseny do cDNA knihovny a klonovány. Následovně jsou sekvenovány a na základě výsledných sekvencí identifikovány a rozdělovány do stávajících nebo nových skupin regulačních RNA (Hafner M., *et al*, 2008).

3 Cíl práce

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Izolace protoplastů a založení protoplastových kultur.
3. Práce s BAC knihovnou a konstrukce celochromozomové próby chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*.
4. Pozorování změn v uspořádání chromozomového teritoria 1 v interfázním jádře protoplastů *Arabidopsis thaliana*.

4 Přístrojové vybavení, materiál a metodika

4.1 Přístrojové vybavení a materiál

4.1.1 Biologický materiál

Jako rostlinný materiál byl použit druh *Arabidopsis thaliana*, wild type. Jedinci byli kultivováni v *in vitro* podmínkách na BM médiu. Před izolací protoplastů byly rostliny udržovány přibližně 3 týdny v podmínkách viz Tabulka č. 1.

	Délka [hod]	Teplota [°C]
Den	16	24 ± 2
Noc	8	20 ± 2

Tabulka č. 1 - Podmínky kultivace rostlinného materiálu ve fytotronu

Zdroj DNA pro tvorbu sond pro chromozom 1 *Arabidopsis thaliana* byl objednán z Arabidopsis Biological Resource Center. DNA segmenty byly klonovány v BAC vektorech pBeloBAC-Kan v liniích *Escherichia coli* kmen DH10B.

4.1.2 Přístroje

analytické váhy, HR 120, A&D, Japonsko

centrifuga, Rotofix 32, Hettich, Německo

centrifuga stolní, Minicentrifuge MCF 2360, LMS, Japonsko

centrifuga, 5804 R, Eppendorf, Německo

centrifuga, Mikro 200, Hettich, Německo

digestoř, MERCI, Česká republika

inkubátor, BT 120, Labo MS, Česká republika

kamera chlazená (fluorescenční mikroskop), DP 72, Olympus, Japonsko

kamera, Edas 290, použitý program Kodak 1D, Scientific Imaging System, Kodak, USA

laminární box, AH-100, Telstar, Španělsko
laminární box, PV-100, Telstar, Španělsko
magnetická míchačka, Mr. Hei – Standard, Heidolph, Německo
mikroskop fluorescenční, BX 60, Olympus, Japonsko
mikroskop reverzní, CK 40 Olympus, Japonsko
mikrovlnná trouba, 3203, ETA, Česká republika
parní sterilizátor, WiseClave, Vitrum, VWR, USA
pH metr, FE20, Mettler Toledo, USA
předvážky, 572, Kern, Německo
příslušenství k destilaci vody, 25, Aqual, Česká republika
rtuťová výbojka, BH2-RFL-T3, Olympus, Japonsko
spektrofotometr, Nanodrop 1000, program NanoDrop 1000 v 3.8.1, Thermo Scientific, USA
sušárna, FD 53 S, Binder, Německo
thermocycler, TCXP, BIOER, Čína
thermoplotýnka, SW85, Adamas, Nizozemí
třepačka, IKA Vibrax VXR Basic, Thermo Scientific, USA
UV Transluminátor, UV, Herolab, Německo
vodní lázeň, 1003, GFL, Německo
vortex, IKA MS2 Minishaker, Thermo Scientific, USA
výrobník ledu, BF 80 WS, Barline, Itálie
zdroj napětí, PowerPackBasic, Bio-Rad, USA

4.1.3 Chemikálie

2, 4 - D, OlChemIm, Ltd

2 – merkaptoethanol, Sigma – Aldrich, GmbH

2 – propanol, Sigma – Aldrich, GmbH

agar, Duchefa Biochemie, b.v.

agaróza, Lonza Biotec, s.r.o.

celulóza, Duchefa Biochemie, b.v.

destilovaná voda

dextran sulfát, Sigma – Aldrich, GmbH

dihydrát citrátu sodného, Lachema, a.s.

dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného, Lachema, a.s.

dihydrogenfosforečnan draselný, Lach – Ner, s.r.o.

ethanol, Lach – Ner, s.r.o.

extrakt z kvasnic, Duchefa Biochemie, b.v.

formamid, Sigma – Aldrich, GmbH

glycerol, Sigma – Aldrich, GmbH

hydroxid sodný, Lach – Ner, s.r.o.

chloramfenikol, Duchefa Biochemie, b.v.

chlorid draselný, Lachema, a.s.

chlorid sodný, Lach – Ner, s.r.o.

IAA, OlChemIm, Ltd

IPAR, OlChemIm, Ltd

kanamycin, Duchefa Biochemie, b.v.

kyselina boritá, Lachema, a.s.

kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma – Aldrich, GmbH

kyselina chlorovodíková, Lach – Ner, s.r.o.

kyselina octová, Lach – Ner, s.r.o.

macerozym, Duchefa Biochemie, b.v.

mannitol, Duchefa Biochemie, b.v.

octan sodný, Sigma – Aldrich, GmbH

paraformaldehyd, Sigma – Aldrich, GmbH

sacharóza, Penta, s.r.o.

saponin, Sigma – Aldrich, GmbH

tris(hydroxymethyl)aminomethanu, Sigma – Aldrich, GmbH

triton Sigma – Aldrich, GmbH

trypton, Duchefa Biochemie, b.v.

TWEEN, Serva, GmbH

4.1.4 Roztoky

0,1mol/l HCl (200 ml)

1,77 ml 35% HCl doplníme destilovanou vodou na 200 ml.

0,45mol/l mannitol (200 ml)

16,4 g mannitolu rozpustíme ve 200 ml destilované vody.

0,45mol/l sacharóza (200 ml)

30,8 g sacharózy rozpustíme v 200 ml destilované vody.

0,5% Triton (100 ml)

5 ml 10% tritonu smícháme s částí 1x PBS a přidáme 0,5 g saponinu. Roztok doplníme 1x PBS na 100 ml.

0,5mol/l EDTA (100 ml)

14,6 g EDTA rozpustíme ve 100 ml destilované vody a upravíme pH na 8.

0,5x BM (1 l)

2,2 g MS a 15 g sacharózy rozpustíme v 1 l destilované vody. Roztok sterilizujeme autoklávem.

BM médium (1 l)

30 g sacharózy a 4,4 g MS se solemi a vitamíny rozpustíme v části destilované vody. Poté přidáme 8 g agaru, doplníme objem destilovanou vodou na 1 l a rozvaříme agar v mikrovlnné troubě.

10x TBE (1 l)

108 g tris a 55 g borité kyseliny rozpustíme v části destilované vody, přidáme 40 ml 0,5mol/l EDTA (pH 8) a doplníme destilovanou vodou na objem 1 l.

0,5x TBE (1 l)

50 ml 10x TBE smícháme s 950 ml destilované vody.

10x PBS (1 l)

80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 a 7,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpustíme v části destilované vody a doplníme objem na 1 l.

1x PBS (1 l)

100 ml 10x PBS smícháme s 900 ml destilované vody.

20x SSC (200 ml)

35,06 g NaCl a 17,6 g dihydrátu citrátu sodného rozpustíme v části destilované vody. Upravíme pH na 7 a doplníme destilovanou vodou na 200 ml.

2x SSC (200 ml)

20 ml 20x SSC smícháme se 180 ml destilované vody.

3mol/l octan sodný (10 ml)

2,46 g octanu sodného rozpustíme v 10 ml destilované vody.

4% paraformaldehyd (10 ml)

0,4 g paraformaldehydu rozpustíme v 10 ml destilované vody.

5% FBS (10 ml)

9,5 ml 1x PBS smícháme s 0,5 ml fetálním bovinním sérem.

20% Savo (100 ml)

20 ml Sava smícháme s 80 ml destilované vody.

50% formamid, iontová síla 2x SSC (1 l)

500 ml formamidu a 100 ml 20x SSC smícháme se 400 ml destilované vody a upravíme pH na 7.

enzymatický roztok pro izolaci protoplastů (1 l)

10 g celulózy a 2,5 g macerozymu rozpustíme v části PM média a poté jím doplníme objem na 1 l.

fixáž ethanol:kyselina octová 3:1 (25 ml)

15 ml 70% ethanolu smícháme s 5 ml ledové kyseliny octové.

LB médium (1 l)

10 g tryptonu, 5 g výtažku z kvasnic a 10 g NaCl rozpustíme v části destilované vody, upravíme pH na 7 a doplníme destilovanou vodou objem na 1 l. Médium sterilizujeme v autoklávu.

LB médium s chloramfenikolem – 50 mg/l (1 l)

V 1 l LB média rozpustíme 50 mg chloramfenikolu.

LB médium s kanamycinem – 50 mg/l (1 l)

V 1 l LB média rozpustíme 50 mg kanamycinu.

Master Mix pro FISH, iontová síla 2x SSC (2 ml)

0,4 g dextran sulfátu rozpustíme v 0,8 ml destilované vody. Poté přidáme 200 µl 20x SSC a doplníme destilovanou vodou objem na 2 ml.

PM médium (1 l)

2 mg IAA, 0,5 mg 2,4 – D a 0,5 mg IPAR rozpustíme v 1 l 0,5x BM médiu.

Zakoupené roztoky

5x DNA Loading Buffer Blue, Bioline, GmbH

Cy3-IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Digoxin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Biotin-Nick translation Mix, Roche Diagnostics, GmbH

COT DNA, Roche Diagnostics, GmbH

DAPI, Vector Laboratories, Inc.

DIG-Nick translation Mix, Roche Diagnostics, GmbH

DOP primery, Generi Biotech, s.r.o.

Sekvence DOP primerů

DOP1: CCGACTCGAGNNNNNCTAGAA

DOP2: CCGACTCGAGNNNNNTAGGAG

DOP3: CCGACTCGAGNNNNNTTCTAG

Extravidin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Gel Red, Biotinum, Inc.

PCR Master Mix, Roche Diagnostics, GmbH

PhasePrep™ BAC DNA Kit, Sigma – Aldrich, GmbH

standard molekulové hmotnosti DNA, BioSystems, s.a., 100 – 1 500 bp DNA ladder

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Sterilizace semen

Semena *Arabidopsis thaliana* byla v laminárním boxu přenesena do plastové mikrozkuřavky, do které byl přidán 1 ml 70% ethanolu. Po 2 min protřepávání byla plastová mikrozkuřavka rychle centrifugována a supernatant odlit. Následovně byl k semenu napipetován 1 ml 20% roztoku Sava a 3 kapky Tweenu. Po 8 min protřepávání byla plastová mikrozkuřavka opět rychle centrifugována a supernatant odlit. Poté byl do mikrozkuřavky napipetován 1 ml sterilní destilované vody. Plastová mikrozkuřavka byla protřepána, rychle centrifugována a supernatant byl opět odlit. Promývací proces byl sterilní vodou opakován 5x. Po promývání byl opět přidán 1 ml sterilní destilované vody. Pipetou byla odpipetována suspenze semen z plastové mikrozkuřavky a po kapkách přenesena na filtrační papír ve sterilní Petriho misce. Petriho miska byla zabalena parafilmem a uskladněna v lednici, připravena pro vysazení na BM médium.

Kultivace rostlinného materiálu

Připravené BM médium bylo rozvařeno, přeneseno do laminárního boxu a přelito do Petriho misek, aby jeho vrstva pokryla dno. Jakmile médium vychladlo, byla z Petriho

misky obsahující osivo přenesena sterilní semena do řady na vychladlé BM médium. Jednotlivé misky byly zabaleny parafilmem a přemístěny do kultivační místnosti. Podmínky růstu rostlinného materiálu jsou v **Tabulka č. 1** v kapitole 4.1.1. Rostliny byly kultivovány 3 týdny, než byly připraveny pro izolaci protoplastů.

4.2.2 Izolace DNA z BAC knihovny

Zmnožení a zamražení BAC klonů

BAC klony obsahovaly bakteriální umělé chromozomy, které nesly fragmenty DNA chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*. Ten byl rozčleněn do 480 linií, kdy byl rozdělen na 5 PLATů, každý PLATE byl rozdělen na A – H segmenty a každý z těchto segmentů byl rozdělen do 12 částí.

Zakoupené BAC klony *Escherichia coli* byly skladovány v 96 jamkových destičkách v mrazáku při -80 °C. Tyto destičky byly na ledu přeneseny do laminárního boxu (za jeden den byl zmnožen 1 PLATE). Do řádně popsaných 6 jamkových destiček byly napipetovány 2 ml LB média s chloramfenikolem nebo kanamycinem (dle instrukcí dodavatele) a 40 µl bakteriální suspenze. Tyto destičky byly přeneseny do inkubátoru a kultivovány přes noc při 37 °C. Další den byly namnožené BAC linie *Escherichia coli* z inkubátoru přemístěny do laminárního boxu a byl odpipetován 1 ml A1 a A2 částí do popsané plastové mikrozkuřavky, následovně 1 ml A3 a A4 do další popsané plastové mikrozkuřavky a obdobně dále, tyto mikrozkuřavky byly dále použity pro izolaci DNA. Zbývající cca 1 ml namnožených BAC klonů v destičce byly přepipetovány do popsaných 48 jamkových destiček, kdy každá část (A1, A2, A3...) byla v jedné samostatné jamce. Do všech těchto jamek bylo následovně přidáno 100 µl glycerolu a destičky byly zamrazeny v mrazničce na jeden den při -20 °C a dále při -80 °C.

Izolace DNA z BAC klonů

Plastové mikrozkušavky, nesoucí BAC klony vždy po 2 liniích (A1-A2, A3-A4...), byly centrifugovány po 5 min při 4 000 rpm. Mezitím byl přichystán resuspendační, lytický a neutralizační roztok z PhasePrepTM BAC DNA Kitu, kdy neutralizační roztok musí být před použitím zchlazen na ledu. Po usazení bakterií byl odlit supernatant. Pelet mikrozkušavky A1-A2 byl dále rozesuspendován pomocí 250 µl resuspendačního roztoku. Tato suspenze byla přenesena do mikrozkušavky nesoucí linie A3-A4, jejich pelet byl také rozesuspendován a tento proces byl zopakován i v mikrozkušavce nesoucí A5-A6. Obdobný proces byl proveden s mikrozkušavkami A7-A8, A9-A10 a A11-A12. Tímto byly získány mikrozkušavky nesoucí smíchané linie A1-A6, A7-A12, B1-B6, B7-B12 až H6-H12 izolovaného platu. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo následovně přidáno 250 µl lytického roztoku, roztok působil 4,5 min za občasného protřepání. Ihned po 4,5 min bylo připipetováno 250 µl neutralizačního roztoku a po protřepání byly mikrozkušavky uchovávány na ledu. Po dokončení úkonu u celého platu byly mikrozkušavky centrifugovány po 5 min, při 4 °C a 14 000 rpm. Vzniklý supernatant byl přenesen do stejně popsaných mikrozkušavek, ke kterým bylo přidáno 450 µl 2-propanolu. Jednotlivé vzorky centrifugujeme po 25 min, při 4 °C a 14 000 rpm. Z mikrozkušavek byl odebrán supernatant a k usazené DNA bylo přidáno 100 µl 70% ethanolu, se kterým byly vzorky centrifugovány po 5 min, při 4 °C a 14 000 rpm. Ethanol byl odpipetován, mikrozkušavky byly ponechány na filtračním papíře, dokud nevyschly a poté bylo DNA rozpuštěno ve 100 µl sterilní destilované vody. Vzorky byly uchovávány při -20 °C, koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru a kontrola délky molekul DNA byla provedena pomocí 1% agarózové elektroforézy.

4.2.3 Příprava DNA sond pro FISH

DOP-PCR vzorků DNA

Na ledu bylo do PCR plastové mikrozkušavky napipetováno 10,5 μl sterilní destilované vody, 12,5 μl PCR Mastermixu, 1 μl DNA ředěného na koncentraci 200 ng/ μl a 1 μl r a f primerů 1, 2 a 3. PCR mikrozkušavka byla přenesena do thermocycleru na program níže.

1x	95 °C
35x	95 °C
	43 °C
	72 °C
1x	72 °C

Koncentrace PCR produktu byla změřena spektrofotometrem a DNA byla uchovávána při -20 °C v mrazničce.

Nick translace

Vzorek DNA byl naředěn na koncentraci 125 ng/ μl v 16 μl sterilní destilované vody v PCR plastové mikrozkušavce. K vzorku DNA byly přidány 4 μl Biotin/DIG-Nick Translation Mixu. PCR mikrozkušavka byla dále inkubována po 85 min při 15 °C v thermocycleru. Po konci cyklu byl k vzorku přidán 1 μl 0,5mol/l EDTA, s kterým inkuboval při 65 °C po 10 min. Následovně byla provedena kontrolní elektroforéza na 1% agarózovém gelu, za použití 3 μl vzorku. Poté byl vzorek skladován při -20 °C.

Převedení próby do formamidu

Po kontrolní agarózové elektroforéze zbylo 18 μl značeného vzorku pomocí digoxigeninu nebo biotinu. Ke vzorku v PCR mikrozkušavce byly přidány 2 μl 3mol/l octanu

sodného a 2 μl COT-DNA. Po proklepání vzorku bylo přidáno 36 μl 96% ethanolu pro UV. PCR mikrozkušavka byla inkubována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 30 min a poté centrifugována v předem vychlazené centrifuze při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, po 30 min a 13 000 rpm. Následovně byl supernatant odpipetován a mikrozkušavky byly ponechány při pokojové teplotě do vysušení. Značená DNA usazená na dně PCR mikrozkušavky byla následovně rozpuštěna ve formamidu. Objem formamidu závisí na množství usazené DNA. Pokud bylo původní množství DNA cca 1 700 ng (95 ng/ μl DNA v 18 μl), tak bylo DNA rozpuštěno ve 42,5 μl formamidu, čímž byla dosažena koncentrace DNA 40 ng/ μl .

4.2.4 Kontrolní agarózová elektroforéza

Kontrolní agarózová elektroforéza byla prováděna po izolaci DNA z BAC klonů a Nick translaci. Do elektroforetické vaničky byl vložen hřebínek pro 20 jamek. Následovně byl vytvořen 1% agarózový gel z 80 ml 0,5x TBE a 0,8 g agarózy, který byl rozvařen v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k homogenizaci. Po částečném vychladnutí směsi byly přidány 3,2 μl Gel Red a po promíchání byl roztok přelit do elektroforetické vaničky. Během chladnutí gelu byly připraveny vzorky pro separaci. Na ústřížek parafilmu bylo přeneseno do jednotlivých kapiček 3 μl vzorku DNA, 1 μl 6x loading buffer a 2 μl sterilní destilované vody a do kapky navíc 5 μl standardu molekulové hmotnosti a 1 μl sterilní destilované vody. Jakmile gel vychladl, byl z něj odstraněn hřebínek a elektroforetická vana byla přenesena do elektroforetické komůrky obsahující 0,5x TBE pufr. Po doplnění 0,5x TBE pufru po rysku komůrky byly jednotlivé vzorky a standard molekulové hmotnosti napipetovány do jamek gelu v pufru a komůrka byla uzavřena a zapojena do zdroje stejnosměrného napětí. Vzorky byly separovány při 110 V po dobu 45 min. Po separaci byl gel vyfocen v UV transluminátoru za použití programu Kodak 1D.

4.2.5 Izolace protoplastů

Přibližně 2 Petriho misky napěstovaných rostlin *Arabidopsis thaliana* na BM médiu byly přeneseny do laminárního boxu. V laminárním boxu byla připravena menší Petriho miska obsahující 5 – 6 ml enzymatického roztoku. Do této Petriho misky byly přeneseny mladší lístky z napěstovaných rostlin a nařezány pomocí sterilního skalpelu. Misky byly zalepeny parafilmem a inkubovány ve tmě po 14 – 16 hodin při 26 °C. Po uplynuté lhůtě bylo Petriho miskou mírně protřepáváno a dále inkubována po dalších 30 min. Mezitím byla připravena další Petriho miska se sterilním mikrosítkem, přes kterou byla suspenze protoplastů přepipetována, abychom médium zbavili nežádoucích nečistot. Získaná suspenze byla přepipetována Pasteurovou pipetou do sterilní skleněné zkumavky a centrifugována po 5 min při 500 rpm. Tímto procesem se protoplasty segregovaly na povrch suspenze. Poté byly převrstveny sterilním 0,45mol/l mannitolem a centrifugovány po 3 min při 500 rpm. Tímto procesem vznikl pruh protoplastů mezi enzymatickým roztokem a 0,45mol/l mannitolem. Protoplasty byly Pasteurovou pipetou přeneseny do další sterilní skleněné zkumavky, do které byly následovně přidány 3 ml 0,45mol/l mannitolu. Zkumavka byla opětovně centrifugována po 3 min při 500 rpm, čímž se protoplasty usadily na dně zkumavky. Supernatant byl odebrán a byl přidán čerstvý 0,45mol/l mannitol. Zkumavka byla centrifugována po 3 min při 500 rpm a supernatant byl odebrán. Vitalita protoplastů byla provedena pomocí fluorescein diacetátu za sledování fluorescenčním mikroskopem. Protoplasty jsou připraveny pro fixaci pro metodu FISH.

4.2.6 FISH

Příprava vzorků

Po kapitole „Izolace protoplastů“ byla přidána fixáž (objem odpovídá 200 μ l na 1 podložní sklíčko). Ve fixáži byly protoplasty zanechány po 10 min, po kterých byly přeneseny na vymražená podložní sklíčka (200 μ l fixáže s protoplasty na 1 vymražené podložní sklíčko), na kterých byla suspenze zanechána, dokud nevyschla. V digestoři byly připraveny vyvíjecí nádoby s roztoky 0,1mol/l HCl, Tritonem, 3 1x PBS a 50% formamidem. Jednotlivá sklíčka byla přenesena do vyvíjecí nádoby s roztokem 0,1 mol/l HCl a byla inkubována po dobu 1 min, poté byly přeneseny do roztoku Triton na 8 min, poté 3x do 1x PBS pokaždé na 5 min a naposledy na 30 min do 50% formamidu. Během posledních 30 min v 50% formamidu byla denaturována sonda. Podle počtu sklíček bylo napipetováno do PCR plastové mikrozkušavky 5 μ l sondy rozpuštěné ve formamidu a 5 μ l Master mixu pro FISH na 1 sklíčko. Tento roztok byl vložen do thermocycleru na 10 min při 80 °C. Po inkubaci byly denaturované sondy vloženy na 10 min na led, dokud nebyly připraveny k použití. Jakmile byla podložní sklíčka vytažena z 50% formamidu, byla osušena ze spodní strany, poté na ně byla napipetována denaturovaná sonda (10 μ l na 1 podložní sklíčko) a byla přikryta krycími sklíčky. Následovně bylo krycí sklíčko oblepeno lepidlem a poté byly vzorky inkubovány na varné plotýnce po 1,5 min při 78 °C. Poté byla podložní sklíčka přenesena do Petriho misek s navlhčenými filtračními papíry. Petriho misky byly oblepeny parafilmem a přeneseny do inkubátoru, kde byly přenechány přes noc při 37 °C. Další den byly z podložních sklíček odstraněny krycí sklíčka a lepidlo a bylo na každé sklíčko napipetováno 200 – 300 μ l 5% FBS a byly přikryty parafilmem,

aby se roztok dostal na celé sklíčko, a inkubujeme po 30 min v pokojové teplotě. Během inkubace namícháme 5% FBS s protilátkou (extravidin nebo myší monoklonální protilátky proti digoxigeninu) 100:1, kdy 100 μ l roztoku je potřeba na 1 sklíčko. Po inkubaci byl 5% FBS ze sklíček odstraněn, na každé sklíčko bylo napipetováno 100 μ l 5% FBS s protilátkou a vzorky byly inkubovány 1 hod ve tmě. Během této hodiny byly připraveny další vyvíjecí nádoby, tentokrát 2 s 2x SSC a 1 s 1x PBS. Nejdříve byla sklíčka inkubována 2x po 5 min v 2x SSC a poté opláchnuta v 1x PBS. Následovně bylo na sklíčka napipetováno 1,5 μ l DAPI, vzorky byly přikryty krycím sklíčkem a buď rovnou pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem, nebo uchovávány při -20 °C.

5 Výsledky

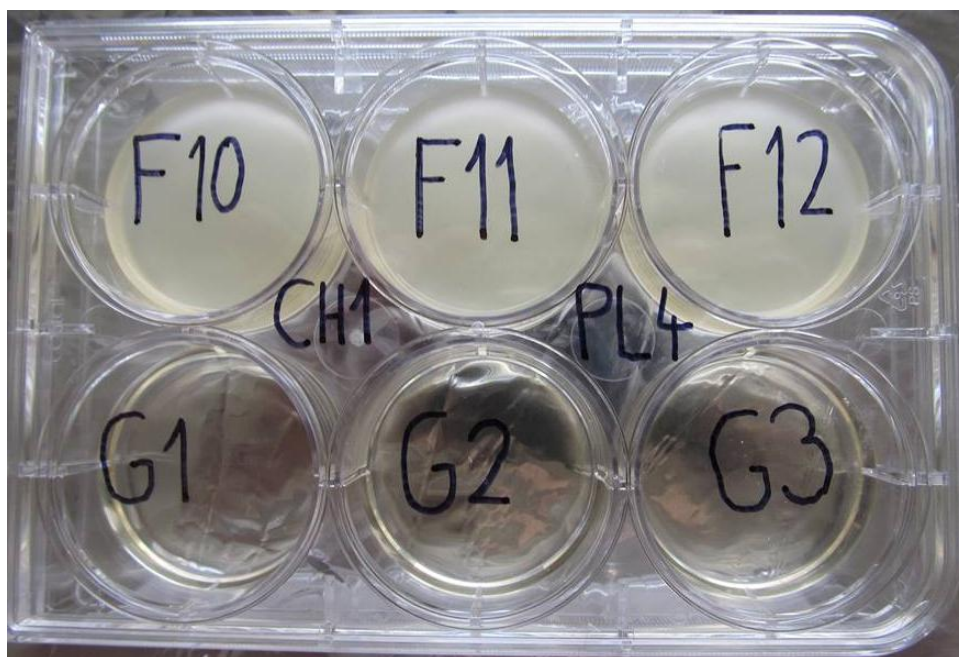
Cílem tohoto experimentu je sestavení celochromozomové sondy chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*, její hybridizace na cílovou strukturu v buněčném jádře protoplastů a sledování chromozomálního teritoria v reakci na stres. Následující text představuje příklad jednoho z mnoha opakování experimentu.

Aby mohla být zkonstruována sonda, musela být nejdříve izolována DNA z jednotlivých linií *Escherichia coli*, nesoucí BAC, obsahující jednotlivé fragmenty odpovídající sekvenci chromozomu 1. Izolace proběhla po noční kultivaci bakterií v LB médiu (viz 4.2.2). Koncentrace jednotlivých vzorků se dále spektrofotometricky měřila a nachází se v Tabulka č. 2. Koncová část PLATu 4 a celý PLATE 5 nebylo možné zmnožit, jedná se pravděpodobně o vadu objednaného materiálu.

CH1PL1	Koncentrace [ng/μl]	CH1PL2	Koncentrace [ng/μl]	CH1PL3	Koncentrace [ng/μl]	CH1PL4	Koncentrace [ng/μl]
A1-A6	273,3	A1-A6	963,1	A1-A6	767,4	A1-A6	457,0
A7-A12	458,2	A7-A12	837,2	A7-A12	1 331,9	A7-A12	1 541,6
B1-B6	338,1	B1-B6	1 831,0	B1-B6	857,4	B1-B6	562,7
B7-B12	505,3	B7-B12	1 671,2	B7-B12	1 428,5	B7-B12	720,8
C1-C6	239,3	C1-C6	960,7	C1-C6	477,8	C1-C6	387,3
C7-C12	410,9	C7-C12	1 576,3	C7-C12	206,8	C7-C12	766,5
D1-D6	262,9	D1-D6	536,7	D1-D6	1 282,9	D1-D6	343,2
D7-D12	556,5	D7-D12	1 743,9	D7-D12	1 543,1	D7-D12	301,8
E1-E6	332,8	E1-E6	1 166,3	E1-E6	519,3	E1-E6	392,9
E7-E12	405,9	E7-E12	2 136,7	E7-E12	1 818,0	E7-E12	215,9
F1-F6	347,9	F1-F6	2 112,1	F1-F6	1 788,4	F1-F6	1 215,0
F7-F12	87,8	F7-F12	2 257,4	F7-F12	1 732,3	F7-F12	202,1
G1-G6	361,1	G1-G6	2 048,6	G1-G6	343,9	G1-G6	-
G7-G12	261,0	G7-G12	2 959,0	G7-G12	1 241,4	G7-G12	-
H1-H6	447,9	H1-H6	2 560,0	H1-H6	1 017,3	H1-H6	-
H7-H12	453,7	H7-H12	1 805,0	H7-H12	1 007,3	H7-H12	-

Tabulka č. 2 - Jednotlivé koncentrace DNA izolované z linií *Escherichia coli*

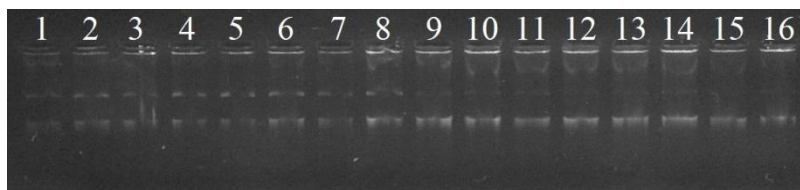
Na Obrázek č. 8 se nachází kultivační destička nesoucí linie *Escherichia coli* CH1PL4 F10-F12 a G1-G3. Podle zákalu je zřejmé, že linie F10-F12 se povedlo úspěšně rozmnožit, kdežto u linií G1-G3 zákal nebyl pozorován, tudíž se množení nezdařilo. Tento obrázek je pouze ukázkou zlomového bodu, jak již bylo zmíněno výše, žádnou z linií nesoucí segmenty DNA zbylé části chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana* nebylo možno rozmnožit.



Obrázek č. 8 - Kultivační destička nesoucí linie *Escherichia coli*

DNA byla dále separována 1% agarózovou elektroforézou (viz 4.2.4). Tato elektroforéza byla prováděna jako kontrola správné izolace DNA a úspěšné nick translace.

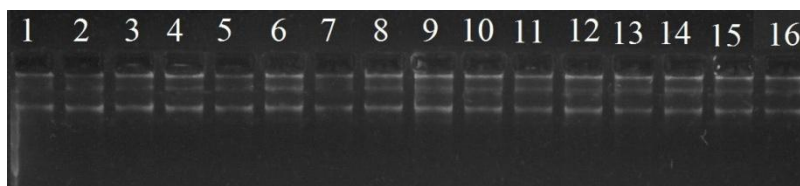
Na Obrázek č. 9 je elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí fragmenty chromozomu 1, PLATE 1. Jsou zde viditelné jednotlivé bandy, odpovídající různě prostorově uspořádaných molekul BAC. Izolaci DNA lze předpokládat za úspěšnou.



Obrázek č. 9 - Elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí CHIPL1

Legenda: 1 - A1-A6; 2 - A7-A12; 3 - B1-B6; 4 - B7-B12; 5 - C1-C6; 6 - C7-C12;
 7 - D1-D6; 8 - D7-D12; 9 - E1-E6; 10 - E7-E12; 11 - F1-F6; 12 - F7-F12;
 13 - G1-G6; 14 - G7-G12; 15 - H1-H6; 16 - H7-H12

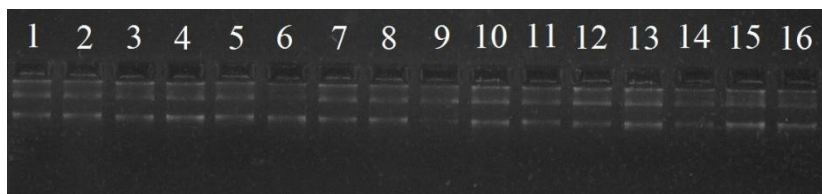
Na Obrázek č. 9 se nachází elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí fragmenty chromozomu 1, PLATE 2. Jsou zde znatelné výrazné bandy, opětovně různě prostorově uspořádaných molekul BAC. Tato izolace DNA byla úspěšná.



Obrázek č. 10 - Elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí CHIPL2

Legenda: 1 - A1-A6; 2 - A7-A12; 3 - B1-B6; 4 - B7-B12; 5 - C1-C6; 6 - C7-C12;
 7 - D1-D6; 8 - D7-D12; 9 - E1-E6; 10 - E7-E12; 11 - F1-F6; 12 - F7-F12;
 13 - G1-G6; 14 - G7-G12; 15 - H1-H6; 16 - H7-H12

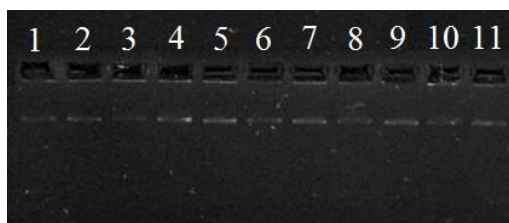
Na Obrázek č. 9 je vyobrazen elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí fragmenty chromozomu 1, PLATE 3. Izolace se dá považovat za úspěšnou, díky znatelně viditelných bandů.



Obrázek č. 11 - Elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí CH1PL3

Legenda: 1 - A1-A6; 2 - A7-A12; 3 - B1-B6; 4 - B7-B12; 5 - C1-C6; 6 - C7-C12;
 7 - D1-D6; 8 - D7-D12; 9 - E1-E6; 10 - E7-E12; 11 - F1-F6; 12 - F7-F12;
 13 - G1-G6; 14 - G7-G12; 15 - H1-H6; 16 - H7-H12

Na Obrázek č. 9 se nachází elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí fragmenty chromozomu 1, PLATE 4. Jednotlivé bandy jsou na tomto elektroforetogramu jednolitě, toto může být způsobeno uniformním prostorovým uspořádáním molekul BAC, izolace lze považovat za úspěšnou v rámci fragmentů A1-A6 do F1-F6. Fragments F7-F12 do H7-H12 nebyly elektroforeticky separovány, jelikož se nerozmnožily kultivované linie *Escherichia coli* nesoucí tyto segmenty.



Obrázek č. 12 - Elektroforetogram izolované DNA z linií nesoucí CH1PL4

Legenda: 1 - A1-A6; 2 - A7-A12; 3 - B1-B6; 4 - B7-B12; 5 - C1-C6; 6 - C7-C12;
 7 - D1-D6; 8 - D7-D12; 9 - E1-E6; 10 - E7-E12; 11 - F1-F6

Část jednotlivých roztoků DNA byla smíchána na jednotlivé PLATy (PLATE 1, 2, 3 a 4), tak aby výsledný roztok nesl koncentraci 200 ng/μl a obsahoval rovnoměrné množství DNA ze všech vzorků. Poté byla provedena DOP PCR (viz 4.2.3).

Následovně byla DNA ze všech těchto vzorků DNA smíchána tak, aby výsledný roztok obsahoval 2000 ng DNA v 16 µl destilované vody. Opětovně je nutné rovnoměrné zastoupení jednotlivých původních vzorků DNA, ze kterých byl roztok míchán. Tento vzorek podstoupil nick translaci, reakční směs obsahovala DIG-Nick translation Mix. Jakmile tato operace skončila, byla opět provedena kontrolní 1% agarózová elektroforéza za použití standardu molekulové hmotnosti 100 – 1 500 bp.

Obrázek č. 13 - Elektroforetogram nesoucí separovanou DNA značenou digoxigeninem po nick translaci nese elektroforetogram, který znázorňuje separaci DNA značenou digoxigeninem po nick translaci. Vzhledem k tomu, že nick translaci provází štípání DNázou I na náhodně dlouhé segmenty, lze předpokládat, že sonda byla připravena správně.

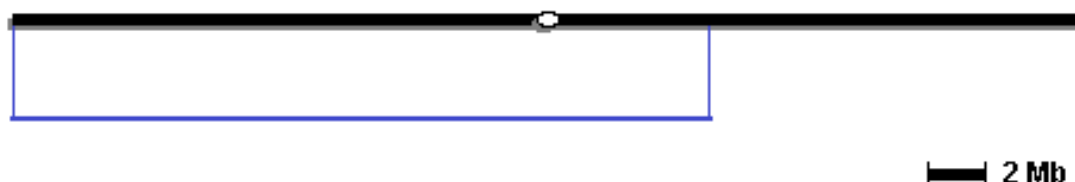


Obrázek č. 13 - Elektroforetogram nesoucí separovanou DNA značenou digoxigeninem po nick translaci

Legenda: M – standard molekulové hmotnosti 100 – 1 500 bp; 1 – DNA po nick translaci, značená digoxigeninem

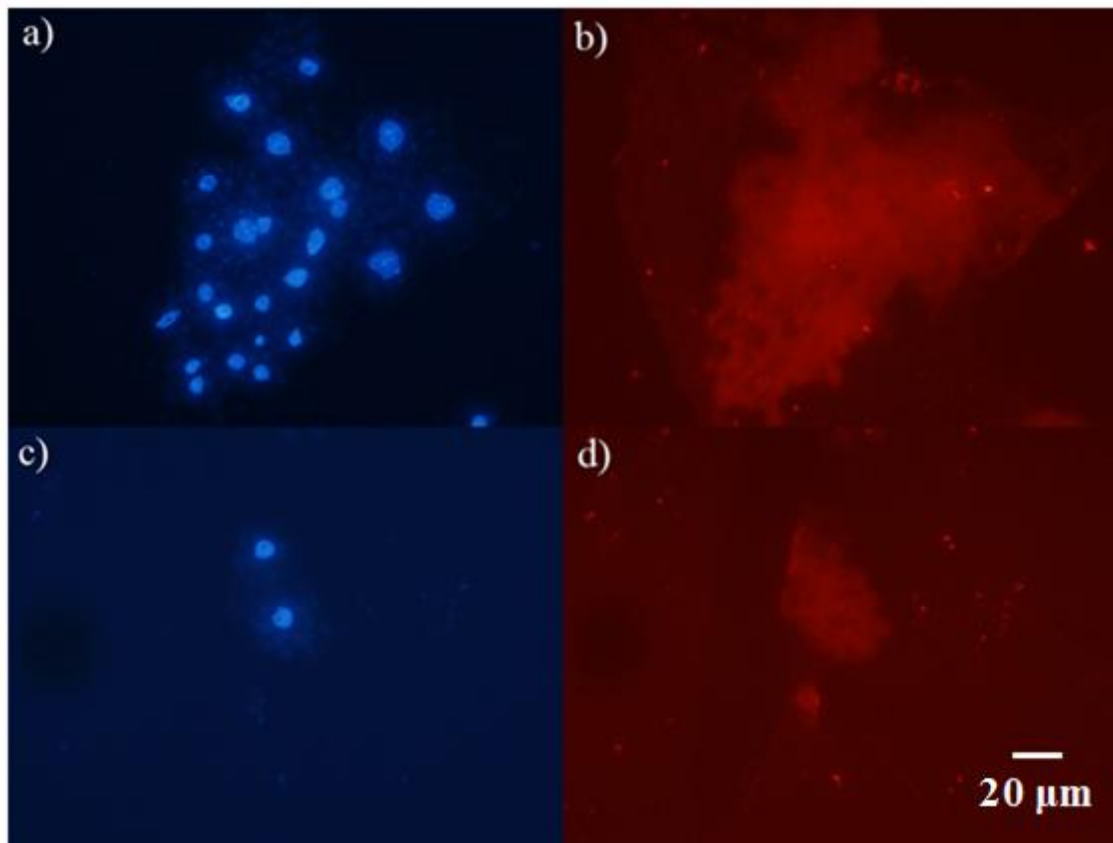
Poté byl převeden do formamidu (viz 4.2.3) a aplikován v technice fluorescenční *in situ* hybridizaci (viz 4.2.6) na protoplastech *Arabidopsis thaliana*.

Obrázek č. 14 vyobrazuje část chromozomu, na kterou byla vytvořena sonda. Na zbytek chromozomu nebyla sonda konstruována, protože se *Escherichia coli*, nesoucí tyto segmenty DNA, nechtěla zmnožit.



Obrázek č. 14 - Schematické zobrazení velikosti sestavené sondy k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*

Na Obrázek č. 15 se nachází fotky jader protoplastů *Arabidopsis thaliana* z fluorescenčního mikroskopu. Části obrázku a) - b) a c) - d) vyznačují stejnou oblast pod různými filtry. Fotky a) a c) jsou snímány filtrem, zachycujícím spektrum emise DAPI. Toto fluorescenční barvivo značí DNA, tudíž barví nespecificky celé jádro. Na těchto fotkách jsou v protoplastech jasná buněčná jádra. Fotografie b) a d) jsou snímány pod filtrem, zachycujícím spektrum emise Cy3, jelikož právě tímto fluorochromem jsou značeny myši monoklonální protilátky proti digoxigeninu. Na těchto fotkách je zřejmé, že signál v buněčných jádrech není viditelný, tudíž experiment nevyšel. Ve kterém kroku se stala chyba, nebylo zjištěno, jelikož koncentrace DNA a jejich kontrolní agarózová elektroforéza vykazovala pozitivní průběžné výsledky.



Obrázek č. 15 - Signál buněčných jader protoplastů *Arabidopsis thaliana*

6 Diskuze

Jedním z cílů laboratorní práce bylo sestavení celochromozomové sondy z jednotlivých BAC klonů, nesoucích fragmenty chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*. Tato próba byla konstruována několikrát podle Lysáka *et al* (2001) a (2003) a dále byla použita v technice fluorescenční *in situ* hybridizace. Sonda byla značena nepřímě, za použití reportérové molekuly a na ní vázané afinitní molekuly. Pro tento účel byly použity páry biotin-extravidin konjugován s FITC a digoxigenin s monoklonálními myšími protilátkami proti digoxigeninu konjugované s Cy3.

Za použití sestavené próby komplementární k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*, byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace. Izolace protoplastů pro experimentální užití a jejich fixace proběhla úspěšně. Pro omezení nespecifického signálu byla použita COT-DNA (Zwick M. S. *et al*, 1997), která blokovala vazbu sondy na repetitivní sekvence DNA. Při vyhodnocování experimentu pomocí fluorescenční mikroskopie však nebyl pozorován žádný signál. Při pokusu o optimalizaci metody byla jako sonda použita repetitivní DNA, kdy byl vynechán krok přidavku COT-DNA. Avšak ani po použití této próby nebyl viditelný signál. Optimalizace dále probíhala používáním původních sond komplementárních k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*, kdy byly upravovány jednotlivé časy vystavení protoplastů a sondy různým roztokům, avšak opětovně nebyl pozorován signál.

Lysák M. A. *et al* (2001) dokázal podobně sestavenou sondu komplementární k chromozomu 4 *Arabidopsis thaliana* hybridizovat v buněčném jádře protoplastů stejnojmenné rostliny. Úspěšně pozoroval signál chromozomálního teritoria 4. Pokus o navázání na tuto práci, hybridizací sestavené sondy chromozomu 1, dopadl neúspěšně.

Důvod neúspěšného provedení experimentu se pravděpodobně týká sestavení sondy. Technika fluorescenční *in situ* hybridizace se dá obecně považovat za velmi zaběhlou, tudíž je nepravděpodobné, že by se nevydařila ani při použití repetitivní DNA jako sondy. Jako příklad řešení se dá zmínit změna délky provádění nick-translace, optimální časový úsek však nebyl nalezen.

7 Závěr

Cílem této práce bylo sestavení celochromozomové sondy z BAC klonů, komplementární k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*. Tato sonda měla být dále použita v technice fluorescenční *in situ* hybridizace, kdy jako experimentální materiál měly být použity vyizolované protoplasty stejnojmenné rostliny. Po vizualizaci signálu mělo dojít k pozorování změn chromozomálního teritoria 1 v závislosti na stresujících podmínkách.

Proběhla kultivace BAC klonů a následná izolace DNA. Tato DNA byla použita jako zdrojový materiál k sestrojení sondy komplementární k chromozomu 1 *Arabidopsis thaliana*. Sond bylo vytvořeno několik, některé značeny fluorochromy FITC a jiné Cy3. Tyto sondy byly použity v technice fluorescenční *in situ* hybridizace, kdy jako experimentální materiál byly použity izolované protoplasty *Arabidopsis thaliana*. Poté proběhla vizualizace výsledků pomocí fluorescenční mikroskopie. Signál chromozomálního teritoria 1 nebyl v buněčném jádře protoplastů pozorován ani po četných pokusech o optimalizaci techniky pro tento účel. Vzhledem k absenci signálu nebyl závěrečný experiment o studiu změn v chromozomálním teritoriu 1 v závislosti na stres uskutečněn.

8 Seznam použité literatury

- Meaburn J. K., Misteli T. (2007): Chromosome territories. *Nature*, 445: 379-381.
- Cremer T., Cremer C. (2001): Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews, Genetics*, 2: 292-301.
- Matera A. G. (1999): Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.*, 9: 302-309.
- Heard E., Bickmore W. (2007): The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19: 311–316.
- Snustad D. P., Simmons M. J. (2009): *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Sheen J. (2007): Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature, Protocols*, 2: 1565-1572.
- M. R. Dawey, P. Anthony, J. B. Power, K. C. Lowe (2004): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnological Advances*, 23: 131-171.
- Ondřej V., Navrátilová B., Protivánková I., Piterková J., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2395-2401.
- Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR*. Academia, Praha.
- Spohn M., Golte-Bechtle M (2010): *Co tu kvete? Květena střední Evropy*. Euromedia group, Praha.

Hays J. B. (2002): *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair*, 1: 579-600.

Lysák M. A., Fransz P. F., Ali H. B. M., Schubert I. (2001): Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 28: 689-697.

Lysák M. A., Pečinka A., Schubert I. (2003): Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome research*, 11: 195-204.

Gall G. J., Pardue M. L. (1969): Formation and detection RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63: 378-383.

Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. (2000): Practical *in situ* hybridization.

BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.

Langer-Safer P.R., Levine M., Ward D.C. (1982): Immunocytological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4381-4395.

Zwick M. S., Hanson R. E., Islam-Faridi M. N., Stelly D. M., Wing R. A., Price H. J., McKnight T. D. (1997): A rapid procedure for the isolation of *C₀t-1* DNA from plants. *Genome*, 40: 138-142.

Brammer S. P., Vasconcelos S., Balvedi L., Poersch L. B., Oliveira A. R., Brasileiro-Vidal A. C (2013): Genomic *in situ* Hybridization in Triticeae: A Methodological Approach. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. Dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding-from-laboratories-to-fields/genomic-in-situ-hybridization-in-triticeae-a-methodological-approach>

Trask B. (1999): Genome analysis – Fluorescence *in situ* hybridization. Cold Spr Harb Lab Press USA, 4: 303-407.

Zwierzykowski Z., Lukaszewski A. J., Lesniewska A., Naganowska B. (1998): Genomic structure of androgenic progen of pentaploid hybrids, *Festuca arundinacea* x *Lolium multiflorum*. Plant Breeding, 117: 457-462.

Khrustaleva L. I., Kik C. (2001): Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. The Plant Journal, 25: 699-707.

Kočárek E., Pánek M. (2010): Klinická cytogenetika I: Úvod do klinické cytogenetiky. Karolinum, Praha.

Not F., Simon N., Biegala I. C., Vaultot D. (2002): Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. Aquatic Microbial Ecology, 28: 157-166.

Manoir S., Speicher M. R., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T. (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. Human Genetics, 90: 590-610.

Schröck E., Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T., (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science, 273: 494-497.

Dixkens C., Klett C., Bruch J., Kollak A., Serov O.L., Zhdanova N., Vogel W.,

Hameister H. (1998): ZOO-FISH analysis in insectivores: "Evolution extols the virtue of the status quo". *Cytogenet Cell Genet*, 80: 61-67.

Bass H.W., Marshall W.F., Sedat J.W., Agard D.A., Cande W.Z. (1997): Telomeres cluster de novo before initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic profase. *The Journal of Cell Biology* 137: 5-18.

Brown T. A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.

Venter J. C., Adams, M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor M., G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau, J., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Francesco V. D., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K. A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G. V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z. Y., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M. H., Wides

R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S. C., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M. L., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y. H., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong R., Suh E., Thomas R., Tint N. N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J. F., Guigó R., Campbell M. J., Sjolander K. V., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang Y. H. Coyne M., Dahlke C., Mays A. D., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A., Zhu X., (2001): The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351.

Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I. (2005): Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 370-377.

Büssow K., Nordhoff E., Lübbert C., Lehrach H., Walter G. (2000): A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics*, 65: 1-8.

Hafner M., Landgraf P., Ludwig J., Rice A., Ojo T., Lin C., Holoch D., Lim C., Tuschl T. (2008): Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, 44: 3-12.

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

2,4 - D – kyselina dichlorfenoxyoctová

AT – adenin a thymin ve vazbě

BAC – umělý bakteriální chromozom

bp – páry bází

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

CG – cytosin a guanin ve vazbě

Cy3 – cyanin 3

Cy5 – cyanin 5

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol

DIG – digoxigenin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DOP PCR – degenerovaná polymerázová řetězová reakce

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FBS – fetální hovězí sérum

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

FITC – fluorescein isothiocyánát

GISH – genomová *in situ* hybridizace

HCl – kyselina chlorovodíková

CH1 – chromozom 1

IAA – kyselina indol-3-octová

IPAR – 6-[g,g-dimethylalylamino]-purin ribosid

ISH – *in situ* hybridizace

kb – kilobáze

M-FISH – vícebarevná fluorescenční *in situ* hybridizace

miRNA – mikro RNA

mRNA – mediátorová RNA

MS – Murashige – Skoog médium

NOR – oblast organizátoru jadérka

PAC – umělý chromozom odvozený z bakteriofága P1

PCR – polymerázová řetězová reakce

PL1-5 – PLATE 1-5

PML částice – částice obsahující protein promyelocytické leukémie a jiné proteiny

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní oxidační radikály

rpm – otáčky za minutu

siRNA – malá interferující ribonukleová kyselina

T_m – teplota tání

YAC – kvasinkový umělý chromozom