

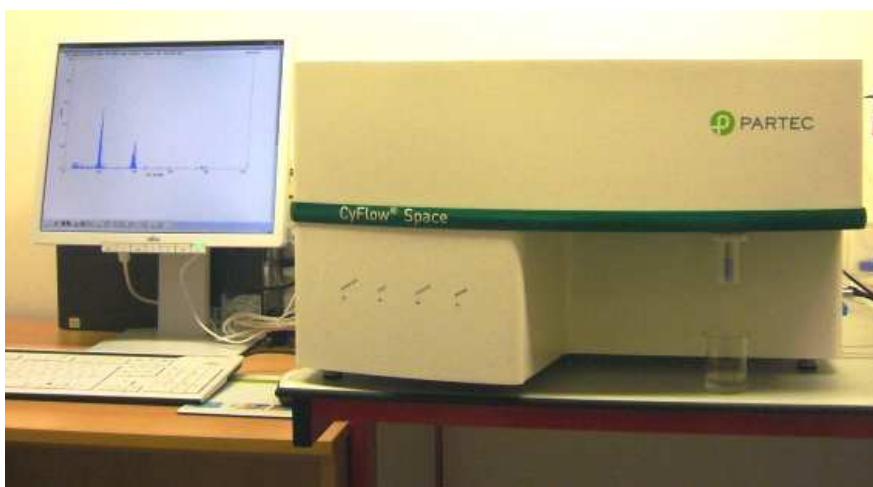
ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA TROPICKÉHO ZEMĚDĚLSTVÍ

Katedra tropických plodin a agrolesnictví

Laboratoř rostlinných explantátů

Laboratorní úlohy: Průtoková cytometrie (Partec CyFlow Space)



Praha 2013

Poděkování

Vytvoření protokolu “Laboratorní úlohy: Průtoková cytometrie (Partec CyFlow Space)” bylo finančně podpořeno Fondem rozvoje vysokých škol v rámci projektu FRVŠ reg. číslo 1397/2013 “**Inovace vybavení laboratoří pro výuku aplikovaných rostlinných biotechnologií**”.

OBSAH

1. Pravidla bezpečnosti práce v Laboratoři rostlinných explantátů.....	4
2. Příprava vzorků s použitím kitu Partec CyStain UV Precise P – návod k použití	5
Podmínky pro skladování kitu.....	5
Další materiálové vybavení potřebné k analýzám.....	5
Příprava vzorků	5
3. Jak postupovat při měření na průtokovém cytometru	6
4. Nastavení přístroje	8
5. Základní analýza píku	9
6. Obecná doporučení při stanovování stupně ploidie	11
7. Příloha – schéma přístroje	12

1. Pravidla bezpečnosti práce v Laboratoři rostlinných explantátů

- Před začátkem práce v laboratoři musí studenti znát pravidla práce a bezpečnosti v Laboratoři rostlinných explantátů.
- V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
- Studenti musí mít plášť, přezůvky a rukavice.
- Nepovolené experimenty jsou přísně zakázány.
- Udržujte laboratoř čistou a uklizenou.
- Zkontrolujte přístroje. Pokud je jakýkoliv problém s přístroji, nepoužívejte ho a informujte školitele.
- Pokud při používání část vybavení selže, okamžitě informujte školitele. Nikdy se nepokoušejte vyřešit problém sami, protože byste mohli zranit nejen sebe ale i ostatní.
- Před odchodem z laboratoře po sobě uklid'te laboratoř.
- Před odchodem z laboratoře vypněte všechny elektrické přístroje a umyjte si ruce.
- Pokud máte nějaké pochyby, zeptejte se školitele.
- Pozorně čtěte etikety.
- Nikdy přímo nepřichíhávejte k látkám. Přečtěte si etiketu (pro zjištění obsahu). Nikdy neochutnávejte chemikálie!
- Zjistěte, kde je v laboratoři umístěn hasicí přístroj a zdroj vody a jak je používat.
- Používané chemikálie a reagenty vracíte vždy na místo, odkud jste je vzali.
- Zvláštní opatrnosti je třeba dbát při manipulaci s otevřeným ohněm, hořlavinami, žíravinami a jedovatými látkami.
- V laminárním boxu nikdy nepracujete při zapnutém UV záření.
- Nehody nebo poranění hlase ihned školiteli a v případě potřeby poskytněte okamžitě první pomoc.
- S látkami dráždivými, páchnoucími a jedovatými se musí pracovat v dobře odsávané a zapojené digestoři.
- Toxický i netoxický odpad vyhazujete do nádob k tomu určených.
- Každý, kdo pracuje v laboratoři, musí respektovat výše uvedená pravidla.

2. Příprava vzorků s použitím kitu Partec CyStain UV Precise P – návod k použití

Zkontrolujte, zda kit CyStain UV Precise P obsahuje následující položky

- *Extraction Buffer*, 125 ml
- *Staining Buffer*, 500 ml

Podmínky pro skladování kitu

- Chemikálie, které jsou součástí kitu, uchovávejte ve tmě, při teplotě 4 °C.

Další materiálové vybavení potřebné k analýzám

- Pipety (1000 µl a 5000 µl) a kompatibilní špičky
- 55 mm plastové Petriho misky
- Žiletky
- 50 µm filtry
- Zkumavky

Příprava vzorků

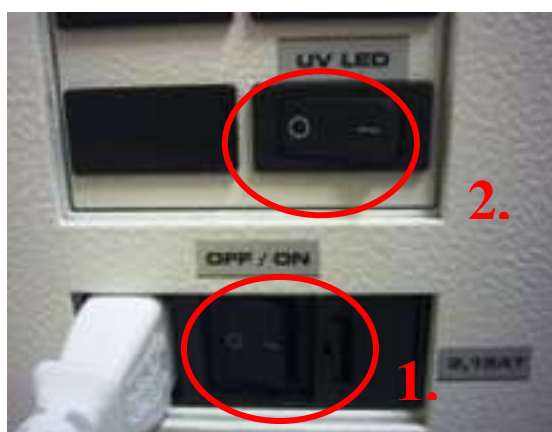
- Odeberte přibližně 0,5 cm² listové čepele a položte na Petriho misku (55 mm).
- Přidejte 400 µl *Extraction Buffer*.
- Nasekejte pletivo pomocí žiletky (30-60 s).
- Žiletky by měly být použity max. na 5-10 vzorků, poté je třeba je vyměnit.
- Inkubujte vzorek 30 seconds až 5 min (optimální doba inkubace je specifická pro každý druh a je třeba ji experimentálně zjistit).
- Přefiltrujte vzorek přes 50 µm filtr do zkumavky.
- Ke vzorku přidejte 1,6 ml *Staining Buffer*.
- Inkubujte po dobu 30-60 s.
- Poté vzorek analyzujte na průtokovém cytometru.

3. Jak postupovat při měření na průtokovém cytometru

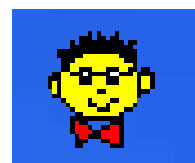
- Zkontrolujte láhev s unášecí kapalinou (*Sheath*) a odpadní láhev (*Waste*).
 - Ujistěte se, že v láhvi s unášecí tekutinou není více než 1600 ml, a že je odpadní láhev prázdná.



- Zapněte přístroj.
 - Zapněte přístroj hlavním vypínačem, poté zapněte laser.

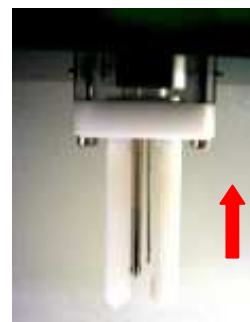


- Zapněte počítač.
- Spusťte software.
 - Klikněte dvakrát na ikonu “FloMax” levým tlačítkem myši, otevře se úvodní okno programu FlowMax. Potvrďte “OK”.
- Ujistěte se, že je průtokový cytometr i software připravený k analýzám.

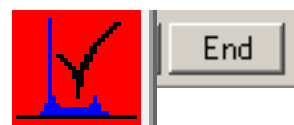


- Naplňte zkumavku připraveným vzorkem (1-2 ml). Zkumavka by nikdy neměla obsahovat více než 2/3 svého objemu.

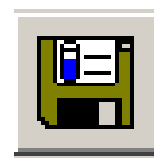
- Vložte zkumavku do držáku vzorku na průtokovém cytometru. Při správném zasazení zkumavky uslyšíte cvaknutí. Vzorek je třeba do úchyty vložit rychle.
- Měření započne automaticky postupným přechodem fází “*Prerun*”, “*Stabilize*”, “*Run*” a “*Counts*”.
 - Ve fázi “*Run*” jsou buňky analyzovány a výsledná data jsou znázorněna v histogramu*.



- Pro ukončení měření klikněte na ikonu (viz obrázek) či na tlačítko “*End*”. Analýza se rovněž automaticky ukončí při vyjmutí zkumavky z držáku vzorku.



- Výsledky uložíte kliknutím na ikonu (viz obrázek) nebo jako “*File-Save As..*”.



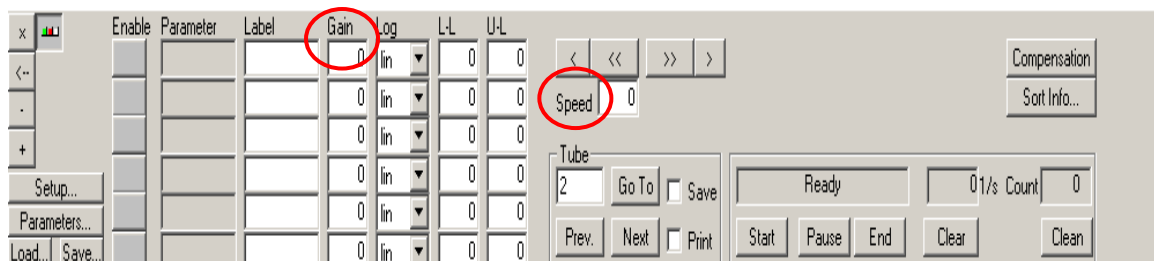
- Pro měření dalších vzorků opakujte předešlé kroky.
- Čištění průtokového cytometru
 - Nastavte rychlost 15.
 - **Postup čištění přístroje:** Do zkumavky odpipetujte 1,6 ml Partec *Cleaning Solution*, vložte do držáku přístroje a celý objem nechte protéci přístrojem. Následně vložte zkumavku s 1,6 ml Partec *Decontamination Solution* na jednu minutu. Poté stikněte tlačítko “*Clean*”. Nakonec nechte protékat 1.6 ml Partec *Sheath Fluid* a po minutě ukončete tlačítkem “*Stop*”.
- Držák vzorku na cytometru je třeba chránit. Poslední zkumavku nechte v držáku, aby nedocházelo k vysychání a krystalizaci zbytků vzorku na držáku.
- Zavřete program FlowMax.
- Vypněte počítač.
- Vypněte průtokový cytometr – hlavním vypínačem a vypínačem laseru.



POZNÁMKA: * Pro optimalizaci měření lze v této fázi měnit nastavení přístroje. Této problematice se věnuje kapitola 4.

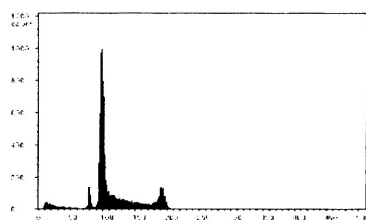
4. Nastavení přístroje

Kliknutím na ikonu „Instrument settings“ či přes nástrojovou lištu „Acquisition – Instruments settings“ otevřete okno Nastavení přístroje.

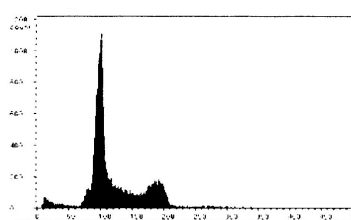


- „Gain“ (Zesílení detektoru)
 - Hodnota „gain“ může být zvýšena či snížena kliknutím do příslušného pole a změnou zadání hodnoty. V případě, že data jsou znázorněna v lineární škále, píky se posouvají doprava při zvyšování hodnoty „gain“ či doleva při snižování hodnot „gain“. Tímto způsobem lze píky umístit na ose x do požadované polohy.
- „Speed“ (Rychlost analýzy)
 - Rychlost analýzy lze regulovat pomocí změny hodnot v poli „speed“ ($\mu\text{l/s}$).
 - Optimální rychlost analýzy je 20-30 částic za sekundu.
 - Pokud je rychlost vyšší, histogram se vytvoří rychleji, ale píky mohou být širší. Obecně platí, čím menší rychlost, tím lépe.

Vliv rychlosti analýzy na kvalitu píků



Rychlost = $3\mu\text{l/s}$



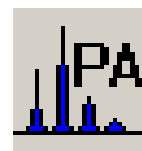
Rychlost = $20\mu\text{l/s}$

- **POZNAMKA:** Více informací ohledně možností nastavení přístroje lze nalézt v manuálu „Operating Manual-Instrument Control and Acquisition“, který je k dispozici v Laboratoři rostlinných explantátů.

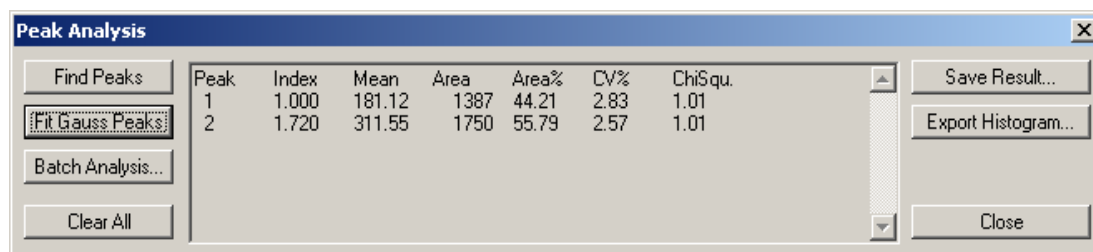
5. Základní analýza píku

Program FloMax prokládá histogramem Gaussovy křivky a automaticky hledá píky. Všechny výsledné hodnoty se týkají **namodelovaných píků** s tvarem odpovídajícím Gaussově křivce.

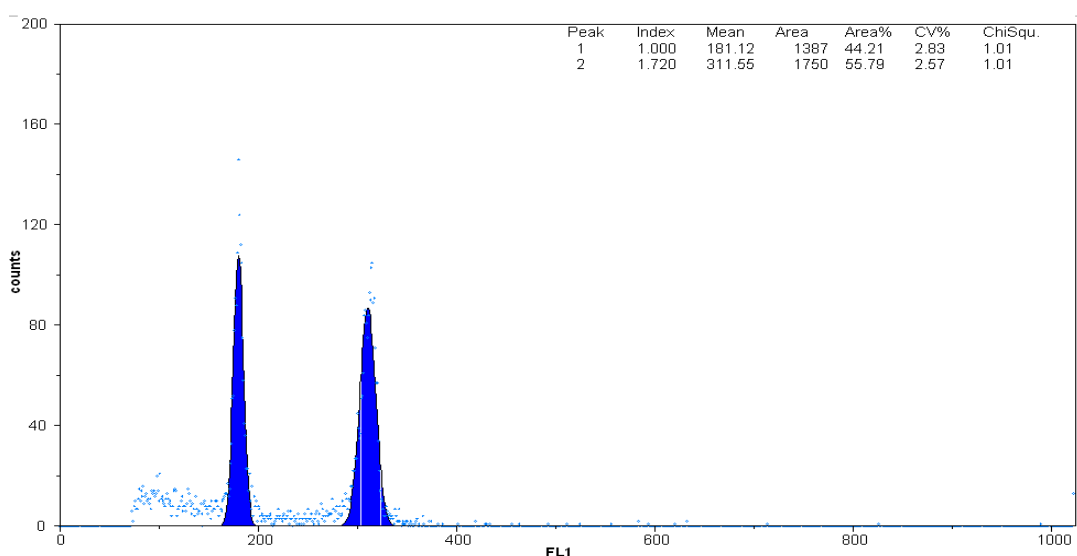
- Klikněte na ikonu “Peak Analysis” nebo zvolte na nástrojové liště “Analysis–Peak Analysis”.
- Otevře se okno “Peak Analysis” (analýza píku).
- Klikněte na tlačítko “Fit Gauss Peaks”.



- V tabulce se znázorní základní charakteristiky jednotlivých píků.



- Po zavření okna “Peak Analysis” zůstanou výsledné údaje zaznamenané v histogramu.



- **Kvantitativní charakteristiky píku:**
 - **“Peak”** (Pík): pořadové číslo píku (odleva doprava)
 - **“Index”** (Index): poměr průměru píku vůči prvnímu píku
 - **“Mean”** (Průměr): střední poloha píku na ose x (kanál)
 - **“Area”** (Plocha): plocha namodelovaného píku. Odpovídá počtu částic v píku.
 - **“Area (%)”** (Plocha %): procento plochy píku z celkové plochy všech píků.
 - **“ChiSqu.”** (Chí-kvadrát): míra, jak moc odpovídá model hrubým datům (čím menší číslo, tím lépe).

- **POZNAMKA:** Více informací ohledně možností nastavení přístroje lze nalézt v manuálu “Operating Manual-Instrument Control and Acquisition”, který je k dispozici v Laboratoři rostlinných explantátů.

6. Obecná doporučení při stanovování stupně ploidie

- Při analýzách by měl být vždy se vzorkem analyzován interní standard.
- Obsah jaderné DNA by se u interního standardu měl blížit analyzovanému druhu (píky by se však neměly překrývat či být příliš blízko sebe).
- Píky interního standardu a vzorku by měly být symetrické a měly by dosahovat přibližně stejné výšky. V každém vzorku by mělo být analyzováno 5000 - 7000 jader.
- Variační koeficient G0/G1 píků by měl být co nejnižší (obecně pod 3%; vyšší hodnoty lze tolerovat u rostlin s malým obsahem jaderné DNA).

Interní standardy

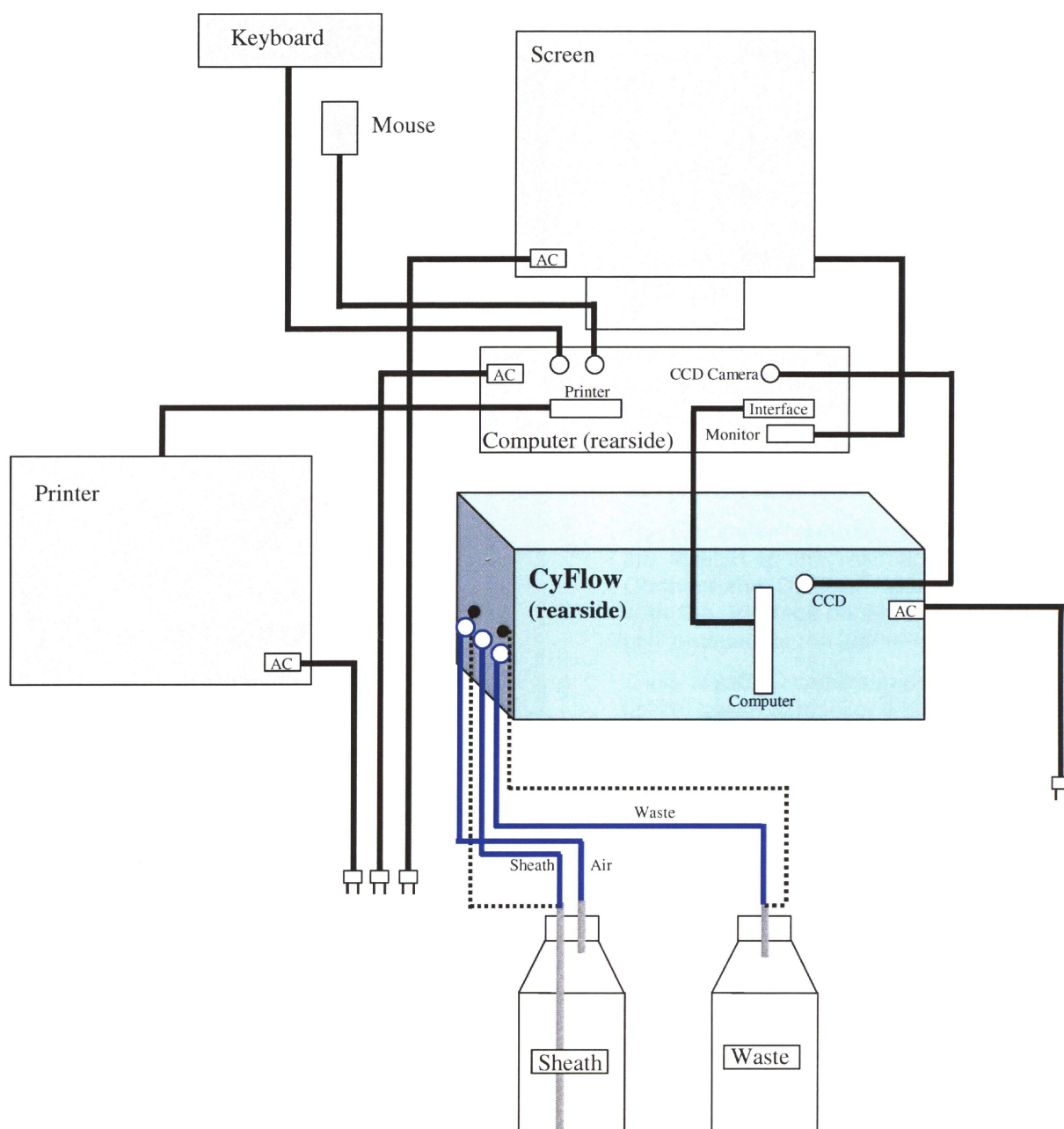
Druhy	2C obsah DNA (pg)
<i>Raphanus sativus</i> cv. Saxa	1,11 pg
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Stupické polní tyčkové rané	1,96 pg
<i>Glycine max</i> cv. Polanka	2,50 pg
<i>Zea mays</i> cv. CE-777	5,43 pg
<i>Pisum sativum</i> cv. Ctírad	9,09 pg
<i>Secale cereale</i> cv. Dankovské	16,19 pg
<i>Vicia faba</i> cv. Inovec	26,90 pg
<i>Allium cepa</i> cv. Alice	34,89 pg

(Zdroj: Botanický ústav AV ČR, Praha – Průhonice, Olomouc)

7. Příloha – schéma přístroje

Průtokový cytometr sestává ze základních komponent:

- 1) Zdroj světla
- 2) Kyveta průtokového cytometru*, fluidika
- 3) Optika
- 4) Detekce a zpracování signálu
- 5) Počítačový systém



***Kyveta (komůrka) průtokového cytometru:**

Vysvětlivky:

vzorek – zkoumaná kapalina

křemenné sklo - používá se pro vysokou propustnost širokého spektra vlnových délek světla

hydrodynamická fokusace - proces, při kterém se díky rozdílným rychlostem a tlakům unášecí kapaliny a vzorku zúží průměr kanálu, kterým proudí vzorek ve zkoumané části kyvety

laminární proudění uvnitř kyvety – je zásadní pro stabilitu a přesnost měření (aby byla pozice fluidního kanálu neměnná v průběhu celého měření)

