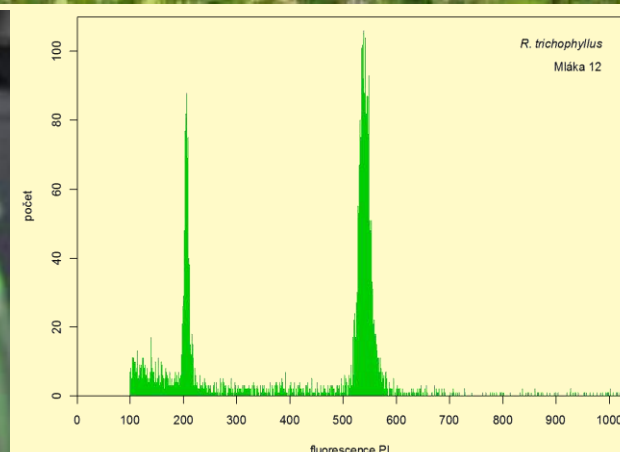
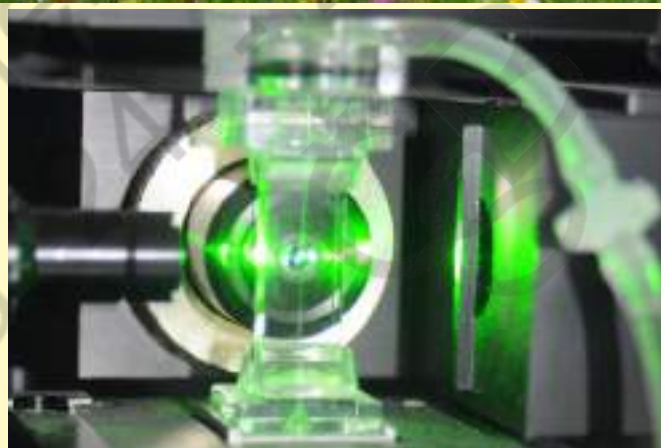


Průtoková cytometrie

Jak (ne)funguje a co nám (ne)může ukázat



Petr Koutecký



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

příprava vzorku

- ▶ co lze měřit:
 - » nejčastěji listy, ale téměř jakékoliv **živé** tkáně (uchovávání dny – týdny)
 - » semena – i mnoho let
 - » vzorky vysušené v silikagelu *většinou* (a méně přesně)
 - » herbáře výjimečně

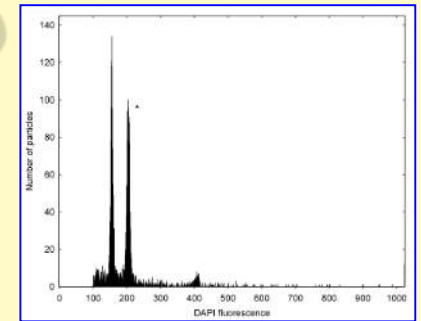
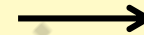
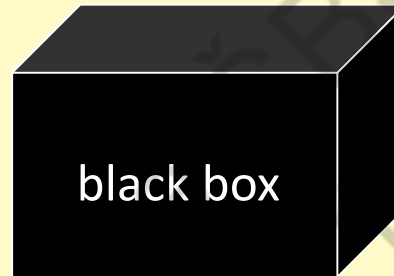
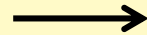
příprava vzorku

- ▶ co lze měřit:
 - » nejčastěji listy, ale téměř jakékoliv živé tkáně (uchovávání dny – týdny)
 - » semena – i mnoho let
 - » vzorky vysušené v silikagelu *většinou* (a méně přesně)
 - » herbáře výjimečně
- ▶ nasekání vzorku žiletkou ve vhodném pufru
 - » izolace buněčných **jader**
 - » cca 1-5 minut
- ▶ filtrace (~desítky μm filtr)
 - » cca 1 min
- ▶ stabilizace jader
 - » 1-30 minut, někdy spojeno s následujícím
- ▶ přidání **fluorescenčního barviva**
 - » vazba na DNA, ~minuty až desítky minut
- ▶ měření v přístroji
 - » cca 3-10 minut

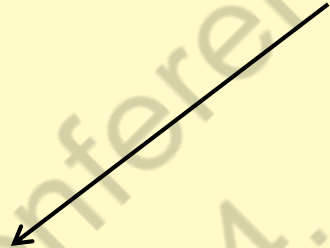
Σ někdy < 10 min
cena < 15 Kč



jak to funguje



grey box I



green box



grey box II



fyzikální princip

- ▶ měření optických vlastností částic (např. buněk, cyto-) při průchodu světlem
- ▶ měření velkého množství částic v proudu kapaliny (*flow*-)

vzorek



kyveta

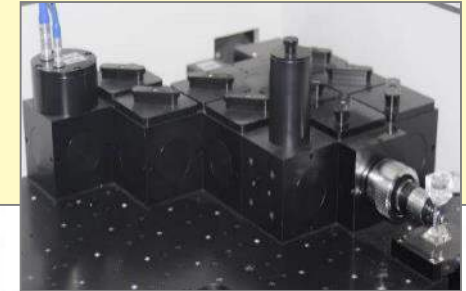
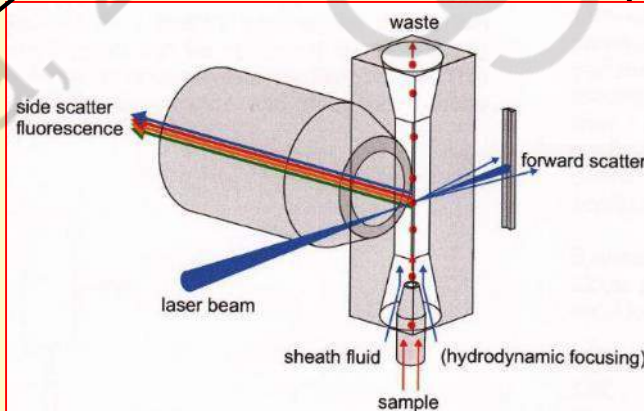


zdroje světla

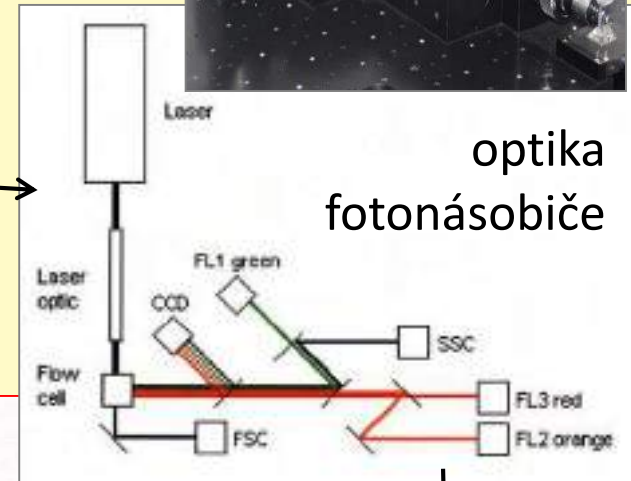
- » laser (např. 532 nm)
- » UV dioda

fluidika

- » pumpa, chlopně,...
- » *sheath fluid*



optika
fotonásobiče



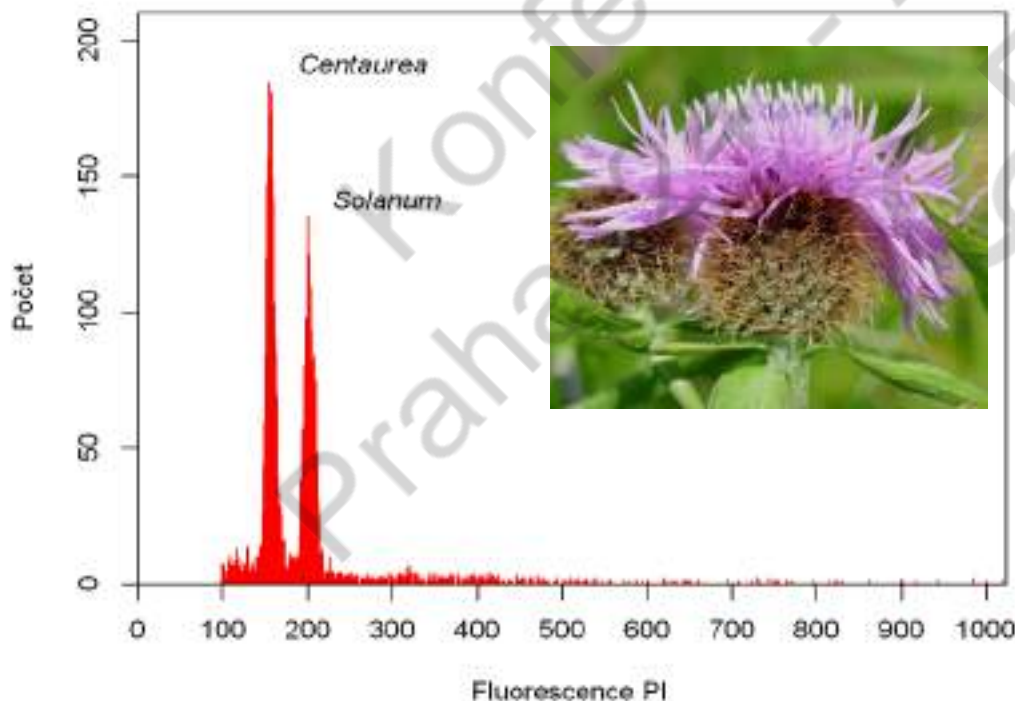
odpad

počítač



výsledky

- ▶ histogram fluorescence
- ▶ osa x = intenzita fluorescence (~ množství DNA v jádře)
 - » relativní jednotky – závisí na nastavení přístroje
- ▶ odečítáme **relativně** vůči standardu
 - » ... a to i u „absolutní“ velikosti genomu (!)
 - » poměr vzorek / standard
 - » další pomocné parametry (CV, počet částic)



Jednotky

- ▶ pg DNA (hmotnost)
- ▶ Mbp / Gbp (délka sekvence)
- ▶ 1 pg ~ 978 Mbp

<i>Centaurea phrygia</i>	155.04
<i>Solanum pseudocapsicum</i>	200.63
poměr	0.773

Solanum pseudoc. 2.59 pg
***Centaurea phrygia* 0.773 * 2.59 pg
= 2.00 pg**

přesnost I

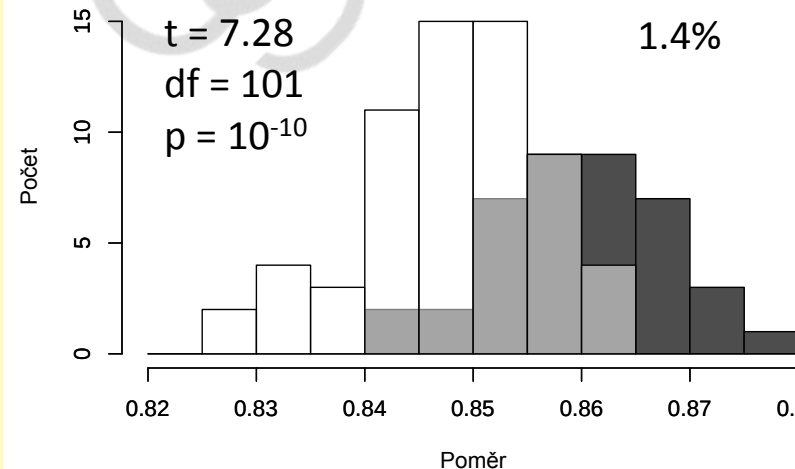
- ▶ přímo detekovatelný rozdíl $> 4\%$
 - » vzácně i menší
 - » „dvojitý pík“
- ▶ kříženci detekovatelní při cca 10% rozdílu rodičů



3.2%



- ▶ menší rozdíly lze prokázat
 - » ale ne „určování“
 - » pouze při porovnáních větších souborů ... klasifikovaných podle jiných dat



přesnost I

- ▶ **jednotky % velikosti genomu**
 - » u dobrého materiálu
- ▶ ale náhodné chyby přístroje
- ▶ pro přesná měření nutné opakované analýzy
 - » „absolutní“ velikost genomu
(min. 3 měření v různých dnech, rozptyl <2%)
 - » vnitrodruhová variabilita, aneuploidie
- ▶ někdy není přesnost nutná
 - » jsou všichni jedinci ve vzorku stejní?
 - » směsné vzorky
- ▶ **měříme relativně – poměry**
 - » stejná absolutní chyba je relativně jiná u malého a velkého genomu
 - » rozdíl v ploidním stupni: 3x vs. 2x → 50%, 16x vs. 15x → 6.7%
 - » aneuploidie: 1 chromosom z 20 → 5%

přesnost II

- měříme velikost jaderného genomu ... **ale kterou?**

Holoploidní velikost genomu

- **2C hodnota** – v buňkách s $2n$ chromosomy
 - » somatická pletiva cévnatých rostlin
- **1C hodnota** – v buňkách s n chromosomy
 - » mechorosty, gametofyty plavuní a kapradin,...
 - » pyl, spóry výtrusných
 - » ... a nebo vypočítaná jako $2C / 2$

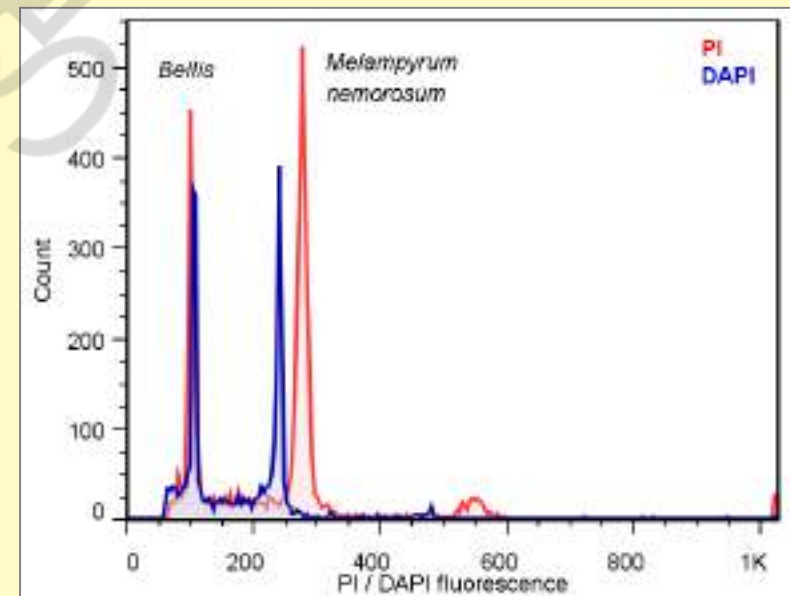


Monoploidní velikost genomu

- **1Cx hodnota** – průměrná velikost jedné chromosomové sady (x)
 - » např. tetraploid, krytosemenné: $1Cx = 2C / 4$

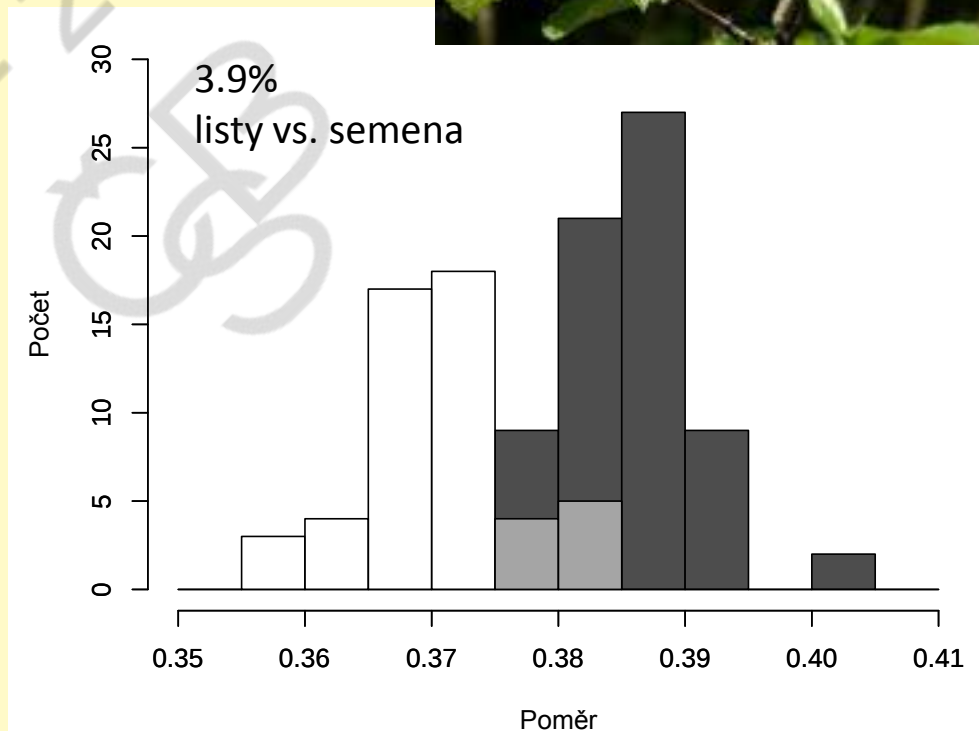
Různá fluorescenční barviva

- rozdílný poměr vzorek / standard —————>



přesnost III

- ▶ měříme velikost jaderného genomu ... **ale s čím srovnáváme?**
- ▶ závisí na **hodnotách standardů**
 - » tabelované hodnoty přesně nesedí na vzájemné poměry
 - » více hodnot pro jeden standard
 - » vždy uvádět, který standard používáme + jeho 1C/2C
 - » ... nebo rovnou poměr vzorek / standard
- ▶ rozdíly mezi pletiví a orgány
 - » jiný obsah sekundárních metabolitů a RNA
 - » jiné uložení DNA apod.
- ▶ čerstvé vs. fixované vzorky



v rámci jedné studie dosažitelná
vysoká přesnost

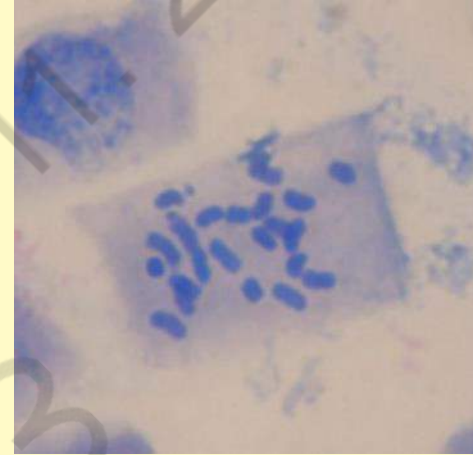
mezi pracovišti / cytometry je
rozdíl <10% celkem dobrá shoda...

ploidie a chromosomy

- ▶ Mluvíme o plodii, ale měříme velikost genomu
- ▶ Počet chromosomů / ploidní stupeň odvozujeme nepřímou !



≠



- ▶ Velikost genomu a počet chromosomů jsou do značné míry nezávislé



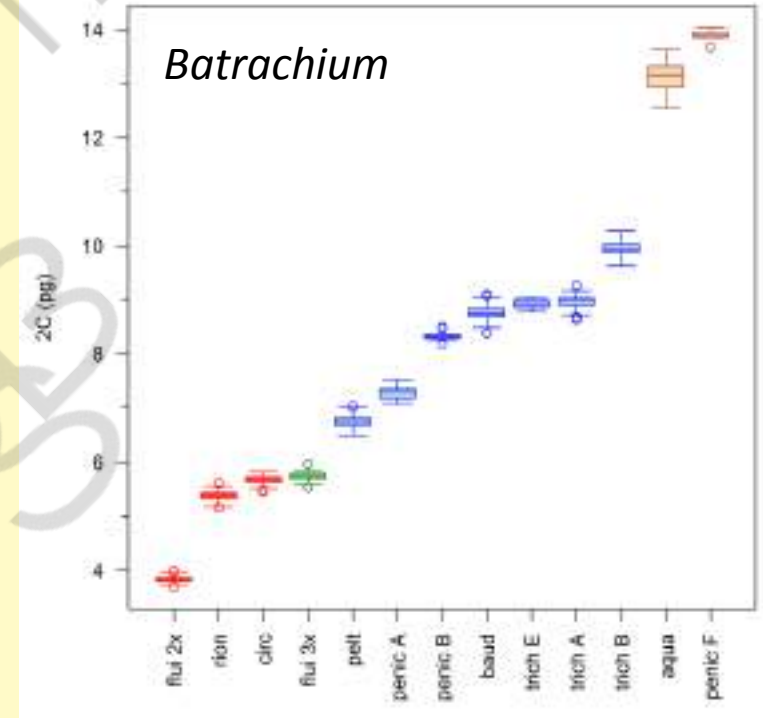
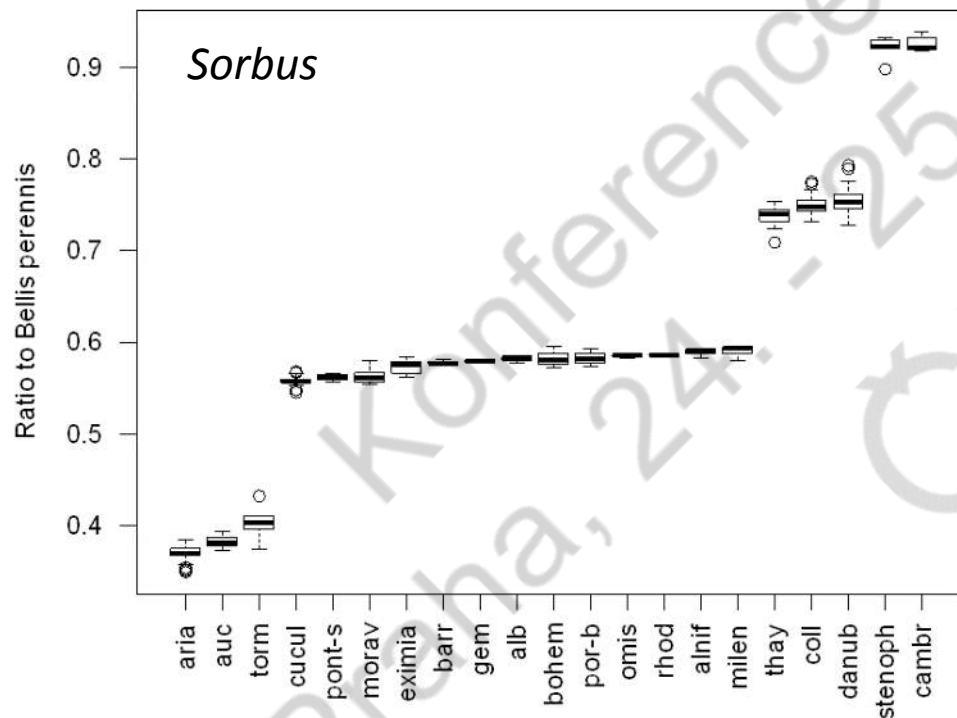
$2n = 18$
 $2C = 1.20 \text{ pg}$



$2n = 18$
 $2C = 17.74 \text{ pg}$

ploidie a chromosomy

- ▶ Počet chromosomů / ploidní stupeň odvozujeme nepřímou z velikosti genomu
- ▶ v některých skupinách dobrá korelace
- ▶ ...ale někdy ne → kalibrace počítáním chromosomů



vzkaz na doma

(take-home message)

- ▶ cytometrie - úžasná, rychlá, levná a spolehlivá metoda
- ▶ umožňuje studovat věci, které nedávno ještě nebyly možné



- ▶ ale má i své limity
- ▶ zejména při přebírání cizích dat je nutné důkladně zkoumat metodiku
... a zbytečně nepřeceňovat malé rozdíly

