

Průtoková cytometrie v botanice

Návody pro praktikum

Obsluha přístrojů

Příprava vzorků

Laboratoř molekulární biologie rostlin

Přírodovědecká fakulta JU

Petr Koutecký

2012

Vytvořeno v rámci projektu Molekularizace biologických oborů PřF JU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ


A. Příprava přístrojů

- 1) Rozmrazíme zásobní roztok fluorochromů (DAPI nebo PI + RNasa) podle požadovaného počtu vzorků, k dispozici jsou dávky po 1 ml (DAPI – cca 25–30 vzorků, PI – cca 20–25 vzorků) nebo poloviční 0,5 ml.
- 2) Zkontrolujeme zásobník *sheath fluid*, případně doplníme, vyprázdníme kontejner na odpad. Kontejner na *sheath fluid* plníme maximálně ze 4/5. Recept pro 3 litry *sheath fluid* (pro jiný celkový objem zachovat poměry):

azid sodný	5 ml	<i>zásobní roztok ve skříni, toxický !, přidávat pipetou, výsledná koncentrace 0.01% (w/v)</i>
Tween20 (cell culture tested)	0,5 ml	<i>ve skříni, vazký, pipetovat ustříženou špičkou a pomalu</i>
destilovaná voda	3 l	<i>jako poslední</i>

- 3) Zkontrolujeme dotažení uzávěru kontejneru *sheath fluid* (i bez dolévání)
- 4) Zapneme laser (CyFlow SL – spínač vlevo vzadu) nebo UV lampu (PAII – spínač z boku, rozsvítí se); zapneme počítač (u PAII klíček z boku). U PAII zapíšeme do sešítka čas spuštění UV lampy.
Před měřením prvního vzorku je třeba počkat cca 10 min, u laseru ideálně i déle (lze zapnout jako první před započítáním práce)
- 5) Připravíme pufrý podle zvolené metodiky (viz protokol C nebo D).

B. Zapnutí a seřizování přístrojů

- 1) Připravíme kalibrační vzorek (obvykle *Pisum sativum*, dvoustupňová metodika bez centrifugace, „Otto pufrý“ – viz protokol C).
- 2) Spustíme program FloMax (příp. také CCD kameru), první okno odsouhlasíme *Operator/Preferences: Operator*
! *Zadání jiného jména nebo Cancel způsobí, že přístroj zapomene některá nastavení, která je třeba obnovit ručně, tomu je nutno se vyhnout!*
- 3) Sejmeme zkumavku s destilovanou vodou, pod *sample port* umístíme kádinku na odpad. Spustíme Acquisition → Sheath fluid prime.
- 4) Necháme cca 1–2 min běžet dokud neprochází fluidikou čistá *sheath fluid* bez bublin, případně bubliny vyženeme z hadiček
- 5) Pokud již není otevřeno, spustíme okno pro ovládání analýzy – Acquisition – Instruments settings nebo ikona .
- 6) Vložíme obarvený (s fluorochromem) kalibrační vzorek, spustíme měření (viz protokol E). Zkontrolujeme symetrii píku, pozadí (co nejnižší) a koeficient variance (cv) píku (Analysis – Peak Analysis – Fit Gauss Peaks). Pro *Pisum sativum* na kanálu ~200 a počtu jader 20–30 / s lze pro cytometr PAII (DAPI) lze akceptovat < 1.3 (max. 1.5), běžně lze dosáhnout hodnoty < 1.1, v ideálním případě ~0.8. Pro cytometr CyFlow SL (PI) lze akceptovat cv < 1.6, poměrně snadno lze dosáhnout 1.3–1.4, v ideálním případě < 1.2.

Návod k nastavení parametrů analýzy viz bod 9.

V případě, že přístroje byly v minulých dnech seřizovány a nepožadujeme velmi přesná měření lze následující krok vynechat, vždy je ale doporučeno zkontrolovat seřizení pomocí kalibračního vzorku.

7) Pokud nejsme spokojeni s kvalitou analýzy kalibračního vzorku, seřídíme polohu kyvety – posun vpřed–vzad stříbrný šroub pod kyvetou, posun vlevo–vpravo otvor (inbus) vlevo od něj. Po každé změně vynulujeme analýzu (*clear*) a znovu zkontrolujeme parametry píků.

! Klíčové je vycentrování kyvety (resp. core stream – oblast, kterou prochází jádra) vůči zdrojovému paprsku světla. Vzhledem ke konstrukci přístrojů to znamená, že pro PAlI (DAPI) je důležitější přesná poloha v pravo–levém směru, zatímco pro CyFlow SL (PI) poloha v předo–zadním směru. Obvykle není potřeba měnit nic jiného než právě tento jeden směr.

Při běžném seřizení jsou výsledné posuny kyvety velmi malé, pracujeme pomalu a jemně!

8) Pokud je potřeba, nastavíme parametry analýzy – které parametry budeme zaznamenávat, počet analyzovaných částic apod.

nahrát uložené / uložit nastavení

zaznamenávané parametry projeví se až v příští analýze!

Detector	Height	Area	Width	Lamp Exc. (Low Pass)
D1 FSC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D2 SSC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D3 FL1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D4 FL2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D5 FL3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

nastavení analýzy (Setup) projeví se až v příští analýze!

Acquisition Setup

- Automatic Stop: None
- Preset Count Gate: <None>
- Preset Count: 5000 Enable
- Preset Time [s]: 60 Enable
- Time Parameter: 327.68
- Time Range [s]: 10
- Time Resolution [ms]: 10
- Sample Delivery: Manual Sample Port
- Robby Autoloader: Auto Clean
- RobbyWell Autoloader: Auto Clean
- Prerun Time [s]: 2
- Stabilizing Time [s]: 2
- Clean Time [s]: 5

celkový počet částic (zaškrtnutí Enable !)

časy náběhu vzorku, doporučeno 2s oba, možno zkrátit u vzorků s malým objemem nebo nízkou koncentrací

9) Připravíme vzorek pouze ze standardu, který se chystáme používat, a nastavíme přístroj tak, aby byl standard na požadovaném kanále (hodnota gain) a osa x měla potřebný rozsah (lower limit - LL). Podle potřeby změním nastavení oken View – Page layout (např. u CyFlow SL stránka s třemi histogramy – FL2, dvourozměrný FL2×SSC, podle potřeby buď FL3 nebo FL2×FL2-w, apod.).

Při rutinní analýze známého materiálu tento krok vynecháváme a použijeme již vyzkoušené parametry.

meřený parametr

gain

lower limit

rychlost měření / odběru vzorku (µl / s)

regulace rychlosti (o 0.1 nebo 1) nebo lower limit (0.5 / 5) nebo gain (0.5 / 5) podle toho, v kterém poli máme kurzor

Speed 0.5

1/s Count 0

Ready

Start Pause End Clear

Prev Next Print

Go To Save

manuální spuštění / zastavení analýzy

manuální spuštění čištění (*clean*)

vynulování analýzy (*clear*)

počet částic za vteřinu

celkový počet částic

leading trigger (hlavní parametr, který určuje, které částice se budou zaznamenávat)

Nastavení vlastnosti diagramu:

poklepání dovnitř diagramu otevře →

parametr / parametry

barva histogramu

rozsah osy y

změna rozsahu osy y při měření, pokud pík přesáhne zadané maximum (doporučeno, ale pomůže vypnout při velkém počtu >1024)

1 parametr / 2 parametry

počet kanálů (doporučeno 1024 / 256)

rozdělení „osy“ z na úseky – pseudocolour plot

minimální počet částí v bodě, aby byl zobrazen (lze použít k vyrušení vzácných výskytů; normálně = 0 = vše)

zobrazení částic jen uvnitř již definovaného gate (ale ukládá a počítá se do celkového počtu všechno)

C. Příprava vzorku - základní protokol (dvoustupňová metodika bez centrifugace; „Otto pufry“)

Možnou modifikací je vložení centrifugačního kroku za bod 5), podrobněji viz Doležel et al. (2007)

- 1) Připravíme barvicí roztok podle požadovaného počtu vzorků – přidáme 2-merkptoethanol a zvolený fluorochrom. Vedle uvedených množství jsou v laboratoři k dispozici i poloviční dávky.

Pro barvení s DAPI:

Otto II pufr	25 ml	zásobní roztok ve skříni
2-merkptoethanol	50 μ l	těkavý, přidávat v digestoři; finální konc. 2 μ l/ml ~ 0.03M
DAPI zásobní roztok	1 ml	v mrazáku; finální konc. 4 μ g / ml

Pro barvení s PI:

Otto II pufr	25 ml	zásobní roztok ve skříni
2-merkptoethanol	50 μ l	těkavý, přidávat v digestoři; finální konc. 2 μ l/ml ~ 0.03M
PI zásobní roztok	1 ml	v mrazáku; finální konc. 50 μ g/ml
RNase IIa zásobní roztok	1 ml	v mrazáku; finální konc. 50 μ g/ml

- 2) Do plastové Petriho misky vložíme analyzovaný vzorek a interní standard

! *Množství vzorku i standardu je třeba empiricky vyzkoušet. Pro tkáň listů je dostačující obvykle 0.25–0.5 cm². Poměr vzorek / standard volíme tak, aby ve výsledném histogramu fluorescence dávaly přibližně stejně vysoké píky.*

- 3) Přidáme 400 μ l vychlazeného (v ledu) Otto I pufru.
- 4) Rostlinný materiál nasekáme v pufru žiletkou na jemné kousky. Každou stranu žiletky používáme obvykle pouze 1 \times .
- 5) Suspenzi pipetováním několikrát promícháme + opláchneme plochu misky.
- 6) Suspenzi filtrujeme do připravené a popsané (!) zkumavky přes 42 μ m filtr (textilie Uhelon 130T). Objem suspenze po filtraci by měl být cca 200 μ l.

! *V suspenzi nesmí být po filtraci žádné viditelné nečistoty (zbytky tkáň, vlákna z okrajů filtru, apod.), které by mohly ucpat přístroj. Nečistoty odstraníme dalším přefiltrováním vzorku.*

- 7) Necháme určitou dobu stát.

! *Dobu stání je třeba empiricky vyzkoušet. Pro většinu druhů stačí několik minut a nejsou na přesnou dobu příliš citlivé, ale v některých případech je nutné dodržet určitou minimální dobu stání (např. Sorbus, Calamagrostis) nebo naopak dobu stání velmi zkrátit (< 1min., např. Centaurea, Odontites, Euphrasia) nebo dodržet optimální úzké časové rozmezí (např. Salix ~3 min).*

- 8) Přidáme barvicí roztok („Otto II“), znovu zkontrolujeme výskyt nečistot (výjimečně mohou být i v pufri!) a necháme barvit.

! *Poměr objemů přefiltrovaného vzorku (OttoI) a barvicího roztoku (OttoII) musí být cca 1 : 4 (kvůli pH). Při větším objemu vzorku je nutné adekvátně upravit objem barvicího roztoku.*

Dobu barvení je nutno empiricky vyzkoušet, většinou stačí cca 1 min., obecně nebývá rostlinný materiál na přesný čas tak citlivý jako v předešlém bodě.

D. Příprava vzorku - jednostupňový protokol (LB01 pufr, seed buffer, apod.)

- 1) Do plastové Petriho misky vložíme analyzovaný vzorek a interní standard

! *Množství vzorku i standardu je třeba empiricky vyzkoušet. Pro tkáň listů je dostačující obvykle 0.25–0.5 cm². Poměr vzorek / standard volíme tak, aby ve výsledném histogramu fluorescence dávaly přibližně stejně vysoké píky.*

- 2) Přidáme 1 ml vychlazeného (v ledu) izolačního pufru.

Obvykle se pracuje s pufrem bez fluorochromu. Pokud již pufr obsahuje fluorochrom nebo 2-merkaptoethanol (nebo jiné nezdravé složky), pracujeme vždy v rukavicích.

- 3) Rostlinný materiál nasekáme v pufri žiletkou na jemné kousky. Každou stranu žiletky používáme obvykle pouze 1×.

- 4) Suspenzi pipetováním několikrát promícháme + opláchneme plochu misky.

- 5) Suspenzi filtrujeme do připravené a popsané (!) zkumavky přes 42 µm filtr (textilie Uhelon 130T).

! *V suspenzi nesmí být po filtraci žádné viditelné nečistoty (zbytky tkáně, vlákna z okrajů filtru, apod.), které by mohly ucpat přístroj. Nečistoty odstraníme dalším přefiltrováním vzorku.*


- 6) Necháme určitou dobu stát.

! *Dobu stání je třeba empiricky vyzkoušet. Pro většinu druhů stačí několik minut a nejsou na přesnou dobu příliš citlivé, ale v některých případech je nutné dodržet určitou minimální nebo maximální dobu stání nebo optimální časové rozmezí.*

- 7) Přidáme ke vzorku zvolený fluorochrom (DAPI nebo PI+RNasa), necháme barvit. Pokud byl výchozí objem pufru 1 ml, obvykle přidáváme 40 µl zásobního roztoku DAPI nebo 50 µl PI + 50 µl RNasy.

Dobu barvení je nutno empiricky vyzkoušet, většinou stačí cca 1 min., obecně nebývá rostlinný materiál na přesný čas tak citlivý jako v předešlém bodě.

E. Měření vzorku

- 1) Pokud již není otevřeno, spustíme okno pro ovládání analýzy – Acquisition – Instruments settings nebo ikona .

- 2) Vložíme zkumavku do *sample portu*, rychlým pohybem dorazíme úplně nahoru (cvaknutí)

! *Pokud není zkumavka dorazena do horní polohy a netěsní, může dojít k automatickému spuštění čištění sample portu a vysátí vzorku*

- 3) Počkáme, dokud se neobjeví signál analyzovaných částic, zpočátku několikrát vynulujeme tlačítkem *Clear* (neplést s *Clean* – spustí čištění a došlo by k vysátí vzorku!).

Pokud se delší dobu nic neobjevuje, zkusíme pootočit zkumavkou (špatně těsní) nebo ji prstem ze spodu zatlačíme více do sample portu; zkontrolujeme, jestli není bublina v kyvetě, apod.

- 4) Rychlost regulujeme tak, aby se počet analyzovaných částic pohyboval okolo 20–30 za sekundu (dobrý kompromis mezi přesností a rychlostí analýzy). Rychlost analýzy by nikdy neměla přesáhnout hodnotu 2.0 µl / s, ideálně ne více než 1.0 µl / s (obecně čím nižší, tím lépe).

5) Podle potřeby doladíme ostatní parametry (*gain, lower limit*)

Pokud byl cytometr nastaven na určitý gain při analýze samotného standardu a při analýze vzorku došlo k výraznému posunu (je třeba gain zvýšit), indikuje to přítomnost většího množství fluorescenčních inhibitorů. Zaznamenejme do protokolu, bereme v úvahu při vyhodnocení analýz (může být příčinou případného nesouladu a „variability“). Hodnotu lower limit volíme tak, aby byla o cca 20 kanálů nižší než je levý okraj prvního píku.

6) Analýza se zastaví v předem určeném počtu částic (viz Setup, protokol B, bod 8). V případě potřeby lze ukončit dříve tlačítkem End, případně znovu spustit tlačítkem Start (nová analýza).

7) Výsledek uložíme File – Save / Save as... (Ctrl + S)

8) Podle potřeby provedeme orientační analýzu (odečtení poloh píků standardu a vzorku, jejich poměr, počet částic apod. – Analysis – Peak analysis – Fit Gauss peaks; příp. ručně přes volbu *Gating*; podrobně viz návod pro analýzu dat).

F. Ukončení práce – čištění a vypnutí přístrojů

1) Po skončení měření vložíme do přístroje necelou polovinu zkumavky s Decontamination solution (fialová), rychlost nastavíme na 5.0.

2) Po zastavení nasávání vzorku (skončení „analýzy“) necháme cca 10 min. (–3 hodiny) působit. V případě nedostatku času lze tento krok vynechat nebo zkrátit, čas od času je ale nutné jej provést.

3) Vložíme do přístroje necelou polovinu zkumavky s Cleaning solution (zelená), rychlost 5.0

4) Vložíme do přístroje zkumavku s destilovanou vodou, rychlost zvýšíme na max. 10.0. Opakujeme ještě 1–2×.

5) Po skončení vyplachování necháme poslední zkumavku s destilovanou vodou v *sample portu*.

6) Uložíme si data (!) na flash disk, vypneme všechny programy, standardně ukončíme Windows.

7) Vypneme laser (CyFlow SL – spínač vlevo vzadu) nebo počítač a vzduchovou pumpu (PA II – klíček z boku) a UV lampu (podsvícené tlačítko vedle klíčku). Zapíšeme do sešitu čas vypnutí UV lampy.

! Pokud bychom potřebovali pokračovat v práci, je nutné UV lampu před další zapnutím nechat zcela vychladnout, minimálně 30 minut!

8) Povolíme víčko kontejneru pro *sheath fluid*, upustíme přetlak vzduchu, dotáhneme zpět.

G. Recepty na nejdůležitější roztoky

Pufr Otto I

kys. citronová monohydrát	4.2 g	(0.1M)	ve skříní
destilovaná voda	cca 170 ml		
Tween20 (cell culture tested)	1 ml	(1% v/v)	ve skříní, vazký, pipetujeme s ustřiženou špičkou a pomalu, po vypuštění shodíme špičku do pufru a necháme rozpustit zbytky

po rozpuštění (< 5 min) doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 200 ml
skladujeme v lednici

Pufr Otto II

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	28.65 g	(0.4M)	ve skříní
destilovaná voda	cca 170 ml		

po rozpuštění (cca 1/2 hod, lze urychlit mírným zahřáním) doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 200 ml

přefiltrujeme přes 42 µm filtr (tkanina Uhelon 130T)
skladujeme za pokojové teploty (!) ve skříní

Zásobní roztok azidu sodného

Pozor! Azid sodný je vysoce toxický, pracujeme v plášti a rukavicích, veškeré kontaminované předměty ihned omýváme větším množstvím vody. Navážku azidu sodného zapíšeme do sešitu.

azid sodný 12 g (6% w/v) ve skříni

destilovaný voda 170 ml

po rozpuštění doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 200 ml

skladujeme za pokojové teploty ve skříni

Seed buffer (podle Matzk et al. 2000, modifikace Krahulcová & Suda 2006)

Tris-base 1.211 g (0.1M) ve skříni nebo PCR laboratoř

MgCl₂·6H₂O 0.107 g (5mM) ve skříni nebo PCR laboratoř

NaCl 0.5 g (85mM) ve skříni

Triton-X-100 200 µl (0.1% v/v) ve skříni

destilovaná voda cca 70 ml

úprava pH pomocí HCl na hodnotu 7.5

doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 100 ml

skladujeme v lednici

Pufr LB01

Tris-base 363.4 mg (15mM) ve skříni nebo PCR laboratoř

EDTA-Na₂ 148.9 mg (2mM) ve skříni nebo PCR laboratoř

spermine tetrahydrochloride 34.8 mg (0.5mM) ve skříni

KCl 1.139 g (80 mM) ve skříni

NaCl 233.8 mg (20 mM) ve skříni

Triton-X-100 200 µl (0.1% v/v) ve skříni

destilovaná voda cca 170 ml

úprava pH pomocí HCl na hodnotu 7.5

doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 200 ml

skladujeme při -20°C v alikvotech pro určitý počet vzorků (10 ml / 20 ml / 25 ml / apod.)

Zásobní roztok DAPI (0.1 mg / ml)

DAPI 10 mg v lednici

destilovaný voda 50 ml

postupně rozpustíme celý obsah zásobní lahvičky s DAPI v destilované vodě, lahvičku několikrát důkladně propláchneme

doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 100 ml

přefiltrujeme přes 42 µm filtr (tkanina Uhelon 130T)

skladujeme při -20°C v eppendorfkách v alikvotech po 1 ml / 0,5 ml

Zásobní roztok PI / RNasa (1 mg / ml) (pro obě látky stejný postup)

propidium jodid nebo RNasa Ila 100 mg v lednici (PI) nebo mrazáku (RNasa)

destilovaný voda 50 ml

postupně rozpustíme celý obsah zásobní lahvičky v destilované vodě, lahvičku několikrát důkladně propláchneme

doplníme vodu v odměrném válci na celkový objem 100 ml

přefiltrujeme přes 42 µm filtr (tkanina Uhelon 130T)

skladujeme při -20°C v eppendorfkách v alikvotech po 1 ml / 0,5 ml

H. Literatura a další čtení

Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature Protocols 2: 2233–2244

Suda J. & Trávníček J. (2006): Estimation of relative nuclear DNA content in dehydrated plant tissues by flow cytometry. – Current Protocols in Cytometry (2006), 7.30.1–7.30.14, John Wiley & Sons

Manuály výrobce cytometrů