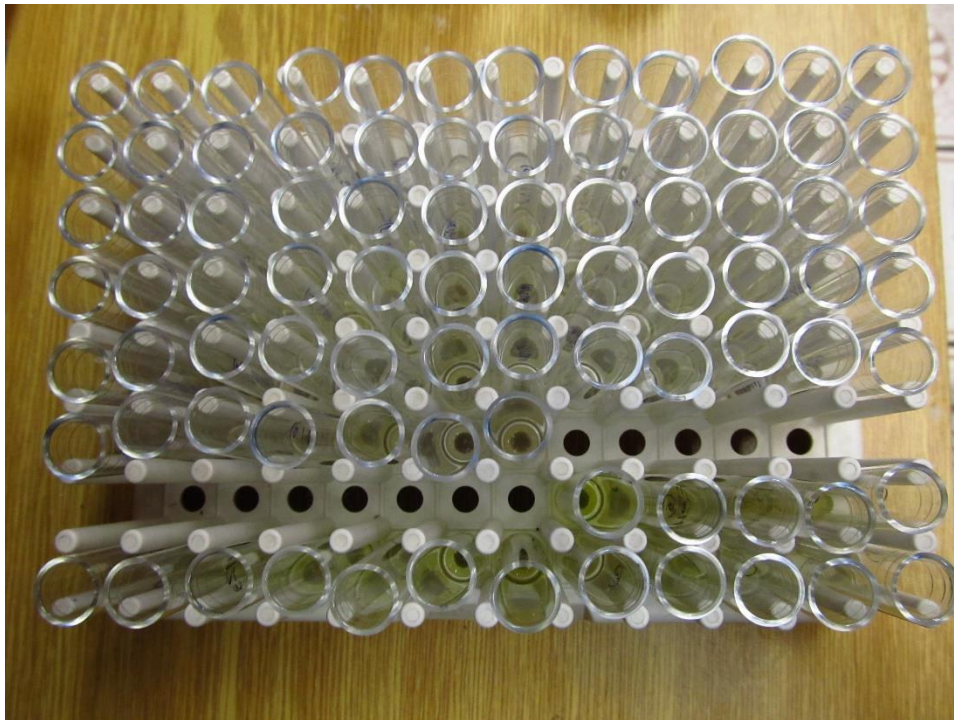


ROZŠÍŘENÝ NÁVOD K PRÁCI S PRŮTOKOVÝM CYTOMETREM

Měření vzorků o neznámé velikosti genomu

Test reprodukčních způsobů



1. Příprava vzorků

1. 1. Jak zjistit standard vhodný k měření neznámého vzorku?

1. 2. Jak nasekat vzorek pro analýzu?

1.3. Příprava barviček

2. Příprava přístrojů

3. Měření vzorků

3.1. Problematické skupiny průtokové cytometrie

Verze první k 18. 10. 2018

1. Příprava vzorků

1. 1. Jak zjistit standard vhodný k měření neznámého vzorku?

A) Plant DNA C-values Database: <http://data.kew.org/cvalues/>

Cvalues database



Query the RBG Kew Plant DNA C-values database

Citation: Bennett MD, Leitch IJ. 2012. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>

E-mail (required)

Select Output Fields

<input type="checkbox"/> Family	<input checked="" type="checkbox"/> Genus	<input checked="" type="checkbox"/> Species	<input type="checkbox"/> Authority
<input type="checkbox"/> Chromosome number (2n)	<input type="checkbox"/> Ploidy level (x)	<input type="checkbox"/> Estimation method	<input type="checkbox"/> Voucher
C-value <input type="text" value="2C (pg)"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Original Reference	Search for	Prime Estimates <input type="text"/>

Select Conditions

Family	<input type="text"/>		
Genus	<input type="text"/>		
Species	<input type="text"/>		
Authority	<input type="text"/>		
DNA range from	<input type="text"/> to <input type="text"/>		
Chromosome number from	<input type="text"/> to <input type="text"/>	Estimation method	All Methods <input type="text"/>
Ploidy level from	<input type="text"/> to <input type="text"/>	Voucher	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No <input checked="" type="radio"/> Either

Sort by

DNA Amount

RBG Kew DNA C-values query results

Results

Plant group	Genus	Species	2C (pg)	Original Reference	Paper
Angiosperm	Lasiocephalus	sodiroi	14.58	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	ovatus	14.99	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	pichinchensis	15.02	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	lingulatus	15.07	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	involutcratus	15.63	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	decipiens	16.10	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	otophorus	16.10	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	patens	17.27	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	ovatus	22.45	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012
Angiosperm	Lasiocephalus	lingulatus	22.69	Dusková et al., 2010 (Ref. 631)	2012

Podívat se na stránku <http://data.kew.org/cvalues>

Kliknout na Plant C-values.

Vyplnit e-mail, v políčku C-value vybrat 2C (pg) a zadat čeleď nebo rod nebo druh. Stisknout run, pokud je tam hledaný záznam, objeví se tabulka.

Pokud chceme změřit *Lasiocephalus ovatus*, pak je vhodným standardem *Pisum sativum* (9,09 pg) a vzorek poleze výše nebo *Vicia faba* (26,9 pg) a vzorek poleze níže. Zcela nevhodné jsou standardy o malé velikosti genomu.

Standard by neměl být více jak třikrát větší/menší než vzorek.

Pokud je pík vzorku na pozici 100, je nutné zjistit, jestli před ním v polovině neleze ještě jeden pík (a místo vzorku vidím G2 fázi).

Ve většině případů však nebude hledání úspěšné, proto přejdi k bodu B.

B) Odhad podle čeledi a druhů se známou velikostí genomu

Níže jsou uvedené standardy s jejich velikostí genomu a vhodných rostlin k měření.

Carex acutiformis (2C = 0,82 pg, označení X)

- Vhodná pro čeledi Cyperaceae, Juncaceae, Brassicaceae.
- Standard pro velmi malé genomy.

Solanum pseudocapsicum (2C = 2,61 pg, označení S)

- Velmi univerzální standard vhodný téměř pro všechny rostliny.
- Použij na většinu vzorků s neznámou velikostí genomu.
- Nepoužívej pro čeleď Poaceae, kapradiny, plavuně, Liliaceae.

Bellis perennis (2C = 3,38 pg, označení B)

- Použij pro rostliny, které se kryjí se *Solanum* nebo zástupně za chybějící hrách.
- *Bellis perennis* najdeš u záhonu růží v BZ.

Pisum sativum cv. 'Ctirad' (2C = 9,09 pg, označení P)

- Zlatý standard, vhodný pro čeleď Poaceae, Asteraceae (které se kryjí se S), plavuně a kapradiny.
- Velmi často není k dispozici, nutno použít *Bellis perennis* nebo *Vicia faba*.

Vicia faba cv. 'Inovec' (2C = 26,9 pg, označení V)

- Vhodný standard pro rostliny s velkými genomy (kapradiny, Liliaceae, hlíznaté rostliny).

C) Možné problémy a jejich řešení

P1) Leze pouze standard

- Nutno přesekat s jiným standardem, buď s menší nebo větší velikostí genomu.
- Poznává se podle toho, že na okraji histogramu vpravo leze sběrný pík (šipka na obrázku), který ukazuje, že je pík vzorku (nebo něco jiného) schovaný mimo škálu.
- Málo vzorku, špatná kvalita vzorku (žádná živá část).

P2) Vzorek leze příliš daleko od standardu

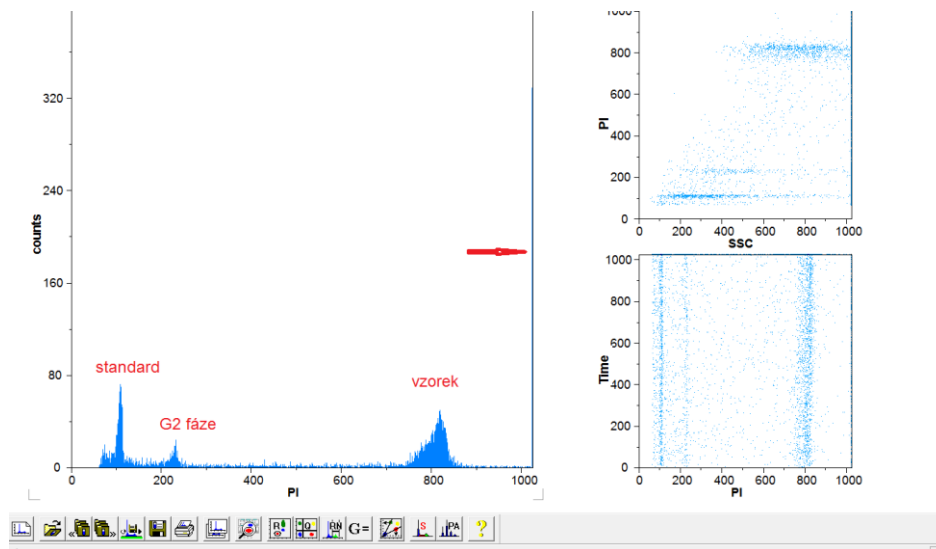
- Nutno přesekat s jiným standardem, a to takovým, který nebude příliš daleko od vzorku.

P3) Vzorek se kryje se standardem

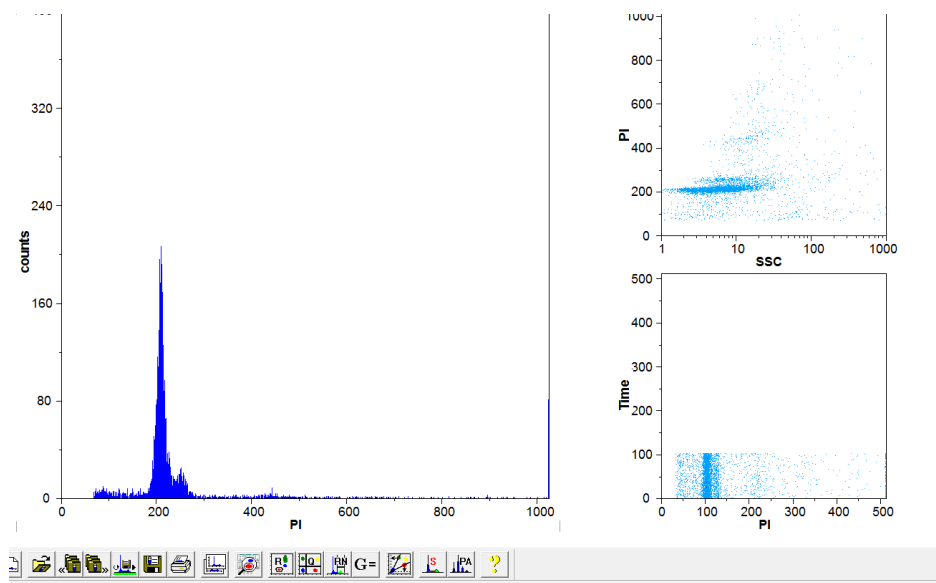
- Nutno přesekat s jiným standardem.

P4) Neleze standard, ani vzorek

- Pravděpodobně ucpaný cytometr, přejdi k problému P9.
- Nečistota na komůrce (použij stlačený vzduch).
- Bublina v komůrce (projed' destilovanou vodou).



Obr. 1: Vzorek daleko od standardu, přítomnost G2 fáze a šipka ukazující na sběrný kanál.



Obr. 2: Kryjící se analýza, kterou je nutné přesekat. Standard je na 200, vzorek leze těsně za ním.

1. 2. Jak nasekat vzorek pro analýzu?

Pro analýzu absolutní velikosti genomu (přístroj s PI) se měří jeden vzorek **2x** v různý den (připravít dvě zkumavky).

Pro analýzu reprodukčních strategií (přístroj s DAPI) se měří z každého vzorku 5 semínek, celkem 5 zkumavek na 1 vzorek.

Výše uvedené se může lišit projekt od projektu, nutno zkontrolovat se školitelem, zadavatelem práce či vedoucím projektu.

Zkumavku označ: **číslo vzorku + rod/druh + standard (34 + *Poa trivialis* + P)**

Petriho miska + 650 ml pufru Otto I. + vzorek + standard + rozsekat žiletkou + přefiltrovat přes filtr do zkumavky.

Použít nejhezčí list z pytlíku. V případě shnilého vzorku možno využít okvětní plátek (pokud je přítomen), živý stonek, případně i větvičku (v největší nouzi). Chlupaté vzorky oholit a u některých čeledí nutno použít jinou část než list (přejdi ke kapitole 3.1. Problematické skupiny průtokové cytometrie).

1. 3. Příprava barviček

Z mrazáku si vyndej barvičku.

Pro absolutní velikost genomu vyndej propidium jodid (PI, červená zkumavka) a RNAázu (bezbarvá).

Připrav si lahvičku s nápisem PI. Do ní nalej pod začátek hrdla pufr Otto II. (vpravo vedle umyvadla na polici). Přidej 1 ml PI (celá eppendorfka) a 1 ml RNAázy (celá eppendorfka). Z ledničky vyndej lahvičku s nápisem merkapták, otevři okno a zapni odsávání. Napipetuj 44 μ m. Pracuj opatrně! Co nejdřív merkapták zavři a ulož zpět do lednice. Barvičku protřep.

1 ml PI – 1 ml RNAázy – 44 μ m merkaptóethanolu – celá lahvička Otto II.

0,75 ml PI – 0,75 ml RNAázy – 33 μ m merkaptóethanolu – $\frac{3}{4}$ lahvičky Otto II.

0,5 ml PI – 0,5 ml RNAázy – 22 μ m merkaptóethanolu – půl lahvičky Otto II.

0,25 ml PI – 0,25 ml RNAázy – 11 μ m merkaptóethanolu – čtvrt lahvičky Otto II.

Pro měření reprodukčních způsobů vyndej DAPI (nažloutlá, označena D).

Připrav si lahvičku s nápisem D. Do ní nalej pod začátek hrdla pufr Otto II. (vpravo vedle umyvadla). Přidej 1 ml DAPI (celá eppendorfka). Z ledničky vyndej lahvičku s nápisem merkapták, otevři okno a zapni odsávání. Napipetuj 50 μ m. Pracuj opatrně! Co nejdřív merkapták zavři a ulož zpět do lednice. Barvičku protřep.

1 ml DAPI – 50 μ m merkaptóethanolu – celá lahvička Otto II.

0,75 ml DAPI – 37,5 μ m merkaptóethanolu – $\frac{3}{4}$ lahvičky Otto II.

0,5 ml DAPI – 25 μ m merkaptóethanolu – půl lahvičky Otto II.

0,25 ml DAPI – 12,5 μ m merkaptóethanolu – čtvrt lahvičky Otto II.

Co dělat, když dojde pufr Otto I. (na přípravu vzorků) a Otto II. (na barvičky).

Otto I.

Na **600 ml** destilované vody si odvaž **12,6 g** kyseliny citronové a odpipetuj **3,75 ml** tweenu 20 (pipeta je nastavená v poličce vedle váhy).

Otto II.

Na **1 l** destilované vody si odvaž **143,25 g** hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrát.

Na **2 l** destilované vody si odvaž **286,5 g** hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrát.

Všechny chemikálie najdeš na poličce vedle pufru Otto II.

Pak to nech rozmíchat na magnetické míchačce. Otto I. je rozmíchán raz dva, Otto II. je potřeba míchat déle.

Postav to na vypnutou míchačku, pak zapni. Pokud jí postavíš na zapnutou, bude to špatně míchat.

Destilovaná voda je u cytometrů, doplnit ji můžeš ve vedlejší laboratoři.

Co dělat, když dojde merkapták.

Požádej obsluhu FCM laboratoře o doplnění.

Pokud není nikdo přítomen, nutno přepipetovat v zapnuté digestoři ze zásobní lahve (nachází se v ledničce zabalená do zip-lock pytlíku a zavřená v lock-lock krabičce.

Pracuj opatrně!

2. Příprava přístrojů

Pro správně fungující přístroje je nutné dodržet následující postup.

Absolutní velikost genomu

- 1) Zapni počítač
- 2) Zapni kolíbkou vzadu na externím zdroji
- 3) Zapni čudlík vzadu na přístroji
- 4) Zapni větráček spojením USB kabelů
- 5) Zapni Flowmax
- 6) Zapni laser spojením kabelů
- 7) Pročisti savem 1x (rychlost 10-12)
- 8) Pročisti destilovanou vodou 2x (rychlost 10-12)
- 9) Obarvi si samostatný standard, vlož do přístroje (rychlost okolo 1) a zjistit jaký má přístroj CV hodnotu a jak pěkný je pík.
- 10) V případě potřeby seříd'
- 11) Pokud vše funguje, můžeš začít měřit, pokud nefunguje, podívej se do sekce „řešení problémů“

- Kliknout do grafu, místo PI-A dát Time, tlačítko Apply

P7) Flowmax se otevře bez ovládacích přístrojů ke stroji

- Zkontrolovat připojení přístroje do počítače a připojení kabelu v přístroji (zvláště u PI je krátký kabel, posunutím počítače se snadno vytáhne jak z počítače, tak z cytometru).

P8) Flowmax hlásí, že je plná odpadová lahev

- Naše cytometry nemají odpadovou lahev.
- Zkontroluj, jestli máš správně zapojený cytometr.
- Zkontroluj, jestli máš propojený cytometr s kabelem a počítačem.

P8) Analýza je hnusná a leze špatně

- Stlačeným vzduchem ofoukej komůrku a vnitřek průtokového cytometru.
- Jestli nepomůže toto, nutno seřídít na standardu (*Solanum* či *Pisum*), požádej obsluhu nebo se podívej do sekce „Seřízení cytometru“.

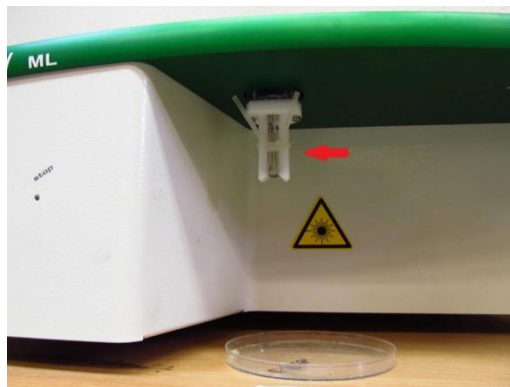
P9) Zkumavka se vzorkem je v přístroji, ale nic neleze

- Je zapnutý laser? Jestli ne, tak ho zapni.
- Obarvil si vzorek? Stopni analýzu, obarvi a vlož zpět.
- Není prasklá zkumavka?
- Vyčistil jsi filtr v lahvi s vodou? Vyměň za nový. Kleště jsou v šuplíku.
- Je dotažené víko lahve s vodou?
- Není ucpaný odpad?
- Přístroj je ucpaný. Dej promýt savem (3x) a destilovanou vodou (3x). Pokud nepomůže, nutno vyčistit komůrku.
- Pokud nepomůže vyčištění komůrky, někdy nutno promýt Savem z lahve. Hadičky z komůrky musí být vytažené, aby se neucpala komůrka, přidržet je u kádinky a Savo nechat do ní vytékat (poteče ze dvou hadiček, ze třetí odpadové ne). Pozor na odbarvení oblečení.
- Pokud ani toto nepomohlo, zkus znovu namíchat barvičku.

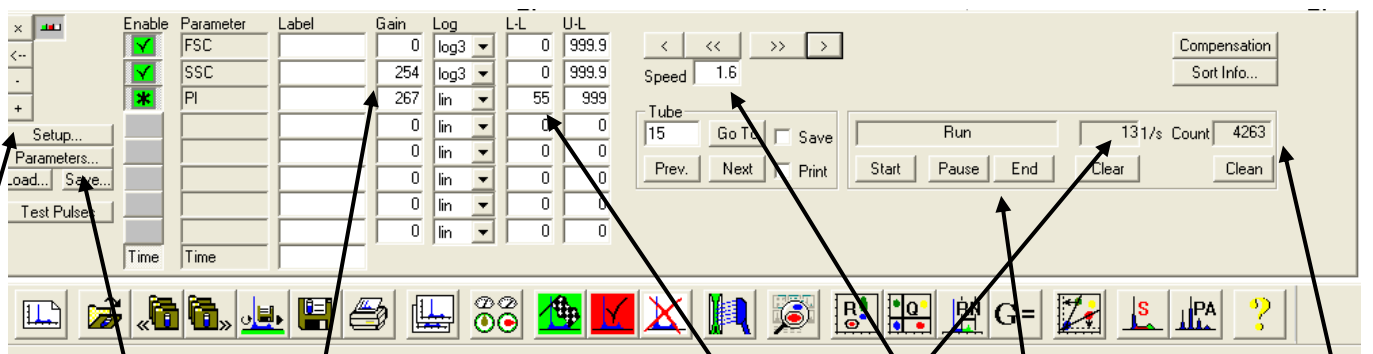
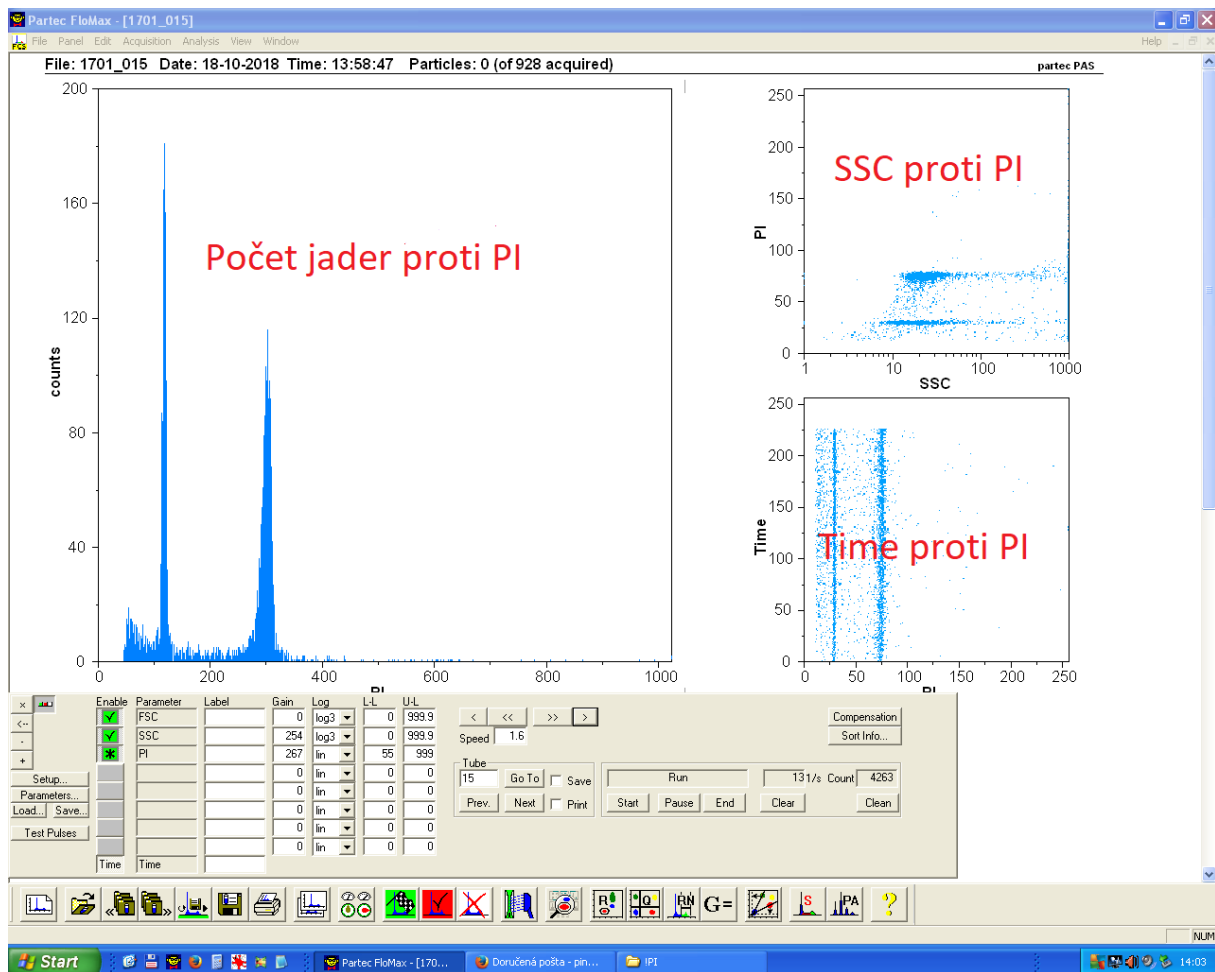
P10) Vzorek jede pomalu a špatně drží v sampleportu

Pravděpodobně špatně těsní sample port.

Starou hadičkou opatrně přitáhni sample port (viz obrázek), tak aby lépe objímala vzorek.



Obr. 4: Sample port a stará hadička, která pomáhá lepšímu těsnění.



Nastavení

Parametry

Gain vedlejšího grafu (SSC)
Gain hlavního grafu (PI)

Ořiznutí

Rychlost

Počet analyzovaných jader

Počet jader za sekundu

Start – po přerušení
zapne analýzu
End – ukončí analýzu
Clear – vyčistí graf
Clean – vyčistí
cytometr, vysaje vzorek

Obr. 5: Některé důležité panely ve Flowmaxu

Seřízení cytometru

K seřizování se používá plochý šroubovák, který se strká doprostřed. Inbus se dává vlevo.

Vpravo se vyšroubuje komůrka, a to nechceš!

Nutno absolvovat školení v laboratoři, bez řádného proškolení se nepouštěj do seřizování.

3. Měření vzorků

Pokud vše proběhlo bez problémů, následuje cca každých 5 minut výměna vzorků po ukončení měření (u PI 5000 jader, u DAPI 3000 jader), hledání standardu a vzorku.

U DAPI zkontrolovat nastavení na 3000 jader. Často je nastaveno jen 1500 (kliknout na Setup vlevo dole).

Ideální rychlost je 20 jader za sekundu (rychlost změň pomocí tlačítka speed, většinou se pohybuje mezi 0,8 – 1,5).

Kontrolovat si docházející vodu v zásobní lahvi.

V případě přestávky na oběd vypni laser/UV lampu a dej prázdnou zkumavku do sample portu.

Protože se měří vzorky o různé velikosti genomu s různými standardy, je nutné měnit gain podle toho, se kterým standardem se zrovna měří.

Příklad:

Mám vzorek *Cerastium* nasekaný s paprikou (S). Neznám jeho velikost genomu.

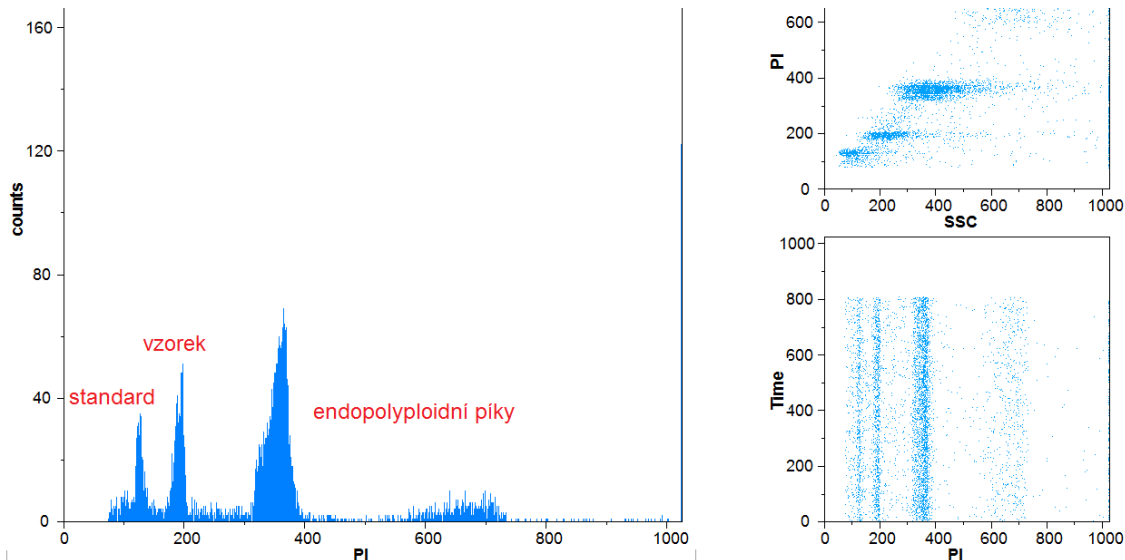
Nastavím si *Solanum* tak, aby bylo na 100 (gain u PI 294). Vidím, že nic neleze, musím posunout *Solanum*, např. na 200 (gain u PI 320). Teprve teď vidím, že *Cerastium* leze pod *Solanem*.

Po ukončení měření pročistit přístroj destilovanou vodou (rychlost nastav mezi 10-12), postupně vypni všechny součásti. V sample portu nech zastrčenou prázdnou a suchou zkumavku.

3. 1. Problematické skupiny průtokové cytometrie

Orchidaceae, Brassicaceae, sukulenty

- Pozor na endopolyploidii.
- Nutno hledat nejnižší pík na histogramu, který odpovídá skutečné velikosti genomu.



Crassulaceae, Oxalidaceae

- Obsah organických kyselin, snižují pH, špatná rozlišitelnost analýzy.

Chlupaté rostliny + Boraginaceae

- Nutno před analýzou oholit žiletkou
- Boraginaceae často vůbec nejdu, ošklivé analýzy.

Malvaceae, Violaceae, Hyacinthaceae, Lythraceae + rostliny obsahující slizy

- Violaceae obsahují slizy, špatně se filtrují, nutno si vzít zelený filtr (v poličce nad sekacím místem).
- Může se stát, že ucpeou cytometr, nutno po takové analýze pročistit savem.

Rosaceae, Geraniaceae, jehličnany, kapradiny

- Obsahují spoustu sekundárních metabolitů (taniny) – hnusné analýzy.
- Když to bude opravdu ošklivé, u kvetoucích rostlin zkusit květ, případně řapík.

Rostliny s velkým genomem (kapradiny)

- Nerozsekávat na kaši.
- Nejlépe je si nasekat standard, potom přidat větší kus kapradinového listu a ten rozsekát na větší části.
- Polezou pomaleji než vzorky na malou velikost genomu.
- Může se stát, že nedojedou do 5000 jader.

Stonek + problematika G2 fáze

- Stonek obsahuje vodivá pletiva, která jsou polyploidní. Na histogramu se to objeví jako další pík (G2 fáze buněčného cyklu). Někdy může být opravdu výrazná.
- Pokud je pík ve dvojnásobné vzdálenosti, nutno si být jist, že se nejedná o G2 fázi, která je většinou malá, není to nejkrásnější pík, ale může být. V takovém případě raději přesekat s jiným standardem.