

Název úlohy:

VIZUALIZACE VAKUOMU

(Vakuom: soubor vakuol v rostlinné buňce)

Rostlinný materiál:

BY-2 tabákové buňky

Princip vizualizace:

Pro vizualizaci vakuol je v současné době využíváno několik způsobů. V tomto praktiku bude využito vitální barvení pomocí (1) barviva FM4-64 a (2) vizualizace vakuol pomocí RFP markeru.

1. Membránový marker FM4-64 (Molecular Probes, kat.č. T13320). Jde o netoxické lipofilní styrylové barvivo, které je ve vodním roztoku nefluorescenční. Předpokládá se, že po přidání barviva k buňkám je barvivo inkorporováno do vnější lipidové vrstvy plazmatické membrány, čímž se stává silně fluorescenčním (excitace: 558nm, emise: 734nm). Barvivo je dále inkorporováno do dalších lipidových struktur v buňce pomocí endocytotických procesů. Po krátkodobém obarvení (minuty až hodiny) lze pozorovat značenou plazmatickou membránu a endocytotické váčky. Po delší periodě barvení (cca 24 h) lze v rostlinné buňce pozorovat systém vakuomu, který je probarven barvivem vneseným díky endocytotickým procesům a dalším pohybům barvy v membránách endozómu.

2. Buňky BY-2 exprimující RFP marker. Tyto buňky stabilně exprimují vnesený gen, který kóduje akvaporin vakuolární membrány (γ TIP), na jehož C-konec je fúzován protein RFP (γ TIP-RFP). Tento fúzní protein je lokalizován do membrány hlavní centrální vakuoly, díky čemuž je možno pozorovat fluorescenčně značený tonoplast (membránu vakuoly).

Postup vizualizace:

Zásobní roztok FM4-64 (20mM v DMSO) se uchovává ve tmě při 4°C.

Vizualizace vakuol: přidat 4 μ l zásobního roztoku do 2,5ml suspenze buněk BY-2 (výsledná koncentrace 32 μ M). Inkubovat 24 hodin ve tmě (25°C) při kontinuálním třepání.

Buňky exprimující γ TIP-RFP není třeba připravovat, stabilní linie je k dispozici v laboratoři.

Úkol:

Pozorujte systém vakuol pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Popište strukturu vakuolu u buněk exponenciálních a stacionárních.

Popište, zda představuje vakuom spíše nepohyblivou nebo spíše dynamickou strukturu.

Popište distribuci vakuolárních membrán během různých fází buněčného cyklu.