

Název úlohy:

VIZUALIZACE JADER

Rostlinný materiál:

BY-2 tabákové buňky v exponenciální fázi růstu

Projasněné pravé listy rostliny *Arabidopsis thaliana*

Princip vizualizace:

Jádro představuje prominentní buněčnou organelu, například v tabákových buňkách BY-2 dobře pozorovatelnou v mikroskopu i v procházejícím světle. Vhodnou pozorovací metodou v procházejícím světle je Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC).

Pro vizualizaci jader i samotných chromozómů v živých buňkách lze využít také fluorescenční metody, z nichž některé budou právě v tomto praktiku demonstrovány.

- A) Barviva řady SYTO (Molecular Probes).** Jde o permeabilní barviva, jejichž fluorescence se výrazně zvyšuje jejich vazbou na DNA nebo RNA. Jednotlivá barviva SYTO se od sebe liší v několika charakteristikách, jako je např. permeabilita, excitační a emisní spektrum, selektivita k DNA nebo RNA – viz Tabulka 1.

Postup barvení: Použijte barviva SYTO 12 a SYTO 64. S barvami pracujte zvlášť, budete je porovnávat. Přidejte 1μl zásobního roztoku barviva (5mM v DMSO) k 1ml buněčné suspenze BY-2. Nechte probarvovat cca 5 minut.

Tvorba preparátu: Kapku nabarvených buněk suspenze BY-2 pomocí barvy SYTO 12 přeneste na mikroskopické sklíčko a přiklopte krycím sklem. Preparát nenechte vyschnout. Stejně vyrobte preparát s buňkami nabarvenými barvou SYTO 64. Pozorujte pod mikroskopem.

- B) Barvivo Hoechst 33258:** Jde o barvivo řady Hoechst. Tato konkrétní barva není permeabilní, tedy neproniká skrze plazmatickou membránu a barvené buňky je tedy třeba před barvením permeabilizovat. Hoechst 33258 má excitační spektrum v UV oblasti (cca 350 nm) a emisi v modré oblasti okolo 461 nm.

- ***BY-2 suspenze buněk barvená pomocí Hoechst 33258***

Postup barvení: 1μl zásobního roztoku (1mg/1ml H₂O) a 1 kapku (pomocí kapátka) 10% TRITONu X100 přidejte k 1ml suspenze BY-2 buněk. Nechte probarvit 10 minut.

Tvorba preparátu: Kapku suspenze nabarvených buněk BY-2 v exponenciální fázi růstu přenést na mikroskopické sklíčko a přiklopit krycím sklem. Preparát nesmí vyschnout. Pozorujte pod mikroskopem.

- ***Projasněné listy rostliny Arabidopsis thaliana barvené pomocí Hoechst 33258***

Postup barvení: list zbavený většiny barviv pomocí projasňovacího roztoku (chloralhydrate, glycerol, voda) přendejte z projasňovacího roztoku do mikrozkušavky s 1ml vody a rozstříhnete na dvě poloviny. Do mikrozkušavky přidejte 1μl zásobního roztoku (1mg/1ml H₂O) barviva Hoescht 33258 a 1 kapku 10% TRITONu X100. Nechte probarvit alespoň 2h.

Tvorba preparátu: projasněný a nabarvený kus pravého listu *Arabidopsis thaliana* přeneste na mikroskopické sklíčko a přiklopte krycím sklem. Pozorujte pod mikroskopem.

Cíle úlohy:

- 1) Pozorujte buňky nabarvené SYTO barvami pod fluorescenčním mikroskopem (excitační a emisní spektra viz tabulka 1). Popište a nakreslete rozdíly ve fluorescenčním značení jader tabákových buněk BY-2 suspenze pomocí SYTO 12 a SYTO 64.
- 2) V BY-2 buňkách obarvených barvivem Hoechst 33258 najděte, popište a nakreslete buňky ve fázi interfáze, profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Popište rozdíl mezi jádry v G1 fázi a G2 fázi.
- 3) U pravých listů *Arabidopsis thaliana* pozorujte, popište a nakreslete jádra barvená pomocí Hoechst 33258 v trichomech a v pokožkových buňkách listu. Popište rozdíly mezi tvarem a velikostí jader v těchto buňkách. Vysvětlete svá pozorování.

| Dye | Cat # | Absorption * (nm) | | Emission * (nm) | | QY † DNA | QY † RNA |
|---------|---------|----------------------|------|--------------------|------|-------------|-------------|
| | | +DNA | +RNA | +DNA | +RNA | | |
| SYTO 9 | S-34854 | 485 | 486 | 498 | 501 | 0.58 | ND |
| SYTO 11 | S-7573 | 508 | 510 | 527 | 530 | 0.49 | 0.39 |
| SYTO 12 | S-7574 | 499 | 500 | 522 | 519 | 0.09 | 0.13 |
| SYTO 13 | S-7575 | 488 | 491 | 509 | 514 | 0.40 | 0.40 |
| SYTO 14 | S-7576 | 517 | 521 | 549 | 547 | 0.08 | 0.12 |
| SYTO 15 | S-7577 | 516 | 518 | 546 | 555 | 0.15 | 0.20 |
| SYTO 16 | S-7578 | 488 | 494 | 518 | 525 | 0.65 | 0.24 |
| SYTO 18 | S-7529 | 490 | 493 | 507 | 527 | 0.24 | 0.31 |
| SYTO 20 | S-7555 | 512 | ND | 530 | ND | 0.16 | ND |
| SYTO 21 | S-7556 | 494 | ND | 517 | ND | ~0.5 | ND |
| SYTO 22 | S-7557 | 515 | ND | 535 | ND | ND | ND |
| SYTO 23 | S-7558 | 499 | ND | 520 | ND | ND | ND |
| SYTO 24 | S-7559 | 490 | ND | 515 | ND | 0.76 | ND |
| SYTO 25 | S-7560 | 521 | ND | 556 | ND | ND | ND |
| SYTO BC | S-34855 | 485 | 487 | 500 | 504 | ND | ND |

SYTO 64 – excitace 599nm / emise 619 nm