



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANISMŮ (EKO/MMEM)

ÚPRAVA PŘÍRODNÍCH VZORKŮ A STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ ABUNDANCE (DAPI)

Pro přímé stanovení celkových počtů mikrobiálních buněk (buněčné abundance) ve vzorku se používají nejčastěji metody založené na detekci buněk pomocí fluorochromů. Jedná se o barviva nukleových kyselin, která se specificky vážou na DNA a jsou schopny fluorescence. Fluorescence je schopnost atomů nebo molekul určitých látek absorbovat kvanta vyšší energie (UV záření) a tuto energii opět vydávat ve formě světelného záření o větší vlnové délce. Díky specifické vazbě barviva na DNA je vyloučeno obarvení anorganického materiálu (neplatí zcela) a vyzařování fluorescenčního světla umožňuje pomocí epifluorescenčního mikroskopu detekovat jednotlivé obarvené objekty.

DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) je barvivo s modrou fluorescencí, které se přednostně váže na dvouřetězcovou DNA (dsDNA), v oblasti bohaté na AT páry. Maximální excitace celku DAPI-DNA je dosažena UV-zářením o vlnové délce 358 nm, maximum emise probíhá v oblasti viditelného světla s vlnovou délkou 461 nm. V určité míře se DAPI váže i na RNA, uplatňuje se zde ovšem jiný mechanismus a navíc emituje slabší záření s maximem cca 500 nm. Určitá nevýhoda barvení pomocí DAPI spočívá v obarvení veškeré DNA, prokaryotické i eukaryotické, proto odlišení modře svítících objektů vyžaduje jistou dávku praxe. DAPI proniká nepoškozenou membránou, může být použito na barvení živých i fixovaných buněk, u kterých dochází k efektivnějšímu probarvení. Hodnocení se provádí pod epifluorescenčním mikroskopem Olympus BX 60 s použitím imerzního objektivu.

Mikroskopický obraz náhodně vybraných polí (o známé velikosti) se přenáší pomocí kamery citlivé v UV oblasti do paměti připojeného počítače, je uložen a později vyhodnocen.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



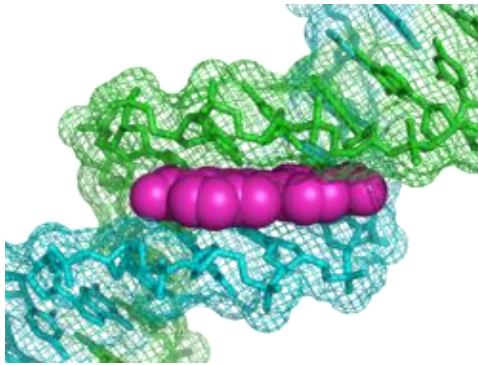
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

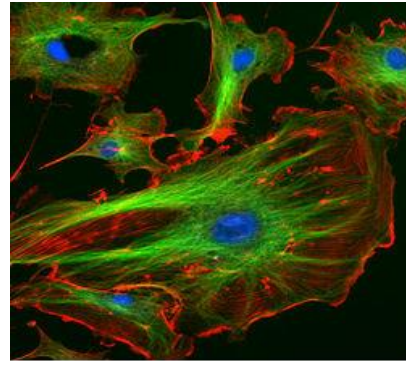
CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Emitované světlo je modré, vlnové délky 490-500 nm. Z tmavého pozadí vystupují modře zbarvené buňky bakterií (tyčinky, koky i vláknité formy), prvoků, řas i sinic, v eukaryontních buňkách pozorujeme intenzivněji zbarvené jádro.

Protože DAPI proniká živými buňkami a interkaluje mezi DNA, je považován za toxickou látku s možným mutagenním efektem, a pro práci s DAPI je nutné používat bezpečnostní opatření, především nitrilové rukavice.



Obr. 1 DAPI vázaná v DNA



Obr. 2 Jádra buněk obarvených DAPI

Sonikace a izopyknická hustotní centrifugace

U většiny typů přírodních vzorků je nezbytné zařadit před aplikací látek založených na vazbě s DNA sonikaci (tj. přiměřené působení ultrazvuku), isopyknickou hustotní centrifugaci, příp. aplikaci detergentu - metody sloužící k oddělení buněk od ostatních partikulí vzorku.

Sonikace spočívá v působení ultrazvukové vlny na vlákna, fibrily a kotvící vrstvy exopolymerů, kterými jsou mikroorganismy přichyceny na povrch vzorku. Aplikace detergentu snižuje povrchové napětí buněk a napomáhá jejich uvolňování z povrchu. Základem hustotní centrifugace je prostředí o měnící se hustotě (hustotní gradient). Každá částice sedimentuje v centrifugační tubě pouze do té úrovně média, která odpovídá hustotou její vlastní hustotě; zde se zastaví a setrvává. V řadě experimentů, které s touto metodou pracují, je gradient vytvářen tak, že hustota na dně centrifugační tuby odpovídá hustotě



evropský
sociální
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

částic, které chceme ze vzorku odstranit, zatímco hustotní vrstva nebo vrstvy nad ní odpovídají hustotě částic, které chceme uchovat, případně dále dělit.

Kombinace výše uvedených metod je vysoce efektivní pro úpravu environmentálních vzorků, u nichž jsou mikrobiální buňky pevně ukotveny v polysacharidové matrix (mikrobiální biofilmy). Biofilm se v přírodním prostředí vytváří v podstatě na každém povrchu, jež je v kontaktu s vodou (ponořené kameny, kořeny, vodní makrofyta, sediment atd..).

POSTUP: Stanovení mikrobiální abundance pomocí DAPI s využitím sonikace a hustotní centrifugace

Hustotní centrifugace a sonikace

U vzorků přírodních biofilmů a vzorků sedimentu je třeba zařadit před vlastní zpracování vzorku ještě hustotní centrifugaci a s ní spojenou separaci buněk od povrchu vzorku pomocí detergentu a působení ultrazvuku (sonikace).

1. Z fixovaných vzorků (paraformaldehyd, finální koncentrace 2%) sedimentu odebereme do 15 ml zkumavky 6 ml vzorku a přidáme 6 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl)
2. Fixované vzorky biofilmu (konkr. vodních makrofyt) nařežeme (nastříháme) na větší kusy a také vložíme do 15 ml zkumavky s fyziologickým roztokem (7 ml).
3. K takto připraveným vzorkům přidáme cca 30-35 μ l detergentu (Triton X-100), vzorky třepeme přes noc nebo alespoň 5 hod předem (třepačka OS-10, 200 rpm) poté sonikujeme 3 x 30 s (Sonopuls HD 2200, 15 % power)
4. Z takto upravených vzorků odebereme do 15 ml zkumavky veškerý supernatant (6 nebo 7 ml) a 3 – 3,5 ml hustotního média Nycodenz opatrně zavedeme injekční jehlou pod vzorek.
5. Vzorky vložíme do centrifugy (Rotofix 32A, 3000 x g) a centrifugujeme po dobu 45 min
6. Po skončení centrifugace je většinou patrné rozložení vzorku, kdy na dně zkumavky se nachází peleta vzorku, nad ní hustotní médium a svrchní vrstvu tvoří supernatant, kde by měly být zachyceny volné buňky.
7. Pipetou opatrně odebereme svrchní vrstvu supernatantu o stejném objemu, jaký jsme do zkumavky napipetovali (tedy 6 nebo 7 ml)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

8. Potřebné množství supernatantu (závisí na typu vzorku a většinou se pohybuje od 500 µl do 2 ml) napipetujeme na membránový filtr, doplníme do 2 ml MQ vodou a dále postupujeme dle vybrané metodiky

Barvení DAPI

1. Pomocí vakuové filtrace nafiltrujeme vzorek na předem označené membránové filtry (v případě potřeby vzorek naředíme)
2. Filtry necháme usušit na filtračním papíru, rozdělíme na patřičné množství sekcí a naneseeme fluorochrom DAPI (finální konc. 65 µg/ml, laboratorní teplota)
3. Takto upravené vzorky inkubujeme v lednici na podložním skle cca 10 min
4. Po inkubaci filtry postupně promyjeme v MQ deionizované vodě a etanolu, přičemž poslední fází je voda
5. Filtr opět necháme usušit na filtračním papíru a umístíme na podložní sklo s kapkou imerzního oleje, na filtr přidáme kapku oleje a přikryjeme krycím sklíčkem. Krycí sklíčko jemně přitlačíme tak, abychom eliminovali vznik nežádoucích vzduchových bublin mezi filtrem a krycím sklem
6. V epifluorescenčním mikroskopu (hranol pro pozorování fluorochromu DAPI při excitaci/emisi 358/461 nm (Olympus BX 60) počítáme alespoň 20 náhodně vybraných polí nebo 400 buněk ($\pm 10\%$ chyba za předpokladu normálního rozdělení)
7. Vlastní vyhodnocení provádíme pomocí programu NIS Elements. Zde počítáme celkovou abundanci buněk. Získaný počet buněk pak přepočteme na 1 ml vzorku (B) podle vztahu:

Počet buněk v 1 ml vzorku (abundance) lze vypočítat podle vzorce:

$$B = n * F/P * V$$

kde n je tzv. „průměrný snímek“ (tj. průměrný počet buněk na snímek),

F plocha filtru (resp. vnitřní průměr filtračního komína)

P plocha, kterou stanovujeme (tj. plocha, na níž počítám, resp. plocha snímku; lze ji zjistit v programu NIS)

V objem zfiltrovaného vzorku v ml



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Potřebný materiál:

pracovní rukavice
membránové filtry Millipore - bílé (0,2 μm , GTTP)
15 ml uzavíratelné zkušavky
skalpel nebo nůžky
injekční jehla a stříkačka
filtrační papír
podložní a krycí skla
Petriho misky
pinzeta
pipeta 1000-10 000 μl + špičky
pipeta 1000-5000 μl + špičky

pipeta 20-200 μl + špičky
pipeta 2-20 μl + špičky

Chemikálie:

paraformaldehyd
deionizovaná MQ voda
fyziologický roztok
imerzní olej
detergent Triton X-100
hustotní médium Nycodenz
fluorochrom DAPI
96% etanol

Doporučená literatura:

- Amalfitano S, Fazi S (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *J Microbiol Methods* 75:237–243
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943–948
- Rickwood D., Ford T., Graham J., 1982. Nycodenz: A new nonionic iodinated gradient medium. *Analytical biochemistry*. 123 : 23-31