



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

MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANISMŮ (EKO/MMEM)

FLUORESCENČNÍ „IN SITU“ HYBRIDIZACE (FISH)

Fluorescenční „*in situ*“ hybridizace je jednou z bazálních metod používaných pro zjištění přítomnosti určitých fylogenetických skupin, ev. taxonů. Pomocí hybridizace lze zjišťovat přítomnost konkrétních sekvencí přímo v buňce, tedy v místě jejich normálního výskytu, tzv. *in situ*. Kromě fylogenetické charakteristiky přírodních společenstev se tato metoda hojně používá také v cytogenetické a molekulární diagnostice.

Princip FISH

Principem metody FISH je hybridizace - schopnost jednovláknových molekul NK tvořit hybridní molekuly (hybridizovat), pokud obsahují komplementární sekvence. Jde tedy o navázání DNA sondy k DNA/RNA vzorku, na základě pravidel komplementarity bází. Hybridizovat mohou samozřejmě pouze jednovláknové molekuly. Pokud jsou sonda nebo vyšetřovaná nukleová kyselina dvojitě vláknové molekuly, musejí být nejdříve denaturovány. Pro hybridizaci jsou pak potřebné stejné podmínky, jako pro renaturaci denaturované DNA. Tyto podmínky musejí umožňovat vznik stabilních vodíkových můstků mezi sondou a vyšetřovanou nukleovou kyselinou.

Na stabilitu vodíkových můstků má vliv teplota a koncentrace iontů. Pokud bude teplota nebo koncentrace iontů v hybridizačním roztoku nižší, bude hybridizace probíhat snadněji, protože vodíkové můstky mezi molekulami sondy a vyšetřované nukleové kyseliny budou stabilnější. Pokud bude naopak teplota nebo koncentrace iontů vyšší, bude hybridizace probíhat pomaleji nebo neproběhne vůbec, protože tepelná energie a ionty zabrání vzniku stabilních vodíkových



evropský
sociální
fond v ČR



MSMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



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

můstků. Kdyby ovšem teplota nebo koncentrace iontů byla příliš nízká, docházelo by k hybridizaci i mezi molekulami, které nejsou přesně komplementární.

Podmínky hybridizace proto musejí být dostatečně přísné (tzv. stringentní), aby byly stabilní jen přesně spárované hybridní molekuly. Jen v tom případě je výsledek hybridizace spolehlivý a může z něho být vyvozen závěr o přítomnosti nebo nepřítomnosti komplementární sekvence ve vyšetřovaném vzorku nukleové kyseliny. Po správné hybridizaci je vzorek promýván puftrem, takže dojde k odmytí nepřesně hybridizovaných molekul sondy a na vyšetřované DNA se “udrží” jen sondy dokonale komplementární.

Užití fluorescenčního barviva při hybridizaci

Abychom mohli zjistit, zda hybridizace proběhla, musíme mít nějak označeny molekuly použité sondy (viz Obr. 1). Jedním ze způsobů značení je použití fluorescenčních barviv. Sonda je označena fluorescenčním barvivem - v našem případě indokarbocyaninové barvivo Cy3 – s maximální excitací při vlnových délkách 550 nm, maximum emise je v oblasti světla s vlnovou délkou 570 nm. K vizualizaci signálu a tedy hodnocení výsledku, se využívá stejně jako u barvení DAPI fluorescenční mikroskop Olympus BX 60. Fylogenetické sondy jsou v podstatě fluorescenčně značené oligonukleotidy komplementární s cílovou sekvencí, pracují na principu penetrace buněčné stěny a hybridizace přímo v buňce (tzv. whole cell hybridization - celobuněčná FISH).



Obr. 1 Navázání označené sondy na molekulu NK



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

Protože v naší laboratoři zjišťujeme pomocí metody FISH zastoupení fylogenetických skupin především u prokaryotických organismů, níže uvádíme jejich základní přehled.

Úvod do fylogeneze prokaryot

Na začátku dvacátého století byla všechna prokaryota (dnes archea a bakterie) považována na základě biochemických, morfologických a fyziologických znaků za stejnorodou skupinu organismů. Vědce k tomu vedlo například složení jejich buněčné stěny, tvar buňky a druh přijímané potravy. V roce 1965 byl navržen nový typ klasifikace, který spočíval ve zjišťování genových sekvencí nukleových kyselin daného organismu. Na základě genetického materiálu se totiž dá poznat, která prokaryota jsou si příbuzná více a která méně. Tento tzv. fylogenetický typ systematiky se užívá dodnes.

Carl Woese a George E. Fox v roce 1977 na základě sekvenace genů kódujících rRNA (ribosomální RNA) vytvořili termín archebakterie pro popis organismů, které jsou fylogeneticky nezávislé na pravých eubakteriích (Eubacteria). Dnes se pro archebakterie spíše používá termín *Archaea* a pro tehdejší eubakterie se razí jednoduše termín bakterie, čímž se zdůrazňuje vzájemná nezávislost těchto skupin organismů. Tři skupiny života, tedy archea, bakterie a eukaryota, se často označují jako domény.

Taxon „doména“ poprvé zavedli v roce 1990 vědci Carl Woese, Otto Kandler a Mark Wheelis, a to ve své studii „Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya“.

Slovo doména pochází z latinského dominium, jež odpovídá významu slov „vlastnictví“, „držení“, ale též „vláda“ a „panství“.

Podle třídoménového systému se rozeznávají tři domény, základní větve života:

- archea (*Archaea*, postaru *Archaeobacteria*)
- bakterie (*Bacteria*, postaru *Eubacteria*)
- eukaryota (*Eukaryota*, též *Eukarya*, česky též někdy jaderní)



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

Archea (*Archaea*, z řec. ἀρχαία, archaia — starobylý), též archebakterie (*Archaeobacteria*), je rozsáhlá skupina (doména) prokaryotických jednobuněčných organismů, jejíž nezávislost na ostatních doménách života (bakterie a eukaryota) byla zjištěna teprve roku 1977.

Velikost buněk se u různých zástupců značně liší, obvykle se pohybuje od 0,1 do 15 mikrometrů. Od bakterií a eukaryot je odlišuje stavba jejich cytoplazmatické membrány, buněčné stěny, genom a některé metabolické pochody. Rozmnožují se binárním dělením.

Na Zemi se archea objevila již před 3,5 miliardami let. Ačkoliv se mnohá archea vyskytují v pestrém spektru různých prostředí, dnes jsou známa především jako extrémofilní organismy. Vyhledávají extrémní stanoviště s vysokou teplotou, extrémním pH či vysokým obsahem solí. Hrají významnou roli v koloběhu prvků, zejména uhlíku, dusíku a síry. Některá archea či jejich enzymy našly užití i v technologiích a průmyslu.

Ke špatné úrovni poznání archeí přispívala i skutečnost, že je archea těžké kultivovat: vyžadují specifickou teplotu, obsah solí a množství kyslíku. Zpočátku se do nové domény řadila pouze methanogenní prokaryota, protože se předpokládalo, že archea žijí jen v extrémních podmínkách (tzv. extrémofilové), jako jsou například horká vřídla či slaná jezera. Na konci dvacátého století se však zjistilo, že se archea běžně vyskytují i na mnohem méně extrémních stanovištích, jako je například půda či mořská voda. Archea zde byla objevena na základě sběru vzorků nukleových kyselin z prostředí. Ty byly pak namnoženy pomocí polymerázové řetězové reakce a identifikovány, většinu archeí totiž nelze kultivovat v laboratoři.

Bakterie (*Bacteria*, dříve též Bacteriophyta či Schizomycetes), nebo také eubakterie (*Eubacteria*), je doména jednobuněčných prokaryotických organismů. Mívají kokovitý či tyčinkovitý tvar a zpravidla dosahují velikosti v řádu několika mikrometrů. Studium bakterií se zabývá bakteriologie, významně tuto vědu rozvinuli Robert Koch a Louis Pasteur.

Typickou součástí bakteriálních buněk je peptidoglykanová buněčná stěna, jaderná oblast (nukleoid), DNA bez intronů, plazmidy a prokaryotický typ ribozomů. U bakterií se

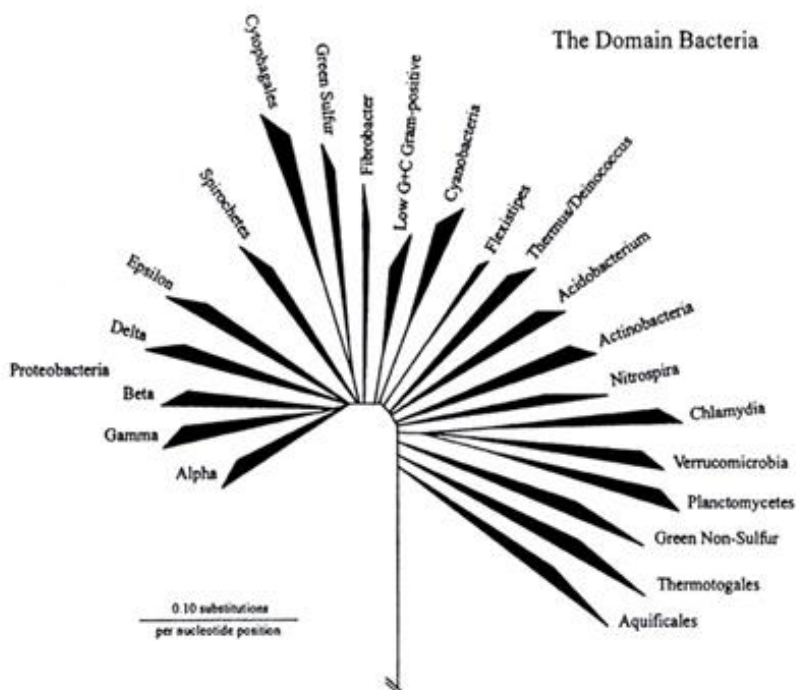
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

nevyskytuje pohlavní rozmnožování, namísto toho se nejčastěji dělí binárně. Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Dříve se druhy bakterií klasifikovaly podle vnějšího vzhledu, dnes jsou moderní zejména genetické metody. Díky nim se dnes rozlišuje asi 25 základních kmenů bakterií.

Bakterie mají velký význam v planetárním oběhu živin a mnohdy vstupují do oboustranně prospěšných svazků s jinými organismy. Mnohé patří mezi komenzálické druhy, které žijí například v lidské trávicí soustavě. Na druhou stranu je známo i mnoho patogenních bakterií, tedy druhů, které způsobují infekce. I člověk mnohé z bakterií využívá, například v potravinářském a chemickém průmyslu. Vědci využívají bakterie ve výzkumu a samotné bakterie jsou předmětem bádání bakteriologie.



Významnou fylogenetickou skupinou z hlediska mikrobiologie jsou *Proteobacteria*, především tzv. alfa-, beta-, gamma-proteobacteria.

Skupina *Alphaproteobacteria* zahrnuje řadu oligotrofů, symbiotických rostlin i zvířat (r. *Rhizobium*) i nebezpečné patogeny (*Rickettsiaceae*).

Betaproteobacteria jsou dominantní složkou

sladkovodního i slaného prostředí s vysokou metabolickou diverzitou – aerobní, chemolitotrofní, fototrofní typy metabolismu.

Gammaproteobacteria tvoří fenotypově i metabolicky rozmanití zástupci (mixotrofní).

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

Hybridizace prokaryotické buňky

Pro fylogenetickou analýzu genomu prokaryot je obvykle využívána ribozomální RNA (rRNA), především struktura molekuly tzv. malá podjednotka prokaryotického ribozómu. Kromě malé podjednotky 16S rRNA, jsou ribozomy složeny i z tzv. velké podjednotky, jež je tvořena 5S rRNA a 23S rRNA (viz Obr 2). Na rozdíl od prokaryot, u eukaryotických buněk nalezneme až 4 druhy rRNA (28S, 18S, 5,8S a 5S). Ribozomální RNA je nejhojnějším typem RNA (až 80% hmotnosti všech RNA v buňce).

Obr. 2 Velká a malá podjednotka bakteriálního ribozomu



Vzhledem ke skutečnosti, že proces syntézy bílkovin je evolučně starobylý a do značné míry konzervativní, používá se molekuly 16S rRNA jako tzv. fylogenetického chronometru. Naproti tomu jsou zde lokalizovány také relativně proměnlivé úseky související s produkcí specifických bílkovin v jednotlivých fylogenetických skupinách. Malá ribozomální podjednotka je proto vhodný cíl detekce fylogeneticky významných úseků, neboť ribozomy jsou základní součástí všech buněk, mají v nich univerzální funkci a většinou se také vyskytují v množství dostatečném pro detekční metody. Teoreticky, každý ribozom v prokaryotické buňce obsahuje jednu kopii 5S, 16S a 23S rRNA, které mohou být obarveny jednou molekulou sondy. Poměrně velké množství ribozomů v buňce tak zajistí poměrně velký barevný signál.

Analýza 16S rRNA (a tedy ani FISH cílená na sekvence této molekuly) však nejsou příliš vhodné u blízké příbuzných druhů, tyto mohou mít totiž velmi podobný sled nukleotidů, který je při nedostatečném množství analyzovaných „jedinců“ obtížně odlišitelný. V takovýchto případech se ukazuje mnohem vhodnější užití sekvencí komplementárních s 23S rRNA, jejichž specifické úseky mohou být až dvakrát delší a obsahují několik výrazně variabilních regionů.



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

POSTUP: Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

1. Filtrace vzorků na membránový filtr (přesný postup závisí na charakteru vzorku)
Vzorky filtrujeme pomocí filtrační aparatury na membránový filtr Millipore (0,2 μm , GTTP)
viz protokol „Barvení DAPI“.

POZN. před započítáním práce nezapomeň zapnout inkubátor na požadovanou teplotu!

2. Příprava hybridizačního a pracího pufru

Přesnou spotřebu hybridizačního a pracího pufru je třeba vypočítat na základě množství
použitých sond a vzorků; počet zkumavek s pracím pufrem odpovídá vždy počtu zkumavek
s hybridizovanými vzorky. Postup přípravy pracího a hybridizačního pufru viz Tab 1 a 2.

3. Zředění próby na cílovou koncentraci

Próbu ředíme MQ vodou (případně jiným rozpouštědlem) na koncentraci $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$
(nebo koncentraci uvedenou pro daný účel v literatuře), přičemž finální
koncentrace sondy, jež je aplikována v hybridizačním pufru na vzorek je $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$

NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ SONDY V NAŠÍ LABORATOŘI:

<i>sonda</i>	<i>sekvence</i>
ALF968 (detekce α - <i>Proteobacteria</i>)	5'- GGT AAG GTT CTG CGC GTT -3'
BET42a (detekce β - <i>Proteobacteria</i>)	5'- GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'
GAM42a (detekce γ - <i>Proteobacteria</i>)	5'- GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'
EUB338 (detekce většiny z domény <i>Bacteria</i>)	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'
EUB338 II (detekce řádu <i>Planctomycetales</i>)	5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT -3'
EUB338 III (detekce řádu <i>Verrucomicrobiales</i>)	5'- GCT GCC ACC CGT AGG TGT -3'
ARCH915 (detekce domény <i>Archaea</i>)	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3'
MPB1 (detekce metanogenních archea)	5'- CATGCACCWCCTCTCAGC-3'

4. Příprava hybridizační směsi

Z hybridizačního pufru napipetujeme po $x * 18 \mu\text{l}$ ($x =$ počet vzorků, resp. sekcí filtru) do
mikrozkumavky (eppendorf, objem 1,5 ml) pro jednotlivé sondy. K pufru přidáme vždy $x * 2$
 μl jednotlivé sondy (1 mikrozkumavka = 1 sonda). U některých mikrobiálních skupin je
potřeba pro detekci celé skupiny použít kombinaci více sond (např. pro doménu *Bacteria*
máme celkem 3 sondy). Pro přípravu takovéto reakční směsi postupujeme analogicky dle



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

postupu výše (tedy 3 * 18 μ l hybridizačního pufru + 2 μ l EUB + 2 μ l EUB II + 2 μ l EUB III pro každý vzorek). Vzniklý roztok důkladně promícháme a uložíme do chladu a temna.

Pozn. Podobná je situace u detekce skupin Proteobakterií β - a γ . Protože beta- a gamma-proteobakterie mají velmi podobný genom, respektive cílové sekvence jsou velmi podobného uspořádání bází, používají se k jejich odlišení tzv. kompetitivní (neznačené) sondy. V podstatě to znamená, že chceme-li hybridizovat vzorek značenou beta-sondou, přidáme kromě této sondy do hybridizační směsi gama-sondu, která nenesou značení; tato se naváže na příslušnou kompetitivní sekvenci gama-bakterií, znemožní volnější navázání beta-sondy a výsledný pohled v mikroskopu potom ukazuje skutečně pouze beta-proteobakterie.

5. Vlastní hybridizace

Hybridizace je náročná na čas i materiál, proto je výhodné jednotlivé filtry (průměr filtru 25 mm) rozřezat na díly a dále pracovat s nimi. Sekce filtrů od jednotlivých vzorků umístíme vedle sebe na podložní sklo. Na jednotlivé výřezy postupně napipetujeme 20 μ l (v případě detekce domény *Bacteria* 60 μ l) směsi hybridizační pufru-sonda; na jednom podložním skle hybridizujeme vždy pouze jeden typ sondy! Sklíčka popíšeme.

Zkumavky (50ml) vystelíme buničitou vatou, zvlhčíme asi 4 ml hybridizačního pufru a do nich velmi opatrně, aby ze sekcí filtrů kapky směsi nestekly, vložíme po jednom podložním skle. Zkumavky důkladně uzavřeme a uložíme ve vodorovné poloze do inkubátoru.

Inkubujeme při teplotě 46°C po dobu tří hodin (dle metodiky).

6. „Praní“

V průběhu hybridizace připravíme pro každou zkumavku s hybridizovanými vzorky („hybridizační zkumavku“) cca 50 ml pracího pufru a vložíme zkumavky s pufrům do vodní lázně předehřáté na teplotu 48°C. Společně s nimi necháme v jiných zkumavkách ohřát také destilovanou vodu určenou k vymývání (pro každou „hybridizační zkumavku“ vždy 1 zkumavka pracího pufru a 1 zkumavka destilované vody). „Hybridizační zkumavky“ vytahujeme z inkubátoru postupně, opatrně z nich vyjmeme sklíčko a rychle je přemístíme do zkumavky s ohřátým pracím pufrům a zpět do lázně; zde probíhá vymývání v klidu po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby vylijeme prací pufr i se vzorky do Petriho misky, pomocí pinzety je promyjeme v destilované vodě ohřáté na 48°C a následně ve studené destilované vodě a necháme na filtračním papíře dokonale usušit.

7. Barvení DAPI

Takto zpracované filtry dále obarvíme fluorochromem DAPI- obdobně jako při barvení bez hybridizace. Kompletně obarvené vzorky umístíme do roztoku Citifluor - Vecta Shield (tzv. *mounting media*, poměr 4:1) a překryjeme krycím sklem.

Pozn. Vectashield obsahuje látky bránící rychlému vyblednutí, po takovéto úpravě je možno vzorky při teplotě -20°C přechovávat i několik dní bez toho, že by došlo k výraznému snížení fluorescence.

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. Snímání a vyhodnocení obrazu

V epifluorescenčním mikroskopu pozorujeme objekty obarvené danou sondou jako červené body. Na každém jednotlivém vzorku, resp. na každém poli zobrazeném v mikroskopu, snímáme celkový počet buněk obarvených DAPI a současně počet buněk obarvených příslušnou sondou (obě barviva přirozeně vyžadují odlišné hranoly).

Vyhodnocení celkové mikrobiální abundance i podílu hybridizovaných buněk provádíme v programu NIS Elements.

Tab. 1 Příprava hybridizačního pufru (objemové množství 20 ml, konkrétní spotřebu nutno upravit podle počtu vzorků)

chemikálie	5 M NaCl 1M Tris-HCl (pH 7,4) formamid - množství závisí na typu sondy; viz Tab. 3 1% SDS destilovaná MQ voda									
postup	do odměrného válce napipetujeme:									
	ALF, BET, GAM, EUB HYBR Pufr	<table border="1"> <tr> <td>NaCl</td> <td>3,6 ml</td> </tr> <tr> <td>Tris-HCl</td> <td>400 µl</td> </tr> <tr> <td>formamid</td> <td>6 ml</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>200 µl</td> </tr> </table>	NaCl	3,6 ml	Tris-HCl	400 µl	formamid	6 ml	SDS	200 µl
NaCl	3,6 ml									
Tris-HCl	400 µl									
formamid	6 ml									
SDS	200 µl									
	doplnit vodou do 20 ml									
	SDS nutno přidávat na konec (riziko vysrážení)									
	celkem 20 ml PUFRU pro ALF, BET, GAM, EUB sondy									
	ARCH, MPB1 HYBR Pufr	<table border="1"> <tr> <td>NaCl</td> <td>3,6 ml</td> </tr> <tr> <td>Tris-HCl</td> <td>400 µl</td> </tr> <tr> <td>formamid</td> <td>4 ml</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>200 µl</td> </tr> </table>	NaCl	3,6 ml	Tris-HCl	400 µl	formamid	4 ml	SDS	200 µl
NaCl	3,6 ml									
Tris-HCl	400 µl									
formamid	4 ml									
SDS	200 µl									
	doplnit vodou do 20 ml									
	SDS nutno přidávat na konec (riziko vysrážení)									
	celkem 20 ml PUFRU pro ARCH, MPB1 sondy									

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

Tab. 2 Příprava pracího pufru (objemové množství 200 ml, konkrétní spotřebu nutno upravit podle počtu vzorků)

chemikálie	<p>5 M NaCl – množství závisí na typu sondy; viz Tab. 3</p> <p>1M Tris-HCl (pH 7,4)</p> <p>0,5 M EDTA (pH 8)</p> <p>1% SDS</p> <p>destilovaná MQ voda</p>																		
postup	<p>do odměrného válce napipetujeme:</p> <table border="1" data-bbox="491 1032 1233 1207"> <tr> <td rowspan="4">ALF, BET, GAM, EUB WASH Pufr</td> <td>NaCl</td> <td>4,08 ml</td> </tr> <tr> <td>Tris-HCl</td> <td>4 ml</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>2 ml</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>2 ml</td> </tr> </table> <p>doplnit vodou do 200 ml</p> <p>SDS nutno přidávat na konec (riziko vysrážení)</p> <p>celkem 200 ml PUFRU pro ALF, BET, GAM, EUB sondy</p> <table border="1" data-bbox="491 1424 1233 1599"> <tr> <td rowspan="4">ARCH, MPB1 WASH Pufr</td> <td>NaCl</td> <td>12,32 ml</td> </tr> <tr> <td>Tris-HCl</td> <td>4 ml</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>2 ml</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>2 ml</td> </tr> </table> <p>doplnit vodou do 200 ml</p> <p>SDS nutno přidávat na konec (riziko vysrážení)</p> <p>celkem 200 ml PUFRU pro ARCH, MPB1 sondy</p>	ALF, BET, GAM, EUB WASH Pufr	NaCl	4,08 ml	Tris-HCl	4 ml	EDTA	2 ml	SDS	2 ml	ARCH, MPB1 WASH Pufr	NaCl	12,32 ml	Tris-HCl	4 ml	EDTA	2 ml	SDS	2 ml
ALF, BET, GAM, EUB WASH Pufr	NaCl		4,08 ml																
	Tris-HCl		4 ml																
	EDTA		2 ml																
	SDS	2 ml																	
ARCH, MPB1 WASH Pufr	NaCl	12,32 ml																	
	Tris-HCl	4 ml																	
	EDTA	2 ml																	
	SDS	2 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

Tab. 3 Koncentrace formamidu a NaCl v závislosti na typu sondy

Probe	Hybridization solution		Wash solution	
	Final	mL formamide	Final	mL 5M NaCl
	Formamide (%)	per 250 mL	NaCl (mM)	per 250 mL
Eub338	30	75	102	5.1
Bet42a	"	"	"	"
Gam42a	"	"	"	"
Alf968	"	"	"	"
HGC69a	20	50	308	15.4
Arch915	"	"	"	"
Euk515	"	"	"	"
CF319a	35	87.5	80	4

POZN: „Who is who?“

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) - chelatující činidlo; je to látka, která narušuje vazby některých iontů. V molekulární biologii se využívá jako součást řady pufrů, ve kterých zajišťuje sekvestraci dvouvalentních iontů, které jsou nezbytné pro funkci DNáz, čímž brání degradaci DNA.

SDS (Sodium-dodecyl-sulphate) - detergent; redukuje nespecifické interkace mezi molekulami. SDS snižuje kontrast pozadí a tím zesiluje sílu fluorescenčního signálu.

formamid - látka, jež destabilizuje nukleové kyseliny. Koncentrace formamidu v hybridizačním pufru závisí na délce sondy a obsahu GC párů, závisí proto na ní efektivita hybridizace. Použití formamidu umožňuje hybridizovat při nižší inkubační teplotě.

Tris – HCl (Tris – hydroxymethylaminomethane) - se používá jako pufrací složka k udržení stabilního pH. Tris – HCl má slabě alkalickou pufrací kapacitu v rozmezí pH 7,2-9.

NaCl (Chlorid sodný) – zajišťuje koncentrací potřebných iontů v roztoku. Pro optimální výsledek hybridizace je nutné zajistit vyšší koncentraci iontů při hybridizaci než při procesu vymývání. Dodržení těchto podmínek zajišťuje efektivnější výsledek, než kdyby koncentrace iontů byla při těchto procesech stejná.



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

Potřebný materiál:

pracovní rukavice
membránové filtry Millipore (0,2 μm ,
GTPP)
50 ml uzavíratelné zkumavky
mikrozkumavky 1,5 ml
skalpel nebo nůžky
filtrační papír
podložní a krycí skla
Petriho misky
pinzeta
odměrný válec
pipeta 1000-5000 μl + špičky
pipeta 2-20 μl + špičky

Chemikálie:

5M NaCl
1M Tris-HCl (pH 7,4)
0,5M EDTA (pH 8)
1% SDS
Citifluor-Vecta Shield
formamid
DAPI
ethanol
deionizovaná MQ voda
oligonukleotidové sondy

Doporučená literatura:

- Beatty B, Mai S, Squire J (2002) FISH – Practical approach. Oxford University Press, Oxford New York.
- Cottrell, MT, Kirchman, DL (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* 48: 168-178.
- Jupraputtasri W, Boonapatcharoen N, Cheevadhanarak S, Chaiprasert P, Tanticharoen M, Techkarnjanaruk S (2005) Use of an alternative Archaea-specific probe for methanogen detection. – *J. Microbiol. Meth.* 61: 95-104.
- Pernthaler J, Glöckner FG, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiol.* 30: 207-225.
- Tijssen P (1993) Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I - Probe Labeling and Hybridization Techniques, Elsevier Science
- <http://www.microbial-ecology.net/probebase/search.asp>