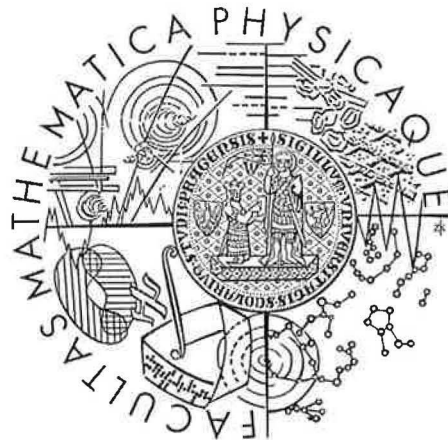


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Andrea Košová

Optimalizace nastavení vnitrobuněčného pH kvasinek elektroporační metodou

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Studijní program: fyzika

2006

Pod'akovanie

Chcela by som pod'akovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce, pánovi Doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc, za ochotu a trpezlivú pomoc pri vedení tejto bakalárskej práce.

Prehlasujem, že som svoju bakalársku prácu napísala samostatne a výhradne s použitím citovaných prameňov. Súhlasím so zapožičaním práce a jej zverejňovaním.

V Prahe dňa 24.07.2006

Andrea Košová

Obsah

1	Teoretická časť	
	a. Kvasinky.....	5
	b. Fluorescencia a fluorescenčné sondy.....	6
	c. Metódy a materiál.....	7
2	Experimentálna časť	
	a. Príprava vzorky a farbenie.....	10
	b. Výsledky merania.....	11
	c. Porovnanie s publikovanými výsledkami.....	17
3	Zhrnutie výsledkov.....	19

Literatúra

Názov práce: Optimalizace nastavení vnitrobuněčného pH kvasinek elektroporační metodou

Autor: Andrea Košová

Katedra (ústav): Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc

e-mail vedoucího: vecer@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: V tejto práci sme študovali nastavenie vnútrobunkového pH kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* pomocou elektroporácie. Na určenie zmien vo vnútri bunky sme používali fluorescenčnú sondu pyranin. Študovaným kmeňom kvasiniek bol AD1-3. Na elektroporačné farbenie sme použili dve metódy – tri milisekundové impulzy a sto impulzov dĺžky dvadsať mikrosekúnd. Prvá metóda mala značne lepšie výsledky. Taktiež sme kalibrovali vnútrobunkové pH v puferoch a testovali sme reakciu na glukózu, ktorá určila, či sú bunky stále živé. Výsledky nášho experimentu som porovnávala s predchádzajúcimi publikovanými experimentmi používajúcimi elektroporáciu s rôznymi parametrami.

Kľúčové slová: vnútrobunkové pH, elektroporácia, fluorescencia, pyranin

Title: Optimisation of adjustment of intracellular pH of yeast with electroporative method

Author: Andrea Košová

Department: Institute of Physics of the Charles University

Supervisor: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Supervisor's e-mail address: vecer@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: This work is concerning the electroporative adjustment of intercellular pH of *Saccharomyces cerevisiae*. We used fluorescent probe called pyranine to identify the changes inside of the cells. The yeast strain studied was AD1-3. We chose two methods for electroporative dyeing – three pulses of one milisecond and hundred pulses of twenty microseconds. The first showed much better results. We also calibrated the intracellular pH in buffers and tested the reaction for glucose which revealed if the dyed cells were still living. I compared the results of our experiment to the other published electroporical experiments, performed by different methods.

Keywords: intercellular pH, electroporation, fluorescence, pyranine

Kapitola 1

Teoretická časť

1.1 Kvasinky

Kvasinky sú jedny z najjednoduchších eukaryotických organizmov, patria do rastlinného systému medzi vyššie huby. Predmetom nášho štúdia bol vybraný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* AD1-3. Základným tvarom tohoto kmeňa je rotačný elipsoid dlhý 3-5 μm a široký 3-4 μm .

Štruktúra bunky kvasiniek

Bunková stena kvasiniek sa skladá z väčšej časti z polysacharidov, ďalej z proteínov, lipidov, fosfolipidov a glukosaminu. Z hľadiska biofyzikálneho výskumu je bunková stena nevýhodou, pretože komplikuje prienik sondy do buniek. Kvôli prítomnosti fosfátov a karboxylových skupín má negatívny náboj. Funkciou bunkovej steny je chrániť ju pred vonkajšími vplyvmi, ďalej udržiava tvar bunky a ovplyvňuje interakciu s inými bunkami.

Ďalším obalom bunky je **cytoplazmatická membrána**, ktorá je na rozdiel od bunkovej steny elastická. Skladá sa z fosfolipidov tvoriacich dvojvrstvu a do nej integrovaných bielkovín. Je semipermeabilná a tvorí osmotickú bariéru medzi bunkou a prostredím.

Protónová pumpa je bielkovina ukotvená v cytoplazmatickej membráne, ktorá je schopná prenášať protóny skrz túto membránu. Takto je schopná vytvárať rozdiel v gradiente pH a elektrického náboja a vybudovať elektrochemický potenciál. Kmeň kvasiniek, ktorý sme študovali, má deletované PDR pumpy, ktoré podľa predchádzajúcich experimentov netransportujú pyranin von z bunky

Cytosól je gélovitá tekutá časť prostredia bunky, v ktorom sú uložené bunkové organely a ostatné časti bunky. Prebieha v ňom časť metabolických procesov. Hodnota pH sa pohybuje medzi 6,2-6,4.

Vakuola je ohraničená membránou, predstavuje zásobáreň vody, bunkových rezerv a iných rôznych organických a anorganických látok. PH vakuoly je 5,5.

Ďalšími dôležitými časťami bunky sú **jadro**, ktoré obsahuje hlavnú časť genetickej informácie bunky, **mitochondrie**, ktoré slúžia predovšetkým na získavanie energie.

Rast a rozmnožovanie

Z experimentálneho hľadiska je dôležitý fakt, že kvasinky sa dajú pestovať *in vitro* a rýchlo sa množia. Bunkový cyklus *Saccharomyces cerevisiae* sa skladá zo štyroch fáz, rast prebieha v siedmich fázach. Z nich je pre nás najdôležitejšia druhá – *log-fáza*, obdobie najväčšieho prírastku bunky. V tejto fáze sú bunky veľmi citlivé na vonkajšie faktory, pretože sú metabolicky aktívne. V nadchádzajúcich fázach dochádzajú bunke živiny, rast sa spomaľuje a neskôr bunky odumierajú.

1.2 Fluorescencia a fluorescenčné sondy

Fluorescencia označuje jav, pri ktorom určitá molekula absorbuje fotóny danej vlnovej dĺžky a následne emituje nízko energetické fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou. Konkrétne je to žiarivý prechod z rovnovážnej vibračnej hladiny niektorého excitovaného singletného stavu S_n do niektorej z vibračných hladín základného stavu S_0 [1]. Vo väčšine prípadov sa jedná o prechod z hladiny S_1 . Doba života fluorescencie je obvykle 0,1 – 100 ns.

Fluorescenčné sondy

Fluorescenčné sondy nám dovoľujú monitorovať nielen stav bunky, ale aj parametre okolia. Je pritom dôležité, aby neovplyvňovali pozorovaný jav – v našom prípade pH, aby dobre absorbovali a jasne a intenzívne fluoreskovali (aby bol signál rozlíšiteľný od pozadia). Každý typ farbiva má odpovedajúci emitovaný

fluorescenčný signál, ktorý nám dáva informácie v podobe excitačných a emisných spektier, kvantového výťažku, polarizácie fluorescenčného žiarenia a doby života fluorescencie.

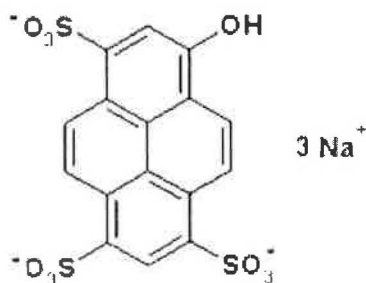
Fluorescenčné sondy sa používajú na rôzne účely – na meranie polarizácie, viskozity, membránového potenciálu, detekciu iontov atď. My sme používali **pyranin**, sondu citlivú na pH, ktorá mení svoje excitačné a emisné spektrum v závislosti na pH prostredia, v ktorom sa nachádza. Pri vhodnom zavedení sondy do bunky (tj. bez narušenia membrány či procesov prebiehajúcich v bunke) sonda mení charakteristickú fluorescenciu bunkovej cytoplazmy v závislosti na koncentrácii protónov a teda následne nám umožní určiť vnútrobunkové pH.

1.3 Metódy a materiál

Pre určenie koncentrácie buniek v suspenzii sa používa **absorbancia OD** (predtým optická hustota), čo je záporný logaritmus pomeru intenzity prechádzajúceho a intenzity dopadajúceho svetla. Čím viac je buniek v suspenzii, tým viac je svetlo ňou prechádzajúce rozptýlené a teda absorbancia je väčšia. Merania boli uskutočnené na spektrofotometre Specol Novaspec II pri vlnovej dĺžke 578 nm.

Pre kalibráciu sme bunky farbili v **puferoch**. Je to roztok, ktorý udržiava konštantnú hodnotu pH. Najsilnejšiu tlmiacu schopnosť má pufer tvorený slabou kyselinou (alebo slabou zásadou) a jej soľou. My sme používali pufer 10mM MES s pH 6,0 a 6,5 a 10 mM HEPES s pH 7,0 a 7,5.

Pyranin je typ fluorescenčnej sondy citlivej na pH. V roztoku sa pyranin disociuje (viď obr. 1). V prostredí s nižším pH sa na skupiny SO_3^- naviažu H^+ a teda sa hovorí o protónovanej forme. Pri vyššom pH sa H^+ naväzujú v menšej miere a jedná sa o neprotónovanú formu. Maximum excitačného spektra protónovej formy je okolo 405 nm, pre neprotónovú formu to je okolo 450 nm. Pri meraní excitačného pomeru $R_{\text{ex}} = I_{405}/I_{440}$ dostaneme informácie o zastúpení oboch foriem pyraninu vo vzorke a o pH v okolí. S klesajúcou hodnotou pH (v oblasti s pH 6-8) rastie hodnota excitačného pomeru R_{ex} .



Obrázok 1: Fluorescenčná sonda pyranin

Bunky sme farbili metódou **elektroporácie**. Na to sa používa pulzný elektroporátor zostavený vo FÚ MFF UK. Elektroporátor sa skladá z pulzného vysokonapäťového zdroja, časovacieho zariadenia a pamäťového osciloskopu. Po obdržaní spínacieho impulzu z časovacieho zariadenia je zdrojom vyslaný vysokonapäťový (VN) impulz so zvolenou časovou šírkou a amplitúdou. Amplitúda pulzu je voliteľná, rovnako ako aj časová šírka. Charakteristiky VN impulzu počas farbenia sú monitorované pomocou osciloskopu. Na farbenie sa používajú špeciálne kyvety s elektródami vo vnútornom vzorkovom priestore, vzdialenosť elektród bola 2 mm.

Na začiatku sa pripraví suspenzia buniek s destilovanou vodou (alebo puferom) a 10mM pyraninom v pomere 1:1 (objem buniek : objem kvapaliny). Táto suspenzia sa vloží do kyvety, na ktorú sa potom privedú VN impulzy. Aby došlo len k minimálnemu poškodeniu bunky používa sa sled krátkych VN pulzov namiesto jedného dlhšieho pulzu, ktorý je obvyčajne používaný pri farbení buniek. Aplikovaním VN impulzu na živé bunky sa zvýši permeabilita membrány vytvorením membránových pórov, ktorými sa farbivo dostane do bunky. Okrem toho tieto póry ešte umožnia vyrovnať pH medzi vnútrom bunky a jej okolím.

Spektrofluorimeter je zariadenie na určovanie fluorescenčných vlastností zložiek vzorky.

V našom experimente sme pri zvolenej emisnej vlnovej dĺžke merali časovú závislosť excitačného pomeru určujúceho zastúpenie protónovanej a neprotónovanej formy farbiva lokalizovaného v bunke.

Zároveň s meraním excitačného pomeru sme sledovali aj intenzitu fluorescencie na emisnej vlnovej dĺžke 540 nm, aby sme zaistili lineárnu odozvu emisie na excitácii.

Použitím excitačného filtrov pri meraní sa dá potlačiť rozptýlené žiarenie z excitačného monochromátoru, použitím emisného filtra pomáha odfiltrovať emisné čiary. My sme použili dva excitačné filtre s $\lambda_{ex1} = 405\text{nm}$ a $\lambda_{ex2} = 440\text{nm}$ a jeden emisný filter s $\lambda_{em} = 540\text{nm}$.

Pri všetkých meraniach sa používala rovnaká spektrálna šírka štrbín excitačného aj emisného monochromátoru 3nm a experimentálne kroky sa snímali každých 10s.

Na pozorovanie ofarbených buniek sme použili invertovaný **fluorescenčný mikroskop** Olympus IX 70 s objektívom pre vodnú imerziu 60/1.4w.

Vzorky boli excitované svetlom xenónovej výbojky prechádzajúcim zvoleným excitačným filtrom – my sme používali filtre BP 450, ktorý prepúšťa excitačné žiarenie s vlnovou dĺžkou 450-490nm a D405/20X, ktorý prepúšťa excitačné žiarenie s vlnovou dĺžkou 390-415nm.

Fluorescenciu ofarbených buniek pozorujeme po priechode emisným filtrom – používali sme filter BA 515, ktorý prepúšťa emisné žiarenie s vlnovou dĺžkou od 500nm.

Dichroitické zrkadlo BS 510 prepúšťa fluorescenciu vzorky a odráža priame aj rozptýlené excitačné žiarenie.

Fluorescenciu bolo možné pozorovať okulárom alebo pomocou programu LuciaG na počítači pripojenom k mikroskopu.

Kapitola 2

Experimentálna časť

2.1 Príprava vzorky a farbenie

Ako už bolo povedané v prvej kapitola, v experimente sme používali kmeň kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* AD1-3. Bunky sme očkovali v laboratóriu vždy v prvý deň poobede o 16:00 sterilnou slučkou z pevného YEPG média do 20mL tekutého YEP média. Ako výživu sme pridali 1mL 40% glukózy. Všetko sa robilo sterilne a bunky sa potom pestovali v trepúcom kúpeli pri teplote 30°C za prísunu kyslíka. Na druhý deň po 16 hodinách sa na spektrofotometre zmeralo OD inokula, ktoré bolo medzi 6-7 a bunky sa znovu sterilne preočkovali do nového média tak, aby výsledné OD = 0,5. Potom po približne 3-4 hodinách kultúra narástla na požadovaných OD \approx 2.

Vtedy sme vzniknutú suspenziu dvakrát odstredili na centrifúge Heraeus MegaFuge 1.0 prístupnej v laboratóriu pri 3000 otáčkach/min počas 4 minút. Premyté a separované bunky sme rovnomerne rozdelili do ependorfiek a v závislosti od objemu buniek sme k nim potom pridali destilovanú vodu alebo pufoery aby vznikla vhodne hustá suspenzia. Ku všetkým týmto vzorkám sme pridali farbivo pyranín v pomere 1:20.

Následne sme bunky metódou elektroporácie opísanej v časti 1.3 ofarbili. Vyskúšali sme dve metódy. Prvú sériu vzoriek sme vystavili trom mikrosekundovým VN impulzom (3x1ms) a pre druhú sériu sme použili 100 dvadsať-mikrosekundových VN impulzov (100x20 μ s). Použité napätie bolo 1000 V a rozmery kyvety 2 mm, čo nám vytvára elektrické pole 500V.mm⁻¹.

Aby sme odstránili zvyšky farbiva z mimobunkového prostredia, ofarbené bunky sme ešte šesťkrát premyli a odstredili na centrifúge - vzorky s destilovanou

vodou sme premývali v destilovanej vode a vzorky s puferami v respektívnych puferoch.

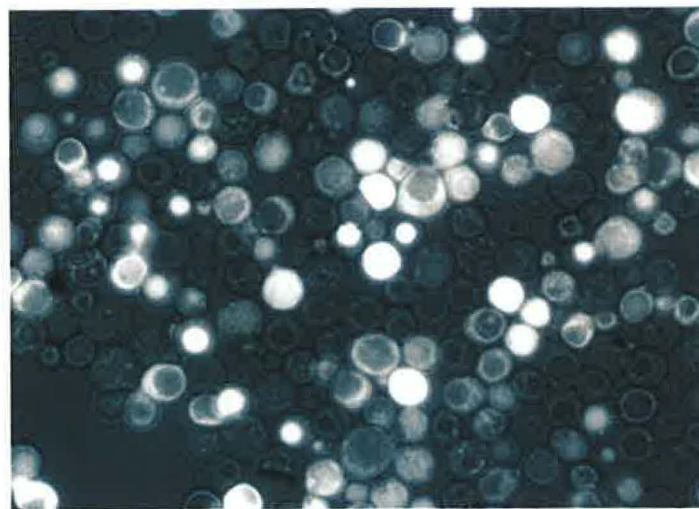
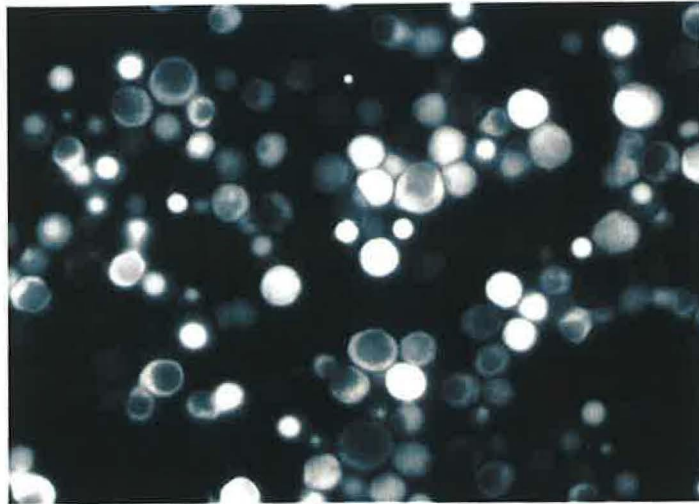
Výsledné sedimentované bunky boli po jemnou zriedení pripravené na pozorovanie a meranie.

2.2 Výsledky merania

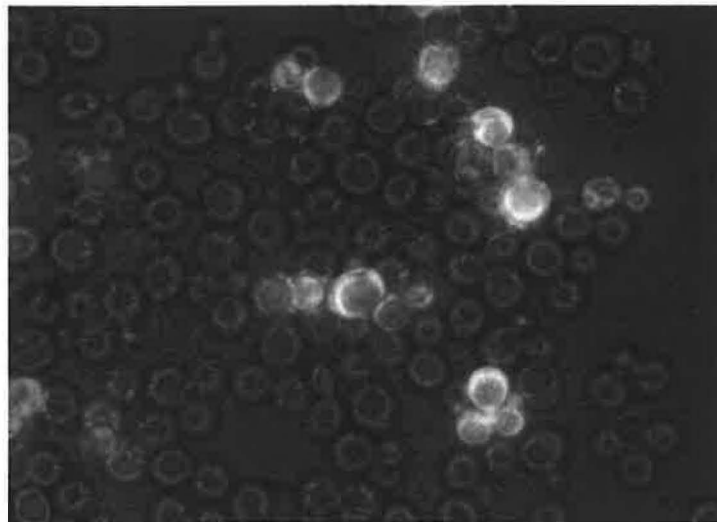
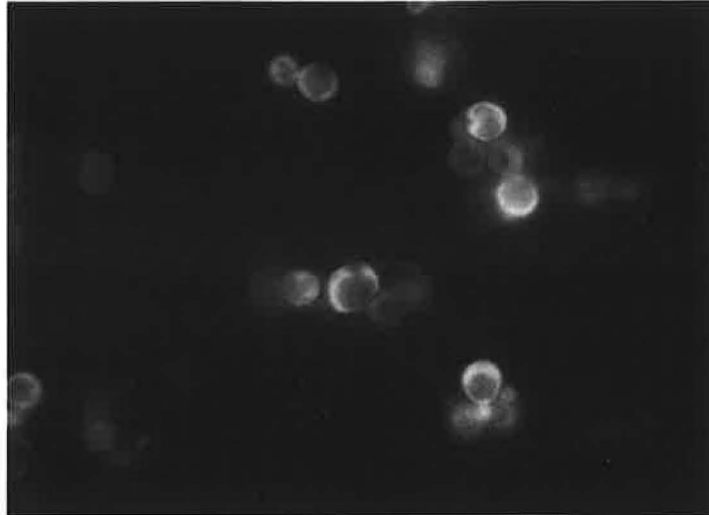
Pozorovanie pod mikroskopom

Pomocou fluorescenčného mikroskopu sme pozorovali stupeň ofarbenia buniek. Zistili sme, že fluorescencia buniek ofarbených pri nastavení 100x20 μ s bola málo intenzívna a ofarbených buniek bolo značne menej ako pri druhom nastavení. Vybranú časť buniek sme najprv excitovali s použitím filtra D405/20X, aby bolo možné pozorovať len fluoreskujúce bunky, a obraz sme zachytili pomocou programu LuciaG. Potom sme tú istú časť vzorku zachytili aj pri prechádzajúcom svetle (bolo vidno všetky bunky) a z výsledných obrázkov bolo teda možné určiť aké množstvo buniek sa ofarbilo.

Pri prvej metóde 3x1ms bolo silne ofarbených približne 60% buniek (vid' obr.2) a pri druhej 100x20 μ s len okolo 15% (vid' obr.3) pri oveľa nižšej intracelulárnej koncentrácii pyraninu.



Obrázok 2: Fluorescencia buniek ofarbených metódou 3x1ms



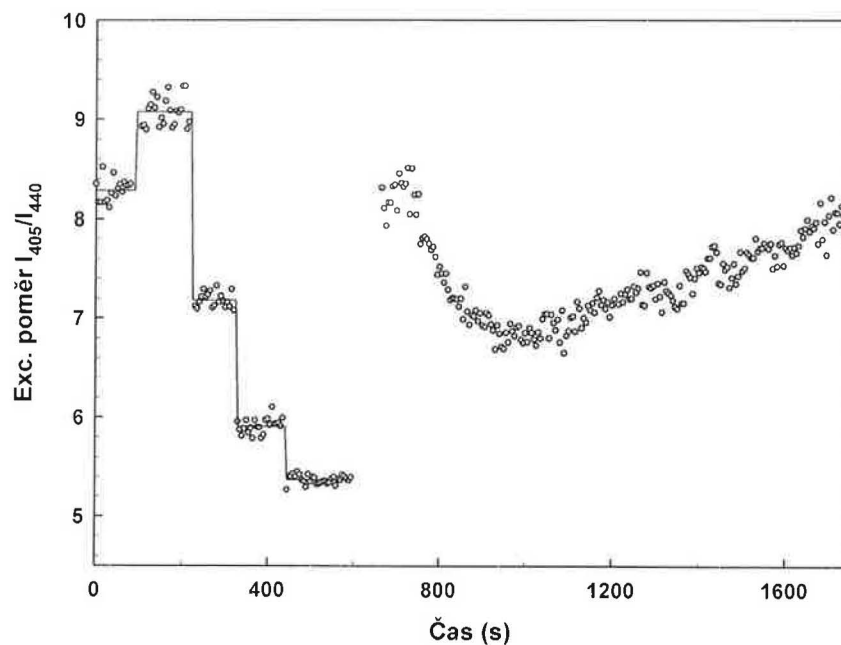
Obrázok 3: Fluorescencia buniek ofarbených metódou $100 \times 20 \mu\text{s}$

Na obrázkoch sa dajú taktiež rozoznať bunky, u ktorých je ofarbená aj vakuola. Tá fluoreskuje intenzívnejšie než ofarbený cytosól, čo je spôsobené kyslejším prostredím vo vakuole.

Meranie na spektrofluorimetre

Pre optimálnu hodnotu fluorescencie sme vzorky rozriedili v destilovanej vode alebo puferoch tak, aby výsledné OD bolo 0,2.

Vnútrobnkové pH kvasiniek sme ofarbením v puferoch a elektroporáciou nastavili na rôzne dané hodnoty pH. Pri samotnom meraní na spektorfluorimetre sme do držiaku na vzorku vložili najprv kyvetu s bunkami ofarbenými v destilovanej vode a nechali sme zmerať niekoľko experimentálnych bodov excitačného pomeru. Potom sme kyvetu vybrali a vložili postupne ďalšie vzorky s vnútrobnkovým pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5. Pre každú vzorku s rôznym pH sme znovu nechali zmerať niekoľko experimentálnych bodov, aby sme fluorescenčnú odozvu pyraninu mohli okalibrovať. Meranie je znázornené v grafe 1.



Graf 1: Meranie časovej závislosti excitačného pomeru fluorescencie.

V druhej časti grafu je znázornená reakcia buniek na pridanie glukózy, ktorou sa budeme zaoberať neskôr.

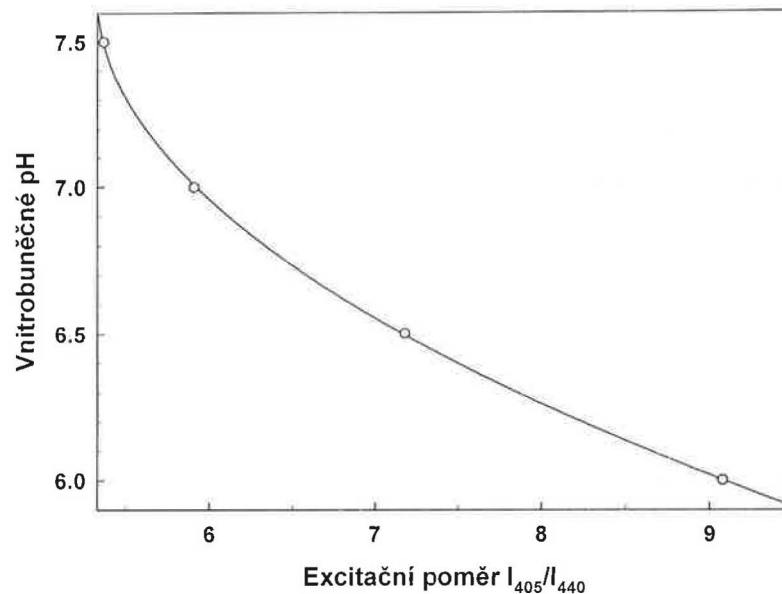
Závislosť excitačného pomeru na vnútrobnkovom pH sme potom preložili kvadratickou krivkou a získali sme vzťah

$$R_{ex} = 85,165 - 20,84 * pH + 1,36 * (pH)^2$$

Z tohoto vzťahu potom môžeme získať závislosť pH na excitačnom pomere :

$$pH = 7,66 - \sqrt{\frac{R_{ex} - 5,33}{1,36}}$$

Kalibrácia vnútrobunkového pH je znázornená v grafe 2.



Graf 2 – Kalibrácia vnútrobunkového pH kvasiniek

Životaschopnosť buniek. Reakcia na glukózu

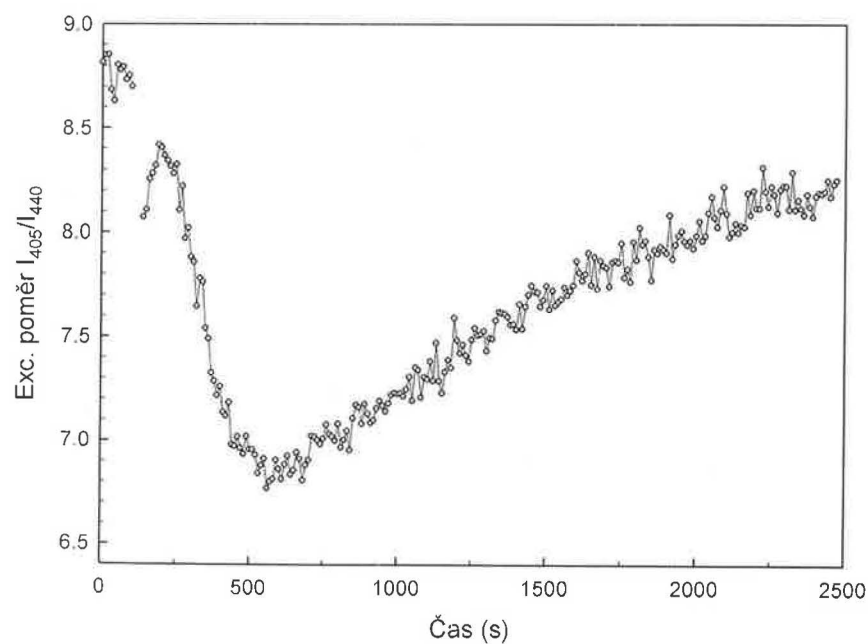
Meraním na spektrofluorimetri sa dá testovať reakciu buniek na glukózu a určiť tak ich životaschopnosť. Po pridaní glukózy k živým bunkám nastáva pri spotrebe energie veľmi rýchla zmena vnútrobunkového pH. Najprv dochádza ku alkalizácii cytosólu a teda k nárastu pH. Po dosiahnutí maximálnej hodnoty nastáva pomalé okyselenie až ku pôvodnej hodnote pH pred pridaním glukózy [1] [5] [6]. Na meranie sme použili vzorku z buniek farbených v destilovanej vode (4mL), ktorá mala počiatočné pH okolo 6,2. K tejto suspenzii sme pridali 100 μ L 40% glukózy. Z grafov 3 a 4 vidíme, že bunky reagujú na pridanú glukózu spôsobom popísaným v literatúre a sú teda živé. Maximálna zmena hodnoty pH je asi 0,5. Inou metódou, ktorá sa používa na sledovanie pomeru živých a mŕtvych buniek v suspenzii, je

pridanie propidium iodidu a pozorovanie ofarbených buniek pod mikroskopom [2]. Dôjde k ofarbeniu len mŕtvych buniek, ktoré vykazujú červenú fluorescenciu. Ako ukazujú výsevové testy, neofarbené bunky sú živé, ale nemusia vždy nutne reagovať na pridanie glukózy

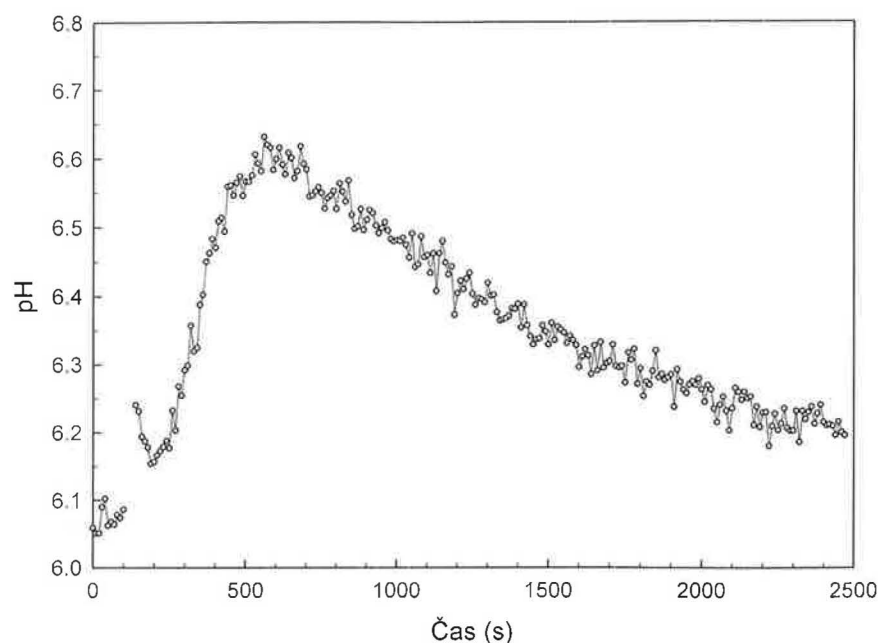
Testy na glukózu sa vykonávali aj v iných experimentoch. V práci [1] sa testovalo potravinárske droždie a kmeň IL. V prvom prípade došlo k nárastu pH o 0,4 jednotiek a test mal približne rovnaký priebeh ako v našom prípade. V druhom prípade prebiehal test na nekalibrovaných bunkách. Odhadnutá hodnota alkalizácie bola 0,1 pH jednotky.

V [5] boli bunky farbené pomocou esterických foriem farbív a k nim bolo pridané 5 krát menšie množstvo glukózy. V tomto prípade došlo k alkalizácii o 0,5 pH jednotiek, čo je rovnaký výsledok ako v našom prípade.

V [7] bol výsledkom testu na glukózu u buniek farbených pomocou elektroporácie nárast hodnoty pH o 0,1 jednotky.



Graf 3: Reakcia buniek na glukózu. Časová závislosť excitačného pomeru. Glukóza bola pridaná v čase $t=100$ s.



Graf 4: Reakcia buniek na glukózu. Časová závislosť vnútrobunkového pH je určená z grafu 3 pomocou spočítanej kalibračnej funkcie. Glukóza bola pridaná v čase $t=100s$.

2.3 Porovnanie s publikovanými výsledkami

V súčasnej dobe sa na farbenie buniek a následné meranie vnútrobunkového pH používajú dve metódy. Prvou je elektroporácia, opísaná v 1.3, ktorá bola použitá v rade experimentov ([1][2][3][4]) a ktorú sme použili aj my. Druhá metóda používa na farbenie buniek esterické formy farbiva ([5] [6]), čo ale môže mať za následok vyššiu akumuláciu farbiva v bunkových kompartmentoch, pretože bunky obvykle obsahujú nižšie koncentrácie esteráz v cytosóle. Metóda elektroporácie je výhodná a preferovaná z viacerých dôvodov: farbivo z buniek nevyteká, fyziológia buniek nie je ovplyvnená do veľkej miery, po farbení sa pyranin nachádza v cytoplazme a teda nám umožňuje merať vnútrobunkové pH, túto metódu možno použiť aj pre iné druhy kvasiniek a mikroorganizmov a tiež pre vkladanie iných látok do buniek.

Peňa v práci [4] na farbenie buniek tiež používal pyranin. Vybraným kmeňom kvasiniek boli komerčne dostupné kmene. Pri elektroporácii aplikoval len jeden VN impulz počas 3,1-3,5ms. Napätie bolo nastavené na 1500 V, vzdialenosť elektród

4mm, kapacitancia pulzu $25\mu\text{F}$ a rezistencia 200Ω . pH sa zisťovalo zo zmien intenzity fluorescencie na jednej emisnej vlnovej dĺžke. Namerané hodnoty pH v tomto experiment boli vyššie než v predchádzajúcich publikáciách, čo bolo spôsobené chybnou kalibráciou. Bol zmeraný aj vplyv pridania glukózy na vnútrobunkovom pH.

V práci [3] sa pri elektroporácii aplikovalo 100 krátkych ($10\mu\text{s}$) VN impulzov z napätím 1500 V, použitá kyveta mala elektródy vzdialené 2mm. Farbili sa bunky z kmeňa IL 125 – 2B pomocou pyraninu v destilovanej vode a v puferoch. Výsledkom bolo 70-90% ofarbených buniek, ktoré sa potom sledovali na spektrofluorimetri a pod mikroskopom. Na kalibráciu pH použili dve metódy – pre každú vzorku s iným pH sa najprv vytvoril histogram závisiaci na hodnote excitačného pomeru vytvorený pre individuálne bunky, potom sa študoval histogram vytvorení pomocou frekvencie pixelov na obrázku zachytenom v mikroskope. Výsledné kalibračné krivky, vytvorené z maximálnych histogramov mali rovnakú charakteristiku. Na testovanie životaschopnosti buniek sa použil propidium iodid.

V Tabuľke 1 sú zhrnuté publikované a nami použité parametre elektroporácie, ktoré umožnili efektívne farbenie kvasiniek.

Kmeň kvasiniek	Časové charakteristiky VN pulzů	Elektrické pole [V/mm]	Referencie
komerčný kmeň	1 x 3,1-3,5ms	375	[4],[7]
AD1-3	3 x 1ms	500	naše meranie
IL	100 x 20-50 μs	625	[8]
IL 125 – 2B	100 x 10 μs	750	[3]

Z Tabuľky 1 je zrejmé, že pre danú časovú šírku VN pulzov existuje optimálna veľkosť elektrického poľa, pri ktorej dochádza k efektívnemu farbeniu buniek. Veľkosť optimálneho elektrického pole s rastoucou časovou šírkou VN pulzů klesá. Zvolíme-li pro danou časovou šírkou VN pulzů hodnotu elektrického pole nižší než je veľkosť optimálna, buňky se přestávají barvit (viz obr.3), naopak pro vyšší hodnotu pole dochází k jejich zabíjení (naše nepublikované výsledky nebo např. [4]).

Kapitola 3

Zhrnutie výsledkov

1. Pomocou elektroporácie boli ofarbené bunky *Saccharomyces cerevisiae* fluorescenčnou sondou pyranin. Pri aplikácii VN impulzov s napätím 1000 V pri vzdialenosti elektród 2 mm sa ako efektívna ukázala metóda využívajúca pulzy s časovou šírkou 1 ms.
2. Fluorescenčná odozva pyraninu z buniek bola okalibrovaná pomocou elektroporačného farbenia suspenzie kvasiniek v puferoch s definovaným pH. Zistila sa tak závislosť medzi excitačným pomerom fluorescenčnej sondy a pH vnútri bunky.
3. Životaschopnosť ofarbených buniek bola dokázaná nameraním publikovanej reakcie kvasiniek na prídanie glukózy.
4. Naše výsledky sme porovnali s už publikovanými výsledkami. Z tohoto porovnania sme našli závislosť medzi šírkou a amplitúdou VN elektroporačných pulzov vedúcich k optimálnemu farbeniu kvasiniek.

Literatúra

- [1] Drápalová, H.: Studium vlivu stresových faktorů na intracelulární pH kvasinek pomocí fluorescenčních sond, FÚ UK.
- [2] Večeř, J., Holoubek, A., Heřman, P.: Manipulation of intracellular pH by electroporation: an alternative method for fast calibration of pH in living cells, *Analytical biochemistry*, 329(2004): 348-350.
- [3] Heřman, P., Drápalová, H., Mužíková, R., Večeř, J.: Electroporative adjustment of Ph in living yeast cells: ratiometric fluorescence pH imaging, *Journal of Fluorescence*, Vol. 15, No. 5, September 2005.
- [4] Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., Calahorra, M.: Proton pumping and internal pH of yeast cells, measured with Pyranine introduced by electroporation, *Journal of Bacteriology*, 177(4): 1017-1022.
- [5] Haworth, R. S., Lemire, B. D., Crandall, D., Cragoe Jr., E. J., Fliegel, L.: Characterisation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1098 (1991) 79-89.
- [6] Haworth, R. S., Fliegel, L.: Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe* – comparison with *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biochemistry* 124: 131-140, 1993.
- [7] Calahorra, M., Martínez, G. A., Hernández-Cruz, A., Peña, A.: Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH, *Yeast* Vol. 14: 501-515 (1998).
- [8] Mužíková, R.: Mikroskopická měření vnitrobuněčného pH kvasinek, FÚ UK.