

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE VE VÝZKUMU KVASINEK *Saccharomyces cerevisiae* A JEJÍ APLIKACE V PRAXI

JAN NOVÁK, GABRIELA BASAŘOVÁ,
JAROMÍR FIALA a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6
jaromir.fiala@vscht.cz

Došlo 22.6.07, přijato 27.9.07.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, *Saccharomyces cerevisiae*, třídění buněk, počet buněk, granularita, fluorescence, viabilita, buněčný cyklus, apoptóza

Obsah

1. Úvod
2. Průtoková cytometrie
 - 2.1. Analýza částic
 - 2.2. Použití průtokové cytometrie v biotechnologiích
 - 2.2.1. Hodnocené parametry
 - 2.2.2. Aplikace fluorescenčních barviv při sledování stavu kvasinek
3. Závěr

1. Úvod

Většina aplikací průtokové cytometrie se zaměřuje na výzkum lidských, živočišných a rostlinných buněk. V posledním desetiletí se průtoková cytometrie těší stále většímu zájmu mikrobiologů, kde je aplikována zejména ve výzkumu kvasinek coby stále významnějšího modelu vyšších eukaryot. V biotechnologických procesech, které jsou založeny na kvasinkách jako biologickém činiteli, vzniká potřeba proces optimalizovat z několika hledisek, mezi které patří stav populace kvasinek. Průtoková cytometrie se nabízí jako analytický nástroj zjišťování stavu kvasinek, neboť je schopna ve spojení s vhodným fluorescenčním barvením ve velice krátkém časovém úseku velice přesně vyhodnotit změny v populaci kvasinek.

2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie patří mezi metody luminiscenční analýzy. Je to fluorescenčně optická metoda, při níž je vzorek unášen proudem nosné kapaliny. Každý průtokový cytometr sestává z několika základních součástí, a to excitačního zdroje, měřicí optické cely, „forward scatter“ detektoru, „side scatter“ detektoru, systému zrcadel, optic-

kých filtrů a několika fluorescenčních detektorů seřazených podle vzrůstající vlnové délky emitované fluorescence (obr. 1). Některé cytometry jsou vybaveny tzv. třídíči (sortery), což jsou přídavná zařízení, fungující na několika odlišných principech, schopná třídít procházející částice na základě zvolených charakteristik.

Excitačním zdrojem bývá buď laser dané vlnové délky (nejčastěji argonový s vlnovou délkou 488 nm) nebo rtuťová výbojka. Vysokotlaké rtuťové výbojky emitují světlo různých vlnových délek a různé energie. U průtokových cytometrů se k excitaci používá hlavně čárové spektrum rtuťových výbojek od 365 po 546 nm. Výstupní výkon vysokotlakých rtuťových výbojek je 50 W, 100 W nebo 200 W. Tyto typy se od sebe liší velikostí a jasem¹.

2.1. Analýza částic

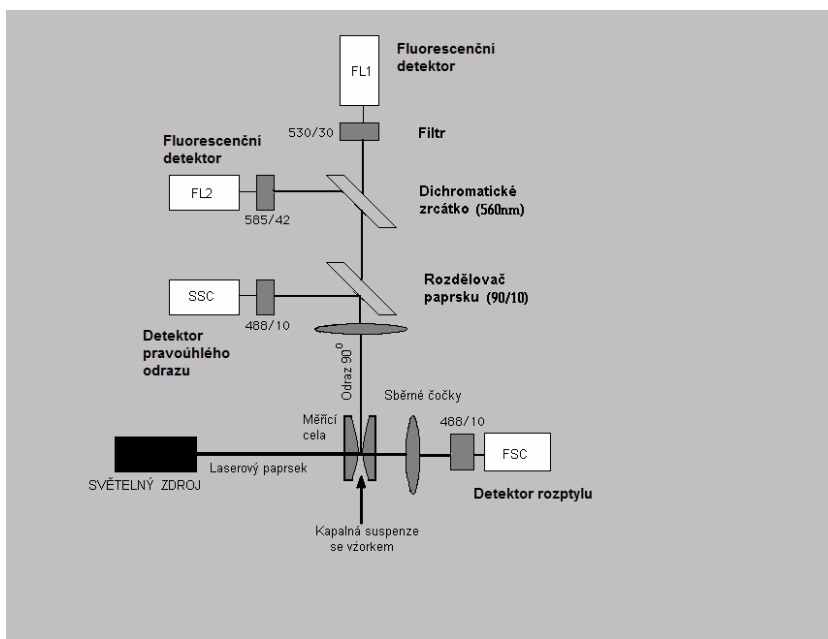
V měřicí cele ze speciálního optického plastu dojde ke střetu světla z excitačního zdroje a buňkami procházejícími jednotlivě kapilárou. Světlo se pak rozptýlí, odrazí nebo při určité vlnové délce vyvolá fluorescenci, jenž se šíří všemi směry od svého zdroje. Úhel rozptylu světla ve směru toku paprsku deteguje tzv. „forward scatter detektor“, jehož odezva je určujícím parametrem velikosti buněk. Světlo rozptýlené pod úhlem 90° vzhledem ke směru toku excitačního paprsku je detegováno tzv. „side scatter detektorem“, jehož signál odpovídá granularitě buněk. Světlo excitačního zdroje je v souladu se známou poučkou vždy nižší vlnové délky než je vlnová délka vyvolané fluorescence, která je detegována několika fluorescenčními detektory (obr. 2)^{1–3}.

2.2. Použití průtokové cytometrie v biotechnologických výrobcích

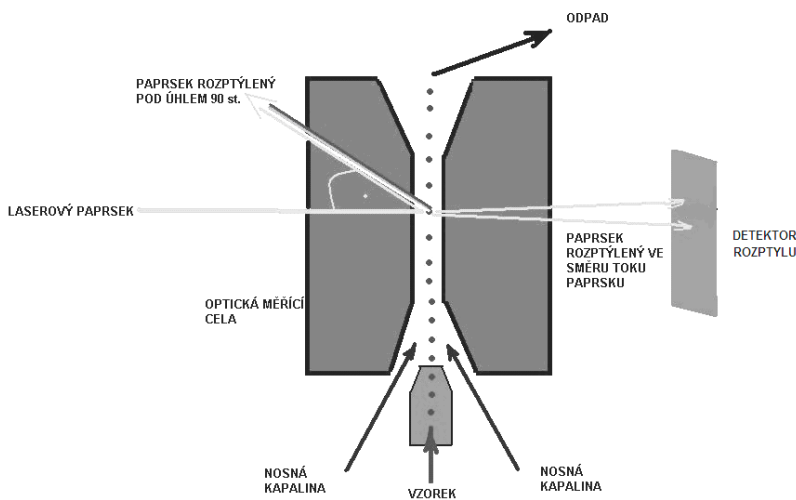
Metodou průtokové cytometrie lze získat informace o rozložení velikosti, granularity buněk v populaci, o intracelulárních komponentech kvasinek (bílkoviny, nukleové kyseliny, steroly), dále lze sledovat změny v rychlosti růstu, určit počet mrtvých a živých buněk v populaci, hodnotit mutace, sledovat buněčný cyklus, měřit velikost, počet buněk, intracelulární pH či dokonce buňky třídít podle zadaných charakteristik. Vzhledem k tomu se v průtokové cytometrii mluví o multidimensionální analýze. Výhodou metody je, že lze získat informace o velkém souboru buněk v relativně krátkém čase^{1,4,5}.

2.2.1. Hodnocené parametry

Výsledky jsou zobrazovány ve formě histogramů a obtisků (dot plot diagramy). Histogram obsahuje distribuci hodnot sledovaného parametru a skládá se z volitelného počtu kanálů. Dot plot diagram představuje rozložení odpovídajících bodů dvou zvolených parametrů



Obr. 1. Základní schéma uspořádání typického průtokového cytometru



Obr. 2. Detail analýzy buněk v měřicí cele průtokového cytometru

v dvourozměrném prostoru^{1,6}.

Běžně dostupné průtokové cytometry jsou schopny zachytit 6 až 12 parametrů proměřované částice. Jde zejména o tyto parametry:

- relativní distribuce velikosti částic ve formě histogramu – měřena dopředným rozptylem světla (FSC – „forward scatter“)
- relativní distribuce granularity částic ve formě histogramu – měřena bočním rozptylem světla (SSC –

„side scatter“)

- relativní distribuce fluorescence různých vlnových délek FL₁FL_n

Velikost, granularita a koncentrace buněk

Zatímco velikost buněk je poměrně známý a dobře představitelný parametr, granularita odpovídá jak rozptylu laserového paprsku způsobeném povrchovými vlastnostmi buňky, tak rozptylu paprsku způsobeným odrazem od vnit-

robuněčných struktur. Většina cytometrů je vybavena funkcí „true volume counting“, která je schopna určit koncentraci buněk přímo v daném roztoku. Např. při zkoumání morfologie a fyziologického stavu pivovarských kvasinek bylo zjištěno, že buňky s nízkou aktivitou a buňky mrtvé jsou v odpovídající fázi vývoje podstatně menší než buňky vitální^{7,8}. Pivovarské kvasnice podléhají změnám velikosti během procesu kvašení, které jsou typické pro každý kmen⁹. Variabilita velikosti během kvašení u kvasinek svrchního kvašení se pohybuje od 2,5 μm do 17,5 μm , u kvasinek spodního kvašení od 2,5 μm do 22,0 μm . Na počátku kvašení je pozorován pokles plochy aktivního povrchu buněk, který souvisí s velkým počtem pučících kvasinek v tomto období^{9,10}. Pro optimální průběh kultivace je důležitá také velikost nově vzniklých dceřinných buněk. Mateřské buňky s velkými dceřinnými buňkami, vznikající v exponenciální fázi růstu populace, jsou žádoucí, neboť velké buňky jsou schopné zahajovat buněčný cyklus téměř okamžitě a to následně zkracuje dobu kultivace^{11,12}.

Jedním z velmi často hodnocených parametrů je přesná koncentrace buněk v objemové jednotce média. Tento parametr se pomocí průtokové cytometrie zjišťuje velmi dobře. Základní podmínkou však je, že nejde o vláknité mikroorganismy a nebo takové, které tvoří shluky, jelikož ty přístroj vyhodnocuje jako jednu částici. Většina průtokových cytometrů je dnes opatřena automatickým počítačím zařízením částic^{1,13}.

Třídění (sorting) buněk

Pomocí průtokového cytometru lze třídít jednotlivé buňky na principu fyzikální separace. Buňky lze dělit podle jedné nebo více charakteristik. Při třídění dochází k přeměně tekutého proudu kapaliny unášející vzorek na aerosol, jehož kapénky obsahují jednotlivé buňky. Po ozáření kapének laserem dochází k lomu na kapénkách a řídicí systém rozhodne o druhu částice a provede následnou separaci buněk. Třídíče částic se využívá při separaci apoptických buněk, ve výzkumu rakovinných buněk, při přípravě synchronizovaných buněčných linií a v poslední době na subcelulární úrovni pro třídění intracelulárních kompartmentů a chromosomů¹⁴.

2.2.2. Aplikace fluorescenčních barviv při sledování stavu kvasinek

Fluorescenční barviva čili fluorofory jsou chemická agens organické povahy, jejichž molekuly jsou excitovatelné a při přechodu do původního stavu emitují fluorescenční světlo. Fluorescenční barviva se dělí do dvou obecných tříd:

- vlastní – jsou součástí biologického materiálu vlastního vzorku,
- nevlastní – jsou přidány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti.

V průtokové cytometrii se téměř výhradně využívají barviva nevlastní, která lze podle povahy vazby na biologickou matici rozdělit na fluorescenční sondy a fluo-

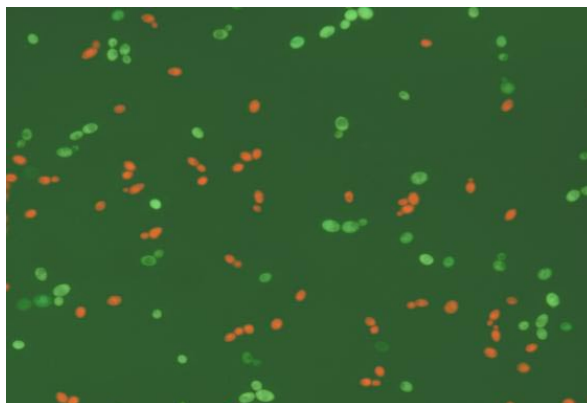
rescenční značky. Pokud se molekula barviva váže na biologickou matici kovalentně, nazývá se fluorescenční značka, pokud se váže nekovalentně, jde o fluorescenční sondu.

Při výzkumu kvasinek se využívají jak fluorescenční značky, tak fluorescenční sondy. Stav kvasinek je obvykle posuzován z hlediska jejich viability a vitality. Viabilita označuje procento buněk v populaci, které jsou živé a schopné dalšího rozmnožování, vitalita odráží fyziologický stav kvasinek.

Počet životaschopných buněk v populaci

Životaschopnost (viabilita) je klíčovým analytickým parametrem buněčné populace ve všech oblastech biotechnologického průmyslu, lze jmenovat kvasné výroby (pivovarství, lihovarství), potravinářský průmysl (droždářství, mlékářství), zpracování odpadů (výroba krmné biomasy), speciální biotechnologie (výroba léčiv, tkáňové kultury), atd. Nejspolehlivější metodou pro její určení jsou kultivační techniky, které jsou však v praxi téměř nepoužitelné, protože časový úsek mezi odebráním vzorku a zjištěným údajem je příliš velký. Z fluorescenčních barviv používaných k určení viability buněk průtokovou cytometrií lze jmenovat: propidiumjodid (3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylamoni)propyl]-6-fenylfenanthridin-5-ium-dijodid fluorescein-diacetát), FDA (fluorescein-diacetát), BCECF (5(6)-karboxy-2',7'-bis(3-karboxypropyl)fluorescein), Hoechst 34580 (*N,N*-dimethyl-4-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazol-2'-yl]anilin) a další desítky komerčně běžně dostupných barviv^{15,16}.

Při kontrole viability kvasinek se většinou využívá kombinace dvou barviv např. propidium jodidu, který proniká buněčnou stěnou mrtvých či poškozených kvasinek a kovalentně se váže na DNA a fluorescein diacetátu, který proniká do všech buněk, ale pouze živými s vyšší esterázovou aktivitou je aktivován na fluorescenční fluorescein. Mrtvé buňky pak emitují fluorescenci v červené oblasti spektra, zatímco živé v zelené oblasti (obr. 3). Dnešní průtokové cytometry jsou navíc vybaveny funkcí, která umož-



Obr. 3. Rozlišení mrtvých a živých buněk na základě fluorescenčního barvení; zvětšení 10 × 40

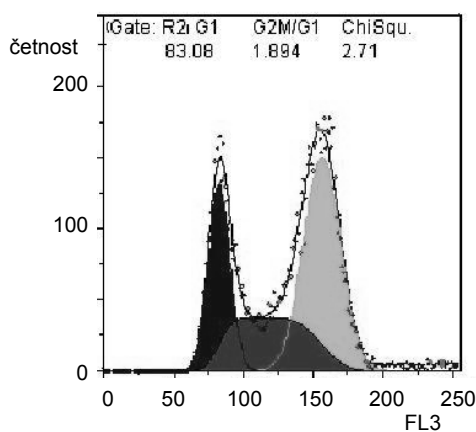
ňuje odlišit buňky živé, mrtvé a subletálně poškozené^{17–19}. Sledování buněčného cyklu

Buněčný cyklus je stále častěji sledovaným parametrem nejen v cytologii živočišných a rostlinných buněk, ale také při zkoumání proliferace kvasinek a některých plísní. Metody průtokové cytometrie pro stanovení jednotlivých fází buněčného cyklu vychází z poznatku, že DNA v buňkách lze (po enzymatickým odstranění RNA) barvit kvantitativně fluorescenčními barvivy. Intenzita fluorescence poté odpovídá obsahu DNA v buňce. Pro stanovení koncentrace DNA se nejčastěji používají fluorescenční značky jako propidium-jodid (3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-fenylfenanthridin-5-ium-dijodid fluorescein-diacetát), akridinová oranž (*N,N,N',N'*-tetramethylakridin-3,6-diamin-hydrochlorid), DAPI (2-(4-karbamimidoylfenyl)indol-6-karboximidamid-dihydrochlorid), Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyfenyl)-*N,N*-dimethyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazol) atd. (tab. I) (cit.^{20–23}).

Za předpokladu, že mezi intenzitou emitované fluorescence a obsahem DNA v buňkách platí přímá úměra, se buňky s dvojnásobnou intenzitou emitované fluorescence vyhodnocují jako buňky v G₂ a M-fázi buněčného cyklu (obr. 4). Bylo např. zjištěno, že při nasazování pivovarských kvasnic k hlavnímu kvašení je výhodné zakvašovat kulturou, ve které je podíl buněk v G₂ a M-fázi maximální. Po nasazení takových kvasnic do provzdušněné mladiny se buňky rychle rozmnoží a přejdou do produkční fáze (G₁-fáze), kdy má populace nízkou aktivitu množení, ale vysokou metabolickou aktivitu projevující se rychlým úbytkem extraktu, tvorbou ethanolu, což se projeví rychlejší dobou kvašení^{11, 24}.

Enzymové aktivity, intracelulární pH

Určení enzymových aktivit pomocí fluorescenčních sond je spíše orientační a určuje, která buňka má vyšší tu



Obr. 4. Automatické vyhodnocení poměru buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu na průtokovém cytometru Partec PAS III; FL3 – relativní intenzita fluorescence zachycená detektorem FL3

kteřou enzymovou aktivitu v porovnání s jinou buňkou. Velmi dobře je popsáno určení esterasové aktivity buněk s použitím fluorescenčních sond v neaktivní (acetoxymethyl estery a nebo diacetáty) formě, která snadno proniká do buňky. Vnitrobuněčné esterasy štěpí molekulu barviva na aktivní fluoreskující barvivo a molekulový zbytek (aceton), vlastní neaktivní molekula barviva je tedy substrátem v enzymové reakci. Vzniklá fluorescence je podle některých prací přímo úměrná dané enzymové aktivitě. Z barviv lze jmenovat FDA fluorescein diacetát a CFDA 5,6-dikarboxyfluorescein-diacetát^{3,25,26}.

Určení vnitrobuněčného pH je založeno na vlastnosti některých barviv měnit intenzitu fluorescence v závislosti na pH. Na základě kalibrace *in vivo* nebo *in vitro* lze těmito sondami poměrně přesně určit intracelulární pH buněk. U kvasinek je např. intracelulární pH ukazatelem jejich vitality²⁷. Jednou z klíčových prací v oblasti je práce Slavíka²⁸.

Z běžně používaných barviv lze jmenovat fluorescein-diacetáty, BCECF, SNARF 1 atd.²⁹

Koncentrace fyziologicky významných látek

Z fyziologicky významných látek kvasinek lze pomocí průtokové cytometrie sledovat koncentraci glykogenu (acriflavine)³⁰, trehalosy (FITC-concavalline A)³¹, proteinů (FITC fluoresceinisothiokianát), neutrálních lipidů (nilská červeň) a sterolů (nystatin)³².

Sledování apoptózy

Apoptóza je vysoce regulovaná forma programované buněčné smrti. Apoptický proces umožňuje rychlé odstranění nepotřebných, poškozených, nebo infikovaných buněk. Jádro apoptických buněk je menší než u normálních buněk, což je možno zachytit pomocí řady barviv (např. řady Hoechst). Další možností, jak sledovat apoptózu, je pozorování zvýšené permeability membrán s použitím barviva YO-PRO1. Fluorescenčně lze dále apoptózu testovat např. s použitím konjugátů annexinu V, a to měřením aktivity specifických proteas. U pivovarských kvasinek se nepotvrdil významnější význam podíl apoptických buněk v populaci, což je připisováno stabilitě polyploidních kmenů^{33,34}.

3. Závěr

Průtoková cytometrie je mikrobiology stále oblíbenější a častěji využívaná metoda, jejímž jediným limitujícím faktorem pro praktické použití v biotechnologických výrobcích je její cena. Ve spojení s vhodným fluorescenčním barvením je schopna velice dobře popsat okamžitý stav populace stejně jako přesně zachytit jakékoli její změny. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se zdá být vhodným modelovým organismem vyšších eukaryot a je vhodným objektem pro metody průtokové cytometrie.

Autoři děkují za finanční podporu získanou v rámci výzkumného záměru MSM 6046137305 a výzkumného centra IM 0570.

LITERATURA

- Shapiro H.: *Practical Flow Cytometry*, 4. vyd. Wiley, New York 2003.
- Walker M. G.: *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley, Dundee 2000.
- Novák J., Basařová G., Fiala J.: *Kvasný Prum.* 49, 260 (2003).
- Squires E. L.: *Anim. Reprod. Sci.* 89, 187 (2005).
- Rieseberg M., Kasper C., Reardon K. F., Scheper T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 350 (2001).
- Partec PAS III, Instrumentations and Optics*. Germany, Catalogue 2001–2002.
- Hashida M., Sakai K., Kogame M.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 25, 353 (1995).
- Achilles J., Mueller S., Bley T., Babel W.: *Cytometry Part A* 61, 88 (2004).
- Novák J., Basařová G., Fiala J., Teixeira J. A., Vicente A. A.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 30, 43/1 (2005).
- Hutter K.-J.: *Brauwelt* 140, 1634 (2000).
- Novák J., Basařová G., Fiala J.: *Kvasný prům.* 50, 214 (2004).
- Thomas K. C., Ingledew W. M.: *J. Ind. Microbiol.* 10, 61 (1992).
- Fiala J., Lloyd D. R., Rychtera M., Kent C. A., Al-Rubeai M.: *Biotechnol. Tech.* 13, 787 (1999).
- Kovářová J.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2003.
- Van Zandycke, Sylvie M., Olivier S., Gualdoni S., Smart K. A.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2003, 15.
- Ki-Bong, Matsuoka H.: *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 47.
- Hutter K. J.: *Brauwelt* 1992, 252.
- Simal O., Gualdoni S., Smart K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 15 (2003).
- Heggart H., Margaritis A., Stewart, R. J., Pilkington H., Sobczak J., Russell I.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 37, 409 (2000).
- Krishan A.: *J. Cell Biol.* 66, 188 (1975).
- Puite K. J., Broeke W. R. R.: *Plant Sci. Lett.* 32, 79 (1983).
- Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K.: *J. Histochem. Cytochem.* 45, 49 (1997).
- <http://probes.invitrogen.com/>, staženo 20.5.2007.
- Hutter K. J., Lange C.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 28, 38/1 (2001).
- Leszczynska M., Oleszkiewicz J. A.: *Env. Technol.* 17, 79 (1996).
- Dive C., Cox H., Watson J. V., Workman P.: *Mol. Cell. Probes* 2, 131 (1988).
- Imai T., Back W., Yasuda Y., Arimura H., Hori T., Abe M., Takeuchi T.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 28, 39/1 (2001).
- Cimprich P., Slavik J.: *Folia Microbiol.* 41, 84 (1996).
- Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1515 (2005).
- Hutter K. J., Remor M., Muller S.: *Monatsschr. Brauwiss.* 53, 68 (2000).
- Hutter K. J., Kliem C., Nitzsche F., Wiessler M.: *Monatsschr. Brauwiss.* 56, 121 (2003).
- Fiala J.: *Disertační práce*. VŠCHT, Praha 2003.
- Neumajer T.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2002.
- Mamdooh G.: *Anticancer Res.* 24, 1455 (2004).

J. Novák, G. Basařová, J. Fiala, and P. Dostálek
(*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Application of Flow Cytometry of Yeast in Research and Practice**

Flow cytometry as a rapid technique can be used for monitoring the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth in biotechnological processes. The technique permits analysis of single cells in suspension and thus to obtain cell size distribution, granularity, intracellular contents of DNA, proteins, and sterols, viability, cell cycle, intracellular pH and enzyme activities. Flow cytometry can also be used for cell sorting. Despite the advantages of flow cytometry, implementation of the technique in biotechnological laboratories is still limited.