

# Katedra Botaniki

Osoba do kontaktu: Anna Rusaczonek

## A. APARATURA BADAWCZA

### 1) Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) FEI 268D „Morgagni” z cyfrową akwizycją obrazu i oprogramowaniem do cyfrowej analizy obrazu

- Analiza anatomiczna i ultrastrukturalna materiału roślinnego, zwierzęcego oraz mikrobiologicznego
- Lokalizacja i kwantyfikacja ilościowa i jakościowa (z pełną wielowymiarową analizą statystyczną koincydencji, istotności znakowania oraz oceną zmian poziomów lokalizacji) znakowania molekuł sygnałnych i białek na poziomie ultrastrukturalnym metodą immunoznakowania w materiale roślinnym, zwierzęcym oraz mikrobiologicznym (technika immunogold oraz kolokalizacje typu double-immunogold)
- Lokalizacja nadtlenu wodoru
- Analiza pomiarowa/morfometryczna na poziomie ultrastrukturalnym
- Ocena ilościowa koncentracji nadtlenu wodoru metodą CTED wraz z oceną statystyczną
- Lokalizacja aktywności różnych enzymów

### 2) Skanujący laserowy mikroskop konfokalny CLSM, Leica DMI6000B SP5 II

- Możliwość wzbudzania naturalnych i sztucznych fluorochromów (barwników fluorescencyjnych) w zakresie ultrafioletu, światła niebieskiego, zielonego i czerwonego
- Detekcja fluorescencji w dowolnym zakresie z dokładnością 1 nm
- Skanowanie sekwencyjne - umożliwia precyzyjną detekcję fluorescencji w momencie, gdy wzbudzone są do fluorescencji dwa lub więcej fluorochromów
- Oddzielna akwizycja fluorescencji dla poszczególnych fluorochromów oraz dowolne ich nakładanie
- Skanowanie preparatów w osi Z umożliwiające rekonstrukcję trójwymiarową takich obiektów jak np. chloroplasty, komórki, fragmenty tkanek (dotyczy roślin i zwierząt)
- Uzyskiwanie widm emisyjnych preparatów mikroskopowych dzięki tzw. skanowaniu lambda co umożliwia lokalizację różnych znanych fluorochromów w strukturach biologicznych, identyfikację nowych oraz precyzyjne ustalenie zakresu “zbierania” fluorescencji dla poszczególnych fluorochromów
- Badania ilościowe zawartości fluorochromów (naturalnych i sztucznych) w poszczególnych strukturach komórkowych, komórkach i tkankach – na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji
- Badania jakościowe i ilościowe chlorofilu, karotenoidów, ligniny, fenoli, flawin i tym podobnych naturalnych fluorochromów oraz fluorochromów sztucznych jak fluoresceina, DAPI, rodamina, oranż akrydyny, błękit Nilu
- Badania ko-lokalizacji różnych fluorochromów np. chlorofilu i karotenoidów w chloroplastach

- Badania jakościowe i ilościowe reaktywnych form tlenu lub azotu, glutationu, aktywności niektórych enzymów
- Wykrywanie przedziałów komórkowych o obniżonym pH
- Wykonywanie serii czasowych – badanie jak zmienia się np. intensywność fluorescencji chlorofilu lub aktywność enzymatyczna w czasie
- Badania ruchliwości cząsteczek fluorochromów metodą FRAP w tym naturalnych jak lignina lub np. białek sprzężonych z GFP
- Badania współdziałania makrocząsteczek po sprzężeniu ich z białkami fluorescencyjnymi - metoda FRET. Możliwość wykazania, że cząsteczki znajdują się w odległości mniejszej niż 10 nm od siebie a zatem prawdopodobnie współdziałają
- Badania w trybie światła odbitego (tryb niekonfokalny) np. złogów związków ceru jakie powstają podczas histochemicznej detekcji reaktywnych form tlenu czy w efekcie aktywności enzymatycznej

### 3) Mikroskopy świetlne z cyfrową akwizycją obrazu

- Stereoskopowy Olympus SZX16
- Klasyczny z DIC Opton Axioskop
- Fluorescencyjny klasyczny z DIC, PH i polaryzacją Olympus AX70 „Provis”
- Fluorescencyjny odwrócony z DIC Olympus IX71

zastosowanie:

- Przygotowanie próbek do analiz mikroskopowych i krojenie skrawków półcienkich do analiz anatomicznych
- Lokalizacja immunofluorescencyjna molekuł sygnałnych i białek z kwantyfikacją ilościową i jakościową (istotności znakowania i poziomu lokalizowanych molekuł)
- Analiza wykonywana na podstawie siły sygnału fluorescencyjnego w oparciu m.in. o parametr CTCF na poziomie tkanek i komórek w materiale roślinnym, zwierzęcym oraz mikrobiologicznym połączona z analizą statystyczną
- Lokalizacja katalazy i peroksydazy
- Podwójna i/lub potrójna immunofluorescencyjna lokalizacja molekuł sygnałnych i białek wraz z oceną ilościową i statystyczną lokalizowanych molekuł
- Detekcja reaktywnych form tlenu – barwienie np. DAB, NBT
- Ocena lokalizacji białek fluorescencyjnych powiązanych z ekspresją konkretnych genów (np. GFP)
- Lokalizacja metali ciężkich w tkankach
- Autofluorescencja związków fenolowych

### 4) Czytnik płytek Thermo Scientific Multiskan GO oraz spektrofotometr kuwetowy

wykonywane analizy:

- Oznaczanie zawartości barwników fotosyntetycznych (karotenoidy, chlorofile)
- Oznaczanie zawartości nadtlenu wodoru
- Oznaczanie aktywności katalazy i peroksydaz

- Oznaczanie aktywności dysmutazy nadtlenkowej
- Oznaczanie zawartości związków fenolowych – polifenole, flawonoidy, flawonole, antocyjany
- Oznaczanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem rodników ABTS, DPPH oraz metody redukcji żelaza
- Oznaczanie peroksydacji lipidów - MDA
- Oznaczanie zawartości proliny

## **B. WYPOSAŻENIE DODATKOWE**

- Mikrotomy Leica RM2065 i RM2165
- Ultramikrotomy Reichert-Jung, Leica Ultracut E/S wyposażone w noże diamentowe
- Zestaw do technik kriogenicznego utrwalania materiału biologicznego i wykonywania preparatów mrożonych - Leica EM AFS, EM CPC i EM FCS; możliwość stosowania technik: cryosectioning (metoda Tokuyasu), progressive lowering of temperature (PLT), freeze substitution, utrwalanie kriogeniczne (plunge freezing, metal mirror freezing)
- Wibrator: Leica VT 1000S
- Płyty grzewcze z wytrząsaniem: Leica HI 1220 (3 szt)
- Komory z laminarnym przepływem powietrza i dodatkowym osprzętem (palniki gazowe Integra Biosciences Fireboy Eco, oświetlenie robocze, lampy UV, czujniki przepływu powietrza): Holten 1.8 (1 szt.), Telstar AH100 (1 szt.), Polon 1200 (1 szt.) do transformacji roślin, hodowli bakterii, grzybów mikoryzowych, kultur in vitro
- Pokój hodowlany przystosowany do uprawy roślin wyposażony w regały oraz odpowiednie oświetlenie
- Komory hodowlane do uprawy roślin oraz prowadzenia kultur w ściśle kontrolowanych warunkach temperatury, wilgotności i fotoperiodu: Sanyo MLR 350 (3 szt), PHCBI MLR-352H-PE
- Termocykler do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR): Bio-Rad CFX Connect
- System do obrazowania fluorescencji i termoluminescencji na żelach agarozowych i membranach: Bio-Rad Gel Doc XR+ Imaging System
- Termocykler do klasycznego PCR: Eppendorf Mastercycler nexus GX2
- Termocykler do in situ PCR: MJ RESEARCH, Inc. PTC-100
- Nanodrop do sprawdzania jakości i czystości kwasów nukleinowych: Eppendorf BioSpectrometer
- Homogenizator kulowy (tissue lyser): Reuch MM400
- System do elektroforezy - Western-Blot: Bio-Rad
- Zamrażarka do głębokiego mrożenia (-80°C): NewBrunswick U410 Premium
- Suszarka próżniowa: TERMED SPT-200
- Wirówka z możliwością chłodzenia prób: Eppendorf 5430R
- Wirówki: MPW-260R, Eppendorf Centrifuge 5415D
- pH-metr z konduktometrem: VWR MU 6100L
- pH-metr: ELMETRON CD-551
- Wytrząsarki inkubatorowe: Memmert IN 30, Biosan ES-20/60
- Cieplarki: ELKON CL-65

- Autoklawy: Laboklav SHP Steriltechnik AG, Zephyr ZEM 1000S
- Małe autoklawy stołowe: Prestige Medical 2100 Classic, Centroclav Connect
- Suszarki laboratoryjne (2 szt)
- Destylarki (2 szt)
- System oczyszczania wody Merc: Milli-Q Direct-Q3 wraz z destylatorem TANKPEO30
- Termoblok z wytrząsaniem: Eppendorf ThermoMixer C Eppendorf
- Densytometr: Biosan DEN-1B
- Wagi analityczne: Radwag AS 110.R2 Plus oraz WPS 210/C/1
- Łaźnie wodne (2 szt)

### **C. specjalistyczne oprogramowania/bazy danych itp. wraz ze wskazaniem wykorzystania**

Oprogramowanie ImageJ, Fiji, Jalview, PyMOL, CELLmicrocosmos Membrane Editor, AIDA, TMHMM, Photoshop, Corel (do obróbki dokumentacji fotograficznej)

Wykonywane analizy w oparciu o oprogramowanie:

- Projektowanie starterów dla reakcji PCR
- Znajdowanie i wybieranie sekwencji odpowiednich to projektowania przeciwciał kierowanych wykorzystywanych w lokalizacji lub do interakcji z receptorami komórkowymi
- Analiza bioinformatyczna sekwencji białkowych i nukleotydowych w kontekście tworzenia drzew filogenetycznych pokrewieństwa/różnic pokrewieństwa
- Tworzenie drzew filogenetycznych na podstawie zdjęć rozdziału elektroforetycznego sekwencji po cięciu restrykcyjnym lub niepokazujące pokrewieństw np. organizmów bakteryjnych
- Tworzenie modeli trójwymiarowych białek z wizualizacją i obrazowaniem domen aktywnych
- Tworzenie modeli błon biologicznych i obrazowanie interakcji białek transbłonowych
- Przewidywanie lokalizacji lub obecności domen transbłonowych z analizą struktury 3D tych obszarów
- Pełna analiza obrazu mikroskopowego poprzez analizę kanałów, tworzenie stagów czy analizę parametrów zdjęcia