

Cải tiến thí nghiệm phân tích nhịp điệu sinh học sử dụng NightShade

Improved experimental setup for analysis of circadian rhythms using the NightShade

José Romário Fernandes de Melo, Christian Hermans, Nathalie Verbruggen

Tóm tắt

Abstract

Đồng hồ sinh học nội sinh chi phối nhịp điệu thường ngày và cho phép các loài sinh vật tiên liệu trước những thay đổi từ môi trường cũng như điều phối và đồng bộ hóa chức năng sinh lý của chúng để thích ứng với những biến chuyển này. Giám sát gen chỉ thị tạo điều kiện thuận lợi cho những nghiên cứu về nhịp điệu sinh học. Thí nghiệm này bao gồm một vùng khởi động của gen đang quan tâm có nhiệm vụ chi phối biểu hiện của luciferase *pGENE::LUC+* và các hệ tạo ảnh có độ nhạy cao [1]. Tuy nhiên, đồng hồ sinh học ở sinh vật đa bào vốn rất đa dạng ở các cấp độ như cá thể, mô hay tế bào [2, 3]. Điều này dẫn đến dữ liệu không chính xác hoặc bị nhiễu. Do đó, điều kiện tiến hành thí nghiệm phải đủ mạnh để có thể giải quyết chính xác những vấn đề liên quan tới đồng hồ sinh học. Vì mục tiêu đó, chúng tôi đã phát triển một chu trình đơn giản cho thí nghiệm về nhịp điệu sinh học với gen chỉ thị được áp dụng trên *Arabidopsis thaliana* với sự hỗ trợ của máy NightShade LB 985. Thí nghiệm của chúng tôi giúp cải thiện chất lượng dữ liệu, giảm biến thiên phát quang giữa các lần lặp và có sự tương đồng cao với các mô hình dự đoán.

*Endogenous biological clocks drive daily rhythms enabling organisms to anticipate environmental changes as well as to coordinate and adapt their physiology in a synchronized manner. Research on circadian rhythms benefits from real-time monitoring of reporter lines in which the promoter of a gene of interest drives the expression of luciferase *pGENE::LUC+* in combination with sensitive imaging systems [1]. However, in multicellular organisms, circadian clocks are naturally variable at individual, tissue as well as cellular level [2, 3], culminating in noisy or inaccurate data. Therefore, robustness is required to accurately address key questions in circadian biology. For this purpose, we developed a simple protocol for circadian rhythms experiments with *Arabidopsis thaliana* reporter lines using the NightShade LB 985. Our experimental setup improves data quality, reduces luminescence variation between replicates and highly correlates with modelling predictions.*

Laboratory of Plant Physiology and Molecular Genetics, Université Libre de Bruxelles – Campus Plaine CP 242, Bd du Triomphe, B-1050 Brussels, Belgium
<http://lpgmp.ulb.be/>

Giới thiệu

Introduction

Đồng hồ sinh học cho phép thực vật dự đoán cũng như đáp ứng trước những biến đổi từ môi trường, do đó, giúp chúng thích ứng tốt hơn [4]. Cả tín hiệu môi trường và trao đổi chất đều được tích hợp trong đồng hồ sinh học và được duy trì bởi một hệ thống mạng lưới các gen và được giữ đồng bộ hóa với chu kỳ ngày/đêm. Ngược lại, đồng hồ sinh học điều hòa rất nhiều con đường để đảm bảo rằng chúng được kích hoạt ở những thời điểm phù hợp trong ngày.

The circadian clock enables plants to anticipate as well as to respond to environmental variations and thus, improves their fitness [4]. Both, environmental and metabolic signals feed into the clock, which is comprised of a network of genes and keep it synchronized with day/night cycle. In return, the clock controls various pathways and ensures they get activated at the appropriate time of the day.

Ánh sáng đóng vai trò như một kim chỉ nam giúp kiểm soát đồng hồ sinh học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu về ảnh hưởng của ánh sáng lên hệ thống “đồng hồ gen” phức tạp nhằm khám phá những cơ chế mà đồng hồ sinh học ở cây sử dụng để thích nghi với sự biến đổi độ dài ngày.

Light is one of the so-called Zeitgebers, which can reset the clock. In this work, we looked at the effect of light on the complex system of clock-genes in Arabidopsis thaliana to explore the mechanisms by which the plant clock adapts to day length variation.



Hệ tạo ảnh trong cơ thể thực vật NightShade LB 985 theo Công nghệ Berthold

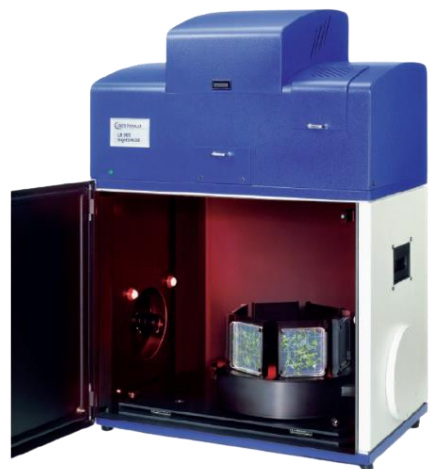
The Berthold Technologies NightShade LB 985 In Vivo Plant Imaging System

Hệ tạo ảnh trong cơ thể thực vật NightShade LB 985 là dòng máy quang đa bộ phận, dễ dàng sử dụng và được ứng dụng vào phân tích cơ thể thực vật. Do được trang bị một hộp sáng kín và một máy ảnh cảm biến lạnh CCD mà nó có thể giảm sát rất nhạy quá trình phát quang và phát huỳnh quang trong mô, cây non hay toàn bộ cơ thể thực vật.

The NightShade LB 985 In vivo Plant Imaging System is a modular, easy to use optical imaging system dedicated to in vivo analysis of plants. Equipped with an absolutely light-tight cabinet and a cooled CCD camera it enables sensitive luminescence and fluorescence monitoring in tissues, seedlings and whole plants.

Máy ảnh có thể được gắn trên trần hoặc mặt bên khoang tối giữ mẫu của máy nhằm tạo điều kiện ghi ảnh từ trên cao hoặc bên cạnh. Hình ảnh của nhiều cây non có thể được xử lý cùng một lúc bằng cách đặt máy ảnh dọc sườn khoang máy. Những cây non này được trồng theo phương thẳng đứng cho phép chúng ta có một cái nhìn toàn diện. Hơn nữa, các yếu tố môi trường chủ chốt như nhiệt độ, độ ẩm và chu kỳ sáng có thể được mô phỏng để tạo ra một môi trường sinh trưởng có kiểm soát.

The camera can be attached either to the ceiling or the side walls of the darkroom – the sample chamber – to facilitate imaging from above and from the side. The latter position of the camera enables processing of multiple seedlings in parallel while growing plants vertically oriented to enable observation of the complete plant. Furthermore, key environmental conditions like temperature or humidity as well as daylight can be simulated to provide a controlled growth environment.



Phương pháp và vật liệu

Materials and methods

Cây *Arabidopsis* non mang cấu trúc *pCCA1::LUC+* được dùng cho phân tích nhịp điệu sinh học. Cây non tám ngày tuổi đã được điều chỉnh để thích ứng với chu kỳ sáng ngắn ngày được chuyển vào khoang NightSHADE để ghi tín hiệu phát quang trong tám ngày tiếp theo. Thông tin cụ thể về thiết bị, máy ảnh CCD, điều kiện sinh trưởng, nguồn sáng và thao tác thực nghiệm với luciferin có thể được tìm thấy ở <http://www.berthold.com/ww/en/pub/bioanalytik/produkte/nightshade.cfm>, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.03.005> [5]. Tín hiệu quang phát ra từ 10 - 15 cây non trồng tập trung được đo bằng máy ảnh CCD gắn trên đỉnh khoang tối trong 600s (chia nhỏ dữ liệu binning 1x1, tăng cao) sau khi tạo thích ứng tối trong vòng 120s trước khi thu quang tử. Cây được nuôi cấy trên đĩa đặt theo phương song song. Những đĩa này đặt dưới máy ảnh khoảng 20 cm để tăng khả năng thu tín hiệu (Hình 1). Tiêu điểm của máy ảnh CCD được điều chỉnh bằng tay.

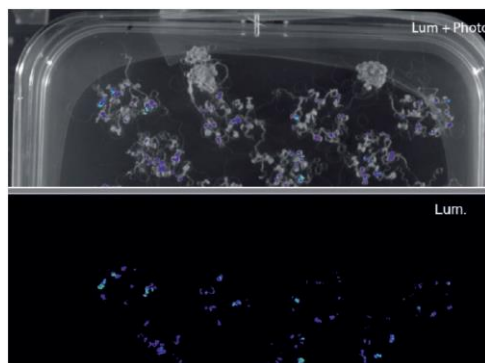
Arabidopsis seedlings bearing pCCA1::LUC+ construct were used for circadian rhythm analysis. Eight-day-old seedlings entrained in short days were transferred into the NightSHADE chamber for luminescence recording during eight additional days. Further details about the device, CCD camera, growth condition, light sources and luciferin manipulation can be found elsewhere (<http://www.berthold.com/ww/en/pub/bioanalytik/produkte/nightshade.cfm> and <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.03.005>) [5]. Luminescence measurements were performed in 10 – 15 pooled seedlings using top-housed CCD camera in darkness during 600s (binning 1x1, high gain) after dark-adaptation for 120 s prior to photon acquisition. Plant culture was performed in horizontally-oriented plates and placed around 20 cm below the camera for enhanced signal acquisition (Fig.1). Manual focus of CCD camera is required.

Kết quả

Results

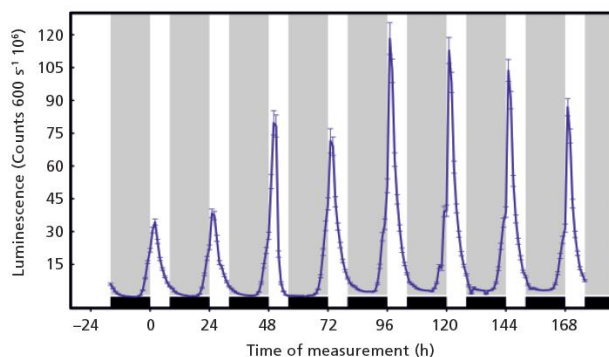
Thích ứng tối trong 120s trước khi tiến hành đếm quang tử giúp giảm thiểu ảnh hưởng tự phát huỳnh quang của diệp lục. Thao tác này được mô tả bởi Hình 1, chúng ta có thể thấy kiểu hình hoang dại Col-0 không phát ra tín hiệu trái ngược với những cây non mang gen chỉ thị. Gen *LIÊN QUAN TỚI ĐỒNG HỒ SINH HỌC (CCA1)* mã hóa bộ máy điều hòa chính của con lắc đồng hồ sinh học trung tâm [6]. Mức biểu hiện của gen này đạt cao khi bình minh lên nhưng lại bị chặn kể từ khi chạng vạng tới đêm [6]. Hoạt động của cấu trúc vùng khởi động *CCA1::LUC+* được ghi lại trong vòng 8 ngày. Khoảng thời gian dao động là 23.910 ± 0.004 h (Hình 2). Độ mạnh của nhịp điệu được biểu diễn bởi đại lượng Sai số Khuếch đại Tương đối (Hình 3). Bên cạnh việc đánh giá chu kỳ 24 h, thí nghiệm này còn kiểm tra tính chính xác của những dự đoán toán học về nguồn sáng cung cấp cho đồng hồ sinh học thực vật trong một khoảng chu kỳ thích ứng rộng như 8; 13 và 16 h [5].

Dark-adaptation for 120s prior to photons counting prevented the incidence of chlorophyll auto-fluorescence, such as demonstrated by the lack of signal in Col-0 wild-type in contrast to reporter seedlings (Fig 1). The CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene encodes a master regulator of the central circadian oscillator [6]. This gene is highly expressed at dawn and repressed through dusk over the night [6]. The activity of the CCA1 promoter::LUC+ was recorded during eight days. The period of the oscillations was 23.910 ± 0.004 h (Fig 2). Robustness of rhythms is shown by the Relative Amplitude Error (Fig 3). In addition to 24 h cycles, this experimental setup allowed to accurately test mathematical predictions of light inputs to the plant circadian clock in a large range of entrainment cycles, such as 8, 13 and 16 h [5].



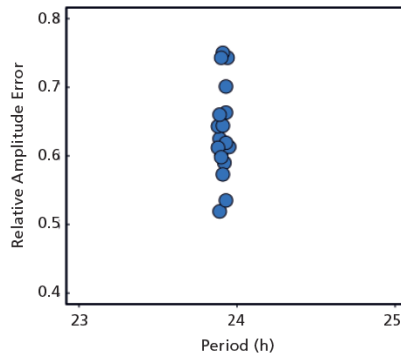
Hình 1. Cây non *A. thaliana* pCCA1::LUC+ (phát sáng) và kiểu hình hoang dại Col-0 7h sau khi bắt đầu phát quang (bắt đầu đo tín hiệu phát quang)

Figure 1. *A. thaliana* pCCA1::LUC+ (glowing) and Col-0 wild type (negative control) seedlings 7h after light onset (when luminescence measurements started).



Hình 2. Hoạt động của chỉ thị Luc ở cây non *A. thaliana* pCCA1::LUC+ trong chu kỳ ngắn ngày (8h sáng/16h tối).

Figure 2. Luc reporter activity of *A. thaliana* pCCA1::LUC+ seedlings under short-day cycles (8h light/16h dark).



Hình 3. Sai số Khuếch đại Tương đối biểu diễn độ mạnh của dao động sinh học

Figure 3. Relative Amplitude Error demonstrating the robustness of the circadian oscillations.

Kết luận

Conclusion

Chúng tôi đã phát triển một chu trình mạnh được nâng cấp cho thí nghiệm đồng hồ sinh học sử dụng NightShade LB 985. Kết quả của chúng tôi làm trên dòng *Arabidopsis thaliana* chỉ thị đồng thuận với những nghiên cứu trước chứng minh mạng lưới gen đồng hồ sinh học nhạy cảm với ánh sáng của *Arabidopsis* giúp cây có khả năng thích nghi với sự thay đổi mùa xét theo độ dài ngày. Hơn nữa, thí nghiệm của chúng tôi làm giảm độ biến thiên phát quang giữa các lần lặp và có mối tương quan cao so với những mô hình dự đoán. Những điều này giúp cải thiện đáng kể chất lượng dữ liệu.

We developed a significantly improved robust protocol for circadian experiments using the NightShade LB 985. The results of our experiments with Arabidopsis thaliana reporter lines agree with previous reports that the light-sensitive Arabidopsis clock gene network provides the plant with the ability to adapt to seasonal changes in day length. In addition, our experimental setup reduces luminescence variation between replicates and highly correlates with modelling predictions, thus, improving data quality.

Tài liệu tham khảo

References

1. Millar, A.J., et al. Plant Cell, 1992. 4(9): p. 1075-1087.
2. Endo, M. Curr Opin Plant Biol, 2016. 29: p. 44-49.
3. Endo, M., et al. Nature, 2014. 515(7527): p. 419-422.
4. Green, R.M., et al. Plant Physiol. 2002. 129: p. 576-584.
5. De Caluwe, J., et al. J Theor Biol, 2017. 420: p. 220-231.
6. Alabadi, D., et al. Curr Biol, 2002. 12(9): p. 757-761.

Dùng cho mục đích nghiên cứu. Không phục vụ các thao tác chuẩn đoán.

© Berthold Technologies năm 2017. Đã đăng ký bản quyền. Những thương hiệu nêu trên là tài sản của Berthold Technologies hoặc các chủ sở hữu của công ty.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

© 2017 Berthold Technologies. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Berthold Technologies or their respective owners.

Berthold Technologies GmbH & Co. KG

Calmbacher Straße 22

75323 Bad Wildbad

GERMANY

phone: +49 7081 177 0

email: bio@berthold.com



www.berthold.com