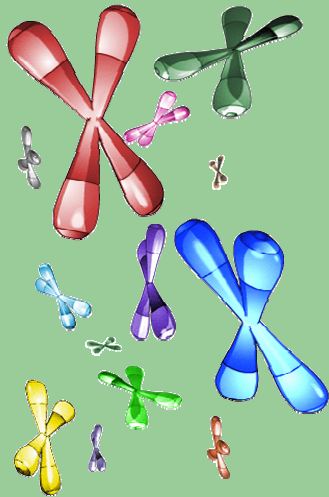


Bi6270c Cvičení z cytogenetiky



Vladimíra Vranová

Odd. genetiky a molekulární biologie
Ústav experimentální biologie
PřF MU

Organizační záležitosti

- dr. Vladimíra Vranová, e-mail: vlavra@mail.muni.cz
- Integrované laboratoře molekulární cytogenetiky
 - Odd. genetiky a molekulární biologie
Ústav experimentální biologie PřF MU
 - Oddělení lékařské genetiky FN Brno
 - Babákova myelomová skupina, Ústav
patologické fyziologie LF MU

<http://www.cba.muni.cz/cytogenlab/>

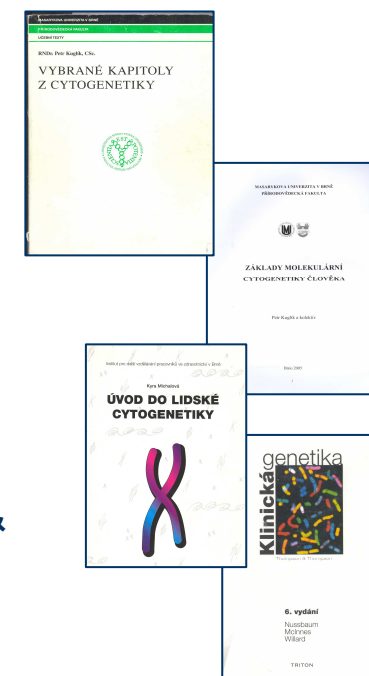


Organizační záležitosti

- jarní semestr 2012 – 13 vyučovacích týdnů (12 týdnů - 9.4. Velikonoční pondělí)
 - 3 skupiny – A, B, C; cvičení každý třetí týden
 - A: 20.2., 12.3., 2.4., 30.4.
 - B: 27.2., 19.3., 16.4., 7.5.
 - C: 5.3., 26.3., 23.4., 14.5.
-
- Univerzitní kampus, A13, Bohunice – Kamenice
 - ILBIT, pavilon A3, 3. poschodí, pracoviště Molekulární cytogenetiky

Organizační záležitosti

- **Podmínky pro udělení zápočtu:**
 - přítomnost na každém cvičení
 - soustředěné pracování a základní znalosti na každém cvičení
- **Literatura**
 - **Kuglík, P.:** Vybrané kapitoly z cytogenetiky, Masarykova univerzita, Brno
 - **Kuglík, P.:** Základy molekulární cytogenetiky člověka, Masarykova univerzita, Brno
 - **Michalová, K.:** Úvod do lidské cytogenetiky, Institut pro další vzdělávání, Brno
 - **Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F.:** Thompson & Thompson – Klinická genetika. Triton, Praha, 2004



Poučení o bezpečnosti při práci

- 1) Do laboratoře vstupujeme jen se souhlasem vyučujícího a v pracovním oděvu.
- 2) Před začátkem vlastní práce se seznámíme s pracovním návodem a během práce jej dodržujeme. Smíme provádět pouze práce, které jsou nařízeny a povoleny vyučujícím a pod jeho dohledem.
- 3) Před začátkem vlastní práce zkontrolujeme stav pracoviště, pracovních pomůcek a přístrojů. Veškeré závady a nedostatky (a to i během vyučování) jsme povinni nahlásit vyučujícímu.
- 4) Se zařízením učebny, pomůckami a přístroji zacházíme opatrně a šetrně dle pokynů vyučujícího.
- 5) V učebně je zakázáno jíst a pít, zachováváme zde klid a pořádek.
- 6) Na pracovišti udržujeme pořádek a čistotu, chováme se ukázněně, pracujeme soustředěně podle návodu a pokynů vyučujícího a používáme potřebné osobní ochranné pracovní prostředky na ochranu života a zdraví.
- 9) Každou mimořádnou událost (vysypání či vylití látky, zasažení očí a kůže, požití, nadýchání, úraz aj.) okamžitě hlásíme vyučujícímu, který zajistí potřebná opatření.
- 11) Po skončení práce pomůcky omyjeme a uklidíme na stanovené místo, uklidíme pracoviště, vypneme elektrické přístroje, nepoužité chemikálie vrátíme vyučujícímu k uložení.

Cvičení z cytogenetiky - osnova

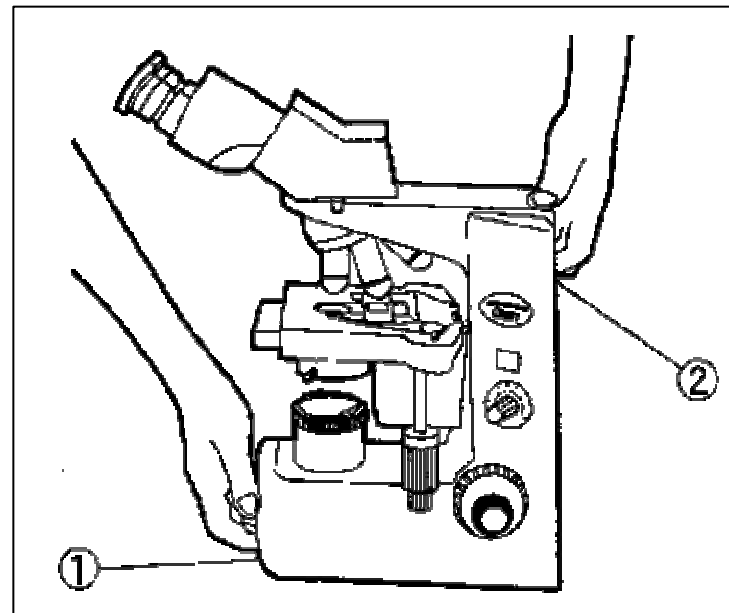
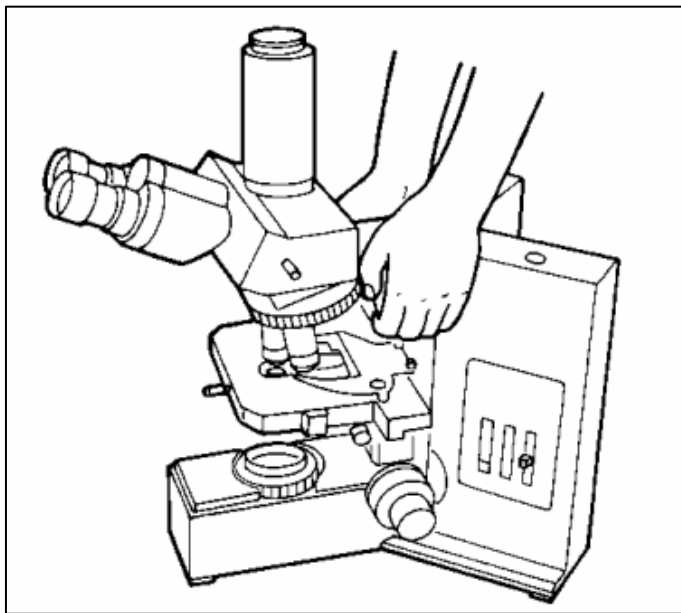
- **1. Základy mikroskopické techniky - světelná mikroskopie.**
Seřízení mikroskopu dle Kohlerova principu, práce se suchým a imerzním objektivem. Pozorování chromozomů *Vicia faba*, živočišných a lidských chromozomů.
- **2. Klasická cytogenetika člověka.**
Příprava cytogenetických preparátů z periferní krve, kostní dřeně. Barvení chromozomů. Identifikace chromozomů. Karyotyp člověka, numerické a strukturní změny chromozomů člověka. Nomenklatura ISCN.
- **3. Molekulární cytogenetika.**
Principy fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) a její využití v prenatální, postnatální a nádorové cytogenetice. Základy využití počítačové analýzy obrazu v cytogenetice.
- **4. Pokročilé metody molekulární cytogenetiky.**
Technika CGH, SKY, array-CGH.

Cvičení 1

Základy mikroskopické techniky - světelná mikroskopie.



Transport mikroskopu



Při jakémkoli přemísťování je nutné mikroskop držet **oběma rukama na dvou určených místech** (1, 2). Jakýkoli jiný způsob přemísťování či posouvání po pracovní desce stolu může vést k vážnému poškození mikroskopu!

Optický mikroskop

(max. rozlišovací schopnost je 0,2 μm)

A: MECHANICKÁ ČÁST.

- stativ (u novějších typů se zabudovaným osvětlovacím zařízením žárovka 6V, popř. halogenové výbojky)
- makrometrický a mikrometrický šroub
- tubus (nejčastěji binokulární)
- stolek (křížový vodič preparátů)
- objektivový revolver

B: OSVETLOVACÍ ZAŘIZENÍ.

- světelný zdroj
- kondenzor
- zrcátka
- irisové clonky

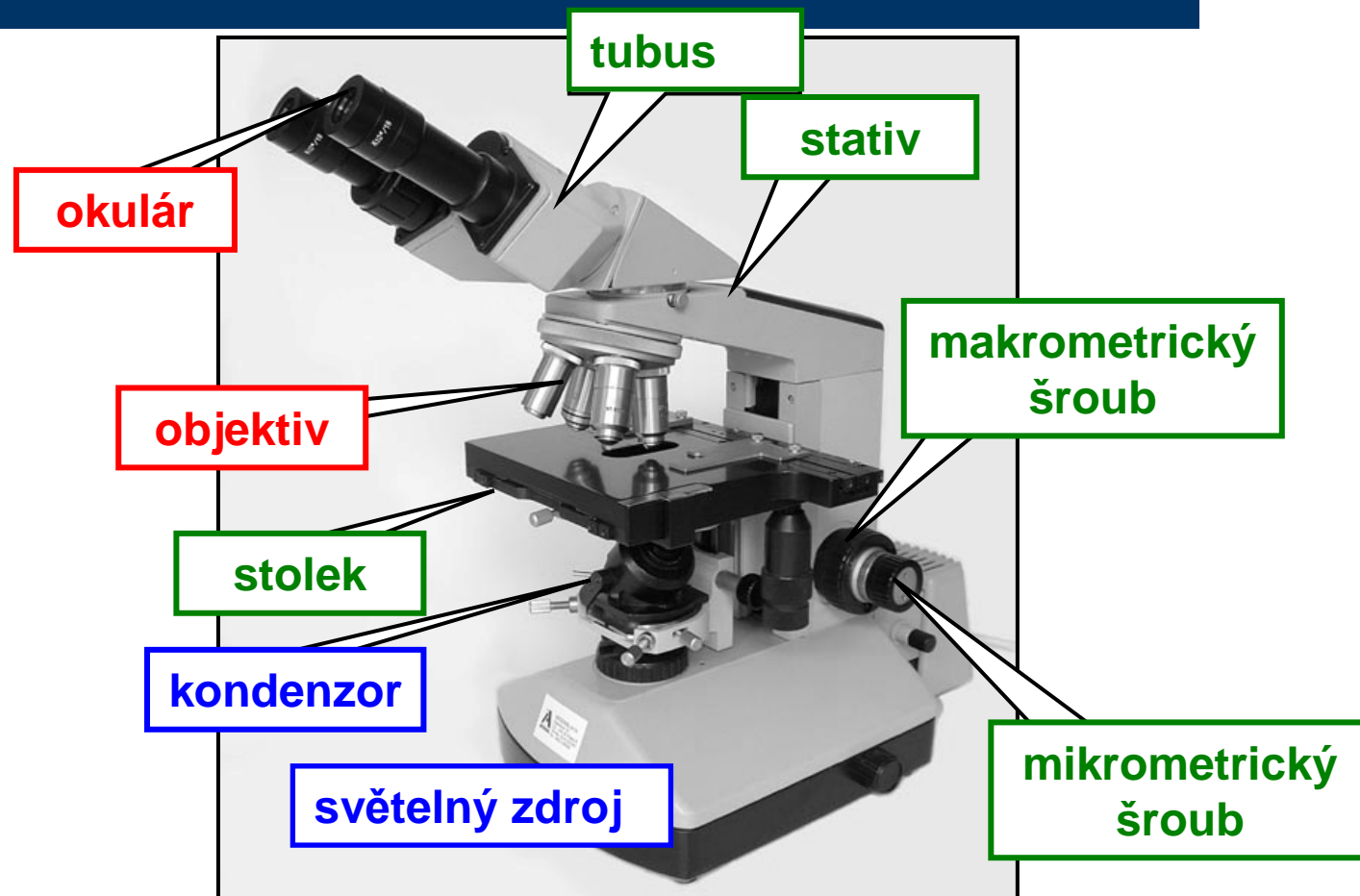
C: OPTICKÉ ČÁSTI.

- okuláry
- objektivy

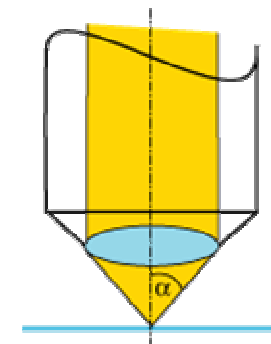
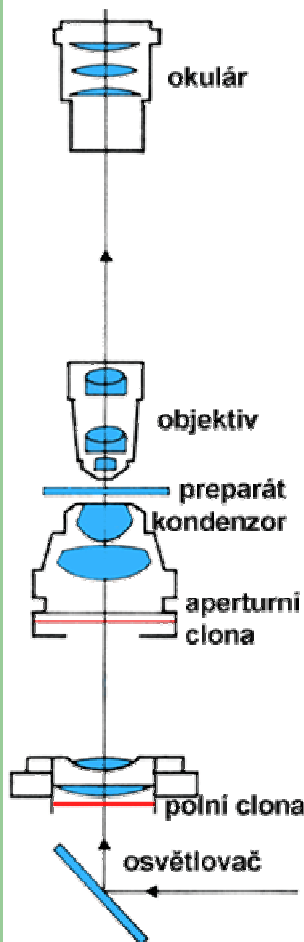
PŘÍSLUŠENSTVÍ.

- zařízení pro zhotovování mikrofotoografií (fototubus, projekтивы, fotoaparát, poloautomatické či automatické expoziční zařízení)
- příslušenství pro fluorescenční mikroskopii (světelná skříň - vysokotlaká rtuťová výbojka, sada budících a závěrných filtrů)
- příslušenství pro pozorování v tmavém poli (kondenzory)
- příslušenství pro pozorování pomocí fázového kontrastu (kondenzory a objektivy PHACO, pomocný okulár)
- polarizační zařízení (polarizátor a analyzátor)
- projekční nástavec, statistické zařízení
- CCD kamera, barevný monitor

Popis světelného mikroskopu



Objektiv



$$NA = \eta \cdot \sin \alpha$$

η - index lomu média před frontální čočkou

α - 1/2 otvorového úhlu

$\eta_{\text{imerzní olej}} = 1,512$

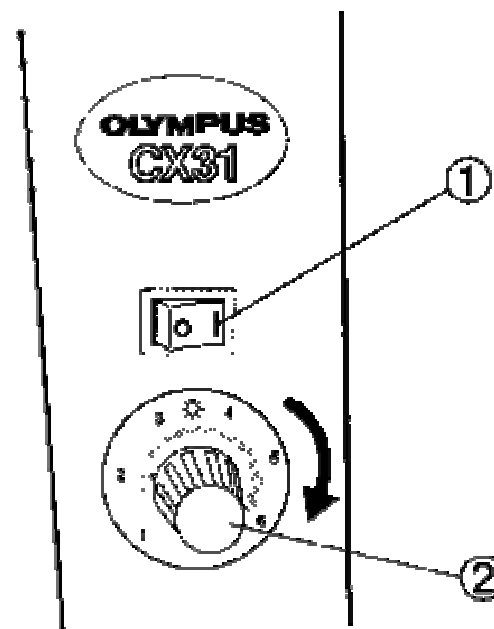
$\eta_{\text{vzduch}} = 1$

Úkol 1: Seřízení mikroskopu dle Köhlerova principu

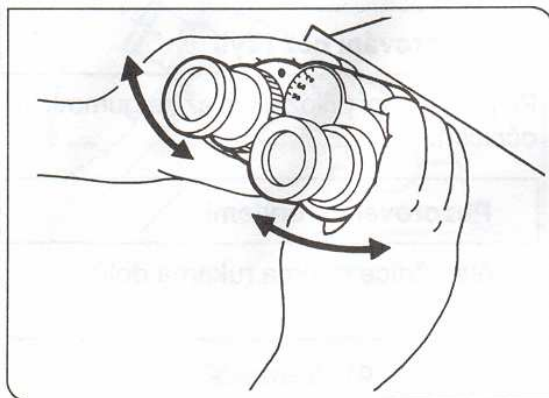


Uvedení mikroskopu do provozu

Před zapnutím mikroskopu kolébkovým spínačem (1) se přesvědčte, že napětí přiváděné ke světelnému zdroji je staženo na minimum, tedy že otočný **potenciometr (2) je nastaven na hodnotu 1**. Teprve po zapnutí spínače je možné zvyšovat napětí (otáčení potenciometru ve směru šipky) a tedy intenzitu emitovaného světla. Otočný potenciometr použijte i v průběhu mikroskopování k úpravě světelné intenzity, např. vždy při změně objektivu.

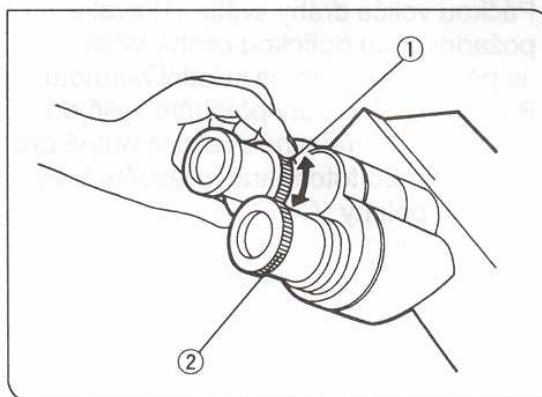


Seřízení mikroskopu



1 *Nastavení vzdálenosti okulárů*

Upravte šířku binokulárního nástavce tak, aby při pohledu do okulárů bylo dobře vidět levým i pravým okem totéž zorné pole. Stupnice napomáhá tomu, abyste mohli mikroskop znovu snadno seřídit.

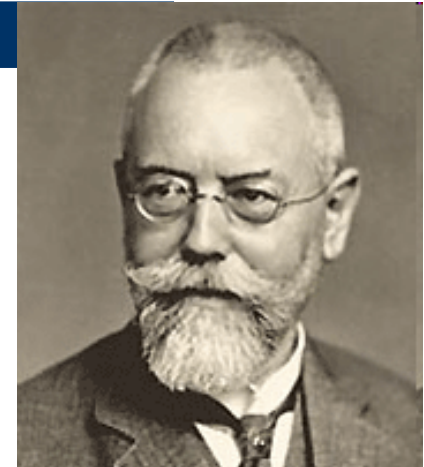


2 *Dioptrická korekce*

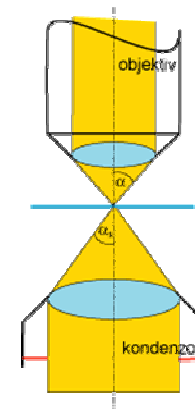
- 1 Dívejte se pravým okem do pravého okuláru a hrubým i jemným posuvem přesně zaostřete.
- 2 Pak při pohledu levým okem do levého okuláru zaostřete obraz pomocí kroužku dioptrické korekce (1).

Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

- pro optimalizaci osvětlení v mikroskopu
- optimální využití optického potenciálu mikroskopu, numerické apertury objektivu a tím i jeho rozlišení
- Výsledkem Köhlerova nastavení by mělo být rovnoměrné a maximální osvětlení průhledného preparátu, ležícího v předmětové rovině. Současně by měla být dosažena nejlepší kombinace mezi rozlišovací schopností a kontrastem.



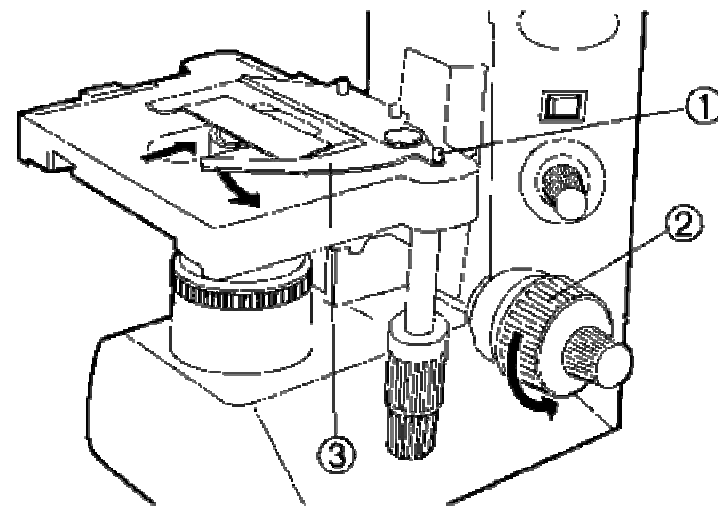
August Köhler (1866 -1948)



Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

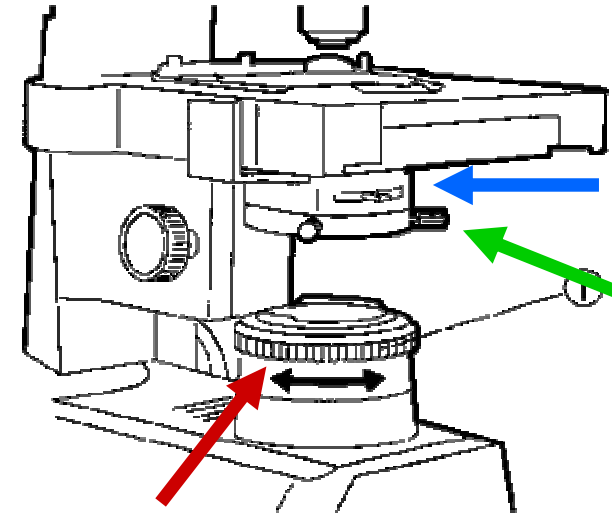
- Musíme mít preparát – trvalé preparáty *Vicia faba* (dobře kontrastní)

Na pracovní stůl mikroskopu vložte připravený preparát tak, že pomocí páčky (1) odkloníte držák preparátu (3). Zaostřete na preparát pomocí ostřicího šroubu (2).

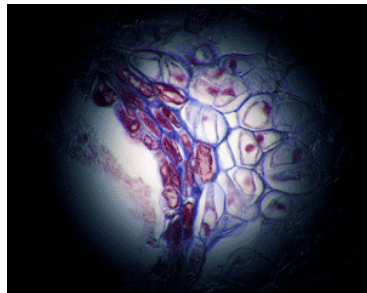


Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

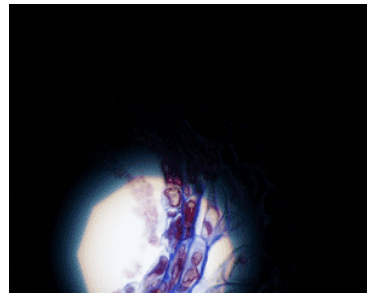
- Nastavte objektiv 10x (případně očistěte objektiv od imerze) a zaostřete buňky preparátu.
- Zavřete **polní clonku** tak, až uvidíte její obrys v zorném poli. Obraz polní clonky (světlý kotouček) v této fázi nemusí být ve středu zorného pole a nemusí mít zaostřené okraje.
- Zaostřete obraz polní clonky tím, že snižujete nebo zvyšujete polohu **kondenzoru**.
- Vycentrujte obraz polní clonky tak, aby byl přesně ve středu zorního pole použitím **centrovacích šroubů** na obvodu kondenzoru.
- Otevřete clonu; při správném vycentrování se okraje budou krýt s okrajem zorného pole.



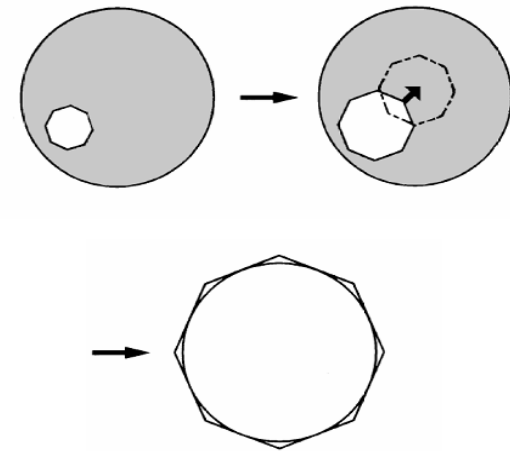
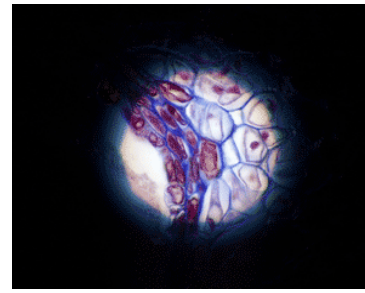
- zaostřený preparát s přivřenou polní clonou...



- polní clona po zaostření...



- .. a vycentrování



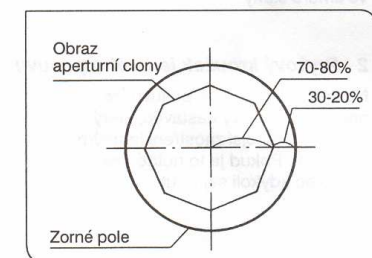
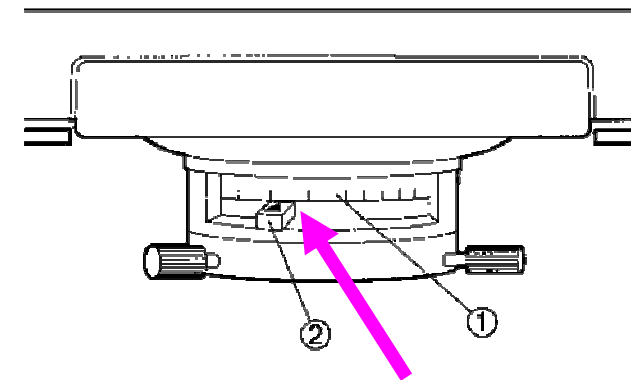
Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

Aperturní clonka - umístěná na kondenzoru. Její otevřenost nastavte pomocí páčky maximálně na hodnotu NA objektivu, který právě používáte. Nejlepších výsledků bývá dosaženo při nastavení aperturní clony na 70 až 80 % NA.

S postupným uzavíráním aperturní clony se zvyšuje hloubka ostrosti a zvyšuje kontrast, postupně však vystupují i různé nečistoty nebo nežádoucí vrstvy buněk.

Co když na kondenzore není stupnice?

Vyjměte okulár a přivřete aperturní clonu, až ji uvidíte na zadní straně čočky objektivu. Otevřete aperturní clonu tak, aby odpovídala 70 – 80% plochy maximálního zorného pole.



Obrázek č. 22

Máme seřízený mikroskop!

...ale pouze pro danou kombinaci objektivu a okuláru.

Teď už se bude měnit jenom aperturní clonka – při každé výměně objektivu ji musíme nastavit na 70 – 80% hodnoty NA daného objektivu.

Úkol 2:
Pozorování chromozomů *Vicia faba*, práce se suchým a imerzním objektivem

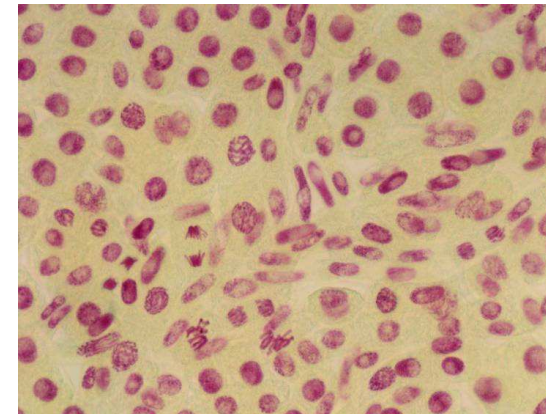


Postup při práci se suchým objektivem

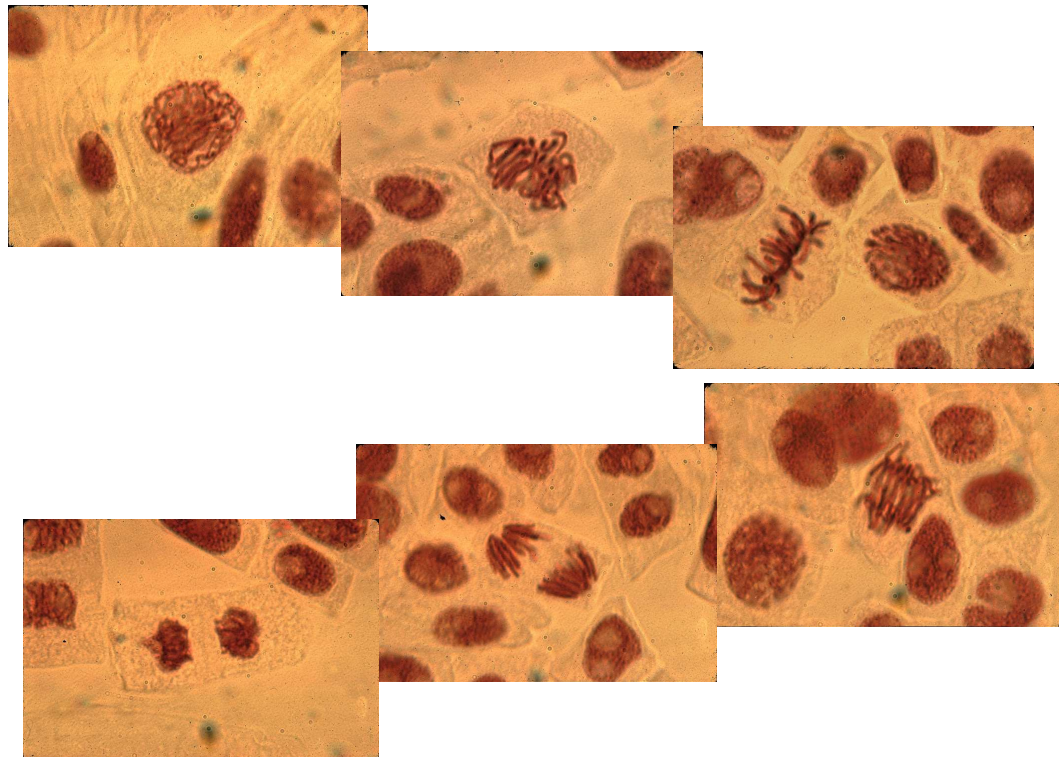
- preparát uložíme tak, aby prohlížená část byla ve středu
- kondenzor snížíme dle použitého objektivu (čím je zvětšení menší, tím je kondenzor níže), aperturní clonu otevřeme (na velikost numerické apertury objektivu)
- makrošroubem snižujeme tubus a v okuláru sledujeme, kdy se objeví záblesk obrazu a doostříme mikrošroubem

Pozorování chromozomů *V. faba* suchým objektivem

- Sklo položte (buňkami nahoru!) na stolek mikroskopu a prohlížejte objektivem o malém zvětšení (4x–10x).
- **Spočítejte 100 buněk a určete mitotický index.**
- Po zaostření na vhodnou mitózu použijte objektiv s vyšším zvětšením (nejlépe 40x–45x) – pozor při zaostřování (nebezpečí poškození preparátu a znehodnocení objektivu!)
- **Najděte jednotlivé fáze buněčného cyklu v preparátech *V. faba*.**



Pozorování chromozomů *V. faba* suchým objektivem



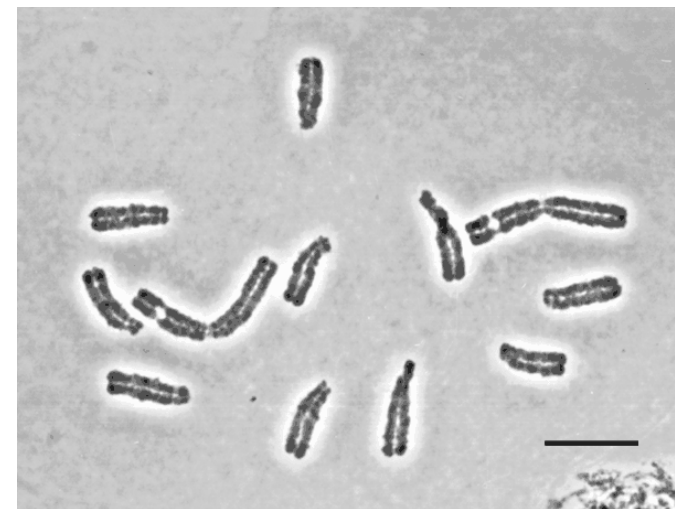
Postup při práci s imerzním objektivem

- preparát uložíme tak, aby prohlížená část byla ve středu
- upravíme hodnotu **aperturní clony otevřeme**
- **na preparát kápneme imerzní olej** (pokud pracujeme s dvojitou imerzí, kápneme olej také na čočku kondenzoru – ještě než ho zvedneme nahoru)
- **makrošroubem snižujeme tubus a pozorováním ze strany sledujeme, kdy se čočka objektivu spojí s olejovou kapkou (záblesk na hraně podložního skla), dále objektiv nesnižujeme díváme se do okulárů a jemným otáčením makrošroubu zvedáme tubus, jakmile se objeví preparát, doostříme mikrošroubem**
- po skončení pozorování zvedneme tubus, preparát odsuneme a pokud nepokračujeme v práci s imerzí, ihned řádně očistíme objektiv (i kondenzor, pokud pracujeme s dvojitou imerzí).

Pozorování chromozomů *V. faba* imerzním objektivem

- Po zaostření na vhodnou mitózu použijte objektiv se zvětšením 100x – pozor při zaostřování (nebezpečí poškození preparátu a znehodnocení objektivu!)
- **Kolik chromozomů má bob?**

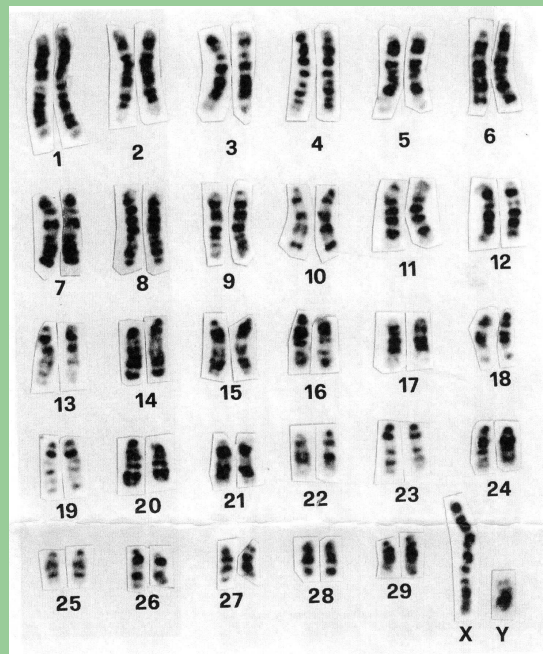
**Správná odpověď je:
12 (nebo 6 párů)**



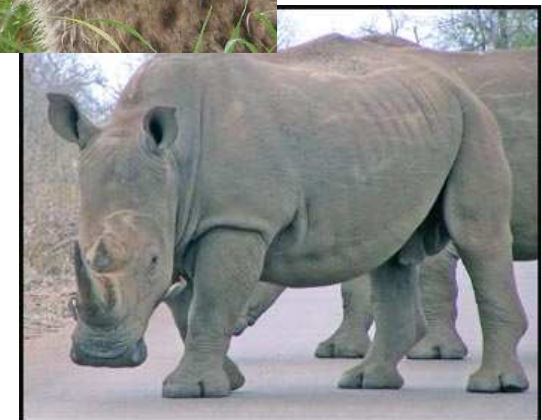
Nejčastější závady

- nedostatečně osvětlené zorné pole – špatně seřízené světlo, snížený kondenzor, zúžená clona
- přesvětlené zorné pole – zvýšený kondenzor, příliš otevřená clona a intenzivní světlo
- objektiv není přetočen přesně do optické osy
- čočky objektivu nebo okuláru jsou znečištěny
- preparát není zcela suchý – i malé zbytky vody vytvářejí s imerzním olejem neprůhlednou emulzi.

Úkol 3: Pozorování živočišných a lidských chromozomů



Pozorujte pod mikroskopem chromozomy býka, žirafy, nosorožce, sitatungy, kudu velkého, hyeny, orangutana a pokuste se přiřadit jednotlivé preparáty danému živočišnému druhu.

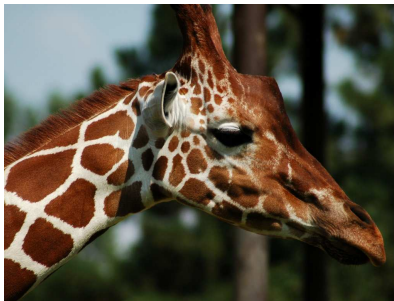




Tur domácí
(*Bos taurus*)
2n = 60
(akrocentrické
chromozomy)



Hyena skvrnitá
(*Crocuta crocuta*)
2n = 40



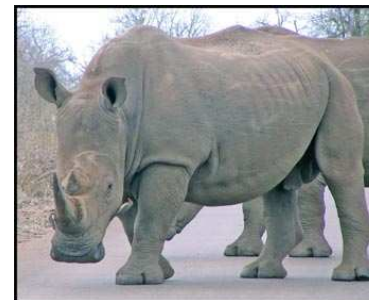
Žirafa síťovaná
(*Giraffa camelopardalis
reticulata*)
2n = 30



Nosorožec černý
(*Diceros bicornis*)
2n = 84



Kudu velký
(*Tragelaphus
strepsiceros*)
2n = 32 ♀, 31 ♂ (t(13;Y))



**Nosorožec bílý
(tuonosý)**
(*Ceratotherium simum*)
2n = 82



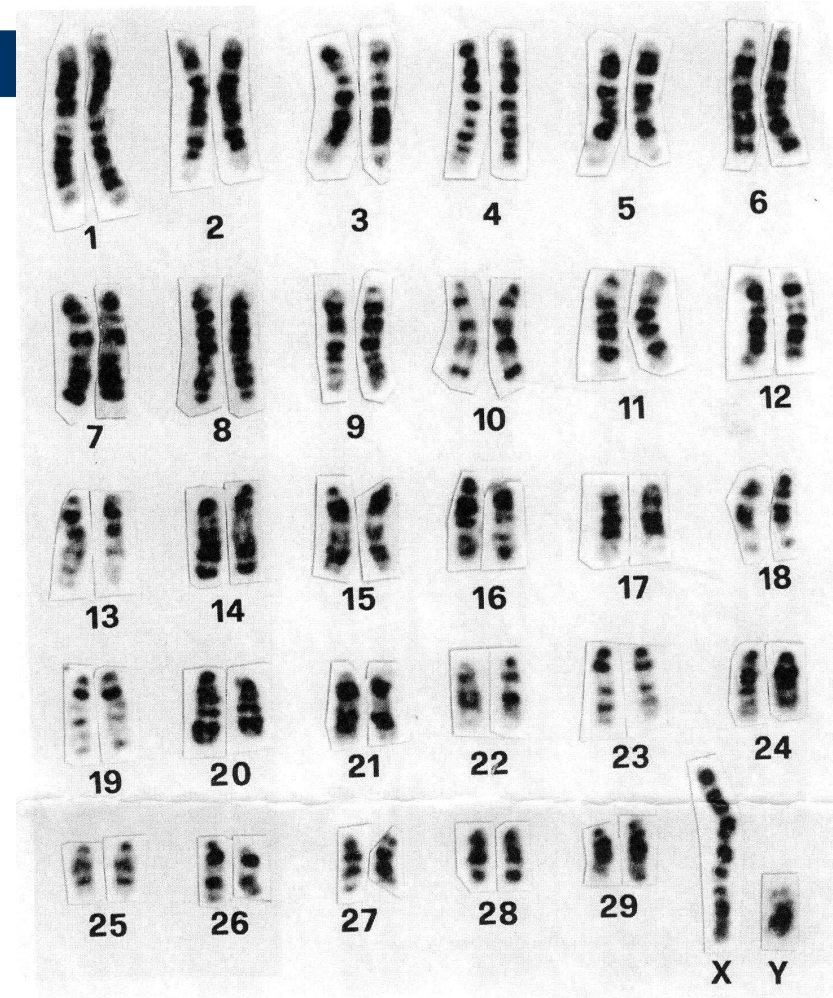
Sitatunga
(Lesoň bahenní)
(*Tragelaphus spekeii*)
2n = 30



Orangutan
(*Pongo pygmaeus*)
2n = 48

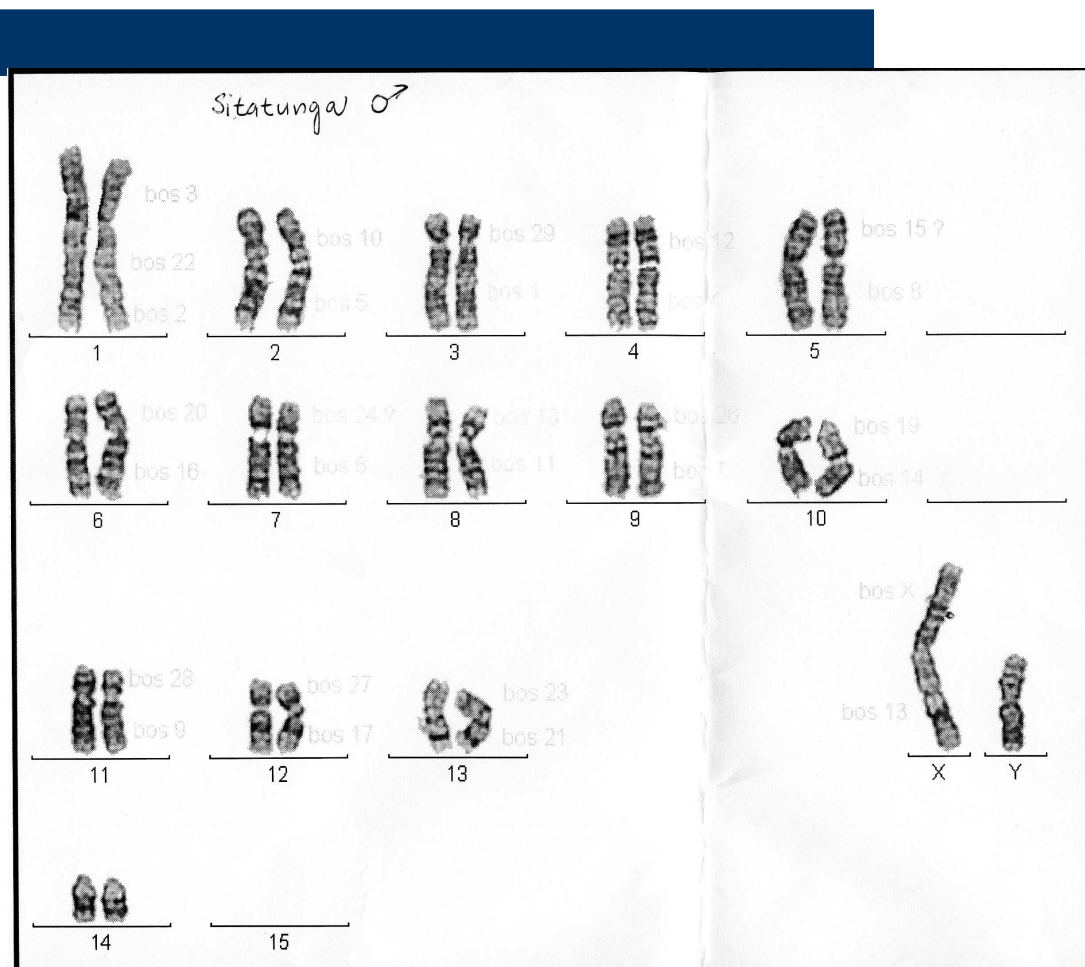
Tur domácí (*Bos taurus*)

$2n = 60$ (akrocentrické chromozomy)



Sitatunga (Lesoň bahenní) (*Tragelaphus spekei*)

$2n = 30$

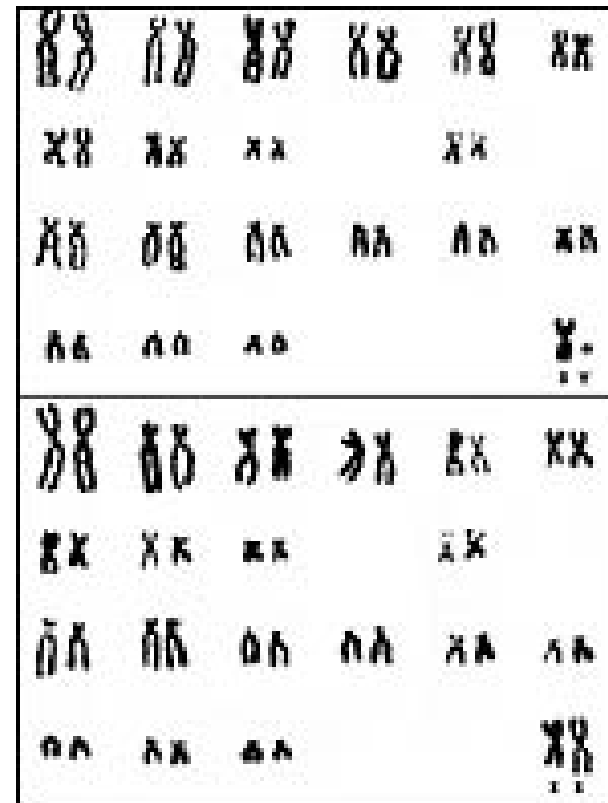




Hyena skvrnitá (*Crocuta crocuta*)

$2n = 40$

3





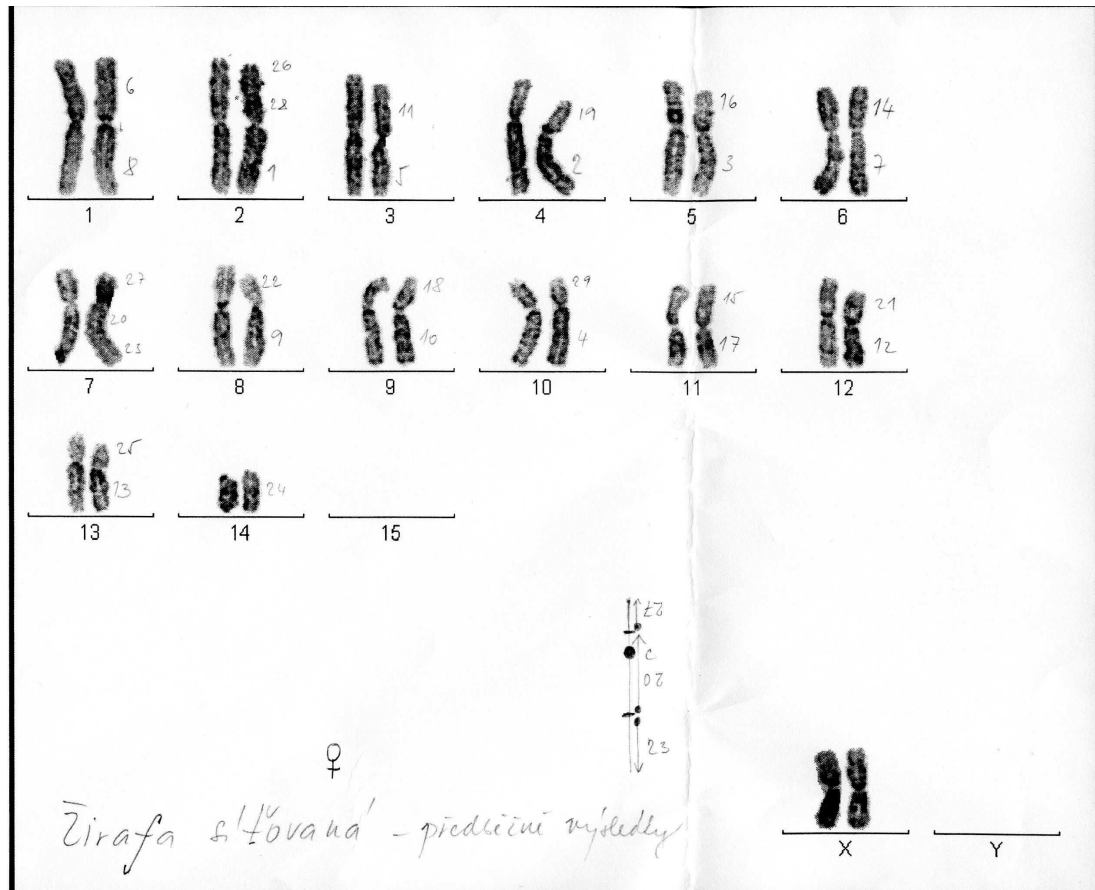
Žirafa síťovaná (*Giraffa camelopardalis reticulata*)

$2n = 30$

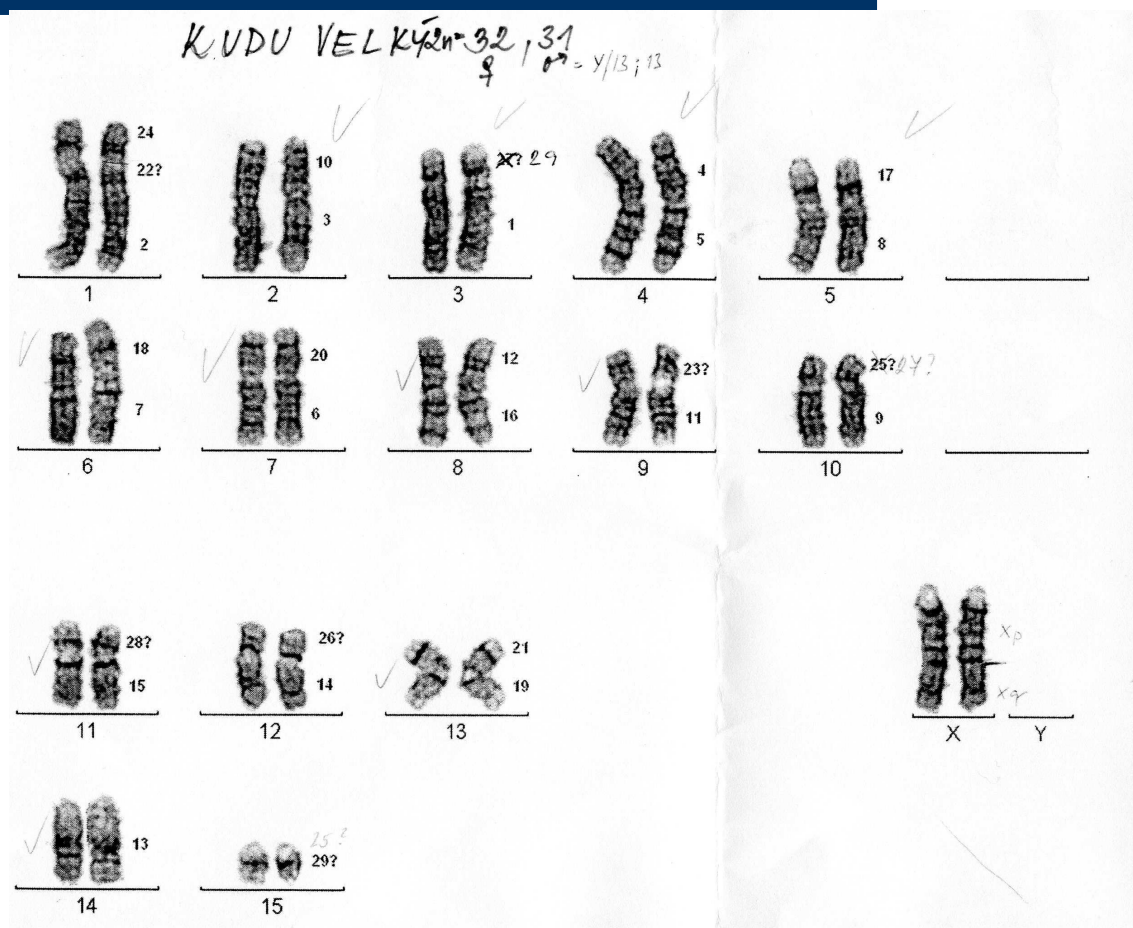
4



- *Giraffa camelopardalis giraffa*
- *G. c. rothschildi*
- *G. c. tippelskirchi*
- *G. c. reticulata*
- *G. c. camelopardalis*
- *G. c. antiquorum*
- *G. c. peralta*
- *G. c. thomicrofti*



Kudu velký (Tragelaphus strepsiceros) 2n = 32 ♀, 31♂ (t(13;Y))

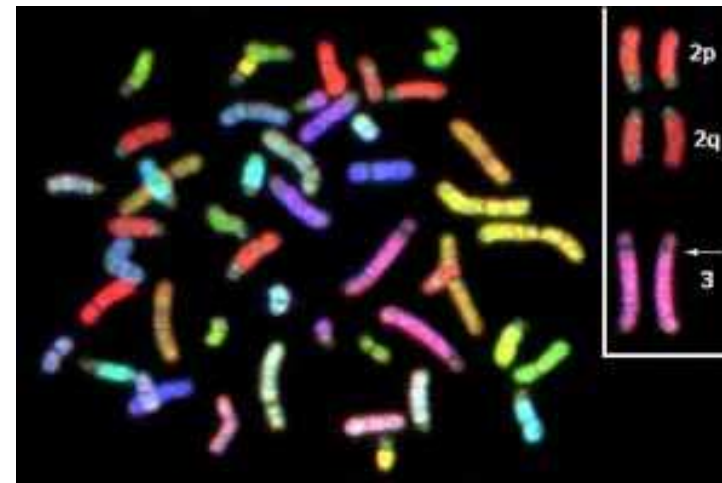
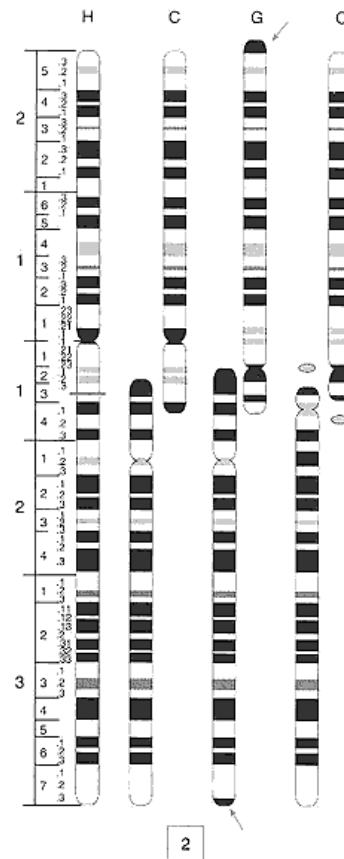


Orangutan (*Pongo pygmaeus*)

Orangutan bornejský (*P.p.pygmaeus*)

Orangutan sumaterský (*P.p.abelii*)

$$2n = 48$$



7

Nosorožec černý (*Diceros bicornis*)

$$2n = 84$$

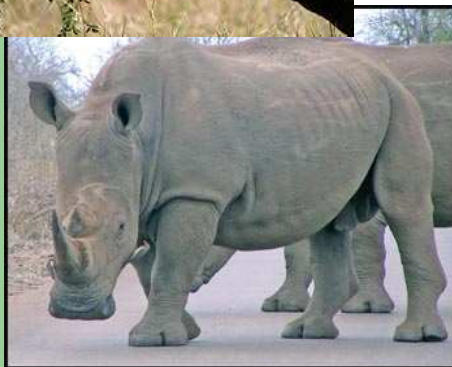
8

Nosorožec bílý (tuponosý) (*Ceratotherium simum*)

$$2n = 82$$



Black Rhinoceros range



White Rhinoceros original range [orange: Northern (*C. s. cottoni*), green: Southern (*C. s. simum*)].

Porovnání dle velikosti dospělých jedinců nosorožců

Nosorožec (hmotnost, délka, výška)

Indický (1,6-2,6t, 420cm, 190cm)

Bílý (1,8t, 450cm, 180cm)

Černý (1,5t, 350cm, 170cm)

Jávský (2t, 300cm, 170cm)

Sumaterský (1t, 300cm, 140cm)

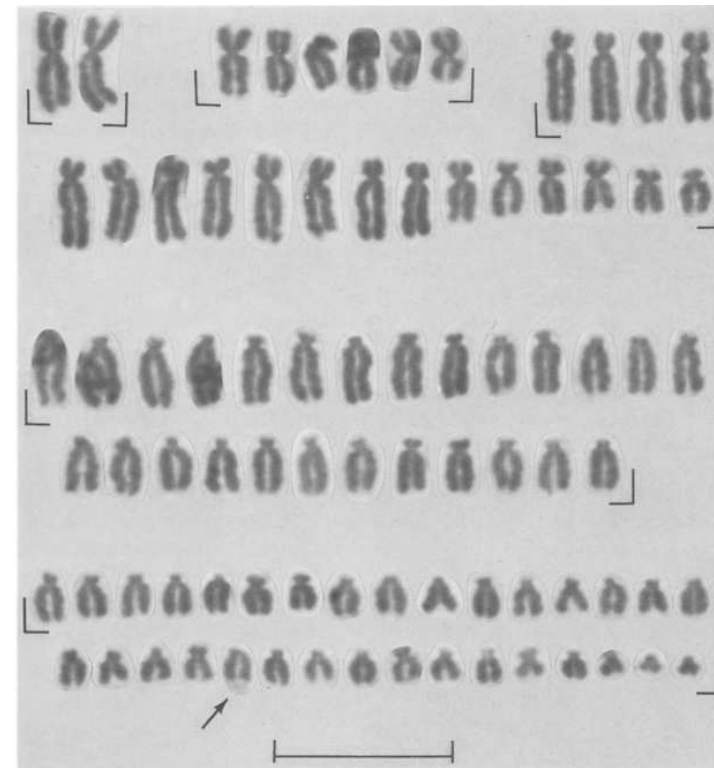
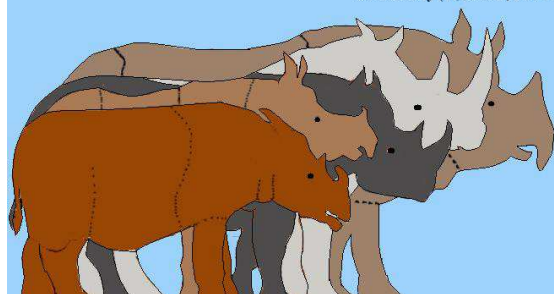
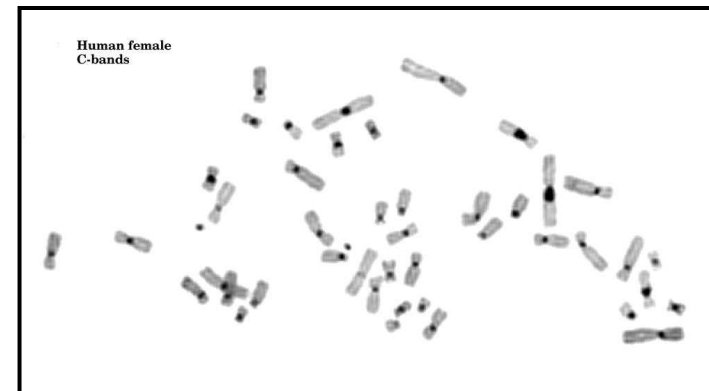
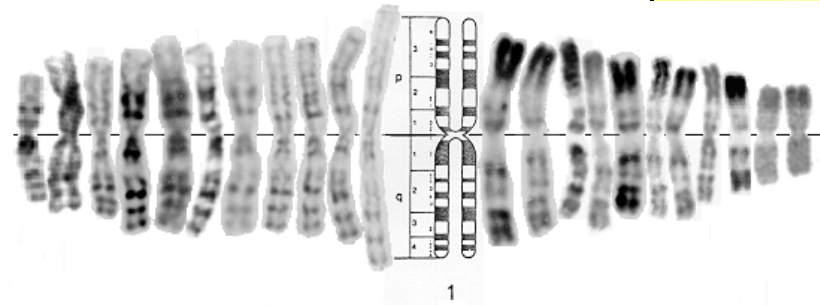
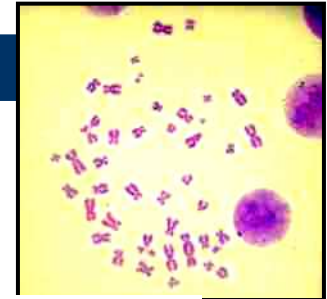


FIG. 1. Chromosomes of a black rhinoceros (acquisition 114M). Satellites (arrow) were consistently seen on one small acrocentric chromosome. Scale indicates 10 μ .

Typy barvení lidských chromozomů

- Klasické barvení
- G-pruhování
- R-pruhování
- C-pruhování

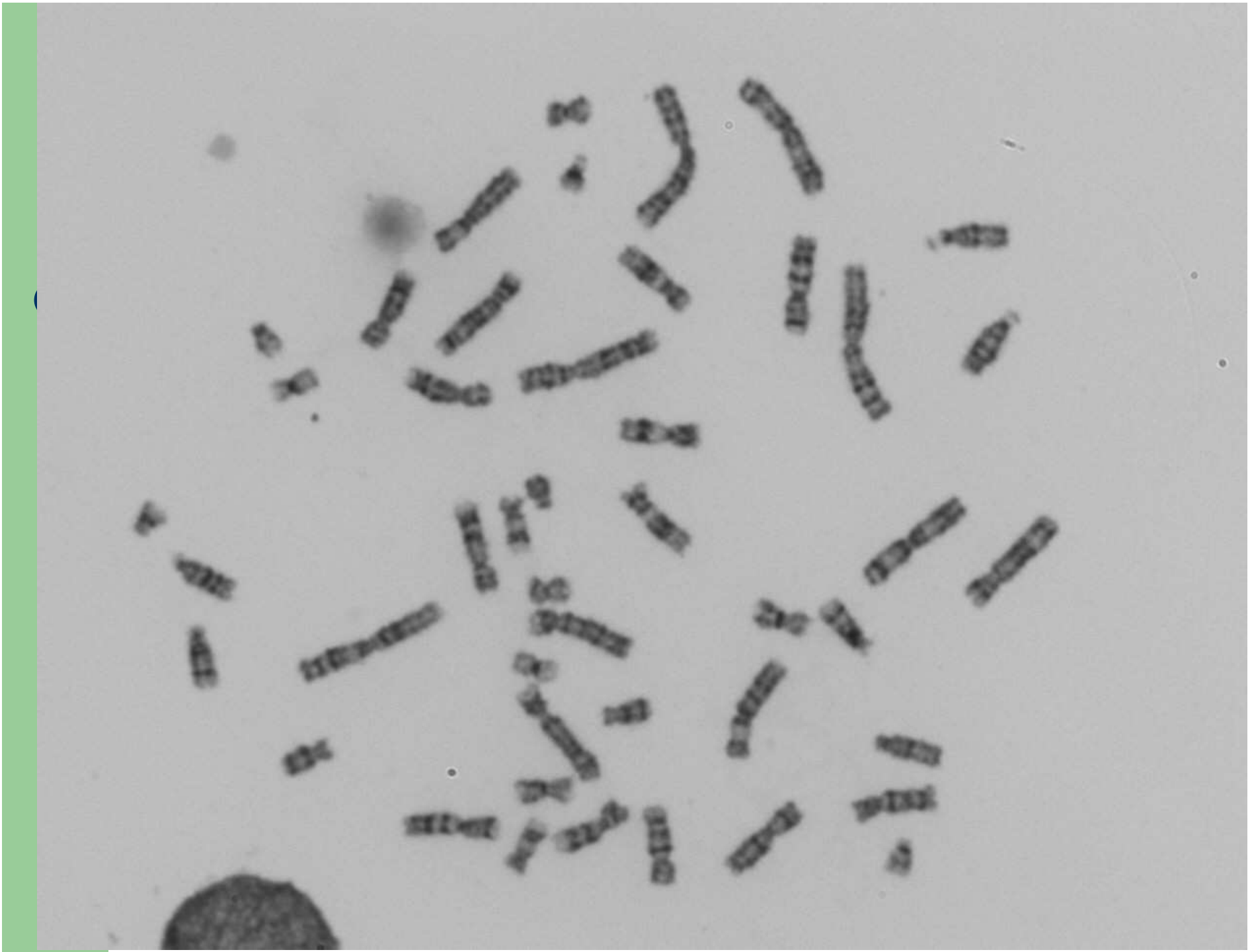


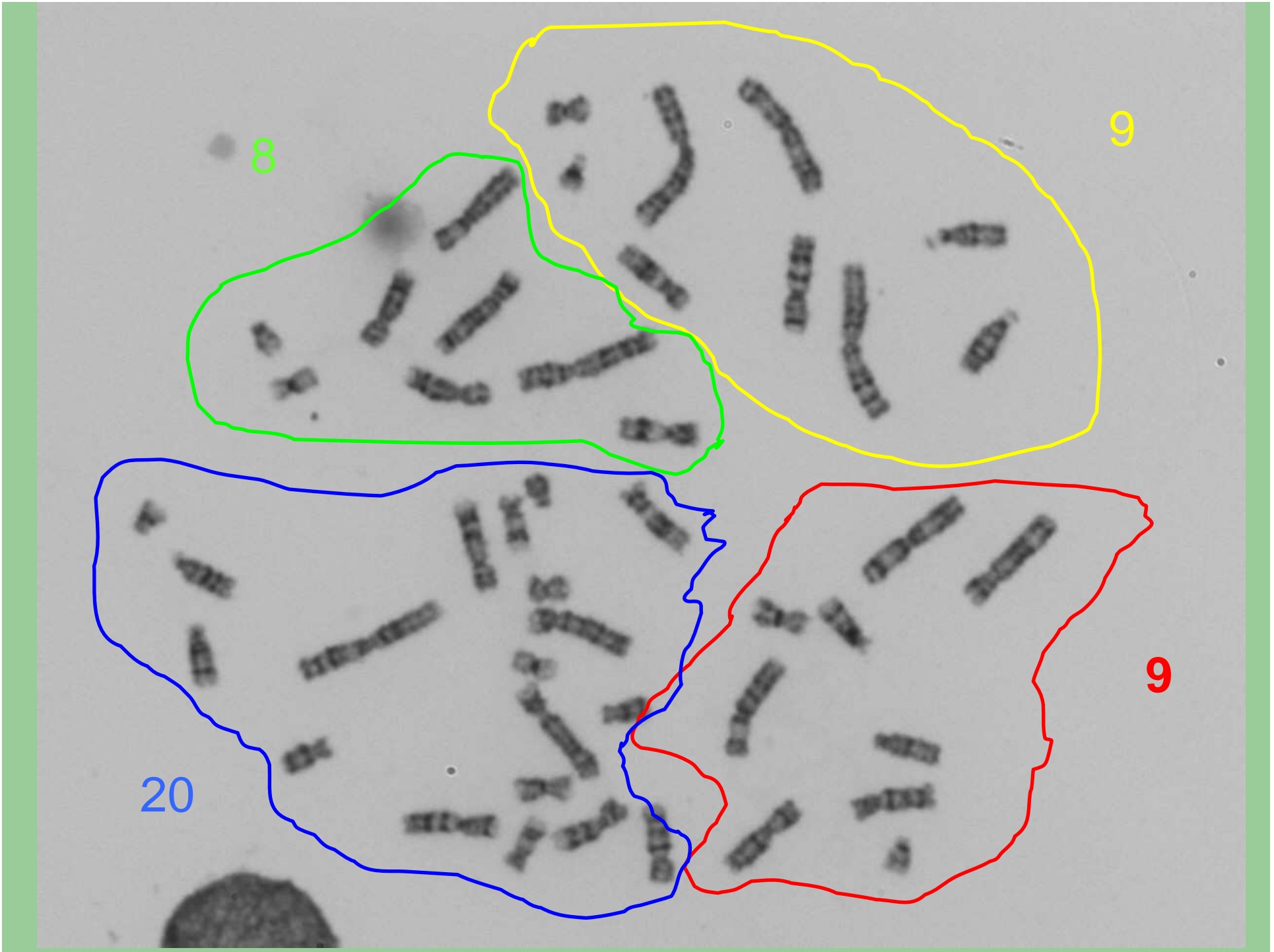
Pozorování lidských chromozomů pod mikroskopem

- Preparáty byly získány z dělicích se **lymfocytů lidské periferní krve**.
- Krev jsme po odběru kultivovali v médiu, kde byly buňky přinuceny k mitotickému dělení.
- Vzniklou suspenzi jsme fixovali, nakapali na skla a napruhovali pomocí G-pruhů (bližší postup v dalším cvičení)

Pozorování lidských chromozomů pod mikroskopem

- Sklo položte (buňkami nahoru!) na stolek mikroskopu a prohlížejte objektivem o malém zvětšení (10x).
- Po vyhledání vhodné mitózy použijte objektiv s vyšším zvětšením (nejlépe 100x) a pozorujte chromozomy barvené G-pruhováním.
- Vhodnou mitózu zakreslete a zkuste spočítat chromozomy.



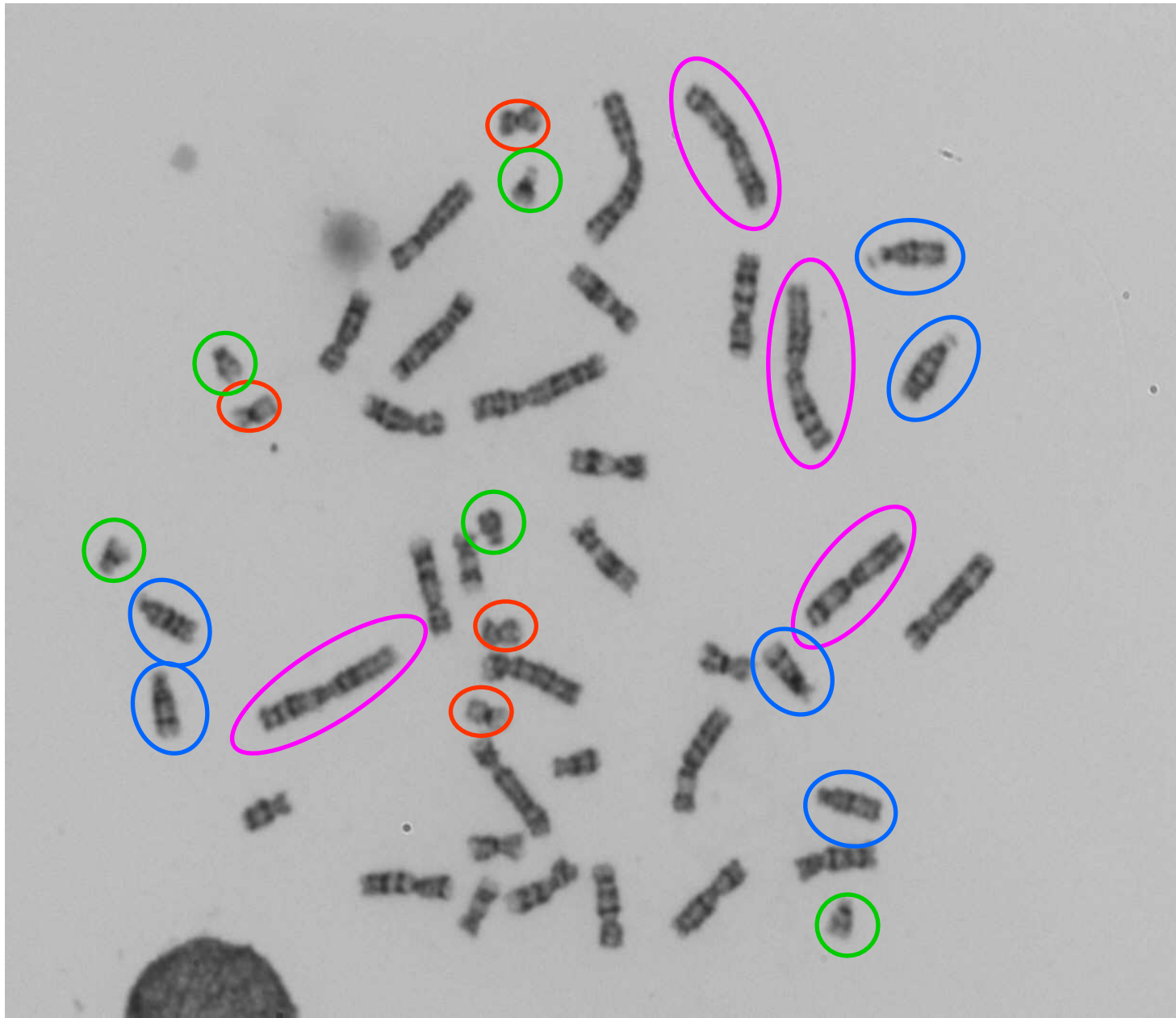


8

9

20

9



velké metacentry

malé metacentry

velké akrocentry

malé akrocentry

zbytek -
submetacentry