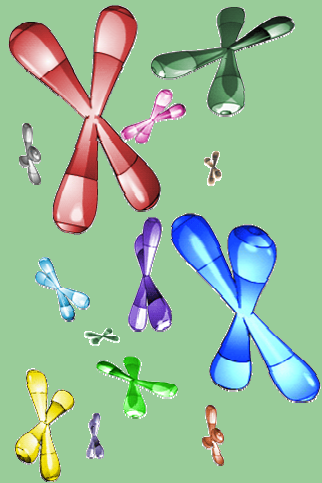


Bi6270c Cvičení z cytogenetiky

Cvičení 2: Klasická cytogenetika



Vladimíra Vranová

Odd. genetiky a molekularní biologie
Ústav experimentální biologie
PřF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

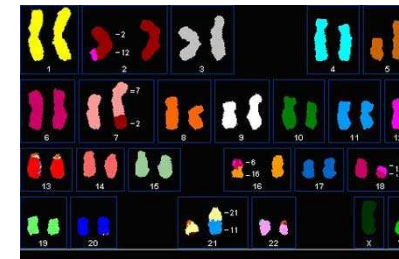
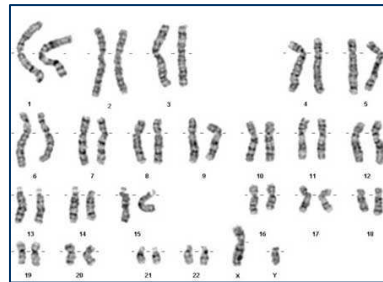
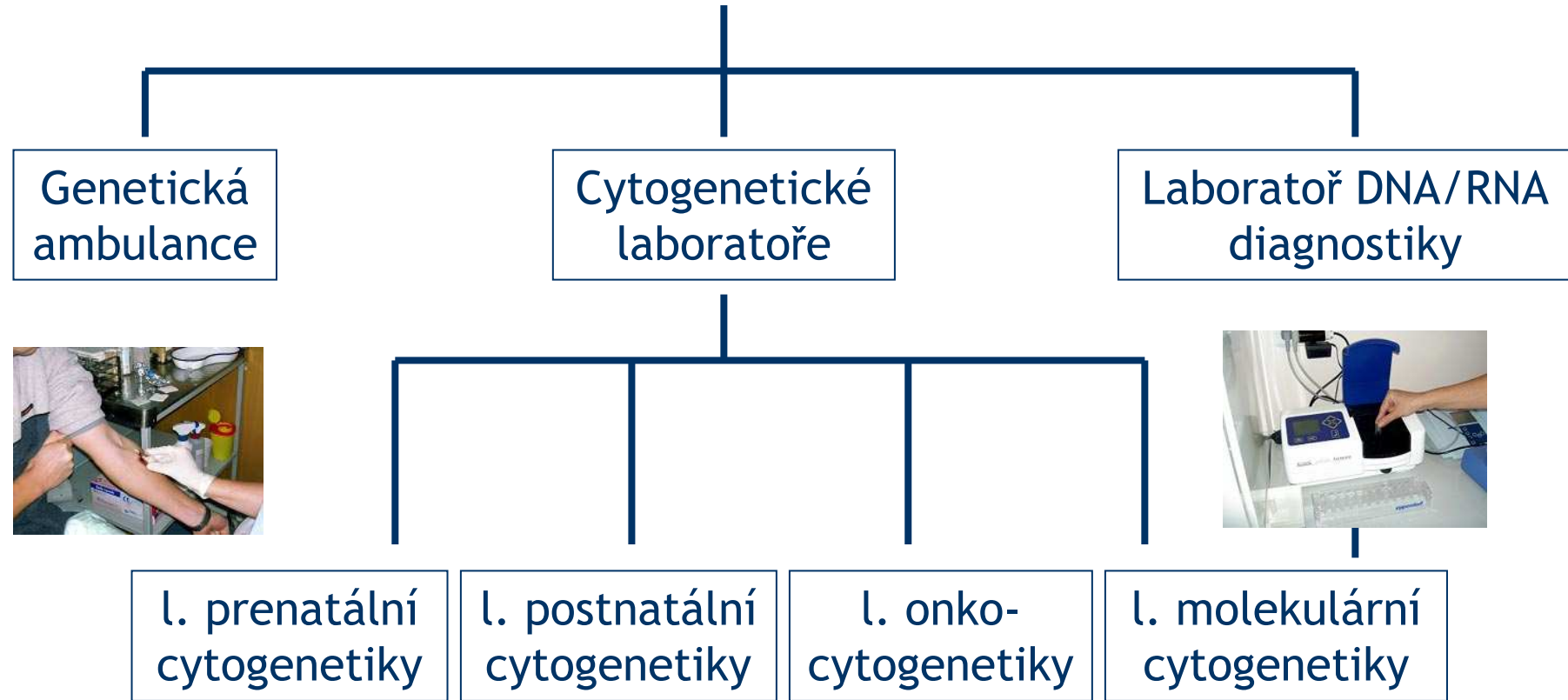
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Klasická cytogenetika

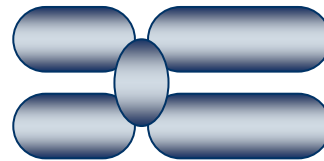
- 1. Genetické pracoviště a možnosti cytogenetických vyšetření.**
- 2. Chromozomy, možnosti jejich kultivace a barvení.**
- 3. Stanovení karyotypu člověka, chromozomové aberace a jejich rozdělení.**



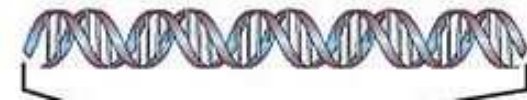
Genetické pracoviště



Možnosti vyšetření

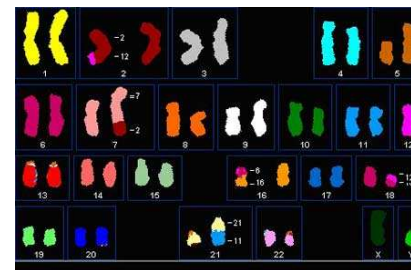


chromozomy



DNA

pacient



**molekulárně-
biologické
vyšetření**

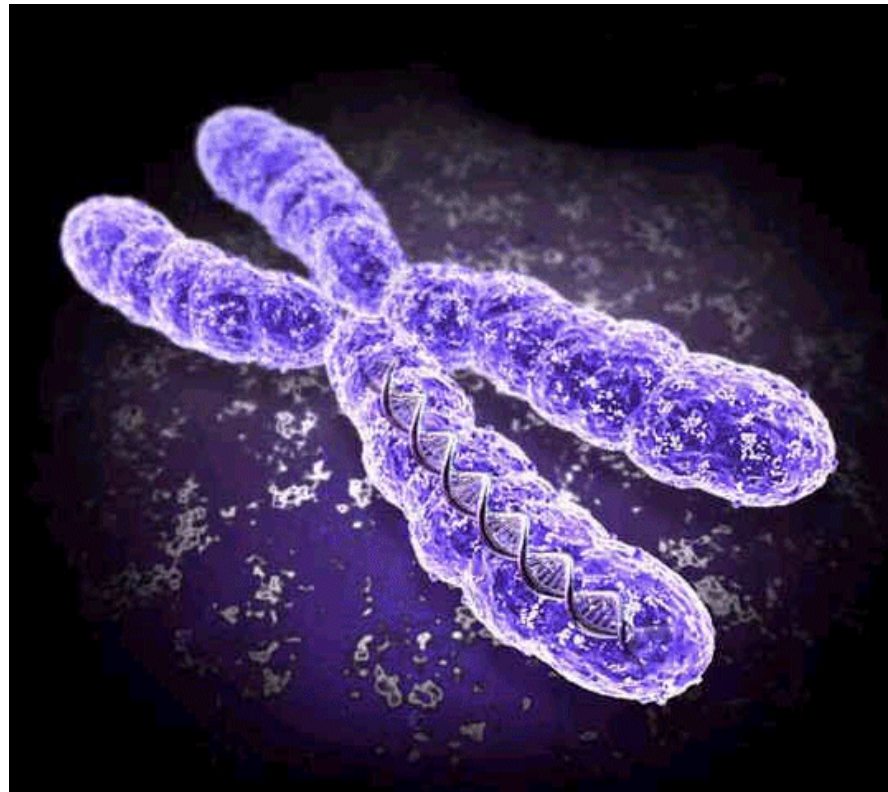
**cytogenetické
vyšetření**

**genealogické
vyšetření**

klasické

**molekulárně-
cytogenetické**

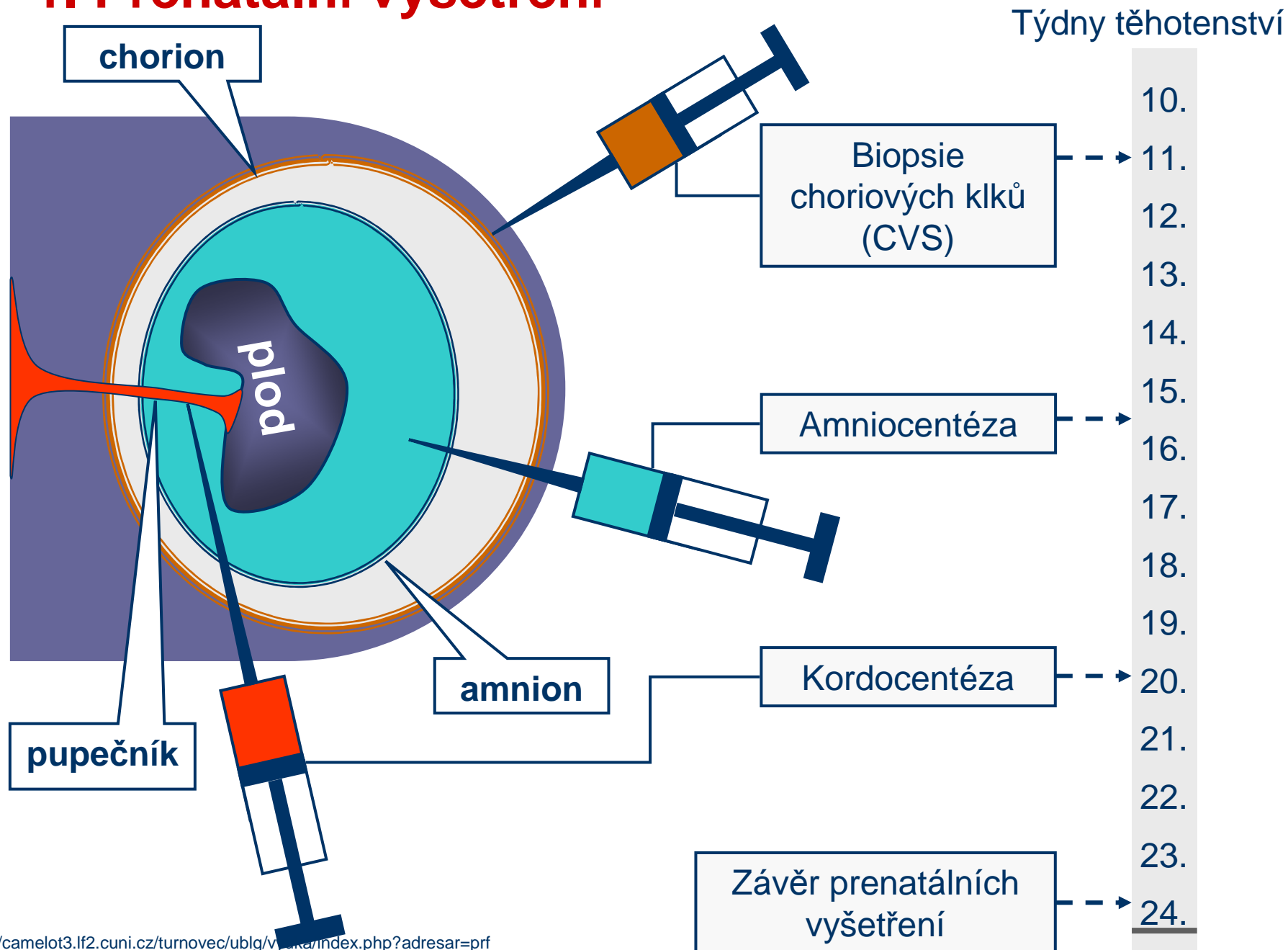
Základem cytogenetického vyšetření je analýza chromozomů.



Úkol 1. Kultivace a zpracování periferní krve pro chromozomální vyšetření



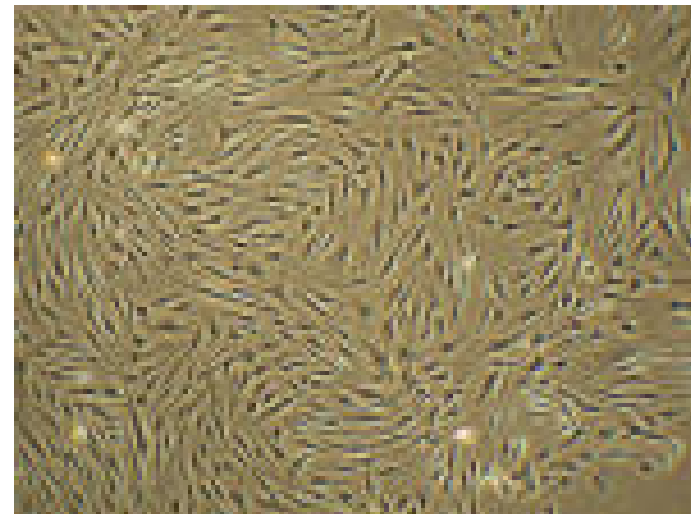
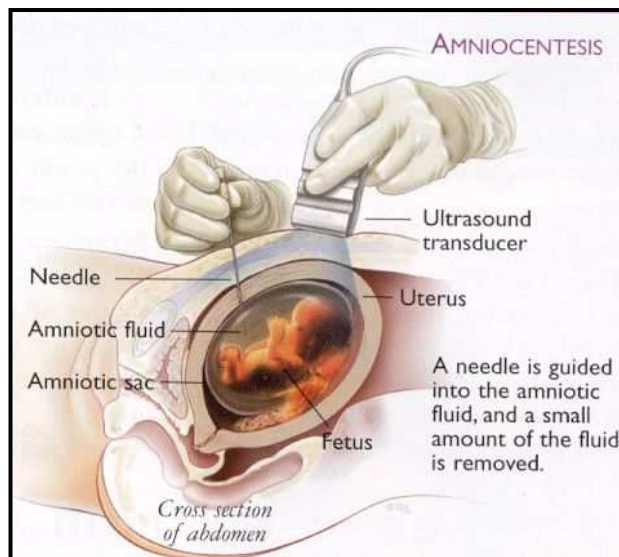
1. Prenatální vyšetření



Prenatální vyšetření:

a) kultivace buněk plodové vody (buňky odloučené z těla plodu)

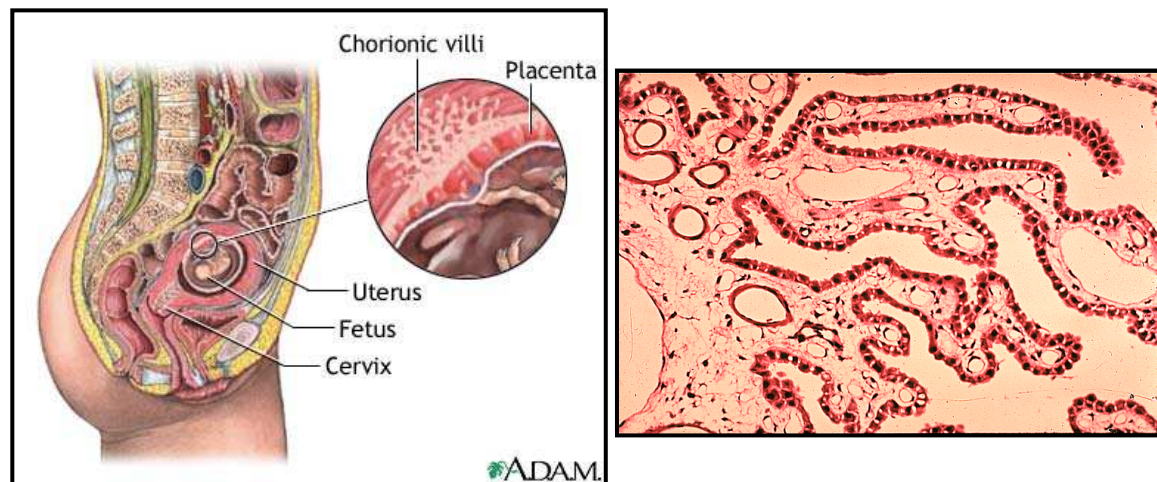
- dlouhodobá kultivace (9-14 dnů)- buňky rostou přisedlé na dně kultivační nádoby v koloniích
- před cytogenetickým zpracováním stažení buněk trypsinem
- ostatní postupy podobné (tj.hypotonie, fixace)



Prenatální vyšetření:

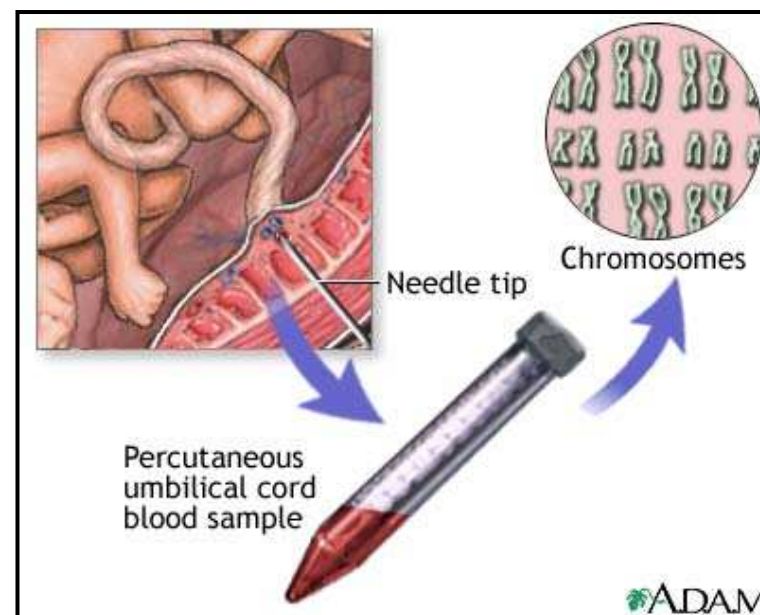
b) vyšetření buněk choriových klků

- přímá metoda nebo krátkodobá kultivace x dlouhodobá kultivace
- rozstříhání očištěné tkáně (event.rozvolnění buněk trypsinem) a nasazení do kultivačního media, kultivace a cytogenetické zpracování
- vyšetřuje se extraembryonální tkáň – určité riziko diskrepance s karyotypem plodu



Prenatální vyšetření: c) kultivace buněk pupečnickové krve

- podobné jako periferní krev
- odběr krve z kličky pupečníku
- krátkodobá kultivace a cytogenetické zpracování



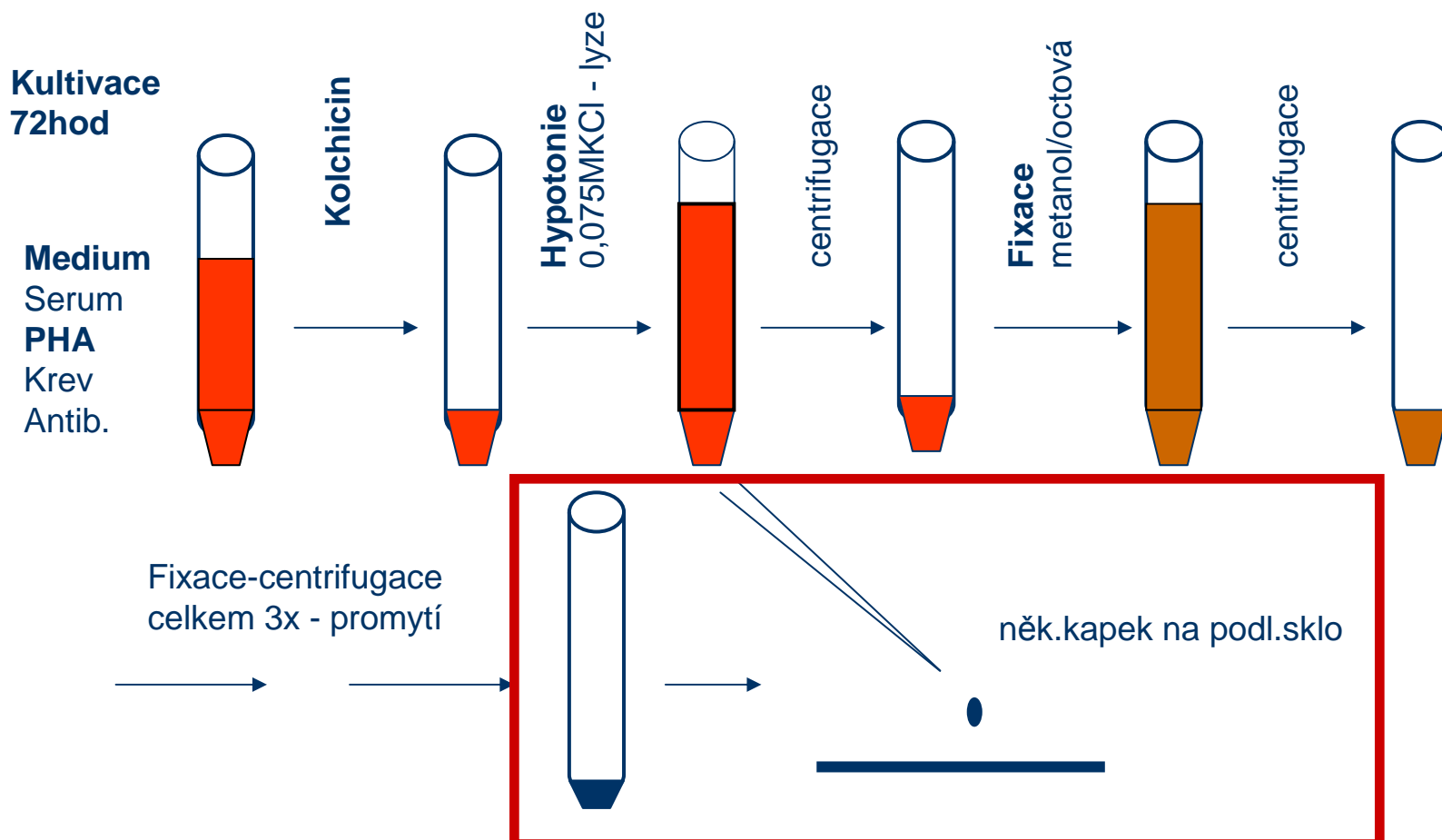
2. Postnatální vyšetření: kultivace periferních lymfocytů

- nasazení plné krve (s heparinem) do **kultivačního media** se sérem a **PHA (phytohemagglutinin** = mitogen)
 - stimuluje především T lymfocyty
- kultivace 48 nebo 72 hodin při 37°C v CO2 termostatu
- zastavení mitotického dělení **kolchicinem** (působí na dělicí vřeténko), centrifugace
- sediment resuspendován v **hypotonickém roztoku** (0,075M KCl, centrifugace
- sediment resuspendován ve **fixačním roztoku** (metanol:kys. octová)
- centrifugace a opakování fixace
- konečný sediment kápnut na podložní sklo-sušení

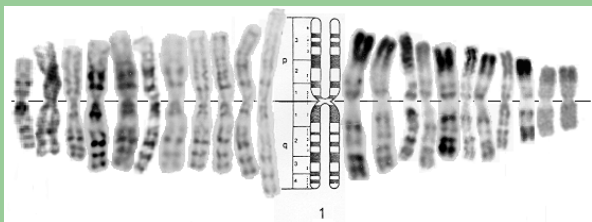
3. Hemato-onkologické vyšetření: kultivace kostní dřeně

- nasazení kostní dřeně do **kultivačního media**
- kultivace 24 hodin při 37°C v CO2 termostatu
- zastavení mitotického dělení **kolchicinem** (působí na dělicí vřeténko), centrifugace
- sediment resuspendován v **hypotonickém roztoku** (0,075M KCl, centrifugace)
- sediment resuspendován ve **fixačním roztoku** (metanol:kys. octová)
- centrifugace a opakování fixace
- konečný sediment kápnut na podložní sklo-sušení

Postnatální vyšetření: kultivace periferních lymfocytů

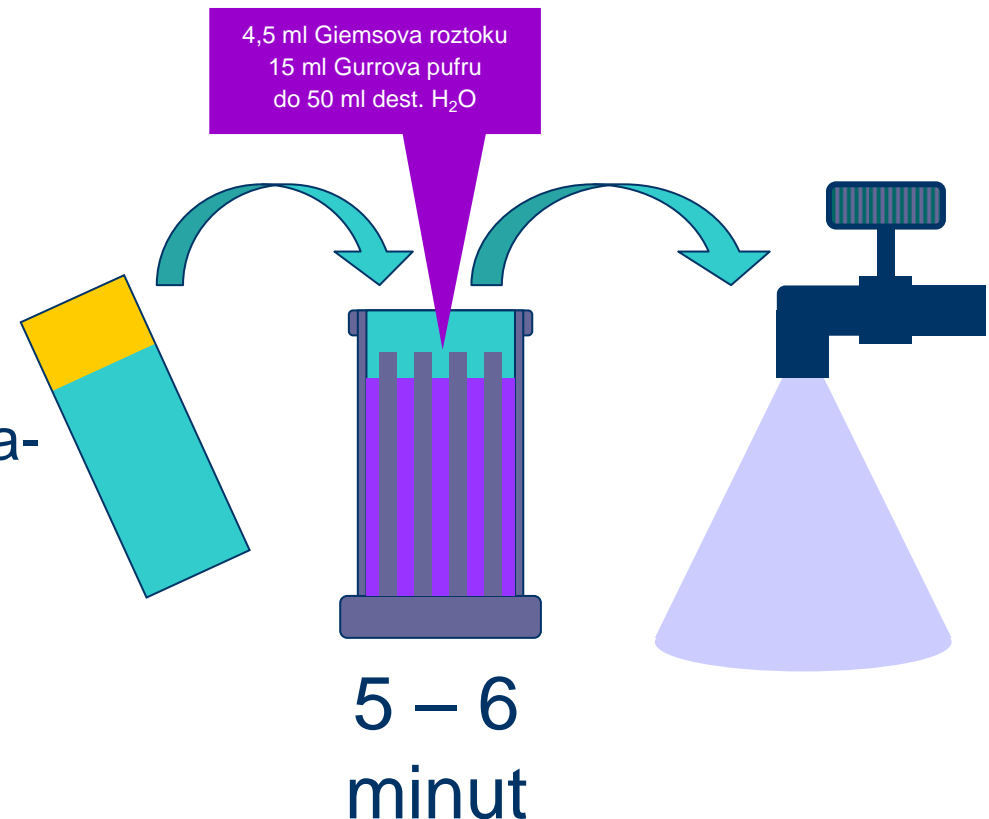


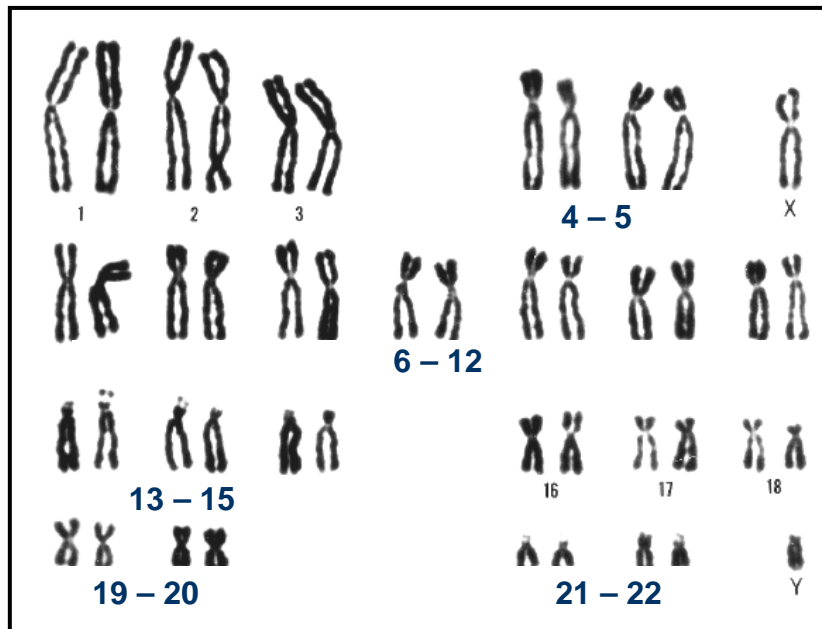
Úkol 2. Barvení a pozorování chromozomů



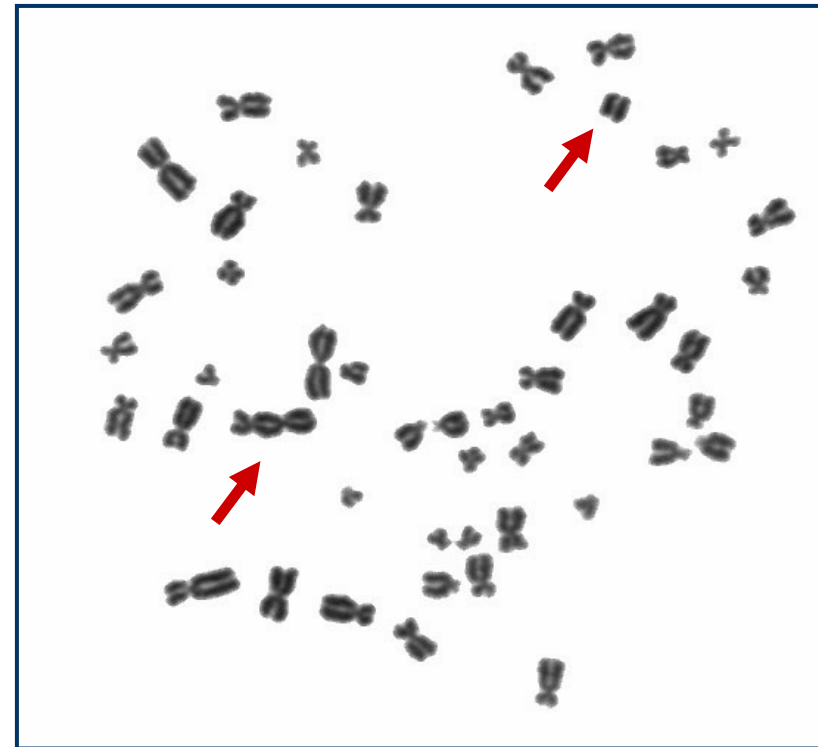
1. KLASICKÉ

- obarvení Giemsou
- neodliší jednotlivé chromozomy
- vhodné pro mutagenní studie
- používáme roztok Giemsa-Romanowski (eventuálně Wrightovo barvivo)





Chromozomy lze rozdělit do morfologických skupin



K detekci získaných chrom. aberací
Dicentrický chromozom + difragment

Schema struktúrnych aberácií

Z'		G'	
Z''		G''	
DF			
F			
DM		DOUBLE MINUTE	
M		MINUTE	
DIC		TIC	
R			
V			chromatidi dova' vy'cimaj
ER		obrykle celá sada chromz. ENDOREDUPLIKACE	

2.DIFERENCIAČNÍ (pruhovací metody)

- odliší jednotlivé chromozomy dle charakteristických pruhů
- vhodné pro studium vrozených chromozomálních abnormalit numerických i strukturních, chromozomálních změn u nádorů

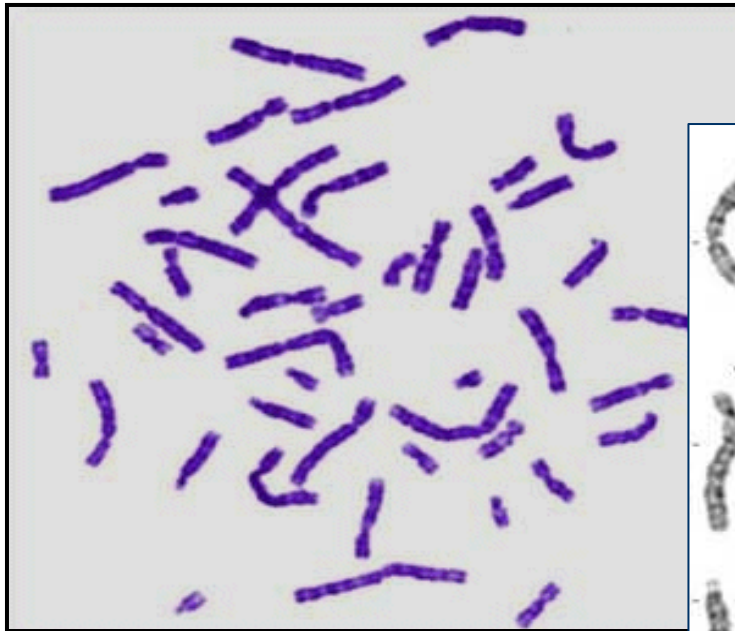
Metoda G pruhů

působení roztoku trypsinu (enzymatická metoda) nebo solných roztoků před vlastním obarvením – různé chromozomální části různě denaturovány trypsinem se odlišně barví Giemsou

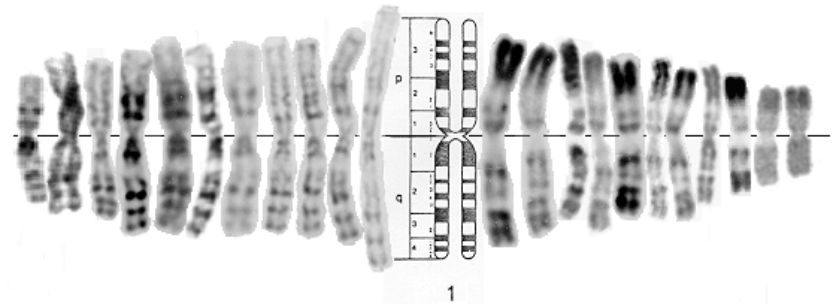
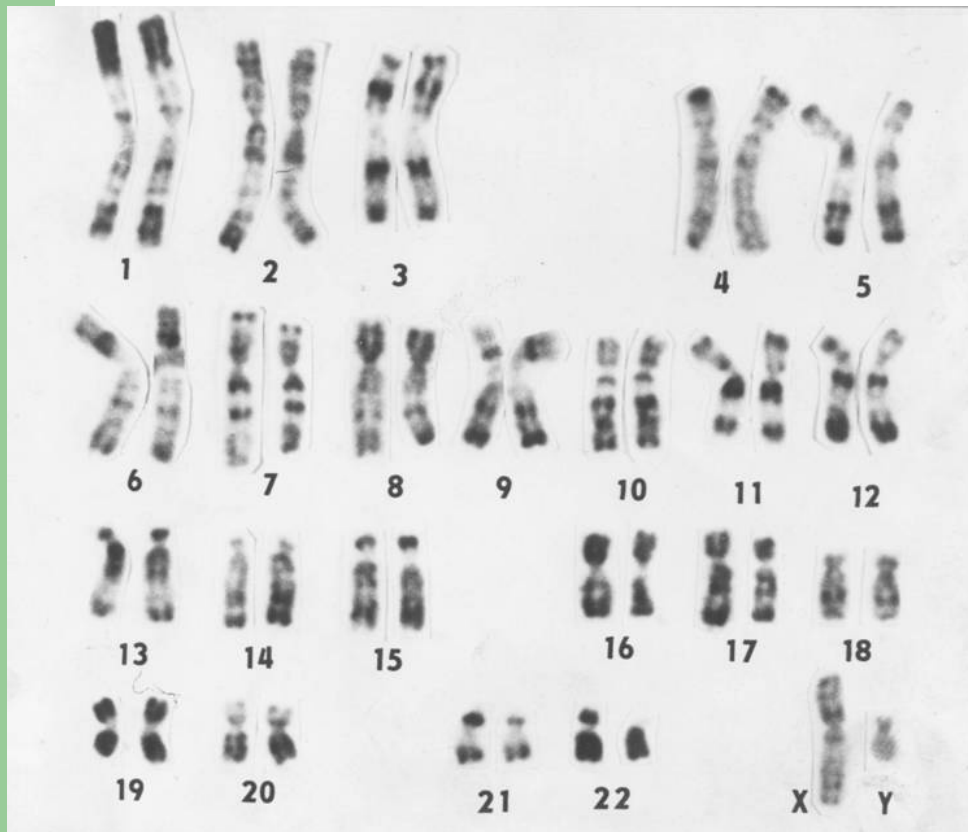
Metoda R-pruhů

působení solných roztoků za vyšší teploty a vyššího pH → pruhování opačné k G pruhům (tmavé G pruhy jsou v R pruzích světlé)

G-pruhy

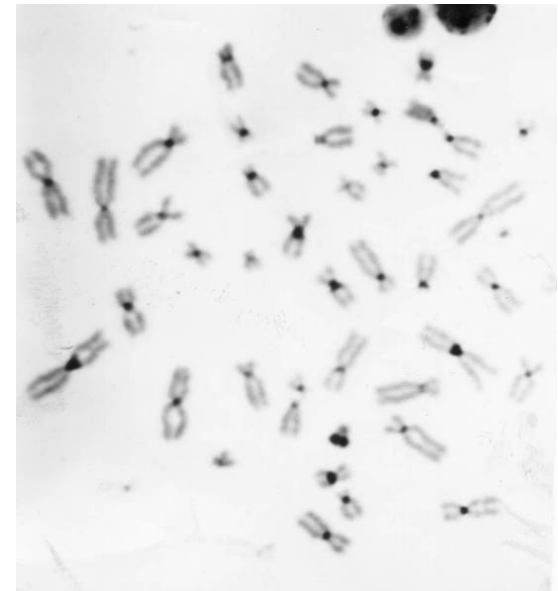


R-pruhy



Barvení heterochromatinu – C-pruhy

- silná denaturace euchromatinových částí: HCl, BA(OH)₂ + solné rotoky za vyšší teploty, Giemsou se pak barví pouze heterochromatinové bloky včetně centromer (jsou resistantnější) – vhodné pro studium heterochromatinových variant

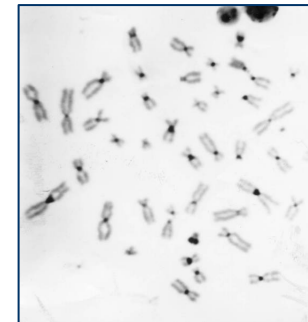
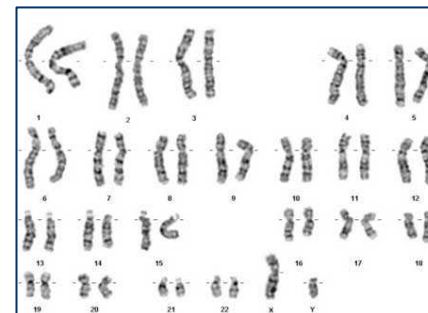
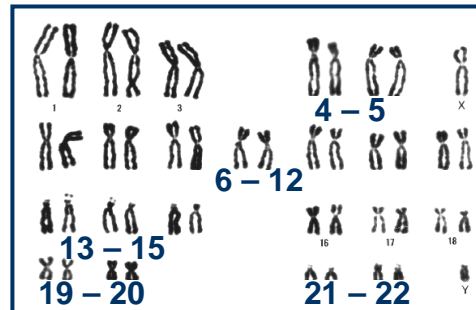


Úkol 2a: Barvení chromozomů pomocí klasického barvení

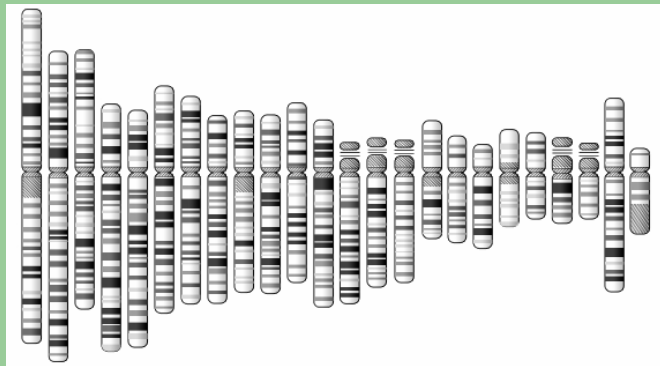


Úkol 2b: Pozorování chromozomů

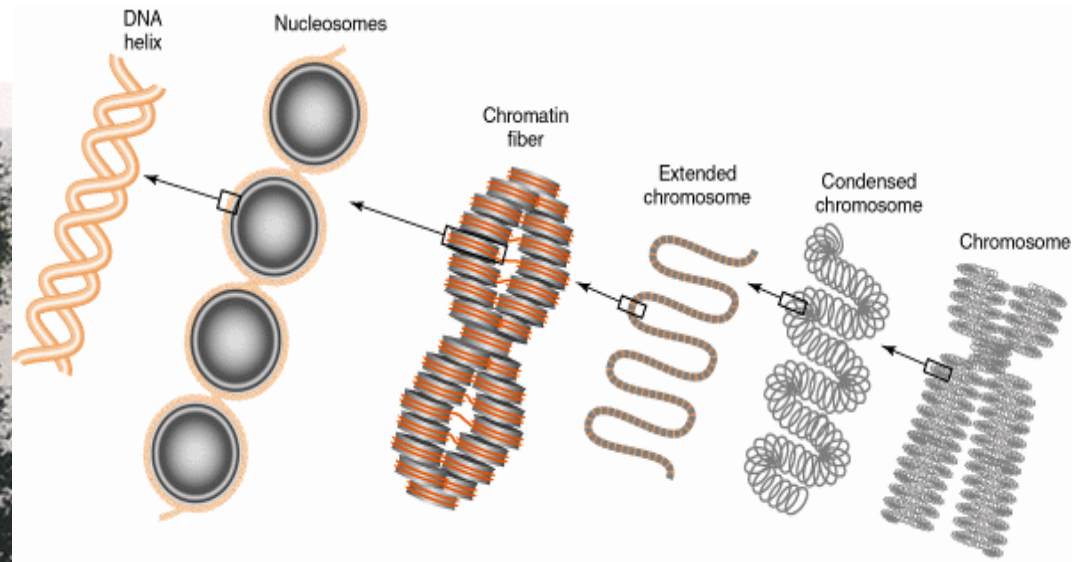
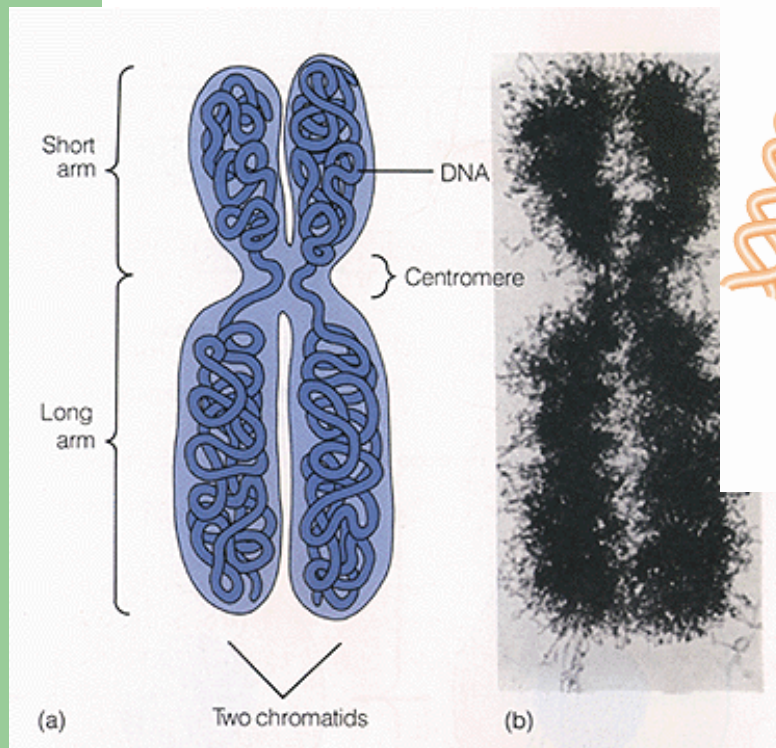
- Pozorujte chromozomy barvené klasicky, pomocí G-pruhování a C-pruhování. Pokuste se najít chromozom Y.
- Pozorujte chromozomy získané z periferní krve, kostní dřeně a tumoru.
- Pokuste se sejmout mitózu pomocí programu LUCIA KARYO.



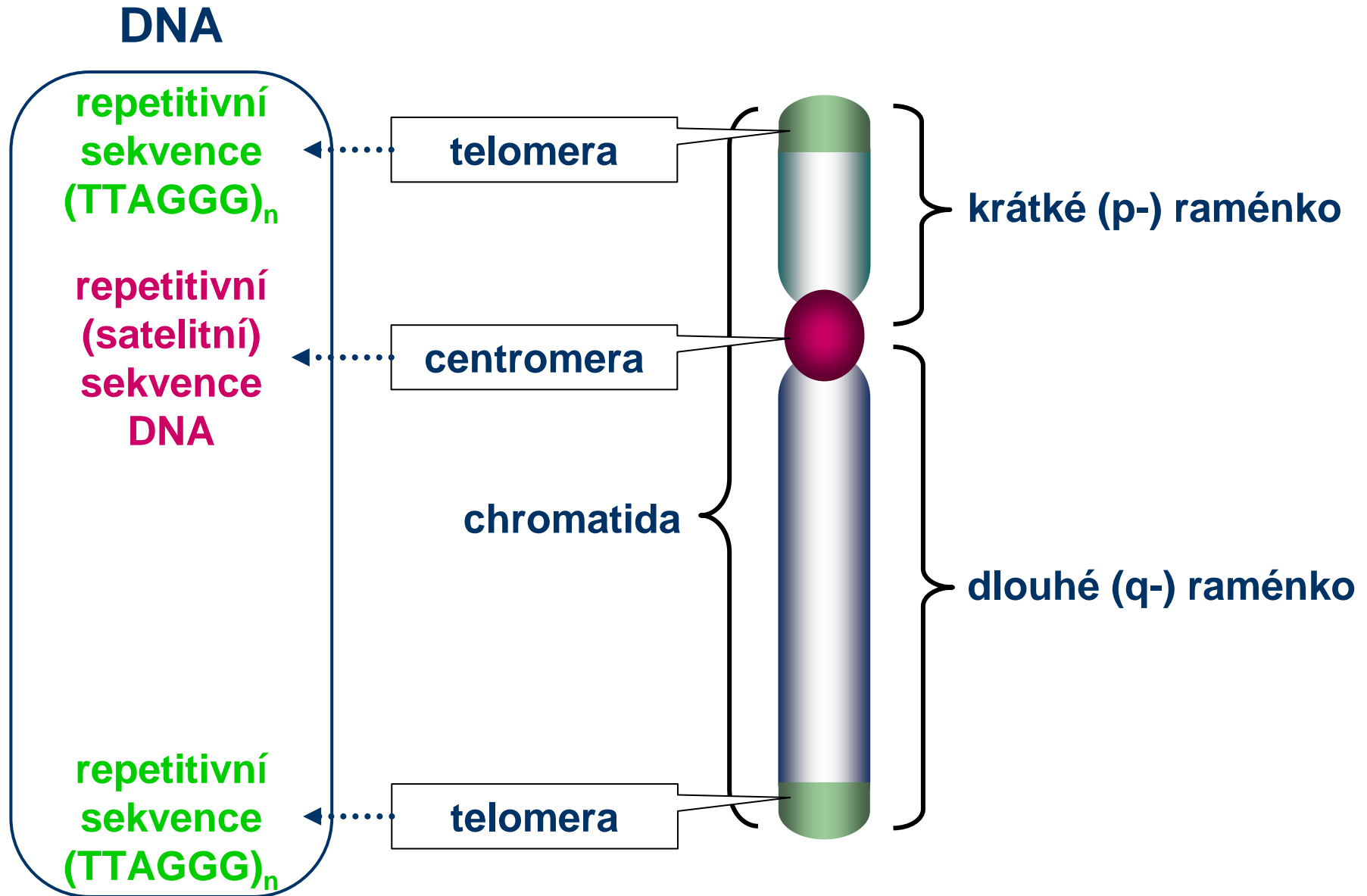
Úkol 3. Sestavení karyotypu člověka



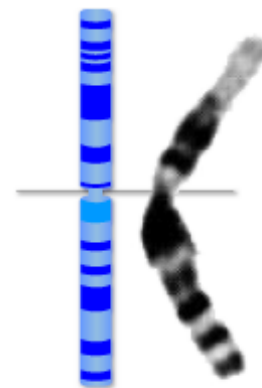
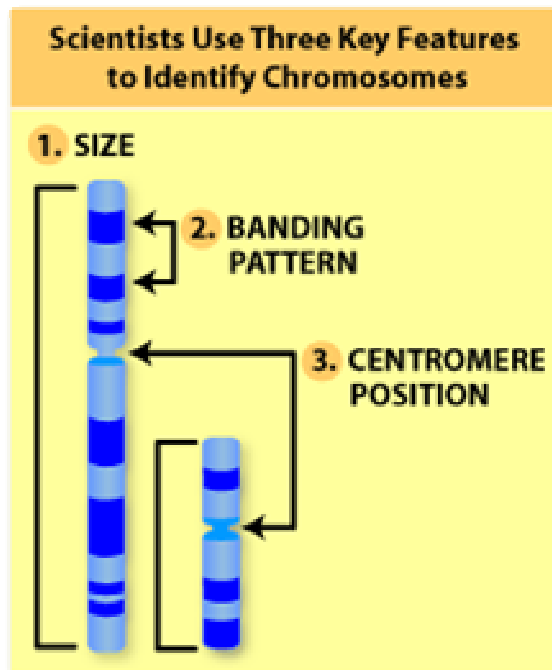
Ultrastruktura chromozomů



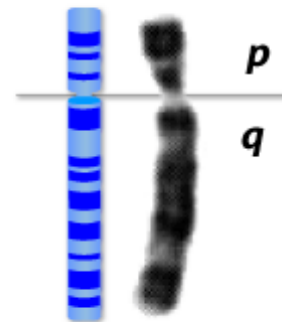
Morfologie chromozomu



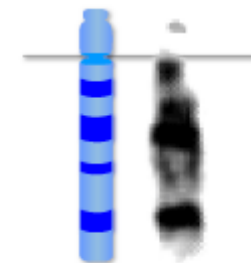
Velikost, poloha centromery a pruhy



Chromosome 1
Metacentric



Chromosome 4
Submetacentric

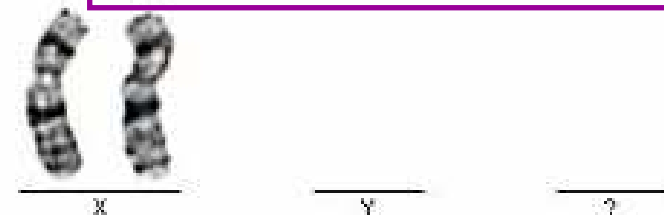
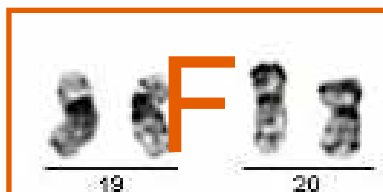
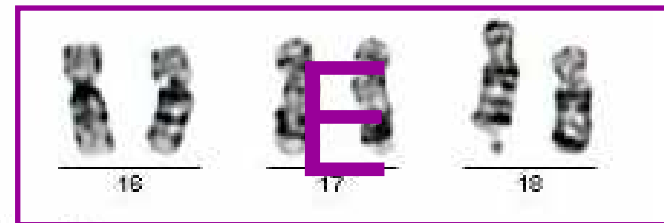
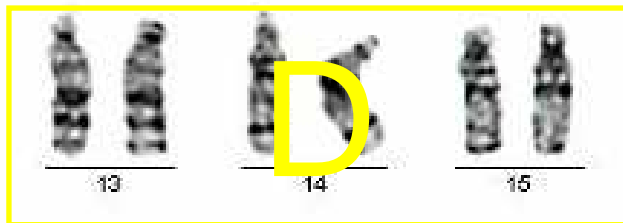
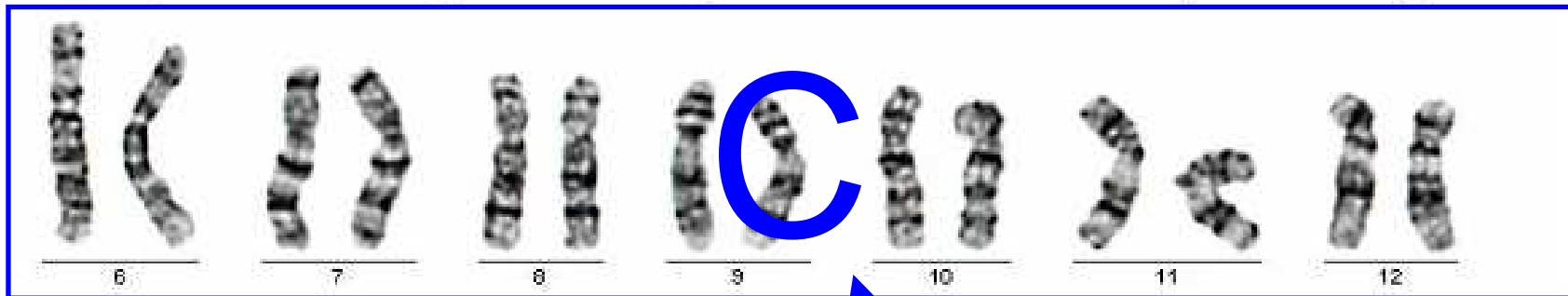
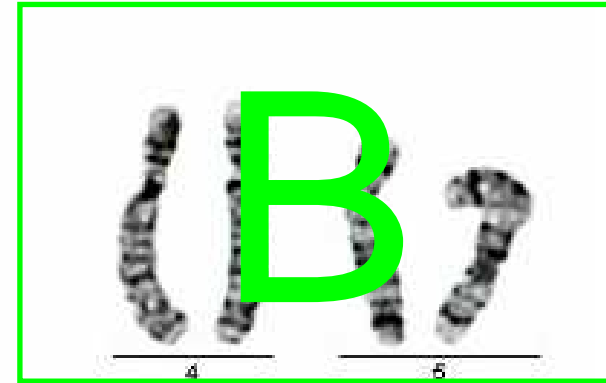
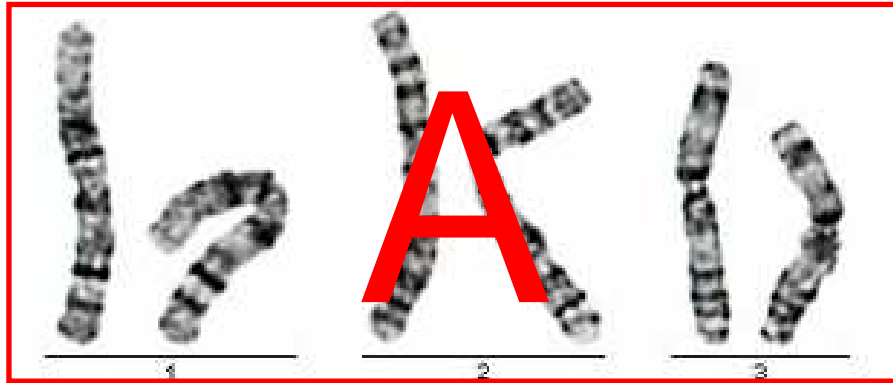


Chromosome 14
Acrocentric

Lidská somatická buňka obsahuje:

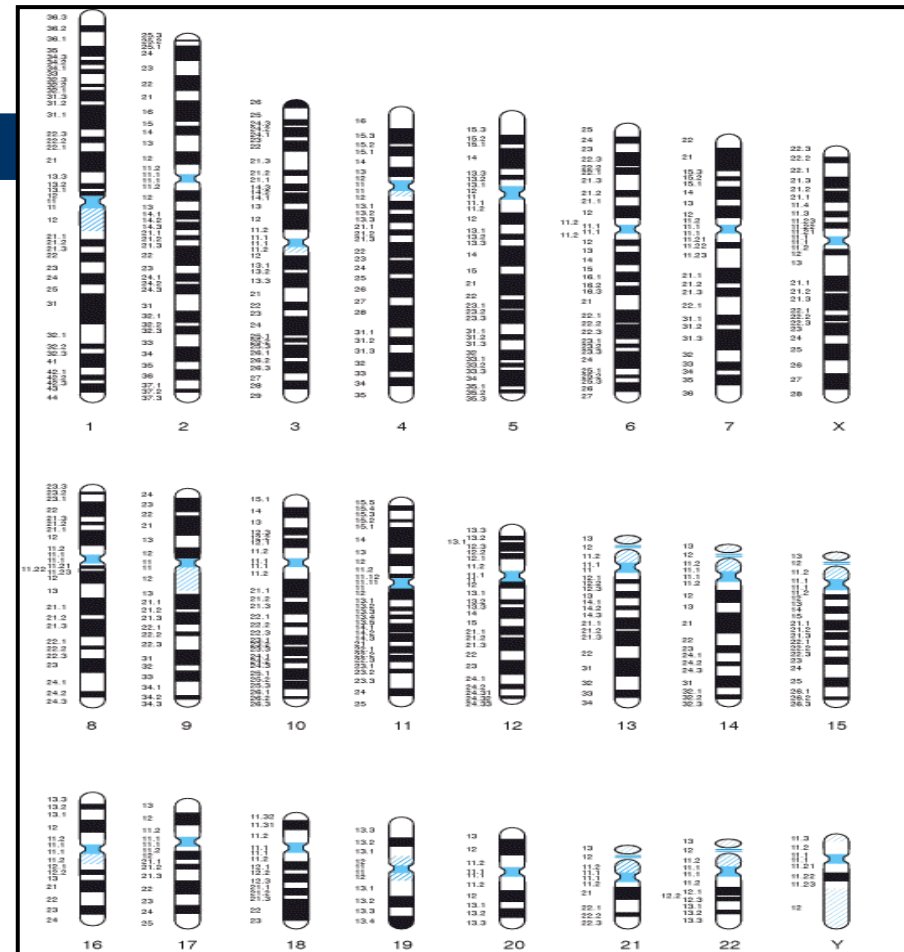
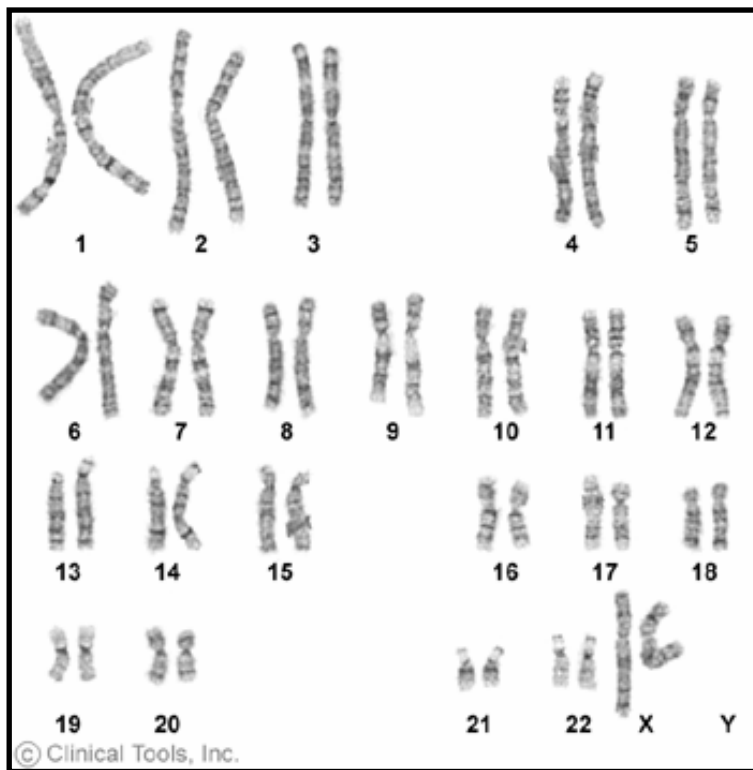
- 23 párů, tj. 46 chromozomů
 - 22 párů autozomů
 - 1 pár gonozomů (XX nebo XY)
- 7 velikostně a morfologicky odlišných skupin chromozomů (A, B, C, D, E, F, G)

Karyotyp člověka



Chromozomové složení buňky udává karyotyp

Karyotyp lidské somatické buňky



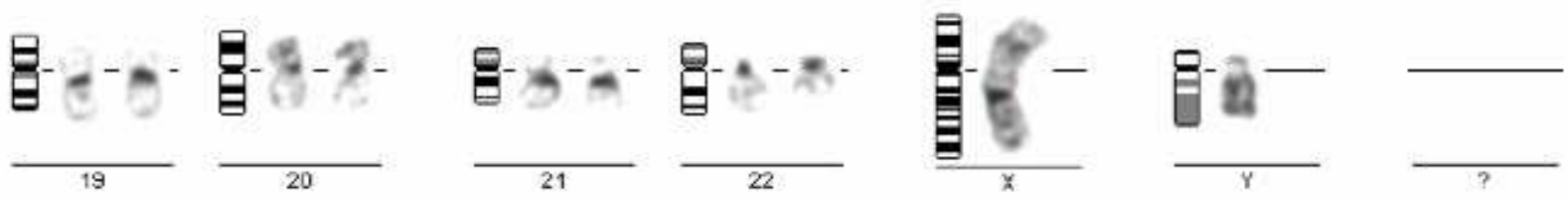
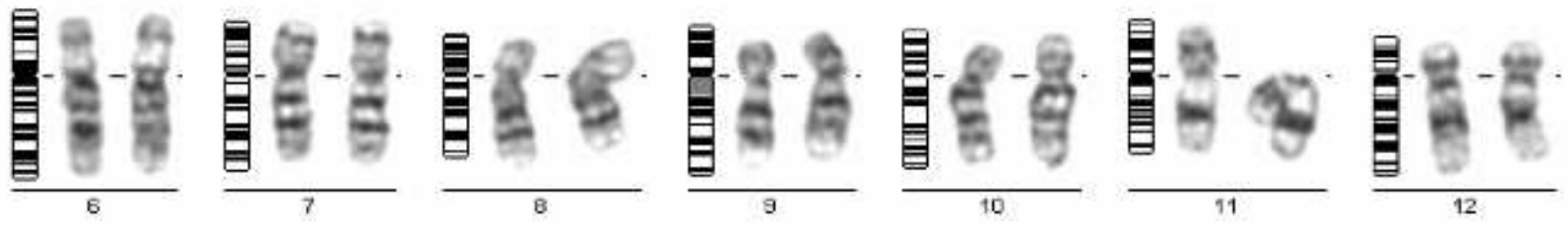
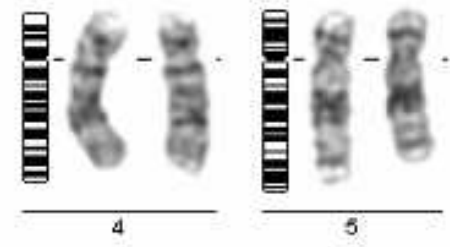
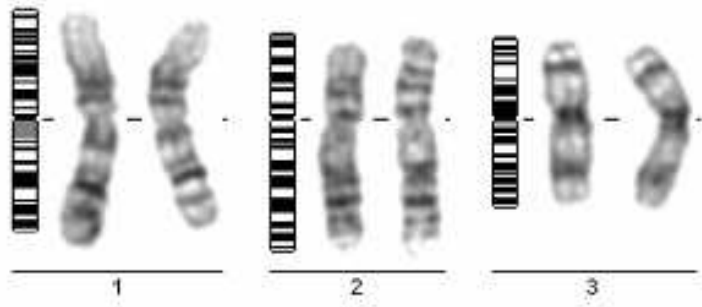
Idiogram lidských chromozomů

Úkol 3a: Sestavte karyotyp člověka

<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/karyotype/>

LUCIA KARYO

- LUCIA KARYO umožňuje:
 - nasnímání obrazů z mikroskopu
 - úpravu obrazů (kontrast, pruhování, barvení)
 - oddělování dotýkajících se chromosomů
 - „inteligentní“ klasifikaci chromosomů
 - tvorbu karyogramů
 - tvorbu zpráv-reportů (RTF formát)



Úkol 3b: Práce s LUCIA KARYO

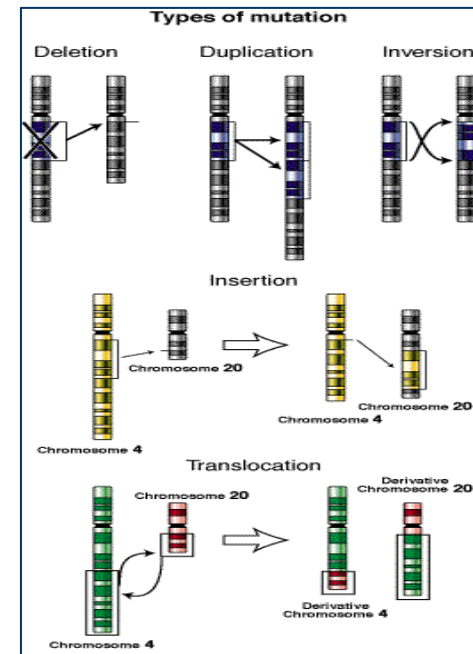
- Segmentace, oddělení jednotlivých chromosomů
- Odstranění buněk a překřížených chromosomů
- Karyotypování
- Posouzení karyotypu, možné odchylky od standartu

Chromozomové aberace a jejich rozdělení

Chromozomové mutace - poškození chromozomů jako příčina genetických onemocnění

a) změny v počtu chromozomů (aneuploidie, polyploidie)

b) změny ve struktuře chromozomů – chromozomové aberace (delece, duplikace ...)



Úkol 3d: Pojmenujte následující chromosomové aberace.

<http://genetika.wz.cz>

Písmenka označují jednotlivé úseky, * označuje centromeru.

ABCDEF*GHIJKL - normální chromosom

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. ABEF*GHIJKL - | Intersticiální delece úseku CD |
| 2. ABBCDEF*GHIJKL - | Duplikace úseku B |
| 3. CBADEF*GHIJKL - | Paracentrická inverze (úsek ABC) |
| 4. ABCDHG*FEIJKL - | Pericentrická inverze (úsek EF*GH) |
| 5. DEF*GHIJKL - | Terminální delece úseku ABC |
| 6. ABCDEF*FEDCBA - | Isochromosom (raménko ABCDEF) |
| 7. ABCDEF*GHIXYZJKL - | Inzerce úseku XYZ |

Zápis karyotypu podle mezinárodní cytogenetické nomenklatury (ISCN)

- Udáváme celkový počet všech chromozomů a pak konstituci gonozomů
muž ... 46,XY, žena ... 46,XX
- Udáváme jednotlivé aberace v pořadí: numerické a strukturní aberace
- **Numerické: -, +**
- **Strukturní:**
 - del** - delece
 - dup** - duplikace
 - inv** - inverse
 - i** - isochromozom
 - r** - ring chromozom (kruhový chromozom)
 - t** - translokace
 - der** - derivovaný, pozměněný chromozom
 - 45, X / 46, XX** - mosaika

Úkol 3c: Zapište karyotypy u uvedených jedinců.

<http://genetika.wz.cz>

Zdravý muž	- 46,XY
Zdravá žena	- 46,XX
Žena s Turner syndromem	- 45,X
Muž s Klinefelter syndromem	- 47,XXY
Holčička s Patau syndromem	- 47,XX,+13
Chlapeček s Down syndromem	- 47,XY,+21
Muž s translokací 14;21	- 46,XY,t(14;21)

Dále zapište diagnózu dle následujících karyotypů.

45,X	Žena s Turnerovým syndromem (monosomie X chromosomu)
47,XXX	Žena s trisomií X ("Superfemale")
46,XX, t(14;21)	Žena s translokací 14;21
46,XY,del(5p)	Muž s delecí krátkého raménka 5. chromosomu (Cri du chat syndrom)