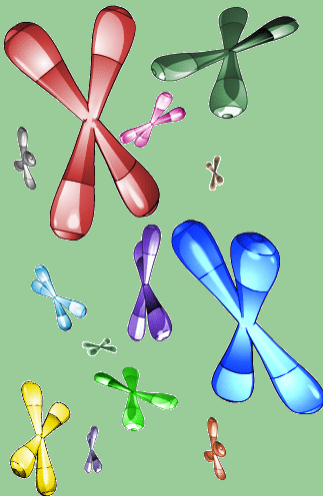


# Bi6270c Cvičení z cytogenetiky 2014



**Aneta Mikulášová**  
**Vladimíra Vallová**

**Odd. genetiky a molekulární biologie**  
**Ústav experimentální biologie**  
**PřF MU**

# Organizační záležitosti

- Mgr. Aneta Mikulášová, e-mail:  
[aneta.mikulas@seznam.cz](mailto:aneta.mikulas@seznam.cz); [kugl@sci.muni.cz](mailto:kugl@sci.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/>

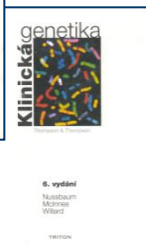
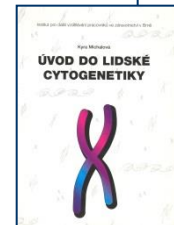
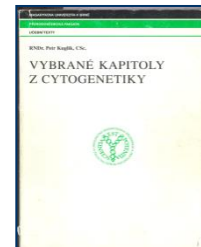


# Organizační záležitosti

- jarní semestr 2014 – 13 vyučovacích týdnů
- 3 skupiny – A, B, C; cvičení každý třetí týden
- A: **18.2., 11.3., 1.4., 22.4.**
- B: **25.2, 18.3., 8.4., 29.4.**
- C: **4.3., 25.3., 15.4., 6.5.**
- Exkurze na OLG FN Brno
- Univerzitní kampus, A13, Bohunice – Kamenice
- pavilon A36/209
- 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

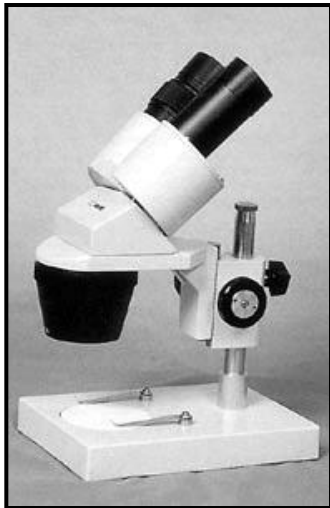
- 1) Do laboratoře vstupujeme jen se souhlasem vyučujícího a **v pracovním oděvu**.
- 2) Před začátkem vlastní práce se seznámíme s pracovním návodem a během práce jej dodržujeme. Smíme provádět pouze práce, které jsou nařízeny a povoleny vyučujícím a pod jeho dohledem.
- 3) Před začátkem vlastní práce 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.

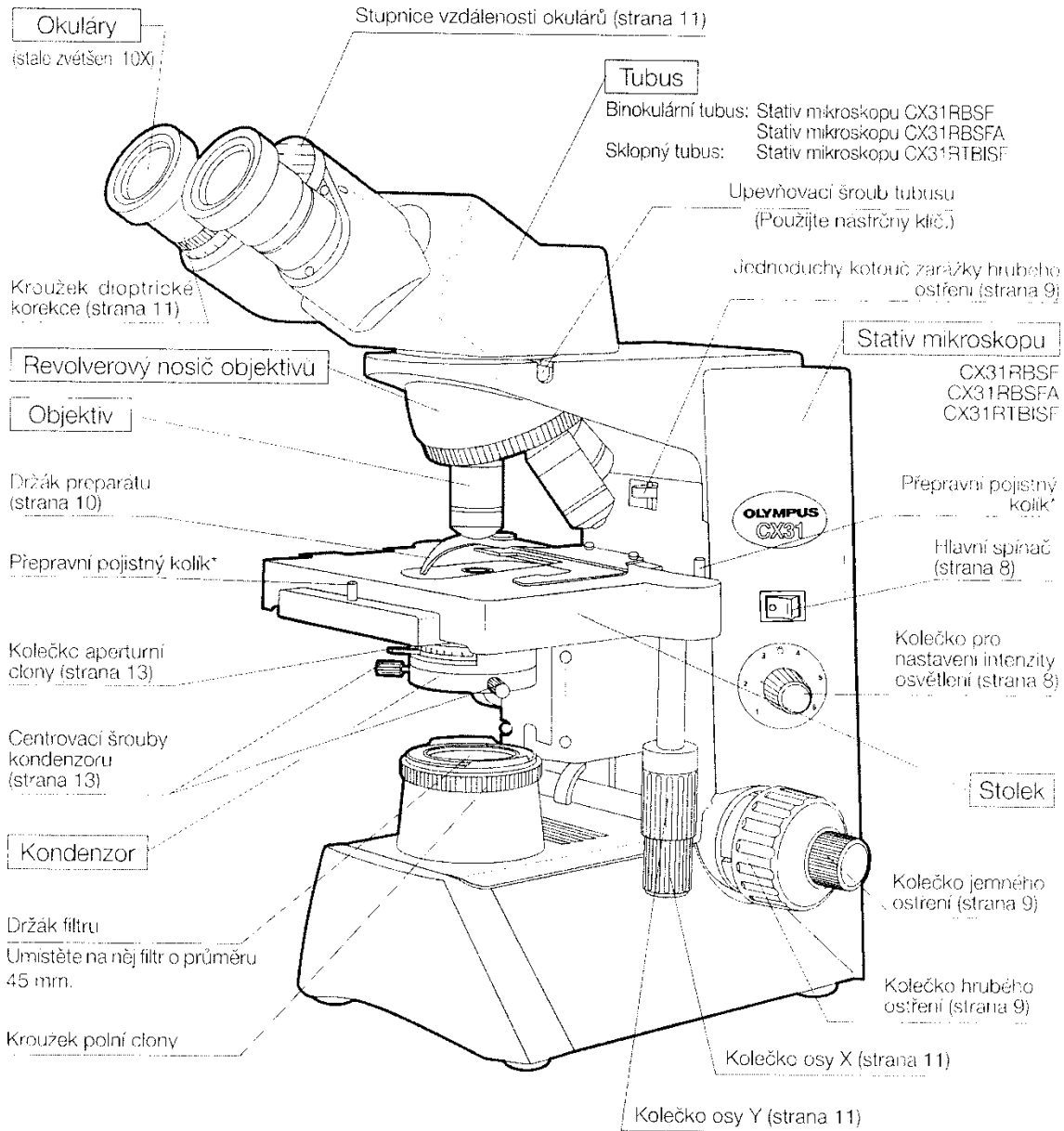


# Úkol 1: Mikroskop CX31- Olympus

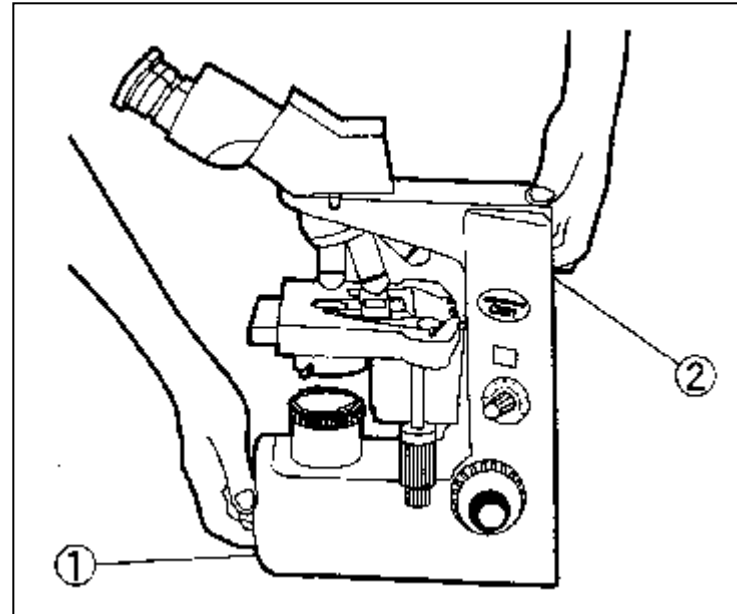
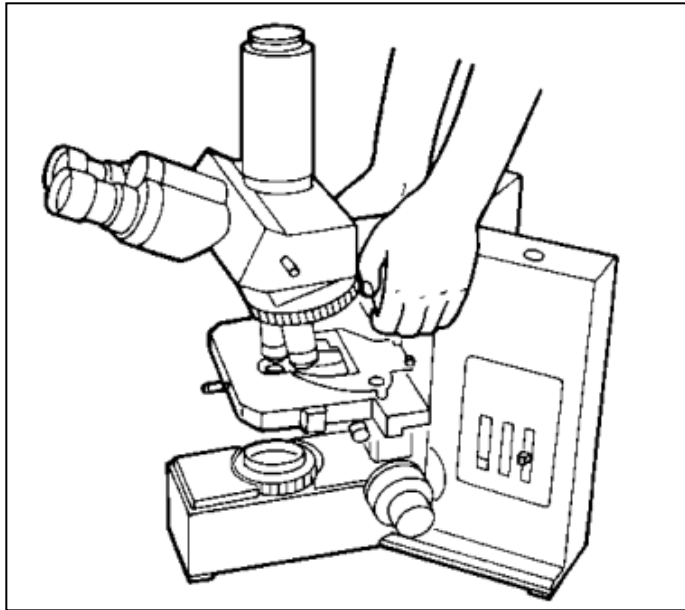
## Seřízení mikroskopu dle Köhlerova principu







# Transport mikroskopu

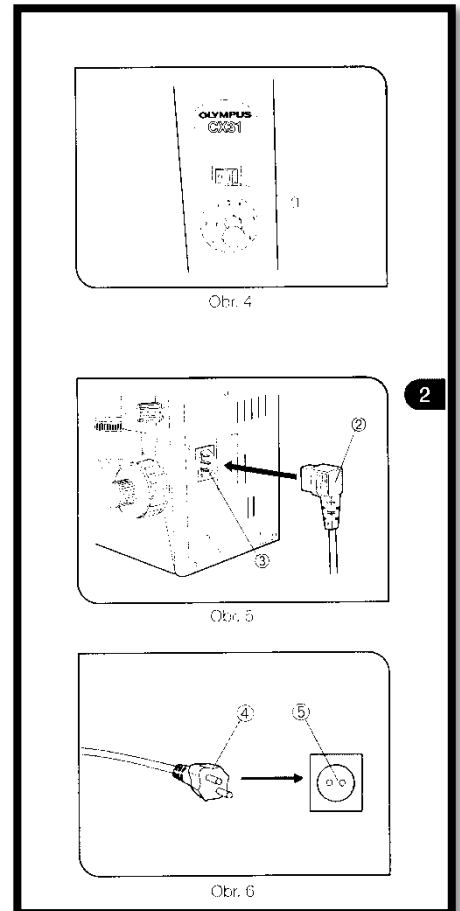


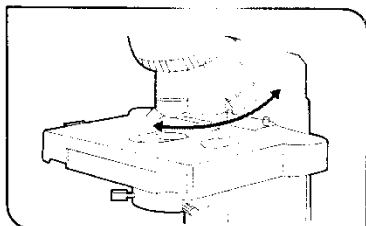
Při jakémkoli přemísťování je nutné mikroskop držet **oběma rukama na dvou určených místech** (1, 2). Jakýkoli jiný způsob přemísťování či posunování po pracovní desce stolu může vést k vážnému poškození mikroskopu!

# Uvedení mikroskopu do provozu

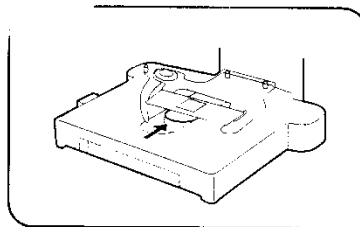
**Před zapnutím mikroskopu** kolébkovým spínačem (1) se přesvědčte, že napětí přiváděné ke světelnému zdroji je staženo na minimum, tedy že otočný potenciometr (2) je nastaven na hodnotu 1.

Teprve po zapnutí spínače je možné zvyšovat napětí (otáčení potenciometru ve směru šipky) a tedy intenzitu emitovaného světla. Otočný potenciometr používejte i v průběhu mikroskopování k úpravě světelné intenzity, např. vždy při změně objektivu.

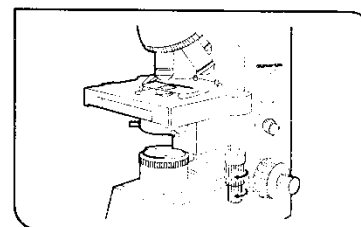


**1**

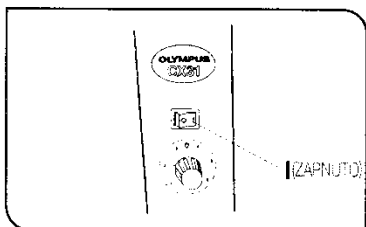
- Otočte revolverový nosič objektivů, aby se do světelné dráhy zařadil objektiv se zvětšením 10x.
- ★ Přesvědčte se, že revolverový nosič objektivů slyšitelně zaskočil.

**2**

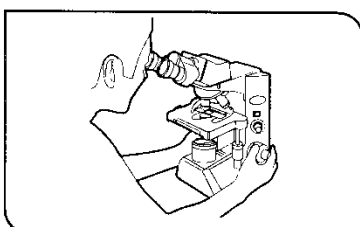
- Uložte preparát na stolek. (strana 10)

**3**

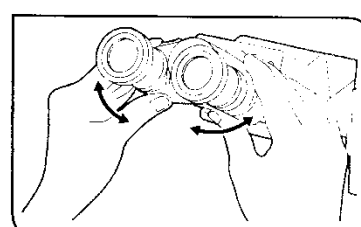
- Otáčejte kolečky osy X a Y k posunutí preparátu do světelné dráhy. (strana 11)

**4**

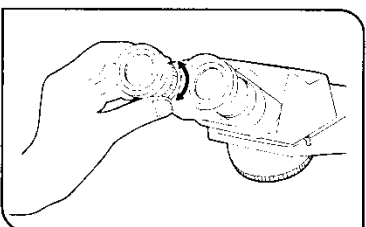
- Hlavní spínač přepněte do polchy „I“ (ZAPNUTO) a pomocí kolečka pro nastavení intenzity osvětlení nastavte osvětlení. (strana 8)

**5**

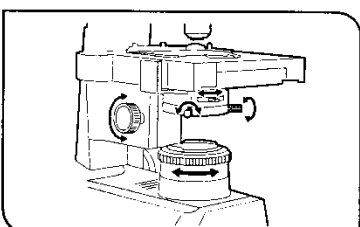
- Otáčejte kolečky hrubého a jemného ostření k zaostření na preparát.

**6**

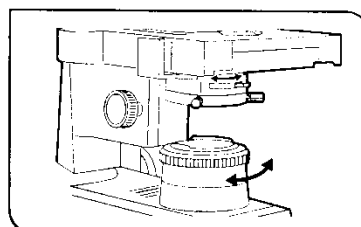
- Nastavte vzdálenost okulárů. (strana 11)
- Pokud je použit sklopný tubus, nastavte jeho úhel sklonu. (strana 11)

**7**

- Nastavte dioptrickou korekci. (strana 11)

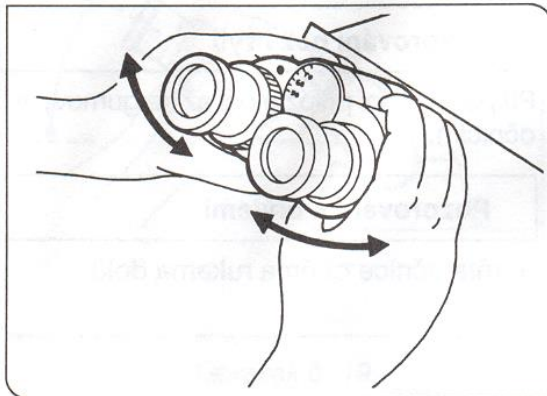
**8**

- Centrování polní clony. (strana 13)

**9**

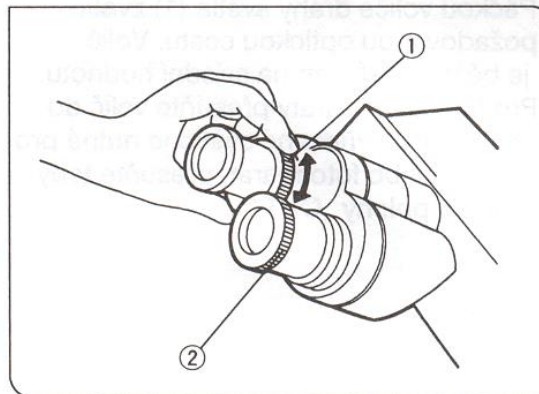
- Nastavte aperturní clonu a polní clonu. (strana 8)

# 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 seřídít.

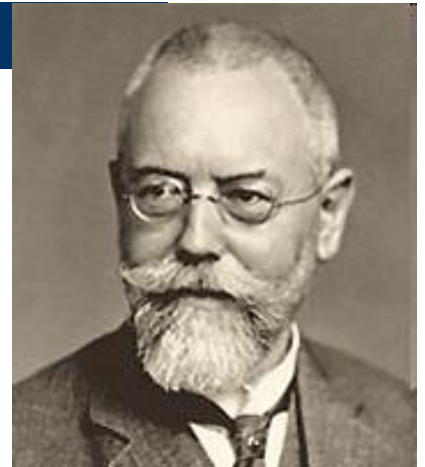


## 2 *Dioptrická korekce*

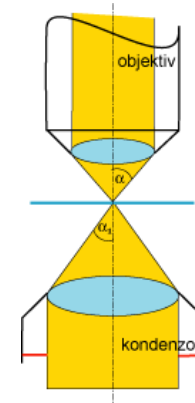
- 1 Dívejte se pravým okem do pravého okuláru a hrubým i jemným posuvem přesně zaostřete.
- 2 Pak při pohledu levým okem do levého okuláru zaostřete obraz pomocí kroužku dioptrické korekce (1).

# 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**.



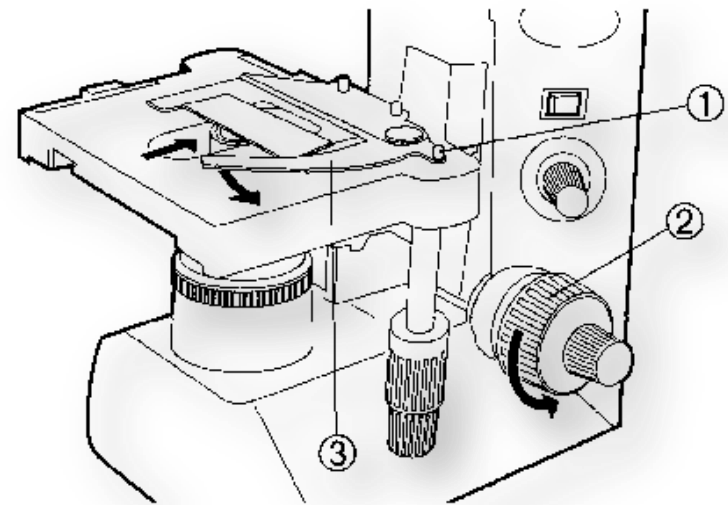
August Köhler (1866 -1948)



# Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

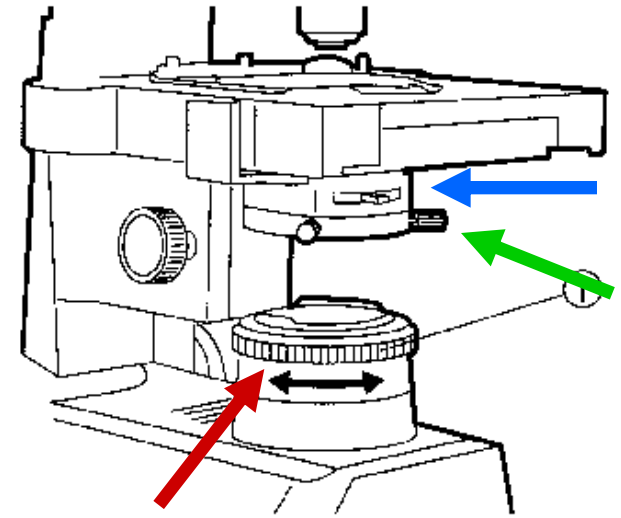
- Musíme mít preparát – trvalé preparáty *Vicia faba* (dobře kontrastní)

Na pracovní stůlek 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

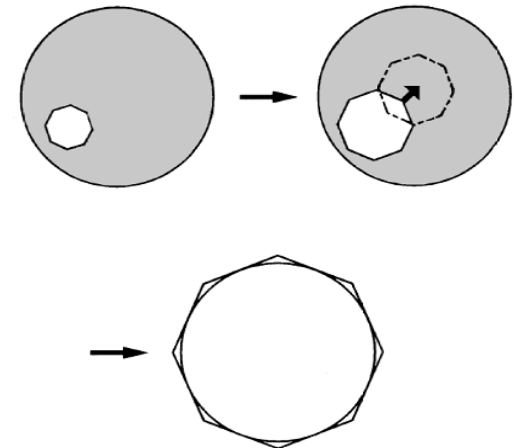
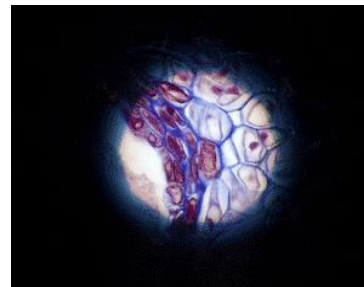
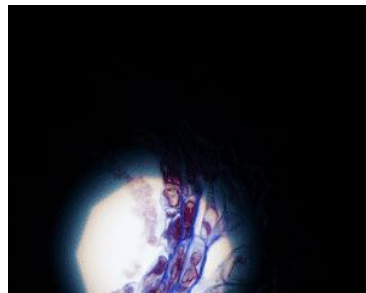
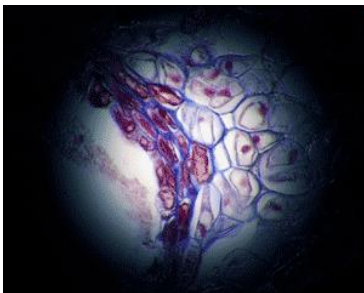
- Nastavte objektiv 10x (případně očistěte objektiv od imerze) a zaostřete buňky preparátu.
- Zavřete **polní clonku** tak, až uvidíte její obrys v zorném poli. Obraz polní clonky (světlý kotouček) v této fázi nemusí být ve středu zorného pole a nemusí mít zaostřené okraje.
- Zaostřete obraz polní clonky 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





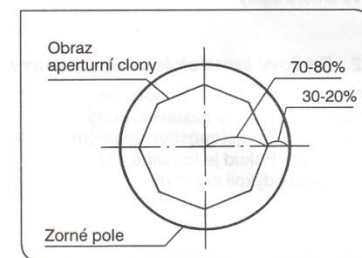
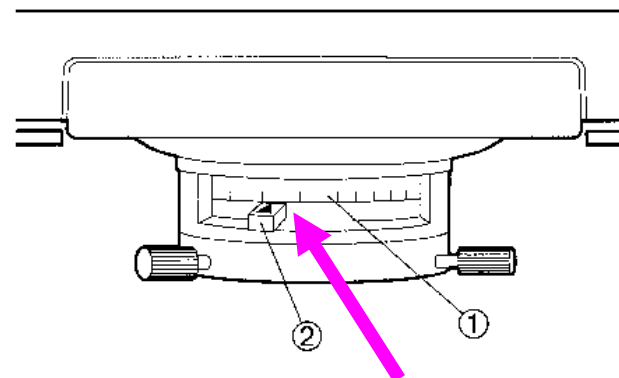
# Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

**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.

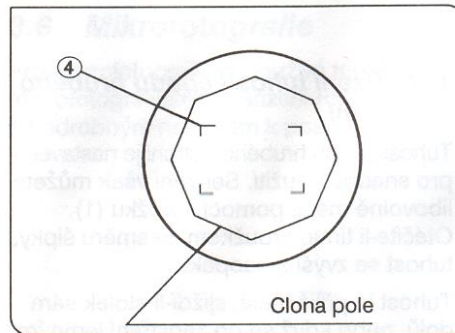
S postupným uzavíráním aperturní clony se zvyšuje hloubka ostroty a zvyšuje kontrast, postupně však vystupují i různé nečistoty nebo nežádoucí vrstvy buněk.

**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.



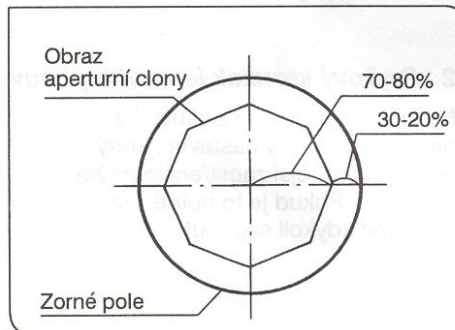
Obrázek č. 22



Obrázek č. 21

### Clona pole

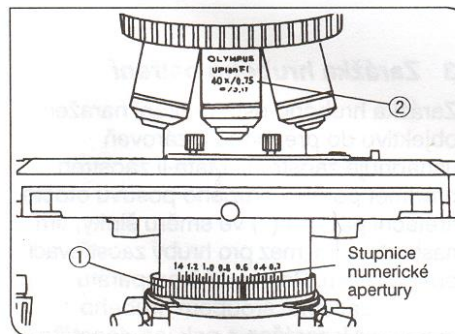
Irisová clona pole zmenšuje průměr svazku paprsků, který vstupuje do kondenzoru, tím omezuje světlo, které se na tvorbě obrazu nepodílí a tak zlepšuje kontrast obrazu. Průměr clony pole má být přizpůsoben zvětšení objektivu tak, aby obraz otvoru clony byl o něco větší než pozorované pole. Při fotografování je vhodné uzavřít clonu tak, aby osvětlené pole bylo jen o málo větší než odpovídající formát filmu (4).



Obrázek č. 22

### Aperturní clona

- Aperturní irisová clona kondenzoru určuje numerickou aperturu osvětlovací soustavy, která by pro dosažení lepšího rozlišení, vyššího kontrastu a také větší hloubky ostrosti měla souhlasit s numerickou aperturou objektivu.
- Protože preparáty bývají obvykle málo kontrastní, doporučuje se nastavit clonu kondenzoru jen na 70 až 80% numerické apertury použitého objektivu.



Obrázek č. 23

### Nastavení numerické apertury

Nastavte numerickou aperturu kondenzoru (1) na asi 80% hodnoty na objektivu (2).

Například: Pro objektiv Plan 40x (NA 0,65) nastavte na stupnici hodnotu 0,5 ( $0,65 \times 0,8 = 0,5$ ).

# 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**

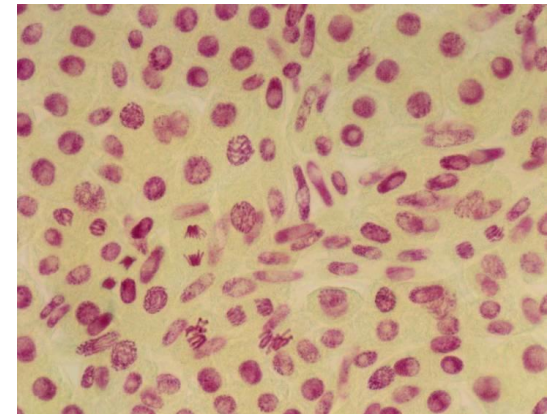


# Postup při práci se suchým objektivem

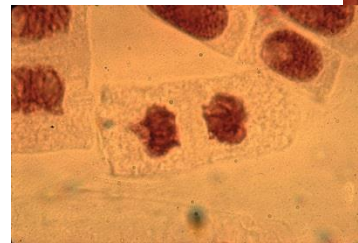
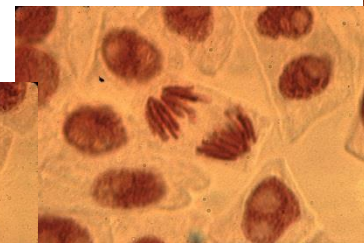
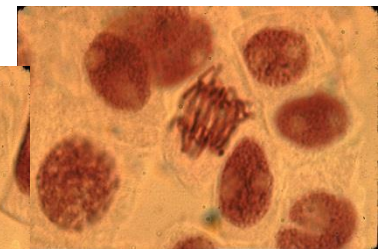
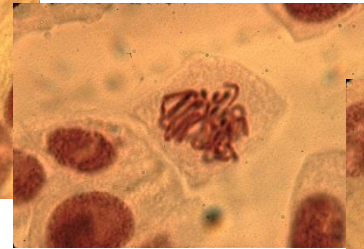
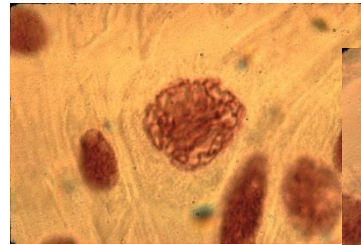
- preparát uložíme tak, aby prohlížená část byla ve středu
- kondenzor snížíme dle použitého objektivu (čím je zvětšení menší, tím je kondenzor níže), aperturní clonu otevřeme (na velikost numerické apertury objektivu)
- makrošroubem snižujeme tubus a v okuláru sledujeme, kdy se objeví záblesk obrazu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



# Pozorování chromozomů *V. faba* suchým objektivem



# Postup při práci s imerzním objektivem

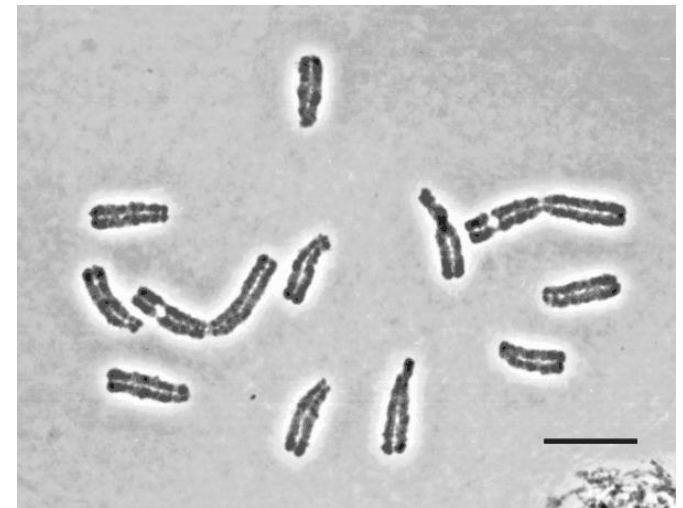
- preparát uložíme tak, aby prohlížená část byla ve středu
- upravíme hodnotu **aperturní clony otevřeme**
- **na preparát kápneme imerzní olej** (pokud pracujeme s dvojitou imerzí, kápneme olej také na čočku kondenzoru – ještě než ho zvedneme nahoru)
- **makrošroubem snižujeme tubus a pozorováním ze 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)**



## Alteration by centric fission of the diploid chromosome number in *Vicia faba* L.

I. Schubert & R. Rieger

Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung, AdW, DDR-4325 Gatersleben, G.D.R.

Received 13.9.1989 Accepted 27.1.1990

### Abstract

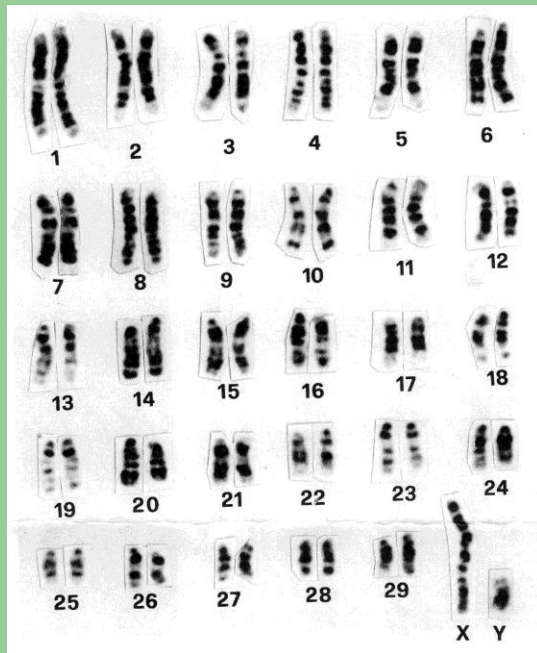
An individual with a diploid chromosome complement of  $2n=14$  instead of  $2n=12$  is described for the broad bean *Vicia faba* L. This karyotypic deviation resulted from 'centromere splitting' of the wildtype metacentric satellite chromosome pair as demonstrated by Giemsa banding pattern. It is the first case of centric fission observed in this species. Our data support the hypothetical mechanism of Robertsonian rearrangements suggested by Holmquist and Dancis (Genetica 52-53: 151-163, 1980).



# 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 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*)  
 **$2n = 82$**



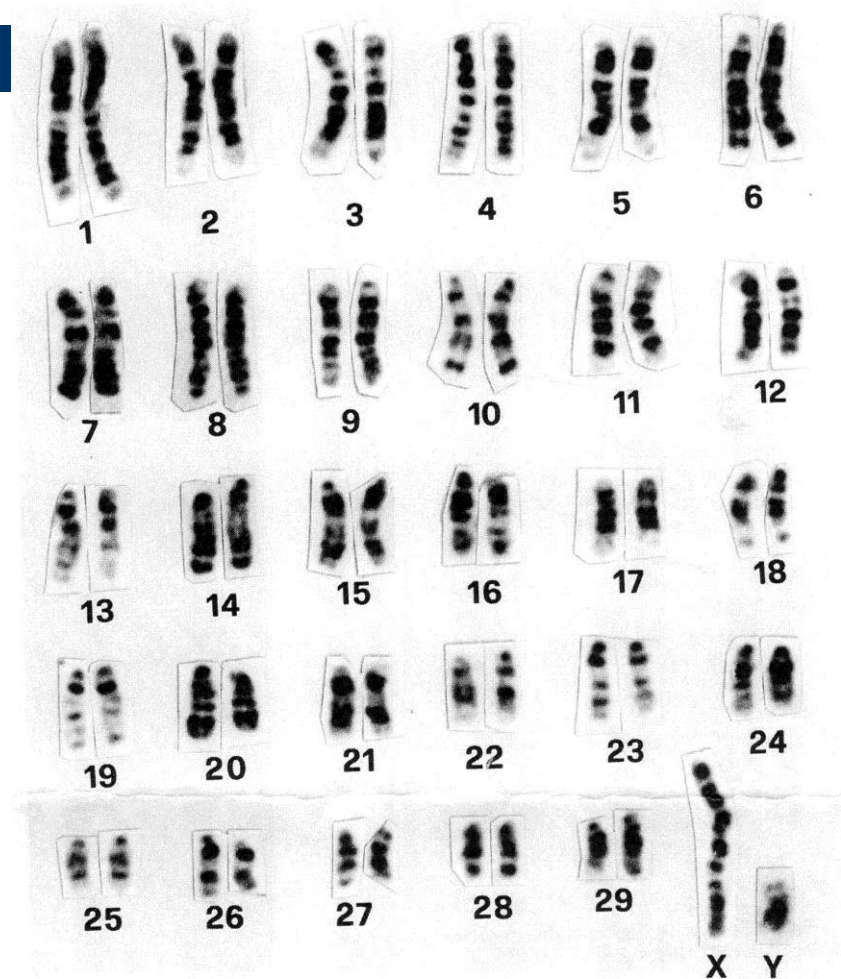
**Sitatunga**  
(Lesoň bahenní)  
(*Tragelaphus spekeii*)  
 **$2n = 30$**



**Orangutan**  
(*Pongo pygmaeus*)  
 **$2n = 48$**

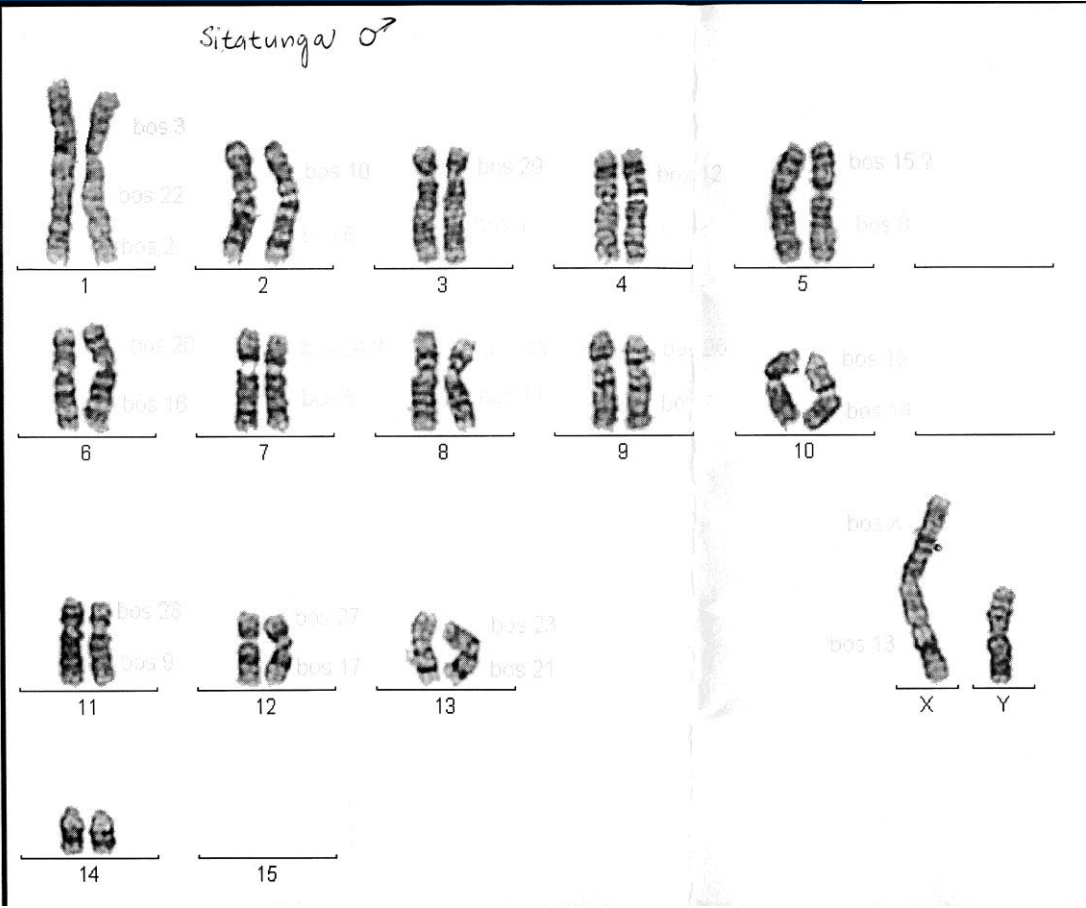
# Tur domácí (*Bos taurus*)

$2n = 60$  (akrocentrické chromozomy)



## Sitatunga (Lesoň bahenní) (*Tragelaphus spekei*)

$2n = 30$



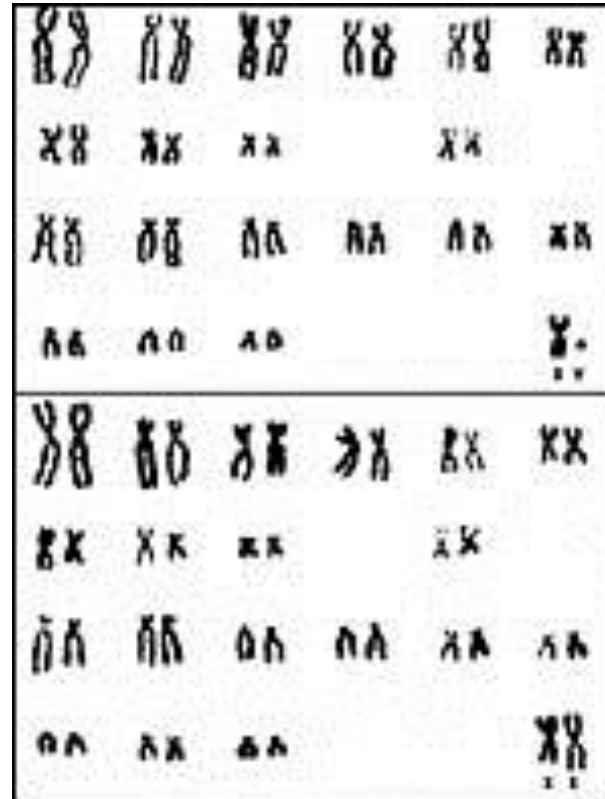


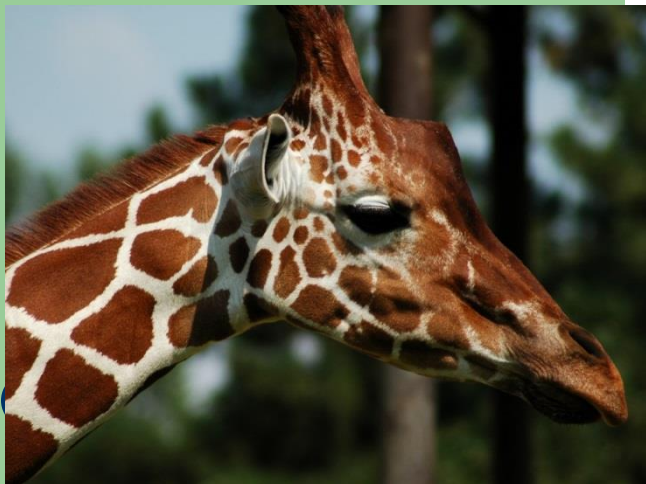


# Hyena skvrnitá (*Crocuta crocuta*)

$$2n = 40$$

3



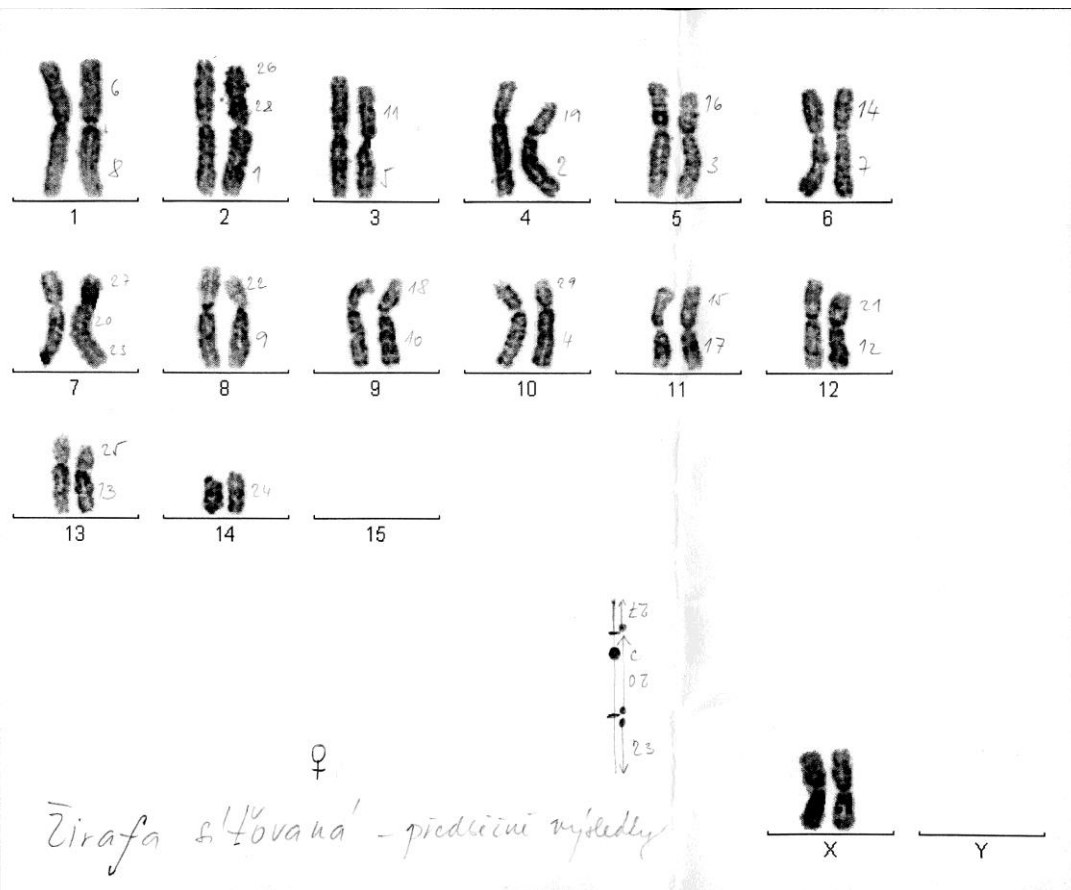


# Žirafa síťovaná (*Giraffa camelopardalis reticulata*)

$2n = 30$

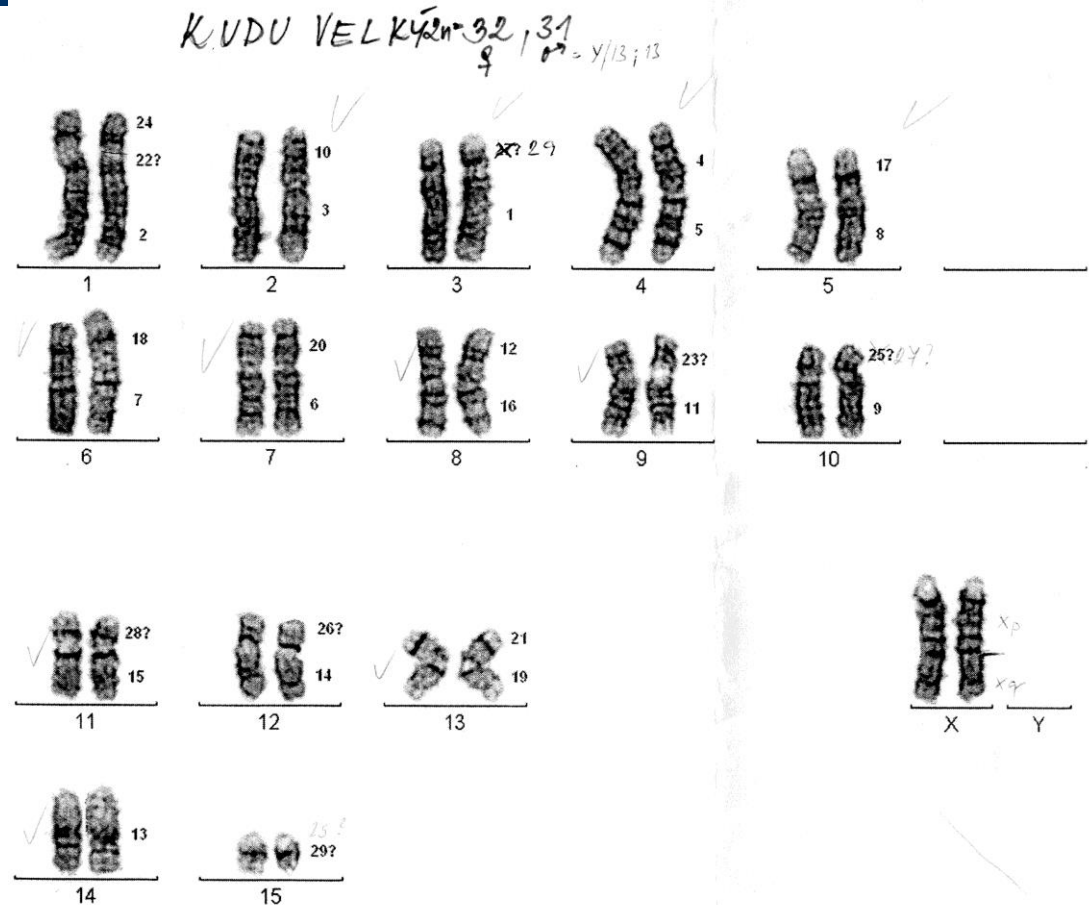


- *Giraffa camelopardalis giraffa*
- *G. c. rothschildi*
- *G. c. tippelskirchi*
- *G. c. reticulata*
- *G. c. camelopardalis*
- *G. c. antiquorum*
- *G. c. peralta*
- *G. c. thomicrofti*



## Kudu velký (Tragelaphus strepsiceros)

2n = 32 ♀, 31♂ (t(13;Y))



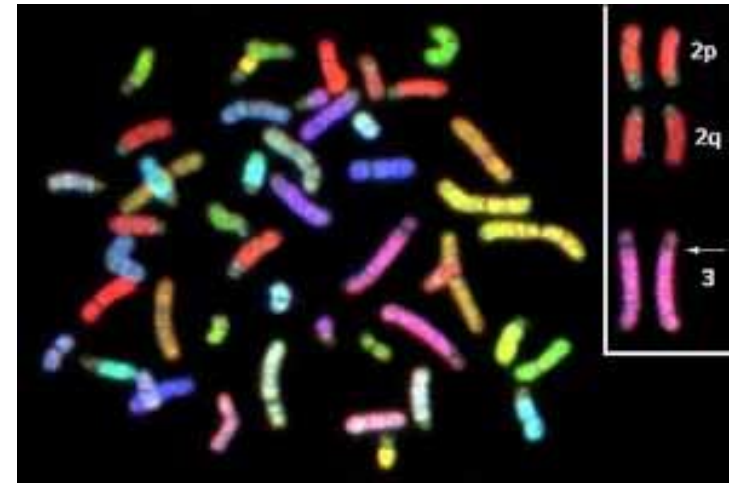
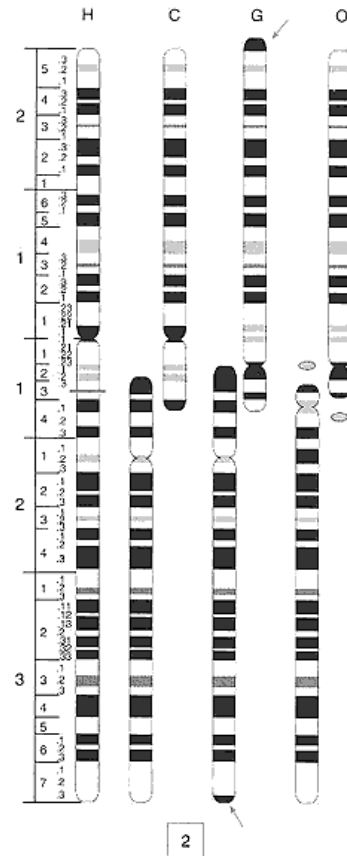


# Orangutan (*Pongo pygmaeus*)

Orangutan bornejský (*P.p.pygmaeus*)

Orangutan sumaterský (*P.p.abelii*)

$$2n = 48$$





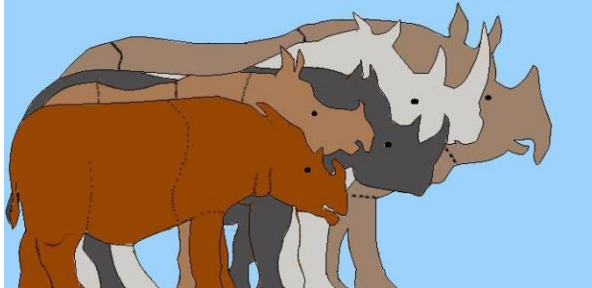
Black Rhinoceros range



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)



**Nosorožec černý  
(*Diceros bicornis*)**

$2n = 84$

7

**Nosorožec bílý (tuonosý)  
(*Ceratotherium simum*)**

$2n = 82$

8

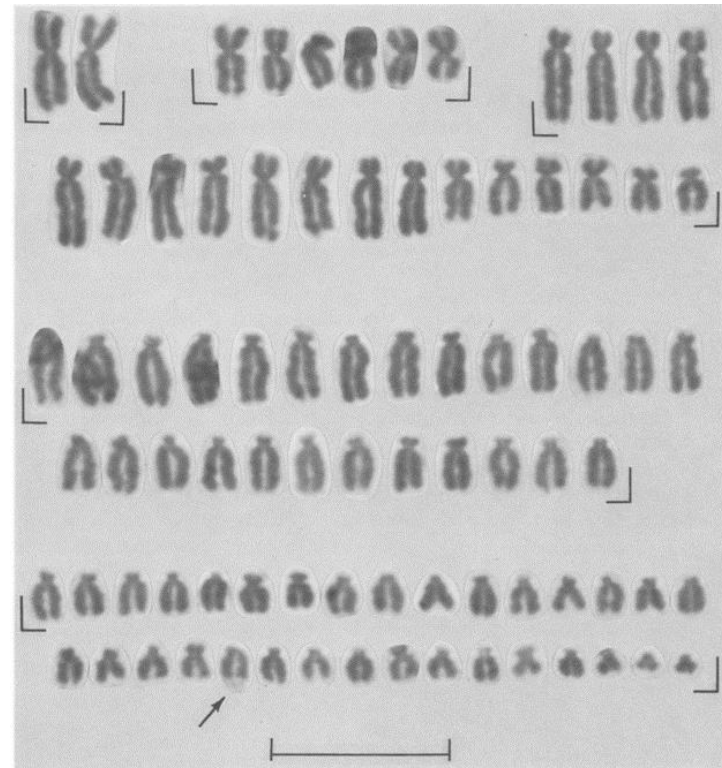
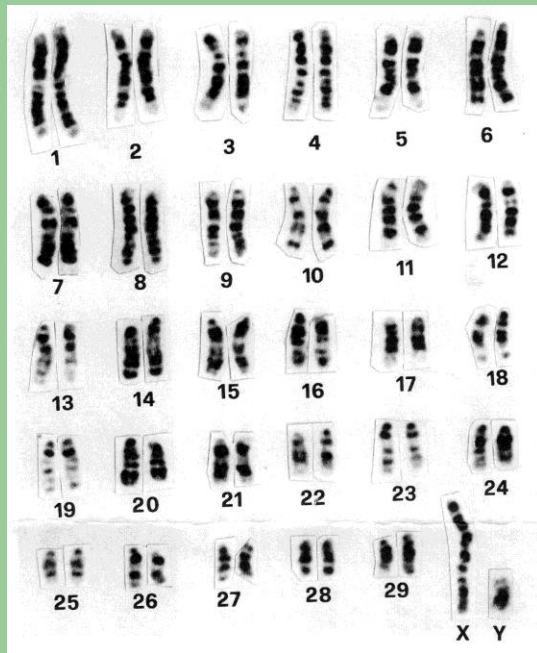


FIG. 1. Chromosomes of a black rhinoceros (acquisition 114M). Satellites (arrow) were consistently seen on one small acrocentric chromosome. Scale indicates  $10 \mu$ .

# Úkol 4:

Pozorování lidských chromozomů  
pod fázovým kontrastem a v procházejícím  
světle



# Fázový kontrast

Při průchodu světla nezbarveným biologickým objektem dochází k fázovému posunu v těch místech, které se liší optickou hustotou

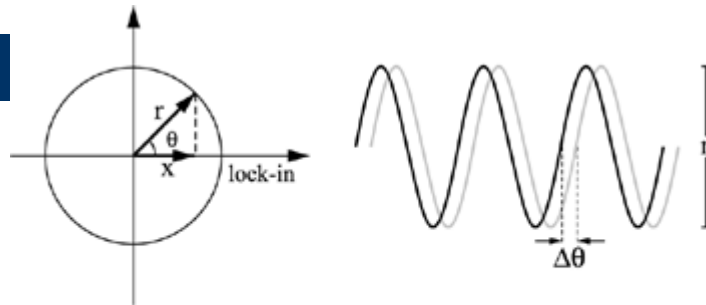
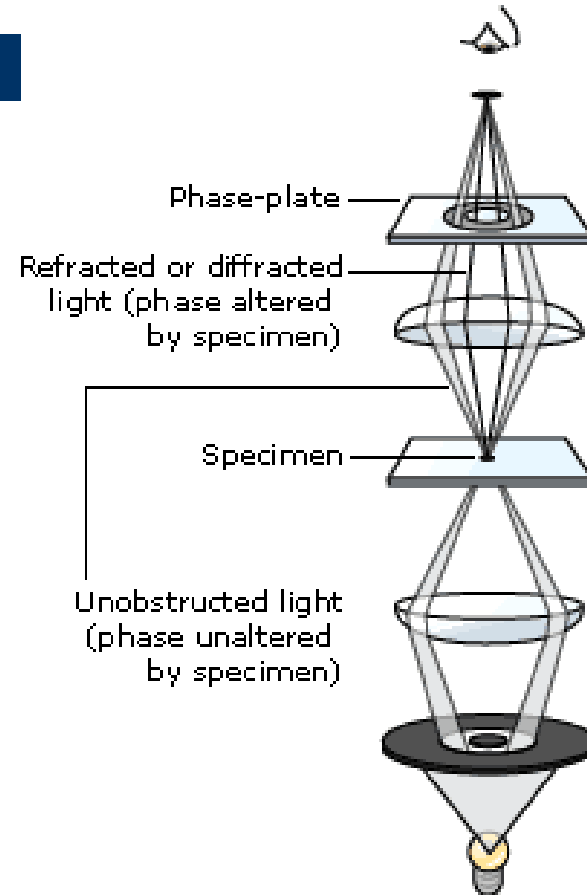
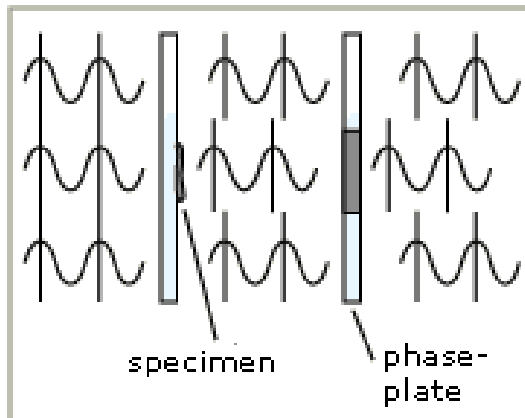
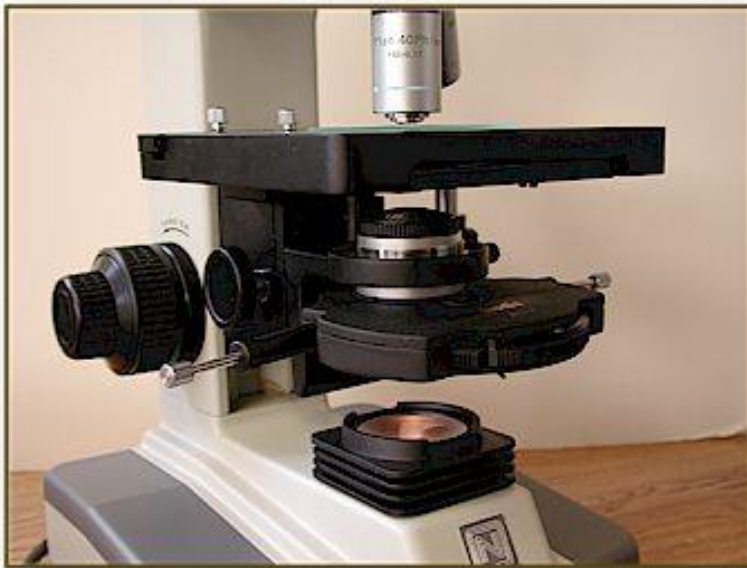


Figura 2. As imagens de contraste de fase são geradas com o sinal ( $r$ ) detectado no eixo x por um amplificador tipo lock-in. Dependendo do ângulo de fase adotado inicialmente ( $\theta$ ) entre a oscilação da sonda e a leitura do fotodetector, o sinal x pode aumentar ou diminuir para a mesma variação de fase ( $\Delta\theta$ ).

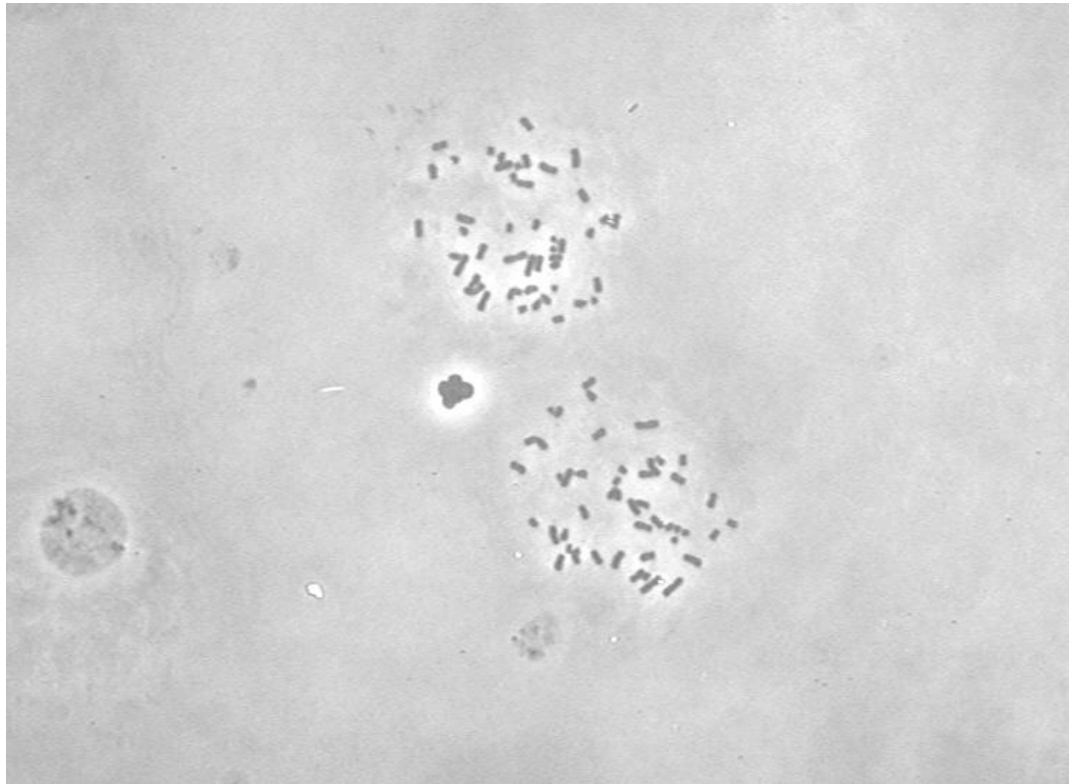


# Zařízení pro fázový kontrast – PHACO objektivy, fázový kondenzor



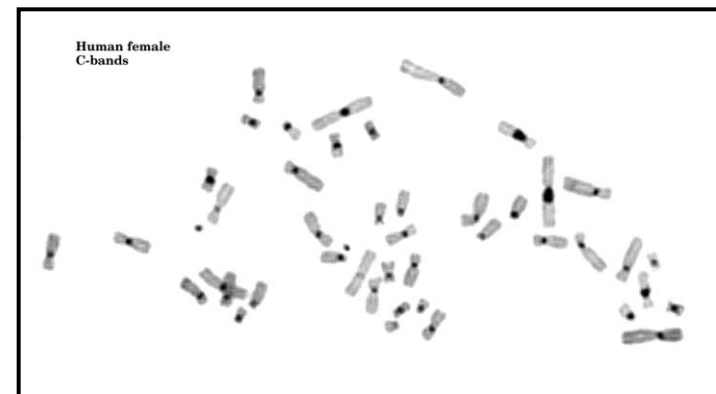
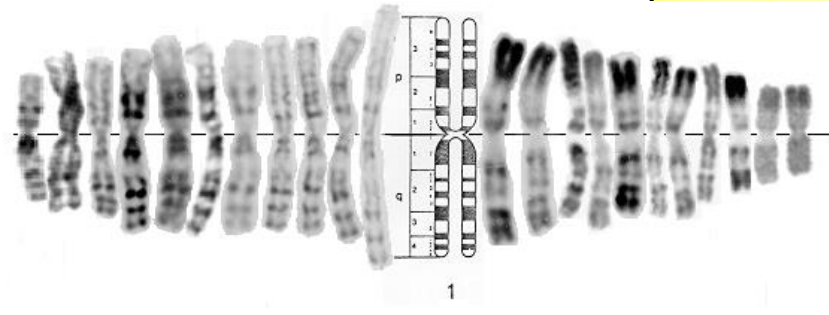
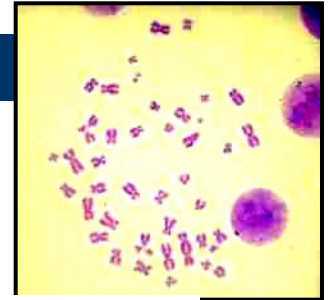


# Pozorování lidských neobarvených chromozomů pomocí fázového kontrastu



# Typy barvení lidských chromozomů

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



# Pozorování lidských chromozomů pod mikroskopem

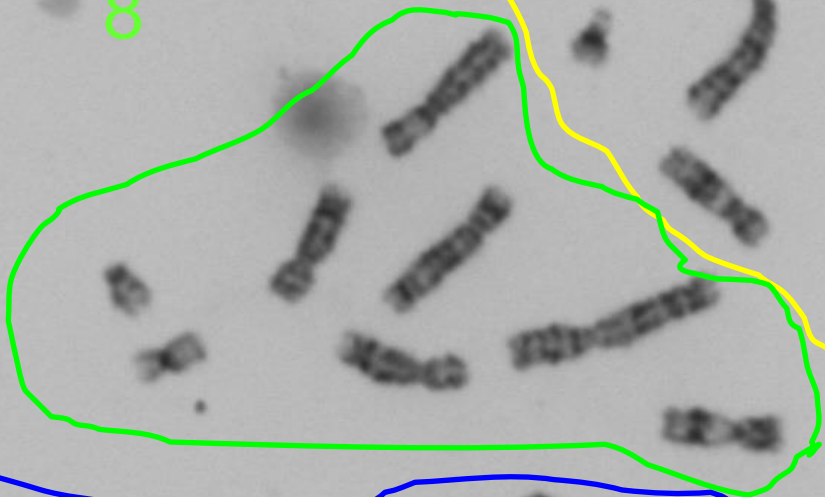
- Preparáty byly získány z dělicích se **lymfocytů lidské periferní krve**.
- Krev jsme po odběru kultivovali v médiu, kde byly buňky přinuceny k mitotickému dělení.
- Vzniklou suspenzi jsme fixovali, nakapali na skla a napruhovali pomocí **G-pruhů** (bližší postup v dalším cvičení)

# 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

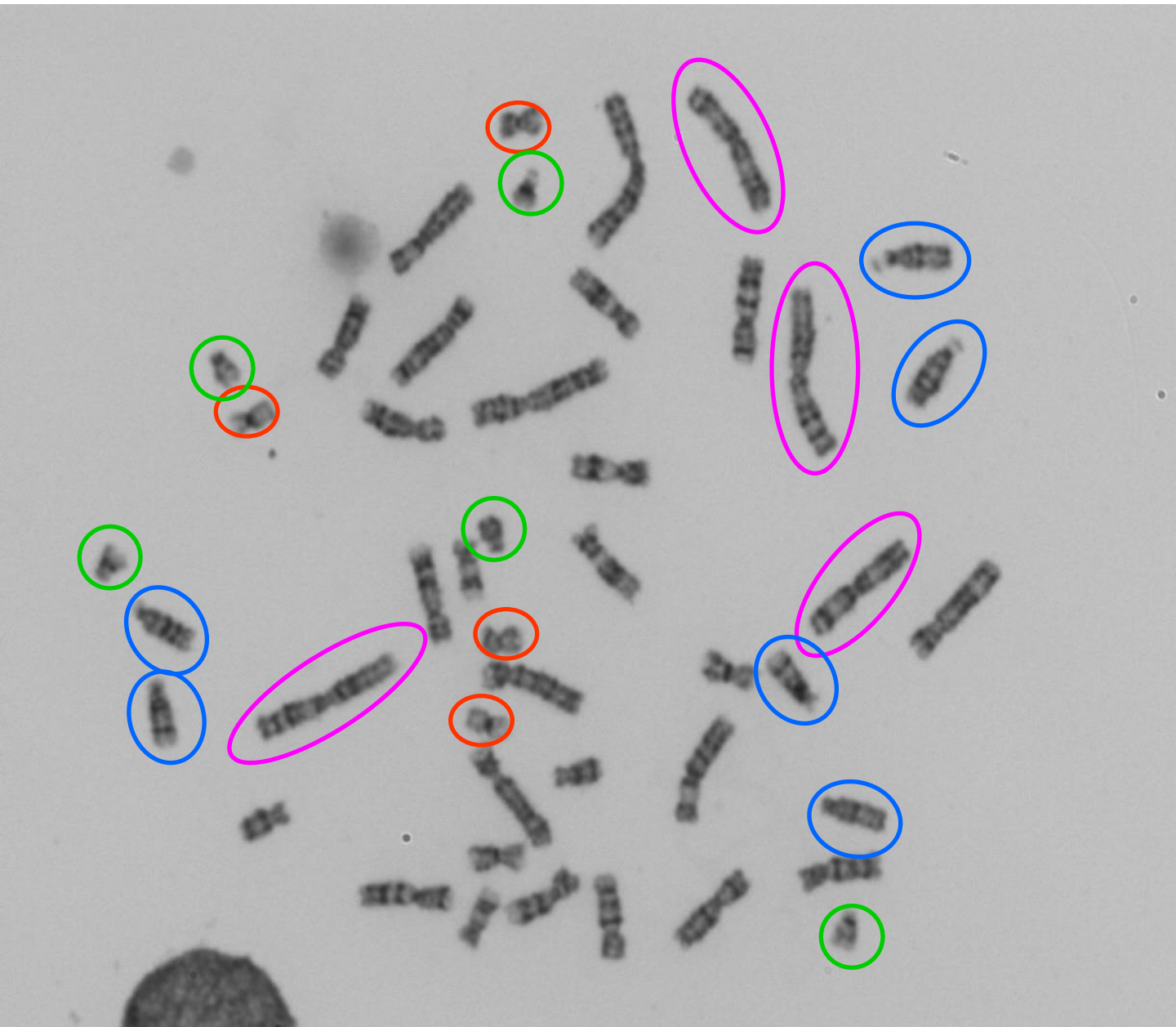


20



9





**velké metacentry**

**malé metacentry**

**velké akrocentry**

**malé akrocentry**

**zbytek -  
submetacentry**