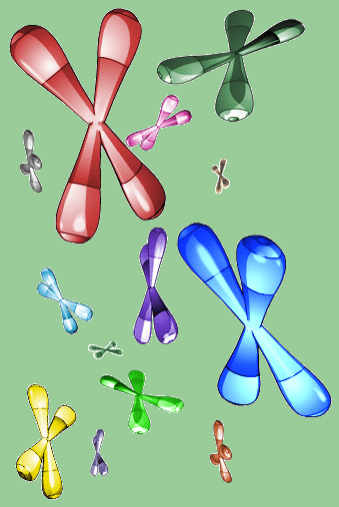
Bi6270c Cvičení z cytogenetiky 2015



Odd. genetiky a molekulární biologie
Ústav experimentální biologie
PřF MU

Organizační záležitosti

- Mgr. Aneta Mikulášová, e-mail: aneta.mikulas@seznam.cz; (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 2015 – 12 vyučovacích týdnů (cvičení)

- 3 skupiny – A, B, C; cvičení každý třetí týden

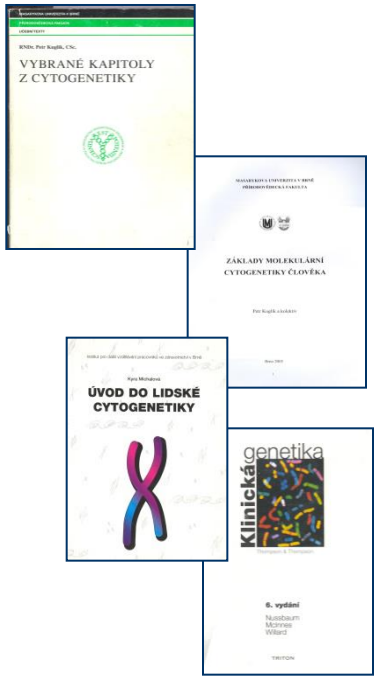
Místo cvičení:

- 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 vzdělávaní, 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, pozorování živočišních 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.

1. Seřízení mikroskopu dle Köhlerova principu

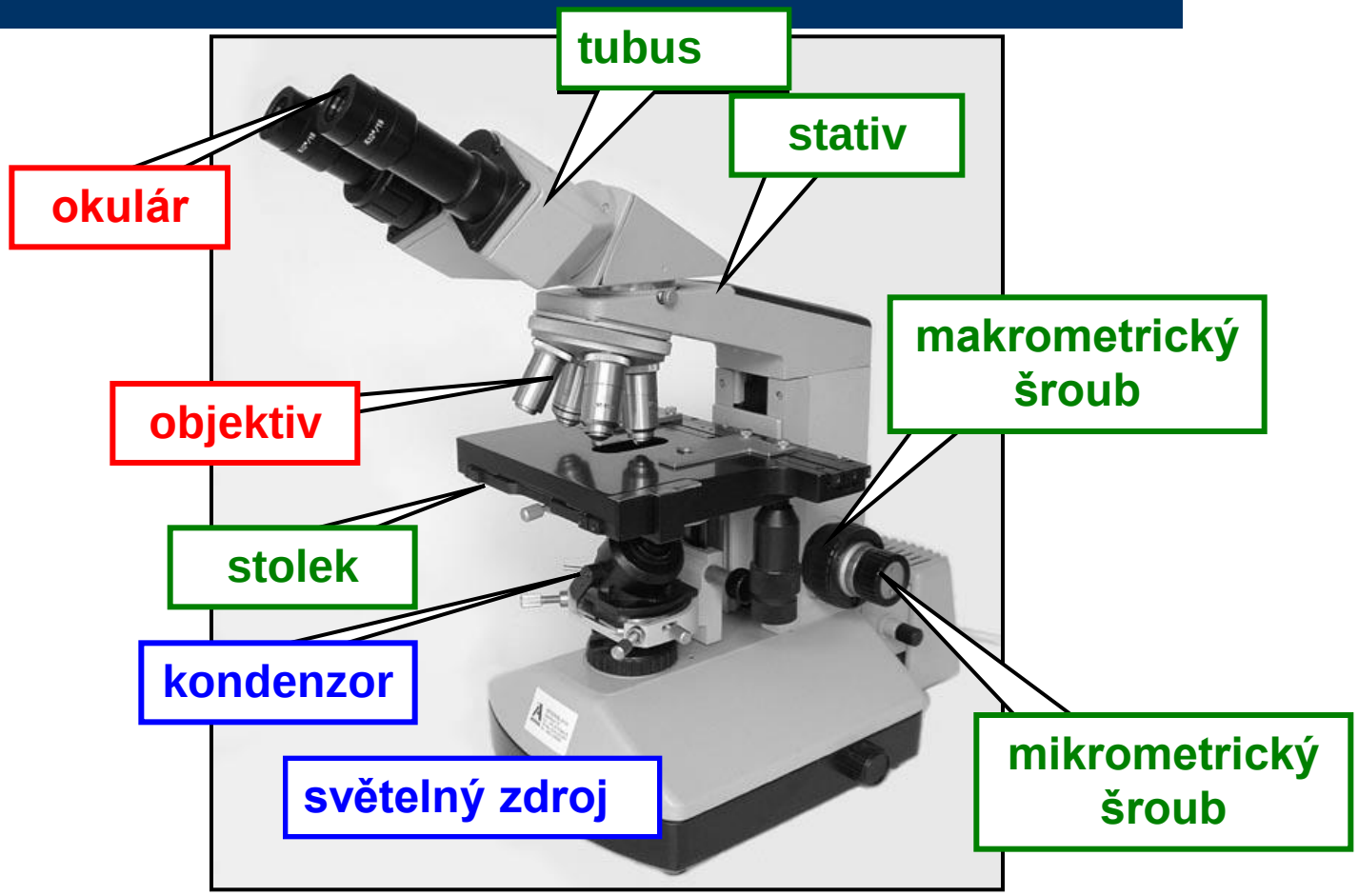
2. Pozorování chromozomů Vicia faba, práce se suchým a imerzním objektivem

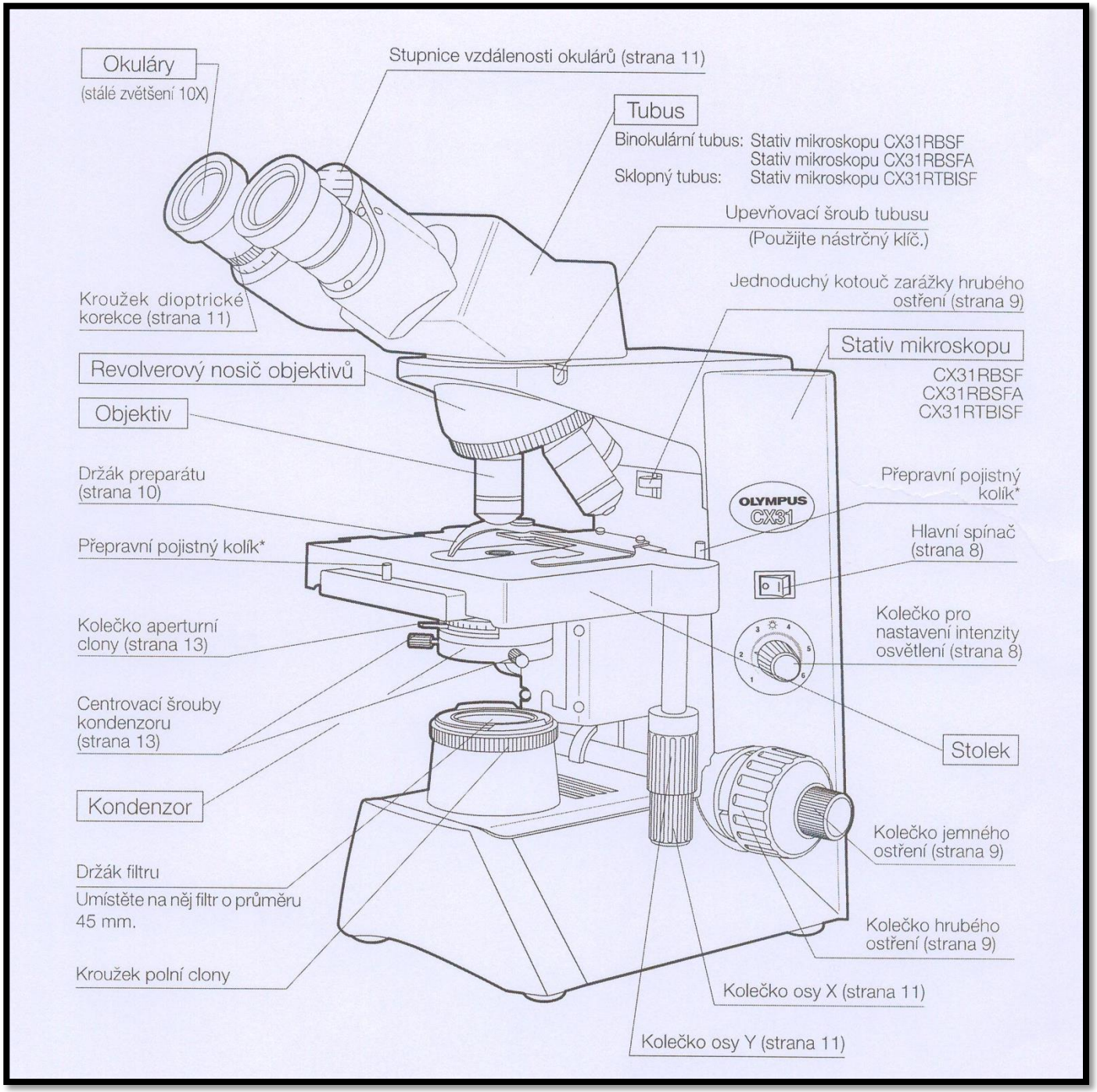
3. Pozorování živočišných chromozomů

4. Pozorování lidských chromozomů pod fázovým kontrastem a v procházejícím světle

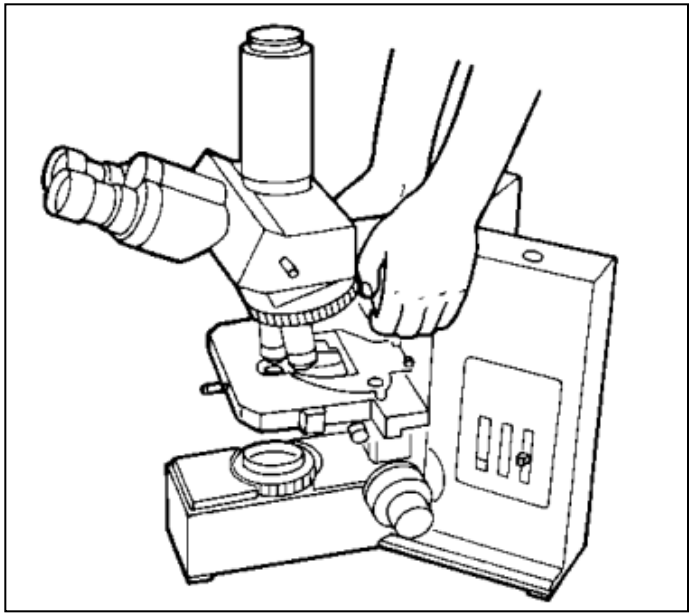
Úkol 1: Mikroskop CX31- Olympus
Seřízení mikroskopu dle Köhlerova principu

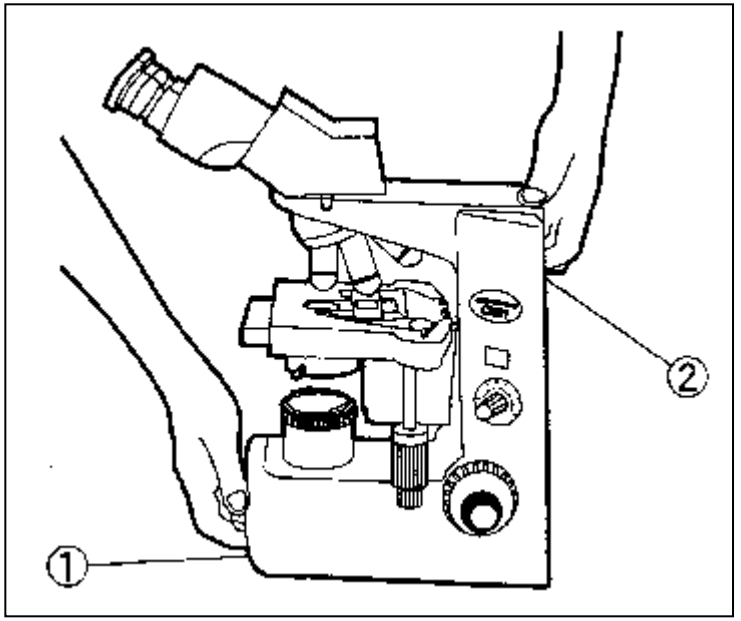
Popis světelného mikroskopu




Okuláry
(stálé zvětšení 10X)
Stupnice vzdálenosti okulárů (strana 11)
Tubus
Binokulární tubus: Stativ mikroskopu CX31RBSF
Stativ mikroskopu CX31RBSFA
Sklopný tubus: Stativ mikroskopu CX31RTBISF
Upevňovací šroub tubusu
(Použijte nástrčný klíč.)
Jednoduchý kotouč zarážky hrubého ostření (strana 9)
Kroužek dioptrické korekce (strana 11)
Stativ mikroskopu
CX31RBSF
CX31RBSFA
CX31RTBISF
Revolverový nosič objektivů
Objektiv
Držák preparátu (strana 10)
Přepravní pojistný kolík*
Přepravní pojistný kolík*
Hlavní spínač (strana 8)
OLYMPUS
CX31
Kolečko aperturní clony (strana 13)
Kolečko pro nastavení intenzity osvětlení (strana 8)
Centrovací šrouby kondenzoru (strana 13)
Stolek
Kondenzor
Kolečko jemného ostření (strana 9)
Držák filtru
Umístěte na něj filtr o průměru 45 mm.
Kolečko hrubého ostření (strana 9)
Kroužek polní clony
Kolečko osy X (strana 11)
Kolečko osy Y (strana 11)

Transport mikroskopu





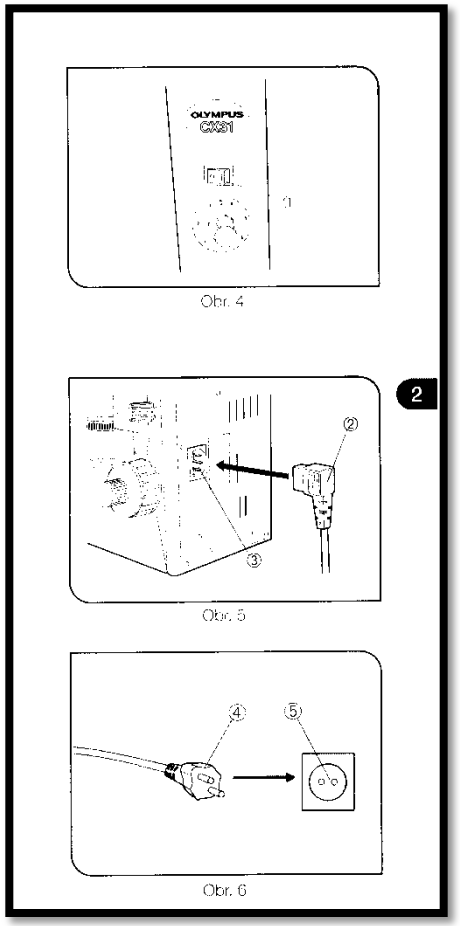
Při jakémkoli přemisťování je nutné mikroskop držet **oběma rukama na dvou určených místech** (1, 2). Jakýkoli jiný způsob přemisťování či posunování po pracovní desce stolu může vést k vážnému poškození mikroskopu!

http://www.sci.muni.cz/~anatomy/mikroskop/olympus_cx31.htm

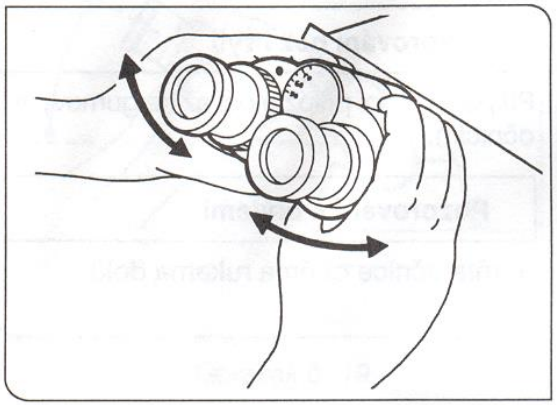
Uvedení mikroskopu do provozu

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.

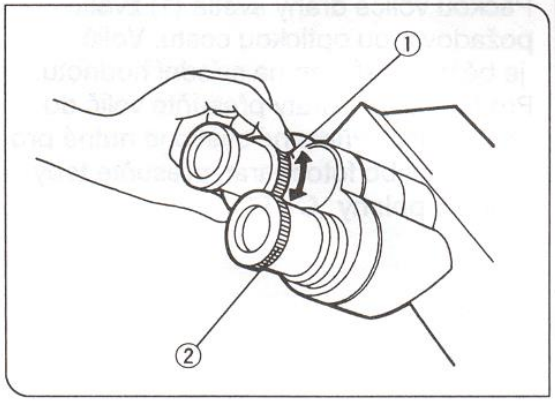


Seřízení mikroskopu



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.

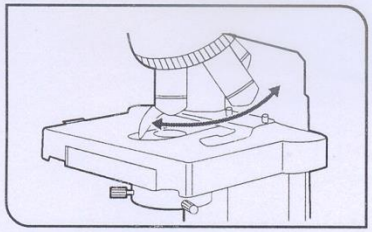


2 *Dioptrická korekce*

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).

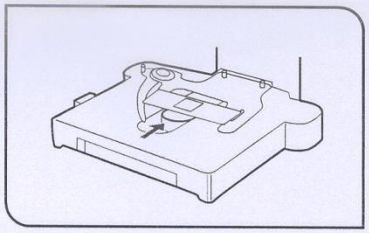
1



• Otočte revolverový nosič objektivů, aby se do světelné dráhy zařadil objektiv se zvětšením 10x.

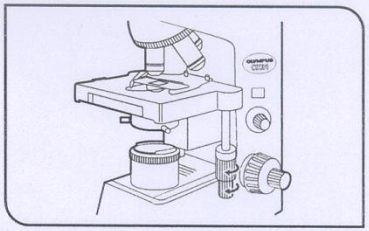
★ **Přesvědčte se, že revolverový nosič objektivů slyšitelně zaskočil.**

2



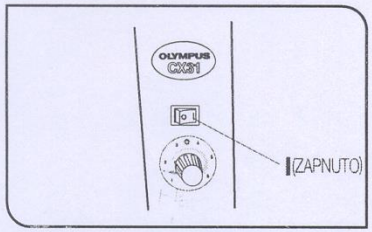
• Uložte preparát na stolek. (strana 10)

3



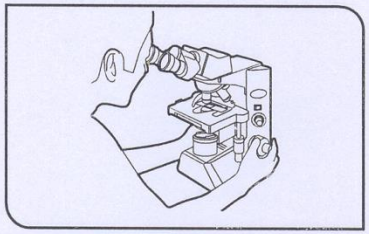
• Otáčejte kolečky osy X a Y k posunutí preparátu do světelné dráhy. (strana 11)

4



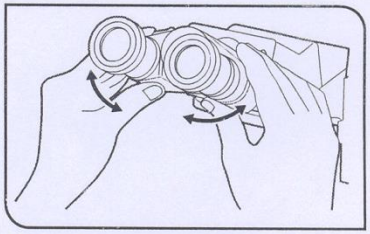
• Hlavní spínač přepněte do polohy „ I “ (ZAPNUTO) a pomocí kolečka pro nastavení intenzity osvětlení nastavte osvětlení. (strana 8)

5



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

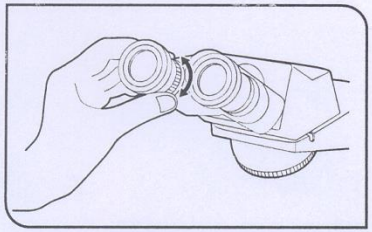
6



• Nastavte vzdálenost okulárů. (strana 11)

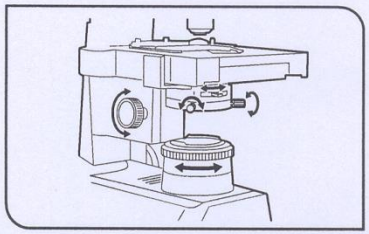
• Pokud je použit sklopný tubus, nastavte jeho úhel sklonu. (strana 11)

7



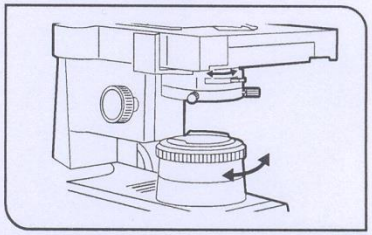
• Nastavte dioptrickou korekci. (strana 11)

8



• Centrování polní clony. (strana 13)

9

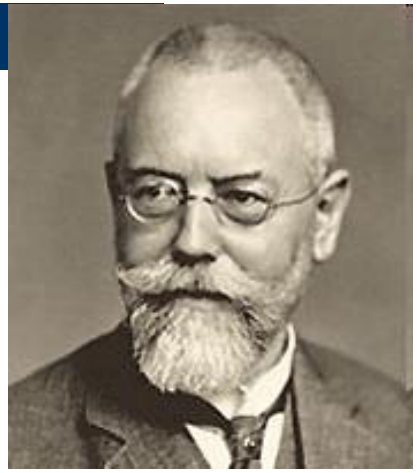


• Nastavte aperturní clonu a polní clonu. (strana 8)

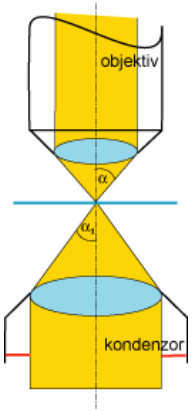
Kohlerův princip

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)

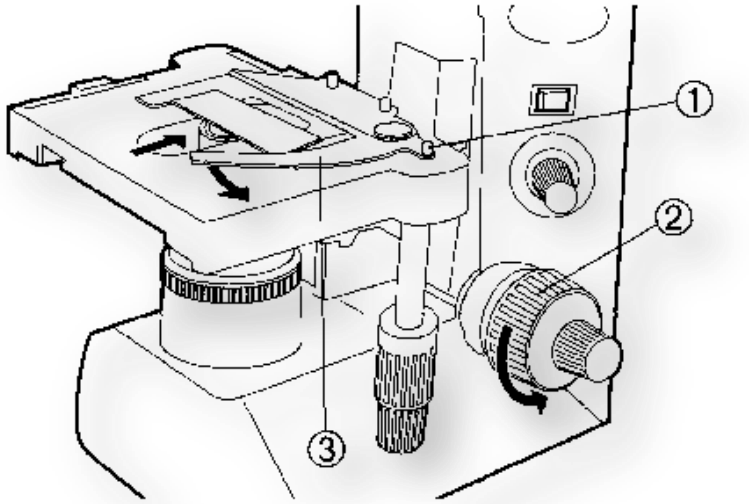


http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro

Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

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

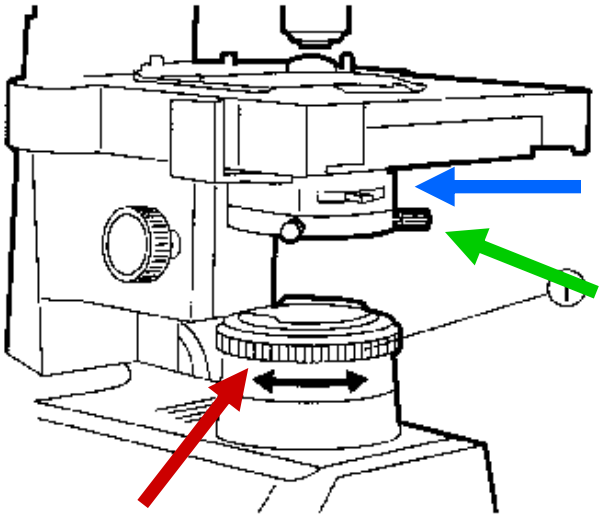
Na pracovní stolek mikroskopu vložte připravený preparát tak, že pomocí páčky (1) odkloníte držák preparátu (3). Zaostřete na preparát pomocí ostřícího šroubu (2).



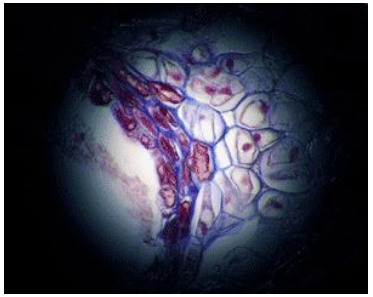
Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

(polní clona, výška kondenzoru, aperturní clona)

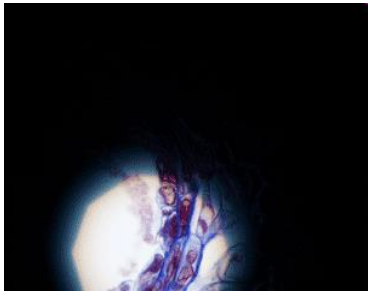
- **Nastavte objektiv 10x (případně očistěte objektiv od imerze) a zaostřete buňky preparátu.**
- **Zavřete polní clonku tak, až uvidíte její obrys v zorném poli.** Obraz polní clonky (světlý kotouček) v této fázi nemusí být ve středu zorného pole a nemusí mít zaostřené okraje.
- **Zaostřete obraz polní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



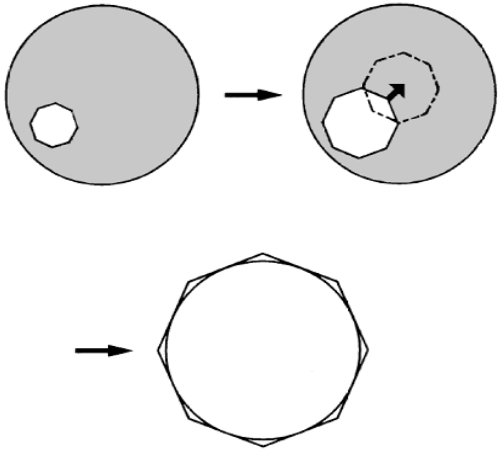
- zaostřený preparát s přivřenou polní clonou...



- polní clona po zaostření...



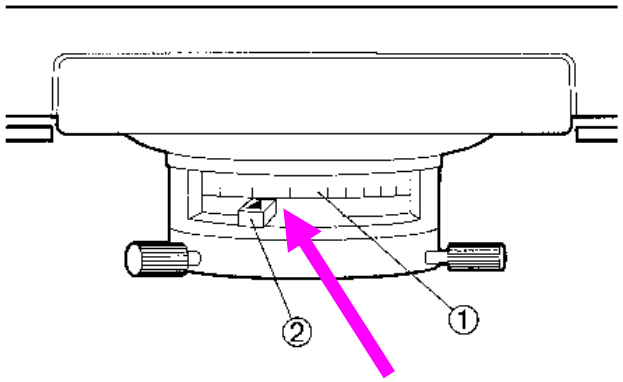
- .. a vycentrování



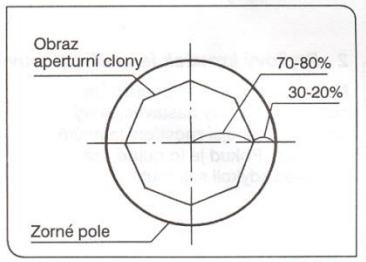
http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro

Seřízení mikroskopu podle Köhlerova principu

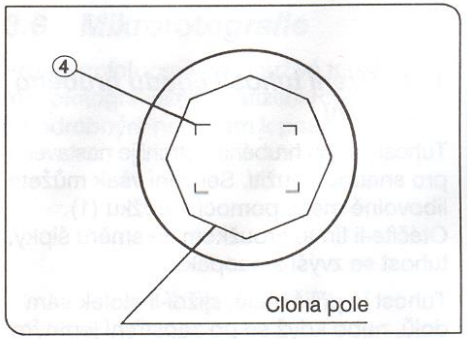
Aperturní clonka - umístěná na kondenzoru. Její otevřenost nastavte pomocí páčky maximálně na hodnotu NA objektivu, který právě používáte. Nejlepších výsledků bývá dosaženo při nastavení aperturní clony na 70 až 80 % NA objektivu.
S postupným uzavíráním aperturní clony se zvyšuje hloubka ostrosti a zvyšuje kontrast, postupně však vystupují i různé nečistoty nebo nežádoucí vrstvy buněk.



A co když na kondenzoru 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.



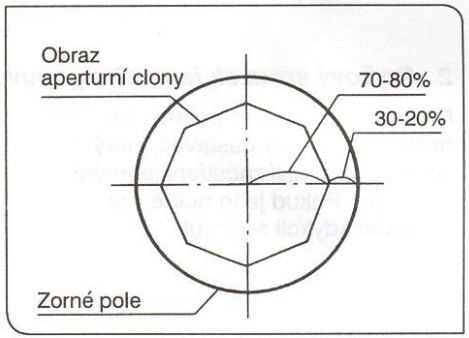
Obrázek č. 22



Obrázek č. 21

Clona pole

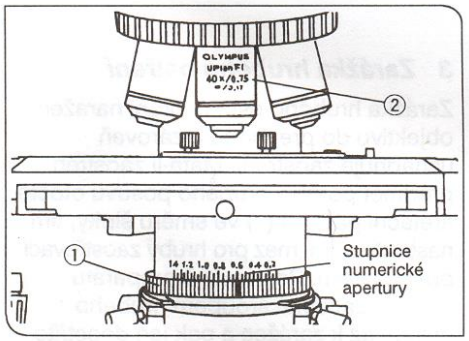
Irisová clona pole zmenšuje průměr svazku paprsků, který vstupuje do kondenzoru, tím omezuje světlo, které se na tvorbě obrazu nepodílí a tak zlepšuje kontrast obrazu. Průměr clony pole má být přizpůsoben zvětšení objektivu tak, aby obraz otvoru clony byl o něco větší než pozorované pole. Při fotografování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



Obrázek č. 22

Apertuní 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 x 0,8 = 0,5).

Máme seřízený mikroskop!

…ale pouze pro danou kombinaci objektivu a okuláru !

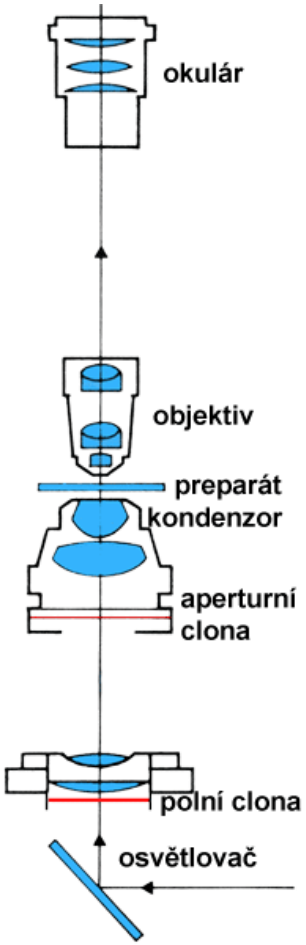
Teď už se bude měnit jenom aperturní clonka –

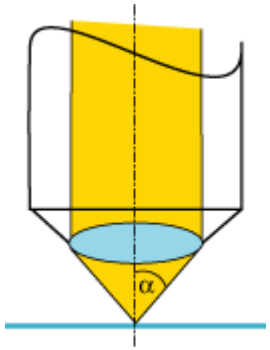
při každé výměně objektivu ji musíme nastavit na

70 – 80% hodnoty NA daného objektivu !

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

Objektiv





$$NA = \eta.\sin\alpha$$

η - index lomu media před frontální čočkou

α - 1/2 otvorového úhlu

$\eta_{imerzní\ olej} = 1{,}512$

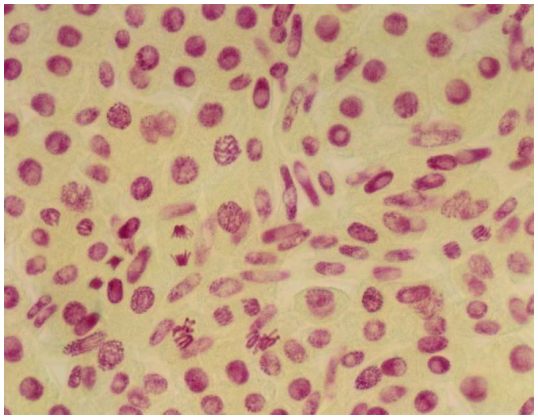
$\eta_{vzduch} = 1$

Postup při práci se suchým objektivem

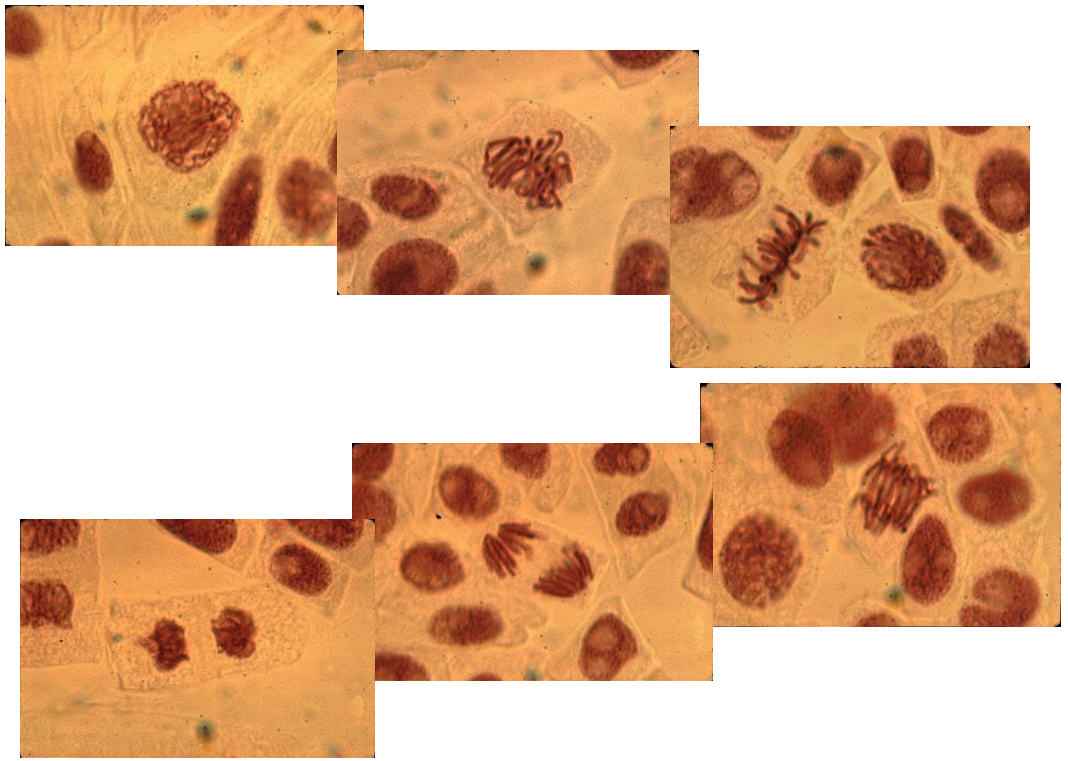
- preparát uložíme tak, aby prohlížená část byla ve středu
- kondenzor snížíme dle použitého objektivu (čím je zvětšení menší, tím je kondenzor níže), aperturní clonu otevřeme (na velikost numerické apertury objektivu)
- makrošroubem snižujeme tubus a v okuláru sledujeme, kdy se objeví záblesk obrazu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

Imerzní olej

Oil Immersion and Numerical Aperture

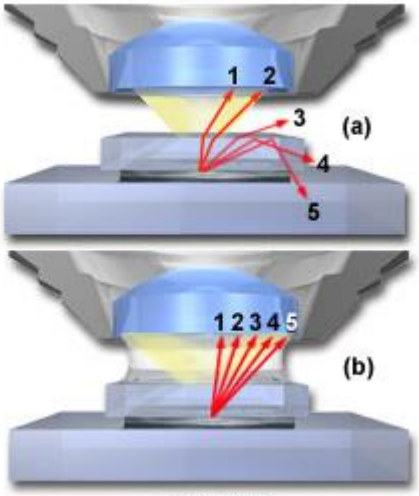


Figure 1

Nemíchat imerzní oleje od různých výrobců !!!

Homogeneous Immersion System

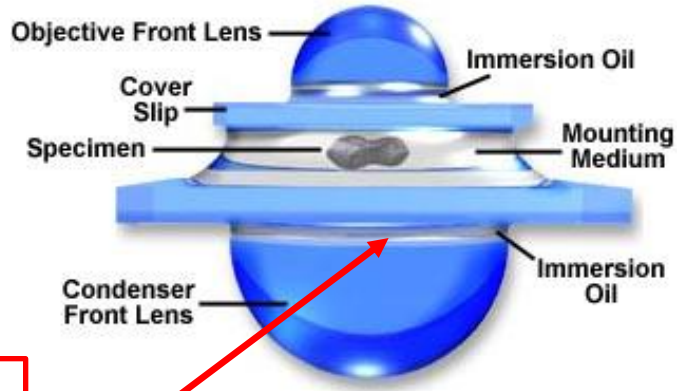


Figure 2

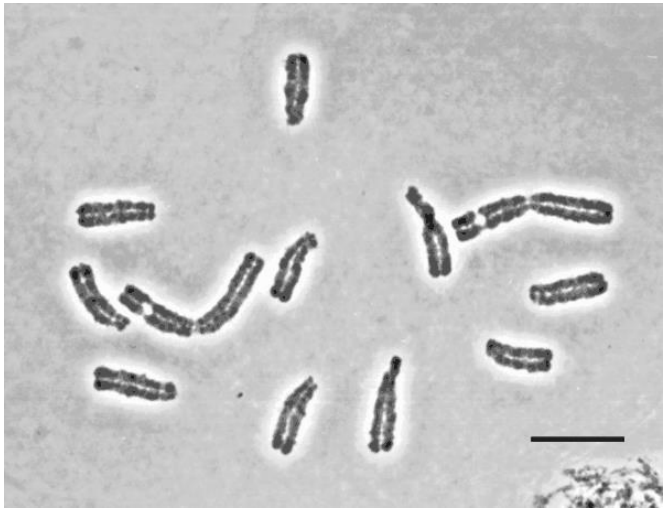
Čištění objektivů od im. oleje – směs
alkohol - éter 7 : 3

Imerz. olej pod kondenzor !!!

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)



Genetica **81**: 67–69, 1990.
© 1990 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

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

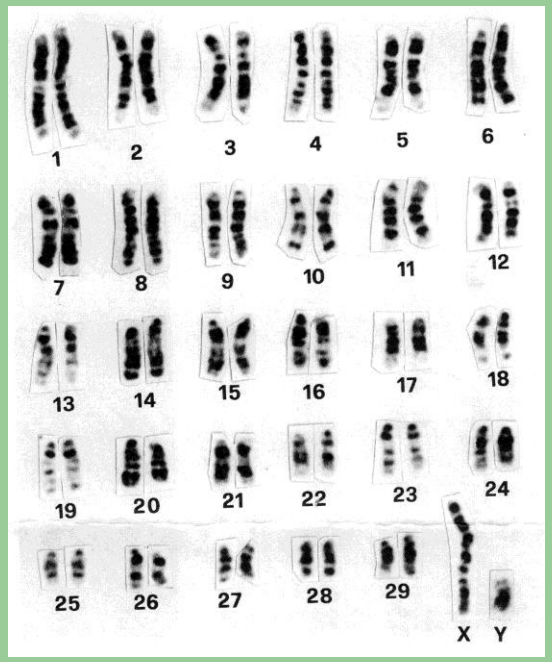
Abstract

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 hypothetic mechanism of Robertsonian rearrangements suggested by Holmquist and Dancis (Genetica 52-53: 151-163, 1980).

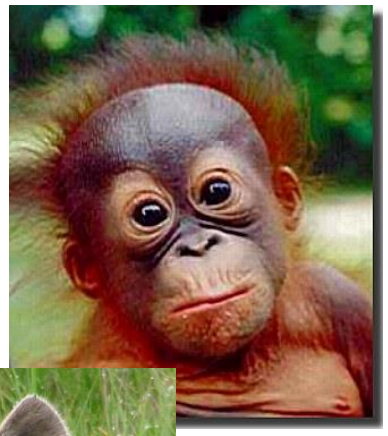
Nejčastější závady

- 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.



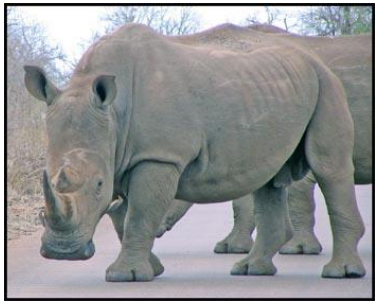
Tur domácí
(Bos taurus)
2n = 60
(akrocentrické chromozomy)

Hyena skvrnitá
(Crocuta crocuta)
2n = 40

Žirafa síťovaná
(Giraffa camelopardalis reticulata)
2n = 30

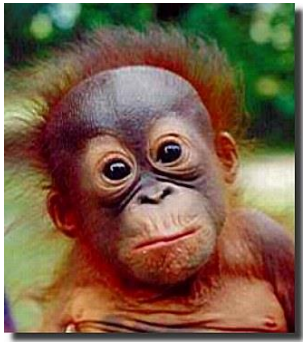
Nosorožec černý
(Diceros bicornis)
2n = 84

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



Nosorožec bílý (tuponosý)
(Ceratotherium simum)
2n = 82

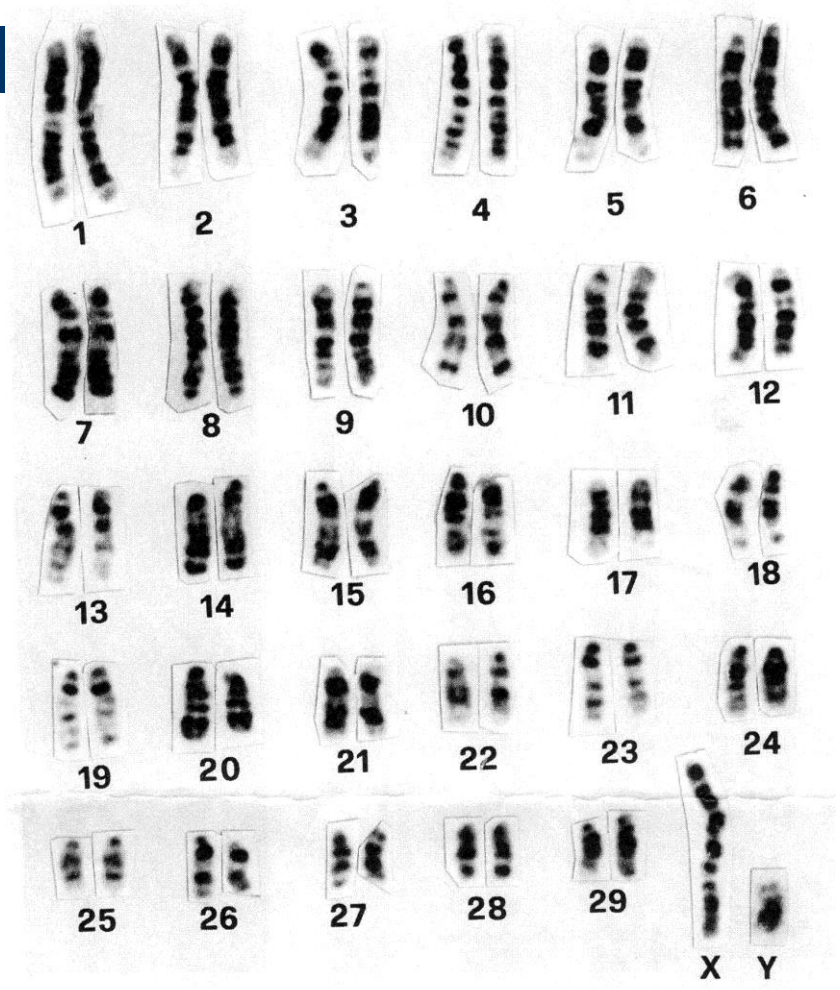
Sitatunga
(Lesoň bahenní)
(*Tragelaphus spekeii*)
2n = 30



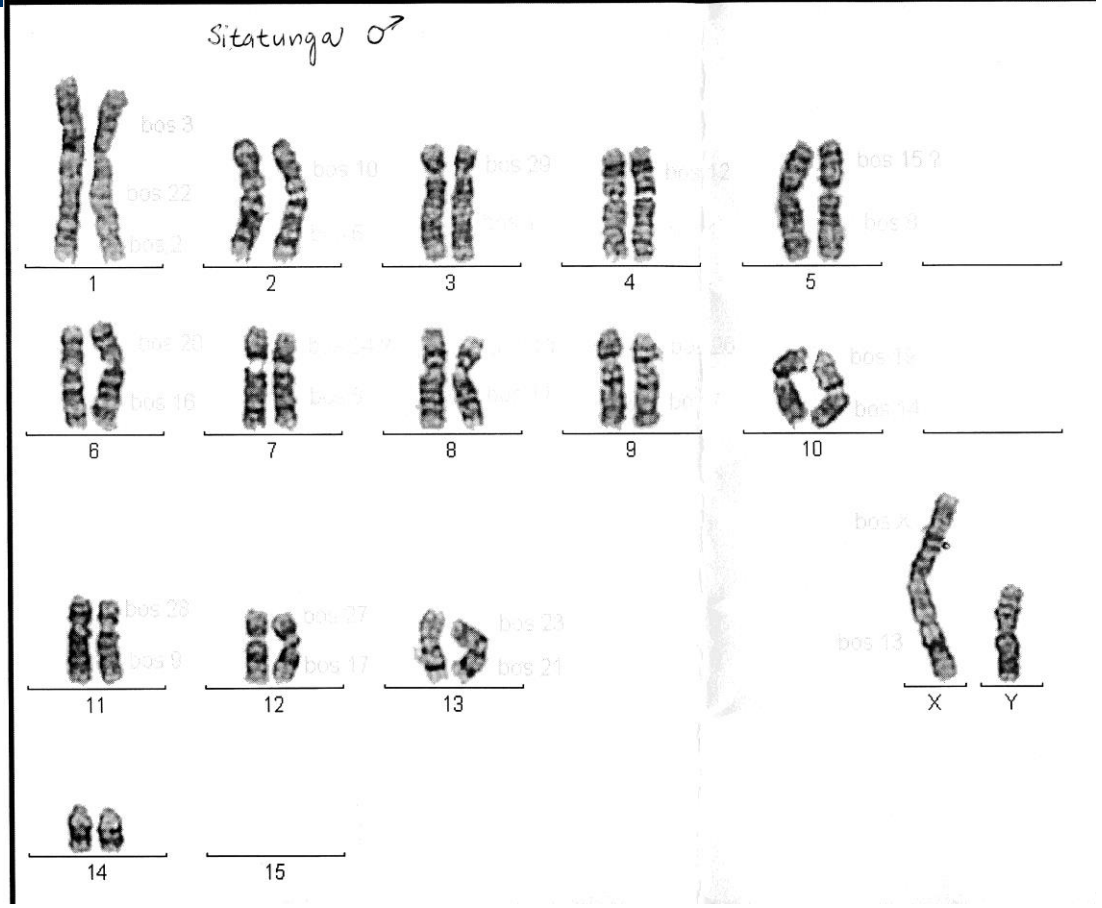
Orangutan
(Pongo pygmaeus)
2n = 48

Tur domácí
(Bos taurus)

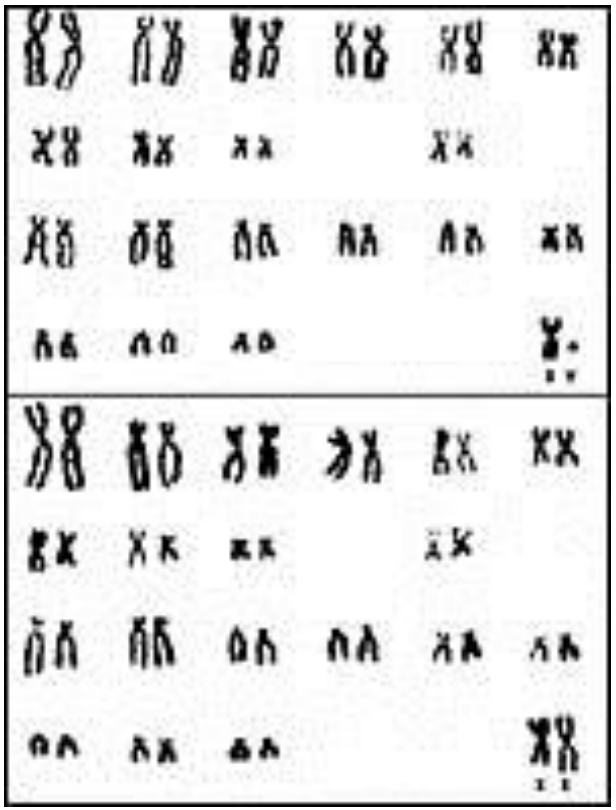
2n = 60 (akrocentrické chromozomy)



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

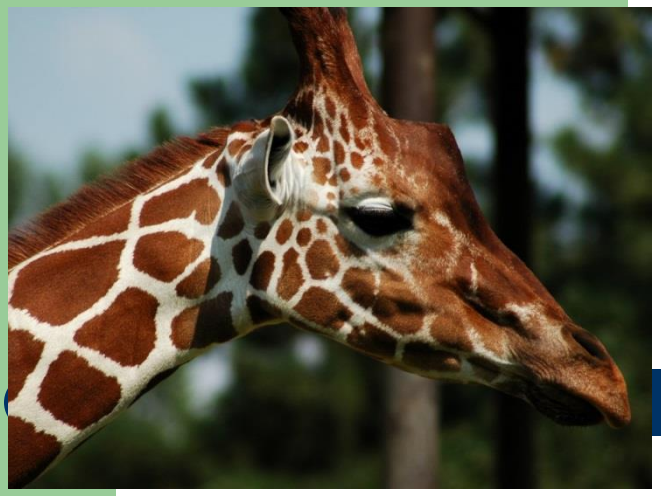


Hyena skvrnitá (Crocuta crocuta) 2n = 40



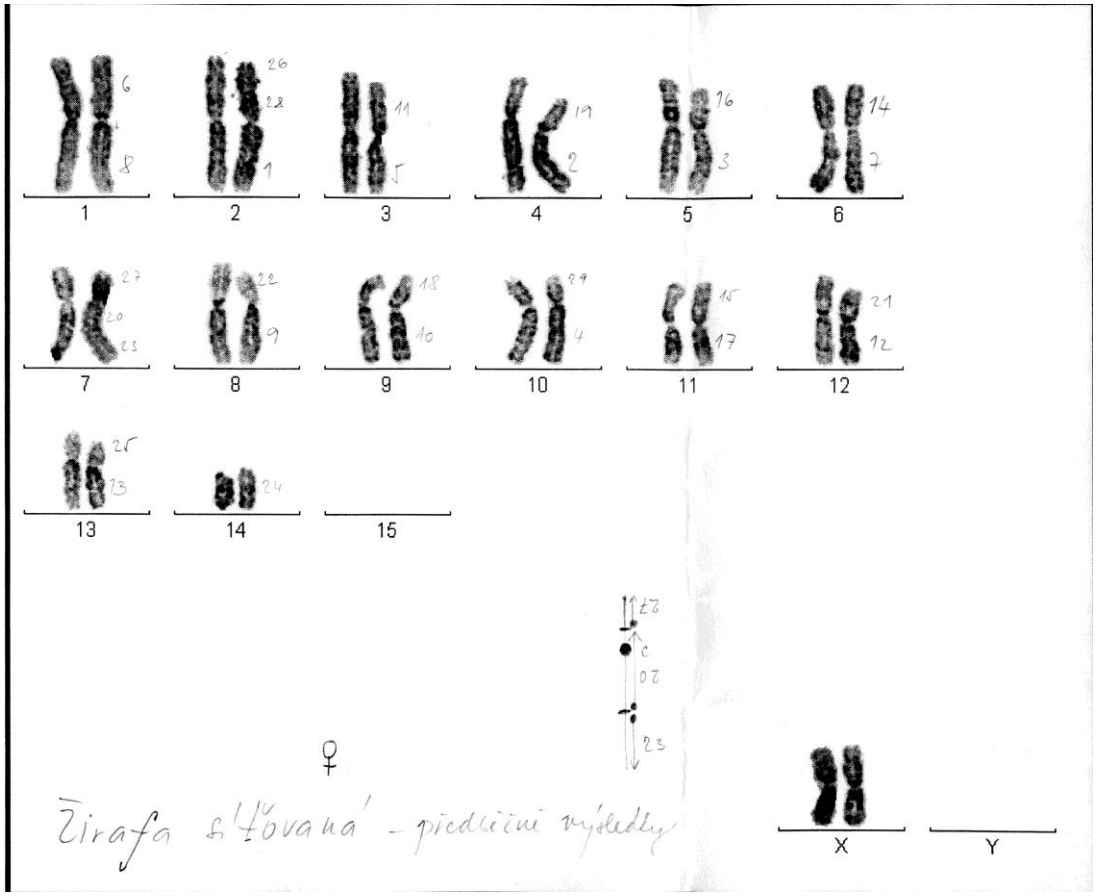
http://placentation.ucsd.edu/spottedhyenafs.htm

Karyotypes of spotted hyenas from Hsu & Benirschke, 1968.

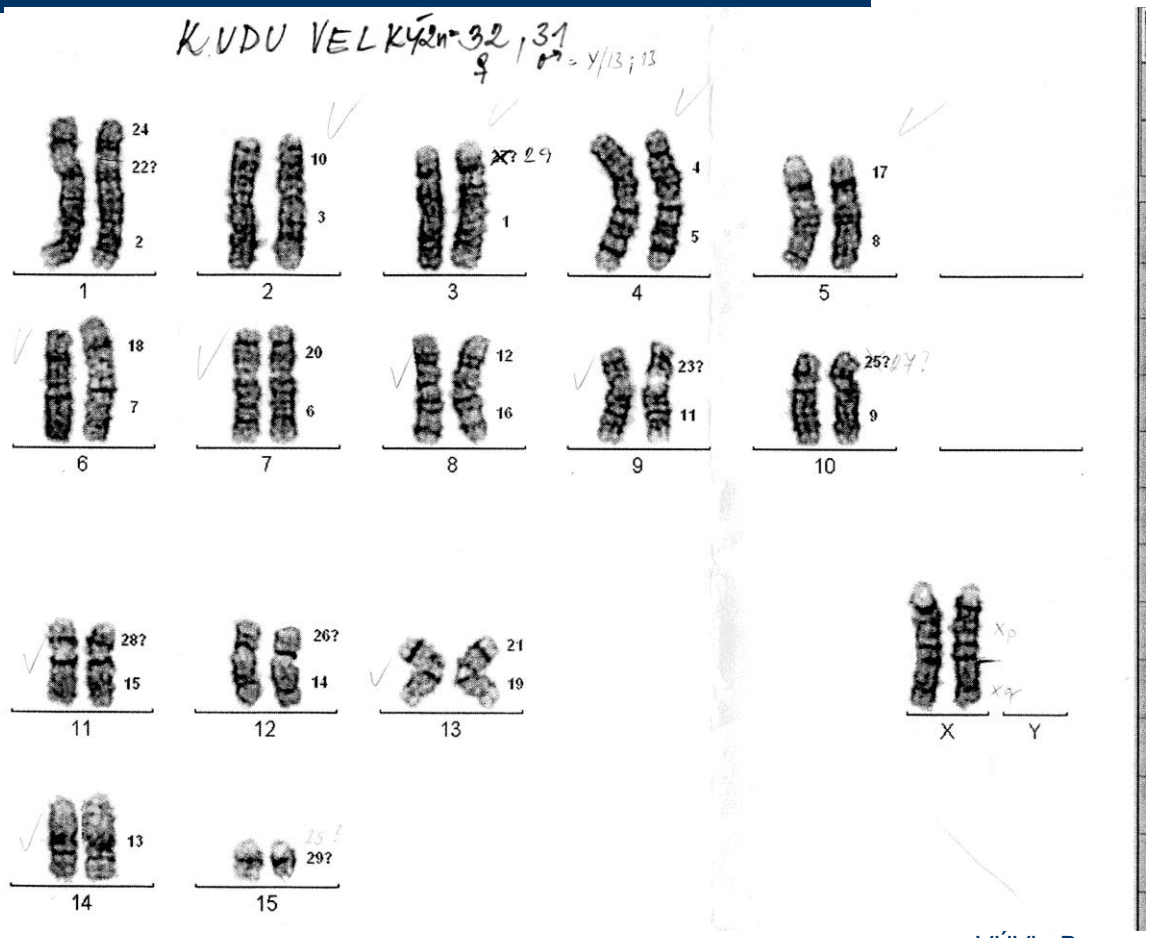


Žirafa síťovaná (Giraffa camelopardalis reticulata) 2n = 30

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



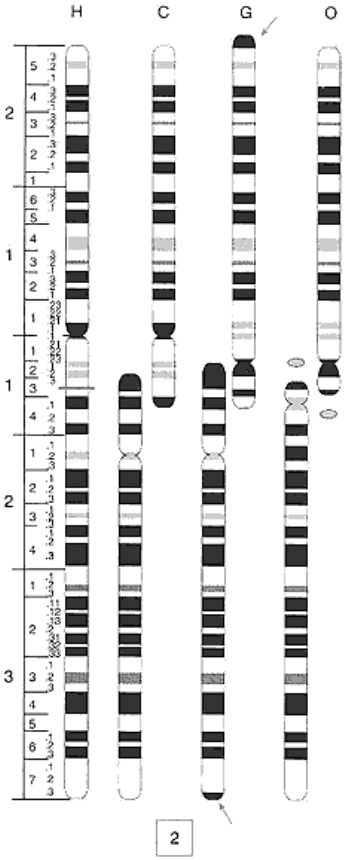
Kudu velký (Tragelaphus strepsiceros) 2n = 32 ♀, 31♂ (t(13;Y))

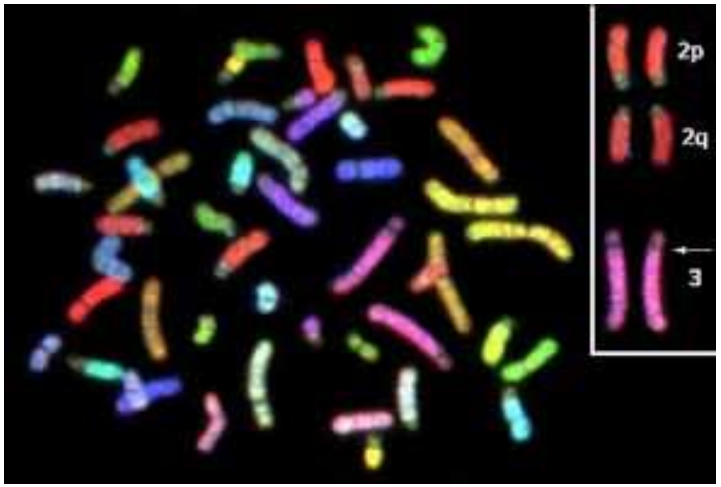


Orangutan
(Pongo pygmaeus)

Orangutan bornejský (P.p.pygmaeus)
Orangutan sumaterský (P.p.abelii)

2n = 48





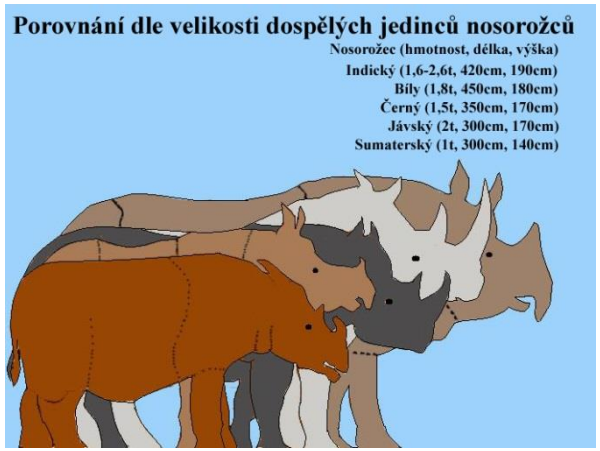
http://www.carolguze.com/text/442-4-chromosome_analysis.shtml

Black Rhinoceros range

Nosorožec černý
(Diceros bicornis)
2n = 84

Nosorožec bílý (tuponosý)
(Ceratotherium simum)
2n = 82

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



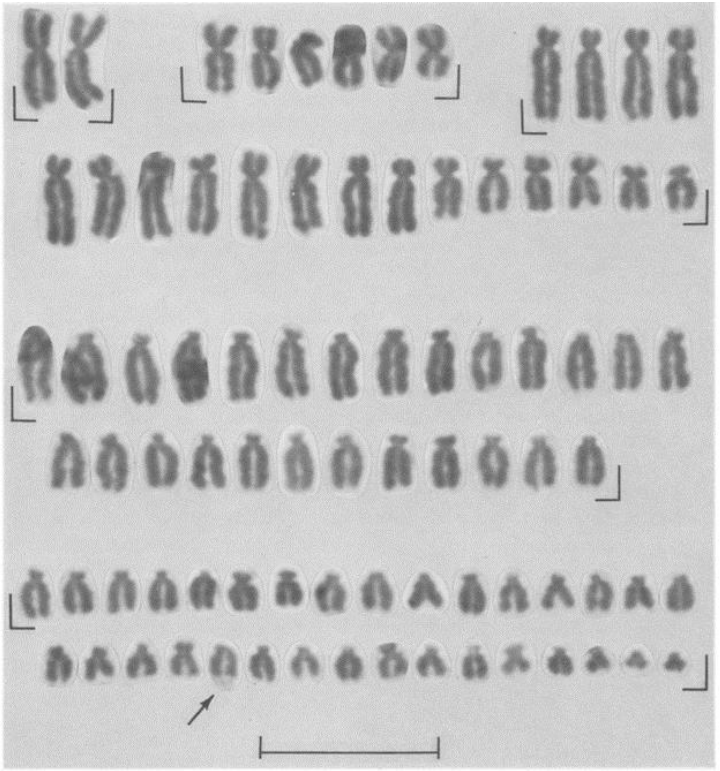
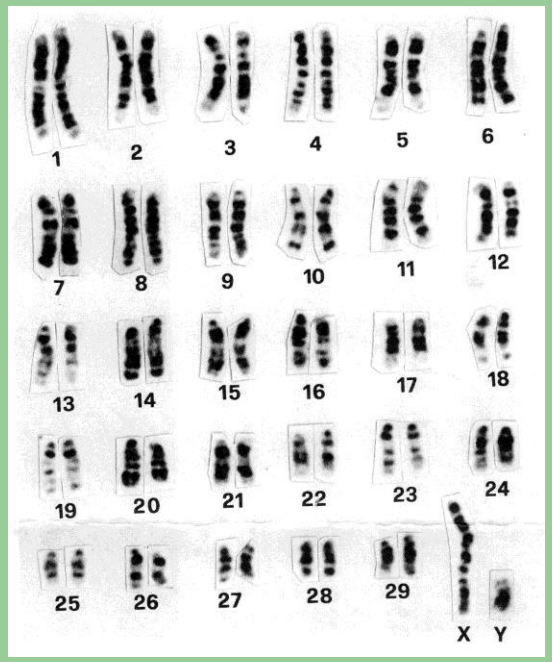


FIG. 1. Chromosomes of a black rhinoceros (acquisition 114M). Satellites (arrow) were consistently seen on one small acrocentric chromosome. Scale indicates 10 μ.

http://www.jstor.org/pss/2458963 http://en.wikipedia.org/wiki/White_Rhinoceros

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

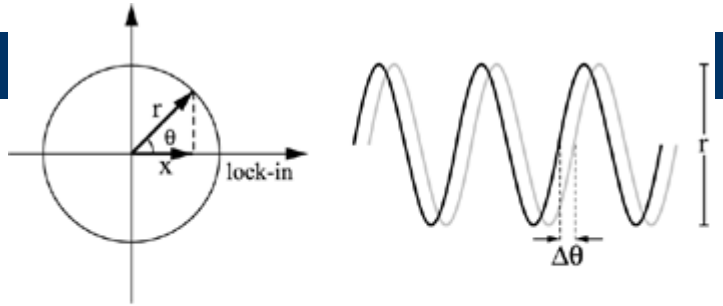
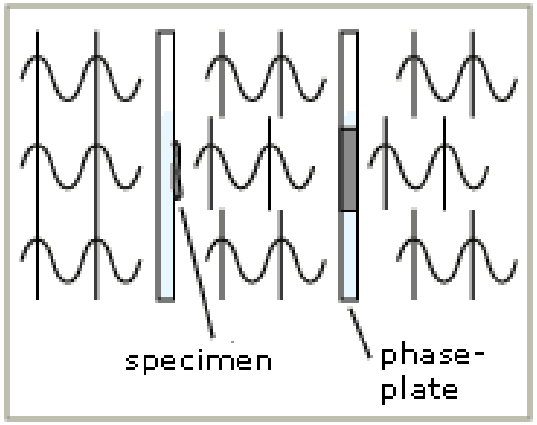
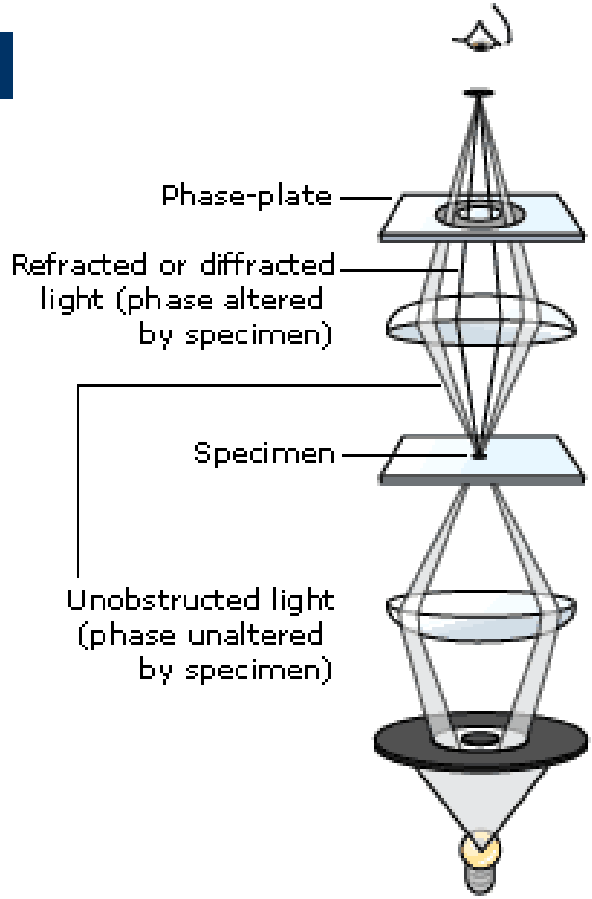


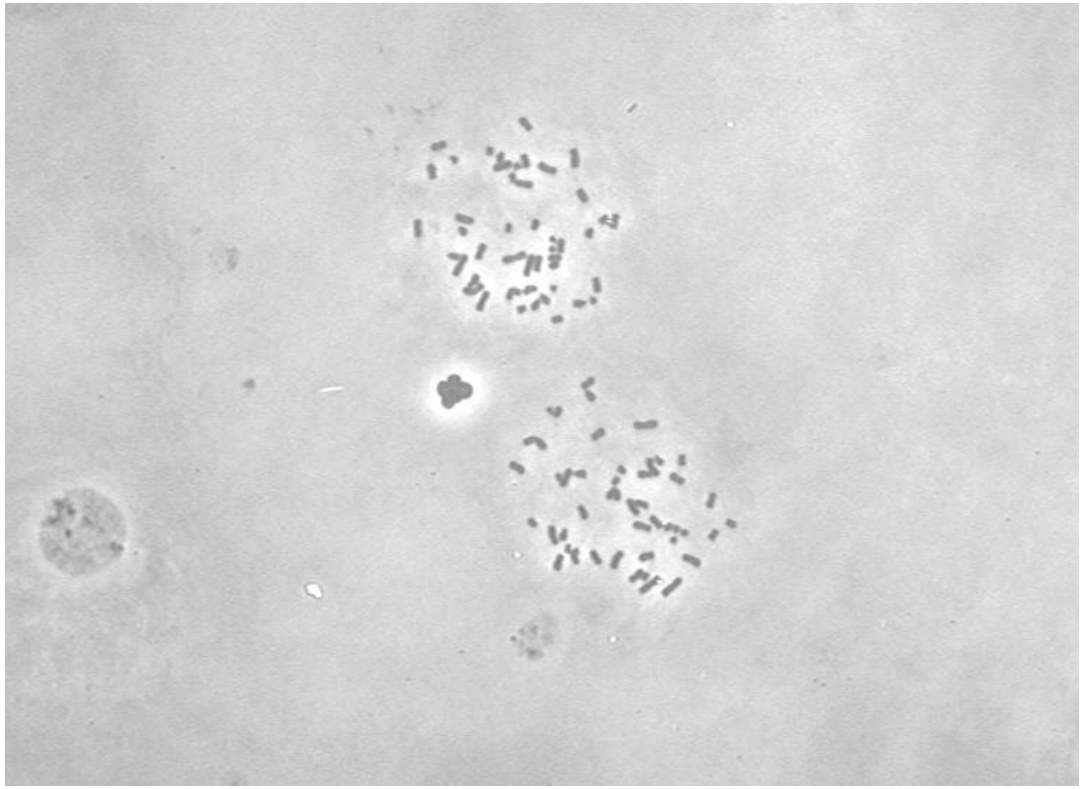
Figura 2. As imagens de contraste de fase são geradas com o sinal (r) detectado no eixo x por um amplificador tipo lock-in. Dependendo do ângulo de fase adotado inicialmente (θ) entre a oscilação da sonda e a leitura do fotodetector, o sinal x pode aumentar ou diminuir para a mesma variação de fase (Δθ).





Zařízení pro fázový kontrast – PHACO objektivy, fázový kondenzor

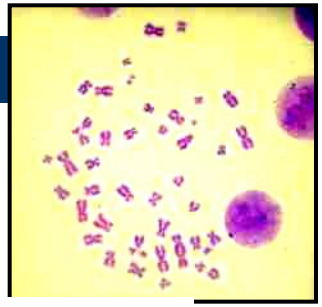
Pozorování lidských neobarvených chromozomů pomocí fázového kontrastu

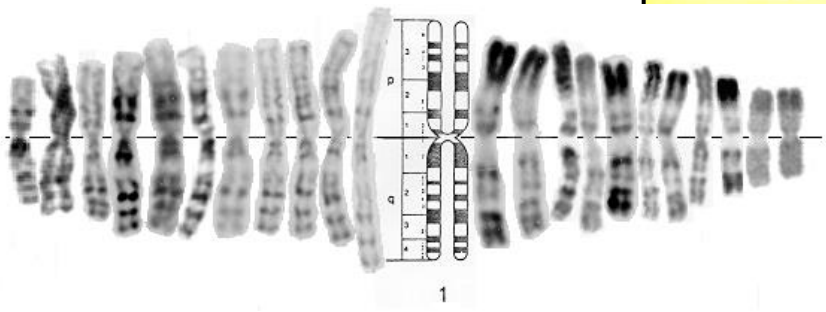


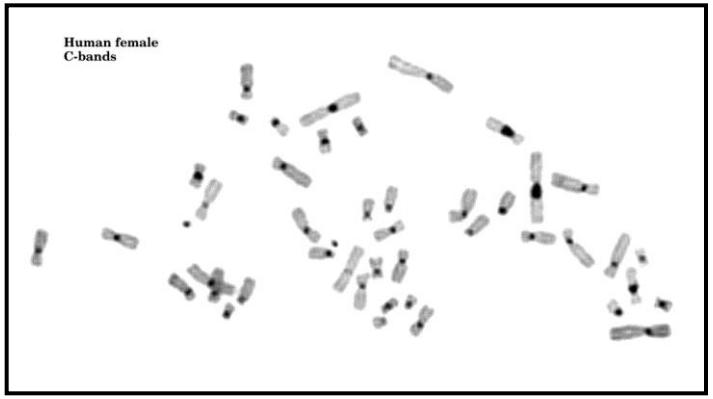
Kontrola dobře rozložených mitóz

Typy barvení lidských chromozomů

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





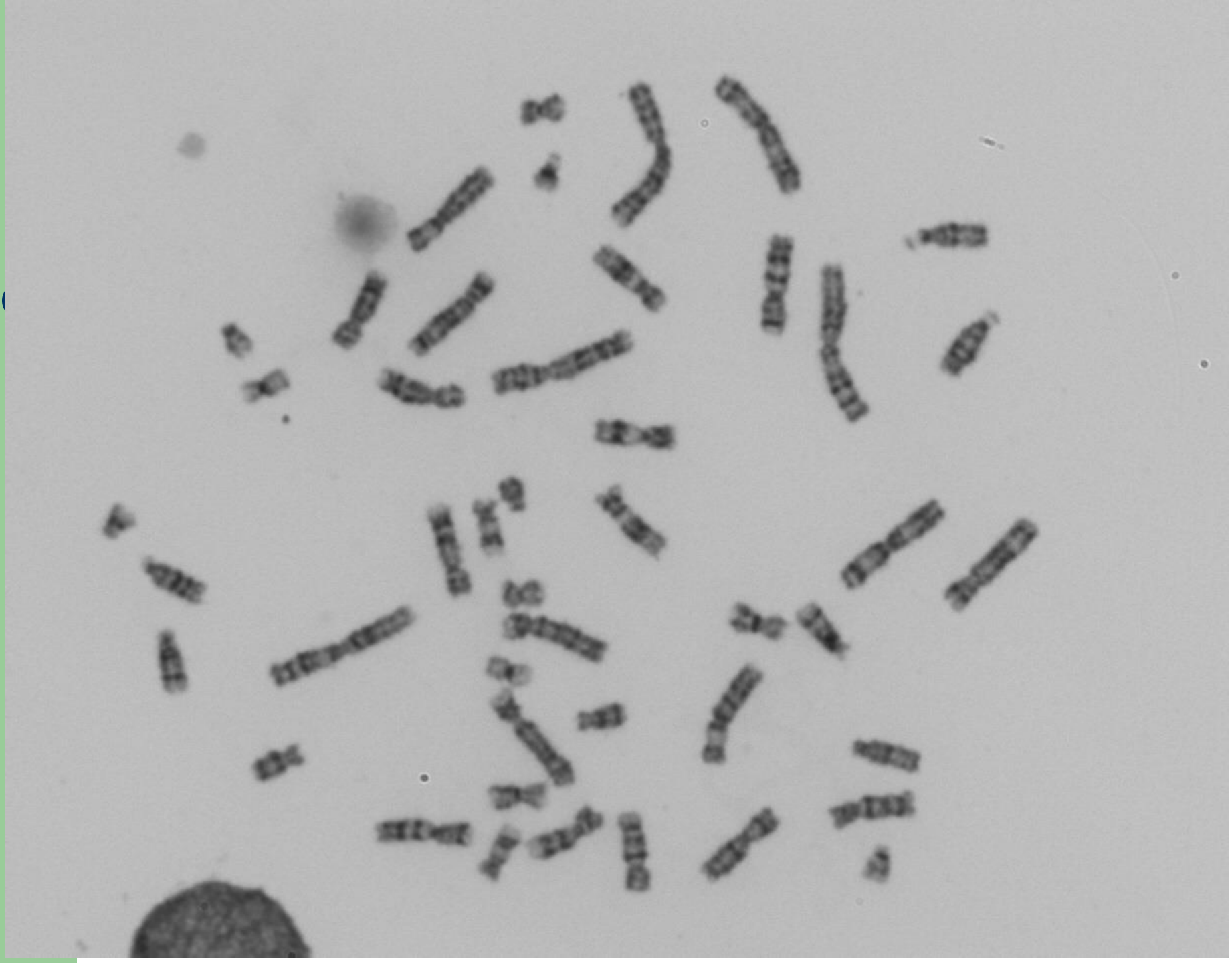


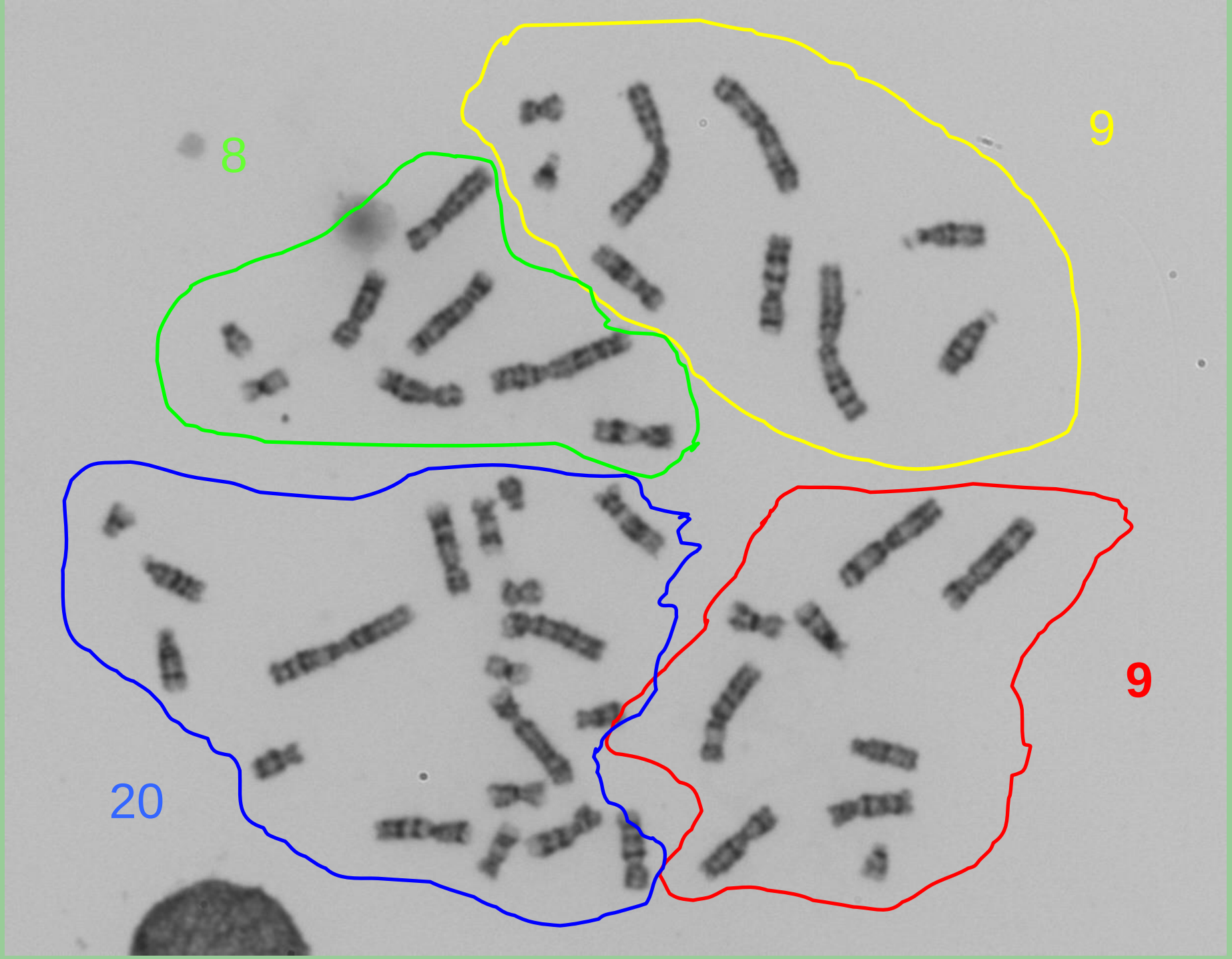
Pozorování lidských chromozomů pod mikroskopem

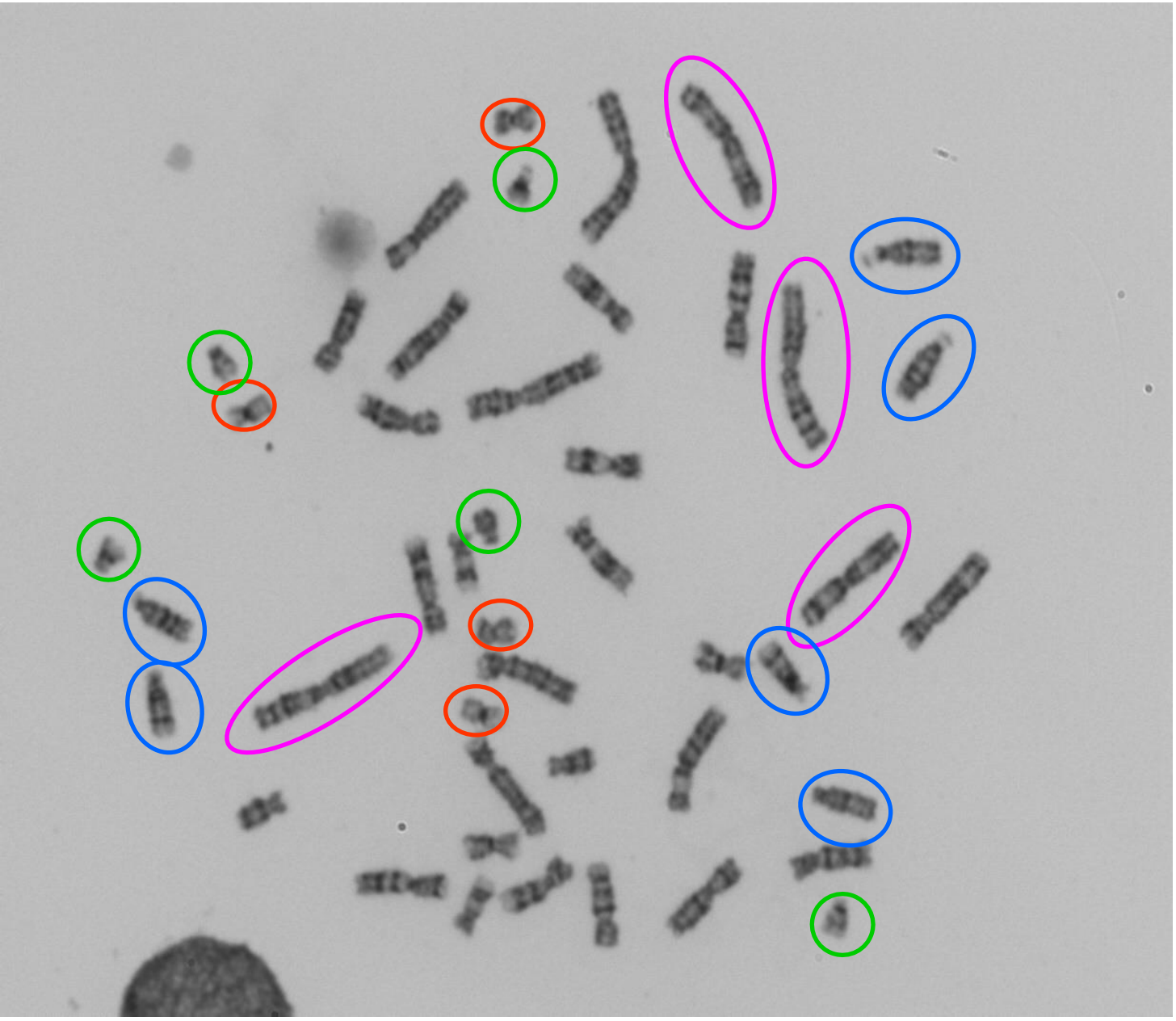
- Preparáty byly získány z dělících se **lymfocytů lidské periferní krve**.
- Krev jsme po odběru kultivovali v médiu, kde byly buňky přinuceny k mitotickému dělení.
- Vzniklou suspenzi jsme fixovali, nakapali na skla a napruhovali pomocí **G-pruhů** (bližší postup v dalším cvičení)

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

Patologické nálezy

- 47,XXY
- ring 21
- 45,X
- 46,XX
- 45,X[9]/47,XXX[1]
- 45,XY,der(13;14)
- 47,+21
- 46,XX,t(4;5)