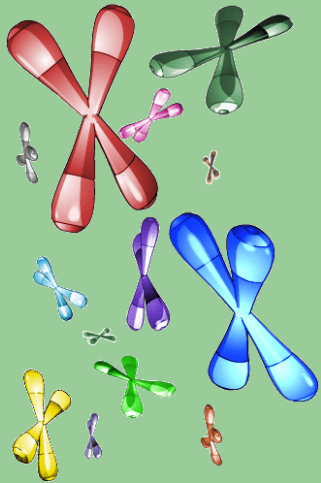


Bi6270c Cvičení z cytogenetiky

Cvičení 2: Klasická cytogenetika



Vladimíra Vallová

Odd. genetiky a molekulární biologie
Ústav experimentální biologie
PřF MU

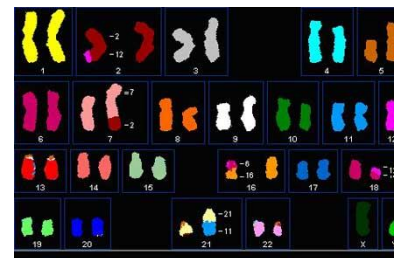
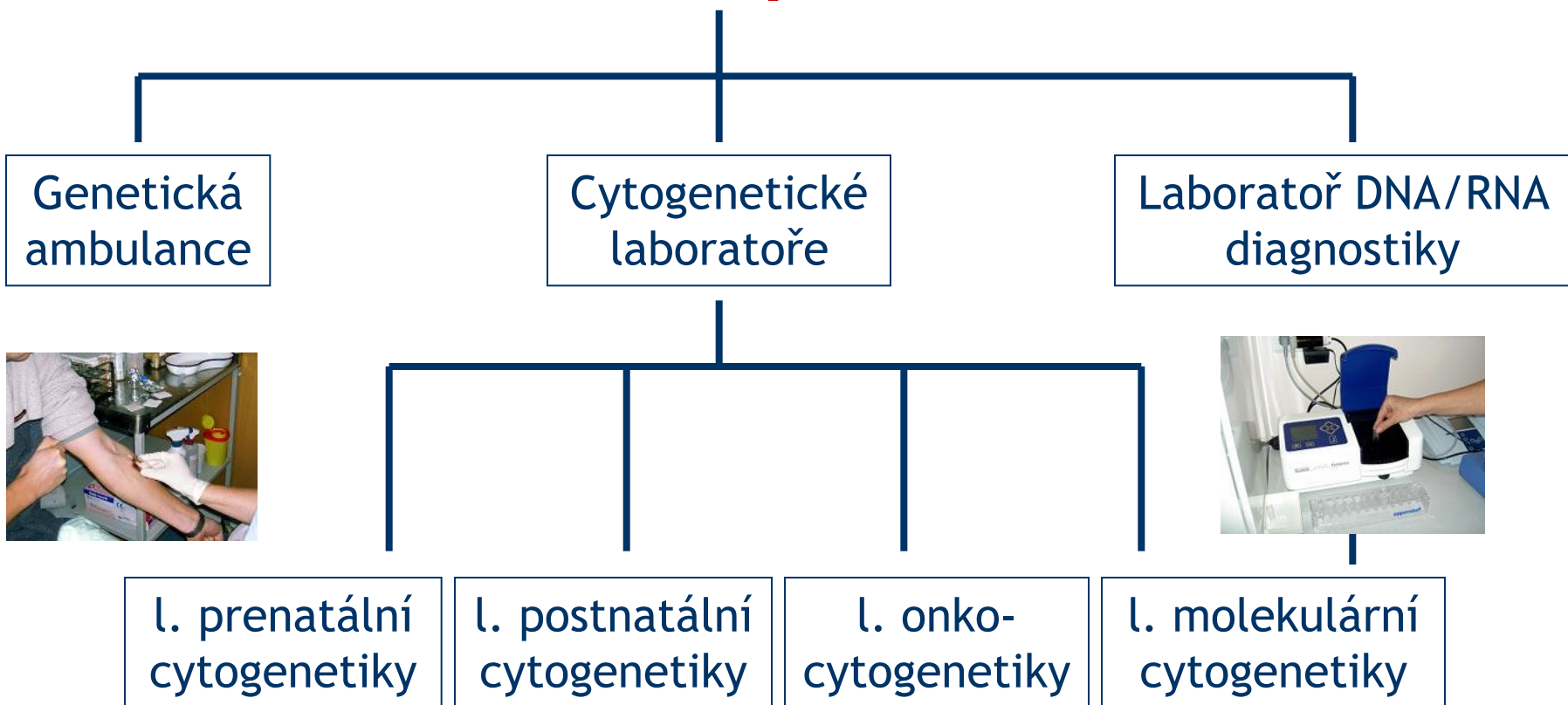


Klasická cytogenetika

- 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

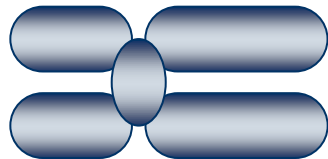


Možnosti vyšetření

Genetická ambulance

Cytogenetické laboratoře

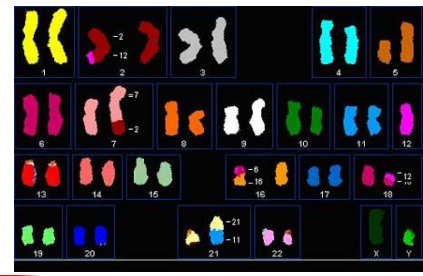
Laboratoř DNA/RNA diagnostiky



chromozomy

DNA

pacient



molekulárně-
biologické
vyšetření

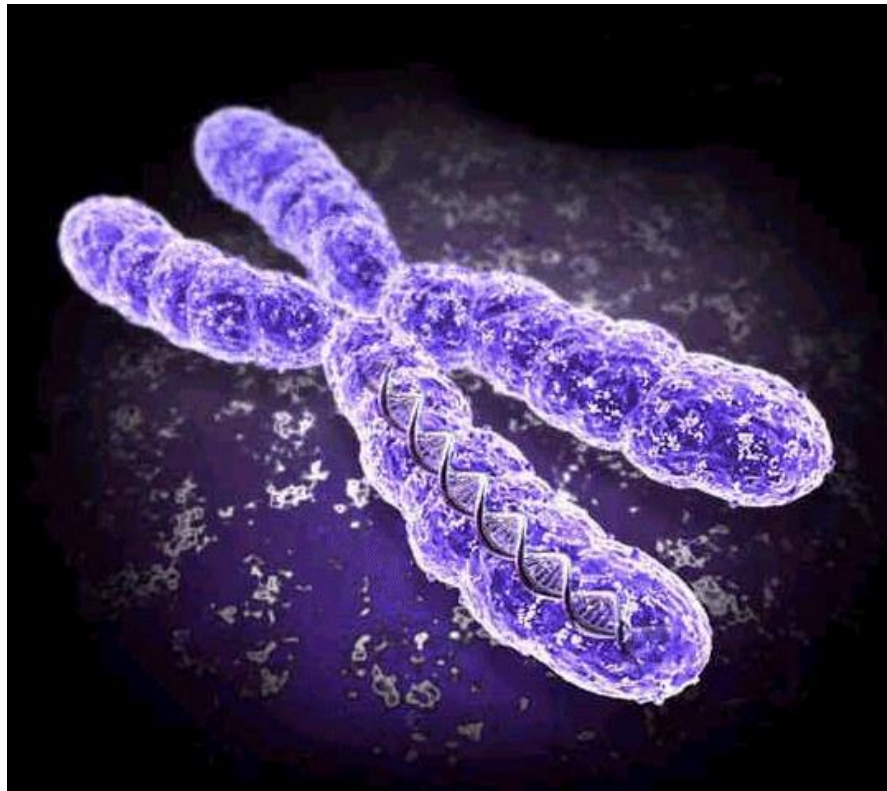
cytogenetické
vyšetření

genealogické
vyšetření

klasické

molekulárně-
cytogenetické

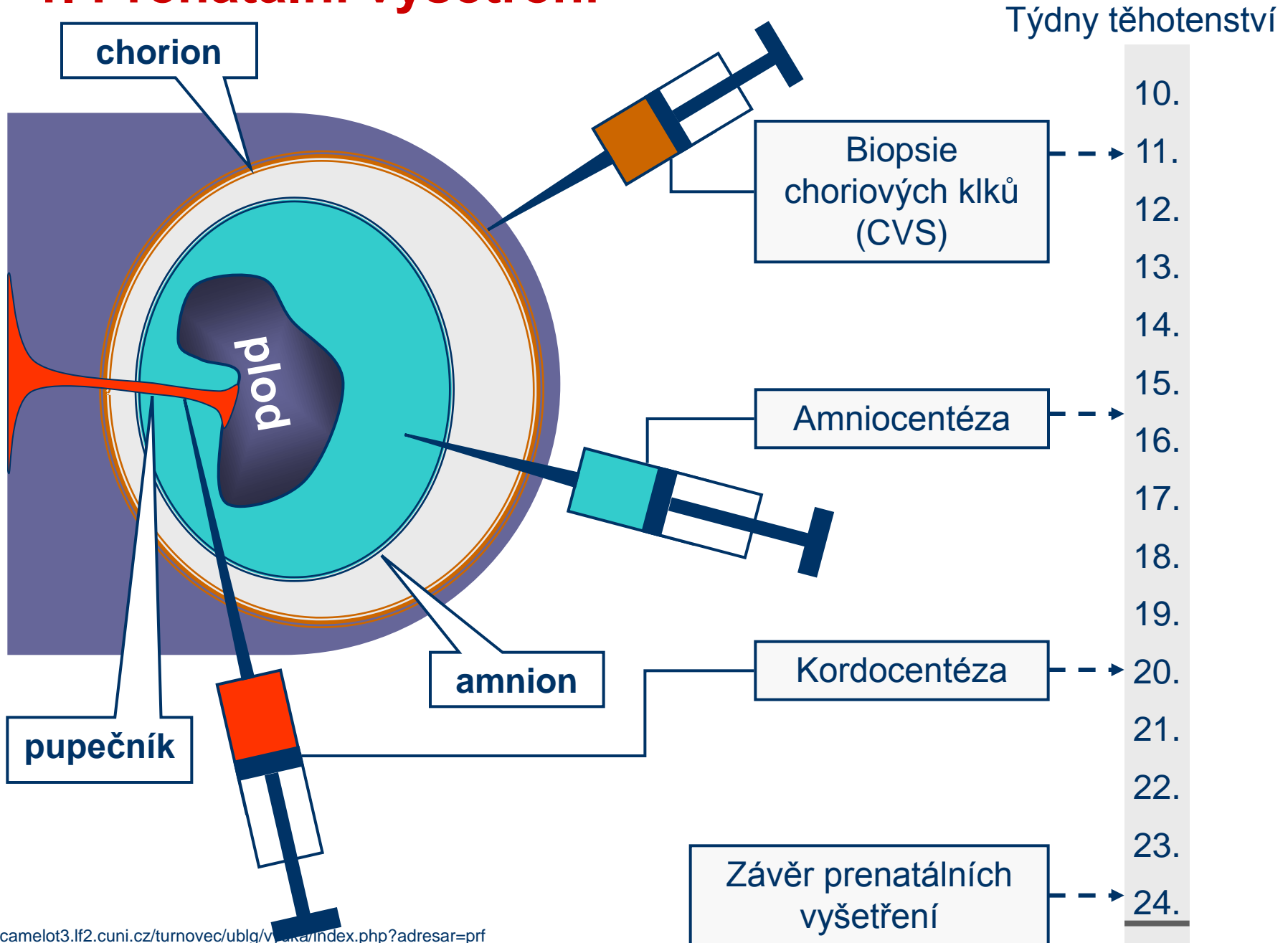
Základem cytogenetického vyšetření je analýza chromozomů.



Úkol 1. Kultivace a zpracování periferní krve pro chromozomální vyšetření



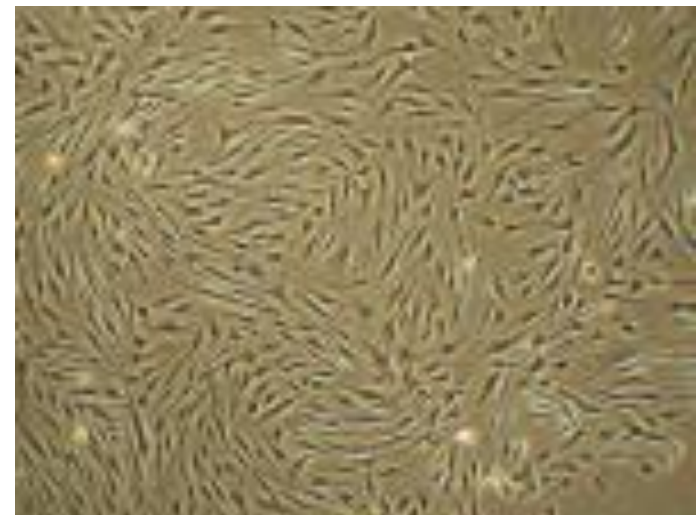
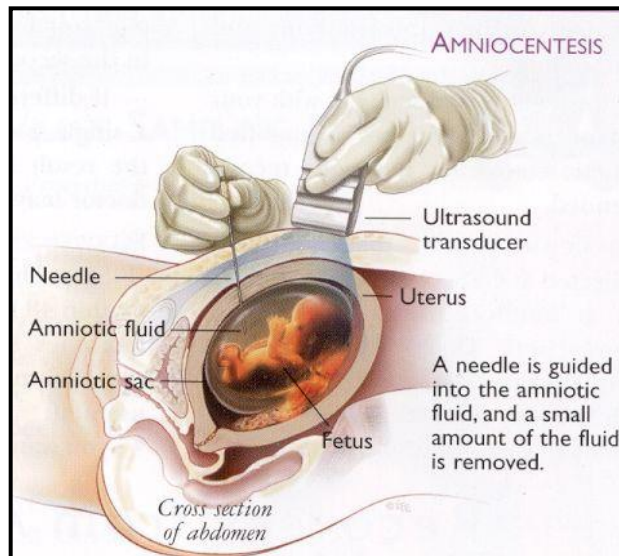
1. Prenatální vyšetření



Prenatální vyšetření:

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

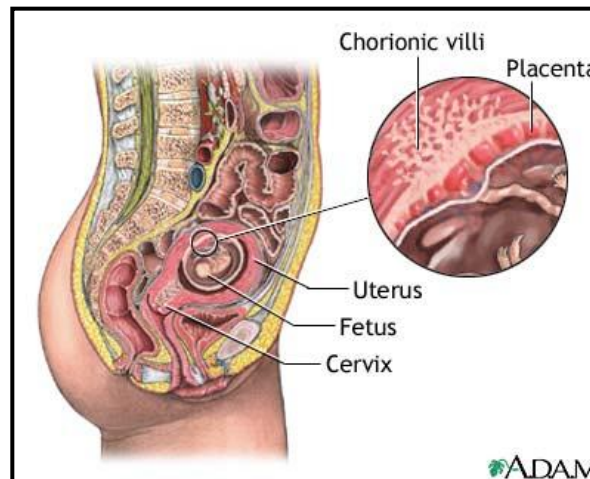
- dlouhodobá kultivace (9-14 dnů)- buňky rostou přisedlé na dně kultivační nádoby v koloniích
- před cytogenetickým zpracováním stažení buněk trypsinem
- ostatní postupy podobné (tj.hypotonie, fixace)



Prenatální vyšetření:

b) vyšetření buněk choriových klků

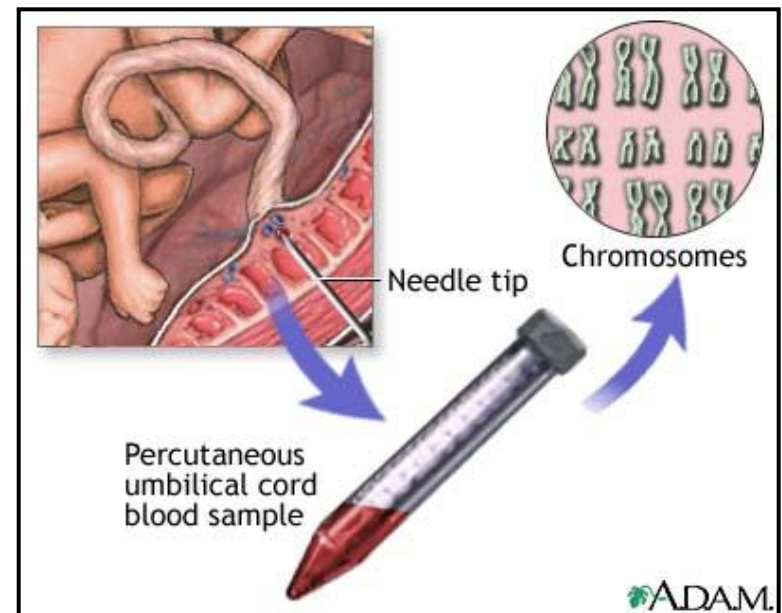
- přímá metoda nebo krátkodobá kultivace x dlouhodobá kultivace
- rozstříhání očištěné tkáně (event.rozvolnění buněk trypsinem) a nasazení do kultivačního media, kultivace a cytogenetické zpracování
- vyšetřuje se extraembryonální tkáň – určité riziko diskrepance s karyotypem plodu



Prenatální vyšetření:

c) kultivace buněk pupečnickové krve

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



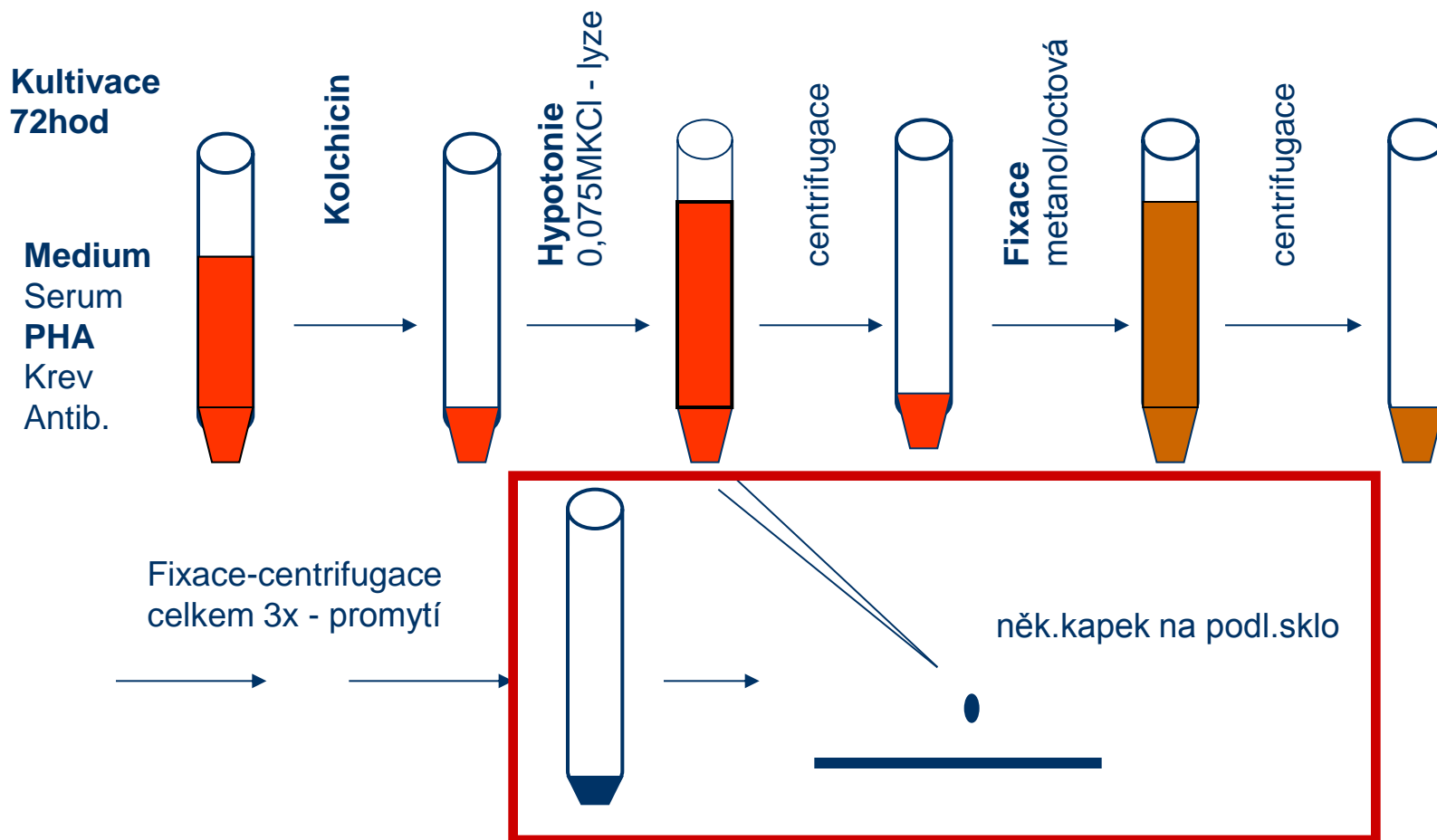
2. Postnatální vyšetření: kultivace periferních lymfocytů

- 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

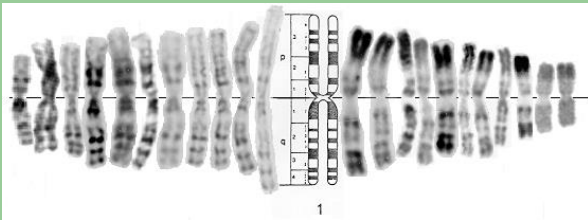
3. Hemato-onkologické vyšetření: kultivace kostní dřeně

- 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

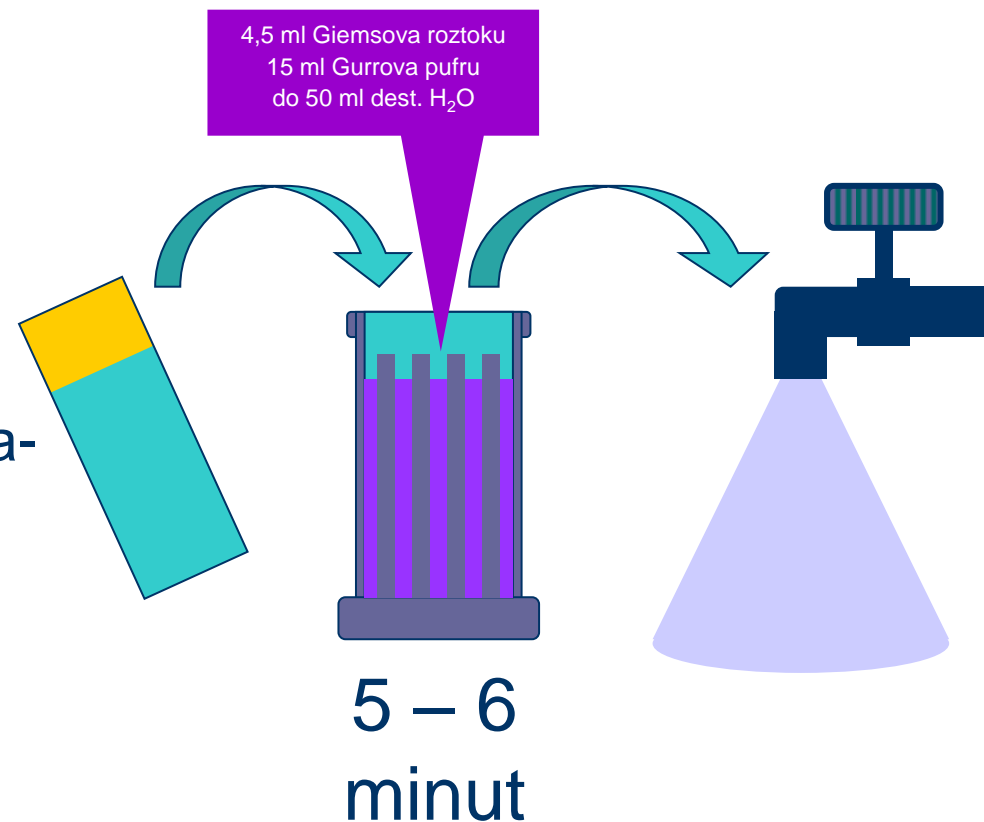


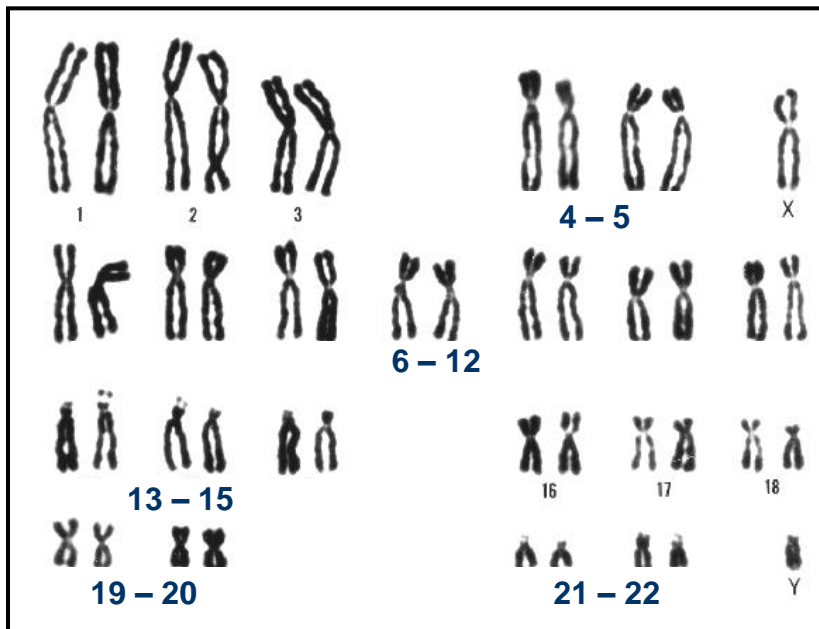
Úkol 2. Barvení a pozorování chromozomů



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 strukturalnich aberaci

| | | | |
|-----|--|---|--|
| Z' | | G' | |
| Z'' | | G'' | |
| DF | | | |
| F | | | |
| DM | | DOUBLE MINUTE | |
| M | | MINUTE | |
| DIC | | TIC | |
| R | | | |
| V | | chromatidová výměna | |
| ER | | obvykle 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

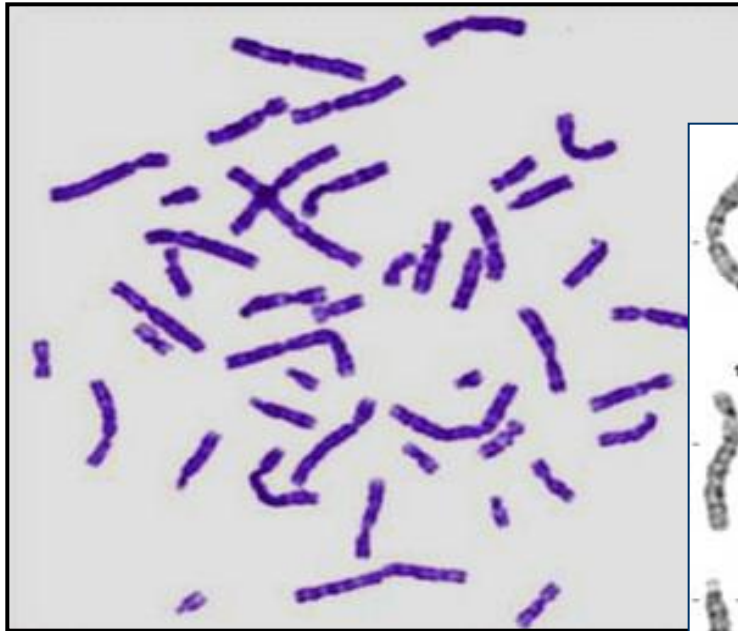
Metoda G pruhů

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

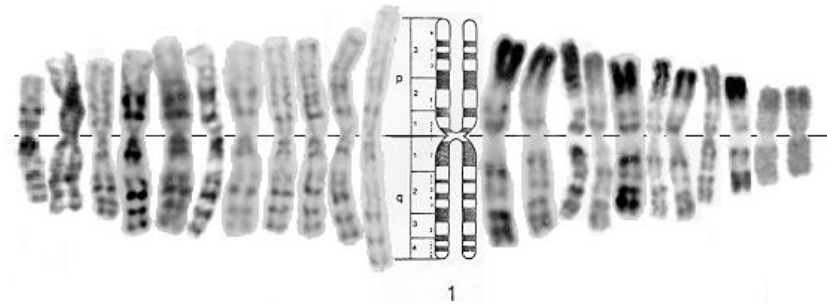
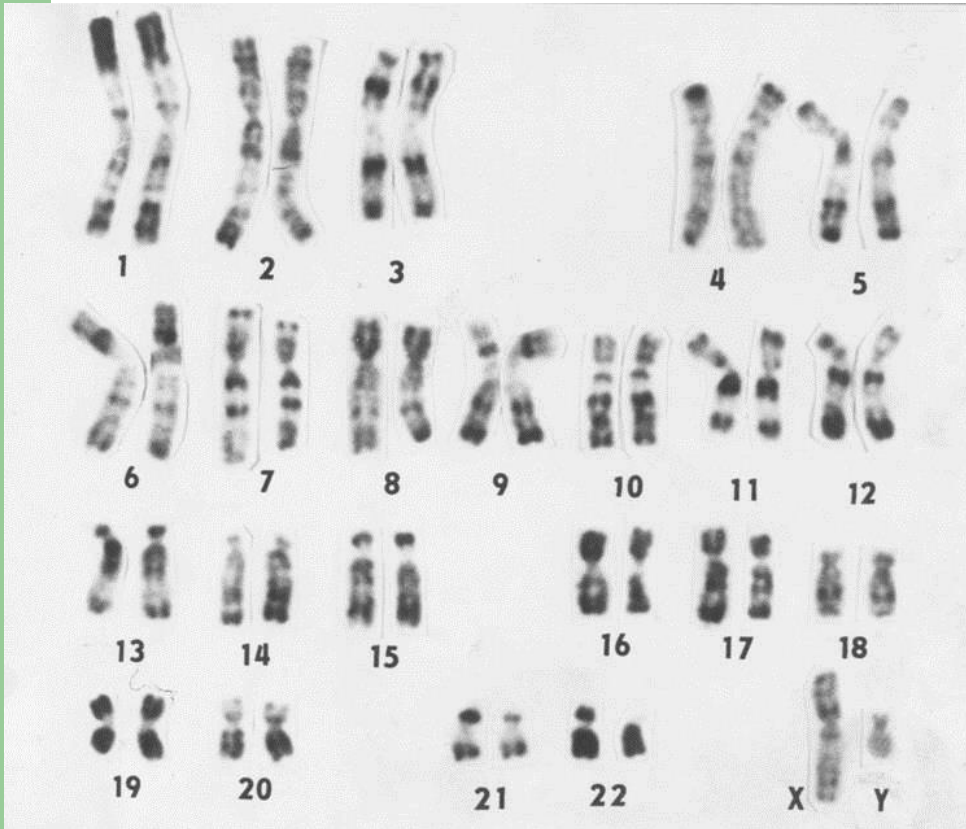
Metoda R-pruhů

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

G-pruhy

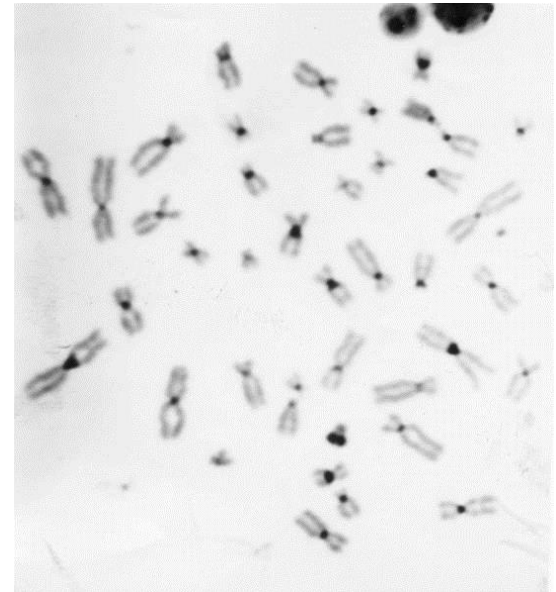


R-pruhy

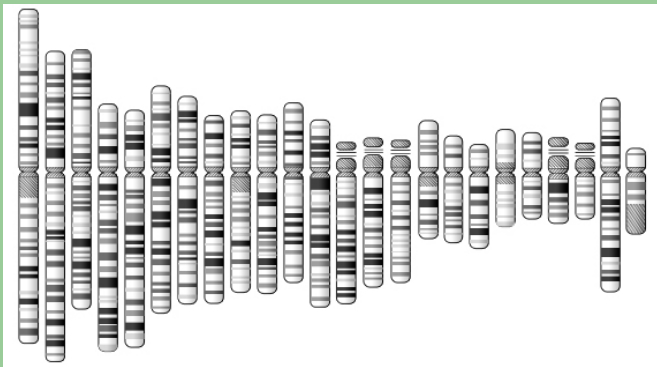


Barvení heterochromatinu – C-pruhy

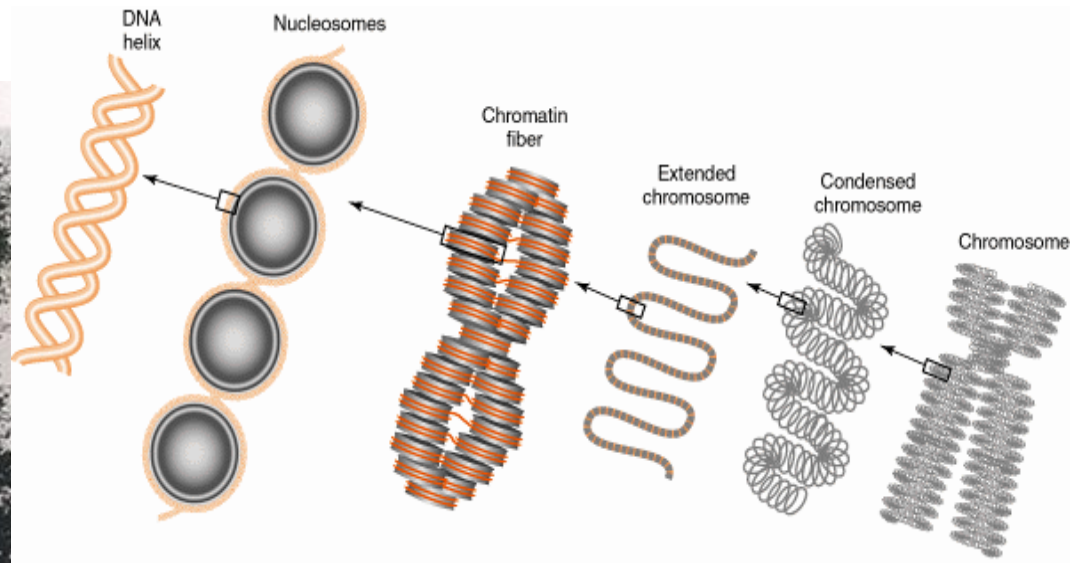
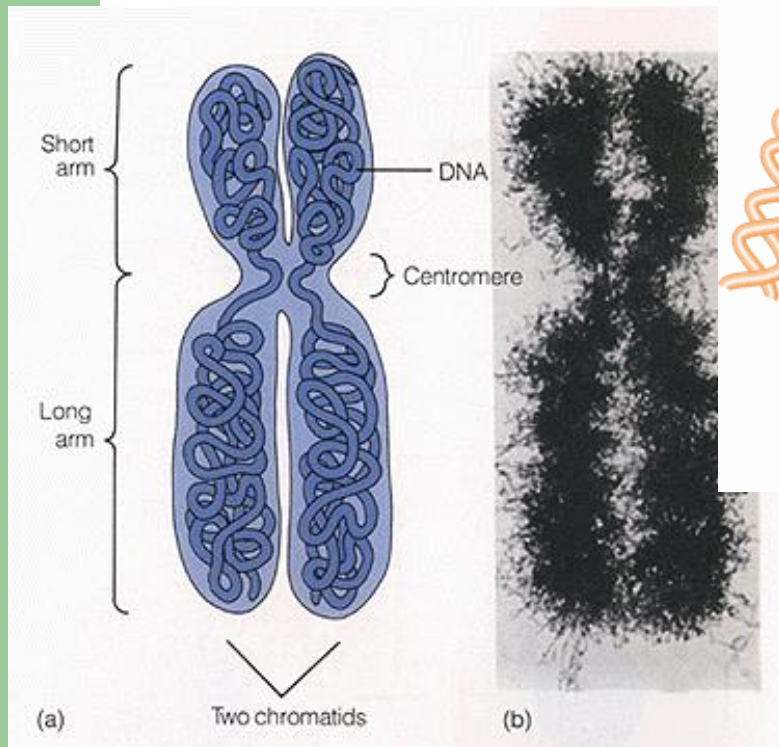
- silná denaturace euchromatinových částí: HCl, BA(OH)₂ + solné rotoky za vyšší teploty, Giemsou se pak barví pouze heterochromatinové bloky včetně centromer (jsou resistantnější) – vhodné pro studium heterochromatinových variant



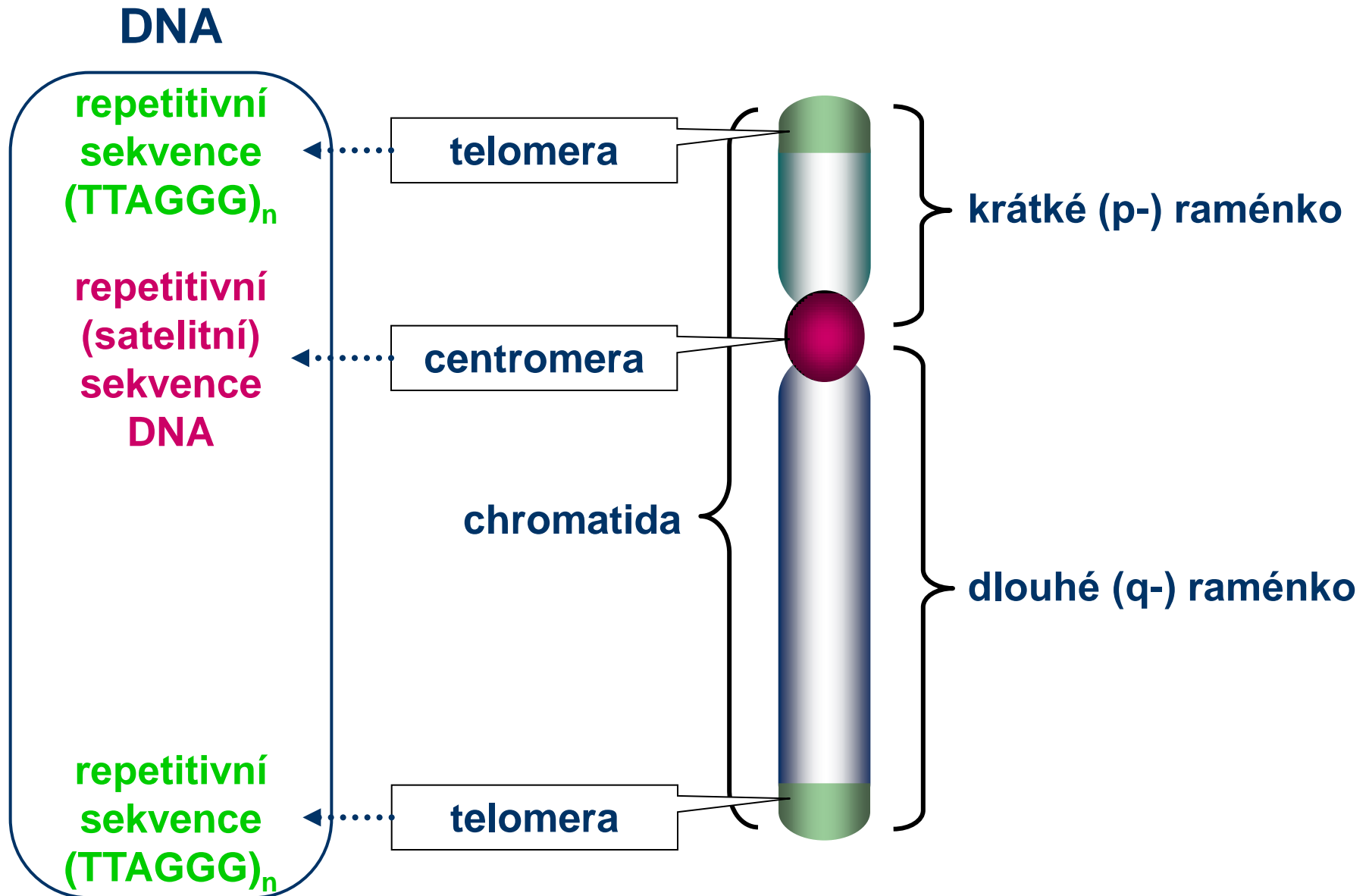
Úkol 3. Sestavení karyotypu člověka



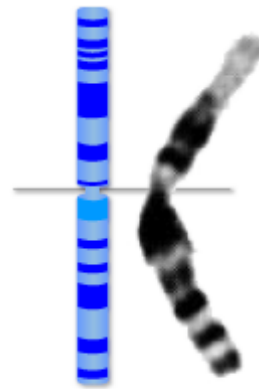
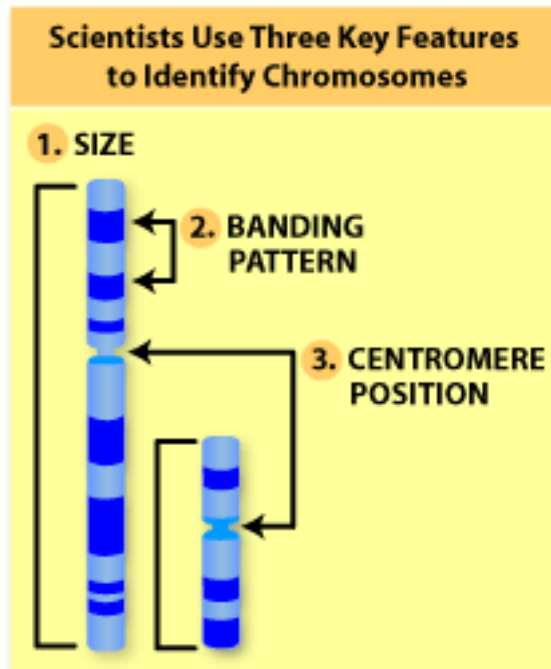
Ultrastruktura chromozomů



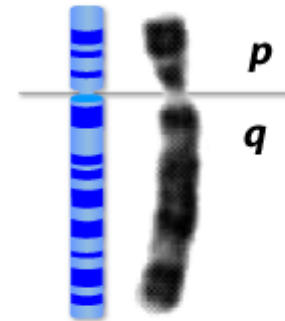
Morfologie chromozomu



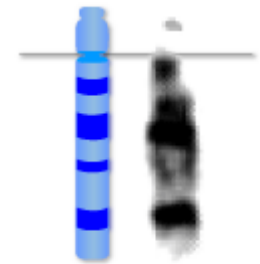
Velikost, poloha centromery a pruhy



Chromosome 1
Metacentric



Chromosome 4
Submetacentric

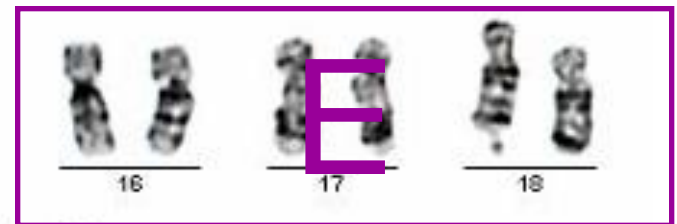
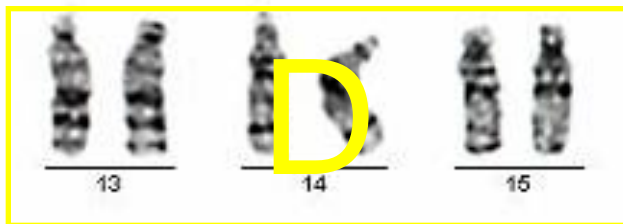
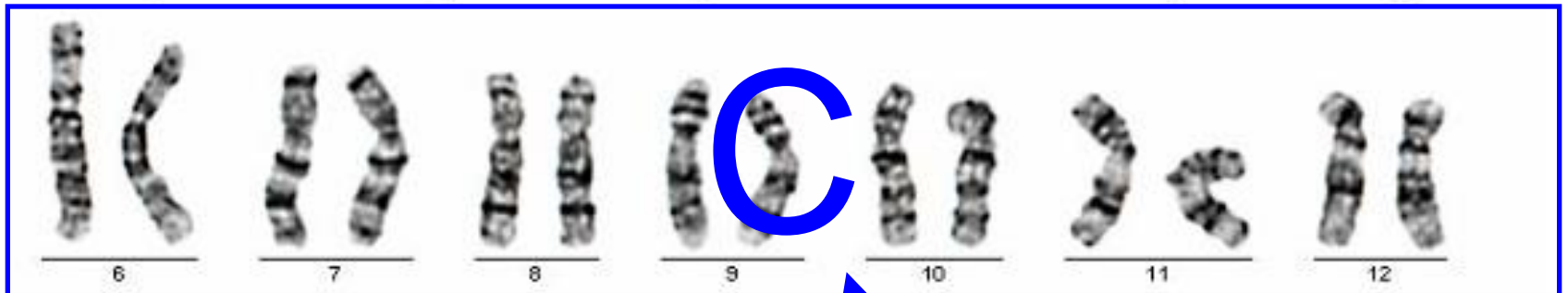
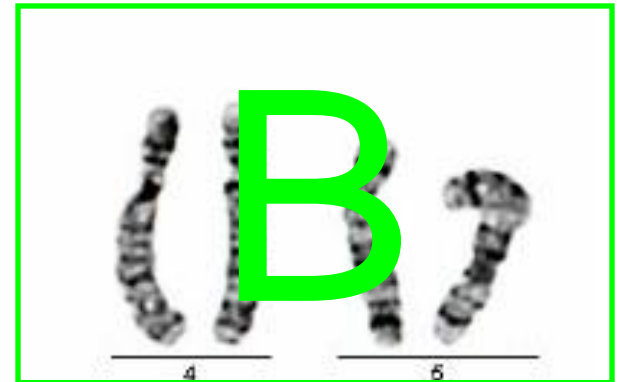
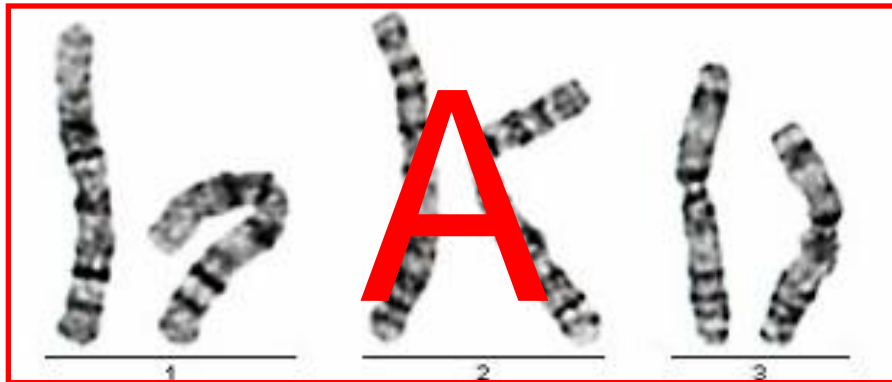


Chromosome 14
Acrocentric

Lidská somatická buňka obsahuje:

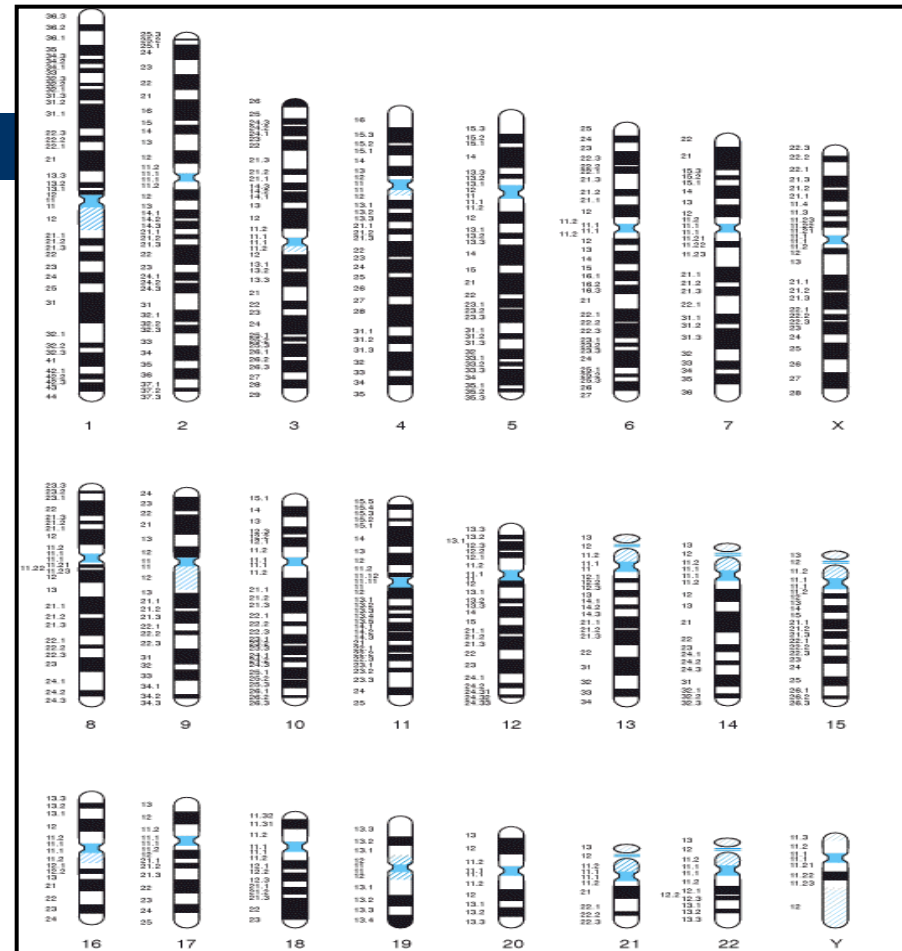
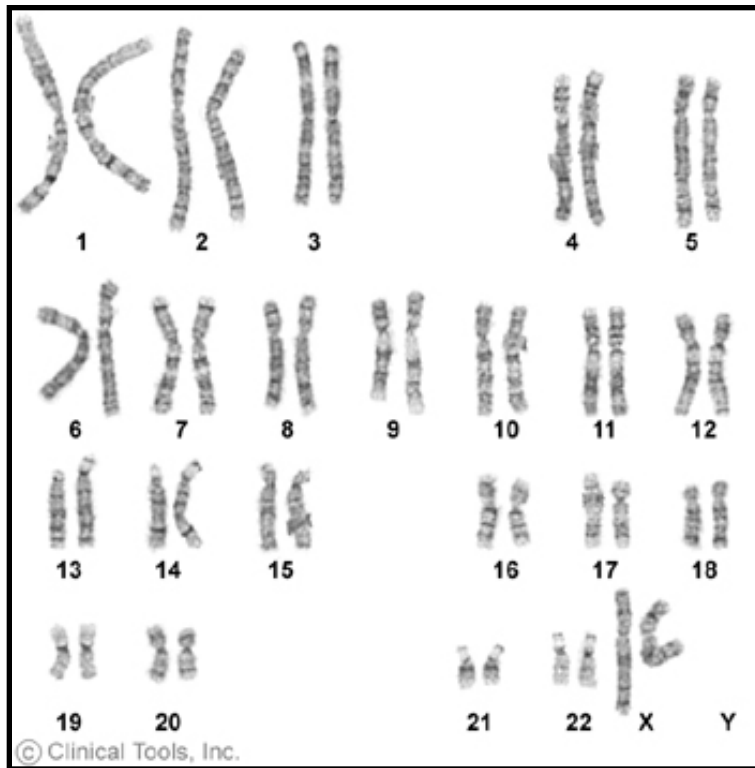
- 23 párů, tj. 46 chromozomů
 - 22 párů autozomů
 - 1 pár gonozomů (XX nebo XY)
- 7 velikostně a morfologicky odlišných skupin chromozomů (A, B, C, D, E, F, G)

Karyotyp člověka



Chromozomové složení buňky udává karyotyp

Karyotyp lidské somatické buňky



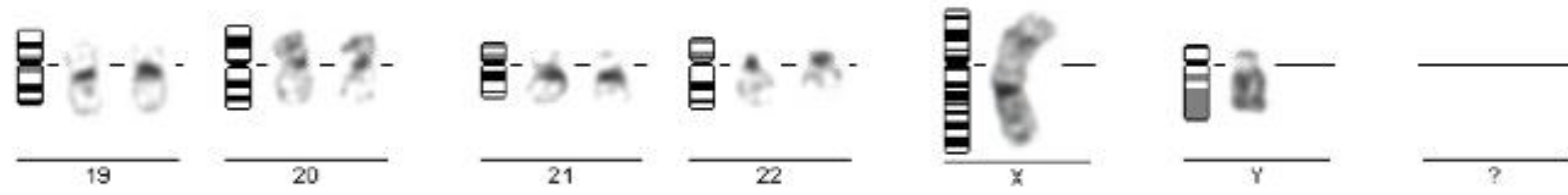
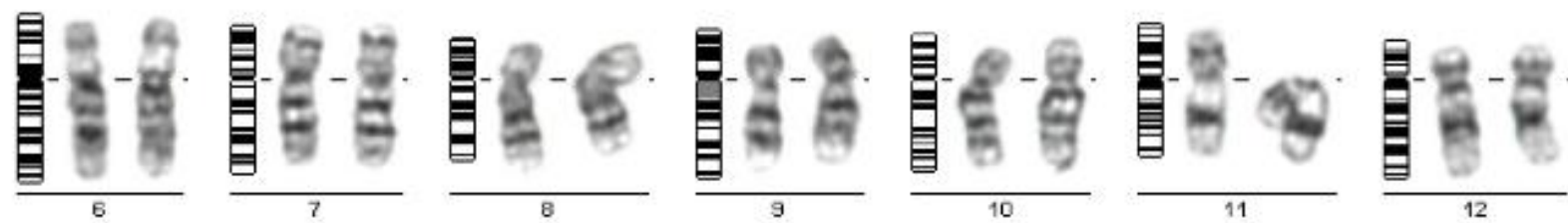
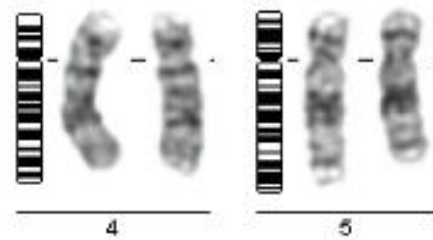
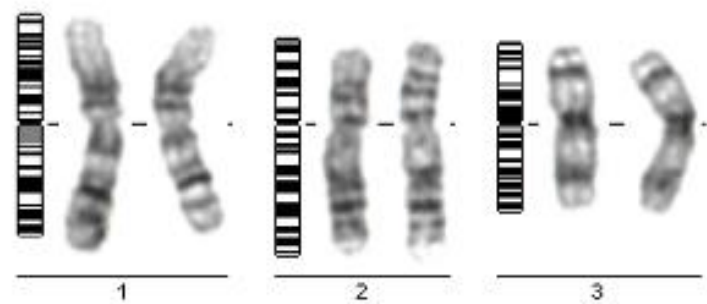
Idiogram lidských chromozomů

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

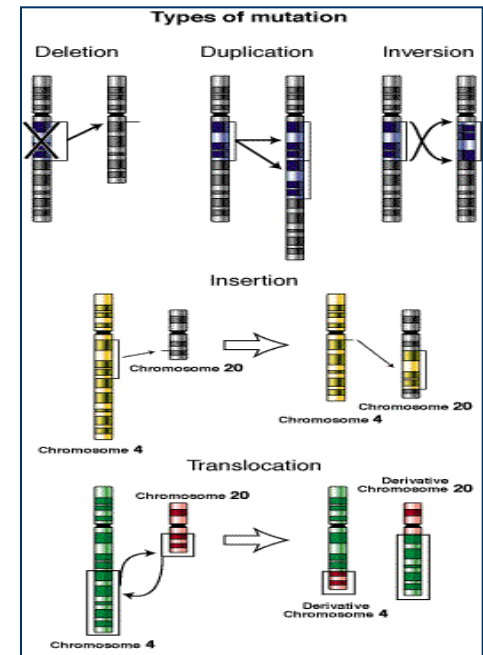
- Segmentace, oddělení jednotlivých chromosomů
- Odstranění buněk a překřížených chromosomů
- Karyotypování
- Posouzení karyotypu, možné odchylky od standartu

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*GHXYZJKL - | 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) |