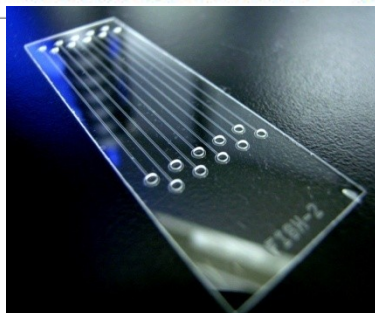
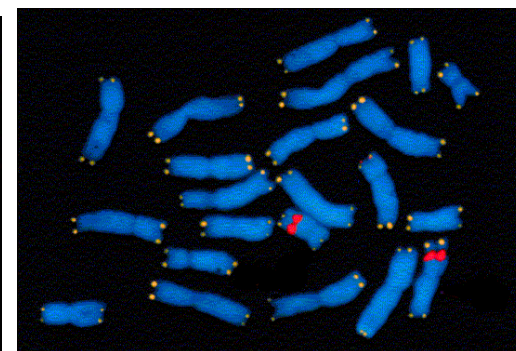
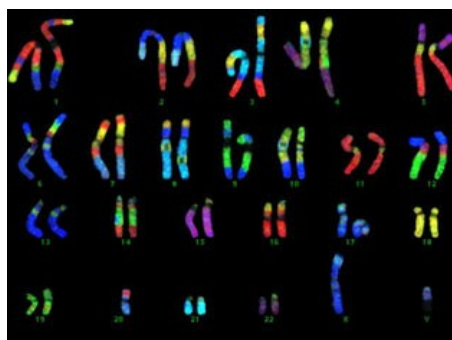
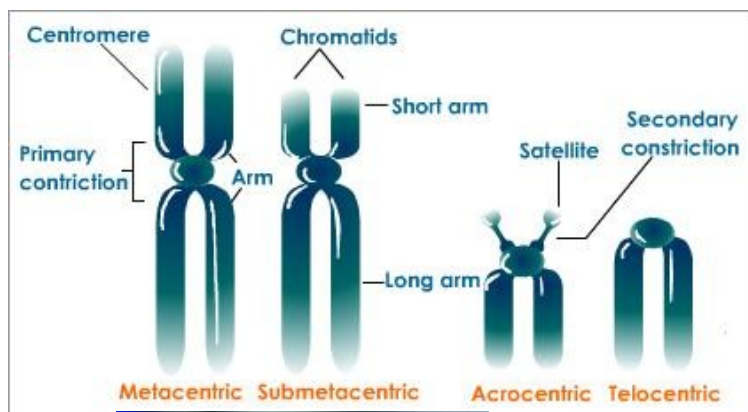
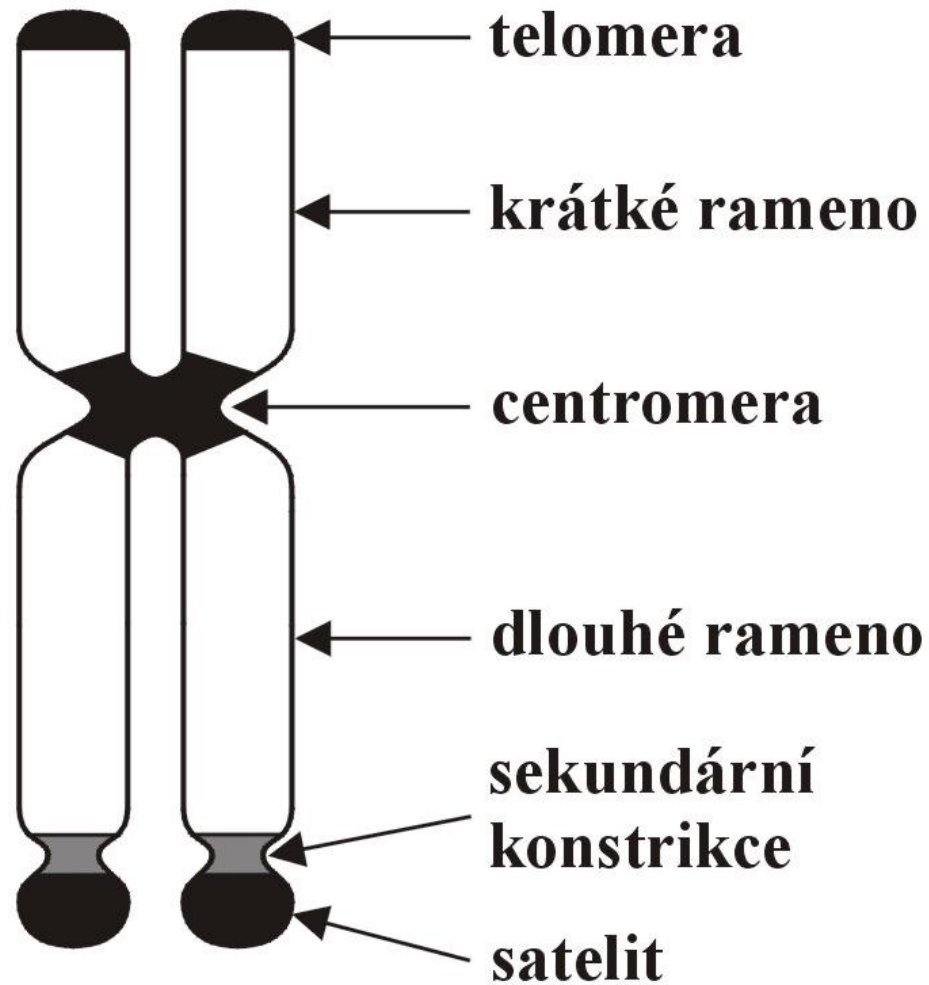


CYTOGENETICKÉ METODY



analýza mikroskopické struktury chromozomů
pojem „chromosom“ – 1888 Wilhelm Waldeyer
chromozomální teorie dědičnosti: 1. pol. 20. stol. -
Theodore Boveri, Walter S. Sutton, Thomas H. Morgan
studium chromozomů: **karyologie, cytogenetika**
karyotyp = uspořádaný obraz sady chromozomů v buňce

Struktura metafázního chromozomu



Klasifikace typu chromozomů podle polohy centromery:

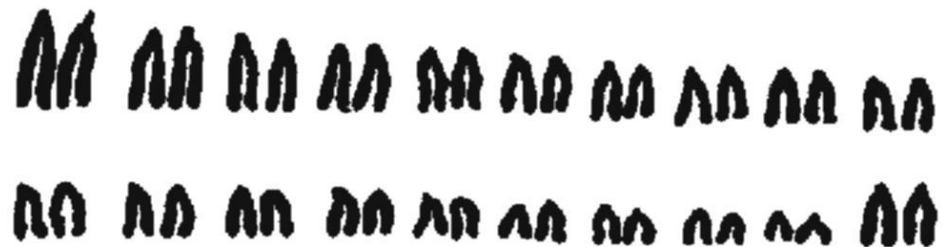
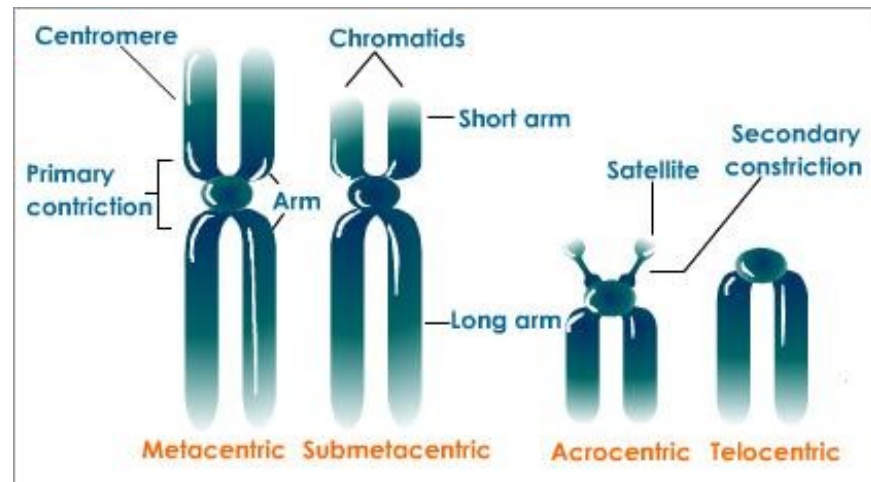
metacentrický

submetacentrický

(subtelocentrický)

akrocentrický

telocentrický



Historie cytogenetiky

role významných technologických inovací - v moderní éře
4-5 takových průlomových momentů:

- 1 objev hypotonického působení → rozprostření metafázních chromozomů
- 2 kultivace leukocytů periferní krve a fibroblastů
- 3 metody proužkování chromozomů
- 4 metody hybridizace *in situ* (ISH)
- 5 využití imunochemických metod spolu s ISH → možnost neradioizotopové detekce hybridizovaných sond (NISH) pomocí různých fluorochromů („chromosome painting“)

Příprava mitotických preparátů

1. Výběr tkáně s vysokou mitotickou aktivitou

kořenová čepička, embrya, larvy, regenerující tkáně

dospělí obratlovci: kostní dřeň, ledviny, slezina, gonády, intersticiální epitelium, epitelium rohovky

někdy stimulace subkutánní, nebo intraperitoneální injekcí fytohemaglutininu, výtažku z líčidla amerického (pokeweed, *Phytolacca americana*) nebo aktivované suspenze kvasinek

Příprava mitotických preparátů

2. Zastavení mitotického dělení *in vivo* nebo *in vitro*

cytostatikum: kolchicin, kolcemid, vinblastin

in vivo:

výhoda: levnější, jednodušší

nevýhoda: nutnost usmrcení organismu

in vitro:

kultivace periferní krve (krátkodobá) a
fibroblastů (dlouhodobá)

výhoda: možnost synchronizace dělení →
snížení variability v kondenzaci chromozomů, zvýšení
kvality preparátu, snížení spotřeby cytostatika

nevýhoda: větší pracnost, finanční a časová
náročnost, méně chromozomů

Příprava mitotických preparátů

3. Hypotonizace buněk

0,075 M roztok KCl, může i destilovaná voda

4. Fixace

„Carnoyova směs“ = metanol : kyselina octová (ledová) 3:1

několkrát vyměnit

pro skvašové preparáty místo metanolu etanol

Příprava mitotických preparátů

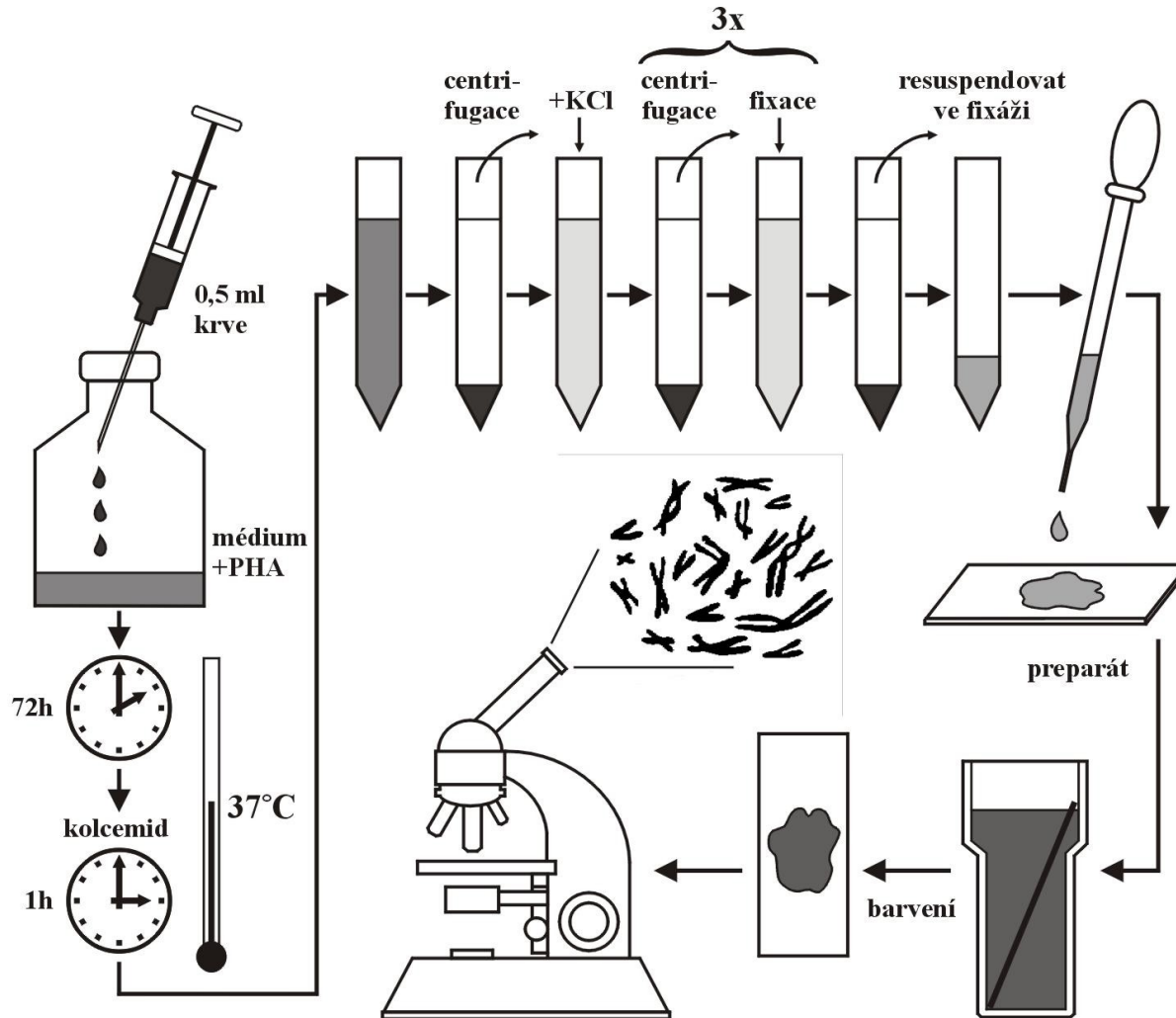
5. Zhotovení preparátu

v zásadě 2 základní techniky:

skvaš („squash“ = rozmačkání): macerace nebo jemné rozemletí kousků tkáně na podložním skle a rozmáčknutí silikonovým krycím sklem

nakapání („splash“): buněčná suspenze nakapána Pasteurovou pipetou z výšky na podložní sklo → roztáhnutí chromozomů povrchovým napětím; po nakapání buď vyschnutí na vzduchu („air-dried“), nebo zapálení suspenze („flame-dried“)

Kultivace krve



Příprava meiotických preparátů

testes, pylové matečné buňky

hypotonizace citronanem sodným, postup obdobný jako u mitotických preparátů

průběh meiózy a význam jednotlivých stadií;

synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush)

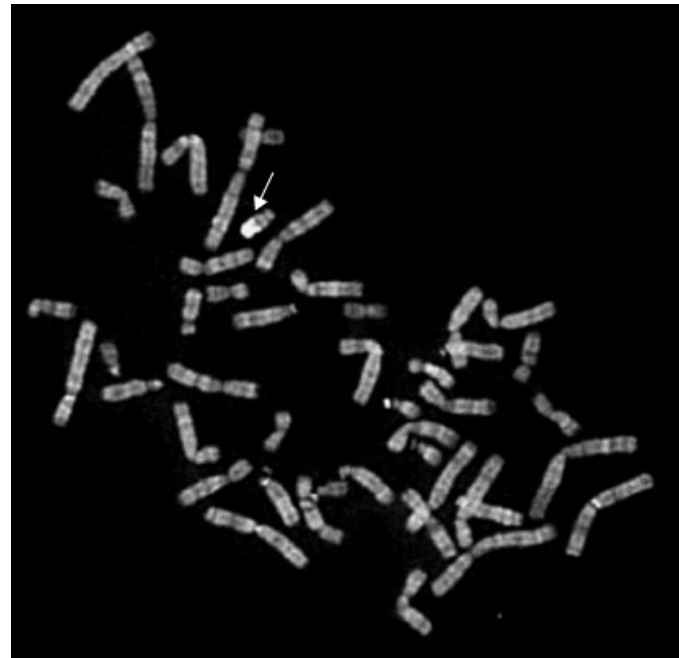
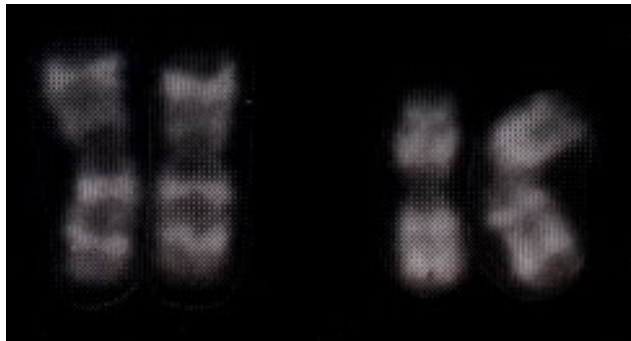
chromozomy

Proužkování chromozomů („banding“)

Q-proužkování (*quinacrine*):

diferenciální excitace a extinkce fluorochromu v závislosti
na zastoupení AT bází

barvení chinakrinem, UV světlo \Rightarrow krátká doba viditelnosti



Proužkování chromozomů („banding“)

G-proužkování (Giemsa, *GTG-banding*):

účinek denaturačních činidel na stabilitu proteinových a nukleových složek chromatinu

pozitivní (tmavé) proužky \approx oblasti bohaté na AT báze (izochory)

působení trypsinu (chymotrypsin, NaOH)

barvení Giemsou

rypoš obří
(*Fukomys mechowii*)



A



rejsek obecný
(*Sorex araneus*)

B





1



2



3



4



5



6-12 a X



16-18



19



20

Homo sapiens



21



22

Proužkování chromozomů („banding“)

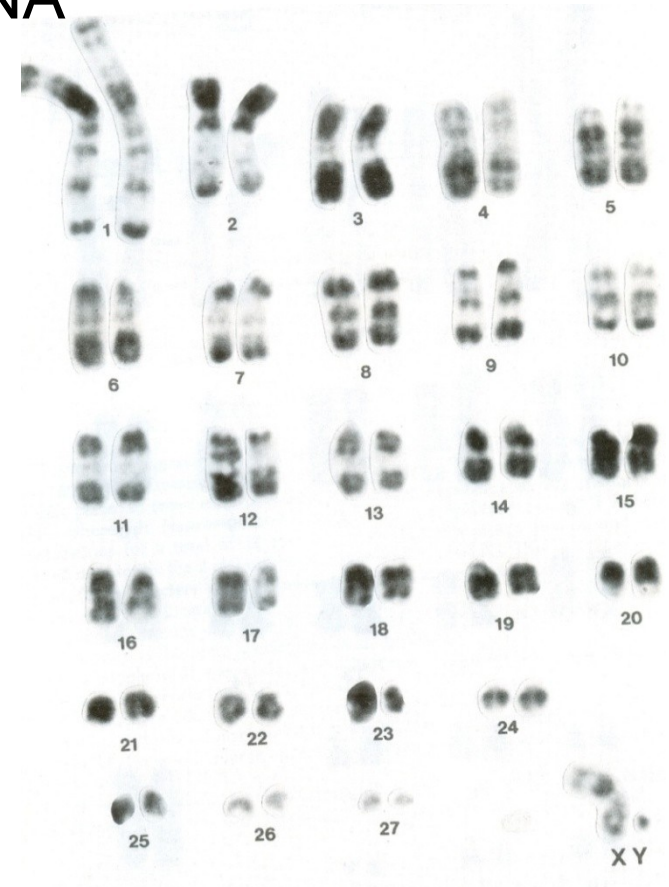
R-proužkování (*reverse banding*):

denaturace při alkalickém působení za vysoké teploty (80-90°C) a následná renaturace DNA

tmavé proužky \approx izochory bohaté na GC báze

barvení Giemsou nebo akridinovou oranží

Lemur catta



Proužkování chromozomů („banding“)

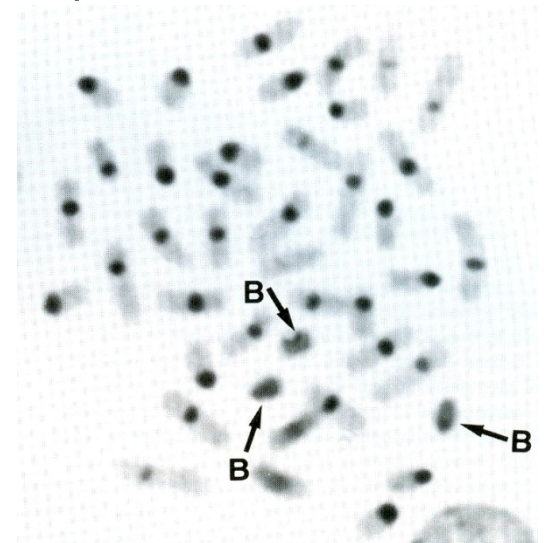
C-proužkování (*constitutive heterochromatin*):

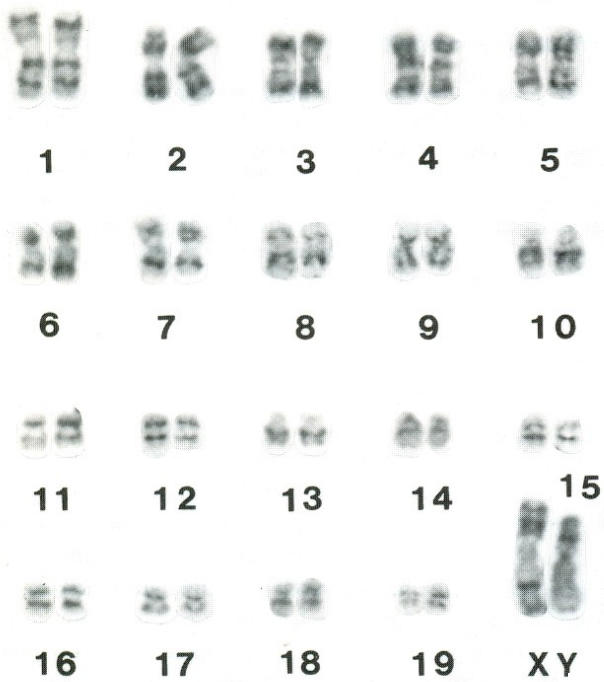
postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady (Ba(OH)₂) a renaturaci heterochromatinu v solném pufu (2×SSC) za vysoké teploty (60°C)

rozpuštění euchromatinu

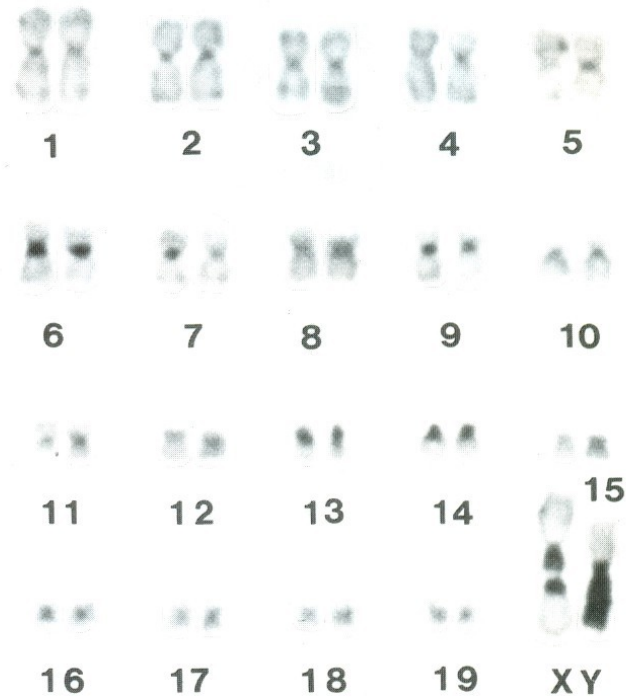
barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)

psík mývalovitý
(*Nyctereutes procyonides*)

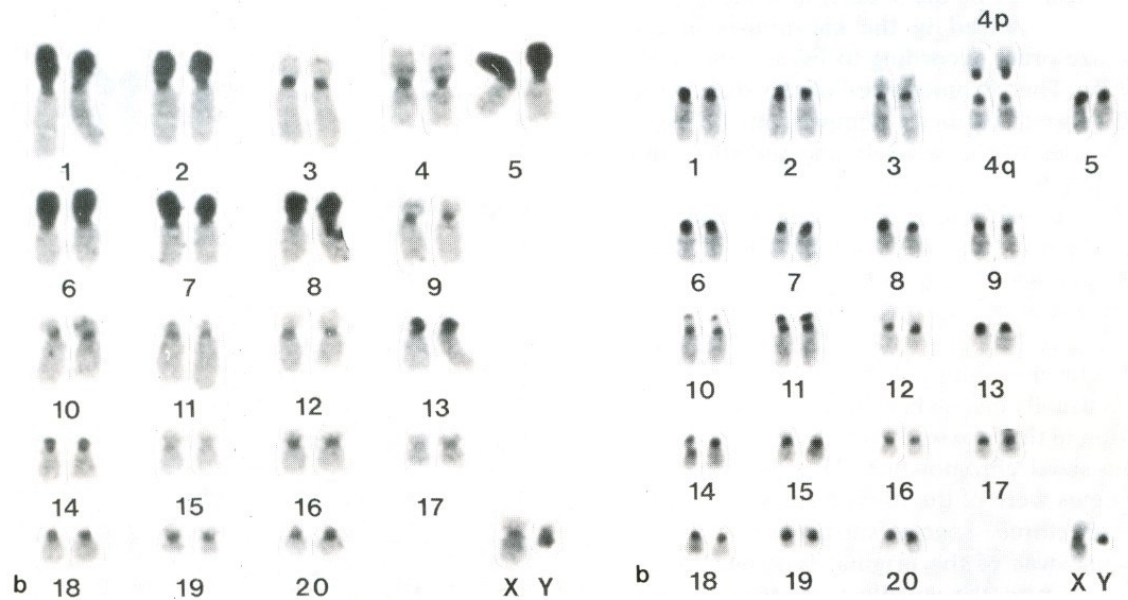




rypoš obří
(*Fukomys mehowi*)



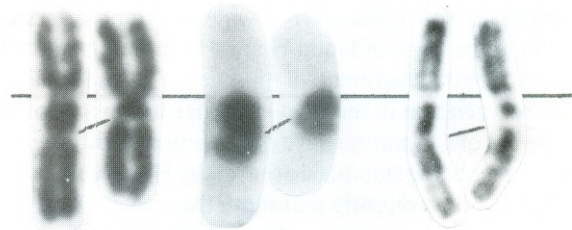
kolčava a hranostaj



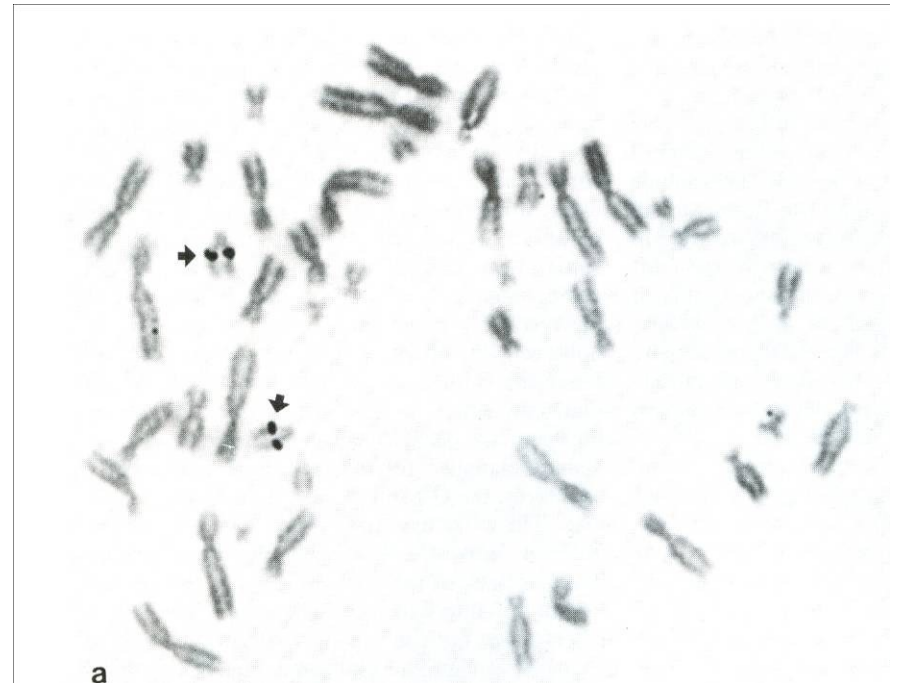
Proužkování chromozomů („banding“)

Ag-NOR:

želatina + kyselina mravenčí, barvení AgNO_3
barvení organizátorů jadérek (pouze aktivní)



rypoš obří
(*Fukomys mechowi*)

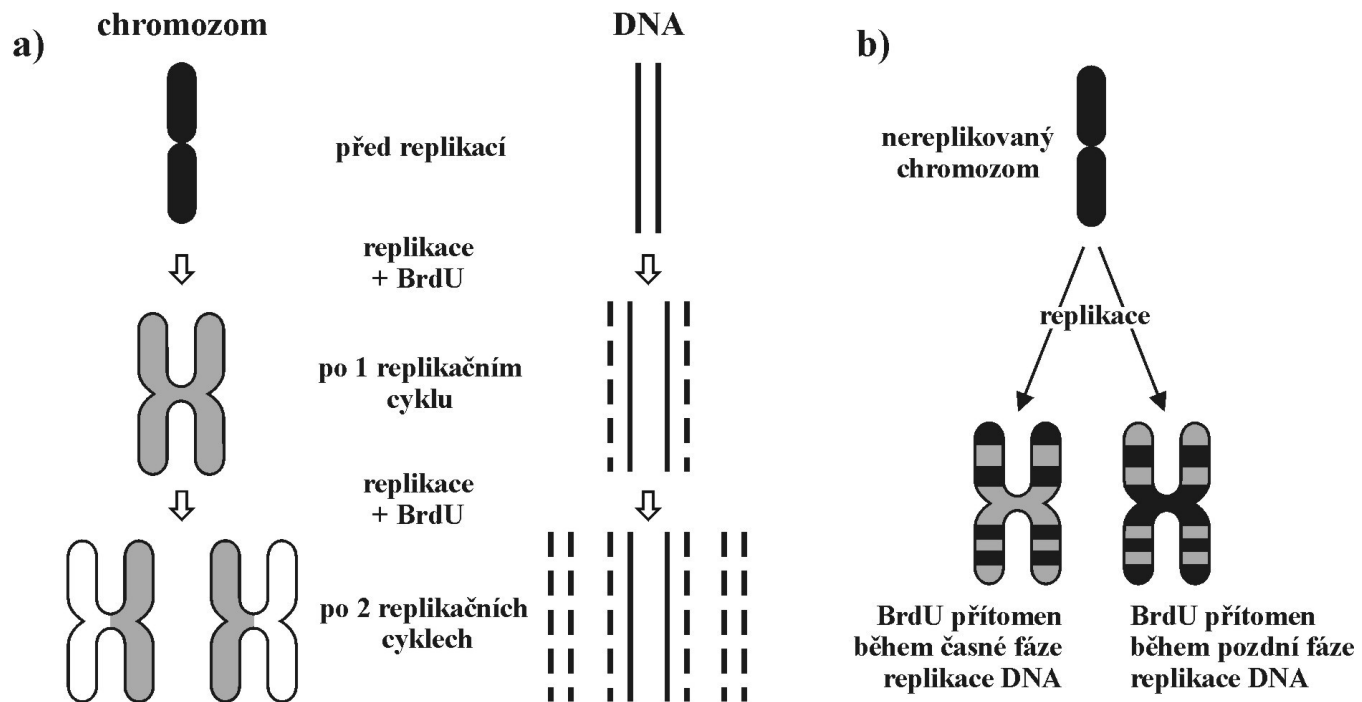


kolčava

Proužkování chromozomů („banding“)

BrdU:

replikace za přítomnosti umělého prekurzoru (5-bromo-2'-deoxyuridin) → sledování výměn sesterských chromatid



Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

hybridizace chromozomů *in situ* se značenou sondou
možnost použití i několika sond současně

vizualizace: protilátky specifické pro biotin (avidin, streptavidin), které jsou konjugovány buď s fluorochromem (např. fluorescein izothiokyanát, FITC), nebo s enzymatickými činidly (např. alkalinfosfatáza, peroxidáza), reakce se specifickým substrátem

Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

CISS, chromosome in situ suppression hybridization

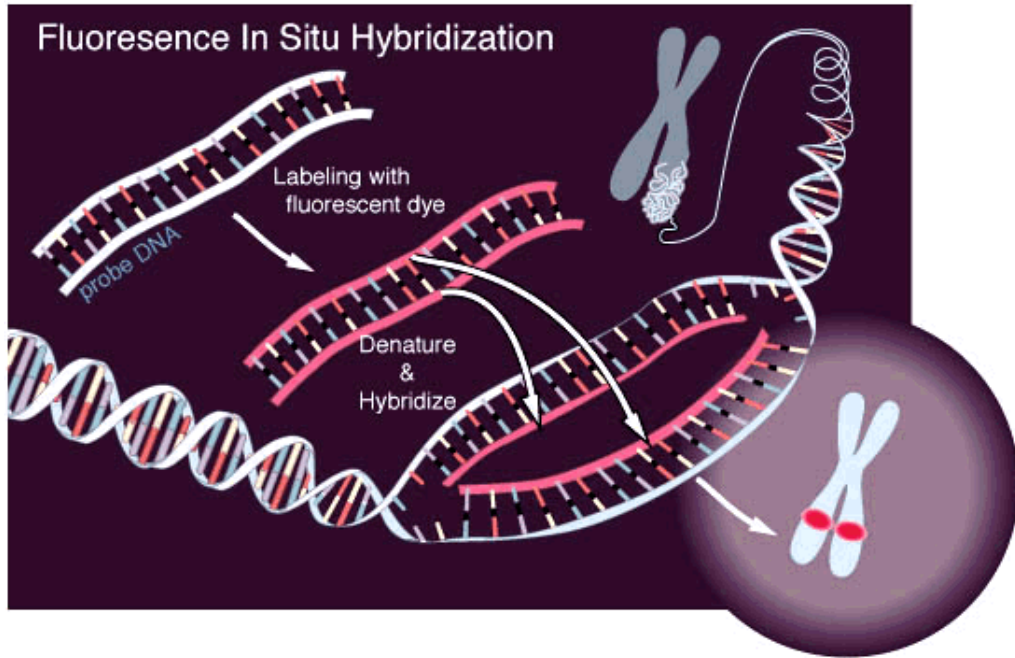
PRINS, primed *in situ* labelling

GISH, whole genome in situ hybridization

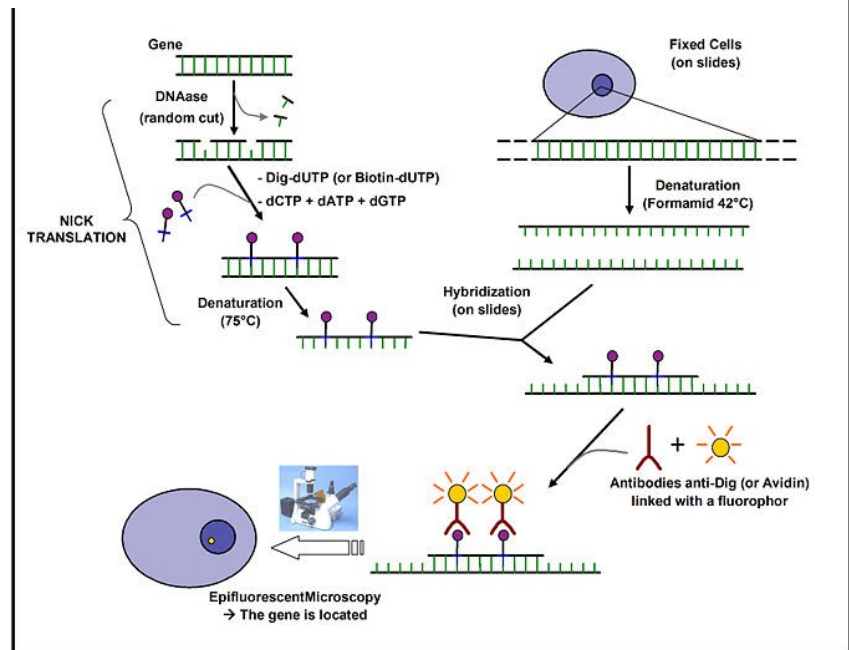
FACS, fluorescence activated cell sorting

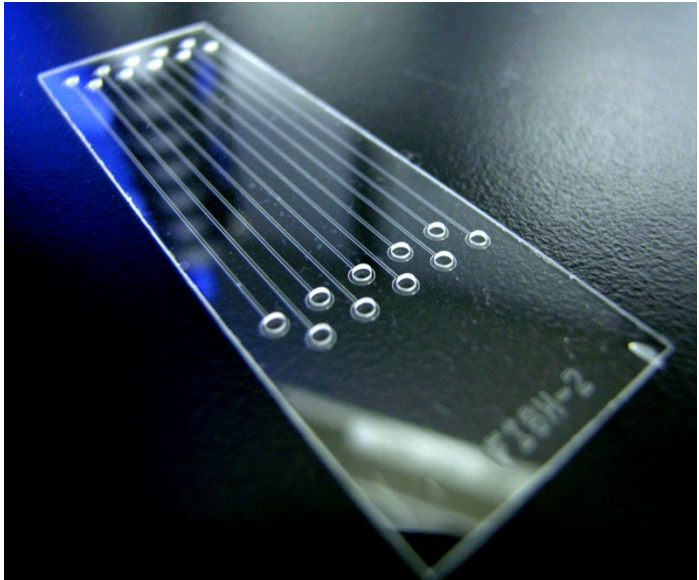
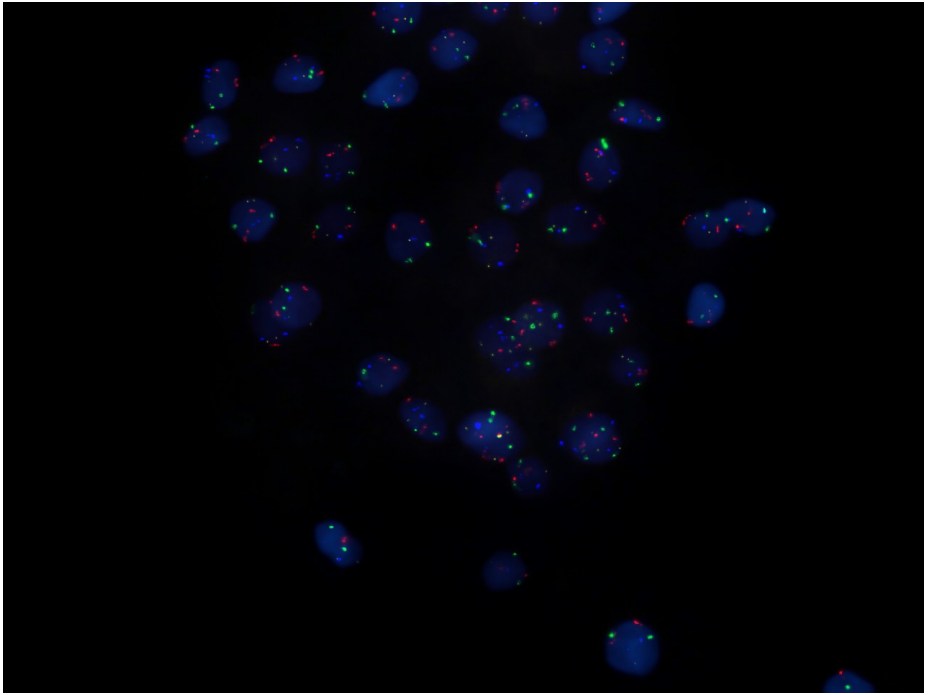
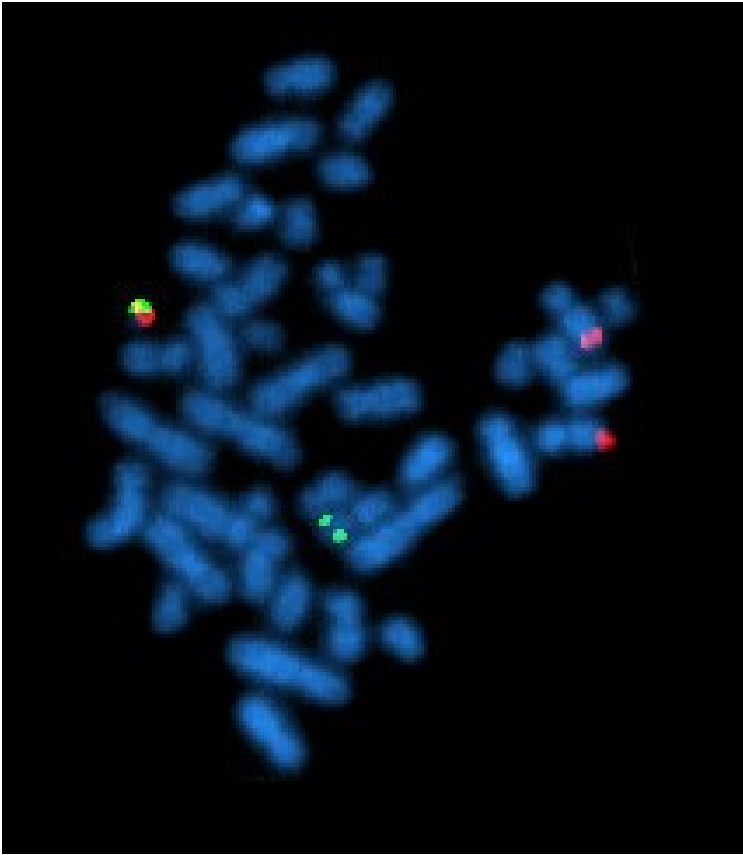
vybarvování chromozomů = „chromosome painting“

Fluorescence In Situ Hybridization

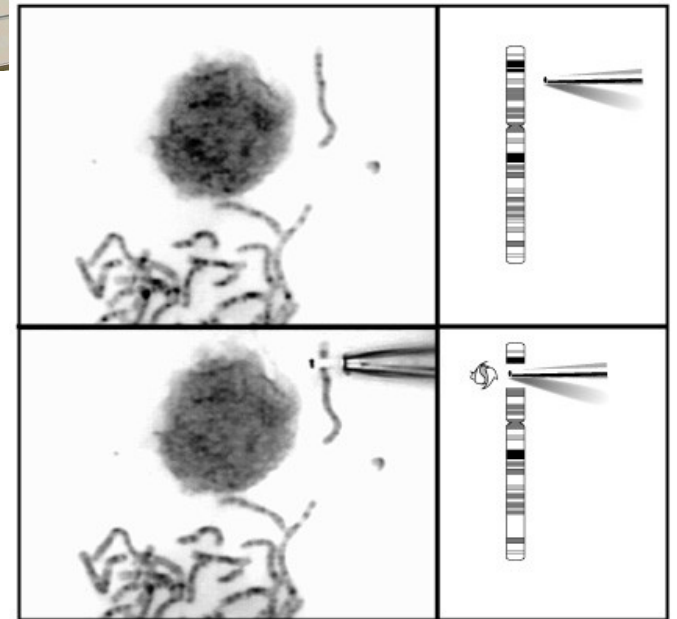
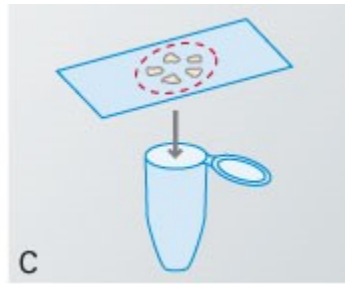
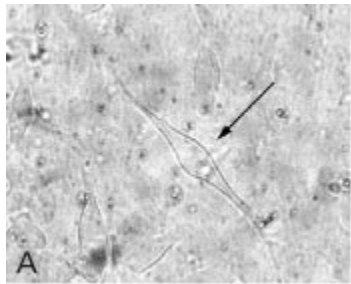
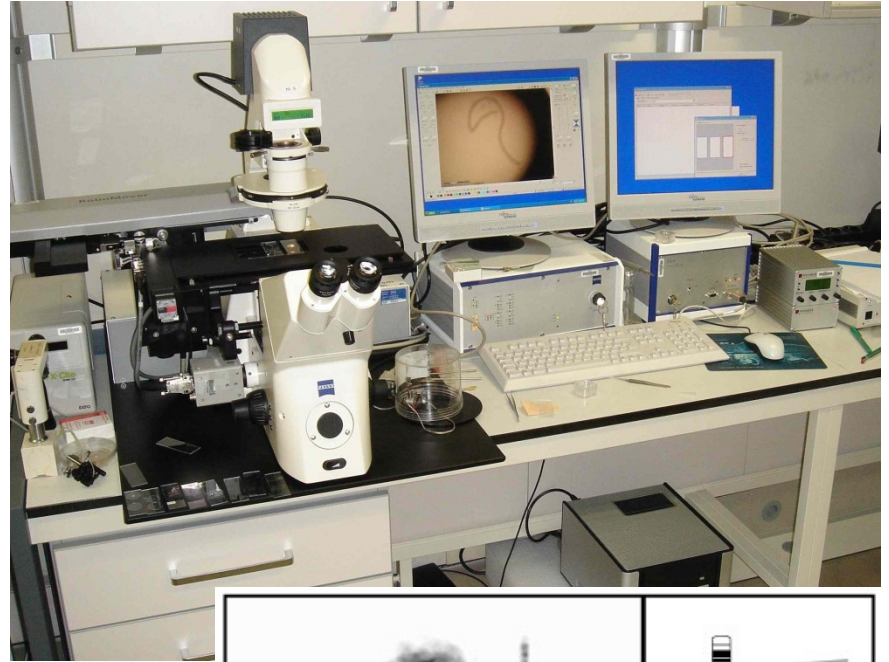
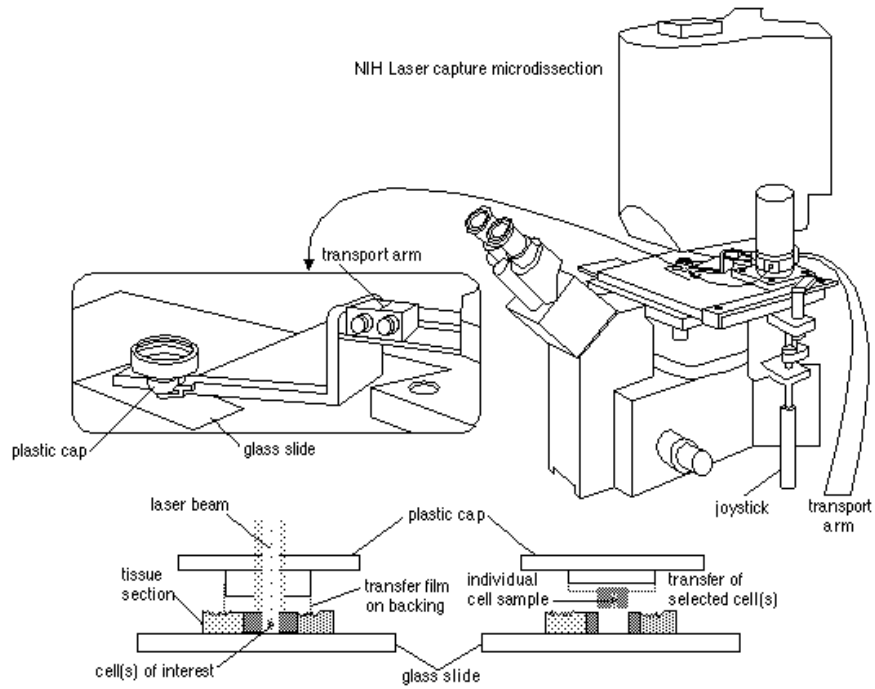


FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



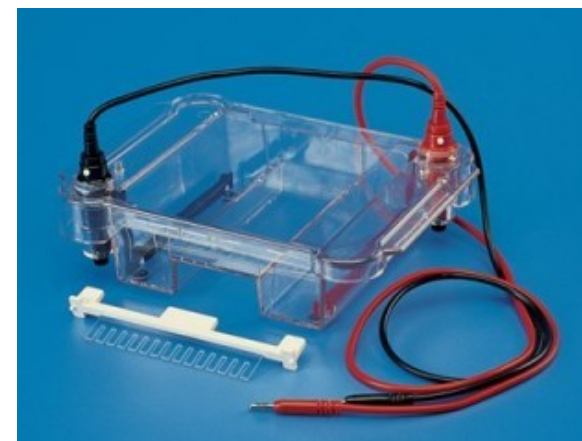
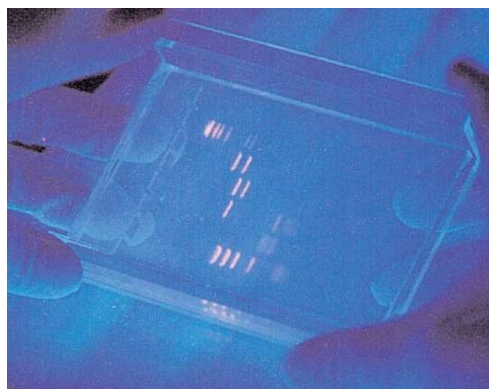
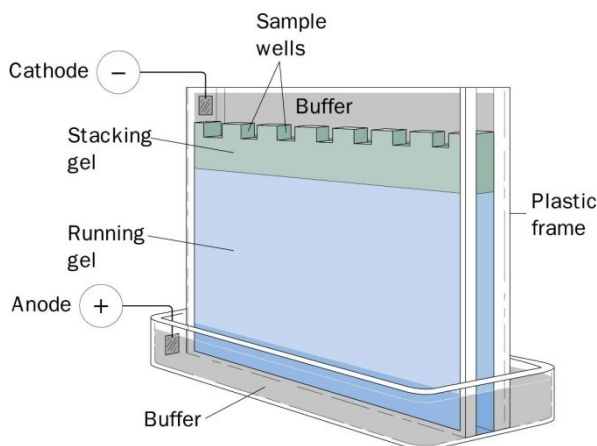


Mikrodisekce



ELEKTROFORÉZA

enzymů a neenzymatických bílkovin



elektroforéza: z řečtiny = transport pomocí elektřiny
obecně = pohyb nabitých částic v médiu vlivem el. pole

do konce 50. let genetická proměnlivost v populacích
studována pouze na základě mendelovských
morfoložických znaků nebo polytenních chromozomů →
otázka, do jaké míry tyto jevy reprezentují skutečnou míru
genetické proměnlivosti v přírodě

substituce aminokyselin můžeme zjistit sekvenováním –
pokud to není možné, lze nahradit elektroforézou proteinů

z 20 AA 3 nesou kladný náboj (Arg, Lys, His), 2 záporný náboj (Asp, Glu)

kromě náboje i velikost a konformace makromolekuly (-S-S-
můstky, van der Waalsovy síly, vodíkové vazby,
elektrostatické síly); pH pufru

stabilizace el. náboje → specifický pufr s vysokou iontovou
silou a pH co nerozdílnější od pI daného proteinu: pH 3-
10, nejčastěji 6,5-9,5

náboj většiny proteinů při pH 8-9 záporný → migrace k
anodě

Princip ELFO znám již od konce 19. stol.

1937 - Thisselius: metoda „pohyblivého rozhraní“

1949 - Linus Pauling: papírový nosič - abnormální Hb srpkovité anémie

1955 - O. Smithies: škrob

1957 - Hunter a Moeller: užití katalytických schopností enzymů (histochemické barvení)

1966 - aplikace ELFO na přírodní populace: Harry Harris (člověk), Richard Lewontin a John Hubby (octomilka)

Nosiče (média):

škrob (starch gel el., SGE): velikost molekuly + velikost náboje

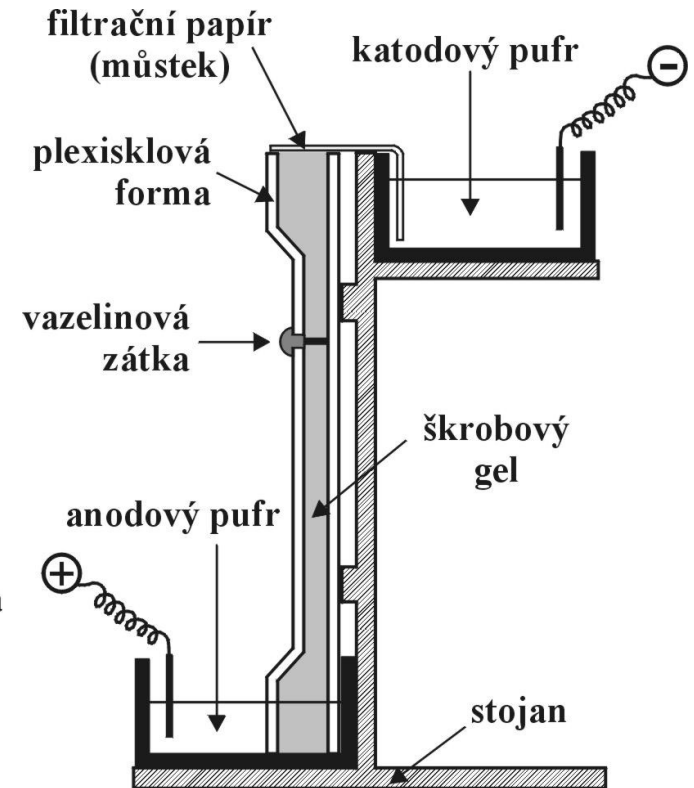
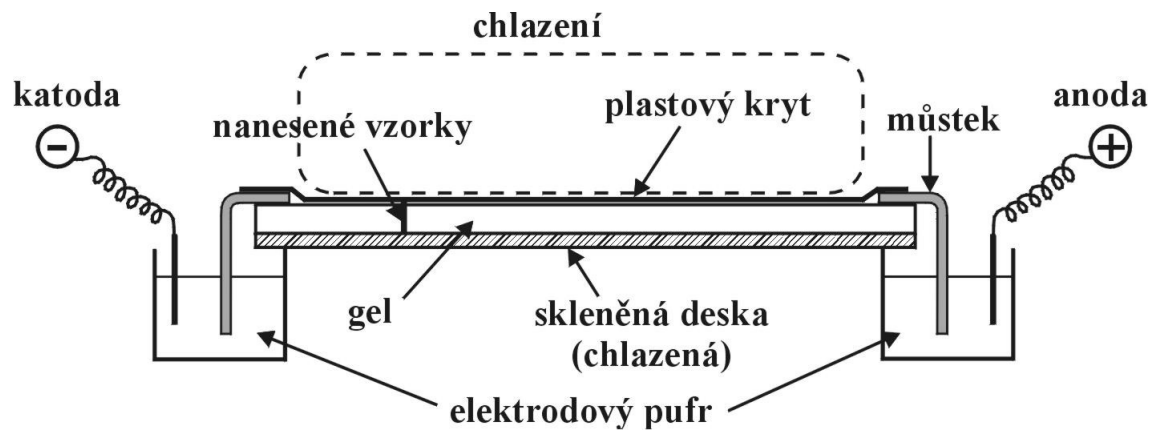
celulózoacetát (CAGE): náboj

agar, agaróza (AGE): náboj

polyakrylamid (PAGE): velikost molekuly + náboj

Metody elektroforézy

- horizontální
- vertikální
- kapilárová

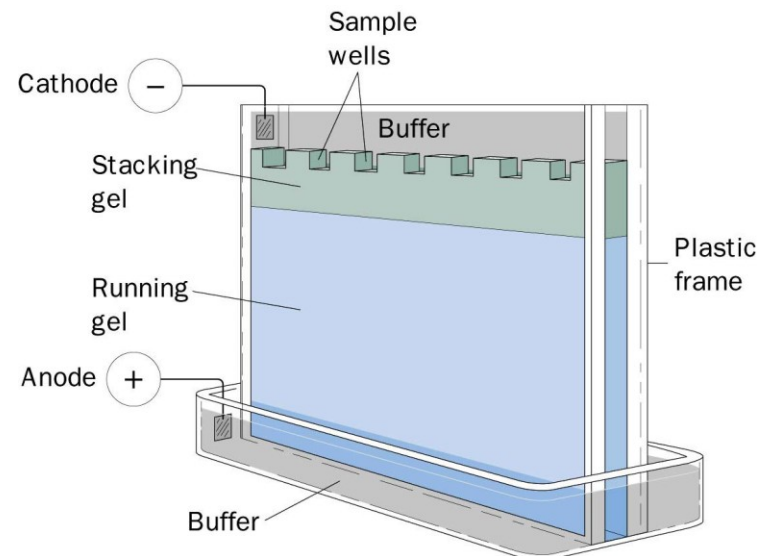


Metody elektroforézy

1. ELFO v kontinuálním pufru

2. ELFO v diskontinuálním pufru (multifázická ELFO):

2 gely o různých koncentracích - koncentrující a separující
na rozhraní „sendvičování“ proteinů mezi „vedoucím“ a „taženým“
iontem; pokud jen tento krok = **izotachoforéza**



Metody elektroforézy

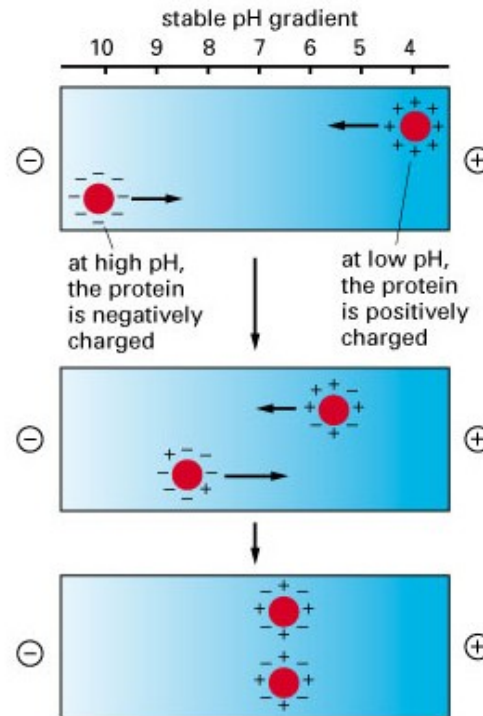
3. Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF):

v gelu syntetické polyamino polykarbonátové skupiny = nosné amfolyty s rozsahem pI

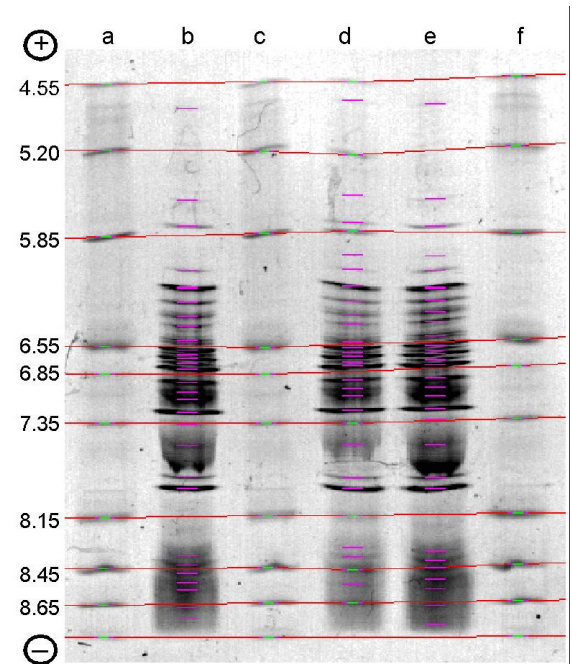
připojením el. pole → stabilní gradient pH; amfolyty drženy v gelu silnou kyselinou při anodě a silnou zásadou při katodě

ISOELECTRIC FOCUSING

For any protein there is a characteristic pH, called the **isoelectric point**, at which the protein has no net charge and therefore will not move in an electric field. In **isoelectric focusing**, proteins are electrophoresed in a narrow tube of polyacrylamide gel in which a pH gradient is established by a mixture of special buffers. Each protein moves to a point in the gradient that corresponds to its isoelectric point and stays there.



The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.



Metody elektroforézy

4. ELFO v močovně a SDS:

SDS = *sodium dodecyl sulphate* (= aniontový detergent):

schopnost rozpouštět některé proteiny a štěpit některé polymery
SDS způsobuje silný záporný náboj proteinů, migrace jen podle hmotnosti molekuly

močovina: podobně jako SDS, ale náboj proteinů normální - migrace podle celkového náboje

(podobně možnost tepelné denaturace proteinů a následná ELFO)

5. Dvousměrná (2-D) ELFO:

připojení el. pole postupně ve dvou na sebe kolmých směrech
např. 1. fáze = IEF, 2. fáze = SDS ELFO - kombinace pI a molekulové hmotnosti

Metody elektroforézy

Schopnost separace proteinů krevní plazmy:

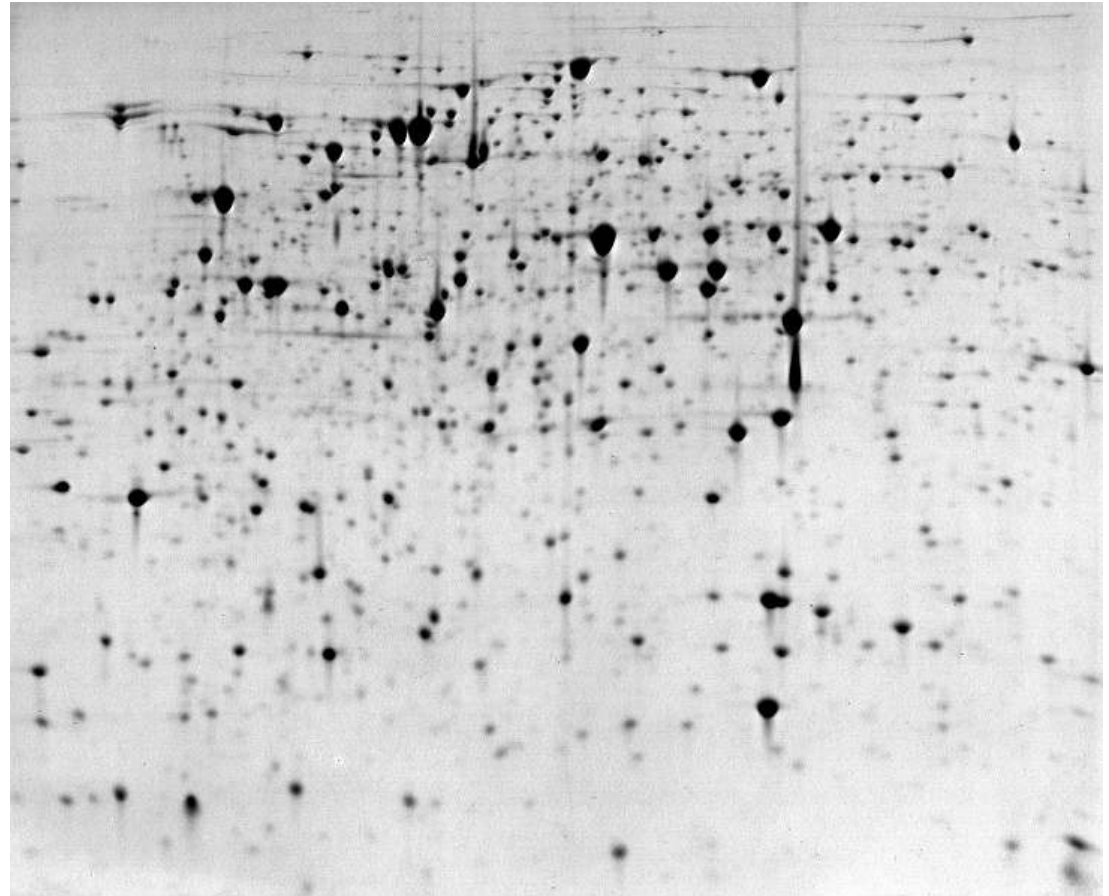
CAGE: 5 pruhů

SGE: 15

PAGE: 19

IEF > 30

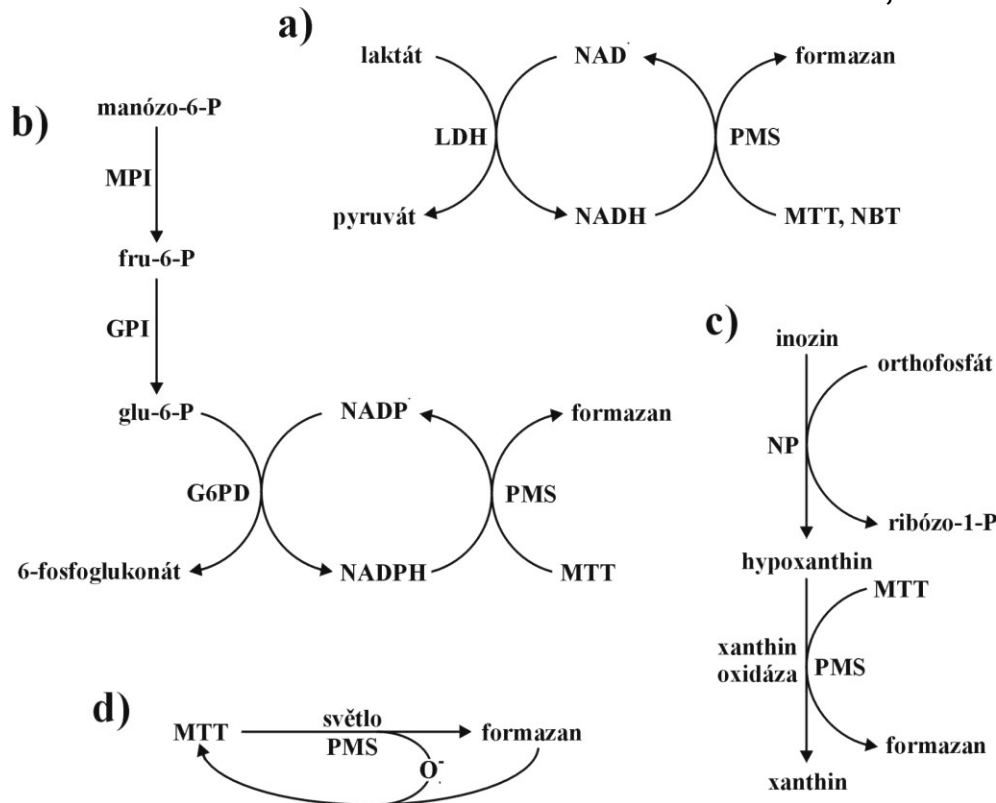
2-D ELFO ca. 300 skvrn
~ 75-100 polypeptidů



Detekce proteinů

nespecifická: amidočerň, Coomassie Brilliant Blue R

specifická: barviva pro glykoproteiny, lipoproteiny
histochemické barvení enzymů: spřažení katalýzy přeměny specifického substrátu s barvicí reakcí - **nitrotetrazoliové soli (MTT, NBT) + PMS (phenazin methosulfát)**; Fast Blue RR; Fast Garnett GBC, Fast Black K



- redukce NAD⁺, NADP⁺
- někdy nutno dodat další enzymy

obarvený gel = obecně **elektroforetogram**,
jestliže obarveny enzymy = **zymogram** (enzymogram)

proužky = „elektromorfy“, „alely“, „alelomorfy“

izozymy, alozymy

