

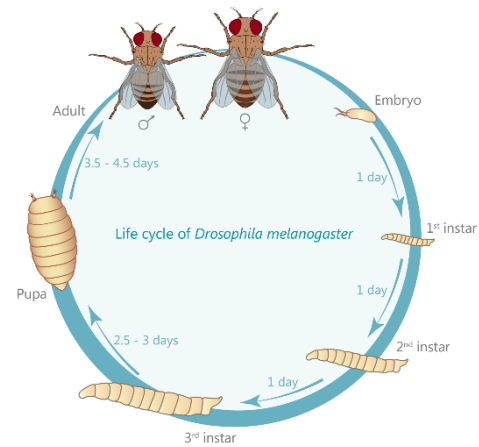
Pondělí 7.6.2021 – Bezobratlí

***Drosophila melanogaster* (Diptera)**

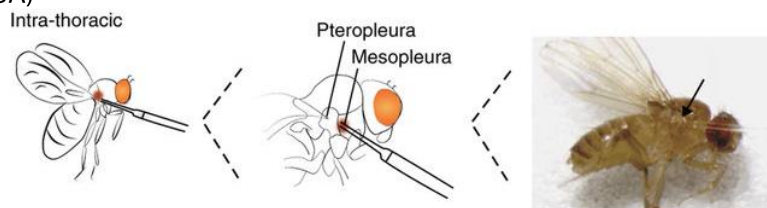
- základy experimentálního chovu
- životní cyklus
- manipulace s larvami a dospělci
- UAS/Gal4 systém a řízení genové exprese

Praktická část:

- určení pohlaví dospělců *D. melanogaster* a sběr nespářených mladých samiček
- vizualizace vnitřních orgánů vnesením GFP pomocí UAS/Gal4 systému: připravte 20 nespářených samiček z Gal4 linie (Act-Gal4, ppl-Gal4 a jiné) a 8 samečků z linie UAS-GFP, které zkřížíte za účelem získání larev F1. Kontrola potomstva za 5-6 dnů.
- příprava larev *D. melanogaster* na nanoinjekce (promytí a fixace)
- injekce značeného roztoku do larev třetího instaru a dospělců pomocí Nanoject II (Drummond Scientific, USA)



Zdroj obrázku: <https://www.walter-lab.com/methods>



Zdroj obrázku: Merklinger and van Rij, 2015

***Galleria mellonella* (Lepidoptera)**

- základy experimentálního chovu
- životní cyklus a možnosti použití v biologickém výzkumu
- manipulace s larvami

Praktická část:

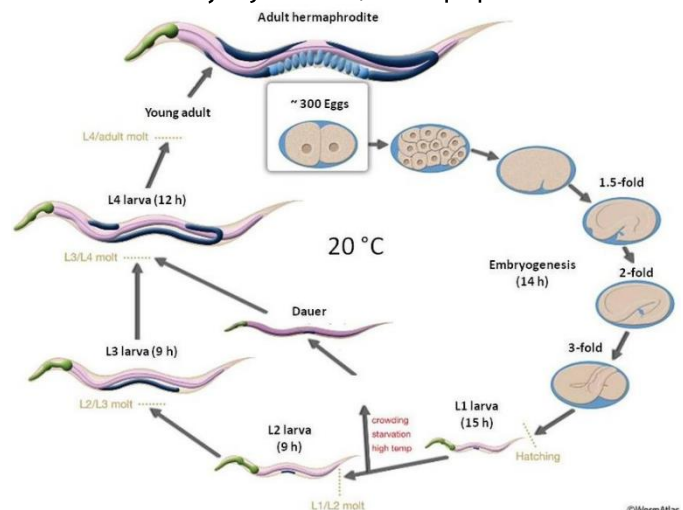
- krmění larev značeným roztokem pomocí metody „force-feeding“, která umožňuje aplikaci přesných dávek podávané látky bez porušení integrity tělních bariér
- podání kofeinu a sledování jeho vlivu na aktivitu a délku vývoje larev (úloha připravovaná pouze mimo bloková cvičení)

***Caenorhabditis elegans* (Nematoda)**

- základy experimentálního chovu a jeho udržování
- životní cyklus a možnosti použití v biologickém výzkumu

Praktická část:

- mikroskopické pozorování jednotlivých stádií *C. elegans*
- manipulace s hlísticemi a synchronizace chovu

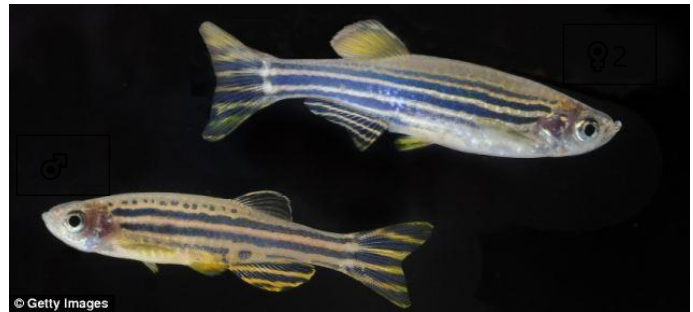


©WormAtlas

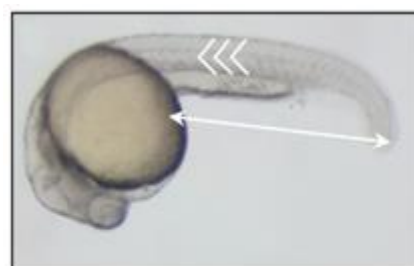
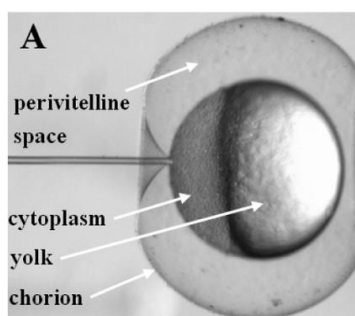
Úterý 8.6.2021 – Ryby

***Danio rerio* (Osteichthyes)**

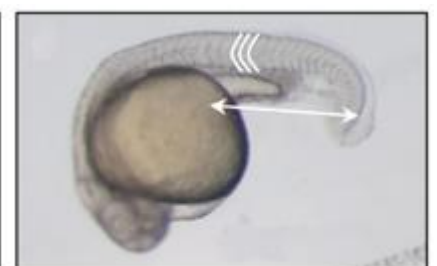
- *Danio* a jiné rybí modely využívané v biologickém výzkumu
- základy experimentálního chovu
- výhody a nevýhody práce s dániem jako modelovým organismem
- využití modelu *Danio rerio* pro studium funkce genů

**Praktická část:**

- Řízené tření Dáníí pro získání stejně starých embryí
- Odběr nakladených jiker
- Aplikace inhibitorů dvou signálních drah (WNT signální dráhy a SHH signální dráhy) na brzké stadium embryí
- Základní manipulace s embryem, odstranění chorionu.
- Analýza efektu inhibice WNT a SHH dráhy po 24 h.
- Základní metody analýzy získaných fenotypů.
- Určení pohlaví u dospělých dáníí a příprava na řízené tření.



Kontrola

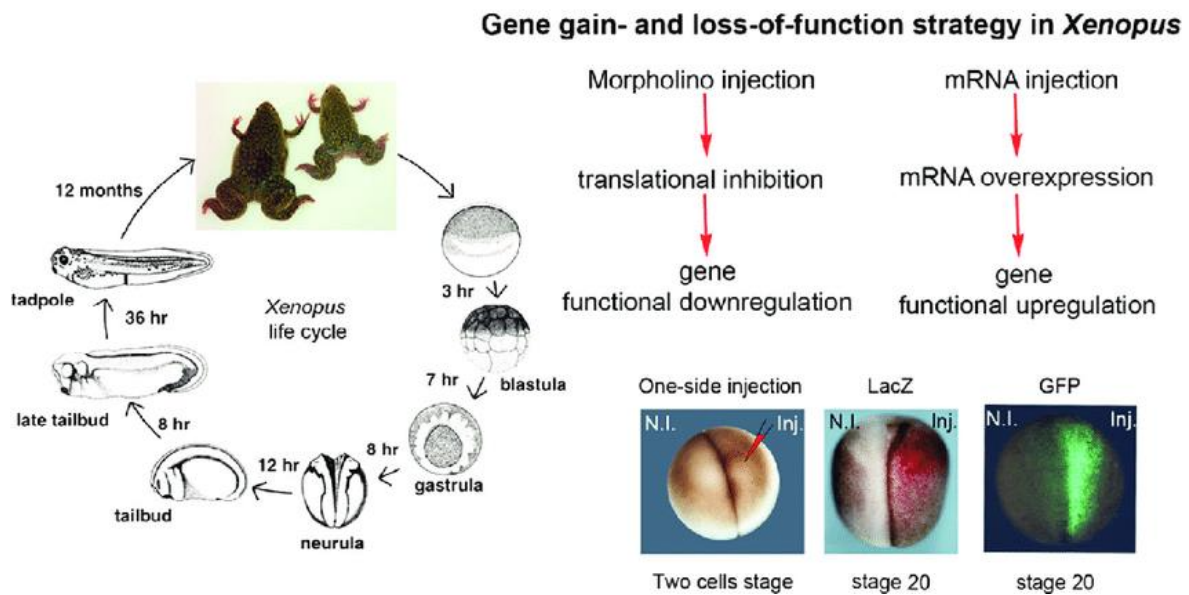


Inh. WNT dráhy

Středa 9.6.2021 – Žáby

***Xenopus laevis* (Anura)**

- základy experimentálního chovu
- životní cyklus a možnosti použití modelu v biologickém výzkumu
- manipulace s embryi a experimentální přístupy pro ovlivnění vývoje jednotlivých tkání a orgánů

***Xenopus laevis* as a model system**

Zdroj obrázku: Nardi et al., 2017

Praktická část:

- Získání vajíček ze samice manuálním způsobem (metoda tzv. „squeezing“)
- *In vitro* fertilizace (IVF): synchronní oplození získaných embryí a jejich následná selekce
- Sledování a určení ranných vývojových stádií žabích embryí – systém Nieuwkoop a Faber (NF)
- Příklad z „klasické“ embryologie: „Copy and paste“ experiment Hanse Spemanna a Hildy Mangoldové z roku 1924 – indukce nové tělní osy (Nobelova cena za tento objev udělena v 1935) (pozn. embrya z předchozího dne)
- Příklad ze současnosti: The Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus* (FETAX): skrínigový test pro určení toxicity látek na vývoj organismu

Čtvrtek 10.6.2021 – Ptáci

Gallus gallus f. domestica (Galliformes)

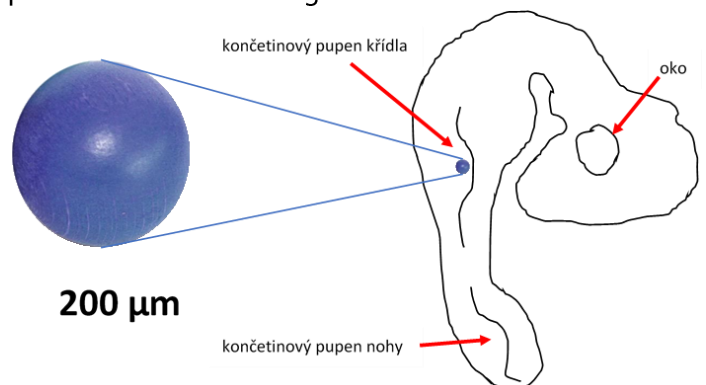
- kuřecí embryo: tradiční modelový organismus pro vývojovou biologii
- výhody a nevýhody použití kuřecího modelu
- manipulace s kuřecím embryem v průběhu experimentu
- experimentální přístupy pro ovlivnění vývoje jednotlivých tkání a orgánů

Praktická část

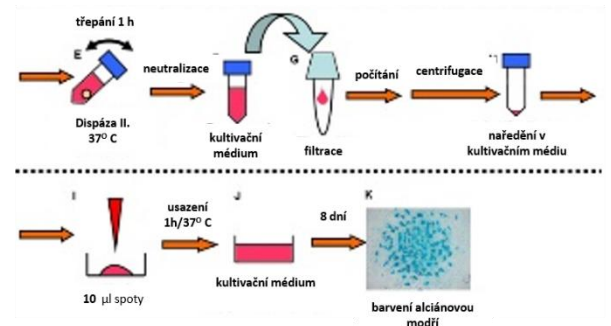
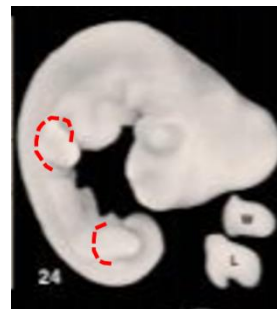
- otevření vajíčka – nůžky a lepicí páska
- určení vývojového stádia kuřecích embryí – systém Hamburger-Hamilton
- dva různé experimentální přístupy – implantace kuliček s morfogenem a založení mikromasových kultur

1. Implantace kuliček s morfogenem – *in ovo* model

- očistit nástroje 70 % EtOH
- narušení extraembryonálních obalů (chorion a amnion) pinzetami
- vytvoření menšího otvoru ve tkáni
- vložení kuličky do otvoru ve tkáni
- kontrola kuličky (zůstává na místě)

2. Založení mikromasové kultury z končetinových pupenů – *in vitro* model

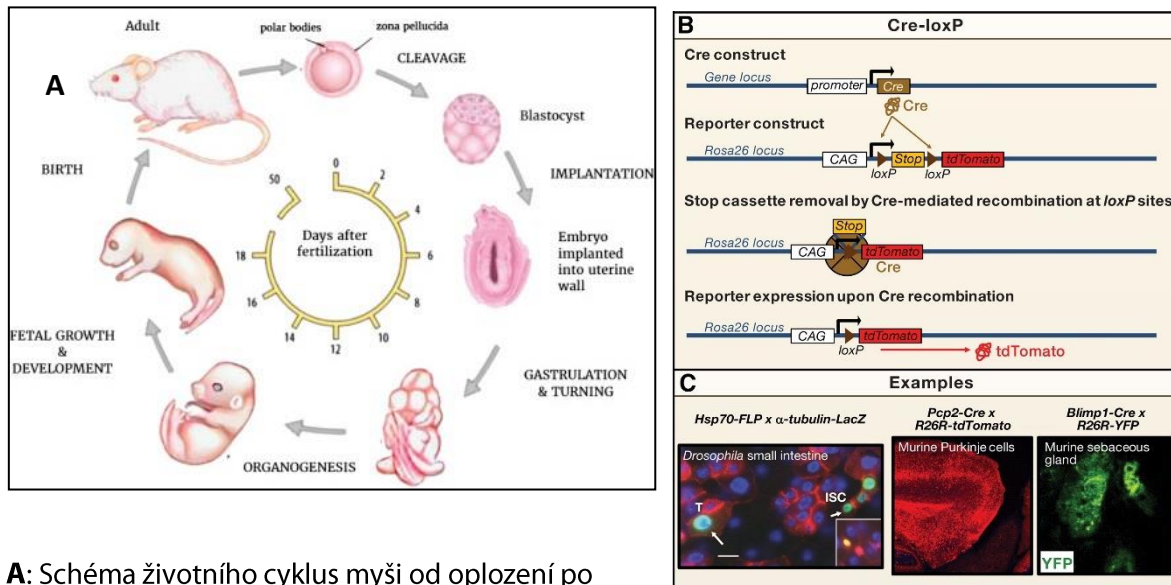
- očistit nástroje 70 % EtOH
- narušení extraembryonálních obalů (chorion a amnion) pinzetami
- přerušení cév vedoucích k embryu (pinzety a nůžky)
- vyjmutí embrya (pinzeta a plastová lžička) do misky s 1xPBS
- odstříhnutí končetinových pupenů u těla (čárkovaná čára viz. obr.)
- rozmělnit končetinové pupeny injekčními jehlami
- sesbírat kousky pupenů do jedné zkumavky
- odsát 1x PBS a přidat 300 μl Dispázy II. 37° C
- třepačka/37° C, každých 15 minut propipetovat
- po 1 hodině neutralizace kultivačním médiem (300 μl)
- filtrace Cell Strainer 40 μm
- spočítat množství buněk na 1 ml
- centrifugace 1500 rpm/5 minut
- naředění buněk na potřebné množství na 1 ml
- nanášení tzv. 10 μl spotů na kultivační misku a ponechat usadit 1 hodinu v inkubátoru
- po 1 hodině přidat 2 ml kultivačního média
- kultivace do 2. dne



Pátek 11.6.2021 – Savci

Mus musculus var. alba (Rodentia)

- výhody a nevýhody práce s myší jako modelovým organismem
- zásady správné manipulace (princip 3R, zákonná legislativa)
- určování pohlaví, životní cyklus, chov (délka březosti, pohlavní zralost, délka života)
- práce s embryi, popis morfologických rozdílů mezi jednotlivými vývojovými stádii
- transgenní myší modely ve službách vývojové biologie, lineage tracing (Cre-loxP, CreERT²)



A: Schéma životního cyklu myši od oplození po dosažení pohlavní zralosti

B, C: Metoda lineage tracing pomocí Cre-loxP systému

Praktická část:

- odběr embryí E10, fixace a další zpracování
- odběr embryí E15, pitva, příprava tkáňových kultur („slicy“/celé orgány)
- krájení zamražených tkání Sox10/ZSGreen myši na kryostatu
- barvení jader na připravených řezech, pozorování „traceovaných“ buněk na konfokálním mikroskopu