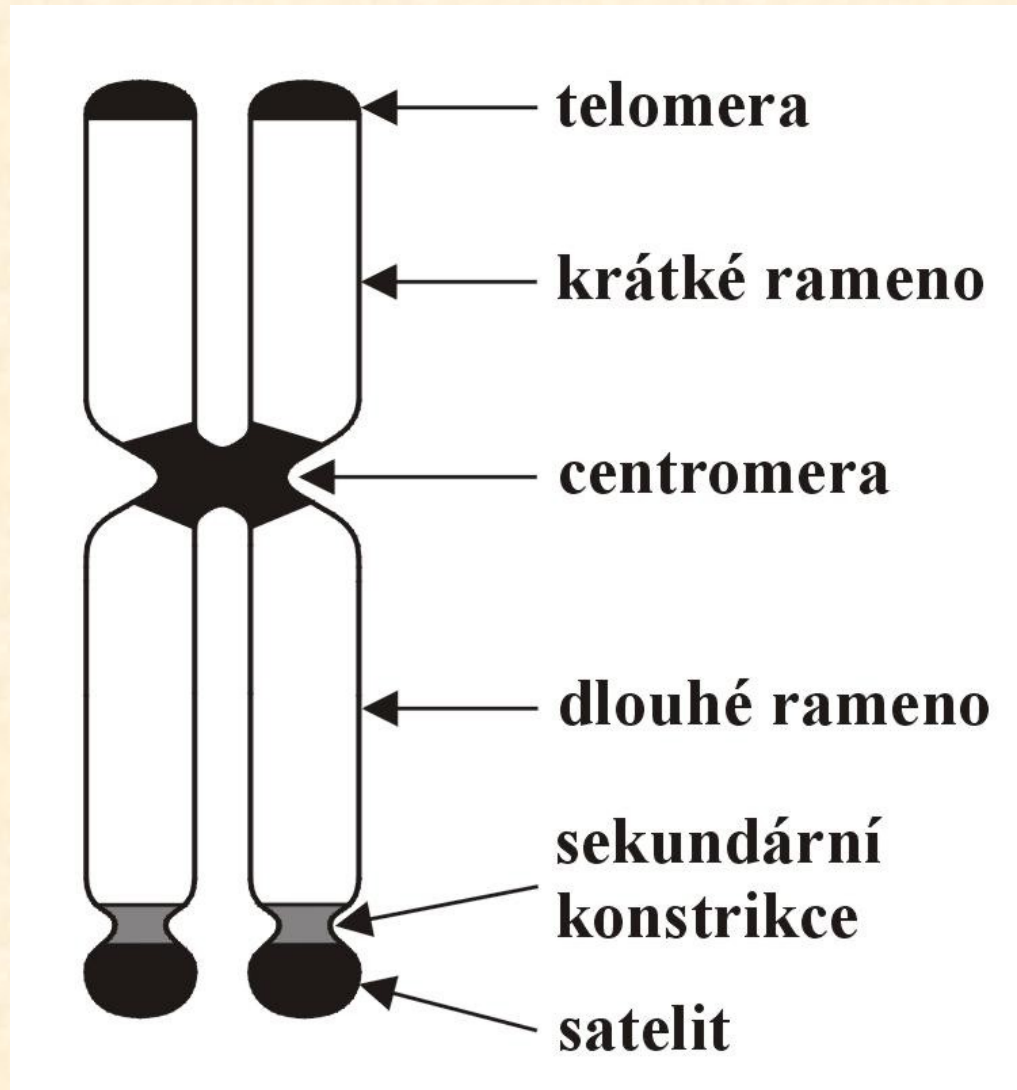




CYTOGENETICKÉ METODY

- analýza mikroskopické struktury chromozomů
- pojem „chromozom“ - 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



CYTOGENETICKÉ METODY

- analýza mikroskopické struktury chromozomů
- pojem „chromozom“ - 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
- 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 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 mitotického dělení → snížení variability v kondenzaci chromozomů, zvýšení kvality preparátu, snížení spotřeby cytostatika

3 hypotonizace buněk

- destilovaná voda, nebo 0,075 M KCl

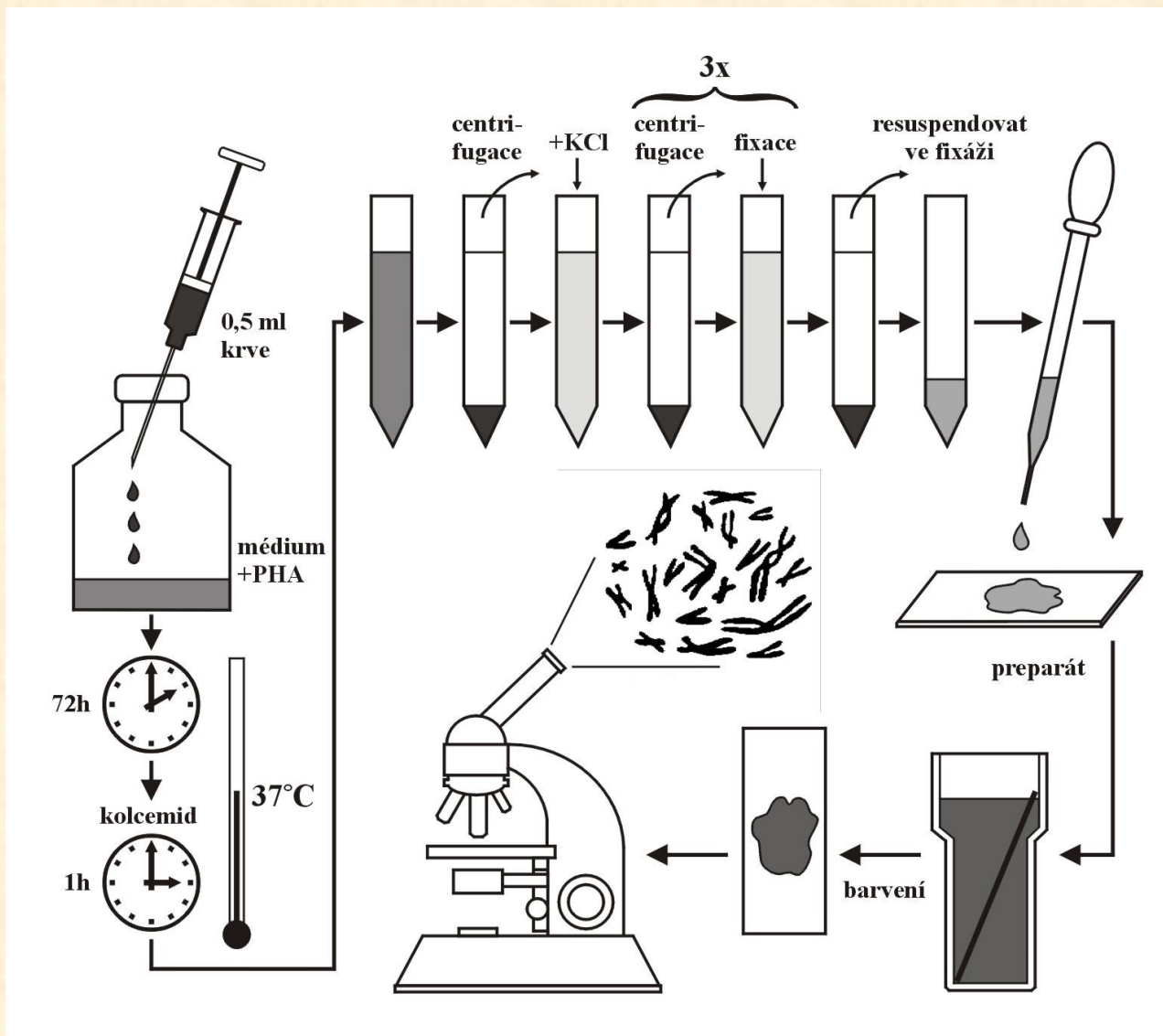
4 fixace

- „Carnoyova směs“ = metanol : kyselina octová (ledová) 3:1
- několikrát vyměnit
- pro skvašové preparáty místo metanolu etanol

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 povrchového napětím; po nakapání buď vyschnutí na vzduchu („air-dried“), nebo zapálení suspenze („flame-dried“)

Kultivace krve



Příprava meiotických preparátů

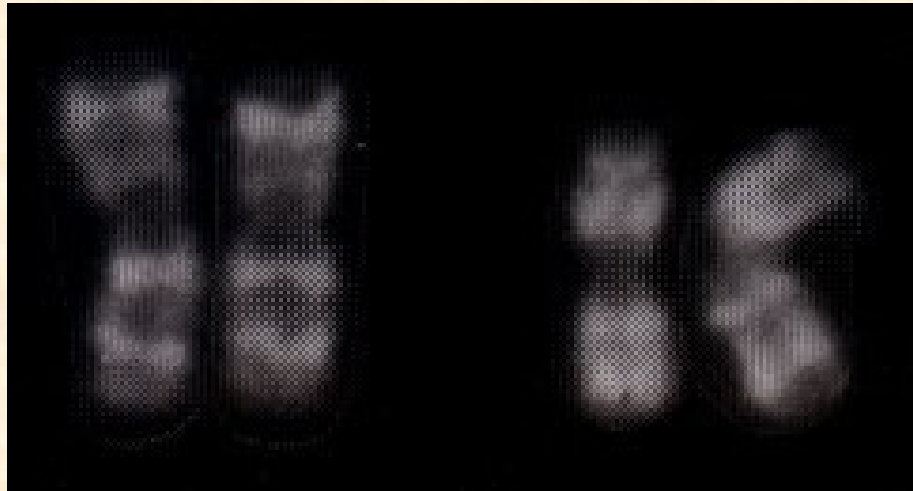
- testes, pylové matečné buňky
- hypotonizace citronanem sodným, postup obdobný jako u mitotických preparátů
- průběh meiózy a význam jednotlivých stadií; synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush) chromozomy

Proužkování chromozomů („banding“)

- Q-, G-, R-, C- proužkování
- AgNOR
- fluorescenční barvení: chromomycin A3, Hoechst 33258, DA/DAPI
- specifická barvení: diferenčně-replikační proužkování = BrdU (bromodeoxyuridin)
- použití restričních endonukleáz

Proužkování chromozomů („banding“)

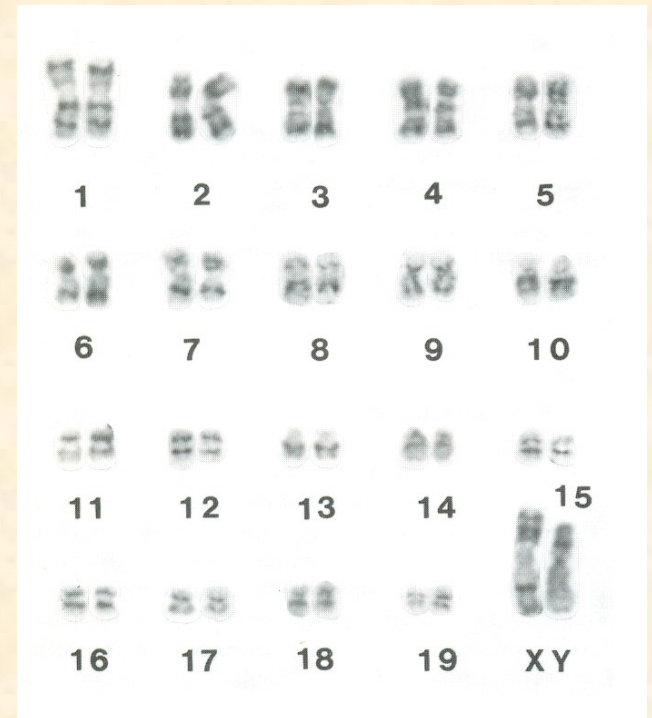
- **Q-proužkování (quinacrine):**
- **diferenciální excitace a extinkce fluorochromu v závislosti na zastoupení AT bází**
- **barvení chinakrinem, UV světlo \Rightarrow krátká doba viditelnosti**



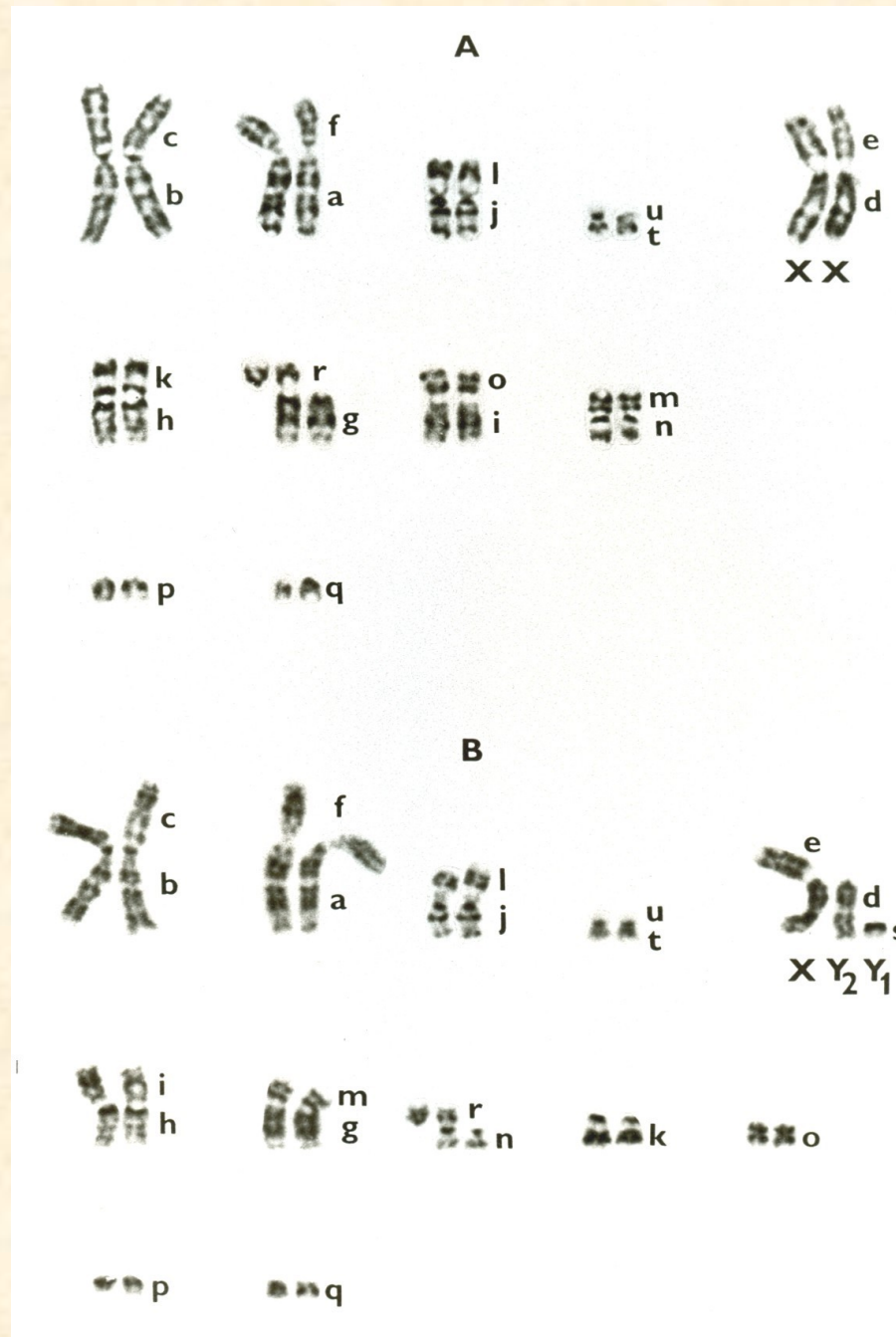
Proužkování chromozomů („banding“)

- **G-proužkování (Giemsa):**
- účinek denaturačních činidel na stabilitu proteinových a nukleových složek chromatinu
- pozitivní (tmavé) proužky \approx oblasti (izochory) bohaté na AT báze
- působení trypsinu (chymotrypsin, NaOH)
- barvení Giemsou

Cryptomys mechowi



Sorex araneus



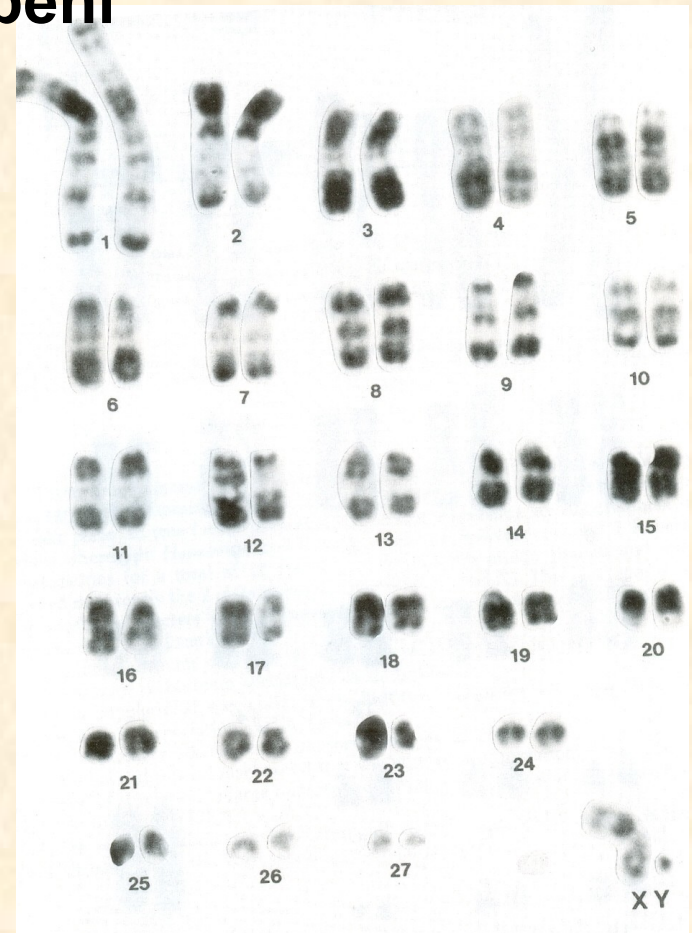


Homo sapiens

Proužkování chromozomů („banding“)

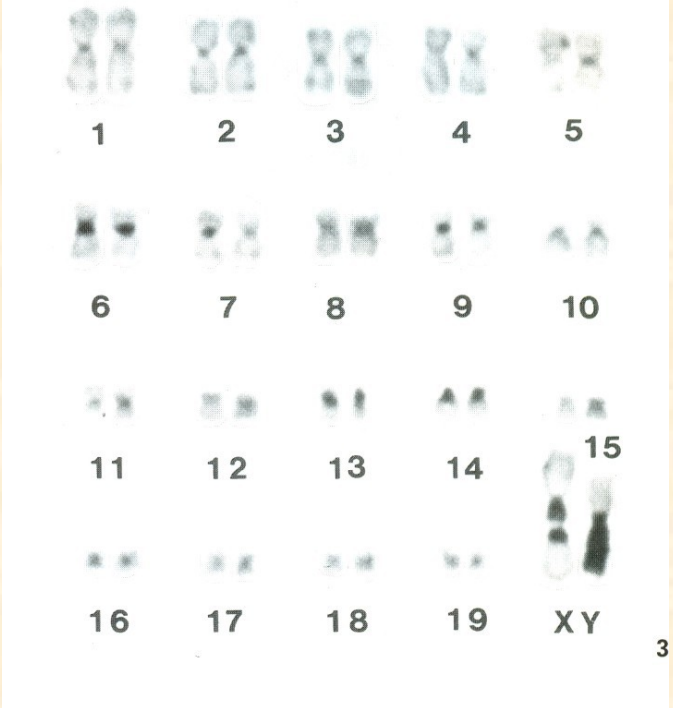
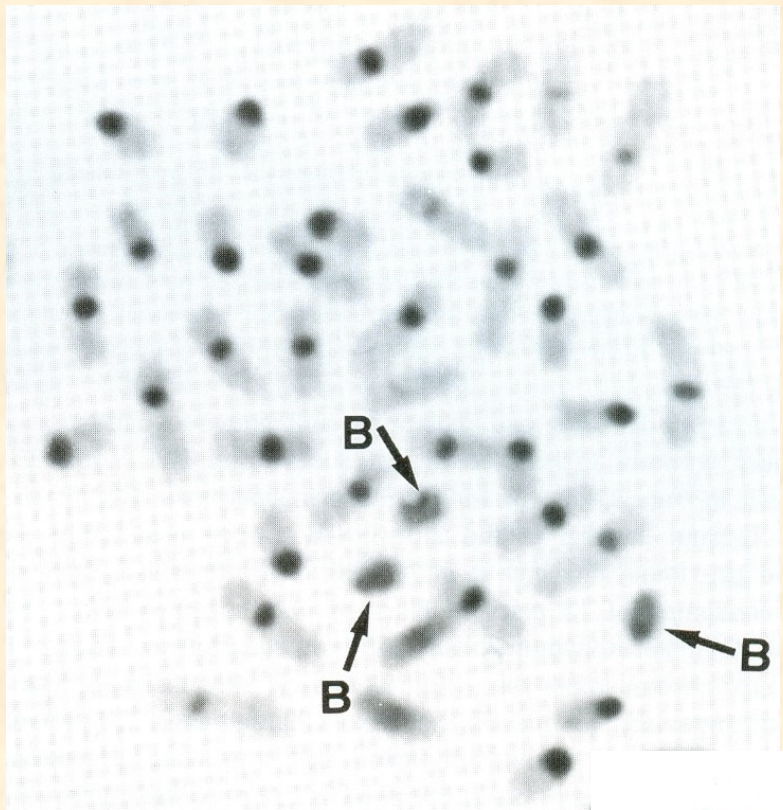
- **R-proužkování (reverse):**
- denaturace při alkalickém působení za vysoké teploty (80-90°C) a následná renaturace DNA
- tmavé proužky \approx oblasti bohaté na GC báze
- barvení Giemsou nebo akridinovou oranží

Lemur catta



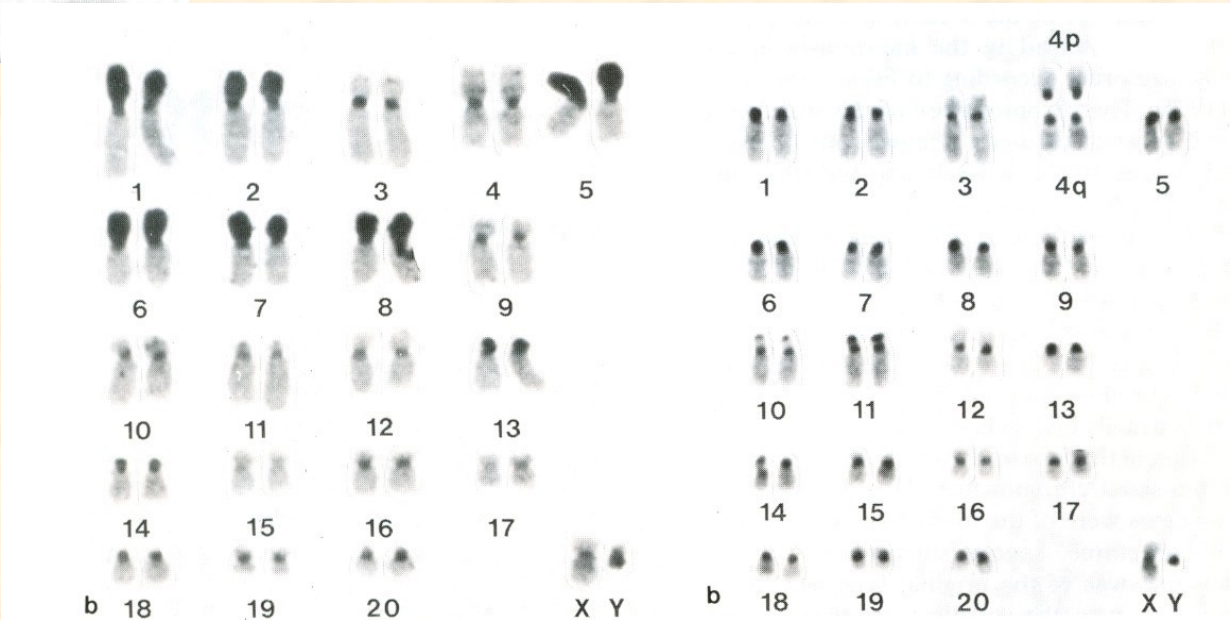
Proužkování chromozomů („banding“)

- **C-proužkování (constitutive heterochromatin):**
- postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a renaturaci heterochromatinu v solném pufu ($2\times\text{SSC}$) za vysoké teploty (60°C)
- rozpuštění euchromatinu
- barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)



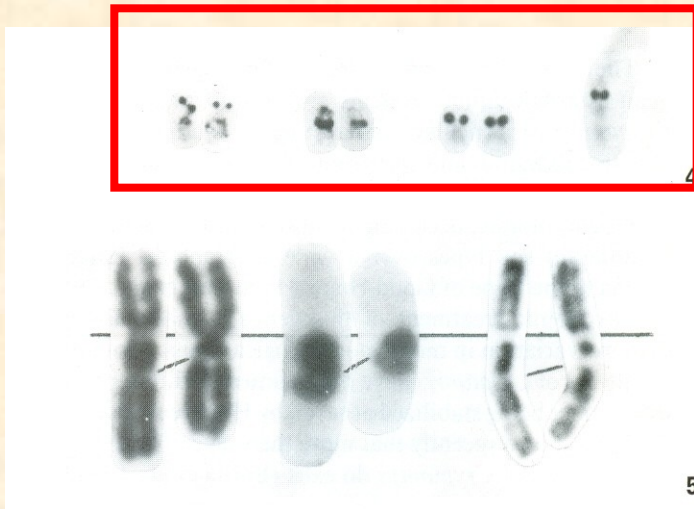
mývalovec kuní

kolčava a hranostaj

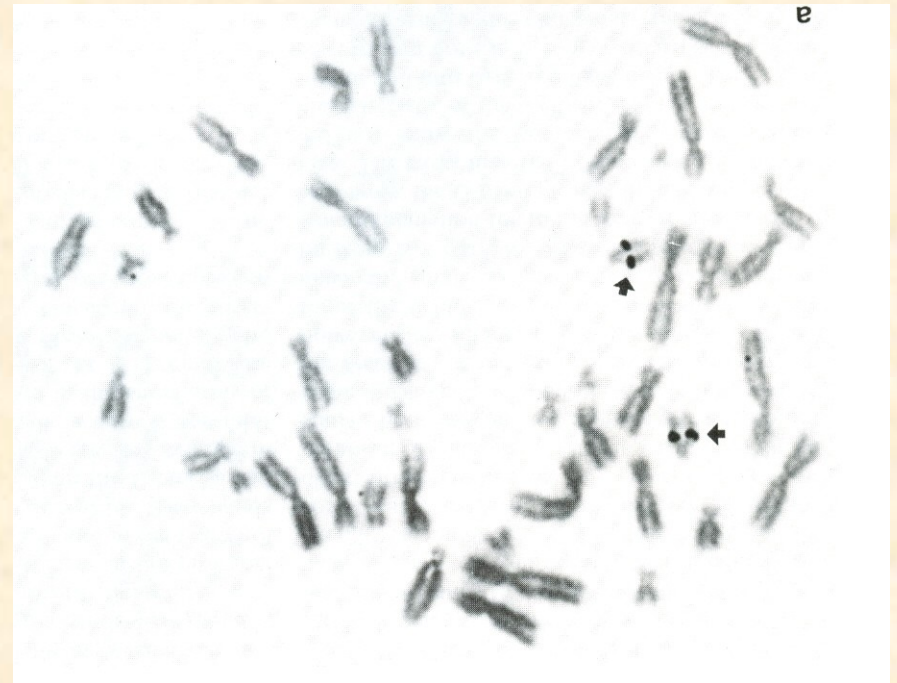


Proužkování chromozomů („banding“)

- Ag-NOR
- želatina + kyselina mravenčí, barvení AgNO_3
- barvení organizátorů jadérek (pouze aktivní)



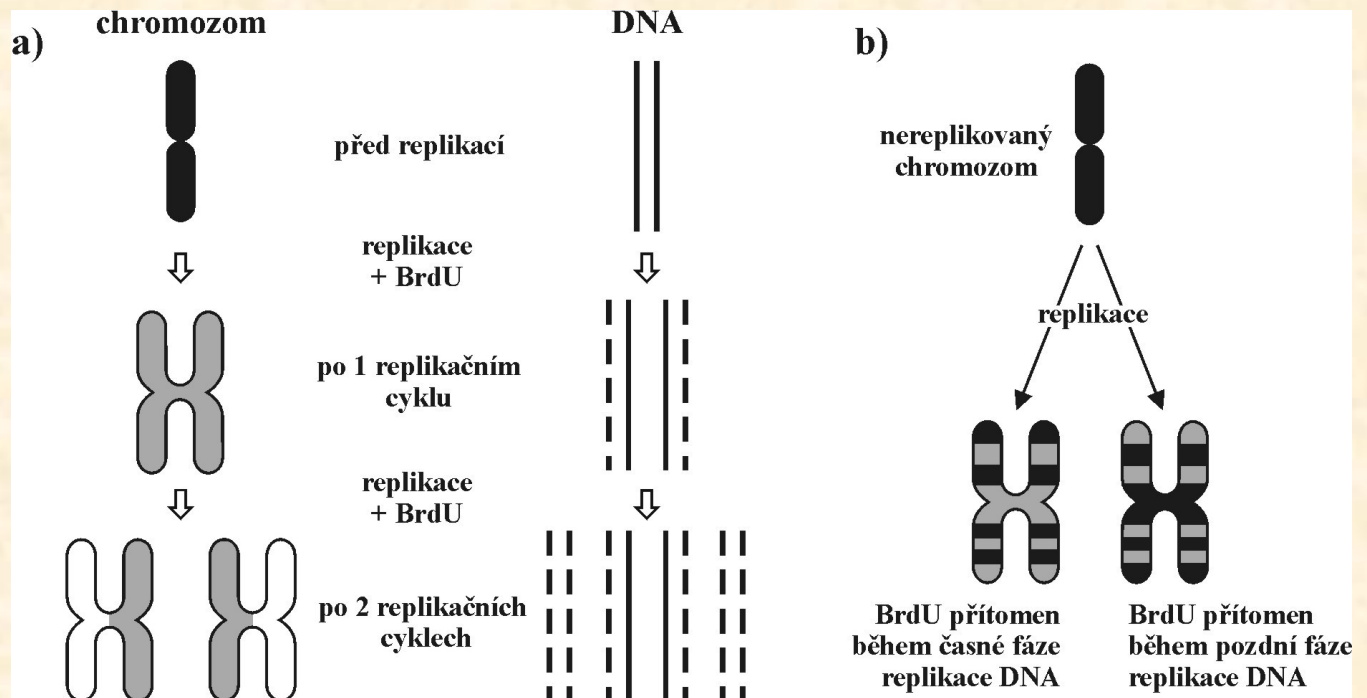
Cryptomys mechowi



kolčava

Proužkování chromozomů („banding“)

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



Proužkování chromozomů („banding“)

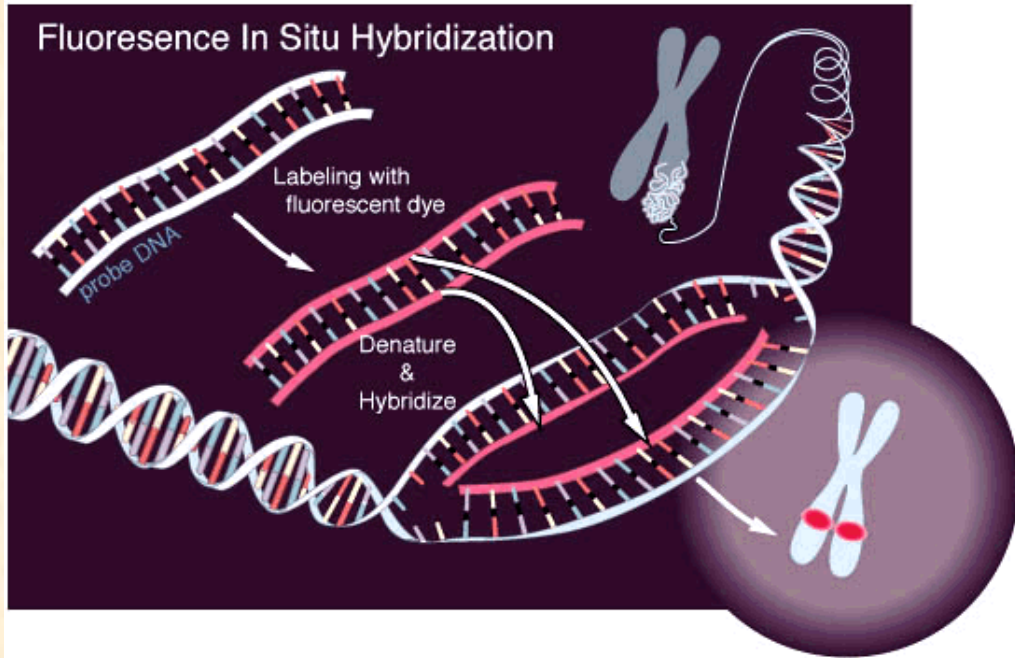
- **C-proužkování (constitutive heterochromatin):**
- postupné působení silné kyseliny a zásady a renaturaci heterochromatinu v solném pufru (2×SSC) za vysoké teploty
- barvení Giemsou (vizualizace konstitutivního heterochromatinu)

Cryptomys mechowi

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

- hybridizace chromozomů in situ se značenou sondou
možnost použití i několika sond současně (až 7) u FISH
sondy značené biotinem
- **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
CIS, chromosome in situ supression hybr.,
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)

