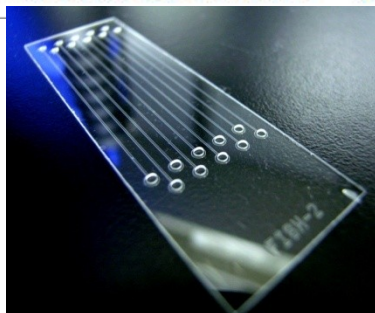
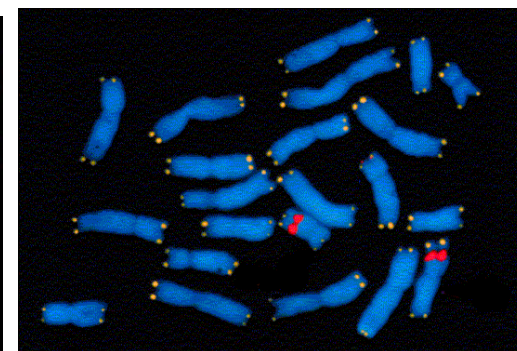
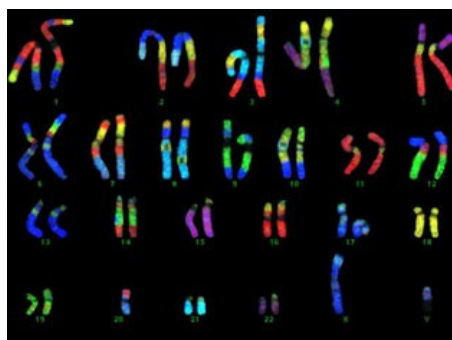
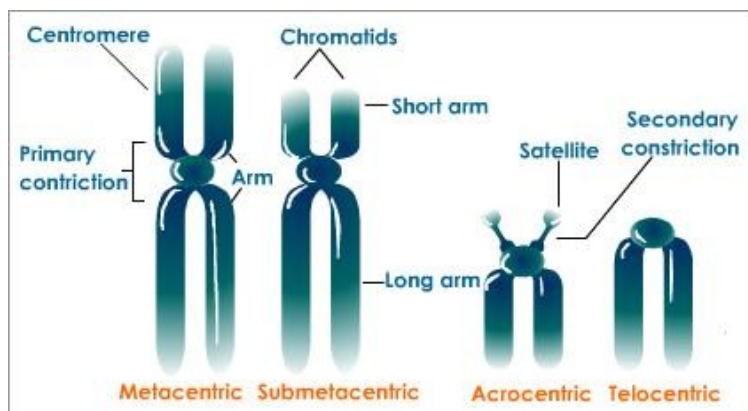


CYTOGENETICKÉ METODY



analýza mikroskopické struktury chromozomů

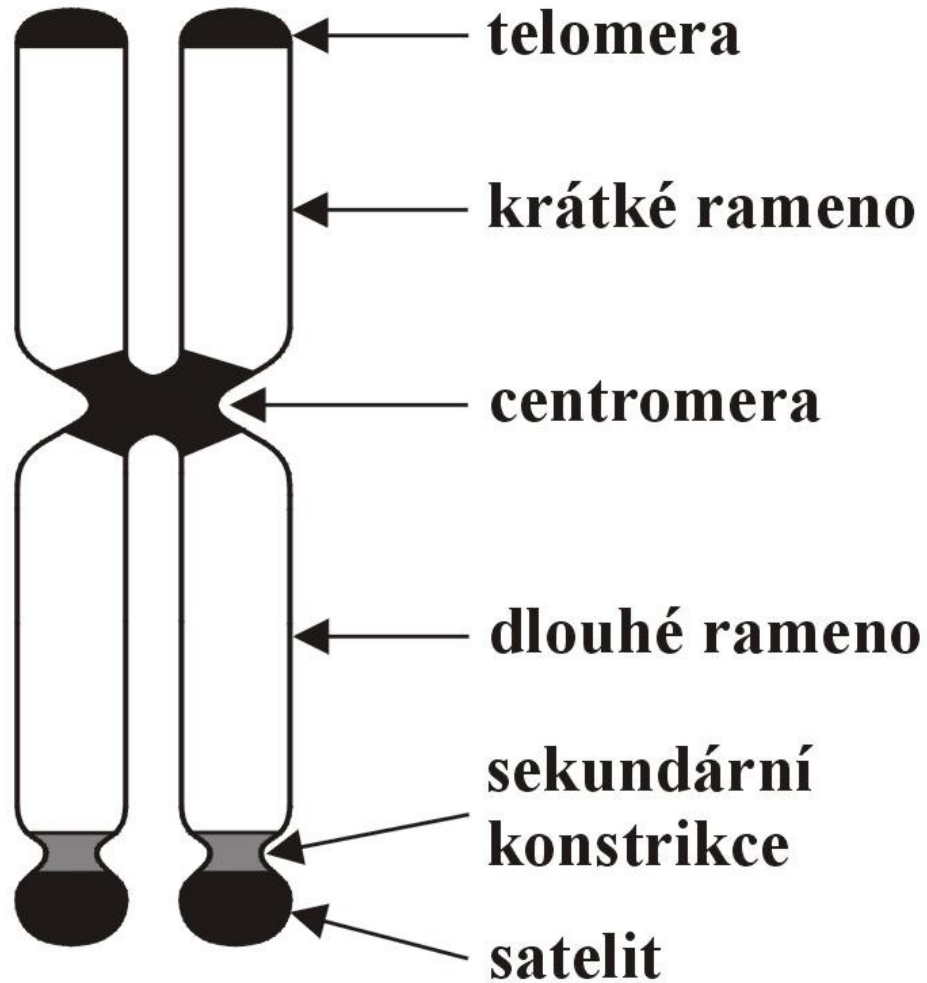
pojem „chromozom“ - 1888 Wilhelm Waldeyer

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



Klasifikace typu chromozomů podle polohy centromery:

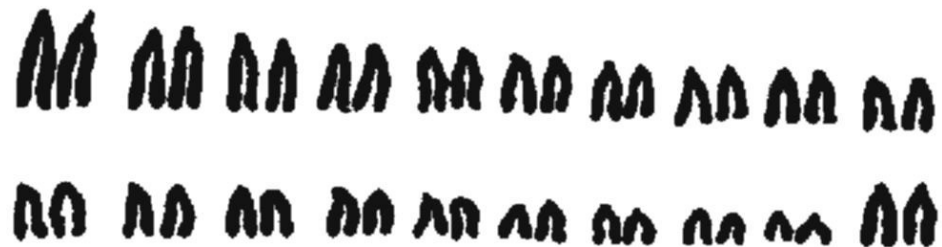
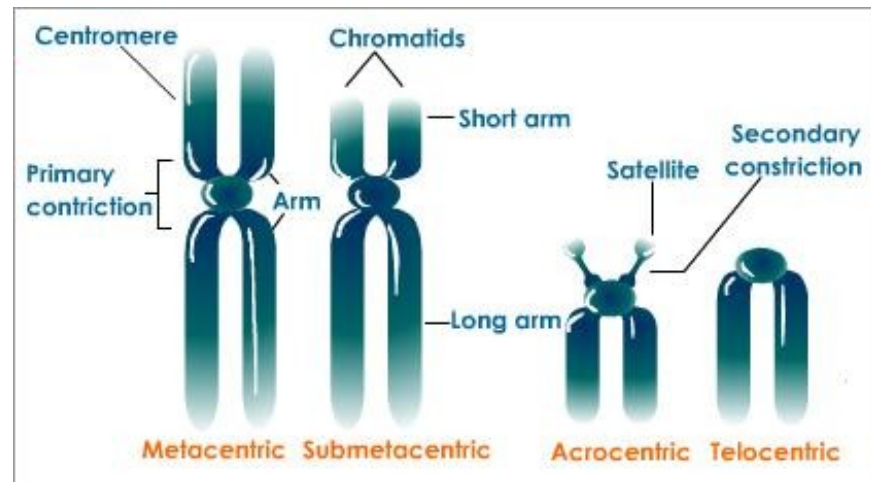
metacentrický

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

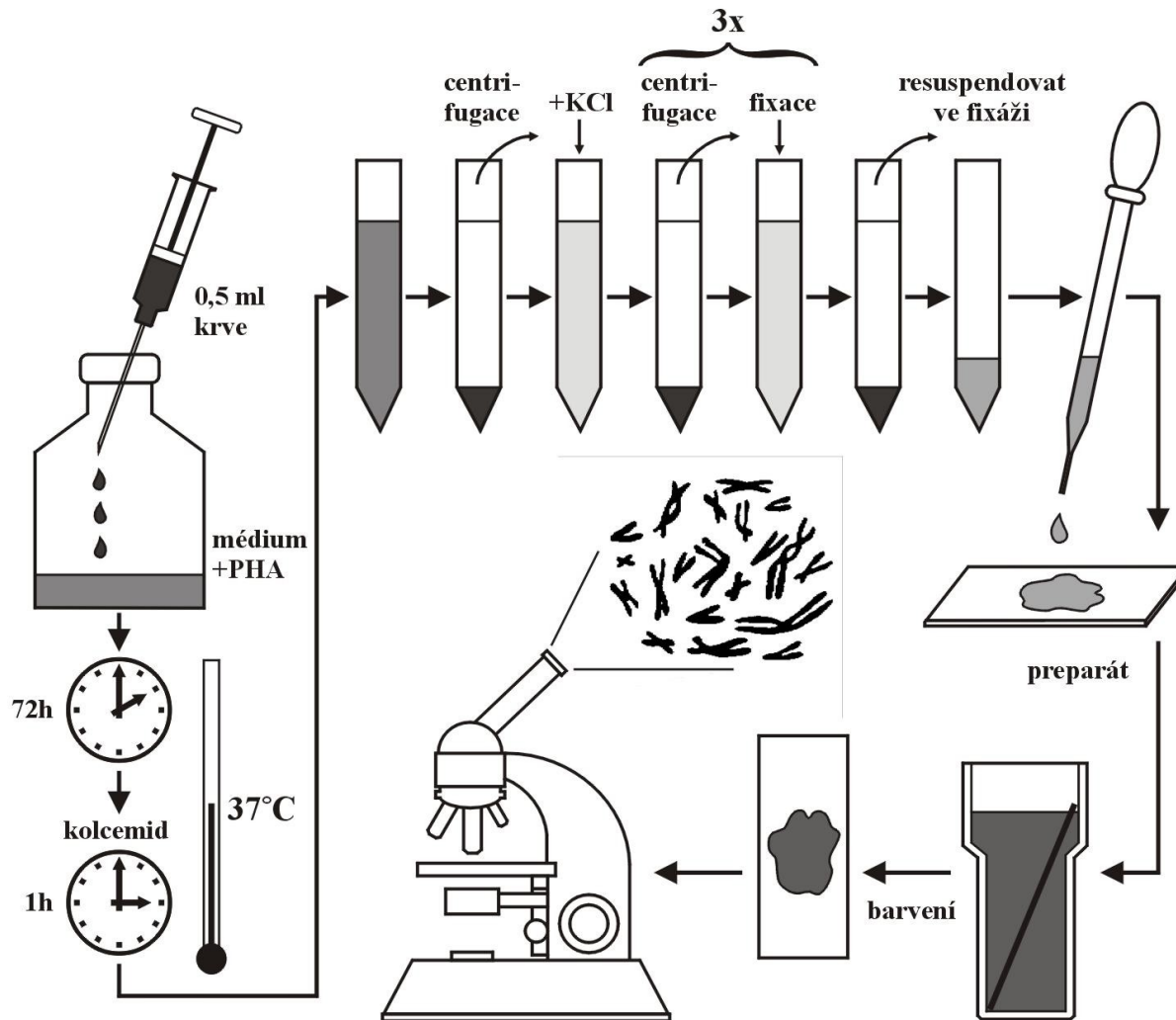
5. Zhotovení preparátu

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

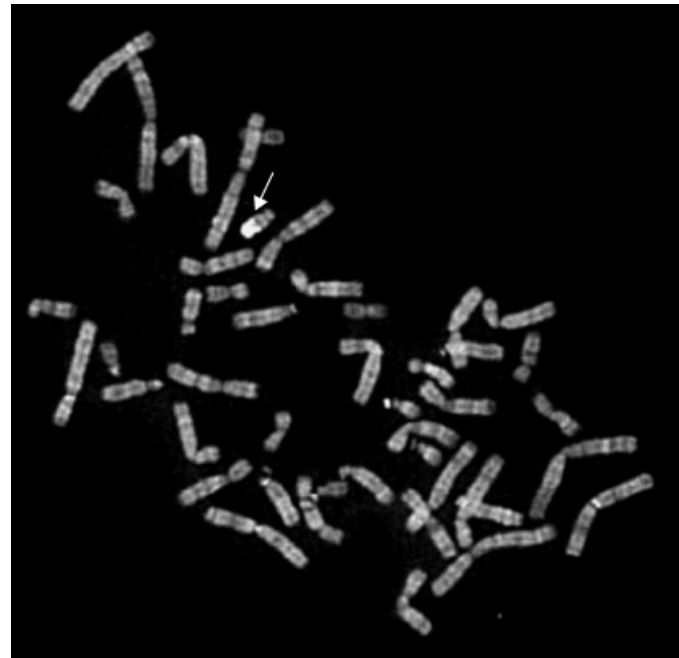
průběh meiózy a význam jednotlivých stadií;
synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush)
chromozomy

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):

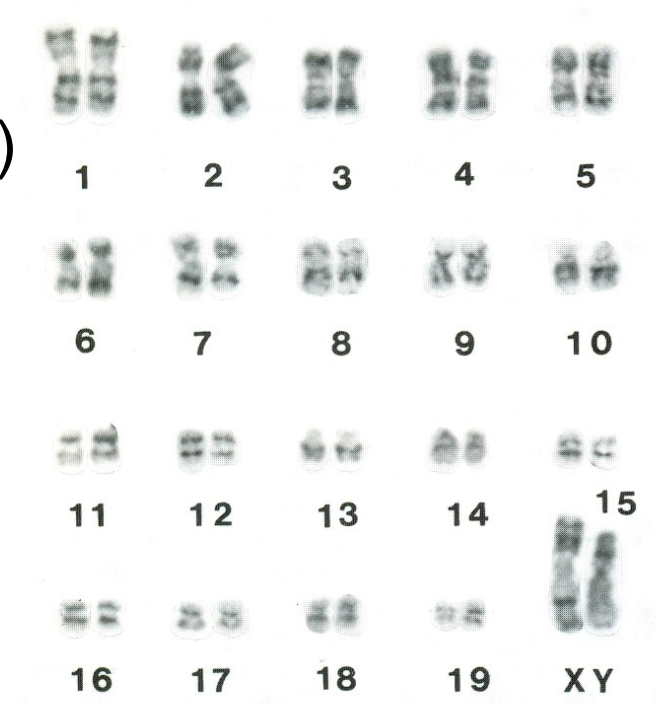
účinek denaturačních činidel na stabilitu proteinových a nukleových složek chromatinu

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“)

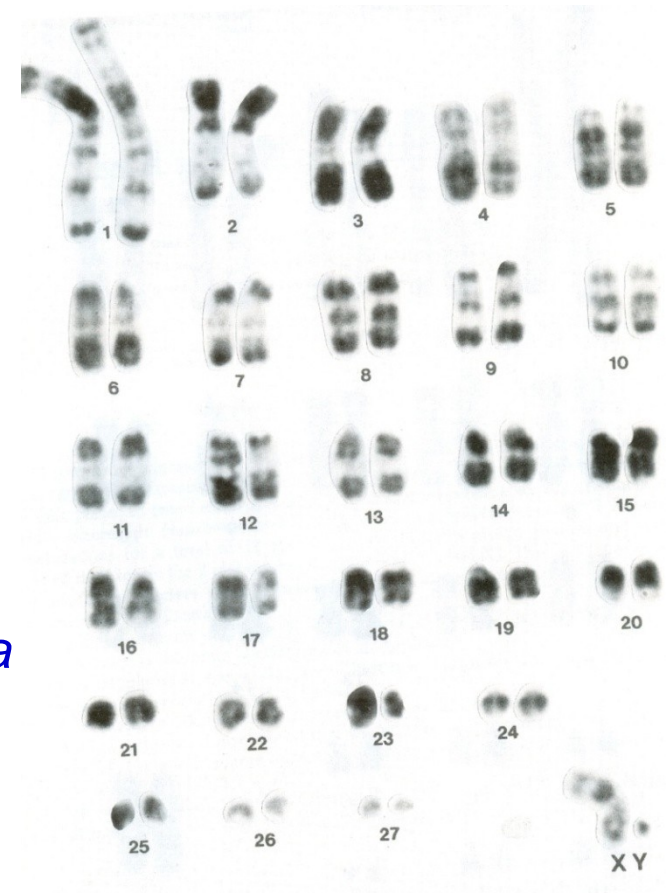
R-proužkování (reverse banding):

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“)

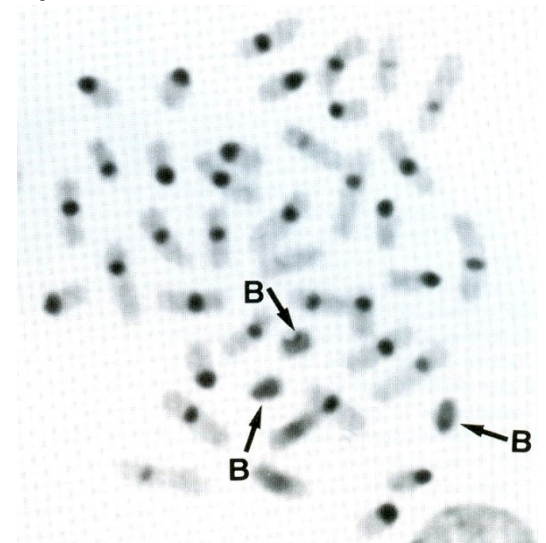
C-proužkování (constitutive heterochromatin):

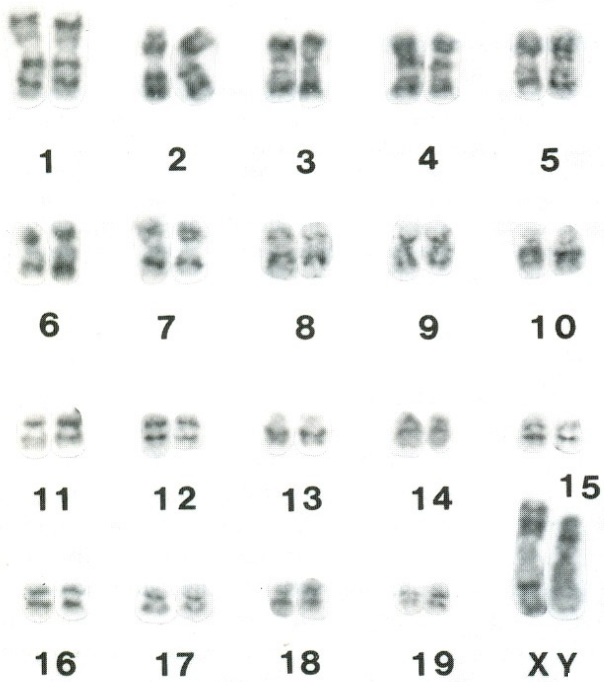
postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a renaturaci heterochromatinu v solném pufu ($2\times\text{SSC}$) za vysoké teploty (60°C)

rozpuštění euchromatinu

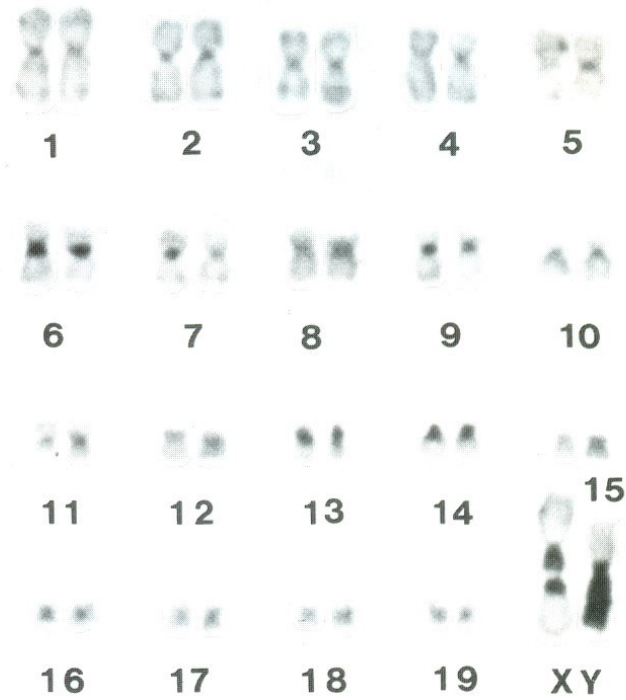
barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)

psík mývalovitý
(*Nyctereutes procyonides*)

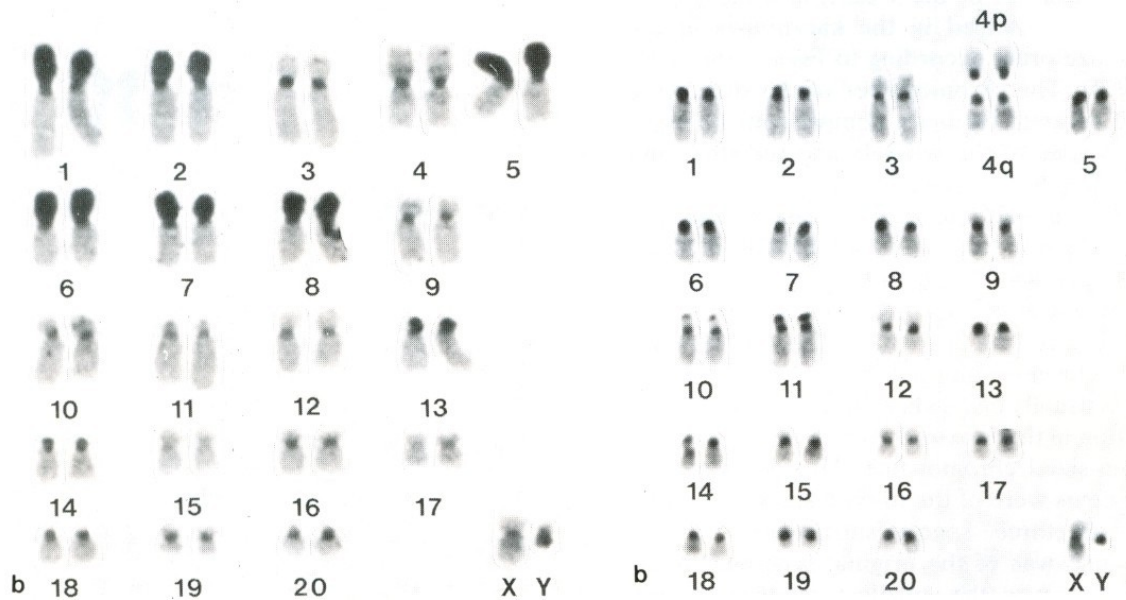




rypoš obří
(*Fukomys mehowi*)



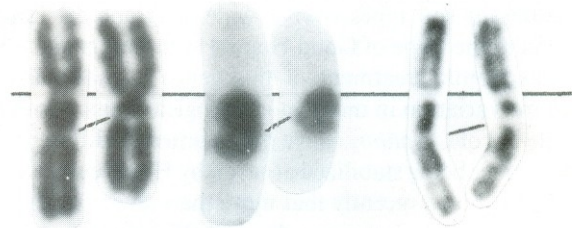
kolčava a hranostaj



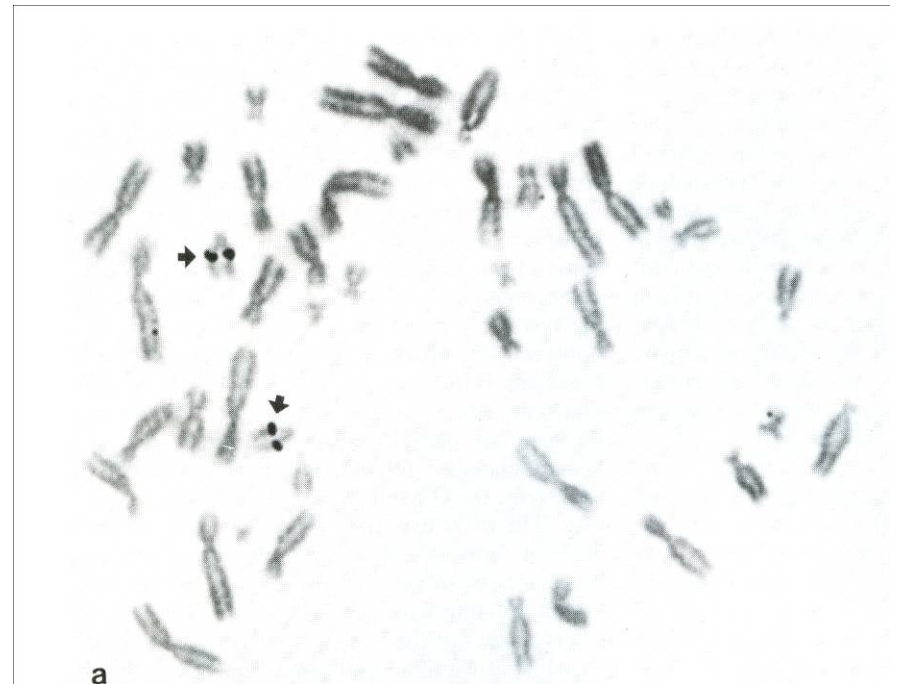
Proužkování chromozomů („banding“)

Ag-NOR:

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



rypoš obří
(*Fukomys mechowii*)

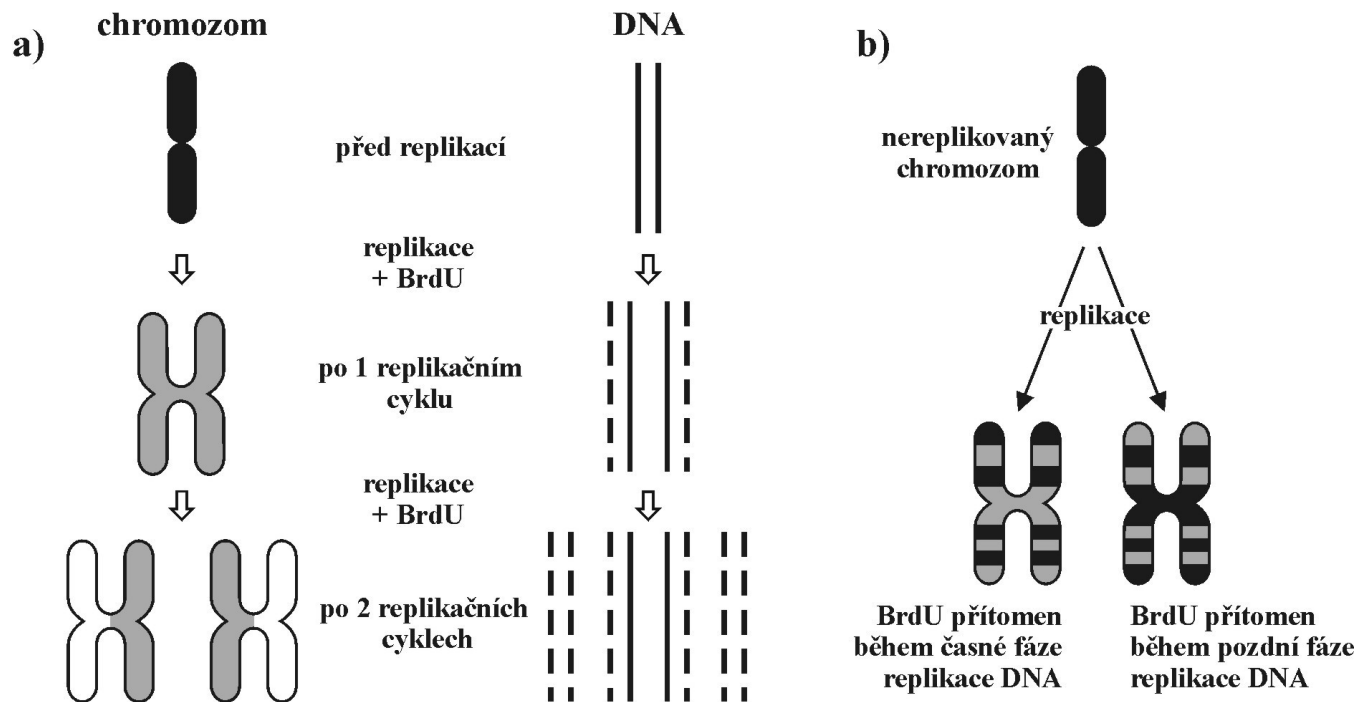


kolčava

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

CISS, chromosome in situ supression hybr.,

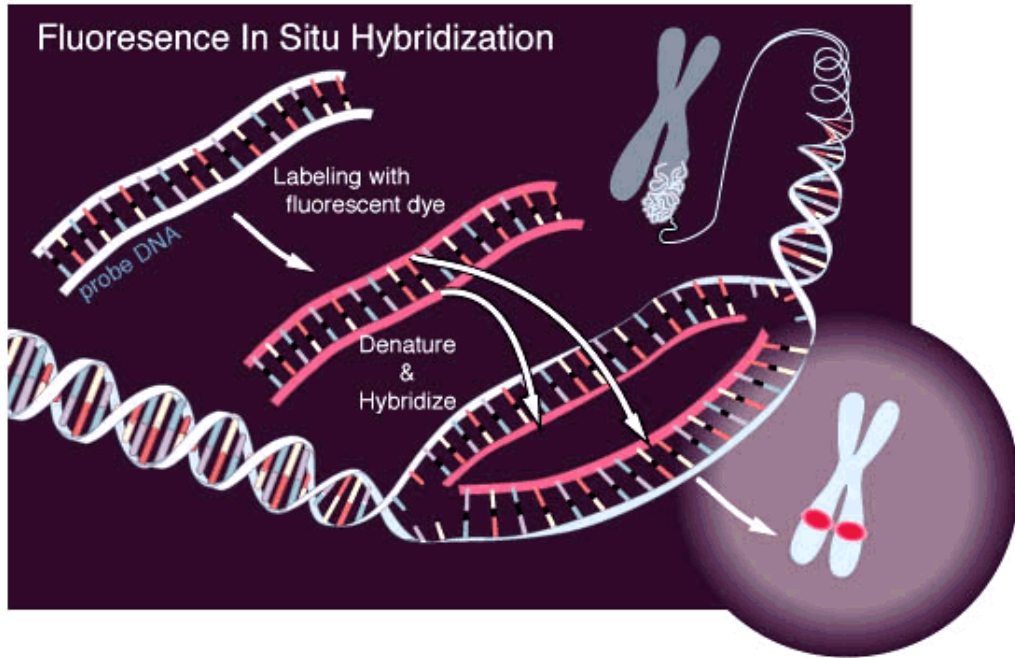
PRINS, primed in situ labelling,

GISH, whole genome in situ hybridization,

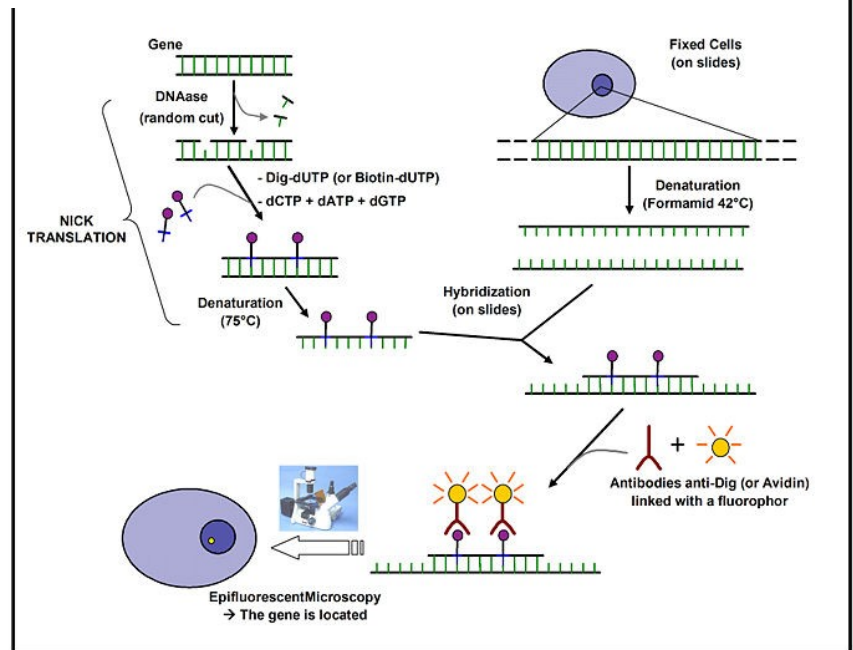
FACS, fluorescence activated cell sorting,

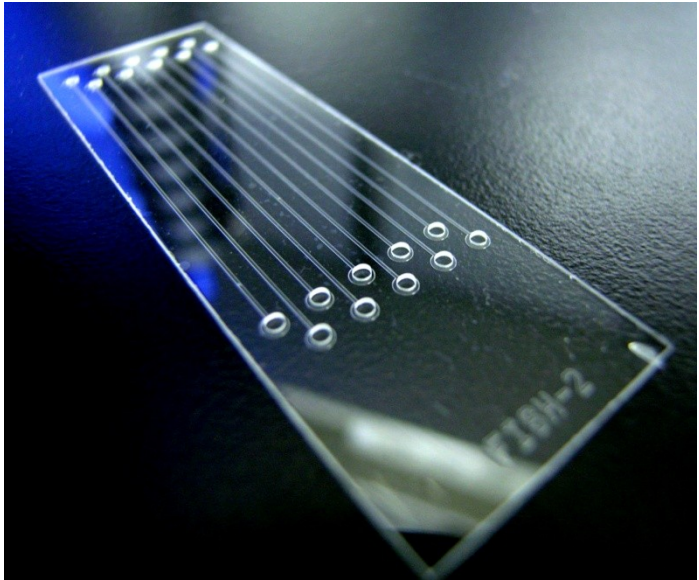
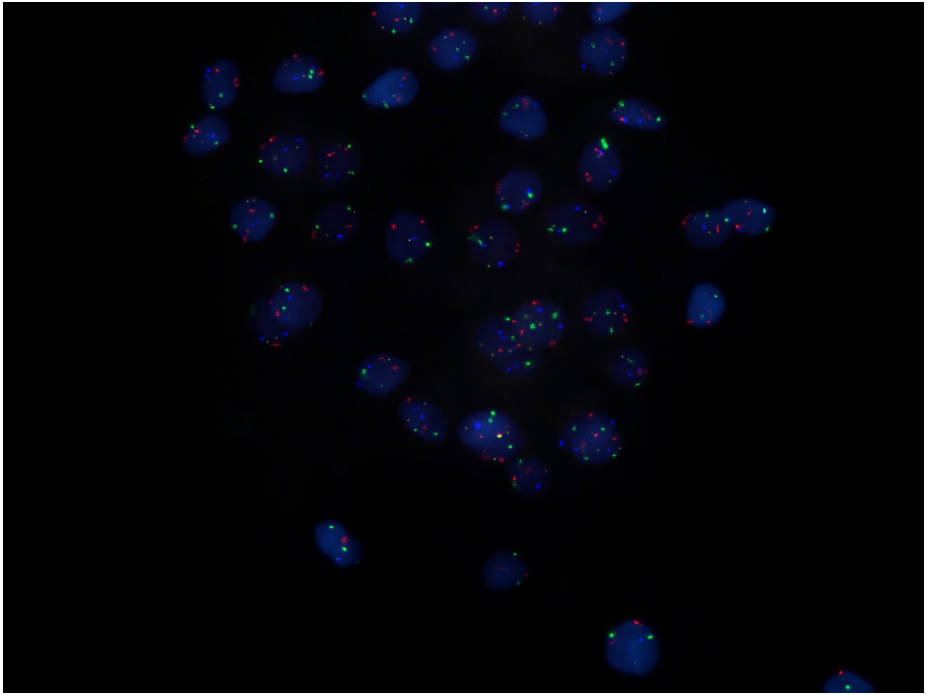
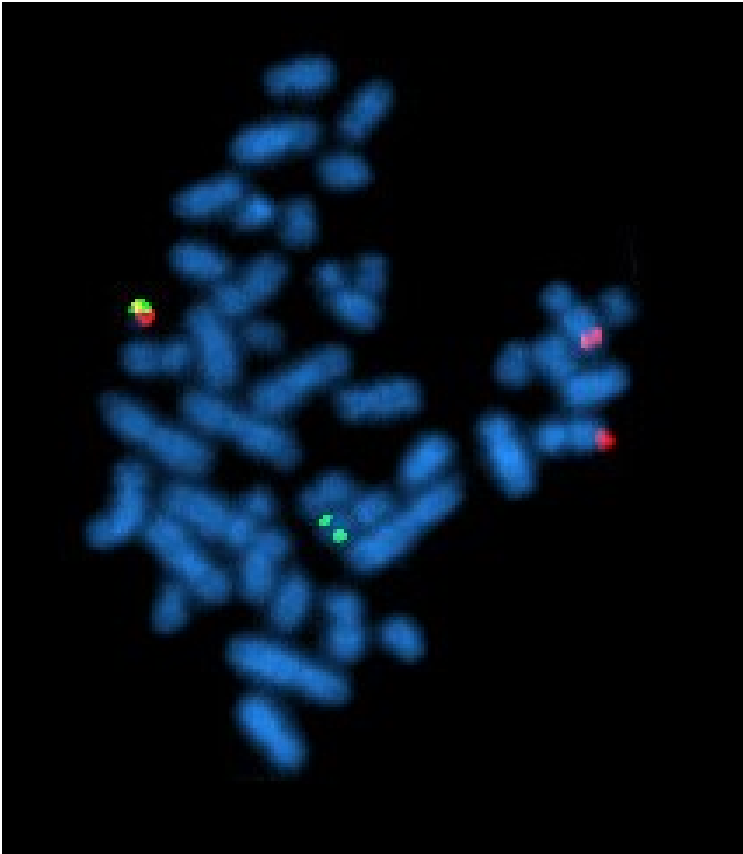
vybarvování chromozomů = „**chromosome painting**“

Fluorescence In Situ Hybridization



FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)





Mikrodisekce

