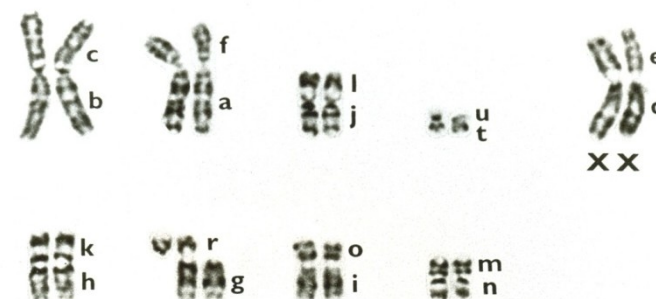
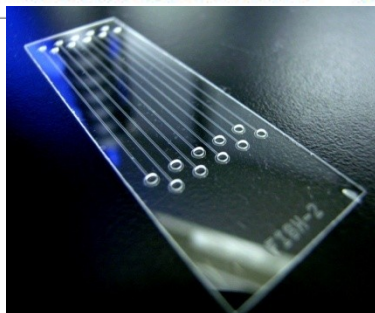
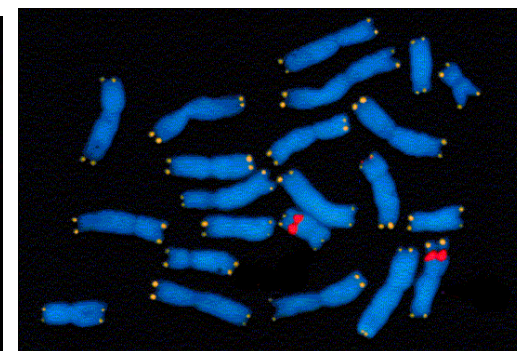
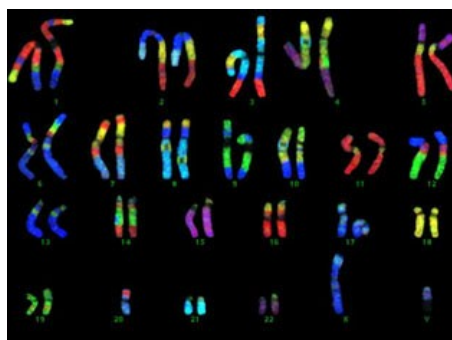
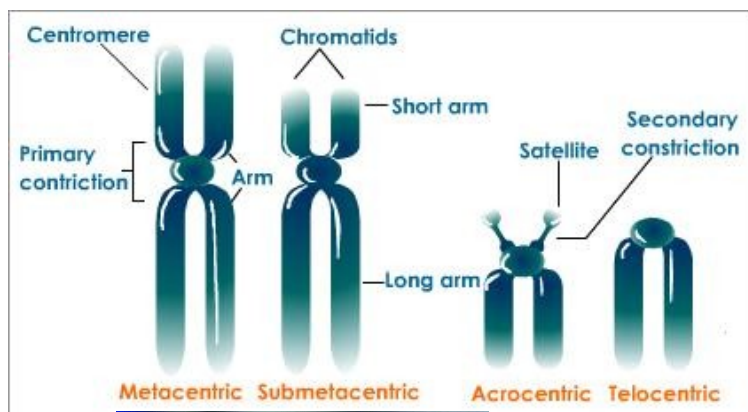


# CYTOGENETICKÉ METODY



analýza mikroskopické struktury chromozomů

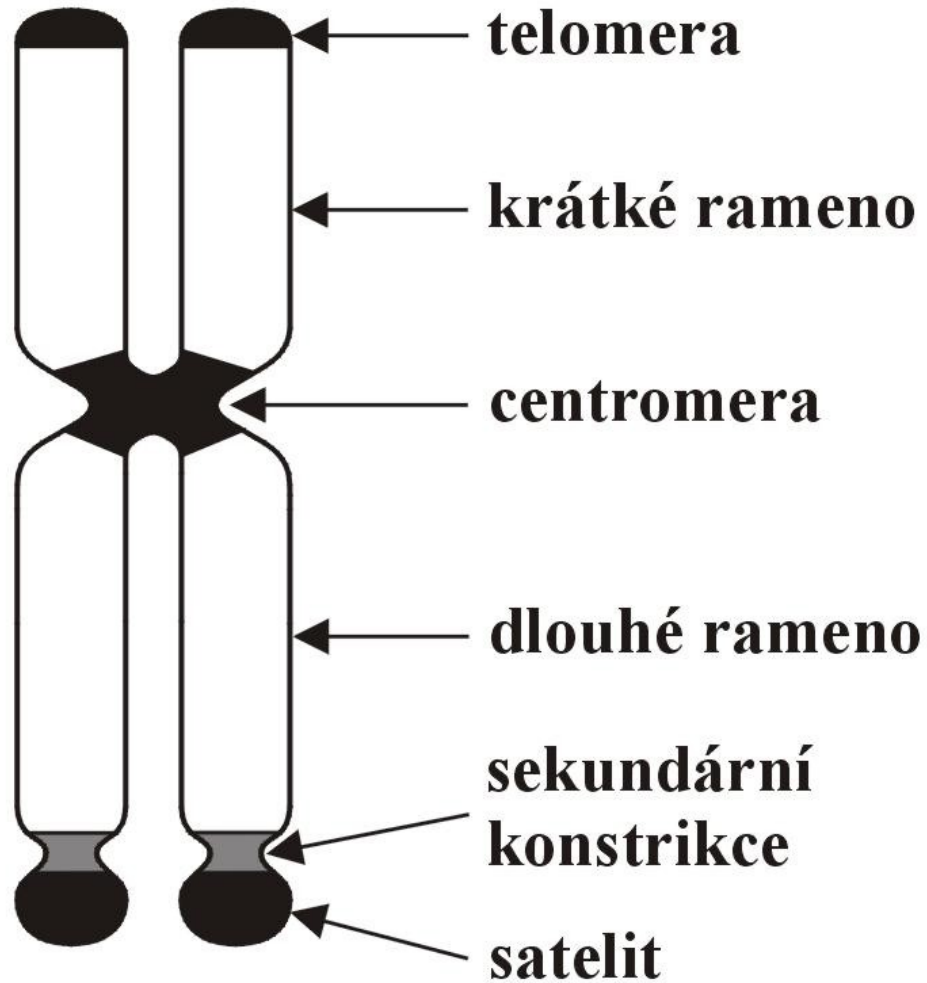
pojem „chromozom“ - 1888 Wilhelm Waldeyer

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:

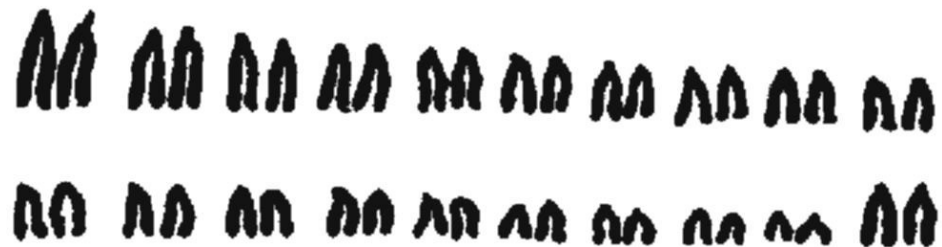
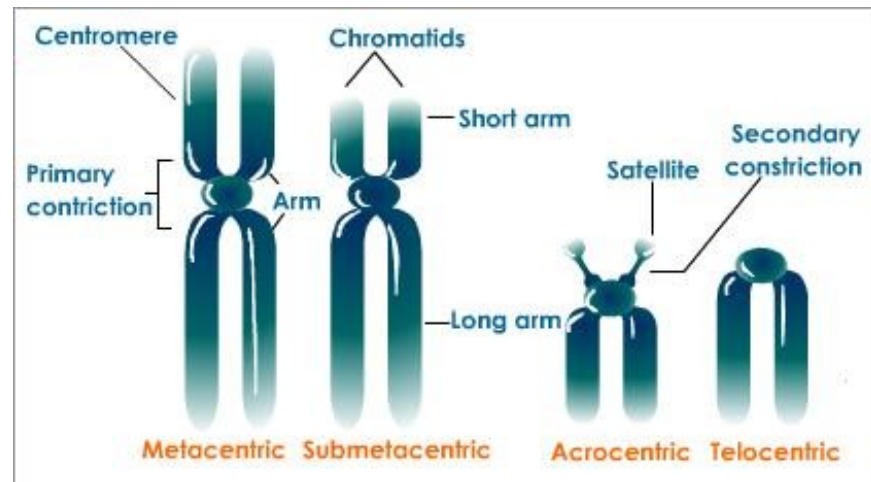
metacentrický

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

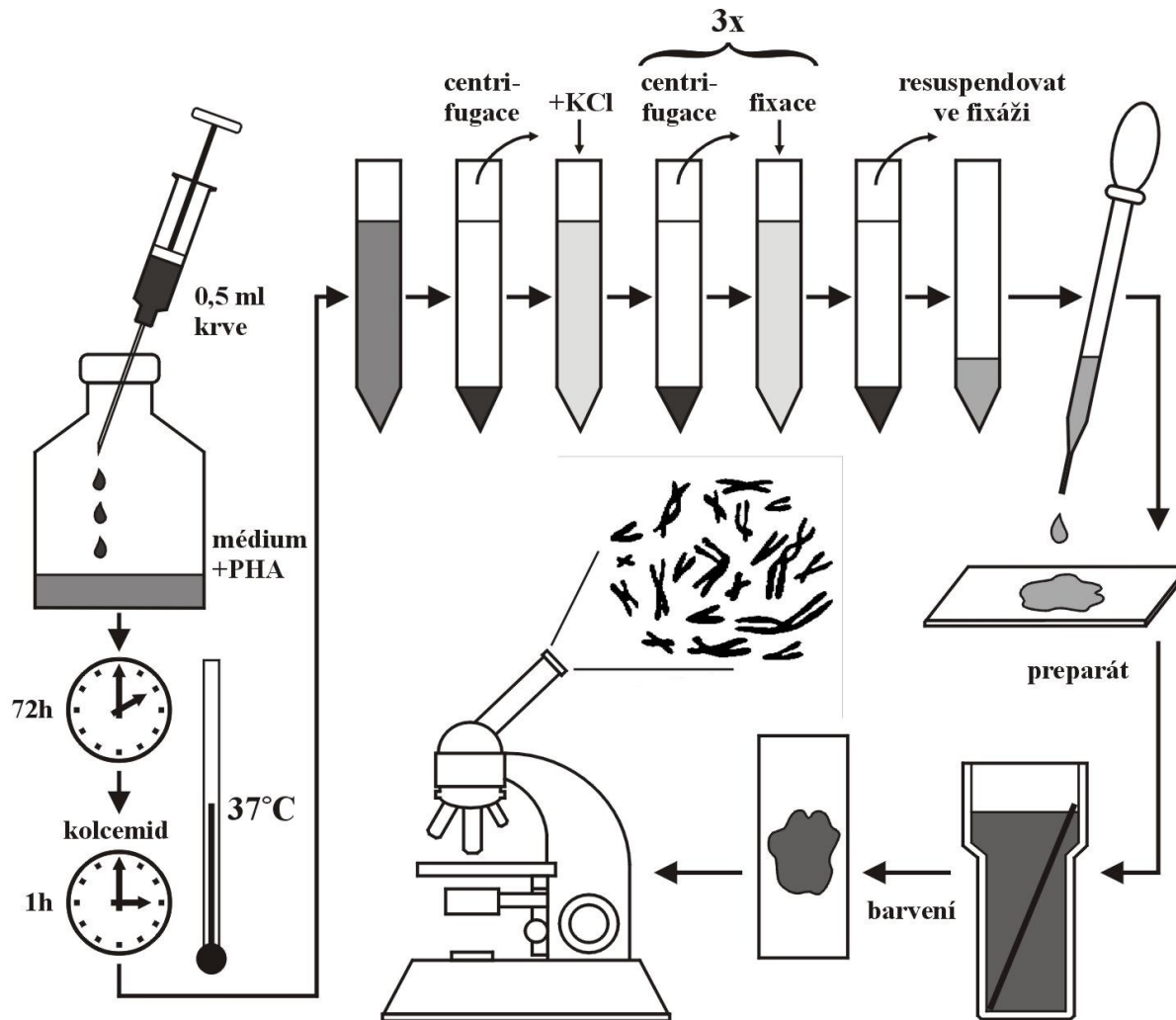
## 5. Zhotovení preparátu

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

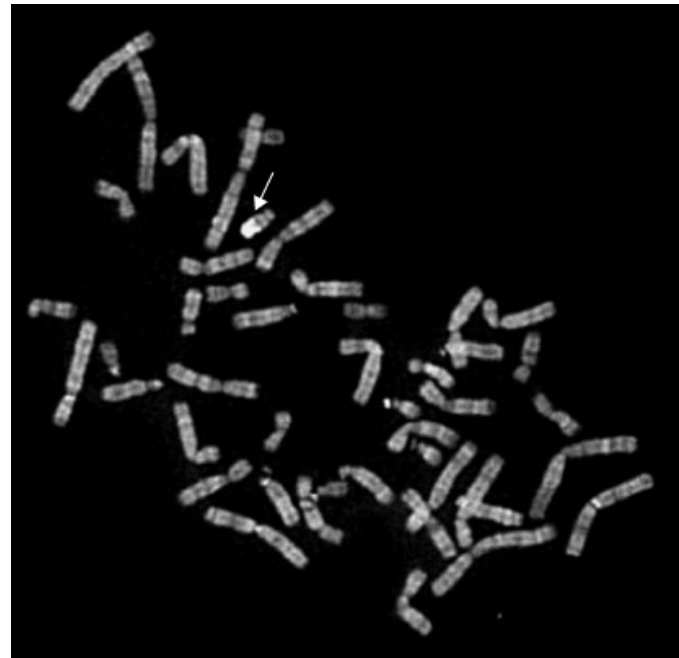
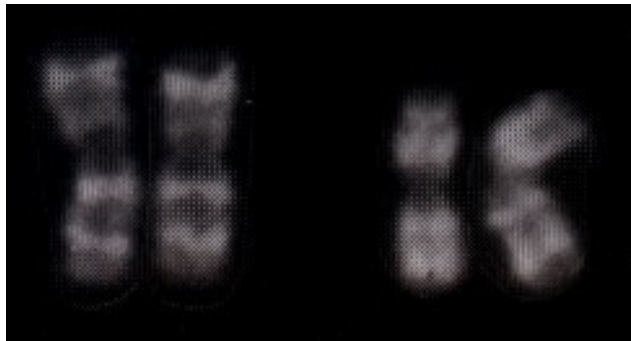
průběh meiózy a význam jednotlivých stadií;  
synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush)  
chromozomy

# 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):

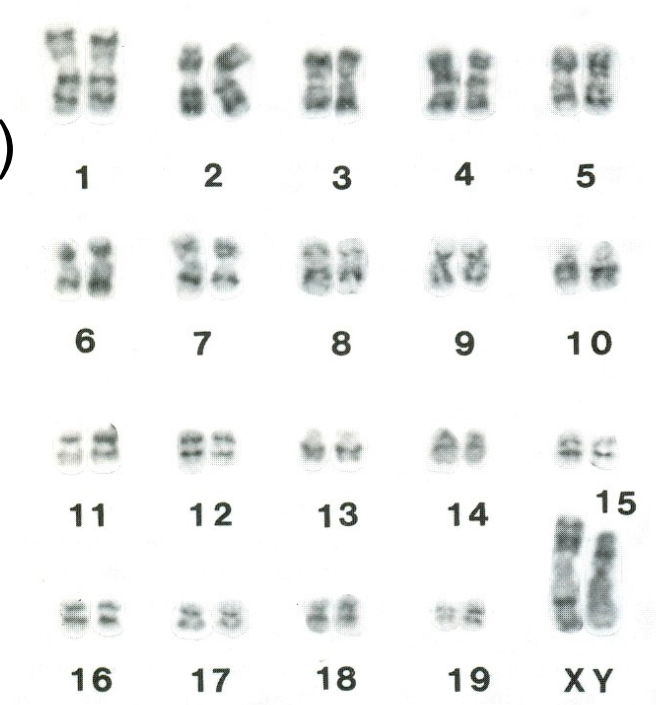
účinek denaturačních činidel na stabilitu proteinových a nukleových složek chromatinu

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“)

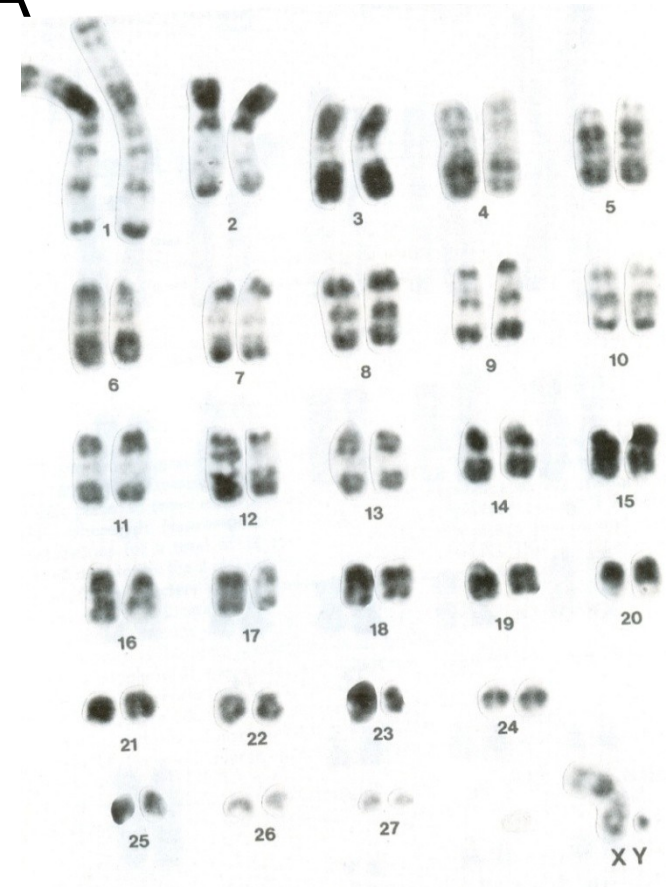
R-proužkování (reverse banding):

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“)

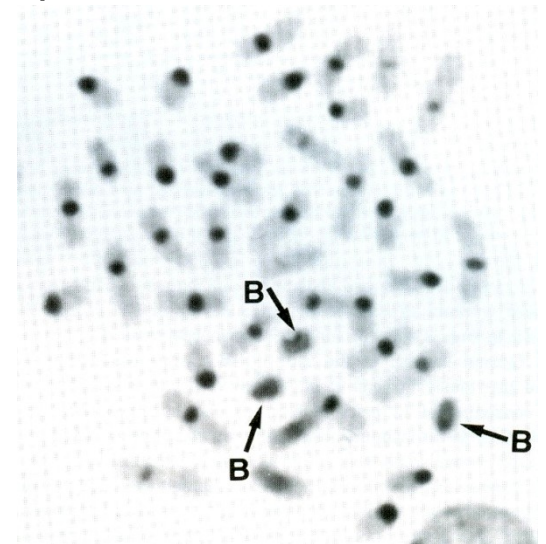
## C-proužkování (constitutive heterochromatin):

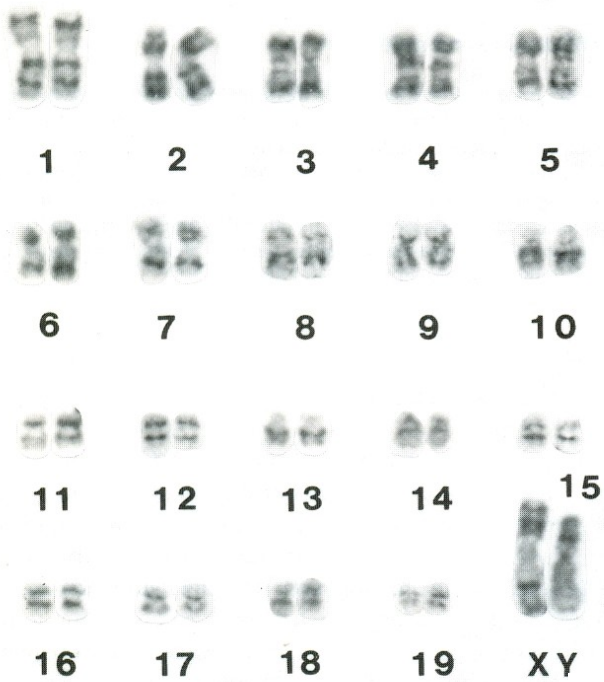
postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady (Ba(OH)<sub>2</sub>) a renaturaci heterochromatinu v solném pufro (2×SSC) za vysoké teploty (60°C)

rozpuštění euchromatinu

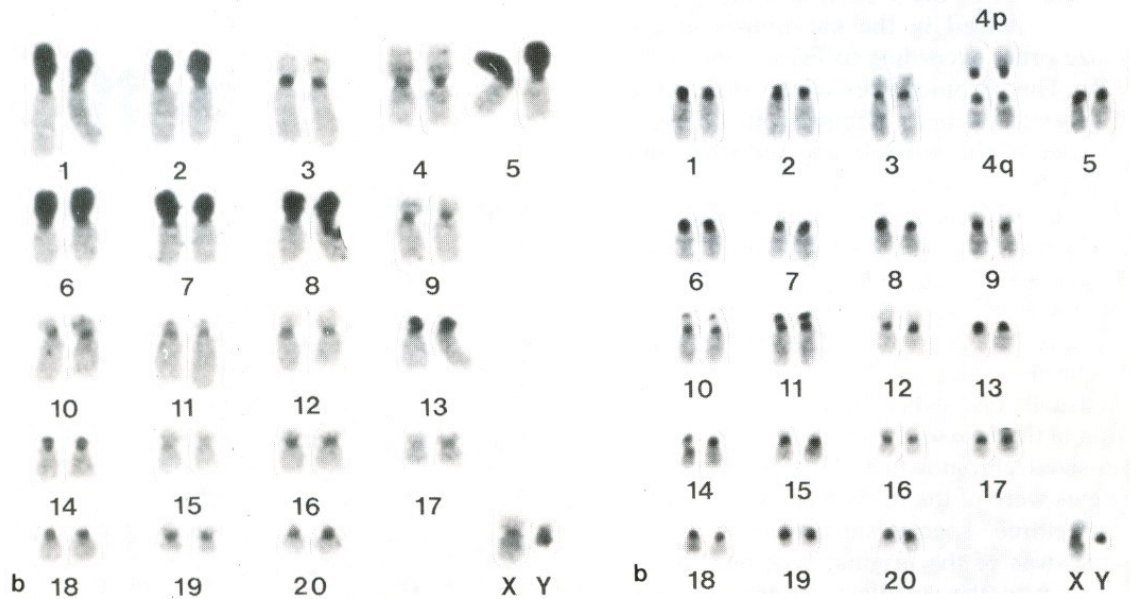
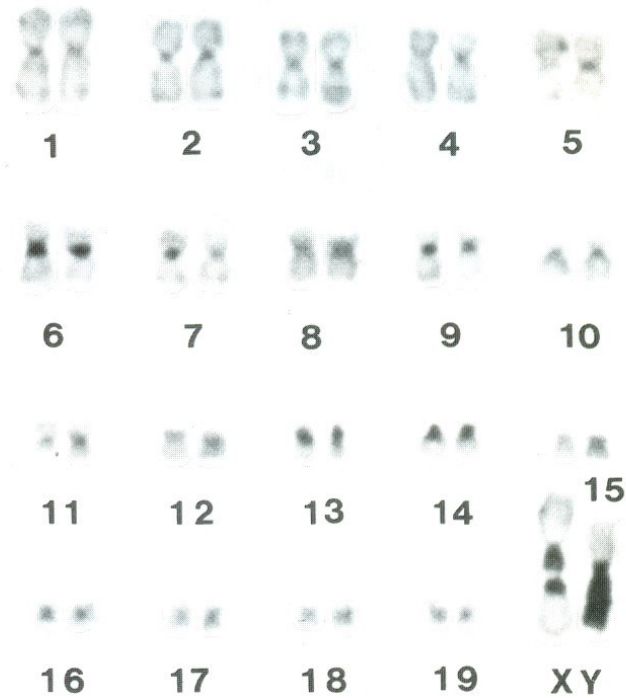
barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)

psík mývalovitý  
(*Nyctereutes procyonides*)





rypoš obří  
(*Fukomys mehowi*)

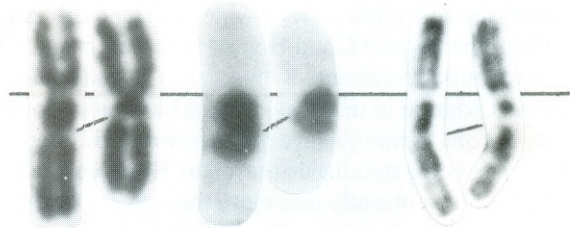


kolčava a hranostaj

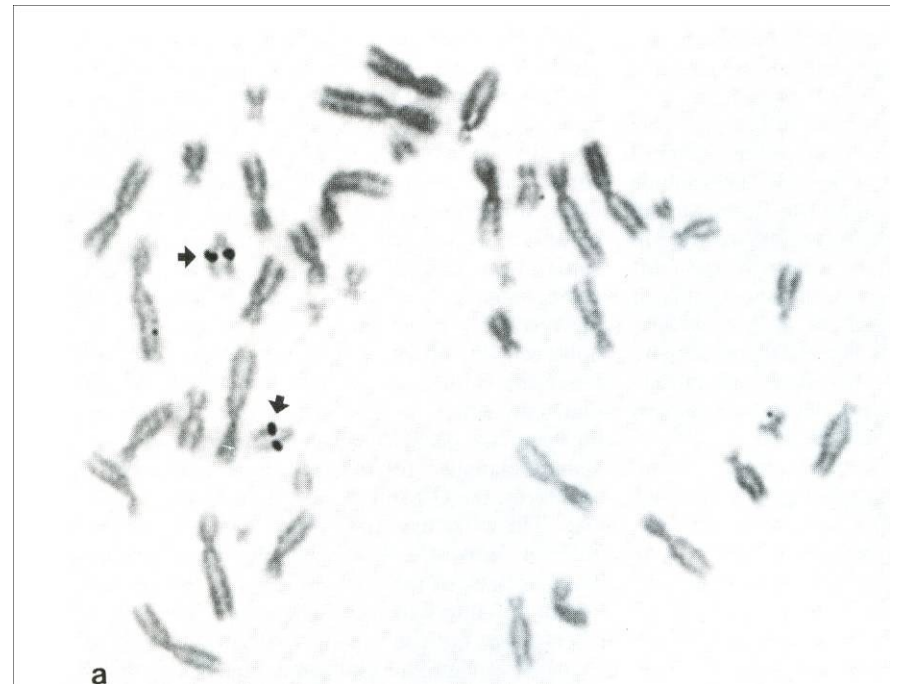
# Proužkování chromozomů („banding“)

Ag-NOR:

želatina + kyselina mravenčí, barvení  $\text{AgNO}_3$   
barvení organizátorů jadérek (pouze aktivní)



rypoš obří  
(*Fukomys mechowi*)

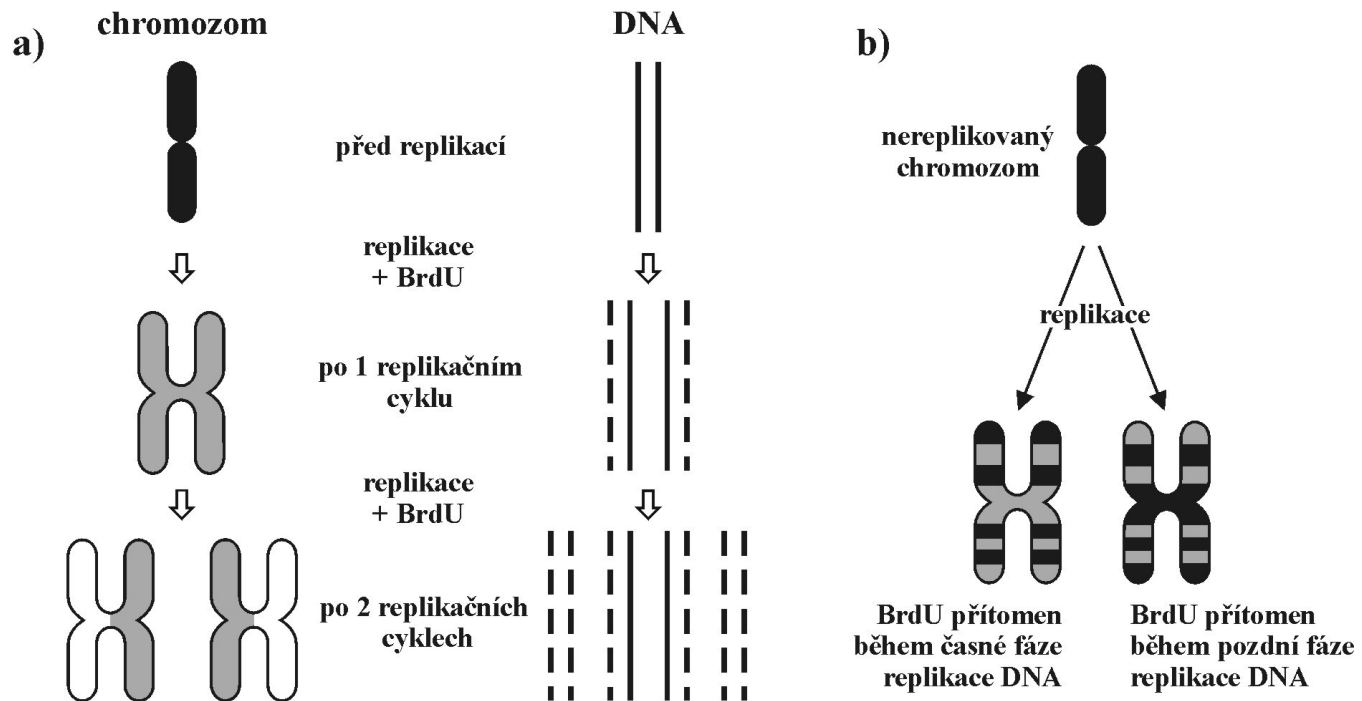


kolčava

# Proužkování chromozomů („banding“)

BrdU:

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



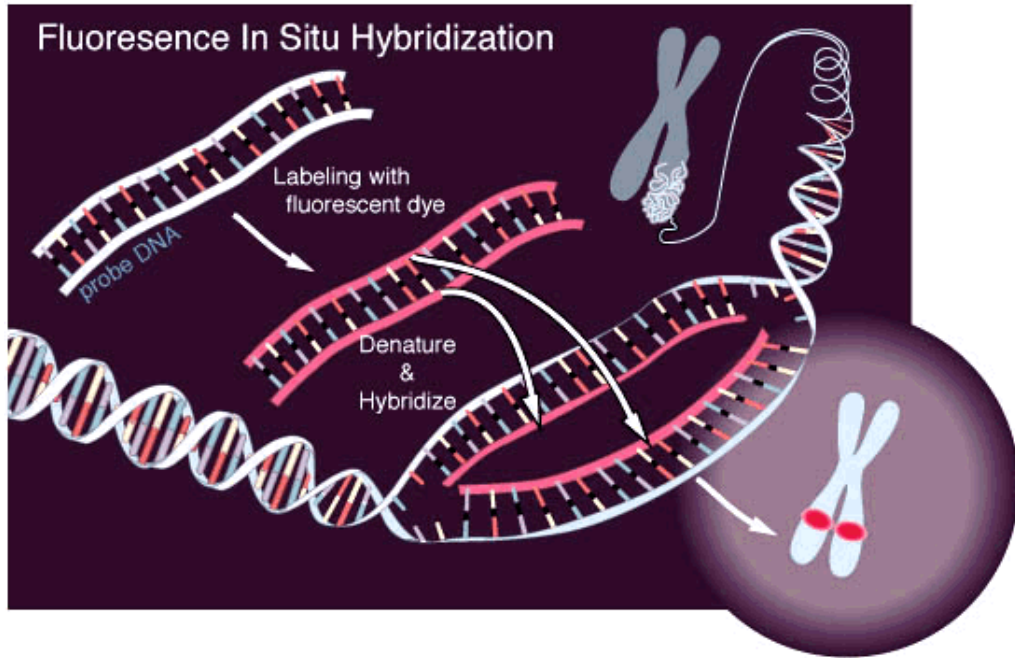
# Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

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

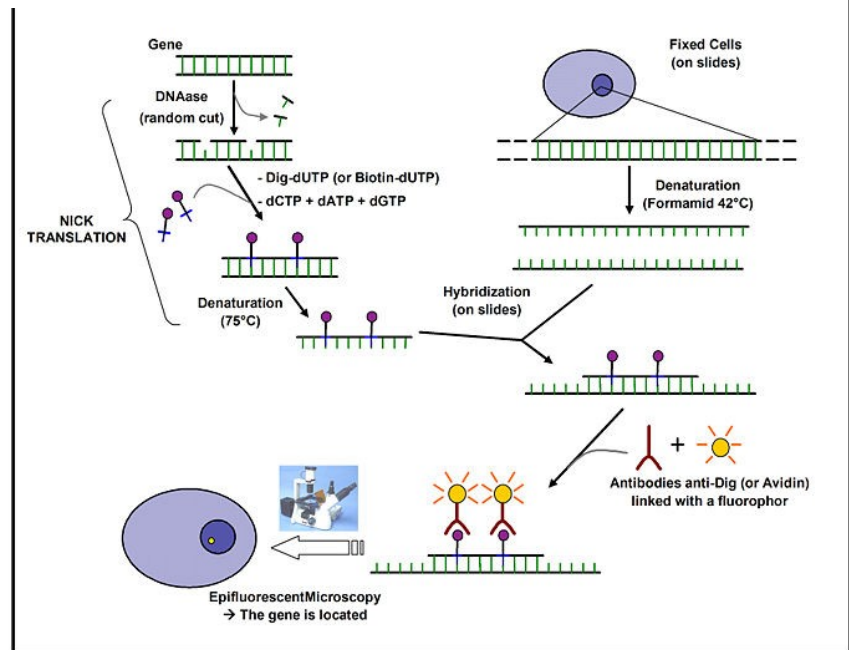
**vizualizace:** protilátky specifické pro biotin (avidin, streptavidin), které jsou konjugovány buď s fluorochromem (např. fluorescein izothiokyanát, FITC), nebo s enzymatickými činidly (např. alkalinfosfatáza, peroxidáza), reakce se specifickým substrátem

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**“

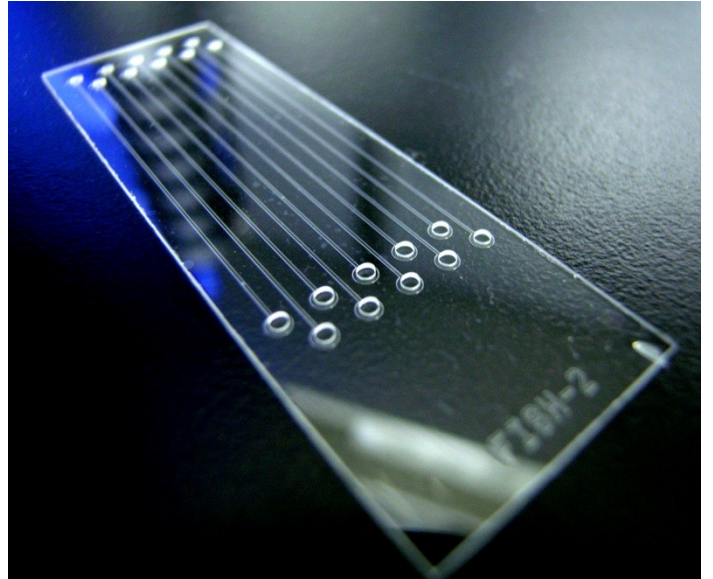
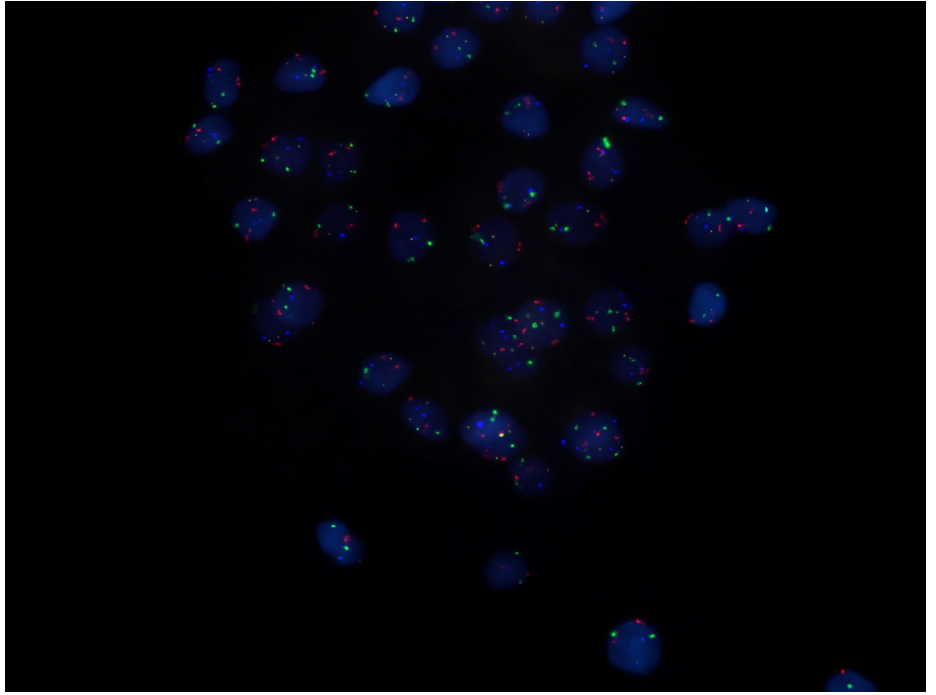
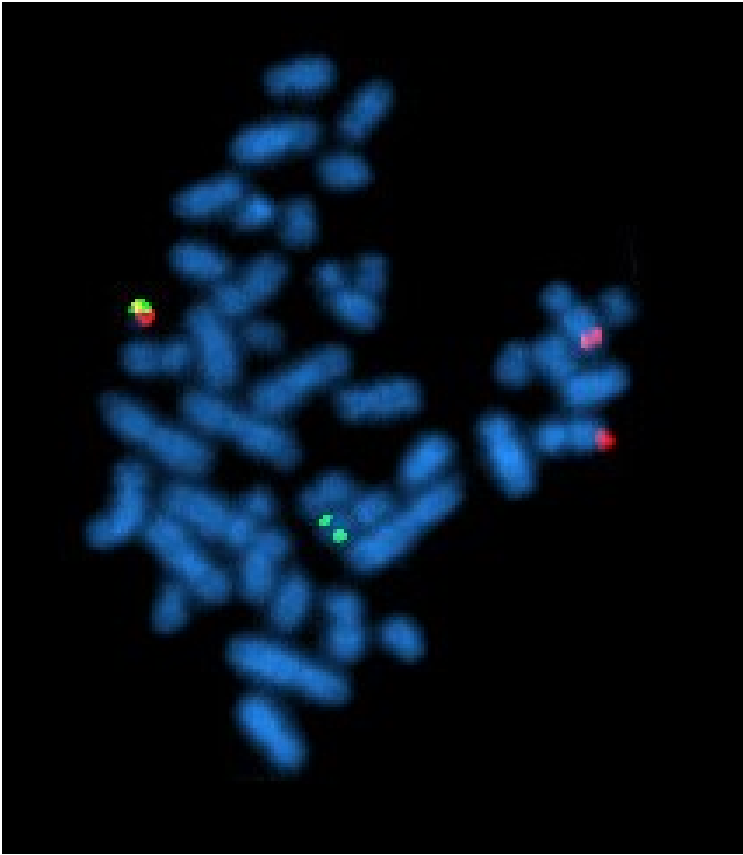
# Fluorescence In Situ Hybridization



## FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)







# Mikrodisekce

