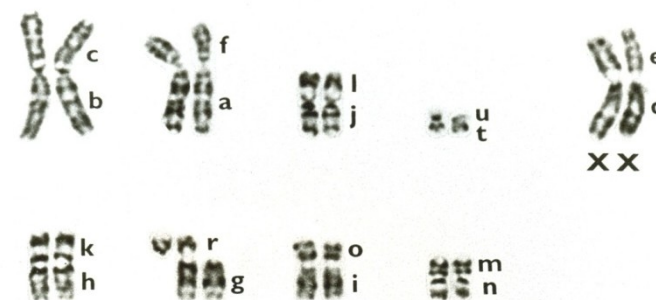
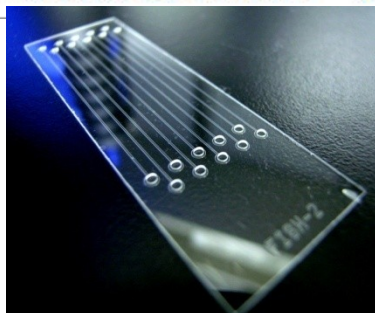
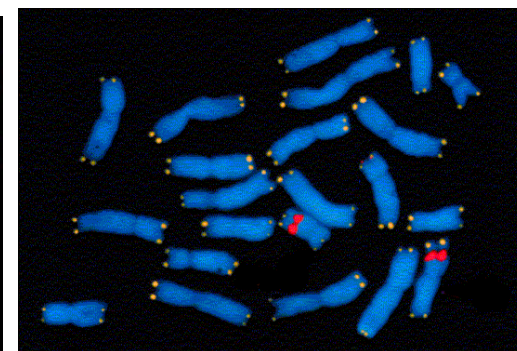
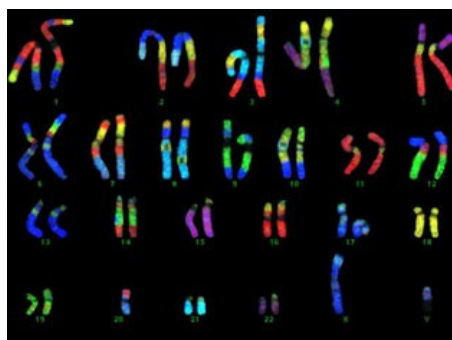
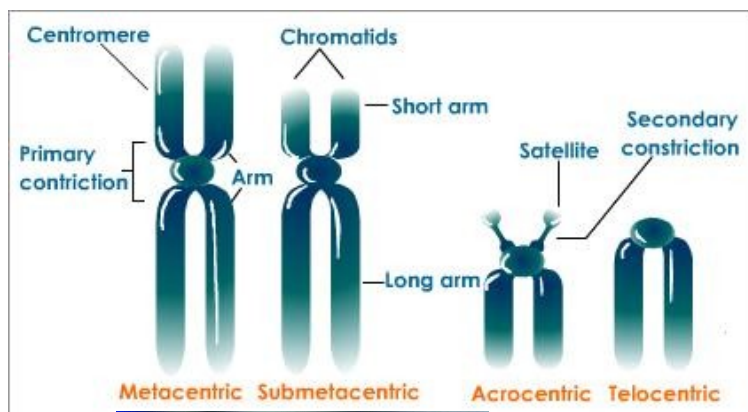
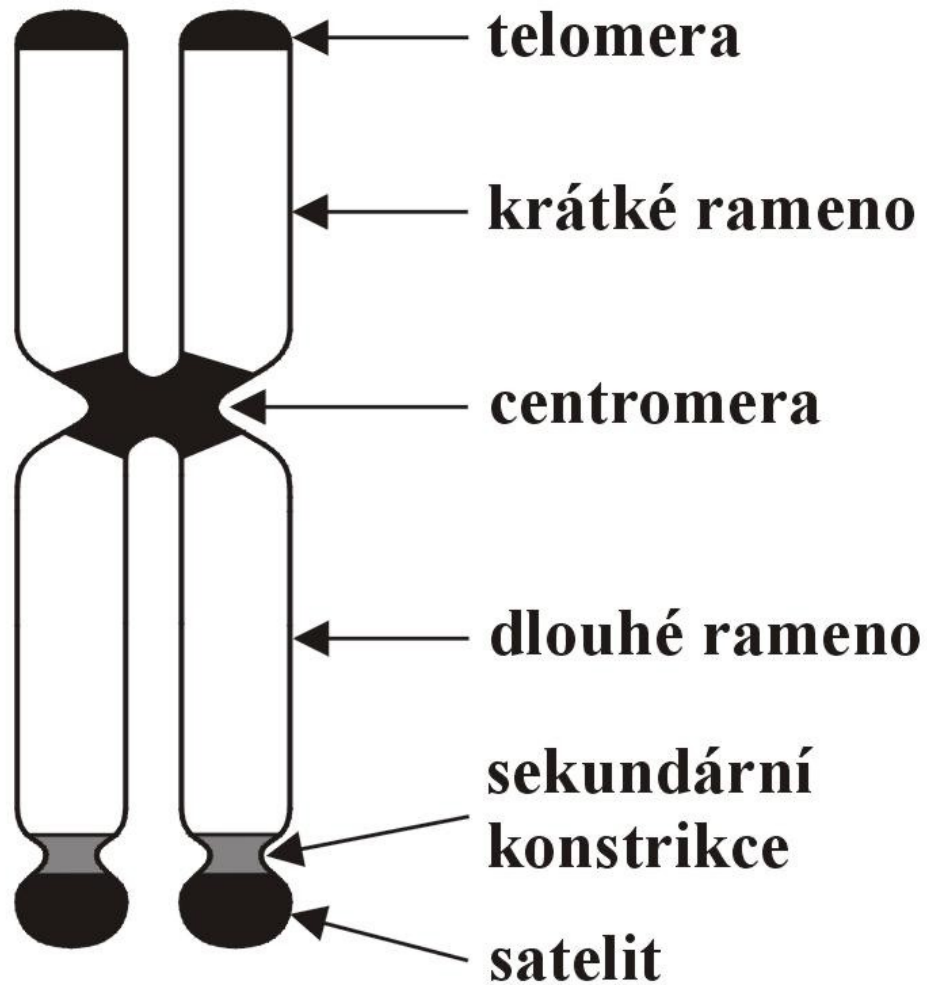


CYTOGENETICKÉ METODY



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:

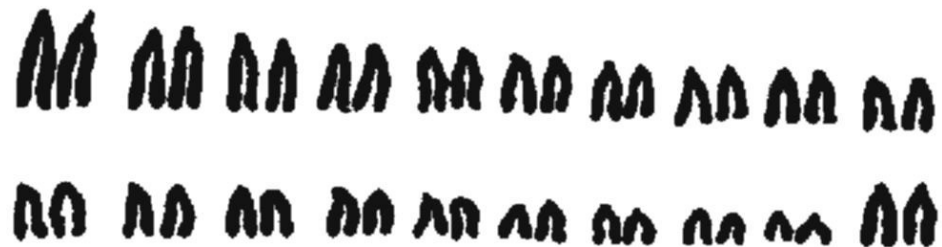
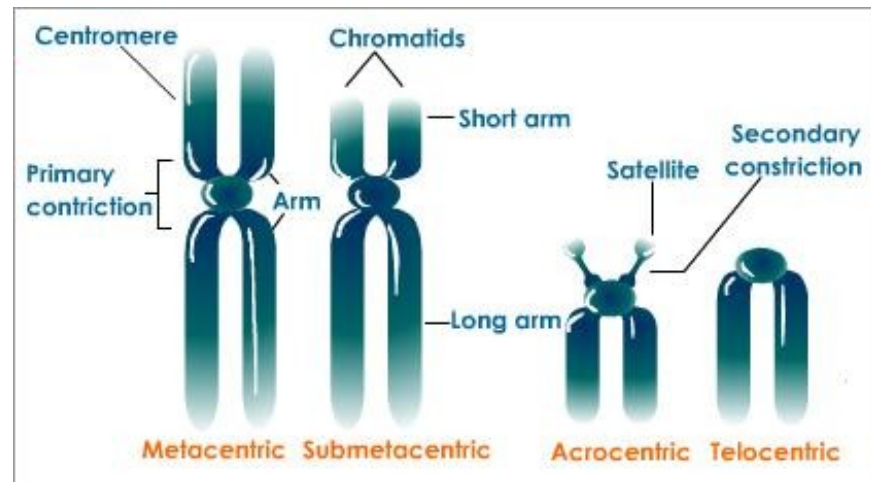
metacentrický

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

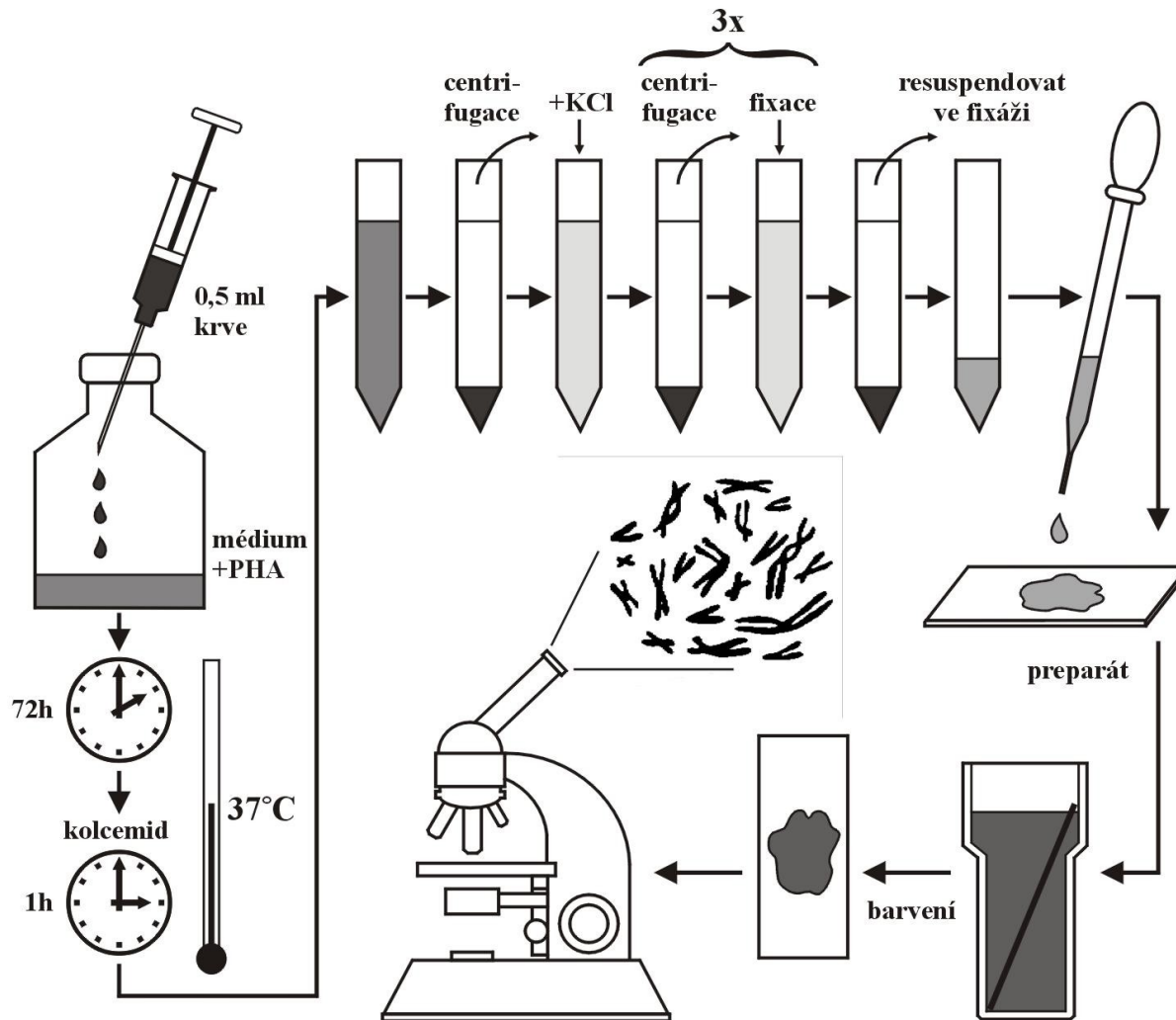
5. Zhotovení preparátu

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

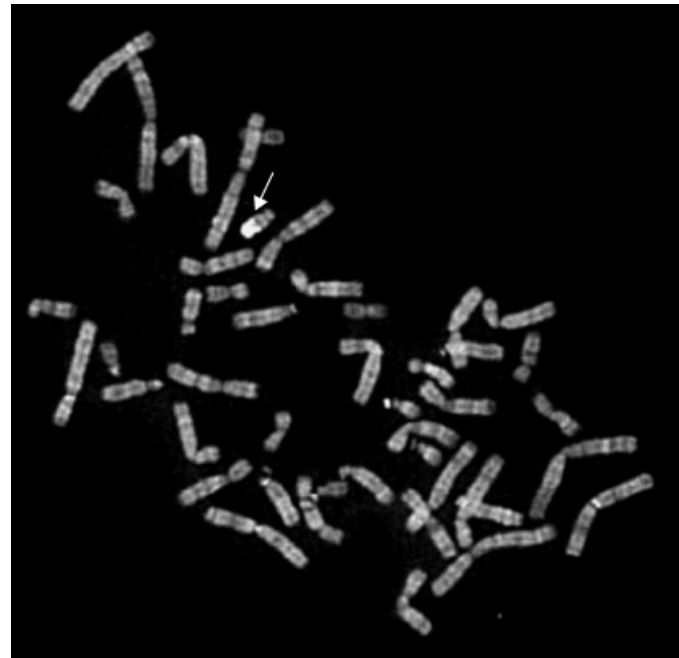
průběh meiózy a význam jednotlivých stadií;
synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush)
chromozomy

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):

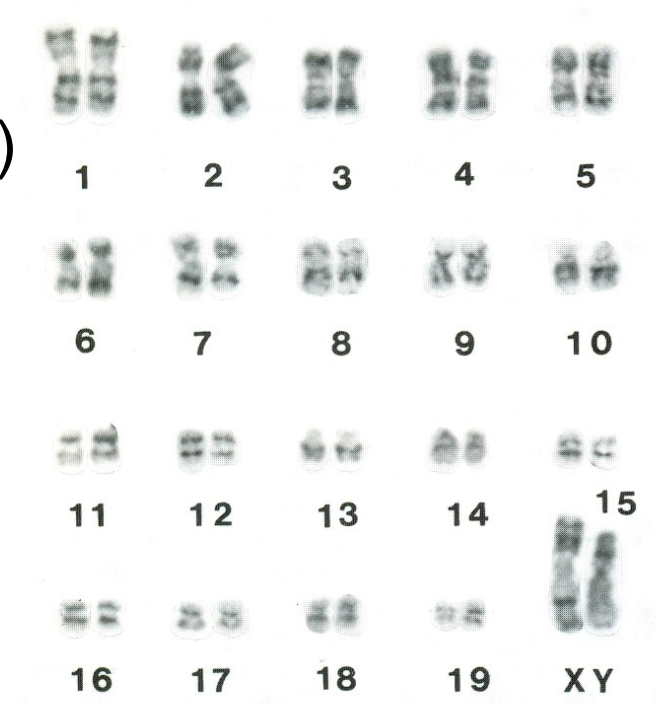
účinek denaturačních činidel na stabilitu proteinových a nukleových složek chromatinu

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



Proužkování chromozomů („banding“)

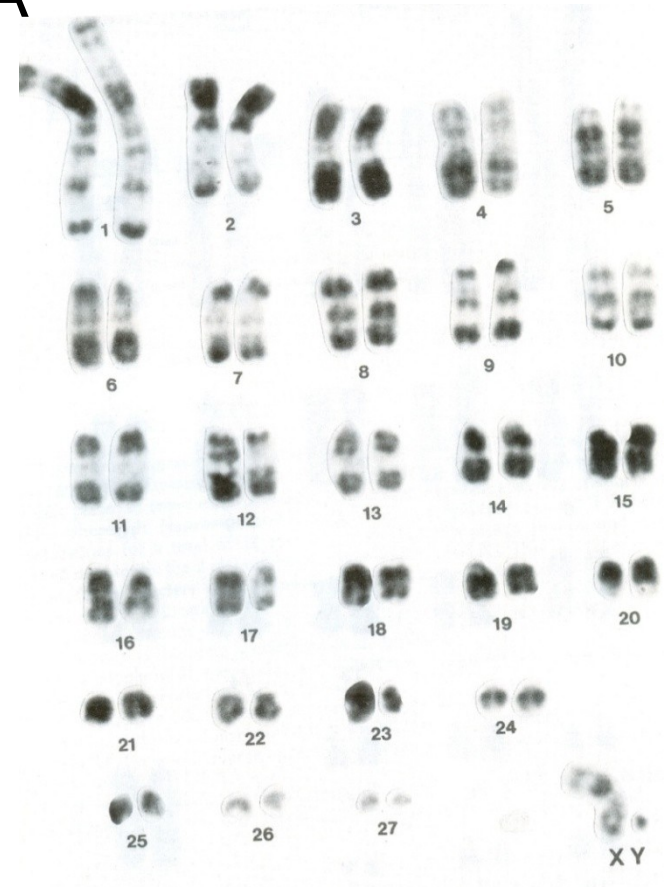
R-proužkování (reverse banding):

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“)

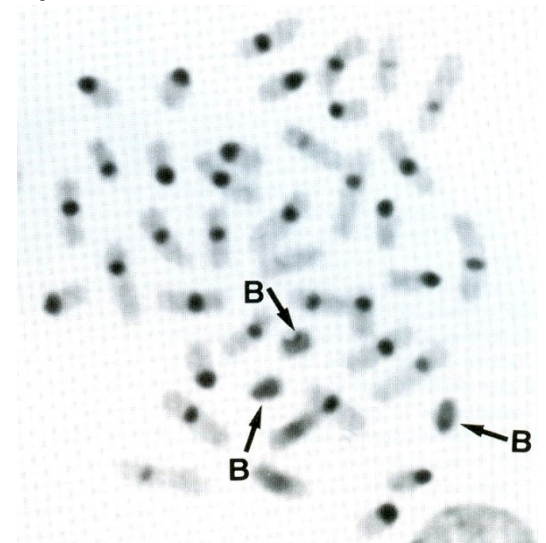
C-proužkování (constitutive heterochromatin):

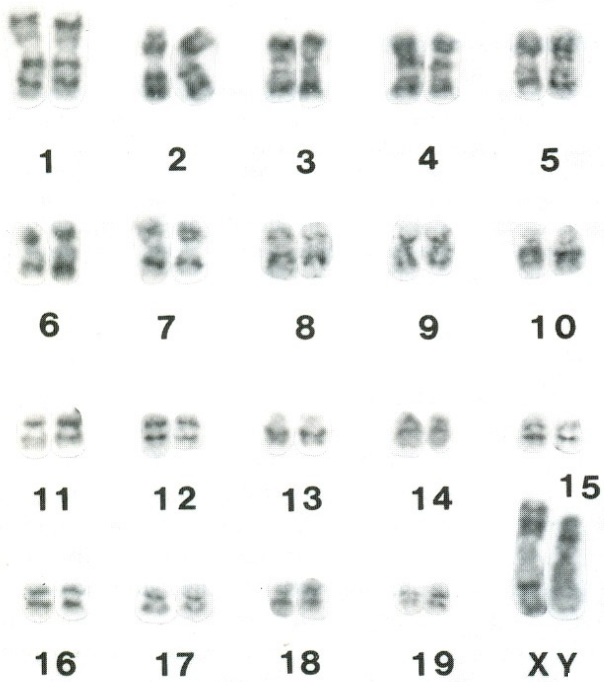
postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a renaturaci heterochromatinu v solném pufu ($2\times\text{SSC}$) za vysoké teploty (60°C)

rozpuštění euchromatinu

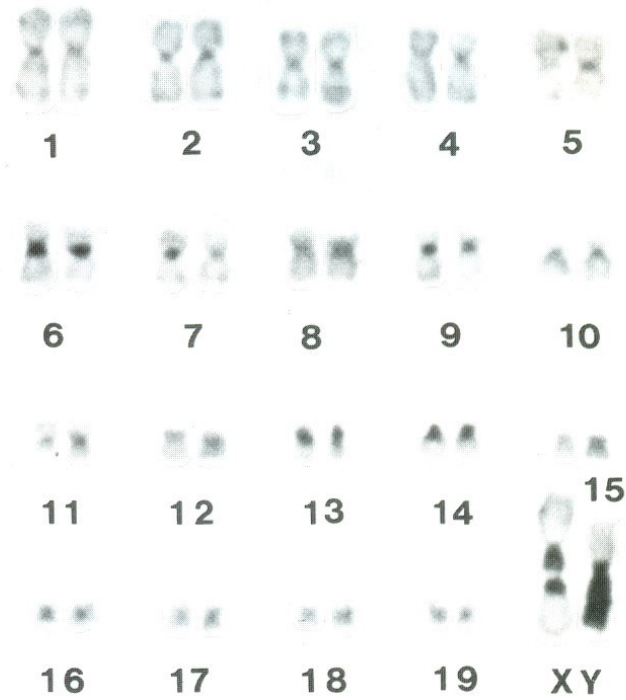
barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)

psík mývalovitý
(*Nyctereutes procyonides*)

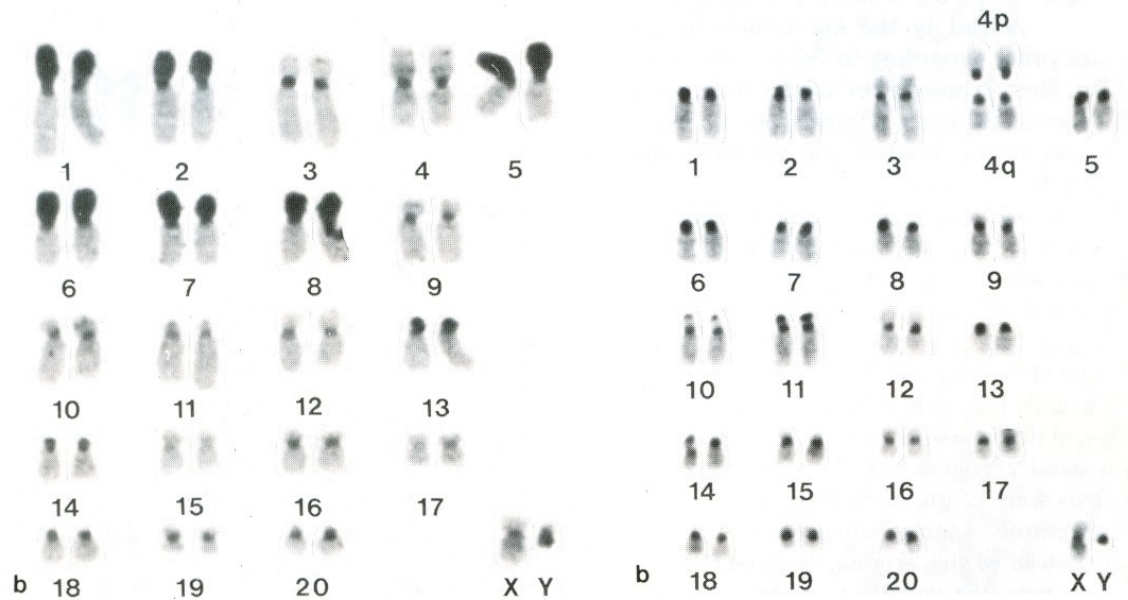




rypoš obří
(*Fukomys mehowi*)



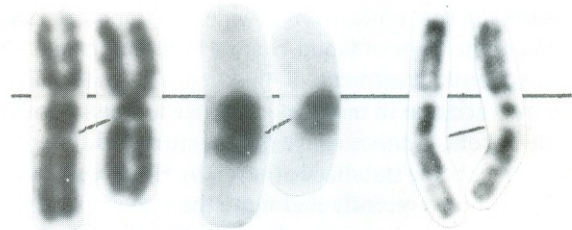
kolčava a hranostaj



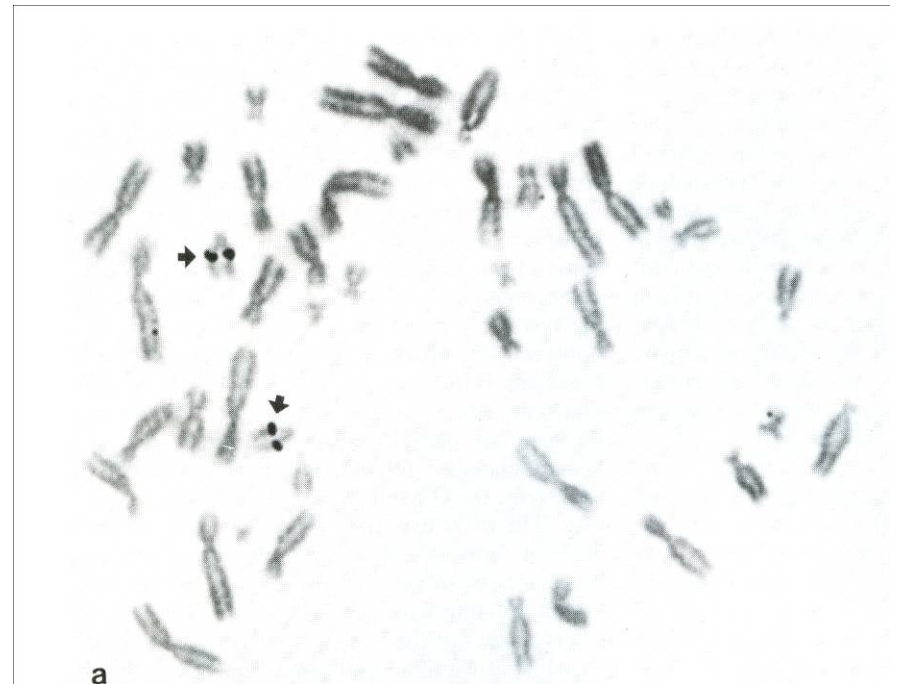
Proužkování chromozomů („banding“)

Ag-NOR:

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



rypoš obří
(*Fukomys mechowii*)

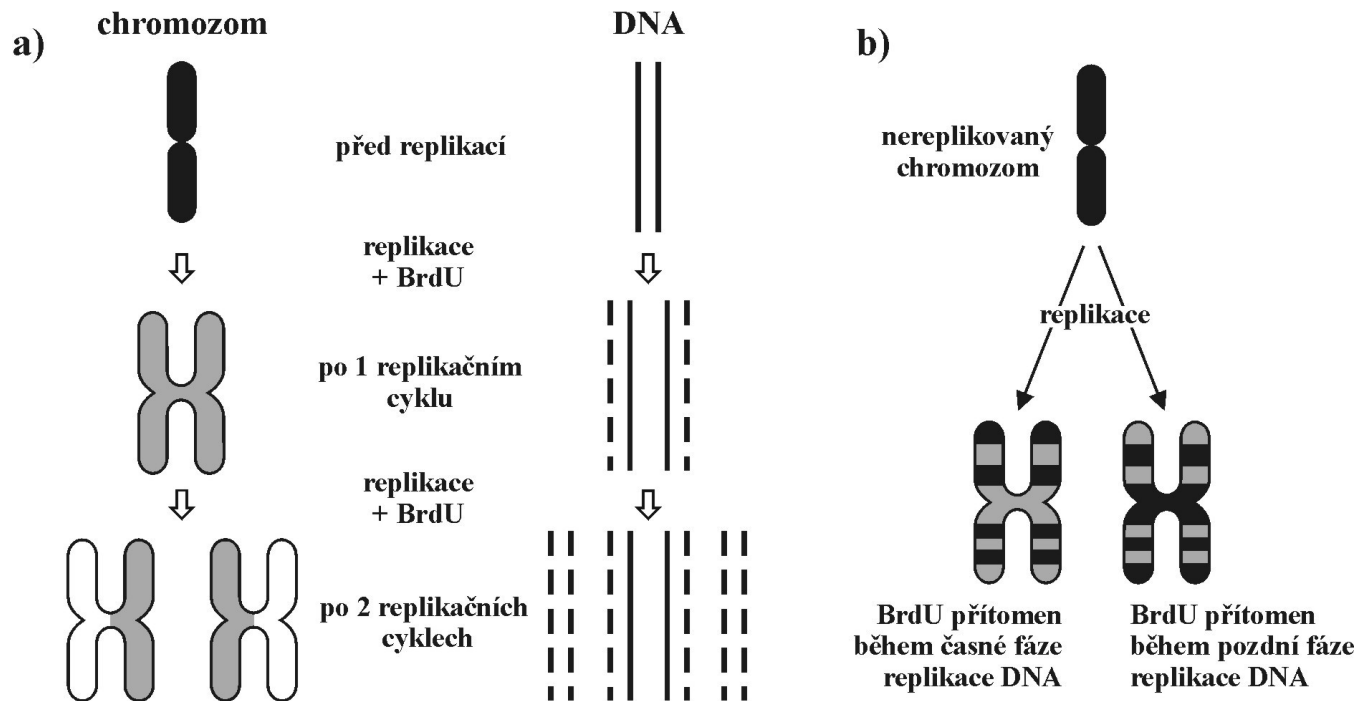


kolčava

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 suppression hybridization

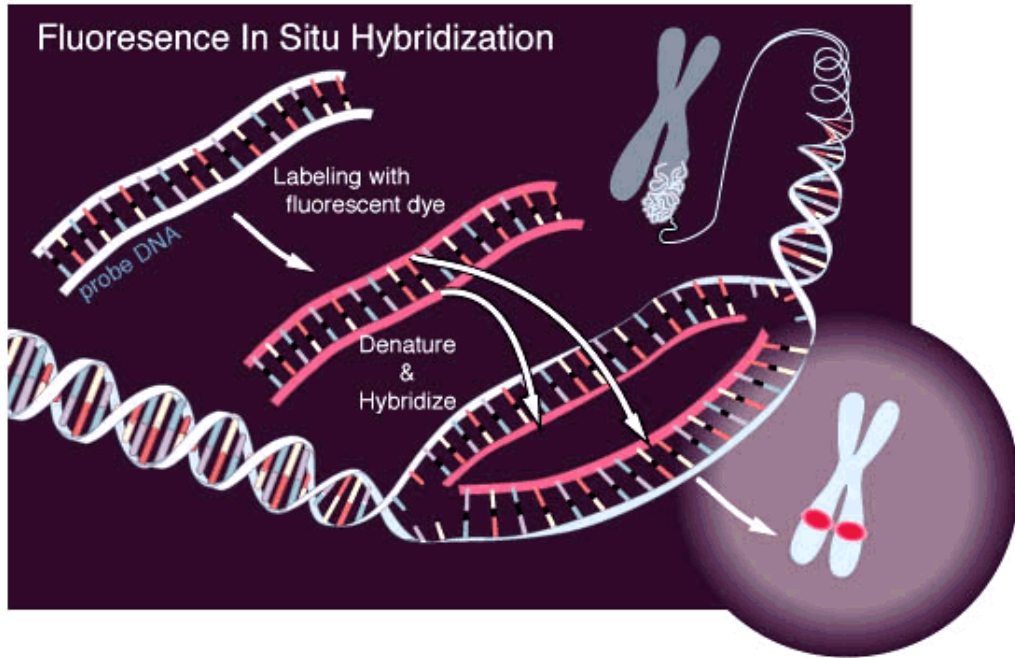
PRINS, primed *in situ* labelling

GISH, whole genome in situ hybridization

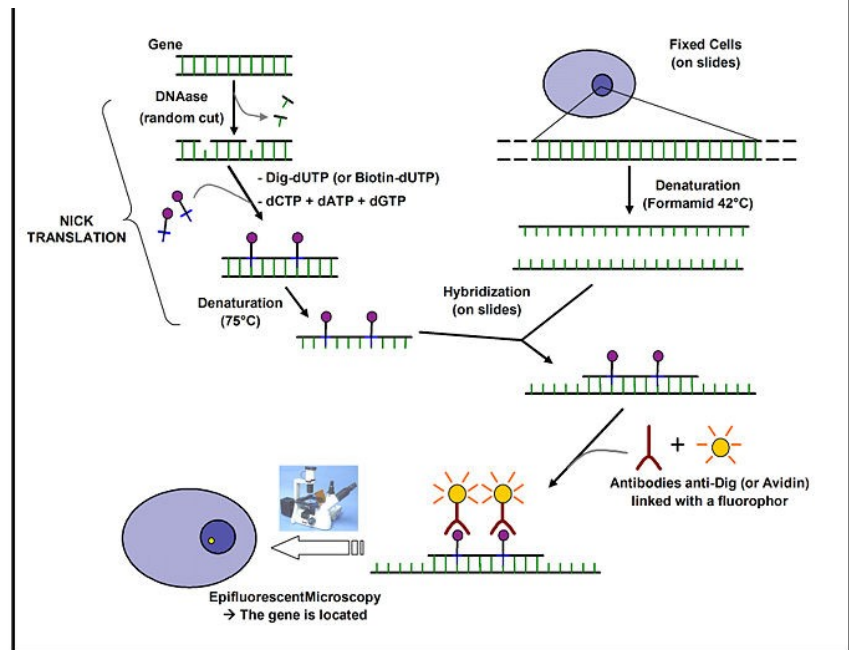
FACS, fluorescence activated cell sorting

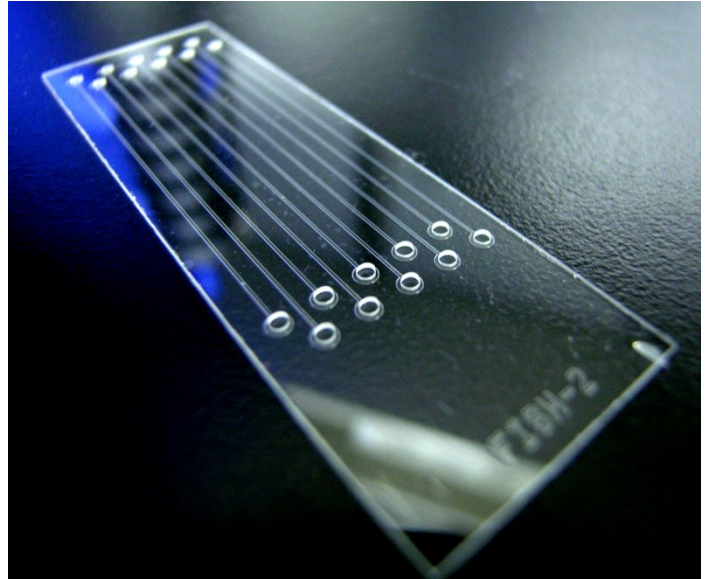
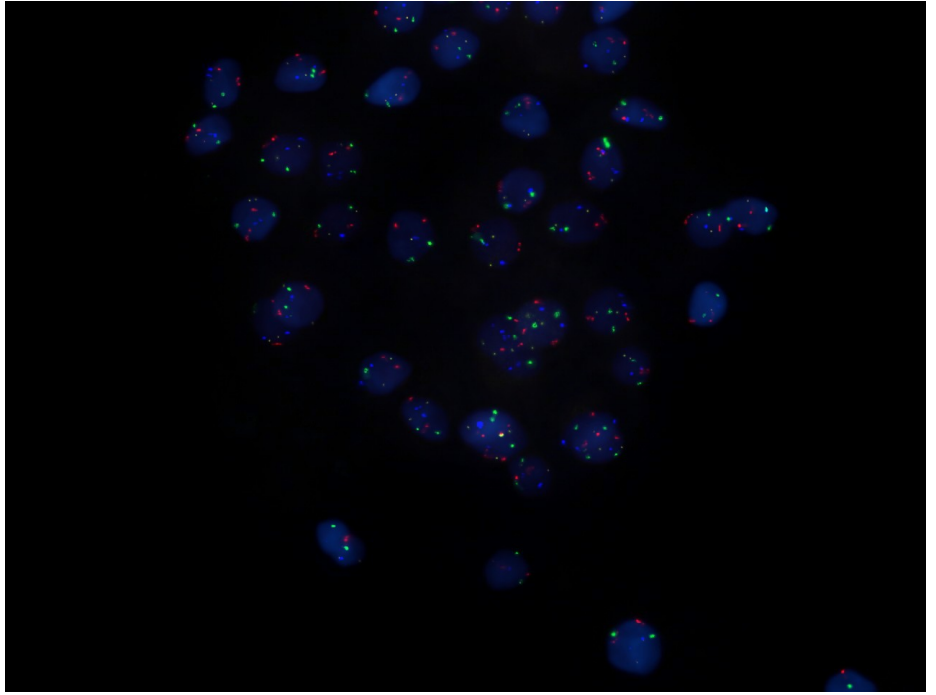
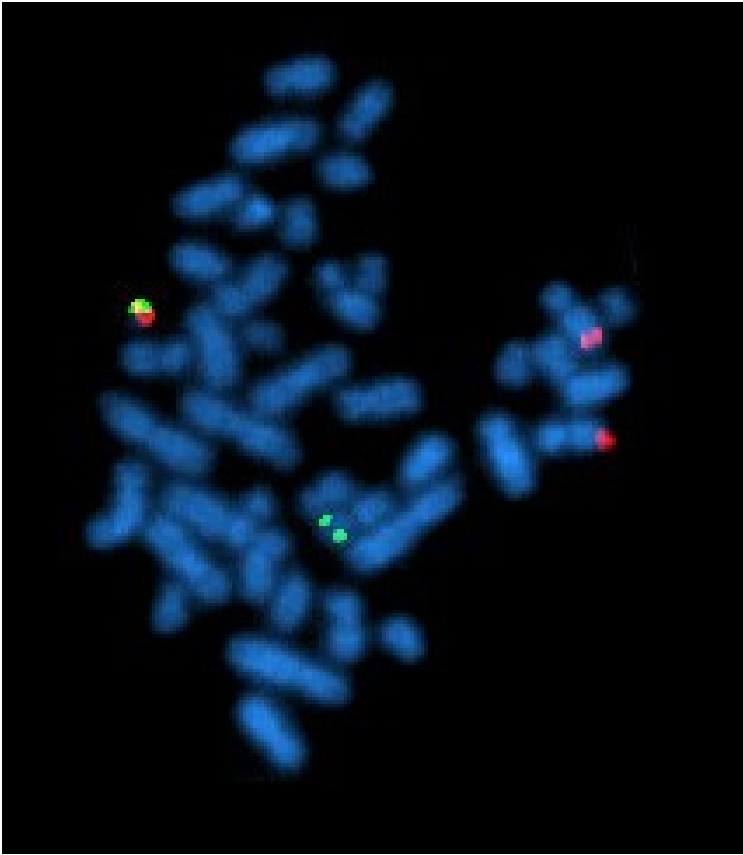
vybarvování chromozomů = „chromosome painting“

Fluorescence In Situ Hybridization



FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)





Mikrodisekce

