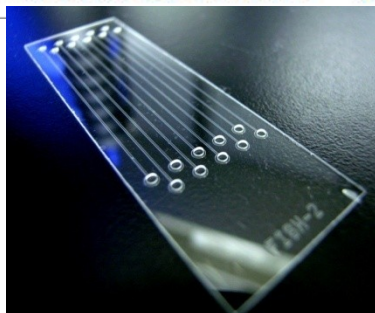
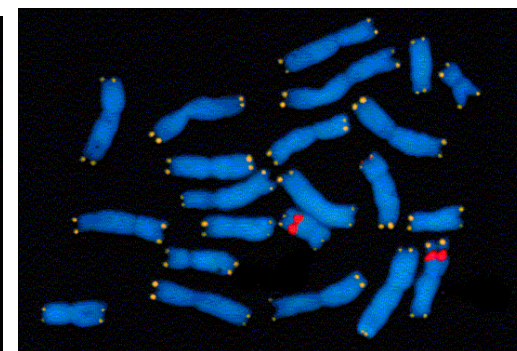
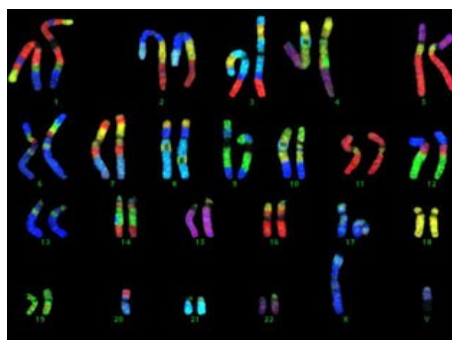
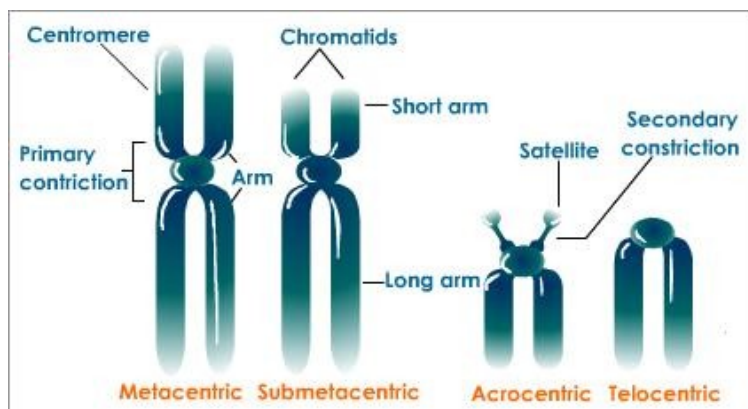
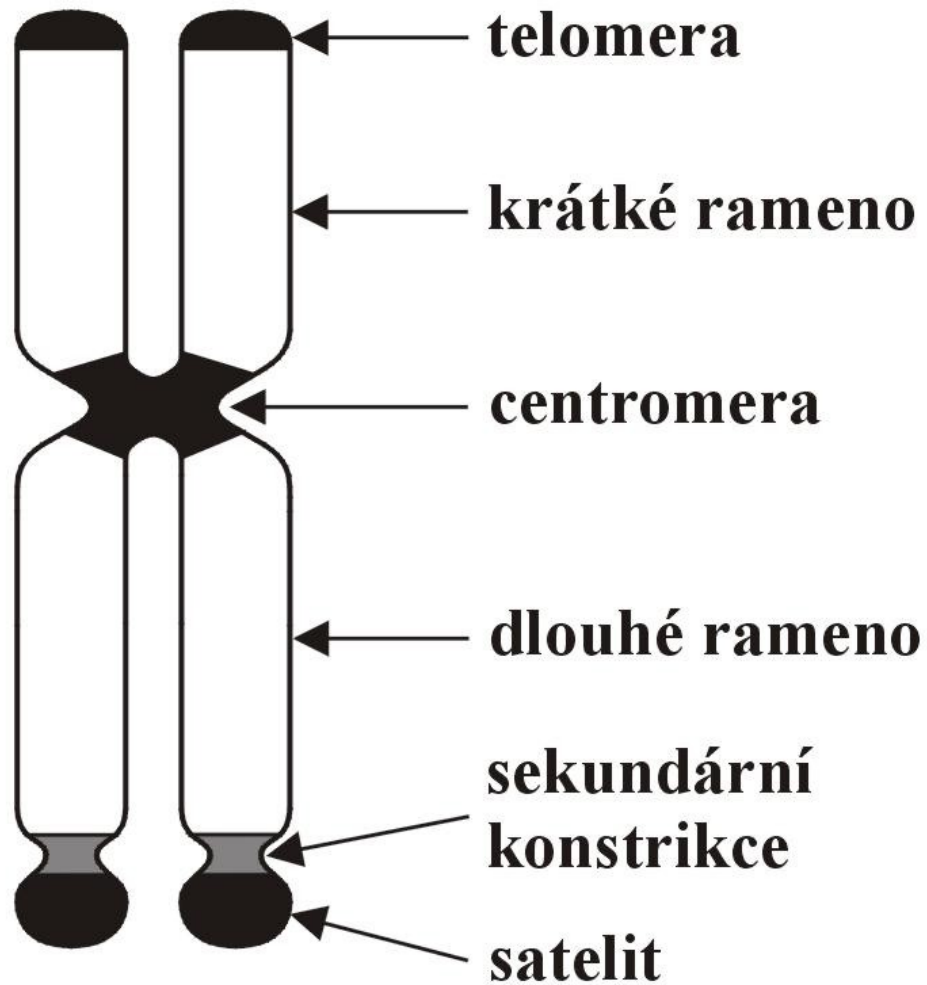


# CYTOGENETICKÉ METODY



analýza mikroskopické struktury chromozomů  
pojem „chromosom“ – 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:

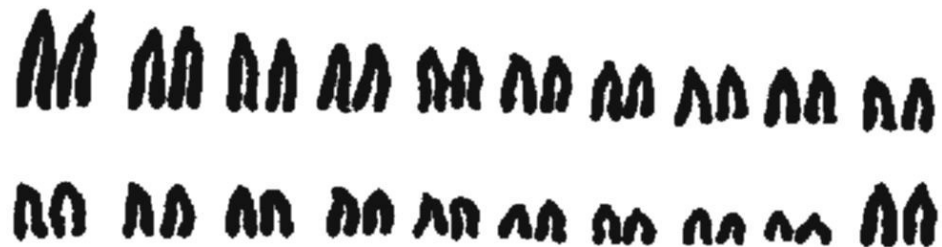
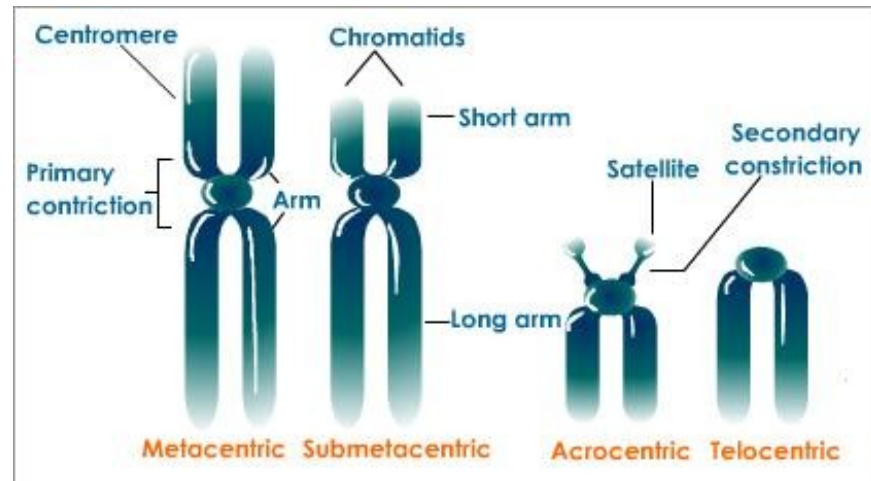
metacentrický

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

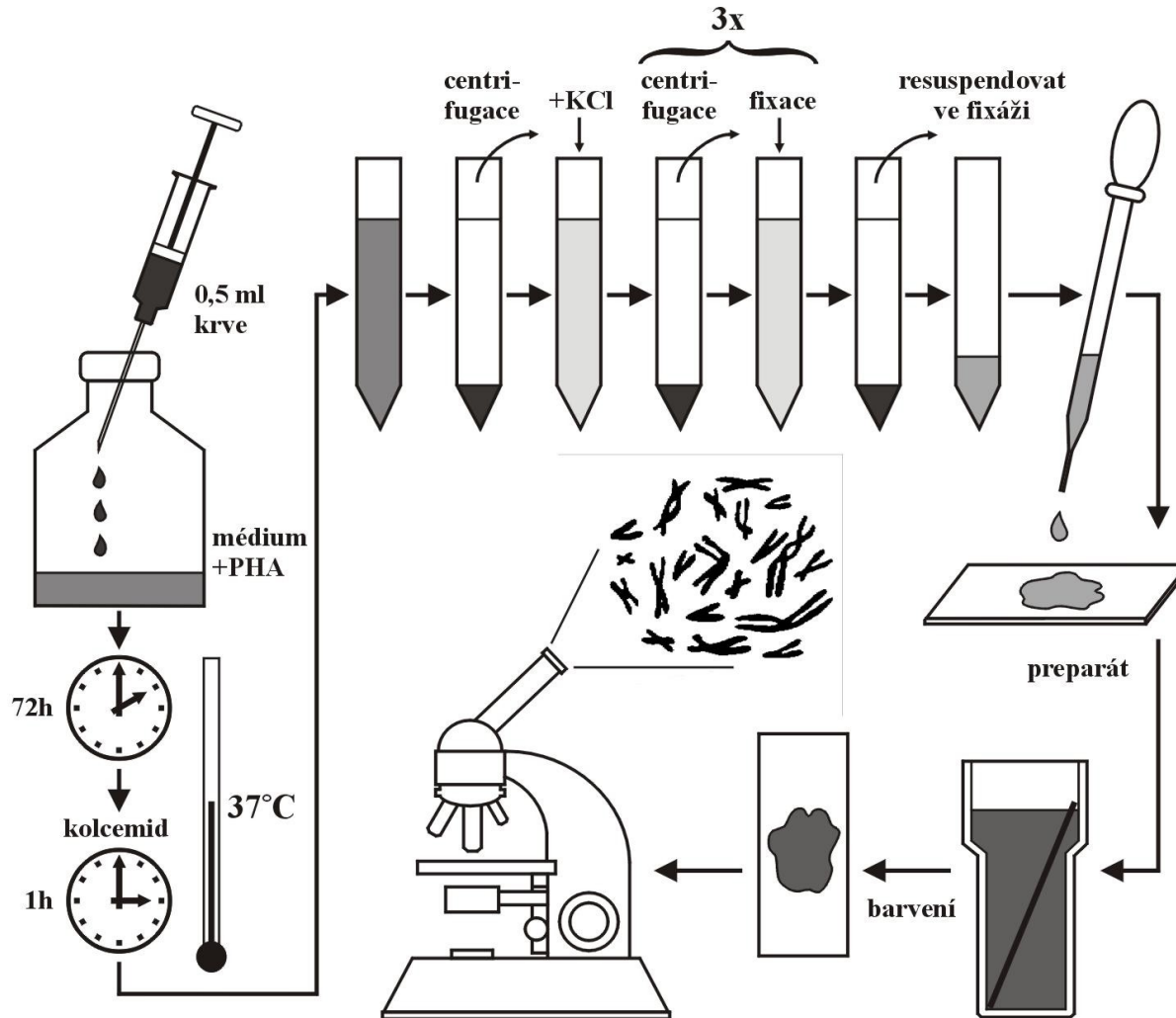
## 5. Zhotovení preparátu

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

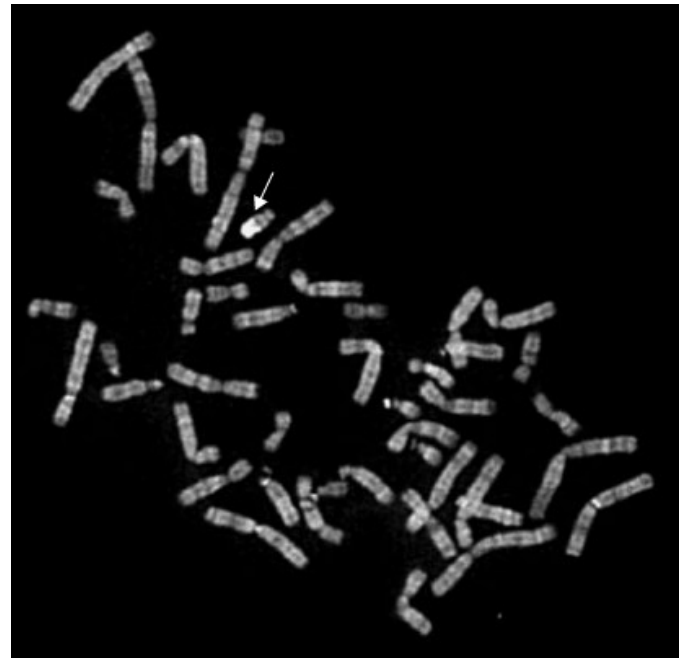
průběh meiózy a význam jednotlivých stadií;  
synaptonemální komplexy (SC), štětkovité (lampbrush)  
chromozomy

# 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*)

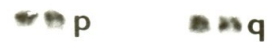


A



rejsek obecný  
(*Sorex araneus*)

B





# Proužkování chromozomů („banding“)

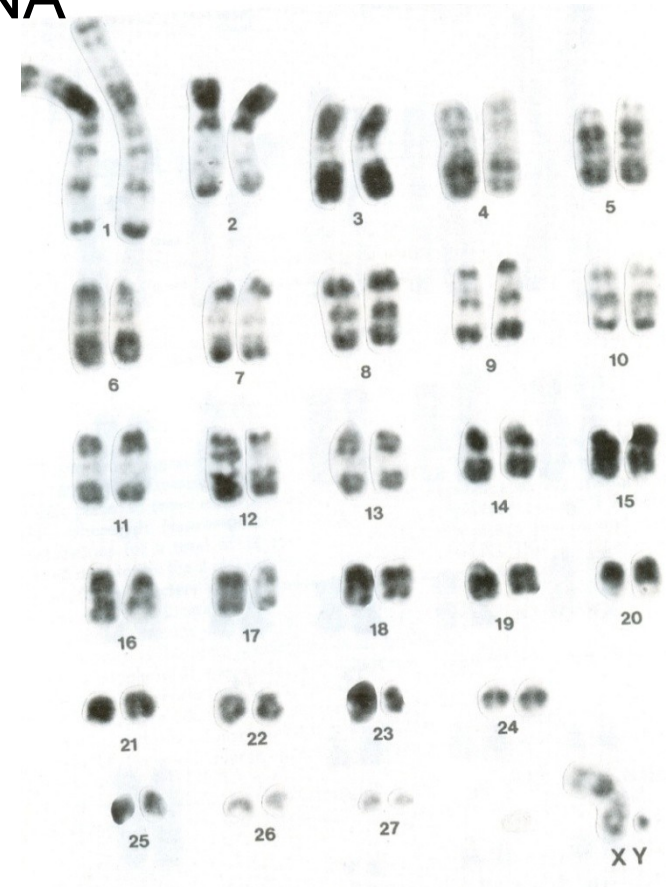
R-proužkování (*reverse banding*):

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“)

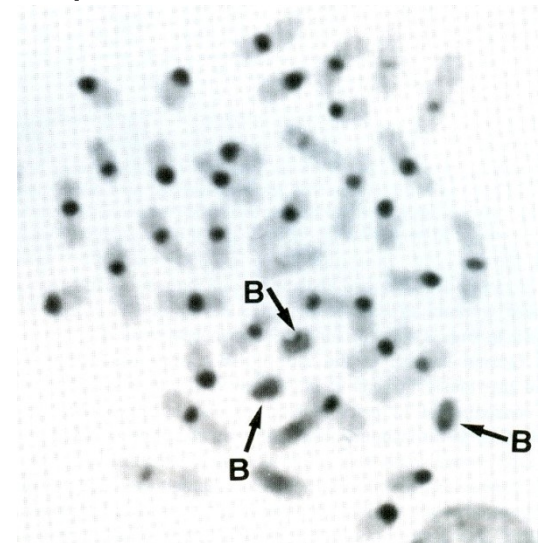
## C-proužkování (*constitutive heterochromatin*):

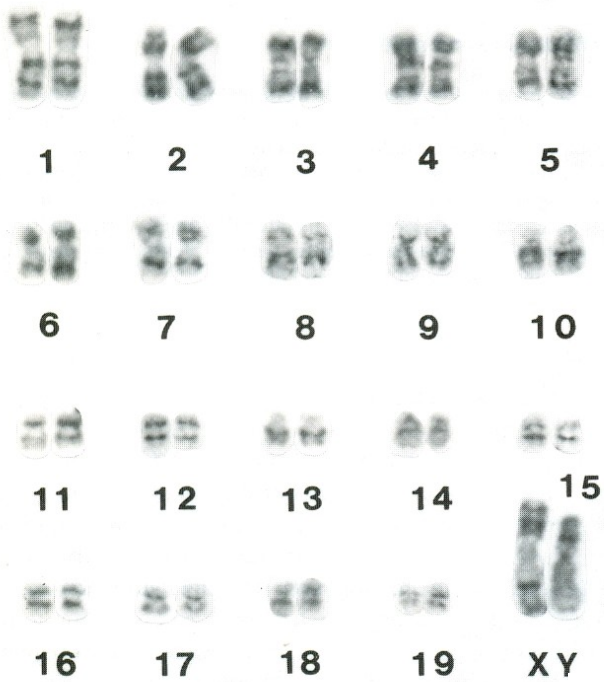
postupné působení silné kyseliny (1M HCl) a zásady (Ba(OH)<sub>2</sub>) a renaturaci heterochromatinu v solném pufu (2×SSC) za vysoké teploty (60°C)

rozpuštění euchromatinu

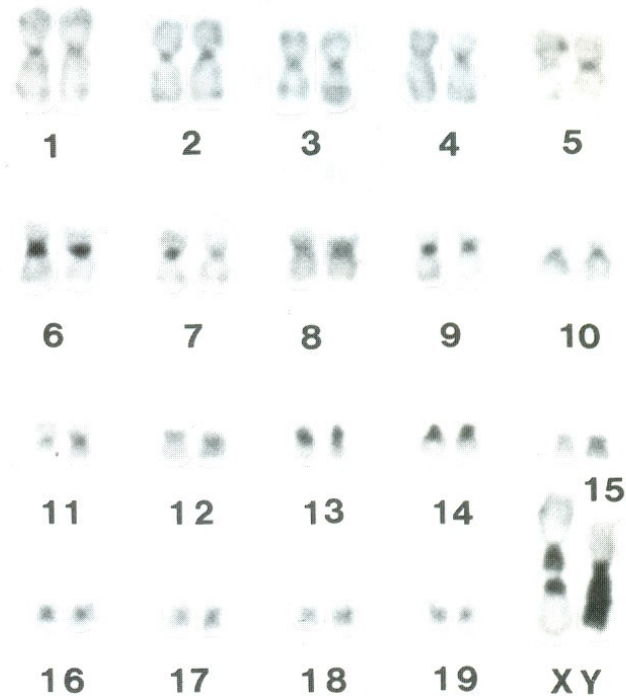
barvení Giemsou (vizualizace satelitní DNA)

psík mývalovitý  
(*Nyctereutes procyonides*)

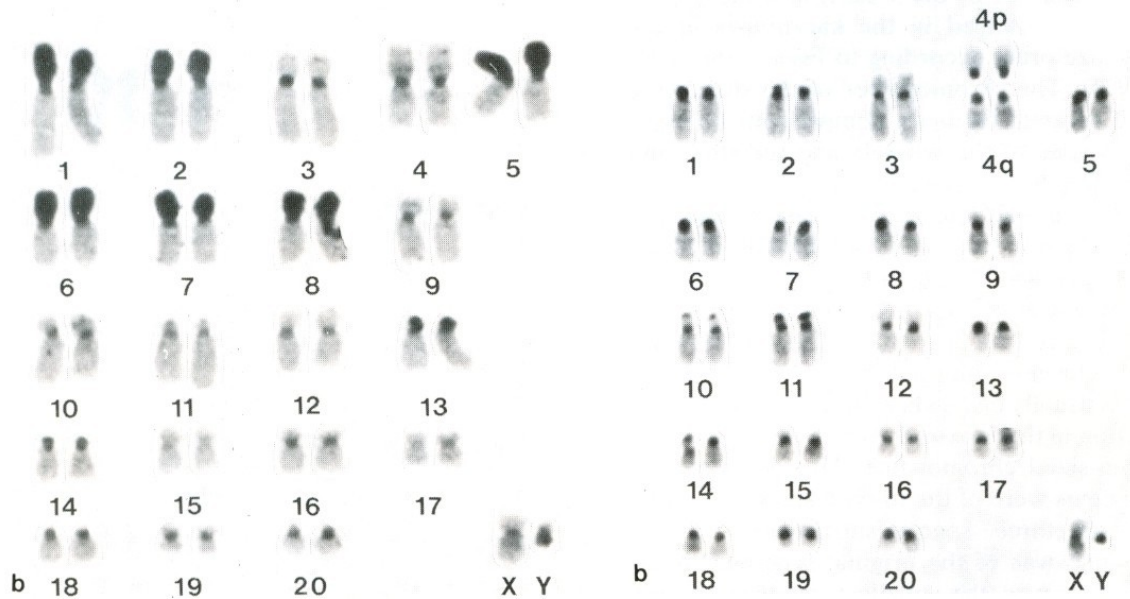




rypoš obří  
(*Fukomys mehowi*)



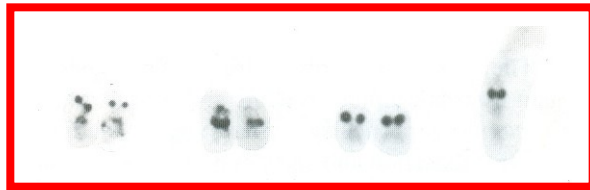
kolčava a hranostaj



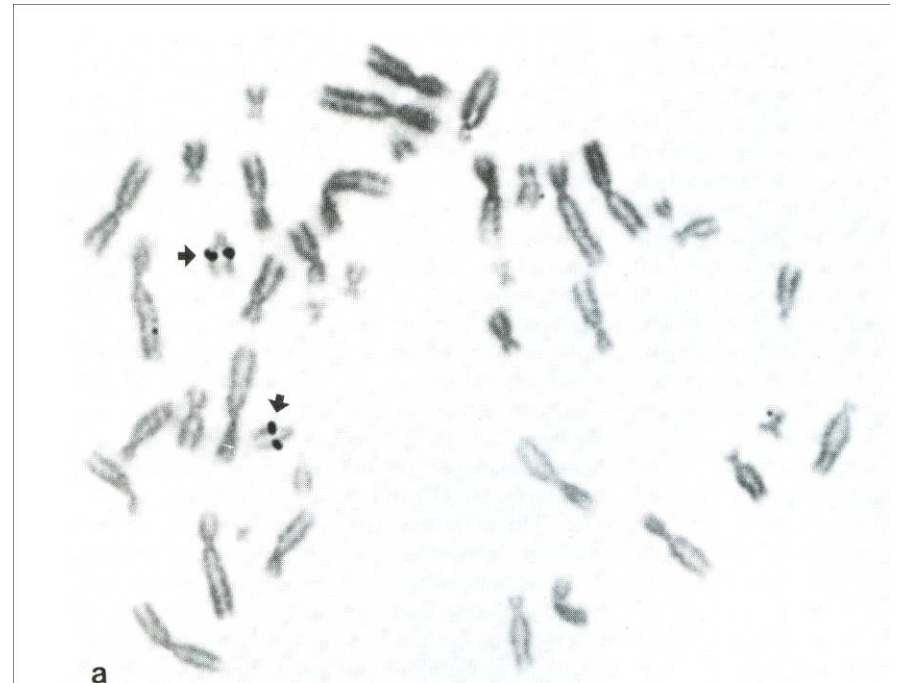
# Proužkování chromozomů („banding“)

Ag-NOR:

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



rypoš obří  
(*Fukomys mechowi*)

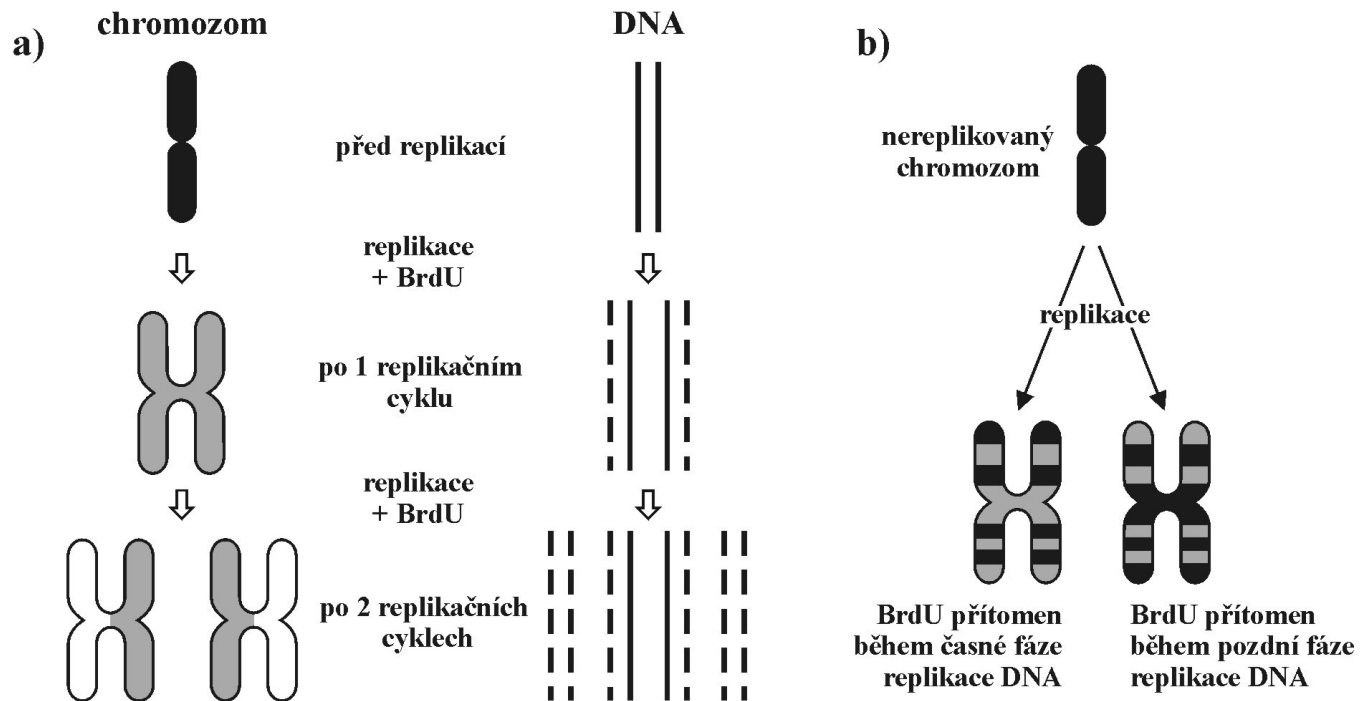


kolčava

# 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

# Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

CISS, chromosome in situ suppression hybridization

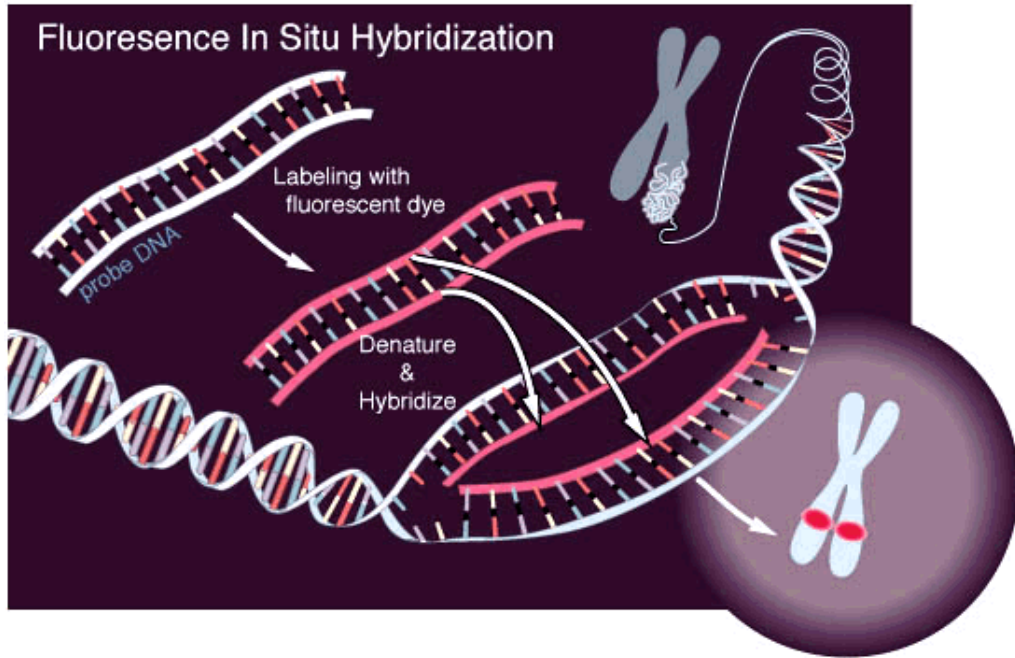
PRINS, primed *in situ* labelling

GISH, whole genome in situ hybridization

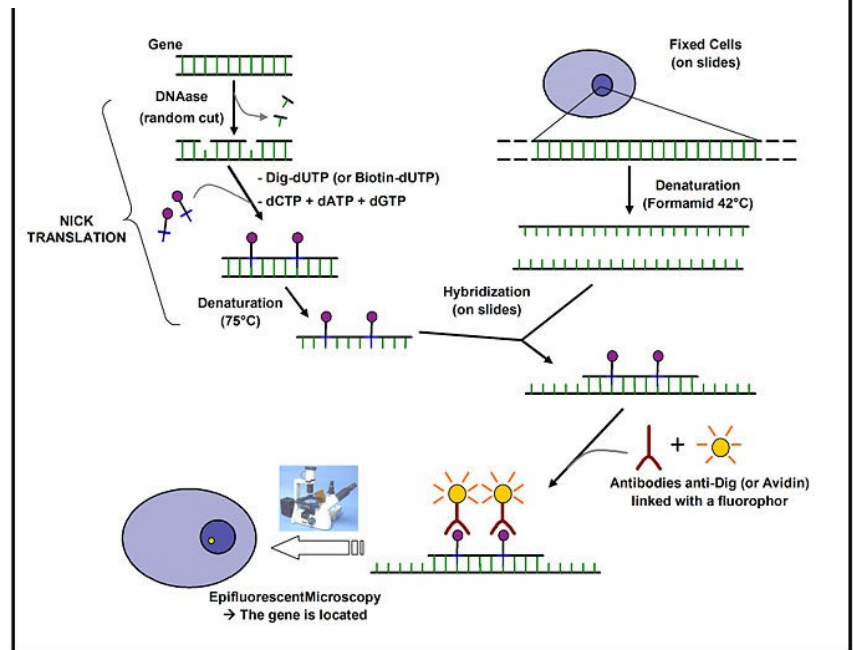
FACS, fluorescence activated cell sorting

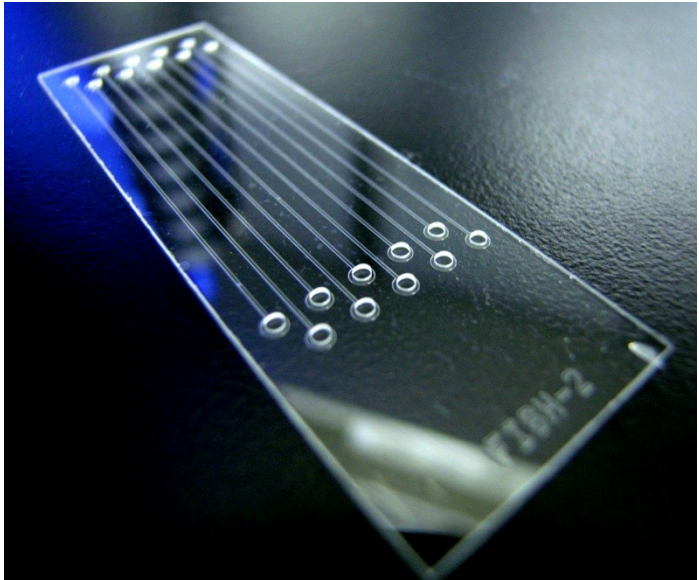
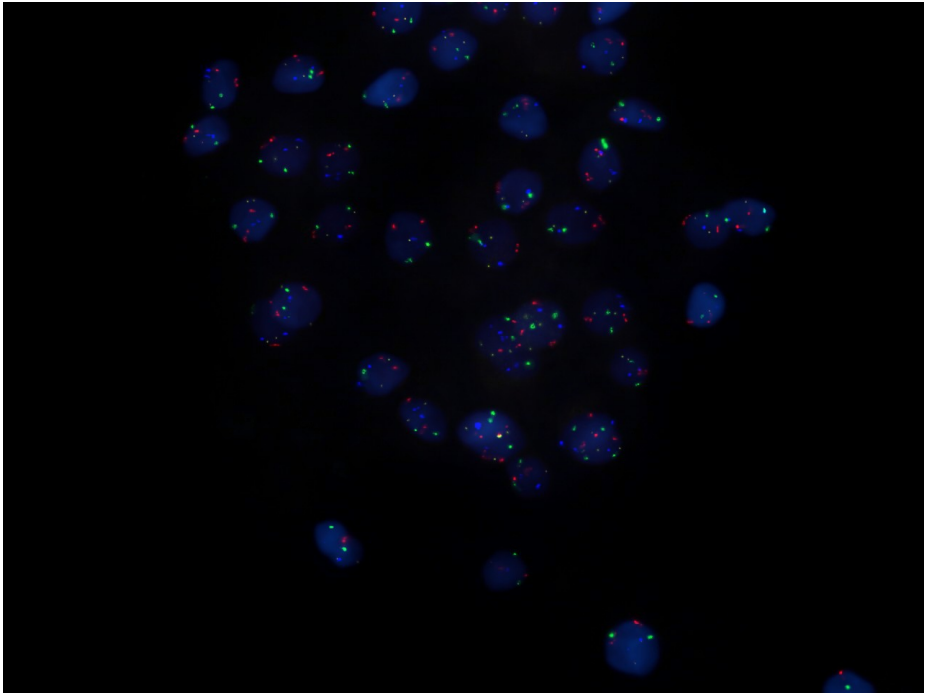
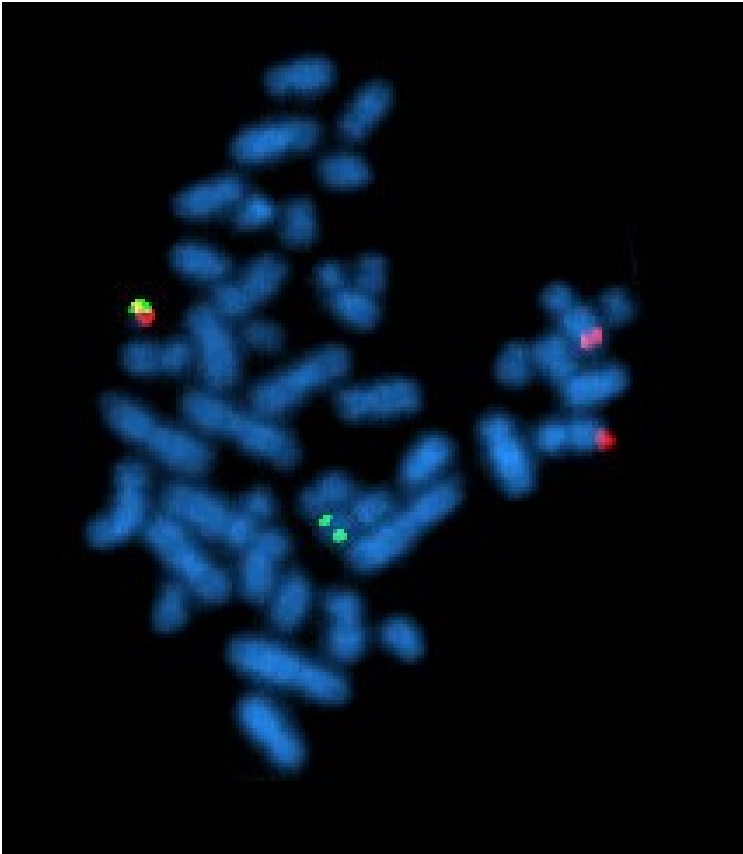
vybarvování chromozomů = „chromosome painting“

# Fluorescence In Situ Hybridization



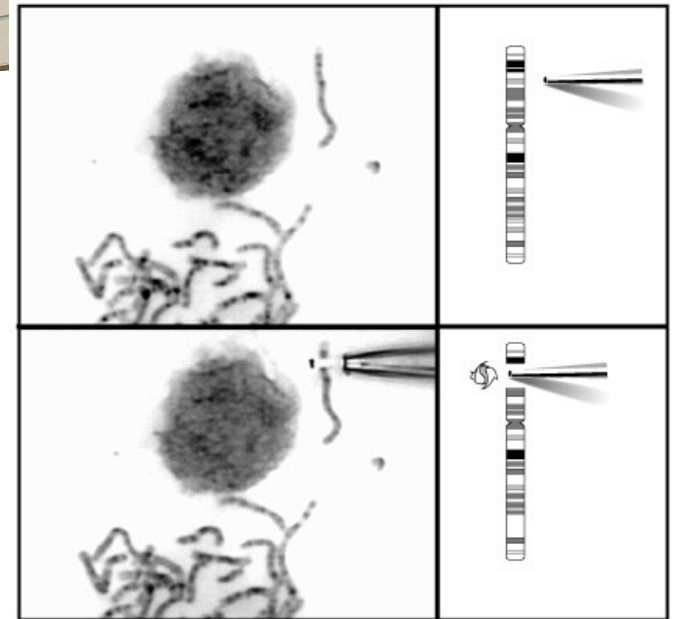
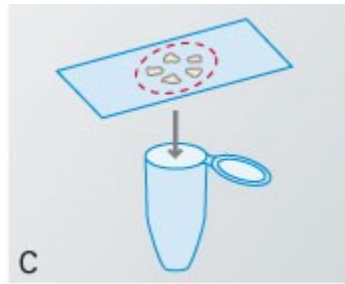
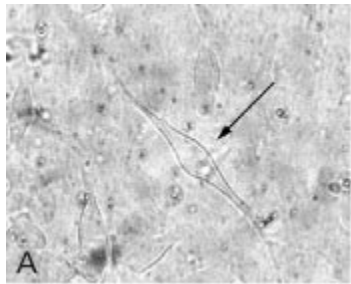
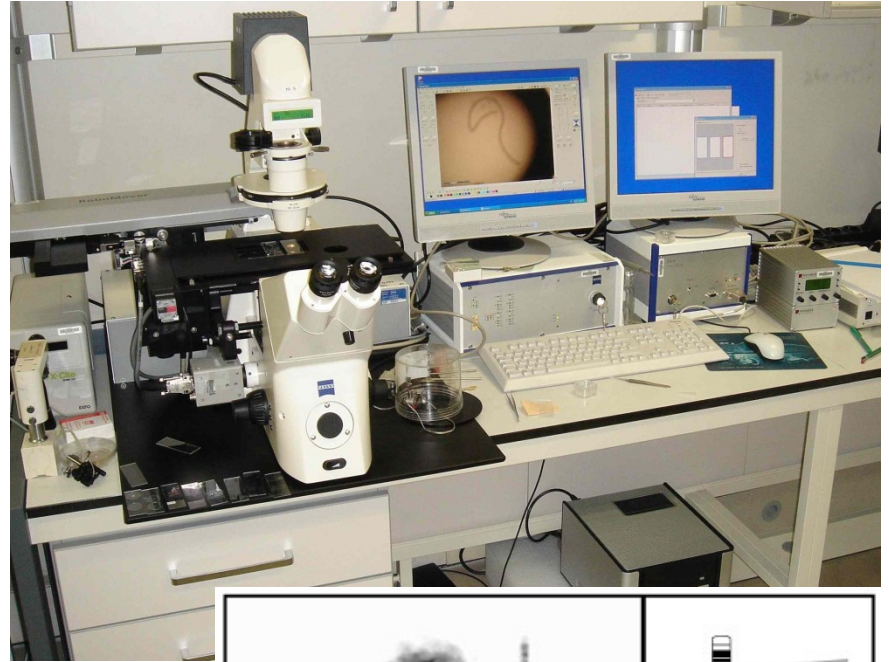
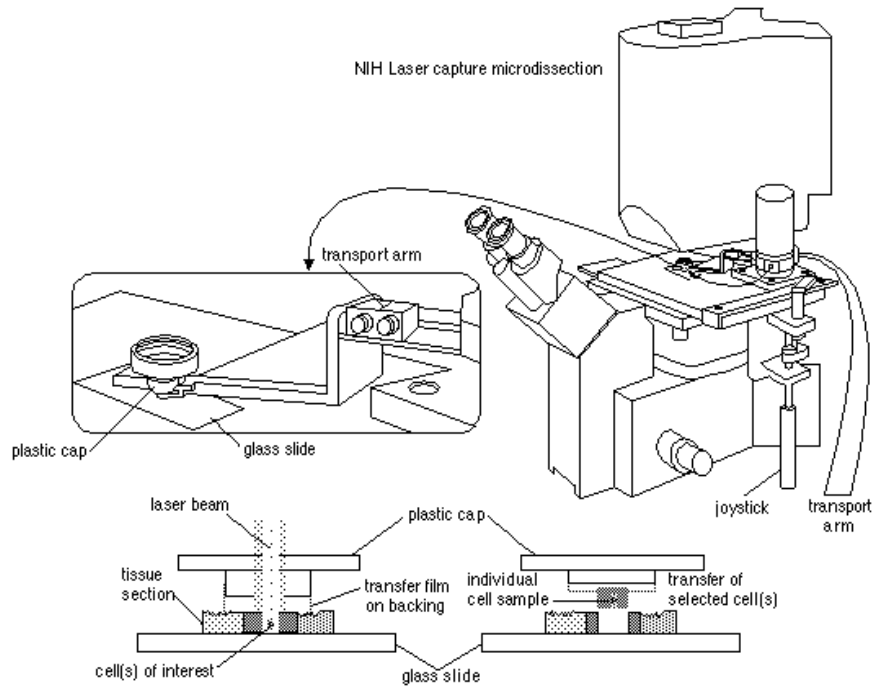
## FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)





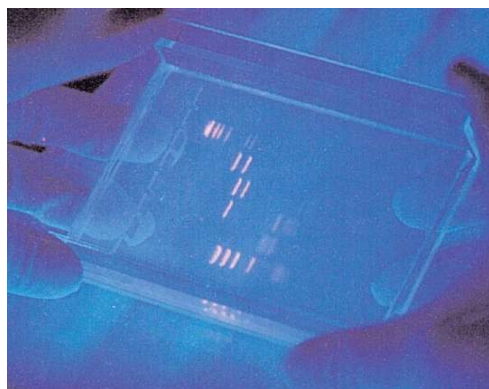
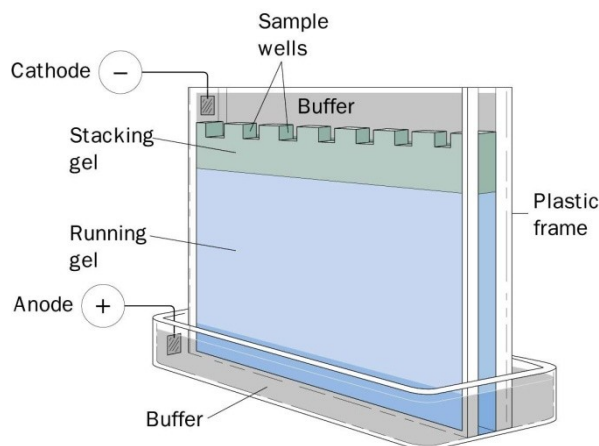


# Mikrodisekce



# ELEKTROFORÉZA

## enzymů a neenzymatických bílkovin



**elektroforéza:** z řečtiny = transport pomocí elektřiny  
obecně = pohyb nabitých částic v médiu vlivem el. pole

do konce 50. let genetická proměnlivost v populacích  
studována pouze na základě mendelovských  
morfológických znaků nebo polytenních chromozomů →  
otázka, do jaké míry tyto jevy reprezentují skutečnou míru  
genetické proměnlivosti v přírodě

substituce aminokyselin můžeme zjistit sekvenováním –  
pokud to není možné, lze nahradit elektroforézou proteinů

z 20 AA 3 nesou kladný náboj (Arg, Lys, His), 2 záporný náboj (Asp, Glu)

kromě náboje i velikost a konformace makromolekuly (-S-S-  
můstky, van der Waalsovy síly, vodíkové vazby,  
elektrostatické síly); pH pufru

stabilizace el. náboje → specifický pufr s vysokou iontovou  
silou a pH co nerozdílnější od pI daného proteinu: pH 3-  
10, nejčastěji 6,5-9,5

náboj většiny proteinů při pH 8-9 záporný → migrace k  
anodě

Princip ELFO znám již od konce 19. stol.

1937 - Thisselius: metoda „pohyblivého rozhraní“

1949 - Linus Pauling: papírový nosič - abnormální Hb srpkovité anémie

1955 - O. Smithies: škrob

1957 - Hunter a Moeller: užití katalytických schopností enzymů (histochemické barvení)

1966 - aplikace ELFO na přírodní populace: Harry Harris (člověk), Richard Lewontin a John Hubby (octomilka)

## Nosiče (média):

škrob (starch gel el., SGE): velikost molekuly + velikost náboje

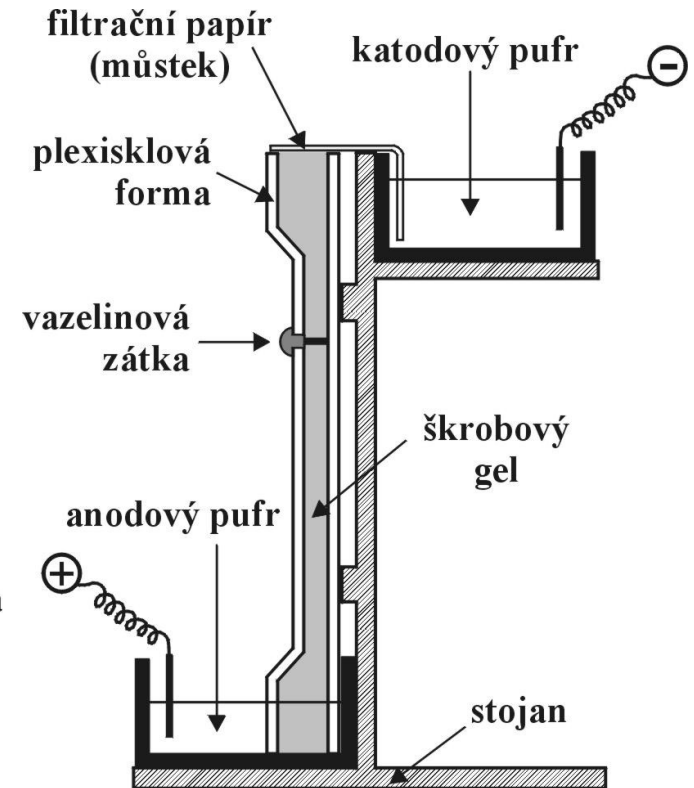
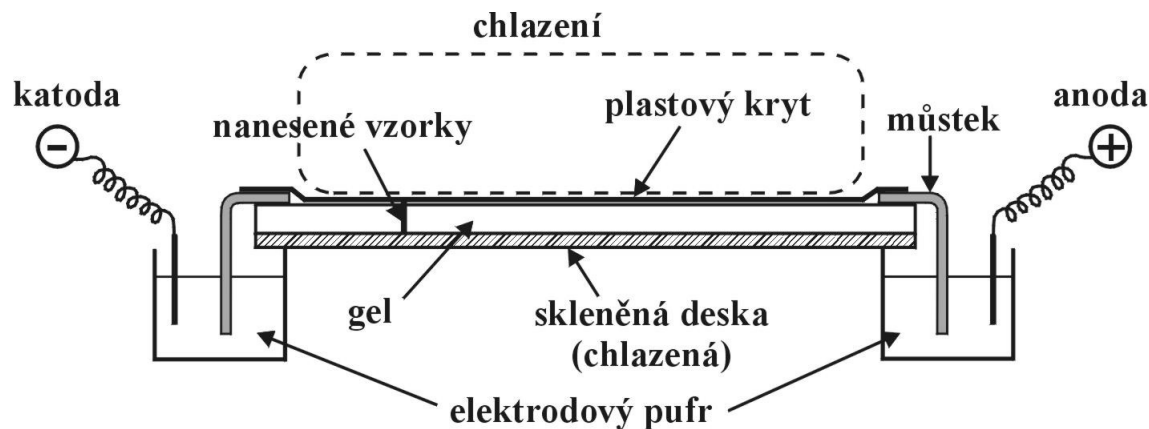
celulózoacetát (CAGE): náboj

agar, agaróza (AGE): náboj

polyakrylamid (PAGE): velikost molekuly + náboj

# Metody elektroforézy

- horizontální
- vertikální
- kapilárová

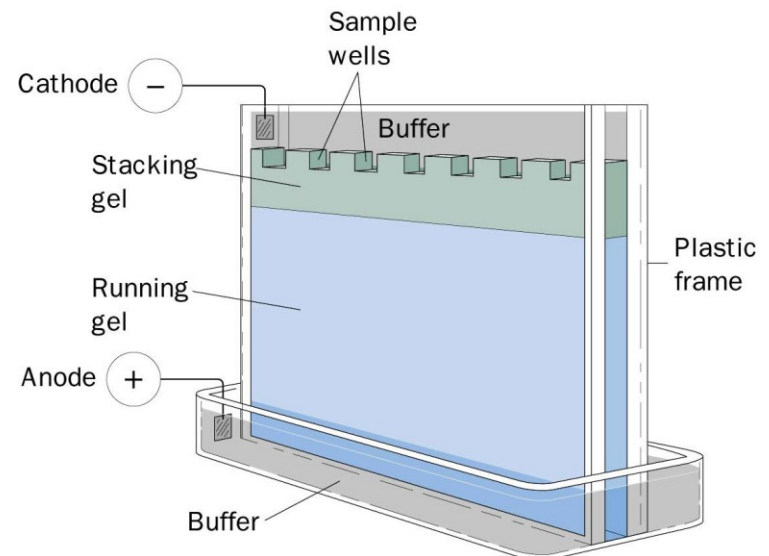


# Metody elektroforézy

## 1. ELFO v kontinuálním pufru

## 2. ELFO v diskontinuálním pufru (multifázická ELFO):

2 gely o různých koncentracích - koncentrující a separující  
na rozhraní „sendvičování“ proteinů mezi „vedoucím“ a „taženým“  
iontem; pokud jen tento krok = **izotachoforéza**





# Metody elektroforézy

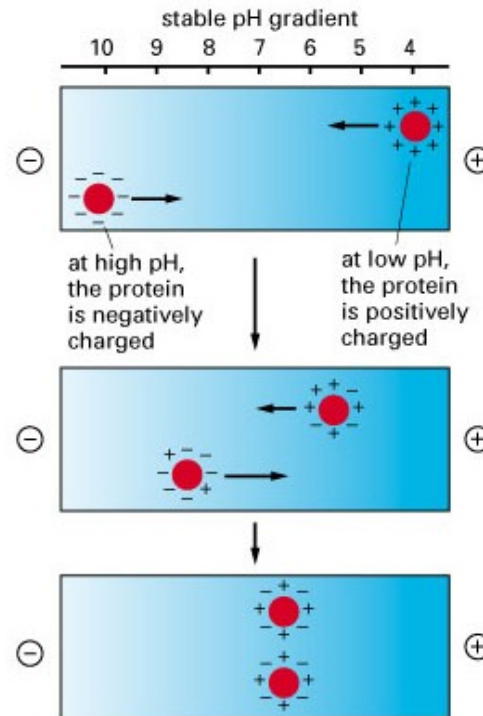
## 3. Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF):

v gelu syntetické polyamino polykarbonátové skupiny = nosné amfolyty s rozsahem pI

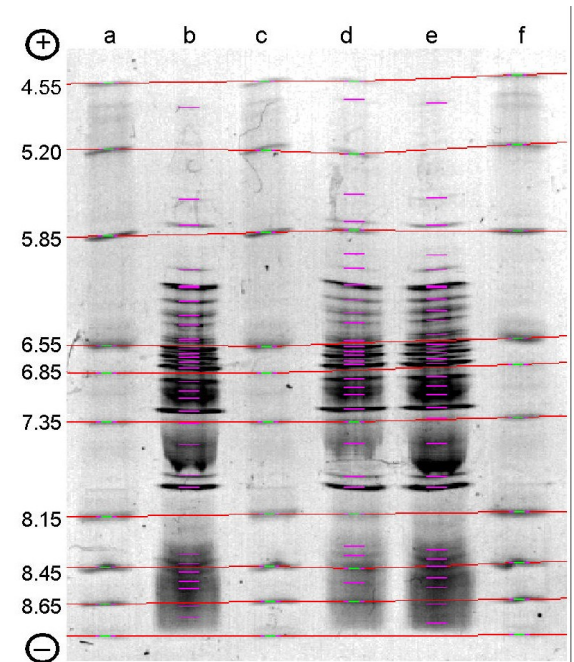
připojením el. pole → stabilní gradient pH; amfolyty drženy v gelu silnou kyselinou při anodě a silnou zásadou při katodě

### ISOELECTRIC FOCUSING

For any protein there is a characteristic pH, called the **isoelectric point**, at which the protein has no net charge and therefore will not move in an electric field. In **isoelectric focusing**, proteins are electrophoresed in a narrow tube of polyacrylamide gel in which a pH gradient is established by a mixture of special buffers. Each protein moves to a point in the gradient that corresponds to its isoelectric point and stays there.



The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.



# Metody elektroforézy

## 4. ELFO v močovně a SDS:

SDS = *sodium dodecyl sulphate* (= aniontový detergent):

schopnost rozpouštět některé proteiny a štěpit některé polymery  
SDS způsobuje silný záporný náboj proteinů, migrace jen podle hmotnosti molekuly

močovina: podobně jako SDS, ale náboj proteinů normální - migrace podle celkového náboje

(podobně možnost tepelné denaturace proteinů a následná ELFO)

## 5. Dvousměrná (2-D) ELFO:

připojení el. pole postupně ve dvou na sebe kolmých směrech  
např. 1. fáze = IEF, 2. fáze = SDS ELFO - kombinace pI a molekulové hmotnosti

# Metody elektroforézy

Schopnost separace proteinů krevní plazmy:

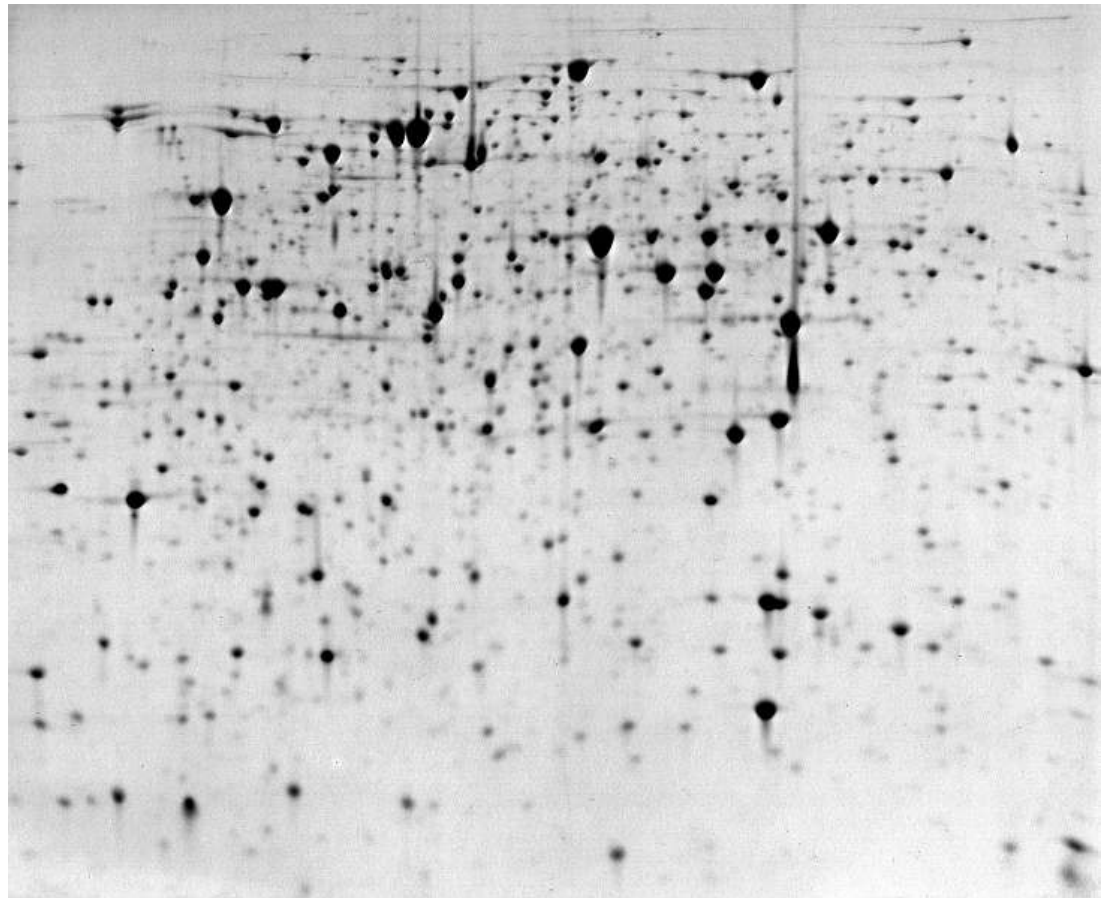
CAGE: 5 pruhů

SGE: 15

PAGE: 19

IEF > 30

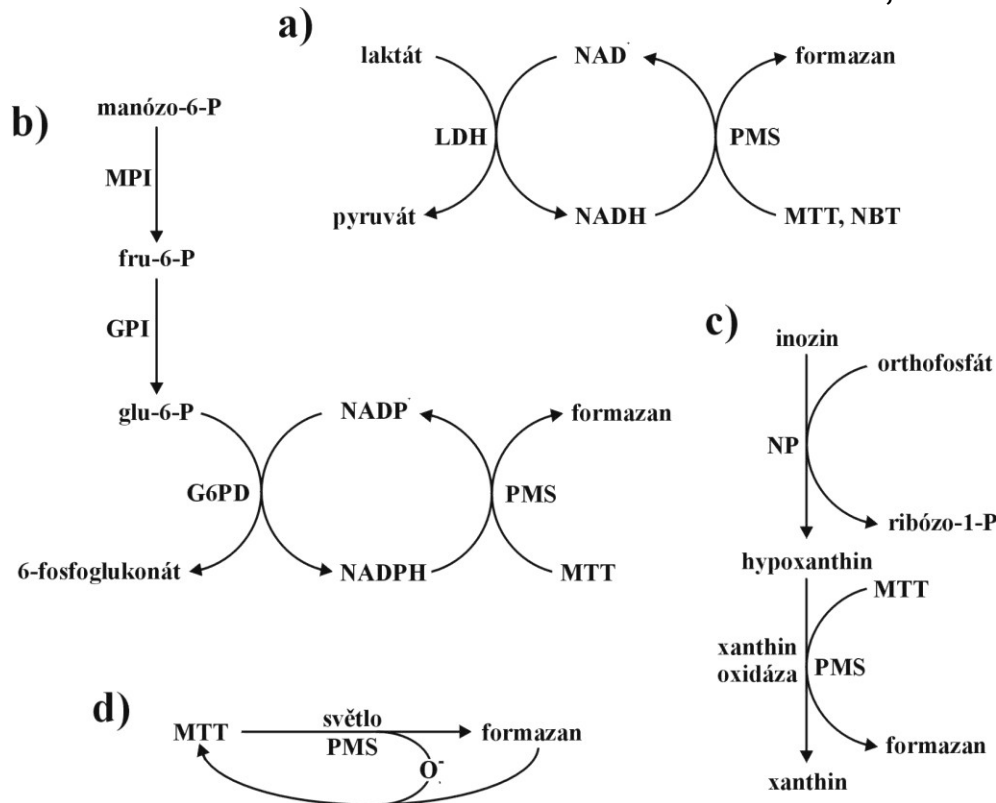
2-D ELFO ca. 300 skvrn  
~ 75-100 polypeptidů



# Detekce proteinů

**nespecifická:** amidočerň, Coomassie Brilliant Blue R

**specifická:** barviva pro glykoproteiny, lipoproteiny  
histochemické barvení enzymů: spřažení katalýzy přeměny specifického substrátu s barvicí reakcí - **nitrotetrazoliové soli (MTT, NBT) + PMS (phenazin methosulfát)**; Fast Blue RR; Fast Garnett GBC, Fast Black K



- redukce NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>
- někdy nutno dodat další enzymy

obarvený gel = obecně **elektroforetogram**,  
jestliže obarveny enzymy = **zymogram** (enzymogram)

proužky = „elektromorfy“, „alely“, „alelomorfy“

**izozymy, alozymy**

