

P o s t u p y b a r v e n í

c h r o m o z ó m ů

užité ve cvičení CCGSB

Pavla Válová
Jarmila Číhalíková

Olomouc 2016

Cvičení č. 1: METAFÁZNÍ CHROMOZÓMY

Roztlakové preparáty kořenových špiček cibule, bobu a ředkvičky

ÚKOLY:

1. Vytvořte **dočasné roztlakové preparáty** ve fruktózovém sirupu a v 45% kyselině octové z předem předpůsobených a nařezaných kořenových špiček cibule (*Allium cepa* L.), bobu koňského (*Vicia faba* L.) a ředkvičky (*Raphanus sativus* L.), nabarvených pomocí Schiffova reagens.
2. Z kvalitních roztlakových preparátů s kořenovými špičkami roztačenými v 45% kys. octové zhotovte za pomoci tekutého dusíku **trvalý roztlakový preparát**.
3. U karyotypů zkoumaných druhů rostlin zjistěte:
 - diploidní počet chromozómů ($2n = \dots$)
 - průměrnou velikost buňky a jádra (v μm) (pomocí okulárového měřítka)
 - velikost největšího chromozómu v analyzovaném karyotypu
 - typ největšího chromozómu podle poměru ramen
 - počet chromocenter v interfázních jádrech
 - uveďte, zda se jedná o homogenní nebo heterogenní karyotyp
 - určete skupinu chromozómů podle velikosti chromozómů v karyotypu („L“ nebo „S“)

Zjištěné údaje запиšte do tabulky na konci cvičení 1.

Upozornění: Při práci s barvivý a roztoky užíváme ochranných rukavic a dbáme, abychom se chemikáliemi nepotřísnili. Barvivo Parafuchsin (= Pararosanilin), užívané při přípravě Schiffova reagens, je mutagen!!!

Postup barvení chromozómů Schifovým reagens:

A) Roztlakový preparát dočasný*

- | | | |
|----|--|------------|
| 1. | Předpůsobení kořenového meristému vybranou látkou | |
| 2. | Fixace v Carnoyově fixáži I (3 : 1)..... | 24 hod. ** |
| 3. | Opláchnutí v dest. vodě (5 min) | |
| 4. | Hydrolyza v 5M HCl při pokojové teplotě | 25 min |
| 5. | Opláchnutí v dest. vodě (5 min) | |
| 6. | Barvení v Schiffově reagens | 35 min *** |
| 7. | Opláchnutí v dest. vodě | |
| 8. | Macerace: v 45% kyselině octové..... | 1–2 min |
| 9. | Roztlak ve fruktózovém sirupu nebo častěji v 45% kys. octové | |

Pozorování v mikroskopu.

* **Poznámka:** Preparáty tohoto typu nejsou trvalé, dají se uchovávat pouze omezenou dobu v lednici (měsíc). Jsou určeny k rychlému orientačnímu hodnocení. Nejsou vhodné k pořízení fotografie (malá hloubka ostrosti).

** Předpůsobení a fixace materiálu již **dříve**. Předpůsobení: cibule, bob, ředkvička – nasycený roztok paradichlorbenzenu - 4 hod.

*** Pokud jsou chromozómy (jádra) Schiffem málo zbarvená, je možné je dobarvit v kapce acetokarmínu (vhodné v případě ředkvičky).

B) Roztlakový preparát trvalý

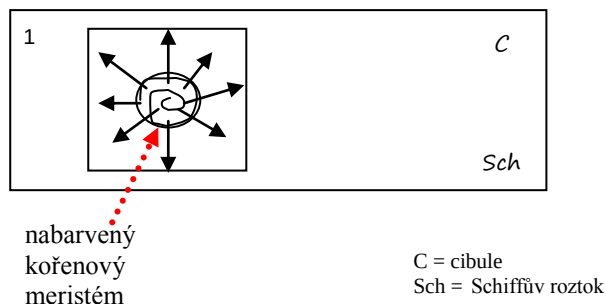
(přes tekutý dusík, případně suchý led)

1. **Předpůsobení** kořenového meristému vybranou směsí
2. **Fixace** v Carnoyově fixáži (3:1) 24 hod.
3. **Opláchnutí** v dest. vodě (5 min)
4. **Hydrolýza** v 5M HCl při pokojové teplotě 25 min
5. **Opláchnutí** v dest. vodě (5 min)
6. **Barvení** v Schiffově reagens 35 min
7. **Opláchnutí** v dest. vodě
8. **Macerace** v 45% kyselině octové 1-2 min
9. **Roztlačení** v kapce 45% kyseliny octové
10. Opatrné vložení preparátu do tekutého dusíku* (příp. položení na kostku **suchého ledu**) a nechat zmrazit (až roztlak zbělá a tekutý dusík kolem podložního skla přestane vřít)
11. **Odstranění krycího skla** širokým skalpelem (příp. žiletkou)
12. **Dehydratace** v 96% etanolu (2x po 5 min.)
13. Vysušení preparátu (možno použít fén)
14. **Uzavření** do uzavíracího media (Euparal – možno přímo, **DePeX** - přes xylén)

*** POZOR: Pracujeme opatrně a s ochranným krytem na oči!!!**

Ukázka správného roztlaku (viz cvičení):

- Nabarvený kořenový meristém (u větších špiček bez čepičky) roztřukat od středu spirálovitým pohybem a potom roztlačit do stran
- Získat jednu vrstvu buněk
- Při roztlaku nepohnout krycím sklem
- Neušpinit povrch krycího skla



Roztlačené buňky pozorujeme mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400x. Vhodné metafázní figury pozorujeme pod imerzním objektivem (100x) s použitím imerzního oleje při zvětšení cca 1 000x.

Pokud při prohlídce v mikroskopu zjistíme, že je roztlak nedostatečný, je možno nadzvednout žiletkou růžek krycího skla a pod sklíčko dokápnout kapku 45% kyseliny octové a provést znovu důkladnější roztlak.

Někdy je možno vyhlédnutou metafázi ještě dodatečně jemně roztlačit (roztřukat) pomocí preparační jehly při použití slabšího objektivu (10x). Nejlépe, pokud je metafáze na okraji roztlačeného pletiva a má kolem sebe dostatek prostoru.

Nejkvalitnější karyotypy (figury) bývají po stranách roztlaku (ne uprostřed).

(Správná příprava roztlakových preparátů viz také Dodatky na konci návodů - **Nejčastější problémy při přípravě a hodnocení karyologických preparátů: Krahulcová, A. (1998):** Karyologie cévnatých rostlin. Příručka praktického cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK Praha.)

Dobarvení chromozómů acetobarvivu:

U rostlin, u nichž jsou chromozómy málo zabarveny Schiffovým reagens, provádíme dobarvení acetobarvivu.

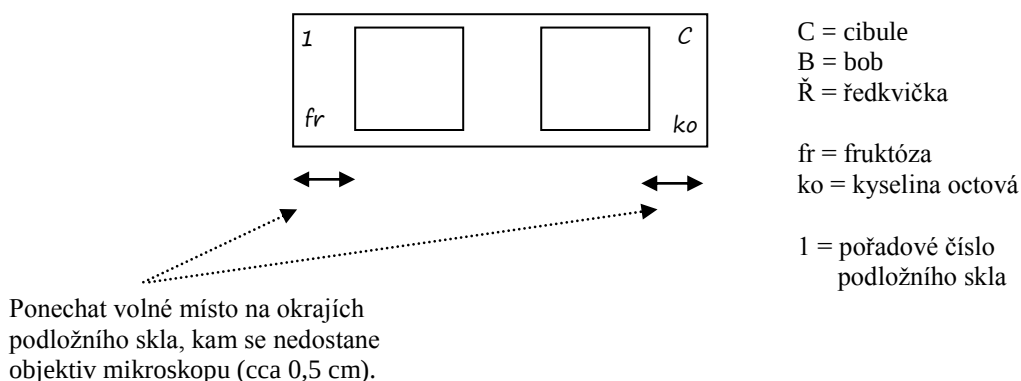
Postup: Ke kořenovému meristému na čistém podložním skle přidáme kapku **barviva** (acetokarmín, laktopropionový orcein), opatrně přiložíme krycí sklíčko tak, aby jedním rohem přesahovalo přes okraj podložního skle, a **velmi jemně provedeme roztlak**. Poté lehce nadzvedneme okraj krycího skle, aby barvivo proniklo k jednotlivým buňkám - toto několikrát opakujeme. Preparát můžeme mírně nahřát nad plamenem lihového kahanu, ale jen tak, aby se barvivo nevařilo. Celkem barvíme asi 5 min. Potom krycí sklo upravíme do správné polohy a opět provedeme mírný roztlak. Přebytečné barvivo odsajeme přiložením proužku čistého filtračního papíru (nesmíme znečistit povrch krycího skle!) a můžeme pozorovat mikroskopem.

Pokud se nepodaří najít buňky s rozloženými chromozómy, které je možno počítat, je nutné postup opakovat s jinými špičkami.

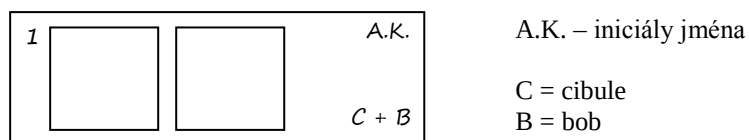
Metafázní chromozómy

– doplňkový materiál

Popis dočasných preparátů na podložním skle: (fixkou na sklo)

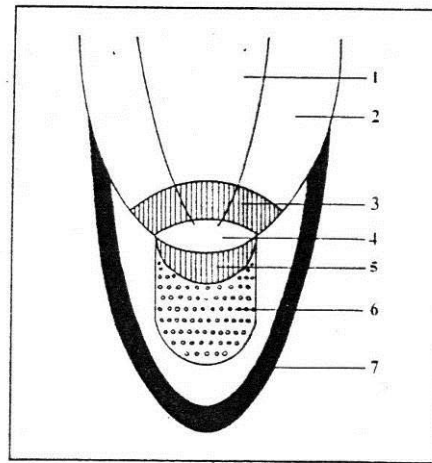


Popis trvalých preparátů na podložním skle: (diamantem na sklo + po zalití do pryskyřice obtažení fixkou)



Anatomická stavba růstového vrcholu kořene:

Apikální meristém s vyznačením klidového centra, proximálního meristému a jednotlivých oblastí v kořenové čepičce.

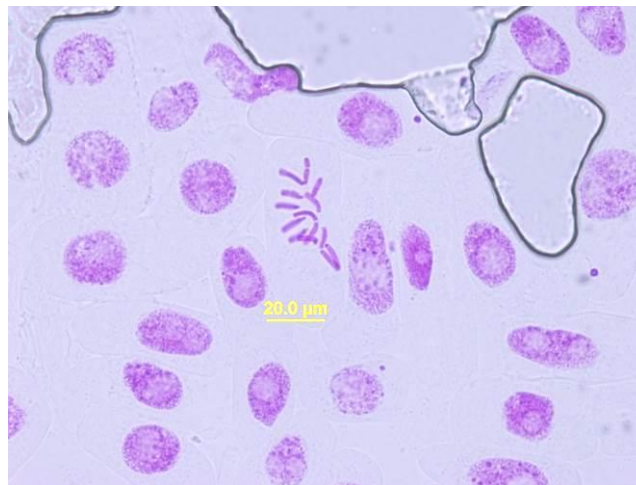


- 1 - střední válec
- 2 - primární kůra
- 3 - meristém**
- 4 - klidové centrum
- 5 - kalyptrógen
- 6 - sloupek
- 7 - periferní buňky čepičky

Mikrofotografie roztlakových preparátů

BOB KOŇSKÝ (*Vicia faba* L.)

předpůsobení p-dichlorbenzenem, barvení Schiffem

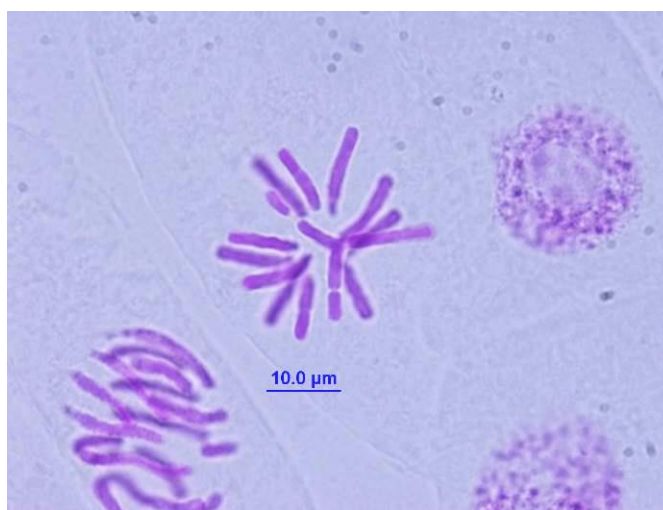


Bob koňský (*Vicia faba* L.) – metafáze mitózy.
Z: 400x. Úsečka 20 μm. Foto Pavla Válová.



Bob koňský (*Vicia faba* L.).

Z: 1000x, imerze. Úsečka 10 μm. Foto Pavla Válová.

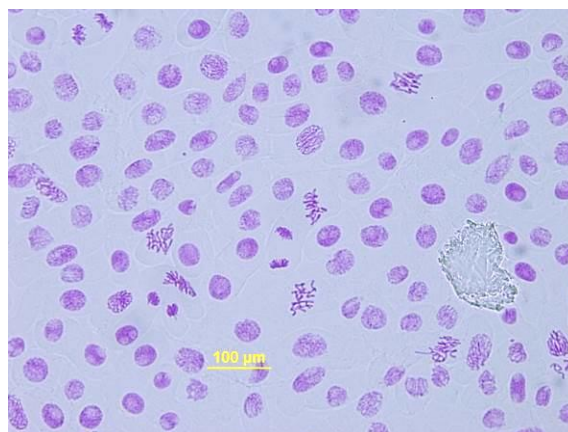


Bob koňský (*Vicia faba* L.).

Z: 1000x, imerze. Úsečka 10 μm. Foto Maroš Prčina.

CIBULE KUCHYŇSKÁ (*Allium cepa* L.)

předpůsobení p-dichlorbenzenem, barvení Schiffem

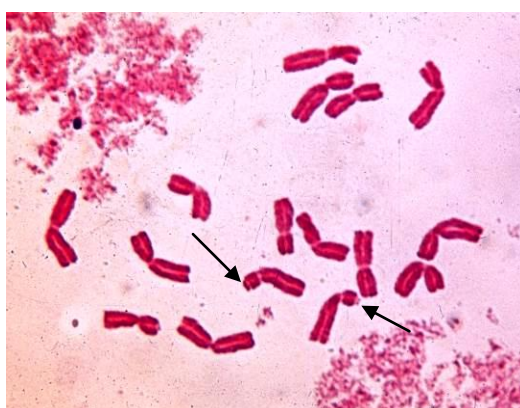


Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.).

Z: 200x. Úsečka 100 μm. Foto Pavla Válová.

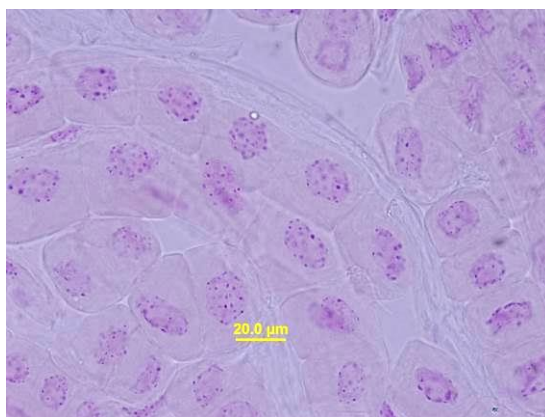


Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.).
Z: 1 000x, imerze. Úsečka 10 μm. Foto Pavla Válová.



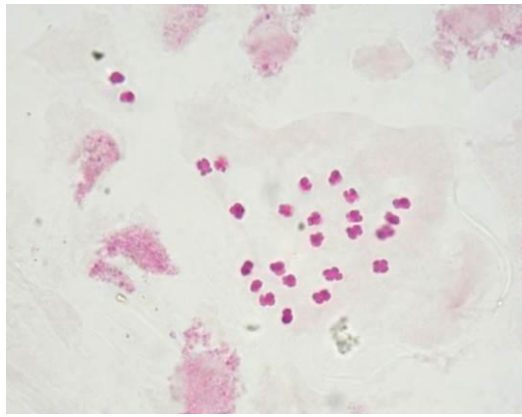
Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.).
Předpůsobení p-dichlorbenzenem, barvení dle Feulgena (Schiffův roztok),
roztlak v acetokarmínu. Šipky označují satelit.
Z: 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.

ŘEDKVIČKA (*Raphanus sativum*)



Ředkvička (*Raphanus sativum* cv. Kvarta).
– chromocentra v interfázních jádrech.
Barvení dle Feulgena (Schiffův roztok), dobarvení a roztlak v acetokarmínu.
Z: 1 000x, imerze. Úsečka 20 μm. Foto Pavla Válová.

HADINEC (*Echium* sp.)

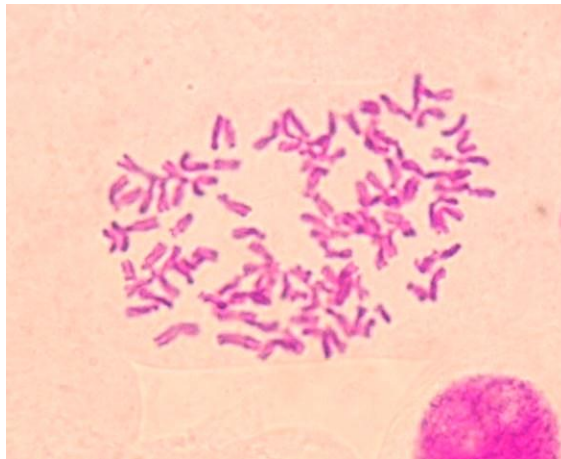


Hadinec (*Echium maculatum*) – příklad homogenního karyotypu.

Chromozómy typu „S“.

Z: 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.

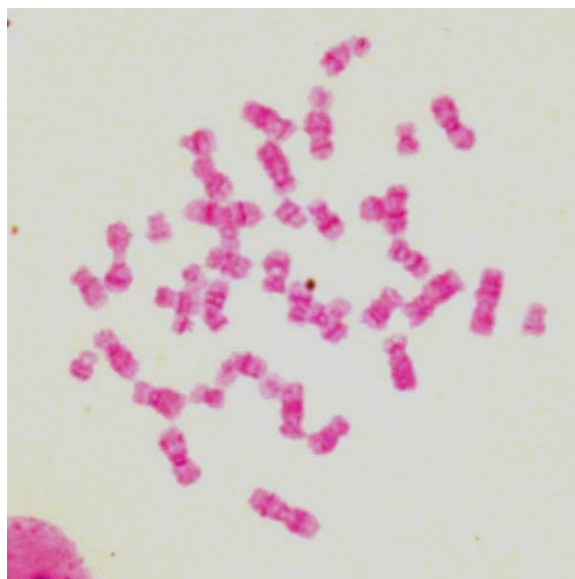
PRYSKYŘNÍK (*Ranunculus* sp.)



Pryskyřník (*Ranunculus* sp.).

$2n = <100$; Z: 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.

ČLOVĚK (*Homo sapiens*)



Nakapávaný preparát lidských leukocytů. G-banding; $2n = 46$.

Z: 1 500x, imerze. Foto Lenka Kučerová.

Mitóza - tabulka k doplnění

Počet chromozómů a jejich charakteristiky

Rostlina	2 n	Velikost nejdelšího chromo- zómu [μm]	Typ chromo- zómu *	Velikost buňky [μm]	Počet chromo- center v interfázi	Typ karyotypu (homogenní x heterogenní)	Typ podle velikosti chromozómů („L“ x „S“)
Ředkvička setá (<i>Raphanus sativus</i>)		X	X				
Cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i>)							
Bob koňský (<i>Vicia faba</i>)							
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)				X	X		

* M = metacentrický; SM = submetacentrický; A = akrocentrický
T = telocentrický; +S = se satelitem

Cvičení č. 2: MEIOTICKÉ CHROMOZÓMY

Meiotické dělení v nezralých prašných pažitky

Charakteristika jednotlivých fází meiózy:

I. dělení – redukční (heterotypické)

profáze I – velké zvětšení objemu jádra

- leptotene - chromozómy se jeví jako dlouhá tenká vlákna,
synizetický svazek – seskupení chromozómů k jedné
straně jádra (lepto = tenký, tene = nit)
- zygotene - párování homologních chromozómů, vznik
synaptonemálního komplexu, podle nových ... již zde průběh
crossing-overu (zygon = dvojitý)
- pachytene - homologní chromozómy formují bivalenty; jsou viditelná místa, kde
proběhl crossing-over* (pachys = tlustý)
- diplotene - desynapse, terminalizace chiasmat (diplos = dvojitý)
- diakineze** - chromozómy velmi zkrácené, **vhodné pro stanovení**
počtu chromozómů (diakino = rozpojují)

* Podle novějších poznatků crossing-over nastává již v zygotenním stadiu a v pachytene již pozorujeme místa, kde k němu došlo.

metafáze I, anafáze I, telofáze I a interkineze:

chiasmata jsou lokalizována na ekvatoriální rovině, do dceřiných jader se separují jednotlivé **celé chromozómy**; v interkinezi nedochází k syntéze DNA a reduplikaci, chromozómy se rozvinují a formuje se jaderná blána.

II. dělení – ekvační (homeotypické) (podobné jako mitóza)

profáze II: chromozómy jsou separovány od sebe – tvoří kříž

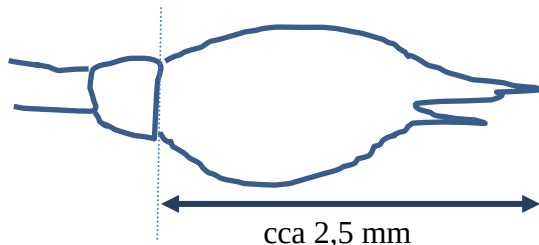
metafáze II, anafáze II, telofáze II:

stejně jako somatické dělení, původní počet chromozómů (2n) je redukován na gametický počet (n).

Vytvoření meiotických preparátů

Rostlinný materiál: **nafixovaná poupata pažítky pobřežní** (*Allium schoenoprasum* L.)
(fixáž alkohol-octová – 3 : 1, 24 h při 4 °C, pak přenesení přes 96% etanol (2x po 15 min) do 70% etanolu a uchovávání v chladničce při 4 °C)

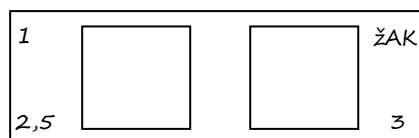
Z květního toulce rostliny odebereme poupě o velikosti cca 2,5 mm – viz nákres níže.



Velikost poupěte změříme milimetrovým měřítkem nebo pod preparační lupou s okulárovým mikrometrem.

Poupě položíme na podložní sklo, na okraj zapíšeme jeho velikost (fixou na sklo).

Popis preparátů na podložním skle:



žAK = železitý acetokarmín
LPO = laktopropionorcein

1 = pořadové číslo
podložního skla
2,5 = délka poupěte v mm

A) Postup barvení prašníků laktopropionovým orceinem:

1. **Macerace** celého poupěte ve směsi 5 M HCl : 96% etanol (1 : 1)..... 10 min
2. Důkladné **opláchnutí** v destilované vodě
3. Odsátí přebytečné vody
4. **Vypreparování prašníků a rozmačkání** na podložním skle (použít zahnutou preparační jehlu) v kapce **laktopropionového orceinu**, lehce zahřát nad lihovým kahanem a nechat chvíli (2 min) barvit.
5. Položení krycího sklíčka, lehké přitlačení a odsátí přebytečného barviva proužkem čistého filtračního papíru (pozor na znečištění krycího sklíčka).
6. Možné orámování preparátu (např. lakem na nehty), aby barvivo nevysychalo.

Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400x, případně s imerzí při zvětšení 1 000x.

B) Postup barvení prašníků železitým acetokarmínem:

1. Obsah prašníků vytlačíme pomocí jehel do kapky **železitého acetokarmínu** a zbytky prašníků odstraníme.
2. Lehce nahřejeme nad plamenem lihového kahanu a necháme asi 1 min barvit.
3. Přiložíme krycí sklo a opatrně roztlačíme.
4. Přebytečné barvivo odstraníme proužkem čistého filtračního papíru (pozor na znečištění krycího sklíčka).

Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení cca 200x a 400x, případně s imerzí při zvětšení 1 000x.

ÚKOLY:

1. Ve vytvořených roztlakových preparátech najděte stadium meiózy, v níž je vidět párování homologních chromozómů (profáze I – diakineze) a spočítejte počet bivalentů; z tohoto počtu určete haploidní a diploidní počet chromozómů u pažitky.
2. Rozhodněte, zda párování homologních chromozómů v metafázi I probíhá pravidelně nebo nepravidelně (vznikají shluky, slepence, kroužky ... chromozómů).
3. Pomocí okulárového měřítka změřte velikost pylových mateřských buněk (PMC) ve stadiu diakineze a buněk tapeta.
4. Rozhodněte, který ze dvou použitých způsobů barvení meiotických preparátů je ke studiu párování homologních chromozómů vhodnější.

Zjištěné údaje zapište do tabulky na konci cvičení 2.

MIKROFOTO MEIOTICKÝCH CHROMOZÓMŮ

skupina MBB C+D (5.11.2010)

PAŽITKA POBŘEŽNÍ (*Allium schoenoprasum* L.)

poupata o velikosti cca 2,5 mm

Fixace Carnoy I (96% etanol : led. kys. octová v poměru 3 : 1), uchovávání v 70% etanolu

Roztlakové preparáty, barvení železitým acetokarmínem



Meióza I: profáze I – zygotene.

Chromozómy v bivalentech tvaru dlouhých tlustých nití; viditelné jádérko (šipka →). Tenký kalózový obal pylové mateřské buňky (PMC) (šipka).

Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.

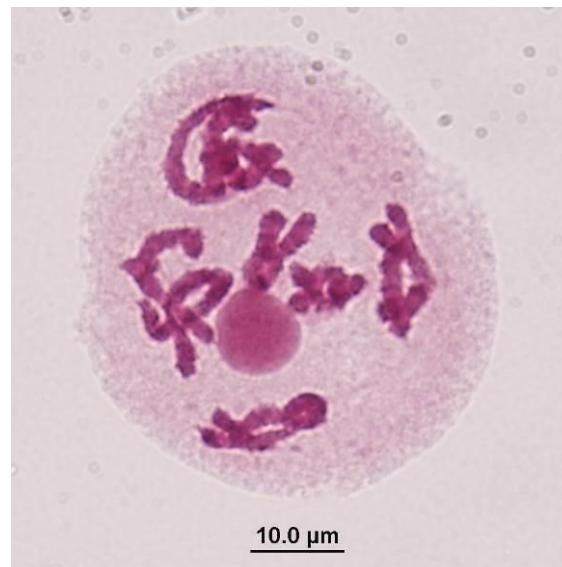


Meióza I: profáze I – diplotene.

Chromozómy v bivalentech, tvorba chiazmat (šipka). Viditelné jadérko.

Roztlačený protoplast bez kalózového obalu.

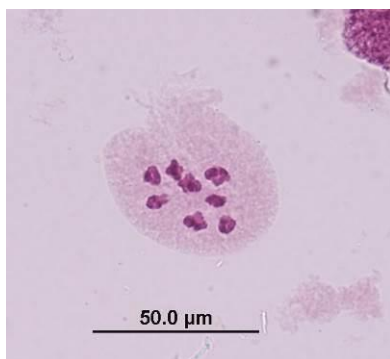
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



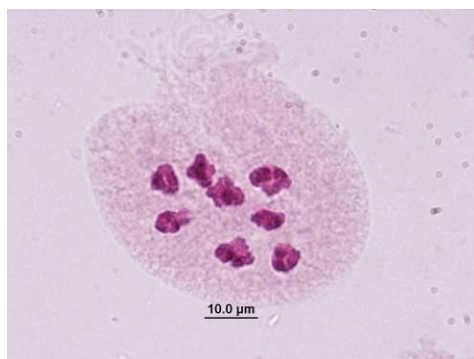
Meióza I: profáze I – diplotene.

Roztlačený protoplast bez kalózového obalu.

Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



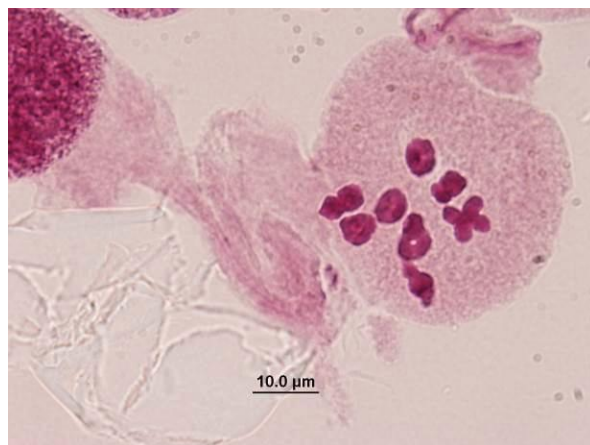
Z = 400x



Z = 1 000x, imerze

Meióza I: profáze I - diakineze. Chromozómy v bivalentech zrníčkovitého tvaru; vhodné stadium pro počítání chromozómů. Roztlačený protoplast bez kalózového obalu.

Foto Pavla Válová.



Meióza I: profáze I – diakineze.
Roztlačený protoplast bez kalózového obalu.
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



Meióza I: profáze I – diakineze.
Roztlačená PMC s kalózovým obalem (šipka).
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



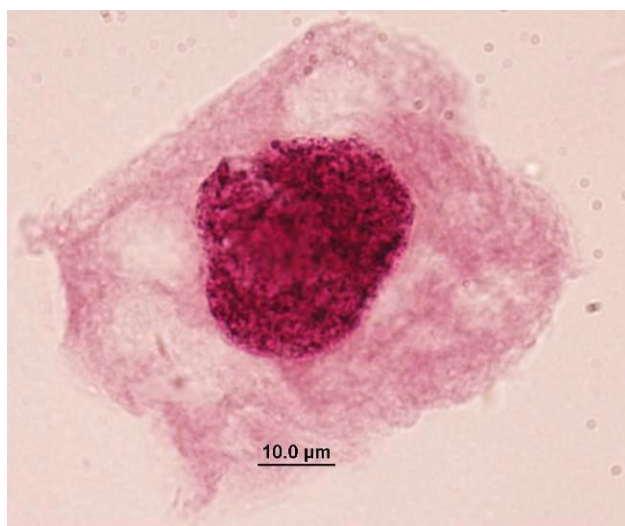
Kalózový obal
pylové mateřské
buňky (PMC)

Meióza I: konec anafáze I.
Jednotlivé celé chromozómy na pólech PMC.
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



Diáda, konec meiózy I.
(bez kalózového obalu)

Tvorba mezibuněčné přepážky mezi vytvořenými buňkami
(sukcesivní - postupný - typ tvorby pylového zrna).
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.



Buňka tapeta v interfázi s velkým interfázním jádrem.
Z = 1 000x, imerze. Foto Pavla Válová.

Meióza - tabulka k doplnění

Počet bivalentů v meióze I – diakinezi a velikost PMC

Rostlina	Počet bivalentů v diakinezi	2 n	Velikost PMC v diakinezi [μm]	Velikost buňky tapeta [μm]	Párování homologních chromozómů [pravidelné x nepravidelné]
Pažitka pobřežní (<i>Allium schoenoprasum</i>)					

Cvičení č. 4:

Diferenciální barvení chromozómů, metody živočišné cytogenetiky

ÚKOLY:

- a) Z předpůsobených a nafixovaných kořenových špiček bobu a cibule zhotovte trvalé preparáty technikou NOR-barvení.
- b) Zhotovte roztlakový preparát metafázních chromozómů z mozkových ganglií larvy drozofily.

A) Metoda barvení organizátoru jadérka a jadérka v interfázním jádře, **NOR-banding**

PRACOVNÍ POSTUP:

Materiál: kořenový meristém cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) a bobu koňského (*Vicia faba* L.)

Předpůsobení: p-dichlorbenzen 4 hod.

Fixace: Carnoy I (3 : 1)*

Hydrolýza: 5M HCl 25 min., laboratorní teplota

Roztlak: V kapce 45% kyseliny octové, krycí sklo odstraňte přes suchý led (tekutý dusík) a roztlak dehydratujte v 96% etanolu (2 x 5 min), poté dejte preparát sušit na vzduch.

Barvení: Na roztláčené buňky pipetujte **10 µl** želatinového roztoku (**1.**) a **20 µl** 50% AgNO₃ roztoku (**2.**). Přikryjte krycím sklem a položte na topnou desku vyhřátou na 70 °C. Asi po 2 min barvicí roztok zhnědne.

Potom krycí sklo smyjte nad kádinkou** pomocí teplé destilované vody ve stříkačce. Preparát vysušte na vzduchu a uzavřete do Euparalu nebo DePeXu (přes xylén).

1. roztok – 2% prášková potravinářská želatina s kyselinou mravenčí (1g želatiny rozpustit v 50 ml dest. vody a přidat 0,5 ml kyseliny mravenčí)

2. roztok - 50% vodný roztok AgNO₃ (0,5g AgNO₃ rozpustit v 1 ml dest. vody)

Upozornění: Protože pracujeme s AgNO₃, což je jed, pracujeme v ochranných rukavicích a dbáme, abychom se roztokem nepotřísnilí.

Pozorování:

Na uzavřeném preparátu pozorujte žlutě zbarvená interfázní jádra a uvnitř jádra tmavě hnědě (příp. černě) zbarvená jadérka. Na satelitních chromozómech se specificky barví organizátor jadérka – chromozómy jsou žluté, NOR je vidět na největším chromozómu jako tmavý pruh.

1		<i>B</i> NOR A.K.
---	---	-------------------------

B = bob
C = cibule
NOR = NOR-barvení

A.K. – iniciály jména

2		<i>Ř</i> NOR A.K.
---	---	-------------------------

Ř = ředkvička
NOR = NOR-barvení

A.K. – iniciály jména

* Předpůsobení a fixace již předem; materiál uchovávaný v 70% etanolu.

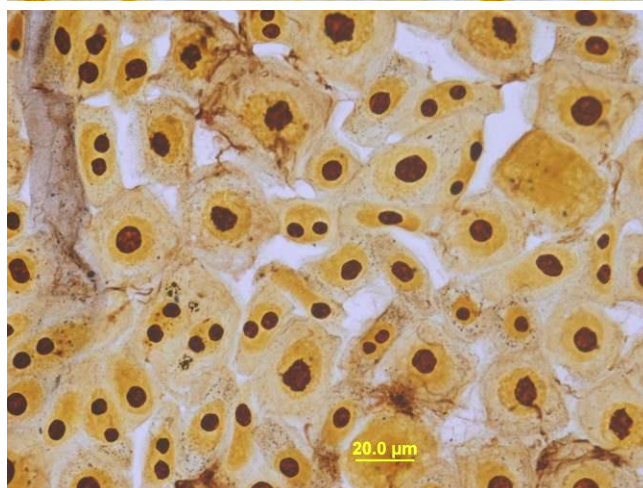
** Roztok s AgNO₃ je jedovatý – nevylévá se do odpadu, ale dává se zvlášť do nebezpečného odpadu k pozdější likvidaci.



NOR-banding u cibule.

Buňky kořenové špičky cibule seté (*Allium cepa*)
po barvení dusičnanem stříbrným.

Z: 400x. Úsečka 50 μm. Preparát Dagmar Smitalová, foto Pavla Válová.



NOR-banding u bobu.

Buňky kořenové špičky bobu koňského (*Vicia faba*)
po barvení dusičnanem stříbrným.

Z: 400x. Úsečka 10 a 20 μm. Preparát a foto Pavla Válová.

B) Mitóza pozorovaná na neuroblastech drozofily **– rychlá roztlačová metoda**

Nejvhodnější buňky pro sledování mitózy u *Dipter* jsou neuroblasty z mozkového ganglionu larvy, kde jsou chromozómy dostatečně velké. Ganglion leží dorzálně od slinných žláz (viz obr. níže).

- Materiál:** larvy drozofily (*Drosophila melanogaster* Meig.) 3. instaru (tj. těsně před zakuklením, kdy vylézají na stěnu kultivační nádoby), pocházející z kultury s nadbytkem potravy; chov při 18 °C)
- Barvení:** roztlak v kapce **laktopropionorceinu**

PRACOVNÍ POSTUP:

1. Larvu položíme na podložní sklo do kapky fyziologického roztoku pod binokulární lupou. Jednou preparační jehlou přidržíme larvu za ústní část (tmavé chitinové háčky), druhou asi uprostřed těla. Tahem jehel oddělíme hlavovou část s mozkovými gangliony (viz obr. níže).
2. Odstraníme nežádoucí části (zbytek larvy, tukovou tkáň).
3. Mozková ganglia přeneseme na čisté podložní sklo a ihned zakápneme **laktopropionovým orceinem** (buňky nesmí vyschnout). Barvivo necháme působit asi 10 minut (můžeme lehce zahřát nad lihovým kahanem).
4. Přiložíme krycí sklo a jemným tlakem buňky ganglia roztlačíme. Preparát opatrně zahřejeme (barvivo nesmí vařit; teplotu podložního skla kontrolujeme hřbetem ruky).
5. Přebytečné barvivo odstraníme překrytím preparátu proužkem čistého filtračního papíru.

Pozorujeme pod mikroskopem při větším zvětšení (400x a potom 1 000x s imerzí).

Pozorování:

Buňky mozku jsou velmi drobné (cca 5 μm). Pozorujeme nabarvená jádra a v některých i jádra v mitóze, případně v metafázi. Chromozómy jsou velmi drobné, na rozdíl od „obrovských“ polyténních chromozómů celková délka metafázních chromozómů měří 7 μm !

V dobře roztlačené buňce v metafázi je vidět 8 chromozómů (viz obrázky níže):

1. pár pohlavních chromozómů - **chromozóm X** - je tyčinkovitého tvaru, **chromozóm Y** má tvar „J“. Dva dlouhé chromozómy tvaru „V“ představují **2. a 3. chromozómové páry**, přičemž 2. chromozóm je poněkud kratší než 3. chromozóm.

Párový chromozóm 4 je velmi malý a jeví se jako tečky.

Na některých preparátech je možné vidět i jednotlivé chromatidy.

Roztržení larvy drozofily za pomoci dvou preparačních jehel

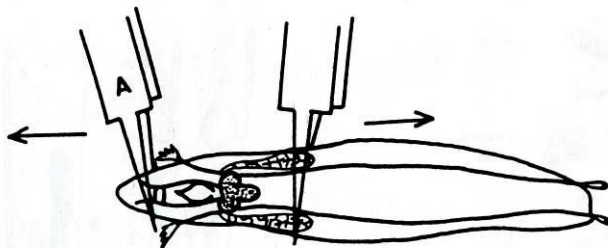
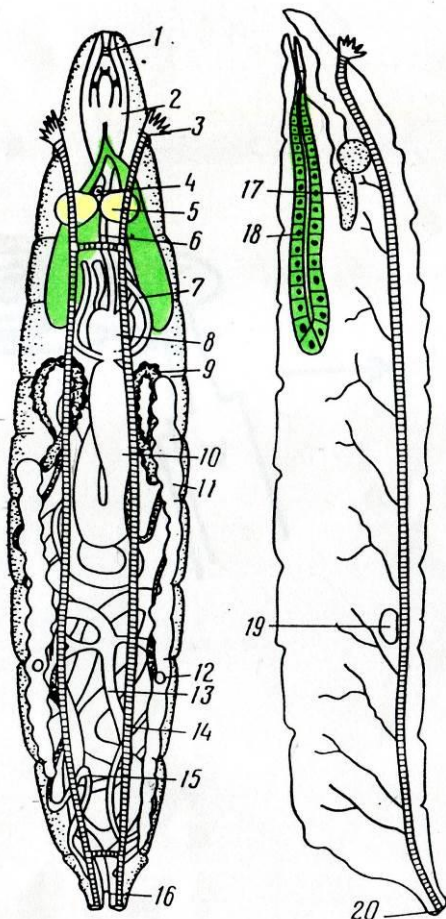


Schéma rozložení orgánů u larvy drozofily

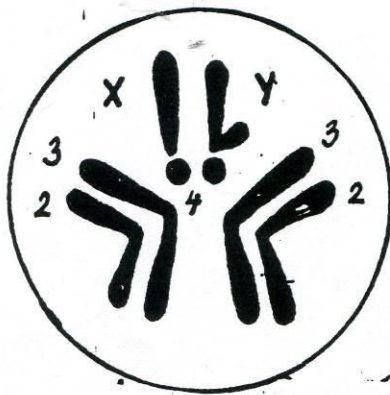
(*Drosophila melanogaster* Meig.)



1. Cefalofaryngeální skelet
2. Hltan
3. Tracheje - ústí
4. Kruhová žláza
- 5. Mozková ganglia**
6. Jícen
7. Žaludeční oblast
8. Předžaludek
9. Přední Malphigio trubice
10. Střední střevo
11. Tukové těleso
12. Vaječník
13. Zadní střevo
14. Tracheje
15. Zadní Malphigio trubice
16. Anální otvor
17. Břišní ganglion
- 18. Slinná žláza**
19. Semenný váček
20. Zadní otvor pro dýchání

Drosophila melanogaster Meig.

Schéma normálních chromozómů ($2n = 8$) u samečka a samičky v metafázi:



Celková délka metafázních chromozómů = 7,5 μm

Celková délka polytenních chromozómů = 1 180 μm

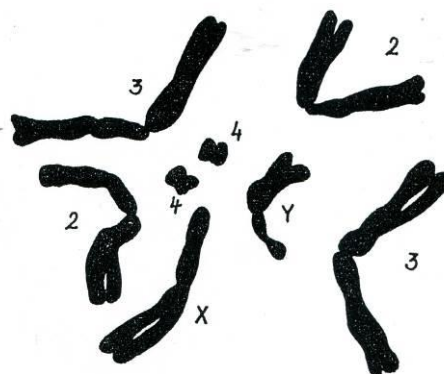
chromozóm X - 220 μm

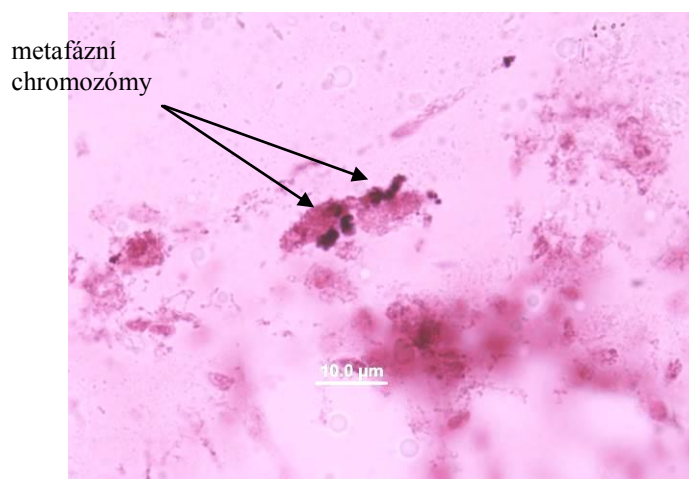
chromozóm 2 - 460 μm

chromozóm 3 - 485 μm

chromozóm 4 - 15 μm

Mitotická metafáze u *D. melanogaster* (sameček)





Metafázní chromozómy v mozkových gangliích drozofily.
Z: 1 000x (imerze). Úsečka 10 μm. Foto Pavla Válová.

CVIČENÍ č. 3:

IZOLACE CHROMOZÓMŮ

Pracovní postup:

Materiál:	kořenový meristém bobu (<i>Vicia faba</i> L.)	
Synchronizace:	2,5 mM HU*	18 hod.
Akumulace metafázi:	2,5 μM APM*	2 hod.
Fixáž chromozómů:	TRIS fixáž + 4% formaldehyd	30 min, 5 °C
Promytí:	TRIS pufr	3 x 5 min
Izolace chromozómů:	20 špiček na vzorek, homogenizace 1 500 ot./18 s filtrace přes 50μm filtr	
Barvení:	DAPI - pracovní roztok**	

Kápnutí 3 μl suspenze na podložní sklo.

Pozorování ve fluorescenčním mikroskopu (s fluorescenční kostkou na DAPI – WU).

* HU = hydroxymočovina, APM = amiprofosmethyl

** viz. DODATKY v Skriptech „Cvičení z cytotaxonomie a cytogenetiky“: Příprava vybraných barviv a roztoků

DODATKY

POSTUP FIXACE ROSTLINNÉHO PLETIVA (k barvení chromozómů)

1.den

- odebrat (odstříhnout) alespoň 10 ks 1 cm dlouhých kořenových špiček (nejlépe ráno)
- vložit do epruvetky s nasyceným roztokem **paradichlorbenzenu** (jedovatý!!!) na 4 hod.
 k předpůsobení (při použití 0,1% vodného roztoku kolchicinu (Jed!!!) doba působení 2 - 2,5 hod.)
 označit vzorek + datum fixace (bílý papír, obyčejná tužka)
- 2x propláchnout **destilovanou vodou** po 15 min (pozor na záměnu kořínků)
- nalít **čerstvě připravený fixační roztok** (Carnoy I, tj. FAE, alkohol-octová fixáž, 3 : 1 = 3 díly 96% etanolu a 1 díl led. kyseliny octové)
 Pozn.: nejlépe nalít trochu fixáže, vylít a zalít novou dávkou fixáže až po okraj (50x více než vzorek)
- nechat přes noc v chladničce při 4 °C

2.den

- vylít fixáž (pozor na ztrátu kořínků)
- 2x propláchnout **96% etanolem** po 15 min působení
 (Pozn.: kyselina octová se musí dostat pryč z pletiva)
- zalít **70% etanolem**
- uložit do chladničky (4 °C) k dlouhodobému uchování (0,5 až 1 rok)

POZOR: Při práci s fixáží používat ochranné gumové rukavice a ochranný kryt na oči!

Sterilizace semen

SAVO dezinfence

100 ml/1l (1 ml/10 ml vody) 3 min
Propláchnout sterilní destilovanou vodou.

2-3% SAVO (chlornan sodný 5-7% akt. Cl)

0,02 - 0,03 l/1l
tj. 80 ml/4l tj. 20 ml/l
Propláchnout sterilní destilovanou vodou.

Sterilizace semen vojtěšky na embryogenezi (aseptická kultivace)

- opláchnutí v 70% etanolu
- 5% chloramin 30 min
- propláchnutí sterilní destilovanou vodou – 8x

Nejčastější problémy při přípravě a hodnocení karyologických preparátů

(Podle **Krahulcová, A. (1998)**: Karyologie cévnatých rostlin. Příručka praktického cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK Praha.)

V meristémech je málo nahromaděných metafází, intenzita buněčného dělení je nízká.

Vyzkoušet různou dobu trvání předpůsobení, případně teplotu. Pokud máme možnost, vyzkoušíme i jinou chemikálii. V případě použití kolchicinu, který má velmi široký záběr (účinkuje na široké spektrum taxonů), pozor na jeho vhodnou koncentraci: pletiva vystavená příliš vysoké koncentraci kolchicinu mají jádra s chromozómy jakoby nabobtnalými a slepenými dohromady, tvořícími útvar podobný klubíčku. Tento stav se již nedá změnit a takové preparáty jsou zcela nepoužitelné. Příliš

dlouhá doba předpůsobení vede obvykle ke vzniku tzv. endomitóz, vznikajících rozdělením chromozómů bez současného rozdělení jádra. Takové buňky bývají v pletivu rozpoznatelné podle toho, že obsahují dvojnásobný počet chromozómů, sestávajících jen z jedné chromatidy (jsou oproti „normálním“ chromozómům v ostatních buňkách o polovinu tenčí). Chyba může spočívat i v nesprávném odebírání pletiv, kde chybějí aktivně se dělicí buňky. Optimální doba odběru (zvláště v terénu v teplých dnech) bývá ráno až časně dopoledne. Začátečníkům někdy činí potíže i rozpoznání aktivně rostoucích kořínků s meristematickou špičkou (kořínky nesmějí být ani příliš přerostlé, ani zaschlé).

Buňky jsou na preparátu špatně rozprostřené, tvoří více překrývajících se vrstev.

Opatrně prodloužit dobu macerace, případně zvýšit koncentraci HCl (pokud používáme maceraci za tepla).

Preparát není čistý, pozorování ruší kousky vysráženého barviva.

Tento problém nastává při použití laktopropionorceinu, pokud jsme dostatečně neodsáli přebytečnou vodu na podložním sklíčku před barvením a rozmáčknutím objektu. Zmíněný roztok barviva se při delším skladování rovněž postupně sráží a je třeba jej občas přefiltrovat.

Krycí sklíčko praská.

Pro pozorování preparátů imerzním objektivem (zvětšení 60x, 100x) volíme tenká krycí sklíčka (označená č. 0), která jsou ale poměrně křehká. Jejich praskání při roztlaku kořenových špiček můžeme omezit dokonalým vypráním objektů tak, aby na nich neulpívaly zbytky substrátu (zrnka písku, částčky půdy). Pozor na přílišný tlak na sklíčko při dodatečném rozmáčkávání objektu!

Buňky jsou potrhány, chromozómy „rozházené“ mimo původní jádra.

Zmírnit tlak při rozmáčkávání tkání nebo zkrátit dobu macerace.

Cytoplazma se přebarvuje.

Objekty mohly být příliš dlouho uchovávané ve fixační směsi: tomu lze předejít jen nezbytnou dobou fixace a následovným skladováním materiálu v 70% etanolu až do dalšího zpracování. Někdy pomůže k projasnění cytoplazmy macerace za tepla (1M HCl při 60 °C) místo jednodušší macerace za studena ve směsi HCl-etanol. Další možností je použití karmínu místo orceinu jako jaderného barviva (orcein barví chromozómy intenzivněji než karmín, ale obvykle častěji přebarvuje cytoplazmu).

Chromozómy jsou málo intenzivně obarvené.

Špatná barvitelnost chromozómů může být způsobena příliš dlouhým skladováním materiálu nebo nedokonalým vypráním vodou mezi předpůsobením, fixací, macerací a barvením. Chromozómy některých taxonomických skupin jsou skutečně obtížně barvitelné jak orceinem, tak karmínem. Lze pro ně vyzkoušet i jiná jaderná barviva a jiné postupy. Slabě obarvené nebo vůbec neobarvené struktury lze dobře studovat při použití mikroskopu s fázovým kontrastem.

Chromozómy ve stádiu metafáze jsou uspořádány příliš blízko sebe nebo neleží v jedné vrstvě.

Pokud jsme jinak s kvalitou preparátu spokojeni (chromozómy jsou dostatečně obarvené a s jasnými obrysy), můžeme si pomocí jemným roztlačením příslušné metafáze preparační jehlou přímo pod mikroskopem. K tomu jsou nejvhodnější metafáze umístěné na okraji roztlačeného pletiva, které mají kolem sebe dost prostoru. Metafázi si najdeme na preparátu pod méně zvětšujícím objektivem (obvykle 10x nebo 16x), prstem přidržíme roh krycího sklíčka a špičkou preparační jehly opatrně příslušné místo roztlačíme za současné kontroly v okulárech mikroskopu. Tlak musí být zpočátku velmi jemný, výsledek stále kontrolujeme mikroskopem. Tento postup vyžaduje zkušenost a cvik - pokud chromozómy rozmáčkne příliš intenzivně, je zpočátku často velmi pěkná metafáze nenávratně zničená.

V jedné metafázi je příliš mnoho chromozómů, nejsou všechny zároveň dobře zaostřené, obtížně se počítají.

Je-li k dispozici kreslicí zařízení, vypomůžeme si schematickým zakreslováním jednotlivých chromozómů při současném jemném proostřování. Můžeme vyzkoušet i počítání chromozómů v zárodečných buňkách (v pylových mateřských buňkách), které již prošly redukčním dělením a kde je chromozómový počet poloviční oproti buňkám somatickým.

Příprava trvalých preparátů metodou odstranění krycího sklíčka pomocí zamrazení:

- roztlak objektu pomocí krycího sklíčka v kapce 45% kyselině octové
- ponoření preparátu s roztlakem do tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo položení preparátu na povrch tuhého CO_2 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)* na tak dlouho, až v případě použití tekutého dusíku se přestanou vytvářet páry dusíku (preparát přestane „syčet“) nebo v případě použití tuhého CO_2 povrch krycího sklíčka zbělá
- okamžité odstranění krycího sklíčka žiletkou
- neprodlené přenesení preparátu do 96% etanolu na 5 min a pak do 100% (možno i 96%) etanolu na 10 min
- vysušení preparátu na vzduchu
- uzavření krycím sklíčkem do uzavíracího média (Euparal, DePeX)

Conger A.D., Fairchild L.M., 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.

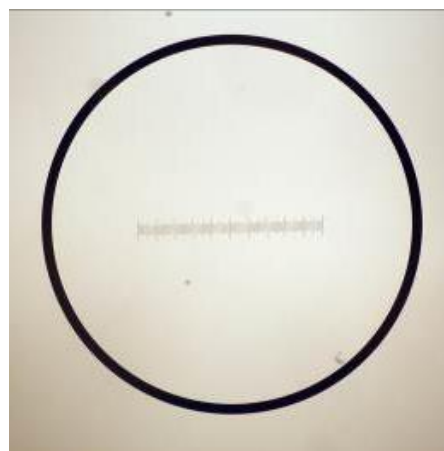
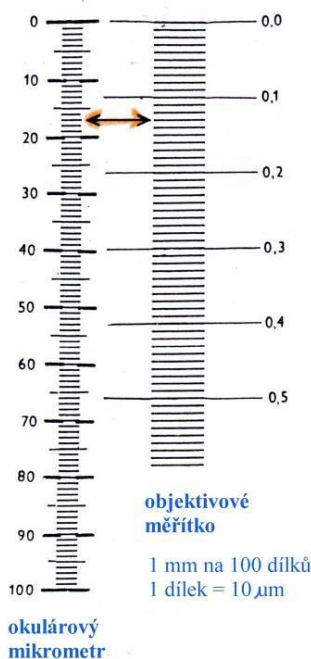
*** Pracujeme v ochranných rukavicích a v případě tekutého dusíku i s ochranným štítem na oči!**

Měření velikosti mikroskopických objektů - měření délky a šířky

Mikroskopické objekty nemůžeme vzhledem k jejich malým rozměrům měřit přímo, ale pouze zprostředkovaně. Při měření délky a šířky mikroskopických objektů používáme dvě měřítka: objektivové a okulárové.

Objektivové měřítko (objektivní mikrometr) je broušená skleněná destička velikosti podložního skla, na níž je uprostřed v kruhové zóně vyryto nebo fotografickou cestou nanесeno měřítko v celkové délce nejčastěji 1 mm, dělené na 100 dílků. Jeden dílek pak odpovídá délce 0,01 mm, tj. 10 μm .

Okulárový mikrometr je sklíčko vložené v okuláru v rovině, kde vzniká obraz pozorovaného předmětu (tj. v místě okulárové clony), a opatřené úsečkou o celkové délce 1 cm rozdělené na 100 dílků (případně o úsečce 0,5 cm dělené na 50 dílků). Okulárové měřítko je na rozdíl od objektivového očíslované. Při jeho použití vidíme v okuláru obraz předmětu a měřítko současně. Ve srovnání s objektivovým měřítkem, kde jeden dílek má konkrétní absolutní hodnotu (10 μm), je okulárové měřítko relativní, protože skutečná délka jednoho dílku závisí na použitém objektivu a mění se s jeho zvětšením.



Mikrofotografie objektivového měřítka (1 mm)

Určení mikrometrických koeficientů (k) pro jednotlivé objektivy školního mikroskopu CHK-2:

Pomůcky: **objektivové měřítko** (objektivní mikrometr) – (OB měřítko)
 okulárové měřítko (okulárový mikrometr) – (OK měřítko) vložený do okuláru na clonku, stupnicí dolů
 případně samostatný měřicí okulár 10x pro mikroskop CHK-2 s již vestavěným OK měřítkem

Postup měření:

1. Na stolek mikroskopu vložíme místo preparátu objektivové měřítko.
2. Okulárem s měřítkem zaostříme objektivové měřítko.
3. Obě měřítka srovnáme do rovnoběžné polohy otočením okuláru a posunem objektivového měřítka na křížovém stolku tak, aby se vzájemně překrývaly.
4. Objektivní mikrometr posouváme až do okamžiku, kdy se jeho počáteční ryska kryje s počáteční ryskou OK měřítka. Hledáme pak, která další ryska OK měřítka se přesně kryje s některou ryskou OB měřítka a spočítáme, kolik dílků OK a OB stupnice se vzájemně rovná.
5. Vypočítáme **mikrometrický koeficient (k)** použitého objektivu podle vzorce:

$$k = \frac{\text{počet dílků OB měřítka} \cdot 10}{\text{odpovídající počet dílků OK měřítka}} \quad [\mu\text{m}]$$

Mikrometrický koeficient udává, kolika mikrometrům odpovídá jeden dílek OK měřítka pro daný objektiv.

6. Vypočítané hodnoty **k** pro jednotlivé objektivy školního mikroskopu zapíšeme do tabulky.

Poznámka:

Mikrometrický koeficient platí jen **pro určitý objektiv, okulár a danou délkou tubusu**. Mění-li se některá z těchto složek, musí se koeficient vypočítat znovu.

Mikrometrický koeficient (k)

pro objektivy školního mikroskopu CHK-2 Olympus:

obj. 4x k = 25 [μm]
obj. 10x k = 10
obj. 20x k = 5
obj. 40x k = 2,5
obj. 100x (imerze) k = 1
