

**UNIVERZITA PALACKÉHO
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



Katedra buněčné biologie a genetiky

Cvičení z Cytotaxonomie a cytogenetiky

(KBB/CCGSB)

pro posluchače Přírodovědecké fakulty UP

Pavla Válová
Jarmila Číhalíková

Olomouc 2017

Cvičení z Cytotaxonomie a cytogenetiky (KBB/CCGSB)

vedoucí:	Mgr. Aneta Grycová, Ph.D. Mgr. Eva Jiskrová, Ph.D. Mgr. Jan Vrána, Ph.D.
studijní kombinace:	MBB3, ZOO, BOT
typ - semestr - rozsah:	A - Z - 2 (blokováno do 4-hodinových cvičení)
ukončení:	zápočet (test)
kredity:	4 – společně s přednáškou Doc. Ing. Jaroslava Doležela, DrSc.

Sylabus cvičení:

G1

- **Úvodní cvičení:** Program na semestr, poučení o bezpečnosti práce v cytologické laboratoři. Seminární práce. Základy mikroskopování na školním mikroskopu.
- **Identifikace chromozómu – I - Mitóza:**
Historie cytogenetiky, principy mikroskopie, techniky barvení chromozómů. Metafázní chromozómy v kořenových špičkách cibule, bobu a ředkvičky - předpůsobení, fixáž, macerace, barvení. Feulgenova reakce, příprava roztlakových a trvalých preparátů - vyhodnocení vlastních preparátů.

G2

- **Diferenciální barvení chromozómů, metody živočišné cytogenetiky:**
C, Q, G, N – banding. Barvení jadérka a organizátoru jadérka – NOR u bobu a cibule. Metody živočišné cytogenetiky. Preparace a barvení mozkových ganglií *Drosophila melanogaster*.

G3

- **Identifikace chromozómu – II - Meióza:**
Chromozómy v meióze. Rychlé barvicí techniky v rostlinné cytologii - orcein, karmín, barvení hematoxylinem. Barvení prašníků pažitky (*Allium schoenoprasum*) laktopropionorceinem a železitým acetokarmínem, orientace ve fázích meiózy a přesný popis vlastního meiotického preparátu. Demonstrace různých karyotypů rostlin a živočichů.

G4

- **Velikost genomu, aneuploidie:**
(pracoviště ÚEB Olomouc – Mgr. Jan Vrána, Ph.D.)
Materiály ke cvičení budou dodány dodatečně.

Metody humánní cytogenetiky:

Cytogenetika a molekulární cytogenetika hematologických malignit.

Přednáška Mgr. Heleny Urbánkové, Ph.D. a exkurze v laboratořích Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci (Teoretické ústavy LF UP, Hněvotínská 5, 6. Patro)

Zápočtový test – termín po dohodě

Podmínky k udělení zápočtu:

1. 100% účast na cvičeních
2. vypracovaná seminární práce
3. zápočtový test (70% úspěšnost)

Požadavky na seminární práci:

- Témata:**
- vybrat konkrétní problematiku z doporučených témat nebo dle vlastního výběru týkající cytologie a cytotaxonomie (na konkrétní téma se mohou hlásit maximálně 3 studenti)
 - zaměřit se i na novinky v daných základních tématech

Formální požadavky: cca 3 strany na PC, formát A4; písmo Times New Roman 11 nebo 12, řádkování 1,15. Zarovnat do bloku. Uvést zdroje informací; použít nejméně 3 zdroje citací (alespoň jedna citace z odborného článku nebo z knihy; **zdroje správně citované**) a text doplnit o obrázky nebo schémata (vždy zdroj; zdroj uvádět hned pod obrázkem).

Soubor poslat (**ne** ve formátu PDF) na mail vedoucího (valovapavla@centrum.cz) s označením: **příjmení autora, kód cvičení, název práce (zkráceně) (bez háček a čárek) a rok vypracování.**
Příklad: Kacirova_CCGSB_Philadelphsky chromozom_2016

Pozn.: Seminární práce nesmí být okopírovaná a musí být nejen z odborného, ale i jazykového hlediska v pořádku a **napsaná v souvislém textu** (ne jako osnova).

Doporučená témata seminárních prací do Cvičení z cytotaxonomie a cytogenetiky (KBB/CCGSB)

Téma	Jméno 1	Jméno 2	Jméno 3
Aberace			
Albert Levan			
Alternativní prodlužování telomer			
Amniocentéza			
Aneuploidie u člověka			
B – chromozómy a jejich význam			
Banding			
Buněčné cykly (neúplné buněčné cykly)			
Cytogenetické nástroje pro určení cytotaxonomie a evoluce karyotypu			
Diagnostika nádorů na chromozomální úrovni			
Downův syndrom			
Eugenika			
Genetika člověka			
Genetika melanomu			
Genetika rostlin			
Genetika živočichů			
Genomové mutace			
Genová terapie			
GFP a jeho využití			
Historie objevu chromozómů			
Chromozómové počty a jejich význam pro taxonomii problematických rodů			
Chromozómová teritoria			
Chromozómové aberace			
Inhibitory telomerázy			
Karyotyp člověka			
Marfanův syndrom			
Meiotický tah			

Metody barvení chromozómů			
Metody studia chromozómů			
Milníky cytotaxonomie			
Molekulární metody v cytogenetice			
Nobelovy ceny v cytogenetické a cytotaxonomické oblasti			
Nový pohled na B-chromozómy			
Philadelphský chromozóm			
Pohlavní chromozómy			
Polyploidie – význam pro evoluci			
Polyploidie u krytosemenných rostlin			
Polyploidní úrovně u vybraných rodů			
Poškození a reparace DNA			
Prenatální diagnostika			
Průtoková cytometrie a její využití v cytogenetice a cytotaxonomii			
Rekombinace a její význam pro genetickou variabilitu			
Telomery			
Teorie sobeckého genu			
Vektory používané při klonování			
Vývoj cytologických barvicích technik			
Význam cytotaxonomie			
Významné mezníky v historii cytogenetiky – vlastní výběr			
Významné osobnosti v cytotaxonomii a cytogenetice (Barbara McClintock, Walther Flemming, Albert Levan ...)			
Vznik nádorového onemocnění			
Y – chromozóm			

Doporučené zdroje:

Zajímavé články: <http://www.osel.cz>

Esej: George Klein: Ateista a Svaté město a jiné eseje (Čiřařovy nové řaty). Vesmír 79, 166, 2000/3.

Campbell N.A., Reece J.B.: Biologie. Computer Press, a.s., Brno, 2006.

Kočárek E., Pánek M., Novotná D.: Klinická cytogenetika I. Skriptum UK 2. LF, Karolinum, Praha, 2006.

Lewis R.: Human Genetics, Concepts and Applications, 9th edition, The McGraw-Hill Companies, 2010.

Pritchard D.J., Korf B.R.: Základy lékařské genetiky. Galén, 2007.

Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika. [Masarykova univerzita, Brno, 1. vydání.](#) 2009.

Strachan T., Read A.: Human molecular genetics. Taylor & Francis Group, LLC., Garland Science, 2011.

Thompson & Thompson: Genetics in medicine. 6. Vydání. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001.

Zásady bezpečnosti práce

1. Každý student je povinen znát a dodržovat základní bezpečnostní předpisy při práci s ohněm, elektrickým proudem a chemikáliemi (zvlášť nebezpečné jedy, ostatní jedy, kyseliny, zásady). Proškolení provede na počátku kurzu vedoucí cvičení.
2. Každé poranění hlásit vedoucímu cvičení a úrazy zapsat do "Sešitu úrazů".
3. Přístup do laboratoře mají pouze osoby, které tam pracují. Studenti se mohou pohybovat pouze v prostorách vyhrazených ke cvičení. Platí přísný zákaz manipulace se zařízením a přístroji, které nejsou určeny k provádění konkrétního cvičení.
4. Vstup do laboratoře je povolen pouze v přezůvkách a ochranném laboratorním plášti (ne z umělých tkanin!).
5. Každý student zodpovídá za průběh své práce, za svěřené zařízení, přístroje, nářadí a materiál a za udržování pořádku a čistoty na pracovním stole.
6. V laboratoři platí zákaz pití, jídla a kouření. K pití nikdy neužívat laboratorní nádoby.
7. Vodovodní odpad se nesmí znečišťovat pevným odpadem (zápalkami, filtračním papírem, agarem a pod.)
8. Po ukončení cvičení je nutné vypnout přístroje a zařízení, schovat přístroje, vrátit nástroje a zapůjčené pomůcky, umýt používané sklo a nářadí a uklidit pracovní místo.
9. Po ukončení nebo při přerušení práce si pořádně umýt ruce.

Poznámky:

Práce s chemikáliemi:

- Používat ochranné pomůcky (gumové rukavice)
- Při polití kyselinou → důkladně omýt tekoucí vodou a neutralizovat 1% roztokem NaHCO_3 (hydrogenuhličitan sodný)
- Při polití louhem → důkladně omýt tekoucí vodou a neutralizovat 1% roztokem kyseliny octové (příp. citrónovou šťávou)
- Při zasažení očí → oplachovat delší dobu pod proudem vody, **vyhledat lékaře!!!**
- Při požití kyseliny → vypít suspenzi oxidu hořečnatého ve studené vodě
- Zásada při zředování kyselin: **kyselinu vlévat pomalu do vody!!!**
- **Nikdy nepipetovat ústy!!!** (používání pipetovacích násadců)

Úrazy elektrickým proudem:

- Nemanipulovat s elektrickými šňůrami, zásuvkami, žárovkami
- Při vypínání šňůry elektrického spotřebiče vždy přidržet zásuvku rukou
- Znat umístění hlavního vypínače elektrického proudu pro laboratoř

Nebezpečí požáru:

- Znat umístění hasicích přístrojů na pracovišti, jejich náplň a použití
- Znat umístění únikového východu z pracoviště
- V případě vzniku požáru uhasit požár dostupnými hasebními prostředky nebo provést opatření k zamezení jeho šíření
- Vznik požáru ohlásit (nebo zabezpečit jeho ohlášení) na HZS Olomouc (telefonní číslo **150**) a uvést - kde hoří (**i město Olomouc – ústředna je v Brně!**), co hoří, kdo volá, odkud volá (tel. č.), zraněné osoby a vyčkat na zpětný dotaz u telefonu
- Provést opatření pro záchranu ohrožených osob a majetku
- Potom vznik požáru ohlásit policii (tel. 158, 156)

Důležitá telefonní čísla:

Rychlá záchranná služba	- 155
Tísňové volání (Evropa)	- 112 (především pro cizí státní příslušníky)
Lékařská služba první pomoci	- 585 544 444
Policie - tísňové volání	- 158
Městská policie	- 156
Hasiči	- 150
Informace o telefonních číslech	- 1180

Další zásady práce v laboratoři:

- opatrnost při umývání laboratorního skla
- neochutnávat chemikálie
- nepokládat zátky od chemikálií na pracovní stoly
- při práci s hořlavinami dbát na dobré odvětrávání par, které se mohou vznítit od okolního plamene nebo tepelného zdroje
- při rozliti hořlaviny zhasnout hořáky, vypnout elektrické spotřebiče v pojistné skřini, intenzivně větrat
- při práci s lihovým kahanem **pozor!!!** - plamen je světle modrý a nebývá zřetelný; dbáme na to, abychom delší vlasý měli sepnuté gumičkou a do blízkosti kahanu nedávali hořlavé předměty
- pozor na možné nahromadění par etanolu nad lihem v lihovém kahanu a jejich případné vznícení při zapalování knotu kahanu
- při vzplanutí malého množství lihu v kádince udusit plamen položením nehořlavé misky (Petriho miska) na kádinku, malé množství hořícího lihu nechat vyhořet (z okolí odstranit hořlavý materiál), případně k udušení plamene použít vlhký hadr
- při práci s éterem dbát zvýšené opatrnosti (možnost vznícení či výbuchu i od horkých součástí) a intenzivně větrat

Hašení požáru na pracovišti:

- Při vzniku požáru je nutno zachovat klid, neztratit duchapřítomnost a okamžitě a účelně zasáhnout.
- Nejprve pomůžeme osobám zasaženým plamenem (uhašení oděvu), potom vypneme elektřinu a odstraníme hořlaviny z blízkosti plamene.
- Požár menšího rozsahu (např. hořící kapalina v nádobách) se snažíme zadusit přiklopením víka nebo vlhkým hadrem.
- **Voda** není vhodná na hašení látek, s nimiž reaguje za tvorby hořlavých plynů. Je vhodná na hašení hořícího lihu (dobře se s ním mísí). **Elektrické vedení se vodou nehasí !!!**

Hasicí přístroje:

- **Práškový PHP** (obsahuje univerzální hasicí prášek), dochází k poklesu energie potřebné k hoření a izoluje hořící předmět od okolního vzduchu. Je **vhodný** na žhnoucí pevné látky, na kapalné látky (benzín, olej, laky, dehet), na plynné látky (acetylen, metan, vodík), na zařízení pod elektrickým napětím do 1 000 V. **Nevhodný** na volně uložené organické látky (piliny, prachy, potraviny – mouka, volně uložený papír). Uvedení do provozu – viz návod na obalu.
- **Sněhové přístroje** (obsahují kapalný CO₂) jsou vhodné k hašení potravin a hořlavých kapalin, včetně acetylenu. Můžeme jich využít k hašení elektrického vedení pod proudem. Nesmí se hasit prach a volně uložené organické látky.
- **Pěnové přístroje** se používají k hašení všech minerálních olejů, benzínu, tuků, dehtu, laků a všech organických hmot. Nehodí se k hašení lihu, éteru, které chemickou pěnu rozkládají. Nesmí se používat k hašení zařízení pod elektrickým proudem!

**Nelze-li požár zlikvidovat vlastními silami, je nutné volat hasiče
(tel. 150) !!!**

CVIČENÍ Č. 1

METAFÁZNÍ CHROMOZÓMY

HISTORIE CYTOGENETIKY

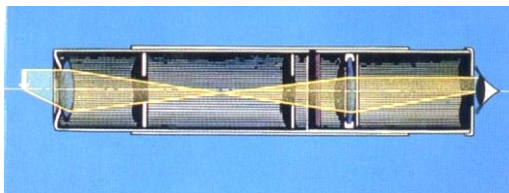
Historie cytogenetiky je spojena s vynálezem mikroskopu a se studiem buňky.

1600 - 1700: Vynález drobnohledu. Doba klasických mikroskopiků – objevení zákonů světla, vznik geometrické optiky.

Před 300 lety začali první biologové svými primitivními mikroskopy studovat biologický materiál od kůry stromů (Hooke) až po lidské spermie (Leewenhoek). Mikrotechnika se rozvíjela od svých jednoduchých počátků, kdy byly zkoumány rostlinné části bez další úpravy.

Hans a Zachariash Jannsenovi (otec a syn)

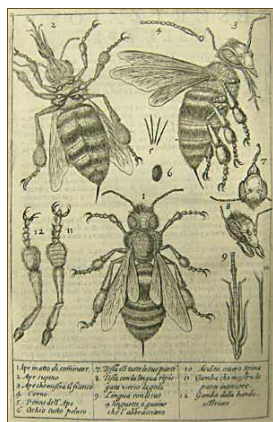
Kolem roku 1590 byl vyvinut první složený (kompaundní) použitelný mikroskop (viz obr.)
Zvětšoval 60x.



Zdroj: propagační materiály Olympus

Francesco Stelluti (1585-1630)

Ital, používal Galileův mikroskop. První kresba včely pomocí mikroskopu r. 1625, publikace o 5 let později v Římě.



F. Stelluti: Kresba včely; detail složeného oka (zdroj Google)

Robert Hooke (1653-1703)

Anglický badatel. První správce přístrojů Královské společnosti v Londýně.

Roku 1665 pozoroval **tenké řezy kůrou korkovníku** pod složeným mikroskopem a objevil, že se skládají ze soustavy malých komůrek a připomínají pláštěv medu. Latinsky je nazval **cellulae** (celula = buňka; cely mnichů). Slovo buňka použil, aby popsal malé boxy nebo póry, které viděl pod mikroskopem. Všechna pozorování představil ve své publikaci „**Micrographia**“ (1665). Je to 38 měděných destiček s detailními popisy Hookových pozorování a interpretací. Zahrnují popisy blechy, vší, složeného oka mouchy. Většinu kreseb si dělal sám.

Přestože výroba skla byla již velmi dobře vyvinuta v antice, oční čočky pro optické pozorování byly v Evropě vyvinuty nejprve jako oční čočky nahrazující dnešní brýle. Hookův mikroskop z r. 1665 byl složen z více čoček. Kondenzor se skládal z vodou naplněné koule a další čočky k soustředění světla. Zvětšení, kterého dosáhl, nebylo větší než 150x. Hooke pozoroval buňky v kouscích kůry, omatidia ve složeném oku mouchy, šupiny na těle mola a mnoho dalších detailů zvířat, rostlin i neživých objektů.

(Traduje se, že Robert Hooke byl prý ve vědě tak dobrý, že mu i Newton, jeho současník a největší učenec té doby, záviděl.)

Marcello Malpighi (1629-1694)

Italský anatom (profesor v Bologni). Použil mikroskop ke studiu orgánů a tkání rostlin a živočichů. Jeho anatomie rostlin (práce "**Anatomia plantarum**" – 1679) se zakládá na mikroskopickém výzkumu jak vnitřní stavby, tak i morfologie.

Nehemiah Grew (1641-1712) – současník Malpighiho

Anglický lékař a rostlinný anatom. Pracoval s R. Hookem v Londýně. Popsal dužinu a póry dřeva. Publikoval dva ilustrované časopisy o mikroskopické anatomii rostlin. Vyslovil teorii, že **pestík u rostlin je samičí a tyčinky s pylem samčí pohlavní orgány**.

Je známý knihou „*The Anatomy of Plants*“ z r. 1682.

Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) – je pokládán za „otce“ mikroskopie

Majitel obchodu ve městě Delftu v Holandsku. Věnoval se konstrukci a designu mikroskopů. Zlepšil výrobu čoček, a tak dosáhl většího zvětšení. Pozoroval celou řadu rostlinných a živočišných objektů, také spojování spermií s vajíčky u žab a ryb. Zavedl **jednoočkový systém** do mikroskopu (téměř kulovitá malá čočka zvětšovala až 270x). Objevil jádro, ale neidentifikoval je. **Jako první pozoroval bakterie, protozoa (prvoky), spermie**. Za pomoci anglického lékaře Regniera Graafa (viz Graafův folikul) napsal 120 obsáhlých dopisů o svých pozorováních Královské akademii v Londýně. Zemřel v Delftu ve svých 91 letech. Zůstalo po něm několik stovek (cca 500) ručně dělaných mikroskopů. Speciální sadu 26 přístrojů odkázal Královské akademii, jejímž byl členem.

Významné objevy:
1675 – prvoci
1677 – spermie a krevní kapiláry
1683 - bakterie

Jan Swammerdam (1637-1680)

Rovněž Holanďan, pocházel z Amsterdamu. Užíval ke své práci mikroskop, zabýval se vývojem hmyzu. Dělal detailní **anatomické studie hmyzu a jiných bezobratlých**. Jeho klasifikace byla založena na rozsahu morfologických změn. Byl mistrem v rozpitvávání a řezů (jepice).

1700 - 1800: Století amatérů mikroskopů - zlepšení mikroskopů pouze mechanické, nikoli optické.

Rudolf Jakob Camerarius (1665-1721)

Německý botanik a profesor medicíny. V roce 1694 informoval o opylovacích procesech a existenci sexuální reprodukce u kvetoucích rostlin. Posléze uzavírá, že **pyl je samčí a pestík samičí element**. Jeho práce dává možnost založení experimentů k hybridizaci rostlin. Připisoval se mu **první umělý kříženec** mezi konopím a chmelem.

Joseph Gottlieb Koreuter (1733-1806)

Německý botanik; publikoval **informace o hybridech mezi rostlinnými druhy**, které se podobaly jednomu rodiči nebo druhému, anebo jevíly jejich kombinaci. Byl první, kdo takové experimenty zavedl. Prováděl pokusy s tabákem. Jedno z jeho mnoha hodnotných pozorování na reciprokých kříženích ukazovalo **rovnost, s kterou přispívají oba rodiče stejnoměrně**.

1800 – 1900: Dokonalá optika od Ernsta Karla Abbého v Jeně – dokonalé objektivy (achromáty) i okuláry, Abbého teorie vzniku obrazu a zavedení **homogenní imerze** umožňující vývoj **cytologie** a **bakteriologie**. **Carl Zeiss** - průmyslová výroba mikroskopů (1847); **Otto Schott** - výzkum optického skla. Polarizační mikroskop. Vznik buněčné teorie, vývoj normální a patologické histologie, buněčná patologie; vznik mikrotechniky.

Jan Evangelista Purkyně (1787-1869)

Český fyziolog; **spoluzakladatel cytologie**. Roku 1825 první objevil **jádro u živočišné buňky** (pomocí lupy v ptačím vejci). Od r. 1832 používá ke svým pozorováním kvalitní mikroskop.

Robert Brown (1733-1858)

Skotský botanik, který již používal kvalitnější mikroskop, s jehož pomocí zjistil, že každá **rostlinná buňka** obsahuje kulatou strukturu, kterou nazval **jádro** (1831). Známy je i tzv. „Brownův pohyb“.

Hugo von Mohl (1805-1872)

Německý lékař a profesor fyziologie, později botaniky. Je obecně považován za **zakladatele moderní rostlinné cytologie**. Popsal **buněčné dělení** a zdůraznil význam protoplazmy.

Matthias Jacob Schleiden (1804-1881)

Německý botanik. Navrhl **buněčnou teorii**, kde formuloval, že buňka je základní jednotkou biologického organismu. Byl vystudovaný právník, posléze se stal profesorem botaniky v Jeně. Poznal důležitost Brownova objevu buněčného jádra. Sám objevil v jádře formace, která jsou nyní známá jako **jadérko – nucleolus**.

Theodor Schwann (1810-1882)

Profesor anatomie v Německu. Pracoval se Schleidenem na buněčné teorii. Aplikoval jeho objevy u rostlin na živočichy. Roku 1838 formuloval jednotnou teorii buněčné organizace – **buněčnou teorii**:

1. Všechny organismy se skládají z jedné nebo více buněk;
2. buňka je základní stavební jednotka organismu a v mnohobuněčném organismu má svůj specifický úkol.

O dvacet roků později bylo přidáno 3. dogma, a to fyziologem **Virchovem**:

3. Buňka může vzniknout pouze z jiné buňky, a to buněčným dělením.
(1855 - známá věta „*Omnis cellula ex cellula*“)

Rudolf Ludwig Carl Virchow (1821–1902)

Německý profesor patologické anatomie, **zakladatel buněčné patologie**; upřesnil a opravil některé závěry Schleidena a Schwanna a upozornil, že **dělení buňky závisí na dělení jádra**. Počátky buněčné struktury a života vůbec viděl v tvůrčím aktu Boha.

Gregor Mendel (1822-1884) – uváděn jako rakouský badatel

1865 matematicky definoval některé zákonitosti genetického přenosu.

- zákon segregace (čistota vloh)
- zákon nezávislé kombinace (volná kombinovatelnost vloh)

Francis Galton (1822–1911)

Anglický badatel a člen Královské společnosti; v roce 1869 publikoval „*Hereditary genius*“, a tak založil na vědeckých základech **humánní dědičnost**. Vyvinul koncept kvantitativní analýzy polygenních znaků. Je zakladatelem **eugeniky** (= sociálně-filosofický směr zaměřený na studium metod, které povedou k dosažení co nejlepšího genetického fondu člověka).

Pokrok v chemii:**Frederik Miescher (1844–1895)**

Švýcarský chemik, který v roce 1871 informoval o tom, že izoloval **kyselinu nukleovou a nukleoprotein**. Zjistil, že je možné dát buňky do suspenze, předpůsobit je a separovat jádra. Z těchto jader preparoval látku významných vlastností, později známou jako DNA. Ze spermií lososů izoloval látku, kterou nazval protamin. Jestliže se protamin slučuje s kyselinou nukleovou, látku nazýváme nukleoprotein.

Walter Flemming (1843–1905)

Rakouský cytolog, který **popsal chromozómy jako vláknitá tělíska v dělicích se buňkách**. Pozoroval jejich podélné dělení a vznik dceřinných jader (své výsledky publikoval v roce 1882 ve své klíčové knize „*Zell-substanz, Kern und Zelltheilung*“ - Cytoplazma, jádro a buněčné dělení). Tento proces nazval v roce 1879 **mitóza**. Studoval je na živých i na fixovaných buňkách mloka. Vyvinul **fixovací a barvicí metody**, aby se zviditelnily cytologické detaily. Studoval problémy buněčného dělení, zkoumal lidské chromozómy. Buněčné dělení demonstroval v epitelu rohovky u člověka (tzv. Flemmingova demonstrace).

- autor termínu mitóza a chromatin
- počet chromozómů před a po mitóze je stejný

1900 a později: Ultramikroskop a elektronový mikroskop umožňující další analýzu buňky a studium bakteriofágů a virů; díky fázovému kontrastu se může vyvíjet studium živých buněk. Fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskop, počítačová technika ve spojení s kvalitními mikroskopy. Mikromanipulátor.

Theodor Boveri (1862–1915) a Oscar Hertwig (1849–1922) (celé jméno: Wilhem August Oscar Hertwig)

Objevíli podstatu redukčního dělení, popsali **meiózu**.

Boveri přispěl k formulaci **chromozómalní teorie dědičnosti**.

Carl Correns (1864–1933) (celé jméno Carl Franz Joseph Correns)

Německý botanik, v roce 1900 s Hugo de Vriesem a Erichem von Tschermakem byl jedním **ze tří znovuoobjevitelů základních principů dědičnosti**, které byly objeveny **Mendelem v roce 1866**.

Dělal pokusy s křížením na kukuřici, fazolích a hrachu. Studoval Mendelovy práce a došel ke stejným závěrům jako Mendel i ke stejným numerickým vztahům.

Hugo de Vries (1848–1933)

Dánský botanik a jeden z prvních genetiků. Znovuobjevitel Mendlových zákonů a zakladatel **mutační teorie**. Zavedl termín **mutace**, znamenající změnu, a své výsledky shrnul v knize „*Mutační teorie*“. Jeho mutace zahrnují změny ve struktuře chromozómu a jejich počtu.

Erich von Tschermak (1871–1962)

Rakouský botanik, jeden ze znovuobjevitelů Mendlových zákonů.

Zabýval se **praktickým křížením rostlin**, zejména hrachu.

Tito tři znovuobjevitelé Mendlových zákonů se proslavili každý na svém vědeckém poli:

Correns položil základy výzkumu dědičnosti, **de Vries** pro mutační teorii, **Tschermak** pro praktické křížení rostlin.

Walter S. Sutton (1876–1916)

Americký genetik. Ukázal význam redukčního dělení a navrhl **chromozómní teorii dědičnosti**.

1933 - cytologie + genetika = cytogenetika

William Bateson (1861–1926)

Britský biolog na Cambridské univerzitě, zajímal se o Mendelovy práce, prozkoumal devět rostlinných druhů a čtyři živočišné. Zavedl termíny **genetika**, **alela**, **homozygot** a **heterozygot**. Popsal první **příčiny genetické vazby** (z genetiky: Batesonovo číslo (c) - udává kolikrát častěji se vyštepí původní rodičovské gamety než rekombinované).

Thomas Morgan (1866–1945) (celé jméno: Thomas Hunt Morgan)

Americký genetik. Objevitel **genetiky drozofily** (1909 – zjistil význam chromozómů při mechanismech přenosu dědičných vlastností drozofily).

Studoval historii přírody, zoologii a makromutace u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Je považován za jednoho z nejvýznamnějších genetiků historie, neboť prokázal, že **geny jsou umístěny na chromozómech** a na základě tohoto poznatku zformuloval **Morganovy zákony dědičnosti** (viz DODATKY).

Ironií osudu je, že Morgan byl svěřepým odpůrcem teorie o umístění genů na chromozómech a své pokusy s octomilkou prováděl původně za účelem jejího jednoznačného vyvrácení; ovšem zejména pro tento objev mu byla v roce 1933 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu.

Robert Feulgen (1884–1955) (celé jméno: Robert Joachim Feulgen)

Německý biochemik; v roce 1924 spolu s **H. Rossenbeckem** popsal **test pro detekci DNA**. Tato specifická barvicí reakce je nyní známa jako **Feulgenova reakce**. Oba dokázali, že nukleové kyseliny brzlíkového typu jsou i v rostlinách.

Feulgen, R., Rossenbeck, H. (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Z. Phys. Chem. 135: 203-248.

Emil Heitz (1892-1965)

Německý genetik; v roce 1933 objevil **význam obřích (polytenních) chromozómů** slinných žláz dvoukřídlého hmyzu jako důležitý objekt cytogenetického významu. Tyto struktury byly objeveny před rokem 1881 (Balbianiho prstence, „puffs“), ale nebyly identifikovány jako chromozómy. Jsou 100–150x větší než mitotické chromozómy. V roce 1928 Heitz jako první rozlišil **dva typy chromatinu**, který nazval **euchromatin** a **heterochromatin**. Euchromatin se barví v interfázi nebo profázi světla nebo vůbec, zatímco heterochromatin se v těchto fázích barví intenzivně tmavě.

V roce 1931 Heitz prokázal vztah mezi počtem jadérek v interfázním jádře a počtem určitého typu chromozómu, nyní nazvaných **satelitní chromozómy**, tj. chromozómy nesoucí **sekundární konstrikci**. Studia těchto chromozómů ukázala, že jádérko je organizováno na specifické straně chromozómu.

Torbjörn Oskar Caspersson (1910-1997)

Vedoucí lékařského výzkumu a oddělení genetiky ve Švédsku; v roce 1936 vyvinul **UV mikroskopii** (mikrofotometrii) pro studium nukleových kyselin. **Kvantitativní mikroskopie** (stanovení proteinů a DNA v jádře). V té době si myslel, že dědičnost je zakódována v proteinech a DNA je jen jednoduchý polymer tvořící kostru. Zavedl **proužkování chromozómů – banding** (Q-banding) (barvením se některé oblasti barví tmavě a některé světle). (neplést - v botanice Casparyho kroužek!)

Murray Barr (1908-1995) (celé jméno Murray Llewellyn Barr)

Kanadský lékař; v roce 1949 náhodně objevil malé barvitelné tělísko v nedělicím se jádře samčího genotypu a jeho absenci u genotypu samčího. Toto tělísko je významným znakem a je nazvané **sex-chromatin** neboli **Barrovo tělísko**.

Barr, M.L., Bertram, E.G. (1949): "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis". Nature 163 (4148): 676–677.

Albert Levan (1905-1998) (celé jméno John Albert Levan)

Švédský botanik a genetik - profesor cytologie na univerzitě v Lundu; v roce 1950 ukázal výsledky **roztlačkové techniky s oxychinolinem** u čtyřiceti rostlinných druhů. Svou práci soustředil na zkoumání chemických látek, které umožní analýzu chromozómů. Chromozómy v metafázi byly zkrácené, věténko bylo rozrušené, mnoho buněk zastaveno při dělení v metafázi. Později aplikoval techniku roztlačku na lidské tkáni. V roce 1956 publikoval článek, kde udává **počet chromozómů u člověka $2n = 46$** . Tento počet získal z tkáňové kultury plicní tkáně ze čtyř rozdílných embryí. Později se věnoval vztahu chromozómů a rakoviny. V roce 1956 zjistil 70 – 80 chromozómů karcinomu plic a žaludku u člověka.

Tjio, J.H., Levan, A. (1956): The chromosome number of man. Hereditas 42: 1-6.

Levan A., Fredga K. et Sandberg A. A. (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Vznik oboru molekulární biologie:

Francis Crick (1916-2004) (celé jméno – Sir Francis Harry Compton Crick)

Britský biofyzik a genetik. V roce **1953** s Američanem **Jamesem Watsonem** publikovali studii, kde popsali model molekulární struktury DNA. Dnes je nazván jako **model Watsona a Cricka**. V roce **1962 získali Nobelovou cenu** za medicínu a fyziologii společně s Novozélandčanem **Wilkinsem**. Objev dvojité šroubovice struktury DNA byl založen na úspěchu Wilkinse a jeho kolegů, kteří měli roentgenový snímek molekuly DNA od Franklinové. Watson a Crick brilantní dedukcí dospěli ke struktuře molekuly DNA.

Ernest J. DuPraw

Model struktury chromatinu (jeden chromozóm = 1 smotaná molekula – Folded Fiber Model)

Současnými významnými cytogenetiky jsou:

Löve Á. (rostlinné chromozómy)

Ernest J. DuPraw (ultrastruktura chromozómu)

George Nomarski (DIC metoda)

Cytogenetika + molekulární biologie = molekulární cytogenetika:

Mary Lou Pardue (ISH - In situ hybridisation pro studium satelitní DNA)

J.G. Gall (ISH - In situ hybridisation pro studium satelitní DNA)

- genomická in situ hybridizace

- chromosome painting

DuPraw, E.J. (1970): DNA and chromosomes. New York: Holt, Rinehart and Winston.

Pardue, M.L., Gall, J.G. (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 168: 1356-1358.

HISTORIE CYTOGENETIKY - POKRAČOVÁNÍ

1930 - 1950

První elektronový mikroskop

Knoll a Ruska – 1932

Elektroforéza proteinů

Tiselius – 1933

Polytenní chromozomy

Painter, Heitz, Bauer – 1933

Organizátor jadérka

McClintock – 1934

Mikroskop-fázový kontrast

Zernicke – 1935

Korelace obsahu DNA s počtem chromozómů

Boivin – 1948

Struktura centroméry a její obsah DNA

Lima-de-Faria – 1950

Ultra-tenké řezy v elektronové mikroskopii

1950

1950 – 1970

Model DNA

Watson a Crick – 1953

Endoplazmatické retikulum

Porter – 1953

Golgiho aparát

Dalton – 1954

Objev lysozomů

De Duve – 1955

Lidské chromozomy; $2n = 46$

Tjio a Levan – 1956

Mediátorová RNA

Jakob a Monod – 1961

Repetitivní DNA

Britten a Kohne – 1968

1970 – 1980

Banding lidských chromozomů	Caspersson – 1970
DNA sekvenační techniky	Sanger a Coulson – 1975
Fúze lidské a rostlinné buňky	Dudáte – 1976
Genové knihovny (Gene libraries)	Maniatis – 1978

1980 – 1990

Kompletní sekvence mitochondriálního genomu u člověka	Sanger – 1981
Metoda DNA fingerprinting	Jeffries – 1985
Metoda PCR	Saiki - 1985
Vnesení lidského genu do myši	Kuehn – 1987

1990 – 2001

První příklad genové terapie u člověka	Anderson – 1990
Kompletní sekvence nukleotidů chromozómu 3 <i>Plasmodium falciparum</i>	Oliver – 1992
Úplná sekvence nukleotidů u mykoplazmy	Frazer – 1995
Sekvence lidského chromozómu 22	Dunham – 1999
Sekvence genomu <i>Arabidopsis</i>	2000
Sekvence lidského genomu	2001 (dokončení projektu HUGO)
HapMap projekt, hybridní embrya	2008
Systematické screeniny nádorů	2009

Nobelovy ceny související s cytogenetikou

V r. **1995** byla udělena **Nobelova cena za fyziologii a medicínu** za objasnění úlohy regulačních genů časného embryonálního vývoje; pokusy byly provedeny na drozofile (Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhardová a Eric F. Wieschaus).

Nobelova cena 2008 za chemii - za objev zelené fluoreskující bílkoviny (GFP):

Osamu Shimomura – první izoloval svítící bílkovinu z medúzy (1962)

Martin Chalfie – první praktické sledování proteinů v organismech pomocí GFP (značení neuronů pro hmatové receptory)

Roger Y. Tsien - objasnil fluorescenční mechanismus GFP a různými modifikacemi rozšířil škálu barev (emisní spektrum)

Nobelova cenu za fyziologii a medicínu za rok 2009:

Udělena trojici amerických vědců (**Elizabeth Blackburnová** (61) z Kalifornské univerzity, její bývalá studentka **Carol Greiderová** (48) z Univerzity Johnse Hopkinse a **Jack Szostak** (57) z Lékařského institutu Howarda Hughese), za příspěvní k pochopení mechanismu řídicího stárnutí buněk. Nobelova cena byla oficiálně udělena „za objev způsobu, jakým jsou chromozómy chráněny telomerami a enzymem telomerázou“.

Nobelova cenu za fyziologii a medicínu za rok 2012:

Udělena japonskému výzkumníkovi **Šinjaovi Jamanakaovi** a Britu **Johnovi Gurdonovi** za přínos v oblasti buněčného výzkumu. Objev laureátů pomohl "zásadním způsobem změnit chápání toho, jak se buňky a organismy vyvíjejí“.

Gurdonovi se už v roce 1962 podařilo vyjmout ze střevní buňky žáby genetickou informaci a vpravit ji do žabího vajíčka tak, aby se z něj vyvinul zdravý pulec. Šinja Jamanaka zase prokázal, že je možné již specializované buňky myši "přeprogramovat zpět" tak, aby se znovu staly kmenovými buňkami. Díky změně čtyř buněk byly tyto stavební kameny organismu připraveny dělit se v libovolné buňky.

ZÁKLADY MIKROSKOPIE

Některé důležité objevy v historii světelného mikroskopu

14. stol.	italští mniši	broušení čoček do brýlí
1590	Jannsenovi	první složený (kompandní) mikroskop
1655	Hook	popsal struktury, které nazval buňkou (celulla) – dvoučočkový m.
1674	Leeuwenhoek	objevil prvoky (<i>Protozoa</i>) – jednočočkový mikroskop
1831	Brown	popsal buněčné jádro
1838	Schleiden a Schwann	buněčná teorie
1857	Kölliker	popsal mitochondrie v buňce svalu
1876	Abbé	optické principy; rozlišovací schopnost objektivu
1879	Flemming	popsal chování chromozómů v mitóze
1881	Retzius	popsal tkáň živočichů
1881	Ramon y Cajal	barvicí techniky pro anatomii
1882	Koch	použil anilínové barvy, aby obarvil mikroorganismy; identifikoval bakterie cholery a tuberkulózy
	Pasteur	identifikoval mnoho chorob pomocí barvení a mikroskopu (kvasinky, vzteklna)
1886	Zeiss	zakladatel výroby mikroskopů
1898	Golgi	poprvé struktury buňky při barvení stříbrem (později nazvané Golgiho aparát)
1911	Reichert	fluorescence (název od světélkujícího fluoritu = kazivec)
1924	Lacassagne	první metoda autoradiografie
1930	Lebedeff	první interferenční mikroskop
1931	Knoll a Ruska	elektronový mikroskop
1935	Zernicke	zavedl fázový kontrast
1955	Nomarski	diferenciální interferenční kontrast (DIC)
1957	Minsky	patent na princip konfokálního mikroskopu
1968		rastrovací tandemový konfokální mikroskop
1978		laserový konfokální rastrovací mikroskop

Moderní mikroskopy jsou dnes poměrně složitým zařízením, jsou vybavené automatizací, mnohými přídatnými zařízeními včetně CCD kamer a jsou napojené na vysoce výkonnou počítačovou techniku. Toto spojení umožňuje zavedení vysoce specializovaných metod, které odhalují nejen další podrobnosti ve stavbě buňky, ale umožňují i přímé sledování jednotlivých molekul, a tím přispívají i k pochopení jejich biologických funkcí.

Světelná mikroskopie

Je základní metodou pozorování ve všech biologických oborech, jejichž předmětem je buňka (tkáň, pletivo, mikroorganismus), protože rozlišovací schopnost této metody odpovídá velikosti buněk a mnohých organel.

Světelná mikroskopie využívá k zobrazení světelné paprsky.

Podle osvětlení objektu rozlišujeme:

1. **mikroskopie v procházejícím světle** = světlo prochází pozorovaným objektem (např. transmittance)
Řadíme sem: mikroskopii ve světelném poli
mikroskopii v temném poli
mikroskopii fázově kontrastní
mikroskopii interferenční
mikroskopii polarizační
mikroskopii fluorescenční
2. **mikroskopie v dopadajícím světle** = světlo dopadá shora na povrch objektu (např. epifluorescence)

Podle osvětlení okolí objektu rozlišujeme:

- mikroskopie ve světlém poli
- mikroskopie v temném poli

POPIS MIKROSKOPU

Mechanické části: stativ, tubus, makro- a mikrošroub, revolverový nosič objektivů, stolek s držáky preparátu

Optické části: objektiv, okulár, hranoly

Osvětlení: zdroj světla, kondenzor, irisová (aperturní) a kolektorová (polní) clona

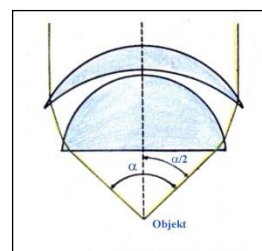
Objektiv a okulár – každý z nich se skládá ze soustavy čoček, které jsou jak spojné (konvexní), tak i rozptylné (konkávní) - kvůli korekci různých vad čoček. Při pohybu tubusu, tj. při ostření, nastavíme objekt mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností a ohniskem objektivu; potom vznikne obraz **skutečný, převrácený a zvětšený**. Obraz vytvořený objektivem je převrácený a okulár jej nazpět nepřevrací. **Výsledný obraz**, který pozorujeme, je **neskutečný, zvětšený a převrácený**. Na kvalitu obrazu má vliv objektiv, okulár jen zvětšuje ty detaily, které v obraze vytvořeném objektivem nejsou.

Objektiv je (mimo jiné) označen dvěma čísly:

1. **zvětšením** – kolikrát je objekt zvětšen v objektivu (např. 4x)
2. **numerickou aperturou** (NA někdy také N.A. nebo jen A)

Rozlišovací schopnost objektivu souvisí hlavně s jeho **numerickou aperturou** (NA), která je dána vztahem: $NA = n \cdot \sin \alpha/2$. Ta určuje rozlišovací schopnost mikroskopu, ovlivňuje světelnost mikroskopického obrazu, ovlivňuje hloubku ostrosti. Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že rozlišovací schopnost je závislá na **indexu lomu prostředí (n)** mezi přední (čelní) čočkou a krycím sklem (čím větší je index lomu tohoto prostředí, tím menší struktury rozlišíme, tím větší je rozlišovací schopnost objektivu), a dále souvisí s **velikostí otvorového úhlu (α)** (viz obrázek), což je úhel, který svírají dva krajní paprsky ohraničující světelný kužel paprsků, které přicházejí z určitého bodu do čelní čočky objektivu.

Viditelnost nějaké struktury v mikroskopu závisí i na **vlnové délce (λ)**. Čím kratší bude vlnová délka, tím menší bude rozměr struktury, kterou ještě můžeme rozlišit.



Rozlišovací schopnost objektivu (a) je pak dána vztahem:

$$a = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha/2} (= NA)$$

- a = rozměr struktury, kterou můžeme ještě rozlišit, nebo vzdálenost 2 bodů v objektu, které ještě odděleně rozlišíme (= skutečná míra rozlišovací schopnosti)
- λ = vlnová délka
- n = index lomu prostředí mezi přední čočkou objektivu a krycím sklem
- $\alpha/2$ = polovina otvorového úhlu objektivu

Rozlišovací schopnost mikroskopu rozlišit ve světle procházejícím kondenzorem dva blízko sebe ležící body a zobrazit je jako 2 body (**d**) a ne jako jeden bod, není určována jen zvětšením objektivu. Je určena číselnou aperturou objektivu i kondenzoru a délkou vlny použitého světla (bílé světlo 0,55 μm) podle vztahu, který definoval Abbé:

$$d = \frac{\lambda}{NA_{\text{obj.}} + NA_{\text{kon.}}}$$

Příklad: $\frac{0,55 \mu\text{m}}{1,4 + 1,4} = 0,196 \mu\text{m} (= 0,2 \mu\text{m})$

(Upřesnění výpočtu podle Rayleiho, zahrnující i difrakční jevy: $d = 0,61 \cdot \lambda / NA_{\text{obj.}} \rightarrow 0,239 \mu\text{m}$)

Z uvedených vztahů vyplývá:

- Objektiv má lepší rozlišovací schopnost, čím bližší dva body dovede rozlišit (okem rozlišíme 0,1–0,15 mm, tj. 150 μm ; u unaveného oka je to jen cca 300 μm).

- 0,2 μm je hranicí rozlišovací schopnosti vůbec, další zmenšení hodnoty $\underline{d}$, a tím zlepšení rozlišovací schopnosti, by bylo možné s použitím světla kratší vlnové délky (bílé světlo má $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$), neboť objektivy a kondenzory nemají obvykle numerickou aperturu větší než 1,4.
- Rozlišovací schopnost je tím větší, čím větší je numerická apertura objektivu. Číslo numerické apertury na objektivu nepřesahuje většinou 1 - je to hodnota pro tzv. suché objektivy, protože index lomu vzduchu je 1 ($\underline{n}$ vody = 1,33; $\underline{n}$ běžného skla = 1,51). Nejvyšší numerická apertura, které lze dosáhnout u suchých objektivů, je 0,95.
- Vzduch lze nahradit jinou látkou a zvětšit tak index lomu. To je např. **imerzní olej** (Olympus $\underline{n} = 1,51$); potom můžeme využít rozlišovací schopnosti imerzního objektivu s udávanou NA = 1,4.

Celkové zvětšení mikroskopu (M):

$$M = M_{\text{obj.}} \cdot M_{\text{ok.}} \cdot k_t$$

$M_{\text{obj.}}$ = zvětšení použitého objektivu

$M_{\text{ok.}}$ = zvětšení použitého okuláru

k_t = zvětšovací koeficient tubusu (projektiv) - u školního mikroskopu = 1

Užitečné zvětšení mikroskopu (Z):

U každého objektivu můžeme stupňovat zvětšení mikroskopu použitím silných okulárů jen po určité mez. Toto užitečné zvětšení souvisí s rozlišovací schopností lidského oka (tj. $d = 0,15 \text{ mm}$) a odvozuje se od hodnoty numerické apertury objektivu.

Pro užitečné zvětšení mikroskopu platí:

$$Z = 500 \cdot NA \text{ až } 1\,000 \cdot NA$$

(např. u obj. s NA = 1,25 Z = 625x až 1250x; maximálního zvětšení dosahující $500 \cdot NA$ se užívá u málo kontrastních preparátů; $1\,000 \cdot NA$ – u vysoce kontrastních (barvených) preparátů.

Základní typy objektivů:

Achromáty (A) – jednoduché, složené ze 2 až 6 čoček, je u nich částečně odstraněna chromatická vada, a to pro světlo červené a modré; běžné u jednoduchých školních mikroskopů;

Planachromáty (PlanA, někdy jen Plan) – korigovány jsou stejně jako achromáty + odstranění sférické vady (mají odstraněno vyklenutí zorného pole, kdy celá plocha je zaostřena stejnoměrně). Jsou důležité **pro mikrofotografii**;

Apochromáty (Apo) – soustava více čoček; vysoká numerická apertura; korekce pro světlo modré, červené i zelené, zorné pole vyklenutější – nevhodné pro černobílé mikrofoto, ale vhodné pro **barevnou mikrofotografii** a pro infračervené světlo;

Planapochromáty (PlanApo) – složité, náročné, drahé – odstranění barevné vady + sférické vady + koma; jedny z nejkvalitnějších objektivů; **vhodné pro mikrofoto**.

Kondenzor

– soustřeďuje světlo na preparát. Je to čočka nebo soustava čoček mezi světlem a preparátem, na spodní straně se nachází clonka složená z lamel (aperturní, irisová clona), které svírají otvor, který můžeme zvětšovat nebo zmenšovat. Správné nastavení aperturní clony zajišťuje optimální obraz objektu, tj. jasný a dostatečně kontrastní.

Metody světelné mikroskopie

1. Mikroskopie v temném poli

Metoda spočívá v tom, že ze světelného kužele vycházejícího z kondenzoru vstupují do roviny pouze okrajové, velmi šikmé paprsky (nikoli centrální, ty jsou odfiltrovány). Objekt je tedy osvětlen jen ze stran, paprsky se od něj odráží, lámou a ohýbají se na něm. Do objektivu vstupují pouze tyto paprsky odražené objektem. Proto objekt září v temném poli.

Metoda se užívá hlavně v bakteriologii, protozoologii a všude, kde potřebujeme zobrazit velmi malé objekty a jejich povrchové struktury.

2. Fázově kontrastní mikroskopie

Nabarvené mikroskopické objekty mění vlnovou délku a amplitudu procházejícího světla. To se projevuje jako rozdíly v barvě objektu a intenzitě světla.

Nezbarvené objekty, např. živé buňky, nemění amplitudu světla, které jimi prochází, ale posunují jen jeho fázi, a to v těch místech objektu, která se liší optickou hustotou, to je indexem lomu.

Podstata fázově kontrastního zařízení – objektivu a kondenzoru – spočívá v tom, že převádí pro nás neviditelné fázové rozdíly na amplitudové, které rozeznáváme.

Fázově kontrastní mikroskopie se užívá pro pozorování nezbarvených objektů, především struktur v živých buňkách. Může podstatně zvýšit kontrast také u slabě zbarvených a špatně rozlišitelných struktur. V cytologii tato metoda slouží ke zvýraznění málo barvitelných chromozómů při jejich počítání v metafázi.

3. Interferenční mikroskopie

Nastává rozklad a znovuspojení dvou světelných paprsků procházejících jednak objektem a jednak nezávisle na objektu. Dosahuje se toho různými fyzikálními způsoby, buď za využití polarizovaného nebo nepolarizovaného světla. Metoda umožňuje kontrastní až plastické zobrazení fázových objektů (průhledných a nezbarvených) lišících se lomivostí.

4. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence – je jev, kdy některé látky po dopadu světla o kratší vlnové délce září světlem o větší vlnové délce, tedy jiné barvy posunuté k červené části spektra. Je projevem intramolekulární energetické změny vzbuzené zářením absorbovaným v látce. K vyvolání fluorescence se užívá nejčastěji modrého a ultrafialového záření ze rtuťových vysokotlakých výbojek.

Objekt obarvíme fluorochromem (např. DAPI, akridinová oranž) a ozáříme světlem určité vlnové délky, které propouští excitační (budící) filtr a které vyvolá fluorescenci použitého barviva. Objekt pozorujeme okulárem přes bariérový (zábranný, ochranný) filtr, který pohltí světlo procházející excitačním filtrem (a které je škodlivé oku) a propustí jen světlo vzniklé fluorescencí. Struktury s navázaným fluorochromem pak září v temném zorném poli.

Tato metoda se používá k vizualizaci buněčných jader, chromozómů, buněčných stěn, jadérek, cytoskeletu a dalších struktur. V mikrobiologii slouží k rychlému orientačnímu průkazu bakterií a kvasinek. Velké uplatnění fluorescence je v imunobiologii (imunofluorescence přímá a nepřímá) a v moderních fluorescenčních metodách (FRAP, FRET, FLIP, TIRFM aj.), které umožňují i sledování pohybu jednotlivých označených molekul, a tím i pozorování životních pochodů probíhajících v čase.

5. Polarizační mikroskopie

Využívá se lineárně polarizovaného světla. Toto světlo se při průchodu dvojlomnými látkami rozkládá na dvě složky. Polarizační zařízení má dvě části: polarizátor a analyzátor, které obsahují polarizační filtry, a světlo prošlé těmito filtry je polarizováno. Rozliší se anizotropní (dvojlomné) struktury, které stáčí rovinu polarizovaného světla, od izotropních (jednolomných).

Polarizační mikroskopy umožňují přesná měření např. v mineralogii. V biologii se polarizační mikroskopie užívá pro zobrazení struktur s lineární orientací nebo krystalické povahy, např. příčně pruhované myofibrily, tonofibrily, krystalické inkluze, celulózní struktury u rostlin, výbrusy zubů a kostí apod.

6. Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Konstrukce optické soustavy světelného mikroskopu patentovaná roku 1955 Georgem Nomarskim. Je využito polarizace světla ve dvou polarizačních hranolech s fázovým posunem vznikajícím ve dvojlomných hranolových děličích tzv. Wollastonova typu. Světlo před vstupem do kondenzoru je nejprve lineárně polarizováno prvním hranolem (**polarizátorem**). Potom prochází **prvním hranolovým děličem** a vstupuje přes kondenzor do objektu a následně do objektivu. **Druhý hranolový dělič** je umístěn těsně za ohniskovou rovinou objektivu. Druhý polarizační hranol – **analyzátor** – pak vytvoří podmínky pro interferenci vzájemně posunutých obrazů → projeví se (ve formě různé intenzity světla) případné fázové posuny vznikající průchodem různě hustého prostředí v pozorovaném objektu (buňce).

Pomocí toto způsobu mikroskopování se **zdůrazní optický reliéf objektu**, který se u biologických objektů zpravidla shoduje s jejich reálným prostorovým reliéfem.

Přednost:

- nevzniká „halo“ efekt typický pro fázový kontrast (silně světlolomné okraje struktur)
- vhodná metoda pro pozorování silných, nebarvených preparátů (tlustších než 5 μm) a při mikromanipulačních technikách

Nevýhoda:

- objekty v režimu DIC se nemohou proměřovat – nedostaneme reálné hodnoty a tato metoda rovněž není vhodná pro pozorování objektů v plastových miskách, protože plasty depolarizují světlo.

7. Konfokální mikroskopie

Idea konfokálního mikroskopu byla patentována v roce 1957 Marvinem Minskim; první funkční konfokální mikroskop pochází z konce 70let. Převratné bylo využití laserového světla jako zdroje a počítače s velkou kapacitou pro následné vyhodnocení obrazu.

Princip konstrukce laserového skenovacího konfokálního mikroskopu (LSCM - Laser Scanning Confocal Microscope): Preparát je osvětlován bodovým zdrojem světla – **laserovým paprskem** zaostřeným na clonku. Zpětně odražené světlo z preparátu prochází znovu objektivem, děličem paprsků a dopadá před fotonásobič. Zde je situována **druhá konfokální bodová clonka, jež blokuje průchod záření pocházejícího z míst mimo rovinu zaostření**. Následný celkový obraz zaostřené roviny získáme jejím **řádkováním** (rastrováním) bod po bodu. Při rastrování je signál z fotonásobiče registrován počítačem.

Velkou předností konfokální mikroskopie je **možnost prostorové rekonstrukce mikroskopických objektů** (tvorba 3D obrazů), opírajících se o několik desítek až stovek optických řezů jedním objektem. Ty jsou postupně snímány při plynule se měnící hloubce zaostření.

Elektronová mikroskopie

Limit daný rozlišovací schopností světelného mikroskopu ($0,2 \mu\text{m} = 200 \text{ nm}$), daný vlnovou délkou viditelného světla, může být zvýšen až 100x nahrazením světelných paprsků tokem svazků elektronů*. Můžeme dosáhnout teoretické rozlišovací schopnosti $0,002 \text{ nm}$. Ovšem mez užitečného zvětšení elektronového mikroskopu pro biologické objekty se pohybuje v rozmezí **100 000 – 200 000x**, přičemž maximální rozlišovací schopnost leží okolo **2 nm**. Jsme schopni rozeznat struktury na úrovni rostlinné a živočišné buňky, struktury bakterií, virů, prionů, malých molekul i atomů.

*(λ elektronu je $\pm 0,004 \text{ nm}$ ($= 0,04 \text{ \AA}$) - závisí na urychlovacím napětí mikroskopu, $0,004 \text{ nm}$ při cca 80 kV ; λ viditelného světla = $380\text{-}780 \text{ nm}$)

Rozlišujeme dva základní typy elektronového mikroskopu:

Transmisní elektronový mikroskop (zkr. TEM)

Rastrovací (řádkovací) elektronový mikroskop (zkr. REM nebo častěji SEM – tj. skenovací)

Další typy mikroskopů

Řádkovací tunelový mikroskop (STM - Scanning Tunnelling Microscope)

Mikroskop atomárních sil (AFM - Atomic Force Microscope)

- rozlišení pod nm – desítky nanometrů (vlákno DNA, atomy)

Další poznatky o mikroskopii viz přednášky v letním semestru Katedry buněčné biologie a genetiky – „Světelná a elektronová mikroskopie“ - KBB/MIK

CHROMOZÓMY V MITÓZE

Mitóza je definována jako proces, pomocí kterého se chromozómy podélně rozdělí na dvě ekvivalentní části, separují se k protilehlým pólům a formují dvě identická jádra a dvě nové buňky. Proces buněčného dělení sestává z **jaderného dělení (mitóza)**, které následuje **cytoplazmatické dělení (cytokineze)**.

Mitóza (z řeckého mitos – „vlákno“) začíná **profází**, kde centrozom (jen u živočišných buněk) formuje dvě centrioly a dva póly dělicího (mitotického) vřeténka a organizuje intracelulární pohyb pomocí mikrotubulů. Na **počátku M-fáze** probíhá fosforylace specifických proteinů. V **prometafázi** zaniká jaderná blána; na kinetochory se upínají mikrotubuly, v **anafázi** se jednotlivé chromatidy vzdalují k pólům. V konečné fázi mitózy (**telofáze**) se konstruuje jaderná blána kolem skupiny rozdělených chromozómů. Buněčné dělení končí tehdy, když je cytoplazmatický obsah rozdělen procesem **cytokineze**; chromozómy dekonduzují.

Fáze mitózy:

Profáze - chromozómy se v profázi jeví jako viditelná tenká vlákna, svinutá a přehýbaná. Každý chromozóm má dvě přilehlá vlákna - chromatidy, což je výsledkem duplikace v S-fázi, na konci profáze se rozpouští jadérko.

V **metafázi** jsou chromozómy v nejvyšším stupni spiralizace, a proto se jeví jako krátké a tlusté. Chromatidy leží vedle sebe. Konec metafáze charakterizuje rozdělení centroméry.

Anafáze je pro chromozómy aktivním a rychlým pohybem, chromatidy jsou taženy směrem k pólům silou, která je způsobena zkracováním mikrotubulů.

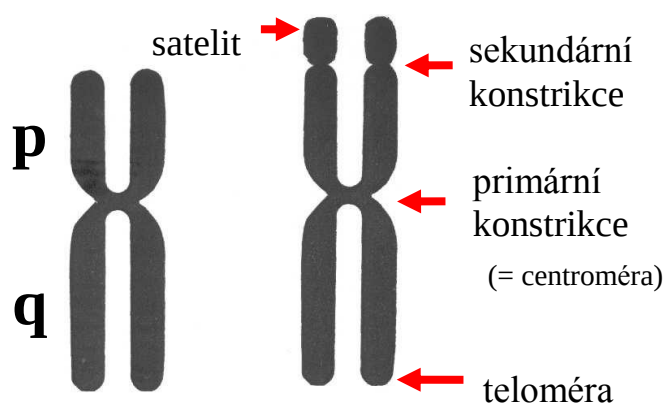
Telofáze začíná dosažením chromozómů k pólům, tvoří se jaderná blána kolem dvou dceřinných jader, formuje se jadérko (na straně satelitního chromozómu), chromozómy fúzíjí v nerozlišitelnou masu chromatinu. Hydratace a despiralizace chromatinu pomáhají procesu reformování interfázního jádra, kde chromozómy ztratí svoji hustotu a barvitelnost.

Historie objevu a detekce chromozómů:

Chromozómy byly objeveny německým botanikem **Carlem von Nägelim** roku 1842, krátce po objevení buněčného jádra (1831 - Brown). Nägelli po dvou letech objevil a popsal i chování chromozómů během buněčného dělení - je to první popis mitotického dělení. Detailně popsal mitózu v roce 1882 **Walter Flemming**. Německý termín „chromosomen“, zavedený **W. von Waldeyerem** roku 1888, je odvozený z řečtiny a znamená „barevné tělíčko“.

První metody k detekci chromozómů byly mikrotomové řezy z tkání. Po roce 1910 byly určeny počty chromozómů u mnoha kulturních rostlin. Následovaly roztakové metody s použitím maceračních směsí a účinných předpůsobení. Rozvíjely se barvicí techniky – karmín, orcein, Schiffovo barvení - a proužkování chromozómů s barvením Giemsou.

Chromozómy a jejich terminologie



• **Primární konstriktce – centroméra** – rozděluje chromozóm na **dvě ramena**, obvykle na krátké (**p** – od franc. petit = malý) a dlouhé (**q** - q jako další písmeno v abecedě po p). V místě centroméry jsou pomocí kohezinu propojeny sesterské chromatidy chromozómu.

Typy chromozómů jsou definovány podle polohy centroméry; klíčem je výpočet **indexu poměru ramen (IPR)**:

$$\text{IPR} = \frac{q}{p} \quad (\text{teoreticky IPR} = 1 - 10)$$

Často se udává i **centromerický index (CI)** = poměr kratšího ramene (p) k celkové délce chromozómu:

$$\text{CI} = \frac{p}{p + q} \cdot 100 \quad (\text{teoreticky CI} = 0 - 50)$$

Nomenklatura chromozómů podle polohy centromery.

Typ chromozómu	Charakteristika podle ramen	CI	IPR	Zkratka
telocentrický	centroméra na konci ramen	< 15	6,1 – až více	T
akrocentrický	malé rameno p	15 - 30	3,1 – 6,0	A
submetacentrický	různě dlouhá ramena	31 - 45	1,3 – 3,0	SM
metacentrický	centroméra uprostřed ramen	46 - 49	1,0 – 1,2	M

Telocentrické chromozómy se u lidí nenacházejí.

Chromozóm bez centroméry se nazývá **acentrický fragment**.

Autozóm = nepohlavní párový chromozóm (člověk 22 párů).

Gonozóm (heterochromozóm, pohlavní chromozóm) – může být párový nebo nepárový, určuje pohlaví jedince.

Klasifikace centromér:

Lokalizovaná centroméra – normální situace, chromozómy mají stálou oblast, kde se upínají vlákna dělicího vřeténka během pohybu chromozómů.

Neocentroméra – situace, kdy oblast centroméry je přemístěna na nové místo na chromozómu

Nelokalizovaná centroméra

- **polycentroméry** – každý chromozóm je připojen mnoha vlákny dělicího vřeténka (škrkavky)

- **holocentroméry** – každý bod na chromozómu vykazuje centromerickou aktivitu (*Hemiptera*, *Homoptera*, *Protista*, u rostlin čeledi *Juncaceae* a *Cyperaceae*)

Podle počtu centromér dělíme chromozómy na:

- **monocentrický chromozóm** – jedna centroméra na chromozómu;
- **dicentrický chromozóm** – chromozóm se dvěma centromérami (je produktem strukturálních změn).

• **Sekundární konstriktce** – odpovídá oblasti organizátoru jadérka (NOR), nesoucí tandemově uložené kopie genů pro rRNA. Někdy je pozorována jako přerušení na chromozómu, které odděluje část chromozómu zvanou **satelit** (trabant); je odpovědná za **formaci jadérka během telofáze**; probíhá zde syntéza ribozomální RNA. V metafázi není jadérko viditelné.

• **Teloméra** – struktura lokalizovaná na obou koncích chromozómu definovaná jako oblast C-band pozitivní a jako oblast specificky se opakujících nukleotidových sekvencí; chrání chromozóm před zkracováním molekuly DNA při replikaci a umožňuje jeho lineární uspořádání.

Podle velikosti mohou být rostlinné chromozómy rozděleny do dvou skupin:

L - typ („long“) zahrnuje velké chromozómy, které jsou v metafázi dlouhé 8 - 10 µm a více; patří sem např. rody *Lilium*, *Trillium*, *Secale*, *Vicia*.

S - typ („short“) zahrnuje malé chromozómy, které jsou v metafázi dlouhé 2 - 3 µm a méně; patří sem např. rody *Arabidopsis*, *Oryza*, *Glycine* a *Brassica*.

Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

BARVENÍ CHROMOZÓMŮ U ROSTLIN

Chromozómy můžeme pozorovat pouze v některých stádiích buněčného dělení. Pozorování chromozómů v mikroskopu je podmíněno jejich barvením. V zásadě rozlišujeme **barvení konvenční**, při kterém je chromozóm obarven stejnoměrně po celé délce, a **barvení diferenciální neboli proužkování** (banding), při kterém se na chromozómu vytvoří podélný vzor charakteristických proužků.

Klasický postup konvenčního barvení chromozómů u rostlin je založen na použití Schiffova reagensu a barvení acetobarvivu (orcein, karmin aj.).

Ke studiu jednotlivých fází mitózy a morfologie metafázních chromozómů vybíráme ty části rostlin (živočichů), které obsahují velmi aktivní dělivá pletiva (meristémy; u živočichů tkáně). V případě rostlin to jsou kořenové špičky nebo mladé listy.

K získání metafázních chromozómů potřebujeme materiál tzv. **předpůsobit**, což usnadňuje počítání chromozómů a hodnocení jejich morfologie (počet a tvar je důležitým znakem charakterizující druh organismu).

• **Předpůsobení** – ovlivnění materiálu ještě před fixací

V cytologii se používá z několika důvodů:

1. k vyjasnění cytoplazmy, popř. zlepšení průniku fixačních tekutin
2. k **rozrušení dělicího vřeténka**
3. ke **zkrácení metafázních chromozómů**

K vyjasnění cytoplazmy a k rozrušení mezibuněčné lamely se užívá **kyselina chlorovodíková** a **enzymy** (pektinázy a celulázy).

Nejvíce rozšířené je předpůsobení, které ovlivňuje samotné chromozómy. Cílem je **získání dostatečného počtu metafází figur**. Je založeno na změně viskozity cytoplazmy, která se projeví destrukcí dělicího vřeténka a zkrácením chromozómů, na kterých jsou vidět konstriktce. Destrukce dělicího vřeténka má za následek poruchu tvorby anafází. Buněčné dělení se zastaví v metafázi, kde lze dobře počítat zkrácené a rozložené chromozómy (→ karyotyp).

Jednotlivé druhy předpůsobení

1. Kolchicin

- alkaloid - poprvé byl izolován z kořene ocúnu (*Colchicum autumnale* L.) Zeiselem v roce 1883; zabraňuje polymerizaci mikrotubulů
- používá se (bez indukce polyploidie) nízká koncentrace: 0,01 – 0,5% koncentrace po dobu 3 hod. (**často 0,1% vodný roztok po dobu 2 hod.**)
- **efektní pro dlouhé chromozómy**
- účinný pro studium struktury chromozómů, pro blokování metafází (kolchicinová mitóza, zkr. c-mitóza)
- u zvířat se aplikuje injekčně nebo přidáním do kultivačního media 2 hod. před odebráním buněk
- derivát kolchicinu - **kolcemid** - pro živočišné buňky (viz cytologie ptáků)

2. Chloralhydrát

- užíván jako předpůsobení v cytologii již od roku 1935
- má stejné účinky jako kolchicin, ale je levnější
- používá se 0,5 – 1% koncentrace 30 min – 4 hod. při pokoj. teplotě

3. Oxychinolin (8-hydroxychinolin)

- poprvé použit v cytologii Tjio a Levanem 1950, dobře působí na **středně velké a velké chromozómy** (časté použití v botanice)
- používá se vodný roztok o 0,002 M koncentraci 3-4 hod. při pokoj. teplotě (nebo po dobu 16 hod. při 10-18 °C)
- dobře zviditelňuje primární a sekundární konstriktci

4. Paradichlorbenzen (p-dichlorbenzen)

- je vhodný pro **druhy s vysokým počtem malých chromozómů** (zvl. rostlinné)
- používá se nasycený roztok 3–5 hod. při pokoj. teplotě

5. Monobromnaftalen (α -monobromnaftalén)

- velmi dobře prostupuje pletivy (vhodný zejména pro obiloviny)
- používá se nasycený roztok po dobu 10 min – 4 hod. při pokoj. teplotě

6. Předpůsobení chladem – ledová voda

- je vhodné pro obiloviny a trávy
- používá se ledová voda 1-2 °C obvykle přes noc

7. Amiprophosmethyl (APM), oryzalin

- látky povahy herbicidů
- používají se vodné roztoky o μ M koncentraci 2 hod. při 25 °C

Po předpůsobení musíme objekty **vypírat v destilované vodě** (u monobromnaftalenu v 45% kys. octové) a pak fixujeme.

Pozn.: Ovlivňování viskozity cytoplazmy u různých objektů je různé → nutnost empirického ověření účinnosti dané chemikálie i podmínek a doby působení.

• Fixace

Účelem fixace je usmrcení tkáně takovým způsobem, aby byla zachována neporušená struktura chromozómů, které bychom mohli dále barvit. Fixační prostředky mohou být obecně povahy **fyzikální** (fixace teplem, vyschnutím) nebo **chemické**. Fixační tekutina musí dobře a rychle proniknout do tkáně, zabránit autolýze proteinů, zachovat bazofilii chromozómů a zvýšit optický kontrast. Protože jedna látka nemá všechny tyto vlastnosti, používají se v cytologii k fixaci **směsi několika látek**. Jednotlivé typy fixačních činidel se liší v závislosti na typu použitého objektu (rostlinné či živočišné buňky, rostliny dvouděložné nebo jednoděložné ...).

Nejvíce používané jsou směsi Carnoyovy (čti Karnoovy), jejichž hlavní složkou je etanol* (viz str. 20).

▪ **Carnoyova fixáž I** (Farmerova fixáž; FAE), fixáž 3:1 – 96% etanol : led. kyselina octová*

▪ **Carnoyova fixáž II**; fixáž 6:3:1 – 96% etanol : chloroform* : led. kyselina octová

Fixáž se připravuje vždy čerstvá. Materiál se fixuje nejdéle 24 hod. při 4 °C (přes noc).

▪ **Alkohol–propionová fixáž**; 3:1 – 96% etanol : kyselina propionová + 1g FeCl₂ · 6 H₂O na 100 ml fixáže (chlorid železitý - pouze jde-li o meiotický materiál)

Obecné zásady fixace materiálu:

- Objekty na fixaci musí být fixační tekutinou obklopeny ze všech stran, mají být čerstvé, co nejmenší a fixační tekutiny má být dostatečné množství (50 až 100násobný objem použitého materiálu).
- Minimální a maximální doba fixáže se musí dodržovat.
- Fixáž musí být odstraněna z objektů vypíráním – v alkoholu (96%) nebo ve vodě.
- Fixované objekty se uchovávají v 70% etanolu v chladničce (+4 °C).

*

Etanol – silně koaguluje proteiny a NK, rozpouští některé tuky a fosfolipidy; rozrušuje mitochondrie, kapky tuku mají tendenci ke slévání, chromozómy nejsou zřetelně rozlišené; neproniká rychle, buňky se v něm sevrkávají (plasmolyzují); objekty ponechané v 96% etanolu tvrdnou a křehnou, ale po následném vymytí fixační tekutiny mohou být neomezeně uchovávány v 70% etanolu.

Ledová kyselina octová (99,8%, p.a.) – má malé rozměry molekul, a tudíž rychle proniká do objektu; plazmatické struktury poněkud rozrušuje, ale dobře fixuje struktury chromozómů; pletiva zůstávají měkká (tato nevýhoda se odstraňuje v kombinaci s alkoholem) – ideální pro fixaci chromozómů.

Chloroform – výborné rozpouštědlo pro tukové substance; užití při fixaci rostlinných pletiv – rozpouští tukové látky na povrchu objektů, a tím urychluje průnik fixačního činidla.

Kyselina osmičelá – silný oxidační prostředek; dokonale fixuje cytoplazmu, mitochondrie a je selektivním prostředkem pro tukovité látky, na nichž se vysráží kovové osmium. Užití hlavně v EM na postfixaci. **Jedovatá!!!**

Způsoby zpracování fixovaného materiálu:

- kapané preparáty
- nátěry (roztěry)
- řezy (zmrazovací mikrotom; mikrotom + zalití do parafínu nebo celoidinu)
- roztlakové metody

Roztlakové metody:

• Macerace

Účelem macerace je **rozrušení střední lamely**, která spojuje buňky v pletivu navzájem. Teprve potom je možné tlakem dosáhnout rozprostření buněk v jedné vrstvě.

Pokud k maceraci přistupujeme rovnou z fixačních směsí obsahujících ještě jiné látky než etanol a kyselinu octovou, opláchneme z fixovaných objektů zbytky fixáže vodou (jinak není promývání nutné). Macerace probíhá buď před barvením, nebo zároveň s barvením, a může se provádět buď za laboratorní, nebo zvýšené teploty.

Jako macerační látka se nejčastěji používá **kyselina chlorovodíková**, resp. její vodné roztoky o různé koncentraci, nebo **směs kyseliny chlorovodíkové s etanolem**.

Nejobvyklejší postup při rychlých metodách je buď macerace při laboratorní teplotě ve směsi koncentrované HCl a 96% etanolu v poměru 1 : 1 (cca 1 - 3 minuty), nebo macerace 1M až 2M HCl při 60 °C (cca 6 - 15 min), při níž dochází k hydrolyze DNA. Udávané rozmezí doby působení platí pro kořenové špičky, poupata vyžadují kratší dobu.

K maceraci se při některých postupech užívá i **enzymů pektinázy, celulázy** nebo jejich směsi. Enzymy se uplatňují zejména při postupech diferenciálního barvení chromozómů (tzv. proužkování), kde nelze použít kyselinu chlorovodíkovou (chromozómy se po jejím působení neproužkují). Při maceraci pomocí enzymů musíme dodržet optimální podmínky pro jejich enzymatickou aktivitu (teplota, pH).

Maceraci zároveň s barvením můžeme s výhodou aplikovat na drobnější a měkčí objekty (malé a křehčí kořenové špičky, poupata, resp. vypreparované prašníky). Provádí se buď působením roztoku acetobarviva (případně s přidáním kyseliny chlorovodíkové), maceračním činidlem je v tomto případě kyselina octová samotná nebo ve směsi s kyselinou chlorovodíkovou. Jejich působení je buď dlouhodobé (přes noc nebo až několik dní) za laboratorní teploty nebo krátkodobé, spojené se zahříváním objektů v roztoku acetobarviva.

Techniky barvení chromozómů

• Barvení

Cílem barvení preparátů je **zvýšení optického kontrastu** - zvýraznění jedné nebo více typů struktur (např. buněčná jádra, mitochondrie, buněčná stěna). **Chromozómy nejsou v normálním světle viditelné**, protože mají stejný lom světla jako cytoplazma. Je možné je zviditelnit pomocí fázového kontrastu, interferenční mikroskopie a jiné modifikace světelné mikroskopie nebo právě **různým barvením**. Dobře se barví **acetobarvivy**, tj. organickými barvivy rozpuštěnými v kyselině octové nebo propionové (acetokarmín, laktopropionorcein, acetonigrosin, lakmoid ...).

Barvení chromozómů vychází z tzv. **auxochromové teorie**. Podle této teorie má molekula barviva dvě složky - **chromofor** a **auxochrom**.

Chromofor = seskupení atomů schopných absorpce světla viditelné části spektra (např. azoskupina, nitroskupina, nitrozoskupina; někdy označován jako **chromogen** = anorganická část molekuly barviva, která je nositelem chromoforního systému atomů)

Auxochrom = část molekuly, kterou se může navázat na substrát (např. hydroxyskupina, aminoskupina), která odpovídá za adhezi barviva k tkáním.

Rozdělení barviv a způsobů barvení

Z praktického hlediska a podle původu rozdělujeme barviva na:

1) přirozená

- a) původu živočišného (karmín)
 - karmín – extrakt ze samiček červce nopálového (*Coccus cacti*)
- b) rostlinného (hematoxylín, orcein, šafrán)
 - hematoxylín – z tzv. kampeškového dubu (*Haematoxylon campechianum*)
 - orcein – z některých lišejníků
 - šafrán – z blizen šafránu (*Crocus sativus*)

2) syntetická (umělá)

- např. **nitrobarviva** (kyselina pikrová), **thiazinová barviva** (azur A, metylenová modř), **akridinová** (akridinová oranž, akriflavin), **xantenová** (fluorescein, rhodamin B) aj.

Podle typu auxochromů dělíme barviva na:

1. **kyselé** – s negativním nábojem – reagují se substancemi se zásaditou reakcí (barvení cytoplazmy, která je bazická)
2. **bazická** – reagují se substancemi s kyselou reakcí (barvení chromatinu, který má kyselou reakci)
3. **amfoterní** – mohou se chovat jako kyselé nebo zásadité barviva (např. orcein)

Různé barvicí metody

Rozdělení podle vitality objektů:

- a) **barvení vitální** – k zjišťování stavu buňky, tkání, pletiv nebo celého organismu
- b) **nevitální** – v usmrcených fixovaných tkáních

Podle postupu při barvení:

- **barvení progresivní** – postupné barvení do žádaného stupně sytosti
- **barvení regresivní** – silné přebarvení objektu a pak postupné odbarvování

- **barvení sukcedánní** – několika barviv po sobě (např. hematoxylin – eosin)
- **barvení simultánní** – směsí několika barviv dohromady (např. Giemsa*)
- **in toto** – barvení celého bločku před řezáním
- **orthochromatické** – struktura se zbarví tónem a barvou odpovídající barvivu (např. kyselina pikrová)
- **metachromatické** – určité složky tkáně se barví jiným odstínem, než má vlastní barvivo (např. tionin barví mezibuněčnou hmotu chrupavky a hlen v načervenalém tónu; granula mastocytů se toluidinovou modří (modrá barva) barví červenofialově)

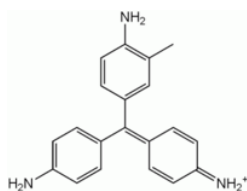
* Komplexní směs barviv s různým stupněm oxidace; obsahuje **metylénovou modř, azur A, B, C, thionin a eosin**.

Další podrobnosti o barvivech a barvení viz skripta – **Knoz, J., Opravilová, V. (1992):** Základy mikroskopické techniky; přehled barviv: **Němec, B. a kol. (1962):** Botanická mikrotechnika.

Příklady barvení chromozómů

1. Feulgenova nukleální reakce (barvení pomocí Schiffova reagens)

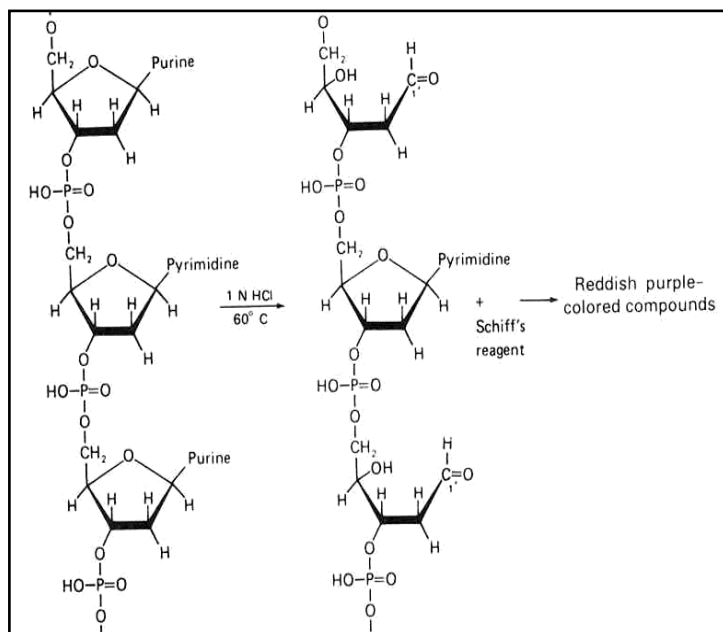
- je považována za **nejúčinnější metodu barvení jader a chromozómů**. Byla vypracována r. **1924 R. Feulgenem a H. Rossenbeckem**. Reakce je podmíněna kyselou hydrolýzou DNA, při které dochází k uvolňování purinových bází (adenin, guanin) a k **odkrytí aldehydických skupin** pentóz. Tyto skupiny oxidují redukovaný fuchsin obsažený v bezbarvém Schiffovu reagens (kyselina fuchsinsířčitá) na původní fialovou formu (typicky růžovofialové zbarvení; při odštěpení pyrimidinů se aldehydy neuvolňují). Jádra odumřelých buněk se barví červeně. Intenzita výsledného zbarvení závisí na druhu použité fixáže a na způsobu hydrolýzy, na vlastnostech Schiffova reagens, na uzavíracím mediu a na způsobu uložení preparátů. Je vhodná pro barvení jak rostlinného pletiva, tak i pro živočišné objekty.



molekula fuchsinu



aldehydická skupina (- COH)



Barvení DNA pomocí Schiffova reagens.

Základní postup barvení Schiffovým reagens:

- A) **Roztlakový preparát dočasný** (roztlak v 45% kys. octové nebo ve fruktózovém sirupu)
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
(případně v 1 M HCl, 60 °C 10 min)
 5. **Opláchnutí** v dest. vodě (5 min)
 6. **Barvení** v Schiffově reagens 30 – 60 min
 7. **Opláchnutí** v dest. vodě
 8. **Macerace**: v 45% kyselině octové 1 – 2 min
nebo ve směsi 2% celulázy a pektinázy ve fosfátovém pufru (35 min, 37 °C)
 9. **Roztlak** v 45% kys. octové nebo ve fruktózovém sirupu

Pozorování v mikroskopu.

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

- B) **Roztlakový preparát trvalý** (vhodný na mikrofoto)
1. **Předpůsobení** kořenového meristému vybranou směsí
 2. **Fixace** v Carnoyově fixáži (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 30–60 min
 7. **Opláchnutí** v dest. vodě
 8. **Macerace** v 45% kyselině octové 1-2 min
 9. **Roztlak** v kapce 45% kyseliny octové
 10. Položení preparátu na kostku **suchého ledu*** a zmrazení (roztlačené pletivo zbělá)
(možno i opatrně ponořit do tekutého dusíku)
 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 - přes etanol, DePeX - přes xylén)

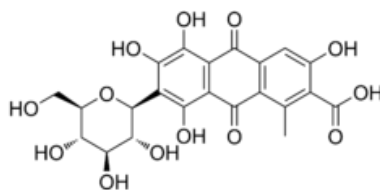
* suchý led = pevný CO₂, t = -70 °C; tekutý dusík: bod tání t = -196 °C (bod varu -195,8 °C)

Němec, B.: Botanická mikrotechnika. Nakladatelství Československé Akademie Věd, Praha 1962, str. 234-237 (Nukleární reakce – reakce Feulgenova; zpracoval dr. P. Milovidov).

2. Acetobarviva (směsi bazických barviv s kyselinou octovou, příp. propionovou, mléčnou, mravenčí...)

Karmín

Nejvíce rozšířené bazické barvivo pro barvení chromozómů; nejstarší v mikroskopické technice (do botanické mikrotechniky je zavedl Theodor Hartig). Je připravováno z rozemletých suchých těl (tzv. košenila) sameček červce nopálového (*Coccus cacti*; tropické americké *Homoptera*), kteří cizopasí na opuncii (*Opuntia coccinifera*). V potravinářství se užívá k barvení (aditivum E120). Připraví se vařením barviva v 45% kyselině octové, přidá se několik kapek železa (hydroxid železitý nebo octan železitý). Je vhodné pro barvení malých chromozómů. Nevýhodou je, že přebarvuje cytoplazmu.



(Návod na přípravu viz příloha)

vzorec kyseliny karmínové

Orcein

Poprvé použit jako barvivo chromozómů (LaCour, 1941).

Je to tmavě červené bazické barvivo původně získáváno z lišejníků dvou druhů – *Rocella tinctoria* a *Lecanora parella*; dnes příprava synteticky.

Používá se jako **acetoorcein** nebo **laktopropionorcein**. Jádra se barví modře, inzulin oranžově, cytoplazma růžově. Použití i při kontrole pH (lakmus).

Lakmoid (známý také pod názvem rezorcinolová modř)

Bazické barvivo rozpustné ve vodě i v alkoholu. Používá se pro barvení kořenových špiček, pylových zrn, pro chromozómy nádorů. Není tak univerzální jako karmín, ale lze jej užít v případech, kde ostatní barviva jsou neúčinná.

LaCour, L.F. (1941): Acetic-orcein. A new stain-fixative for chromosomes. *Stain Technol.* 16: 169-174.

Základní postup při barvení chromozómů acetobarvivy (orcein, karmín):

1. **Fixace** kořenových špiček ve fixáži 3 : 1 20 min
2. **Macerace** ve směsi 5M HCl a 96% etanolu 1 : 1 10 min
3. **Promytí** ve vodě 2 x 5 min
4. **Roztlak** - na podložním skle odkrojíme meristém, roztlačíme a částečně odstraníme krycí sklo (nadzvedneme růžek KS).
5. **Barvení** - na roztlak kápneme barvivo, položíme krycí sklo, zahřejeme nad lihovým kahanem a necháme barvit v teplém roztoku barviva.
6. Přebytečné barvivo odsajeme filtračním papírem a roztlak **zarámujeme**.

Preparáty tohoto typu jsou k okamžité orientaci, dají se uchovat v ledničce několik dnů. Nejsou vhodné k fotografování.

Příprava roztlakového preparátu meristému kořenové špičky cibule (bobu).

Nafixované kořínky osušíme na filtračním papíru, na 10 min. je přeneseme do macerační směsi a pak je promýváme v destilované vodě (2x 5 min). Položíme je na čisté podložní sklo a z kořínku odřízneme žiletkou **pouze kořenovou špičku s meristematickým pletivem**. Přidáme kapku barviva (acetokarmín, laktopropionový orcein), opatrně přiložíme krycí sklíčko tak, aby jedním rohem přesahovalo přes okraj podložního skla, a **velmi jemně provedeme roztlak**. Poté lehce nadzvedneme okraj krycího skla, aby barvivo proniklo k jednotlivým buňkám - toto několikrát opakujeme. Preparát můžeme mírně nahřát nad plamenem lihového kahanu 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 skla!) a můžeme pozorovat mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400x. Vhodné figury pozorujeme pod imerzním objektivem při zvětšení cca 1000x.

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

3. Hematoxylín (není bazické barvivo)

Přírodní barvicí substance získaná z jádra dřeva stromu kreveně (*Haematoxylon campechianum*) pocházejícího z Mexika (tzv. kampeškové dřevo). Připravené barvivo musí zrát (= oxidovat) na hematein; čerstvý roztok nebarví.

● **Uzavírání preparátů**

Rámečkování u odpařujících se uzavírajících médií (př. vazelína, lak – asfaltový, acetonový, hustý kanadský balzám, tmely – lanolin, kalafunový, du Noyerův; v současnosti i tzv. "rubber cementy", které z preparátů jdou později snadno odstranit)

Zhotovení roztlaků přímo v uzavírajících médiích – např. ve fruktozovém sirupu

Prosáváním objektů uzavírajícím médiem – např. glycerolem nebo minerálním olejem

Uzavírající média – funkce:

- konzervační a současně zachovávající barvení
- projasňovací (vysoký index lomu),

- rychlé tuhnutí při styku se vzduchem

Rozdělení podle rozpustnosti ve vodě:

a) s vodou smíselná

glycerol, glycerol-želatina, fruktózový sirup

b) s vodou nemíselná

Média dobře tuhnou, preparát není třeba rámovat.

U většiny uzavírajících médií nutné dokonalé odvodnění objektů alkoholovou řadou (70-96-100%) a xylenem.

Příklady uzavírajících médií:

Kanadský balzám (původně pryskyřice z jedle (*Abies balsamea* a *A. canadensis*), dnes syntetická příprava; rozpouští se v organických rozpouštědlech (xylen, benzen, chloroform, terpentýn), vysoký index lomu - $n = 1,535$ (dobře projasňuje preparáty); reakce slabě kyselá

Solakryl – syntetická pryskyřice, tuhne rychleji než kanadský balzám, má neutrální reakci

DePex - syntetická pryskyřice (uzavírání preparátů přes xylén)

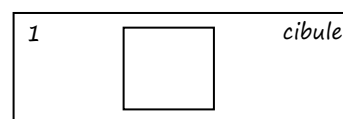
Uzavírání z 80% etanolu:

Euparal - syntetická směs různých látek (např. kafr, eukalyptol, fenylosalicylát aj.)

• Popis preparátů

Nativní – fixem na podložní sklo - materiál - pravý horní okraj

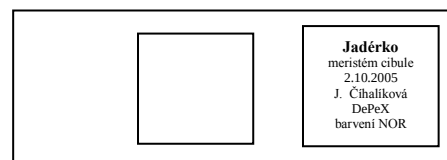
- pořadové číslo – levý horní okraj



Trvalé – pomocí štítku nalepeného na okraj preparátu:

Opatření popisem:

- stručný název preparátu
- datum sběru, lokalita, jméno sběratele
- použité uzavírající médium
- způsob barvení



• Archivace

Speciální krabice určené pro archivaci

Mitotický index

= poměr buněk v mitóze k celkovému počtu buněk.

Buňky jsou fixovány **bez předpůsobení**. Barveny jsou pomocí Schiffova reagens.

Z jedné kořenové špičky hodnotíme asi 1000 buněk.

Z jednoho vzorku hodnotíme 5 kořenových špiček.

Mitotické aberace – poruchy mitotického dělení

Aberace mohou vznikat:

spontánně – neznáme příčinu vzniku

indukovaně – UV zářením, chemomutageny, infekcemi

Mitotické aberace zahrnují:

c-mitózy (kolchicinová mitóza – zastavení rozchodu chromozómů v metafázi)

mikrojádra

Skupina anafázních aberací:

acentrické fragmenty

chromozómové mosty

opožděné chromozómy

multipolární mitózy

Viz rovněž „Mitóza“ v rámci Cvičení z obecné genetiky (KBB/OGCSB).

Počet prohlédnutých kořínků či metafází ke stanovení počtu chromozómů

(podle RNDr. Jitky Štěpánkové, CSc.)

Rychlý screening: 1-2 metafáze z 1 - 2 kořenových špiček jedné rostliny

POPULACE: 10 jedinců, z každého 5 metafázních figur

Ověření, kdy vnitrodruhová variabilita je nízká: 3 jedinci – z každého 5 metafází

Při větší variabilitě: prohlédnout více kořenových špiček

CVIČENÍ Č. 2

CHROMOZÓMY V MEIÓZE

Meióza je nejdůležitější modifikací mitózy; jedná se o redukční dělení, které zajišťuje konstantní počet chromozómů z generace na generaci.

Je definována jako dvě následná jaderná dělení s jednou duplikací chromozómů.

Objev meiózy (1879) je připisován **Augustu Weismannovi** (1834-1914).

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 (zygon = dvojitý)
pachytene	- homologní chromozómy formují bivalenty, průběh crossing-overu* (pachys = tlustý)
diplotene	- desynapse, terminalizace chiasmat (diplos = dvojitý)
diakinese	- chromozómy velmi zkrácené, vhodné pro stanovení počtu chromozómů (diakino = rozpojuji)

* 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 – genetické důsledky, 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).

Mikrosporogeneze (viz mikrofotografie):

K vývoji pylových zrn (mikrosporogenezi) dochází v prašnicích obvykle dlouho před otevřením květu. V archesporiálním pletivu prašníků dochází nejprve ke značnému zmnožení buněk sérií mitotických dělení. Vznikající buňky se označují jako **pylové mateřské buňky** (PMC). V pylových mateřských buňkách probíhá meióza. Z jedné PMC buňky tak vznikají **čtyři haploidní buňky pylové tetrády**. Každá buňka se vyvíjí samostatně v pylové zrno. Buněčná stěna pylového zrna je rozdělena na zevní – exine a vnitřní - intine. Pylové zrno je nejprve jednojaderné, ale pak se jeho haploidní jádro rozdělí. Teprve toto dvojjaderné pylové zrno je schopno vyklíčení na blizně. Při vyklíčení proniká intine na určitém místě přes otvor v exině a vytvoří pylovou láčku, na jejímž konci pronikají do semeníku obě jádra. Jedno z nich, **vegetativní jádro**, je resorbováno v průběhu růstu pylové láčky. Jedná se tedy o programovanou buněčnou smrt – apoptózu. Druhé, **generativní jádro**, se ještě jednou mitoticky rozdělí, a to buď ještě v pylovém zrně, nebo až v klíčící pylové láčce. Trojbuněčný pyl – pylové zrno - má jedno vegetativní a dvě generativní jádra s malým obsahem cytoplazmy (= spermatické buňky).

Většina čeledí krytosemenných rostlin má dvojbuněčná pylová zrna (170 čeledí). Mezi nimi jsou *Liliaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*.

Trojbuněčná pylová zrna se vyskytují např. u čeledi *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Poaceae* (viz foto na cvičení).

Postup barvení mladých poupat pažitky

Rostlinný materiál: **nafixovaná poupata pažitky 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)

A) Postup barvení prašníků laktopropionovým orceinem:

Z rostliny odebereme poupě o velikosti menší než 5 mm (pažitka 2 - 3 mm).

1. **Izolujeme** prašníky (pokud to jde), jinak pracujeme s celým poupětem
2. **Fixujeme** v Carnoyově fixáži I – 3 : 1 5 – 10 min
3. **Macerace** ve směsi 5M HCl : 96% etanol (1 : 1) 10 min
4. Důkladné **opláchnutí** v destilované vodě
5. **Rozmačkání** prašníků na podložním skle (použít zahnutou preparační jehlu)
6. **Barvení laktopropionovým orceinem** – přidat kapku barviva a lehce přikrýt krycím sklíčkem
7. Barvivo zahřejeme, krycí sklíčko lehce přitlačíme, přebytečné barvivo odsajeme a preparát případně orámujeme, aby barvivo nevysychalo
8. Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400x, případně s imerzí při zvětšení 1 000x

B) Postup barvení prašníků železitým acetokarmínem:

1. Nafixované poupě o velikosti cca 0,2 – 0,3 mm změříme milimetrovým měřítkem nebo pod preparační lupou s okulárovým mikrometrem.
2. Poupě položíme na podložní sklo, na okraj zapíšeme jeho velikost (fixem na sklo) a s pomocí zahnutých preparačních jehel vypreparujeme prašníky, zbytek odstraníme.
3. Obsah prašníků vytlačíme pomocí zahnutých preparačních jehel do kapky **železitého acetokarmínu** a zbytky prašníků rovněž odstraníme.
4. Lehce nahřejeme nad plamenem lihového kahanu a necháme asi 1 min barvit.
5. Přiložíme krycí sklo a opatrně roztlačíme.
6. Přebytečné barvivo odstraníme proužkem filtračního papíru.
7. Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení cca 200 a 400x, případně s imerzí při zvětšení 1000x.

Průběh meiózy a její genetický význam viz i „Meióza“ v rámci „Cvičení z obecné genetiky“ (KBB/OGCSB).

ÚVOD DO CYTOTAXONOMIE

K pochopení genomických vztahů a vazeb v rámci rodů a druhů, se využívá **popisných metod**, jako jsou morfologie a anatomie, **cytologických metod** – počet chromozómů a jejich morfologie (karyotyp), párování chromozómů v meióze a **molekulárních metod**.

Metody vhodné pro cytotaxonomická studia:

1. Klasické **stanovení počtu chromozómů** a jejich **morfologie** (karyotyp a idiogram)
2. **Studium meiózy** – párování chromozómů
3. **N-banding** - studium a identifikace satelitních chromozómů a jadérek
4. **C-banding** - identifikace a rozlišení chromozómů pomocí heterochromatinových pruhů na chromozómech barvených Giemsou
5. **Fluorescenční průkaz jaderné DNA** – identifikace jaderné DNA a chromozómů pomocí fluorochromů
6. **Flow-cytometrická analýza rostlinného genomu** – studium stupně ploidie, studium obsahu jaderné DNA
7. **Metody molekulární biologie** – GISH, FISH, PRINS, RFLP*

*GISH – genomická *in situ* hybridizace (*in situ* = na místě – na chromozómu nebo v jádře)

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

PRINS – Primed *In Situ* DNA Labelling (= PCR *in situ*; fyzická lokalizace repetitivních sekvencí na chromozómech; alternativní metoda k FISH)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism - délkový polymorfismus restričních fragmentů

ad 1) Stanovení počtu chromozómů

Přehled některých barvicích metod:

A) Barvení malých chromozómů

enzymatická macerace/ air drying method

EMA metoda

1. Předpůsobení – specifické pro daný objekt
2. Fixáž – 3:1 čerstvě připravená 1 hod.
3. Opláchnutí v dest. vodě
4. Macerace – směs enzymů*, 37 °C 30–60 min
5. Opláchnutí v dest. vodě
6. Kápnutí macerované špičky v kapce fixáže na podložní sklo
7. Vyschnutí preparátu
8. Barvení v **Giemsově barvivu** ředěném ve fosfátovém pufru pH = 6,8

*Směs enzymů: 4% celulóza Onozuka; 0,3% pektolyáza; 1,5% macerozym ve fosfátovém pufru při pH = 4,2

B) Barvení velkých chromozómů

roztlakové techniky/squash method

Dočasné preparáty:

1. Předpůsobení – specifické pro daný objekt
2. Fixáž – Carnoy 3:1 nejméně 1hod.
3. Macerace v 45% kys.octové
4. Barvení v **acetoorceinu** nebo **acetokarmínu**
5. Zahřátí barviva na podložním skle
6. Roztlak v teplém barvivu
7. Odsátí barviva
8. Rámování krycího skla

Trvalé preparáty:

1. Předpůsobení - specifické pro daný objekt
2. Fixáž – Carnoy 3:1 24 hod.
3. Hydrolýza v 5M HCl 30 min
4. Barvení v **Schiffově reagens** 60 min
5. Roztlak přes suchý led v kapce 45% kys. octové (případně tekutý dusík)
6. Dehydratace v 96% etanolu - 2x 15 min
7. Uzavírání do DePeXu nebo Euparalu

Barvení cytologicky obtížných druhů:

C) Barvení chromozómů dřevin

Užívá se jak enzymatická macerace, tak roztlak. Macerace je vzhledem k obsahu ligninu a pektinů v tkáních složitější. Buněčné dělení trvá delší dobu a kořeny rostou pomaleji než u bylin. **Semena klíčí delší dobu, proto je nutné je před vyklíčením sterilizovat.**

Postup:

1. Semena dřevin sterilizována v 70% etanolu a 1% chlornanu sodném ($\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; chlorové bělidlo)
2. Opláchnutí sterilizovanou vodou
3. Semena vyseta na filtrační papír (doba klíčení závisí na druhu)
4. Vyklíčené kořenové špičky ihned uřezat – dlouhé mají redukováný mitotický index
5. Předpůsobení a fixáž
6. Macerace ve směsi 4% celulózy a 1,5% pektolyazy a 0,3% macerozymu; pH = 4,2
7. Roztlak meristému v kapce fixáže
8. Vysušení skel (přes suchý led) a dehydratace v 96% etanolu
9. Barvení v **Giemsově roztoku** (fosfátový pufr pH = 4,2)

D) Barvení chromozómů z květů a listů

Jestliže nejsou k dispozici kořenové špičky, můžeme použít mladé pupeny nebo listy.

1. Mladé ještě svinuté listy nebo mladé pupeny - do 1 cm
2. Fixáž v Carnoyově fixáži 3:1 tak dlouho, dokud se listy neodbarví; můžeme přenést i do čerstvé fixáže
3. Hydrolýza v 1 M HCl při 60 °C 10 min
nebo v 5 M HCl při pokoj. teplotě 25 min
4. Opláchnutí dest. vodou (5 min)
5. Barvení v **Schiffově reagens** 30-60 min
6. Opláchnout 2x v 0,5% roztoku kyseliny siřičité (H₃CO₄) 10 min
7. Roztlak v kapce 45% roztoku kys. octové
8. Rámování

Před rámováním se pod mikroskopem přesvědčíme, jestli je roztlak dostatečně nabarven. Není-li tomu tak, **dobarvujeme 1% acetokarmínem** a potom rámuje.

E) Barvení druhů s nízkým obsahem DNA

barvení hematoxylinem a carbol – fuchsinem

- 1) **Barvení chromozómů *Lupinus luteus* L. hematoxylinem** (složení viz Dodatky)
Materiál: kořenové špičky ze semen
Předpůsobení: ledová voda v ledničce 24 hod.
Fixáž: Carnoy I (3:1) 2-3 hod. v pokojové teplotě
nebo 24 hod. při 4 °C
Hydrolýza: 1 M HCl 60 °C 5 min
Barvení: **hematoxylin + FeNH₄(SO₄)₂** (síran železitoamonný) - zahřívát na skle
dokud chromozómy nejsou tmavé
Trvalý preparát: suchý led → dehydratace v 96% etanolu, DePeX nebo Euparal
Nevýhoda: barvení bledne po 3 měsících
- 2) **Barvení carbol-fuchsinem** (složení viz Dodatky)
Materiál: kořenový meristém (předpůsobení, fixace)
Barvení: **carbol-fuchsin** 14 – 16 hod. v ledničce
Propláchnutí ve studené vodě 3x až se odstraní barvivo
Roztlak v kapce 45% kys. octové
Carbol-fuchsin se používá také k dobarvení preparátů, např. po barvení Schiffovým reagens nebo orceinem.

KARYOSYSTEMATIKA

- zvažuje poznatky o jádře, resp. chromozómech, z hlediska jejich využitelnosti jako **rozlišovacích znaků mezi taxony**. Znalosti o proměnlivosti počtu, velikosti a tvaru chromozómů umožnily nový pohled na taxonomii určitých druhů – u rostlin např. u mnoha kapradin, z krytosemenných rostlin u čeledí *Brassicaceae*, *Poaceae*, v rodech *Crepis*, *Tragopogon*, *Clarkia* a dalších.

Chromozómy jako objekt zkoumání a jejich význam v karyosystematice rostlin

(podle Krahulcová, 1998)

Karyotypem rozumíme chromozómovou sadu jedince (nebo skupiny příbuzných jedinců) definovanou počtem, velikostí a tvarem chromozómů obvykle tak, jak se tyto jeví v metafázi mitotického dělení. **Idiogram** je pak schematické znázornění karyotypu.

Počet, tvar a velikost chromozómů lze využít spolu s ostatními znaky (např. morfologickými, fytogeografickými, ekologickými, chemickými) jako charakteristiku určité taxonomické skupiny a k definování rozdílů mezi skupinami. **Většinu karyologických znaků ale lze spíše využít k charakteristice skupin na úrovni druhové a nižší.**

Karyosystematika věnuje pozornost i **uspořádání homologních chromozómů při redukčním dělení**, které (zjednodušeně řečeno) odráží míru vývojové příbuznosti rodičovských genomů. Pravidelný průběh meiózy při gametogenezi má totiž zásadní význam pro životaschopnost

gamet, a tedy i pro schopnost produkovat životaschopné potomstvo. U polyploida hybridního původu se mohou přednostně párovat chromozómy v rámci rodičovských sad, ačkoliv genetické rozdíly mezi sadami neumožňují párování „homologních“ chromozómů. Polyploidizace ve spojení s hybridizací má proto obrovský význam v evoluci vyšších rostlin, protože v mnoha případech obnovuje plodnost hybridů, kteří by jinak zůstali sterilní.

Informace o počtu chromozómů může být cenným vodítkem v těch případech, kdy se v rámci celé skupiny příbuzných taxonů vyskytuje více stupňů ploidie, které někdy tvoří celé polyploidní řady (komplexy). **Diploidní taxony jsou pokládány za původnější**, polyploidní za odvozenější, vzniklé často hybridizací taxonů s nižší ploidní úrovní (např. polyploidní komplex *Dactylis glomerata*).

Proměnlivost v počtu a morfologii chromozómů nemá stejnou váhu a význam ve všech taxonomických skupinách. Některé skupiny jsou z karyologického hlediska značně **uniformní**; např. v podčeledi **Maloideae** (rody *Malus*, *Pyrus*, *Crataegus*, *Sorbus*) jsou chromozómové počty založeny na násobcích čísla 17 (základní číslo $x = 17$) a většina druhů je diploidních se somatickým chromozómovým počtem $2n = 34$. Polyploidní jsou v této podčeledi hlavně apomiktiční hybridy.

Karyologicky značně **homogenní** je čeleď **Pinaceae** z nahosemenných (rody *Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Larix*), která obsahuje pouze diploidy se somatickým chromozómovým počtem $2n = 24$. Chromozómové sady zástupců této čeledi jsou si značně podobné, tj. chromozómy mají podobnou velikost a tvar (**homogenní karyotyp**).

Naopak **značná rozrůzněnost** jak v počtech chromozómů, tak v jejich velikosti a tvaru existuje např. v rodu *Crepis* nebo *Delphidium* (stračka) (**heterogenní karyotyp**).

V čeledi miříkovitých (**Apiaceae**) jsou často různé rody charakterizovány **různými základními čísly x** , tj. jejich somatické počty chromozómů jsou tvořeny násobky po sobě jdoucích čísel v rozmezí od 6 do 11.

Před zahájením karyologického studia jakékoliv taxonomické skupiny je třeba si ujasnit, co nám mohou často pracně získaná data o počtech a případně tvaru a velikosti chromozómů poskytnout, a zda nám mohou pomoci v řešení daného problému.

Například znalost chromozómového počtu může být nesmírně cenným vodítkem v některých skupinách morfologicky podobných a snadno zaměnitelných druhů, lišících se právě chromozómovým počtem.

Příklady: - skupina pomněnek *Myosotis palustris* zahrnující diploidní *M. nemorosa* ($2n = 22$), hexaploidní *M. laxiflora*, *M. radicans* a *M. palustris* ($2n = 66$) a oktoploidní *M. caespitosa* ($2n = 88$).

- ze snadno zaměnitelných druhů rozrazilů *Veronica polita* a *V. opaca* je první z nich diploidní ($2n = 14$), druhý tetraploidní ($2n = 28$).

- znalost chromozómového počtu je důležitá např. při určování druhů rodu *Callitriche* (hvězdoš), z živočichů např. u hrabošů a mnoha dalších rodů.

B-chromozómy

V karyotypech některých skupin vyšších rostlin, ale i v živočišné říši, se vyskytují tzv. **B-chromozómy** (někdy označované jako nadpočetné nebo akcesorické chromozómy). Jejich označení „B“ vyjadřuje určitou odlišnost ve vzhledu i chování oproti „regulérním“ A-chromozómům, charakteristickým pro daný taxon; to souvisí s genetickým obsahem B-chromozómů, který zřejmě není pro životaschopnost organismu nezbytný. Dosud nepanuje zcela jednotný názor ani na jejich obecný přínos pro organismus, ani na jejich škodlivý vliv projevující se zejména snížením zdatnosti nositelů nebo potomstva při nahromadění velkého množství B-chromozómů. Nové studie B-chromozómů se shodují, že tyto chromozómy jsou mnohem zajímavější, než se původně předpokládalo, a že rozhodně nejsou inertní a mohou mít vliv na svého nositele. Předpokládáný původ i mechanismus jejich vzniku se u různých druhů organismů liší, i když má u všech podobné základní sekvence.

U vyšších rostlin se B-chromozómy častěji vyskytují např. v čeledích *Poaceae*, *Asteraceae*, *Cichoriaceae* nebo *Liliaceae*. Jejich přítomnost a počet může, ale nemusí být stálý ani mezi jedinci v populaci, ani v rámci jedné rostliny mezi různými pletivy a buňkami. Přítomnost B-chromozómů v karyotypu se vyjadřuje zápisem typu např. $2n = 18 + 0 - 2B$, kde 18 znamená stálý somatický počet chromozómů a kde v buňkách individua (nebo rostlin v populaci) byly pozorovány přídatné B-chromozómy v počtu od 0 do 2.

Příklady: měsíčnice roční: $28 + 2B$; řepčík královský: $24 + 0 - 12B$; psárka luční: $28 + 0 - 2B$; žito seté: $14 + 0 - 8B$; kukuřice setá: $20 + 1 - 7B$)

Poznámka: U ptáků jsou často kromě sady autozómů i **mikrochromozómy** (mikrosatelity).

Pohlavní chromozómy u rostlin

Pohlavní chromozómy u dvoudomých rostlin s chromozomálním určením pohlaví mají speciální význam. Převážná těchto rostlin je typu *Drosophila*, tj. s homogametickým samičím pohlavím a heterogametickým samčím (výskyt např. v rodech šťovík (*Rumex acetosa*, silenka dvoudomá (*Silene dioica*, syn. *Melandrium* - Y-chromozóm mnohem větší než X), *Asparagus*, posed dvoudomý (*Bryonia dioica*), papája obecná (*Carica papaya*). Typ *Abraxas* má např. jahodník *Fragaria orientalis* nebo modelová rostlina molekulární biologie - topol chlupatoplodý (*Populus trichocarpa*).

Pohlaví u typu *Drosophila* bývá určeno nejen přítomností nebo nepřítomností Y chromozómu, ale exprese samčího pohlaví je většinou dána ještě počtem X chromozómů a ostatních chromozómů sady (autozómů).

Základní karyologické charakteristiky a jejich variabilita u krytosemenných rostlin

Počet chromozómů

Chromozómový počet se zjišťuje nejčastěji z buněk dělicích se somatických pletiv (např. meristémů kořenových špiček). Počet chromozómů stanovený v **somatických buňkách** se konvenčně označuje jako **2n**. Chromozómový počet v zárodečných buňkách (např. v pylových mateřských buňkách během mikrosporogeneze) je tzv. **gametický počet** s označením **n**. Pokud je meióza pravidelná a již proběhlo redukční dělení, je počet chromozómů v zárodečných buňkách snížen oproti somatickým buňkám na polovinu. Počítat chromozómy v zárodečných buňkách může být proto výhodné tam, kde je v somatických buňkách vysoký počet drobných chromozómů (např. rod *Carex*, *Bolboschoenus*, většina kapradin), případně u rostlin, jejichž somatické meristémy jsou hůře dostupné nebo se obtížně zpracovávají. Použitelnost zárodečných buněk pro počítání chromozómů je omezena např. u některých **apomiktických** rostlin, kde je meióza nepravidelná nebo neprobíhá vůbec.

Důležitou charakteristikou, významnou především na úrovni rodové a vyšší, je tzv. **základní chromozómové číslo** (značí se **x**). Jeho násobky tvoří chromozómové počty jednotlivých druhů rodu. Pokud se jedná o celé násobky základního čísla, mluvíme o **euploidii** (nebo orthoploidii). Stav, kdy se počet chromozómů od základního čísla drobně odchyluje, nazýváme **aneuploidii** (nebo anorthoploidii). Některé rody (nebo dokonce i čeledi) mají jen jedno základní číslo, jiné jich mají několik (např. *Pinaceae* $2n = 24$, *Apiaceae* různý počet).

Z krytosemenných rostlin byl nejnižší známý somatický počet chromozómů zjištěn u *Haplopappus gracilis* ($2n = 4$) (čeleď *Asteraceae*). Naopak některé vysoce polyploidní apomiktické druhy rodu *Poa* mají v somatických pletivech víc než 200 chromozómů. Mnohem vyšším somatickým chromozómovým počtem se vyznačují některé kapradiny (např. *Ophioglossum reticulatum* - hadilka - má $2n$ vyšší než 1 200).

Počet chromozómů u vybraných organismů:

červ <i>Ascaris megalocephala</i> (škrkavka)	$2n = 2$
<i>Haplopappus gracilis</i> (<i>Asteraceae</i>)	$2n = 4$
škarda vláskovitá (<i>Crepis capillaris</i>)	$2n = 6$
muntžak červený (<i>Muntiacus muntjak</i>)	$2n = 6$
huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	$2n = 10$ (i tetraploid $2n = 20$)
drozofila (<i>Drosophila melanogaster</i>)	$2n = 8$
bob koňský (<i>Vicia faba</i>)	$2n = 12$
cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i>)	$2n = 16$
včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	samička $2n = 32$, sameček $2n = 16$
ředkev setá (<i>Raphanus sativus</i>)	$2n = 18$
prase domácí (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	$2n = 38$
člověk (<i>Homo sapiens</i>)	$2n = 46$
kůň (<i>Equus</i> sp.)	$2n = 64$
hraboši	$2n = 17 - 64$
nosorožec dvourohý (<i>Diceros bicornis</i>)	$2n = 84$

prstnatec májový (<i>Dactylorhiza majalis</i>)	2n = 80
stařinec oranžový (<i>Tephrosieris aurantiaca</i>)	2n = 96
kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	2n = 104
kapradina hadilka	
<i>Ophioglossum petiolatum</i>	2n = 510
<i>Ophioglossum reticulatum</i>	2n = více než 1 200
	(některé populace i 1 440 – tj. 96x; x = 15)

Velikost chromozómů

Velikost chromozómů je stejně jako jejich počet **značně variabilní**. Řádově se pohybuje většinou v mikrometrech. Velmi drobné chromozómy, o délce až kolem 0,2 μm , mají např. někteří zástupci čeledi *Cyperaceae*: tato velikost už je na hranici rozlišitelnosti optického mikroskopu s imerzním objektivem, běžně užívaného ke studiu chromozómů. Naopak velké chromozómy se vyskytují v čeledích *Paeoniaceae* nebo *Liliaceae*: největší chromozóm u cibule (*Allium cepa*) měří 10 μm , chromozómy některých druhů rodu *Lilium* dosahují délky až 25 μm .

Poznatky o tvaru a velikosti chromozómů v určité skupině mohou vypovídat o **vývojových vztazích mezi taxony**: i zde totiž existují znaky pokládané za primitivní a znaky odvozené, vývojově pokročilejší. Z tohoto hlediska je důležitý pojem tzv. **symetrie versus asymetrie karyotypu**. **Karyotypy symetrické** sestávají z chromozómů přibližně stejné velikosti a převládají v nich metacentrické chromozómy (s centromérou uprostřed). **Asymetrie karyotypu** vzrůstá jednak se stoupající rozrůzněností chromozómů v sadě podle délky, jednak se stoupajícím podílem chromozómů akro- a telocentrických (s centromérou posunutou ke konci raménka).

Symetrické karyotypy jsou pokládány za primitivnější, asymetrické za odvozené, charakteristické pro více specializované taxony.

Löve Á., Löve D. (1975): Plant chromosomes. J. Cramer, Vaduz.

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

Suda J. (2009): Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? Živa 5/2009, 204-208.

CVIČENÍ Č. 3

VELIKOST GENOMU, ANEUPLOIDIE

Materiály zajistí dr. Vrána z ÚEB Olomouc

CVIČENÍ Č. 4

DIFERENCIÁLNÍ BARVENÍ CHROMOZÓMŮ

- techniky proužkování chromozómů

Princip technik proužkování (taky pruhování neboli banding; pruh = band):

Chromozómy mají v metafázi **omezený počet morfologických charakteristik**, které je dovolují navzájem odlišit. Jsou to: **délka chromozómů, umístění centroméry, délka jednotlivých ramen a sekundární konstriktce**. Pokud tyto charakteristiky chybí, jsou chromozómy nerozlišitelné.

Rozlišení umožňuje **metoda podélné diference chromozómů, tzv. proužkování chromozómů (banding)**. Každý chromozóm karyotypu je odlišitelný rozdílně umístěnými proužky.

Specifické oblasti na chromozómu nazvané **heterochromatin** (viz i E. Heitz - Historie cytogenetiky) zůstávají během telofáze kondenzovány a v interfázním jádře vytvářejí vysoce kondenzovaná chromocentra (například u mrkve a brusinky).

Konstitutivní (obligátní) heterochromatin – na chromozómech se nachází zejména v centromerách a telomerách; v oblastech nukleárního organizátoru mitotických chromozómů, v interfázi → tvorba chromocenter. Je pozdně se replikující, geneticky inertní a obvykle obsahuje vysoce repetitivní sekvenční DNA.

Fakultativní (příležitostný) heterochromatin (dočasně netranskribované geny) představuje potenciálně inaktivní chromatin zahrnující např. interfázovou kondenzaci jednoho chromozómu X či celého chromozómového páru (Barrovo tělísko). Fakultativní heterochromatin může přecházet z inaktivního heterochromatinu v euchromatin (u eukaryot může sloužit k regulaci genetické informace).

Konstitutivní heterochromatin má identické pruhy na homologních chromozómech, **fakultativní heterochromatin** je charakteristický rozdílnými pruhy na homologních chromozómech. Distribuce konstitutivního heterochromatinu je chromozómově a druhově specifická a může být použita k identifikaci chromozómů.

Množství heterochromatinu v jádrech je závislé na transkripční aktivitě: málo heterochromatinu je přítomno v transkripčně aktivních nádorových buňkách, naopak zralé spermatocyty – transkripčně inaktivní – jsou prakticky vyplněny transkripčně inaktivním kondenzovaným heterochromatinem.

První techniky proužkování byly popsány v roce **1968** a byly to první metody, které rozlišovaly chromozómy na základě jejich lineární diferenciací. V roce 1968 **Caspersson** se spolupracovníky popsal metodu proužkování chromozómů za použití fluorescenční alkylační látky – quinacrinu mustard (**Q-banding**). Tato látka byla použita k identifikaci chromozómů u různých rostlinných a živočišných druhů, včetně člověka.

Nejdůležitější aplikací proužkovacích technik je **identifikace chromozómů v karyotypu**. Můžeme identifikovat nejen celé chromozómy, ale především malé úseky na chromozómu, které jsou výsledkem přestavěného karyotypu. Mnohé translokace jsou reciproké a nemohou být detekovány pomocí jednoduchých barvicích technik, a ty, které nejsou reciproké, zahrnují tak malé množství genetického materiálu, který je nepozorovatelný. Většina takových translokací má vážné klinické následky, jako např. Philadelphský chromozóm, který je odpovědný za chronickou myeloidní leukémii. Tento chromozóm je definován jako nerekiproká translokace části dlouhého ramene chromozómu 22 a dlouhého ramene chromozómu 9.

Základní typy proužkování:

Barvení specifických frakcí chromatinu

C–banding (*constitutive heterochromatin*)

C-banding je charakterizován vznikem pruhů v oblasti centromery. Je indukován působením kyseliny octové, hydroxidem barnatým, horkou solí a barvením **Giemsovým barvivem** (proto často označován i jako Giemsa C-banding). Obecně je používán k **identifikaci oblastí konstitutivního heterochromatinu**. Tento typ DNA často obsahuje vysoce repetitivní sekvenční, jako satelitní DNA, které jsou geneticky inaktivní.

Giemsa C–banding technika byla původně vyvinuta pro **lidské chromozómy**, kde se diferenciálně barví centromerický úsek a také ostatní úseky obsahující konstitutivní heterochromatin, což jsou obvykle úseky telomerické nebo subtelomerické. Slouží k sledování variability tohoto chromatinu u různých osob (např. strukturálních aberací postihujících heterochromatinové oblasti Y chromozómu).

Je vhodný i pro rostlinný materiál, protože distribuce C-bandů je u různých druhů různá. Významně se podílí na identifikaci chromozómů **obilovin**, kde se dají odlišit translokované linie u pšenice. Chromozómy žita v karyotypu pšenice jsou charakterizovány přítomností velkého telomerického C–pruhu.

Mechanismus C-banding:

Mechanismem je **selektivní extrakce euchromatinových segmentů z chromozómových ramen**, zatímco větší část DNA zůstává v proužcích. Extrakce DNA je výsledkem 3 základních kroků:

- 1) depurinace DNA (působením 45% kys. octové)
- 2) ireversibilní (nevratná) denaturace DNA (hydroxidem barnatým – 5% Ba(OH)₂)
- 3) extrakce depurinované DNA z oblastí mimo proužky (inkubace v horkém SSC pufru)
- 4) barvení Giemsou

Tato metoda se rovněž nazývá **BSG** (barium–saline–Giemsa). Ukazuje polohu konstitutivního heterochromatinu a tmavé pruhy lze tedy očekávat u centromér a telomér.

NOR – banding (*Ag-NOR-banding*)

Tato technika byla vyvinuta pro **diferenciální barvení organizátoru jadérka (NOR)** u rostlinných a živočišných chromozómů.

Selektivně **detekuje oblasti organizátoru jadérka** – tj. **sekundární konstrikci** a v interfázním jádře **jadérko** – tento úsek na chromozómu obsahuje mnohonásobné kopie genů a ribozomální RNA.

Barvicí látkou je **AgNO₃** (dusičnan stříbrný), který **barví proteiny jadérka** – tj. na chromozómech se sekundární konstrikcí zbytky proteinů). Počet chromozómů, které obsahují sekundární konstrikci, kolísá od 1 páru k několika (záleží to na druhu). Proces normální nukleogeneze spočívá v zániku jadérka na konci profáze a jeho vytvoření v telofázi.

Ag–NOR–banding je používán v karyotypu k identifikaci satelitního chromozómu a k analýze aktivity jadérka. V karyotypu člověka selektivně barví satelity u 5 párů akrocentrických chromozómů – 13, 14, 15, 21 a 22.

Metoda barvení organizátoru jadérka a jadérka v interfázním jádře, NOR – banding

Pro speciální barvení organizátoru jadérka (NOR) byla modifikována metoda dle:

Howell, W.M. and Black, D.A. (1980): Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014.

Postup barvení:

- Materiál:** kořenový meristém cibule (*Allium cepa* L.) a bobu (*Vicia faba* L.)
Předpůsobení: p-dichlorbenzen 3,5 hod. (nebo kolchicin 0,1% roztok 2 hod.)
Fixace: Carnoy I (3:1)
Hydrolýza: 5M HCl 25 min., laboratorní teplota
Roztlak: v kapce 45% kyseliny octové, krycí sklo odstraněno přes suchý led, dehydratace v 96% etanolu (2x po 15 min) a vysušení na vzduchu
Barvení: 1. roztok - 2g práškové potravinářské želatiny rozpustit ve 100 ml dest. vody a přidat 1 ml kyseliny mravenčí
2. roztok - 50% vodný roztok AgNO₃

Pro barvení se pipetuje 10 µl želatinového roztoku (**1.**) a 20 µl 50% AgNO₃ roztoku (**2.**) na preparát. Roztlak se přikryje krycím sklem a položí na desku vyhřátou na 70 °C. Asi po 2 min barvicí roztok zhnědne. Potom krycí sklo smyjeme stříkačkou nad kádinkou. Preparát se vysuší na vzduchu a uzavře do Euparalu (přes 80% etanol) nebo DePeXu (přes xylén).

Na uzavřeném preparátu pozorujeme žlutě zbarvená interfázní jádra a uvnitř černě zbarvená jadérka. Na satelitních chromozómech se specificky barví organizátor jadérka – chromozómy jsou žluté, NOR – tmavý pruh.

Barvení strukturních proužků chromatinu

G – banding (*Giemsa*)

Jednoduchý dvoustupňový proces zahrnuje **enzymatické předpůsobení za použití trypsinu** a následné barvení **Giemsou** (případně Leishmanovým barvivem nebo Wrightem). Je to metoda, která byla vyvinuta paralelně s C-bandingem – vytváří na podélné délce chromozómu tmavé a světlé pruhy – tzv. **G-pruhování**.

Obecně lze říci, že **tmavé G-pruhy** (G – pozitivní) jsou relativně bohaté na A-T a jsou pozdně se replikující (heterochromatin), zatímco **světlé G-pruhy** (G – negativní) jsou raně se replikující a transkripčně velmi aktivní (euchromatin). Předpokládá se, že mechanismus vedoucí ke vzniku G – pruhů souvisí se změnami chromozómových proteinů.

Tento typ proužkování se užívá **především u živočišných chromozómů**; přítomnost G-pruhů u rostlin je stále předmětem diskuse. Chromozómy nabarvené touto technikou obsahují mnoho

proužků, proto je tato technika **důležitá v klinické cytogenetice**. G-banding není aplikovatelný u všech druhů, ale obecně může být použit u obratlovců. Tímto způsobem proužkování je možné získat i **informace o fylogenetickém vývoji mezi druhy**.

(viz sestavování karyotypu člověka barveného G-bandingem ve Cvičení z genetiky ve 2. ročníku bakalářského studia)

Q – banding (*fluorescenční banding; quinacrin*)

První technika proužkování chromozómů. Byla vyvinuta **Casperssonem a spol.** (1968, 1971), kteří použili fluorochrom **quinacrin** (chinakrin; derivát chininu) pro diferenciální barvení chromozómů *Vicia faba* L. Po barvení quinacrinem nebo quinacrin mustardem určité oblasti chromozómů vykazovaly jasnou fluorescenci. Tyto pruhy jasné fluorescence jsou chromozómově specifické a mohou být použity k identifikaci chromozómů. Důležité u této metody proužkování chromozómů je aplikace fluorescenčních barviv bez předchozího chemického působení, které by poškozovalo strukturu chromatinu nebo dokonce odstraňovalo některé komponenty chromozómů.

Jiná barviva pro fluorescenční banding: acridine orange, ethidium bromide, propidium iodide, Hoechst 33258, DAPI.

U živočichů Q-banding odpovídá G-bandingu, používá se jako doplňková metoda, zejména při hybridizaci *in situ*.

U rostlin se shoduje s oblastmi konstitutivního heterochromatinu zdůrazněné C-bandingem.

Hy-banding u rostlin (*HCl, hydrochlorid acid*)

Rostlinné chromozómy vykazují tmavé a světlé pruhy po působení kyselinou chlorovodíkovou. Hy-banding chromozómů bobu detekuje pruhy na satelitním metacentrickém chromozómu.

R-banding (*reverse*)

Reversní banding. Opak G – pruhování. Tmavé pruhy se objevují v oblastech bohatých na G-C, obsahují druhou frakci euchromatinu s časnou replikací.

Užívá se pro zpřesnění analýz nebo ke studiu pozdně se replikujícího X-chromozómu.

Postup: krátká inkubace chromozómů v horkém SSC pufru (denaturace a následná renaturace DNA při alkalickém působení za vyšší teploty), následuje barvení **Giemso** (označení **RHG**). Druhou možností R-bandingu je barvení chromozómů přímo bez inkubace SSC pufrém **akridinovou oranží (RFA)**.

U rostlinných chromozómů je obecně menší využití pruhovacích metod, protože rostlinná DNA je 8 i vícekrát spiralizovanější, a proto jsou chromoméry špatně odlišitelné od pruhů; podobně je pruhování obtížné i u nižších obratlovců a bezobratlých.

METODY ŽIVOČIŠNÉ CYTOGENETIKY

Karyotyp je dnes popsán u řady příslušníků nejrozličnějších živočišných kmenů.

Z metodického hlediska je **nejobtížnější preparace chromozómů bezobratlých**. Výjimku tvoří skupiny významné zejména jako modelové objekty (*Molusca, Diptera*); v počátcích je cytogenetika některých parazitických forem, kde karyotyp může být významným determinacním znakem.

Cytogenetika obratlovců se vyznačuje nerovnoměrností v počtu druhů s dosud popsaným karyotypem, a to jak mezi, tak i uvnitř jednotlivých tříd. Nejlépe prozkoumány jsou karyotypy hospodářsky významných druhů savců, kdy se množství známých poznatků blíží úrovni běžné cytogenetice humánní.

U **ptáků** existují základní popisy karyotypů jen u malého procenta celkového počtu druhů; nejlépe je zpracován pouze kur domácí (*Gallus domesticus*) a několik dalších hospodářských druhů.

Ze **studenokrevných obratlovců** je situace příznivá u obojživelníků, kteří jsou tak po savcích nejlépe prozkoumanou skupinou.

Cytogenetika **plazů a ryb** nedosahuje takové úrovně, a to pro nesmírné bohatství druhů.

Pro **paryby a kruhoústé** je dosud jen velmi málo údajů.
Proužkovací metody lze aplikovat jen u vyšších obratlovců.

Metody studia chromozómů u živočichů

1. Nakapávané techniky (vysušení na vzduchu)

Materiál: **dělicí se buňky**

- **kostní dřev** savců, obojživelníků a ptáků
- **slezina**
- **buňky střevního epitelu**
- **fibroblasty** (pojivová tkáň)

Jiné zdroje než savčí buňky:

- a) teplokrevní živočichové
 - ptáci (**inkubace leukocytů**)
 - obojživelníci (**buňky střevního epitelu a buňky kostní dřevě**)
- b) studenokrevní živočichové
 - plazi (**leukocyty**)

2. Roztlakové preparáty

- **obojživelníci: střevní epitel** - buňky epitelu jsou seškrabány ze stěny svalů a barveny v acetoorceinu a roztačeny ve 45% kys. octové
- **ptáci: pulpa ptačího pera**
je preferována před leukocyty, protože nepoškozuje živočicha, materiál se aktivně dělí a nepotřebuje kultivaci
- **larvy Dipter: neuroblasty, testes**

● Metoda barvení pulpy ptačího pera:

Výhody:

- buňky pulpy jsou vždy dostupné
- pulpa obsahuje aktivně se dělicí buňky
- není nutná kultivace buněk
- časově nenáročná metodika

Metoda dle Schoffnera et al. (1996) – barvení laktopropionovým orceinem:

1. Nejvhodnější jsou **nezralá nepigmentovaná pera** – např. pera z malých sotva vylíhnutých ptáků; u vzrostlých bereme malá pera. Na 30-40 min vpravujeme vnitřně do bříška 0,05% roztok **kolchicinu** nebo 0,05% roztok **kolcemidu** (= derivát kolchicinu) (40 µl na 30 kg váhy mladého ptáka a 1 ml na 1,3 kg vzrostlého ptáka).
2. Po 30-45 min po zavedení kolcemidu vytrhneme pero a vymačkáme pulpu. Pulpa se dá do kapky **hypotonického roztoku** (0,45% Na-citrát). Je-li pulpa velká asi 1 mm, hypotonizace trvá asi 10-15 min při pok. teplotě. Větší množství pulpy pera se rozdělí na menší kousky a hypotonizuje se 15-20 min. Pulpa dospělých ptáků bývá často želatinovaná nebo vláknitá a musí se macerovat 10% trypsinem.
3. Po hypotonizaci se kousky pulpy fixují čerstvě připraveným fixačním roztokem **45% led. kyseliny octové**. Doba fixace je nejméně 30 min.
Tkáň může být skladována v uvedeném fixansu několik hodin až dní (při 4 °C v chladničce).
4. Z fixačního roztoku vyjmeme kousek pulpy na filtrační papír, osušíme a dáme na podložní sklo. Pomocí pinzety tkáň krouživým pohybem jemně **rozetřeme** asi na $\frac{3}{4}$ plochy podložního skla a rychle přikryjeme krycím sklem, aby preparát nezaschl.
5. Provedeme **roztlak** přes filtrační papír palcem kolmo na preparát po několik sekund.
6. Barvíme **laktopropionovým orceinem**.

První možnost: Malý kousek pulpy vložíme na 5-10 min do několika kapek barviva v hodinovém skle, poté ji přeneseme na podložní sklo, rozetřeme a roztačíme.

Druhý způsob: nejdříve provedeme roztačení pulpy na podložním skle, přidáme kapku barviva, nahřejeme nad plamenem a zarámujeme. Preparáty mohou být barveny i Giemsou (2%) ve fosfátovém pufru při pH = 6,8 asi 10 min.

Tyto dočasné preparáty je možné převést přes suchý led a uzavřít přes xylén do DePeXu (viz návod v dodatcích).

• **Technika barvení gonád u larvy *Eristalis tenax*:**

Systematické zařazení:

Řád: *Diptera* – dvoukřídlí

Čeleď: *Syrphidae* – pestřenkovití

Rod: *Eristalis* – pestřenka

Druhy: *E. arbustorum*

E. tenax (L.) – pestřenka (včelice) trubcová



Eristalis tenax

Postup barvení:

Fixáž: 3 : 1 (96% etanol : led. kyselina octová)

Uchovávání: 70% etanol

Macerace: 96% etanol : 5M HCl (v poměru 1:1)

Barvení: roztlak v kapce **acetoorceinu**
Zahřátí + barvení v teplém roztoku barviva
odsátí přebytku barviva
rámování

• **Mitóza pozorovaná na neuroblastech drozofily – rychlá roztlaková 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. na cvičení).

Postup barvení:

Fixáž larev: 3 : 1 (96% etanol . led. kyselina octová)

Uchovávání: 70% etanol

Barvení: roztlak v kapce **laktopropionorceinu**

Vypreparovaný ganglion drozofily dáme na podložní sklo do kapky acetokarmínu a po přikrytí krycím sklíčkem a mírném roztlaku vyhledáme pod mikroskopem vhodné metafázové figury; pozorujeme pod imerzí s 100x zvětšujícím objektivem.

Pozorujeme 8 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.

Relichová J. (2001): Praktická cvičení z genetiky. Skripta MU Brno, Brno.

Pohlavní chromozómy u živočichů

- velká většina živočichů jsou hermafrodité, bisexualita je výjimkou
- hermafrodité: např. hlísti, žížaly, pijavice, měkkýši
- hermafroditismus je pro evoluci výhodnější než gonochorismus
- oddělené pohlaví – výhoda pro vyšší živočichy

X, Y chromozómy (typ *Drosophila*)

XX – homologní svou délkou, samičí karyotyp (homogametické pohlaví)

XY – nehomologní nebo částečně homologní, samčí karyotyp

X – přítomen u obou pohlaví

Y – přítomen pouze u jednoho pohlaví

(u rostlin je tento typ přítomen např. u *Melandrium album*, *Acetosa* sp., *Asparagus* sp.)

XX – pohlaví homogametické, protože produkuje pouze jeden typ gamet (X).

XY – pohlaví heterogametické, produkuje dva typy gamet (X a Y)

V některých skupinách živočichů Y chromozóm chybí.

Z, W chromozómy (typ Abraxas) (*Abraxas grossularia* = píďalka angreštová)

ZZ – samčí karyotyp (homologní)

ZW – samičí pohlaví (heterogametické) – motýli, ptáci, některé ryby, obojživelníci, červi

(u rostlin je tento typ přítomen např. u jahodníku *Fragaria orientalis*)

Příklady karyotypů:

Karyotyp kura domácího (*Gallus domesticus*)

$2n = 78$

6 párů makrochromozómů a 29 párů mikrochromozómů

- ptačí chromozómy nemají sekundární konstrikci

- pro ptáky je typický vysoký počet chromozómů – malý počet **makrochromozómů** reprezentující asi 2/3 genetické výbavy a větší počet **mikrochromozómů**, ale jen menší část geonomu

- centroméra makrochromozómů – metacentrická nebo submetacentrická

- mikrochromozómy – akro- až telocentrické

Doporučená literatura:

Kristýna Pospíšilová: Cytogenetická studie ptačího genomu. Bakalářská práce PřF UP Olomouc, Katedra buněčné biologie a genetiky, 2006.

Karyotyp člověka

- do roku 1950 byly lidské chromozómy studovány pouze na histologických řezech (např. parafinové řezy z varlat mrtvých mužů) – takto byl stanoven počet chromozómů $2n = 48$

- před rokem 1956 byly známy pouze dvě skutečnosti o lidské genetice: počet chromozómů a XX – XY orientace

Historie:

1956 – začátek moderní lidské genetiky

1956 – Tjio a Levan (viz i Historie cytogenetiky) upřesnili počet chromozómů – $2n = 46$

1979 Hsu rozdělil výzkum cytogenetiky u člověka do 4 oblastí:

1. doba temna – před rokem 1952

2. doba hypotonická – 1952-1958

3. doba trisomiků – 1959-1969

4. doba bandingů – od 1970 dosud

5. doba molekulární genetiky – od 1985 dosud

ad 1) chromozómy byly pozorovány na řezech z tkání mrtvol a barveny hematoxylinem

ad 2) předfixační působení v hypotonickém roztoku soli, kde se separují chromozómy; je to období počátku analýzy lidského karyotypu – pokus o rozlišení jednotlivých chromozómů

ad 3) zavedeny nové metody pro analýzy chromozómů mentálně postižených – tak byla v r. 1959 objevena trisomie 21 (Downův syndrom), Turnerův syndrom (X0), Klinefelterův syndrom (XXY) jako abnormální pohlavní vývoj. Později další syndromy: trisomie 13 (Patauův s.), trisomie 18 (Edwardův s.).

Studie chromozómů se začaly věnovat aberacím a jejich fenotypovým projevům. Inovovaly se metody buněčných kultur, kde byly použity lymfocyty z periferní krve.

Doporučený článek: [George Klein: Ateista a Svaté město a jiné eseje \(Císařovy nové šaty\).](#)

[Vesmír 79, 166, 2000/3.](#)

Konvence pro popis lidských chromozómů

Konference o nomenklatuře chromozómů:

Denver 1960

Londýn 1963

Chicago 1966

Paříž 1971 – tady byl ustanoven mezinárodně uznávaný systém kvalifikace chromozómů (Pařížská nomenklatura). Byl založen na identifikaci chromozómů pomocí G-pruhování a identifikoval různé chromozómové abnormality. Chromozómy jsou číslovány podle Casperssona (1971), který jako první publikoval G-banding karyotyp.

Pravidla v popisu chromozómů:

1. počet chromozómů daného druhu – *Homo sapiens* - 46
2. pohlavní orientace za číslem – 46, XY
3. dále následuje číslo abnormálního chromozómu – 46, XY, 16
4. označení ramene abnormálního chromozómu - 46, XY, 16q
5. specifikace původu a umístění abnormality - 46, XY, 16qh+
p = krátké rameno
q = dlouhé rameno
h+ = přídavný heterochromatin

Příklady: 47, XX, +13 = žena s trisomií chromozómu 13 (Patauův syndrom)
45, XY, -21 = muž s monosomií chromozómu 21 (Downův s.)

Páry autozómů jsou řazeny do 7 skupin (A - G) se stabilním počtem homologních párů.

Základní metody prenatalní diagnostiky

1. **Roentgenové vyšetření plodu:** odhalení vad kostního systému, amniografie – využívá kontrastní náplně amniotické dutiny k lokalizaci placenty, určení pohlaví plodu, stanovení vitality plodu.
2. **Fetální elektrodiagnostika:** významná k vyšetření plodu se zvýšeným rizikem výskytu vývojových vad kardiovaskulárního systému.
3. **Ultrazvukové vyšetření plodu:** poruchy vývoje plodu, sledování růstu plodu, vrozených vad.
4. **Fetoskopie:** amnioskopem zavedeným transabdominálně umožňuje určení pohlaví plodu, přímý odběr krve plodu; umožňuje diagnózu vrozených vývojových vad.
5. **Amniocentéza:** transabdominální amniocentéza; možno provádět v 14. – 16. týdnu těhotenství, nejdéle však do 24. týdne pro možnost potratu; odběr 10-20 ml plodové vody (žlutá barva; u odumřelého plodu je barva hnědá). Buňky plodové vody pocházejí z amnia, tj. z povrchu těla plodu.

Příprava preparátu k cytogenetickému vyšetření

Nakapávaný preparát z předem kultivovaných leukocytů

(lze použít u všech savců)

1. 10 - 20 ml periferní krve se odebere do zkumavky s heparinem (zábrana srážení).
2. Umístění do termostatu při 37 °C na 1 - 2 hod.
3. Krev se rozdělí na erytrocyty (dole) a na leukocyty (nahore).
4. 0,8 ml plazmy s leukocyty přeneseme do sterilních podmínek, přidáme 8 ml pufru pro kultivaci buněk (např. glutamin + herpes) a 0,1 ml fytohemaglutininu* + antibiotika.
5. Kultivujeme při 37 °C 72 hod. (3 dny).
6. 1,5 hod. před ukončením kultivace přidáme kolchicin (mitotický jed).
7. Centrifugujeme.
8. K sedimentu přidáme hypotonický roztok (0,075M HCl) a vytvoříme homogenní suspenzi buněk.
9. Suspenzi buněk přeneseme do 10 ml čerstvě připravené fixáže 3 : 1 (u lidských leukocytů se používá místo etanolu metanol).
10. Nakapáváme na podložní sklo, vysušíme na vzduchu a barvíme Giemsou.

* Fytohemagglutinin: zkr. PHA – látka rostlinného původu z fazole *Phaseolus vulgaris* patří k lektinům; aglutinuje krevní buňky a je schopen stimulovat lymfocyty k dělení.

Příprava cytogenetického preparátu u člověka

Nakapávaný preparát z předem kultivovaných leukocytů

1. 10-20 ml periferní krve se odebere do zkumavky s heparinem.
2. Umístění do termostatu při 37 °C na 1 - 2 hod.
3. Krev se rozdělí na erytrocyty (dole) a na leukocyty (nahore).
4. 0,8 ml plasmy s leukocyty přeneseme do sterilních podmínek, přidáme 8 ml pufru pro kultivaci buněk (např. glutamin + herpes) a 0,1 ml fytohemaglutininu + antibiotika.
5. Kultivujeme při 37 °C 72 hod. (3 dny).
6. 1,5 hod. před ukončením kultivace přidáme kolcemid.
7. Centrifugujeme.
8. K sedimentu přidáme hypotonický roztok (0,075M HCl) a vytvoříme homogenní suspenzi buněk.
9. Suspenzi buněk přeneseme do 10 ml čerstvě připravené fixáže 3 : 1 (s metanolem).
10. Nakapáváme na podložní sklo, vysušíme na vzduchu a barvíme Giemsou.
11. Vyhodnocení karyologických figur pomocí počítače.

Hodnocení z 20 metafází, z 10 karyotypizovaných buněk.

DODATKY:

Příprava vybraných barviv a roztoků:

Laktopropionový orcein:

Příprava zásobního roztoku:

2 g orceinu rozpustíme za chladu v 100 ml směsi kyseliny propionové a mléčné v poměru 1 : 1. Necháme týden ustát a přefiltrujeme.

Uchováváme v tmavé zabroušené láhvi v chladu.

Pracovní roztok: zásobní roztok ředíme v poměru 10 : 3 destilovanou vodou; občas přefiltrujeme.

Acetokarmín:

45 ml ledová kyselina octová

55 ml destilovaná voda

0,5 g karmín

Do vařící tekutiny přidáme barvivo, krátce povaříme, zamícháme a necháme vychladnout. Po vychladnutí přefiltrujeme. Karmín různé šarže od různých výrobců může barvit různě intenzivně. Nejsme-li s barvicí schopností připraveného roztoku spokojeni, lze koncentraci barviva zvýšit (pracujeme raději s 1 g karmínu).

Uchováváme v laboratorní teplotě.

Příprava železitého acetokarmínu (1,5% roztok):

1,5 g karmínu (např. Serva) přidáme do 100 ml 45% kyseliny octové a zvolna vaříme 0,5 - 1 h za stálého míchání v Erlenmayerově baňce (s úzkým hrdlem přikrytým hodinovým sklíčkem). Vychladlý roztok zfiltrujeme. K polovině připraveného acetokarmínu přidáme několik kapek roztoku chloridu železitého (v 45% kys. octové), dokud barvivo není modravě červené, ale bez vysrážení. Potom přidáme zbytek neupraveného acetokarmínu.

Uchováváme v hnědé zabroušené láhvi při pokojové teplotě. Občas přefiltrujeme.

Acetoorcein:

Zásobní roztok: 2,2 g orceinu rozpustíme za mírného varu ve 100 ml ledové kyseliny octové.

Po dokonalém rozpuštění roztok zfiltrujeme a ředíme.

Standardní pracovní roztok je 1% ve 45% kyselině octové.

Poznámka: Trvanlivost barviva je dobrá, ale je potřeba čas od času roztok přefiltrovat.

Karbolfuchsin (carbol-fuchsin):

Koncentrovaný roztok: 5-7 g bazického fuchsinu (nebo Parafuchsin, Serva) rozpustíme ve 100 ml čistého etanolu; nerozpuštěné barvivo odstraníme filtrací. Filtrát zředíme 900 ml 4% vodného roztoku fenolu (navazovat a pracovat v gumových rukavicích!).

Příprava Schiffova reagens:

(Lilie 1951) – na 100 ml

1. 85 ml destilované vody
2. 10 ml 1 mol/l HCl (= 1M HCl)
3. 1,9 g $K_2S_2O_5$ (= pyrosiřičitan draselný)
4. 1 g Parafuchsin (Serva) (jiný název Pararosanilin)

1.den - Míchat 1 hod v zazátkované hnědé nádobě. Nechat stát (uzavřené) ve tmě přes noc.

2.den - Přidat 1 g aktivního uhlí (Norit) a míchat 1 min. Filtrovat přes filtrační papír **navlhčený**

1M HCl (nebude-li roztok bezbarvý, tak postup opakovat).

Skladovat v co nejmenší hnědé zábrusné láhvi při 4 °C.

Pozn.: Bílá sraženina na dně není na závadu. Fuchsin basic (Serva) vyžaduje až 4x aktivní uhlí.

Lilie, R.D. (1951): Allochrome procedure; differential method segregating connective tissues collagen, reticulum and basement membranes into two groups. *Am. J. Clin. Pathol.* 21: 484-488.

Správně připravený roztok je čirý a je-li správně uskladněn, až dva měsíce dobře barví. Použitý roztok barviva se zpět k zásobnímu roztoku již neleje. V případě, že se Schiffovo barvivo zkazí a zbarví se, lze jej

obnovit tak, že k 100 ml roztoku barviva přidáme 0,5 g NaHSO₃. Pokud roztok nevybledne, přidá se několik kapek 1 mol/l HCl. Obnovený roztok může být používán několik týdnů, pokud je uložen v ledničce a ve tmě. Obnovení může být jednou nebo 2x opakováno.

Chung C.F., Chen Ch.M. (1970): Restoring exhausted Schiff's reagent. Stain. Techn. 45: 91-92;
Cabral H. R. A., Novak I. T. C., Rabino Z. M., Robert G. B. (1997): A simple method to restore exhausted Schiff reagent. Journal Of Histotechnology. 20(1): 79-80.

Hematoxylin - zásobní roztok (25 ml):

2,5 g hematoxylin
25 ml 96% etanol
0,5 g KJO₃ (= jodičnan draselný)

Vše ředíme 1 : 20 destilovanou vodou. Získáme 0,5 l roztoku barviva.

Před prací jej přefiltrujeme.

Nepřipravujeme jako zásobní roztok. Při vlití do vody musí mít voda fialovou barvu. Jakmile voda zhnědne, je třeba hematoxylin vyměnit.

0,1 % roztok kolchicinu:

Navážku 0,1 g kolchicinu doplníme do 100 ml destilovanou vodou. Uchováváme v ledničce při 4 °C.

Nasycený roztok para-dichlorbenzenu:

Navážku 5 - 10 g krystalického p-dichlorbenzenu dáme do 500 ml destilované vody v láhvi se zábrusem a uložíme přes noc do termostatu při 60 °C. Uchováváme při pokojové teplotě.

Fyziologický (Schenův) roztok:

7,0 g NaCl
0,42 g KCl
0,25 g CaCl₂ - vše rozpustíme v 1 l destilované vody

Fruktózový sirup:

30 g fruktózy
20 ml destilované vody
malý krystal thymolu na konzervaci (po rozmíchání fruktózy s destilovanou vodou)

Necháme v termostatu (35 °C) zhoustnout.

Giemsovo barvivo (Giemsa) používané v proužkovacích metodách:

= komplexní směs barviv s různým stupněm oxidace. Obsahuje **metylénovou modř, azur A, B, C, thionin a eosin**. Molekuly barviv jsou v interakci s fosfátovými skupinami DNA. Intenzita zbarvení záleží mimo jiné na tom, kolik DNA obsahuje volných fosfátových skupin a jaká jejich část je obsazena bílkovinami.

5M HCl (1 litr):

412,5 ml konc. HCl doplníme destilovanou vodou do 1 litru. (+ 588 ml dest. vody)

Kyselinu vždy lijeme do vody!

100 ml – 41,2 ml konc. HCl doplníme do 100 ml destilkou (+ 58,8 ml dest.)

1M HCl (1 litr):

82,5 ml konc. HCl doplníme destilovanou vodou do 1 litru. (+ 917,5 ml dest. vody)

100 ml - 8,25 ml konc. HCl doplníme do 100 ml destilkou (+ 91,75 ml dest.)

45% kyselina octová – 100 ml:

54,6 ml destilované vody + 45,4 ml ledové kyseliny octové

DAPI (4',6 - diamidino-2-phenylindole. 2 HCl) - konc. 1 µg/ml

zásobní roztok: 0,1 mg DAPI do 1 ml deionizované vody

pracovní roztok: 1 µg DAPI v 1 ml deionizované vody

(10 µl zásobního roztoku do 1 ml dest.vody)

Uchovávání: zásobní roztok při -20 °C, tma; pracovní roztok při +4 °C, tma, asi 2 týdny

Pozn.: Pokud pracovní roztok má vyšší koncentraci, fluoreskuje pozadí preparátu.

DePeX

= komerční výrobek firmy Serva, obsahující neutrální roztok polystyrénu a dalších plastických hmot v xylénu. Slouží k rámování roztlakových a roztěrových preparátů. Orámováním preparátů se prodlouží jejich trvanlivost.

Kyselina octová ledová - 99,8 % p.a.

při uložení v chladničce při +4 °C přechází do tuhého skupenství („led“).

Systematický název	kyselina ethanová/kyselina methyl-karboxylová
<u>Triviální název</u>	kyselina octová
Latinský název	Acidum aceticum
<u>Anglický název</u>	Acetic acid
Německý název	Essigsäure
<u>Funkční vzorec</u>	CH ₃ COOH
<u>Sumární vzorec</u>	C ₂ H ₄ O ₂
Vzhled	bezbarvá kapalina

Poznámka: molarita roztoku se správně udává v **mol.l⁻¹** (= starší označení M)

POZNÁMKY K MIKROSKOPOVÁNÍ:

Postup na začátku mikroskopování:

1. Mikroskop zapojíme do zásuvky elektrického vedení a zapneme žárovku. Do optické osy mikroskopu nastavíme objektiv 4x (na některých mikroskopech 10x), stolek posuneme dolů. Aperturní (irisovou) clonu kondenzoru úplně otevřeme a nastavíme intenzitu světla pomocí regulátoru osvětlení asi na polovinu.
Připomínka: Plné intenzity světla užíváme jen výjimečně, protože se tím zkracuje životnost žárovky a může se poškozovat zrak!
2. Upravíme si rozestup okulárů tak, abychom oběma očima viděli jen jedno zorné pole.
3. Zkontrolujeme čistotu optiky: Otáčíme okuláry a případný prach z čoček kondenzoru a okulárů odstraňujeme odmaštěným štětečkem (pomocí 96% etanolu) nebo pomocí ofukovacího balónku (**v žádném případě foukáním!**).
4. Zaostření a centrování objektu: Na stolek položíme preparát a pozorovaný objekt umístíme na střed kondenzoru. Stolek posuneme makrošroubem **nahoru na doraz**. Při pohledu v okuláru zaostřujeme na objekt pomalým posunováním stolku pomocí makrošroubu **směrem dolů** a doostříme mikrošroubem.
5. Vyrovnáme světlost obrazového pole regulátorem osvětlení a kontrast obrazu pomocí aperturové (irisové) clony.
6. Pozorovaný detail umístíme doprostřed zorného pole (centrujeme). Je-li třeba, vyměníme objektiv za silnější pomocí revolverového měniče objektivů. Při normální tloušťce krycího skla přitom **nehýbáme stolem a detail doostříme pouze mikrošroubem**.
Pozor - silně zvětšující objektivy mají čelní čočku těsně u krycího skla – při neopatrné manipulaci hrozí nebezpečí poškození čoček objektivů a preparátu!
7. Vyrovnaní dioptrické vady oka: Nejlépe při větším zvětšení (obj. 20x, 40x) zaostříme mikrošroubem na určitý detail objektu **jen s pravým okulárem**. Poté tentýž detail pozorujeme pouze **levým okulárem**, a pokud jej nevidíme stejně ostře, doostříme pomocí dioptrického kroužku na levém okuláru (**bez použití makro- a mikrošroubu**). Zapamatujeme si polohu na ryse pro příští pozorování mikroskopem.

Postup k nastavení správné apertury kondenzoru pro jednotlivé objektivy:

1. Objektivem 4x (a poté 10x a 40x) **zaostříme objekt** v preparátu. Aperturní clonu úplně uzavřeme.
2. Vyjmeme pravý okulár a tubusem pozorujeme osvětlenou zadní čočku objektivu. Pohybujeme páčkou aperturní clony a pozorujeme pohybující se okraj clony v zadní čočce objektivu.
3. Clonu otevřeme tak, aby se její okraj kryl s okrajem zadní čočky objektivu. Tím je dosaženo stejné apertury objektivu s aperturou kondenzoru a je splněna podmínka nejlepšího rozlišení mikroskopu.
4. Nasadíme zpět okulár a pozorujeme buňky při $NA_{obj.} = NA_{kond.}$. Intenzitu osvětlení upravíme regulátorem osvětlení. Nyní zkusíme pohybovat páčkou aperturní clony a pozorujeme objekty při různém zaclonění. Všimneme si zvýraznění kontur buněk při větším zaclonění.

V praxi cloníme vždy o trochu víc než $NA_{obj.} = NA_{kond.}$ (clonu otevřeme nejčastěji na 70-80 %), abychom získali kontrastnější obraz. Nemá se ale překročit mez, kdy průměr otvoru clony odpovídá 1/3 průměru zadní čočky objektivu. Při větším clonění vznikají optické artefakty (např. světlé lemy kolem struktur, které jsou výsledkem výsledkem ohybu světla, a jsou zobrazeny nečistoty v různých výškách média).

Mějme na paměti, že:

- **nadměrné přiclonění** způsobuje zúžení světelného kužele vytvořeného kondenzorem; to snižuje číselnou aperturu kondenzoru i objektivu, a tím se zhoršuje rozlišovací schopnost mikroskopu, přičemž hloubka ostrosti se přitom zvětšuje.
- **nedostatečné přiclonění** (tj. nadměrné otevření aperturní clony) způsobuje přesvětlení objektu, čímž se zmenšuje kontrast obrazu a zmenšuje se zároveň hloubka ostrosti. Přesvětlený objekt může být pro pozorovatele neviditelný.

Kvalitní obraz je vždy kompromisem mezi kontrastem, rozlišením a hloubkou ostrosti.

Pro každý objektiv upravujeme aperturu kondenzoru zvlášť.

Na konci mikroskopování

1. Vypneme žárovku mikroskopu a vytáhneme šňůru ze zásuvky.
2. Vytáhneme a dle pokynů vedoucího zrušíme preparát.
3. Pokud jsme pracovali s imersním objektivem (100x), odstraníme podle doporučených instrukcí imersní olej.
4. Do optické dráhy mikroskopu nastavíme nejmenší objektiv a mikroskop přikryjeme obalem, případně schováme do skříňky.

RUŠENÍ PREPARÁTŮ:

Dbejte pokynů vedoucího cvičení po ukončení cvičení:

1. Z podložního skla opatrně odstraníme krycí sklo a vyhodíme jej do koše na sklo. Podložní sklo umyjeme jarem, opláchneme vodovodní a poté destilovanou vodou a dáme na sušák. Suché sklo se před dalším použitím ponoří do 96% etanolu.
2. Preparáty barvené jedovatými barvivy nebo prohlížené s použitím imersního oleje vyhazujeme celé do odpadu na sklo (viz pokyny vedoucího).

Nejčastější chyby v mikroskopování:

- nedodržení sledu jednotlivých úkonů (viz str. 49);
- použití silně zvětšujícího objektivu (40x) hned na začátku mikroskopování;
- preparát je položen krycím sklem dolů;
- nesprávné osvětlení a clonění (viz str. 50);
- necentrování objektu v zorném poli;
- neproostřování pozorovaného objektu pomocí mikrošroubu*.

(*Poznámka: Lidské oko při pozorování akomoduje, optická soustava mikroskopu akomodovat neumí!)

Nejčastější závady při mikroskopování a jejich odstraňování – viz následující tabulka

Hlavní zásada: nesvíti-li mikroskop, nejdříve zkontrolujeme přívod elektrické šňůry a kontakty, nesvíti-li dále, pak je nutno zkontrolovat žárovky – to nezkoušíme sami, ale přenecháváme vedoucím cvičení!!!

Závady při mikroskopování a jejich odstraňování:

Závada	Příčina	Odstranění
Světelný elektrický zdroj nesvíí	Špatně zasunuta průvodní šňůra!	Překontrolovat přívod el. proudu
	Spálená el. žárovka nebo výbojka	Odpojit mikroskop od elektrického zdroje a žárovku či výbojku vyměnit
Obraz je neostrý a nelze jej při použití silnějších objektivů zaostřit	Preparát je položen na stůl krycím sklíčkem dolů	Položíme správně preparát
	Příliš silné krycí sklíčko	Použijeme správné krycí sklíčko (o tloušťce 0,17 mm)
	Vrstva zalévajícího média je příliš silná	Upravíme znovu preparát
Obraz je zamlžen nebo skvrnitý	Je znečištěný okulár (poznáme při otočení okulárem)	Okulár očistíme od prachu a jiných nečistot, otisku prstů apod.
	Příliš silné krycí sklíčko	Použijeme správné krycí sklíčko
	Objektiv je znečištěn prachem, imerzním olejem, ...	Objektiv očistíme štětcem od prachu, opatrně odstraníme imerzní olej směsí éter-etanol nebo jen etanolem
Obraz je nedostatečně osvětlen	Kondenzor je umístěný příliš nízko	Posuneme kondenzor nahoru
Obraz je málo kontrastní	Irisová clona kondenzoru je příliš otevřena	Irisovou clonu přivřeme (nastavíme podle použitého objektivu na 70-80 % NA objektivu)
Málo zbarvený objekt není vidět	Příliš otevřená aperturní clona	Silně přivřeme aperturní clonu
Objekt nelze nalézt při pozorování silným objektivem	Objekt (detail) nebyl ve středu zorného pole při pozorování slabším objektivem	Pozorovaný detail předem nastavíme při pozorování slabším objektivem přesně do středu zorného pole
Osvětlena je pouze část obrazu	Revolverová hlavice s objektivy je neúplně dotočena	Otočíme revolverem s objektivy, až zaklapne západka
Zorná pole v pravém a levém okuláru nejsou stejně zaostřena	Je nastavena nesprávná dioptrická korekce	Upravíme dioptrickou korekci kroužkem levého okuláru

Další doporučení ke správnému mikroskopování:

Správné pokládání krycího sklíčka

Krycí sklíčko pokládáme tak, že jednu jeho hranu položíme na podložní sklo blízko kapky vody a pak jej přiklopíme přes kapku vody na podložní sklo. Tím zamezíme vzniku bublin mezi oběma skly. Krycí sklíčko uchopujeme pouze za hrany a dbáme, abychom je nepošpinili – každá nečistota se odrazí v získané kvalitě mikroskopického obrazu.

Práce s imerzním objektivem (100x oil, bílý kroužek u čelní čočky objektivu)

- Při zaostřenému objektu preparátu objektivem 40x posuneme pozorovaný detail doprostřed zorného pole (centrujeme).
- Objektiv 40x posuneme doleva na poloviční vzdálenost k objektivu 100x, na povrch krycího skla do optické osy mikroskopu dáme kapku imerzního oleje ($n = 1,5$), zasuneme objektiv 100x (**nehýbáme stolkem!**) a mírným kývavým pohybem spojíme kapku oleje s čočkou objektivu.
- Obraz **doostříme pouze mikrošroubem**. Upravíme kontrast obrazu aperturní clonou (aperturní clona kondenzoru je nastavena na použitý objektiv 100x) a intenzitu osvětlení preparátu regulátorem osvětlení.

Užíváme **tenkých krycích skel** (0,17 mm a tenčích).

Imerzní olej používáme pokud možno bez bublinek! **Nemícháme oleje** různých značek a firem dohromady, jinak dochází k zakalení oleje.

Pro fluorescenci používáme **speciální imerzní olej**, který je bez autofluorescence.

Na kvalitnější imerzní objektiv 100x je **irisová clonka** (viz fluorescenční mikroskop BX60): při používání tohoto objektivu při pozorování ve světlém poli je clona úplně otevřená, při pozorování fluorescence je clona otevřená jen zčásti podle intenzity fluorescence.

Úplný imerzní systém – k dokonalému využití osvětlení preparátu použijeme tzv. úplný imerzní systém, tj. imerzní olej dáváme mezi krycí sklo a čelní čočku objektivu i mezi čočku kondenzoru a podložní sklo (důležité např. pro pozorování v zástínu).

Po ukončení mikroskopování očistíme čočku objektivu (příp. kondenzoru) od imerzního oleje nejdříve na sucho měkkým hadříkem, pak hadříkem navlhčeným ve směsi éter : etanol (7 : 3) a ihned utřeme dosucha; podobně čistíme trvalý preparát. **Imerze by se neměla nikdy dostat na suchý objektiv! Citlivý je obzvláště objektiv zvětšující 40x, který má jen velmi malou pracovní vzdálenost (cca 0,5 mm)!!!**

Čištění čoček: Čočky čistíme jemným hadříkem namočeným ve směsi éter : etanol (7 : 3) a ihned utřeme dosucha (do tmele, kterými jsou čočky spojeny, se nesmí dostat rozpouštědlo!). Vnitřek optických dílů nečistíme; tuto práci svěřujeme odborníkům!

Čištění podložních skel: umytí jarem a opláchnutí vodovodní vodou → opláchnutí destilovanou vodou → usušení na stojánku → uložení do nádoby s 96% etanolem → vyleštění jemným bavlněným hadříkem. Označení podložních skel fixkou předem odstraníme pomocí 96% etanolu. Některá použitá podložní skla (po barvení jedovatými barvivami nebo znečištěná imerzním olejem – viz doporučení vedoucího) vyhazujeme do odpadního skla.

Použitá krycí sklíčka nečistíme, vyhodíme je do odpadu skla.

Výskyt artefaktů

Mezi artefakty patří různé nečistoty, krystalky barviva, vlákna papíru, vaty, otisky prstů, poškození vyvolaná preparací pletiva, tkáně a buněk.

Čím víc přiclونíme, tím víc artefaktů uvidíme (zvýšíme hloubku ostrosti a kontrast, takže mohou být zobrazeny i nečistoty ležící nad a pod pozorovaným objektem).

Základní charakteristiky používaného školního mikroskopu:

Školní mikroskop CHK-2 firmy Olympus

výrobek z roku 1997 (novější typy: studentské mikroskopy CX21 a CX22LED)

Celkové zvětšení 40x až 100x

Objektivy jsou **achromatické** (korekce barevné vady pro červené a modré světlo, vyklenuté zorné pole)

Parametry achromatických objektivů:

		CHK-2		CX21	CX22LED
		pracovní vzdálenost *	rozlišení **	pracovní vzdálenost *	rozlišení
E A4x	NA = 0,10	29,0 mm	3,4 μm	22,0 mm	3,36 μm
E A10x	NA = 0,25	6,3 mm	1,3 μm	10,5 mm	1,34 μm
E A20x	NA = 0,40	$\pm 0,86$ mm	0,82 μm		
E A40x	NA = 0,65 (s pružinou)	0,53 mm**	0,52 μm	0,56 mm	0,52 μm
E A100x oil	NA = 1,25 (s pružinou)	0,2 mm	0,26 μm	0,13 mm	0,27 μm

* = Working distance (WD);

** Rozlišení = nejmenší vzdálenost dvou od sebe odlišených bodů ($d = 0,61 \cdot \lambda / \text{Na}_{\text{obj}}$)

**** Pozor na malou pracovní vzdálenost u objektivu 40x – ta je jen 0,5 mm !!!**

Označení na objektivě u školního mikroskopu Olympus CHK-2:

	E A4	E A10	E A20	E A40	E A100
NA objektivu	0,10	0,25	0,40	0,65	1,25 oil
	160/ -	160/ -	160/ 0,17	160/ 0,17	160/ -
barevný kroužek	červený	žlutý	zelený	modrý	bílý

(k rychlé orientaci zvětšení)

Vysvětlení označení na objektivě:

E = z angl. *enlarge* = zvětšení

A = typ odstraněné vady, v tomto případě *achromát*

4 = zvětšení objektivu (4x)

0,10 = NA objektivu

160 = mechanická délka tubusu 160 mm

∞ = mechanická délka tubusu neomezena (optika s korekcí na nekonečno)

160/- = / - použití preparátu s krycím i bez krycího skla

/0 = preparát bez krycího skla (hlavně metalurgické objektivy)

/0,17 = preparát s krycím sklem o předepsané tloušťce 0,17 mm

oil = imerzní objektiv na imerzní olej

Okuláry u CHK-2

CHWK 10x-T (číslo pole 18)*, možnost použití mikrometru

průměr zorného pole:

4,5 mm (obj. 4x)

1,8 mm (obj. 10x),

0,45 mm (obj. 40x),

0,18 mm (obj. 100x) (tj. 180 μm)

Dioptrické nastavení levého okuláru v rozmezí plus minus 5D

Vzdálenost mezi pupilami nastavitelná v rozmezí 54-72 mm

***Číslo pole:** číselná hodnota (v mm), která udává průměr obrazu otvoru clony pole v zorném poli okuláru.

Průměr zorného pole (P): aktuální velikost zorného pole v mm ($P = \text{číslo pole okuláru} / \text{zvětšení objektivu}$)

Kondenzor – NA (numerická apertura) = 1,25 (s imerzí)

Mechanická délka tubusu 160 mm (u firem Olympus, Nikon)

Binokulární tubus skloněný o 45 °, otočný o 360 °, zvětšovací faktor 1

Stolek s křížovým posuvem

Šroub pro jemné zaostření (pravý) s měřítkem: jedna otočka o 360 ° = 0,22 mm, jeden dílek měřítka = 1,1 μm

Osvětlení: vestavěný iluminátor, halogenová žárovka 6 V 20 WHAL (Philips 7388)

Nastavitelná intenzita světla (v noze stativu) – kroužek regulátoru osvětlení

Hmotnost mikroskopu 4,2 kg; příkon max. 20 VA (W)

Další podrobnosti viz http://opticalservice.cz/download/navody/Olympus_CHK2.pdf

Mikroskopy řady CX21 – mají kvalitnější objektivy typu UIS (Universal infinity Systém – optika s korekcí na nekonečno) – **planachromáty** (označené Plan), které mají kromě odstraněné barevné vady pro červené a modré světlo odstraněnu i sférickou vadu (jsou vhodné i pro mikrofotografii)

Pracovní vzdálenost (Working distance - WD): u obj. 10x je vyšší – 10,5 mm – než u CHK-2

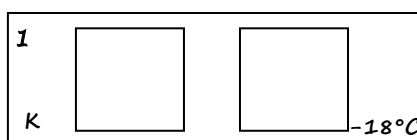
Osvětlení: 6 V, 20 W halogenová žárovka – označení 6V20WHAL (Philips Type 7388)

Mikroskopy řady CX22LED – pracují s LED žárovkou (0,5 W) s dlouhou dobou životnosti.

U tohoto typu osvětlení není nutno vypínat LED žárovku při krátkodobém přerušení mikroskopování.

Jinak platí, že při přerušení mikroskopování, vypínáme žárovku mikroskopu.

Příklad popisu dočasných preparátů na podložním skle (fixkou na sklo):



1 = pořadové číslo
podložního skla

K = kontrolní suspenze

-18 °C = suspenze
zamražená v -18 °C

Ponechat volné místo na okrajích
podložního skla, kam se nedostane
objektiv mikroskopu (cca 0,5 cm).

Před čištěním podložního skla popisky fixkou odstraníme pomocí 96% etanolu nebo setřeme hubkou.

K zopakování:

Morganovy zákony:

1. Geny jsou lineárně uspořádány na chromozómech.
2. Geny jednoho chromozómu tvoří vazebnou skupinu. Počet vazebných skupin organismu je shodný s počtem párů homologních chromozómů, které má;
3. Mezi geny homologického páru chromozómu může prostřednictvím crossing-overu probíhat genová výměna. Frekvence crossing-overu je přímo úměrná vzdálenosti genů.

Drosophila jako jeden z experimentálních modelových organismů:

Drosophila melanogaster L. – octomilka obecná (ovocná – banánová - muška), se ukázala jako jeden z nejideálnějších laboratorních modelů pro cytogenetická studia. Kompletní životní cyklus z vajíčka po dospělce trvá deset dnů. Tento hmyz dává více než třicet generací za rok. Je lehce křížitelná, fertilní. Velké chromozomy slinných žláz (polytenní chromozomy) jsou mnohonásobně větší než normální somatické chromozomy. Ideální je rovněž nízký počet chromozomů: $n = 4$.

V r. 1995 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu za objasnění úlohy regulačních genů časného embryonálního vývoje; pokusy byly provedeny na drozofile (Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhardová a Eric F. Wieschaus).

Mendelovy zákony:

1. Zákon uniformity hybridů v F1 generaci

Jsou-li rodiče ve sledovaném znaku homozygotní jsou jejich potomci genotypicky i fenotypicky uniformní. Potomci dominantního a recesivního homozygota jsou všichni uniformní, heterozygoti.

2. Zákon nestejnorodosti F2 generace

Při křížení heterozygotů se v potomstvu vyštěpují znaky hybridních rodičů v charakteristickém poměru celých čísel.

3. Zákon volné kombinovatelnosti genů

- při tvorbě gamet dochází k náhodné segregaci alel jednotlivých alelových párů;
- při segregaci alel do gamet se alely různých genů (na různých lokusech) kombinují nezávisle na sobě;
- při vzájemném křížení vícenásobných heterozygotních hybridů vznikne mezi alelami sledovaných znaků (genů) tolik kombinací, kolik je teoreticky možných matematických kombinací mezi vzájemně nezávislými veličinami.

Literatura k cytotaxonomii:

Knoz J., Opravilová V. (1992): Základy mikroskopické techniky. Skripta MU Brno.

Kočárek E., Pánek M., Novotná D. (2006): Klinická cytogenetika I. Skriptum UK 2. LF, Karolinum, Praha.

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

Kuglík P. (2000): Vybrané kapitoly z cytogenetiky. Skriptum, Masarykova univerzita v Brně, Vydavatelství MU, Brno-Krávická hora, 2000.

Levan A., Fredga K., Sandberg A. A. (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Lewis R. (2010): Human Genetics, Concepts and Applications, 9th edition, The McGraw-Hill Companies.

Löve Á., Löve D. (1975): Plant chromosomes. J. Cramer, Vaduz.

Matis D. a kol. (2001): Mikroskopická technika. Faunima, Bratislava.

Němec B. a kol. (1962): Botanická mikrotechnika. Nakladatelství ČSAV, Praha.

Paleček J. (1996): Biologie buňky, I. Základy mikroskopické cytologie. Skripta UK Praha.

Pazourková Z., Pazourek J. (1960): Rychlé metody botanické mikrotechniky. ČAZV, SZN Praha.

Ruzin S. E. (1999): Plant microtechnique and microscopy. Oxford University.

Snustad D. P., Simmons M. J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno, 1. vydání.

Šafářová D. (2011): Kapitoly z obecné genetiky. Skripta. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Internetové adresy:

Populárně-naučné články: <http://www.osel.cz/>

http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_home.html

<http://www.slideshare.net/medik.cz/praktikum-3-07>

<http://library.cincymuseum.org/bot/grew.htm>

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/crick-bio.html