

MITÓZA V BUŇKÁCH KOŘENOVÉ ŠPIČKY CIBULE (*ALLIUM CEPA* L.)

(Základní technika barvení chromozomů. Fáze buněčného cyklu a mitózy podle nativního a trvalého preparátu. Výpočet mitotického indexu.)

ÚVOD

Sled pochodů probíhajících v buňce od skončení jedné mitózy do konce mitózy následující se nazývá *buněčný cyklus* (dále BC). Ve zkratce probíhá následovně: Buňka přesně zdvojnásobuje svůj obsah DNA a zdvojuje svou cytoplazmu včetně organel. Po rovnoměrném rozdělení jádra a jeho obsahu (mitóza) dojde k samotnému fyzickému oddělení buněk, kdy je mezi nově vznikající buňky rozdělena cytoplazma a organely (cytokineze). Mitóza a cytokineze tvoří dohromady *M fázi* (mitotickou fázi) buněčného cyklu. Zbývá část buněčného cyklu - doba mezi jednotlivými následnými buněčnými děleními - se označuje jako *interfáze* (dále INT).

Interfáze

Interfáze zaujímá nejméně 90% z celkového času BC a biologická aktivita buňky je v jejím průběhu velmi vysoká (období kontinuálního růstu buňky). Dělíme ji na tři části: G_1 , S a G_2 . V G_1 -fázi (z angl. gap - první mezera) probíhá syntéza bílkovin, DNA polymerázy, syntéza RNA a tubulinu, v periodě označované *S-fáze* (syntetická fáze) je syntetizována DNA (replikace DNA a histonů s následným zdvojením chromozomů, zdvojení páru centriol u živočišných buněk) a v poslední fázi BC nazývané G_2 -fáze (druhá mezera) probíhá metabolická aktivita a růst buňky (žádná replikace DNA). Během G_1 (u živočichů a u rostlin) a G_2 (jen u rostlin) mohou buňky přecházet - reverzibilně - do klidové fáze G_0 .

Trvání BC - *generační doba buňky* - hodně kolísá, závisí na typu buňky a na jejím fyziologickém stavu. Některé buňky se dělí vícekrát za hodinu, zatímco jiným může BC trvat více než den (př.: *Vicia faba* - celý cyklus trvá cca 19 hod, z toho G_1 - 5 h, S - 7 h, G_2 - 5 h, M - 2 h; embryo – BC zkrácen až na 30 minut). V mnohobuněčném organismu se většina buněk nachází v G_0 fázi, navíc počet jejich možných dělení je výrazně omezen. Velmi často dochází také k zastavení dělení, jakmile buňka dosáhne určité specializace (např. nervové tkáň, svalová vlákna). Růst organismu a zvýšení počtu buněk zpravidla zajišťují kmenové buňky nebo meristémy (u rostlin).

Na konci interfáze má buňka jedno nebo více jadérek a její jádro je ještě obklopeno jadernou membránou. U živočišných buněk se na vnější straně jádra nachází dva centrozomy, které byly duplikovány v průběhu INT a u živočichů obsahují dvojici centriol. Mikrotubuly, vzniklé polymerací tubulinu, tvoří kolem každého centrozomu kruhovou řadu zvanou *astrosféra* (astery). Jednotlivé chromozomy ještě nemohou být v této fázi rozlišeny mikroskopem, protože jsou tvořeny tenkými a poměrně volně spiralizovanými chromatinovými vlákny.

MITÓZA

Mitóza, **mitotické dělení**, se objevuje u eukaryot a je evoluční adaptací spojenou s problémem přesného rozdělení genetického materiálu jádra do dvou dceřiných buněk. Ačkoliv určité detaily mitózy se od jednoho organismu k druhému mohou lišit, základní mechanismus, kterým mitóza probíhá, je u eukaryot obdobný a rozdělení rodičovského genetického materiálu (zdvojeného v S-fázi buněčného cyklu) je velmi přesné.

Mitózu dělíme do 5 fází: *profázi*, *prometafázi*, *metafázi*, *anafázi*, a *telofázi*; po ní následuje vlastní dělení buňky, *cytokineze*.

Profáze

Během profáze se projevují změny jak v jádře, tak v cytoplazmě. Dochází k rozpadu endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu na malé fragmenty, v jádře mizí jadérka. Chromozomová vlákna se více spiralizují a vytvářejí jednotlivé chromozomy pozorovatelné světelným mikroskopem. Každý zdvojený chromozom je tvořen dvěma sesterskými chromatidami, které jsou propojeny po celé délce za pomoci proteinu *kohezinu* a každá z nich nese specifickou oblast primární konstrikce, centromeru. V oblasti centromery vzniká na každé chromatidě chromozomu složitá proteinová struktura označovaná jako *kinetochor*. Na počátku profáze se od sebe oddělují dva centrozomy a pohybují se k opačným pólům buňky. Tyto slouží jako organizátory mikrotubulů, z nichž se vytváří mitotické (dělicí) vřeténko. Některá vlákna dělicího vřeténka sahají od jednoho pólu směrem k rovníku buňky, kde se spojují, tzv. *polární vlákna*. Centrozomy jsou pak označovány za póly vřeténka.

Prometafáze

Ke konci profáze se rozpadá jaderná membrána. Mikrotubuly vřeténka mohou nyní pronikat do oblasti jádra a spojují se s již plně spiralizovanými chromozomy (kvarterní struktura chromozomu). Některá vlákna mitotického vřeténka pronikají až ke chromozomům, kde se připojují na kinetochory v oblasti centromery, tzv. *kinetochorová vlákna*. V buňce zůstávají i nepřipojená vlákna, která tvoří tzv. *astrosféru*.

Metafáze

Centrozomy jsou na protějšcích stranách (na pólech) buňky a určují podélnou osu dělení. Chromozomy se tahem dělicího vřeténka (kinotochorových vláken) seskupují v ekvatoriální rovině buňky (*metafázní destičce*), přičemž centromery všech chromozomů jsou vyrovnané v řadě na metafázní destičce. Tato vlákénka jsou vzhledem ke své funkci v anafázi označována také jako *tažná*.

Metafáze je nejvhodnější fází k počítání chromozomů a k jejich identifikaci.

Anafáze

Anafáze bývá často nejkratším úsekem mitózy. Na začátku anafáze je propojení mezi chromatidami přerušeno za pomoci proteolytického enzymu *separázy* a jednotlivé chromatidy se tahem dělicího

vřeténka pohybují k pólům buňky. Každá chromatida je nyní považována za samostatný chromozom (*dceřiný chromozom*). Aparát mitotického vřeténka zajišťuje rovnoměrnou *segregaci chromosomů*, tj. že z každého chromozomu vždy jedna chromatida putuje k jednomu buněčnému pólu a druhá k opačnému. Chromozomy se k buněčným pólům pohybují zkracováním, depolymerací, kinetochorových vláken centromerou dopředu (jejich rychlost je asi 1 $\mu\text{m/s}$) – anafáze A. Ve stejné době se póly buňky od sebe rovněž vzdalují – anafáze B. Na konci anafáze mají oba póly buňky stejné - a úplné - sestavy chromozomů.

Telofáze

V telofázi dále prodlužují polární vlákna buňku a při pólech buňky se začínají tvořit *dceřiná jádra* v místech, kde se shromáždily chromozomy. Dochází k obnovení jaderné membrány z fragmentů rodičovské jaderné membrány a ostatních částí endoplazmatického retikula, znovu se objevuje jádérko a rozvolňují se chromatinová vlákna každého chromozomu.

CYTOKINEZE

Dělení cytoplazmy a buňky, obvykle probíhá ve stejném čase, za vzniku dvou oddělených dceřiných buněk následuje krátce po ukončení mitózy. U vyšších rostlin vzniká buněčná destička (*fragmoplast*) od středu k obvodu buňky (*centrifugálně*), u živočišných buněk se plasmatická membrána tvoří směrem z obvodu dovnitř (*centripetálně, zaškrcením, rýhováním*) za aktivní účasti mikrotubulů.

Frekvenci mitóz v dané živočišné tkáni či v rostlinném pletivu nám udává tzv. **mitotický index (MI)**. Je to číselný poměr počtu buněk, které se nacházejí ve stadiu mitózy, k počtu všech buněk. Naznačuje proliferaci aktivitu tkáně či pletiva. Zpravidla se vyjadřuje v procentech (%) dělicích se buněk k celkovému počtu buněk ve sledované tkáni. Závisí na délce trvání mitózy a na délce interfáze.

Metody barvení chromozomů

Chromozomy nejsou v normálním světle viditelné, protože mají stejný lom světla jako cytoplazma. Je možné je zviditelnit pomocí fázového kontrastu nebo různým barvením. Dobře se barví *acetobarvivy*, tj. organickými barvivy rozpuštěnými v kyselině octové nebo propionové (acetokarmín, laktopropionový orcein, acetonigrosin, lakmoid ...). Před barvením zařazujeme *fixaci* materiálu, nejčastěji alkohol-octovou (96% etanol : ledová kys.octová v poměru 3:1 - tzv. Farmerova fixáž, FAE) a tzv. *maceraci* (důležitá u rostlin. pletiva k rozrušení středních lamel buněčné stěny), často směsí koncentrované HCl : 96% etanol v poměru 1:1 (nebo 1M nebo 5M HCl, případně enzymaticky pektinázami a celulázami). Barvením acetobarvivy se jasně vybarví chromatin a chromozomy, cytoplazma se zbarví růžově. V případě, že chceme počítat chromozomy, zařazujeme před fixaci tzv. *předpůsobení* (nejčastěji roztok kolchicinu¹, para-dichlorbenzenu², 8-hydroxychinolinu nebo studená

¹ *Příprava 0,1 % roztoku kolchicinu*

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

voda). Předpůsobením se rozruší dělicí vřeténko, chromozomy se zkracují, nedochází k rozchodu chromatid. Jednotlivé chromozomy jsou uvolněny z mitotického aparátu, a tím také lépe rozloženy v celé buňce. Zvyšuje se počet pozorovaných metafází (tzv. *c-mitóza*). Pro přesnější identifikaci jednotlivých chromozomů - zejména v metafázi - slouží v poslední době tzv. *proužkování chromozomů* neboli *banding*. Principem těchto metod je diferenciální barvení chromatinu (vznik proužků, pásků).

Základní schéma barvení kořenových špiček laktopropionovým orceinem³

1. Předpůsobení:	0,1% roztok kolchicinu	2 h
	nebo nasycený roztok paradichlorbenzenu	3,5 h
2. Fixace:	96% etanol : led. kyselina octová (3 : 1)	24 h
3. Macerace:	konc.HCl : 96% etanol (1 : 1)	1-10 min (podle materiálu)
4. Vypírání:	destilovaná voda	1-2 min
5. Barvení:	kapka barviva	
6. Roztlak:	v barvivu na podložním skle + zahřátí	

Jiným častým způsobem barvení chromozomů je *barvení dle Feulgena*. Tímto způsobem se vybarví výhradně struktury obsahující DNA. Pomocí hydrolýzy v HCl (1M HCl při 60 °C nebo 5M HCl při laboratorní teplotě) se z DNA odštěpí purinové báze a barvivo - *bazický fuchsin*, obsažené v *Schiffově reagens* - se naváže na volné aldehydické skupiny zbytků deoxyribózy.

Základní schéma barvení Schiffovým reagens⁴:

1. Předpůsobení:	0,1% roztok kolchicinu (nasycený roztok paradichlorbenzenu)	2 h (4 h)
Fixace:	96% etanol : led. kyselina octová (3 : 1)	24 h
2. Hydrolýza:	5M HCl (laboratorní teplota)	30 min
3. Vypírání:	destilovaná voda	5 min
4. Barvení:	Schiffovo reagens	30 min
5. Vypírání:	destilovaná voda	5 min
6. Macerace:	45 % kyselina octová	2 min
7. Roztlak:	v kapce kyseliny octové nebo železitého acetokarmínu	

METODIKA:

² Příprava nasyceného roztoku 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.

³ Laktopropionový orcein

Příprava zásobního roztoku: 2 g orceinu rozpustíme za chladu ve 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. Podle potřeby přefiltrujeme.

⁴ Schiffovo reagens

Smíchat 170 ml dest. vody, 20 ml 1N HCl, 3,8g K₂S₂O₅, 2g Parafuchsin míchat 2 h v zazátkované nádobě; nechat stát přes noc v uzavřené nádobě; přidat 2 g aktivního uhlí; míchat 1 min; přefiltrovat přes filtrační papír navlhčený 1N HCl (roztok musí být čirý). Uchováváme ve tmavé nádobě v chladničce.

Příprava roztlakového preparátu meristému kořenové špičky cibule

A) Barvení laktopropionovým orceincem

PROVEDENÍ:

Rostlinný materiál

nafixované kořenové špičky cibule kuchyňské (*Allium cepa*)

Pomůcky

mikroskop, podložní a krycí skla, filtrační papír, žiletka, pinzeta, preparační jehly, lihový kahan, zápalky, trvalé preparáty mitózy

Chemikálie a roztoky

barvivo laktopropionový orcein - pracovní roztok, destilovaná voda, macerační směs

Pracovní postup

Před zhotovením preparátu nakličíme na vlhkém filtračním papíru semena cibule. Nakličená semena s asi 1 cm kořínky vložíme do fixační směsi (viz výše) na dobu nejméně 30 min. (Provede vedoucí cvičení).

1. Nafixované kořínky opláchneme v destilované vodě a na 2 min. přeneseme do macerační směsi.
2. Kořínky opět opláchneme destilovanou vodou a položíme na čisté podložní sklo.
3. Z kořínku odřízneme žiletkou kořenovou špičku s meristematickým pletivem, přidáme kapku barviva a necháme působit asi 5 min.
4. Opatrně přiložíme krycí sklíčko a mírným tlakem roztláčíme.
5. Preparát mírně nahřejeme nad plamenem lihového kahanu tak, aby se barvivo nevařilo. Kvalitu roztlaku a zbarvení kontrolujeme průběžně pod mikroskopem (zvětšení 200x a 400x).

B) Barvení Schiffovým reagens:

PROVEDENÍ:

Rostlinný materiál

nafixované kořenové špičky cibule kuchyňské (*Allium cepa*)

Pomůcky

mikroskop, podložní a krycí skla, filtrační papír, žiletka, pinzeta, preparační jehly, lihový kahan, zápalky, trvalé preparáty mitózy

Chemikálie a roztoky

barvivo Schiffovo reagens, kyselina chlorovodíková (5 M), destilovaná voda, 45% roztok kyseliny octové

Pracovní postup

Před zhotovením preparátu naklíčíme semena cibule na vlhkém filtračním papíru. Naklíčená semena s asi 1 cm kořínky vložíme do fixační směsi (viz výše) na dobu nejméně 30 min. /96% etanol : ledová kyselina octová (3:1)/. Fixovaná naklíčená semena, případně kořínky opláchneme v destilované vodě, a nabarvíme v Schiffově barvivu. (Provede vedoucí cvičení).

1. Připravené nabarvené kořínky cibule přeneseme na podložní sklo do kapky 45% kyseliny octové a odřízneme kořenovou špičku. (Zbytek kořínku odstranit.)
2. Přiložíme krycí sklíčko a mírným tlakem špičku roztlačíme.

ÚKOL č. 1: Provedení roztlakového preparátu, pozorování mitózy

- 1.1 Proved'te roztlakový preparát (viz metodika).
- 1.2 Zakreslete jednotlivé fáze mitózy z vlastního preparátu a ke každé fázi zakreslené mitózy stručně napište, co se děje s chromozomy.
- 1.3 Porovnejte obě metody barvení mitotických chromozomů.

ÚKOL č. 2: Vypočítejte mitotický index roztlačeného pletiva kořenové špičky

- 2.1 V 10-ti zorných polích mikroskopu spočítejte všechny buňky a buňky v mitóze.
- 2.2 Mitotický index stanovte podle vzorce: $MI [\%] = M / N \cdot 100$
kde M = počet buněk v mitóze, N = počet všech buněk.
- 2.3 Výsledky z výpočtu mitotického indexu запиšte do tabulky:

Zorné pole č.	Počet buněk v				Počet všech buněk	MI
	profázi	metafázi	anafázi	telofázi		
1.						
...						
Celkem						

ZÁVĚR:

V závěru celého cvičení zhodno'te provedení vlastního roztlakového preparátu a srovnejte různé způsoby barvení chromozomů. Uved'te, které fáze mitózy jste pozoroval/a na vašem roztlakovém preparátu a uved'te počet chromozomů ($2n = \dots$) pro zkoumaný rostlinný druh. Zhodno'te mitotický index roztlačeného pletiva.

Schéma: **Mitóza a cytokineze**

/© 2013 Nature Education; De Mey a kol. Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus* endosperm with the immuno-gold staining method. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 79:1898-902 (2013)./

