

PRAKTICKÁ CVIČENÍ Z OBECNÉ GENETIKY

Mgr. Dana ŠAFÁŘOVÁ, Ph.D.

RNDr. Pavla VÁLOVÁ

RNDr. Lenka UVÍROVÁ

Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta

Univerzita Palackého v Olomouci

Obsah

Mitóza v buňkách kořenové špičky cibule a bobu (<i>Allium cepa</i> L., <i>Vicia faba</i> L.)	3
Polytenní chromozómy v jádrech buněk slinných žláz larvy drozofily	10
Meiotické dělení v nezralých prašnicích pažitky (<i>Allium schoenoprasum</i> L.)	14
Vybrané genetické úlohy a jejich řešení I.	19
Vybrané genetické úlohy II.	23
<i>Drosophila melanogaster</i> Meig. - klasický genetický objekt	28
Pohlavní chromatinový znak u člověka - sex chromatin	33
Karyotyp člověka	37
Genealogie	40
Hlavní krevní skupiny (A, B, AB, 0) a jejich dědičnost	45
Protokol - struktura	51

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

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

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. Pak se jádro a jeho obsah rozdělí (mitóza). Po ukončení mitózy se pochodem zvaným cytokineze rozdělí cytoplazma mezi dceřinými buňkami. Mitóza a cytokineze tvoří *M fázi* (mitotickou fázi) buněčného cyklu. Zbývá část buněčného cyklu - přestávka mezi následným buněčným dělením - se označuje jako *interfáze* (dále INT).

Interfáze

Interfáze zaujímá nejméně 90% 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 chromozómů, 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). V mnohobuněčném organismu se nacházejí rovněž specializované buňky, které se po svém vzniku dělí pouze zřídka nebo vůbec (př. - nervové buňky).

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 páry centriolů, vytvořené rozdělením jednoho páru během INT. Mikrotubuly, vzniklé polymerizací tubulinu, tvoří kolem každého páru centriolů kruhovou řadu zvanou *astrosféra* (astery). Jednotlivé chromozómy ještě nemohou být v této fázi rozlišeny mikroskopem, protože jsou tvořeny poměrně volně spiralizovanými chromatinovými vlákny.

MITÓZA

Mitóza se objevuje u eukaryot a je evoluční adaptací spojenou s problémem přesného rozdělení genetického materiálu do dvou dceřiných buněk. Ačkoliv určité detaily mitózy se od jednoho organismu k druhému mohou lišit, postup, kterým mitóza probíhá, je u mnohých eukaryot podobný. Rozdělení rodičovského zdvojnásobeného genetického materiálu je přitom velmi přesné. Např. experimenty s kvasinkami ukázaly, že chyba při rozdělení chromozómu se vyskytne pouze jednou v přibližně 100 000 buněčných děleních.

Mitózu dělíme do 4 (6) fází: *profázi*, (*prometafázi*), *metafázi*, *anafázi*, *telofázi* (*cytokinezi*).

Profáze

Během profáze se projevují změny jak v jádře, tak v cytoplazmě. V jádře mizí jadérka. Chromozómová vlákna se více spiralizují a vytvářejí jednotlivé chromozómy pozorovatelné světelným mikroskopem. Každý zdvojený chromozóm se jeví jako dvě stejné sesterské chromatidy spojené centromérou. Každá ze dvou chromatid chromozómu má nyní určitou strukturu zvanou *kinetochor*, umístěnou v oblasti centroméry. Během profáze se páry centriolů (u živočišné buňky !, u rostlin amorfní oblast organizačního centra vřeténka) pohybují od sebe pryč podél povrchu jádra tím, že se prodlužují svazky mikrotubulů mezi nimi. V cytoplazmě se tvoří *dělicí vřeténko* (u rostlin achromatické vřeténko); je tvořeno z mikrotubulů a přidružených bílkovin umístěných mezi dvěma páry centriolů. Některá vlákna dělicího vřeténka sahají od jednoho pólu směrem k rovníku buňky - *polární vlákna*, jiná od centriolu ke kinetochorům - *kinetochorová vlákna*. Ke konci profáze se rozpadá jaderná blána. Mikrotubuly vřeténka mohou nyní pronikat rozrušeným jádrem (jadernou membránou) a spojují se s již kompaktními chromozómy (maximální spiralizace chromozómů je dosaženo při přechodu z profáze do metafáze - tzv. *prometafáze*).

Metafáze

Páry centriolů jsou nyní na protějších stranách (na pólech) buňky. Chromozómy se seskupují v ekvatoriální rovině buňky (*metafázní destičce*), přičemž leží svými dlouhými osami přibližně v pravém úhlu k ose vřeténka. Centroméry všech chromozómů jsou v této fázi vyrovnané v řadě na metafázní destičce a jsou přichycovány ke kinetochorovým vláknům dělicího vřeténka - tato vlákna jsou vzhledem ke své funkci v anafázi označována také jako *tažná*. Dochází k *rozdělení centromér*, které spojují obě chromatidy.

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

Anafáze

Anafáze bývá často nejkratším úsekem mitózy. Začíná, když se párové centroméry každého chromozómu pohybují od sebe zvlášť a oddělují tak od sebe sesterské chromatidy. Každá chromatida je nyní považována za samostatný chromozóm (*dceřiný chromozóm*). Vřeténkový aparát pak začíná pohybovat připojenými sesterskými chromatidami směrem k protějším pólům buňky. Z každého chromozómu vždy jedna chromatida putuje k jednomu buněčnému pólu a druhá k opačnému. Chromozómy se k buněčným pólům pohybují zkracováním kinetochorových vláken centromérou dopředu (jejich rychlost je asi 1 $\mu\text{m/s}$). Ve stejné době se póly buňky rovněž od sebe vzdalují. Na konci anafáze mají dva póly buňky stejné - a úplné - sestavy chromozómů.

Telofáze a cytokineze

V telofázi dále prodlužují polární vlákna buňku a při pólech buňky se začínají tvořit *dceřiná jádra* v místech, kde se shromáždily chromozómy. Jaderná blána se vytvoří z fragmentů rodičovské jaderné blány a ostatních částí endoplazmatického retikula. V dalších pochodech, opačných k profázi, se objevuje jadérko a chromatinová vlákna každého chromozómu se rozvinou.

Cytokineze - dělení cytoplazmy - obvykle probíhá ve stejném čase, takže vznik 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, rýhováním*) za aktivní účasti mikrotubulů.

Časový průběh mitózy

př. hrách: profáze - 40 min, metafáze - 20 min, anafáze - 12 min, telofáze - 120 min

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 (%) dělících se buněk k celkovému počtu buněk ve sledované tkáni. Závisí na délce trvání mitózy a na délce interfáze.

Metody barvení chromozómů

Chromozómy 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 chromozómy, cytoplazma se zbarví růžově.

V případě, že chceme počítat chromozómy, zařazujeme před fixaci tzv. *předpůsobení* (nejčastěji roztok kolchicinu¹, para-dichlorbenzenu², 8-hydroxychinolinu nebo studená voda). Předpůsobením se rozruší dělicí vřetenko, chromozómy se zkracují, nedochází k rozchodu chromatid. Jednotlivé chromozómy 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 chromozómů - zejména v metafázi - slouží v poslední době tzv. *proužkování chromozómů* neboli *banding*. Principem těchto metod je diferenciální barvení chromatinu (vznik proužků, pásků).

Základní schéma barvení kořenových špiček laktopropionovým orceinem³

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

Jiným častým způsobem barvení chromozómů 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 fuchsín*, obsažené v *Schiffově reagens* - se naváže na volné aldehydicke skupiny zbytků deoxyribózy.

¹ Příprava 0,1 % roztoku kolchicinu

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

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.

Základní schéma barvení Schiffovým reagens⁴:

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

METODIKA:

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 dejte naklíčit semena cibule na vlhký filtrační papír. Naklíčená semena s asi 1 cm kořínky vložte do fixační směsi (viz výše) na dobu nejméně 30 min. (Provede vedoucí cvičení).

Nafixované kořínky opláchněte v destilované vodě a na 2 min. přeneste do macerační směsi. Kořínky opět opláchněte destilovanou vodou a položte na čisté podložní sklo. Z kořínku odřízněte žiletkou kořenovou špičku s meristematickým pletivem, přidejte kapku barviva a nechejte působit asi 5 min. Opatrně přiložte krycí sklíčko a mírným tlakem roztláče. Preparát mírně nahřejte nad plamenem lihového kahanu tak, aby se barvivo nevařilo. Kvalitu roztlaku a zbarvení kontrolujte průběžně pod mikroskopem (zvětšení cca 200 a 400x).

⁴ *Schiffovo reagens*

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 dejte naklíčit semena cibule na vlhký filtrační papír. Naklíčená semena s asi 1 cm kořínky vložte do fixační směsi (viz výše) na dobu nejméně 30 min. ((96% etanol : led. kyselina octová (3 : 1)). Kořínky opláchněte destilovanou vodou, přeneste je na 20-30 min do roztoku 5M HCl, poté opláchněte destilovanou vodou a přeneste do Schiffova barviva. Barvěte 30-45 min, poté opláchněte v destilované vodě a krátkodobě uchovejte v destilované vodě ve 4 °C. (Provede vedoucí cvičení).

Připravené nabarvené kořínky cibule přeneste do roztoku 45% kyseliny octové, odřízněte kořenovou špičku. (Zbytek kořínku odstraňte.) Přiložte krycí sklíčko a mírným tlakem špičku roztláčte.

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 každé z fází zakreslené mitózy stručně napište, co se děje s chromozómy.
- 1.3 Porovnejte obě metody barvení mitotických chromozomů.

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

- 2.1 V 10ti 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 zapište do tabulky:

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

ZÁVĚR:

V závěru celého cvičení zhodnoťte provedení vlastního roztlakového preparátu, srovnajte různé způsoby barvení chromozómů. Uveďte, které fáze mitózy jste pozorovali na vašem roztlakovém preparátu a uveďte počet chromozómů ($2n = \dots$) pro zkoumaný rostlinný druh. Zhodnoťte mitotický index roztlakčeného pletiva.

POLYTENNÍ CHROMOZÓMY V JÁDRECH BUNĚK SLINNÝCH ŽLÁZ LARVY DROZOFILY

(*Struktura chromozómu a její současná interpretace. Euchromatin a heterochromatin. Kultivace materiálu, izolace slinných žláz larvy octomilky. Rychlé barvení laktopropionovým orceinem. Stanovení heterochromatinových a euchromatinových úseků.*)

ÚVOD

Chromozómy jsou pentlicovité útvary, které je možno mikroskopem pozorovat v dělicím se jádře (ve fázi M buněčného cyklu). Mají různý tvar a velikost. Různé organismy mají různý počet chromozómů (př.: kapradina *Ophioglossum petiolatum* $2n = 510$, červ *Ascaris megalocephala* $2n = 2$). U téhož druhu je počet chromozómů konstantní.

Morfologická stavba: Chromozóm se skládá ze dvou chromatid, které jsou spojeny centromérou. Centroméra je umístěna v oblasti primární konstrikce, je-li přítomna sekundární konstrikce, pak zde leží organizátor jadérka (resyntetizuje se zde jadérko). Za sekundární konstrikcí se někdy nalézá přívěsek - satelit (traband).

Chemická stavba: Chromozóm je tvořen chromatinem - tj. nukleovou kyselinou typu DNA (deoxyribóza, kyselina fosforečná, purinové a pyrimidinové báze A,T,G,C), která je v trvalé vazbě s proteiny (histonové a nehistonové, neutrální nebo převážně kyselé povahy).

Podle intenzity barvení acetobarvivu, stupně kondenzace a intenzity transkripce rozlišujeme dva druhy chromatinu: euchromatin (slabé barvení, malá kondenzace, transkripčně aktivní) a heterochromatin (silná barvitelnost, silná spiralizace, transkripčně inaktivní - málo geneticky aktivní). Není zde přesná hranice. Heterochromatin rozlišujeme konstitutivní (obligátní), který je transkripčně trvale inaktivní (zůstává v kondenzovaném stavu po celý BC - nepřepisuje se do RNA, výskyt hlavně v centromérách, v telomérách, v oblasti nukleárního organizátoru mitotických chromozómů, v interfázi → tvorba chromocenter). Fakultativní (příležitostný) heterochromatin se může být v závislosti na ontogenezi vyskytovat v obou formách (příklad: jeden z chromozómů X v buňkách savčích samic - heterochromatinový X zůstává stále v kondenzovaném stavu po celý BC, replikuje se v pozdní S-fázi a nepřepisuje se do RNA, přepisují (exprimují) se jen geny, které se nachází v euchromatinovém X-chromozómu).

Během interfáze jsou vlákna despiralizovaná, proto hůře viditelná.

Netypické chromozómy

Štětkovité chromozómy (lampbrush) jsou známy z oocytů některých živočichů. V období *meiotické profáze I* se k sobě přikládají homologické chromozómy, některé části se despiralizují (dekondenzují) a hodně vyklenou (párovité postranní smyčky). Délka štětkovitého chromozómu - až 1 mm. Probíhá zde tvorba m-RNA (proteosyntéza). Existuje teorie, podle níž je každá smyčka nositelkou jednoho genu. Ke konci profáze smyčky mizí.

Polytenní chromozómy (také mnohovláknové, gigantické, obří) nacházíme v různých tkáních larev některého dvoukřídlého hmyzu (slinné žlázy, buňky středního epitelu a malphigických trubic), rovněž i u rostlin (v endospermu kukuřice, v antipodách máku, oměje, pšenice, řeřichy, v chalázních haustoriích kokrhele, v chalázní části endospermu hrachoru). Jsou zpravidla 50 - 200krát delší než normální chromozómy v metafázi mitózy, každý měří 200 až 600 μm a dosahuje šířky až 25 μm (u *Drosophila melanogaster* je celková délka polytenních chromozómů 1 180 μm , oproti 7,5 μm v mitóze). Ve slinných žlázách nedochází k dělení, takže tyto chromozómy jsou v *interfázi*, a jsou tedy v *despiralizovaném* stavu. Každý polytenní chromozóm se skládá z množství chromatinových vláken, které vznikly mnohonásobnou (1000 - 5000x) replikací a zůstávají spolu v paralelním uspořádání. Část konstitutivního heterochromatinu v oblasti centromér se však nereplikuje, takže polytenní chromozóm není souborem jednotlivých nepolytenních mitotických chromozómů. Párové (homologní) chromozómy jsou k sobě těsně přiložené ("somatické párování"), proto je v buňkách vidět místo diploidního *haploidní počet chromozómů*. Při barvení acetobarvivy každý polytenní chromozóm pozorovaný světelným mikroskopem vykazuje lineární řadu střídajících se proužků (*disků*) a meziproužků tmavší a světlejší barvy, což je způsobeno rozdílným barvením heterochromatinu a euchromatinu. Poloha a počet disků jsou pro určitý chromozóm druhově specifické. Při aktivním fungování ztrácejí některé části polytenních chromozómů diskovité uspořádání, vznikají vychlípeniny - *puffy* ("puffs", Balbianiho prstence), kde probíhá tvorba mRNA. Jsou méně barvitelné. Místa vzniku vychlípenin jsou specifická pro každou tkáň a stádium vývoje.

Význam polytenních chromozómů:

- snadné vizuální sledování změn chromozómů při vzniku tzv. chromozómových aberací (delece, inserce, duplikace, inverze...)
- lokalizace genů, mapování lokusů genů
- identifikace jednotlivých úseků polytenních chromozómů (taxonomie druhů)

(Porovnáváme standardní a změněné jedince.)

PROVEDENÍ

Materiál

larvy *Drosophila melanogaster* na konci 3. instaru (tj. těsně před zakuklením, kdy vylézají na stěnu kultivační nádoby), pocházející z kultury s nadbytkem potravy a uchovávané při nižší teplotě (18°C).

nebo larvy bedlobytek, patentky

Laboratorní přístroje a pomůcky

mikroskop (obj. 45x a 100x - imerse), binokulární lupa, podložní a krycí skla, žiletka, lihový kahan, zápalky, filtrační papír, buničitá vata, tmavý papír, pinzeta, preparační jehly

Chemikálie a roztoky

barvivo *laktopropionový orcein* (příprava viz protokol Mitóza), fyziologický (Schenův)⁵ roztok

Pracovní postup

1. Larvu položíme na podložní sklo do kapky fyziologického roztoku. Jednou preparační jehlou přidržíme larvu za ústní část (tmavé chitinové háčky), druhou asi uprostřed těla. Tahem jehel oddělíme hlavovou část se slinnými žlázami tvořenými průzračnými buňkami (uvnitř jsou jádra se stužkovitými útvary - chromozómy).
2. Pod binokulární lupou odstraníme nežádoucí části (zbytek larvy, tukovou tkáň).
3. Slinné žlázy přeneseme na čisté podložní sklo a ihned zakápneme laktopropionovým orceinem (buňky nesmí vyschnout). Barvivo necháme působit asi 10 minut (můžeme lehce zahřát nad lihovým kahanem).
4. Přiložíme krycí sklíčko a preparát pozorujeme pod mikroskopem při malém zvětšení. Zakreslíme tvar buněk a jádra. Poté vyjmeme preparát z mikroskopu a jemným tlakem buňky roztlačíme. Dáváme pozor na poškození chromozómů. Preparát opatrně zahřejeme (barvivo nesmí vařit, teplotu podložního skla kontrolujeme hřbetem ruky).
5. Přebytečné barvivo odstraníme překrytím preparátu proužkem filtračního papíru.
6. Pozorujeme pod mikroskopem při větším zvětšení.

⁵ Příprava fyziologického (Schenova) roztoku

7g NaCl, 0,42g KCl, 0,25g CaCl₂ rozpustit v 1l destilované vody

ÚKOL:

1. Zakreslete buňky slinných žláz s polytenními chromozómy při malém zvětšení mikroskopu.
2. Zakreslete zvětšený vybraný úsek polytenního chromozómu s jednotlivými disky, případně pufy, a označte heterochromatinové a euchromatinové části chromozómu.
3. Zakreslete schéma rozložených polytenních chromozómů a popište jednotlivá ramena.
4. Zjistěte počet chromozómů u *D. melanogaster* ($n = \dots$, $2n = \dots$).

ZÁVĚR

Zhodnoťte úspěšnost izolace slinných žláz a jejich zbarvení. Uveďte, zda jste pozorovali chromocentrum a jednotlivá ramena chromozómů, případně tvorbu pufů.

MEIOTICKÉ DĚLENÍ V NEZRALÝCH PRAŠNÍCÍCH PAŽITKY (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.)

(Roztlakový preparát, barvení železitým acetokarmínem, fáze meiózy I a meiózy II, význam meiózy z genetického hlediska, proces crossing-over.)

ÚVOD

MEIÓZA

(redukční dělení buněk, dříve allotypické dělení) je jaderné dělení, které předchází vzniku gamet. Probíhá ve dvou po sobě následujících dělení - první je *heterotypické dělení* (redukční, meióza I) odlišné od mitózy (po něm může následovat interfáze - interkineze, ale bez S-fáze) a druhé *dělení homeotypické* (ekvační, meióza II) odpovídající mitóze.

Heterotypické dělení (meióza I)

PROFÁZE I :

Z celého meiotického dělení zaujímá nejdelší část - až 90 %. Může trvat několik hodin až dní, i několik roků. Lze ji rozdělit na 5 etap:

Leptotene (řec. leptos=tenký, tene=nit) - spiralizace chromozómů, chromozómy mají vzhled dlouhých jemných vláken.

Zygotene (zygon=dvojitá nit) - homologní chromozómy se přikládají podélně těsně k sobě tak, že jednotlivé chromoméry velikostí i tvarem si odpovídající leží vedle sebe (konjugace, synapse - synaptó=spojují), homologní chromozómy se navzájem ovíjejí → *bivalent (geminus)*. Tvorba synaptonemálního komplexu (SC) - je to zipu podobné seskupení bílkovin a RNA, které v této fázi drží homologní chromozómy těsně dohromady.

Pachytene (pachys=tlustý) - každý z chromozómů tvořící bivalent se podélně rozdělí s výjimkou centroméry, vznikne nový útvar tvořený 4 chromatidami (tetrádové stadium bivalentu). Každý z homologních chromozómů má nezávislou centroméru, takže tetráda má dvě centroméry. Od okamžiku vzniku tetrádového stadia vznikají odpudivé síly mezi oběma původními homologními chromozómy; oba mají snahu se od sebe oddálit, ale brání jim v tom složité vzájemné propletení. V místech, kde se nesesterské chromadidy překládají, vznikají útvary *chiasmata* (χ). Takových chiazmat může být na jedné dvojici chromozómů až 10 (u kukuřice připadá na jeden bivalent 5,6 chiazmat). V důsledku silného mechanického tahu v místech chiazmat může dojít k *přetržení* chromatid, k posunu zlomových ploch a jejich *znovuspojení*. Tento pochod se nazývá *crossing-over* a jeho podstatou je *výměna částí*

nesesterských chromatid, a tedy i skupin genů, *mezi dvěma homologními chromozómy*. Výměna genetického materiálu je významná pro genovou rekombinaci genů na sebe vázaných (tzv. vazba vloh). (Zlomy a c.-o. mohou nastat v jednom nebo na více místech homologních nebo sesterských chromatid, kde se vytvářejí v synaptonemálním komplexu tzv. rekombinační uzlíky.) Frekvence c.-o. je závislá na stáří organismu, jeho pohlaví, charakteru chromozómů, teplotě, aj. Podle posledních poznatků dochází k pachytene již v dřívějších fázích, pravděpodobně v zygotene.

Diplotene (diplos=dvojitý) - pokračuje spiralizace chromozómů. Dvojice homologních chromozómů u bivalentu mají snahu se navzájem co nejvíce od sebe oddálit. Bivalenty jsou spolu spojeny pouze v tom místě, kde proběhly procesy výměny. Tato místa jsou zřejmá i ve světelném mikroskopu jako překřížení (chiazmata) - u pšenice struktury ve tvaru X, u jiných kruhovitě bivalenty. Jednotlivé bivalenty zaujmou postavení těsně při jaderné bláně, střed jádra zůstává volný. (U člověka se diplotenní stádium udržuje po mnoho let. Toto klidové stádium, které trvá od narození děvčete až po indukci zrání folikulu ve vaječnicích /cca 13-50 let/, se označuje jako *dictyoten*).

Diakineze (diakino=rozpojují) - poslední etapa, v níž zaniká jaderná blána a jadérko. Chromozómy se dále zkracují a tloustnou. Chiazmata se posunují ke koncům chromatid (*terminalizace chiazmat*). U organismů s centriolem se jeho zdvojené páry začnou přesouvat k budoucím pólům dělicího vřeténka.

METAFÁZE I

Diferencuje se dělicí vřeténko a chromozómy se staví do ekvatoriální roviny navzájem přes sebe přeloženými konci chromatid (bivalenty terminalizovanými chiazmaty v ekvatoriální rovině), centroméry směřují k opačným koncům dělicího vřeténka.

ANAFÁZE I

Z každého bivalentu se uvolňují nerozštěpené dvouchromatidové chromozómy (nedochází k štěpení centromér), a ty se rozestupují k protilehlým pólům dělicího vřeténka. Rozestup chromozómů zajišťuje pochod zvaný *segregace chromozómů*. Distribuce chromozómů k pólům vřeténka je *naprosto nahodilá* s ohledem na to, který chromozóm pochází od otce a který od matky. Tato nahodilá kombinace chromozómů v haploidní sadě se projevuje jako *zákon o volné kombinovatelnosti vloh*. Počet chromozómů u jednotlivých pólů je haploidní.

TELOFÁZE I

Může proběhnout stejně jako u mitózy, tzn. - vzniknou dvě haploidní jádra oddělená buněčnou přepážkou nebo vznikne jen buněčná přepážka a časná telofáze heterotypického dělení přechází do pozdní profáze homeotypického dělení.

V případě vzniku pylových *tetrád* u většiny dvouděložných rostlin nedochází v telofázi I k tvorbě buněčné přehrádky (simultánní typ), zatímco u jednoděložných rostlin k tvorbě buněčné přepážky dochází (sukcesivní typ, vznik *diády*).

Homeotypické dělení (meióza II)

PROFÁZE II

Odpovídá telofázi předchozího dělení, na konci profáze se diferencují dvě dělicí vřeténka.

METAFÁZE II

Probíhá u obou buněk vzniklých I. dělením synchronizovaně. Chromozómy zaujmou polohu v ekvatoriální rovině svými centroméry. Délka chromozómů je poněkud kratší než u mitotické metafáze.

ANAFÁZE II

Dochází k podélnému rozštěpení centromér a k rozchodu jednotlivých chromatid k pólům dělicího vřeténka. Délka chromozómů je již normální.

TELOFÁZE II

Odpovídá telofázi mitózy.

Produktem meiózy výchozí mateřské buňky ($2n$) je *čtveřice (tetráda) haploidních gamet (n)*.

(Pozn.: u pylové mateřské buňky (PMC) vznikají čtyři haploidní *mikrospory*, z každé pak následným vývojem vznikne pylové zrno.)

VÝZNAM MEIOTICKÉHO DĚLENÍ

Meióza je dvojnásobným rozdělením jader, ale pouze jedním rozdělením chromozómů a centromér. Dochází zde k realizaci základních genetických zákonů, a to:

Zákonu segregace

Zákonu volné kombinovatelnosti

Zákonu rekombinace vloh na sebe vázaných.

Vzniklé gamety obsahují různé sestavy výchozích chromozómů a při oplození pak v zygotech vznikají nejrůznější chromozómové kombinace - dochází ke značnému genetickému rozrůznění potomků. Genetická různorodost v potomstvu je navíc zesilována i procesem crossing-over.

Pomocí syngamie (splynutí buněk) se spojí dvě podobné, ale ne zcela identické sady chromozómů a alel do jedné buňky (zygoty). Biologický význam syngamie a meiózy spočívá v *umožnění rekombinace*. Pro pouhou redukci počtu chromozómů by stačil první krok dělení - jádra vzniklá meiózou I jsou již, co do

počtu chromozómů, haploidní. Meióza se však bez výjimky skládá ze dvou následných dělení (I a II) - z diploidní mateřské buňky vznikají čtyři haploidní gamety. Bez druhého dělení (meióza II) by byl účinek crossing-over geneticky neúčinný.

PROVEDENÍ

Rostlinný materiál

nafixovaná poupata pažitky⁶ (*Allium schoenoprasum* L)

Pomůcky

mikroskop (objektiv 40x); preparační lupa s okulárovým mikrometrem; milimetrové měřítko; centrofix; podložní a krycí skla; pinzeta; preparační jehly – 2; žiletka; filtrační papír; lihový kahan; zápalky

Chemikálie a roztoky

barvivo acetokarmín⁷

Pracovní postup

1. Nafixované poupě 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 preparačních jehel vypreparujeme prašníky, zbytek odstraníme.
3. Obsah prašníků vytlačíme/rozmáčkneme pomocí 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 400 x, případně s imersí při zvětšení 1000x.

⁶ Fixáž alkohol-octová

3:1, 24 h při 4°C, pak přenesení přes 96% etanol do 70% etanolu a uchování v chladničce při 4°C

⁷ Příprava acetokarmínu (1,5% roztok)

1,5g 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. Uchováváme v hnědé zabroušené láhvi při pokojové teplotě. Občas přefiltrujeme.

ÚKOLY

1. zakreslete jednotlivá stádia meiózy ve vztahu k velikosti poupat (uvést velikost poupat, při kterém bylo příslušné stádium pozorováno, popsat viditelné struktury pylové mateřské buňky (PMC) a vedle uvést, co se děje s chromozómy, zapsat zvětšení mikroskopu!)
2. zakreslete meiotické stádium, v němž můžeme vidět důsledek crossing-overu (chiazmata) (podle nativního preparátu nebo podle mikrofotografie)
3. zjistte počet bivalentů v metafázi I, příp. v diakinezi I
4. určete počet chromozómů ($2n = \dots$) charakteristických pro pažitku (*Allium schoenoprasum* L.)
5. dokumentace pozorovaných fází meiotického dělení
6. srovnajte; na základě získaných vědomostí, nákrešů a fotodokumentace; meiotické a mitotické dělení (odlišnosti, shody)
- 7.

ZÁVĚR

Zhodnoťte vlastní provedení roztlakového preparátu (kvalitu roztlaku a kvalitu barvení železitým acetokarmínem). Uveďte, která stádia meiózy jste pozorovali na vlastních preparátech a dejte je do vztahu s velikostí poupěte, označte stádium, v němž probíhá crossing-over a uveďte počet bivalentů v metafázi I meiotického dělení a počet diploidních chromozómů ($2n$) pro daný rostlinný materiál.

VYBRANÉ GENETICKÉ ÚLOHY A JEJICH ŘEŠENÍ I

(Mendelovy zákony, dihybridismus, trihybridismus)

ÚVOD

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

Podmínky platnosti⁸

- jedná se o genomovou dědičnost
- geny leží na autozomech
- geny nejsou ve vazbě (leží na různých chromozomech)
- geny fungují nezávisle na sobě (nejedná se o vlohovou interakci)

⁸ S. Jones (Jazyk genů):

„... Platnost Mendelových zákonů se rychle potvrdila u stovek rostlinných a živočišných druhů. Mendel byl geniální anebo měl potřebné štěstí mít pravdu tam, kde se všichni předtím mýlili. Žádná jiná věda neodvozuje svůj původ tak přímočaře, od jediné osobnosti jako právě genetika. Mendelova práce je doposud základem celého širokého oboru, kterým se genetika stala...“

2. Zápis znaků

	Alela				Dominance
Standardní	dominantní	A	recesivní	a	A nad a
Mutační genetika	standardní	+	mutantní	y	+ nad y
		y ⁺		y	y ⁺ nad y
		B ⁺		B	B nad B ⁺

3. Zápis znaků

P - parentální generace

F₁ - 1. generace potomků (filiální)

F₂ - 2. generace potomků (filiální)

obvykle samičí pohlaví x samčí pohlaví (nemusí být vždy dodrženo)

P: AA x aa

F₁: Aa

F₂: AA : 2 Aa : aa

Mendelistický čtverec:

	samice	
samec	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

Přehled základních typů křížení:

<i>Typ křížení</i>	<i>Genotypové štěpení</i>	<i>Fenotypové štěpení</i>
AA x aa	Aa (neštěpí)	A (neštěpí)
Aa x Aa	AA : 2Aa : aa	3A : 1a
Aa x aa	1Aa : 1aa	1A : 1a
Aa x AA	1Aa : 1AA	A (neštěpí)

ÚLOHY

1. Je dána chromozómová výbava gamet P generace.
Vyznačte chromozómovou výbavu hybridu a všechny možné kombinace gamet, které se mohou vyskytnout u tohoto hybridu při meiózi.
2. Jaká je pravděpodobnost, že redukované chromozómové sestavy při gametogenezi budou svým složením zcela odpovídat původním haploidním chromozómovým sadám rodičů?
a) u kukuřice ($2n=20$)
b) u člověka ($2n=46$)
3. Genotyp jedinců tetrahybrida v F_1 generace $AaBbCcDd$. tyto čtyři geny leží na různých chromozomech. Jaká je pravděpodobnost, že potomci v F_2 generaci budou mít následující genotypy?
a) $AaBbCcDd$
b) $AABBCCDD$
c) $AaBBccDd$
d) $AaBBCCdd$
4. Jaká je pravděpodobnost, že rodičovský pár následujících genotypových sestav bude mít potomka uvedeného genotypu?
a) $AABBCC \times aabbcc \rightarrow AaBbCc$
b) $AABbCc \times AaBbCc \rightarrow AabbCC$
c) $AaBbCc \times AaBbCc \rightarrow AaBbCc$
d) $aaBbCC \times AA Bbcc \rightarrow AaBbCc$
5. Manželský pár má šest dětí. Naneštěstí, oba rodiče jsou heterozygoti pro cystickou fibrózu. Jaká je pravděpodobnost, že:
a) První dítě bude normální?
b) Všechny děti budou normální?
c) Všechny děti budou mít cystickou fibrózu?
d) Normální dítě bude heterozygot pro cystickou fibrózu?
6. U skotu je bezrohost dominantní nad rohatostí.
Jaké potomstvo můžeme očekávat z křížení bezrohého býka s rohatými kravami, když jedna z nich již dříve při stejném křížení porodila rohaté tele?
7. Vzájemné křížení dvou dlouhosrstých morčat dalo 18 dlouhosrstých a 5 hladkosrstých potomků. Jaký podíl dlouhosrstých potomků je v příslušném alelickém páru homozygotní?

8. Černá barva skotu je dominantní nad barvou červenou. Při křížení s jedním a tímž černým býkem porodila červená kráva Zorka černé telátko, černá kráva Majka černé telátko a černá kráva Bětko červené telátko.

Co můžeme říct o genotypové sestavě jednotlivých zvířat? Zapište.

9. U ředkve může být tvar podlouhlý, kulatý nebo oválný. Křížení mezi dlouhými a oválnými dalo 159 dlouhých a 156 oválných. Křížení mezi oválnými a kulatými dalo 203 oválných a 199 kulatých. Křížení mezi dlouhými a kulatými dalo 576 oválných. křížení mezi oválnými a oválnými dalo 121 dlouhých, 243 oválných a 119 kulatých. Jaký typ dědičnosti se projevuje v těchto kříženích? Zapište v genotypch.

10. U člověka je tmavá barva očí dominantní nad modrou barvou očí a rovněž schopnost vládnout pravou rukou je dominantní nad leváctvím. Geny pro oba znaky leží na různých párech homologních chromozomů.

Tmavooký pravák se oženil s modrookou levačkou. Jaké potomstvo lze očekávat v této rodině? (Uvažujte obě možnosti, tj. že muž je v obou alelových párech homozygot nebo heterozygot.)

11. Modrooký pravák se oženil s tmavookou levačkou. Narodily se jim dvě děti - tmavooký levák a modrooká pravačka. Z druhého manželství téhož muže rovněž s tmavookou pravačkou se narodilo 9 tmavookých praváků.

Jaké jsou genotypy všech zúčastněných osob?

12. Je dán trihybrid úplně dominantní ve 3 znacích (heterozygot), octomilka:

- a) dlouhokřídlost je dominantní nad krátkokřídlostí (vg)
- b) hnědá barva těla je dominantní nad černou (e)
- c) červené oko je dominantní nad redukovaným (ey)

Zapište křížení a vytvořte mendelistický čtverec pro F_2 generaci, uveďte fenotypové štěpné poměry (číselně i slovně)

VYBRANÉ GENETICKÉ ÚLOHY II.*(Nemendelistická dědičnost, kodominance, genové interakce, vazba genů)***ÚLOHY**

1. Základní krevní skupiny - A, B, AB, 0 - jsou určeny řadou alel (*mnohotná alelie*), které jsou děděny *jednoduše autozomálně podle Mendelových zákonů*. Tyto alely se mohou kombinovat po dvou vždy na stejném lokusu 9. chromozómového páru (koncová část q-raménka). Základní jsou tři alely I^A , I^B a i . I^A a I^B jsou *dominantní a navzájem kodominantní*, i je vůči oběma *recesivní*. Protože každá osoba nese dvě alely (jednu alelu zděděnou od otce, druhou od matky), je možných celkem 6 *genotypů* (počet genotypů u mnohotné alelie = $n \cdot (n+1) / 2$, přičemž n = počet alel)

Vyplňte následující tabulku:

<i>Krevní skupina dítěte</i>	<i>Možný genotyp dítěte</i>	<i>Krevní skupina matky</i>	<i>Možný genotyp matky</i>	<i>Možná krevní skupina otce</i>	<i>Vyloučen otec s krevní skupinou</i>
0		0			
0		A			
0		B			
A		0			
A		A			
A		B			
A		AB			
B		0			
B		B			
B		A			
B		AB			
AB		A			
AB		B			
AB		AB			

2. Vzhledem k nízkému procentu rekombinací a k vysoké polymorfnosti HLA systému (což umožňuje přenášení celých HLA haplotypů na potomstva, se určování HLA antigenů využívá při paternitních sporech. Do níže uvedené tabulky doplňte HLA haplotypy :

HLA genotypy	HLA haplotypy
Otec A1 A3 B8 Bw15 Cw1 Cw1	
Matka A1 Aw23 B7 B8 Cw1 Cw4	
Dítě A1 Aw23 B7 Bw15 Cw1 Cw4	
Otec A2 A2 B5 Bw38 Cw3 Cw4	
Matka A11 Aw26 B12 B18 Cw1 Cw2	
Dítě A2 Aw26 B18 Bw38 Cw2 Cw3	
Otec A3 Aw24 B7 B12 Cw2 Cw4	
Matka A2 A32 B7 Bw35 Cw4 Cw5	
Dítě A2 A3 B7 B7Cw4 Cw4	
Otec A28 Aw33 B14 Bw40 Cw3 Cw3	
Matka A11 A29 Bw15 Bw40 Cw3 Cw5	
Dítě A11 A28 Bw15 Bw40 Cw3 Cw3	

3. Dědičnost ošupení u kapra je charakterizuje reciproká interakce s letálním účinkem konstituce NN.

S- Nn řádkový

S- nn šupinatý

ss Nn hladký

ss nn lysý

a) zjistěte fenotypový štěpný poměr u potomků vzniklých křížením dvou řádkových kaprů (F1 generace), použijte rozvětovací metodu (!)

b) pomocí rozvětovací metody zjistěte fenotypový štěpný poměr u potomků vzniklých křížením kapra a řádkovým uspořádáním s kaprem hladkým.

4. Dermatoglyfické obrazce jsou individuálně rozdílné a jsou podmíněny celou řadou genů. Mezi charakteristické znaky patří počet lišt, který je dán tloušťkou epidermis. Základní tloušťka je regulována základním vlohovým párem společným pro všechny prsty. U dominantního homozygota VV je epidermis silná, počet linií je 0-15, počet 16-22 je projevem heterozygota, počet větší než 22 odpovídá výbavě vv. Směrodatný je prst, který má nejvíce lišt. Kromě této vlohy působí ještě další dva páry. Faktor radiální R, působí na palci ukazováčku a prostředníku, faktor ulnární U, působí na prsteníčku a malíčku. Pro stanovení genotypu je třeba vypočítat rozdíl mezi maximálním počtem linií a nejnižším počtem na radiálních a ulnárních prstech. Je-li rozdíl větší než 10 jedná se o dominantního homozygota, je-li 0-4 recesivního homozygota, 5-10 heterozygota.
- charakteristické pro hodnocení jsou tzv. středy obrazce (terminus) a trojúhelníčky (triradius). Hodnocení se provádí tak, že se spojí triradius s terminem a spočítají se všechny průsečky s papilárními liniemi.



- a) vyhodnoťte obrazce papilárních linií vzniklé otiskem vašich prstů, otisky provedte na proužky papíru
- b) zjistěte svůj genotyp pro geny V,U,R.

5. Barva vlasů člověka je podmíněna interakcí šesti genů. Gen A podmiňuje tvorbu pigmentu a je *recesivně epistatický* vůči ostatním genům. (Jedinec genotypu *aa* je albín, frekvence albinismu je 1:100 000) Gen B podmiňuje tvorbu hnědého pigmentu a je *dominantně epistatický* vůči genu R. Homozygotně recesivní sestava *bb* podmiňuje světlé zbarvení vlasu. Gen R umožňuje tvorbu rudého (červeného) pigmentu, jeho recesivní alela *r* je inaktivní. Zbývající alely D, F, V kvantitativně ovlivňují intenzitu zbarvení. Mezi dvojicemi alel všech šesti genů je vztah úplné dominance.

barva vlasu	genotyp A- B- -- +	barva vlasu	genotyp A- bb R- +	barva vlasu	genotyp A- bb rr +
černé	D- F- V-	tmavorudé	D- F- V-	tmavožluté	D- F- V-
tmavohnědé	D- F-vv D- ff V- dd F- V-	rudé	D- F-vv D- ff V- dd F- V-	žluté	D- F-vv D- ff V- dd F- V-
hnědé	D- ff vv dd F- vv dd ff V-	zlatorudé	D- ff vv dd F- vv dd ff V-	světležluté	D- ff vv dd F- vv dd ff V-
světelněhnědé	dd ff vv	zlatěplavé	dd ff vv	plavé	dd ff vv
bílé	aa -- --				

- 5.1 Pokuste se na základě svého fenotypu (případně na základě znalosti fenotypu rodičů) určit vlastní genotyp.
- 5.2 Rodiče měli hnědé vlasy a narodily se jim děti s vlasy plavými a světležlutými. Jaké měli rodiče genotypy?
- 5.3 Zjistěte možné fenotypy dětí černovlasých rodičů s genotypem *AaBBRrDDFfVv*.

6. Z uvedených fenotypových kategorií vzniklých při testovacím křížení drosophily zjistěte pořadí genů na chromozomu. Dále zjistěte sílu vazby mezi sousedními geny.

Recesivní fenotyp	Dominantní fenotyp
cn rumělkové oči	+ červené oči
dp zmenšená křídla	+ normální křídla
vg zkrácená křídla	+ normální křídla

B1: $cn\ dp\ vg / cn\ dp\ vg \times + + + / + + +$

+++	cndp+	cn++	+dp+	cn+vg	+dpvg	++vg	cndpvg
676	101	32	591	591	32	101	676

$p = \text{počet potomků vzniklých rekombinací} / \text{počet všech potomků} \cdot 100$ (cM)

7. Zjistěte genovou mapu V. chromozomu rajčete. Jedná se o seřazení genů F,H CH,K,L,N,S a o výpočet síly vazeb(p) v cM mezi sousedními geny. Fenotypové frekvence potomků vzniklých testovacím křížením jsou uvedeny níže.

CHNs + chNs = 0,4%	nSk + NsK = 0,8%	FchN + fCHn = 1,3%
CHNs + chnS = 2,6%	Nsk + nSK = 2,2%	Fchn + fCHN = 7,7%
CHns + chNS = 14,6%	NSk + nsK = 29,2%	FCHn + fchN = 13,7%
CHNS + chns = 82,4%	NSK + nsk = 67,8%	FCHN + fchn = 77,3%
HfCH + hFch = 1,8%	sKl + SkL = 8,6%	
HFch + hfCH = 7,2%	SKl + skL = 20,4%	
Hfch + hfCH = 20,2%	Sk1 + sKL = 21,4%	
HFCH + hfch = 70,8%	SKL + skl = 49,6%	

DROSOPHILA MELANOGASTER MEIG. - KLASICKÝ GENETICKÝ OBJEKT

(*Morfologická, fyziologická a ekologická charakteristika, laboratorní chov. Manipulace. Vybrané mutantní linie - popis a charakteristika, srovnání se standardní populací.*)

ÚVOD

Drosophila melanogaster Meig. (drozofila, octomilka, "banánová muška") se stala historicky prvním organismem, který při studiu dědičnosti nabyl charakteru genetického modelu. Důvodem k tomu je 1. možnost snadného pěstování i křížení, 2. krátká generační doba, 3. dostatečně početné potomstvo, 4. existence kmenů s rozdílnými geneticky podloženými znaky (barva očí a těla, morfologie křídel atd.), 5. malý genóm (velikosti asi 1/20 typického savčího genómu), který umožňuje molekulárně genetickou analýzu.

Domovem *D. melanogaster* je Indo-malajská oblast. Kromě tohoto druhu se v oblastech střední Evropy nachází přes deset jiných druhů rodu *Drosophila*.

Genetické studium u drozofily začalo r. 1909 v laboratoři T. H. Morgana v USA, kde jako první byly podány důkazy o tom, že převážná většina genů je uložena v chromozómech. V průběhu dalších let pak posloužila *D. melanogaster* jako experimentální modelový organismus k vyřešení mnoha důležitých teoretických otázek genetiky, např. determinace pohlaví, indukce mutací, znalosti o rekombinacích, chromozómových přestavbách, aj.

Životní cyklus zahrnuje čtyři hlavní stadia vývoje: *vajíčko, larva, kukla a dospělec (imágo)* (viz pracovní list)

Vajíčka - jsou kladena na povrch kultivačního média, jsou bílá a dlouhá asi 0,5 mm.

Larvální vývoj - larvy po vylíhnutí zalézají do kultivačního média. Rozlišujeme 1., 2. a 3. instar; při posledním instaru larvy dosáhnou délky asi 4,5 mm a skládají se z 12 segmentů (hlava, 3 hrudní a 8 abdominálních). Ve stadiu 3. instaru je možno rozeznat samečky podle samčích gonád, které jsou několikrát větší než samičí a v preparačním mikroskopu jsou vidět při pohledu shora jako dva světle oválné měchýřky.

Vyvinuté larvy vylézají na stěny nádoby a zde se mění v *kuklu* dlouhou asi 3 mm, která je zpočátku bílá, ale později rychle hnědne.

Imága - jsou velká 2 až 3 mm, přičemž samička se od samečka liší velikostí a vahou (váha cca 1,5 mg a 0,8 mg), počtem facet ve složených očích (u samičky zhruba 780, u samečka 740), zbarvením terminální části hřbetní strany zadečku (u samičky tmavé pruhování na zašpičatělém zadečku, u samečka celistvá tmavá skvrna na kulatém zadečku). Samečci mají navíc na pátém článku prvního páru nohou štětinovitý hřebínek (sex comb) sloužící k přidržení samiček při kopulaci (viz obr.). Samičky jsou schopny pářit se za 12 hodin od vylíhnutí z kukly, zatímco samečci se mohou pářit již za několik málo hodin. Spermie si samička uchovává v receptaculu seminis a ty pak slouží k oplodnění velkého množství vajíček (za cca 10 dnů samička naklade až 300 vajíček). Samičky po narkotizaci mohou začít klást vajíčka asi po 48 hodinách.

V laboratorních chovech je možno za rok získat asi 25 generací.

Délka trvání jednotlivých stadií vývoje *D.melanogaster* při kultivaci na 25 °C :

embryonický vývoj ve vajíčku	1 den
první larvální stadium (L1)	1 den
druhé larvální stadium (L2)	1 den
třetí larvální stadium (L3)	2 dny
"prepupa"	4 hodiny
kukla	4,5 dní
imágo	40-50 dní

Laboratorní chov: Mouchy se pěstují v přiměřených nádobkách (např. Erlenmayerovy baňky 250 nebo 100 ml, epruvety) při pokojové teplotě nebo v termostatu při 25 °C.

Příprava živného média:

1. 87 g *kukuřičného šrotu* se vaří v 800 ml vody 1,5 hod. na vodní lázni. Zároveň se v jiné nádobě namočí 15 g agarů do 200 ml vody. Po 1,5 hod. vaření se přidá 25 g sušených kvasnic (TEBI), 50 g krystalového cukru a namočený agar. Vše se vaří na vodní lázni ještě 30 min. Nakonec se přidá 40 ml desinfekčního roztoku (12 g kyseliny benzoové se rozpustit s 2,5 g kyseliny sorbové v 240 ml denaturovaného etylalkoholu - uchováváme v ledničce do zásoby).

2. Jednodušší médium připravíme z 450 ml vody, 62 g *pšeničné mouky*, 65 g cukru, 0,7 g kuchyňské soli a 4 ml desinfekčního roztoku: 350 ml vody se solí, cukrem a desinfekčním roztokem přivedeme k varu, pak přidáme mouku rozmíchanou ve zbytku vody a vaříme asi 5 min.

Rozvařená půda se ihned nalévá do předem vysterilizovaných kultivačních nádob uzavřených vatovou zátkou (sterilizace v horkovzdušném sterilizátoru 1 hod. při 120 °C nebo v autoklávu 0,5 hod. při 121 °C). Do 100 ml baňky se dává asi 25 ml média (tj. 1,5 až 2 cm vrstva). Do takto připravených nádob se dávají mouchy až druhý den, kdy ze stěn zkondenzuje voda. Zbylou vodu na stěnách nádoby otřeme sterilním filtračním papírem. Na povrch média ještě klademe kolečko několikrát propíchnutého a předem vysterilizovaného filtračního papíru tak, aby přesně zakrývalo celé dno (případně zmačkaný kousek sterilního filtračního papíru), a uzavřeme vatovou zátkou.

Do baněk dáváme zásadně živé, tj. neuspané mouchy, do 100 ml nádoby 5 párů much. Počet samečků může být menší než samiček.

Pro minimalizaci kontaminace neuchováváme kultury drozofily déle než 1 měsíc.

Manipulace

Při množení kmenů drozofily můžeme imága přímo vytřepat poklepem na stěny nádoby ze staré kultury do nádoby s novým médiem bez narkotizace. Potřebujeme-li s nimi manipulovat v průběhu experimentů - tj. rozlišit pohlaví, vybrat virginelní (neoplozené) samičky, sestavit požadované páry k reprodukci, sledovat výskyt určitého znaku apod. - musíme je *narkotizovat* v narkotizační nádobce *éterem*.

Na vatu připevněnou naspodu zátky kápneme trochu éteru a nádobku uzavřeme. Za chvíli nádobku otevřeme a vytřepeme do ní mouchy z kultivační nádoby. Mouchy jsou během několika sekund znehybněny a můžeme je vysypat na destičku z bílého mléčného skla a provést s nimi potřebné manipulace. Dáváme pozor, abychom mouchy „nepřenarkotizovali“ - takové mouchy nastaví křídla kolmo vzhůru. Vybrané jedince shrneme štětečkem do suché zkumavky, kde jsou jen po dobu potřebnou k probuzení (5 až 10 min.), až pak je vytřepeme do připravené nádoby s kultivačním médiem. Přitom touto nádobou poklepáváme o korkovou podložku, aby mouchy neuletěly, než nádobu uzavřeme vatovou zátkou.

Kulturu opatříme štítkem s potřebnými údaji a uložíme do termostatu.

Pro křížení vybíráme *neoplozené* (virginelní) samičky - tj. asi 4-6 hod. po vylíhnutí. Tyto samičky jsou znatelně světlejší, mají protáhlý zadeček a někdy ještě ne zcela rozvinutá křídla. Vybíráme je 1 až 2 dny před zahájením pokusu a uchováváme je krátce v malé nádobce s živným médiem nebo (na 1 den) ve zkumavce s proužkem filtračního papíru namočeného v cukrové vodě.

Mutantní linie

V současné době je u *D. melanogaster* popsáno a analyzováno asi 13 600 genů (celý genóm čítá přibližně 116 miliónů párů bazí). Tyto geny jsou lokalizovány do *čtyř vazbových skupin* odpovídajících *čtyřem*

párům chromozómů. První pár (1) tvoří heterochromozómy X a Y, ostatní (2, 3 a 4) autozómy. Nejdelší jsou autozómy 3, chromozóm 4 je ve srovnání s ostatními velmi malý a nese i méně genů. Samičí pohlaví je homogametní - XX, samčí heterogametní - XY.

Mutantní alela se u drozofily značí symbolem s malým počátečním písmenem, je-li recesivní (což je převážná většina - např. *w*: white - bílé oči, *y*: yellow - žluté tělo), a velkým, je-li dominantní - *B* (Bar - zúžené oči). Standardní alela pak symbolem " + " nebo *w*⁺.

PROVEDENÍ

Materiál

kultura *Drosophila melanogaster* Meig. - divoký typ (+) a některé z mutantních kmenů drozofily

Laboratorní přístroje a pomůcky

stereolupa, Erlenmayerovy baňky 100 ml s kultivačním médiem uzavřené vatovou zátkou, éterizační baňka, pinzeta, štěteček, filtrační papír, suché zkumavky s uzávěrem (na virginelní samičky), podložka z molitanu

Chemikálie

diethylether (k narkotizaci)

POZOROVÁNÍ A NÁKRESY :

Manipulace s drozofilami:

- prepouštění na nové médium
- narkotizace
- třídění podle pohlaví, výběr juvenilních samiček

ÚKOLY:

1. Zakreslete rozdíl samec x samička (šipkami označit rozdíl)
2. Zakreslete štětinovitý hřebínek na metatarsu prvního páru nohou u samečka (sex comb)
3. Zakreslete jednotlivá stadia vývinu od vajíčka k dospělci (s udáním doby vývinu) (*odborné studium biologie*)

4. Charakterizujte vybrané mutantní kmeny drosophily, (zapište do tabulky⁹ podle vlastního pozorování a genové mapy drozofily)
5. Určete „slepé“ vzorky
6. Vyhodnoťte F2 generaci křížení, zjištěné údaje o determinaci znaků prokažte pomocí statistického hodnocení chí-kvadrát testem.

ZÁVĚR

⁹ Tabulka: Charakteristika vybraných (kurantních) kmenů

<i>Mutace</i>	<i>Symbol</i>	<i>Ovlivněná část</i>	<i>Fenotyp</i>	<i>Lokalizace na chromozómu</i>	<i>Viditelnost</i>
			barva očí, tvar očí, barva těla, barva chloupků, tvar křídel	-	-

POHLAVNÍ CHROMATINOVÝ ZNAK U ČLOVĚKA - SEX CHROMATIN

(Barvení a pozorování Barrova tělíška v jádrech buněk ústní sliznice. Aplikace rychlé barvicí metody laktopropionový orcein. Rozdíly mezi normálním mužem a normální ženou. Procentuální zastoupení pohlavního chromatinu v buňkách žen a mužů. Demonstračně anomální případy. Fluorescenční barvení Y-chromatinu.)

ÚVOD

U řady savců u homogametického pohlaví - tedy u samic - byla v nedělicích se jádrech somatických buněk opakovaně prokázána přítomnost tzv. *pohlavního chromatinu*. Jako pohlavní chromatin, který je také označován podle svého objevitele *Barrovo tělíško*, označujeme útvar barvitelný v interfázi technikami specifickými pro průkaz DNA (tj. postupem podle Feulgena) nebo i jinými jadernými barvivy (karmín, orcein). Má velikost asi 1 μm , je většinou pravidelně plankonvexního tvaru s ostrým ohraničením a je zpravidla uložen při vnitřní straně jaderné membrány. Barrovo tělíško obvykle nelze prokázat ve všech buňkách u homogametického pohlaví, ale u jejich podstatné části - např. u žen v 30 - 40 % buněk ústní sliznice (údaje se dosti liší, někdy 20 až 70 %). U mužů se může vyskytnout u 0 - 0,3 % buněk.

Pohlavní chromatin je vlastně inaktivovaný *chromozóm X*, který v *interfázi zůstává spiralizován* a je proto barvitelný. Většina genů *X chromozómu*, který tvoří Barrovo tělíško, se nevyjadřuje - nejsou geneticky aktivní (i když malé oblasti tohoto chromozómu aktivní zůstávají). Zjistila to počátkem 60. let Mary F. Lyonová, která kromě toho prokázala, že inaktivace postihuje se stejnou pravděpodobností jeden nebo druhý chromozóm *X*. Tento jev byl nazván *lyonizace*. K ireversibilní (nezvratné)¹⁰ inaktivaci jednoho z chromozómů *X* dochází u savců v rané fázi embryonálního vývoje (u člověka 16. den od vzniku zygoty). Volba který z obou chromozómu *X* bude aktivní, probíhá náhodně a nezávisle v každé z embryonálních buněk přítomných v době inaktivace *X-chromozómu*. Následkem toho se samičí pohlaví skládá z mozaiky dvou typů buněk - buněk s aktivním *X* odvozeným z otce, a z buněk s aktivním *X* odvozeným z matky. Obsahuje-li dvojice chromozómů *X* heterozygotní pár alel (*Aa*), potom určité soubory buněk budou fenotypově vyjadřovat funkci jedné (*A*) nebo druhé alely (*a*). (např.: produkce enzymu dehydrogenázy glukózo-6-fosfátu a *X*-vázaná anhidrotická ektodermální dysplazie - tj. chybění potních žláz - u žen, skvrnitá srst u samiček myší, tříbarevná srst u koček). Homogametičtí jedinci (*XX*), pokud jejich pohlavní chromozómy obsahují heterozygotní páry alel, jsou tedy *mozaikou*. V rozdílných souborech buněk se uplatňuje soubor alel vždy pouze jednoho z obou chromozómů *X* (proto u jednovaječných dvojčat jsou si více podobné páry jedinců samčího pohlaví než samičího).

¹⁰ Trvání inaktivace není absolutní – kondenzovaný *X-chromozóm* je reaktivovaný během tvorby vajíček.

Inaktivací jednoho z chromozómu X u homogametického pohlaví je zabezpečeno, že *dávka alel, uložených v pohlavních chromozómech X, je u obou pohlaví totožná*. U ptáků (typ *Abraxas*) nedochází k inaktivaci jednoho z chromozómů Z u samců (ZZ). Oba systémy určení pohlaví vznikly v evoluci patrně na sobě nezávisle.

Y chromozóm se v jádrech somatických buněk mužského pohlaví dá dobře identifikovat fluorescenčními metodami jako tzv. *Y-chromatin*. Po obarvení preparátů chinakrinem, derivátem fluorochromu akridinu, chromozóm Y silně září v jádře jako malý bod (velikosti 0,5 μm). Y-chromatin je tvořen materiálem delšího heterochromatinového raménka Y chromozómu, které přetrvává v interfázním jádře, absorbuje více fluorochromu a v důsledku toho intenzivně září. Lze ho prokázat ve 20-50 % jader epitelových buněk bukalní sliznice normálních mužů, kdežto u normálních žen je možno nalézt podobná (imitující) fluoreskující tělíška nejvýš u 5 % jader. Heterochromatinová část Y chromozómu může být co do velikosti značně rozdílná, proto, je-li příliš krátká, není možné Y-chromatin prokázat.

Y-chromatin mívá někdy „rozštěpený“ tvar (tvar V).

Využití barvení pohlavního chromatinu

- určení pohlaví jedince, diagnostice různých typů abnormalit u člověka
- orientační určování pohlaví lidského embrya (z plodové vody)
- kontrola pohlaví u sportovkyň

PROVEDENÍ

Materiál

buňky epitelu bukalní sliznice

Laboratorní přístroje a pomůcky

školní mikroskop (obj. 40x, 100x imerse), fluorescenční mikroskop (excitační filtr 490 nm, bariérový filtr 540 nm) (Olympus BX-60, hranol WB), sterilní dřevěná špachtle, mikroskopické potřeby, diamant na sklo, lihový kahan + zápalky, proužky filtračního papíru, barvicí nádobka Hellendahl, Petriho miska, alobal, Pasteurova pipeta, kádinka, minutky

Chemikálie a roztoky

laktopropionový orcein (příprava viz protokol Mitóza), roztok chinakrin dihydrochloridu, 96% etanol, diethylether, 0,1 M HCl, destilovaná voda, fosfátový pufr¹¹

¹¹ Fosfátový pufr

89,5 ml 0,1 M kyseliny citronové

160,5 ml 0,2 M hydrogenfosforečnan sodný

- doplnit redestilovanou vodou na 500 ml (pH 6,8)

Pracovní postup

A. Barvení sex-chromatinu laktopropionovým orceinem (studium odborné a pedagogické biologie)

1. Sterilní lopatkou provedeme stěr buněk epitelu z obou stran vnitřní strany ústní sliznice (po odstranění odumřelých buněk).
2. Výtěr nanese ve formě roztěru na podložní sklo, přikápneme kapku laktopropionového orceinu, promícháme preparační jehlou a necháme barvit 5 min, přičemž barvivo lehce zahřejeme nad plamenem lihového kahanu (barvivo nesmí vařit!).
3. Na preparát přiložíme krycí sklíčko a jemným tlakem provedeme roztlak.
4. Zbytek barviva odstraníme proužkem filtračního papíru.
5. Pod mikroskopem při větším zvětšení (obj. 40x a 100x-imerse) vyhledáme interfázní jádra, vyhodnotíme s ohledem na zastoupení sex chromatinu¹². Dáváme pozor na jádra v mitóze a na jádra degenerovaná (shluky chromatinu), která do hodnocení preparátu nezapočítáváme. Barrova tělíčka jsou obvykle dobře vidět na pozadí málo zrnité nukleoplasy.

B. Fluorescenční barvení Y – chromatinu

1. Špejlí provedeme stěr buněk epitelu z obou stran vnitřní strany ústní sliznice.
2. Výtěr nanese ve formě roztěru na diamantem označené podložní sklo a fixujeme 5 min v kapce směsi etanol:éter v poměru 1:1.
3. Preparát necháme oschnout a macerujeme v 0,1 M HCl 5 min, poté opláchneme destilovanou vodou.
4. Preparát převrstvíme kapkou 5% roztoku chinakrin dihydrochloridu. Barvíme 10 minut ve tmě.
5. Opláchneme destilovanou vodou.
6. Stabilizujeme 5 minut v roztoku fosfátového pufru (pH 6,8).
7. Mokrý preparát překryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu.

ÚKOLY

1. Zakreslete buňky bukalní sliznice barvené laktopropionovým orceinem, ve vašem preparátu a v preparátu vašeho spolužáka opačného pohlaví, s různým uložením Barrova tělíčka.
2. Schématicky zakreslete buněčné jádro s pohlavním X-chromatinem v různých genotypech člověka.

¹² Jako X-pozitivní jádro považujeme jen to, ve kterém najdeme při okraji kondenzovaný X chromatin. V klinické praxi se výsledek vyjadřuje jen jako pozitivní nebo negativní. Hodnotí se 100 - 500 jader.

3. V 10-ti zorných polích spočítejte buňky s Barrovým tělískem a bez Barrova tělíška, vyhodnoťte procentuální výskyt pohlavního chromatinu ve vašem preparátu a v preparátu spolužáka opačného pohlaví.
4. Zakreslete buňku s Y-chromatinem.

ZÁVĚR

Uveďte procentuální zastoupení Barrova tělíška ve vašem preparátu. Jaké jste chromozómové konstituce (s ohledem na pohlavní chromozómy)?

KARYOTYP ČLOVĚKA

(*Metody lidské cytogenetiky, klasifikace lidských chromozómů, karyotyp člověka.*)

ÚVOD

Cytogenetika je vědní obor, který se zabývá studiem buněčných struktur nesoucí genetickou informaci. Pomocí cytologických metod zjišťuje počet, tvar a strukturu chromozómů a hledá příčiny a následky jejich změn.

Cytogenetické vyšetřovací metody

Základní metodou je chromozómová analýza, jejímž výsledkem je stanovení karyotypu. Nejčastějším materiálem pro vyšetřování chromozómů v somatických buňkách během mitotického dělení jsou buňky periferní krve, kostní dřeň, choria a plodové vody. Pro svou snadnou dostupnost jsou nejvýhodnější bílé krvinky (lymfocyty) periferní krve. Na přípravu krátkodobé buněčné kultury se používá vzorek heparizované periferní krve. Mitotická aktivita lymfocytů se stimuluje fytohemaglutininem (extrakt z fazole, *Phaseolus vulgaris*), který se přidává do kultivačního média. Buněčná kultura se kultivuje v termostatu asi 72 hod. při teplotě 37⁰C. Ke konci kultivace se do média přidává asi na 2 hod. kolchicin, který poruší funkci dělicího vřeténka, a tak vyvolává nahromadění buněk ve stadiu metafáze. Buňky jsou dále vystaveny hypotonizaci a fixaci. Pak se buněčná suspenze nanese na podložní skla a barví se nejčastěji Giemsovým barvivem. Vhodné mitózy se vyfotografují. Ze zhotovených obrázků se chromozómy vystříhnou a roztřídí podle velikosti, umístění centromery a uspořádání proužků dle mezinárodně platné klasifikace (Paris Conference 1971) a sestaví se karyotyp.

Metody barvení chromozómů

Až do r. 1970 bylo konvenční (homogenní) barvení Giemsovým barvivem jedinou barvicí metodou. Avšak jejím velkým nedostatkem bylo, že neumožňovala přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů, samozřejmě i jejich aberací. Další pokrok nastal až s rozvojem nových barvicích metod, tzv. proužkovacích (banding) metod.

Q - banding - první metoda ze série nových barvicích metod, kdy se k barvení chromozómů používá fluorescenčních derivátů quinakrinu. Ve fluorescenčním mikroskopu se na chromozómech objeví příčné proužky jasně a méně jasně fluoreskující. Nevýhodou metody je nestabilita barvení.

G - banding - v současné době je to nejpoužívanější metoda, kdy se chromozómy vystaví účinku trypsinu, který denaturuje proteiny chromozómů a ty se obarví Giemsovým barvivem. Na chromozómech vzniknou tmavé a světlé proužky, podle kterých lze přesně určit jednotlivé chromozómy, popřípadě i jejich anomálie.

R - banding - (R - reverse = opačný) - pruhy na chromozómech jsou vyvolány působením horkých alkalických roztoků a opět barvením Giemsovým barvivem. Vzniklé tmavé a světlé proužky na chromozómech jsou stabilní a při srovnání s G-proužky jsou umístěny opačně.

HRT - metoda - pozorování chromozomů v profázi. Metoda umožňuje registrovat mnohem větší počet proužků na chromozómech a sledovat jejich detailnější strukturu. Hodnocení je však velmi obtížné.

C - banding - významná barvicí metoda, kdy se na chromozómech barví konstituční heterochromatin, tj. oblast centromer a dlouhá ramena chromozómu Y. Neumožňuje však identifikaci jednotlivých chromozómů.

Metody proužkování chromozomů, zejména G-banding, umožňují přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů a tedy sestavení karyotypu. Tímto způsobem lze sledovat nejen numerické, ale i strukturální aberace chromozómů, a diagnostikovat závažná genetická onemocnění.

Stanovení karyotypu člověka

Fyziologický karyotyp somatické buňky člověka ($2n = 46$) se skládá ze 46 chromozómů, tj. z 23 homologických párů.

Žena: fyziologický karyotyp 46, XX

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozómů) XX.

Muž: fyziologický karyotyp 46, XY

Je tvořen z 22 párů autozomů a z 1 páru gonozomů (pohlavních chromozómů) XY.

ÚKOLY

1. Sestavte karyotyp člověka

PROVEDENÍ

Materiál

mikrofotografie metafáze lidských chromozómů - G-banding

Potřeby

nůžky, lepidlo, pinzeta, předloha sestaveného karyotypu

Pracovní postup

1. Vystříhejte jednotlivé chromozómy.
2. Seřadte je podle velikosti od největších po nejmenší, podle umístění centromery a zařadte do skupin A až G.
3. Ve skupinách A až G proveďte podle proužků na chromozómech jejich přesnou identifikaci.
4. Podle sestaveného karyotypu určete pohlaví vyšetřovaného jedince. Rozhodněte, zda jde o fyziologický nebo patologický karyotyp a pomocí symbolů zapište.

ZÁVĚR

Uveďte a zhodnoťte výsledek úkolu.

GENEALOGIE

(Genealogická metoda. Genealogické symboly. Rozbor rodokmenů. Základní typy dědičnosti.)

ÚVOD

Genealogie je základem genetického vyšetření člověka, jehož cílem je stanovení typu dědičnosti daného onemocnění. Zásadní význam má zjištění příbuzenských vztahů, pohlaví postižených i nepostižených osob v rodině, data jejich narození a úmrtí, počet a pořadí narozených osob v sourozenstvech a údaje o jejich zdravotním stavu. Základní data a příbuzenské vztahy se zachycují pomocí standardních symbolů v tzv. **genealogické schéma** neboli **rodokmen**.

Hloubka genealogického schématu je zpravidla limitována dostupností potřebných informací na 3-4 generace. Naproti tomu je však nutné zachytit rodinu v co největší šíři. Osobu, kterou začíná genetická analýza dědičnosti určité vlastnosti v rodokmenu, označujeme termínem **proband**. Tato osoba je zpravidla nositelem sledovaného znaku, ve schématu je označena šipkou. Členy rodiny, patřící do stejné generace, se zachycují v horizontálních řadách. Jednotlivé generace označujeme římskými čísly. Příslušníky jednotlivých generací označujeme zleva doprava arabskými čísly. Tímto způsobem každá osoba v rodokmenu získá souřadnicová čísla, která se používají v legendě, popř. v textu.

Pro účely praktického cvičení budeme předpokládat:

- a) Sledovaný znak (nemoc) je podmíněn vždy jen jedním genem se dvěma alelami, mezi kterými je vztah úplné dominance.
- b) Gen vykazuje úplnou penetranci.
- c) V rodokmenu sledujeme pouze jeden znak.
- d) Znak je podmíněn genem buď v autozómu (A) nebo v gonozómu X (G), přičemž znak je určen alelou dominantní (D) nebo recesivní (R).

Základní typy dědičnosti:

I. Autozomálně dominantní typ dědičnosti (AD)

U tohoto typu dědičnosti nelze podle fenotypu nemocného stanovit jeho genotyp. K manifestaci choroby dojde jak u heterozygota (Aa), tak i u dominantního homozygota (AA). Recesivní homozygot (aa) je zdrav.

Pro analýzu rodokmenového schématu platí tyto zákonitosti:

1. Znak (nemoc) je přenášen zpravidla po více generací, aniž by některou z nich vynechal.
2. Zdraví příslušníci rodiny mají již jen zdravé děti.
3. Obě pohlaví jsou postižena stejně často.
4. Otec nemocného je stejně často postižen jako matka.
5. V rodinách s jedním postiženým rodičem je v průměru 1/2 dětí postižena (riziko 50%). V rodinách se dvěma postiženými rodiči je riziko 75%.
6. Rodiče nebývají častěji příbuzní, než odpovídá průměrné četosti příbuzenských sňatků v dané populaci.

Příklady autozomálně dominantních chorob:

	frekvence v populaci
- Vrozená hluchota	1 : 7 500
- Dentinogenesis imperfecta	1 : 8 000
- Polypóza tlustého střeva	1 : 20 000
- Retinoblastom	1 : 20 000
- Hypokalcifikace zubů	
- Diastema mediale	
- Katarakta	

II. Autozomálně recesivní typ dědičnosti (AR)

U tohoto typu dědičnosti lze podle fenotypu nemocného určit jeho genotyp, poněvadž příčinou choroby je přítomnost dvou defektních recesivních alel na jednom z 22 párů autozómů. Genotyp nemocného jedince mužského i ženského pohlaví je recesivní homozygot (aa). Naproti tomu fenotypicky zdravý jedinec může být heterozygotem (Aa) nebo dominantním homozygotem (AA).

Pro analýzu rodokmenového schématu platí:

1. V rodině jsou zpravidla postiženi sourozenci.
2. Rodiče jsou většinou zdraví (heterozygoti).
3. Obě pohlaví jsou postižena stejně často.
4. Jsou-li oba rodiče zdraví, riziko pro potomky je 25%. Je-li jeden z rodičů probanda nemocen, je riziko pro potomky 50%. Jsou-li nemocní oba rodiče, je riziko pro potomky 100%.
5. Čím je sledovaný znak v populaci vzácnější, tím častěji prokážeme u rodičů probanda příbuzenský sňatek.

Příklady autozomálně recesivních chorob: frekvence v populaci

- Mukoviscidóza	1 : 2 500
- Fenylketonurie	1 : 6 000
- Albinismus	1 : 10 000
- Galaktosémie	1 : 40 000

III. Gonozomálně recesivní typ dědičnosti, vázaný na X chromozóm (GR)

U tohoto typu dědičnosti lze u nemocných i zdravých mužů a u nemocných žen stanovit genotyp podle fenotypu. U zdravých žen však nikoliv. Příčinou onemocnění muže je přítomnost jedné defektní recesivní alely v heterologní oblasti X chromozómu, postižený muž je hemizygot (X^aY). Zdravý muž musí mít genotyp X^AY . U nemocné ženy jsou dvě defektní recesivní alely na obou chromozómech, postižená žena je recesivní homozygot (X^aX^a). Zdravá žena může být buď homozygot X^AX^A nebo heterozygot X^AX^a - přenašečka.

Pro analýzu rodokmenového schématu platí:

1. Postižení jsou pouze muži.
2. Vloha se přenáší přes fenotypicky zdravou ženu heterozygota - přenašečku.
3. Žena - přenašečka má 50% synů postižených, 50% dcer jsou heterozygoti - přenašečky.
4. Muž nikdy nepředává znak synům.
5. Všechny dcery postiženého muže jsou heterozygoti - přenašečky.

Příklady gonozomálně recesivních chorob, vázaných na X chromozóm:

	frekvence v populaci
- Hemofilie A	1 : 10 000
- Duchennova muskulární dystrofie	1 : 100 000
- Daltonismus	

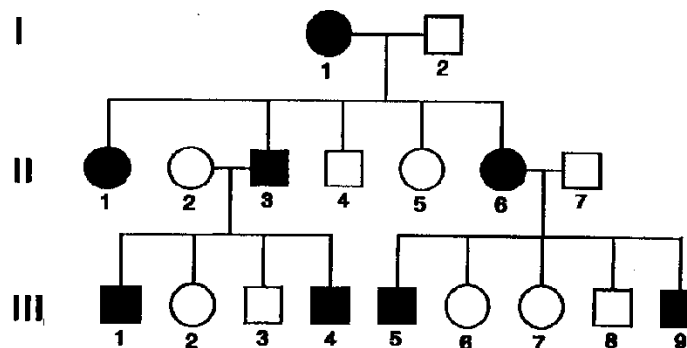
ÚLOHY

1. Vypište základní genealogické symboly.
2. Pomocí genealogických symbolů sestavte rodokmen Vaší rodiny (maximálně 3 generace), sebe označte jako probanda.
3. Proveďte analýzu neznámých rodokmenů a určete, jaký typ dědičnosti podmiňuje daný znak (nemoc).

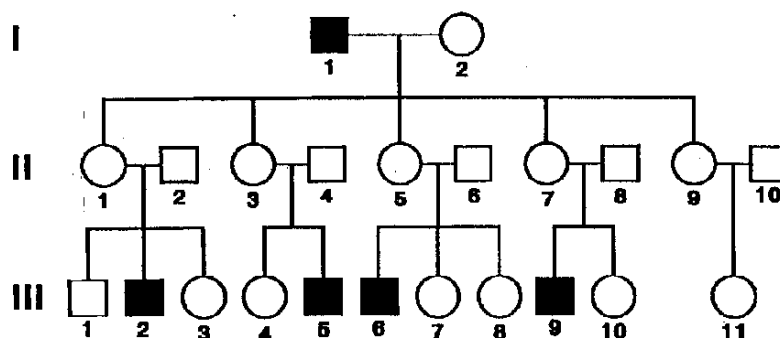
ZÁVĚR:

Shrňte výsledky.

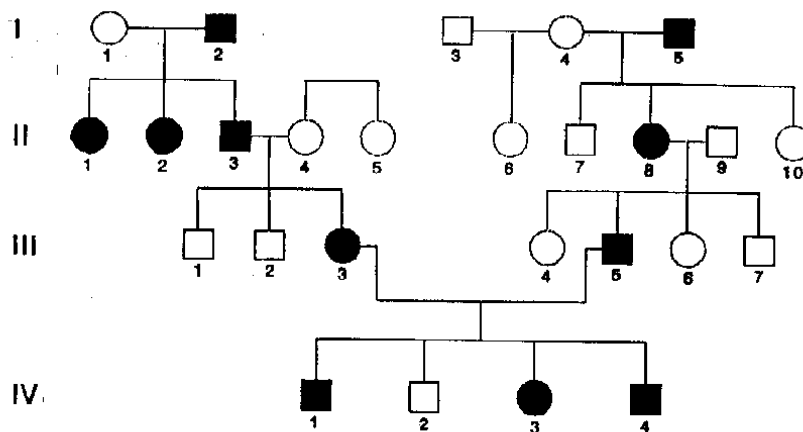
Rodokmen 1



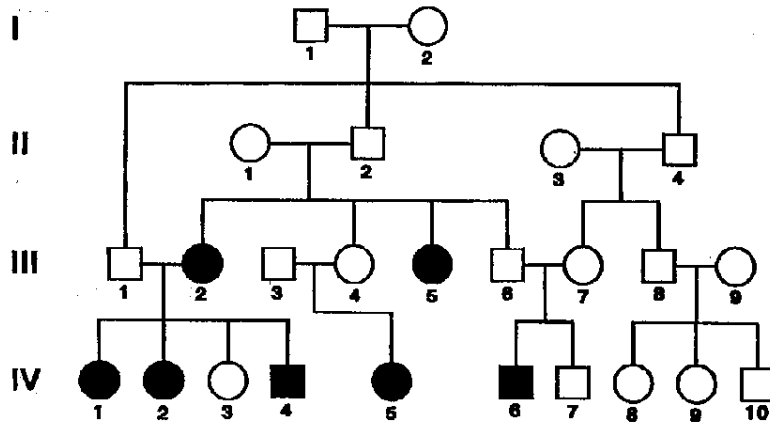
Rodokmen 2



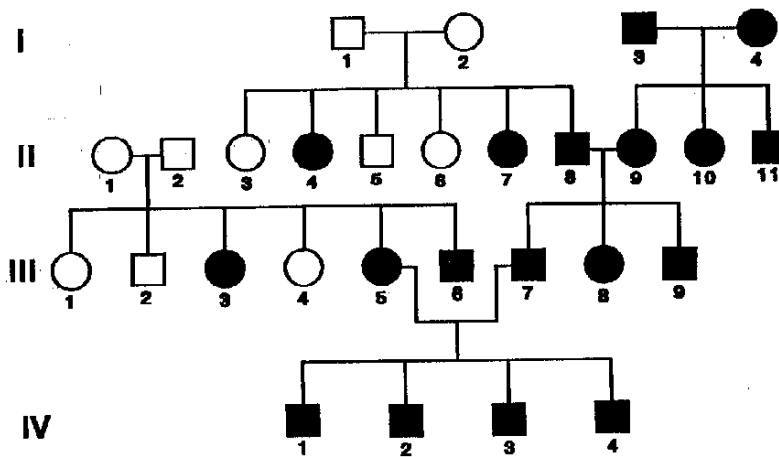
Rodokmen 3



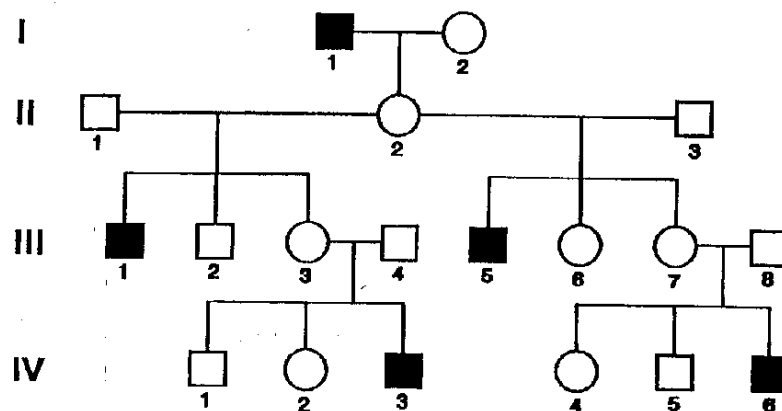
Rodokmen 4



Rodokmen 5



Rodokmen 6



HLAVNÍ KREVNÍ SKUPINY (A, B, AB, 0) A JEJICH DĚDIČNOST

(Určení krevních skupin ABO systému pomocí antisér. Frekvence fenotypů v dané skupině. Výpočet frekvence homozygotně dominantních a heterozygotních jedinců: Hardyho-Weinbergův zákon. Příklady na řešení dědičnosti krevních skupin u člověka.)

ÚVOD

V membránách červených krvinek jsou různé *antigeny*, zvané **aglutinogeny**, nejvýznamnější jsou A a B. Pokud je přítomen aglutinogen A, hovoříme o erythrocytech skupiny A, při přítomnosti aglutinogenu B → erythrocyty skupiny B, při přítomnosti aglutinogenů A i B → erythrocyty skupiny AB a při nepřítomnosti aglutinogenů → erythrocyty skupiny 0.

V krevní plazmě jsou *protilátky* bílkovinné povahy zvané **aglutininy** (anti-A a anti-B). Následující tabulka ukazuje typ krevní skupiny, typ erythrocytů a zastoupení či nezastoupení aglutinogenů a odpovídajících aglutininů:

Krevní skupina	Erythrocyty skupiny	Aglutinogen (na krvinkách)	Aglutinin (v krevní plazmě)	% zastoupení v naší populaci
A	A	A	anti-B	42
B	B	B	anti-A	12
AB	AB	A i B	-	8
0	0	-	anti-A, anti-B	38

Aglutinační reakce nastane, sejde-li se aglutinogen A s aglutininem anti-A nebo aglutinogen B s aglutininem anti-B. Při transfúzi krve lze použít jen krev stejně skupiny. Poučka o univerzálním dárci (0) a univ. příjemci (AB) neplatí (mimo jiné se v krvi skupiny 0 mohou vyskytnout zvýšené titry aglutininů anti-A a anti-B). Před každou transfúzí je třeba provést křížovou zkoušku, zda sérum příjemce neshlukuje krvinky dárce a naopak.

Čtyři krevní skupiny objevil *Karl Landsteiner* v r. 1900 (na něm nezávisle později - 1907 - český psychiatr *J. Janský*) a označil je písmeny A, B a 0, názor na **dědičnost krevních skupin** pochází z r. 1908. Základní krevní skupiny - **A, B, AB, 0** - jsou určeny řadou alel (**mnohotná alelie**), které jsou děděny *jednoduše autozomálně podle Mendelových zákonů*. Tyto alely se mohou kombinovat po dvou vždy na stejném lokusu 9. chromozómového páru (koncová část q-raménka). Základní jsou tři alely: **I^A, I^B** a **i** (někdy označovaná jako I⁰). I^A a I^B jsou **dominantní a navzájem kodominantní**, i je vůči oběma **recesivní**. Protože každá osoba nese dvě alely (jednu alelu zděděnou od otce, druhou od

matky), je možných celkem 6 genotypů¹³.

<i>Genotyp</i>	<i>Fenotyp</i>
i i	0
I ^A i nebo I ^A I ^A	A
I ^B i nebo I ^B I ^B	B
I ^A I ^B	AB

Mnohotná alelie je ještě v další úrovni - v rámci skupiny A se rozlišuje 5 podskupin A₁ - A₅ (A₁ je nejčastější a dominantní nad ostatními podskupinami), u skupiny B dvě podskupiny.

Na dědičnost krevních skupin nemá vliv prostředí. Jednoduchých zákonitostí dědičnosti krevních skupin se využívá v paternitních a maternitních sporech a při zjišťování jedno- a dvouvaječnosti dvojčat.

Možnosti vyloučení otcovství se dále prohlubují stanovením krevních skupin ostatních systémů a dalších somatických znaků. Příslušnost k určité krevní skupině lze zjistit i ze zaschlých krevních skvrn, z jiných tkání a i ze sekretů (spermatu, slin...) → význam v *soudním lékařství*.

Při vylučování otcovství můžeme postupovat podle následující tabulky:

<i>Krevní skupina dítěte</i>	<i>Možný genotyp dítěte</i>	<i>Krevní skupina matky</i>	<i>Možný genotyp matky</i>	<i>Možná krevní skupina otce</i>	<i>Vyloučen otec s krevní skupinou</i>
0		0			
0		A			
0		B			
A		0			
A		A			
A		B			
A		AB			
B		0			
B		B			
B		A			
B		AB			
AB		A			
AB		B			
AB		AB			

¹³ Stanovení počtu genotypů u mnohotné alelie podle vzorce: $n \cdot (n+1) / 2$, kde n = počet alel

Další krevně skupinové systémy

Proti nim neexistují v lidské krvi antiséra (nebo jen velice zřídka); vytvářejí se imunizací vhodného objektu (králík) příslušným antigenem. Pro transfúzi nemají význam, protože nepřítomnost aglutininů zaručuje kompatibilitu jakýchkoliv dvou kreví, ale mají velký význam v genetice a v paternitních sporech.

Krevní faktory M a N - jde o jediný alelický pár bez vzájemné dominance a recesivity → kodominance, umístěný na 4. chromozómu - genotypy MM, MN nebo NN, fenotypy: M, MN a N (M - asi 28 % , MN - asi 50 % , N - 22 %) (s antigeny M a N je spojena dvojice antigenů S a s - systém je někdy označován rovněž jako MNSs krevní systém).

Krevní faktor P - podmíněn jedním alelickým párem - Pp , je jednoduše dominantní (genotypy: PP, Pp a pp, fenotypy: P⁺ a P⁻)

Krevní faktor Q - podobný P

Systém Xg - zajímavý svou lokalizací na X-chromozómu (vazba na pohlaví)

Rh - faktor - bylo rozlišeno přes 30 variant pěti hlavních Rh antigenů determinovaných genovým komplexem na 1. chromozómovém páru (na p-raménku). Jedná se o tři těsně sdružené lokusy D-C-E (mají proto silnou vazbu). Serologicky jde prokázat antigeny kódované alelami D, C, c, E, e. Antigenní produkt alely d nebyl zjištěn - jde o recesivní ztrátovou alelu. Nejvýznamnější z nich je gen D - jedinci s homozygotními alelami d/d jsou Rh-negativní, tj. nemají alelu D, bez ohledu na přítomnost dalších dominantních alel C a E. Velká většina Rh-negativních jedinců má genotyp cde/cde, nejčastější kombinace u Rh-positivních je CDe/CDe). Rh-faktor je nezávislý na dosud známých krevních systémech. Má praktický význam v souvislosti s hemolytickou nemocí novorozenců (erythroblastosis fetalis).

Jedinci Rh⁺ (*Rh-positivní*) - 85 % bělošské populace, nesou na svých červených krvinkách antigen, který reaguje s protilátkou (aglutininem) vzniklou imunizací králíka krvinkami opice makaka - *Macacus rhesus* (odtud **Rh**-faktor, nyní *Macaca mulatta*). Rh⁻ (*Rh-negativní*) - 15 % - tento antigen na erytrocytech nenesou.

Pokud je matka Rh⁻ (alely d/d), otec Rh⁺ (D/d) a pokud dítě je Rh⁺ (D/d), potom se mohou jednotlivé krvinky z plodu dostat placentou do krevního oběhu matky (asi 15 % případů), kde vyprovokují tvorbu protilátky proti RhD antigenu, který se může vracet zpět placentou do plodu a zde vyvolávat aglutinační reakci - vzniká *erythroblastóza*. Při prvním těhotenství není imunizace matky dosti silná a těhotenství je bezproblémové, při dalším těhotenství stejného typu již vzniká nebezpečí

srážení krve plodu, protože plod je již od počátku zaplavován anti-Rh⁺ aglutininem z matčiny krve - může dojít ke smrti plodu před porodem nebo brzy po narození, není-li mu včas vyměněna všechna krev.

V současné době je možná prevence podáváním protilátek anti-Rh⁺ matce.

Frekvence jednotlivých krevních skupin se liší od populace k populaci :

Evropa: **A**- 40%, **B**- 10%, **0**- 45%, **AB**- 5%

(klesání četnosti lidí s krevní skupinou B a stoupání s A od Dálného východu na západ Evropy - důsledek tatarsko-mongolských vpádů 500 - 1000 let př.n.l., Romové: větší četnost genu B - nedávná imigrace z Indie)

Asie: vyšší zastoupení **B** skupiny (stř.Asie 37,4%, stř. Evropa - 15%, Anglie - 8,9%, Baskové na Pyrenejském poloostrově - 2% ; směrem na západ se % zastoupení B skupiny snižuje)

Severní Amerika : Indiáni : **0**- až 100%, **B**- 0 až 1%, **A**- 12 až 83%

Hardyův - Weinbergův zákon genetické rovnováhy

Populace - soubor jedinců téhož druhu, kteří žijí na určitém stanovišti a kteří jsou prostorově oddělení od jiných souborů téhož druhu. Z genetického hlediska je populace soubor jedinců spojených příbuzenskými vztahy.

V **panmiktické** populaci (vzájemné křížení členů populace mezi sebou) se udržuje konstantní poměr mezi jedinci jednotlivých genotypů. Tato rovnováha mezi homozygotně dominantními, heterozygotními a homozygotně recesivními jedinci v dostatečně velké populaci se označuje jako **Hardyův-Weinbergův zákon**. Rovnicí lze tuto rovnováhu vyjádřit takto:

$$p^2 (AA) + 2pq (Aa) + q^2 (aa) = 1$$

p - frekvence (poměrné zastoupení) dominantní alely, $p = 1 - q$

q - frekvence recesivní alely, $q = 1 - p$

p^2 - podíl jedinců dominantního genotypu (AA), $p^2 = (1 - q)^2$

q^2 - podíl jedinců recesivního genotypu (aa)

$2pq$ - frekvence heterozygota

Pouze u jedinců recesivního fenotypu známe genotyp, jedince homozygotně dominantní a heterozygotní nelze podle fenotypu odlišit, výpočtem však můžeme stanovit hodnotu jejich zastoupení. Ze zastoupení recesivních homozygotů v populaci lze tedy podle H.-W. zákona vypočítat zastoupení jedinců homozygotně dominantních a heterozygotních.

PROVEDENÍ

A) Určení krevní skupiny systému AB0

Pomůcky

diagnostická souprava AB0 na určení základních krevních skupin, sterilní jehla na jedno použití (!), desinfekční roztok, náplast, filtrační papír, nádoba na nebezpečný odpad

Pracovní postup

1. Na určená políčka papírku diagnostické soupravy si kápněte po kapce příslušná antiséra (anti-A a anti-B).
2. Povrchově dezinfikujte hmatový polštářek vybraného prstu (nejlépe malíček nebo prsteníček).
3. Pomocí jednorázové sterilní jehly proveďte povrchový vpich do matového poštářku..
4. Do políček s jednotlivými antiséry (na papírku diagnostické soupravy) přeneste, pomocí tyčinek, malé kapky krve z prstu a elipsovými pohyby je rozmíchejte v séru (na každé sérum použijte jiný konec tyčinky, aby nedošlo ke smíchání rozdílných antisér)
5. Výsledky odečítejte **do dvou minut** po promíchání. Podle typu srážení určete, o jakou krevní skupinu se jedná. Vysvětlete, proč se v jednotlivých políčkách krev srážela či nesrážela.
6. Ve vaší skupině vyhodnoťte procentuální zastoupení krevních skupin (tabulka!) a výsledek porovnejte s literárními údaji pro naši populaci.

B) ÚLOHY s problematikou dědičnosti krevních skupin u člověka

1. Doplňte tabulku k vyloučení otcovství:
2. Matka má krevní skupinu 0 a otec krevní skupinu B.
Může mít některé z jejích dětí krevní skupinu shodnou s matkou?
3. Matka má krevní skupinu 0 a otec AB.
Může mít některé z jejích dětí krevní skupinu shodnou s jedním z rodičů?

4. Rodiče mají krevní skupiny A a B.

Jaké krevní skupiny mohou mít jejich děti?

5. V porodnici zaměnili dva chlapce. Rodiče jednoho z nich měli krevní skupiny A a 0, rodiče druhého A a AB. Rozbor krve ukázal, že jeden z chlapců má krevní skupinu 0, zatímco druhý má krevní skupinu A.

a) Který z chlapců patří k jednomu a který k druhému rodičovskému páru?

b) V jakých případech by stačilo znát pouze krevní skupinu matky a nebylo by nutné znát krevní skupinu otce?

6. Chlapec má krevní skupinu 0 a jeho sestra AB.

Jaké krevní skupiny mají jejich rodiče?

7. Dědičnost krevních faktorů MN. Doplňte tabulku.

(Tyto aglutinogeny mohou být v krvi současně nebo jednotlivě. Jde o jeden vlohový pár bez vztaku dominance a recesivity.)

<i>Rodiče</i>	<i>Děti možné</i>	<i>Děti vyloučeny</i>
M x M		
M x MN		
M x N		
N x N		
N x MN		
MN x MN		

8. **Dědičnost Rh faktoru.**

(Rozlišujeme 2 typy fenotypů – Rh^+ a Rh^- . Znak je dědičně řízen 3 geny (ve velmi silné vazbě) - C,D,E. Je-li v genotypu přítomna alespoň jedna alela D, je fenotyp jednoznačně Rh^+ bez ohledu na ostatní alely. Rh^+ je úplně dominantní nad Rh^- .)

Jaké děti, co se týče Rh-faktoru, se mohou narodit rodičům, kde otec má genotyp

a) CcDDEe a žena ccdee ?

b) CcDdEe a žena CcddEe ?

9. Podle **Hardyho-Weinbergerova zákona** vypočítejte procentuální zastoupení homozygotně dominantních a heterozygotních jedinců v naší populaci pro albinismus, který se vyskytuje v poměru 1 : 20 000?

Jméno a příjmení:

Datum:

Studijní skupina:

Protokol č.:

Název: *Vlastní název tématu cvičení*

Úvod: *Teorie a princip úlohy - stručně, slouží k charakterizaci daného tématu.*

Provedení: **Materiál:** *veškerý použitý materiál (včetně materiálu rostlinného či živočišného původu)*
Laboratorní přístroje a pomůcky: *veškeré použité nástroje a přístroje*
Chemikálie (a použité roztoky): *veškeré použité chemikálie, včetně barviv a destilované vody*
Pracovní postup: *Vlastní popis práce, včetně odchylek od návodu*

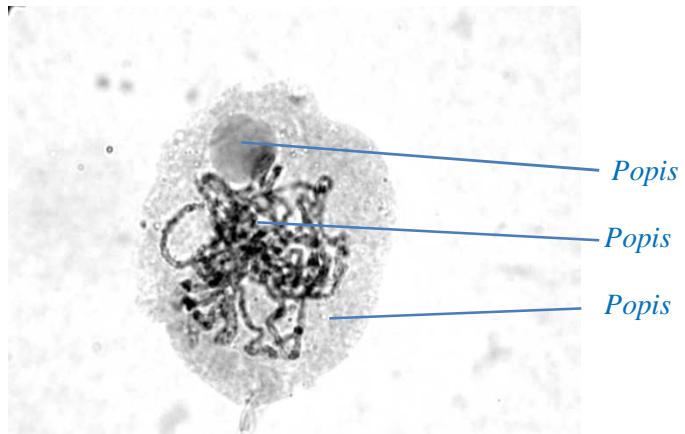
Výsledky: *Přesně a přehledně zaznamenané zjištěné hodnoty nebo pozorování - formou nákresů, tabulek či výpočtů nebo popisů)dle potřeby)*

Hodnocení: *Hodnocení získaných výsledků a jejich srovnání s teoretickými nebo literárními údaji (je-li možné), zdůvodnění odchylek od očekávaných výsledků.*

Závěr: *Formou VELMI stručného "abstraktu" charakterizovat téma práce, použitou metodu a podstatné výsledky.*

Nákres (Obrázek) (5cm na výšku nebo šířku):

Nadpis



zvětšení