

Téma: Buněčné jádro

Úvod:

Buněčné jádro je organelou eukaryotické buňky, v němž je uložena většina genetické informace buňky. Jádro je od okolní cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s póry. Jaderná DNA má dvě základní funkce. Jednak řídí veškeré metabolické děje v buňce, tím že dává vzniknout RNA, která je následně translatována do proteinů. Další funkcí je uchování genetické informace a její přenos do dceřiných buněk. V dospělém organismu se většina buněk již nedělí - je v interfázi. Během interfáze je DNA dekondenzována a v jádře probíhá transkripce. Zatímco během mitózy, která předchází buněčnému dělení, je DNA vysoce kondenzovaná a pozorovatelné jsou jednotlivé chromozómy. V mitóze dochází ke zdvojení obsahu DNA a jejímu následnému rozdělení do dceřiných buněk.

Pro stanovení proliferace buněk se využívá výpočet mitotického indexu. V současné době se s určením mitotického indexu setkáváme například v medicínském výzkumu, kde slouží ke stanovení toxicity testovaných látek, v ekologii při určování působení látek na organismy v prostředí či v klinické medicíně k určení počtu dělicích se buněk v potencionálním nádoru z biopsie tkáně. Mitotický index je definován jako poměr počtu buněk v mitóze k celkovému počtu buněk. Čím je mitotický index vyšší, tím více buněk se nachází v mitotické fázi buněčného cyklu. Abychom mohli mitotický index stanovovat je potřeba jádra (DNA) obarvit. Klasickou metodou využívanou k zviditelnění DNA je Feulgenova reakce, která je založena na redukci kyseliny fuchsinsířčité (Schiffova činidla) aldehydickou skupinou. Principem je kyselá hydrolýza DNA kyselinou chlorovodíkovou, při níž dochází k odštěpení purinovýchází z DNA. V místě jejich odštěpení se na deoxyribózových podjednotkách DNA uvolňují aldehydické skupiny, které redukují Schiffovo činidlo a propůjčují tak DNA červenofialové zbarvení, ta je pak snadno detekovatelná světelným mikroskopem.

Další velkou skupinou barviv využívaných k zviditelnění DNA jsou barviva fluorescenční. Fluorescence je schopnost některých látek po ozáření světlem o kratší vlnové délce (excitační záření) emitovat světlo o delší vlnové délce. Lze rozlišit dva typy fluorescence primární/autofluorescenci a sekundární fluorescenci. Autofluorescence je schopnost některých přirozeně se vyskytujících látek, jako je například chlorofyl, fluoreskovat po dopadu UV záření. Sekundární fluorescenci rozumíme fluorescenci barviva tzv. fluorochromu kovalentně navázaného na sledované buněčné struktury. Pro práci s fluorochromy je nutné znát jejich základní vlastnosti jako je jejich excitační a emisní vlnová délka a jejich afinita k buněčným strukturám. Excitační a emisní spektra některých vybraných fluorochromů jsou uvedena v tabulce č. I.

Tabulka č. I: Fluorescenční barviva používaná v buněčné biologii:

Flourochrom		λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
DAPI	4,6-diamino-2-fenylindol	358	461
FITC	fluorescein-5-izothiokyanát	492	516-525
TRITC	tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát	535-545	570-580
5-AIF	5-jodoacetamidofluorescein		
PI	propidium jodid	535	617
	Ethidium bromide	518	605
FDA	Fluorescein diacetát	490	513
	Hoechst	350	461
	Akridinová oranž	460	650

Úkol č.1: Barvení jádra pomocí DAPI

Materiál: kultura hmyzích buněk SF9

Chemikálie: pracovní roztok DAPI (4,6-diamino-2-fenylindol) o koncentraci 1 µg/ml

Pomůcky: fluorescenční mikroskop a mikroskopické potřeby; automatické pipety + špičky

Postup:

1. Na podložní sklíčko napipetujte 10 µl buněčné suspenze SF9, připipetujte 10 µl pracovního roztok DAPI a překryjte krycím sklíčkem.
2. Preparát pozorujte pomocí fluorescenčního mikroskopu a hodnotte tvar jader, jejich relativní velikost vztahenou k velikosti buňky a také strukturu jader, zda jsou homogenní či heterogenní. Schematicky zakreslete buňku s obarveným interfázním a mitotickým jádrem a výsledek zhodnoťte.

Úkol č.2: Barvení jádra Feulgenovou reakcí

Materiál: naklíčená čočka jedlá (*Lens esculenta*)

Chemikálie: Framerova fixační směs (96% ethanol : koncentrovaná kyselina octová (3:1); 1N HCl; Schiffovo reagens; destilovaná voda

Pomůcky: kyvety; vodní lázeň; Petriho misky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z naklíčené čočky vypreparujte z kořínků pomocí skalpelu kořenovou špičku.
2. Oddělené kořenové špičky přeneste do Framerovy fixační tekutiny na Petriho misku. Doba fixace je 15 minut při pokojové teplotě.
3. Po ukončení fixace přeneste kořenové špičky do 1N HCl a nechte hydrolyzovat 10 minut v 1N HCl při 60 °C ve vodní lázni.
4. Poté hydrolyzu zastavte oplachem preparátu destilovanou vodou - 2x 3 minuty.
5. Kořenové špičky vložte do kapky Schiffova reagens na podložní sklo, přiložte krycí sklo a proveďte roztlak.
6. Sklo s preparátem vložte do kyvety s roztokem Schiffova reagens a nechte barvit 25 minut při pokojové teplotě.
7. Po nabarvení preparát vyjměte a zlehka opláchněte destilovanou vodou.
8. Preparát pozorujte pod mikroskopem a do protokolu schematicky zakreslete buňku s obarveným interfázním a mitotickým jádrem a výsledek slovně zhodnoťte.
9. Stanovte mitotický index. Spočítejte tedy celkový počet buněk a počet buněk v mitóze v 10 zorných polích, zapište do tabulky a stanovte mitotický index.

Tabulka č. II: Stanovení mitotického indexu buněčné suspenze SF9:

Zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Celkem	Mitotický index
Počet buněk												
Počet buněk v mitóze												

Použitá literatura:

Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie, Olomouc.

Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie, Praha.