

# Identifikace chromozomů

## Barvení chromosomů

### Klasické barvení

Chromosomy obarvené roztokem podle Giemsy-Romanovského jsou homogenně tmavé. Tento typ barvení umožňuje hodnotit počet a hrubou stavbu chromosomů, zlomy a nestabilní přestavby (u jedinců vystavených působení klastogenních činitelů). Klasické barvení se používá i u pacientů s poruchami reparace poškozené DNA (Fanconiho anémie, ataxia-telangiectasia, Nijmegen-breakage syndrom).



Klasické barvení

### G pruhy

G pruhování je nejčastěji rutinně používané barvení v cytogenetických laboratořích. Vzor tvořený příčnými pruhy se objeví na chromosomech inkubovaných v trypsinu po obarvení roztokem podle Giemsy-Romanovského. Počet pruhů závisí na stupni kondenzace chromosomů. V metafázi je na chromosomech 400–450 pruhů. V prometáfázi je v karyotypu identifikovatelných okolo 850 pruhů. Tmavě se barví heterochromatinové oblasti tvořené DNA bohatou na adenin a thymin. Světlé pruhy odpovídají euchromatinu bohatému na guanin a cytosin.



Karyotyp G-pruhy

### R pruhy

Metoda R pruhování je založena na působení vysoké teploty (87 °C) a následném obarvení roztokem podle Giemsy-Romanovského. Výsledný pruhový vzor je reverzní k G pruhování (G negativní).

### AgNOR barvení

Toto barvení se využívá ke sledování variant sekundární konstriktce akrocentrických chromosomů. Dusičnan stříbrný se selektivně vysráží v oblasti nukleolárního organizátoru.

### C barvení

Metoda slouží ke zobrazení konstitutivního heterochromatinu – satelitní DNA. U člověka je variabilita ve velikosti konstitutivního heterochromatinu na dlouhých ramenech chromosomů 1, 9, 16 a Y.



C-barvení, t(X,Y)

## Speciální metody

### SCE (Sister Chromatide Exchange)

Symetrická výměna úseků DNA mezi sesterskými chromatidami pozorovatelná na metafázních chromosomech. Za fyziologických podmínek dochází při každé replikaci ke 4–6 SCE. UV záření a působení genotoxických látek indukuje zvýšení počtu SCE v buňkách.

K vizualizaci SCE se využívá „harlequinská“ technika, založená na rozdílném zbarvení sesterských chromatid. Lymfocyty periferní krve se kultivují v mediu s BrdU (5-bromo 2-deoxyuridin – analog thyminu). Při replikaci se BrdU inkorporuje do nově vznikajících řetězců DNA namísto thyminu. V metafázi následujícího buněčného cyklu mají chromosomy v jedné sesterské chromatidě v obou vláknech DNA substituovaný BrdU a ve druhé chromatidě jedno vlákno původní a druhé s BrdU. Přítomnost BrdU v DNA snižuje její schopnost vázat některá barviva a po barvení např. Giemsovým barvivem jsou světlejší chromatidy s BrdU.

Podle zbarvení chromatid je v kultuře možné odlišit metafáze 1., 2. a 3. dělení.

Test SCE *in vitro* na lidských lymfocytech se využívá k testování klastogenních účinků látek. Tento test je citlivější než hodnocení ZCHA. *In vivo* způsobuje zvýšení počtu SCE např. kouření, a některá cytostatika (na bázi alkylačních látek). U jedinců s Bloomovým syndromem je vyšetření SCE rutinně používanou vyšetřovací metodou (počet výměn i více než 100 na mitózu).

### Fragilní-X

V lidském karyotypu je známa řada fragilních míst – oblastí častého vzniku zlomů. Objevují se na metafázních chromosomech po expozici určitými látkami nebo při růstu v deficitních médiích. Většinou jejich přítomnost nespojuje s patologickým fenotypem. Určitou výjimku tvoří fragilní místo Xq27.3 (FRAXA) u pacientů se syndromem fragilního X.

Xq27.3 je folát senzitivní místo, které je možno vizualizovat po kultivaci v mediu s nízkým obsahem kyseliny listové, příp. za přítomnosti antagonistů kys. listové FudR (5'-fluoro 2'-deoxyuridin) nebo metotrexátu.

Cytogeneticky lze za optimálních laboratorních podmínek (a při troše štěstí) diagnostikovat přítomnost fra Xq27.3 jak u postižených mužů tak u žen přenašeček.

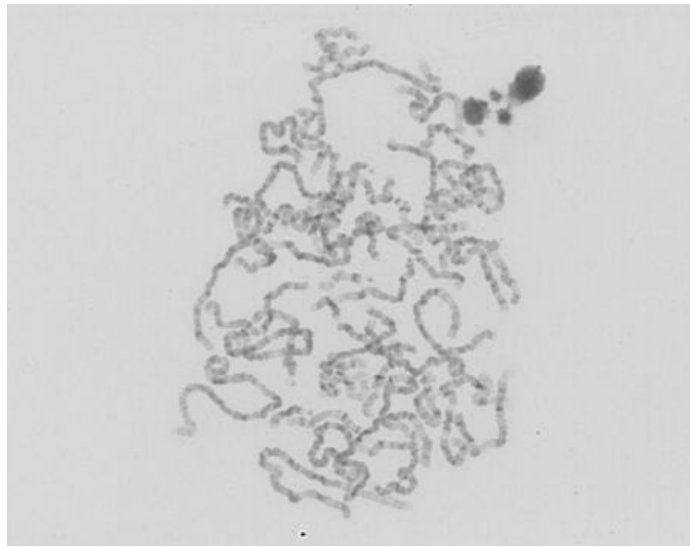
Syndrom fragilního X je podmíněn expanzí tripletové repetice CGG v prvním exonu genu *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1). V současné době se pro diagnostiku FRAXA cytogenetická diagnostika již nevyužívá a dává se přednost přímé DNA diagnostice zaměřené na počet repetice v daném genu.

V oblasti Xq28 leží ještě další folát senzitivní fragilní místa; FRAXE – spojené s mírnější mentální retardací a snad benigní FRAXF.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Syndrom fragilního X.*

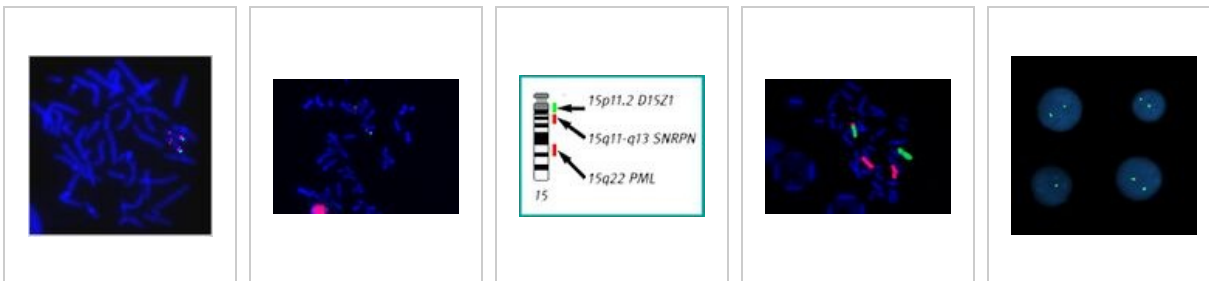
### HRT (High Resolution Technique)

Metoda HRT umožňuje analyzovat velmi dlouhé jen částečně spiralizované chromosomy. Speciální kultivační technika zahrnuje synchronizaci dělení buněčné kultury methotrexátem a následné zastavení dělení v prometafázi. Na chromosomech je možné identifikovat až 850 G-pruhů. Tato metoda je vhodná pro analýzu strukturních přestaveb malého rozsahu (např. mikroleceí), v rámci rutinní diagnostiky se s ní ovšem dnes již nesetkáme, neboť byla kompletně nahrazena (ještě přesnější) metodou microarray.



## FISH (Fluorescent in situ hybridization)

Metoda FISH využívá DNA sondy značené fluorescenčním barvivem k detekci specifických úseků DNA. FISH lze použít jako doplňkovou metodu při cytogenetickém vyšetření. Sondy se aplikují přímo na buněčný materiál (chromosomy v metafázi a prometáfázi nebo interfázni jádra), není nutná izolace DNA. Preparáty se hodnotí pod fluorescenčním mikroskopem.



FISH – lokus specifická sonda, Prader-Willi

FISH – lokus specifická sonda, delece 15q11-q13, Prader-Willi

FISH – Schema lokus specifická sonda, Prader-Willi

FISH – Malovací sonda t(5;7)

Interfázni FISH –  $\alpha$ -satelitní sonda, mozaika 46XX/45X

## Typy sond

- **Lokus-specifické** sondy je možné použít pro jádra v interfázi i pro metafázni chromosomy. Slouží k vyšetřování mikroleceí, subtelometrických přestaveb a amplifikací.
- **Satelitní** (centromerické, telometrické) sondy je možné použít pro jádra v interfázi i pro metafázni chromosomy. Užívají se k určení počtu jednotlivých chromosomů a k vyšetřování mozaicismu.
- **Celochromosomové** (malovací) sondy jsou vhodné pouze pro metafázni chromosomy. Slouží k hodnocení přestaveb chromosomů.

## Nejčastěji používaná fluorescenční barviva

- **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenylindol) – k podbarvení preparátů (counterstaining).
- **FITC** (fluorescein-5-isothiokyanát) – zelený signál.
- **TRITC** (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát) – červený signál.

## Odkazy

### Související články

- Chromosomy
- Chromosomální abnormality
- Lidský karyotyp
- Indikace k vyšetření karyotypu
- Klinická genetika
- Prenatální diagnostika