

#### 4. BUNĚČNÉ JÁDRO A BUNĚČNÉ KULTURY

##### TEORETICKÝ ÚVOD:

##### **Buněčné jádro**

Buněčné jádro je organelou eukaryotické buňky. Je v něm 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 pak uchování genetické informace a její přenos do dceřiných buněk.

Soubor událostí vedoucích k rozdělení mateřské buňky na dceřiné se označuje jako buněčný cyklus. Ten se skládá z G1, S a G2 fáze, souhrnně označovaných jako interfáze, a vlastního dělení označovaného jako M fáze. G1 a G2 jsou fáze, ve kterých buňka roste, syntetizuje RNA a proteiny, zdvojuje organely a tvoří struktury potřebné pro rozdělení mateřské buňky. V S fázi buněčného cyklu navíc dochází ke zdvojení DNA prostřednictvím procesu replikace. Na konci S fáze je tedy každý chromozom tvořen dvěma identickými sesterskými chromatidami, které jsou spojeny v místě centromery.

M fáze představuje fyzické rozdělení a přesnou distribuci duplikovaných chromozomů do dceřiných buněk. Somatické buňky se dělí procesem označovaným jako mitóza, při kterém z jedné mateřské buňky vznikají dvě identické dceřiné buňky. Mitózu dělíme na pět fází:

- Profáze
  - Dochází ke kondenzaci (spiralizaci) chromozomů; tvorbě mitotického vřeténka z duplikovaných centrozomů, které se rozcházejí k opačným pólům buňky; polymerací tubulinu vznikají mikrotubuly, které vycházejí z centrozomů, a to astrální – hvězdicovitě rozbíhající se kolem centrozomů, polární – směřující k opačnému pólu buňky; na konci profáze se rozpadá jadérko.

- Prometafáze
  - Dochází k rozpadu jaderné membrány; polární mikrotubuly se napojují na chromozomy v oblasti centromery ke kinetochoru tak, že jedna sesterská chromatida je připojena k jednomu pólu vřeténka, zatímco druhá chromatida ke druhému pólu, taková mikrotubulová vlákna jsou pak označována jako kinetochorová.
- Metafáze
  - Chromozomy jsou v nejkondenzovanějším stavu a lze je dobře rozlišit pod mikroskopem; tahem kinetochorových mikrotubulů dochází k uspořádání chromozomů do ekvatoriální roviny (metafázní destička) mezi póly dělicího vřeténka. Raménka chromozomu směřují k pólům buňky.
- Anafáze
  - Dochází k oddělení sesterských chromatid a k jejich posouvání k opačným pólům buňky (centromerou dopředu) zkracováním kinetochorových vláken. Dochází také k oddalování pólů mitotického aparátu. Na konci fáze jsou k pólům odtaženy jednochromatidové chromozomy, zachovává se tak jejich počet a genetická informace.
- Telofáze
  - Dochází k prodlužování polárních vláken, kinetochorová vlákna mizí. Na opačných pólech buňky se kolem jednochromatidových chromozomů rekonstruuje jaderná membrána dvou dceřiných jader, částečně ze zbytků původního jádra. Dochází k dekondenzaci chromozomů a rekonstrukci jadérek.

Po mitóze následuje cytokineze, při které dochází k rozdělení cytoplazmy a organel mateřské buňky mezi dvě nově vznikající dceřiné buňky. Obvykle není považována za součást mitózy. Rostlinné buňky se dělí centrifugálně (od středu), kdy se v místě ekvatoriální roviny formuje buněčná přepážka. U živočichů dochází k zaškrcení buňky pomocí kontraktilního prstence (centripetálně) a rozdělení na dvě dceřiné buňky.

## Vizualizace jádra

Klasickou metodou pro vizualizaci jádra (zviditelnění DNA), které je pak možné pozorovat za pomoci světelné mikroskopie, je Feulgenova reakce, která je založena na redukci kyseliny fuchsinsířičité (Schiffova činidla) aldehydickou skupinou. Principem je kyselá hydrolyza DNA kyselinou chlorovodíkovou, při níž dochází k odštěpení purinových bazí z DNA. V místě jejich odštěpení se na deoxyribózových podjednotkách DNA uvolňují aldehydické skupiny, které redukuje Schiffovo činidlo a propůjčují tak DNA červenofialové zbarvení, které je pak snadno detekovatelné 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 fluorescencí rozumíme fluorescenci barviva tzv. fluorochromu 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. Příkladem sondy hojně využívané pro vizualizaci buněčného jádra pomocí fluorescenční mikroskopie je 4',6-diamino-2-fenylindol (DAPI). DAPI je interkalační fluorescenční barvivo, které se váže na DNA do oblastí bohatých na báze adenin a thymin. Excitační a emisní spektra DAPI jsou spolu s některými dalšími používanými fluorescenčními barvivy uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Příklady fluorescenčních barviv používaných v buněčné biologii.

Fluorochrom	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
4',6-diamino-2-fenylindol (DAPI)	358	461
Fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)	492	516-525
Propidium jodid (PI)	535	617
Hoechst-33258	350	450

## Buněčné kultury

V současné době patří buněčné kultury mezi základní nástroje používané jak v základním, tak i aplikovaném výzkumu. Využívají se jako biologický model pro experimentální práci, vývoj léčiv, pro výrobu monoklonálních protilátek a dalších molekul. Řadu linií lze snadno kultivovat a představují dobře charakterizovaný homogenní materiál dostupný v dostatečném množství pro experimentální práci.

Pro úspěšnou kultivaci buněk musí být splněny podmínky prostředí podobné prostředí *in vivo*, které zajišťují kultivační média a inkubátory. Kultivační médium musí obsahovat vyvážený poměr aminokyselin, cukrů, vitamínů, solí, mastných kyselin, antibiotik a stabilizátorů pH, které jsou nezbytné pro růst buněk. Po určité době buňky v kultuře vyčerpají živiny z média či jejich počet stoupne na neúnosnou míru, proto je nutné část buněk odebrat, smísit s novým médiem a přenést do nové kultivační láhve (tzv. pasážování buněk).

Práce s buněčnými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení a manipulaci. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility, proto je nutno pracovat v aseptickém prostředí, které zabraňuje kontaminaci mikroorganismy (bakterie, viry, houby, paraziti,...). Sterilního prostředí je dosaženo používáním laminárních boxů neboli flowboxů s horizontálním nebo vertikálním prouděním sterilního vzduchu, používáním sterilních nástrojů, pomůcek, roztoků a nádob, a také rozdělením pracovišť na septickou a aseptickou část, dezinfekcí a používáním ochranných pomůcek. Nejjednodušším způsobem, jak vysterilizovat drobnější kovové či skleněné předměty (pinzety), je opláchnutí předmětu 70% ethanolem a následné opálení nad lihovým kahanem. Kromě toho existuje celá řada různých sterilizátorů: parní - autoklávy, horkovzdušné, chemické, radiační. Pro práci v aseptickém prostředí se zásadně doporučuje nošení laboratorního oblečení a gumových rukavic, které se navíc po navléknutí omyjí 70% ethanolem.

### **Úkol č. 1: Barvení jádra Feulgenovou reakcí**

Materiál: naklíčená čočka jedlá (*Lens esculenta*)

Chemikálie: Framerova fixační směs (96% ethanol:koncentrovaná kyselina octová, 3:1), 1M HCl, Schiffovo reagens

Pomůcky: termoblok, kádinky, pinzeta, skalpel, světelný mikroskop + mikroskopické pomůcky

Postup:

1. Z předem naklíčené čočky (3-4 dny) vypreparujte pomocí skalpelu kořínky.
2. Kořínky přeneste do Framerovy fixační směsi a fixujte po dobu 24 h.  
*Provedeno vedoucím cvičení.*
3. Opláchněte kořínky 3x v destilované vodě.
4. Přeneste kořínky do 1M HCl a hydrolyzujte po dobu 30 min při 60 °C.
5. Hydrolýzu zastavte oplachem kořínků 3x v destilované vodě.
6. Kořínky přeneste do Schiffova reagens a inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě.
7. Vypreparujte z kořínku obarvenou kořenovou špičku, vložte do kapky Schiffova reagens na podložním sklíčku, přikryjte krycím sklíčkem a proveďte roztlak.
8. Preparát pozorujte pod mikroskopem a určete jednotlivé fáze mitózy.

## **Úkol č. 2: Pasážování adherentní nádorové linie**

Materiál: buněčná kultura adherentní nádorové linie HeLa

Chemikálie: kultivační médium DMEM s přídavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu, penicilinu a L-glutaminu; EDTA, trypsin/EDTA, 70% ethanol

Pomůcky: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu + sada sterilních pomůcek pro práci ve flowboxu, inverzní světelný mikroskop, Petriho misky, zkumavky

Postup:

1. Před začátkem práce ve flowboxu je potřeba flowbox zapnout a vysterilizovat UV zářením po dobu přibližně 15 min. *Provedeno vedoucím cvičení.*
2. Nasadte si gumové rukavice, otřete pracovní plochu 70% ethanolem a stejně tak rukavice. Při práci nikdy nepohybujeme rukama či nesterilními pomůckami nad sterilními předměty, otevřenými nádobami apod. Sterilními špičkami nebo pipetami se nedotýkáme ničeho nesterilního.
3. Přeneste Petriho misku s HeLa buňkami z inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) do flowboxu.
4. Pasteurovou pipetou odsajte staré kultivační médium.
5. Poté napipetujte skleněnou pipetou 1 ml EDTA po stěně Petriho misky tak, aby nedošlo k odlepení buněk ode dna kultivační nádoby. Opláchněte krouživými pohyby dno misky.
6. Pasteurovou pipetou odsajte roztok EDTA a přidejte 0,5 ml roztoku trypsin/EDTA.

7. Petriho misku přeneste do inkubátoru a inkubujte po dobu 3-5 min.
8. Jakmile se buňky odlepí ode dna kultivační nádoby, přeneste Petriho misku do flowboxu.
9. Opláchněte dno misky 3 ml čistého kultivačního média.
10. Přeneste na Petriho misku 1 ml (25 %) buněčné suspenze.
11. Doplněte 4 ml čistého kultivačního média na celkový objem 5 ml média.
12. Petriho misku se spasážívanými buňkami vložte zpět do inkubátoru.

### **Otázky:**

1. Jak se nazývá první buněčná kultura odvozená z lidské tkáně? Kdy a z čeho byla odvozena? Používá se dodnes?
2. Jak se liší inverzní mikroskop od klasického světelného mikroskopu? Proč se využívá k pozorování buněčných kultur v kultivačních nádobách?
3. Popište jednotlivé fáze mitózy.

### **Použitá literatura:**

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

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

AescuLab – systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-203: Práce v aseptickém prostředí.