



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice
Czech Republic

www.frov.jcu.cz

Laboratoř zárodečných buněk

Ing. Roman Franěk, Ph. D.

Ing. Michaela Vazačová

Mgr. Zuzana Havlíková, Ph. D.

Embryonální vývoj ryb a zárodečných buněk

Ema Jílková, Anna Kašáková, Zdeněk Bjaček,
Eliška Bžochová, Zuzana Bačová, Daniel Jirka



Danio pruhované

- *Danio rerio*
- „Zebříčka pruhovaná“
- Asie, Indie
- Modelový organismus
- Dosahuje dospělosti kolem třetího měsíce věku
- PGC – Primordiální zárodečné buňky

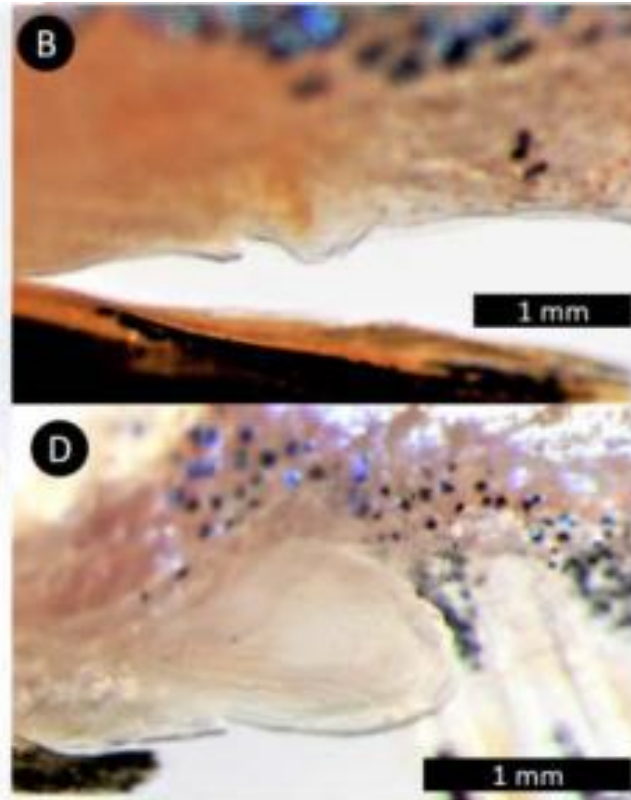
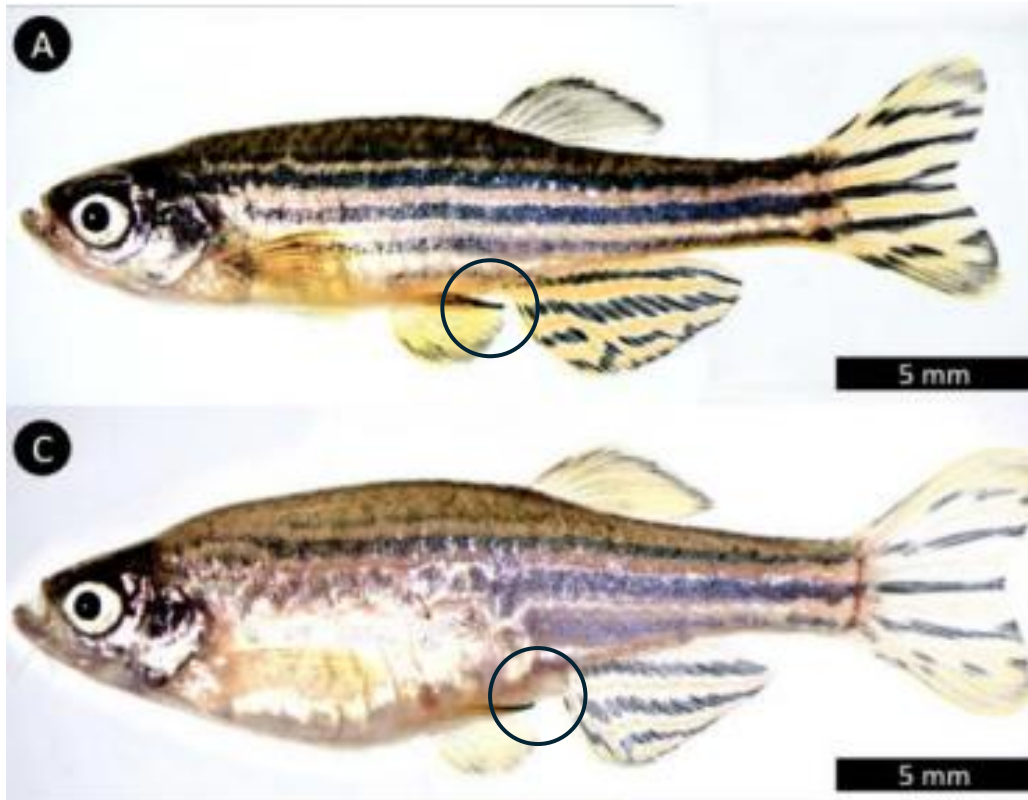




Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Rozlišení pohlaví



Zdroj: FROV JUNI



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Poloměřlý výtěr dánia pruhovaného ve vytíracích nádobách (*in vivo*)

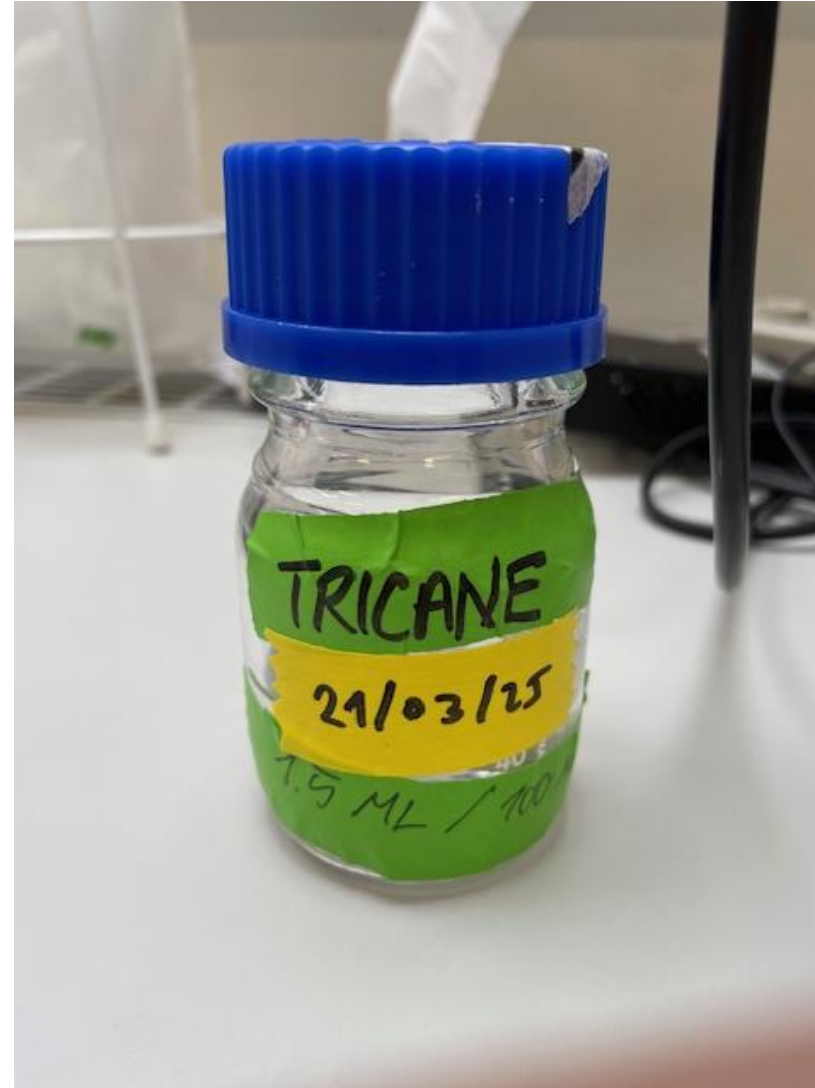




Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Uspání – umělý výtěr





Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Umělý výtěr (*in vitro*)

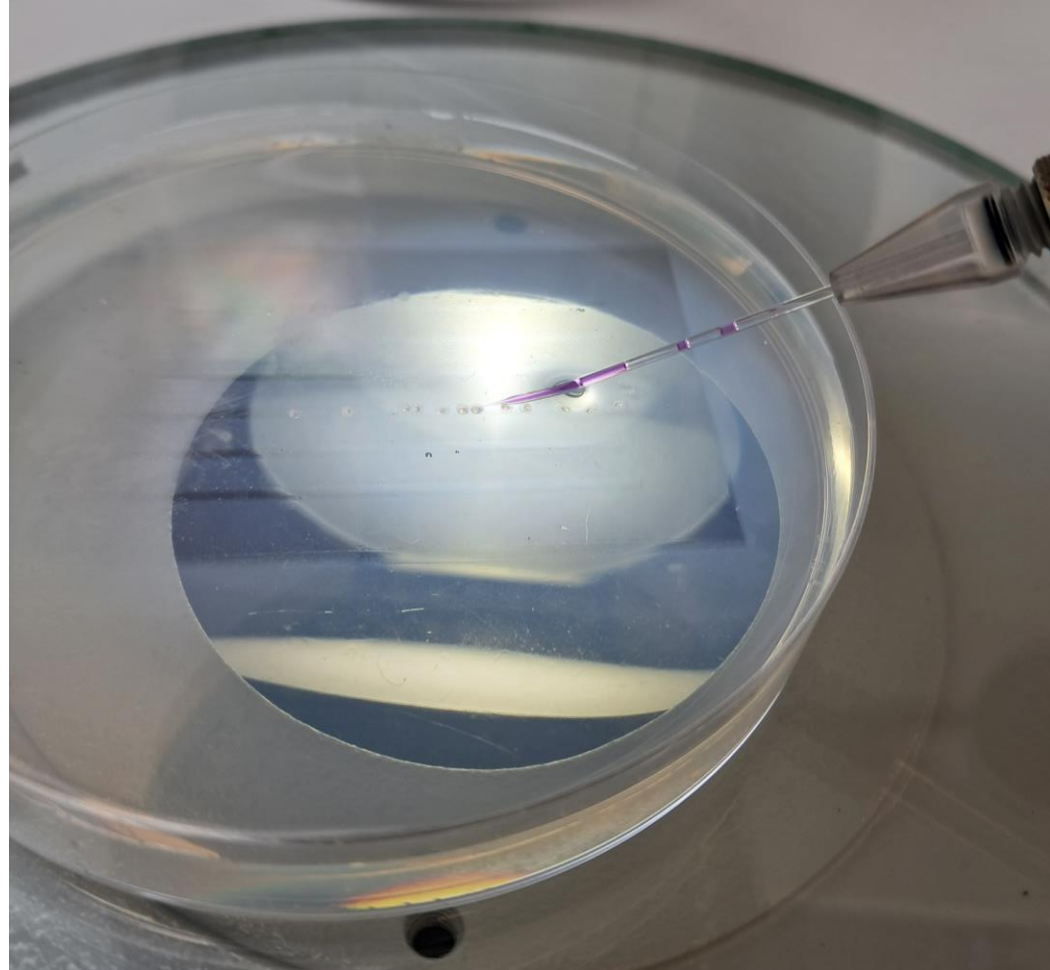
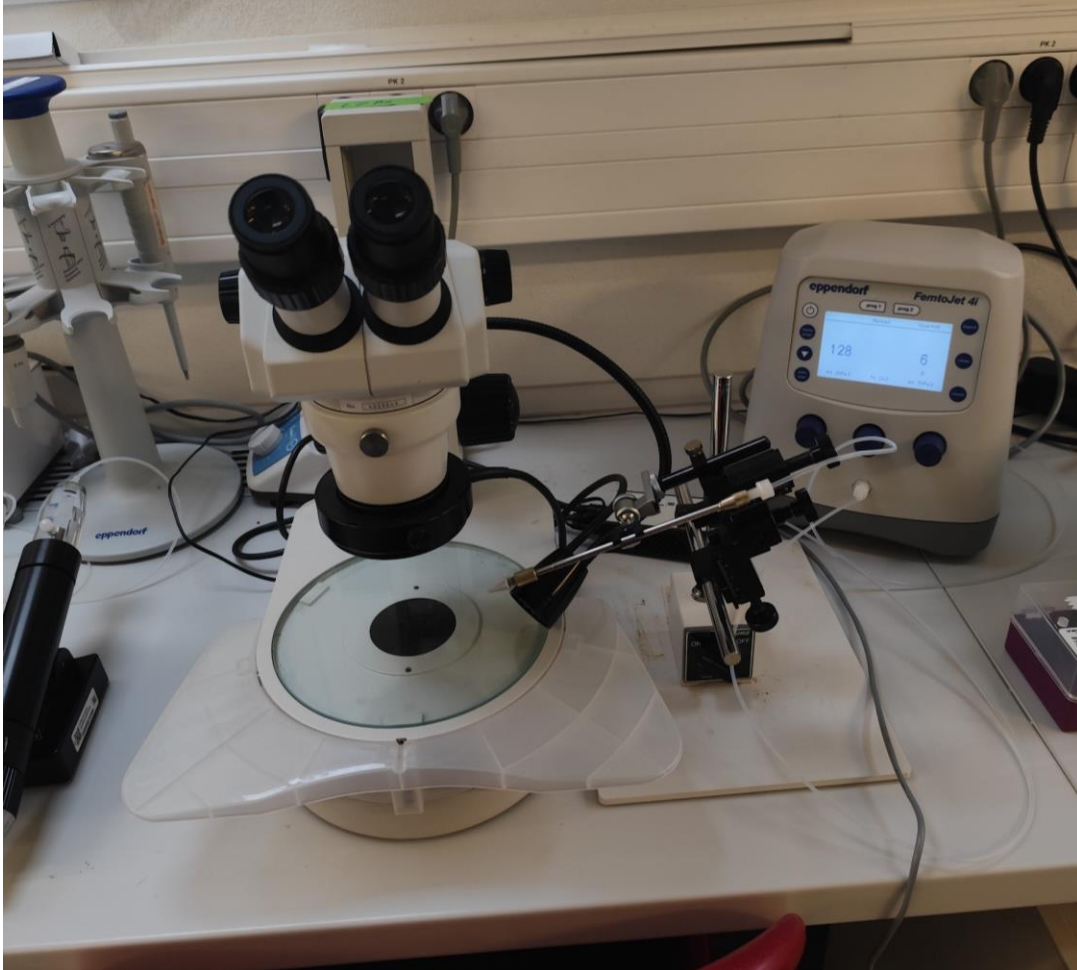




Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Mikroinjikace fluorescenční látky do embryí



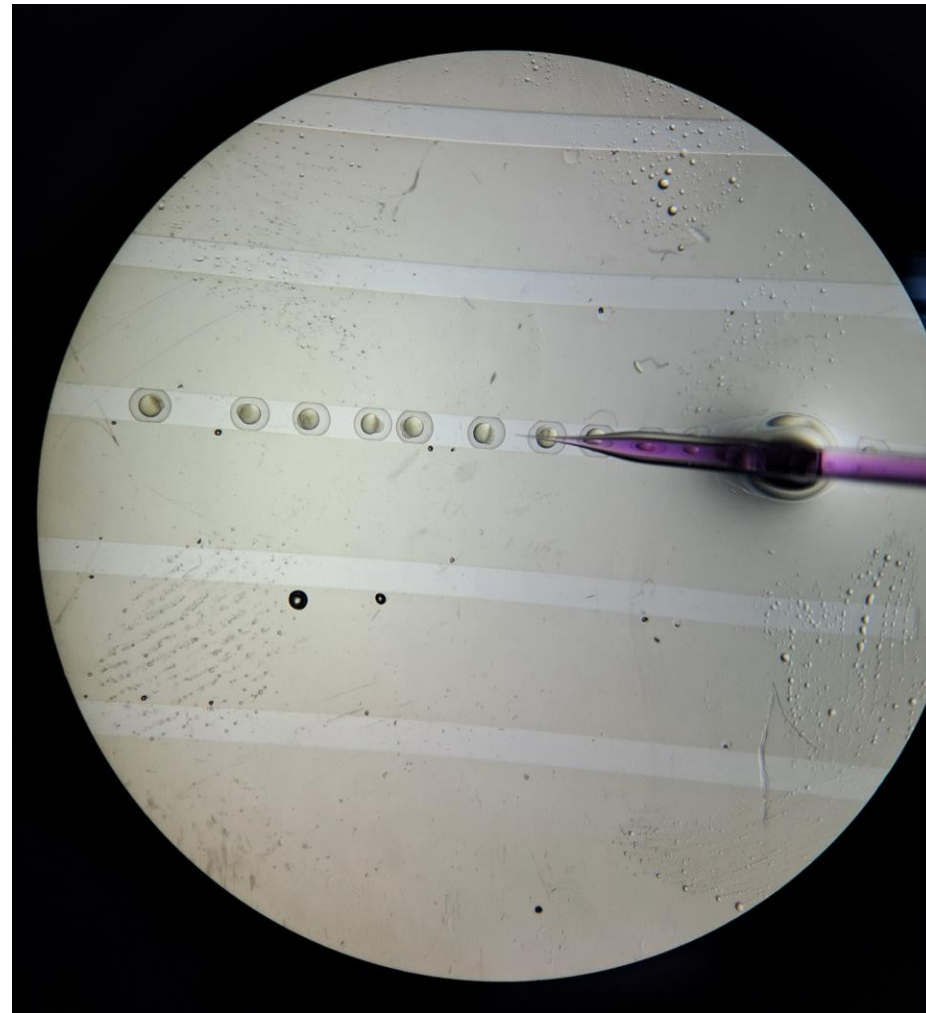
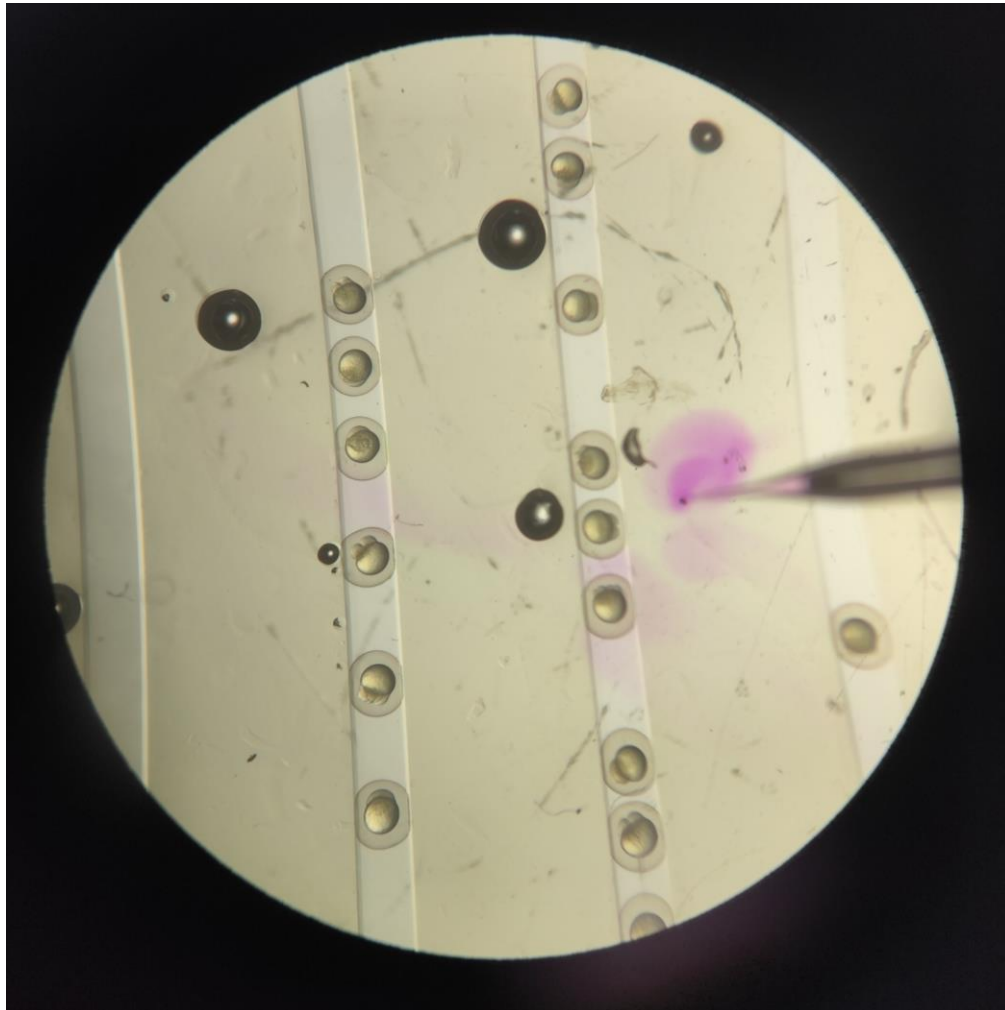
rhodamin



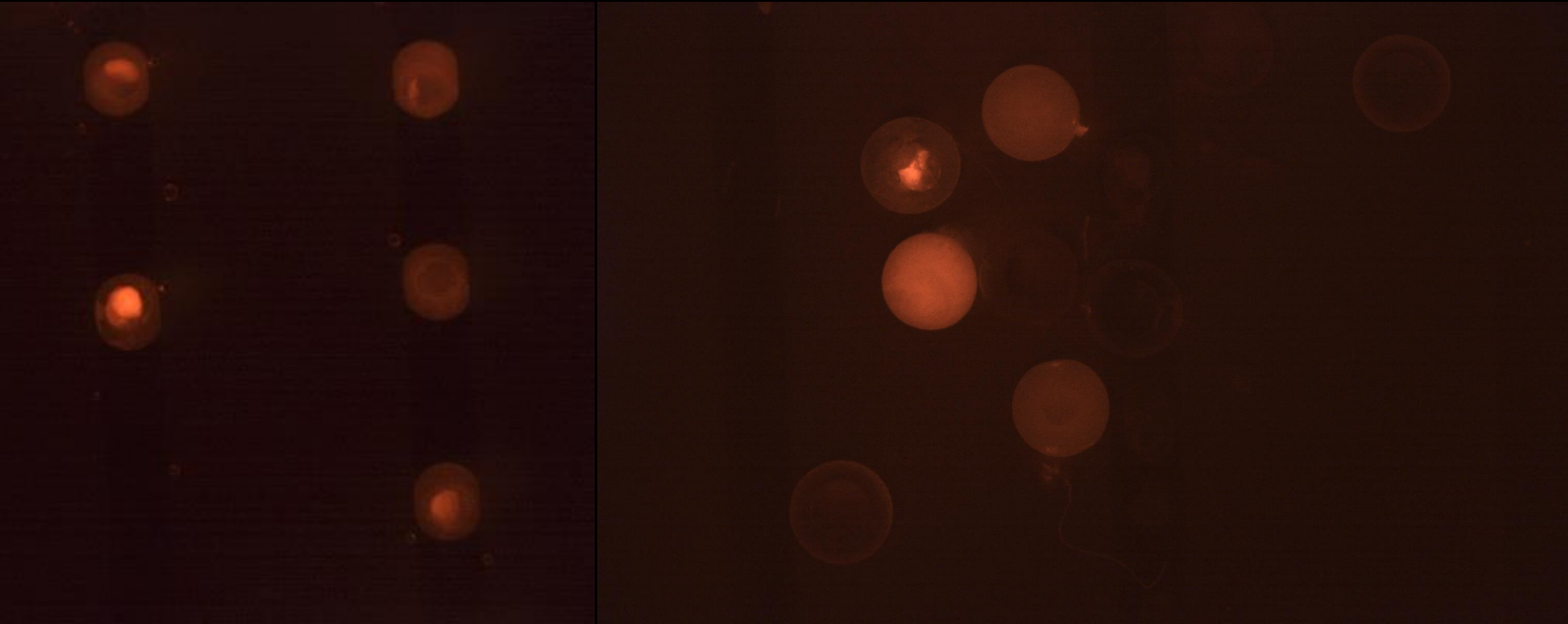
Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

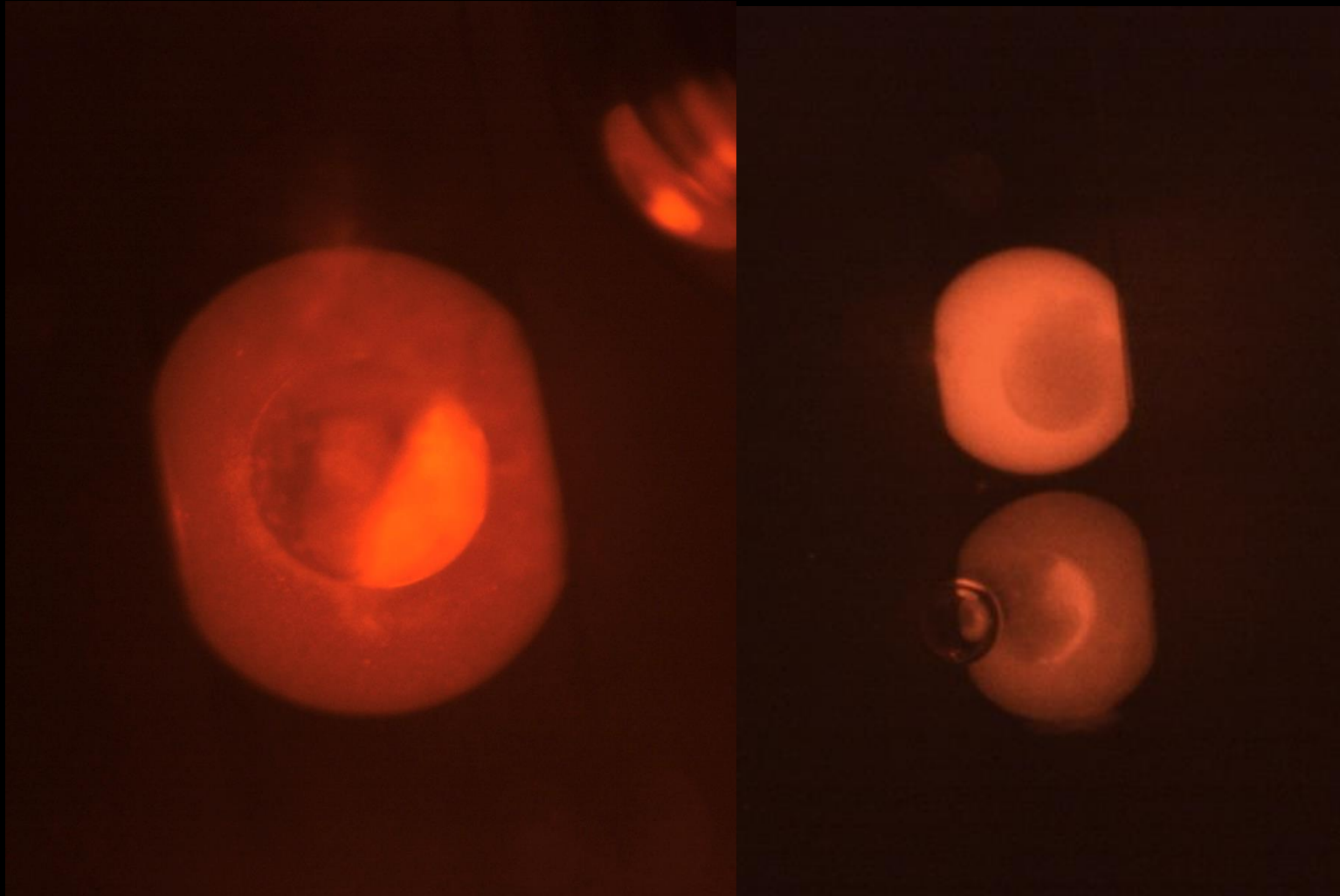
Mikroinjikace fluorescenční tekutiny do embryí

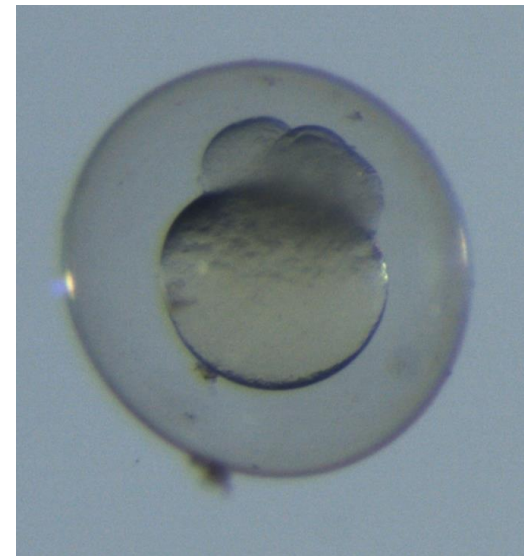
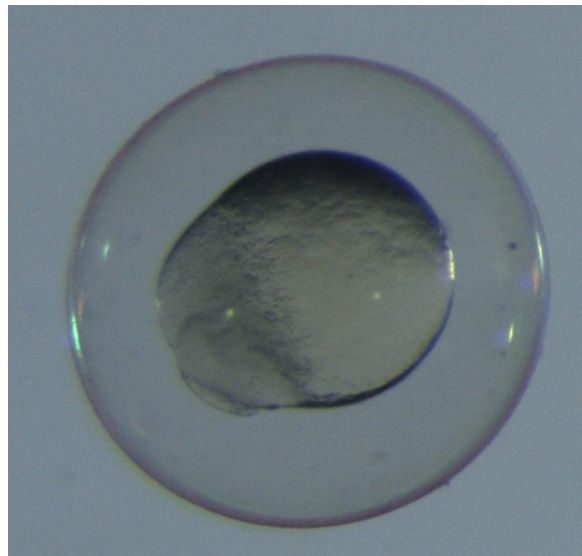
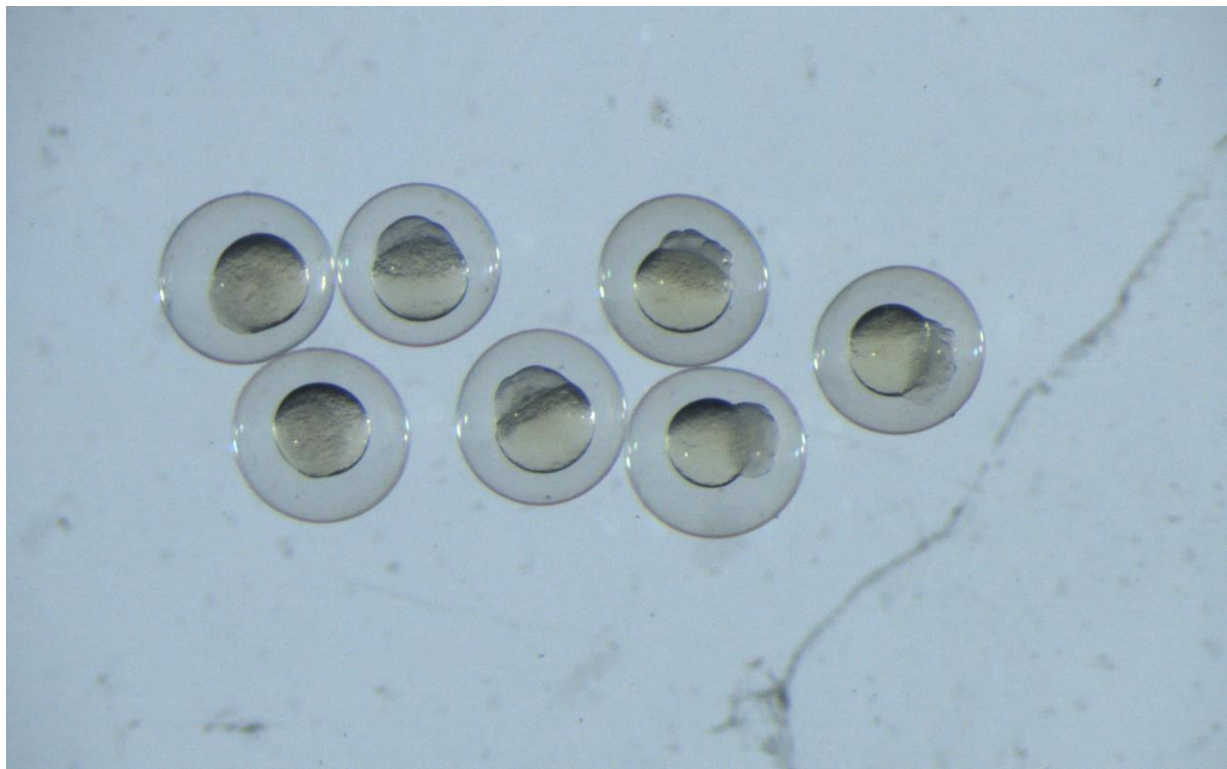


Obarvená embrya ve fluorescenčním mikroskopu

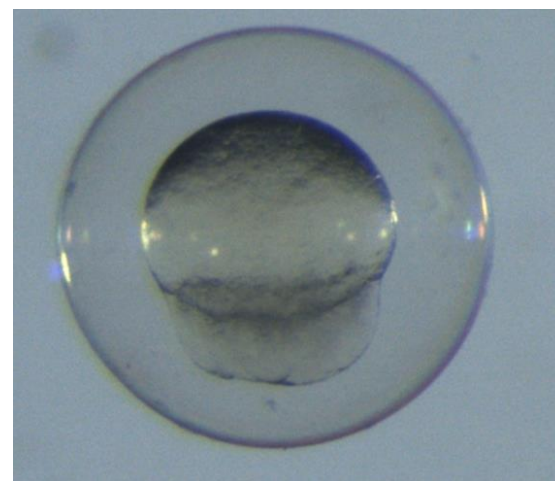


Obarvená embrya ve fluorescenčním mikroskopu





8 buněk

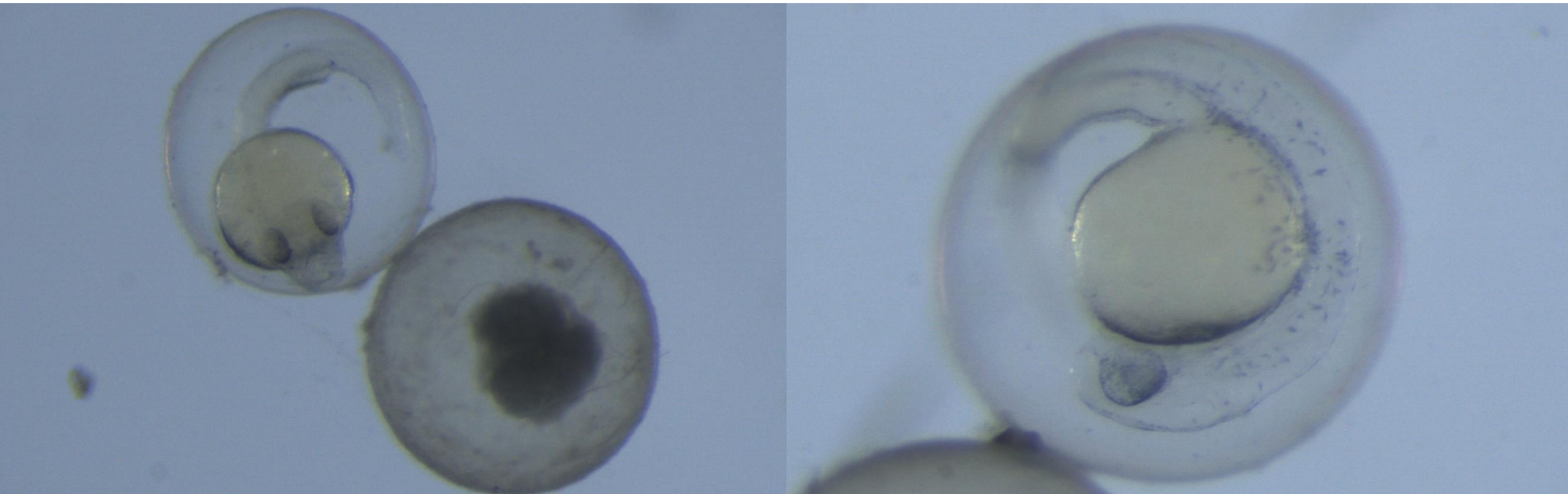


16 buněk



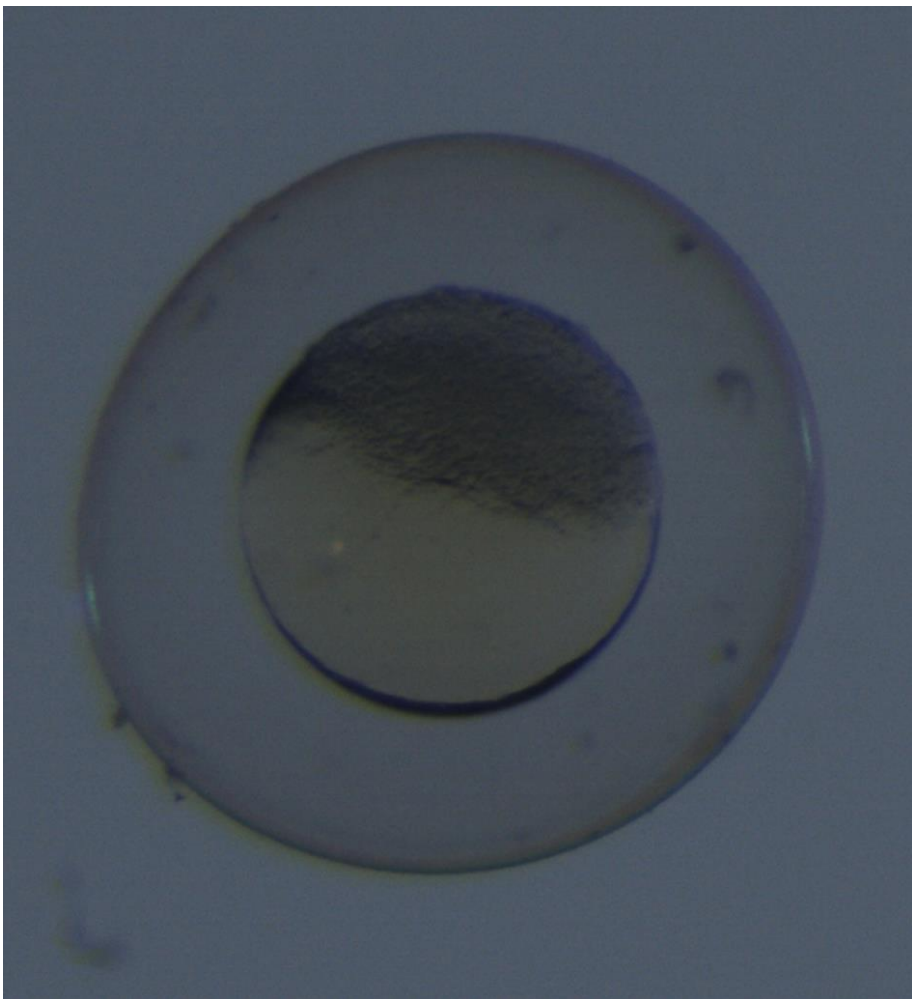
Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

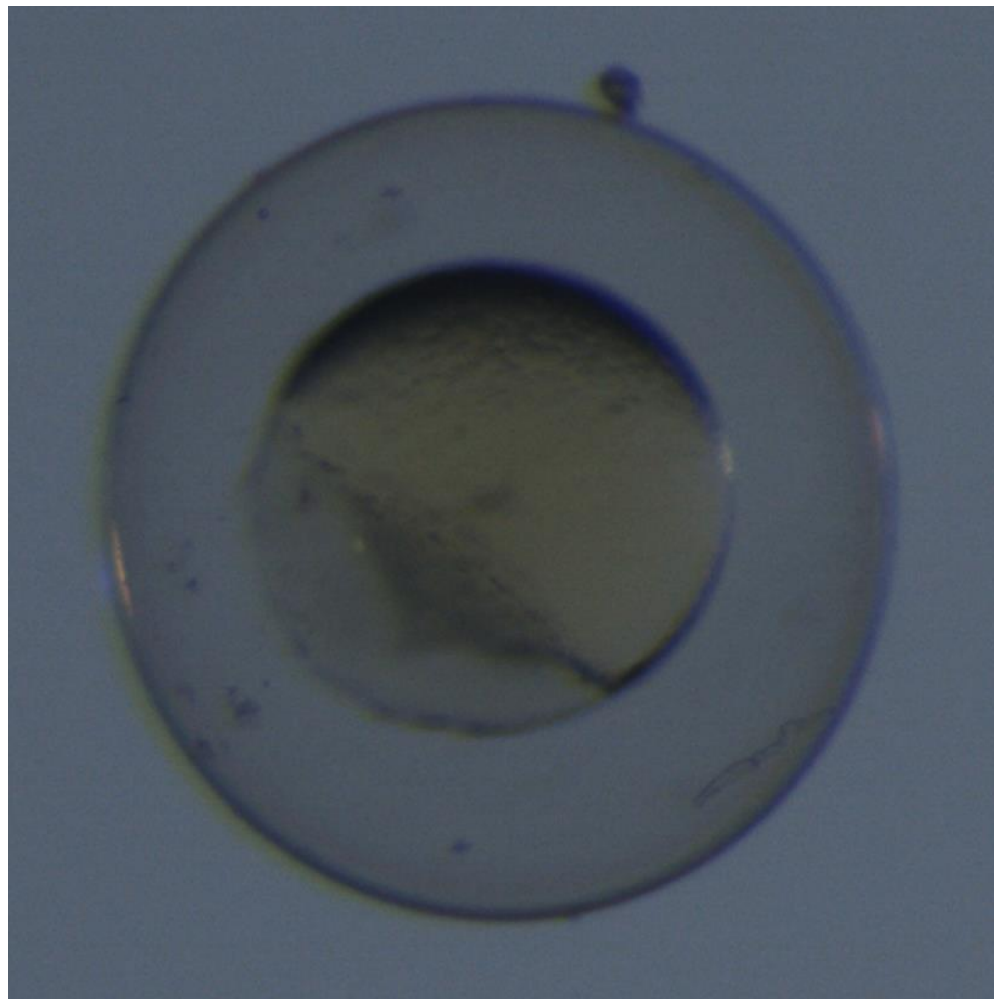




Embryo, které se vyvíjí, viditelné buňky



Embryo, které se nevyvíjí, nedošlo k dělení buněk

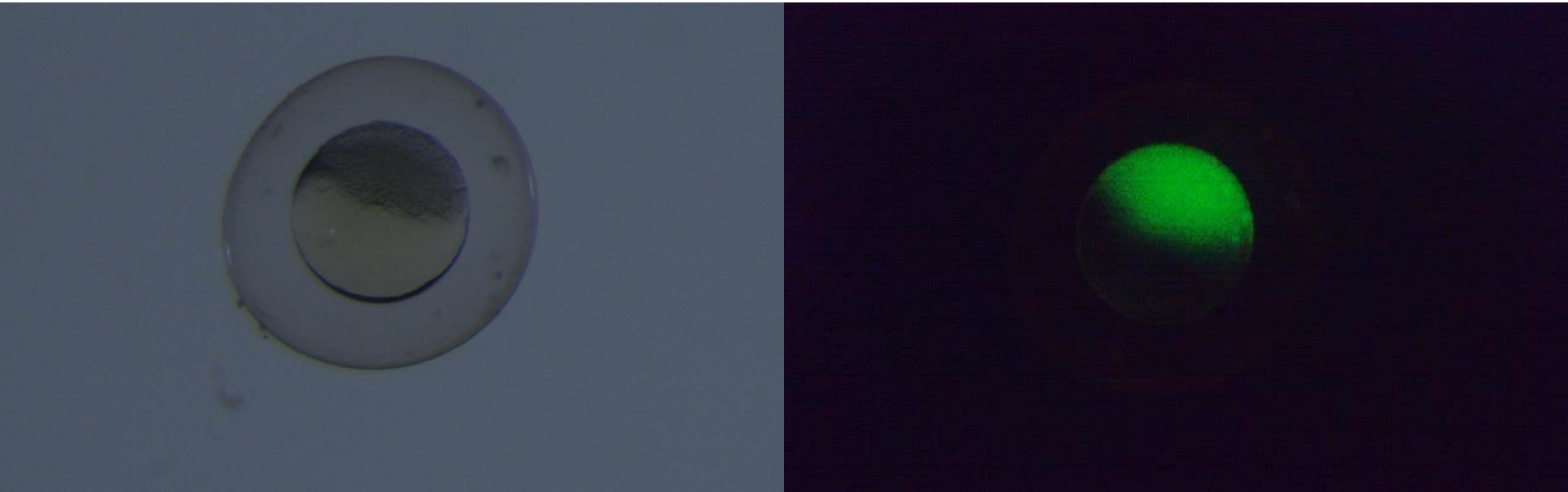




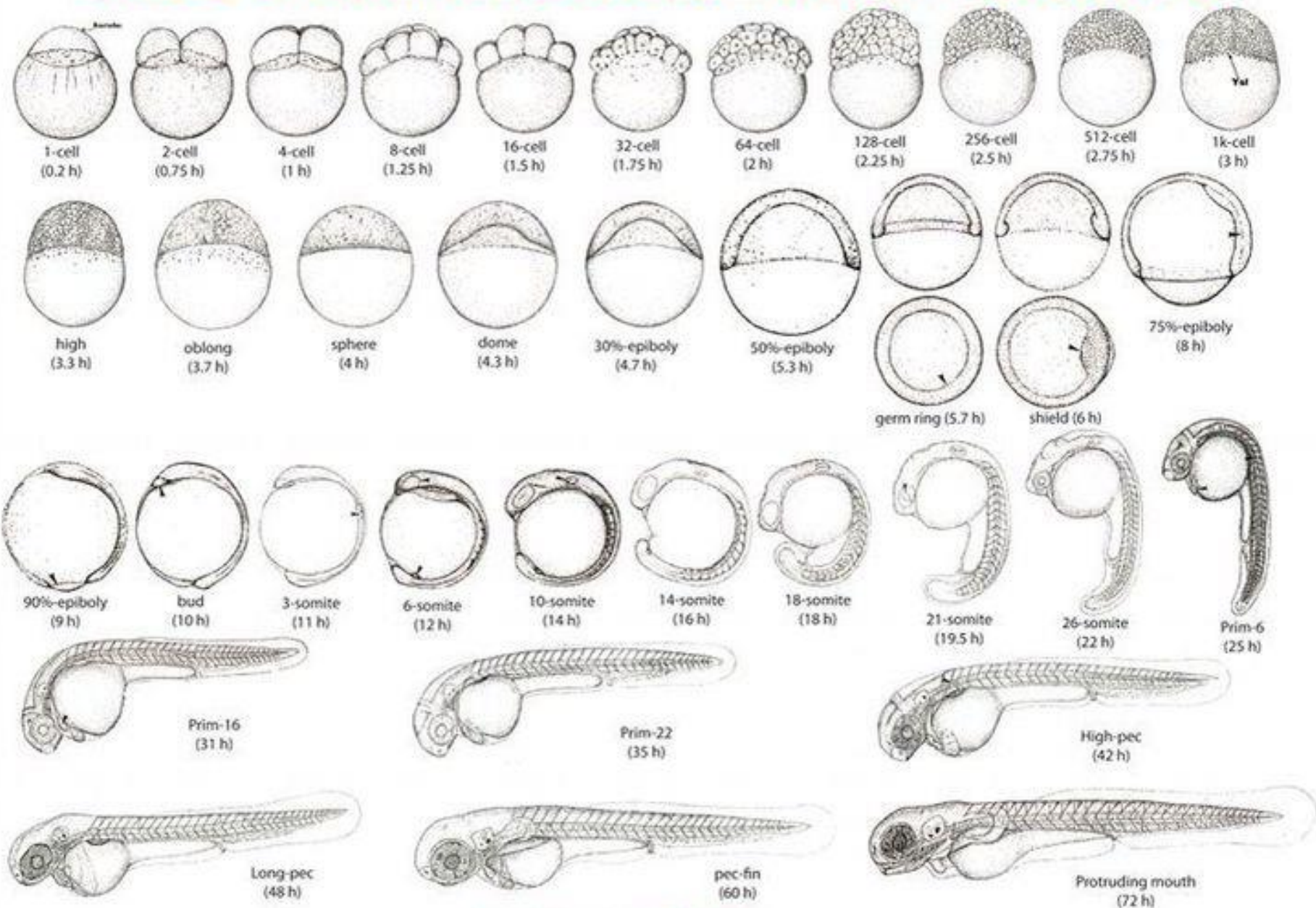
Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

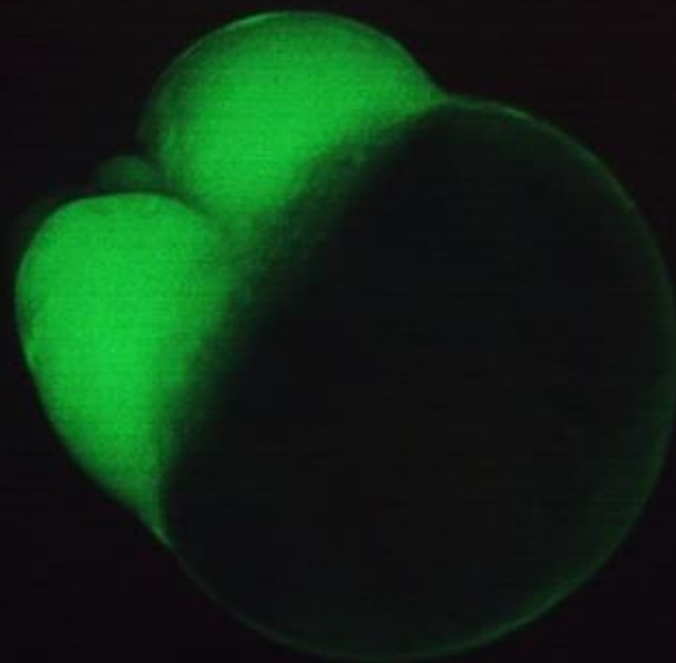
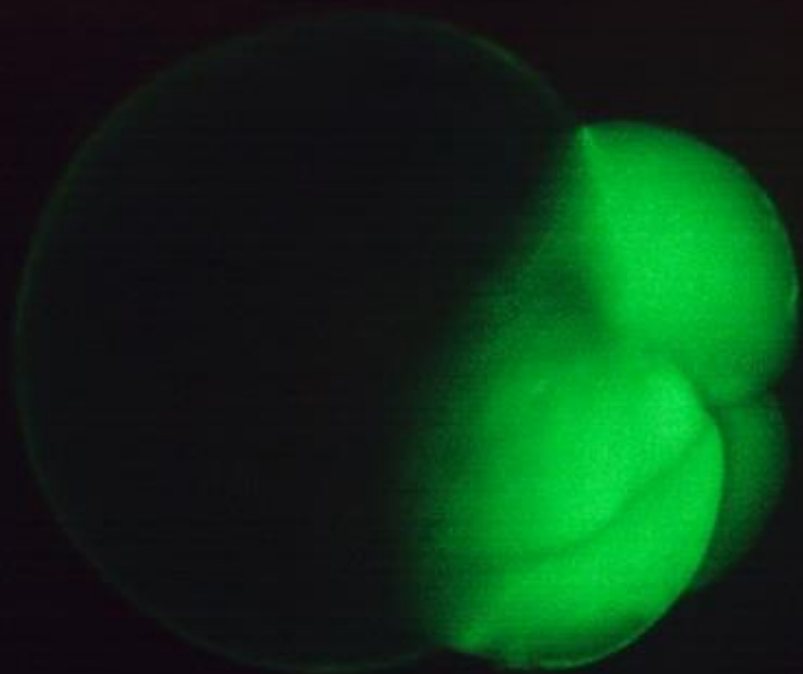
Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Embryogeneze

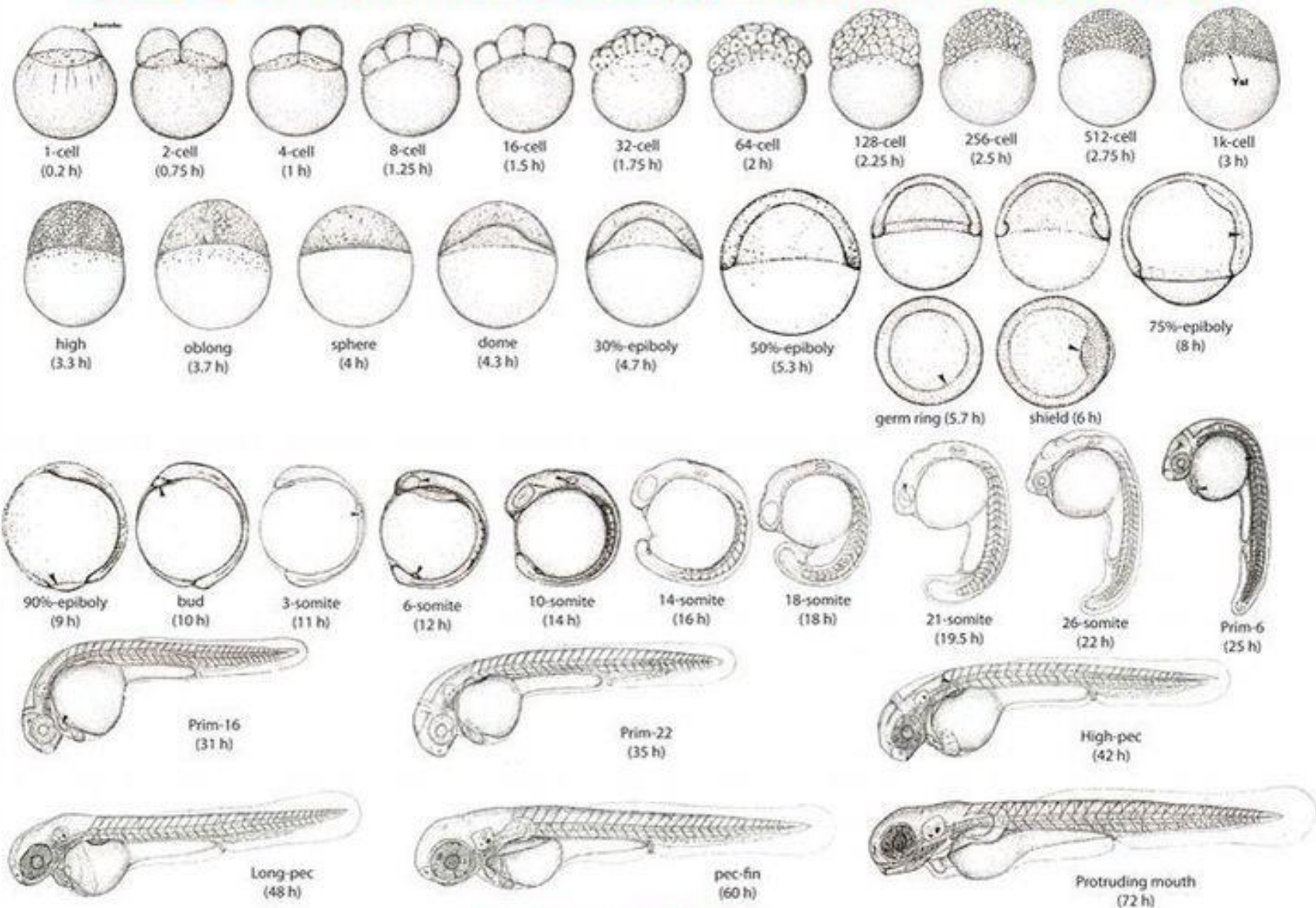


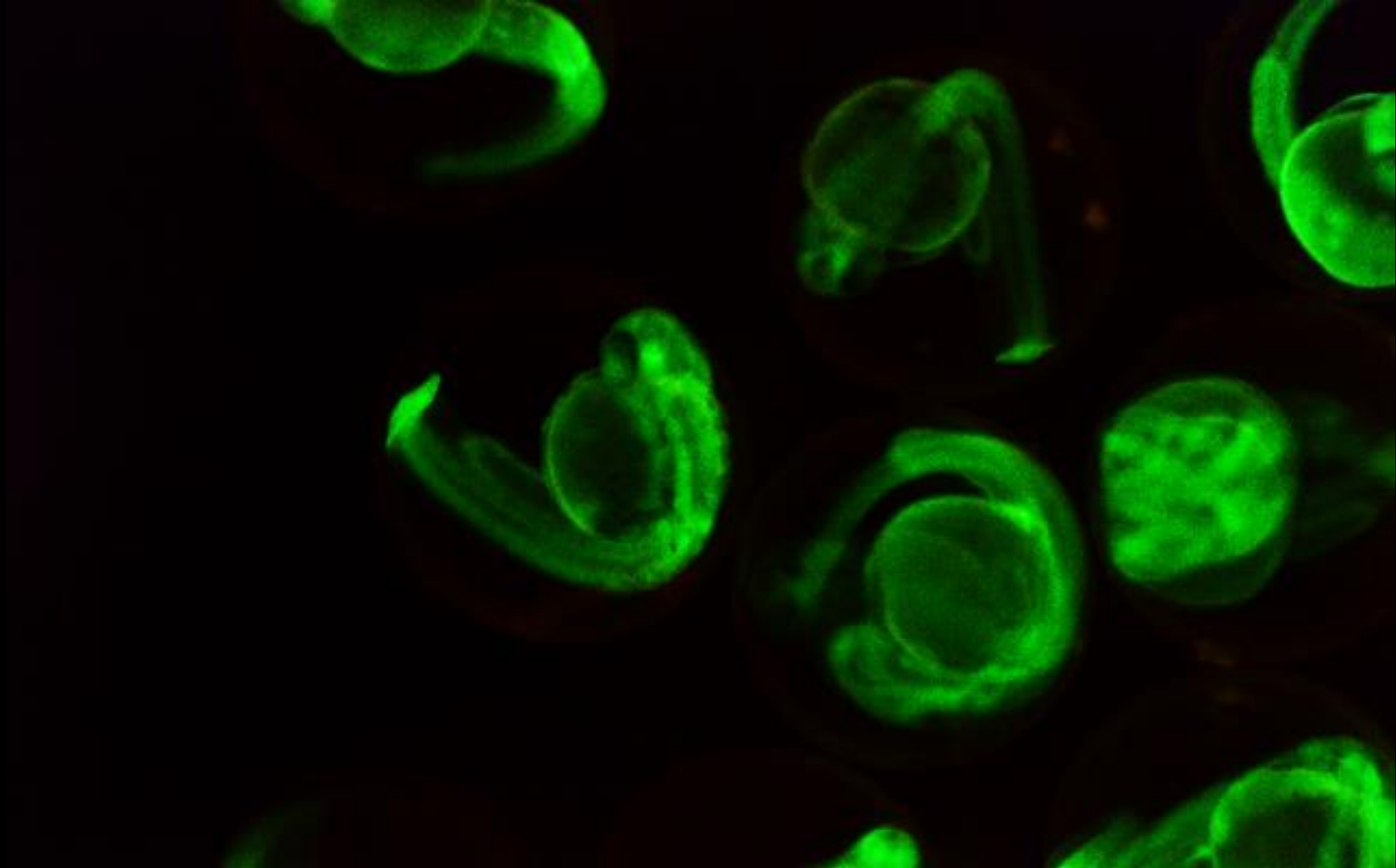
STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE ZEBRAFISH

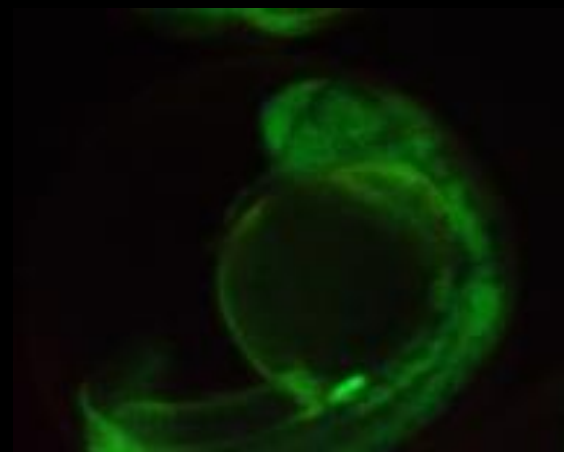
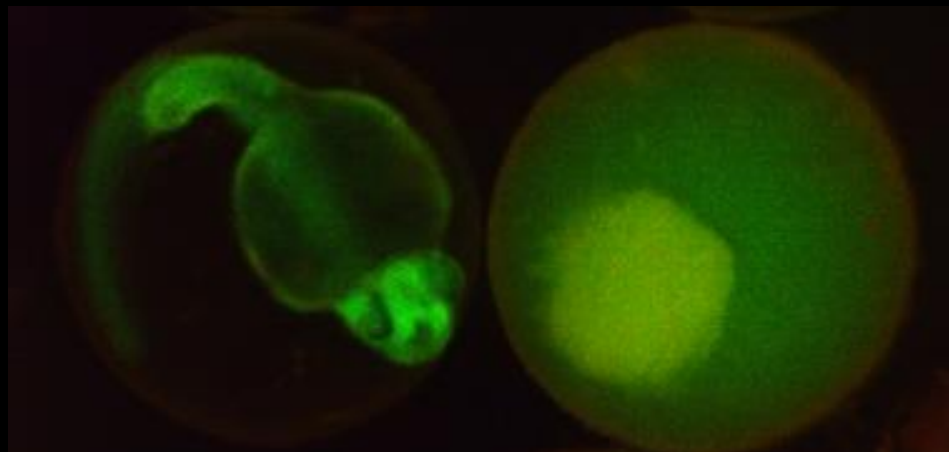




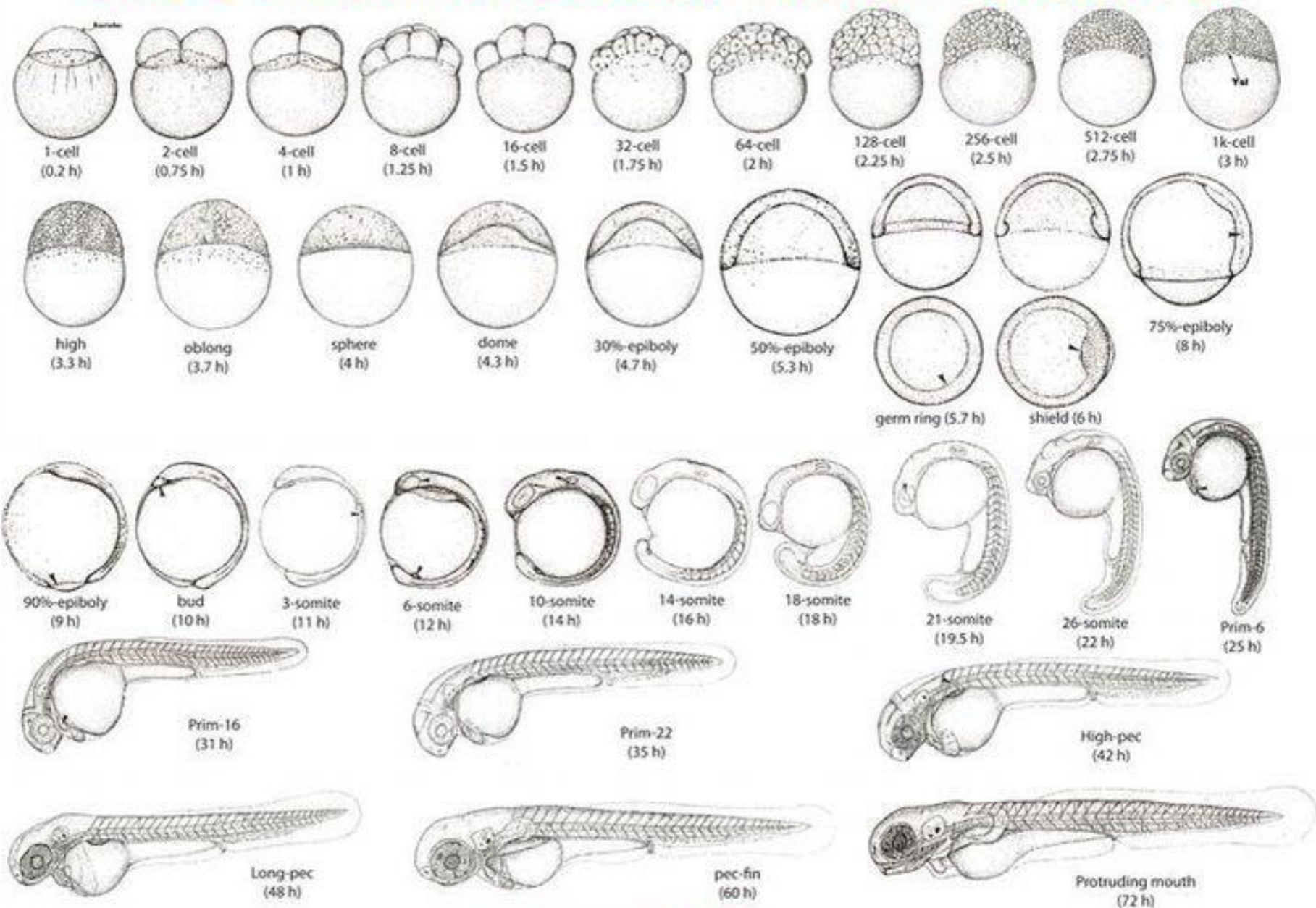
STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE ZEBRAFISH

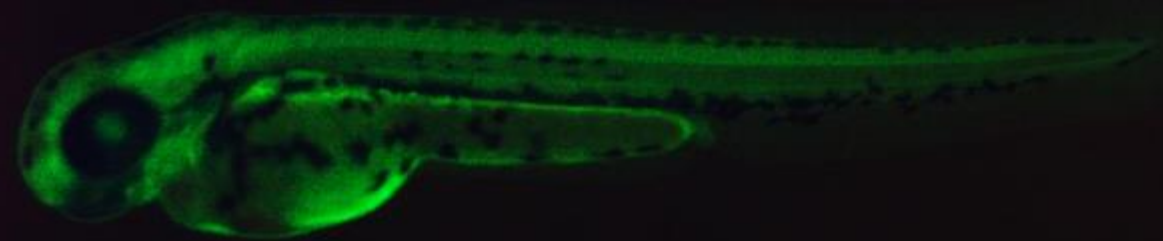
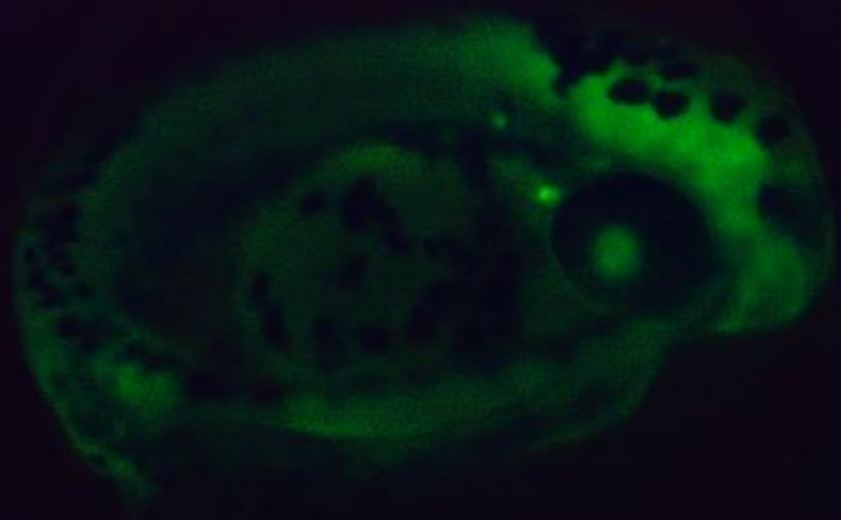






STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE ZEBRAFISH



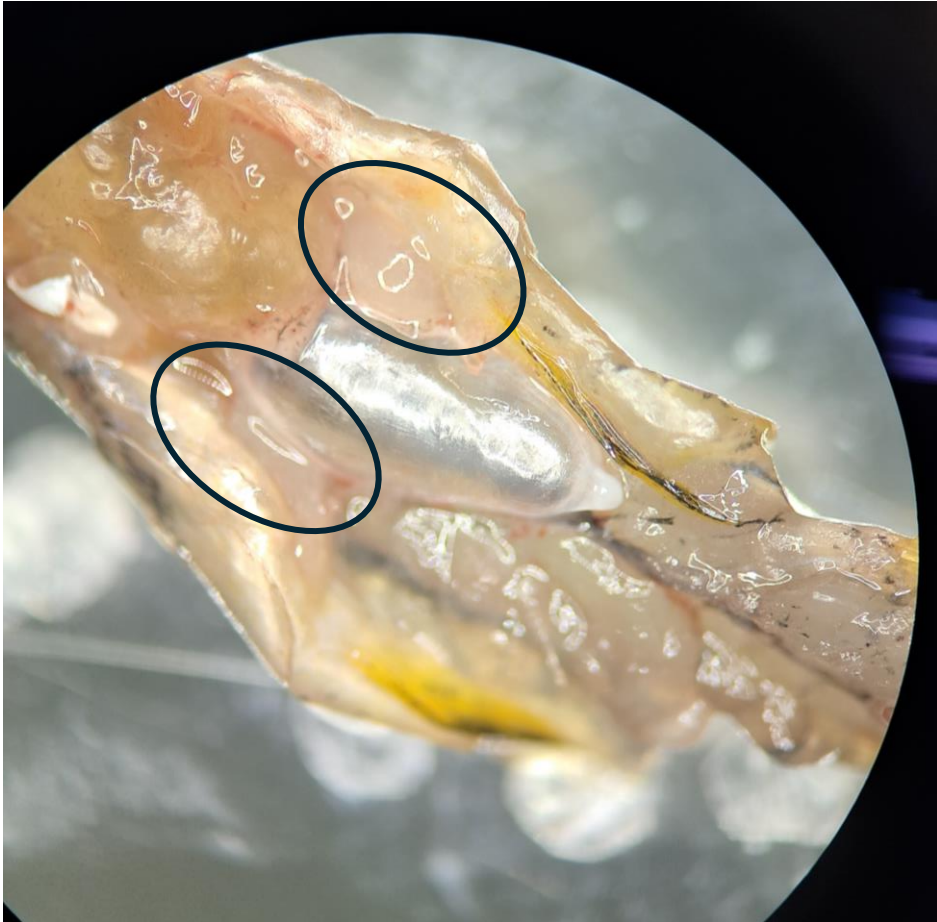




Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Pitva a preparace testes nebo ovarií



Testes



Ovaria



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

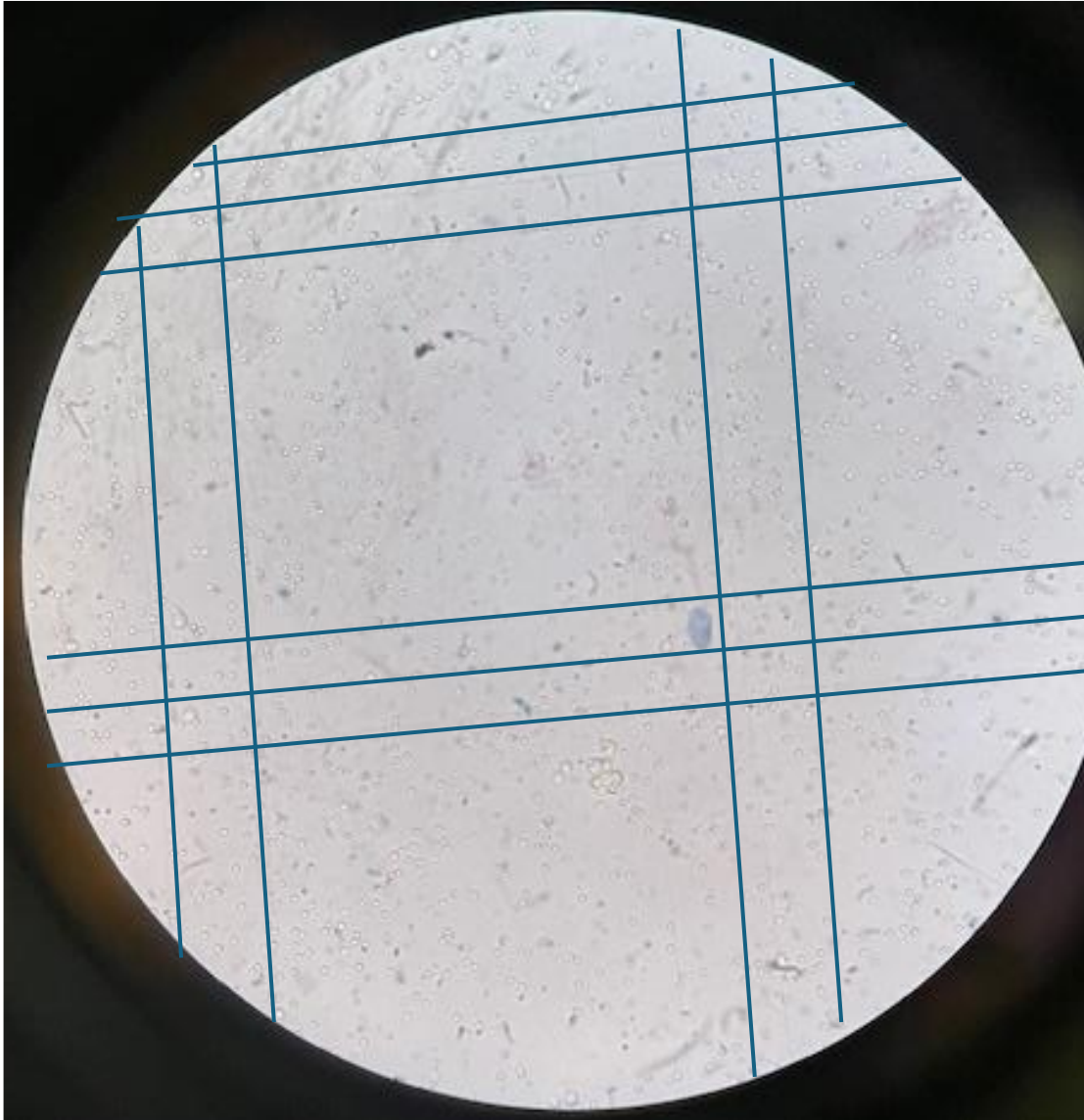
Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Oddělení buněk od tkání pomocí mikrofiltru





Počítání živých PGC



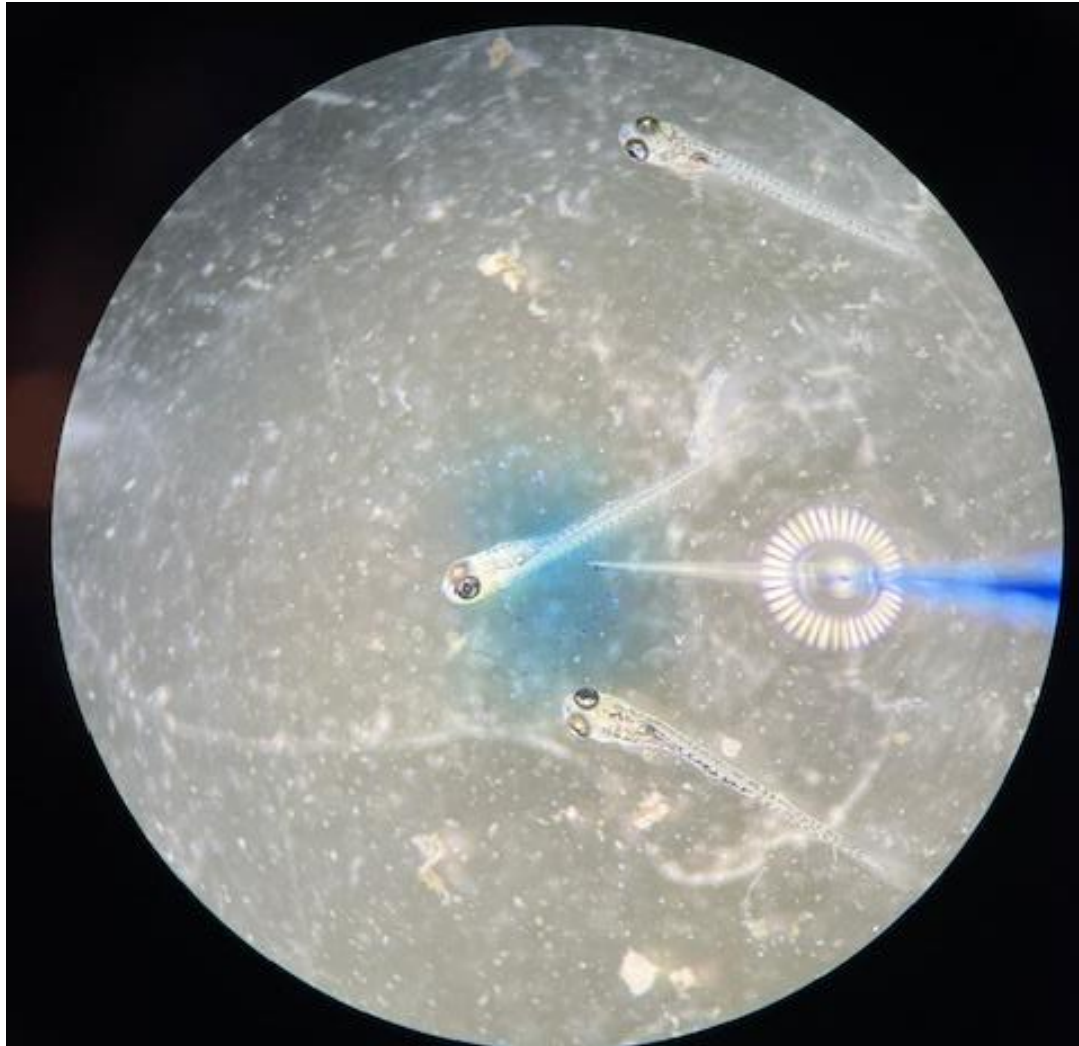
- Počet buněk ve 24 čtvercích
- Zjištění koncentrace
- Možnost ředění



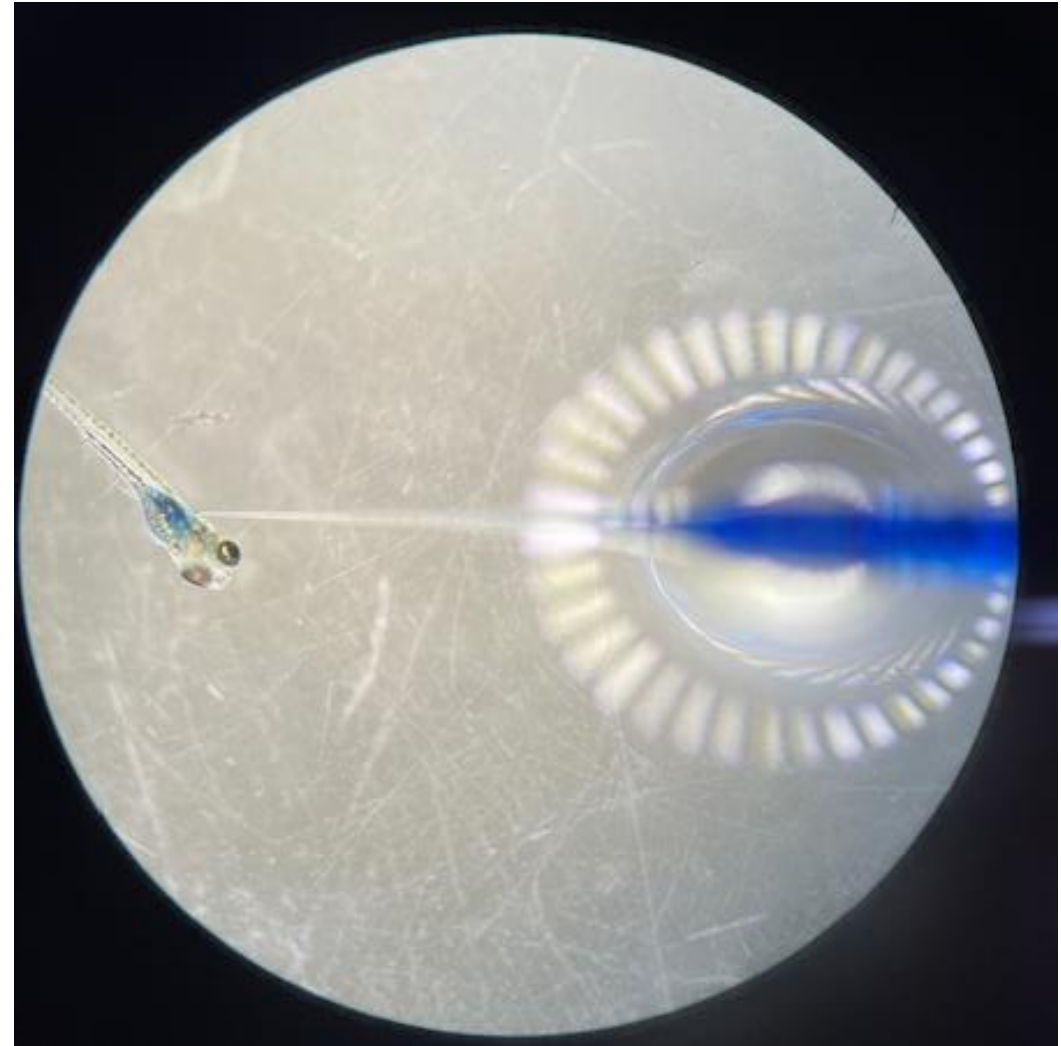
Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Mikroinjikace PGC do larev



Methylene blue





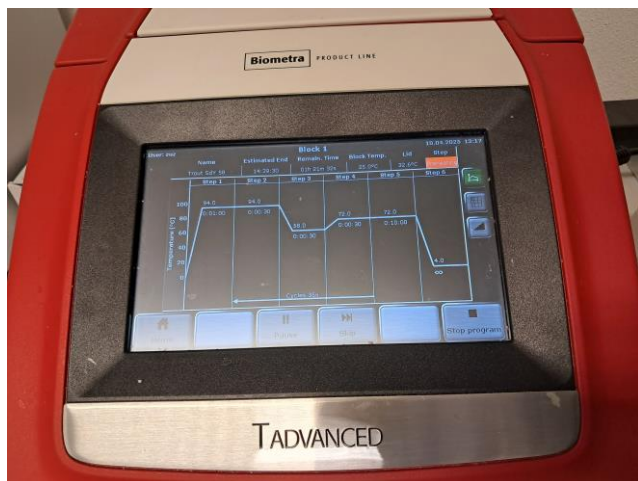
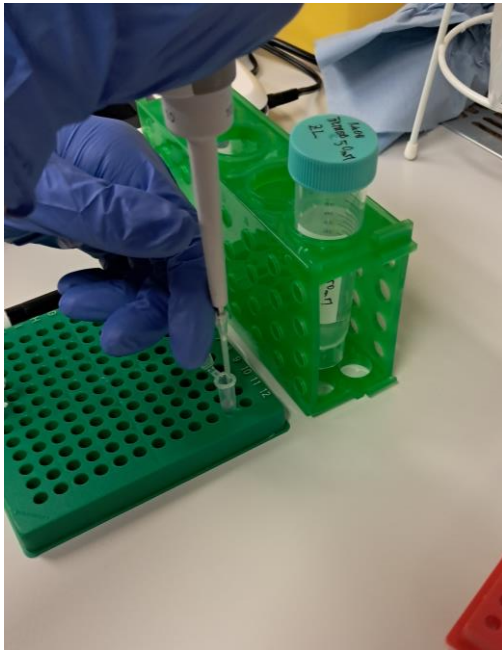
Izolace DNA metodou HOT SHOT



- NaOH (hydroxid sodný)
- Ustříhnout kousek ploutvičky
- PCR cyclor program HOT SHOT, 95°C na 10 minut
- Tris-HCl (kyselina chlorovodíková)



PCR



- PCR H2O
- Primer F a R
(oligonukleotidy)
- PPP Master Mix
- Vzorek
- Přístroj PCR cyclor
program Trout SdY 58
- Vzorky na 1% agarosvý gel
- Samec band, samice nic

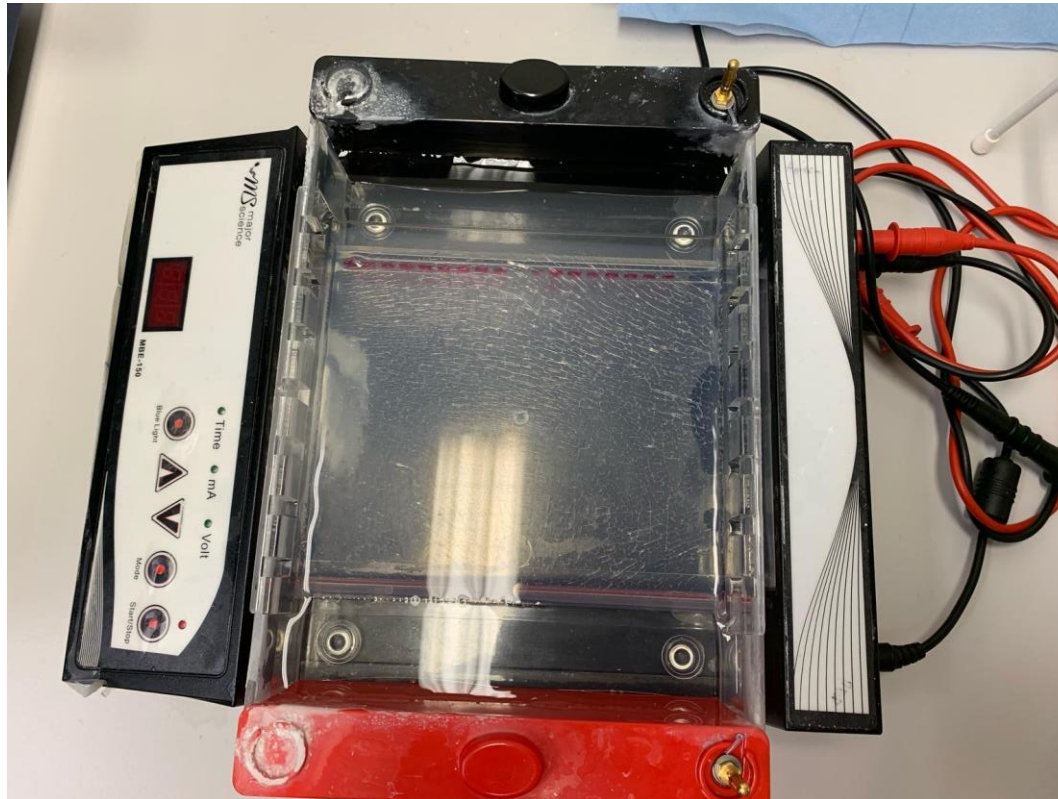


Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

ELFO

- Separace molekul podle velikosti
- Migrace DNA (-) $\rightarrow$ (+)
- Zobrazení výsledku pod UV
- Ladder





Příprava ELFO

- Agar
- TBE (=Tris/kys. boritá/EDTA) – pufr
- Barvivo Goldview (ethidium bromid), DNA
- Nosič do ELFO vany s TBE
- Pipetace vzorků
- ELFO 120 V 45 minut



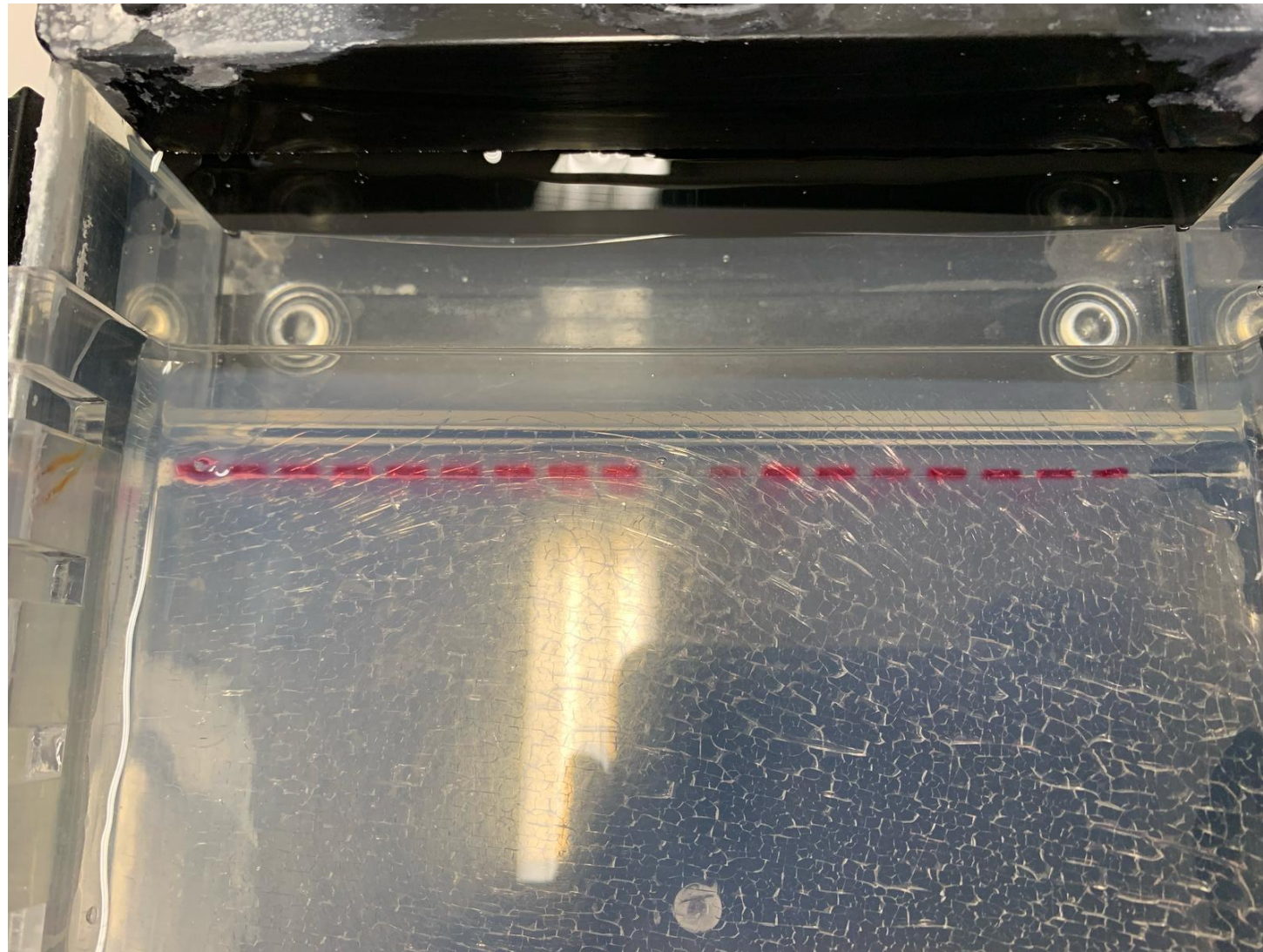


Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Výsledky ELFO

- 2 kontroly pro každé pohlaví
- 4 vlastní vzorky
- Ladder
- SDY primery -> viditelné bandy samci





Výsledky ELFO

- 1 samice
- 2 samec
- 3 samce
- 4 samec
- 5
- 6
- 7
- 8
- L kontrolní žebřík
- 9 samice
- 10 samec
- 11 samice
- 12 samec
- 13
- 14
- 15
- 16





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Výsledky ELFO

- 1 samice
- 2 samec
- 3 samce
- 4 samec
- 5 samec
- 6 samec
- 7 samice
- 8 samice
- L kontrolní žebřík
- 9 samice
- 10 samec
- 11 samice
- 12 samec
- 13 samec
- 14 samec
- 15 samice
- 16 samice



Děkujeme Vám za Vaší
pozornost!