

# Metody vývojové biologie - cvičení

-

## *Gallus gallus f. domestica* – kuřecí embryo



5. 4. 2024 – 3D modely/Detekce genové exprese

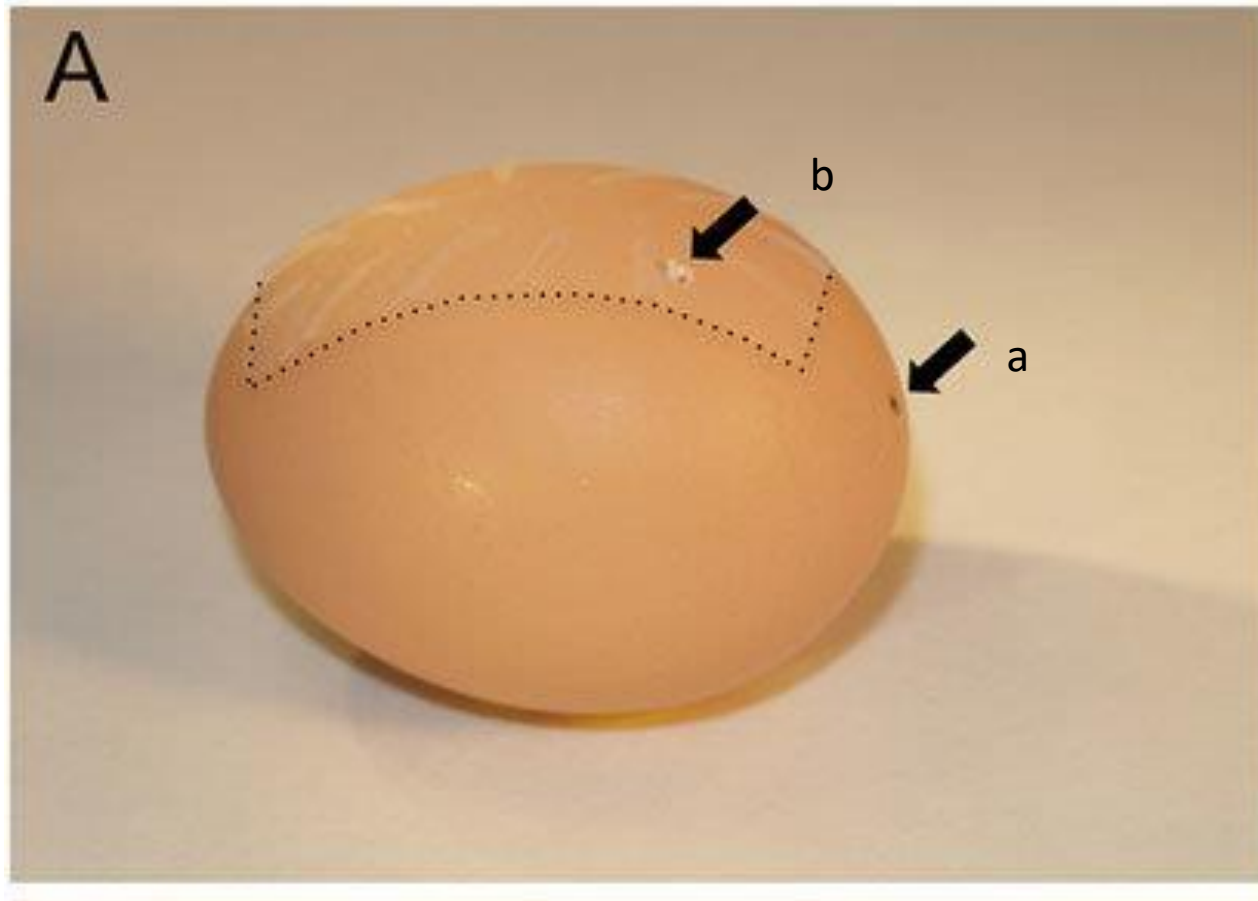
# 1. Část – tvorba 3D kultury

- Vstupní buněčný materiál – končetinové pupeny *Gallus gallus f. domestica* – kuřecí embryo

# Postup

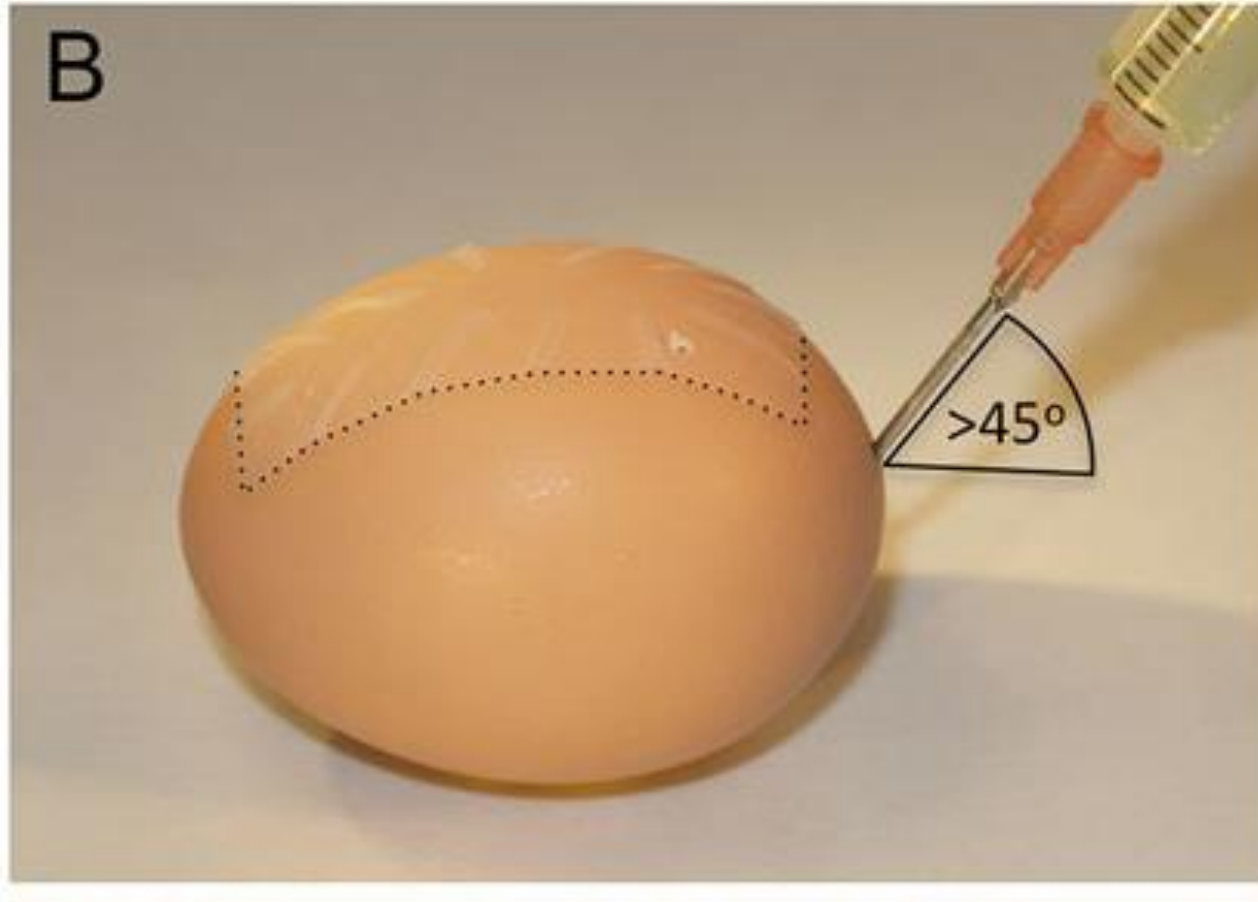
1. Otevření vajíčka
2. Odstranění embryonálních obalů
3. Určení orgánů a stádia podle Hamburgera a Hamiltona
4. Vyjmutí embrya z vajíčka
5. Oddělení končetinových pupenů

# 1. Otevírání vajíčka



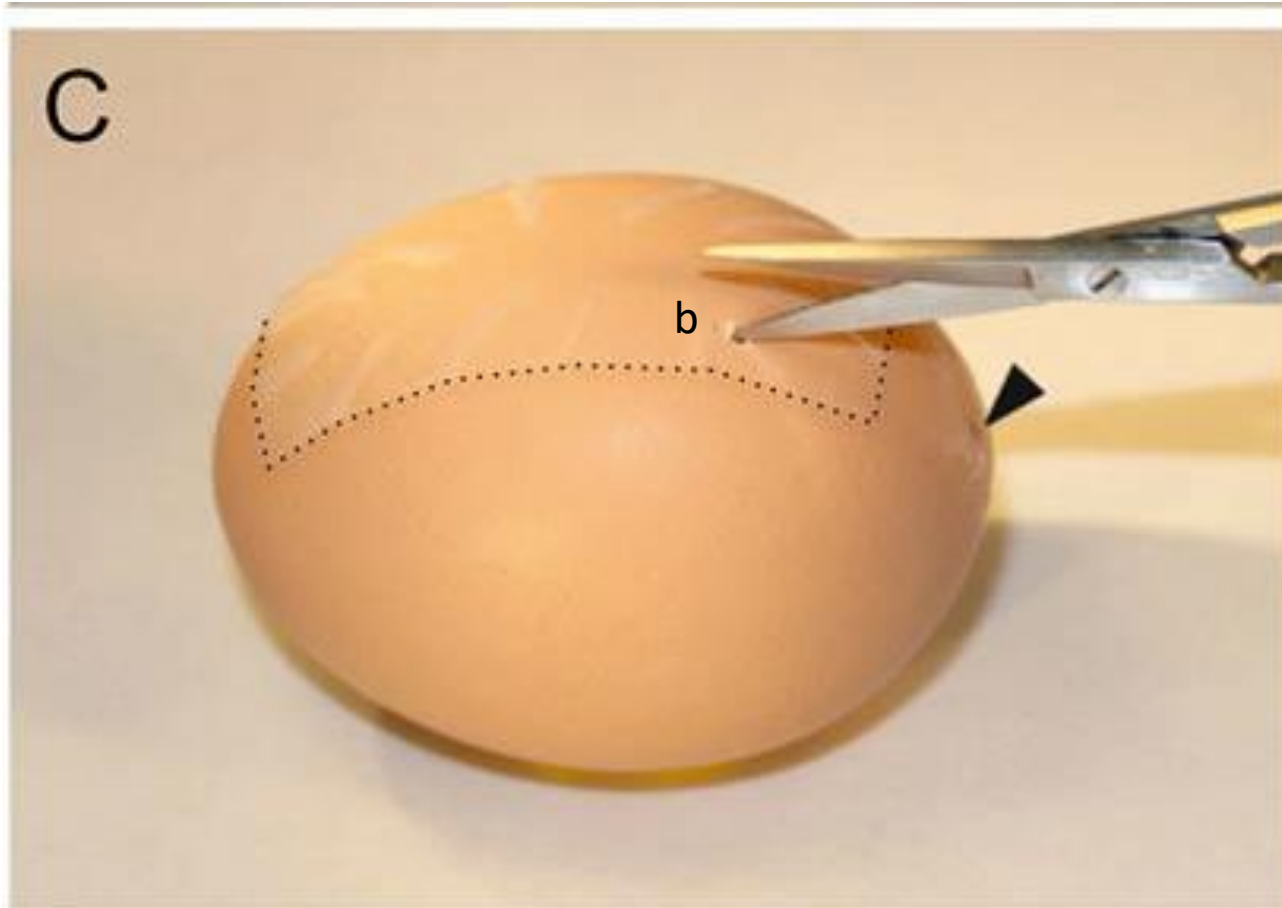
A. Pomocí hrotu nůžek vytvořit jeden malý otvor na tupém konci (a) a druhý na velké plošce (b)

# 1. Otevírání vajíčka



B. Vložení jehly se stříkačkou do otvoru na tupém konci (pozor, aby nedošlo k poškození vnitřních obalů), naklonění pod úhlem  $45^\circ$ , zasunutí jehly hlouběji do vajíčka po vnitřní stěně skořápky, odsátí cca 1 ml bílku → vytvoření prostoru pro manipulaci

# 1. Otevírání vajíčka



C. Přelepení otvoru b a vyznačeného prostoru lepicí páskou (části skořápky nebudou padat dovnitř vajíčka a povrch okolo otvoru bude zpevněný), pomocí nůžek vytvořit ve vyznačené části otvor

# 1. Otevírání vajíčka



D. Vzniklý otvor by měl být symetrický a dostatečně velký pro následnou manipulaci s embryem uvnitř vajíčka

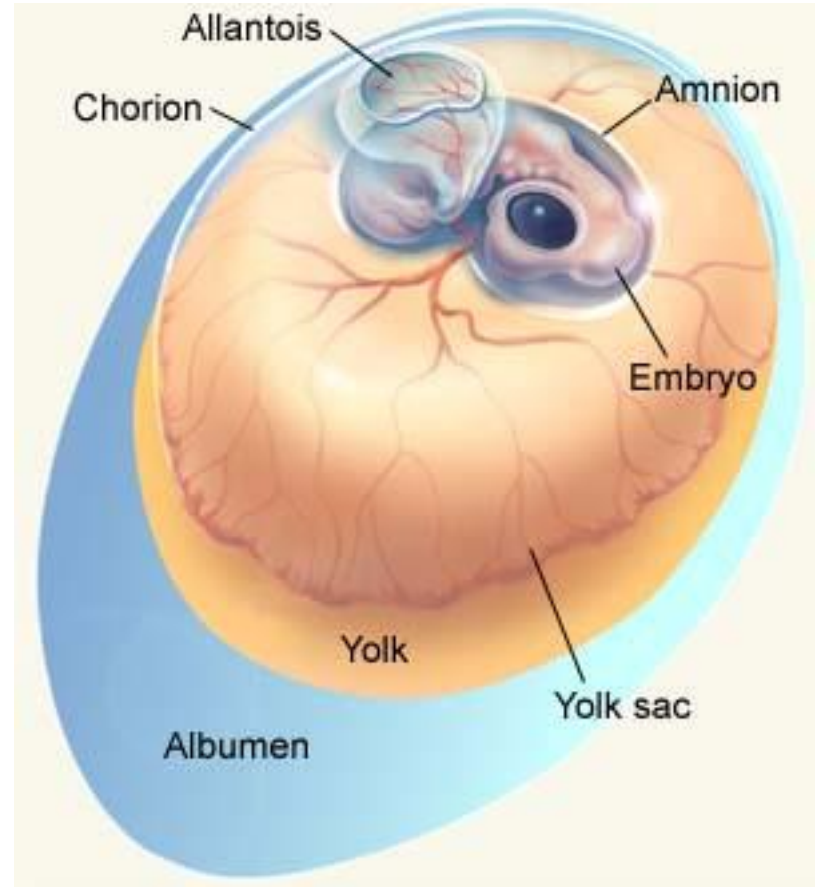
# Nastavení stereoskopu

1. Vložit otevřené vajíčko ve stojánek(A)  
pod preparační stereoskop (B)
2. Zaostřit pomocí velkého šroubu (C)
3. Nastavit osvětlení (D)
4. Dostatečně přiblížit pomocí malého šroubu (E)
5. Opět doostřit pomocí velkého šroubu (C)



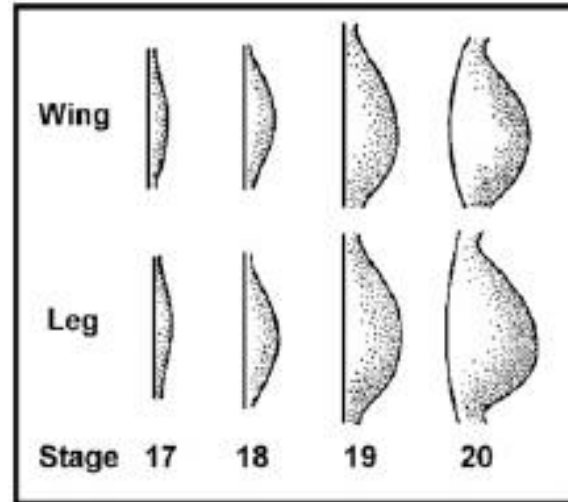


## 2. Odstranění embryonálních obalů



Pomocí ostrých pinzet odstranění nejprve chorionu (povrchová lesklá membrána) a následně odstranění amnionu (špatně rozeznatelná membrána obalující pouze embryo)

## 4. Vyjmutí embrya z vajíčka



Nejdříve je nutné přerušit cévy a závěsy, posléze embryo vytáhnout pomocí pinzet (když to nejde, výborně poslouží obyčejná plastová lžička)

Vyjmutí embrya slouží k:

- Použití embryonálních tkání ke kultivaci (tkání, 2D nebo **3D primární buněčné linie**)
- Při ukončení experimentu je nutné embryo vyjmout a dále zpracovat ovlivněné tkáně

# Metody vývojové biologie

-

## Praktická část



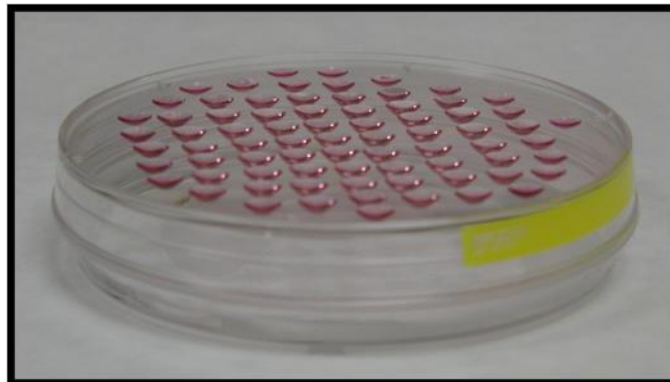
Metody vývojové biologie – 3D kultury a Detekce genové exprese

# 3D kultury - sféroidy

Sféroidy: sledování vlivu morfogenu na diferenciaci mezenchymových buněk končetin do buněk chrupavky/kosti v 3D modelu

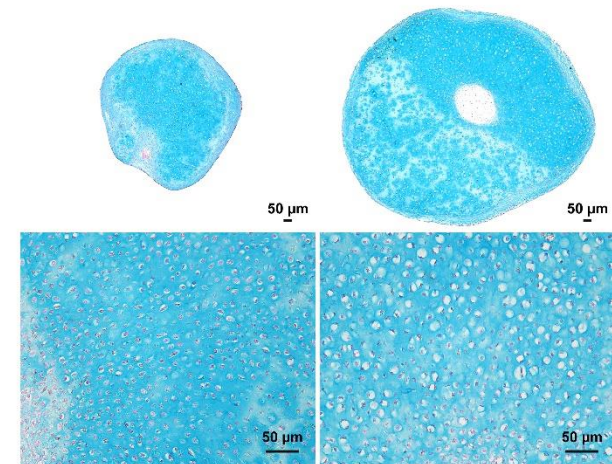
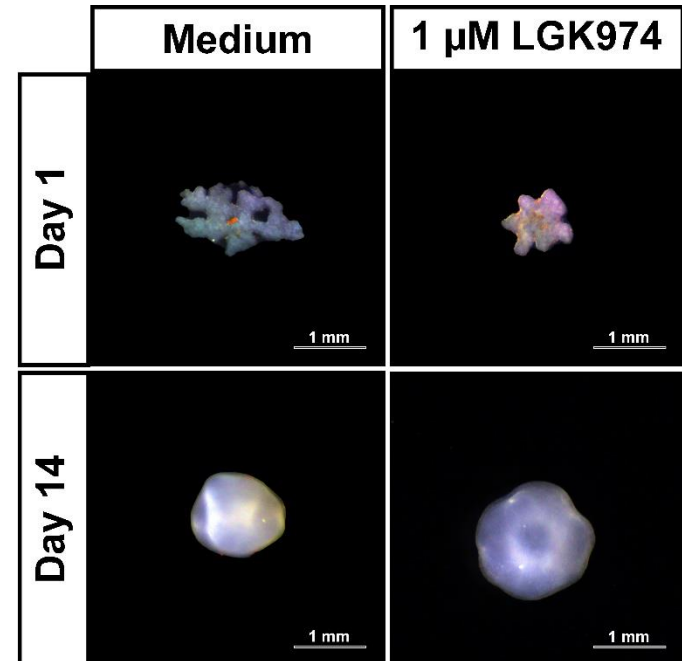
# 3D sferoidové kultury

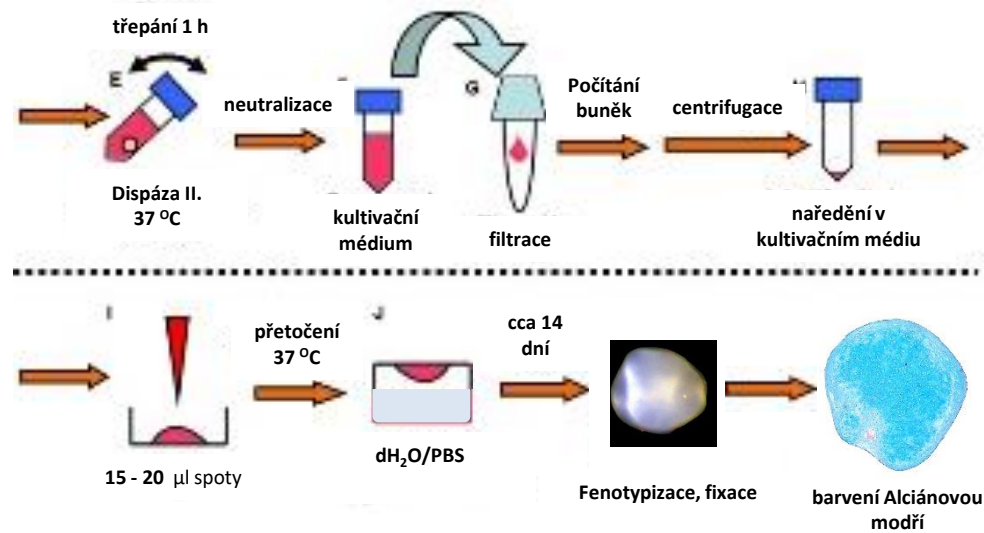
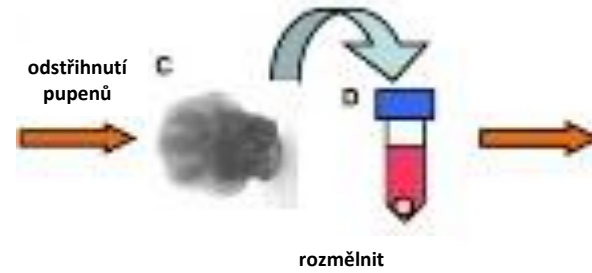
- *In vitro* technika např. ke studiu chondrogenní diferenciaci mezenchymových buněk
- vytvoření „spotů“ na víčko kultivační misky s vysokou buněčnou hustotou ( $2 \times 10^7$  buněk/ml), médium s kyselinou askorbovou a beta glycerol fosfátem
- Otočení vzhůru nohama – kondenzace buněk
- kondenzace buněk – vytvoření chrupavkových nodulů (simulace *in vivo* chondrogenese) na „dně“ kapky
- možnost ovlivnit chondrogenní diferenciaci morfogeny a dalšími látkami



# Kultivace a charakterizace

- *In vitro* kultivace – 14 dní (výměna média každý den)
- Charakterizace velikosti, členitosti, ...
- Fixace – specifické barvení Alciánovou modří (chrupavka)

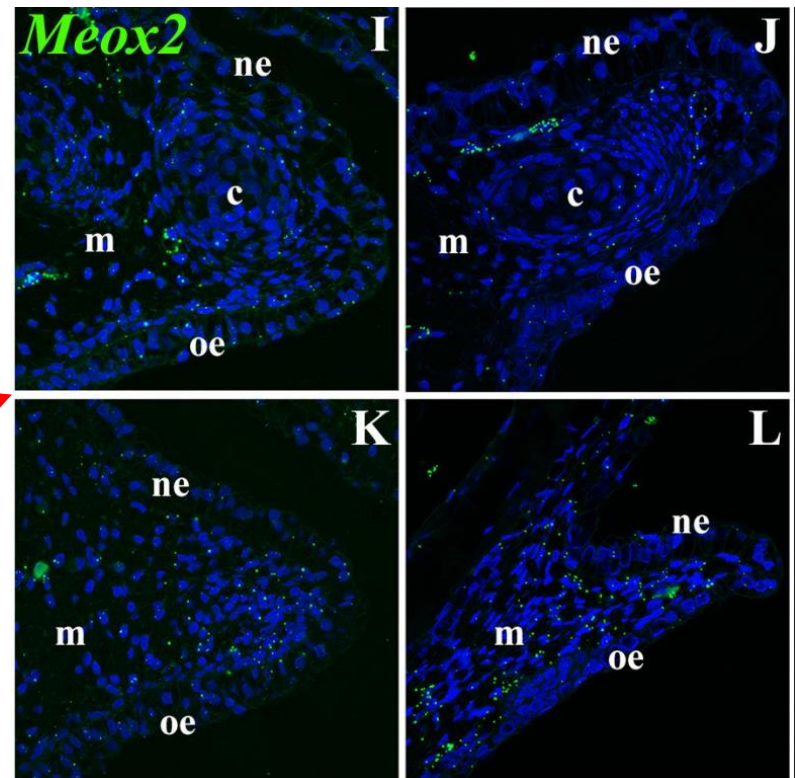




# Detekce genové exprese *in situ*

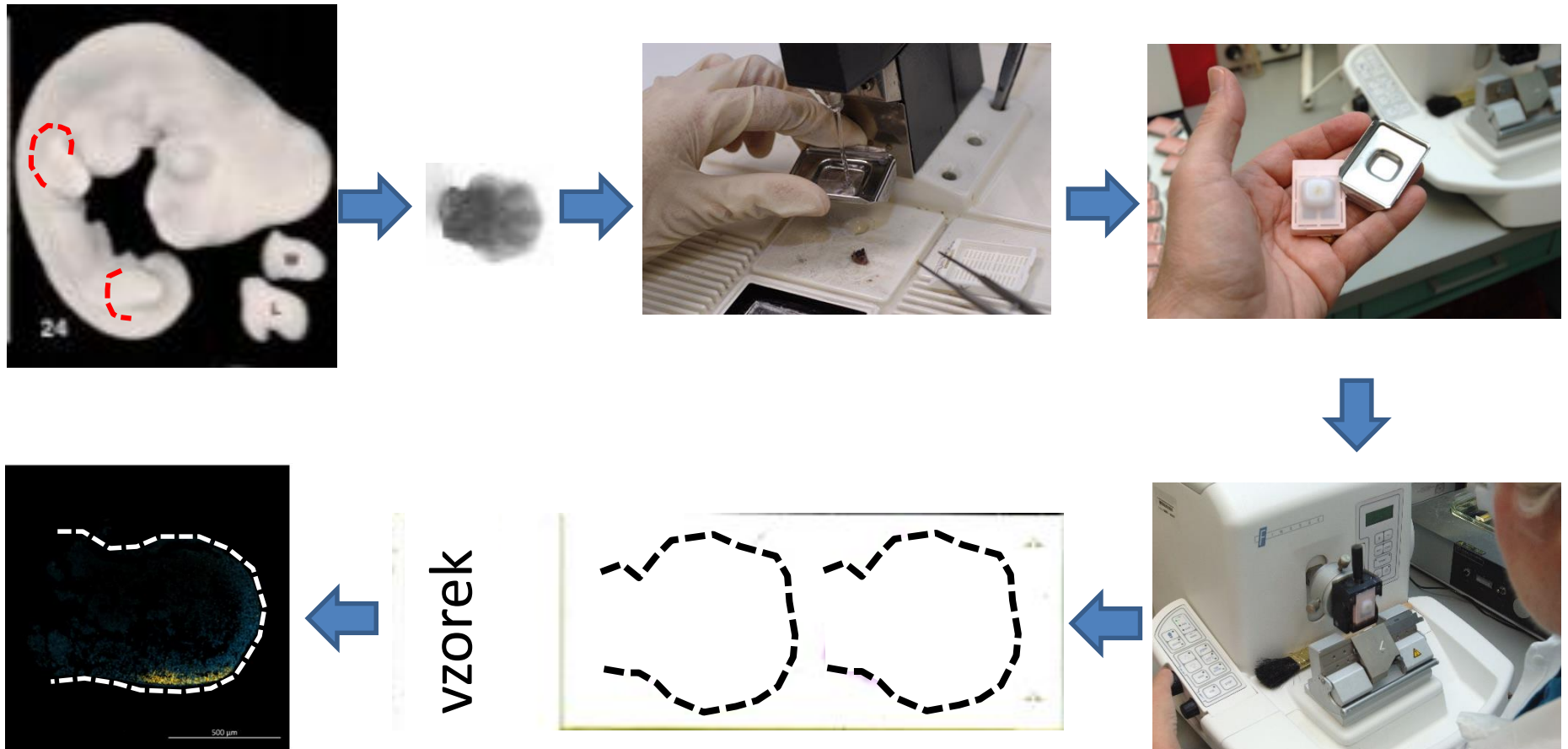
- Detekce molekul mRNA přímo v tkáni
- Asociace genové exprese s jednotlivými typy buněk a tkání/orgánů
- Lokalizace a kvantifikace

vzorek





# Příprava tkání a tkáňových řezů



# *In situ* hybridizace - RNAScope

