

OBSAH

- Předmluva 11
- Úvod 13
- I. **Všobecná část** (A. ROMANOVSKÝ) 15
- A. Technické vybavení 15
1. Místnost 15
 2. Optika 15
 3. Laboratorní sklo 16
 4. Nástroje 16
 5. Různé 16
 6. Větší přístroje 17
 7. Nástroje vlastní výroby 17
- B. Biologická čistota, sterilita 20
1. Mytí a čištění 20
 2. Sterilisace 21
 3. Použití antiseptik a antibiotik 22
- C. Operační a kultivační roztoky 23
- D. Narkotisace 26
- E. Cytologické a histologické metody zpracování zárodečného materiálu 27
- F. Obojživelníci, jejich chov a vývoj 31
1. Používané druhy obojživelníků 31
 2. Přechovávání a chov 34
 3. Péče o vajíčka, zárodky a larvy 35
 4. Krmení 36
 5. Nemoci obojživelníků 36
 6. Vývojová stadia, rychlost vývoje, motilita 37
 - a) Vývojová stadia 37
 - b) Rychlost vývoje 39
 - c) Motilita 39
- G. Všobecné pokyny k pokusné práci 41
1. Příprava pracovního prostoru 41
 2. Příprava operačních misek 41

3. Příprava kultivačních misek 41
4. Příprava nástrojů k operaci 42
5. Příprava zárodků k operaci 43
6. Používání roztoků 43
7. Zacházení s operovanými zárodky a jejich další kultivace 44
8. Vedení protokolu 44

H. Některé speciální metody a návody 45

1. Vynucená ovulace a umělé oplození 45
 - a) Vynucená ovulace 45
 - Anura* 45
 - Urodela* 47
 - b) Umělé oplození 48
 - Anura* 48
 - Urodela* 49
2. Odstranění vaječných obalů 50
 - a) Odstranění vnějších obalů 50
 - Mechanické odstranění 50
 - Odstranění obalů trávením papainem 52
 - Odstranění obalů včetně vitelinní membrány trávením trypsinem a papainem 52
 - Odstranění obalů a vitelinní membrány trypsinem a thioglykolátem 53
 - Odstranění obalů ozářením ultrafialovým světlem 53
 - Získání vajíček bez vnějších obalů podvázáním vejcovodů 54
 - b) Odstranění vitelinní membrány 54
3. Barvení chromosomů v ocasních špičkách larev a roztlacích zárodků 55
 - a) Metoda barvení ocasních špiček 55
 - b) Barvení chromosomů v roztlacích a nátěrech 57

II. Experimentální výzkum přípravných a počátečních fází vývoje 59

A. Samčí pohlavní ústrojí a spermatogenese (J. NEDVÍDEK) 59

1. Varle 59
2. Spermatogenese 60
3. Výdej spermíí 61
4. Přídavné orgány 61

B. Samičí pohlavní ústrojí a oogenese (J. NEDVÍDEK) 61

1. Vaječník 61
2. Oogenese 62
 - a) Příprava mikroskopických preparátů ovaria 64
 - b) Operační vnyětí části ovaria a kultivace oocytů 65
 - c) Třídění oocytů 65
 - d) Odstranění folikulárních buněk 66
 - e) Injekce do oocytů a vajíček 67
 - f) Isolace jádra oocytu 67
 - g) Isolace chromosomů 68
 - h) Trvalé preparáty chromosomů 70
 - i) Značení chromosomů radioaktivními prekursorry 71
3. Zrání oocytů a ovulace 72

- a) Indukce zrání in vitro 74
 - b) Indukce zrání a ovulace in vitro 74
4. Zvrat pohlaví 74

C. Oplození a zygota (A. ROMANOVSKÝ) 76

- 1. Oplození 76
 - a) Časový sled změn jaderného materiálu v oplozeném vajíčku (cytologie oplození) a jejich závislost na teplotě 79
 - b) Aktivace neoplozených vajíček elektrickým šokem 79
 - c) Aktivace neoplozených vajíček skokana nabodnutím 79
- 2. Umělá parthenogeneze 81
 - a) Parthenogenetický vývoj vajíček skokana po nabodnutí 81
- 3. Androgenese 82
 - a) Enukleace vajíčka odstraněním dělicího vřeténka nabodnutím 82
 - b) Enukleace vajíčka čolka odsátím dělicího vřeténka 82
 - c) Enukleace vajíček UV ozářením 83
- 4. Gynogenese 83
 - a) Inaktivace spermií skokana působením toluidinové modři 84
 - b) Inaktivace spermií čolka UV ozářením 84
- 5. Hybridisace 84
 - a) Hybridisace čolků 85
- 6. Heteroploidie 86
 - a) Produkce heteroploidů teplotním šokem aplikovaným na vajíčko těsně po oplození 87
 - b) Produkce tetraploidů teplotním šokem aplikovaným v období 1. rýhy 87
- 7. Transplantace jader 88
 - a) Vnitrodruhová transplantace jader u skokana 89
 - b) Mezirodhová transplantace jader u čolka 90

III. Experimentální výzkum období rýhování, morfogeneze a organogeneze (A. ROMANOVSKÝ) 93

A. Rýhování, blastula 93

- a) Produkce identických dvojčat konstrikcí zárodku ve stadiu dvou blastomer 94

B. Gastrula, neurula, pokročilá stadia 95

- 1. Extirpace, implantace, transplantace 98
 - a) Extirpace části neurální destičky 98
 - b) Extirpace poloviny neurální destičky a její replantace při obrácení její podélné a příčné osy 99
 - c) Implantace horního rtu blastoporu do blastocoelu časné gastruly (indukce sekundární neurální destičky) 100
 - d) Transplantace základu končetiny 101
 - e) Parabiosa 102
 - f) Chiméry 103
- 2. Kultivace izolovaných tkání či orgánových základů 104
 - a) Kultivace explantované tkáně v ektodermálním vřetku (sendvič technika) 105
 - b) Kultivace zárodečného ektoblastu ve visuté kapce 106
- 3. Kultivace zárodečných buněk (buněčná kultura) 107
 - a) Kultivace izolovaných buněk časného zárodku 108
- 4. Disociace zárodečných tkání a separace buněk 111

IV. Imunoembryologie (A. ROMANOVSKÝ) 113

A. Základní potřeby 114

1. Materiál 114
2. Roztoky 114

B. Příprava antigenních extraktů, imunisace, příprava sér 115

1. Příprava antigenu a imunisace 115
2. Odběr krve, zpracování a uložení sér 117
3. Příprava testovacích antigenů 118
4. Vysycování antisér 118
5. Příprava globulinové frakce antiséra 119

C. Prstěncová precipitační reakce 120

D. Precipitace v agarovém gelu (agaroprecipitace) 121

1. Jednoduchá difuze podle Oudina 122
2. Dvojitá difuze v kapiláře 124
3. Dvojitá difuze v misce podle Ouchterlonyho 124

E. Imunoelektroforesa 130

F. Imunofluorescence 132

- a) Průkaz ztráty antigenní specifity vajíčka v dalším vývoji zárodku prstěncovou reakcí 136
- b) Průkaz stadijně specifické antigenicity neuruly dvojitou difuzí v agaru modifikací podle Abeleva 137
- c) Průkaz orgánově specifických antigenů svalu imunoelektroforesou 138
- d) Průkaz přítomnosti myosinu v myotomu zárodku skokana imunofluorescencí 138

G. Transplantační imunita u obojživelníků 138

1. Všeobecné pokyny 139
2. Transplantace kůže na pulcích skokanů 140
3. Transplantace kůže na dospělých skokanech 140
4. Transplantace hůže na čolcích 141
5. Aktivně získaná tolerance u obojživelníků 142
 - a) Vyvolání tolerance injekcí homogenátu heterologní tkáně v larválním stádiu 142
 - b) Vyvolání tolerance embryonální parabiosou 142
 - c) Závislost vyvolání tolerance na kvantitě transplantovaného materiálu v zárodečném období 143

V. Chemická embryologie (J. NEDVÍDEK) 144

A. Cytochemické metody 145

1. Barevné reakce 145
 - a) Feulgenova reakce 145
 - b) Barvení methylovou zelení a pyroninem 146
 - c) Barvení nukleolárního organisátoru 147
2. Fluorescenční mikroskopie 147
 - a) Schiffovo reagens – auramin O 147
 - b) Barvení akridinovou oranží 148

3. Enzymatická extrakce 148
 - a) Extrakce desoxyribonukleasou 149
 - b) Extrakce ribonukleasou 149
 4. Hybridisace nukleových kyselin *in situ* 149
- B. Biochemické metody 151
1. Radioaktivně značené prekursory 151
 - a) Dlouhodobé značení RNK oocytů 152
 - b) Pulsní značení RNK 152
 - c) Značení nukleových kyselin v době zrání a ovulace 153
 - d) Značení nukleových kyselin v zárodečném vývoji 153
 - e) Značení RNK *in vitro* 153
 2. Příprava a uchování materiálu 154
 - a) Odstranění bakterií 154
 - b) Odstranění folikulárních buněk 154
 - c) Skladování vajíček a zárodků 155
 3. Kvantitativní stanovení nukleových kyselin 155
 - a) Metody extrakce 155
 - b) Kolorimetrické stanovení 158
 4. Isolace žlutkových zrn a mitochondrií 160
 5. Isolace nukleových kyselin 160
 - a) Isolace DNK podle Marmura 161
 - b) Isolace DNK ze žlutku 162
 - c) Isolace RNK 162
 6. Dělení nukleových kyselin 164
 7. Dělení basí a nukleotidů 164
 - a) Chromatografie na papíře 164
 - b) Chromatografie na tenké vrstvě celulosy 165
 - c) Dělení nukleotidů sloupcovou chromatografií 166
 8. Isolace bílkovin 166
 - a) Isolace aktinu 166
 - b) Isolace myosinu 167

Doslov 168

Literatura 169

Rejstřík 177

Přílohy