

Cytobiochemiczne metody
przyżyciowej analizy wybranych
struktur subkomórkowych i
homeostazy komórki w czasie
rzeczywistym

PRAKTIKUM Z CYTOCHEMII
(BCH-395)

Cytobiochemiczne metody przyżyciowej analizy wybranych struktur subkomórkowych i homeostazy komórki w czasie rzeczywistym

Mikroskopia fluorescencyjna jest powszechnie stosowaną techniką pozwalającą na lokalizację w komórce dowolnych jej składników jeśli tylko posiadamy możliwość wcześniejszego wyznakowania ich fluorochromem o określonych właściwościach. Fluorescencja preparatu może mieć również pochodzenie naturalne (np. chlorofil, celuloza, porfiryny), jednakże w zdecydowanej większości przypadków stosowane są fluorochromy zewnętrzne.

Szczególną grupę fluorochromów stanowią barwniki stosowane do obserwacji przyżyciowych i pomiarów ilościowych, które zmieniają swoje właściwości spektralne po związaniu badanej substancji. Do tej grupy fluorochromów zaliczamy na przykład niskocząsteczkowe związki syntetyzowane chemicznie – np. wskaźniki zmian stężenia jonów wapnia w komórce, takie jak Fluo-4 czy Fluo-3 oraz sondy ratiometryczne – Fura-2. Innymi coraz częściej stosowanymi barwnikami są sondy umożliwiające wizualizację m.in. zmian stężenia jonów potasu, reaktywnych form tlenu oraz pH we wnętrzu komórek.

Powszechne zastosowanie znajdują również białka fluoryzujące, w szczególności białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein, GFP). W praktyce często wykorzystywane w badaniach wydajności transfekcji komórek, jako cząsteczka reporterowa oraz jako białko fuzyjne (złożone z GFP i badanego białka) do przyżyciowych badań zmian lokalizacji białek w komórce w czasie różnych procesów np. zmian zachodzących w cytoszkieletie komórek. Białka fluoryzujące są również wykorzystywane do projektowania wskaźników białkowych stężenia jonów w komórce m.in. jonów wapnia. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej stworzono fuzje GFP i białek pokrewnych np. YFP (ang. yellow fluorescent protein) oraz CFP (ang. cyan fluorescent protein) z fragmentami białek wiążących jony wapnia – kalmoduliny lub troponiny C. Sondy są skonstruowane tak, aby zmieniały się ich właściwości fluorescencyjne w odpowiedzi na zmianę stężenia jonów wapnia.

W badaniach wykorzystujących wskaźniki fluorescencyjne stężenia jonów w komórkach najczęściej stosowane są odwrócone mikroskopy fluorescencyjne szerokiego pola z oświetleniem episkopowym. Wykorzystywane są jednak również fluorescencyjne czytniki płytek wielodołkowych, mikroskopy konfokalne (m.in. obrazowanie tkanek) oraz mikroskopy dwufotonowe (badania *in vivo*).

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie w trakcie ćwiczeń obserwacji w żywych komórkach. Studenci będą śledzić zmiany w organizacji struktur subkomórkowych (cytoszkielet aktynowy) oraz dynamikę zmian stężenia jonów wapnia we wnętrzu komórek z wykorzystaniem barwników Fluo-4 i Fura-2.

Procedura wykorzystania barwnika Fluo-4:

1. Oglądnąć (w mikroskopie odwróconym) komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych:
 - komórki prawidłowe – linia embrionalnych ludzkich komórek nerki (HEK-293)
 - komórki nowotworowe – linia komórek ludzkiego raka prostaty (DU145)
2. Przygotować 1,5 ml medium do hodowli komórek z dodatkiem 1 μ M barwnika Fluo-4 (wyjściowe stężenie – 1 mM).
3. Zmienić pożywkę w szalkach hodowlanych:
 - zlać pożywkę znad komórek
 - zalać komórki medium z dodatkiem barwnika Fluo-4
 - opisać szalkę!
4. Inkubować komórki w inkubatorze (temp. 37°C, w obecności 5% CO₂), przez 60 min
5. Usunąć medium z dodatkiem barwnika z szalki.
6. Zalać komórki medium bez czerwieni fenolowej.
7. Zamknąć szalkę i zabezpieczyć jej brzegi za pomocą parafilmu.
8. Tak przygotowane szalki użyć do obserwacji mikroskopowej w mikroskopie fluoresencyjnym przy odpowiednim zestawie filtrów wzbudzenia i emisji:
 - światło wzbudzające: światło niebieskie (488 nm)
 - emisja - światło zielone (520 nm)

Procedura wykorzystania barwnika Fura-2:

1. Oglądnąć (w mikroskopie odwróconym) komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych:
 - komórki prawidłowe – linia embrionalnych ludzkich komórek nerki (HEK-293)
 - komórki nowotworowe – linia komórek ludzkiego raka prostaty (DU145)
2. Przygotować 1,5 ml medium do hodowli komórek z dodatkiem 5 μ M barwnika Fura-2 (wyjściowe stężenie – 5 mM).
3. Zmienić pożywkę w szalkach hodowlanych:
 - zlać pożywkę znad komórek
 - zalać komórki medium z dodatkiem barwnika Fura-2
 - opisać szalkę!
4. Inkubować komórki w inkubatorze (temp. 37°C, w obecności 5% CO₂), przez 30 min
5. Usunąć medium z dodatkiem barwnika z szalki.
6. Zalać komórki medium bez czerwieni fenolowej.
7. Inkubować komórki w inkubatorze (temp. 37°C, w obecności 5% CO₂), przez 30 min
8. Zabezpieczyć brzegi szalki za pomocą parafilmu.
9. Tak przygotowane szalki użyć do obserwacji mikroskopowej w mikroskopie fluoresencyjnym przy odpowiednim zestawie filtrów wzbudzenia i emisji:
 - światło wzbudzające: światło UV (340/387 nm)
 - emisja - światło zielone (510 nm)

Zagadnienia:

- Zjawisko fluorescencji
- Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego oraz kamer CCD
- Podstawowe zasady przyżyciowego obrazowania komórek
- Podstawy wykorzystania barwników ratiometrycznych

Zalecana literatura:

- Bruce Alberts i in. „Molecular Biology of the Cell” Garland 2002
- Bruce Alberts i in. „Podstawy Biologii Komórki” PWN 2007
- “Maintaining Live Cells on the Microscope Stage”
<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/livecellmaintenance.html>
- „Introduction to Charge-Coupled Devices (CCDs)”
<http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/ccdintro.html>
- Wykłady z kursu „Praktikum z cytochemii” (wykłady poprzedzające ćwiczenie)