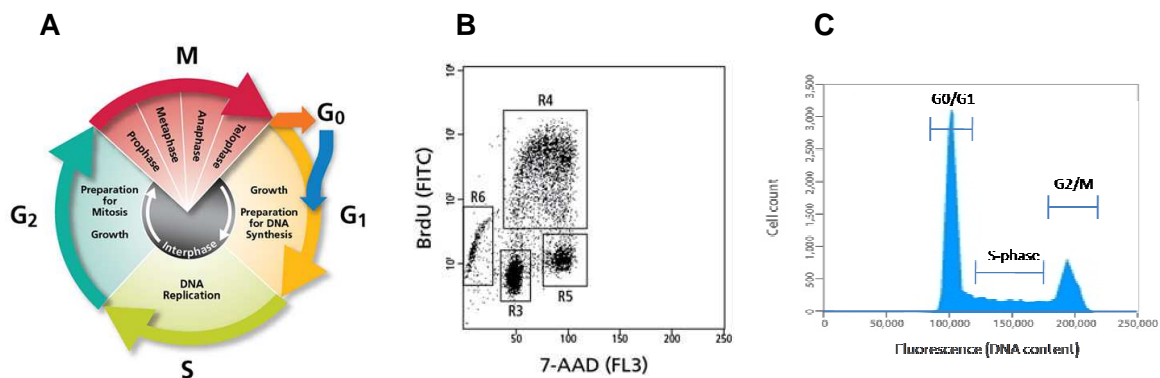


TEMAT ĆWICZENIA: Analiza cyklu komórkowego z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej

Wstęp

Cykl komórkowy zakończony podziałem mitotycznym (cykl życiowy komórki) to proces prowadzący do powstania dwóch komórek potomnych, będących wiernymi kopiami komórki, z której powstały. Cykl komórkowy można podzielić na dwie fazy – M (mitozę lub mejozę) oraz interfazę, będącą okresem między jednym podziałem komórki a drugim. W trakcie trwania interfazy wyróżnia się 4 fazy: G₀, G₁, S i G₂. Komórki, które w najbliższym czasie nie będą się dzielić znajdują się w fazie G₀. Wejście komórki w fazę G₁ obliuguje ją do przejścia przez kolejne etapy cyklu i w końcu prowadzi do jej podziału. Na schemacie poniżej (Rys. 1A) przedstawiono fazy cyklu komórkowego.



Rys. 1. Panel A- Fazy cyklu komórkowego. Panel B i C- Przykładowe analizy cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej. Panel B- dot-plot otrzymany po wybarwieniu komórek przeciwciałem wyznakowanym FITC skierowanym przeciwko BrdU oraz 7-AAD. Panel C- Histogram otrzymany po wybarwieniu komórek jodkiem propidyny.
(<http://www.bdbiosciences.com/sg/research/apoptosis/analysis/index.jsp>; <http://uic.igc.gulbenkian.pt/fc-protocols.htm>).

Cytometria przepływowa jest narzędziem umożliwiającym analizę cyklu komórkowego. Jednym z barwników wykorzystywanych do analizy cyklu komórkowego jest jodek propidyny (PI). PI wnika przez błonę komórkową utrwalonych oraz spermeabilizowanych komórek, a następnie wiąże się z DNA na zasadzie interkalacji pomiędzy komplementarnymi zasadami obydwu nici. Jest to wiązanie stechiometryczne dostarczające informacji na temat reakcji PI z DNA, a więc proporcji pomiędzy komórkami znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Na Rys. 1C przedstawiono analizę cyklu komórkowego z zastosowaniem PI. Najwyższy pik to komórki nie dzielące się, będące w fazie G₀ lub G₁ cyklu komórkowego (komórki diploidalne). Drugi mniejszy pik to komórki w fazie G₂ i M (mitozy), o podwojonej ilości DNA (komórki tetraploidalne). Pomiedzy pikami znajdują się komórki w fazie S (syntezy DNA).

5'-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) jest analogiem nukleotydu tymidyny, który podczas fazy S zostaje wbudowany do syntetyzowanego DNA. W tym celu przed przystąpieniem do analizy cyklu komórkowego konieczne jest dodawanie BrdU do medium

hodowlanego. Detekcję wbudowanego BrdU umożliwia wybarwienie komórek (utrwalonych i po permeabilizacji błony komórkowej) przeciwciałem wyznakowanym fluorescencyjnie (np. FITC) skierowanym przeciwko BrdU. Dodatkowo, równocześnie stosuje się barwienie DNA przy pomocy 7-aminoactinomycyn D (7-AAD), który wykazuje duże powinowactwo do regionów GC. Opisane barwienie dwukolorowe umożliwia uzyskanie danych liczbowych oraz charakterystykę populacji komórek aktywnie syntetyzującej DNA w kontekście ich pozycji w cyklu komórkowym (G₀/G₁, S, G₂/M definiowanych poprzez intensywność fluorescencji emitowanej przez 7-AAD). Na Rys. 1B komórki z bramki R3 znajdują się w fazie G₀/G₁, R4 w fazie S, R5 w fazie G₂/M, natomiast komórki z bramki R6 w fazie sub-G₁ (komórki apoptotyczne).

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest przygotowanie komórek do analizy cyklu komórkowego poprzez zastosowanie barwień a) jodkiem propidyny oraz b) przeciwciałem przeciwko BrdU oraz analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.

Przebieg doświadczenia:

(Praca w zespołach dwuosobowych. Każda osoba z podzespołu otrzyma po 2×10^6 komórek inkubowanych z BrdU lub nie traktowanych BrdU).

I. Analiza cyklu komórkowego przy pomocy barwienia przeciwciałem skierowanym przeciwko BrdU oraz 7-AAD (BD Pharmingen BrdU Flow Kits).

1. Otrzymałą zawiesinę komórek zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
2. Zawiesić pelet w 200 μ l BD Cytofix/Cytoperm Buffer. Inkubować 15 min w RT.
3. Po zakończeniu utrwalania dodać 1 ml 1X BD Perm/Wash Buffer. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
4. Pelet komórkowy zawiesić w 200 μ l BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus. Inkubować 10 min. na lodzie.
5. Po zakończeniu permeabilizacji dodać 1 ml 1X BD Perm/Wash Buffer. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
6. Zawiesić komórki w 200 μ l BD Cytofix/Cytoperm Buffer. Inkubować 5 min w RT.
7. Po zakończeniu kolejnego etapu utrwalania dodać 1 ml 1X BD Perm/Wash Buffer. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
8. Zawiesić komórki w takiej objętości roztworu DNazy (300 μ g/ml) żeby 30 μ g DNazy przypadało na 10^6 komórek. Inkubować 50 min w 37°C.
9. Po zakończeniu trawienia DNazą dodać 2 ml 1X BD Perm/Wash Buffer. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).

10. Zawiesić pelet w 100 μ l 1X BD Perm/Wash Buffer zawierającego FITC-conjugated anti-BrdU Antibody (1:50). Inkubować 20 min. w RT.
11. Po zakończeniu inkubacji dodać 1 ml 1X BD Perm/Wash Buffer. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
12. Zawiesić pelet w 40 μ l roztworu 7-AAD w celu wybarwienia DNA komórki. Dodać 400 μ l 1X BD Perm/Wash Buffer. Przefiltrować przez filtr o średnicy porów \varnothing 40 μ m.
13. Analizować na cytometrze przepływowym BD FACS Aria III przy przepływie nie przekraczającym 400 obiektów/s.

Uwaga! Wykonane barwienie jest barwieniem dwukolorowym, które przed analizą cytometryczną wymaga wykonania kompensacji. Asystent przygotowuje następujące próbki kompensacyjne: Próbka niebarwiona, Próbka barwiona przeciwciałem FITC anti-BrdU oraz próbka wybarwiona 7-AAD.

II. Analiza cyklu komórkowego przy pomocy barwienia jodkiem propidyny

1. Otrzymaną zawiesinę komórek zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
2. Zawiesić pelet w 600 μ l PBS.
3. Do probówki dodać 1 ml zmrożonego 70% etanolu na 10^6 komórek (w sumie 2 ml). Zworteksować.
4. Utrwalać 60 min. na lodzie. Dodać 4 ml PBS.
5. Zwirować probówki (2000 rpm., 10 min., RT).
6. Zawiesić pelet w 4 ml PBS.
7. Zwirować probówki (2000 rpm., 10 min., RT).
8. Powtórzyć 2x płukanie PBS (punkty 6 i 7).
9. Zawiesić pelet w 200 μ l PBS. Dodać 100 μ l RNazy (100 μ g/ml). Inkubować 5 min. w RT.
10. Dodać 1 ml jodku propidyny (50 μ g/ml). Inkubować 30 min. w 37°C.
11. Do probówki dodać 4 ml PBS, a następnie probówki zwirować (2000 rpm., 10 min., RT).
12. Zawiesić komórki w 500 μ l PBS. Przefiltrować przez filtr o średnicy porów \varnothing 40 μ m.
13. Analizować na cytometrze przepływowym BD FACS Aria III przy przepływie nie przekraczającym 400 obiektów/s.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

1. Metody barwienia komórek w celu analizy cyklu komórkowego

Zalecana literatura:

1. Elwira Śliwińska- ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPLÝWOWEJ DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI DNA U ROŚLIN. Postępy Biologii Komórki, 2008.

2. Piotr Pozarowski, Zbigniew Darzynkiewicz- Analysis of cell cycle by flow cytometry
3. http://brain.fuw.edu.pl/edu/BIOL:Podzia%C5%82_kom%C3%B3rki._Cykl_kom%C3%B3rkowy