

BARWIENIA IMMUNOCYTOCHEMICZNE KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z wybranymi metodami immunocytochemicznymi, z metodą pośredniej immunofluorescencji i metodą immunoenzymatyczną i oraz możliwościami wykrywania obecności i lokalizacji i różnych białek w komórkach zwierzęcych..

Przebieg ćwiczenia:

- I. Identyfikacja różnych izoform aktyny w otrzymanych komórkach metodą pośredniej immunofluorescencji.
- II. Identyfikacja różnych izoform aktyny w tych samym typie komórek pośrednią metodą immunoenzymatyczną.
- III. Porównanie trudności, czułości i przydatności obu metod do wykrywania takiego samego antygeny

Wykonanie ćwiczenia:

Praca w dwuosobowych zespołach

1. Oglądnąć (w mikroskopie odwróconym) komórki z hodowli *in vitro* (wysiane na szkiełkach umieszczonych w szalkach hodowlanych).
fibroblasty skóry ludzkiej (HSF)
ludzkie fibroblasty oskrzeli (HBF) wyizolowane od osoby zdrowej
ludzkie fibroblasty oskrzeli (HBF-AS) wyizolowane od osoby chorej na astmę oskrzelową
2. Każdy zespół wybiera do barwienia 4 szalki ze szkiełkami z takimi samymi komórkami

Dwa szkiełka należy wykorzystać do identyfikacji odpowiednio β -aktyny lub α -aktyny (α -SMA) metodą pośredniej immunofluorescencji

*jedno szkiełko należy przeznaczyć do wykrywania poszukiwanego białka metodą immunocytofluorescencji pośredniej (inkubacja utwalonych komórek kolejno z pierwszo- i drugorzędowym przeciwciałem),
drugie szkiełko wykorzystać do przeprowadzenia kontroli negatywnej (inkubacja utrwalonych komórek tylko z drugorzędowym, znakowanym fluorescencyjnie przeciwciałem)*

3. **Dwa szkiełka** należy wykorzystać do identyfikacji odpowiednio β -aktyny lub α -aktyny (α -SMA) pośrednią metodą immunoenzymatyczną

*jedno szkiełko należy przeznaczyć do wykrywania poszukiwanego białka metodą immunoenzymatyczną (inkubacja utrwalonych komórek kolejno z pierwszo- i drugorzędowym przeciwciałem oraz substratem),
drugie szkiełko wykorzystać do przeprowadzenia kontroli negatywnej (bez inkubacji komórek z przeciwciałem przeciw poszukiwanemu antygenowi)*

Identyfikacja białek metodą pośredniej immunofluorescencji w komórkach z hodowli *in vitro*

Wybrać do barwienia 2 szkiełka z takimi samymi komórkami.

Utrwalanie komórek:

1. Zlać pożywkę z szalki znad szkiełek z komórkami i przepłukać szkiełka 3 razy roztworem PBS o temp. 37°C.
2. Zlać PBS i zalać komórki 3,7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrwalać komórki przez 15 min w cieplarni.
3. Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać szkiełka 3 razy roztworem PBS.
4. Zlać PBS i zalać komórki 0.1% roztworem Tritonu X-100 i pozostawić na 7 min w temperaturze pokojowej.
5. Zlać Triton X-100 znad komórek i przepłukać szkiełka 3 razy PBS.

Inkubacja komórek z przeciwciałem I-rzędowym:

(nieznakowanym, swoistym przeciwciałem skierowanym przeciwko poszukiwanemu antygenowi)

6. Zlać PBS i zalać komórki roztworem 1% BSA (albuminy surowicy wołowej) w PBS i inkubować w temperaturze pokojowej około 10 min
7. Przygotować komory wilgotnościowe do barwienia komórek:
Małe szalki szklane umieścić w dużych szalkach wyłożonych wilgotną watą (komory wilgotnościowe), aby krople przeciwciała nie wysychały.
8. Na suchą małą szalkę położyć 1 pasek parafilmu o wielkości około 2cm x 2cm, na środek każdego kawałka parafilmu nakropić 20µl przeciwciała:
- monoklonalne **mysie przeciwciało przeciwko β -aktynie lub α -SMA (IgG)**.
9. Wyjąć szkiełko z utrwalonymi komórkami z roztworu BSA w PBS, osuszyć brzegi szkiełka bibułą i położyć je na parafilmie, tak aby komórki dotykały kropli przeciwciała. Inkubować komórki z przeciwciałem 45 min, w temperaturze pokojowej.
10. Po inkubacji komórek z przeciwciałem pierwszorzędowym szkiełko umieścić w szalce wypełnionej roztworem PBS i przepłukać starannie 3 razy.

Inkubacja komórek z przeciwciałem II-rzędowym:

(znakowanym fluorescencyjnie przeciwciałem skierowanym przeciwko immunoglobulinom zwierzęcia, od którego uzyskano przeciwciało I-rzędowe).

Roztwór przeciwciała dodatkowo zawiera barwniki fluorescencyjne do wybarwienia jąder i filamentów aktynowych.

11. Na wieczko małej szalki położyć pasek parafilmu o wielkości około 2cm x 2cm i na środek nakropić 20µl **mieszaniny barwników**, która zawiera odpowiednio rozcieńczone:
 - kozie przeciwciało anty-mysie IgG znakowane Alexa-488
 - roztwór barwnika Hoechst 33258, o stężeniu 500ng/ml
 - falloidynę znakowaną Alexa 546 w stężeniu 500ng/ml.

12. Barwione szkiełko z komórkami położyć na parafilmie tak, aby komórki dotykały kropli mieszaniny barwników i barwić komórki 35 min, w ciemności, w temperaturze pokojowej, w szalce wyłożonej wilgotną watą.
13. Po zakończonym barwieniu zdjąć szkiełko z parafilmu i przenieść do szalki z H₂O destylowaną i wypłukać starannie 5 razy.

Przygotowanie preparatu:

14. Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 2 razy po 10µl H₂O destylowanej.
Na krople wody nałożyć kolejno (komórkami do wody):
szkiełko z wybarwionymi komórkami oraz szkiełko po reakcji kontrolnej,
osuszyć brzegi szkiełek bibułą i okleić je lakierem do paznokci.
15. Tak przygotowane preparaty oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym przy odpowiednim zestawie filtrów (wzbudzenia i emisji)
dla struktur barwionych:
Hoechst 33258
światło wzbudzające: UV (max 352nm), a emisja - światło niebieskie
Aleksa-Fluor 488:
światło wzbudzenia: niebieskie (max 488 nm), a emisja – światło zielone
Alexa-Fluor 546:
światło wzbudzenia: zielone (max 554 nm), a emisja – światło czerwone.
16. Porównać fluorescencyjne obrazy barwionych komórek, określić obecność i organizację różnych izoform aktyny w komórkach (preparaty wykonywane przez różnych studentów).

Identyfikacja białek pośrednią metodą immunoenzymatyczną w wybranych komórkach z hodowli

Wybrać do barwienia 2 szkiełka z takimi samymi komórkami.

Utrwalanie komórek:

1. Zlać pożywkę z szalki, w której znajduje się szkiełko i przepłukać dokładnie szkiełko roztworem PBS z jonami Ca^{2+} , Mg^{2+} o temp. 37°C.
2. Zlać PBS i zalać komórki 3,7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrwalać komórki przez 15 min w cieplarni.
3. Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać szkiełka 3 razy roztworem PBS.
4. Zlać PBS i zalać komórki 0.1% roztworem Tritonu X-100 i pozostawić na 7 min w temperaturze pokojowej.

Inaktywacja endogennego enzymu znacznikowego:

5. Zlać Triton X-100 znad komórek i przepłukać szkiełka 2 razy PBS.
Zalać komórki 1 ml roztworu 0,1% H_2O_2 i inkubować komórki przez 5 minut.
6. Zlać wodę utlenioną i przepłukać trzykrotnie PBS

Inkubacja komórek z przeciwciałem I-rzędowym:

(nieznakowanym, swoistym przeciwciałem skierowanym przeciwko poszukiwanemu antygenowi)

7. Zlać PBS i zalać komórki roztworem 1% BSA (albuminy surowicy wołowej) w PBS i inkubować w temperaturze pokojowej około 10 min.
8. Przygotować komory wilgotnościowe do barwienia komórek: Małe szalki szklane umieścić w dużych szalkach wyłożonych wilgotną watą (komory wilgotnościowe), aby krople przeciwciała nie wysychały.
9. Inkubacja komórek z pierwszorzędnym przeciwciałem:
Na suchą małą szalkę położyć 1 pasek parafilmu o wielkości około 2cm x 2cm, na środek kawałka parafilmu nakropić 20µl specyficznego przeciwciała
- monoklonalne **mysie przeciwciało przeciwko β -aktynie lub α -SMA (IgG).**
10. Wyjąć szkiełko z utrwalonymi komórkami szalki z roztworu BSA w PBS, osuszyć brzegi szkiełka bibułą i położyć je na parafilmie, tak aby komórki dotykały kropli przeciwciała.
Inkubować komórki z pierwszorzędnym przeciwciałem 45 min, w temperaturze pokojowej.
11. Po inkubacji komórek z przeciwciałem pierwszorzędnym szkiełko umieścić w szalce wypełnionej roztworem PBS i przepłukać starannie 3 razy.

Inkubacja komórek z przeciwciałem II-rzędowym:

przeciwciałem znakowanym HRP (peroksydazą chanową) skierowanym przeciwko immunoglobulinom zwierzęcia, od którego uzyskano przeciwciało I-rzędowe)
(przeciwciało przeciwko mysim IgG sprzężone z enzymem).

12. Inkubacja komórek z **przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP)**.
Na szalkę położyć pasek parafilmu o wielkości około 2cm x 2cm i na środek nakropić 20 µl roztworu **koziego przeciwciała anty-mysie IgG znakowanego HRP** (HRP-conjugated anti-mouse antibody)
Szkienka z komórkami położyć na parafilmie tak, aby komórki dotykały kropli przeciwciała i **barwić komórki 35 min**, w ciemności, w temperaturze pokojowej, w szalkach wyłożonych wilgotną watą.
13. Po zakończonym barwieniu zdjąć każde ze szkiełek z parafilmu i przenieść do szalek z PBS i wypłukać szkiełka starannie 3 razy.

Inkubacja komórek z substratem:

14. Zlać PBS i inkubować komórki w **roztworze substratu dla peroksydazy (CN/DAB)**.
(zmieszane 0,2 ml CN/DAB Solution (10X) z 1,8 ml buforu Stable Peroxide Substrate Solution).
DAB (3,3' diaminobenzidyna), zmieszana z 4CN (4-chloro-1-naftolem) dają w obecności HRP i H₂O₂ czarny nierozpuszczalny produkt. Miejsca, gdzie związało się przeciwciało drugorzędowe staną się czarne.
15. **Inkubować 7-10 minut**, aż szkiełko zabarwi się na czarno.
16. Po zakończonym barwieniu wypłukać szkiełka starannie 3 razy PBS.
17. **Zalać szkiełka roztworem hematoksyliny** – inkubować 1 minutę, a następnie przepłukać szkiełka 3 razy wodą z kranu.

Przygotowanie preparatu:

18. Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 2 razy po 10µl H₂O.
Na krople wody nałożyć kolejno szkiełka z wybarwionymi komórkami (komórkami do wody), osuszyć brzegi szkiełek bibułą i okleić je lakierem do paznokci.
19. Tak przygotowane preparaty **oglądać w mikroskopie jasnego pola**.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- Organizacja, funkcje i metody badania cytoszkieletu w komórkach zwierzęcych.
- Metody immunocytofluoresencyjne i ich znaczenie w badaniach biologii komórki.
- Zastosowanie barwników fluorescencyjnych w badaniach struktury i funkcji komórek.

Zalecana literatura:

Wykład 1 z kursu Praktikum z cytochemii 2015/16.

B. Alberts i inni.-Podstawy Biologii Komórki, PWN 2005; rozdz.17.

Kurs: „Biologia komórki dla biochemików ” (lub inny kurs Biologii komórki) – wykłady dotyczące budowy i funkcji cytoszkieletu.

K. Mann, **M. Michalik**. Miofibroblasty – komórki „pod presją”. Wszechświat 108(10-12): 292-296, 2007 (plik. pdf w załączeniu)