

PODSTAWY CYTOCHEMII (BCH 395)

CYTOCHEMIA

z gr. 'kytos' - komórka; 'χημεία – chemieia

Chemia komórki

Encyklopedia PWN:

Nauka badająca związki i procesy chemiczne, które zachodzą w organellach komórkowych.

Słownik Wyrazów Obcych :

Dział biochemii zajmujący się badaniem komórek w celu rozpoznania i poznania procesów chemicznych w nich zachodzących.

Cytochemia – bada skład chemiczny, lokalizację określonych substancji chemicznych oraz procesy chemiczne zachodzące na poziomie komórki

Histochemia – nauka z pogranicza histologii i biochemii.

Bada skład chemiczny i procesy biochemiczne w obrębie tkanek, stosując metody nie uszkadzające struktury badanego obiektu.

Celem cytochemii / histochemii jest:

- identyfikacja i lokalizacja poszczególnych substancji chemicznych w komórkach i tkankach
- śledzenie badanych reakcji dokładnie w miejscu ich powstawania

Praktikum z cytochemii

<http://www.uj.edu.pl/web/zbk/dydaktyka/kursy/BCH395>

Charakterystyka kursu:

10 godzin wykładów
30 godzin laboratoryjnych

Koordinator: dr Marta Michalik (p. C118)

Prowadzący:
nauczyciele akademicy ZBK

Zasady zaliczenia:

- uczestniczenie w zajęciach
- przygotowywanie się na ćwiczenia (sprawdzanie wiadomości - oceny cząstkowe)
- **kolokwium zaliczeniowe**

Ocena z kursu jest średnią ważoną:

- ocen cząstkowych otrzymanych przez studenta w trakcie ćwiczeń praktycznych (50%)
- oceny z kolokwium zaliczeniowego (50%)

Metody cytochemiczne

- Klasyczne barwienia cytologiczne
(histologiczne)
- Metody immunocytochemiczne
- Autoradiografia

Cytochemia /histochemia klasyczna

Zbiór metod pozwalających na wykrywaniu *in situ* w komórkach (cytochemia) i tkankach (histochemia) określonych substancji chemicznych

wykrywana substancja + substrat → produkt reakcji
(w komórce / tkance) (wprowadzony) (wytworzony)

produkt reakcji:

- widoczny w obrazie mikroskopowym
- nierozpuszczalny w środowisku reakcji
(zazwyczaj to środowisko wodne)

Podstawy cytochemii /histochemii

produkt reakcji:

➤ barwny



➤ fluoryzujący



➤ elektronowo gęsty



Cytochemia klasyczna

- **swoistość różna**
(im wyższa tym lepsza metoda)
- ograniczona
 - wykrywanie np. cukrowców, lipidów, białek bogatych w określone aminokwasy, kwasów nukleinowych, związków nieorganicznych, pierwiastków
 - a nie określonych związków
 - wykrywanie enzymów (aktywność enzymu)

Typy reakcji cytochemicznych (histochemicznych)

Reakcje cyto/histochemiczne cechuje specyficzność – swoistość

➤ reakcja bezpośrednia

produkt powstaje po dodaniu substratu w miejscu lokalizacji danej substancji
(np. wykrywanie białek przez uwidocznienie ich reszt tyrozynowych)

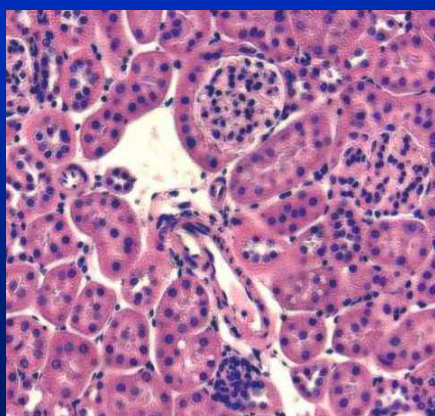
➤ reakcja dwu- lub kilkietapowa

(1) zmiana struktury chemicznej wykrywanej substancji
(2) zmieniony związek - wykrywany jest przez przeprowadzenie końcowej reakcji barwnej np. wykrywanie wielocukrów w podwójnej reakcji:
reakcja utleniania wielocukrów i reakcji barwnej identyfikującej wykrywany związek

Typy reakcji cytochemicznych (histochemicznych)

➤ reakcje oparte na specyficznym wiązaniu barwników na drodze oddziaływań elektrostatycznych

(np. wykrywanie cząsteczek kwaśnych, anionowych barwnikami kationowymi);



Komórki zbiorczego kanalika moczowego nerki

Hematoksylina

powinowactwo do struktur zasadochłonnych, ujemnie naładowanych (DNA, RNA, kwaśne białka). Barwi jądra, rybosomy

Eozyna

Reaguje z grupami kationowymi
powinowactwo do cząsteczek kwasochłonnych związków i tkanki wykazują acidofilię
Barwi białka, cytoplazmę, substancję międzykomórkową

Typy reakcji cytochemicznych (histochemicznych)

- reakcje oparte na stereospecyficznym wiązaniu barwników przez pewne związki wysokocząsteczkowe
(np. wykrywanie DNA zielenią metylową)
- reakcje oparte na selektywnej rozpuszczalności barwników w wykrywanych związkach
(np. wykrywanie lipidów Sudanem III)
- kombinacja kilku powyższych typów reakcji

Typy reakcji cytochemicznych (histochemicznych)

- wykrywanie enzymów przez uwidocznienie produktów ich aktywności
wprowadzone substraty ulegają przemianie w barwny (lub elektronowo gęsty) strąk pod wpływem katalitycznej funkcji wykrywanego enzymu.
- Wykrywany enzym musi być czynny,
odpowiednie procedury przygotowywania materiału
- odpowiednie warunki reakcji pozwalającej na wykrycie aktywności enzymu
(INKUBACJA - pH, temperatura optymalna dla działania enzymu)
zawiera specyficzny dla wykrywanego enzymu substrat,
jony stymulujące aktywność danego enzymu, dodatkowe składniki biorące udział w reakcji – koenzymy

Zastosowanie reakcji cytochemicznych (histochemicznych)

Do wykrywania:

- aminokwasów i białek
- kwasów nukleinowych
- węglowodanów
- lipidów
- enzymów (fosfataz, esteraz, dehydrogenaz, peptydaz)
- innych substancji (aldehydy, ketony, metaloproteiny, jony – Fe, Cd)

Duża różnorodność metod, wiele dziś już rzadko stosowanych

Wykrywanie polisacharydów - reakcja PAS

- Najczęściej stosowana reakcja histochemiczna.
 - Reakcja dwuetapowa
 - I etap – materiał (oligocukry) poddaje się utlenianiu 1% kwasem nadjodowym, (zachodzi przekształcenia grup glikolowych w grupy aldehydowe)
 - II etap – powstały dwualdehyd uwidacznia się przy użyciu odczynnika Schiffa (odbarwiona forma fuksyny zasadowej)
- Produkt reakcji – **purpurowy**

Wykrywanie polisacharydów - reakcja PAS

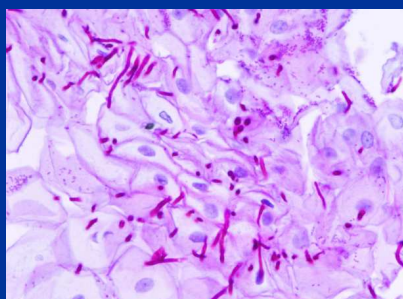
Dodatnią reakcję PAS dają:

- nierozpuszczalne polisacharydy – glikogen, skrobia, celuloza
- mukopolisacharydy, glikoproteiny, glikolipidy
- struktury komórkowe i tkankowe wykazujące obecność większych ilości nierozpuszczalnych polisacharydów
 - błony podstawne,
 - wewnątrzkomórkowe złogi glikogenu,
 - glikoproteidowe i śluzowe ziarna wydzielnicze
- **sfingomieliny** (utlenianie kwasem powoduje powstanie grup aldehydowych)

Wykrywanie polisacharydów - reakcja PAS



Nabłonek jelita ssaka

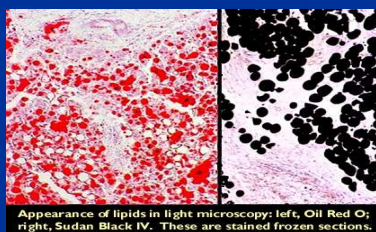


glikogen
wybarwiony na kolor czerwono-fioletowy

Wykrywanie lipidów

Do histochemicznego wykrywania lipidów używa się głównie barwników wykazujących niską rozpuszczalność w wodzie i alkoholu, natomiast wysoką w tłuszczach (barwnik rozpuszcza się w tłuszczu powodując jego zabarwienie):

- Sudan III, Sudan IV,
 - Barwią kwasy tłuszczowe, trójglicerydy
 - Wynik – czerwone zabarwienie
- czerń sudanowa
 - barwią kwasy tłuszczowe, trójglicerydy
 - Wynik barwienia – czarne zabarwienie
- czerwień oleista



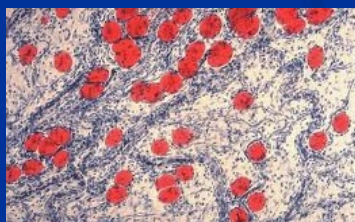
Zanurzenie skrawka tkanki zawierających skupiska lipidów do wodnego roztworu jednego z tych barwników, powoduje (zgodnie ze stopniem rozpuszczalności) przejście barwnika z fazy rozpuszczalnika do fazy lipidowej.

Wykrywanie lipidów

Inne ściśle histochemiczne metody barwienia lipidów, odznaczają się wyższą swoistością i używane są do różnicowania poszczególnych klas lipidów.

Należą tu:

- Reakcja z kwasem fosfomolibdenowym (wykrywa lipidy bogate w cholinę)
- Reakcja z dwufenylokarbozonem i rtęcią (wykrywa lecytyny i sfingomieliny)
- Reakcja bromkowo – srebrowa (wykrywa lipidy nienasycone)
- Reakcja z ftalocyjanianem miedzi (wykrywa fosfolipidy)



Lipidy wybarwione czerwieńią oleistą

Wykrywanie kwasów nukleinowych

Do reakcji służących do wykrywania kwasów DNA i RNA należy:

Reakcja Feulgena – służy do wykrywania DNA.

- Składa się z dwóch etapów
- **I etap** – tkankę poddaje się hydrolizie w 1N kwasie solnym, powoduje to pęknięcie pierścienia pentozowego dezoksyrybozy i wytworzenie grupy aldehydowej
- **II etap** – wykrywanie wolnej grupy aldehydowej odczynnikiem Schiffa
- DNA barwi się na czerwono
- Nie służy do wykrywania RNA (hydroliza nie powoduje pęknięcia pierścieni rybozy)

Wykrywanie kwasów nukleinowych

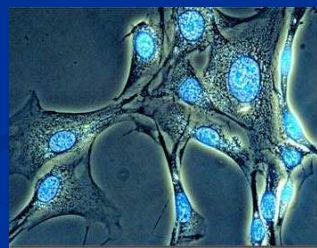
Reakcja Bracheta – służy do różnicowego wykrywania DNA i RNA w tym samym materiale, za pomocą tzw. polichromu Unny (mieszanka zieleni metylenowej i pyroniny)

- Zielen metylenowa wykazuje powinowactwo do DNA
- Pyronina swoiście wiąże się z RNA
- Efekt barwienia – czerwono zabarwione rejony komórki bogate w RNA (obszary chromatyny zawierające rybosomy, jąderko), zielono-fioletowy odcień chromatyny jądrowej

Wykrywanie kwasów nukleinowych

- Metody fluorescencyjne – z wykorzystaniem różnych barwników fluorescencyjnych które swoiście wiążą się do DNA:

- DAPI (dwuaminofenyloindol)
- Hoechst 33342
- Hoechst 33258



DNA w jądrze wybarwione DAPI

- Barwniki te przepuszczane przez błony komórkowe, wiążą się preferencyjne do rejonu par zasad adenina-tymina w DNA

Wykrywanie białek

Większość metod wykrywania białek opiera się na reakcjach barwnych z resztami określonych aminokwasów.

- Reakcja Milтона z kwasem azotowym, azotanem rtęci i azotanem sodu (wykrywa reszty tyrozyny)
- Reakcja z dwunitrofluorobenzenem (wykrywa reszty tyrozyny, -SN, -NH₂)
- Reakcja z naftolo-etylenodwuaminą (wykrywa reszty tryptofanu)
- Reakcja z dwuchloronaftolem (wykrywa reszty argininy)
- Reakcja z błękitem rtęciowo - bromofenolowym (wykrywa większość białek)

Klasyczne metody cytochemiczne służące do wykrywania białek są obecnie rzadko wykorzystywane.

Immunocytochemia

oparta na wysokiej swoistości wiązania antygenu z przeciwciałem



➤ antygen

każda substancja w komórce, która ma właściwości immunogenne

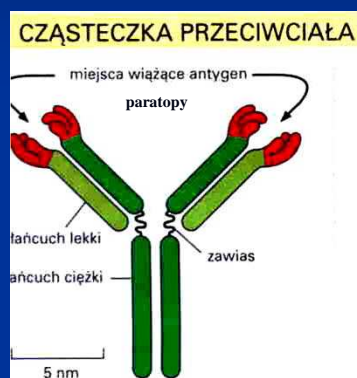
➤ determinanta antygenowa (epitop) - grupa rozpoznawana przez przeciwciało

➤ immunocytochemiczne uwidacznianie antygenu w materiale biologicznym wymaga uzyskania go w czystej postaci a następnie otrzymania swoistych dla tego antygeny przeciwciał (immunizacja zwierząt laboratoryjnych)

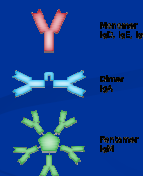
Immunocytochemia

➤ przeciwciało

immunoglobulina skierowana przeciw danemu antygenowi



Klasy (podklasy)
IgA (2), IgD, IgE, **IgG (4)**, IgM



Klasy, typy, podtypy – na podstawie **izotypów** (różnic w planie budowy łańcuchów)

allotypy – drobne zmiany w obrębie danego izotypu, warunkowane zmiennością genetyczną.

idiotypy – grupy przeciwciał o takiej samej swoistości (różnice w budowie części zmiennej)

idiotypy - izotypy ?

Immunocytochemia

Kinetyka reakcji antygen-przeciwciała zależy od:

➤ powinowactwa przeciwciała

siła wiązania Ag przez pojedynczy paratop
stała równowagi proporcjonalna do powinowactwa

$$K_a = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]}$$

zależy – szybkości i siły tworzenia wiązania Ag-Ab

Przeciwciała heteroklityczne

które powstały w wyniku immunizacji danym antygenem, ale które wykazują wyższe powinowactwo do innego antygeny

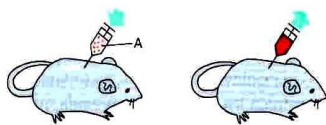
➤ zachłanności (awidności) przeciwciała

siłę wiązania poliwalentnego Ag z kilkoma paratopami Ab
zachłanność > sumy powinowactw

Otrzymywanie przeciwciał

Przeciwciała poliklonalne

Przeciwciała można otrzymać w laboratorium poprzez zaszczepienie organizmu zwierzęcia (najczęściej mysz, królik, owca lub gęś) dowolnym antygenem (A)

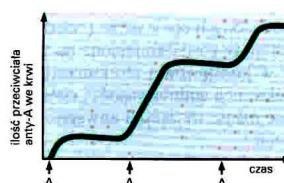


szczepienie antygenem A

późniejsze pobranie krwi

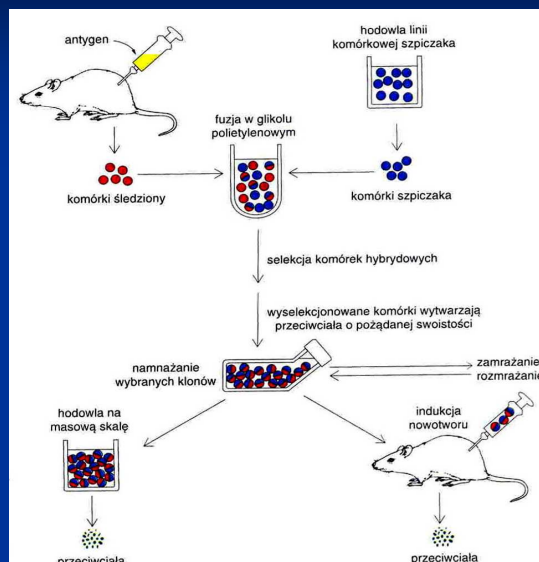
Powtarzane w odstępach kilku tygodni szczepienie tym samym antygenem stymuluje specyficzne limfocyty B do uwalniania dużych ilości przeciwciała anti-A (skierowanego przeciwko antygenowi A) do krwiobiegu

mieszany przeciwciał
rozpoznających różne
determinanty, i różniących się
powinowactwem



Ponieważ antygen A stymuluje wiele różnych limfocytów B, krew zawiera różnorodne przeciwciała anti-A, z których każde wiąże A w nieco inny sposób

Otrzymywanie przeciwciał przeciwciała monoklonalne



jednakowa swoistość

Zalety stosowania przeciwciał

monoklonalnych

- wysoka specyficzność i powtarzalność reakcji z Ag
- można używać ich w bardzo małych stężeniach
zmniejszając wiązania Ab z innymi białkami oraz wiązania niespecyficzne (tło).
- możliwość wykrywania Ag o subtelnych różnicach w budowie (Ag różniących się jednym epitopem)
- możliwość wykrywania modyfikacji antygeny, takich jak: utlenienie, fosforylacja czy proteoliza.

poliklonalnych

- niski koszt uzyskiwania
- wysoka zachłanność (awidność)
łatwość i wyższa czułość wykrywania Ag
- trwałość powstałych kompleksów Ag-Ab w mniejszym stopniu niż w przypadku przeciwciał monoklonalnych zależy od właściwości roztworu (np. pH)

Wady stosowania przeciwciał

monoklonalnych

- Ab może rozpoznawać dwa różne Ag, na których obecny jest ten sam epitop
- trudność badania wieloepitopowego Ag przy pomocy jednego rodzaju Ab monoklonalnych (reakcja fałszywie negatywna)

Nie stosuje się w testach opartych na reakcjach immuno-precypitacji i aglutynacji

poliklonalnych

- brak możliwości wykrywania Ag o subtelnych różnicach w budowie (Ag różniące się jednym epitopem)
- trudność wykrycia konkretnego Ag o wielu epitopach w mieszaninie Ag
- zróżnicowane powinowactwo Ab poliklonalnych do Ag, rzutuje na wiarygodność, spójność i powtarzalność wyników reakcji

Nie stosuje się w czułych i precyzyjnych technikach (np. cytometria przepływowa)

Immunocytochemia - znaczniki

➤ fluorochromy



➤ enzymy

peroksydaza; fosfataza zasadowa



➤ białka zawierające metal ciężki

ferrytyna

➤ metal ciężki

złoto koloidalne



Metody cytochemiczne oparte na reakcji antygen-przeciwciała

- immunocytochemia / immunohistochemia
- cytometria przepływowa
- immunobloting (Western blot)
- immunoprecypitacja
- techniki ELISA oraz ELISPOT

Immunocytochemia

Metody immunocytochemiczne

Metody bezpośrednie

Metody wielostopniowe

Metody pośrednie

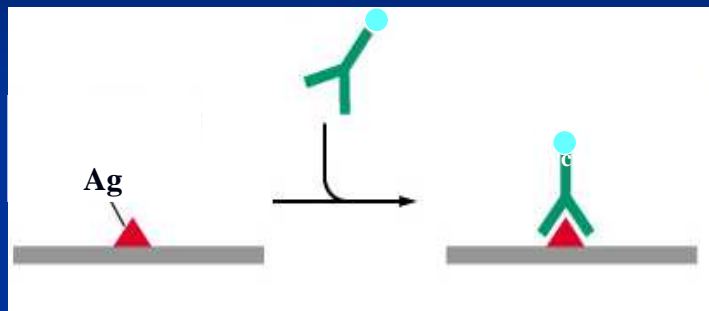
Metody nieznakowanych przeciwciał

Metody inne

Metody wykrywania kilku antygenów

Immunocytochemia

Metody bezpośrednie



- **Zalety:**
 - prostota
- **Wady:**
 - stosunkowo niska czułość
 - możliwe obniżenie powinowactwa Ab do Ag poprzez chemiczne połączenie Ab ze znacznikiem za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych

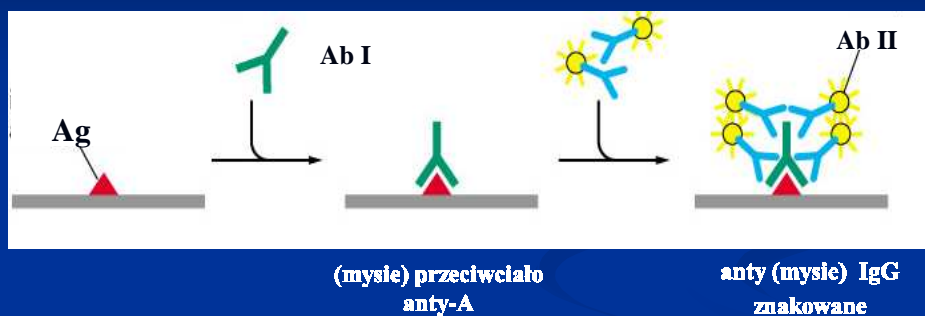
Immunocytochemia

Metody wielostopniowe

- różnorodne
- stosowanie kilkietapowych reakcji
- przeciwciało wiążące antygen nie jest wyznakowane
- **Zalety:**
 - wzmocnienie czułości znakowania
 - wzrost specyficzności reakcji
 - te same układy znakujące można zastosować do przeciwciał przeciw różnorodnym Ag
- **Wady:**
 - złożoność procedury zwiększa prawdopodobieństwo fałszywych wyników

Immunocytochemia

Metody pośrednie



➤ **Zalety:**

kilkakrotnie bardziej czułe niż metody bezpośrednie;
stosunkowo proste w wykonaniu

Immunocytochemia

Metody nieznakowanych przeciwciał

- Stosowanie układu nieznakowanych przeciwciał
- Znacznik (najczęściej peroksydaza) wprowadzony w ostatnim etapie jest antygenem dla ostatniego użytego przeciwciała

Mostek pojedynczy
Mostek podwójny
Metoda PAP i jej odmiany

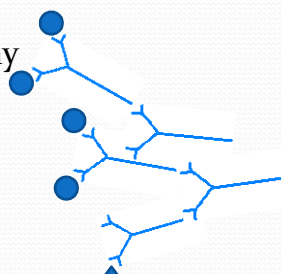
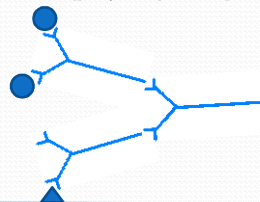
➤ **Zalety:**

wysoka czułość

➤ **Wady:**

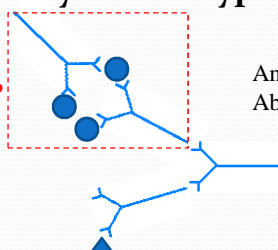
Metody nieznakowanych przeciwciał reakcje z kompleksem enzym-antyenzym

- Mostek pojedynczy / podwójny



- Metoda PAP (peroksydaza-antyperoksydaza)

Kompleks PAP



Antyglobulina = mostek
AbI a antyenzymem

Immunocytochemia

Inne metody

- Metody z białkiem A
- Układ awidyna-biotyna
- Metody znakowanych antygenów
- Metody z przeciwciałami z wbudowanym haptenem

Immunocytochemia

Układ awidyna-biotyna

- Wykorzystuje trwałe i bardzo swoiste połączenie tworzące się pomiędzy
 - widyną – glikoproteidem występującym w białku jaja (lub streptawidyną wyizolowaną z paciorkowca *Streptomyces avidinii*),
 - a biotyną – niskocząsteczkową witaminą (H)
- Jedna cząsteczka awidyny przyłącza 4 cząsteczki biotyny
- Biotynę można sprzęgać na drodze chemicznej z przeciwciałami,
- Awidynę można znakować

Istnieją dwie podstawowe odmiany reakcji z awidyną i biotyną:

reakcja LAB (ang. labeled avidin-biotin),

w której awidyna jest wyznakowana

reakcja ABC (ang. avidin-biotin-enzyme complex),

w której do biotynylowanej immunoglobuliny przyłącza się wielocząsteczkowy kompleks awidyny i biotynylowanego enzymu znacznikowego.

Immunocytochemia

Układ awidyna-biotyna –metoda ABC

