

BIOLOGIA KOMÓRKI

Mikroskopia fluorescencyjna -1
Przyżyciowe barwienia organelli wewnątrzkomórkowych

Wstęp

Komórki eukariotyczne, w odróżnieniu od komórek prokariotycznych posiadają wysoce skomplikowaną strukturę wewnętrzną. Eukarionty mają bowiem jądro komórkowe ograniczone otoczką jądrową, zawierające DNA z histonami upakowanymi w chromosomy, skomplikowany system organelli błonowych: siateczkę śródplazmatyczną gładką (SER) i szorstką (RER), aparat Golgiego, endosomy oraz lizosomy, które razem tworzą szlak wydzielniczy komórki oraz mitochondria, plastydy (komórka roślinna) i peroksosomy. Dzięki obecności systemu wewnątrzkomórkowych błon biologicznych, który warunkuje istnienie odrębnych przedziałów wewnątrzkomórkowych (tzw. kompartmentację) komórka eukariotyczna posiada zdolność prowadzenia dużej liczby odmiennych (często przeciwstawnych) procesów biochemicznych, w bliskim sąsiedztwie i w tym samym czasie.

Zastosowanie klasycznego mikroskopu świetlnego ze względu na jego małą zdolność rozdzielczą (0,2 μm) ogranicza możliwość dokładnej obserwacji struktur wewnątrzkomórkowych, dlatego też w tego typu badaniach bardzo często wykorzystuje się mikroskopię elektronową, której zdolność rozdzielcza na poziomie 0,2 nm niesie ze sobą znacznie większe możliwości poznania ultrastruktury organelli komórkowych.

Alternatywą dla tej złożonej techniki pozostają reakcje immunocytochemiczne, bazujące na swoistej reakcji antygen-przeciwciało, których cechą charakterystyczną jest wysoka czułość umożliwiająca detekcję sygnału poniżej zdolności rozdzielczej klasycznego mikroskopu świetlnego. Wykorzystanie różnorodnych fluorochromów sprzężonych z przeciwciałami umożliwia zastosowanie w tego typu badaniach mikroskopii fluorescencyjnej. Takie analizy możliwe są po utrwaleniu badanych komórek i ich dość złożonej obróbce. Zagadnienia te omawiane są szczegółowo na kursach realizowanych przez nasz Zakład: Praktikum z biologii komórki – (Wbt-106) oraz Praktikum z cytochemii – (BCH-395).

W ostatnich latach uzyskano szereg fluorochromów, które z jednej strony wiążą się specyficznie do określonych struktur komórkowych, co pozwala na określenie ich ewentualnego położenia w komórce, z drugiej zaś nadają się do barwień przyżyciowych. Wśród nich wyróżnić można barwniki wiążące się do:

- **błon aparatu Golgiego,**

- *barwniki BODIPY FL C5-ceramide, BODIPY TR C5-ceramide*
Są sfingolipidami z grupy ceramidów wyznakowanymi fluorescencyjnie fluoroforami BODIPY FL (wzbudzenie – 505 nm; emisja zielona – ~511 nm i czerwona – ~620 nm); oraz BODIPY TR (wzbudzenie – 589 nm; emisja czerwona – ~617 nm). Fluorescencyjne analogi ceramidów jakimi są barwniki z tej grupy akumulują się i specyficznie wiążą do aparatu Golgiego.

Więcej na:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01154.pdf>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22854569>

- **mitochondriów:**

- *Mito-Tracker*

Więcej na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf>

- *Rodamina 123* - jako silnie kationowy barwnik posiada zdolność przyłączania się do ujemnie naładowanych przedziałów komórki takich jak wewnętrzna błona mitochondriów, dzięki czemu pozwala na lokalizację tych organelli w komórce, oraz śledzenie zmian w ich właściwościach, w tym potencjale transmembranowym.

Więcej na:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r8004?lang=pl®ion=PL>

http://ac.els-cdn.com/S0005272803001105/1-s2.0-S0005272803001105-main.pdf?_tid=ccd52bda-9093-11e6-ac9c-00000aacb35e&acdnat=1476287695_8597cc8a79820c8a609e90ad0e0f42c3

- **siateczki śródplazmatycznej:**

- barwnik DiOC₆ (3,3'-heksylokarbocyjanian jodowy) jest używany do barwienia wewnętrznych błon w komórce – np. do wizualizacji siateczki śródplazmatycznej.

- Więcej na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408585>

- ER-Tracker™ Green (BODIPY® FL Glibenclamide) – jest barwnikiem bardziej specyficznym dla siateczki śródplazmatycznej i rzadziej wybarwia mitochondria (od powszechnie używanego DiOC₆ (3)), a także jest mniej toksyczny dla komórek, co pozwala na dłuższe obserwacje przyżyciowe. Glibenklamid (wykorzystywany dość powszechnie jako lek przeciwcukrzycowy), z którym sprzężony jest fluorochrom wiąże się do receptora sulfonilomocznika – podjednostki ATP-zależnych kanałów potasowych, które są zazwyczaj obecne w dużej liczbie na siateczce endoplazmatycznej. Niska ekspresja receptorów sulfonilomocznika w komórkach różnego typu może jednak stanowić przeszkodę w procedurze barwienia.

- Więcej na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12353.pdf>

- **lizosomów**

- Lyso-Tracker – fluorescencyjne związki acidofilne

- Więcej na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07525.pdf>

- **błony komórkowej**

- barwnik DiIC₁₈ (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametylindokarbocyjanian perchloru) krótka inkubacja np. 10-15 min

- **przedziałów endosomów**

- barwnik DiIC₁₈ (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametylindokarbocyjanian perchloru) kilkugodzinna inkubacja

Do wizualizacji DNA w komórkach żywych stosuje się barwniki zdolne do penetracji błon komórkowych i wiążące się bezpośrednio z DNA:

- **Hoechst 33342 oraz Hoechst 33258** – zawierające układ bis-benzimidazolowy – wiążące się bardzo ściśle z DNA poprzez interkalację w małym rowku (bruździe) helisy DNA. Hoechst 33342, zawiera dodatkową grupę etylową, przez co jest bardziej lipofilny, w związku z czym lepiej przenika przez nienaruszone błony biologiczne. Z kolei Hoechst 33258 ma znacząco mniejszą zdolność penetracji błony komórkowej, więc jest częściej używany do barwień komórek utrwalonych, gdzie błona komórkowa została naruszona. Obydwa barwniki wzbudzone są światłem UV (przy długości fali świetlnej około 345 nm), maximum fluorescencji to ok. 485 nm (kolor niebiesko-fioletowy)

- **DAPI (4',6-diamidinihydrochloran-2-fenylindonu)** - aromatyczna, heterocykliczna amina stosowana jako barwnik fluorescencyjny silnie wiążący się do dwuniciowego DNA poprzez interkalację. DAPI jest wzbudzany światłem UV (max. absorpcji: 358 nm), i wiązany do DNA ma maksimum emisji przy 461 nm (kolor niebiesko-fioletowy). DAPI wiąże się także do RNA, jednak słabiej, a maksimum emisji DAPI związanego z RNA jest przesunięte do około 400 nm.

- **DRAQ5™**

- 1, 5- bis{ [2-(di- methylamino) ethyl] amino}- 4, 8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione – barwnik o czerwonej fluorescencji wiążący się z DNA żywych, bądź utrwalonych komórek, o silnie zredukowanym efekcie fotobłaknięcia

- http://www.cardoso-lab.org/publications/Martin_2005.pdf

- [http://www.abcam.com/ps/products/108/ab108410/documents/ab108410%20DRAQ5%20v2%20\(Web\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/108/ab108410/documents/ab108410%20DRAQ5%20v2%20(Web).pdf)

Cel ćwiczenia:

- zapoznanie z budową i zasadą działania mikroskopu fluorescencyjnego oraz wykorzystaniem fluorescencji w badaniach biologii komórki;
- praktyczne zapoznanie z metodami wizualizacji organelli w żywych komórkach (w komórkach zwierzęcych z hodowli *in vitro*) z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych

Materiały:

- Hodowle *in vitro* ssaczych komórek:
 - # **prawidłowych** (np. ludzkich fibroblastów skóry (HSFs), ludzkich fibroblastów płuc (HLFs), komórek nabłonkowych płuc (BEAS) ludzkich komórek nabłonkowych prostaty (PNT2), mysich fibroblastów (3T3))
 - # **nowotworowych** (np. komórek raka prostaty (DU-145); komórek szczurzego mięsakoraka (XC); mysich komórek melanoma (B16))Komórki zostały wysiane na szkiełka umieszczone w szalkach Petriego i rosną w standardowych warunkach hodowli (odpowiednia pożywka, temp. 37°C, 5% CO₂);
- Pożywka hodowlana (bez czerwieni obojętnej) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS 5-10%) oraz antybiotyków (penicylina, streptomycyna);
- Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) z jonami wapnia i magnezu
- Fluorochromy do barwień przyżyciowych (roztwory wyjściowe w PBS):
 - DiIC₁₈ (0,9 mM)
 - DiOC₆ (0,25 mg/ml)
 - Rodamina 123 (0,1 mg/ml)
 - Lyso - Tracer 99 (0,75 µM)
 - Hoechst 33342 (0,1 mg/ml)

Wykonanie ćwiczenia:

1. Grupa ćwiczeniowa dzieli się na **trzyosobowe zespoły**.
2. Każdy zespół otrzymuje **3 różne typy komórek** w których wybarwi **jeden wskazany przez prowadzącego typ organelli komórkowej** (błonę komórkową, siateczkę endoplazmatyczną, mitochondria, lizosomy) **oraz jądra komórkowe** (wg protokołów podanych poniżej).
3. Każda osoba z zespołu pracuje oddzielnie i w wybranych przez siebie komórkach wybarwia wybrany przez grupę typ organelli komórkowej oraz jądra komórkowe, wykorzystując barwnik Hoechst 33342 oraz barwnik przyżyciowy odpowiedni do wizualizacji danej organelli.
4. W trakcie zajęć każda osoba indywidualnie przygotowuje raport z wykonywanego ćwiczenia (wg wskazówek prowadzącego).
5. Należy obejrzeć preparaty przygotowane przez wszystkich kolegów z zespołu i porównać wygląd i lokalizację wizualizowanej organelli wewnątrzkomórkowej w komórkach różnego typu.

RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNE

Barwienie przyżyciowe siateczki śródplazmatycznej barwnikiem DiOC₆ oraz jąder komórkowych barwnikiem Hoechst 33342

1. Przygotować 1 ml roztworu barwników DiOC₆ (w stężeniu 2,5 µg/ml) oraz Hoechst 33342 (w stężeniu 1 µg/ml) w ciepłej pożywce hodowlanej (odpowiednio rozcieńczyć przygotowane roztwory wyjściowe podanych barwników).
2. Wybrać do doświadczenia jedną szalkę z komórkami wysianymi na szkiełku, oglądnąć komórki w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym.
3. Usunąć pożywkę hodowlaną z szalki, po czym natychmiast zalać komórki 1ml pożywki (o temp. 37°C) zawierającej mieszaninę barwników DiOC₆ i Hoechst 33342.
4. Szalkę z komórkami umieścić na **10 min** w inkubatorze (37°C, 5% CO₂)
5. Po zakończonej inkubacji zlać pożywkę z szalki, a szkiełko z komórkami przepłukać delikatnie 3 razy PBS z jonami wapnia i magnezu (o temp. 37°C).
6. Do komory do barwień przyżyciowych nakropić 30 mikrolitrów pożywki i przełożyć szkiełko z komórkami – komórkami do dołu – do komory.
7. Przygotowany preparat obejrzeć w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Zamieścić w raporcie krótki opis preparatu (widoczne organelle, rysunek, opis i podpis).
8. Przełączyć mikroskop do pracy w epi-fluorescencji (zmienić obiektywy, włączyć odpowiedni zestaw filtrów).
9. Obejrzeć preparat przy wzbudzeniu UV oraz światłem niebieskim. Porównać obrazy komórek w kontraście-faz i w epi-fluorescencji. Określić % komórek dzielących się oraz dokonać obserwacji komórek w różnych fazach mitozy.
10. Obserwacje oraz wszelkie uwagi do przygotowanych preparatów (czyli tzw. „dyskusję wyników”) opisać w raporcie z ćwiczeń.
11. Obejrzeć preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów wykonane na komórkach tego samego typu, w których wybarwiono inne organelle komórkowe.

BŁONA KOMÓRKOWA

**Barwienie przyżyciowe błony komórkowej barwnikiem DiIC₁₈
oraz jąder komórkowych barwnikiem Hoechst 33342**

1. Przygotować 1 ml roztworu barwnika DiIC₁₈ o stężeniu 9 μM, przez rozcieńczenie roztworu wyjściowego (0,9 mM) pożywką hodowlaną (o temperaturze 37°C).
2. Zlać płyn hodowlany z otrzymanej szalki z komórkami, dodać 1 ml wcześniej przygotowanej pożywki z barwnikiem. Szalkę umieścić na **50 min** w inkubatorze (37°C, 5 % CO₂).
3. Po zadanym czasie inkubacji do szalki z komórkami, do pożywki zawierającej barwnik DiIC₁₈, dodać barwnik Hoechst 33342 w takiej objętości, aby jego stężenie końcowe w płynie hodowlanym wyniosło 1 μg/ml, dokładnie wymieszać pożywkę i szalkę ponownie umieścić na **10 min** w inkubatorze.
4. Po zakończonej inkubacji szkiełko z komórkami 3x delikatnie przepłukać ciepłym PBS z jonami wapnia i magnezu.
5. Do komory do barwień przyżyciowych nakropić 30 mikrolitrów pożywki i przełożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami – komórkami do dołu – do komory.
6. Przygotowany preparat obejrzeć w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Zamieścić w raporcie krótki opis preparatu (widoczne organelle, rysunek, opis i podpis).
7. Przełączyć mikroskop do pracy w epi-fluorescencji (zmienić obiektywy, włączyć odpowiedni zestaw filtrów).
8. Obejrzeć preparat przy wzbudzeniu UV oraz światłem zielonym. Porównać obrazy komórek w kontraście-faz i w epi-fluorescencji. Określić % komórek dzielących się oraz dokonać obserwacji komórek w różnych fazach mitozy.
9. Obserwacje oraz wszelkie uwagi do przygotowanych preparatów (czyli tzw. „dyskusję wyników”) opisać w raporcie z ćwiczeń.
10. Obejrzeć preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów wykonane na komórkach tego samego typu, w których wybarwiono inne organelle komórkowe.

MITOCHONDRIA

**Barwienie przyżyciowe mitochondriów Rodaminą 123
oraz jąder komórkowych barwnikiem Hoechst 33342**

1. Przygotować 1 ml roztworu Rodaminy 123 o stężeniu 1 µg/ml pożywce hodowlanej (o temp. 37°C).
2. Wybrać do doświadczenia jedną szalkę z komórkami wysianymi na szkiełku, oglądnąć komórki w mikroskopie odwróconym.
3. Usunąć pożywkę hodowlaną z szalki, po czym natychmiast zalać komórki 1 ml przygotowanego roztworu Rodaminy 123 (o temp. 37°C).
4. Szalkę z komórkami umieścić na **50 min** w inkubatorze (37°C, 5% CO₂).
5. Po zadanym czasie inkubacji, do w szalki z komórkami (do pożywki zawierającej Rodaminę 123) dodać barwnika Hoechst 33342 w takiej ilości, aby jego stężenie w medium wyniosło 1 µg/ml, po czym pożywkę dokładnie wymieszać i szalkę ponownie umieścić w inkubatorze na **10 min**.
6. Po zakończonej inkubacji zlać pożywkę z szalki, a szkiełko z komórkami przepłukać delikatnie 3 razy PBS z jonami wapnia i magnezu (o temp. 37°C).
7. Do komory do barwień przyżyciowych nakropić 30 mikrolitrów pożywki i przełożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami – komórkami do dołu – do komory.
8. Przygotowany preparat obejrzeć w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Zamieścić w raporcie krótki opis preparatu (widoczne organelle, rysunek, opis i podpis).
9. Przełączyć mikroskop do pracy w epi-fluorescencji (zmienić obiektywy, włączyć odpowiedni zestaw filtrów).
10. Obejrzeć preparat przy wzbudzeniu UV oraz światłem niebieskim. Porównać obrazy komórek w kontraście-faz i w epi-fluorescencji. Określić % komórek dzielących się oraz dokonać obserwacji komórek w różnych fazach mitozy.
11. Obserwacje oraz wszelkie uwagi do przygotowanych preparatów (czyli tzw. „dyskusję wyników”) opisać w raporcie z ćwiczeń.
12. Obejrzeć preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów wykonane na komórkach tego samego typu, w których wybarwiono inne organelle komórkowe.

LIZOSOMY

**Barwienie przyżyciowe lizosomów barwnikiem Lyso-Tracer Red 99
oraz jąder komórkowych barwnikiem Hoechst 33342**

1. Przygotować 1 ml roztworu barwnika Lyso-Tracer 99 o stężeniu 75nM, przez rozcieńczenie roztworu wyjściowego (0,75 μ M) ciepłą pożywką hodowlaną.
2. Wybrać do doświadczenia jedną szalkę z komórkami wysianymi na szkiełku, oglądnąć komórki w mikroskopie odwróconym.
3. Usunąć pożywkę hodowlaną z szalki, po czym natychmiast zalać komórki 1ml przygotowanego roztworu barwnika Lyso-Tracer 99 (o temp. 37°C).
4. Szalkę z komórkami umieścić na **50 min** w inkubatorze (37°C, 5% CO₂).
5. Po zadany czasie inkubacji, do w szalki z komórkami (do pożywki zawierającej Lyso-Tracer 99) dodać barwnika Hoechst 33342 w takiej ilości, aby jego stężenie w medium wyniosło 1 μ g/ml, po czym pożywkę dokładnie wymieszać i szalkę ponownie umieścić w inkubatorze na **10 min**.
6. Po zakończonej inkubacji zlać pożywkę z szalki a szkiełko z komórkami przepłukać delikatnie 3 razy PBS z jonami wapnia i magnezu (o temp. 37°C) .
7. Wyczyścić komorę do oglądania żywych komórek i szkiełko nakrywkowe.
8. Do komory do barwień przyżyciowych nakropić 30 mikrolitrów pożywki i przełożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami – komórkami do dołu – do komory.
9. Przygotowany preparat obejrzyć w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Zamieścić w raporcie krótki opis preparatu (widoczne organelle, rysunek, opis i podpis).
10. Przełączyć mikroskop do pracy w epi-fluorescencji (zmienić obiektywy, włączyć odpowiedni zestaw filtrów).
11. Obejrzyć preparat przy wzbudzeniu UV oraz światłem zielonym. Porównać obrazy komórek w kontraście-faz i w epi-fluorescencji. Określić % komórek dzielących się oraz dokonać obserwacji komórek w różnych fazach mitozy.
12. Obserwacje oraz wszelkie uwagi do przygotowanych preparatów (czyli tzw. „dyskusję wyników”) opisać w raporcie z ćwiczeń.
13. Obejrzyć preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów wykonane na komórkach tego samego typu, w których wybarwiono inne organelle komórkowe.

Referat: Mikroskopia fluorescencyjna w badaniach struktury i funkcji komórek

Zakres materiału, jaki należy przygotować do ćwiczeń:

- Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego (schematyczny rysunek)
- Barwniki fluorescencyjne stosowane w biologii komórki
- Zastosowanie fluorescencji w biologii komórki i diagnostyce klinicznej
- Budowa i funkcje podstawowych organelli wewnątrzkomórkowych
- Metody „przyżyciowej” wizualizacji w komórce poszczególnych organelli

Zalecana literatura:

- B. Alberts i in.: *Podstawy biologii komórki*, PWN 2005, część druga [PL]
Rozdział 15: Przedziały wewnątrzkomórkowe i transport
- Wincenty M. Kilariski: *Strukturalne podstawy biologii komórki*, PWN 2013 [PL]
Rozdziały: IV. Organizacja cytoplazmy
5.1. Układ endosomowy i lizosomy (5.2)
6.1. Struktura mitochondriów
VIII. Cykl życiowy komórki i jej podział
- G. Karp: *Cell biology, Seventh Edition: International Student Version*, Wiley [ENG]
Rozdział 18.1: Methods in cell biology: the light microscope

Pomocne strony internetowe:

- Mikroskopia fluorescencyjna w badaniach struktury i funkcji komórek [PL]:
<http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Kaluzny05>
- Introduction to fluorescence microscopy NIKON [ENG]:
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- Fluorescence microscopy OLYMPUS [ENG]:
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>
- Introduction to fluorescence microscopy ZEISS [ENG]:
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>
- Introduction to Live Cell Imaging Techniques NIKON [ENG]:
<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/>

Ciekawe filmy i wizualizacje:

- Zobaczć ukryte: Mikroskopia fluorescencyjna [PL]:
a) Jak działa mikroskop fluorescencyjny?
<http://scholaris.pl/resources/run/id/52154>
Ekran interaktywny (przełączanie stron w prawym górnym rogu (a oraz b))
<http://www.scholaris.pl/resources/run/id/58825>
- Microscope working in animation [ENG]:
<https://www.youtube.com/watch?v=PCJ13LjncMc>
- Microscopy: Introduction to Fluorescence Microscopy (Nico Stuurman) [ENG]:
<https://www.youtube.com/watch?v=AhzhOzgYoqw>