Zastosowania zautomatyzowanych systemów mikroskopowych do poklatkowej rejestracji procesów biologicznych

PRAKTIKUM Z BIOLOGII KOMÓRKI
(BT 206, BT 231)

Zastosowania zautomatyzowanych systemów mikroskopowych do poklatkowej rejestracji procesów biologicznych

Jedną z możliwości zastosowania automatycznych mikroskopów fluorescencyjnych wyposażonych w kamery CCD jest ich użycie do poklatkowej rejestracji procesów biologicznych. Zapisy tego rodzaju mają w biologii komórki długą historię. Początki stosowania takich metod sięgają lat pięćdziesiątych, kiedy to Rose, Abercrombie i Ambrose zastosowali filmowe metody zdjęć poklatkowych i analizy klatka po klatce otrzymanego materiału. Metody te wniosły wiele do badań biologii komórki. Jednak ich zastosowanie było ograniczone przez praco- i czasochłonność. Prawdziwy przełom przyniosło dopiero zastąpienie w latach osiemdziesiątych metod filmowych, rejestratorami sygnału video a następnie bezpośrednio sygnału cyfrowego i zastosowanie do ich analizy metod komputerowej analizy obrazu. Podstawowym elementem układu pozwalającego na rejestrację zjawisk na poziomie pojedynczej komórki jest oczywiście mikroskop. Najpraktyczniejsze z wielu względów są w tym przypadku mikroskopy odwrócone, najlepiej z opcją mikroskopii fluorescencyjnej oraz możliwością zastosowania kontrastu fazowego, interferencyjnego kontrastu Nomarskiego lub Hoffmana. Ponieważ badania komórek muszą w większości przypadków być prowadzone w temperaturze 37°C, konieczne jest dodatkowe zastosowanie komory umożliwiającej utrzymanie potrzebnej temperatury. Często komory takie kontrolują również poziom CO_2. Widziany pod mikroskopem obraz jest przenoszony bezpośrednio do komputera jako obraz cyfrowy i zapisywany w zadanych odstępach czasowych, uzależnionych od kinetyki rejestrowanego procesu. Rejestracja w zależności od badanego procesu może zachodzić albo w trybie mikroskopii fluorescencyjnej albo w świetle przechodzącym.

Celem ćwiczeń jest zapoznanie się z możliwością wykorzystania poznanego na wcześniejszych zajęciach mikroskopu Leica DM IRE2 oraz programu Leica FW4000 do poklatkowej rejestracji procesów biologicznych. Z różnych poznanych wcześniej funkcji mikroskopu na ćwiczeniach wykorzystane zostaną jego możliwości akwizycji obrazu w trybie „time-lapse" z możliwością dowolnego projektowania przez użytkownika trybu pracy (ustawianie parametrów pracy kamery, otwierania i zamykania migawek, zmian filtrów, ustawiania odstępów czasowych, zmiany położenia stolika zarówno w płaszczyźnie x,y,z, możliwość prowadzenia rejestracji obrazów z kilku miejsc preparatu w czasie jednej sekwencji). Wykorzystanie tych możliwości umożliwi w trakcie jednego eksperymentu zarejestrowanie ruchu komórek w kilku wybranych miejscach naczynia hodowlanego, bez konieczności ingerencji użytkownika.

Ponieważ sposób przygotowania takich aplikacji jest zbliżony w systemach oferowanych przez różnych producentów, ćwiczenie umożliwi uczestnikowi kursu bezproblemową a przynajmniej znacznie ułatwioną obsługę tego rodzaju oprogramowania na różnych typach mikroskopów.

Ze względu na ograniczony czas ćwiczeń, do zaprezentowania możliwości sytemu wybrano bardzo dynamiczne pod względem ruchowym komórki *Dictyostelium discoideum,* jednak na podobnych zasadach można przeprowadzić rejestrację dowolnych komórek zmieniając jedynie niektóre parametry doświadczenia takie jak np. czas doświadczenia czy krok czasowy pomiędzy kolejnymi rejestrowanymi klatkami.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z zasadami obsługi automatycznego mikroskopu fluorescencyjnego oraz przeprowadzenie doświadczenia polegającego na wykorzystaniu systemu mikroskopowego do rejestracji migracji komórek w zadanym okresie czasu, przy określonym kroku czasowym oraz wybraniu kilku różnych miejsc analizowanego preparatu.

Przebieg doświadczenia:

I Przygotowanie komórek:

1. 5 ml zawiesiny komórek *Dictyostelium discoideum* przenieść z kolby hodowlanej do probówki i odwirować (5 minut/1000obr).
2. Zawiesić komórki w roztworze 3 ml roztworu Chalkley`a.
3. Zawiesinę komórek wysiać na szlakę Petriego.
4. Po około 10 minutach (gdy komórki będą przyczepione do podłoża i rozpłaszczone) rozpocząć rejestrację zachowania komórek.

II Rejestracja ruchów komórek

1. Uruchom program **Leica FW4000**
2. W oknie Leica FW4000 wybierz **user name – DefaultUser** i naciśnij **Create New Experiment.**
3. W otwtym oknie wpisz nazwę swojego eksperymentu., w oknie **Based on Experiment** wybierz eksperyment **„Ekranwzor”** a następnie **Create New**.
4. W oknie **Enter Information** wpisz krotki opis eksperymentu (w oknie **Comments**) i naciśnij **OK**.
5. Naciśnij przycisk **X/Y.**
6. Okno Live Image Setup:

   Ikony kolorowe – poszczególne kanły dla różnych fluorochromów
   Aparat – zrobienie pojedynczego zdjęcia
   Zielony kwadrat/2 trójkąty – włącznik „żywego” obrazu
   Obiektyw – zmiana obiektywu
   Suwak – ustawianie czasu otwarcia przesłony kamery
   Gain – wzmocnienie obrazu
   Black/White – kontrast
   Lamp – regulacja intensywności świecenia lampy halogenowej

   a) Umieścić pod mikroskopem oglądany preparat
   b) Wybrać obiektyw suchy x20 (plus soczewka x1,5) i ustawić odpowiednie położenie kondensora do pracy w kontraście interferencyjnym Nomarskiego (położenie kondensora: 10/20, pryzmat: C)
   c) Ustawić optymalny kontrast poprzez obrót polaryzatora i ustawienie pryzmatu.

7. Wybrać kanał dla światła przechodzącego (**szara ikona**).Włączyć podgląd obrazu na monitorze (**ikona z zielonym kwadratem**), ustawić odpowiedni czas otwarcia

przesłony - taki aby obraz na monitorze był najlepszy. Wybrać opcję **binning 2x2** i **8 bitowy tryb pracy** (opcja nie jest aktywna w trybie „żywego" obrazu)

8. Uruchomić panel sterowania stolikiem (**Visit sites**) przyciskiem **N**:

    a) Wybrać odpowiednie miejsce na preparacie i zapisać jego współrzędne **xyz**, naciskając w oknie - **Visit sites** przycisk – **Add**
    b) Zmienić położenie stolika joystikiem i zapisać kolejne położenie preparatu
    c) W ten sposób wybrać 3 miejsca na preparacie a następnie przycisnąć – **OK**.

9. Uruchomić panel projektowania sekwencji poklatkowych przyciskiem **T**. Wprowadź czas trwania eksperymentu (**Insert after, Run for** (20 min), **Every** (15 s), **OK**, **OK**, **OK**)
10. Uruchomić zapisywanie obrazu przyciskiem – **Capture.**
11. Obejrzeć zapisane obrazy naciskając przycisk – **Review**, a następnie 2-krotnie klikając miniaturę zarejestrowanego obrazu z wybranej pozycji na preparacie.
12. Dokonać wstępnego elektronicznego przetworzenia obrazów (**Contrast, Apply to all**).
13. Wybrać zestaw obrazów odpowiadający jednemu z wybranych miejsc i wysłać do dalszej analizy (**File, Select required images, ImageSet = Processed, Insert, następnie Stage position = Positionnumber** (wybrane miejsce), **Insert**, (zaznaczyć **limit images to those where**), **OK**.
14. Utwórz z otrzymanej sekwencji prezentację w formacie avi. (**Galery, Export selected images to publishing, Publish, Movie Maker, Check file list, Options** [10 frames per second], **Write avi**, zapisz, pełne klatki, **OK)**,
15. Obejrzeć otrzymaną sekwencję poklatkową

Zagadnienia:

- Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego oraz kamer CCD
- Podstawowe pojęcia dotyczące komputerowej analizy obrazu
- Metody określania aktywności ruchowej komórek

Zalecana literatura:

- Podstawy biologii komórki, Wprowadzenie do biologii molekularnej pod redakcją B. Alberts`a.
- http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/index.html
- Z.Madeja. Wpływ homo- i heterotypowych oddziaływań komórka-komórka na aktywność ruchową komórek nowotworowych. Seria Wydawnicza Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UJ. Kraków 2002. str 20-26