

BIOLOGIA KOMÓRKI

Separacja komórek zwierzęcych w gradiencie gęstości

WSTĘP

W wielu dziedzinach nauk przyrodniczych istnieje potrzeba stosowania określonej liczby komórek o wysokiej czystości i żywotności. Dotyczy to szczególnie komórek do zastosowań biotechnologicznych i komórek stosowanych w celach terapeutycznych. Obecnie dostępny jest szeroki wybór technik separacji komórek takich jak cytometria przepływowa (FACS) lub sortowanie magnetyczne (MACS), które opierają się na kryteriach fizycznych (rozmiar, gęstość), ładunku elektrycznym i znacznikach immunologicznych. Techniki te w wielu wypadkach nie dają jednak oczekiwanych rezultatów rozdziału i zadowalającej liczby oczyszczonych komórek. Stąd ciągle poszukiwane są i udoskonalane nowe metody separacji komórek. Separacja komórek pełni kluczową rolę w badaniach podstawowych i praktyce klinicznej. Badania przeprowadzane na komórkach hodowanych oraz organellach komórkowych takich jak lizosomy, mitochondria, jadra komórkowe i rybosomy często wymagają wysoko oczyszczonego materiału. Obecnie coraz bardziej zaznacza się zapotrzebowanie na skuteczne metody separacji, identyfikacji i charakteryzacji różnych typów komórek. Zagadnienia te dotyczą szczególnie takich dziedzin jak: immunologia, hematologia, biologia komórki, patologia kliniczna i onkologia.

Wśród wielu stosowanych technik separacji komórek ważną grupę stanowią metody oparte na zjawisku sedymentacji. Do technik tych zaliczamy różnego rodzaju wirowania. Wirowania były stosowane w laboratoriach chemicznych od 1852r, a jako metoda separacji komórek ssaczych zostały wprowadzone przez Mela w 1963r. W rotorze wirówki wytwarzana jest siła kilkuset krotnie przewyższająca ziemską grawitację. Następuje opadanie cząstek (komórek) i ustawianie się ich w równowadze do gradientu stężeń (wirowanie izopikniczne). W procesie wirowania następuje migracja komórek w gradiencie, gdy ich molekularna gęstość jest zrównoważona gęstością separującego roztworu dana grupa komórek zajmuje zwarte określone miejsce. Po zakończeniu wirowania można pożądane frakcje zebrać i użyć do dalszych eksperymentów. Przed rozpoczęciem wirowania należy dobrać szereg parametrów takich jak wartość siły odśrodkowej, czas wirowania, gęstość i lepkość medium oraz rodzaj rotoru. Wirowanie izopikniczne prowadzi do separacji komórek różniących się gęstością. Różnice gęstości są obserwowane pomiędzy poszczególnymi typami komórek, a w trakcie wielu procesów fizjologicznych dochodzi do zmian gęstości komórek. W obrębie rosnącej chrząstki występują komórki na różnym stopniu zróżnicowania a wraz z ich dojrzewaniem zmniejsza się ich gęstość wypornościowa. Do zmiany gęstości wypornościowej komórek dochodzi także w trakcie dojrzewania makrofagów. Najdojrzałe makrofagi cechują się najmniejszą gęstością wypornościową. Makrofagi separowane w oparciu o różnice ich gęstości wypornościowej wykazują różnice w rozmiarach, powinowactwie do lektyn i ekspresji antygenów. Badacze apoptozy wskazują na trudność pozyskiwania komórek będących na poszczególnych stadiach tego procesu. Prowadzone obecnie badania sugerują, że w komórkach wchodzących w kolejne stadia apoptozy dochodzi do stopniowego zwiększania gęstości wypornościowej.

Niestety, dopóki nie uda się skutecznie oddzielić od siebie komórek prezentujących odrębne funkcje, będących w różnych fazach cyklu komórkowego, lub na różnych stopniach zróżnicowania, będzie bardzo trudno badać molekularne mechanizmy zaangażowane w rozpoznawanie się, specjalizację, interakcję komórkową, cytotoksyczność i transformację nowotworową komórek.

CEL ĆWICZENIA

Część teoretyczna ćwiczenia ma na celu zapoznanie studenta z podstawowymi technikami separacji komórek, ich zaletami oraz ograniczeniami. W części praktycznej student dokona próby rozdzielenia komórek żywych i martwych poprzez wirowanie w gradiencie gęstości. W trakcie wykonywania ćwiczenia student zapozna się także z podstawami obsługi licznika cząstek Coulter Z2.

Warunkiem zaliczenia ćwiczenia jest wykonanie ćwiczenia oraz sporządzenie krótkiego sprawozdania zawierającego opis ćwiczenia, opracowane wyniki oraz ich analizę.

WYKONANIE ĆWICZENIA

Materiały

- probówka z komórkami linii WC 256 (komórki żywe)
- probówka z komórkami linii WC 256 (komórki martwe utrwalone formaldehydem)
- roztwór FDA (25µg/ml)
- roztwór bromku etydyny (10µg/ml)
- PBS bez jonów Ca i Mg
- 9 probówek z roztworami dekstranu o masie cząsteczkowej 15-20 tyś o stężeniach w zakresie 1 - 15%
- 1 probówka z 1,5% roztworem metylocelulozy (o lepkości 15 cp)

Wykonanie

Przy pomocy hemocytometru Burkera obliczyć liczbę komórek WC 256/ ml w otrzymanych zawiesinach

Część I. Określenie liczby komórek linii WC 256 w poszczególnych probówkach przy użyciu licznika cząstek Coulter Z2.

1. Z probówki z komórkami żywymi pobrać 100 µl zawiesiny, przenieść do czystej probówki i uzupełnić roztworem PBS do objętości 10ml. **Komórki uprzednio dobrze rozpipetować.**
2. Zawiesinę komórek dobrze wymieszać, a następnie przenieść do kuwety pomiarowej i umieścić w liczniku cząstek.
3. **Pod kontrolą asystenta grupy** ustawić zakres pomiaru średnicy komórek na 10- 18µm i uruchomić zliczanie komórek
4. Otrzymany wynik to liczba komórek w 1ml badanej zawiesiny.
5. Obliczyć liczbę komórek w zawiesinie wyjściowej.
6. Procedurę pomiaru powtórzyć dla komórek martwych

Porównać wynik liczenia komórek przy pomocy hemocytometru Burkera i licznika cząstek Coulter Z2. Wziąć pod uwagę czas przygotowania preparatów do pomiaru, czas i wydajność pomiaru oraz dokładność otrzymanych wyników.

Po określeniu liczby komórek:

7. Obliczyć objętość, w jakiej znajduje się 500 tys. Komórek żywych i przenieść ją do nowej probówki. Czynność powtórzyć z komórkami martwymi.
8. Do probówki z komórkami żywymi dodać roztworu FDA w stosunku 1:1 i umieścić na 5 minut w cieplarni.
9. Do probówki z komórkami martwymi dodać roztwór bromku etydy w stosunku 1:1 i umieścić na 5 minut w cieplarni.
10. Obie probówki dopełnić do 10 ml roztworem PBS, odwirować (5min, 1000r.p.m), nadsączyć zlać, osad zawiesić w 100µl roztworu PBS bez jonów Ca i Mg i dobrze rozpipetować. Następnie komórki wymieszać z 0,5ml roztworu metylocelulozy (probówka „M”).

Część II. Budowanie gradientu oraz rozdział komórek.

1. Rozpocząć nawarstwianie gradientu przez kolejne nalewanie na siebie roztworów dekstranu od najwyższego stężenia do najniższego (jako pierwszy nakładany jest roztwór nr 1, po nim kolejno aż do nr 9). Nawarstwianie należy przeprowadzać bardzo powoli, nie dopuszczając do mieszania się poszczególnych warstw.
2. Otrzymany gradient obejrzeć bardzo ostrożnie pod światło. W dobrze nałożonym gradiencie widoczne będą granice poszczególnych warstw.
3. Otrzymałą uprzednio zawiesinę komórek żywych i martwych w metylocelulozie delikatnie nawarstwić na przygotowany gradient dekstranu.
4. Wirować przez 5 min przy 1500 r.p.m.

Część III. Weryfikacja wyniku.

1. Odwirowane probówki z komórkami delikatnie przenieść nad stolik fluorescencyjny. Obserwować świecenie na czerwono i zielono w różnych miejscach probówki.
2. Przy pomocy strzykawki z długą igłą pobrać ok. 1ml płynu z rejonu świecącego na kolor zielony.
3. Zebraną zawiesinę dopełnić roztworem PBS bez jonów do 5ml i odwirować przy 1000rpm przez 5 min.
4. Oglądając preparat w mikroskopie fluorescencyjnym obliczyć żywotność komórek w otrzymanej frakcji (% żywych komórek).

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- rodzaje wirowań
- roztwory stosowane do przygotowania gradientów oraz rodzaje gradientów i sposoby ich przygotowania
- kryteria separacji komórek
- potrzeba separacji komórek

Literatura

- L. Stryer „Biochemia” sedymentacja, prędkość 52; równowagowa 52,71; w gradiencie sacharozy 319; współczynnik S 51,52; wirowanie 52, 85, 86, 99, 100, 848, 874, 1049 (strony podane dla starego wydania)
- S. Stokłosa „Hodowla komórek i tkanek” rozdz.7- Rozdzielanie i identyfikowanie komórek.
- Krótkie wykłady „Biologia molekularna” sekcja A2 – Izolacja organelli.
- B. Alberts „Podstawy biologii komórki”- hasła; wirowanie różnicowe, sedymentacja