

ĆWICZENIE 4: Mikroskopia konfokalna

Wprowadzenie

1. Wizualizacja komórek

Poznanie organizacji strukturalnej komórek żywych organizmów jest warunkiem koniecznym dla zrozumienia ich funkcjonowania w organizmie. To, czego możemy dowiedzieć się o komórkach zależy od narzędzi, którymi dysponujemy, a znaczne postępy w biologii komórki często są wynikiem wprowadzenia nowych technik mikroskopowych.

Mikroskopy optyczne, które wykorzystują światło widzialne do oświetlenia preparatów, są wciąż podstawowym narzędziem w badaniach biologii komórki. W celu lepszego uwidocznienia komórek i ich składników pod mikroskopem, często stosuje się różnego rodzaju barwienia, pozwalające na zróżnicowanie morfologii komórek. Przykładem jest barwienie metodą Giemsy, bardzo często wykorzystywane do odróżnienia jądrowej i/lub cytoplazmatycznej morfologii płytek krwi oraz czerwonych i białych krwinek. Zastosowanie klasycznego mikroskopu świetlnego, ze względu na jego małą zdolność rozdzielczą, ogranicza jednak możliwość dokładnej obserwacji struktur wewnątrzkomórkowych.



Rysunek 1. Mikroskop optyczny

Ze względu na intensywny wzrost zainteresowania szybkimi i precyzyjnymi technikami pozwalającymi na monitorowanie zmian morfologicznych i fizjologicznych komórek mikroorganizmów, mikroskopia optyczna jest wciąż bardzo ważna, zwłaszcza z powodu rozwoju metod specyficznego znakowania i obrazowania poszczególnych składników komórkowych oraz rekonstrukcji ich trójwymiarowej struktury. Ważną zaletą jest fakt, że w mikroskopii optycznej światło jest stosunkowo „nieniszczące”, dzięki czemu możliwe jest, na przykład oznakowanie określonych składników komórek za pomocą markerów fluorescencyjnych, takich jak białko zielonej fluorescencji (GFP), umożliwiając obserwację ich ruchów i interakcji w żywych komórkach.

Najpopularniejszym sposobem wizualizacji komórek jest stosowanie **barwienia fluorescencyjnego** i obserwacje mikroskopowe przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub konfokalnego. Mikroskopia fluorescencyjna jest odmianą mikroskopii świetlnej. Zasada działania mikroskopów fluorescencyjnych opiera się na zjawisku fluorescencji, czyli emitowaniu światła widzialnego w wyniku naświetlania obiektu promieniami ultrafioletowymi, niebieskimi lub zielonymi. Umożliwia to detekcję i wizualizację sygnału pochodzącego od fluorochromu, czyli substancji zdolnej do emisji światła fluorescencyjnego po wzbudzeniu światłem o określonej długości. Analizowane próbki mogą wykazywać zdolność do naturalnej fluorescencji (np. chlorofil), bądź mogą być wyznakowana barwnikami fluorescencyjnymi (przyłączonymi kowalencyjnie lub poprzez jakikolwiek inny typ oddziaływań fizyko-chemicznych między substancjami) w celu specyficznego wizualizacji określonych struktur sub-komórkowych lub niektórych procesów fizjologicznych.

Badanie w mikroskopie fluorescencyjnym polega na tym, że wyłączone zostaje światło widzialne, a preparat jest oświetlany w ciemnym polu widzenia przez światło o wybranym zakresie długości fal. Jeżeli fluorochrom związał się ze strukturą komórki, np. chromatyną

jądrową, to zacznie po pewnym czasie emitować światło o charakterystycznym dla niego kolorze (np. jodek propidyny na czerwono) i stanie się możliwa obserwacja tylko jąder komórkowych świecących kolorem czerwonym, podczas gdy inne części komórek w ogóle nie będą widoczne.



Rysunek 2. Mikroskop fluorescencyjny.

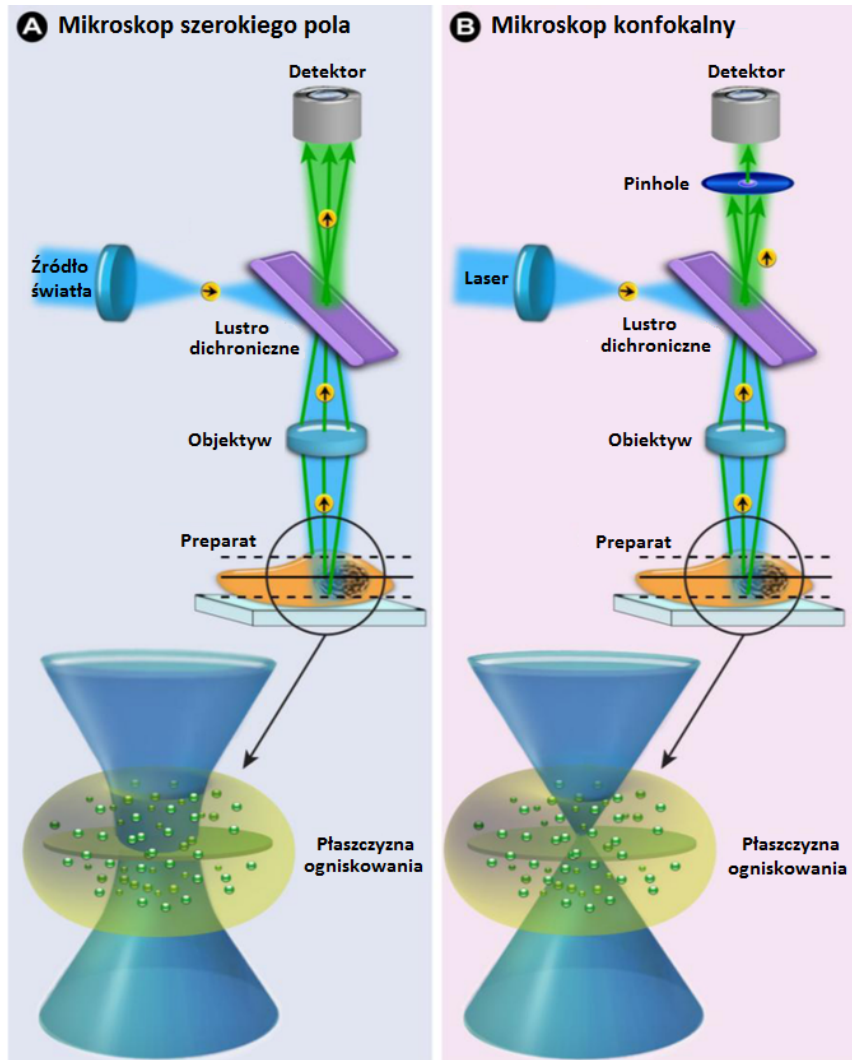
Mikroskopia konfokalna jest bardziej zaawansowaną, nowoczesną odmianą mikroskopii fluorescencyjnej, w której źródłem światła jest laser. Charakteryzuje się ona zwiększonym kontrastem, a zatem i lepszą rozdzielczością. W zwykłej mikroskopii tzw. szerokiego pola (także w mikroskopie fluorescencyjnym), próbka jest oświetlana przez źródło światła w całości. W odpowiedzi na to, albo odbija światło, albo fluoryzuje, a powstałe sygnały zbierane są przez obiektyw. Sygnał docierający do detektora pochodzi nie tylko z miejsca ogniskowania, ale z całego przekroju próbki. Obraz oglądanych obiektów jest ostry i wyraźny tylko w płaszczyźnie ogniskowania, natomiast obrazy obiektów leżących przed i za nią tym bardziej tracą ostrość, im dalej od tej płaszczyzny się znajdują. W wyniku tego uzyskiwany obraz charakteryzuje się wysokim tłem wobec sygnału z miejsca ogniskowania, zmniejszając tym samym kontrast (ostrość konturów). Dodatkowo stosowane w mikroskopii szerokiego pola filtry emisyjne mogą powodować, że fluorescencja z dwóch różnych

zastosowanych znaczników fluorescencyjnych może częściowo na siebie nachodzić, utrudniając prawidłową analizę.

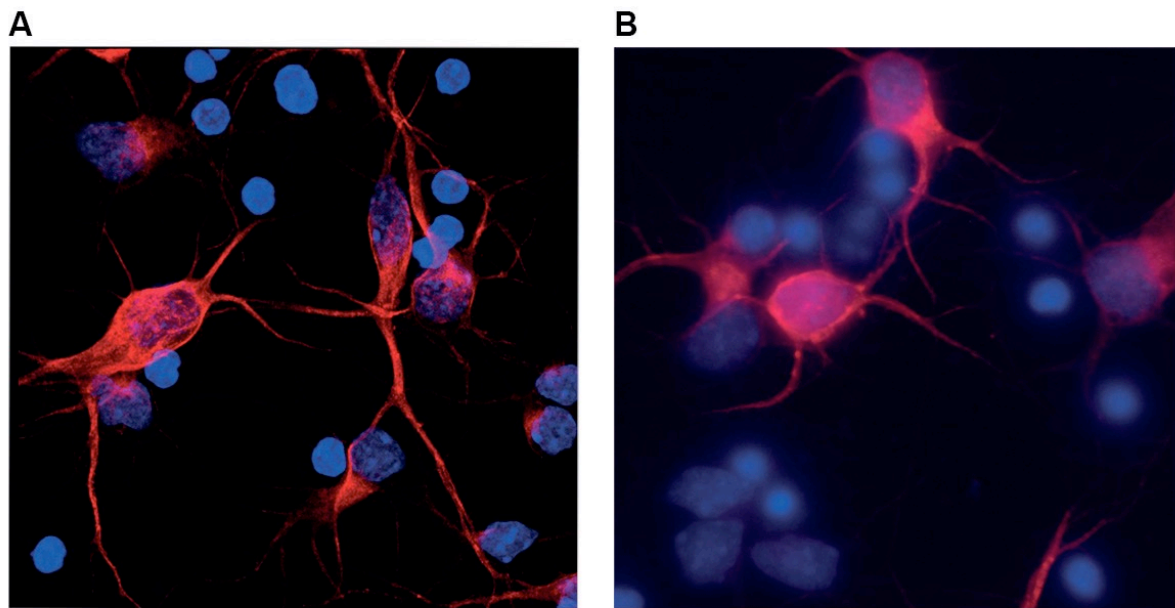
W przypadku mikroskopii konfokalnej, podstawowym założeniem jest wyeliminowanie obrazów pochodzących spoza płaszczyzny ogniskowej poprzez zastosowanie przed detektorem (na przykład kamerą CCD) przesłony konfokalnej (pinhole). Dzięki temu możliwe jest uzyskanie obrazu o wysokiej ostrości i ze znacznie słabszym tłem. Wiązka lasera o odpowiedniej długości fali skupiana jest na pojedynczym punkcie obserwowanego obiektu, a światło odbite od tego punktu przechodzi przez układ optyczny i trafia do detektora. W mikroskopie konfokalnym, w odróżnieniu do mikroskopu fluorescencyjnego, obraz tworzony jest metodą punkt po punkcie, dzięki skokowemu przemieszczaniu się wiązki po obiekcie. Dodatkowo, zmiana położenia przesłony konfokalnej wzdłuż osi optycznej, powoduje zmianę płaszczyzny ogniskowania, co pozwala na uzyskanie szeregu przekrojów badanego obiektu na różnej głębokości. Dzięki tej właściwości możliwe jest tworzenie trójwymiarowego obrazu badanego obiektu. Obrazy otrzymywane przy pomocy mikroskopu konfokalnego najczęściej charakteryzują się wysoką rozdzielczością oraz kontrastem, znacznie przewyższając jakością te, które można wykonać klasycznym mikroskopem szerokiego pola. Mikroskop konfokalny pozwala również odseparować widma emisji dwóch lub więcej różnych znaczników fluorescencyjnych, zmniejszając niebezpieczeństwo pojawienia się zjawiska nakładania się poszczególnych widm podczas obrazowania wyznakowanych preparatów. Dodatkową zaletą mikroskopii konfokalnej jest możliwość prowadzenia badań przyżyciowe (obserwacja komórek w naczyniu hodowlanym).

Jednakże, użytkowanie mikroskopów konfokalnych ma również wady, takie jak: bardzo duży wpływ czynników otoczenia (pomieszczenie, którym znajduje się mikroskop musi być odpowiednio przygotowane), możliwość „wyświecania” preparatów, a także czasochłonność przygotowania preparatów oraz ich obserwacji. Co więcej, rozdzielczość

otrzymywanych obrazów jest wciąż gorsza niż w przypadku mikroskopii elektronicznej.



Rysunek 3. Porównanie ogólnej zasady działania A) mikroskopu szerokiego pola (fluorescencyjnego) oraz B) mikroskopu konfokalnego.

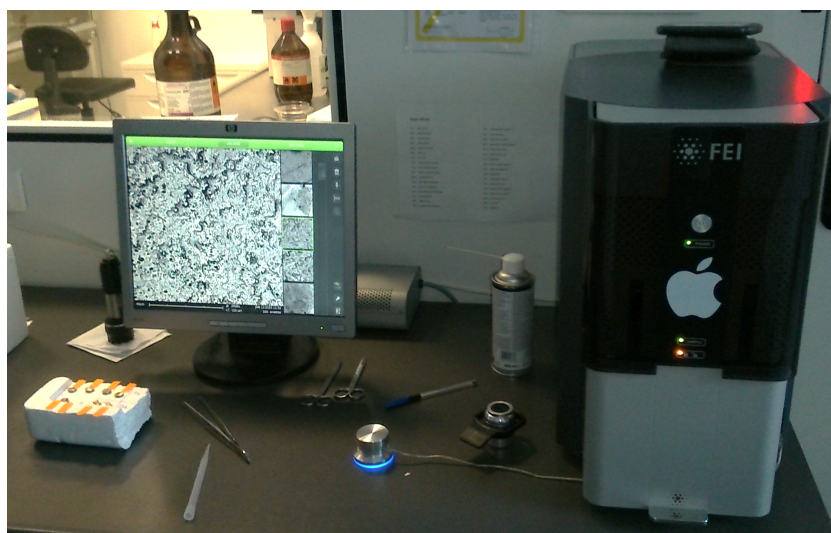


Rysunek 4. Porównanie zdjęć wykonanych przy pomocy A) mikroskopu konfokalnego oraz B) mikroskopu fluorescencyjnego. Rysunek przedstawia komórki neuronalne, w których jądra komórkowe wyznakowano DAPI (kolor niebieski), a α -tubulinę (kolor czerwony) wyznakowano przeciwciałem przeciwko α -tubulinie, skoniugowanym z fluoroforem Alexa 555.



Rysunek 5. Mikroskop konfokalny.

Komórki rosnące na materiale można obserwować przy użyciu **mikroskopu elektronowego**. Zasada działania skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) polega na skanowaniu preparatu wiązką elektronów zogniskowaną na preparacie dzięki cewkom elektromagnetycznym, które w mikroskopach elektronowych działają jako soczewki. W miarę bombardowania każdego kolejnego punktu powierzchni preparatu przez wiązkę elektronów, detektor rejestruje liczbę elektronów rozproszonych lub odbitych, które są następnie przetwarzane na obraz próbki. Mikroskop tworzy wyraziste obrazy trójwymiarowe przedmiotów o dużej głębi ostrości i rozdzielczości (do 0,2 nm).

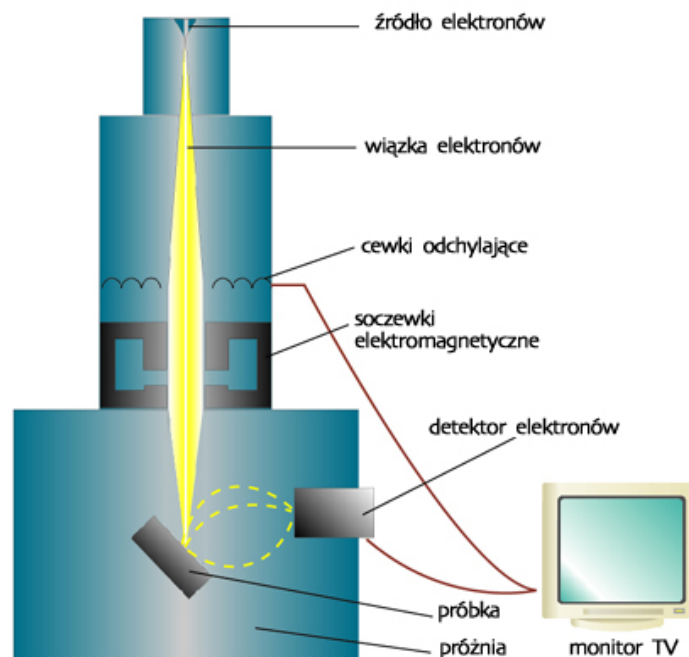


Rysunek 6. Skaningowy mikroskop elektronowy.

Skaningowy mikroskop elektronowy składa się z:

- o działa elektronowego, gdzie wytwarzana jest wiązka elektronów,
- o kolumny, w której następuje przyśpieszenie i ogniskowanie wiązki elektronów,
- o układu próżniowego,
- o komory próbki, w której elektrony wiązki oddziałują z próbką,
- o zestawu detektorów odbierających różne sygnały emitowane przez próbkę,

- o systemu przetwarzania sygnału na obraz.



Rysunek 7. Schemat budowy elektronowego mikroskopu skaningowego.

Skaningowa mikroskopia elektronowa ma jednak pewne ograniczenia. Ze względu na fakt, że próbka podczas analizy znajduje się w wysokiej próżni, musi być ona odporna na warunki próżniowe, a także na bombardowanie elektronami. Jest to bardzo istotne, ponieważ dla prawidłowej obserwacji struktura powierzchniowa obiektu nie może ulec zniszczeniu. Dodatkowym wymogiem przeprowadzenia obserwacji przy użyciu mikroskopu SEM jest przewodzenie ładunku elektrycznego przez powierzchnię preparatu. W przypadku, gdy próbka nie wykazuje przewodnictwa, należy pokryć powierzchnię preparatu cienką warstwą metalu ciężkiego (złota, palladu, srebra, chromu lub miedzi), na przykład poprzez napylenie.

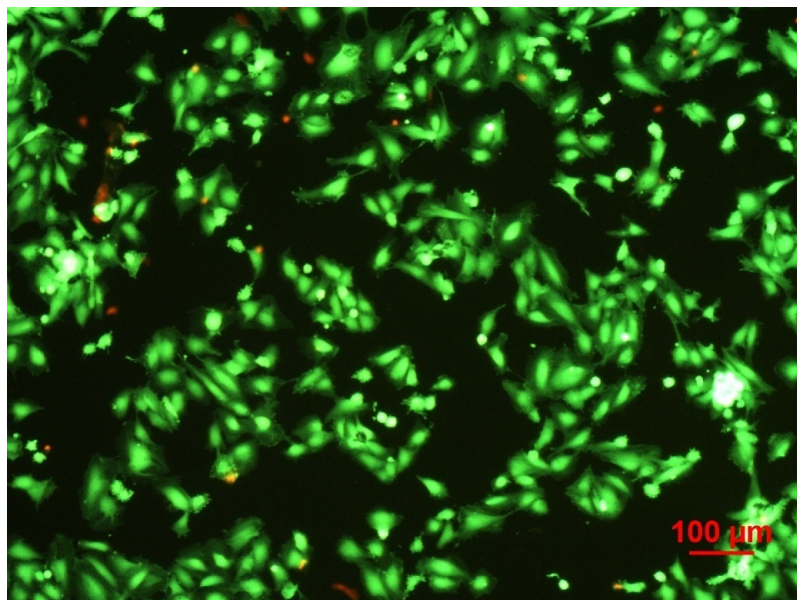
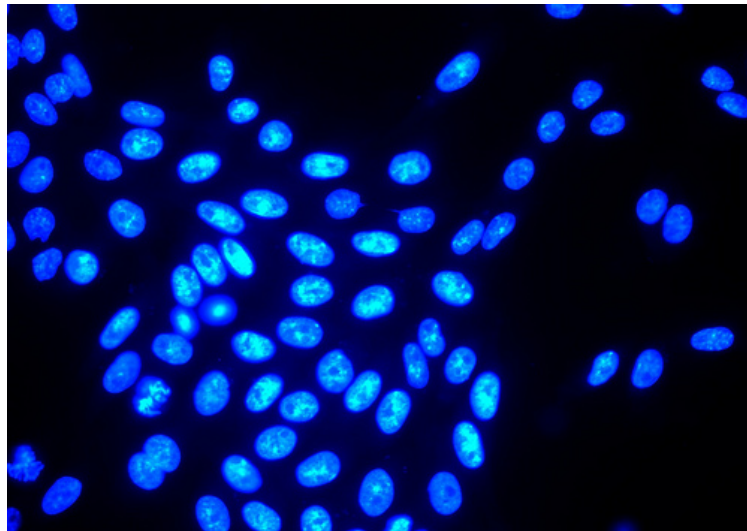
Mikroskopia fluorescencyjna oraz mikroskopia elektronowa stanowią wzajemne uzupełnienie. Mikroskopia elektronowa pozwala na lepszą wizualizację morfologii całej komórki i sposobu ułożenia na powierzchni materiału. Materiał przed analizą należy poddać odpowiedniemu przygotowaniu. Pierwszym etapem jest utrwalenie komórek (paraformaldehyd, aldehyd glutarowy), a następnie odwodnienie

przy użyciu szeregu roztworów o wzrastającym stężeniu etanolu. Opcjonalnie można wykonać osmowanie preparatu przy użyciu czterotlenku osmu - OsO_4 , który tworzy wiązania z fosfolipidami obecnymi w błonie komórkowej poprawiając widoczność tych struktur podczas analizy SEM.

Barwienie fluorescencyjne pozwala z kolei na wybarwienie konkretnych organelli (najczęściej jądra, mitochondria) lub/i szkieletu cytoplazmatycznego i dokładną analizę ewentualnych nieprawidłowości w budowie tych struktur. Popularnym barwnikiem jest Hoechst – barwnik, który posiada zdolność przenikania przez błony komórkowe i interkalacji DNA. Po związaniu z DNA barwnik wzbudzony UV (o długości ok. 345 nm) emituje światło o długości ok. 485 nm, powodując niebiesko-fioletowe zabarwienie jądra komórkowego (rys.3 góra).

Stosowanie odpowiednio dobranej pary barwników pozwala również oszacować żywotność komórek rosnących na materiale. Przykładem może być para barwników: estrowa pochodna kalceiny oraz jodek propidyny. Barwniki te umożliwiają jednoczesną detekcję komórek żywych i martwych (rys. 3 dół). Ester kalceiny jest związkiem silnie lipofilnym, dzięki czemu z łatwością przechodzi przez błony komórkowe, gdzie jest hydrolizowany przez enzymy komórkowe. Powstała w ten sposób kalceina, w przeciwieństwie do jej estru, jest związkiem fluorescencyjnym, który wzbudzony światłem o długości fali 490 nm emituje zielone światło. Zdolność do hydrolizy estru kalceiny mają jedynie komórki żywe, co skutkuje ich „wybarwieniem”. Jodek propidyny natomiast jest związkiem, który nie jest w stanie przejść przez błony komórkowe żywych komórek. Wnika natomiast do wnętrza komórek martwych i uszkodzonych, gdzie dyfunduje do DNA jądrowego i tworzy z nim kompleks, który wzbudzony światłem o długości 490 nm emituje światło czerwone.

Hodowle komórkowe/KKITRIZ - LABORATORIUM
Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja
Aktualizacja: 19/03/2022



*Rysunek 8. Jądra komórkowe wybarwione Hoechst (góra);
komórki wybarwione estrem kalceiny i jodkiem propidyny (dół).*

ĆWICZENIE 4

4.1 Mikroskopia konfokalna - obserwacje

Materiały:

- wybarwione preparaty - polimerowe maty z utrwalonymi komórkami

Wykonanie:

1. Przeprowadzić obserwacje mikroskopowe, zanotować obserwacje
2. Wykonać zdjęcia (3 powtórzenia) dla każdej próbki
3. Policzyc (program ImageJ) liczbę komórek/jednostkę powierzchni, opcjonalnie odsetek powierzchni zajętej przez komórki (w przypadku barwienia aktywny)

Sprawozdanie z ćwiczeń 1-4 powinno zawierać:

- krótką informację nt wykonanych czynności (w punktach)
- gęstość hodowli zmierzoną za pomocą licznika oraz hemocytometru wraz z wyliczeniem żywotności oraz odpowiednimi przeliczeniami dotyczącymi rozcieńczenia zawiesiny do uzyskania pożądanej gęstości
- wyniki analiz cytotoksyczności wraz z wyliczeniem żywotności komórek w próbie badanej, zależnością dawka-żywotność oraz wartością IC50
- zdjęcia CLSM dla danego materiału wraz z wartością liczby kom/mm² oraz odsetkiem powierzchni zajętej przez komórki
- wnioski