

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

Ćwiczenie nr 9.

Techniki analizy uszkodzeń DNA: test kometowy cz. 1.

Proszę przynieść na zajęcia własne rękawice!

UWAGA! Praca z materiałem biologicznym!

Odczynniki:

PBS

DPBS

1% żel agarozowy (agaroz o niskiej temperaturze topnienia) w DPBS

Bufor do elektroforezy: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA w wodze MiliQ, zawsze na świeżo.

Schłodzony bufor lizujący: 100 mM EDTA, 10mM Tris, 2,5M NaCl, 1% Triton X-100 w wodze MiliQ.

Trypsyna

Płyn hodowlany DMEM

Sprzęt:

Miniwirówka

Termoblok 37°C

Aparat do elektroforezy DNA z zasilaczem

Pipety automatyczne

Eppendorfki 2ml

Mikroskop

Szkiełka podstawowe,

Kominki

Zimne wkłady chłodnicze

Test kometkowy (ang. comet assay) jest testem służącym do wykrywania uszkodzeń DNA powstających podczas procesu apoptozy. Metoda polega na przeprowadzeniu elektroforezy pojedynczych unieruchomionych komórek zatopionych w żelu agarozowym. Nie pocięte fragmenty pozostają w jądrze komórkowym, natomiast pocięte ujemnie naładowane fragmenty DNA migrują pod wpływem pola elektrycznego w kierunku anody (+), dając obraz przypominający **kometę**. Kształt powstałej komety zależy od ilości i jakości powstałych uszkodzeń DNA. Powstały ogon jest tym większy im większy jest stopień zaawansowania fragmentacji. Test kometowy, zależnie od pH środowiska elektroforezy, pozwala na wykrycie różnych form uszkodzeń DNA i daje możliwość odróżnienia od siebie dwóch typów śmierci komórkowej, nekrotycznej od apoptotycznej (metoda alkaliczna). W warunkach alkalicznych wykrywane są pęknięcia pojedynczych nici DNA oraz podwójne pęknięcia łańcuchów DNA. Warunki neutralne umożliwiają identyfikację tylko podwójnych pęknięć łańcucha DNA, które charakterystyczne są dla procesu apoptozy, gdyż enzymy tną dwuniciowy DNA między nukleosomami.

Komórki przeznaczone do wykonania testu **kometowego** unieruchamia się w agarozie na szkiełkach mikroskopowych. Następnie w celu przerwania błony komórkowej komórki traktuje się buforem lizującym. Tak przygotowane komórki poddaje się elektroforezie (w warunkach neutralnych w standardowym buforze TBE lub w warunkach alkalicznych). Pod wpływem przyłożonego napięcia pofragmentowane DNA opuszcza komórkę i przemieszcza się w kierunku anody. Po zakończeniu elektroforezy wybarwia się DNA w celu uwidocznienia pociętego DNA. Jeżeli nie doszło do pocięcia

DNA obserwuje się jedynie świecenie w obrębie głowy komety, gdyż nie pocięte DNA jest za duże by mogło opuścić komórkę.

Hodowla komórkowa to metoda umożliwiająca utrzymywanie poza organizmem, czyli *in vitro*, żywych komórek przez dłuższy okres czasu. W odpowiednich warunkach, komórki proliferują, czyli rozmnażają się. Proliferacja umożliwia uzyskiwanie materiału badawczego do różnych doświadczeń.

Zadanie 1.

Celem testu **kometowego** jest sprawdzenie czy przeprowadzone wcześniej doświadczenia na komórkach (np. inkubacja ze związkami, czy różnego rodzaju terapie przeciwnowotworowe) doprowadzają komórki do śmierci komórkowej: nekrotycznej czy apoptotycznej. Komórki przeznaczone do wykonania testu **kometowego** po wcześniej przeprowadzonych doświadczeniach, należy poddać trypsynizacji.

1. Od prowadzącego otrzymasz **komórki**, które znajdują się na **dnie szalki**. Jest to hodowla monowarstwowa. Po rozsadzeniu na szalkę, komórki przyczepiają się do niej. Proliferyując powiększają swoją liczbę, tworząc jedną warstwę na dnie naczynia.

Sprawdź pod mikroskopem, jaki kształt przybierają przyklejone komórki na dnie szalki. Podpisz szalkę.

2. Proces trypsynizacji.

2A. W celu „oderwania” komórek od podłoża, **usuń** (do brudów/zlewek) przy pomocy pipety 1000 μ l **płyn hodowlany** przechylając lekko szalkę. Usuń dokładnie całą ilość płynu uważając na przyklejone komórki.

2B. Delikatnym strumieniem **nalej do szalki 2 ml roztworu PBS**, poruszaj szalką tak, aby roztwór mógł wypłukać pozostały płyn hodowlany, po czym usuń PBS tak jak w punkcie wyżej. **WAŻNE:** Nie kieruj strumienia płynu bezpośrednio na komórki aby ich mechanicznie nie oderwać od podłoża.

2C. Delikatnym strumieniem **zalej komórki 1 ml roztworu 0.25% trypsyny**. Inkubuj komórki w obecności trypsyny 3-5 minut; Czas trypsynizacji zależy od aktywności trypsyny, typu oraz „kondycji” komórek. W ciepłym środowisku trypsyna działa skuteczniej, dlatego **włóż** szalkę do **termobloku** (37°C) na 3 min.

2D. Po tym czasie sprawdź pod mikroskopem, czy komórki przybrały okrągły kształt i czy luźno unoszą się w zawieszynie. Jeśli nie, to odczekaj dodatkowe 2 minuty, i przenieś ponownie szalkę do termobloku. To kluczowy moment, dlatego zapytaj prowadzącego czy komórki rzeczywiście zdążyły się odkleić.

2E. Dodaj do szalki **0,5 ml płynu hodowlanego** (DMEM). Delikatnie wymieszaj poprzez pipetowanie zawartość w szalce, aby uzyskać jednolitą zawiesinę komórek.

2F. Całość **przenieść** pipetą do eppendorfki (Pamiętaj aby ją podpisać!). Komórki odwiruj **10 min.** na **10000 rpm**. (pamiętaj o przeciwwadze!). Po odwirowaniu **dokładnie!** zlej supernatant. Komórki znajdują się na ścianie eppendorfki (powinien być widoczny pelet).

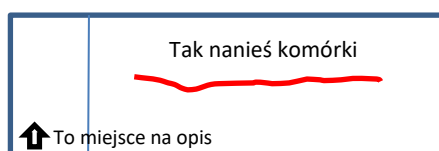
3. Płukanie komórek PBS'em. Do eppendorfki z komórkami dodaj **1 ml roztworu PBS** i tą samą końcówką wymieszaj poprzez pipetowanie, aby uzyskać jednolitą zawiesinę komórek. Komórki **odwiruj 10 min.** na **10000 rpm**. (pamiętaj o przeciwwadze!). Po odwirowaniu **dokładnie!** zlej supernatant.

4. Do eppendorfki z komórkami dodaj **30 μ l roztworu DPBS** i tą samą końcówką wymieszaj poprzez pipetowanie, aby uzyskać jednolitą zawiesinę komórek.

5. Do następnego etapu, czyli nałożenia komórek na szkiełko podstawowe, będą potrzebne:

1% agaroza typu VI w buforze DPBS,
szkiełko podstawowe (to grubsze),
szkiełko nakrywkowe (bardzo cienkie),
wkład chłodniczy.

Wcześniej przygotowana agarozą, aby nie zastygła musi być w temperaturze co najmniej 37°C, dlatego będzie stała w termobloku o temperaturze 37°C. Przygotuj sobie szkiełko podstawowe, podpisz je po matowej stronie. Pobierz **100 µl agarozy i wymieszaj z komórkami, pobierz całość i nanieś na szkiełko podstawowe** na ok. połowę jego długości (patrz rysunek). Od razu nanieś szkiełko nakrywkowe, tak aby zrównały się bokami.



6. Jeśli są bąbelki powietrza, delikatnie naciśnij szkiełko, bąbelek powinien przemieścić się i „ucieć”. Tak przygotowane szkiełka umieść na zimnym wkładzie chłodniczym na około 45 sekund. Obserwuj szkiełko, agarozą nie powinna zamarznąć.

7. Po zestaleniu się agarozy, **zsuń ostrożnie** szkiełko nakrywkowe (tak aby nie naruszyć agarozy) i **zanurz** szkiełko podstawowe w **buforze lizującym** w temperaturze 0 – 4°C na minimum **20 min.** (Prowadzący określi dokładny czas)

8. Po lizie szkiełka **przenieś do buforu do elektroforezy na 20 min.** (tzw. Rozwijanie”, ten etap nie powinien trwać ani dłużej ani krócej).

9. Po skończonym rozwijaniu elektroforezę przeprowadzić w następujących warunkach: natężenie: 490 mA, napięcie: 1,0 – 1,2 V/cm, czas: **20 minut**, temperatura: 0 – 4°C.

10. Po elektroforezie szkiełko płukać w wodzie (2 x 5 minut).

11. Szkiełko suszyć w temperaturze pokojowej przez całą noc lub do czasu barwienia.

ANALIZA szkiełek odbędzie na kolejnych ćwiczeniach.

Utrwalanie i wizualizacja. Szkiełko umieszcza się na 10 minut w roztworze utrwalającym o składzie: 50 g siarczynu cynku, 150 g kwasu trójchlorooctowego, 50 g glicerolu w 1 litrze wody. Następnie szkiełko umieszcza się w wodzie, w celu przepłukania (1 x 1 minut). Szkiełko suszyć całą noc w temperaturze pokojowej. Szkiełko umieszcza się w roztworze barwiącym (srebro, DAPI, Hoechst, PI) na 10 – 20 minut. Barwienie zatrzymuje się w 1 % kwasie octowym (5 minut). Preparat płucze się w wodzie (1 x 1 minutę), a następnie suszy całą noc w temperaturze pokojowej.

Uzyskane komety liczy się przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus. Analizie poddaje się od 100 do 500 komórek. Komórki ocenia się analizując: rozmiar głowy i ogona oraz intensywność ich świecenia.