

Grupa.....

Wrocław,

.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 6.

1. Metody immunocytochemiczne – detekcja białek w preparatach komórkowych.
2. Barwienia histologiczne. Barwienie H&E, znakowanie cytoplazmy, jądra i organelli komórkowych.
3. Metody hybrydyzacyjne – dot blot.

Wstęp teoretyczny

Immunocytochemia zajmuje się wykrywaniem w komórkach substancji o charakterze antygenowym za pomocą znakowanych przeciwciał. Immunocytochemia należy do grupy metod określanych jako techniki **immunohistochemiczne**, w których badanym materiałem obok komórek są tkanki.

Immunohistochemiczne uwidocznienie antygeny w komórce wymaga otrzymania przeciwciał swoistych dla tego antygeny. Wyizolowany metodami preparatyki biochemicznej antygen służy do immunizacji zwierząt laboratoryjnych, które będą później stanowić źródło swoistych przeciwciał.

Stosowane w immunocytochemii przeciwciała mogą być wyznakowane różnymi znacznikami, umożliwiającymi uwidocznienie miejsca wiązania się przeciwciała do znajdującego się w komórce antygeny. Najczęściej obecnie stosowanymi znacznikami są enzymy (peroksydaza chrzanowa, fosfataza zasadowa) oraz szeroka gama fluorochromów (immunofluorescencja). Metody wykorzystujące enzymy jako znaczniki są często bardziej złożone niż metody immunofluorescencyjne, ponieważ wymagają przeprowadzenia dodatkowej reakcji histochemicznej uwidaczniającej aktywność enzymu, którym wyznakowane było przeciwciało. Końcowa reakcja histochemiczna prowadzi do nagromadzenia znacznych ilości barwnego produktu reakcji, co umożliwia uwidocznienie miejsca wiązania znakowanego przeciwciała nawet przy śladowych ilościach antygeny w komórce. Stąd też metody te charakteryzują się wysoką czułością.

Aby ułatwić dostęp przeciwciał do wnętrza komórek i ich wiązanie się z antygenem stosowana jest **permeabilizacja błon komórkowych detergentami** (np. Triton X100). Chociaż wiązanie antygen-przeciwciała charakteryzuje się wysoka specyficznością, istnieje możliwość nieswoistych oddziaływań (np. na drodze oddziaływań elektrostatycznych) między badanym materiałem a białkami osocзовymi, w tym również przeciwciałami. Aby zapobiec tym niespecyficznym reakcjom, przed przeprowadzeniem właściwej reakcji immunohistochemicznej, wykonuje się tzw. **blokowanie**, polegające na inkubacji preparatów z nieaktywną immunologicznie (nie zawierającą swoistych przeciwciał) surowicą innego gatunku zwierzęcia niż to, od którego uzyskano przeciwciała.

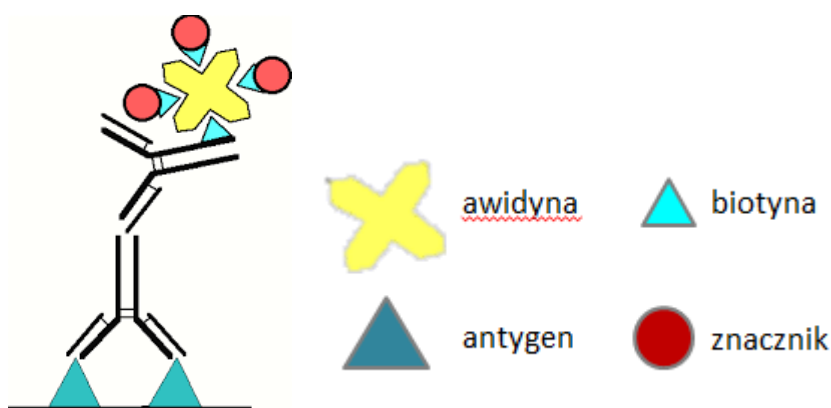
Stosowanie przeciwciał znakowanych enzymami wymaga dodatkowo **unieczynnienia tkankowego enzymu** o takiej samej aktywności jaką wykazuje enzym znacznikowy. Istnieje bowiem możliwość, że

badana tkanka zawiera taki enzym i w reakcji wykrywającej enzym znacznikowy mógłby on powodować pojawienie się zabarwienia w miejscu nie związanym z obecnością antygeny (tzw. reakcja niespecyficzna). Unieczynnienie endogennego enzymu przeprowadza się poprzez inkubację komórek lub tkanki z odpowiednim inhibitorem (w przypadku zastosowania jako znacznika peroksydazy chrzanowej używa się 0,3 – 3% roztworu nadtlenku wodoru) przed wykonaniem właściwej reakcji immunocytochemicznej.

Metoda biotyna – awidyna (metoda ABC)

W metodzie tej wykorzystuje się trwałe i specyficzne oddziaływanie pomiędzy glikoproteiną awidyną, a biotyną. Jedna cząsteczka awidyny przyłącza 4 cząsteczki biotyny. Zwykle biotynę sprzęga się z przeciwciałem drugorzędowym oraz znakuje się enzymatycznie. W tej sytuacji wiązanie awidyna-biotyna pełni rolę łącznika pomiędzy przeciwciałem a znacznikiem. W najpopularniejszym wariantcie tej metody przeprowadza się następujące etapy: 1) inkubacja z nieznakowanym przeciwciałem pierwszorzędowym, 2) inkubacja z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym, 3) inkubacja z kompleksem awidyna – biotynylowana peroksydaza chrzanowa 4) inkubacja z substratem dla peroksydazy (np. diaminobenzdyną).

Metoda ta, mimo że dość czasochłonna jest często stosowana ze względu na bardzo wysoką czułość, a zatem na możliwość wykrywania w komórkach nawet antygenów występujących w śladowych ilościach.



Schemat reakcji immunocytochemicznej metodą ABC.

Zadanie 1.

Przeanalizuj etapy reakcji immunocytochemicznej wykonanej na preparatach utrwalonych komórek z hodowli in vitro i odpowiedz na pytania:

1. Przepłukać preparaty z utrwalonymi komórkami w PBS (1 x 5 min)
2. Zanurzyć komórki w 0,1% Tritonie X100 w PBS przez 10 min
3. Przepłukać w PBS 2 x 3 min
4. Inkubować komórki w roztworze 3% nadtlenku wodoru w PBS przez 10 min
5. Przepłukać w PBS 2 x 3 min
6. Inkubować komórki w obecności 5% - 10% surowicy (w PBS) pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało drugorzędowe przez 10 min.
7. Delikatnie odsączyć nadmiar surowicy.
8. Komórki inkubować w obecności odpowiednio rozcieńczonego przeciwciała pierwszorzędowego przez 20 h w tem. 4°C

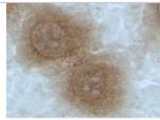
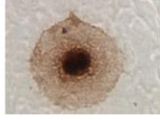
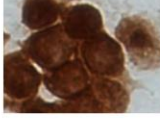
9. Przepłukać buforem PBS 3 x 3 min
 10. Nałożyć przeciwciało drugorzędowe sprzężone z peroksydazą na 20 min w temp. 37°C
 11. Przepłukać buforem PBS 3x 3 min
 12. Przeprowadzić reakcję barwną: komórki inkubować przez 2-7 min w roztworze diaminobenzyny (DAB).
 13. Przepłukać szkiełka wodą bieżącą w celu zakończenia reakcji.
 14. Wybarwienie jąder komórkowych poprzez inkubację w hematoksylinie przez około 5 minut.
 15. Przepłukać szkiełka wodą destylowaną.
 16. Nakleić szkiełka z wybarwionymi komórkami na szkiełka podstawowe używając DPX/balsam kanadyjski.
 17. Oglądać preparaty w mikroskopie świetlnym, porównać ekspresję ocenianego białka.
- Równolegle przygotować kontrolę negatywną na jednym preparacie polegającą na zastąpieniu przeciwciała pierwszorzędowego PBS!

Wyjaśnij w jakim celu stosujemy następujące kroki procedury:

1. Traktujemy komórki 0,1% Tritonem X100 w PBS
2. Inkubujemy komórki w roztworze 3% nadtlenku wodoru:
3. Inkubujemy komórki w obecności 5% - 10% surowicy (w PBS) pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało drugorzędowe

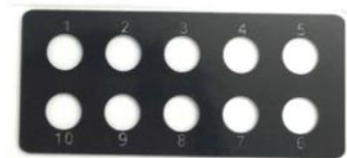
Zadanie 2. Przeanalizuj sposób wykonania oceny immunocytochemicznej preparatów poniżej, a następnie wykonaj samodzielną analizę:

Tabela. Skala intensywności zabarwienia reakcji immunocytochemicznej

Intensywność zabarwienia	Oznaczenie	Przykład
Bez zabarwienia	-	
Słabe zabarwienie	+	
Średnie zabarwienie	++	
Silne zabarwienie	+++	

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla III roku Analityki Medycznej

Wybierz co najmniej 3 preparaty do oceny intensywności reakcji, dokonaj oceny co najmniej 2 dołków objętych reakcją, poniżej przykładowe zdjęcie preparatu:



Wybierz 3 różne przeciwciała. Oceny dokonujemy analizując preparaty w mikroskopie prostym.

Przeciwciało 3	Odczyt 1	Odczyt 2	Odczyt 3
% wybarwionych komórek			
Intensywność zabarwienia			
Średni wynik			

Przeciwciało 3	Odczyt 1	Odczyt 2	Odczyt 3
% wybarwionych komórek			
Intensywność zabarwienia			
Średni wynik			

Przeciwciało 3	Odczyt 1	Odczyt 2	Odczyt 3
% wybarwionych komórek			
Intensywność zabarwienia			
Średni wynik			

Zadanie 3. Barwienie H&E

Barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E) jest najczęściej stosowaną metodą barwienia przeglądowego w histologii. Hematoksylina jest naturalnym barwnikiem pozyskiwanym z amerykańskiego drzewa *Erythroxylon campechianum*. Używa się jej w postaci złożonych roztworów zawierających sole glinu, żelaza, chromu lub wolframu. Zawartość tych metali sprawia, że tkanka przyjmuje barwnik. Elementy zasadochłonne takie jak jądra komórkowe (grupy fosforanowe DNA), rybosomy, depozyty wapnia, bakterie G(+) barwią się na niebiesko (fioletowo). Po barwieniu, należy preparaty długo płukać w bieżącej wodzie, gdyż dopiero po wypłukaniu uzyskuje się czysto niebieskie zabarwienie jąder komórkowych. Eozyna jest bromową pochodną fluoresceiny, jest słabym kwasem i wykazuje silne powinowactwo do kwasochłonnych elementów komórki, takich jak białka cytoplazmy czy białka macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen i elastyna), włókna nerwowe, włókna gęłowe i tym samym barwi je na czerwono (różowo).

Procedura barwienia hematoksyliną i eozyną:

Materiały :

- preparaty komórkowe utrwalone formaliną 4% na szkiełkach mikroskopowych,
- roztwór hematoksyliny
- roztwór eozyny
- szklane „kominki” do barwienia
- Rękawiczki – każdy przynosi swoje!!!

Procedura:

1. Utrwalone komórki na szkiełkach przepłukać w PBS;
2. Przełożyć preparat do kominka z hemetoksyliną i barwić przez 1.5 minuty poprzez zanurzenie w szklanym kominku, można wykorzystać stoper z telefonu);
3. Preparat przenieść do kominka z wodą destylowaną na 5 minut;
4. Płukać preparat pod bardzo delikatnym strumieniem bieżącej wody około 20 minut, aż do uzyskania niebieskiego zabarwienia jąder komórkowych (kontrola pod mikroskopem lub do widocznej makroskopowo zmiany zabarwienia komórek);
5. Umieścić preparat kominka z roztworem eozyny i barwić przez 5 minut poprzez zanurzenie szkiełka do szklanego kominka;
6. Przepłukać preparat wodą destylowaną poprzez zanurzenie szkiełka w szklanym kominku z wodą destylowaną na 2 minuty;
7. Preparat odwodnić umieszczając go w roztworach alkoholu (80%, 90% i 96%) na 1 minutę (pod dygestorium);
8. Preparaty „zamknąć” za pomocą medium do zamykania preparatów – przy pomocy bagietki szklanej nakładamy kroplę medium DPX na szkiełko podstawowe i przykrywamy szkiełkiem nakrywkowym - pod dygestorium - DOKŁADNA KONTROLA PROWADZĄCEGO!!!

Zadanie 4. Analiza metodą dot blot

Metoda dot blot jest podobna zasadą działania do metody western blotting (obie metody pozwalają na identyfikację i analizę białek). Jednak w metodzie dot blot białka nie są rozdzielane przy użyciu elektroforezy a bezpośrednio nanoszone na membranę a następnie wykrywane za pomocą przeciwciał.

Odczynniki:

- Nitroceluloza, pęseta, szalka
- Przeciwciało A –biotynylowane kozie anty- mysie immunoglobuliny IgG
- ExtrAvidin - koniugat awidyny z peroksydazą
- Kazeina w odtłuszczonej 5% mleku
- bufor TBS pH 7,6
- bufor octanowy
- diaminobenzodyna (DAB) do wybarwienia reakcji

Procedura:

1. Pasek nitrocelulozy umieścić na ręczniku papierowym, podpisać ołówkiem rozcieńczenia i obrysować miejsca nanoszenia przeciwciała.

2. W zaznaczone miejsca na bibule nanieść po kropli przeciwciała A w różnych rozcieńczeniach: 1:1, 1:2, 1:5.
3. Wysuszyć ok 10 min. na powietrzu
4. Inkubować w szalce z kazeiną 30 min.
5. Płukać 3x 5 min. w buforze TBS, bufor usunąć z szalki.
6. Na bibułę w szalce nałożyć awidynę skoniugowaną z peroksydazą i inkubować 30 min.
7. Płukać 2x 5min buforem TBS.
8. Płukać 1x 5 min w buforze octanowym, bufor usunąć z szalki.
9. Nałożyć DAB.
10. Odpłukać substrat w wodzie wodociągowej.

Polecenie sprawdzające 1:

Zanotuj obserwacje wybarwienia przeciwciała w zależności od jego stężenia z wykonanego ćwiczenia.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Polecenie sprawdzające 2:

Uzupełnij tabelkę:

Rodzaj rozpoznawanej sekwencji	Nazwa metody hybrydyzacyjnej stosowanej w biologii molekularnej	Stosowana "sonda hybrydyzacyjna"
aminokwasy w białkach		
nukleotydy w RNA		
nukleotydy w DNA		