

Téma: Buněčné jádro a Buněčné kultury

A) Buněčné jádro

Úvod:

Buněčné jádro je organelou eukaryotické buňky. Je v něm uložena většina genetické informace buňky. Jádro je od okolní cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s póry. Jaderná DNA má dvě základní funkce. Jednak řídí veškeré metabolické děje v buňce, tím že dává vzniknout RNA, která je následně translatována do proteinů, další funkcí je pak uchování genetické informace a její přenos do dceřiných buněk. V dospělém organismu se většina buněk již nedělí - je v interfázi. Během interfáze je DNA dekonzenzována a v jádře probíhá transkripce. Během mitózy, která předchází buněčnému dělení, je DNA vysoce konzenzovaná a pozorovatelné jsou jednotlivé chromozómy. Dochází během ní ke zdvojení obsahu DNA a jejímu následnému rozdělení do dceřiných buněk.

Klasickou metodou pro vizualizaci jádra (zviditelnění DNA), které je pak možné pozorovat za pomoci světelné mikroskopie, je Feulgenova reakce, která je založena na redukci kyseliny fuchsinsířčité (Schiffova činidla) aldehydickou skupinou. Principem je kyselá hydrolýza DNA kyselinou chlorovodíkovou, při níž dochází k odštěpení purinových bazí z DNA. V místě jejich odštěpení se na deoxyribózových podjednotkách DNA uvolňují aldehydické skupiny, které redukují Schiffovo činidlo a propůjčují tak DNA červenofialové zbarvení, které je pak snadno detekovatelné světelným mikroskopem.

Další velkou skupinou barviv využívaných k zviditelnění DNA jsou barviva fluorescenční. Fluorescence je schopnost některých látek po ozáření světlem o kratší vlnové délce (excitační záření) emitovat světlo o delší vlnové délce. Lze rozlišit dva typy fluorescence primární/autofluorescenci a sekundární fluorescenci. Autofluorescence je schopnost některých přirozeně se vyskytujících látek, jako je například chlorofyl, fluoreskovat po dopadu UV záření. Sekundární fluorescenci rozumíme fluorescenci barviva tzv. fluorochromu kovalentně navázaného na sledované buněčné struktury. Pro práci s fluorochromy je nutné znát jejich základní vlastnosti jako je jejich excitační a emisní vlnová délka a jejich afinita k buněčným strukturám. Příkladem sondy hojně využívané pro vizualizaci buněčného jádra pomocí fluorescenční mikroskopie je DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol). DAPI je interkalační fluorescenční barvivo, které se váže na DNA do oblastí bohatých na báze adenin a thymin. Excitační a emisní spektra DAPI jsou spolu s některými dalšími používanými fluorescenčními barvivy uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. I: Fluorescenční barviva používaná v buněčné biologii:

Fluorochrom	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
4',6-diamino-2-fenylindol (DAPI)	358	461
Fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)	492	516-525
Tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát (TRITC)	535-545	570-580
Propidium jodid (PI)	535	617
Ethidium bromid	518	605
Fluorescein diacetát (FDA)	490	513
Hoechst-33258	350	450
Akridinová oranž	460	650

Úkol č. 1: Barvení jádra Feulgenovou reakcí

Materiál: naklíčená čočka jedlá (*Lens esculenta*)

Chemikálie: Framerova fixační směs - 96% ethanol : koncentrovaná kyselina octová (3:1); 1N HCl; Schiffovo reagens; destilovaná voda

Pomůcky: kyvety; vodní lázeň; Petriho misky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Z naklíčené čočky vypreparujte z kořínků pomocí skalpelu kořenovou špičku.
2. Oddělené kořenové špičky přeneste do Framerovy fixační tekutiny na Petriho misku. Doba fixace je 15 minut při pokojové teplotě.
3. Po ukončení fixace přeneste kořenové špičky do 1N HCl a nechte hydrolyzovat 10 minut v 1N HCl při 60 °C ve vodní lázni.
4. Poté hydrolyzu zastavte oplachem preparátu destilovanou vodou - 2x 3 minuty.
5. Kořenové špičky vložte do kapky Schiffova reagens na podložní sklo, přiložte krycí sklo a proveďte roztlak.
6. Sklo s preparátem vložte do kyvety s roztokem Schiffova reagens a nechte barvit 25 minut při pokojové teplotě.
7. Po nabarvení preparát vyjměte a zlehka opláchněte destilovanou vodou.
8. Preparát pozorujte pod mikroskopem a do protokolu schematicky zakreslete buňku s obarveným interfázním a mitotickým jádrem a výsledek slovně zhodnoťte.

Úkol č. 2: Barvení jádra pomocí Hoechst-33258

Materiál: buněčná kultura adherentní nádorové linie HeLa (kontrolní a ovlivněná nocodazolem)

Chemikálie: pracovní roztok Hoechst-33258 o koncentraci 1µg/ml v PBS

Pomůcky: fluorescenční mikroskop; automatické pipety + špičky

Postup:

1. Z buněčné kultury odsajte kultivační medium.
2. Napipetujte pracovní roztok Hoechst-33258.
3. Pozorujte inverzním fluorescenčním mikroskopem.
4. Porovnejte rozdíl mezi kontrolním vzorkem buněk a vzorkem buněk ovlivněných nocodazolem.

B) Buněčné kultury

Úvod:

Buněčné kultury patří v současné době k nejpoužívanějším biologickým modelům. Buněčné kultury živočišných buněk slouží pro studium nových léčiv, kultury rostlinných buněk pak nacházejí značný význam ve šlechtitelství a genovém inženýrství při produkci transgenních plodin.

Pro úspěšnou kultivaci buněk musí být splněny podmínky prostředí podobné prostředí *in vivo*, které zajišťují kultivační média a inkubátory. Kultivační médium musí obsahovat vyvážený poměr aminokyselin, cukrů, vitamínů, solí, mastných kyselin, antibiotik a stabilizátorů pH, které jsou nezbytné pro růst buněk. Po určité době buňky v kultuře vyčerpají živiny z média či jejich počet stoupne na neúnosnou míru, proto je nutné část buněk odebrat, smísit s novým médiem a přenést do nové kultivační láhve.

Práce s buněčnými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení a manipulaci. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility, proto je nutno pracovat v aseptickém prostředí, které zabraňuje kontaminaci mikroorganismy (bakterie, viry, houby, paraziti,...). Sterilního prostředí je dosaženo používáním laminárních boxů neboli flowboxů s horizontálním nebo vertikálním prouděním sterilního vzduchu, používáním sterilních nástrojů, pomůcek, roztoků a nádob, a také rozdělením pracovišť na septickou a aseptickou část, dezinfekcí a používáním ochranných pomůcek. Nejjednodušším způsobem, jak vysterilizovat drobnější kovové či skleněné předměty (pinzety), je opláchnutí předmětu 70% ethanolem a následné opálení nad lihovým kahanem. Kromě toho existuje celá řada různých sterilizátorů: parní - autoklávy, horkovzdušné, chemické, radiační. Pro práci v aseptickém prostředí se zásadně doporučuje nošení laboratorního oblečení a gumových rukavic, které se navíc po navléknutí omyjí 70% ethanolem.

Úkol č. 1: Pozorování buněčné kultury inverzním mikroskopem

Materiál: různé buněčné kultury

Pomůcky: inverzní mikroskop

Postup:

1. Seznamte se s použitím inverzního mikroskopu.
2. Pozorujte inverzním mikroskopem různé buněčné kultury v kultivačních lahvích. Sledujte tvar a denzitu buněk.

Úkol č. 2: Práce ve flowboxu

Materiál: různé buněčné kultury

Chemikálie: kultivační média

Pomůcky: flowbox a sada sterilních pomůcek pro práci ve flowboxu

Postup:

1. Před začátkem práce v flowboxu je potřeba zapnout flowbox a zároveň UV záření přibližně na 15 minut.
2. Před prací ve flowboxu otřete pracovní plochu 70% ethanolem. Nasaďte si gumové rukavice a omyjte je 96% ethanolem a nechejte ve flowboxu uschnout.

3. Při práci v boxu je důležité udržovat čistotu a pořádek.
4. V boxu s vertikálním laminárním prouděním je potřeba myslet na to, že NIKDY nepohybujeme rukama či nesterilními pomůckami NAD sterilními předměty, otevřenými nádobami, lahvemi, zkumavkami atp. V případě flowboxu s horizontálním prouděním vzduchu takto nečiníme ZA sterilními předměty.
5. Sterilními špičkami nebo skleněnými pipetami je potřeba manipulovat tak, abychom se nikdy nedotkli ničeho nesterilního.
6. Po ukončení práce je třeba vždy důkladně uklidit pracovní plochu. Tu otřete nejprve destilovanou vodou a poté 70% ethanolem. Pokud jste při práci používali vakuovou pumpu, je potřeba promýt nasávací hadičku 70% ethanolem.

Otázky:

1. Jak se nazývá první buněčná kultura odvozená z lidské tkáně? Kdy byla odvozena a používá se dodnes?
2. Jak se liší inverzní mikroskop od klasického světelného mikroskopu? Proč se využívá k pozorování buněčných kultur v kultivačních nádobách?

Použitá literatura:

- Hejtmánek, M. (2001): Úvod do světelné mikroskopie, Olomouc.
- Vymětalová, V. (2001): Laboratorní cvičení z biologie, Praha.
- AescuLab - systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-203: Práce v aseptickém prostředí, Dolečková.