

NOWOCZESNE METODY MIKROSKOPII OPTYCZNEJ W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest obserwacja układów biologicznych za pomocą współczesnych technik mikroskopii optycznej, takich jak mikroskopia kontrastowo-fazowa, mikroskopia z kontrastem różnicowo – interferencyjnym i mikroskopia fluorescencyjna.

2. Aparatura

- Mikroskop fluorescencyjny IX71 firmy Olympus z kamerą cyfrową
- Zasilacze
- Komputer z oprogramowaniem
- Zestaw odczynników chemicznych

3. Program ćwiczenia

- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii optycznej jasnego pola
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii kontrastowo – fazowej
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii z kontrastem różnicowo – interferencyjnym
- Przygotowanie preparatów do mikroskopii fluorescencyjnej
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej
- Obserwacja procesu migracji komórkowej keratynocytów rybich

4. Tematy do kolokwium

- Podstawowe zjawiska optyczne: dyfrakcja, interferencja, polaryzacja, fluorescencja
- Budowa i zasada działania mikroskopu optycznego
- Budowa i zasada działania mikroskopu kontrastowo – fazowego
- Budowa i zasada działania mikroskopu z kontrastem różnicowo – interferencyjnym
- Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego
- Budowa komórki
- Migracja komórkowa

5. Procedura utrwalania i barwienia komórek (F-aktyna/jądra komórkowe):

- Komórki pobrane z hodowli wypłukać w buforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS, przed płukaniem bufor podgrzać do temperatury ok. 37 st. C
- Następnie komórki utrwalać 3,6% formaldehydem przez 8 min. (roztwór formaldehydu w PBS). Po upływie czasu utrwalania komórki 3-krotnie wypłukać w PBS.
- W celu zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej, komórki poddać działaniu TRITONu w stężeniu 0,1%, czas inkubacji z TRITONEM 3 min. Po upływie tego czasu komórki dokładnie wypłukać w PBS.
- W kolejnym kroku, komórki inkubować z 1% roztworem surowicy bydlęcej FBS (roztwór przygotowany w PBS) przez 20 min, a następnie komórki wypłukać w PBS.
- Dodać barwnik fluorescencyjny. W zależności od rodzaju barwnika, czas inkubacji wynosi:
 - barwienie F-aktyny poprzez kompleks falloidyna-AlexaFluor488: 20-25 min
 - barwienie jąder komórkowych stosując np. DAPI: 4-6 minPodczas inkubacji z barwnikiem preparat należy zabezpieczyć przed ekspozycją na światło.
- Po upływie żadanego czasu inkubacji z barwnikiem próbkę należy dokładnie (3-4x) wypłukać w PBS.

MIKROSKOPIA OPTYCZNA W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

Wprowadzenie

Komórka, jako podstawowa jednostka życia, jest przedmiotem zainteresowania wielu nauk. Począwszy od biochemii, badającej jej skład molekularny, poprzez biologię i medycynę a kończąc na fizyce i biofizyce, które zajmują się określaniem jej parametrów fizycznych. Zrozumienie mechanizmów funkcjonowania pojedynczych komórek jest kluczem do zrozumienia funkcjonowania bardziej złożonych organizmów, dlatego też obserwuje się tak dynamiczny rozwój nauk związanych z mikrobiologią i biologią komórki.

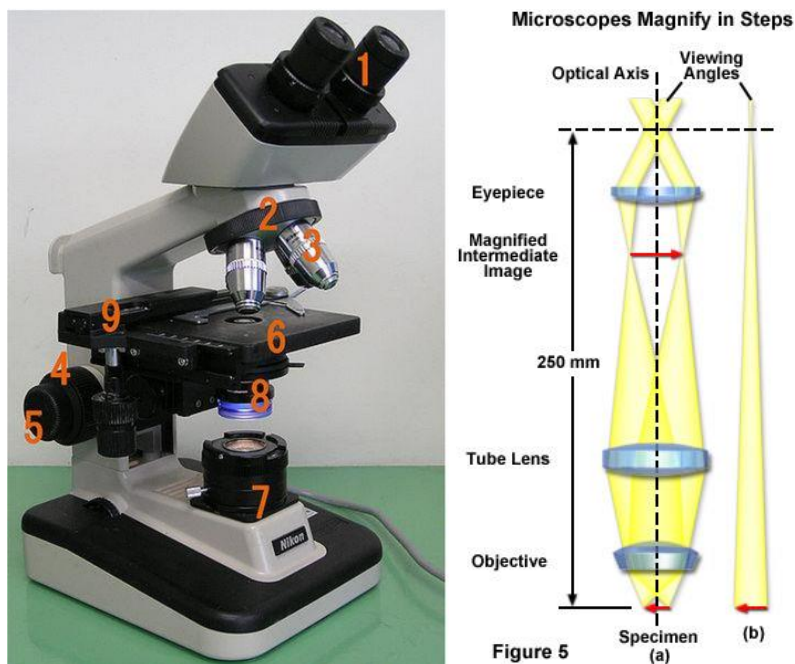
Ponieważ komórki są małe i złożone, niezwykle trudnym zadaniem jest obserwacja ich wewnętrznej struktury, badanie składu molekularnego oraz mechanizmów funkcjonowania poszczególnych komponentów. Narzędzia, którymi dysponujemy w badaniach warunkują to, jak wiele o komórkach i ich funkcjonowaniu jesteśmy w stanie się dowiedzieć, dlatego też stosowanie coraz to nowych technik skutkuje zwykle postępem w dziedzinie biologii komórki. Ponadto, zrozumienie obecnego stanu wiedzy na ten temat wymaga podstawowej znajomości wykorzystywanych metod badawczych.

Wynalezienie mikroskopu optycznego zapoczątkowało rozwój biologii komórki, a sam mikroskop optyczny wciąż jest podstawowym narzędziem wykorzystywanym w badaniu komórek.

Dzięki dynamicznemu rozwojowi technik mikroskopii optycznej, jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat, dysponujemy metodami specyficznego znakowania i obrazowania poszczególnych struktur komórkowych oraz rekonstrukcji obrazów w trzech wymiarach. Ważną zaletą mikroskopii optycznej jest fakt, że światło jest stosunkowo nieszkodliwe dla próbek biologicznych i nie powoduje ich uszkodzeń. Z drugiej strony jednak mikroskopia optyczna jest ograniczona przez skończoną zdolność rozdzielczą ze względu na długość fali światła widzialnego. [1]

Mikroskop – budowa i zasada działania

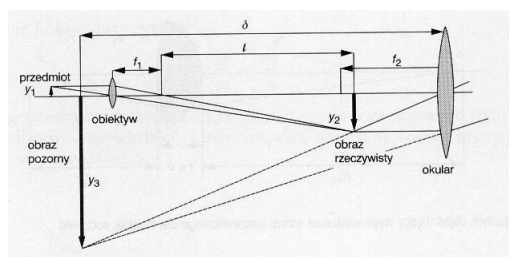
Mikroskop to przyrząd optyczny umożliwiający obserwację małych obiektów. Jego podstawowe elementy to źródło światła, obiektyw, który daje powiększony obraz przedmiotu oraz okular, który dodatkowo powiększa otrzymany obraz. Pozostałe elementy mikroskopu to stolik do mocowania próbek, rewolwer umożliwiający zmianę obiektywu, śruby makro- i mikrometryczna służące do zgrubnej (śruba makrometryczna) i precyzyjnej (śruba mikrometryczna) regulacji ostrości obrazu oraz kondensor, którego zadaniem jest równomierne oświetlenie obserwowanego przedmiotu. Wszystkie elementy umocowane są w statywie.



Rysunek 1. Budowa i zasada działania mikroskopu optycznego: 1. okular osadzony w tubusie; 2. rewolwer; 3. obiektyw; 4. śruba makrometryczna; 5. śruba mikrometryczna; 6. stolik; 7. źródło światła; 8. kondensor; 9. statyw [2, 3]

Powiększenie mikroskopu

Schemat biegu promieni w mikroskopie optycznym przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Schematyczny bieg promieni w mikroskopie optycznym.

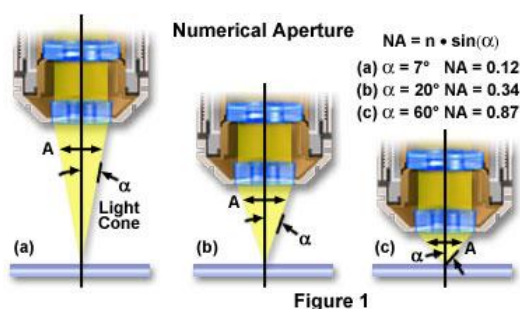
Powiększenie mikroskopu M zależy od powiększenia obiektywu i okularu:

$$M = M_1 \cdot M_2 \approx \frac{\delta}{f_1} \cdot \frac{l}{f_2}$$

Zdolność rozdzielcza mikroskopu

Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest to najmniejsza odległość l dzieląca dwa punkty, które w obrazie mikroskopowym są dostrzegalne oddzielnie. Wielkością charakterystyczną, która określa możliwość optymalnego wykorzystania obiektywu w danym środowisku jest apertura numeryczna

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$



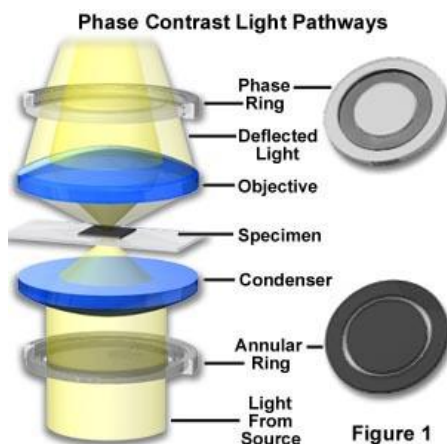
Rysunek 3. Apertura numeryczna [4]

Dla obiektywu pracującego w świetle monochromatycznym zdolność rozdzielcza wyraża się wzorem:

$$l = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

Mikroskop kontrastowo – fazowy

Żywe komórki oraz innego rodzaju bezbarwne próbki są zwykle słabo widoczne pod tradycyjnym mikroskopem jasnego pola. Dlatego do obrazowania tego typu obiektów wykorzystywany jest zwykle kontrast fazowy, opracowany po raz pierwszy w 1930 roku przez holenderskiego fizyka Fritza Zernike.



Rysunek 4. Schemat działania mikroskopu kontrastowo – fazowego [5].

W przypadku kontrastu fazowego nie chodzi o zwiększenie kontrastu pomiędzy jasnymi i ciemnymi obszarami obrazu, ale o uwidocznienie deformacji czoła fali, jaka powstaje podczas przechodzenia fali płaskiej o stałej amplitudzie przez ośrodek o niejednorodnym współczynniku załamania, np. wodę z okruchami szkła, które nie są widoczne. W metodzie tej źródło światła jest odwzorowane na pierścieniowej przesłonie umieszczonej w płaszczyźnie ogniskowej kondensora. Światło przechodzące przez tę przesłonę i kondensator przechodzi więc przez obserwowany przedmiot jako wiązka promieni równoległych. Na strukturze przedmiotu następuje dyfrakcja, ale promienie nie ugięte biegają dalej, nie zmieniając kierunku i obiektyw mikroskopu skupia je na pierścieniowej przesłonie (płytkę fazowej). Obszar 0 zerowego rzędu ugięcia, który w zwykłym mikroskopie jest mały i

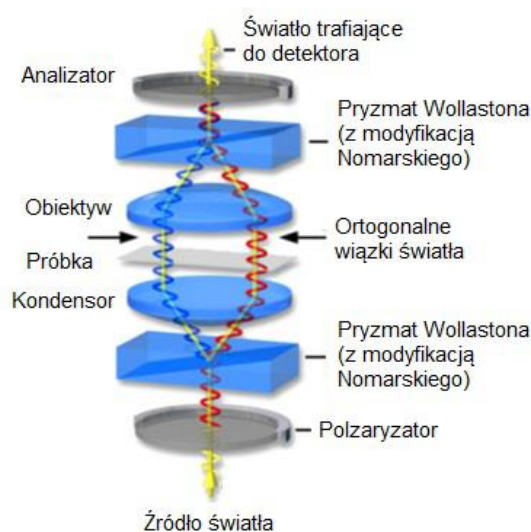
obejmuje bliskie otoczenie punktu 0 jest tutaj rozciągnięty na całym pierścieniu przesłony. Ten właśnie pierścień jest pokryty substancją, która osłabia natężenie światła i przesuwają jego fazę o 90 stopni [6].

Jeśli faza wiązki odniesienia zostanie przesunięta o nieparzystą wielokrotność połowy długości fali zobaczymy obraz obiektu jako jasny na ciemnym tle.

Mikroskop z kontrastem różnicowo interferencyjnym

Przeszkody utrudniające obrazowanie za pomocą kontrastu fazowego, takie jak występowanie tzw. halo, czyli jasnej bądź ciemnej otoczki widocznej wokół obserwowanych komórek, a także ograniczenie do bardzo cienkich preparatów [7] eliminuje kontrast różnicowo-interferencyjny DIC (ang. Differential Interference Contrast). Został on po raz pierwszy opracowany w 1955 roku przez Francisa Smitha, który włączył dwa pryzmaty Wolastona w układ optyczny tradycyjnego mikroskopu polaryzacyjnego. Współczesne mikroskopy z kontrastem różnicowo-interferencyjnym wykorzystują pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego, zaprojektowany przez fizyka polskiego pochodzenia, Jerzego Nomarskiego.

Schemat obrazujący budowę i działanie mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym przedstawia Rysunek 5.



Rysunek 5. Zasada działania mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym [8]

Niespolaryzowana wiązka światła wychodząca ze źródła pada na polaryzator i zostaje spolaryzowana pod kątem 45 stopni. Następnie pada na pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego i zostaje rozszczepiona na dwie składowe biegnące w nieco innych kierunkach i spolaryzowane prostopadłe względem siebie. Po przejściu przez kondensor składowe te są do siebie równoległe a odległość między nimi nie przekracza zdolności rozdzielczej obiektywu. Po przejściu przez obserwowany przedmiot każda z wiązek doświadcza różnej drogi optycznej ze względu na różną grubość badanej próbki oraz jej budowę. Po opuszczeniu próbki równoległe promienie są skupiane przez obiektyw a kolejny pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego dokonuje rekombinacji obu wiązek. Aby uzyskać interferencję dwóch wiązek światła różniących się drogą optyczną należy drgania ich pól elektromagnetycznych sprowadzić do wspólnej płaszczyzny i osi. Cel ten jest zrealizowany poprzez ustawienie na drodze optycznej analizatora.

Efekty widoczne na obrazach uzyskanych tą techniką, tj. kolor, różne natężenie oświetlenia, są związane ze zmianami współczynnika załamania oraz grubości oglądanej próbki w różnych jej rejonach. W związku z tym, obraz sprawia wrażenie trójwymiarowego, co nie oddaje jednak rzeczywistej geometrii próbki, a jest jedynie wizualizacją tego jaką drogę optyczną światło pokonuje przy przejściu przez nią. Dlatego też obrazy uzyskane za pomocą kontrastu różnicowo-interferencyjnego nie nadają się do precyzyjnego mierzenia rzeczywistych wysokości.

Mikroskopia z kontrastem różnicowo-interferencyjnym ma wiele zalet. W porównaniu z mikroskopią kontrastowo-fazową istnieje możliwość pełnego wykorzystania apertury numerycznej (brak przysłony pierścieniowej) oraz zastosowania tzw. barwienia optycznego (ang. optical staining). Pozwala także na osiągnięcie znakomitej rozdzielczości.

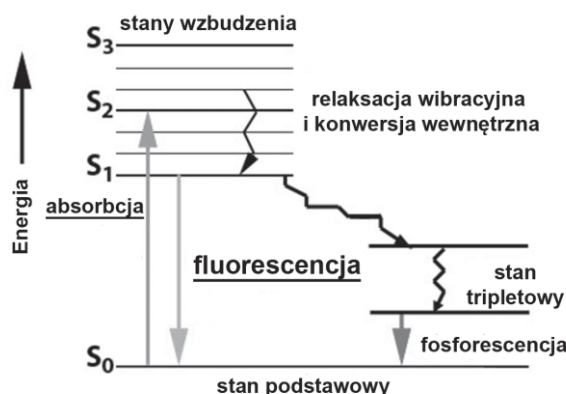
Użycie pełnej apertury numerycznej obiektywu umożliwia skupienie mikroskopu na cienkiej warstwie badanej próbki i uniknięcie przenikania się obrazów z płaszczyzn położonych wyżej lub niżej. Wyeliminowany też został efekt halo, utrudniający interpretację obrazów uzyskanych za pomocą kontrastu fazowego.

Wadą kontrastu interferencyjno-różnicowego jest fakt, iż naczynia do hodowli tkankowej wykonane z plastiku bądź szkła mogą wykazywać własności dwójłomne. Powodują one wówczas uzyskanie mylnych obrazów. [9]

Mikroskop fluorescencyjny

Mikroskopia fluorescencyjna stała się jedną z kluczowych technik stosowaną w biologii oraz naukach biomedycznych ze względu na zalety, których nie oferuje tradycyjna mikroskopia optyczna. Zastosowanie fluorochromów umożliwiło wysoce specyficzną identyfikację oraz obrazowanie komórek i struktur subkomórkowych, często bardzo trudnych, lub wręcz niemożliwych do zobrazowania za pomocą klasycznego mikroskopu świetlnego. W szczególności, mikroskopia fluorescencyjna jest zdolna do wykrycia pojedynczych cząsteczek lub organelli komórkowych.

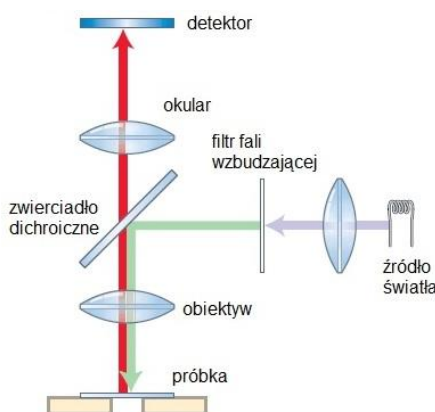
Mikroskop fluorescencyjny wykorzystuje zjawisko fluorescencji, czyli emisji promieniowania przez naświetlaną substancję, która jest związana z powrotem cząsteczek do stanu podstawowego o tej samej multipletowości spinowej co stan wzbudzony. Proces ten dobrze ilustruje tzw. diagram Jabłońskiego (Rysunek 6)



Rysunek 6. Diagram Jabłońskiego [10]

Podstawowym zadaniem mikroskopu fluorescencyjnego jest naświetlenie badanej próbki wiązką światła o zadanej, odpowiedniej dla zastosowanego fluorochromu, długości fali, a następnie wyodrębnienie znacznie słabszego światła wyemitowanego przez próbkę. W odpowiednio skonfigurowanym mikroskopie fluorescencyjnym do obserwatora powinno dotrzeć jedynie światło pochodzące z fluorescencji, obrazujące wybarwione struktury na ciemnym tle [11].

Zasadę działania mikroskopu fluorescencyjnego przedstawia Rysunek 7.



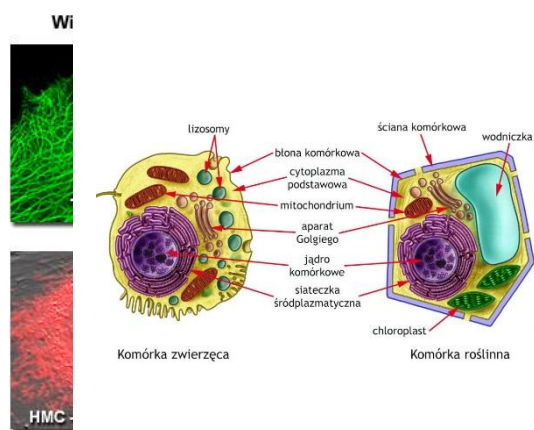
Rysunek 7. Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego [12]

Lampa łukowa lub inne źródło światła emituje wiązkę o szerokim zakresie długości fal. Wiązka przechodzi przez filtr, który z całego zakresu wybiera jedną długość fali (bądź wąski zakres długości fal) odpowiednio zdefiniowany dla użytego fluorochromu (zwykle jest to ultrafiolet bądź niebieski lub zielony zakres światła widzialnego). Wyselekcjonowana wiązka pada na powierzchnię zwierciadła dichroicznego, które przez odbicie kieruje ją na wysokoaperturowy obiektyw, a następnie w stronę obserwowanej próbki. Obserwowany preparat fluoryzuje pod wpływem padającej wiązki, a emitowane światło jest ponownie zbierane przez obiektyw. Emitowana wiązka przechodzi przez zwierciadło dichroiczne i pada na filtr fali emitowanej, którego zadaniem jest usunięcie światła nie pochodzącego z fluorescencji próbki. Wiązka przechodzi przez okular, a następnie trafia do detektora, którym może być ludzkie oko, kamera CCD lub fotopowielacz. [11]

Mikroskopia fluorescencyjna posiada wiele niezaprzeczalnych zalet. Umożliwia specyficzne znakowanie substancji i organelli komórkowych oraz ich obserwację. Jest metoda czuła oraz zapewnia uzyskanie obrazów o wysokiej jakości, charakteryzujących się wysokim kontrastem. Z drugiej jednak strony techniki mikroskopii fluorescencyjnej wymagają odpowiedniego przygotowania preparatów (aplikacja barwnika fluorescencyjnego). Niektóre z wykorzystywanych fluorochromów są toksyczne dla komórek, co wymaga ich uprzedniego utrwalenia (ang. fixation), a tym samym uniemożliwia ich obserwację *in vivo*. [1]

Budowa komórki

Komórka jest podstawowym składnikiem budulcowym organizmów żywych, w tym również człowieka. Ważną cechą komórek człowieka jest występowanie w nich jądra komórkowego i charakterystycznych organelli (struktur komórkowych). Te wszystkie cechy udowadniają, że człowiek należy do eukariontów. Komórki mogą mieć różne kształty i funkcje, ale zawierają mniej więcej ten sam zestaw organelli [13], które mogą być obrazowane dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik mikroskopii optycznej.



Rysunek 8. Budowa komórki [14, 15]

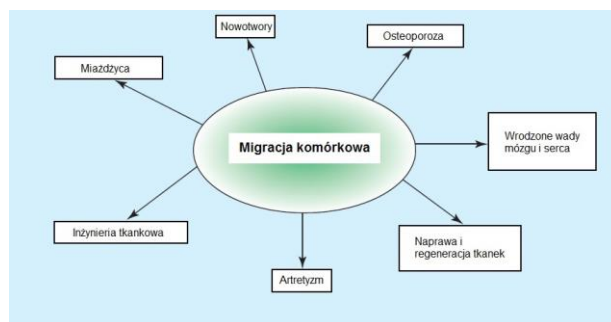
Migracja komórkowa

Ruch pełzający komórek jest przykładem procesu, w którym kluczową rolę odgrywa dynamiczna integracja włókien cytoszkieletu, białek motorycznych oraz regulatorowych. Wiele komórek, szczególnie zwierzęcych, porusza się pełzając po powierzchniach, zamiast używać do tego celu rzęsek lub wici. Podczas embriogenezy struktura organizmu powstaje przez migracje pojedynczych komórek oraz całych arkuszy nabłonka do ściśle określonych miejsc docelowych.

Dalekozasięgowy ruch pełzakowaty jest fundamentalny dla budowy oraz rozwoju układu nerwowego. Komórki układu odpornościowego tj. makrofagi i neutrofile pełzną w kierunku miejsc infekcji i pochłaniają patogeny, co jest najbardziej agresywna forma wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Podobnie fibroblasty migrują w tkance łącznej przebudowując ją gdzie jest to konieczne oraz pomagając odbudować zniszczone struktury w miejscach uszkodzeń. Również komórki naskórka migrują przez kolejne warstwy zastępując martwe złuszczone komórki aż same podzieli ich los [1]. Znaczenie migracji komórkowej dla organizmu ludzkiego obrazuje schemat przedstawiony na Rysunku 9.

Ruchem pełzającym poruszają się także niektóre organizmy jednokomórkowe, czego przykładem mogą być wolnożyjące ameby *Amoeba proteus*, *Acanthamoeba castellanii*, czy śluzowiec *Dictyostelium discoideum* [16].

Migracja komórkowa może mieć również charakter patologiczny. Komórki nowotworowe z pierwotnego guza atakują sąsiednie tkanki, dostają się do naczyń krwionośnych i limfatycznych a następnie rozprzestrzeniają się po całym organizmie i zasiedlają kolejne narządy tworząc przerzuty [1, 16].



Rysunek 9. Znaczenie migracji komórkowej dla organizmu ludzkiego. [17]

Komórki często napotykają na swojej drodze gradienty czynników chemicznych i fizycznych, w związku z czym wykształciły one mechanizmy reagowania na te gradienty, w wyniku których komórka wykonuje ruch zgodny z kierunkiem nasilania się bodźca lub w stronę przeciwną. Taki kierunkowy ruch całych organizmów nazywamy taksją. Chemotaksja, będąca odpowiedzią na bodziec chemiczny oraz fototaksja, związana z bodźcami świetlnymi są dwoma najlepiej poznanymi rodzajami taksji [18]. Przykładami innych taksji może być aerotaksja, będąca ruchem ukierunkowanym ze względu na stężenie tlenu, hydrotaksja, związana z występowaniem wody w środowisku [18], czy galwanotaksja – ruch wywołany obecnością pól elektrycznych [17].

Badanymi od stosunkowo niedawna rodzajami ruchów kierunkowych są haptotaksja oraz durotaksja. Haptotaksja jest zależną od rodzaju podłoża migracją, w której komórka reaguje na gradient adhezyjności lub inne sygnały wiodące związane z macierzą pozakomórkową [19]. Gdy komórki znajdują się na podłożu elastycznym obserwuje się durotaksję, czyli ukierunkowaną migrację do obszarów o większej sztywności [20].

Niektóre z komórek wykształciły wyspecjalizowane narządy ruchu tj. rzęski, wici, pseudopodia czy lamellipodia. Rzęski i wici są popularnymi wśród komórek eukariotycznych narządami ruchu umożliwiającymi pływanie. Rzęski są krótkimi strukturami, zwykle występującymi w dużej liczbie na powierzchni komórki. Wici z kolei są dłuższe i zwykle występują pojedynczo lub w niewielkich skupiskach. Pod względem budowy obie struktury są podobne – zawierają one układ stabilnych mikrotubul oraz białko motoryczne dyneinę, które przy zużyciu ATP wywołuje ślizganie się mikrotubul względem siebie, czego następstwem jest podobny do uderzeń ruch rzęsek (wici), a w konsekwencji przemieszczenie komórki [18].

Filamenty aktynowe znajdujące się w strefie frontalnej migrującej komórki ulegają szybkiej organizacji w pęczki i sieci w wiodącym regionie komórki, zwanym lamellipodium. Niektóre komórki, na tej samej zasadzie, wykształcają cienkie, przypominające palce wypustki, tzw. filopodia. Struktury te umożliwiają komórkom ruch pełzający [12].

Literatura

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- [2] http://pl.wikipedia.org/wiki/Mikroskop_optyczny
- [3] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/introduction.html>
- [4] <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasna.html>
- [5] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html>
- [6] <http://www.oficyna.pwr.wroc.pl/e-book/instrum2.pdf>
- [7] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>
- [8] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>
- [9] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicintro.html>
- [10] W. Brutkowski, Mikroskopia konfokalna a mikroskopia szerokiego pola – dwa podejścia do badań przyżyciowych, *Kosmos* 62 (2013) 171-180
- [11] <http://www.microscopyu.com/print/articles/fluorescence/fluorescencein>
- [12] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. E. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, 2000.
- [13] http://pl.wikibooks.org/wiki/Biologia_dla_liceum/Budowa_komórek_człowieka
- [14] <http://www.pearltrees.com/bartunio/biologia/id10501393/item97734914>
- [15] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>
- [16] W. Kłopocka, J. Barańska, Rola białek z rodziny Rho w kontroli migracji komórek pełzających, *Postępy Biochemii* 51(1), 2005.
- [17] R. Horwitz, D. Webb, *Cell migration*, *Current Biology*, Vol 13, No 19.
- [18] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 14th Edition, Pearson.
- [19] C. M. Wells, M. Parsons, *Cell Migration, Developmental Methods and Protocols*, 2nd Edition, Humana Press, 2011.
- [20] B. Harland, S. Walcott, S. X. Sun, Adhesion dynamics and durotaxis in migrating cells, *Phys. Biol.*, 8, February 2011.