

Super-resoluční fluorescenční analýza buněčného cytoskeletu

P. Elblová¹, M. Uzhytchak¹, A. Frtús¹, L. Konopová², A. Moravcová³

Fyzikální ústav Akademie věd ČR¹

Gymnázium Jateční Ústí nad Labem²

Střední průmyslová škola Třebíč³

elblova@fzu.cz, uzhytchak@fzu.cz, frtus@fzu.cz, lenkonop@seznam.cz,
anetka.moravcova1@seznam.cz

Abstrakt:

Práce představuje rozeznávání sub-celulárních struktur a přípravu buněk kultivací a pasážováním.

1 Úvod

Eukaryotická buňka - základní stavební a funkční jednotka živých organismů. Lidské tělo se skládá z přibližně 200 typů buněk, které jsou různě uzpůsobeny k plnění určité funkce. Mezi základní složky eukaryotické buňky patří plazmatická membrána, endoplazmatická membrána, Golgiho aparát, vakuola, cytoskelet, centrozom, ribozom, jadérko, jádro, peroxizom, lysozom, mitochondrie.

Cytoskelet - soustava vláknitých bílkovinných útvarů, která má opěrnou a pohybovou funkci. Významnou roli hraje při dělení buňky. Existují tři typy cytoskeletárních útvarů: mikrotubuly, mikrofilamenta a střední filamenta.

- **Mikrotubuly** - dlouhé duté trubice, tvořeny proteinem tubulinem skládající se ze dvou podjednotek α a β . V živočišných buňkách mikrotubuly vycházejí z organizačního centra z (centrozom) nacházející se poblíž jádra.

Hlavní funkce: určovat pozice membránových buněčných organel řídit transport uvnitř buňky.

- **Mikrofilamenta** (neboli aktinová filamenta) - šroubovitě polymery proteinu aktinu.

Hlavní funkce: Podílet se na buněčném pohybu prostřednictvím buněčného povrchu například fagocytóza.

- **Střední filamenta** (neboli intermediární filamenta) - tvořeny vláknitými molekulami bílkovin. Jsou nejpevnějšími a nejodolnějšími ze všech tří typů cytoskeletárních struktur.

Hlavní funkce: Zajistit pevnost buněk.

2 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie je založena na schopnosti určitých molekul emitovat světlo ve viditelné oblasti elmag. spektra. Aby bylo emise docíleno, je nutné těmto emitujícím molekulám dodat relativně velkou dávku energie. Toho je docíleno ozařováním vzorku silným laserem. Díky několika úpravám je dnes konfokální mikroskop schopen zobrazit objekty až o velikosti 120 nm. Konfokální mikroskop umožňuje sledování živých buněk v kulturách a analýzu různých buněčných funkcí naživo (např. analýza mitochondrií, poškození buněčné membrány a lysozomů; hodnocení potenciálu mitochondriální membrány a analýzu cytoskeletonu. Konfokální mikroskop Olympus IX83 využívá k excitaci fluorescenčních značek lasery, a kromě běžné struktury fluorescenčního mikroskopu obsahuje tzv. "pinhole", a tedy "štěrbinu", která umožňuje odfiltrovat veškerou nepotřebnou emisi světla, která nepochází ze sledované fokální roviny.

Buňky se připravují kultivací a pasážováním (odebráním staré a přidáním nového kultivačního média). Takto připravené buňky se promyjí a zafixují paraformaldehydem a permeabilizují se 0,5 % Tritonem X-100. Následně se přidají fluorescenční protilátky navazující se na proteiny cytoskeletu a mezi řetězce DNA.

Použili jsme metodu konfokální mikroskopie, abychom posoudili velikost buněk a jejich jader. Pomocí software ImageJ jsme se upravovali a zpracovávali obdržené konfokální fotografie.

3 Shrnutí

Během návštěvy Laboratoře biofyziky na FZÚ AV ČR, jsme se naučili základní práci s buněčnými kulturami, jako například pasážování, počítání a kultivování buněčných linií. Kromě toho jsme připravili vzorky na imunofluorescenci pomocí protilátek a fluorescenčních značek. Použitím konfokální mikroskopie jsme analyzovali cytoskeletární struktury a buněčná jádra. Pomocí analytického softwaru ImageJ jsme měřili velikost buněk a jader, z kterých jsme udělali aritmetický průměr a zanesli do grafů.

Jádro HeLa	Buňka HeLa	Jádro Alexander	Buňka Alexander	Jádro HuH7	Buňka HuH7
μm	μm	μm	μm	μm	μm
16,5887	29,322682	16,91263043	27,20408696	18,30784	39,586

Hodnoty jsou aritmetickým průměrem všech měření

Poděkování

Všem organizátorům Týdne vědy. Vedoucím našeho projektu.

Reference

B-Tubulin D2N5G

<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/b-tubulin-d2n5g-rabbit-mab/15115>

ActinGreen 488 Ready Probes

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37110>

Hoechst 33342 solution

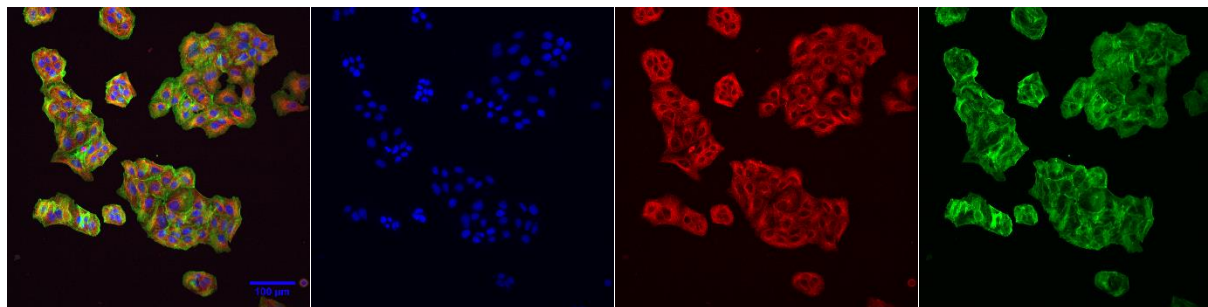
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570>

Alexander buňky 20x

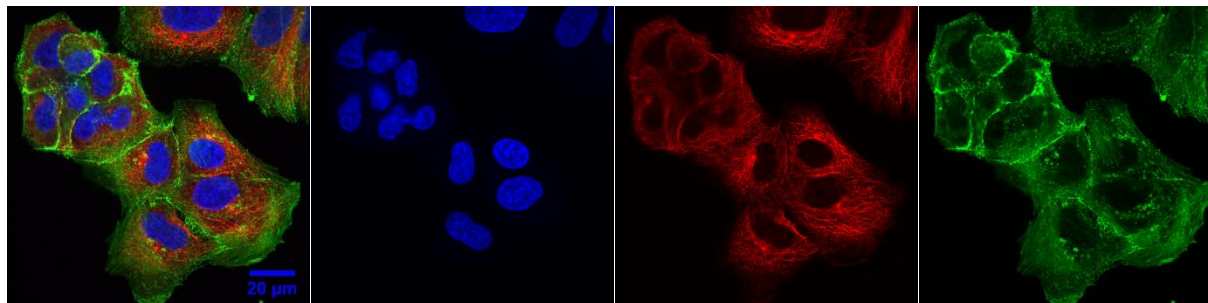
Jádro

β -Tubulin

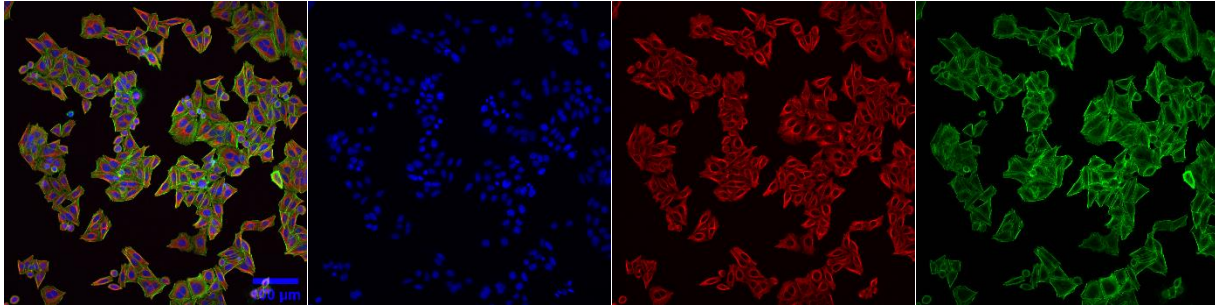
F-aktin



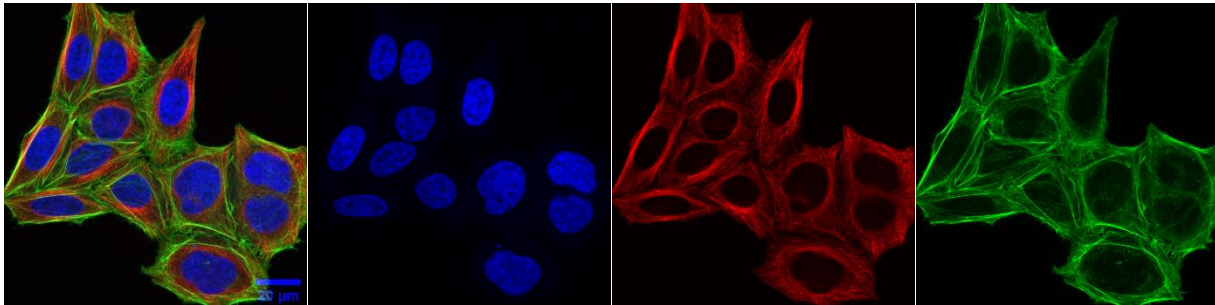
Alexander buňky 100x



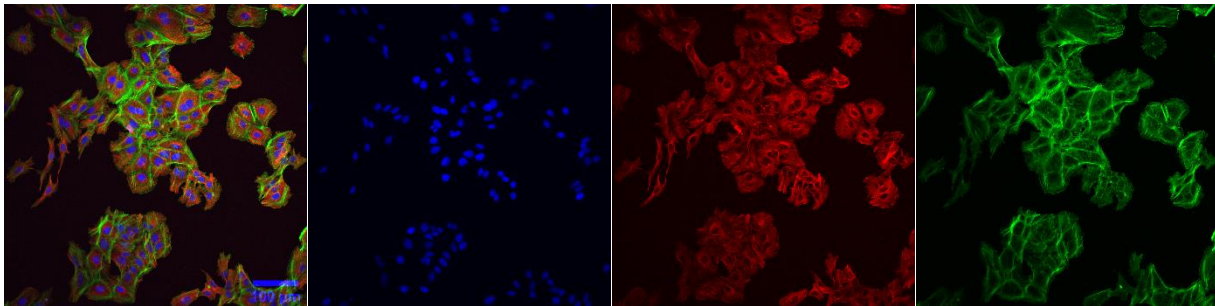
HeLa buňky 20x



HeLa buňky 100x



HuH7 buňky 20x



HuH7 buňky 100x

