

## F7DIMZKS Metody zobrazování tkáňových kultur a biologických struktur

### Návod na cvičení 1: Zobrazení nativních biologických struktur, fázový kontrast

## ZOBRAZENÍ NATIVNÍCH BIOLOGICKÝCH STRUKTUR, FÁZOVÝ KONTRAST

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

### ÚVOD

Tkáňové inženýrství je multidisciplinárním oborem, ve kterém se uplatňují poznatky z oblasti inženýrství, biomateriálů, biologie a medicíny. Biomateriály ve 2D či 3D struktuře poskytují vhodný substrát pro adhezi, růst a případnou diferenciaci buněk. 3D biomateriál (scaffold) může být osazen i více buněčnými typy najednou. Pro potřeby tkáňového inženýrství jsou tedy potřebné mikroskopické metody zobrazující jednotlivé buňky v 2D či 3D kulturách, a dále pak možnost zobrazení celých tkáňových řezů. Pozorovat můžeme morfologii celých buněk, jednotlivé proteinové struktury uvnitř buňky, buněčné receptory, mezibuněčnou hmotu, strukturu daného biomateriálu, interakci buněk s biomateriálem, atd.. Důležitou výhodou je také možnost nedestruktivního a minimálně invazivního zobrazování struktur (např. pozorování morfologie živých buněk (nativní mikroskopování) nebo mikroskopování tkáňových řezů, při kterých jsou bez poškození zachovány jednotlivé struktury).

V následujících kapitolách budou zmíněny jednotlivé mikroskopické metody, se kterými se můžeme v tkáňovém inženýrství setkat: inverzní mikroskopie, metoda fázového kontrastu, fluorescenční mikroskopie a laserová konfokální skenovací mikroskopie. Budou diskutovány možnosti, výhody a nevýhody daných mikroskopických technik.

### INVERZNÍ MIKROSKOPIE

V tkáňovém inženýrství s výhodou používáme tzv. invertované či inverzní (převrácené) mikroskopy. Objektivy se nachází pod vzorkem a zdroj světla a kondenzor nad vzorkem. Samotný vzorek je umístěn na posuvném stolku s různými „spacery“ - vložkami pro umístění kultivačních a destiček (*Obrázek 1*). Pozorování je tedy prováděno skrze dno kultivační misky a je možno se přiblížit k pozorovanému objektu bez namočení objektivu do kultivačního média a narušení sterilních podmínek tkáňové kultury. Můžeme tak pozorovat objekty nejen na krycím sklíčku, ale i v uzavřené Petriho misce, kultivační destičce či kultivační láhvi. Dále pak máme možnost pozorování objektů volně plovoucích v kapalinách – např. dosud neadherované buňky nebo buňky v suspenzi. Výhodou je také volný prostor nad vzorkem, který nám dovoluje snadnější manipulaci se vzorkem při pozorování. Naopak nevýhodou tohoto uspořádání je omezení pracovní vzdálenosti objektivu tloušťkou dna kultivační nádoby. Zvláště u objektivů s větším zvětšením (40x a více) má toto omezení vliv na numerickou aperturu a tedy světelnost objektivu, což má vliv především na pozorování slabších zdrojů záření ve fluorescenční mikroskopii.

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku, CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002244

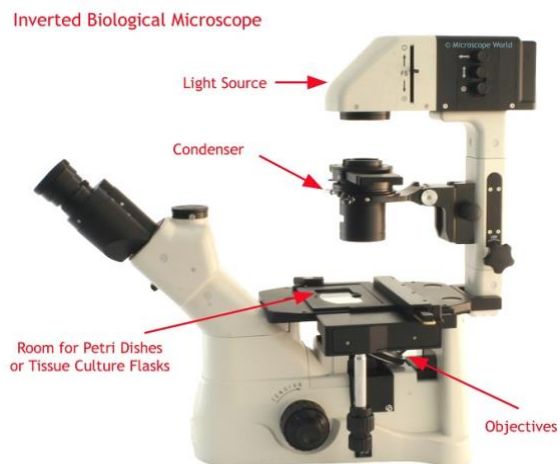


EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Návod na cvičení 1: Zobrazení nativních biologických struktur, fázový kontrast

Samozřejmostí je u většiny mikroskopů používaných v laboratořích tkáňových kultur také možnost snímání a přenosu obrazu do počítače pro možnost pozdějších analýz pořízených obrazů.

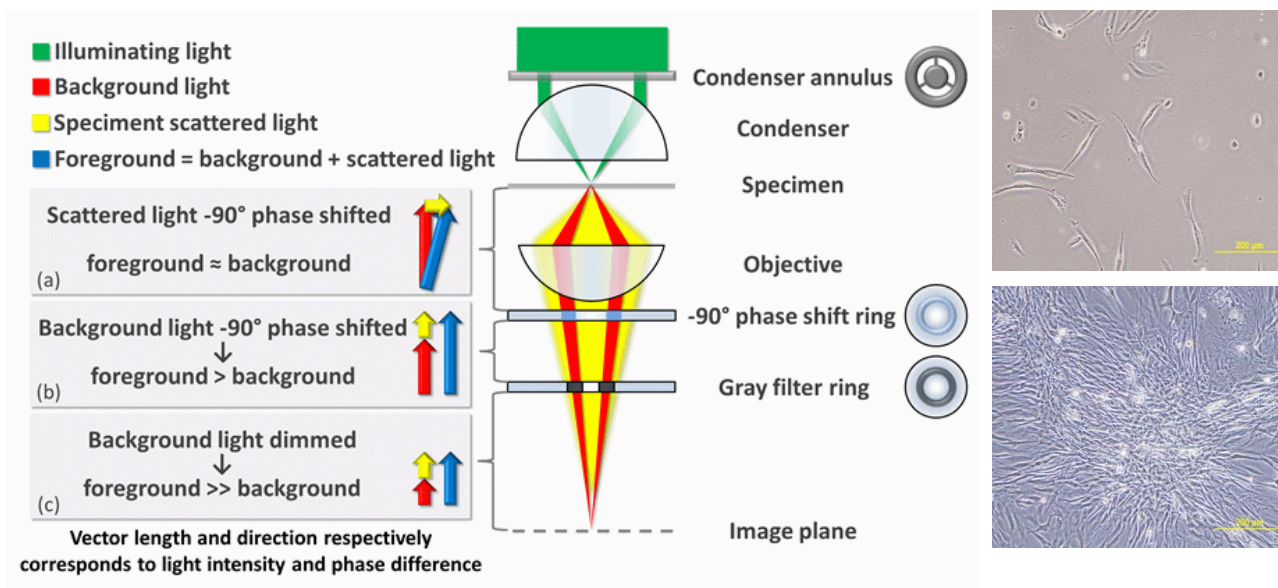


Obrázek 1 - Invertovaný mikroskop používaný v laboratořích tkáňových kultur (zdroj:www.microscopeworld.com).

## METODA FÁZOVÉHO KONTRASTU

Metoda fázového kontrastu je založená na posunu fáze světla procházejícího transparentním vzorkem bez rozptýlení (background light) vůči světlu rozptýlenému strukturami vzorku (speciment scattered light) a převedením tohoto fázového posunu na rozdíl intenzity světla pomocí jejich interference v obrazové rovině (Obrázek 2). Vzorek je osvětlován skrze kruhovou štěrbinu (zelená), nerozptýlené světlo (červená) pak prochází v objektivu skrze optické elementy, které ho ztlumí a posunou ve fázi, což umožní vhodnou interferenci s rozptýleným světlem (žlutá), která nám kontrastně zobrazí struktury vzorku.

Fázový kontrast nám umožňuje oproti konvenční mikroskopii světelného pole pozorovat výrazněji kontury buněk, a tedy jejich morfologii. Dále jsou ve fázovém kontrastu patrné i další struktury jako buněčné jádro či některé orgány. Buňky můžeme pozorovat ve 2D nebo v tenkých transparentních konstruktech. Na základě morfologie tedy můžeme odlišit některé buněčné typy či pozorovat hustotu buněk v kultuře (Obrázek 2).



Obrázek 2 – princip pozorování pomocí fázového kontrastu (zdroj: wikipedia.org), dále příklad kmenových buněk z tukové tkáně krátce po nasazení – 1. den kultury (některé buňky jsou již adherované a rozprostřené, některé buňky jsou zatím kulaté, mohou se rozprostřít později), druhá fotografie pak představuje ostrůvek, ze kterého vyrůstají kmenové buňky 7. den buněčné kultury.

## ZADÁNÍ

Vaším úkolem bude zafixovat, obarvit a následně pozorovat a dokumentovat buňky (kmenové buňky z tukové tkáně, endotelové buňky, kostní buňky linie Saos2) adherované v kultivační destičce.

## PŘÍSTROJE

- Laminární box
- CO2 inkubátor
- Invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem a fluorescencí
- Zařízení na přípravu ultračisté vody

## DALŠÍ POMŮCKY

- Buněčná kultura - nasazená na šesti jamkové kultivační desce (6-well) v cca 60% konfluenci
- rukavice
- plastové pipety (Pasteurovy pipety)
- mechanické pipety

Návod na cvičení 1: Zobrazení nativních biologických struktur, fázový kontrast

- špičky k mechanickým pipetám
- mikrozkušavky (eppendorfký) či 15ml centrifugační zkumavky (dle množství barvených vzorků)
- stojan na mikrozkušavky/zkušavky
- kádinka (50 ml nebo větší)
- hliníková fólie
- minutka na měření času

### FIXACE BUNĚK A PŘÍPRAVA VZORKU

1. Vezmeme kultivační destičku s adherovanými buňkami z inkubátoru
2. Opatrně odsajeme z jamek kultivační médium do kádinky mechanickou pipetou nebo Pasteurovou pipetou - !pozor, aby nedošlo i k odsátí či poškození buněk! (špičku pipety mít při kraji jamky)
3. Přidáme 500  $\mu$ l PBS - !nutno měnit špičky na mechanické pipetě, aby nedošlo ke kontaminaci zásobních roztoků! !nutno pracovat rychle, aby buňky v jamkách nevyschly!
4. Odsajeme PBS do kádinky
5. Do jamek přidáme 500  $\mu$ l 70% ethanolu (popřípadě 4% paraformaldehydu)
6. Fixujeme 10-15 min při pokojové teplotě
7. Ethanol odsajeme do kádinky
8. Do jamek přidáme 500  $\mu$ l PBS
9. Takto fixované buňky jsou stabilní a můžeme je do následného barvení uchovat při teplotě 4 °C