

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

«Утверждаю»

Проректор по научной деятельности КФУ

Д.К.Нургалиев



МЕТОДИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Разработана в рамках выполнения НИР: «Разработка методик выполнения исследований живых эукариотических клеток для повышения уровня сложности и расширения перечня выполняемых научно-технических услуг Междисциплинарного ЦКП КФУ»

Казань 2014

Определения и сокращения

Перевиваемые культуры – культуры immortalized клеток млекопитающих, культивируемые *in vitro*.

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцирующий протеин, кодируемый в трансформированных клетках млекопитающих специальными ген-инженерными конструкциями.

eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) – улучшенный зеленый флуоресцирующий протеин, кодируемый в трансформированных клетках млекопитающих специальными ген-инженерными конструкциями

Лазерная сканирующая микроскопия – построение микроскопических изображений путем последовательной регистрации сигнала из отдельных вокселей исследуемого объекта.

Псевдоцвет – используется при построении микроскопических изображений с регистрацией различных типов сигналов в отдельных каналах, для выражения интенсивности сигнала, зарегистрированного в отдельном канале, или выражения интенсивности комбинации сигналов из конкретных каналов.

Непрерывная микроскопия – микроскопия клеточных культур, проводимая при постоянном нахождении объекта в зоне микроскопии.

Прерывистая микроскопия – микроскопия, при которой объект исследования в промежутках между актами регистрации переносится в условия стандартного культивирования.

Прижизненные красители – красители, окрашивающие клетку либо целиком, либо ее отдельные структуры, но не вызывающие заметного снижения ее жизнеспособности.

Фототоксичность – токсическое воздействие света при освещении культивируемых *in vitro* клеток.

3D- и 4D-микроскопия – трехмерная лазерная сканирующая микроскопия и трехмерная лазерная сканирующая микроскопия во времени.

LSM780 NLO META – лазерный сканирующий микроскоп фирмы ZEISS на базе инвертированного микроскопа AXIOObserver, с фемтосекундным инфракрасным лазером для двухфотонного возбуждения флуорохромов, оборудованный META-детектором.

LSM510 META – лазерный сканирующий микроскоп фирмы ZEISS на базе прямого микроскопа AXIOImager A1, оборудованный META-детектором.

DAPI - (4',6-diamidino-2-phenylindole) – флуоресцентный краситель, предпочтительно связывающийся с АТ-обогащенными районами ДНК. Широко используемый в флуоресцентной микроскопии.

Hoechst 33342 - флуоресцентный краситель, предпочтительно связывающийся с АТ-обогатченными районами ДНК. Широко используемый в флуоресцентной микроскопии.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых методов прижизненной микроскопии клеток эукариот является в настоящее время одной из актуальных задач современной биологии. На прижизненной микроскопии основан целый ряд направлений исследований. Так, прижизненная микроскопия гарантирует проведение анализа интактных клеток, незатронутых и неповрежденных в процессе фиксации и последующей подготовке к микроскопии. Прижизненная микроскопия позволяет проводить эффективный анализ межклеточных контактов и межклеточного взаимодействия, результатов воздействия на клетку различных физических и химических факторов. Исследования с использованием клеточных культур являются необходимым элементом доклинических испытаний новых фармакологических препаратов. В связи с этим в настоящее время в арсенале большинства крупных фирм, занимающихся производством микроскопического оборудования есть различные варианты, обеспечивающие проведение прижизненной микроскопии, как с использованием различных типов стандартной световой микроскопии таких, как фазовый контраст, DIC, Plast-DIC, так и с использованием прижизненных красителей. Особый интерес представляют красители, синтезируемые непосредственно исследуемыми клетками. В основном они основаны на создании и использовании специальных генетических конструкций, кодирующих химерные белки, в состав которых входит GFP или такие его модификации, как eGFP. Широко используются различные трекеры, позволяющие идентифицировать конкретные клетки при их совместном культивировании (Kilgore, Dolman et al. 2013).

Важной частью исследований, использующих прижизненную микроскопию, является 3D- и 4D-микроскопия, для которой используется как конфокальная микроскопия, так и лазерная сканирующая микроскопия с мультифотонным возбуждением. Лазерные сканирующие микроскопы с нелинейной оптикой позволяют использовать для возбуждения флуорохромов лазерные линии близкие к инфракрасному свету, что значительно снижает токсический эффект облучения и позволяет проводить микроскопические исследования в течение длительного времени (Hoover and Squier 2013).

Огромное значение имеет выявление с помощью микроскопического анализа интересующих исследователя клеток, последующее выделение которых открывает возможности секвенирования образцов, свободных от какой-либо контаминации, проведения исследований, посвященных изучению экспрессии генов, устойчивости или чувствительности клеток к различным воздействиям на разных стадиях клеточного цикла. Подобные подходы используются для изучения строения и функции клеток, организации и подвижности клеточных органелл, их колокализации с разными зондами, антителами,

флуоресцентными белками и многом другом. Одним из преимуществ использования флуоресцентных реагентов является возможность проведения мультиплексного анализа, так как различные органеллы могут быть помечены красителями с различными характеристиками возбуждения и эмиссии. На сегодняшний день существует широкое разнообразие коммерчески доступных флуоресцентных красителей и реагентов для визуализации органелл в живых и фиксированных клетках. Поэтому зачастую сложно выбрать наиболее оптимальный подход для решения конкретной задачи.

При выборе реагентов для флуоресцентного анализа необходимо принимать во внимание спектральные свойства этих реагентов, а также характеристики фильтров, имеющихся для оборудования, на котором будет проводиться детекция сигнала. Кроме этого важным фактором является селективность используемых реагентов к исследуемым органеллам. Большинство реагентов на основе органических красителей менее специфичны по сравнению с реагентами на основе антител, но все же при определенных условиях могут быть использованы для прижизненного анализа клеточных структур. Помимо выбора реагента важным этапом является оптимизация условий мечения, таких как: концентрация красителя, выбор буферного раствора, в котором производится мечение и время инкубации. Необходимо учитывать, что условия мечения желательно оптимизировать для каждой конкретной клеточной линии и используемого красителя.

Целью настоящей научно исследовательской работы является разработка методик прижизненной окраски и люминесцентной микроскопии эукариотических клеток. Конкретные задачи НИР включали разработку методик (i) прижизненной окраски и люминесцентной микроскопии эукариотических клеток на (ii) прямых и (iii) инвертированных микроскопах, (iv) лазерных сканирующих микроскопах и (v) оборудовании, позволяющем совмещать длительное культивирование и непрерывную микроскопию.

Разработка методик прижизненной окраски и люминесцентной микроскопии эукариотических клеток является необходимым элементом успешного выполнения этапа проекта «Разработка методик выполнения исследований с использованием высокопроизводительного секвенирования, совместимых с оборудованием, имеющимся в распоряжении Междисциплинарного ЦКП КФУ, а так же планируемым к закупке в рамках соглашения №14.594.21.0003».

Необходимое оборудование для постановки методики и клеточные культуры:

AXIOImager A1 - прямой люминесцентный микроскоп,

AXIOObserver - инвертированный люминесцентный микроскоп,

LSM510META - лазерный сканирующий микроскоп на базе прямого люминесцентного микроскопа AXIOImager A1,

LSM780 NLO META - лазерный сканирующий микроскоп на базе прямого люминесцентного микроскопа AXIOImager A1 с возможностью двухфотонного возбуждения флуорохромов,

Cell-IQ - оптическая система, совмещенная с CO₂-инкубатором,

CO₂-инкубаторы,

Ламинар для стерильной работы с клеточными культурами,

Прочее лабораторное оборудование: центрифуги, весы, автоматические дозаторы и т.д.

В работе в качестве модельной системы использовались иммортализованные фибробласты человека hTERT-BJ1 со стабильной экспрессией eGFP. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности.

Используемые среды: Фибробласты человека hTERT-BJ1 культивировали в среде DMEM (Sigma), содержащей 10% эмбриональной сыворотки коров (Invitrogen) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков 1:1 пенициллина и стрептомицина (Invitrogen).

Пересевы проводили: Фибробласты человека hTERT-BJ1 перед пересевом промывали фосфатно-солевым буфером (1xPBS). Затем клетки обрабатывали раствором 0,25% трипсина с 0,03% ЭДТА в течение 3-5 мин. Для нейтрализации действия трипсина добавляли равный объем ростовой среды, после чего клетки суспендировали до единичных клеток, переносили в коническую пробирку объемом 15 мл и центрифугировали 5 мин при 300 g. После центрифугирования клетки ресуспендировали в питательной среде и высаживали в соотношении 1 к 3. Клетки пассировали с интервалом в 2-3 дня, после достижения 100% плотности клетки замораживали по протоколу заморозки.

Протокол заморозки: Перед замораживанием ЭС клетки промывали фосфатно-солевым буфером и трипсинизировали в 0,25% растворе с 0,03% ЭДТА трипсина в течение 3-5 мин. Затем добавляли один объем среды, суспендировали и центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. После центрифугирования супернатант осторожно удаляли, осадок клеток ресуспендировали в среде для заморозки (40% DMEM, 50% эмбриональной сыворотки коров и 10% DMSO). Суспензию клеток переносили в криопробирки по 1 мл и помещали в криоконтейнер. Криоконтейнер оставляли при -80°C на 24 часа, после чего криопробирки переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом.

1.1. Технические проблемы проведения прижизненной люминесцентной микроскопии.

Прижизненная люминесцентная микроскопия эукариотических клеток требует решения нескольких задач.

- обеспечения условий нормального культивирования клеток в процессе микроскопии.
- отработки условий микроскопии (уровень и длительность освещения клеток в период микроскопии), позволяющих избежать значительного воздействия на культивируемые клетки.
- разработки вариантов микроскопии на прямых и инвертированных микроскопах.
- разработки вариантов прерывистой микроскопии, непрерывной микроскопии в пределах 2-3-х суток, непрерывной микроскопии в пределах 2-3-х недель.

1.2. Камеры и культуральная посуда для проведения люминесцентной микроскопии.

1.2.1. Камера для прерывистой микроскопии на прямом люминесцентном микроскопе.

Для прерывистой микроскопии на прямом люминесцентном микроскопе окрашенные клетки помещали между двух покровных стекол в разработанную для этой цели камеру. Принцип подготовки камеры описан на рисунке 1. Следует отметить, что предложенный вариант микроскопии обеспечивал при высокоразрешающей микроскопии наличие между внешней линзой объектива микроскопа и объектом микроскопии (эукариотической клеткой) только эмиссионного масла и покровного стекла толщиной 0,17 мм.

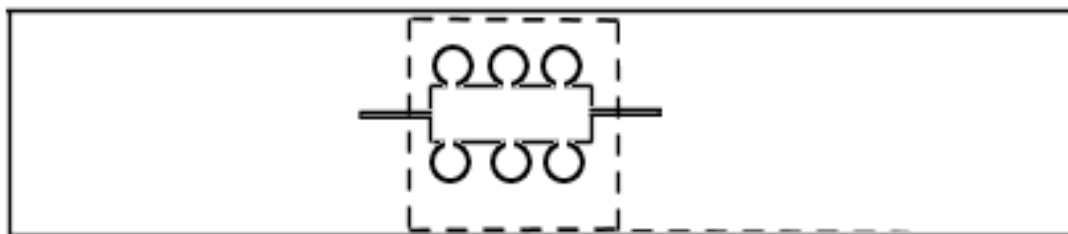


Рисунок 1. Базовая заготовка для камеры, обеспечивающей микроскопию на прямом или инвертированном люминесцентном микроскопе. Материал – нержавеющая сталь. Габариты 70 x 25 x 1 мм (идентичны предметному стеклу для микроскопии). В центре вырезанный прямоугольник 18 x 8 мм, с которым соединены отверстия диаметром 3 мм, каналы 10 x 0,7 x 0,7 мм. В каналы впаяны иглы от инъекционных шприцов, согнутые в тупом конце канала под углом 45°. Металлическая часть камеры стерилизуется автоклавированием. В стерильных условиях камера заклеивается с двух сторон чистыми покровными стеклами 24 x 24 мм. Границы вклейки обозначены на рисунке пунктиром. Чистые покровные стекла стерилизуются обработкой ультрафиолетовым облучением в

течении ночи. Суспензия клеток в ростовой среде вводится шприцом в камеру через иглы, затем входы в иглы закрываются. Отверстия, примыкающие к камере, остаются заполнены воздухом и служат как для газообмена клеток, так и для компенсации давления при изменении температуры в процессе культивирования и микроскопии. После заполнения камеры ростовой средой с клетками камера помещается в термостат (37 °C) вниз покровным стеклом, которое при микроскопии будет прилегать к объективу. Через 10 часов, после прикрепления клеток к стеклу и их распластывания клетки могут быть обработаны и/или окрашены необходимыми веществами путем замены (замен) через впаянные иглы от инъекционных шприцов ростовой среды на соответствующие растворы. Камера может быть использована для прижизненной микроскопии клеток с использованием обычного прямого или инвертированного люминесцентного микроскопа. После микроскопии камера должна быть снова помещена в термостат. В случае наличия в комплекте микроскопа термостолика или термокамеры, может проводиться непрерывная микроскопия. Возможное время непрерывной микроскопии зависит от качества термостатирования, но не может превышать 5-6 часов.

Такая предложенная и опробованная конструкция камеры обеспечивает возможность использования эмиссионных объективов с большой числовой апертурой, что позволяет достичь максимального разрешения при проведении микроскопии. Проведение микроскопии с использованием такой камеры позволяло выявлять минорные изменения в организации клетки, и детали межклеточных взаимодействий. Камера испытана при проведении прижизненной микроскопии на микроскопах AXIOImager A1, AXIOObserver, LSM510META, LSM780 NLO META. Негативной стороной использования такой камеры является отсутствие возможности выделения интересующих исследователя клеток, выявленных при проведении микроскопического анализа.

1.2.2. Прижизненная микроскопия клеток, культивируемых в чашках Петри.

Использование для прижизненной микроскопии клеток, культивируемых в чашках Петри, накладывает на организацию микроскопии ряд ограничений. Для проведения микроскопии необходим инвертированный микроскоп. Прерывистая микроскопия возможна, но после регистрации изображения чашку Петри с клетками следует поместить назад в CO₂-инкубатор. При необходимости повторных съемок одних и тех же клеток необходимо маркировать зоны съемок и ориентацию чашки Петри. Последняя проблема может быть решена использованием вместо чашки Петри планшетов и регистрации при съемке нониусов. При наличии моторизованного предметного столика поиск места предыдущей съемки может проводиться автоматически. Толщина и материал дна

стандартной чашки Петри ограничивают возможность использования объектов с большой числовой апертурой, т.е., не позволяют проводить микроскопию с высоким уровнем разрешения. Было найдено следующее решение данной проблемы: использовались чашки Петри с вырезанным в дне окном, которое было заклеено покровным стеклом. Использование таких чашек Петри позволило проводить люминесцентную микроскопию с использованием эмиссионных объективов с числовой апертурой до 1,4, т.е. с максимальным уровнем светового разрешения. Использование стандартных и специальных чашек Петри было успешно использовано на микроскопах AXIOObserver, LSM780 NLO META.

Микроскоп LSM780 NLO META был оборудован специальной камерой, обеспечивающей в окружающем чашку Петри пространстве поддержание температуры 37 °C и 5% CO₂, что позволило проводить непрерывную микроскопию длительностью до 72 часов.

1.2.3. Прижизненная микроскопия клеток с использованием оборудования Cell-IQ.

Cell-IQ – это автоматизированная система для длительного культивирования и анализа клеток, которая сочетает в себе компоненты инкубатора, для культивирования клеток, микроскопа, для получения изображений и специального программного обеспечения, для анализа изображений.

Компоненты инкубатора включают в себя термостатируемую камеру, в которой поддерживается постоянная температура в диапазоне от 20 до 40 °C необходимая для роста и деления клеток, держатели для двух планшетов, совместимые со всеми типами культуральных планшетов (на 6, 12, 24, 48 и 96 лунок), а также две газовых линии для подачи 5% CO₂, рисунок 2. Подача газа осуществляется непосредственно в планшет при помощи специальных крышек Cell-Secure, у которых имеется вход для подачи газа и выход с фильтром. Такая система позволяет поддерживать наиболее оптимальные условия для культивирования различных клеточных линий.

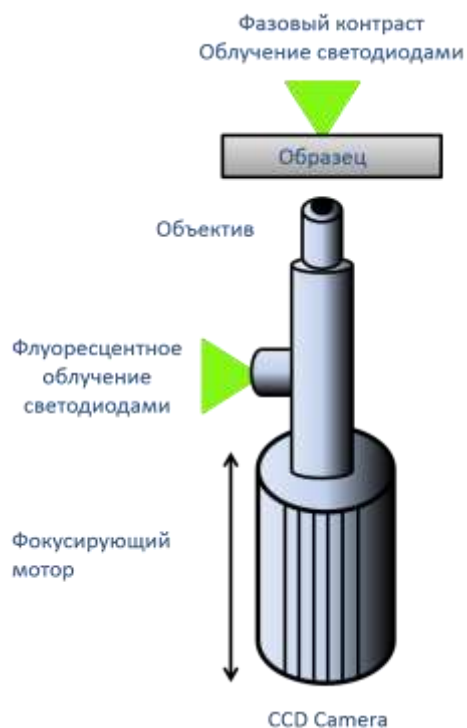


Рисунок 2. Слева представлена термокамера CellIQ, обеспечивающая поддержание условий для длительного культивирования клеток. Справа – крышки Cell-Secure для культуральных планшетов, обеспечивающие подачу газа непосредственно в планшеты.

Для регистрации изображений платформа Cell-IQ оснащена оптической системой – Рисунок 3.

Рисунок 3. Оптическая система в оборудовании CellIQ

Оптическая система включает в себя светодиодный источник света для обеспечения длительного срока работы, высокоскоростной модуляции и оптимальной длины волны, ПЗС-камеру, систему автоматической фокусировки с функцией поддержания хорошего фокуса на протяжении всего эксперимента, набор объективов (x4, x10, x20, x40), три флуоресцентных канала. Для получения наиболее четкого и качественного изображения в системе Cell-IQ применяется технология получения полностью сфокусированного изображения – Рисунок 4. Чтобы вся область визуализации была хорошо сфокусирована используется метод совмещения фокусов для получения стека изображений. Для этого с помощью программного обеспечения проводится совмещение сфокусированных пикселей из оптических срезов в Z-стеке для получения одного готового, информационно насыщенного изображения. Как правило, размер Z-стека составляет 0,8 мкм, а его толщина равна 16 мкм.

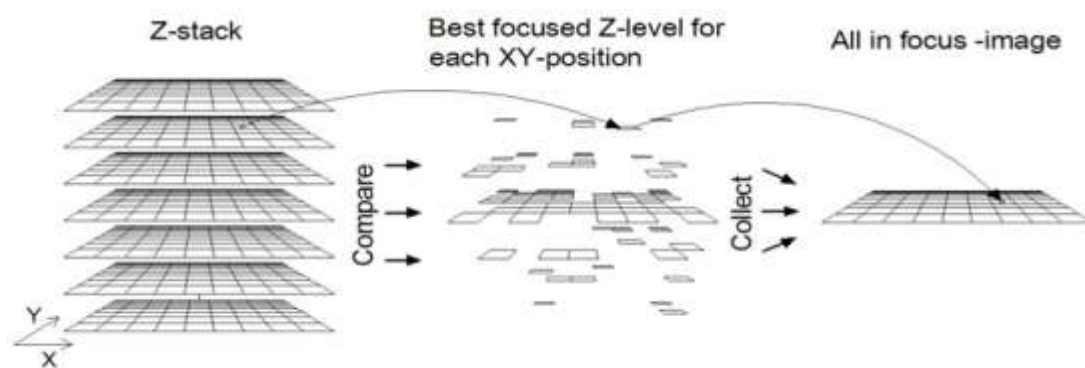


Рисунок 4. Технология получения полностью сфокусированного изображения.

При работе на Cell-IQ с помощью программного обеспечения можно задавать параметры культивирования и получения изображений такие как: температурные характеристики, условия подачи газовой смеси, выбор области и размера зоны анализа в пределах лунки, длительность измерений и частоту чередования циклов в пределах одного или двух планшетов, увеличение, количество каналов – 3 флуоресцентных канала и фазовый контраст и др. Для анализа полученных изображений также применяется специализированное программное обеспечение, в котором используется технология «Машинного зрения». Данная технология позволяет отслеживать и количественно анализировать различные типы/фазы клеток на изображениях, полученных методом фазового контраста. Клетки распознаются по структуре их поверхности и внешней форме. Кроме того, система способна обучаться и совершенствоваться в процессе работы.

Таким образом система прижизненной микроскопии Cell-IQ открывает широкие возможности для проведения различных исследований, в которых требуется

прижизненная микроскопия. При помощи данной системы можно изучать основные параметры популяции клеток (количество клеток, пролиферацию и гибель), динамические параметры популяции клеток (миграция, митотический индекс, прикрепление к поверхности, изменения формы и размера), морфологические характеристики (развитие отростков у нейронов, изменения в цитоплазме и ядре при воздействии веществ, распознавание вакуолей, образование сосудов), морфология-распознавание клеточных типов (совместное культивирование и гетерогенные клеточные популяции, анализ дифференцированных клеточных популяций, исследования нано - частиц и нано – трубок) и многом другом.

