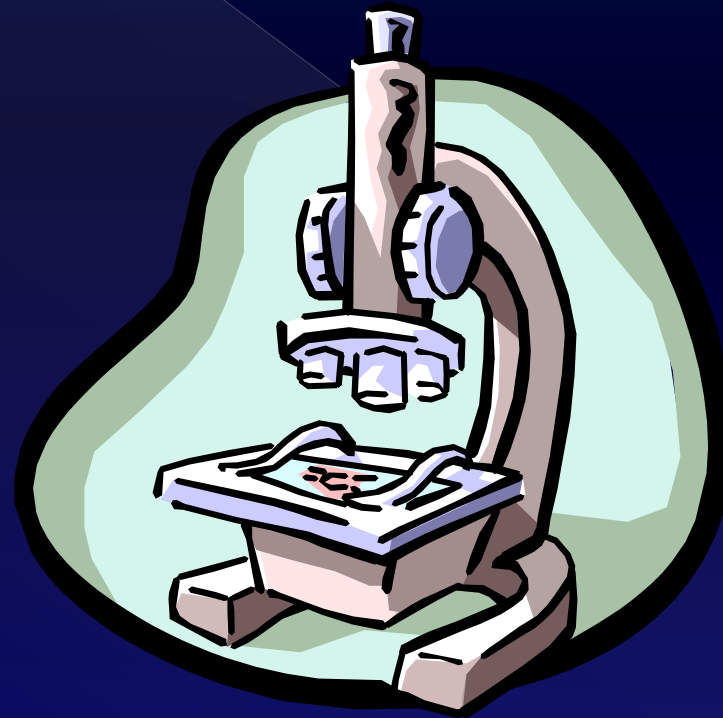


# METODY BADANIA KOMÓREK I TKANIEK



# ZASTOSOWANIA HODOWLI

1. Badania podstawowe *in vitro*
2. Diagnostyka
3. Produkcja szczepionek (polio, odra, świnka, różyczka)
4. Produkcja enzymów, hormonów, cytokin
5. Produkcja przeciwciał monoklonalnych
6. Uzyskiwanie komórek do przeszczepów

# PODSTAWOWE DEFINICJE

Hodowla tkanek - badanie komórek, tkanek i narządów przetrzymywanych lub rosnących in vitro ponad 24 godziny (poniżej 24h – inkubacja)

Hodowla pierwotna - hodowla wyprowadzona z komórek, tkanek lub narządów pobranych bezpośrednio z organizmu

Linia komórkowa- powstaje z hodowli pierwotnej po założeniu pierwszej podhodowli (po pierwszym pasażu).

Ustalona linia komórkowa – linia, którą można pasażować dowolnie długo (nieśmiertelna)

# Definicje cd.

## CZAS PODWOJENIA POPULACJI

odstęp czasu, w którym liczba komórek podwaja się

## TRANSFORMACJA KOMÓREK

zmiana komórek prawidłowych w komórki nowotworowe, spowodowana wprowadzeniem nowego materiału genetycznego lub mutacją.

## WZROST HODOWLI

zwiększanie się masy komórek (dawniej określenie to dotyczyło zwiększania się ich liczby)

## PROLIFERACJA, ROZMNAŻANIE

zwiększanie się liczby komórek w hodowli

# WSPÓŁCZESNA HODOWLA

-oprzyrządowanie laboratoriów umożliwia zachowanie  
jałowości hodowli



# POŻYWKI HODOWLANE

1. Odpowiednie ciśnienie osmotyczne  $340 \pm 5$  mOsm/Kg H<sub>2</sub>O i pH w zakresie do 7,2 do 7,4.

2. SKŁAD POŻYWKI:

sole mineralne

aminokwasy

glukoza

kwasy tłuszczowe

witaminy

zasady purynowe i pirymidynowe

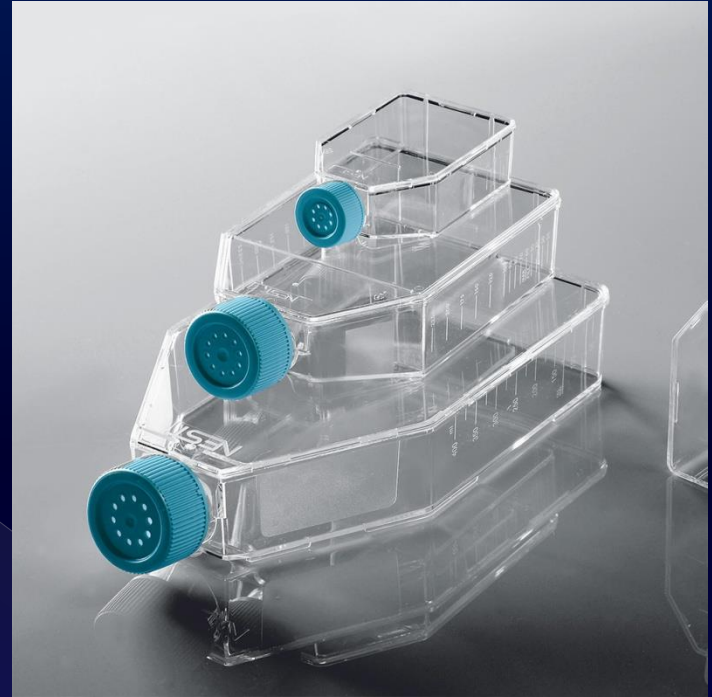
czerwień fenolowa

bydlęca surowica płodowa – źródło czynników wzrostu i hormonów



# WSPÓŁCZESNA HODOWLA

-wprowadzenie plastikowych naczyń jednorazowych, o odpowiednio przygotowanej powierzchni



-wykorzystywanie czynników wzrostowych dla uzyskania proliferacji i wzrostu różnych typów komórek

-wyprowadzenie licznych stałych linii komórkowych

# INKUBATOR

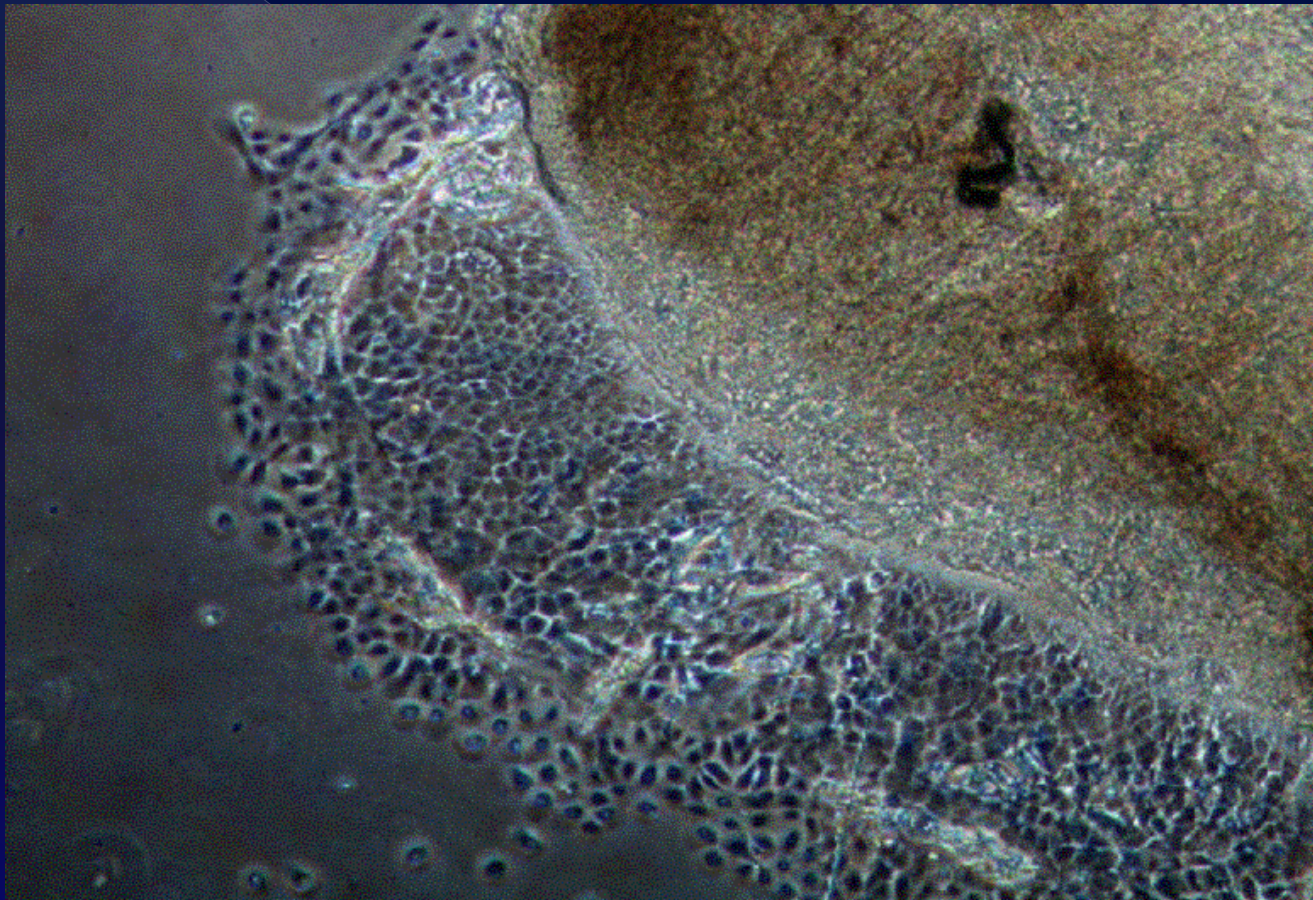
Zapewnia optymalną temperaturę, wilgotność, stężenie dwutlenku węgla i tlenu.





# IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

1. Hodowanie w naczyniu eksplantatu (wyosobnionego fragmentu tkanki lub narządu) przez czas konieczny do wypełnienia z niego komórek.



# IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

Rozdzielenie eksplantatu na pojedyncze komórki metodą enzymatyczną:

a) gdy mało substancji międzykomórkowej np. tkanki płodowe – trypsyną

b) gdy dużo substancji międzykomórkowej np. chrząstka – kolagenazą z dodatkiem deoksyrybonukleazy

Rozdzielenie explantatu na większe fragmenty np. uzyskanie pęcherzyków tarczycy lub wysepek trzustkowych – kolagenazą

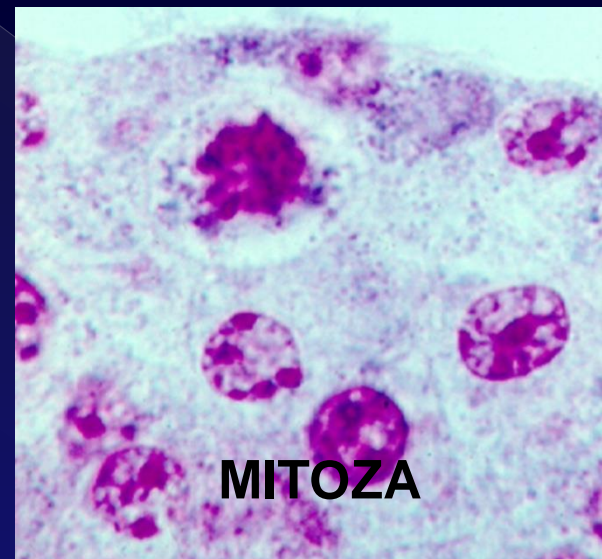
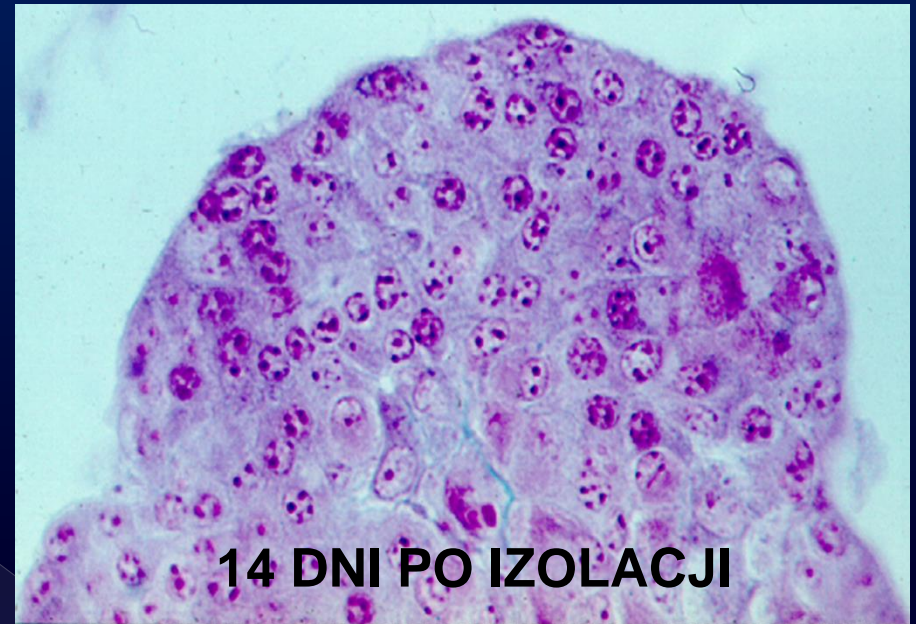
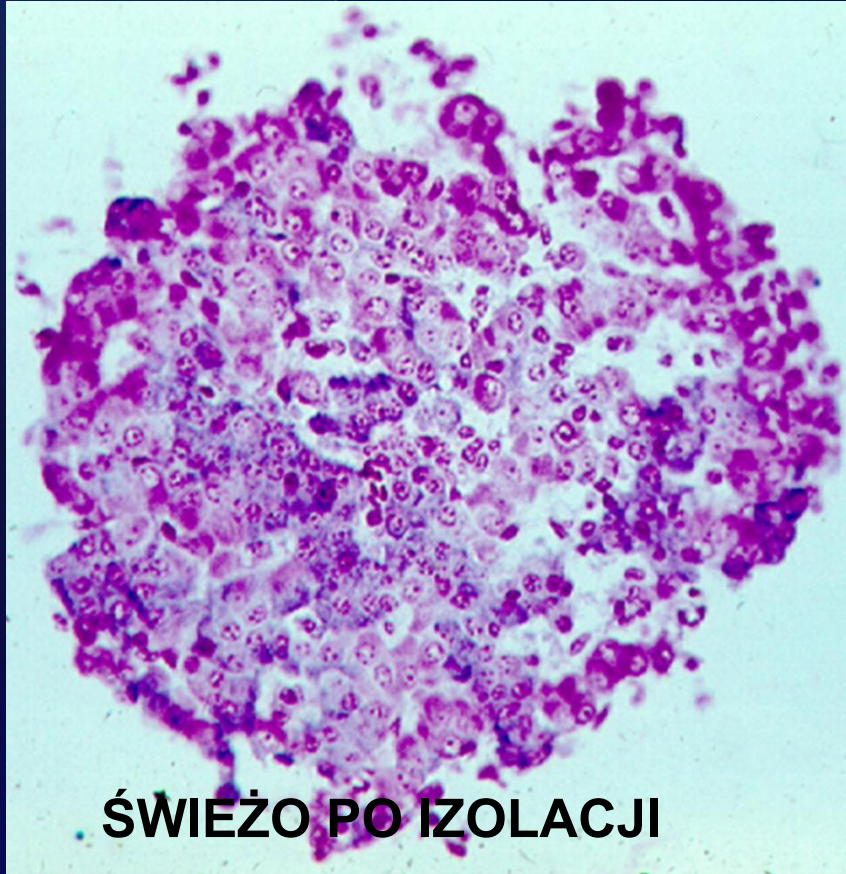
Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.

Stanislaw Moskalewski Department of Histology and Embryology, Medical University of Warsaw

General and Comparative Endocrinology 1965; 44(3):342-53. DOI: 10.1016/0016-6480(65)90059-6



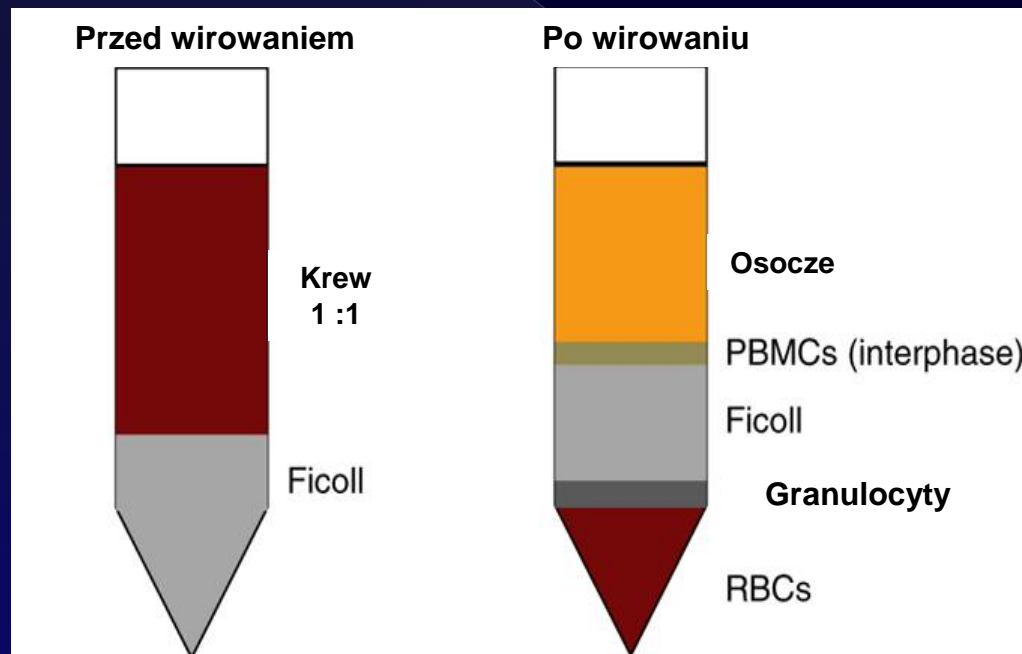
# WYSEPKA LANGERHANSA



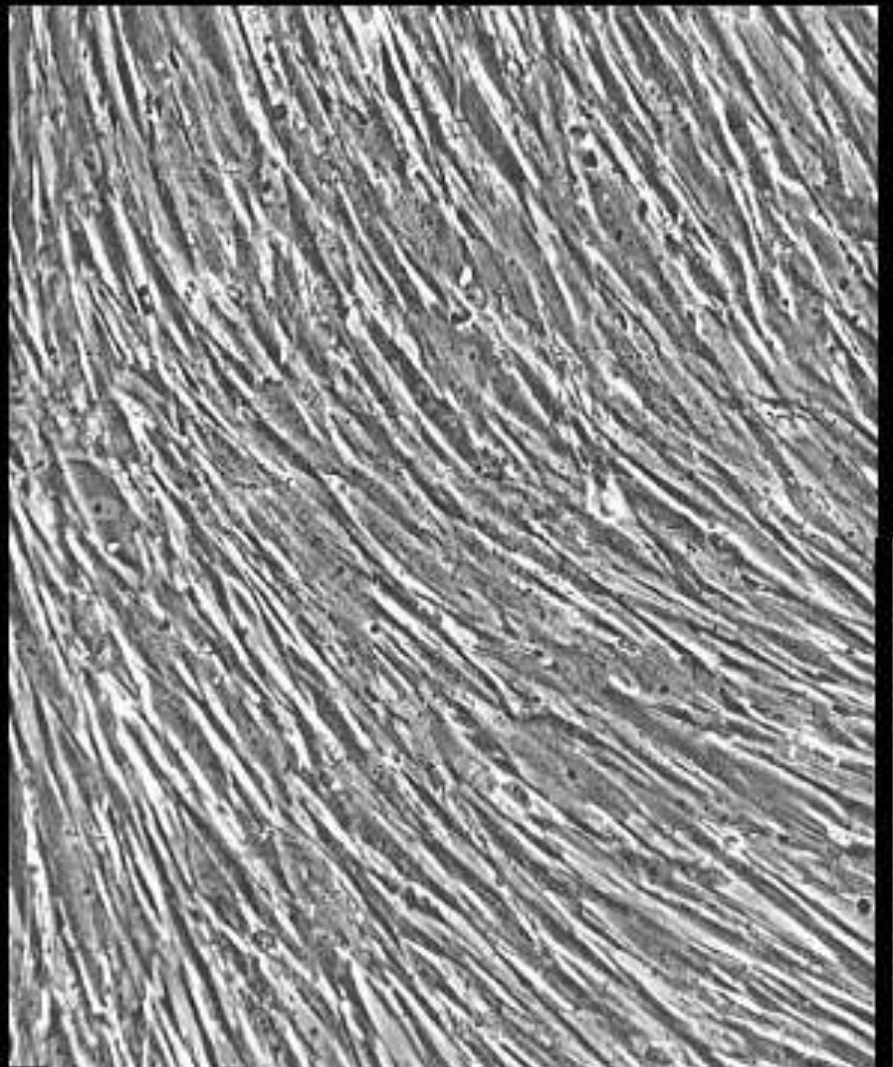
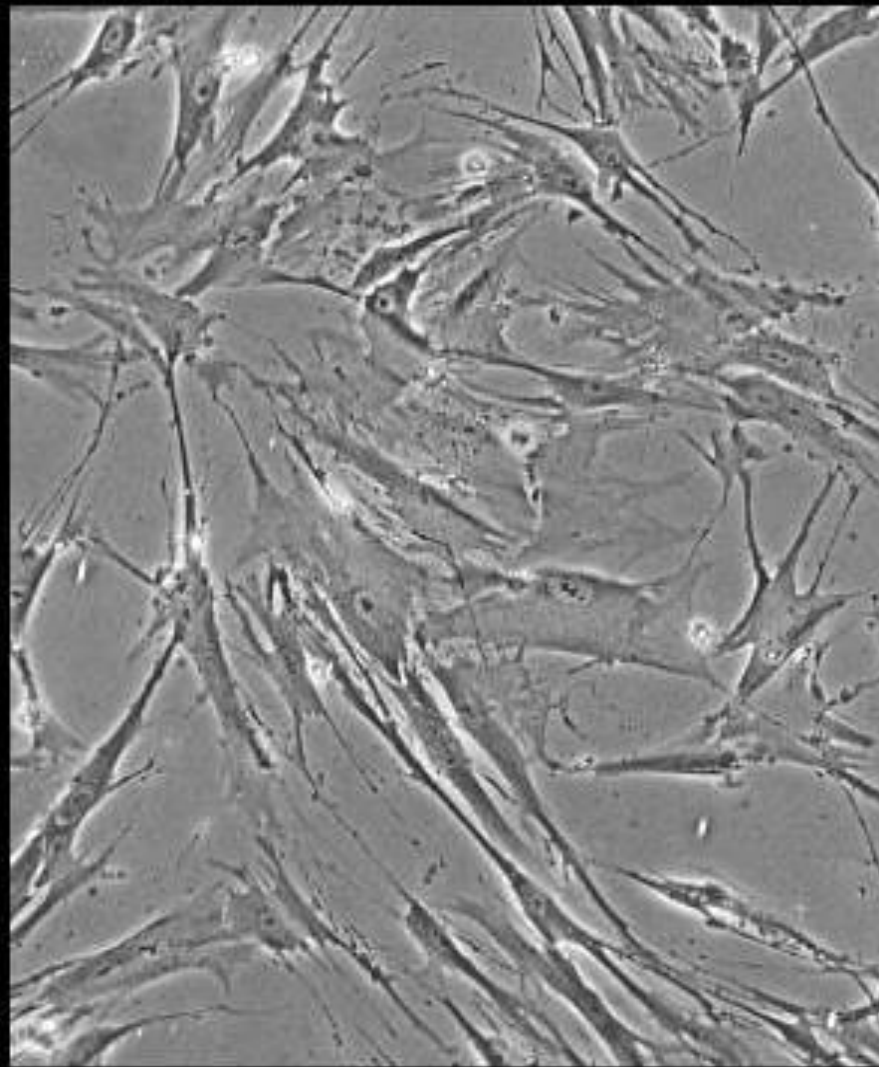
# IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

Rozdzielanie heterogennej populacji komórek np. komórek krwi:  
Przez wirowanie w gradiencie gęstości – komórki rozdzielane zgodnie ze stałą sedymentacji

Krew zmieszana z antykoagulantem, rozcieńczoną 1 : 1, nawarstwioną na wodny roztwór obojętnego, rozgałęzionego, wysokocząsteczkowego polisacharydu (gęstość 1.075g/ml) poddawano wirowaniu.



# FIBROBLASTY W HODOWLI



# ZAHAMOWANIE KONTAKTOWE

zjawisko hamowania podziałów komórek przy zetknięciu się komórek ze sobą; obserwowane w hodowlach komórkowych prowadzonych na podłożach stałych; rezultatem jest hodowla składająca się z jednej warstwy komórek stykających się z podłożem. W tym punkcie prawidłowe komórki przestają się dzielić.

**KONTAKTINHIBINA** – glikoproteina występująca w błonie komórek

**CiR** – receptor dla kontaktinhibiny

Połączenie receptora z ligandem powoduje zmiany w układzie kinaz zależnych od cyklin (brak aktywności kompleksu CDK4 z cykliną D), co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych.

**Fibroblasty stransformowane – brak CiR**

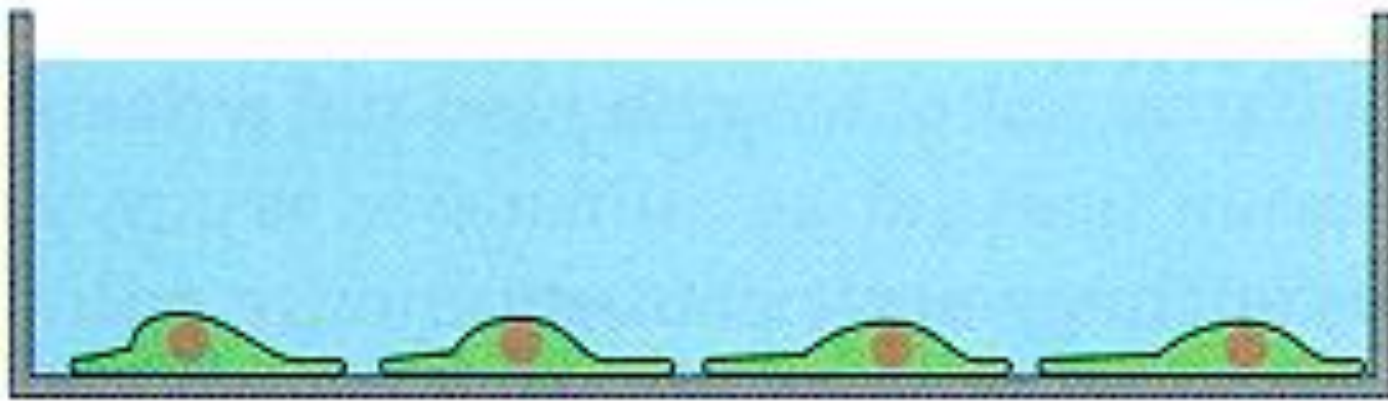
# LINIE KOMÓRKOWE

## **DIPLOIDALNA LINIA KOMÓRKOWA**

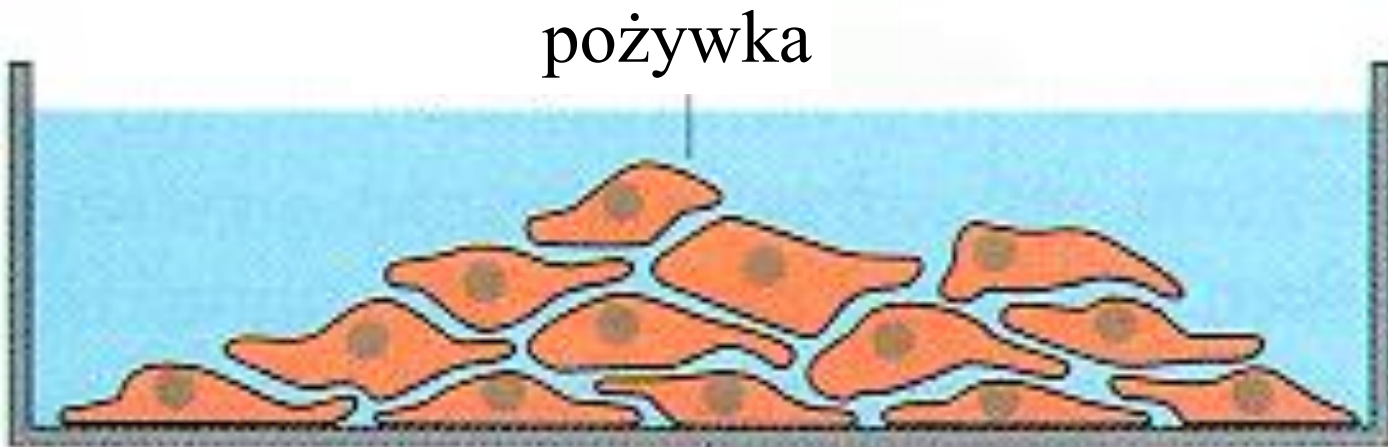
linia, w której przynajmniej 75% komórek ma taki sam kariotyp jak prawidłowe komórki somatyczne gatunku, z którego wyprowadzono hodowlę

## **HETEROIDALNA LINIA KOMÓRKOWA**

linia komórkowa, w której mniej niż 75% komórek ma diploidalny kariotyp



komórki  
prawidłowe  
(diploidalne)



pożywka

komórki  
nowotworowe  
(hetero-  
ploidalne)

dno płytki

ZAHAMOWANIE KONTAKTOWE – KOMÓRKI DIPLO- I HETEROPLOIDALNE

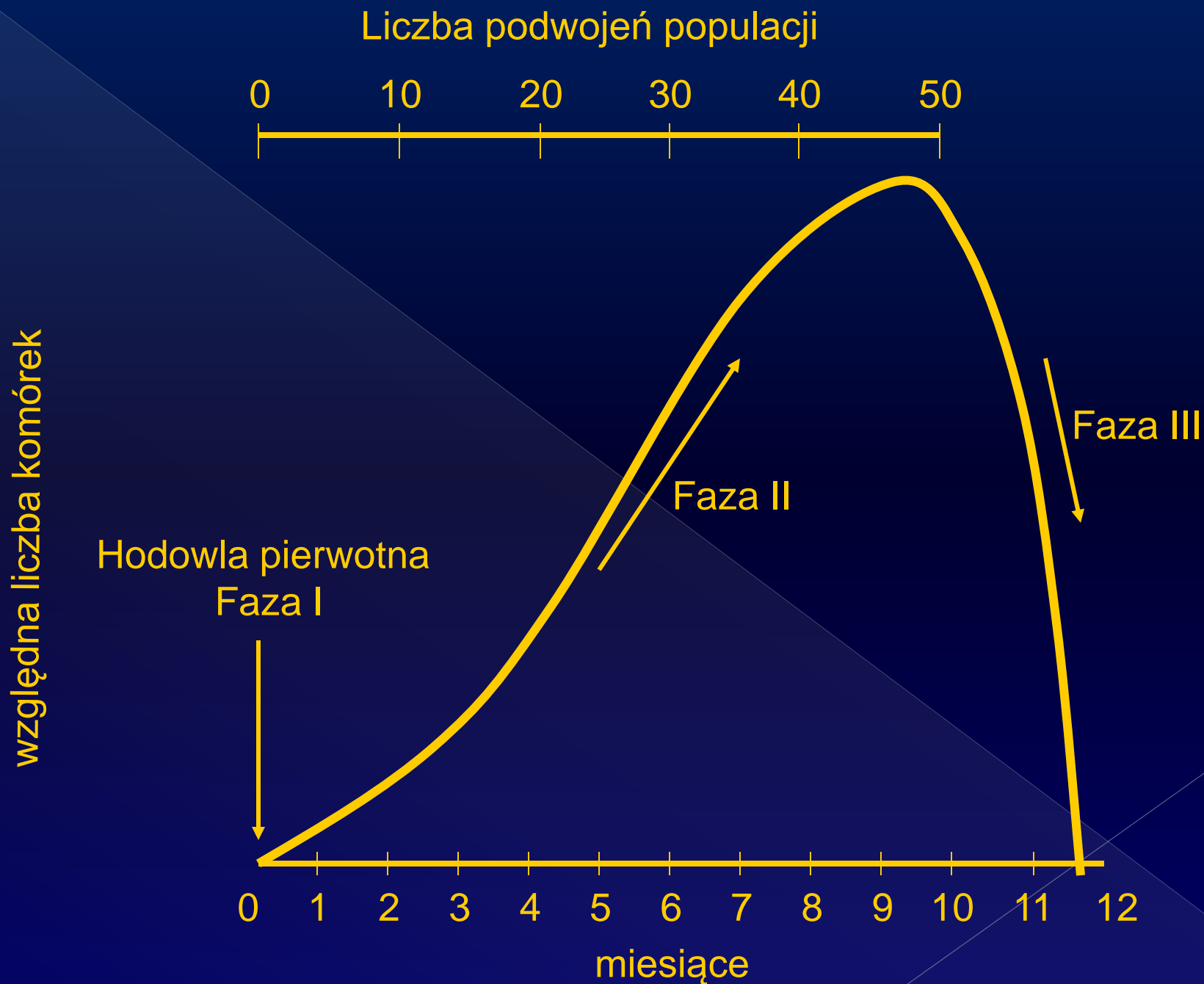


# LICZBA PODWOJEŃ POPULACJI

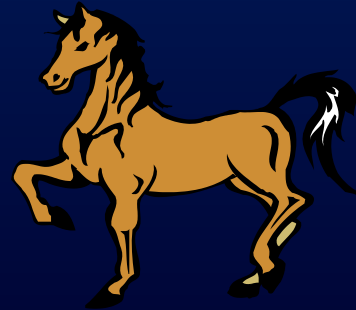
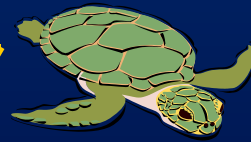
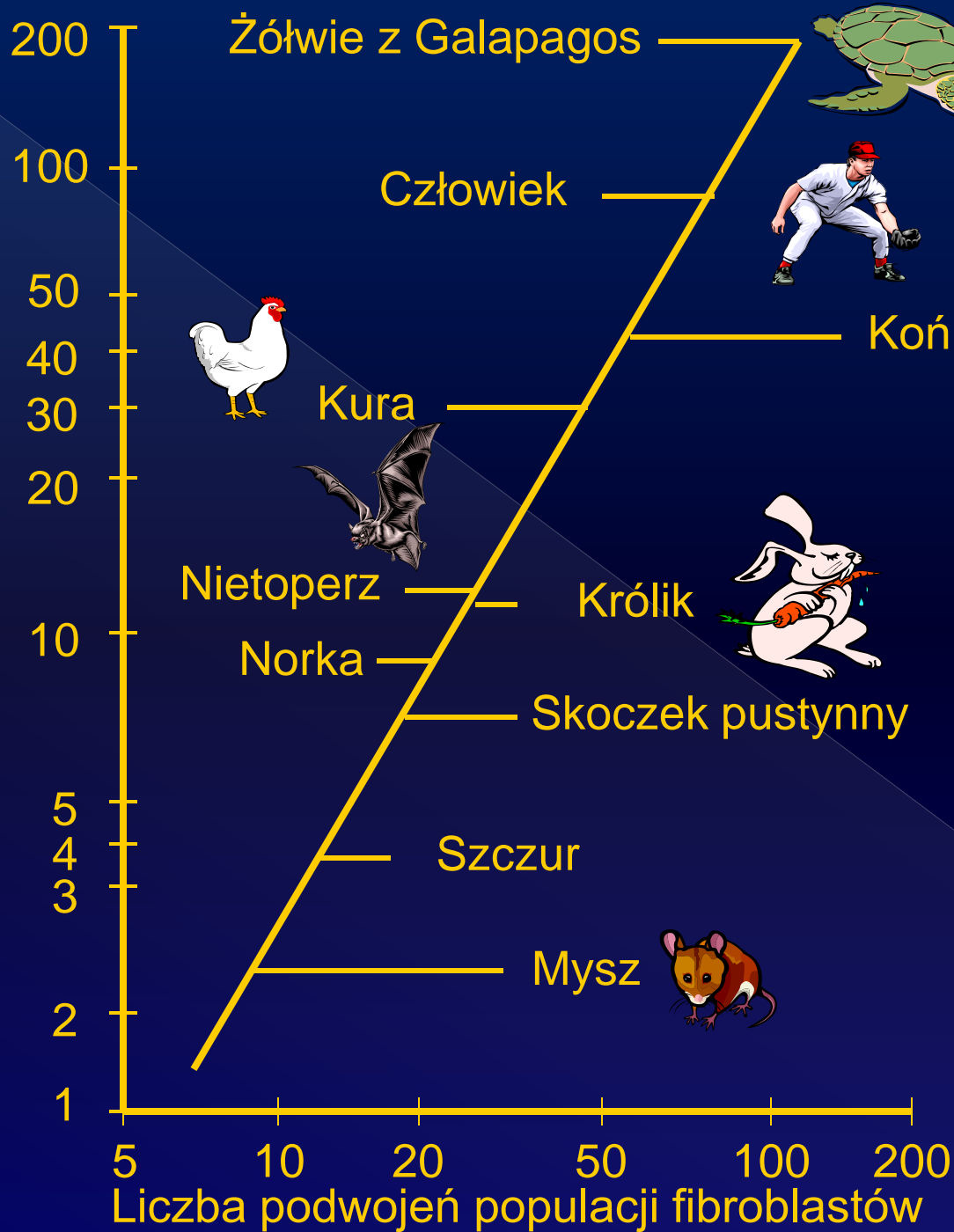
Ludzkie prawidłowe fibroblasty młodego osobnika w hodowli przechodzą kilkadziesiąt podwojeń populacji (50-60) – limit Hayflicka

Profesor  
Leonard Hayflick





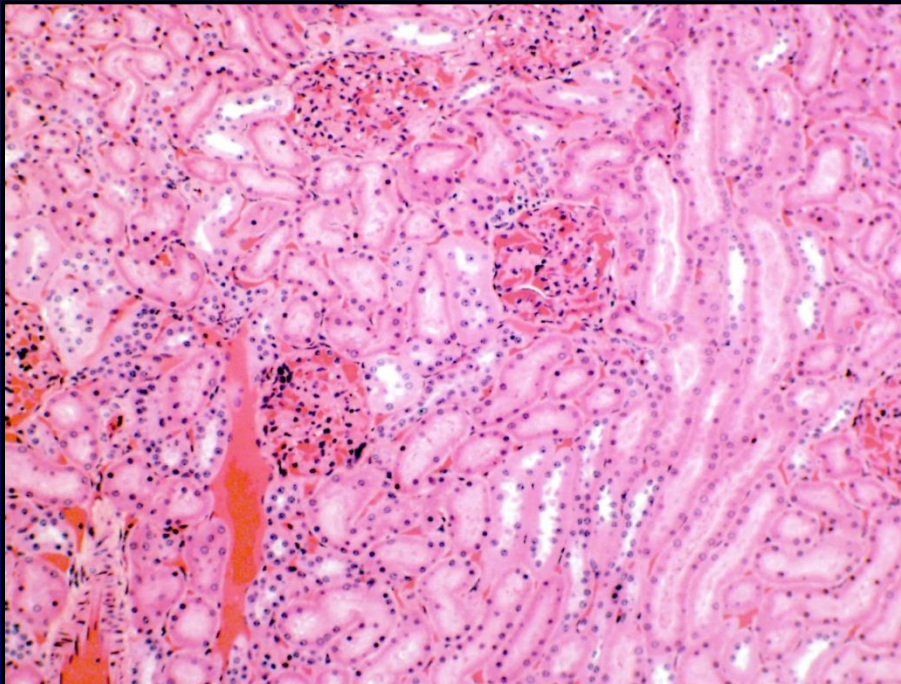
Maksymalna długość życia (w latach)



# BADANIE KOMÓREK I TKANEK

## Co można badać?

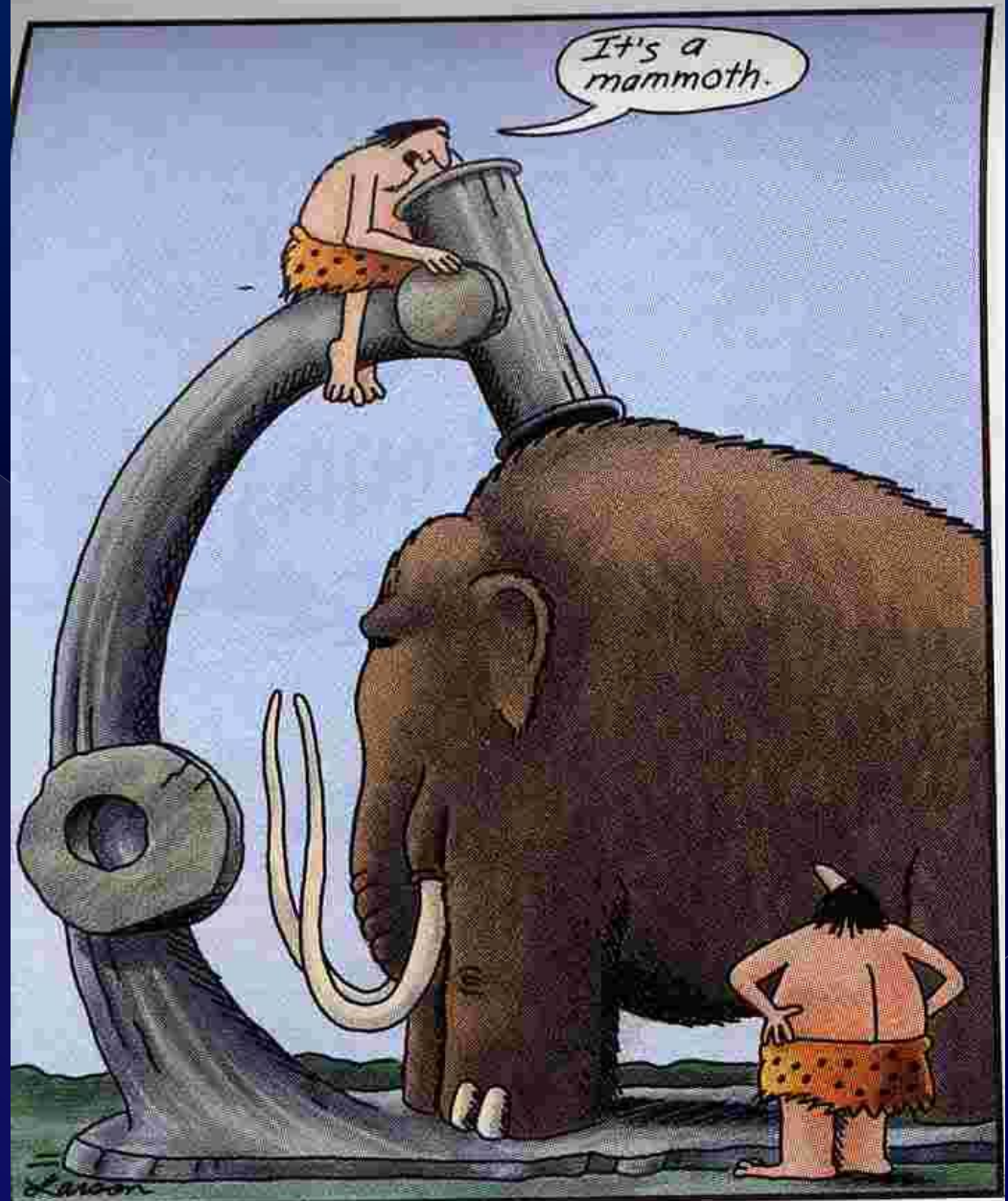
Budowę komórek/tkanek      Mikroskop światłny/elektronowy



# HISTORIA

MIKROSKOP:  
JEDNO Z  
NAJWCZEŚNIEJSZYCH  
NARZĘDZI WCZESNYCH  
BIOLOGÓW KOMÓRKI

Pierwsze mikroskopy optyczne Zachariasz i Hans Janssen - Holandia. Antonie van Leeuwenhoek udoskonalił konstrukcję mikroskopów i rozwinął ich produkcję w XVII wieku. Obserwował żywe komórki – plemniki, pierwotniaki, erytrocyty.



Wczesny mikroskop

# CYTO- i HISTOCHEMIA

(wykrywanie związków chemicznych występujących w komórkach, tkankach i w substancji międzykomórkowej)

-BARWNE REAKCJE HISTOCHEMICZNE

-AUTORADIOGRAFIA

-IMMUNOHISTOCHEMIA



# REAKCJA P.A.S (Periodic acid–Schiff )- WYKRYWANIE WIELOCUKRÓW

WIELOCUKRY



KWAS  
NADJODOWY

(utlenianie grup glikolowych)



GRUPY ALDEHYDOWE

ODCZYNNIK SCHIFFA

(bezbarwna fuksyna zasadowa)

CZERWONE ZABARWIENIE

ODCZYNNIKA SCHIFFA

(GLIKOGENOZY, NOWOTWORY)



# Reakcja PAS w jelicie – komórki kubkowe





# HISTOENZYMOLOGIA

## ENZYM

(np. fosfataza zasadowa,  
dehydrogenaza kwasu bursztynowego)



SUBSTRAT



PRODUKT

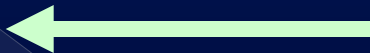


ZWIĄZEK POŚREDNI

STRĄT

(barwny, nierozpuszczalny)

**FOSFORAN Beta-NAFTYLU**



**FOSFATAZA ZASADOWA**

**Beta-NAFTOL**

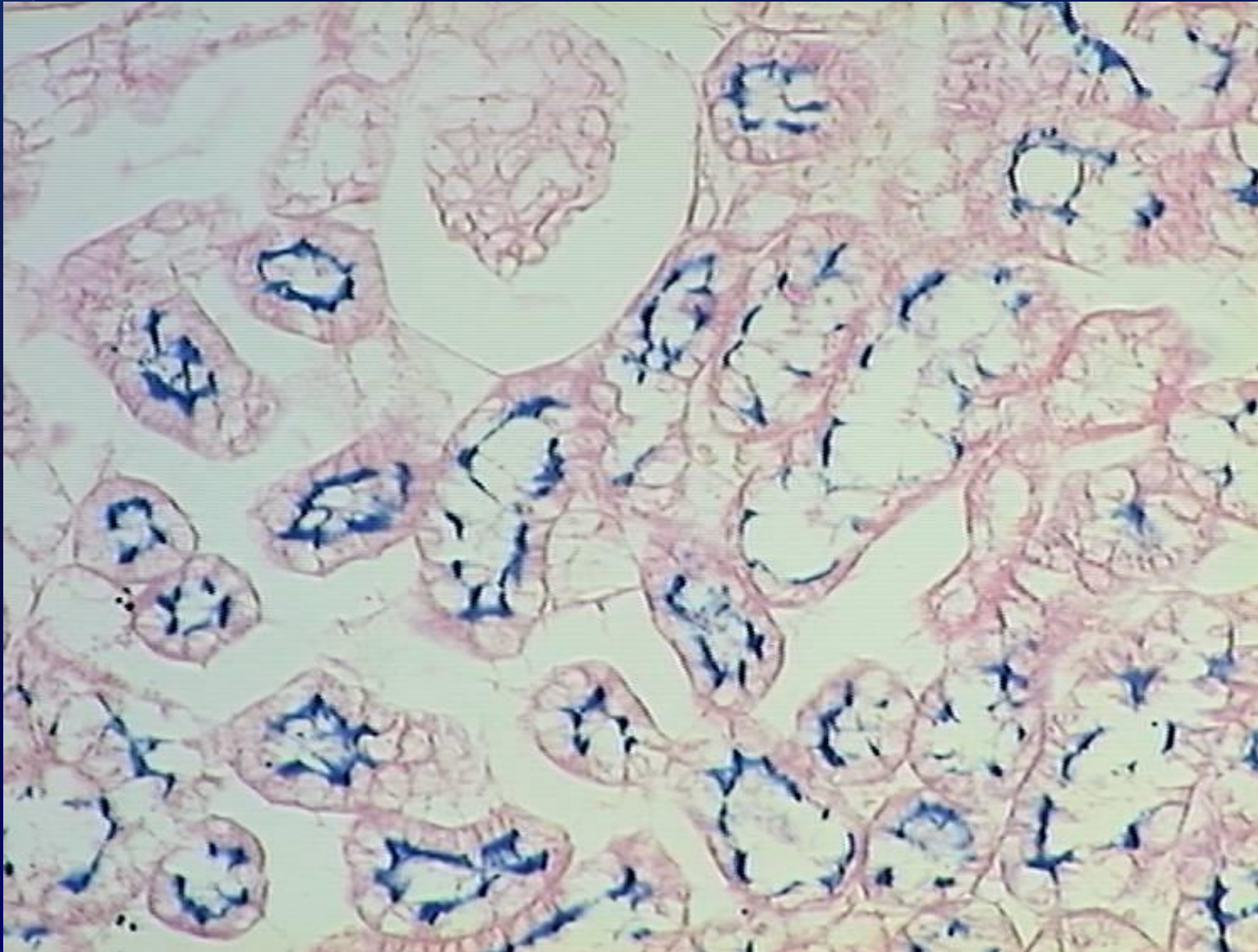


**BARWNIK DWUAZOWY**

**BARWNY KOMPLEKS**

**(GUZY WYWODZĄCE SIĘ Z TROFOBLASTU,  
PRZERZUTY RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO)**

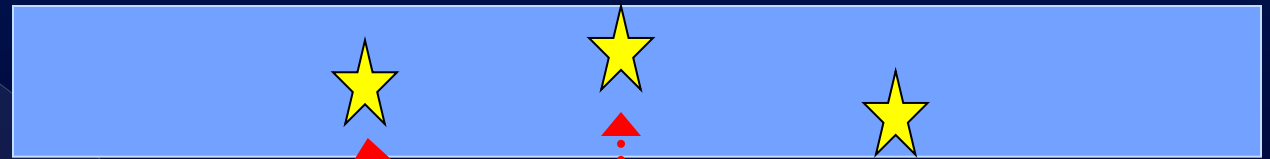
## Kanaliki bliźsze nerki wykazujące aktywność fosfatazy zasadowej



# AUTORADIOGRAFIA

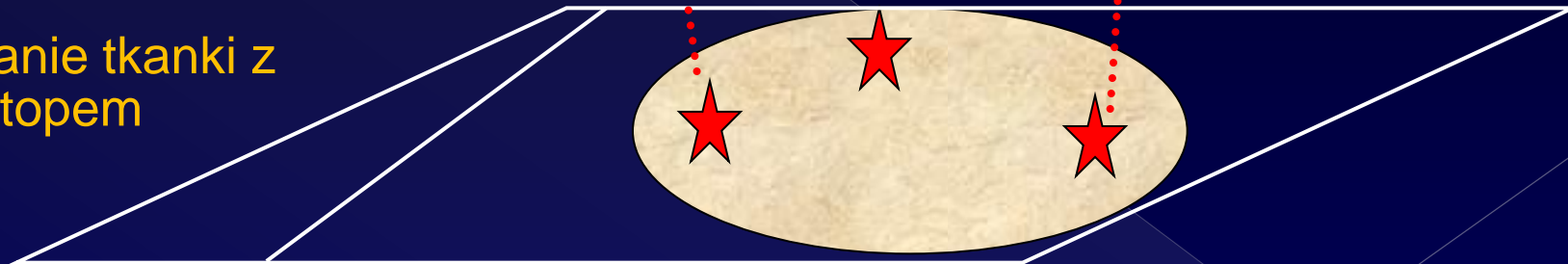
Promieniowanie uderza w ziarna srebra w emulsji i ujawnia je.  
Powstanie obrazu utajonego; srebro metaliczne

Ekspozycja emulsji  
na promieniowanie  
(AgBr w żelatynie)

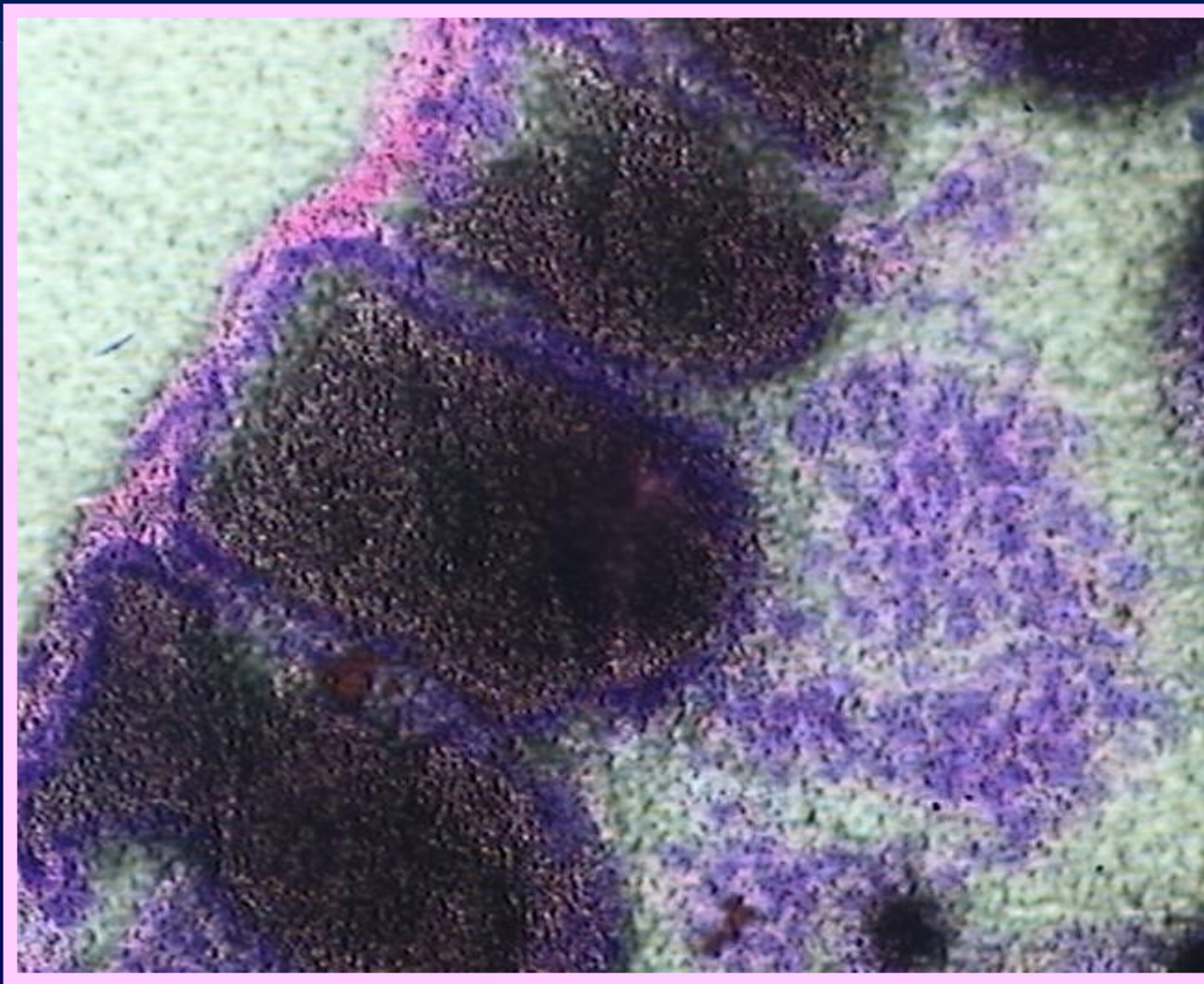


Izotop emituje  
promieniowanie (zwykle beta)

Inkubowanie tkanki z  
izotopem



Obróbka fotograficzna przetwarza obraz utajony w obraz widzialny.  
Nad miejscem preparatu gdzie w tkance wbudowany był izotop  
widoczne są czarne ziarna srebra.



TARCZYCA - jod<sup>131</sup>

# IMMUNOHISTOCHEMIA

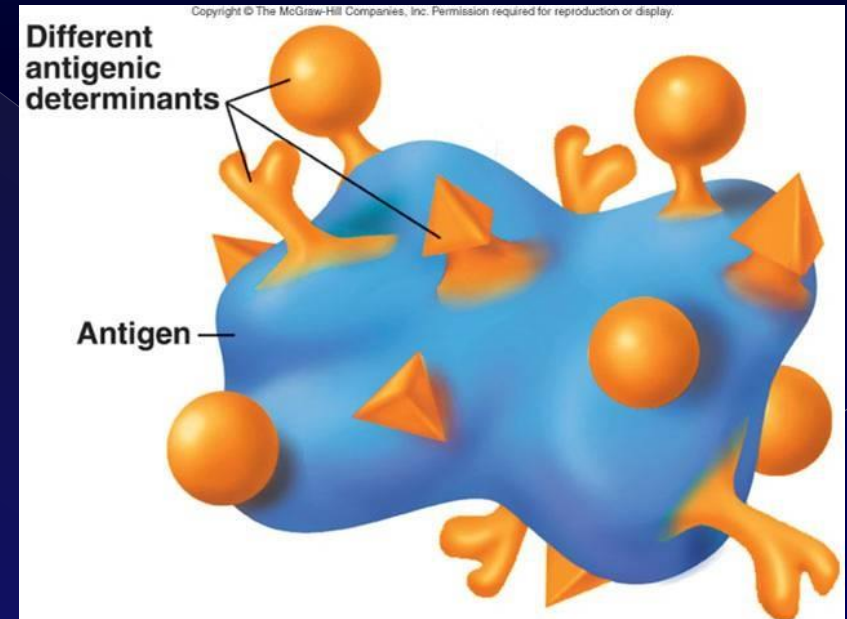
Wykrywanie antygenów obecnych w komórkach i tkankach za pomocą przeciwciał:

monoklonalnych i poliklonalnych



$F(ab)_2$

Fc



## METODY ZNAKOWANIA PRZECIWCIAŁ

- **FLUOROCHROMY** (np. pochodne fluoresceiny)
- **METALE** (np. ferrytyna; złoto koloidalne)
- **IZOTOPY** (np.  $^3\text{H}$ ;  $^{125}\text{J}$ ;  $^{35}\text{P}$ ;  $^{14}\text{C}$ )
- **ENZYMY** (np. fosfataza zasadowa, peroksydaza)

# IMMUNOHISTOCHEMIA

## - METODA BEZPOŚRENIA

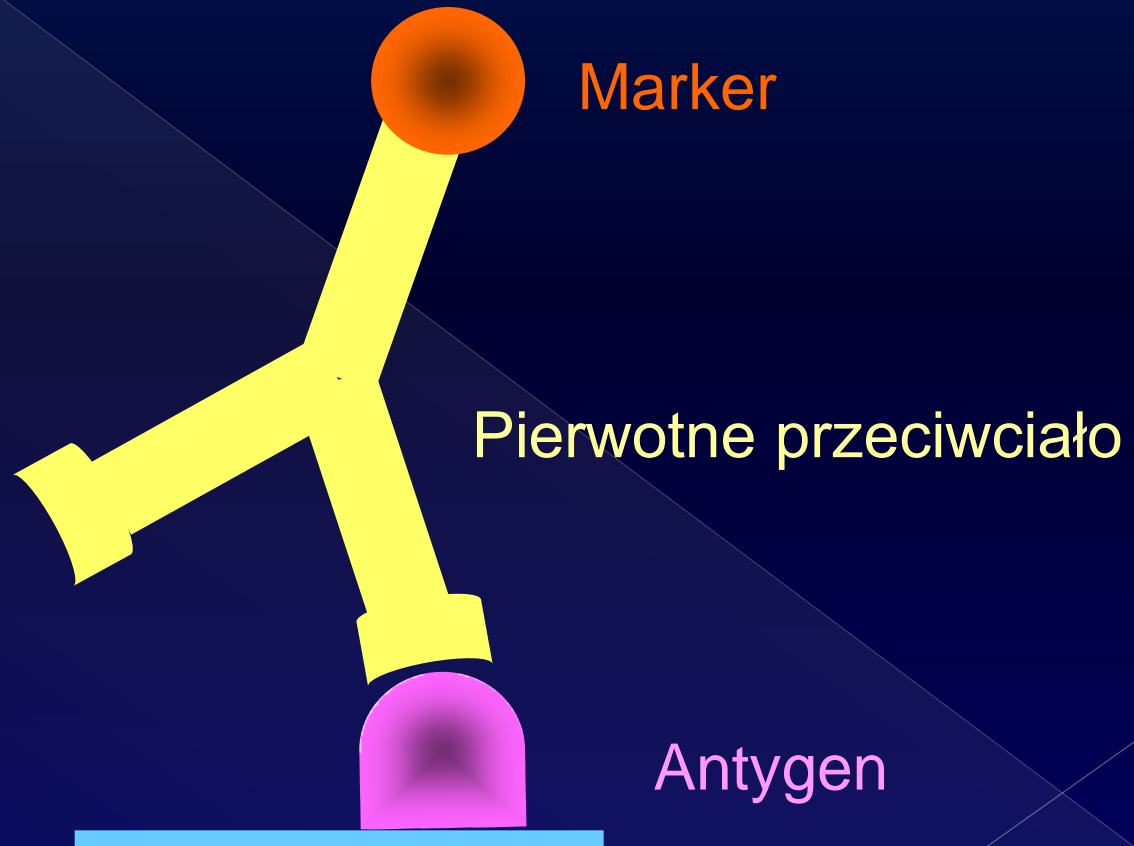
-z użyciem pierwotnego przeciwciała

## - METODA POŚREDNIA

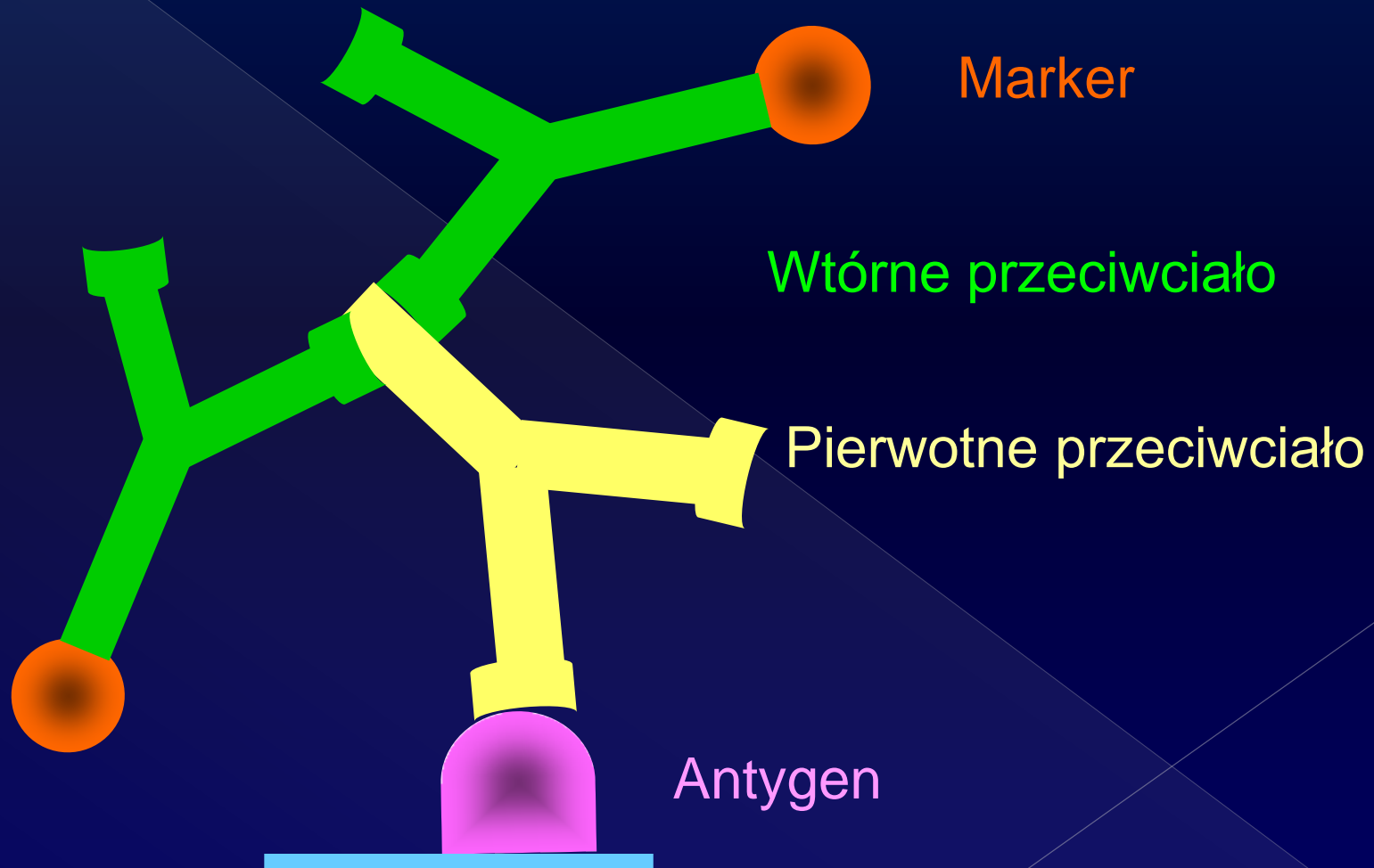
-z użyciem dalszych przeciwciał



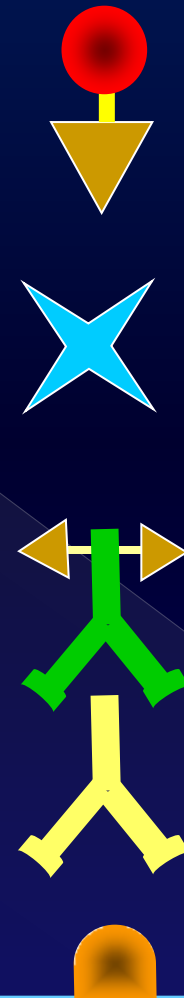
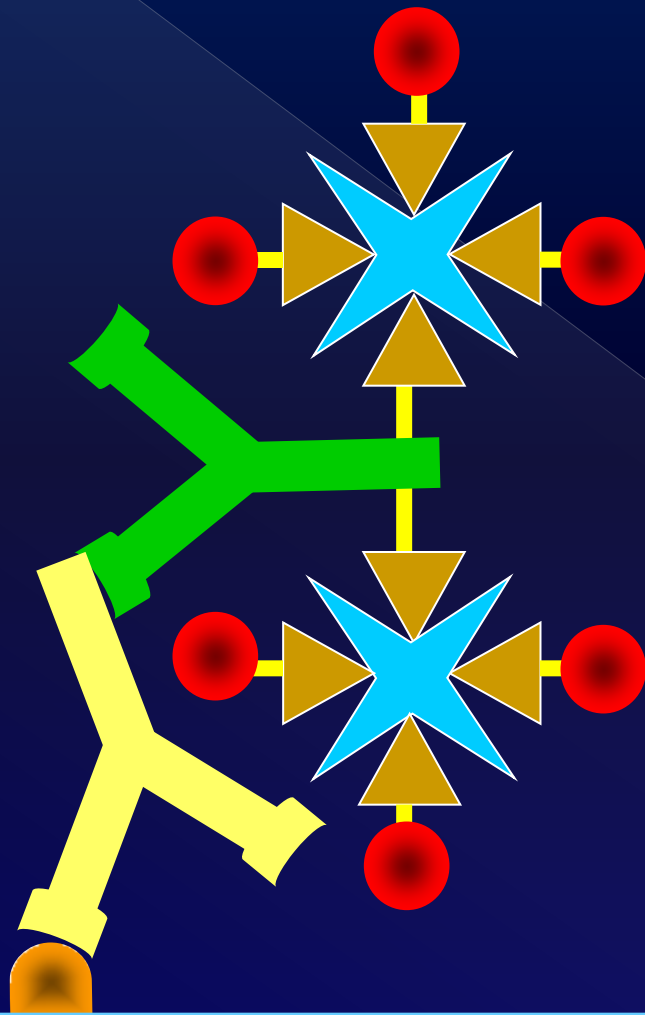
# IMMUNODETEKCJA BEZPOŚREDNIA



# IMMUNODETEKCJA POŚREDNIA



# IMMUNODETEKCJA POŚREDNIA



biotynylowany  
znacznik

streptawidyna  
lub awidyna

Biotynylowane  
wtórne  
przeciwciało

Pierwotne przeciwciało

antygen

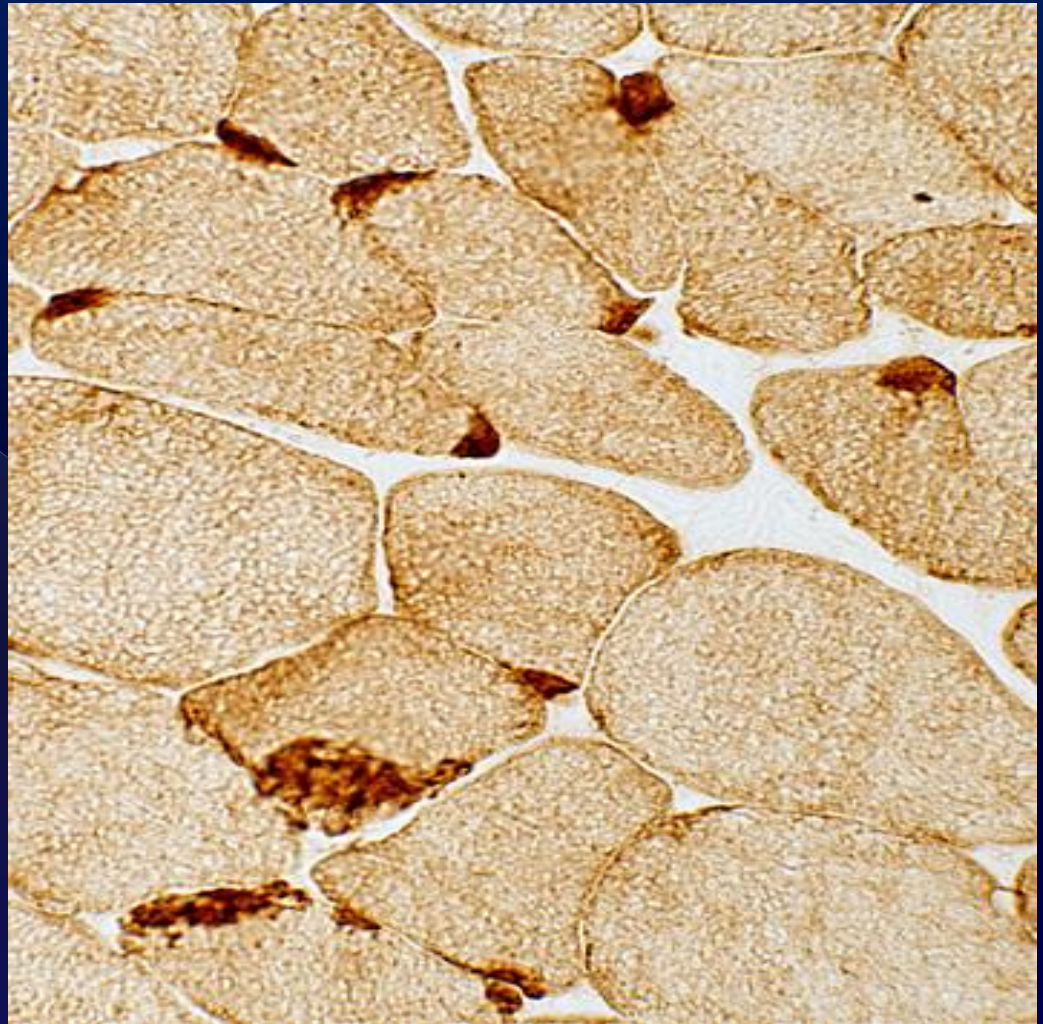
PEROKSYDAZA

SUBSTRAT  $H_2O_2$

Dwuaminobenzzydina  
(DAB)

(chromogen, donor  
wodoru)

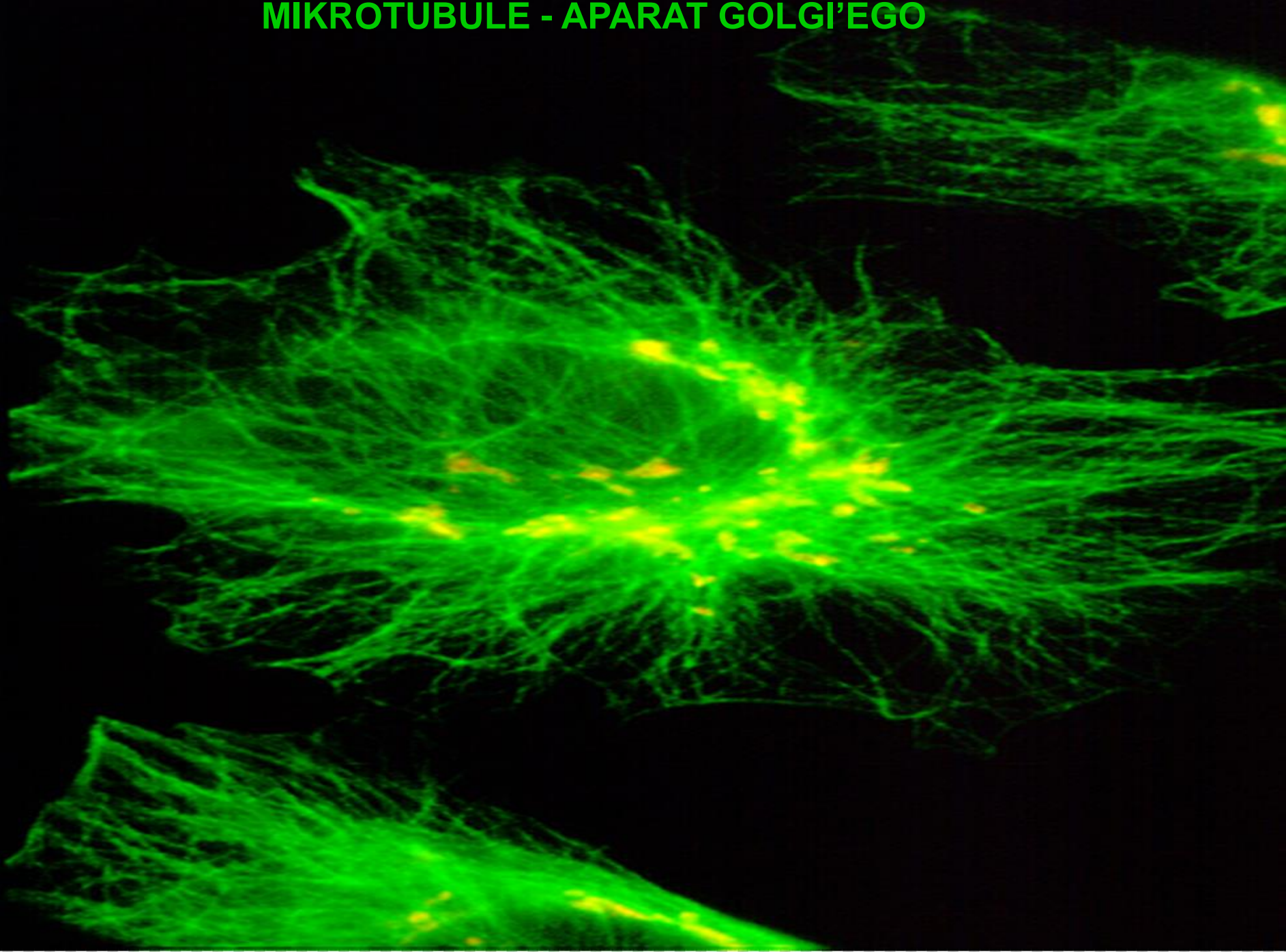
Utlenienie



BRUNATNY STRĄT

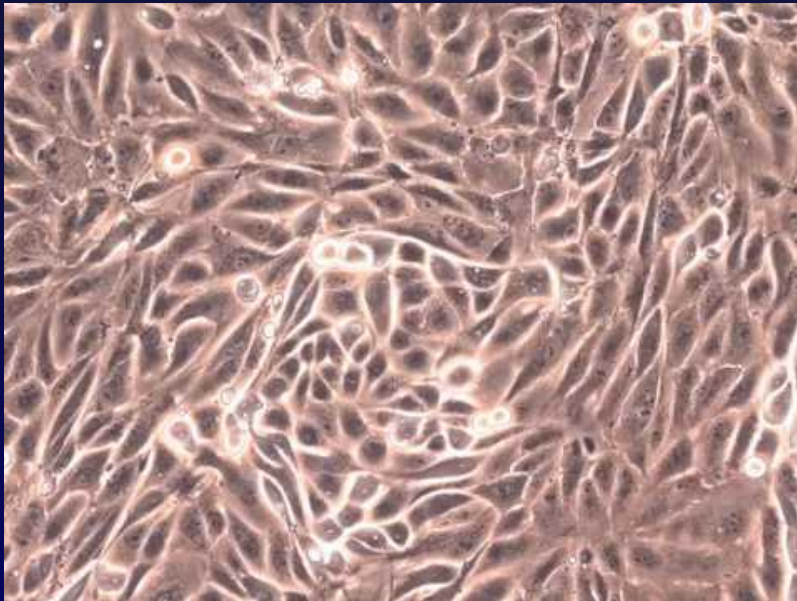
Wykrywanie desminy w komórkach  
mięśni szkieletowych

# MIKROTUBULE - APARAT GOLGI'EGO



# Co jeszcze możemy zbadać?

**Hodowla  
komórek/tkanek**

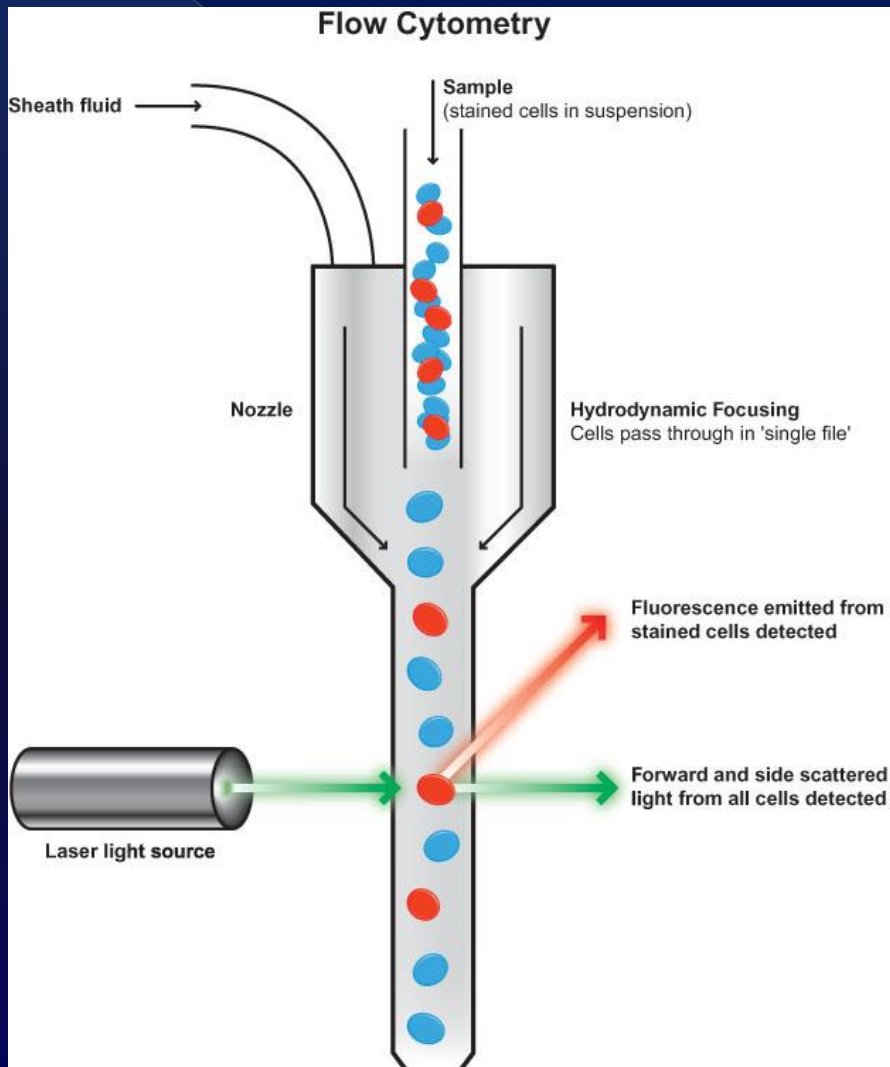


Hodowla komórek nabłonka nerki

**Mikroskop odwrócony**



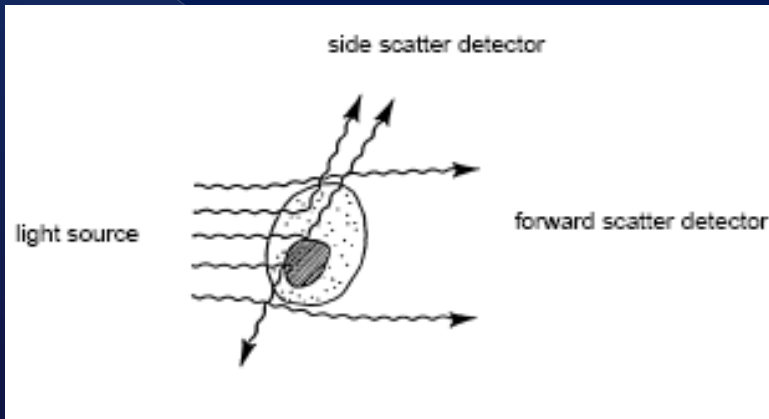
# CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



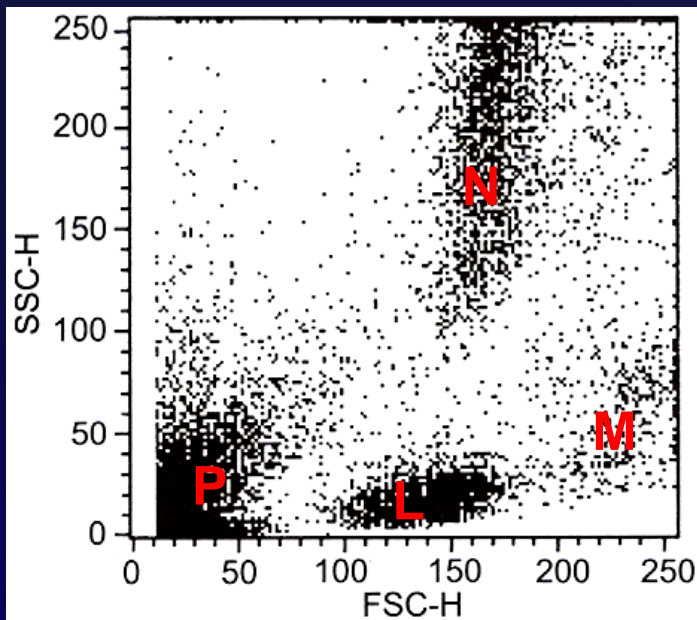
Cytometr przepływowy jest wyposażony w system pomiarowy, system optyczny (lampy, lasery), system detekcji sygnału oraz oprogramowanie umożliwiające przekształcenie ugięcia promienia światła forward-scattered light (**FSC**) i jego rozproszenia side scattered light (**SSC**), a także sygnału z fluorescencji w impulsy elektryczne.

Komórki pojedynczo przechodzą przez wiązkę światła lasera

# CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



FSC – Forward-scattered light (ugięcie wiązki) jest proporcjonalne do rozmiaru i pola powierzchni komórki.



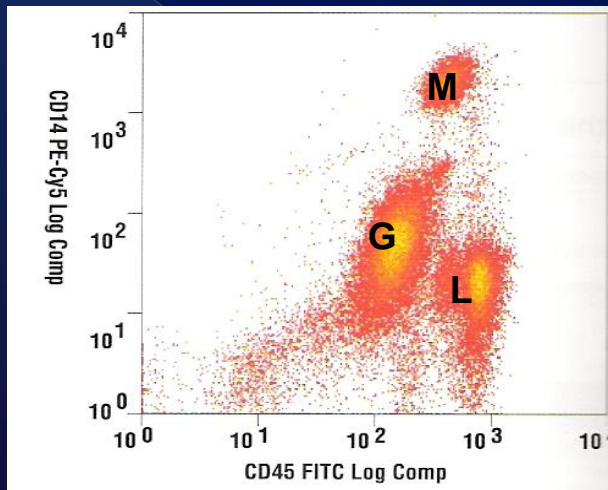
Ludzkie leukocyty krwi obwodowej  
FSC/SSC.

SSC - Side-scattered light (rozproszenie) jest proporcjonalne do ilości ziarnistości, pęcherzyków i komplikacji układu błon wewnątrzkomórkowych.

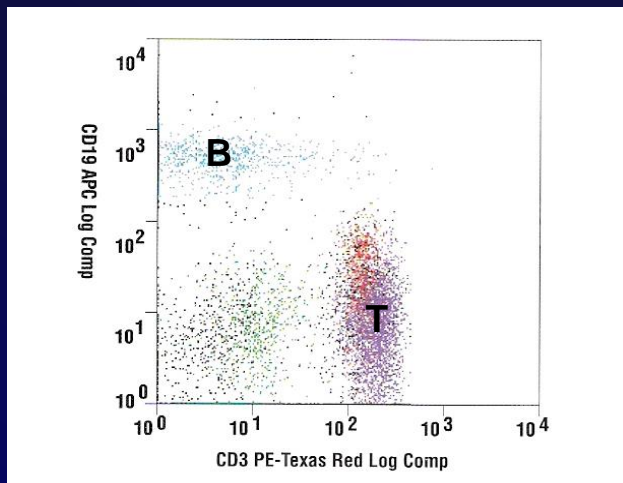


# CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA

Leukocyty krwi obwodowej

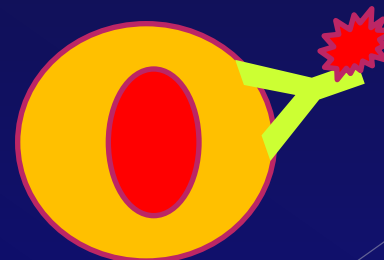


Anty-CD45 i anty-CD14.



Anty-CD3 i anty-CD19.

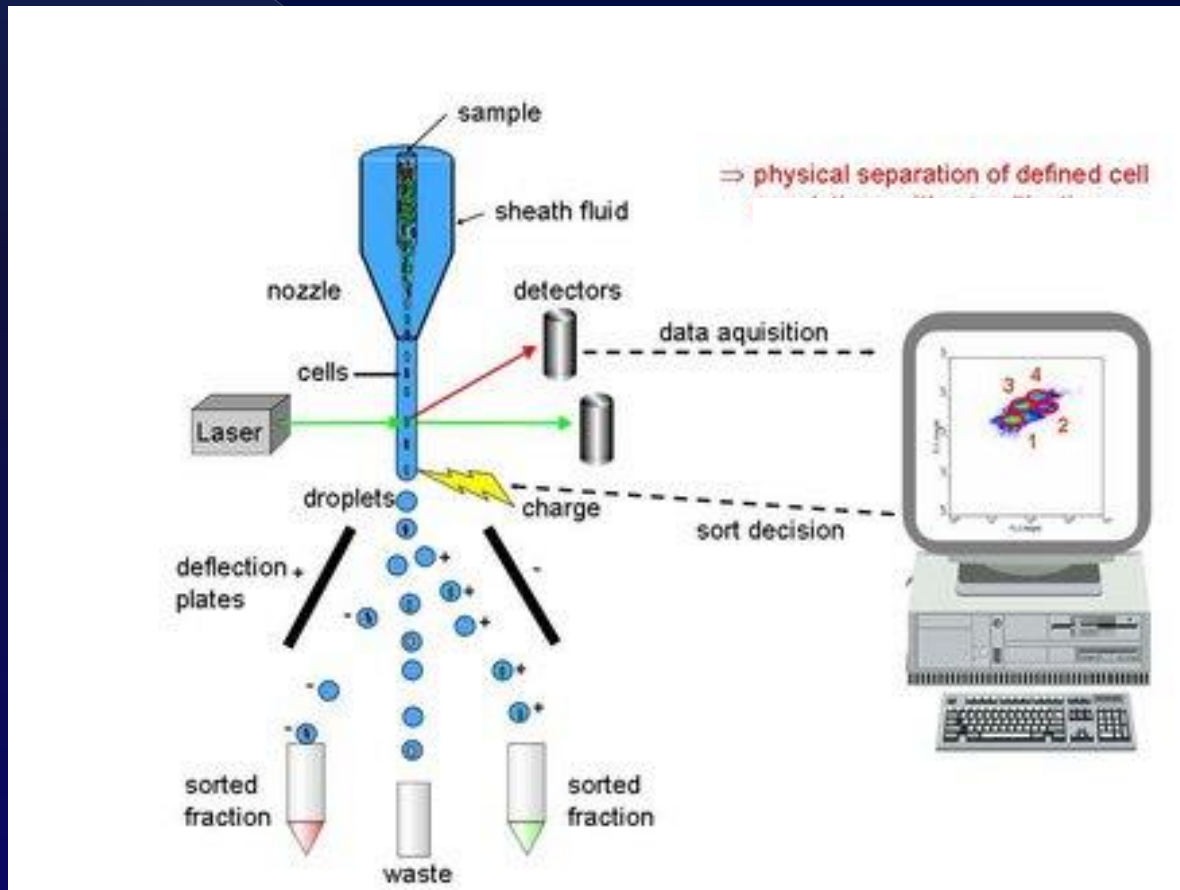
Sprzęgnięte z barwnikiem fluorescencyjnym przeciwciała są stosowane do identyfikacji poszczególnych komórek w zależności od ich markerów powierzchniowych. Można użyć jednocześnie kilku fluorochromów. Wybarwienie różnych komórek wraz z FSC i SSC tworzy wzór danej subpopulacji.



Przeciwciało  
znakowane  
fluorochromem

# SORTOWANIE KOMÓREK

Umożliwia wychwytywanie i kolekcjonowanie komórek dla dalszej analizy (mikroskopowej, biochemicznej lub funkcjonalnej)



# ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ

## DIAGNOSTYKA:

- chorób rozrostowych układu chłonnego i krwiotwórczego
- wrodzonych i nabytych niedoborów odporności
- chorób autoimmunizacyjnych
- analiza komórek przeznaczonych do przeszczepów szpiku

## MONITOROWANIE:

- przebiegu leczenia białaczek
- stanu układu odpornościowego pacjentów z HIV
- leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepach

# Co jeszcze można zbadać?

## Zawartość komórek

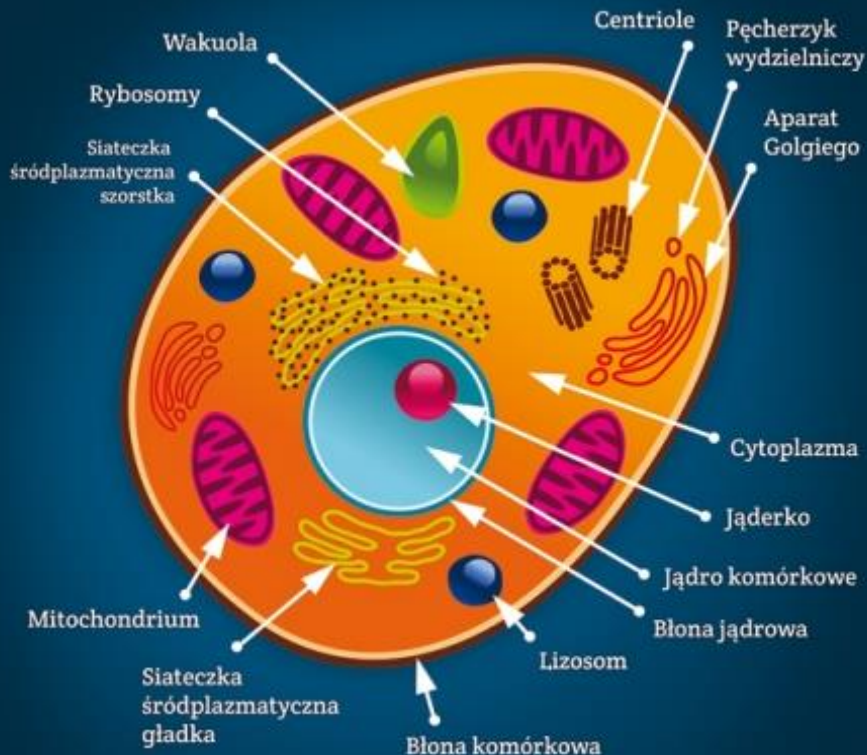
**Organelle**

**Białka**

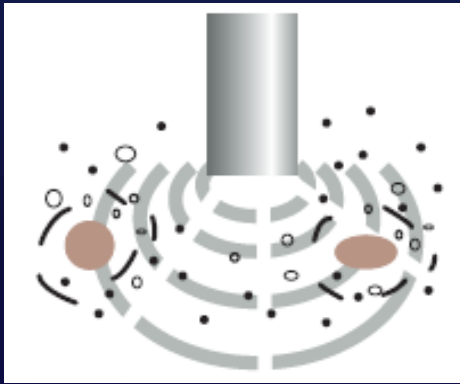
**Sacharydy**

**Kwasy nukleinowe**

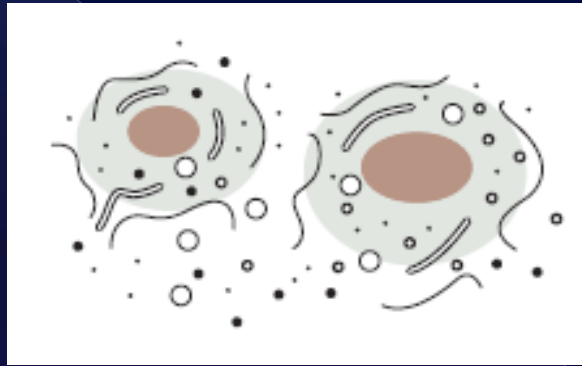
**Lipidy**



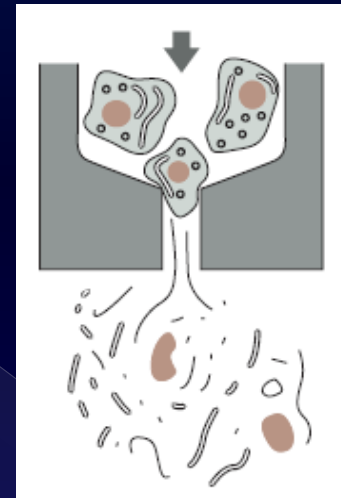
# ***Izolacja materiału***



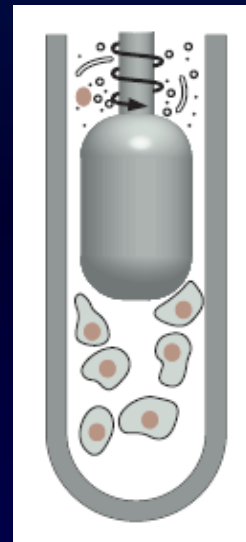
Rozbijanie  
komórek  
ultradźwiękami



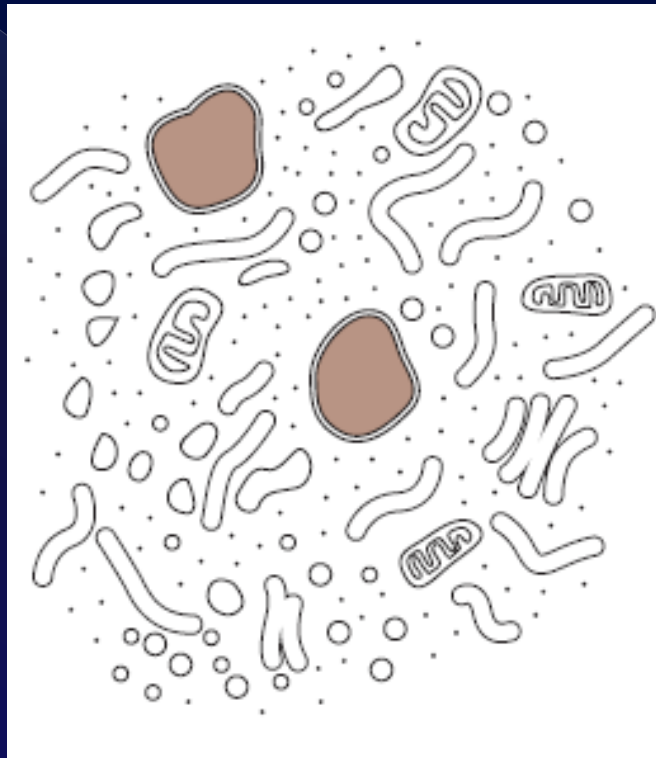
Niszczanie błon  
komórkowych  
detergentami



Mechaniczne  
rozbijanie komórek



# *Izolacja materiału*

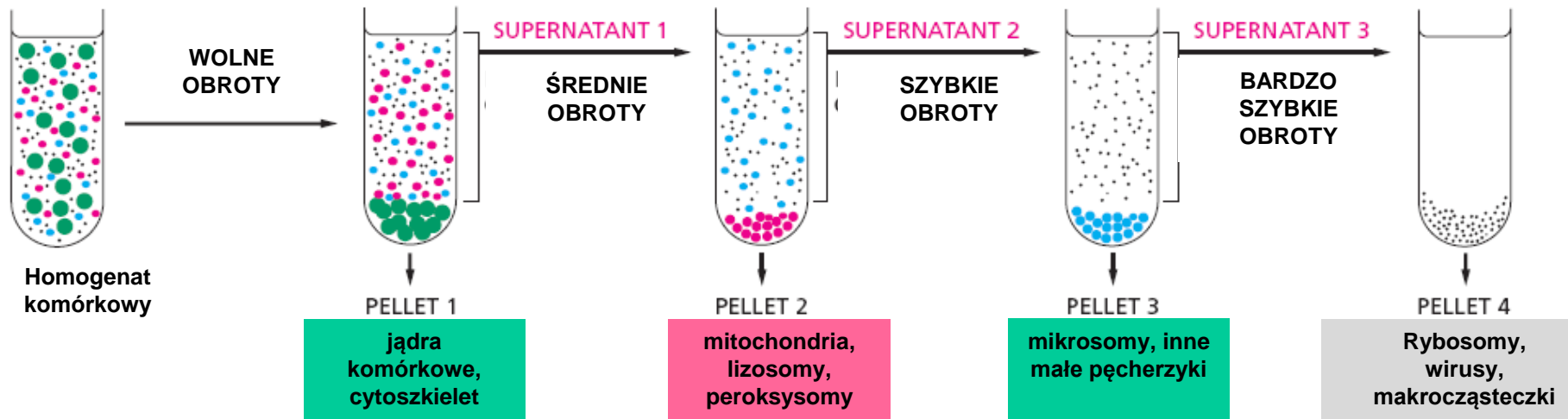


Homogenat z komórek

# Frakcjonowanie

## Wirowanie frakcjonujące

różnice w rozmiarze i gęstości: struktury o większym rozmiarze i gęstości tworzą peletki przy działaniu mniejszej siły odśrodkowej.



# WESTERN BLOT

Metoda wykrywania białek w homogenatach tkankowych, ekstraktach komórkowych lub płynach ustrojowych.

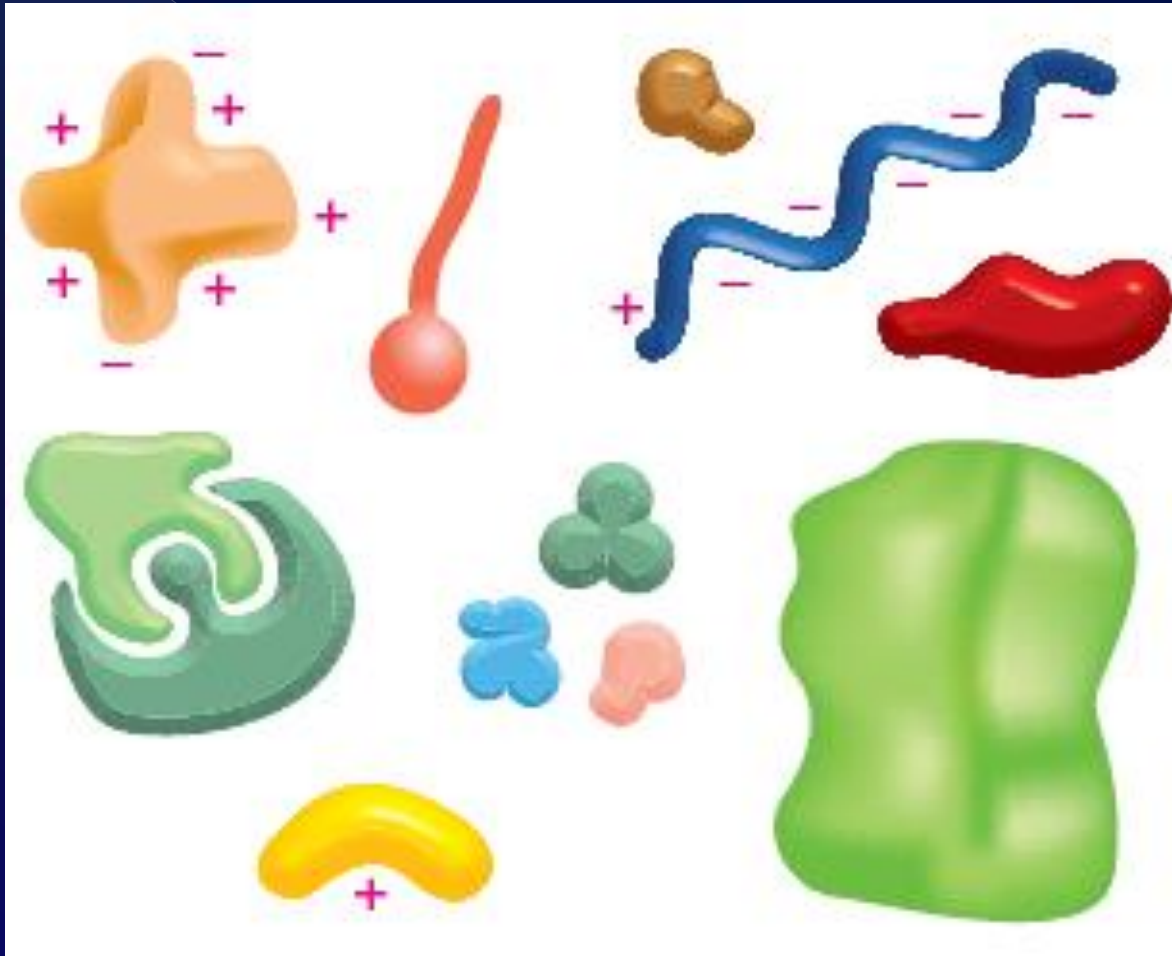


W. Neal Burnette – amerykański biochemik, opublikował pracę, w której opisał technikę nazwaną przez niego Western blotting (1981)



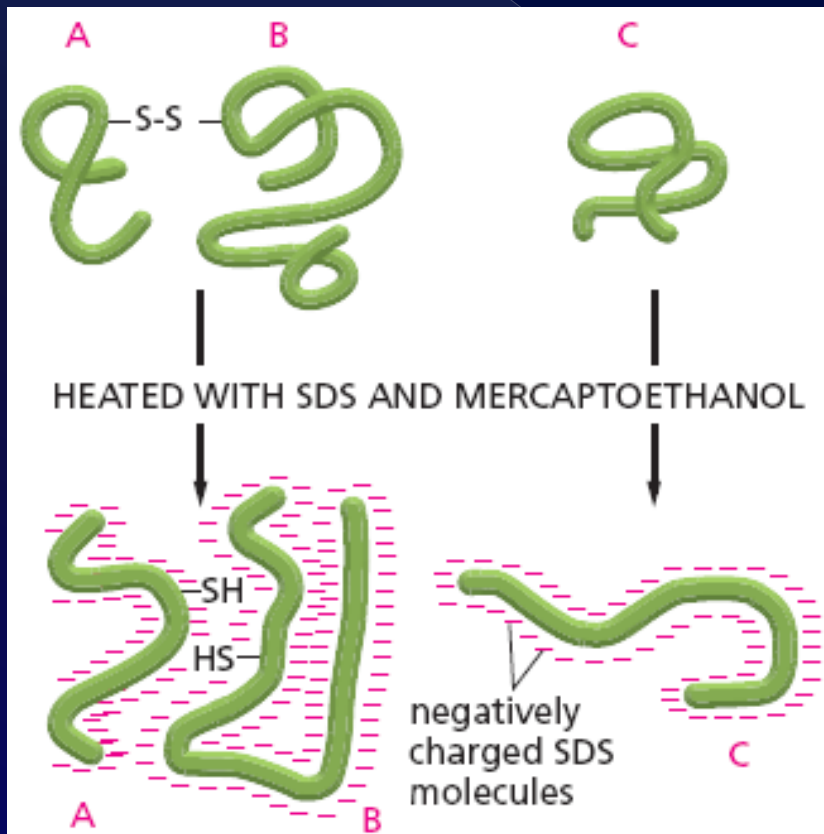
# ANALIZA BIAŁEK

## *Rozdzielanie i wykrywanie*



# ANALIZA BIAŁEK

## Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecylu sodu (SDS-PAGE).

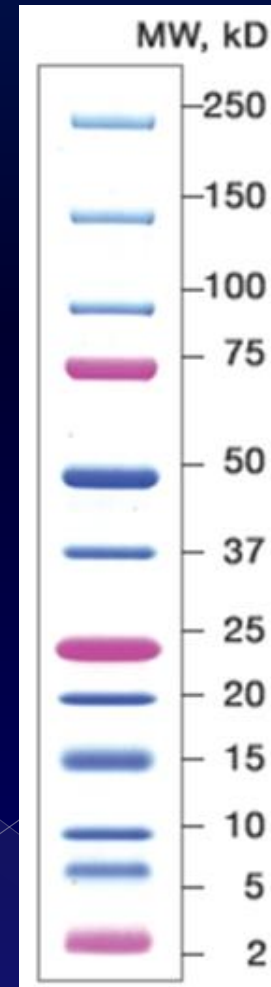
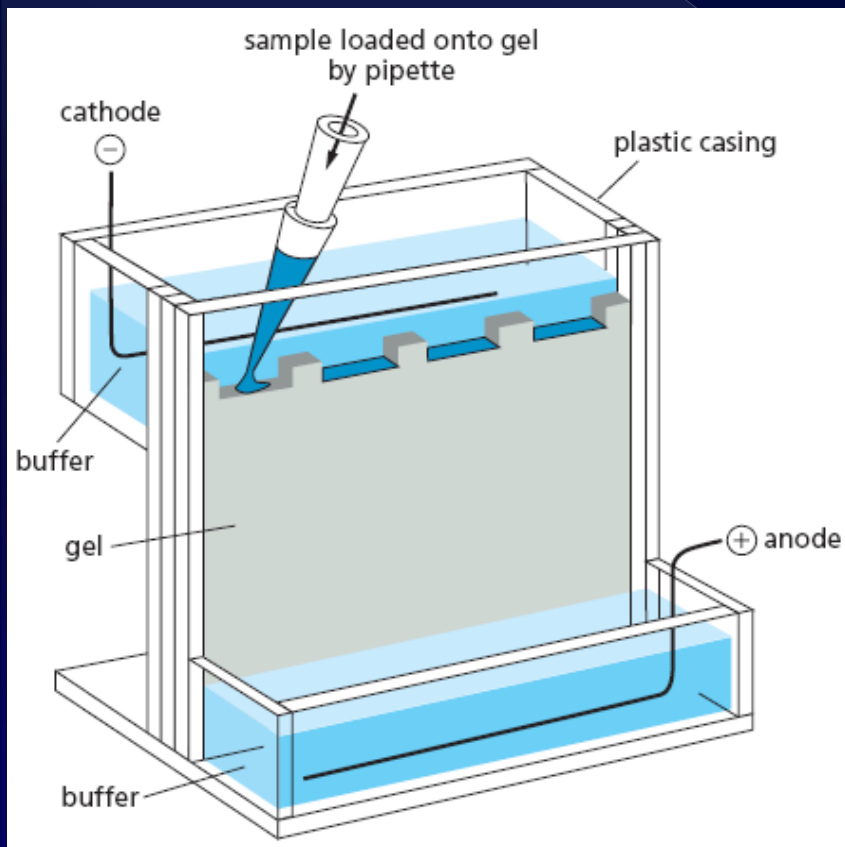


Białka w próbce są ogrzewane z ujemnie naładowanym detergentem SDS (anionowy surfaktant), który je opłascza, nadaje im jednolitej gęstości ładunek ujemny i rozwija. Mostki dwusiarczkowe (S-S) są redukowane przez merkaptoetanol

# ANALIZA BIAŁEK

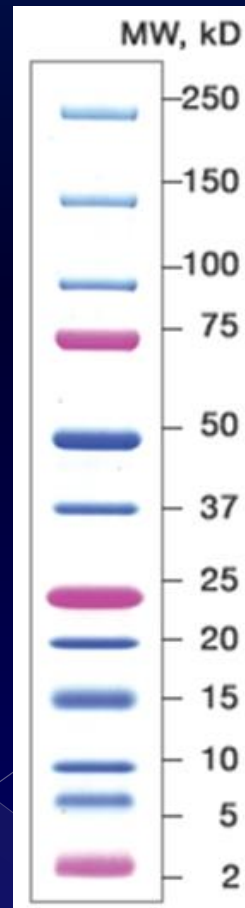
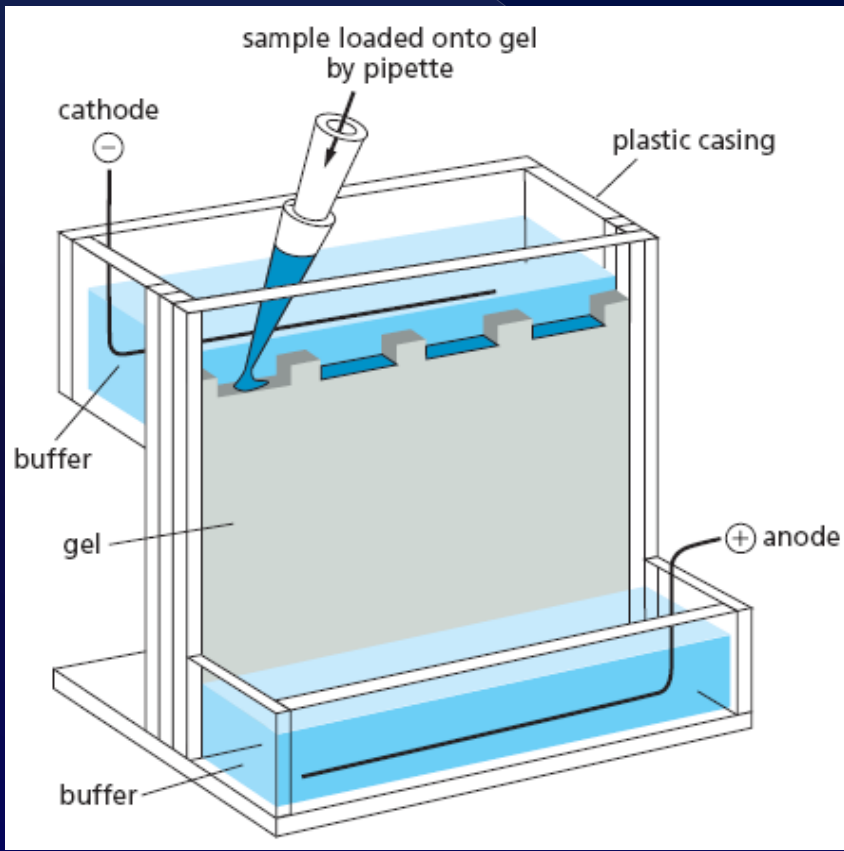
## Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu (SDS-PAGE).

Próbkę umieszcza się w studziencie w żelu poliakrylamidowym, a następnie przykłada się pole elektryczne. Pod wpływem pola ujemnie naładowane kompleksy SDS-białka migrują w żelu w kierunku dodatniej anody. Małe białka szybciej, większe białka wolniej.



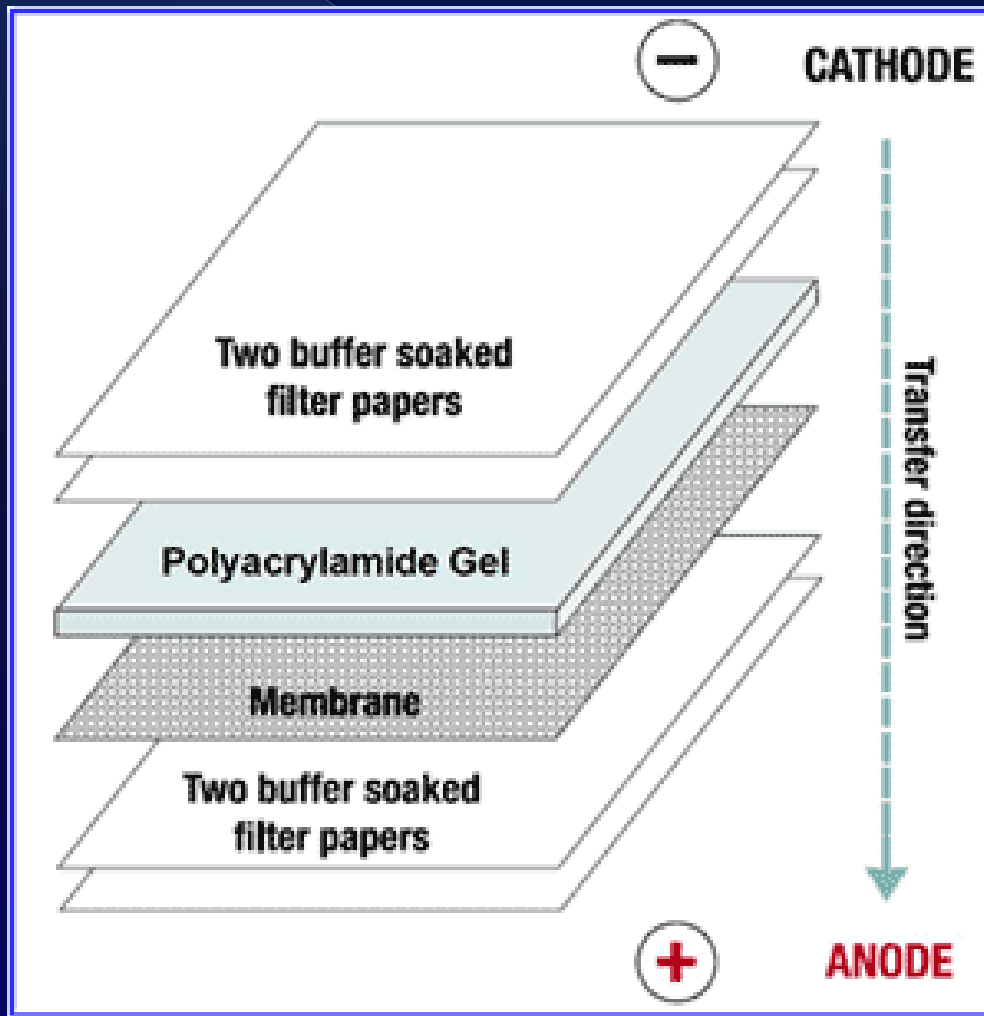
# ANALIZA BIAŁEK

## Elektroforeza



# ANALIZA BIAŁEK

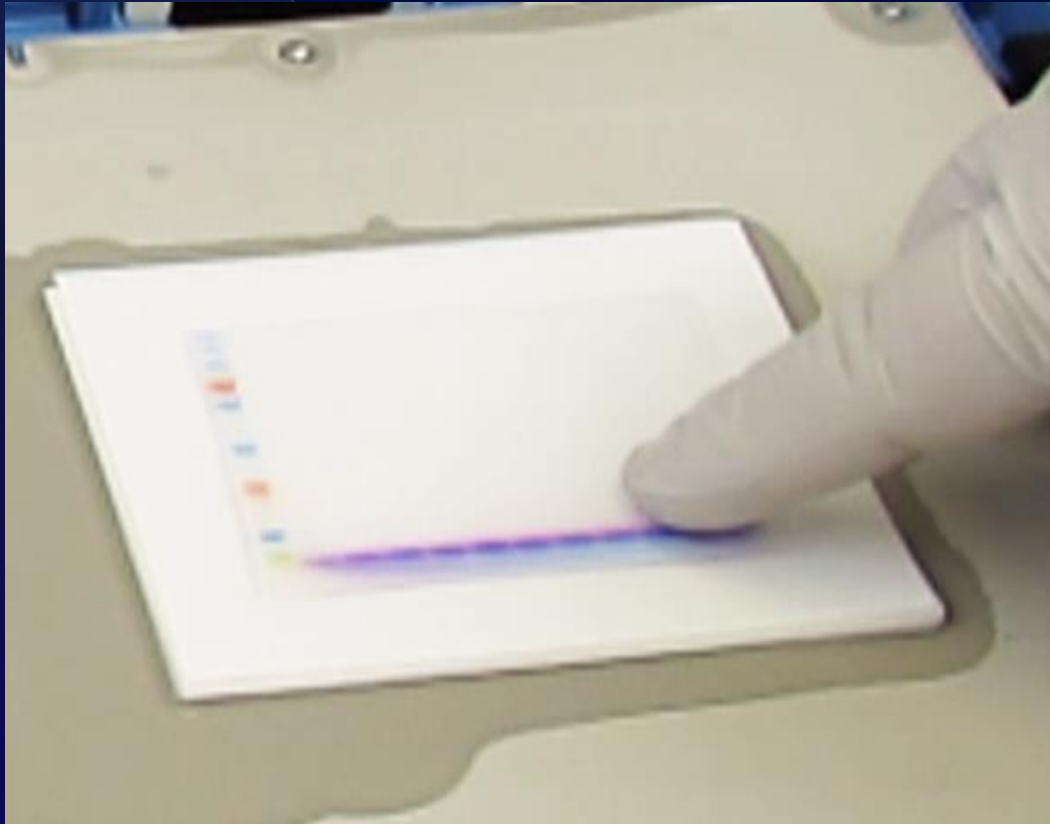
## TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA BŁONĘ



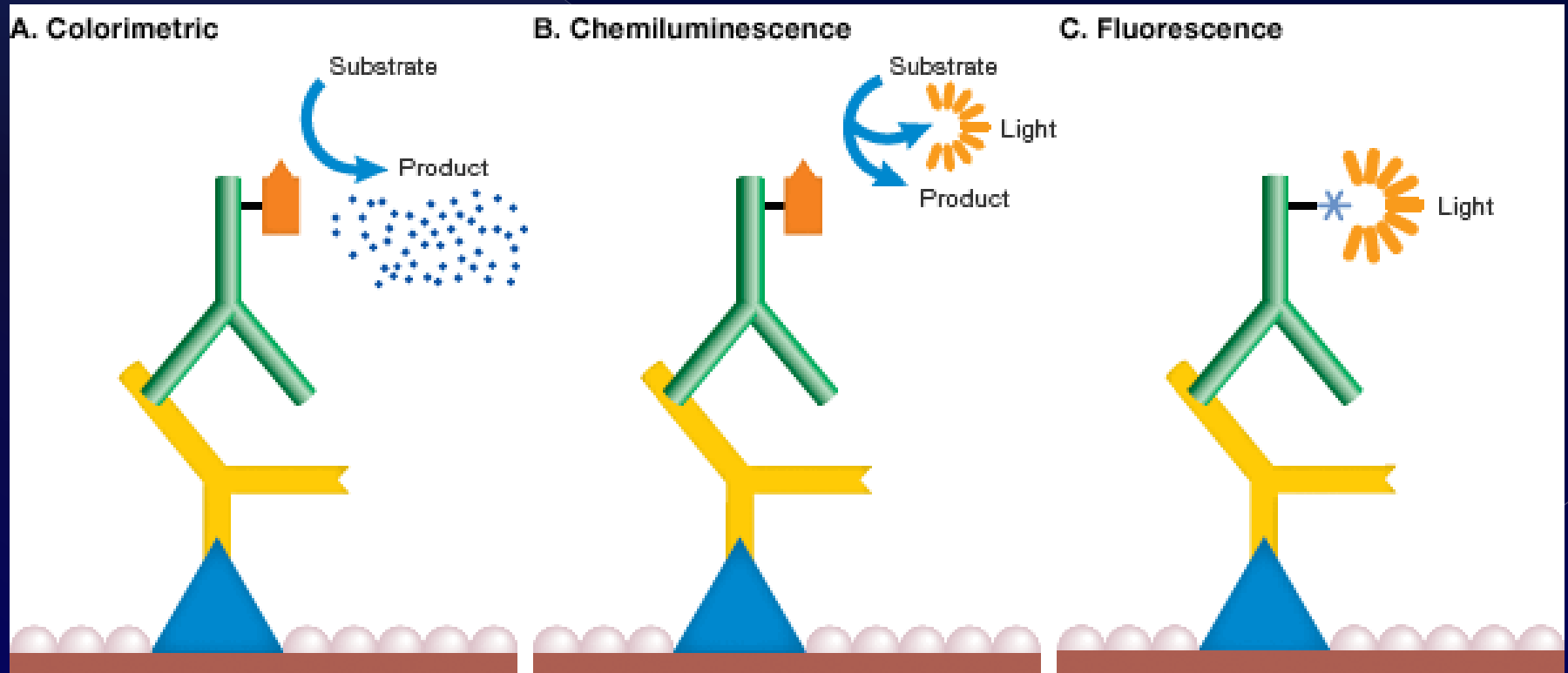
Żel z rozwiniętym zestawem białek umieszcza się następnie w urządzeniu, które umożliwia (pod wpływem pola elektrycznego) przeniesienie białek z żelu na powierzchnię specjalnych błon (np. błony nitrocelulozowej lub z polifluorku winylidenu (PVDF), która silnie adsorbuje białka.

# ANALIZA BIAŁEK

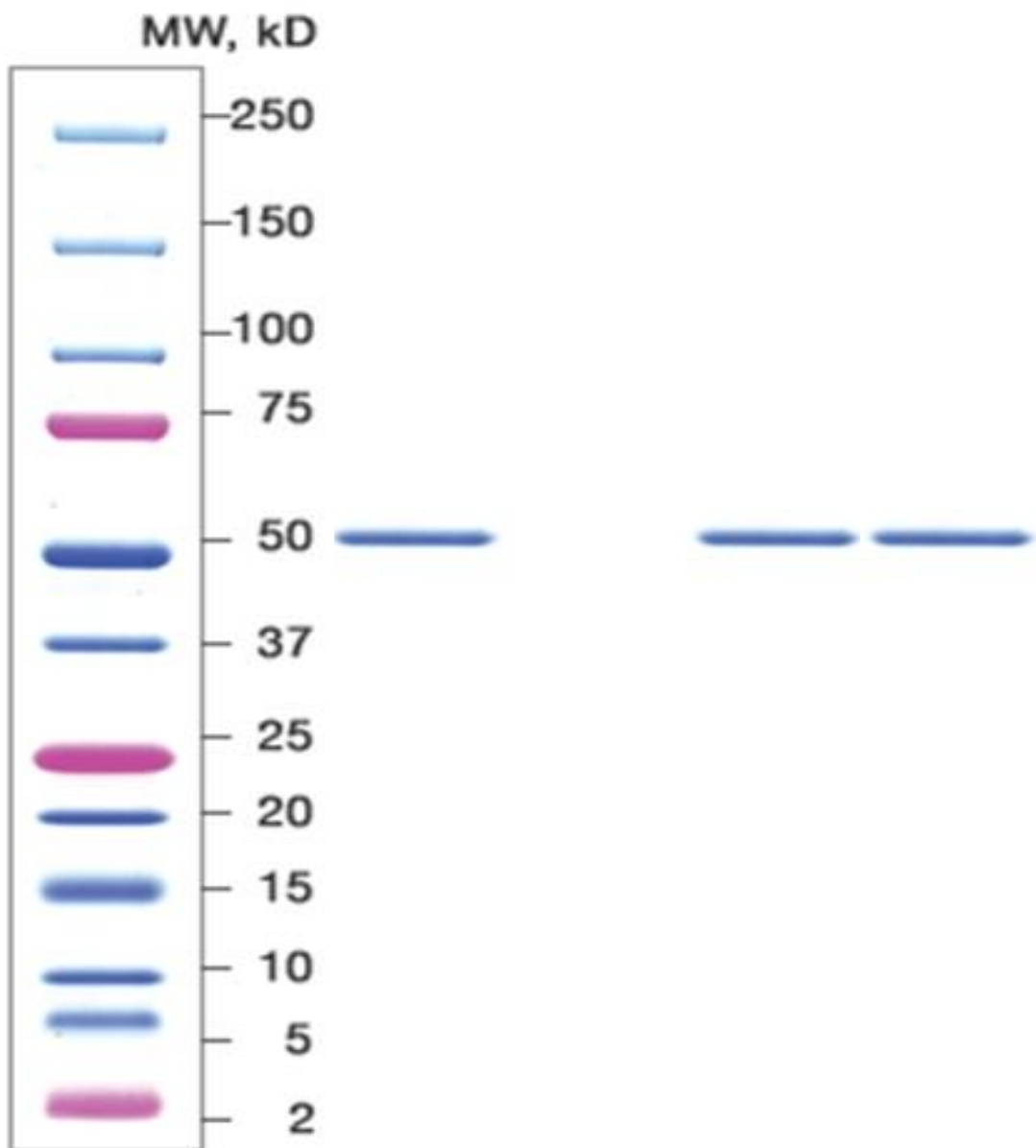
## WESTERN BLOT Błona PVDF po transferze



# WESTERN BLOT - RÓŽNE METODY DETEKCJI



# WESTERN BLOT - WYNIK





# ANALIZA BIAŁEK

**ELISA** - test immunoenzymatyczny, wykrywanie i ocena ilościowa białek z użyciem przeciwciał związanych z enzymem

1966 - opłaszczenie przeciwciałami lub antygenem płytki - Wide and Jerker Porath

1971 - Peter Perlmann and Eva Engvall at Stockholm University - test ELISA

**Enzyme**

**Linked**

**Immunosorbent**

**Assay**

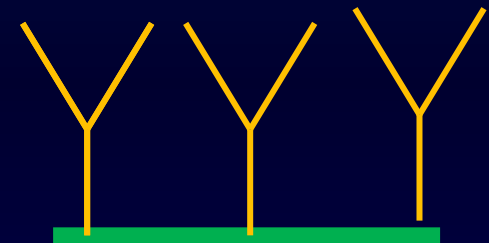
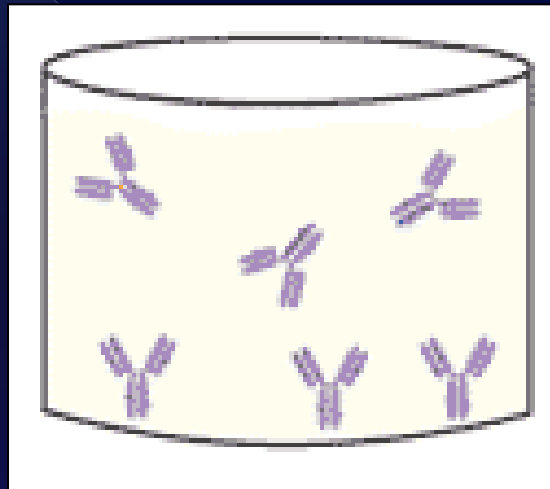


**Wykrywanie i ocena ilościowa białek**

# ANALIZA BIAŁEK

## ELISA

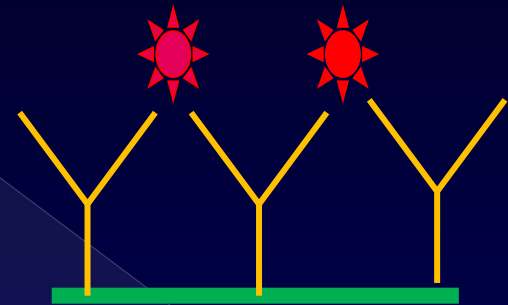
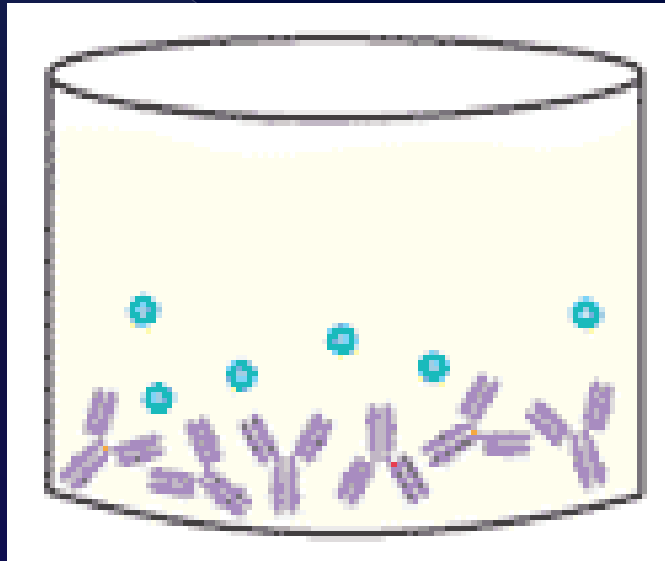
Płytki 96-studzienkowa



Dno płytki jest pokryte przeciwciałami wychwytyjącymi

# ANALIZA BIAŁEK

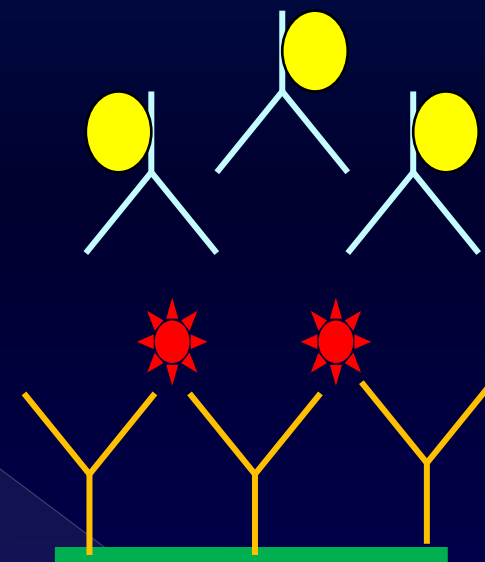
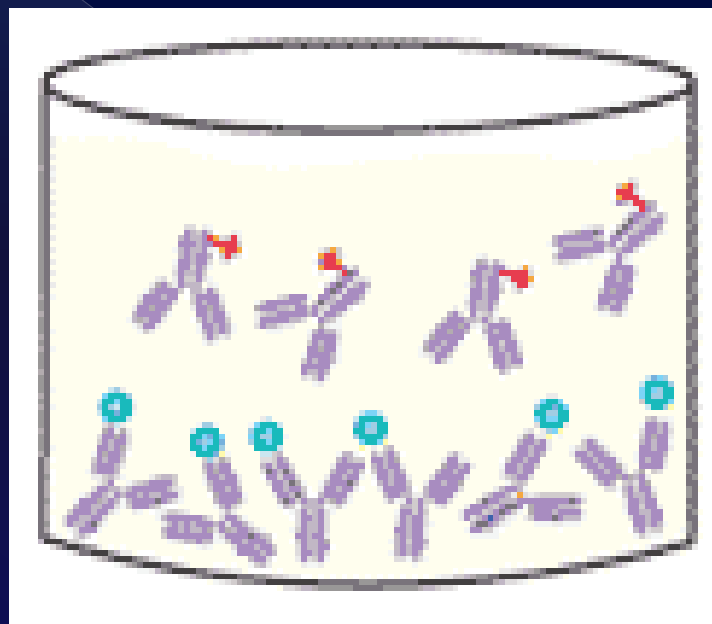
## ELISA



Próbka z badanym białkiem

# ANALIZA BIAŁEK

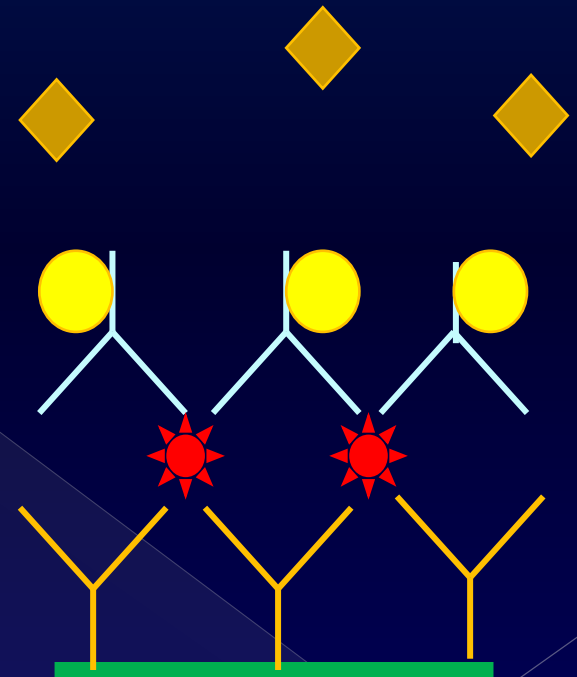
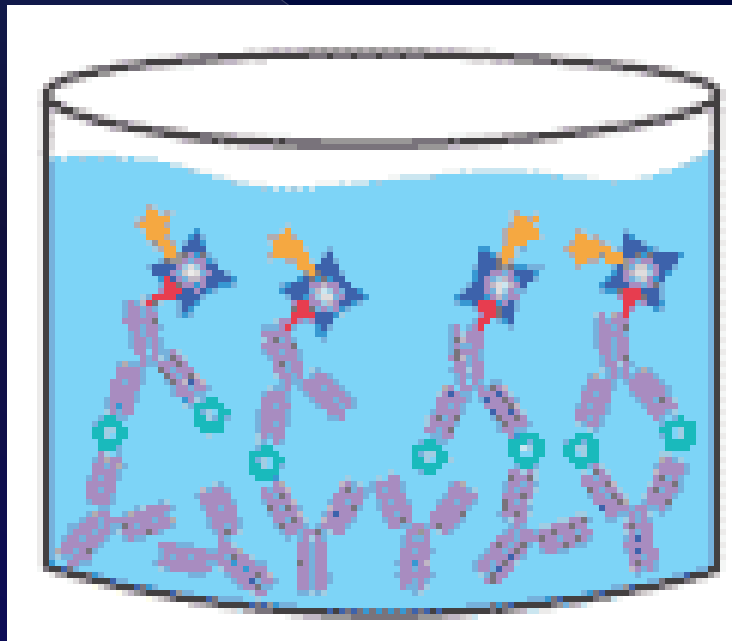
## ELISA



Przeciwciała sprzęgnięte z enzymem

# ANALIZA BIAŁEK

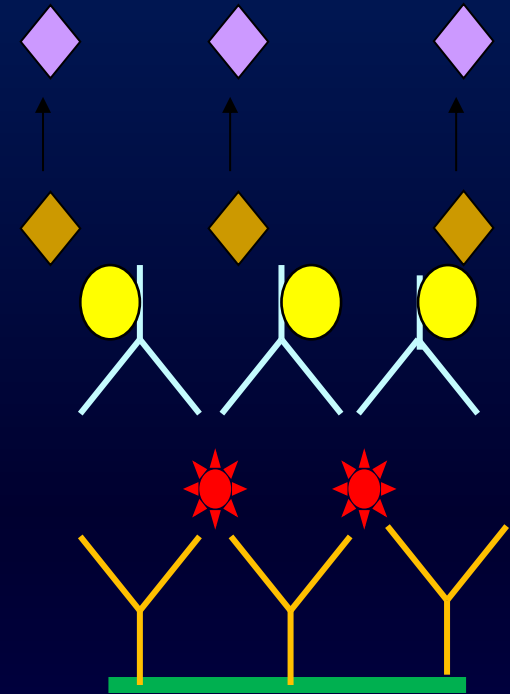
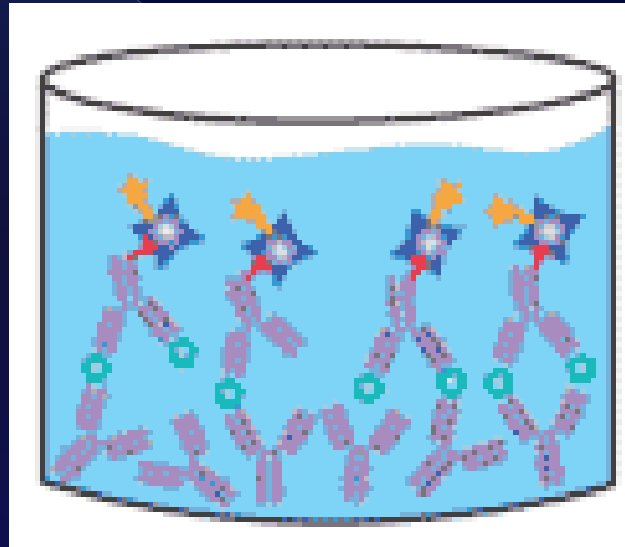
## ELISA



Dodanie substratu

# ANALIZA BIAŁEK

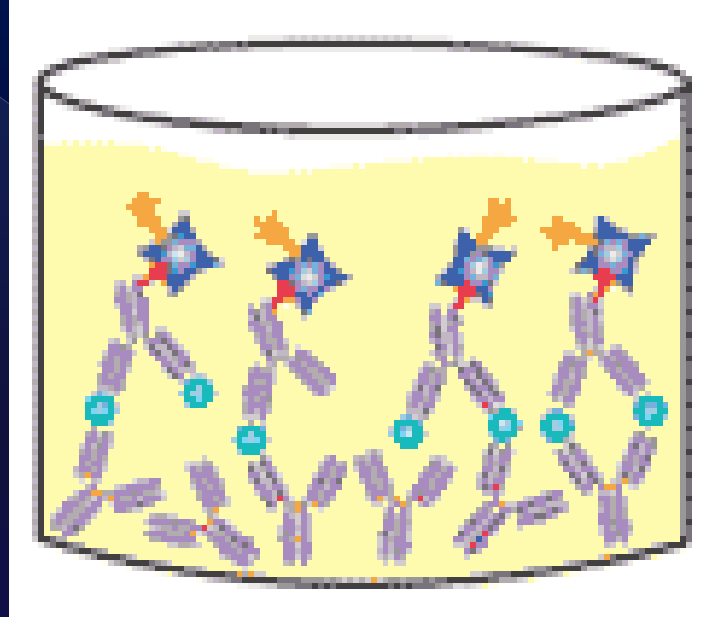
## ELISA



Przekształcenie bezbarwnego substratu w barwny produkt.  
Intensywność barwy zależy od ilości badanego białka.

# ANALIZA BIAŁEK

## ELISA



Dodanie roztworu stopującego reakcję

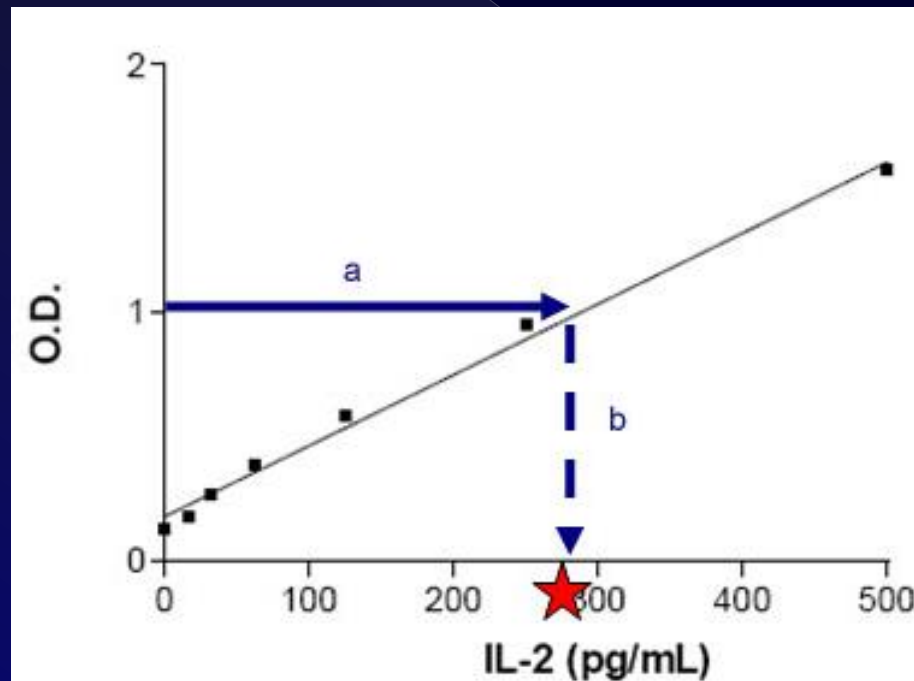
Odczyt absorbcji

# ANALIZA BIAŁEK

## ELISA

Standard

Nieznane stężenie  
badanego białka





# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH



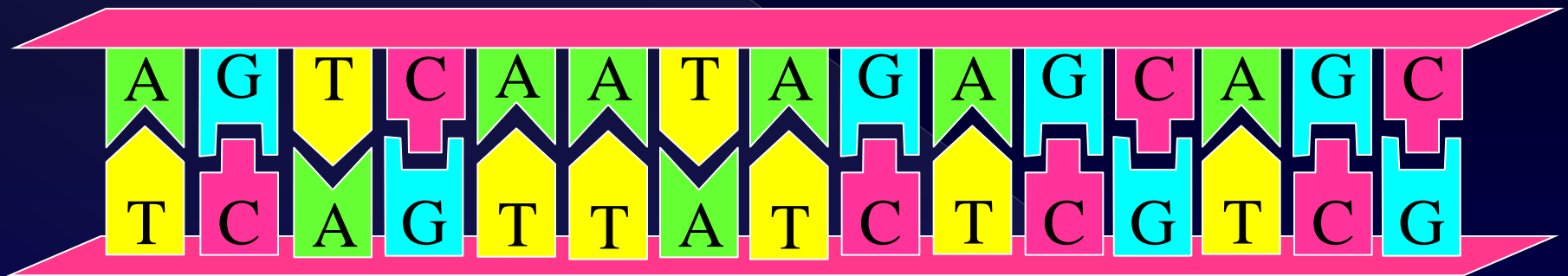
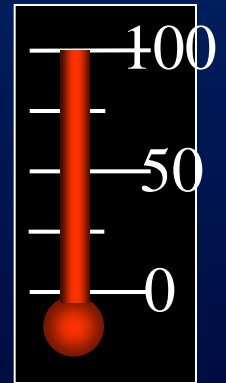
***Amplifikacja***

***Ekspresja  
genów***

# Denaturacja

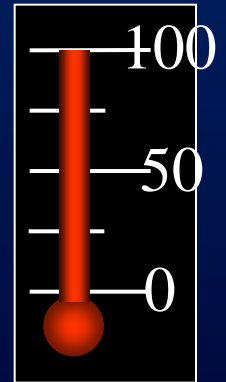
Denaturacja DNA (topnienie DNA, mięknięcie DNA) – separacja podwójnej nici DNA na dwie pojedyncze nici wskutek zerwania wiązki wodorowych pomiędzy nićmi (denaturacja termiczna, denaturacja chemiczna)

# Renaturacja



Powolne ochładzanie DNA powoduje, że małe komplementarne obszary przeciwnych nici DNA łączą, dając obszary podwójnej helisy. Następnie reszta helisy szybko ulega renaturacji.

# Hybrydyzacja



Zjawisko spontanicznego łączenia się komplementarnych nici kwasów nukleinowych (DNA z DNA, RNA z RNA lub DNA z RNA).

# SOUTHERN BLOT

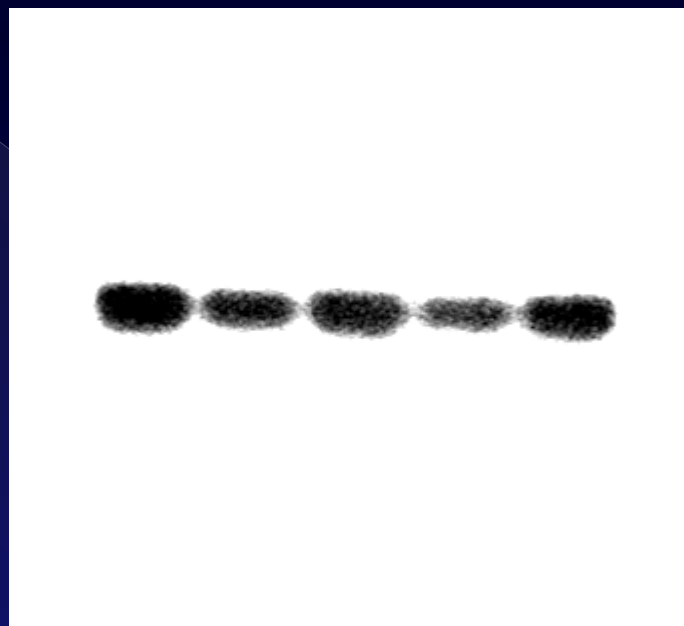
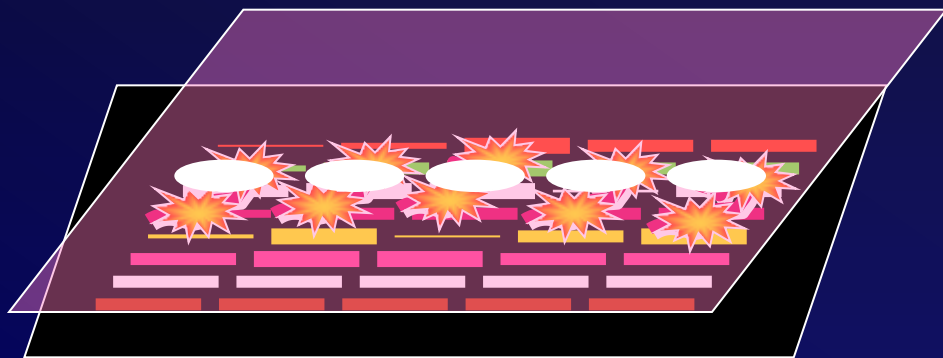
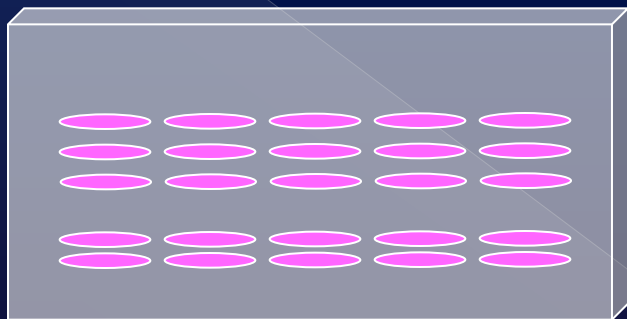


Hybrydyzacja metodą Southerna – stosowana w biologii molekularnej metoda służąca do wykrywania określonych fragmentów DNA. Jej nazwa pochodzi od nazwiska Edwina Southerna, który ją opisał i przedstawił w roku 1975.

Sir Edwin Mellor Southern, angielski biolog molekularny.

# SOUTHERN BLOT

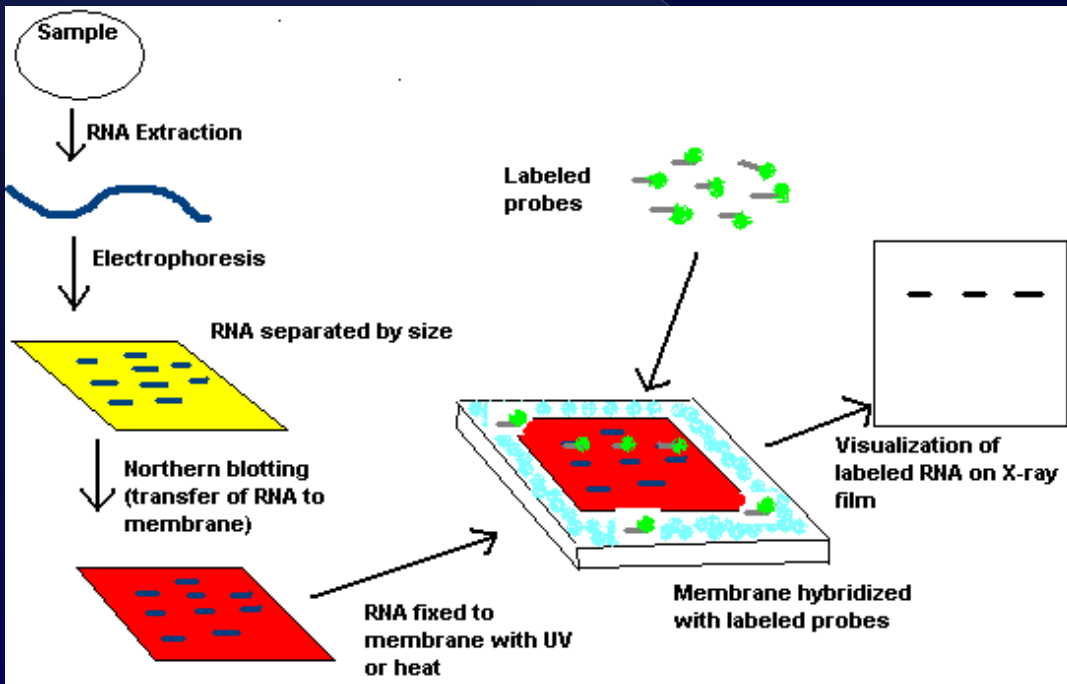
1. Cięcie DNA enzymami restrykcyjnymi
2. Elektroforeza DNA.
3. Denaturacja alkaliczna DNA
4. Transfer na błonę nitrocelulozową lub nylonową.
5. Dodanie wyznakowanej sondy – fragmentu DNA lub RNA.



Southwestern blot - identyfikacja białek wiążących DNA poprzez ich zdolność do łączenia się z sondami DNA. Białka są poddawane elektroforezie i transferowane na błonę.

# NORTHERN BLOT

Hybrydyzacja northern – stosowana w biologii molekularnej metoda służąca do detekcji określonych sekwencji RNA. Najczęściej stosuje się ją do wykrywania mRNA genów ulegających transkrypcji w komórce (James Alwine, David Kemp, George Stark – amerykańscy biochemicy)



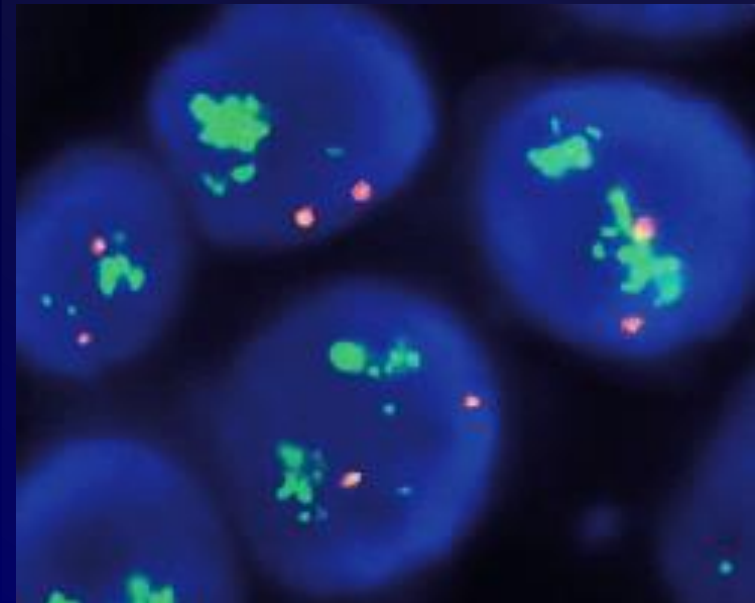
RNA poddaje się rozdzielaniu elektroforetycznemu (elektroforezie) na żelu, po rozdzielaniu RNA przenosi się na odpowiednią membranę, membranę z RNA inkubuje się z sondą DNA lub RNA, następnie przeprowadza detekcję, czyli uwidacznianie sondy, która związała się do poszukiwanej sekwencji RNA na membranie.

# Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

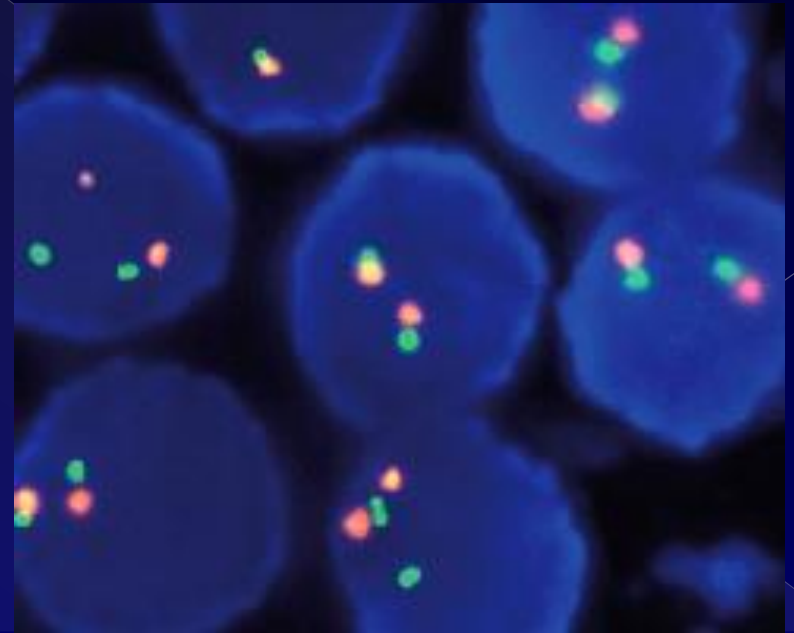
Wykrywanie określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA

Rak sutka – multiplikacja genu HER2 - sonda HER2/Cen-17. (sygnał zielony z HER2 i pomarańczowy z centromerem chromosomu 17.

Amplifikacja genu HER2



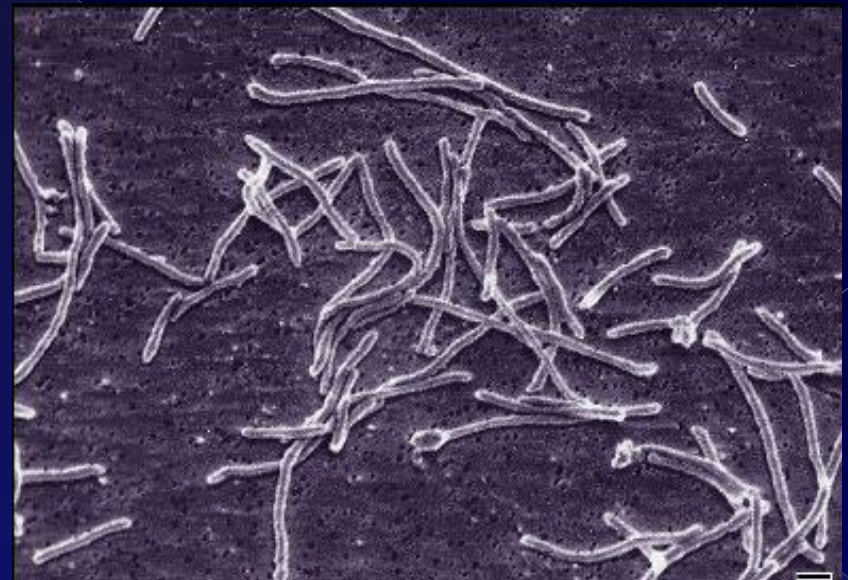
Prawidłowe jadro



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

## Reakcja łańcuchowa polimerazy

*Thermus aquaticus* – gatunek bakterii bytujący w wysokich temperaturach. Jest źródłem temperaturoopornej Taq polimerazy DNA wykorzystywanej w biologii molekularnej do reakcji PCR – techniki amplifikacji DNA. Bakterie te zostały odkryte w gorących źródłach Parku Narodowego Yellowstone.



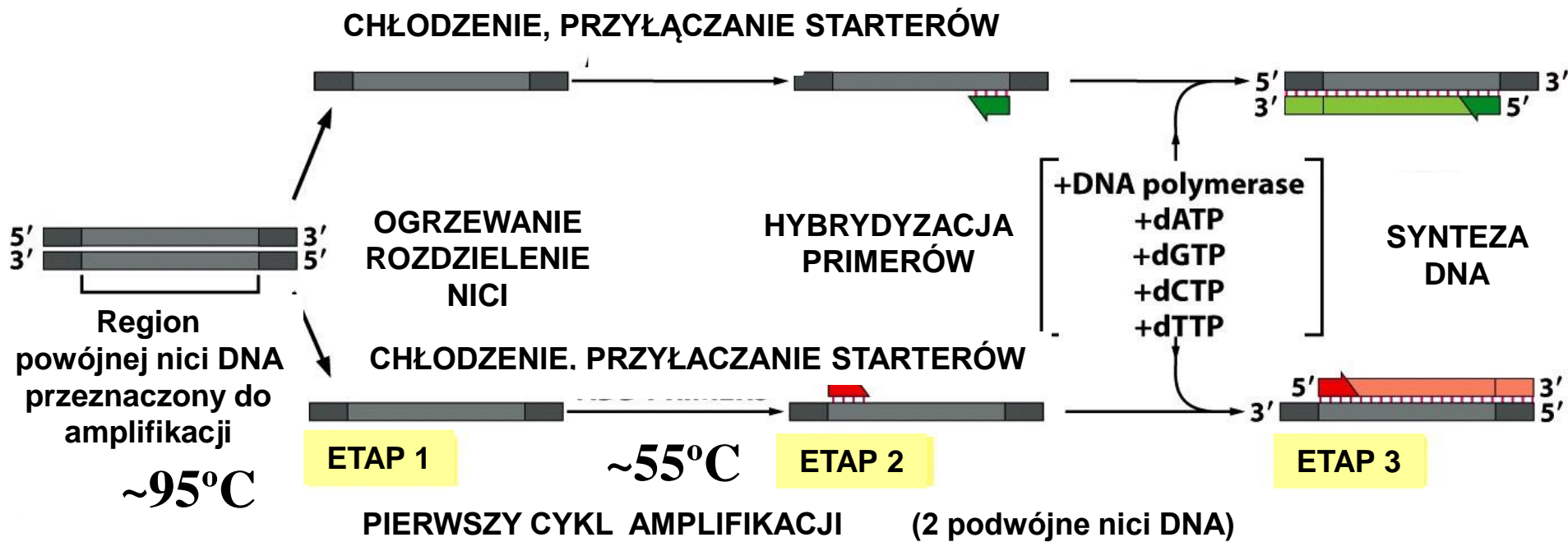


Kary Banks Mullis amerykański biochemik. Udoskonalił technikę łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR), za co otrzymał Nagrodę Nobla w 1993r. Proces ten był opisany wcześniej przez Kjell Kleppe (norweskiego biochemika) H. Gobind Khorana (hindusko-amerykańskiego biochemika) pozwalając na amplifikację swoistych sekwencji DNA. Udoskonalenie Mullisa sprawiło, że metoda ta stała się powszechną techniką biologii molekularnej.



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

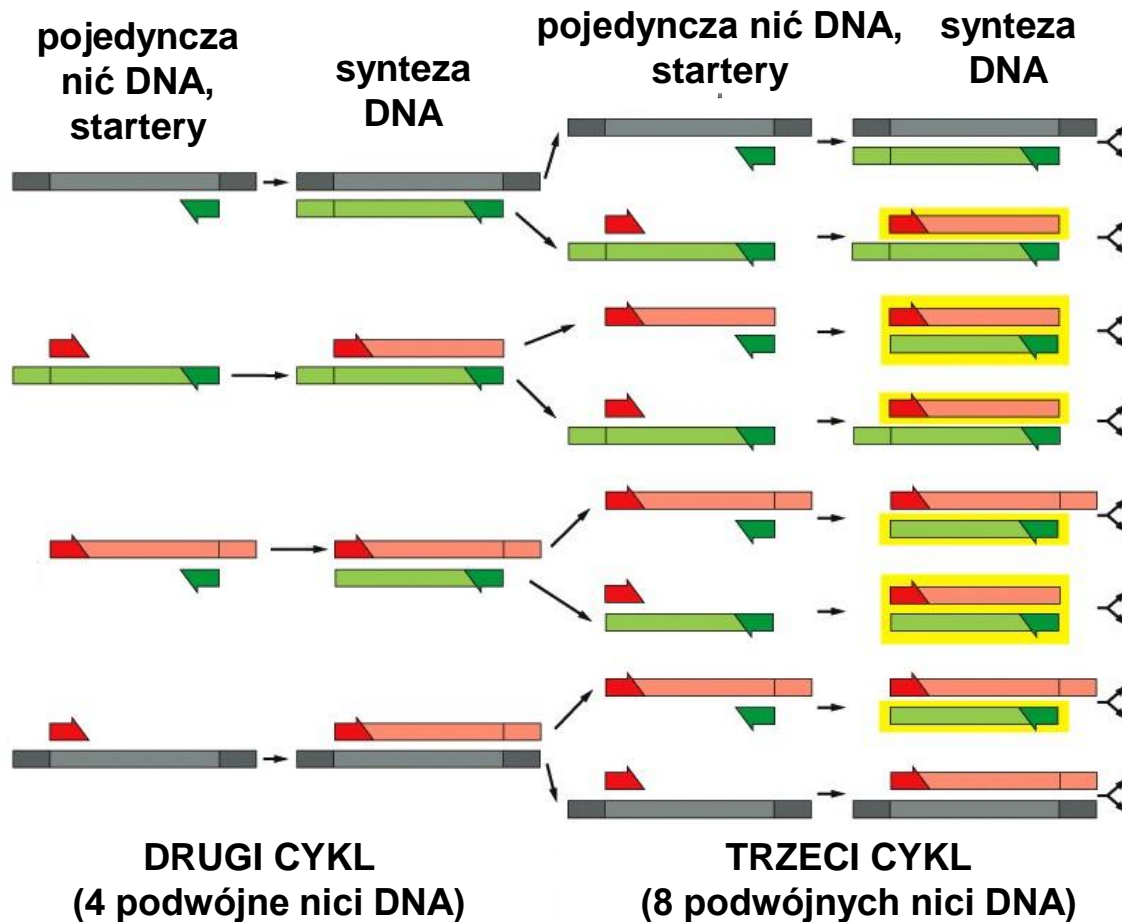
## Reakcja łańcuchowa polimerazy



Termostabilna polimeraza DNA - polimeraza Taq syntetyzuje nową nić DNA z nukleotydów wykorzystując pojedynczą nić DNA jako matrycę i startery DNA do inicjacji syntezy.

# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

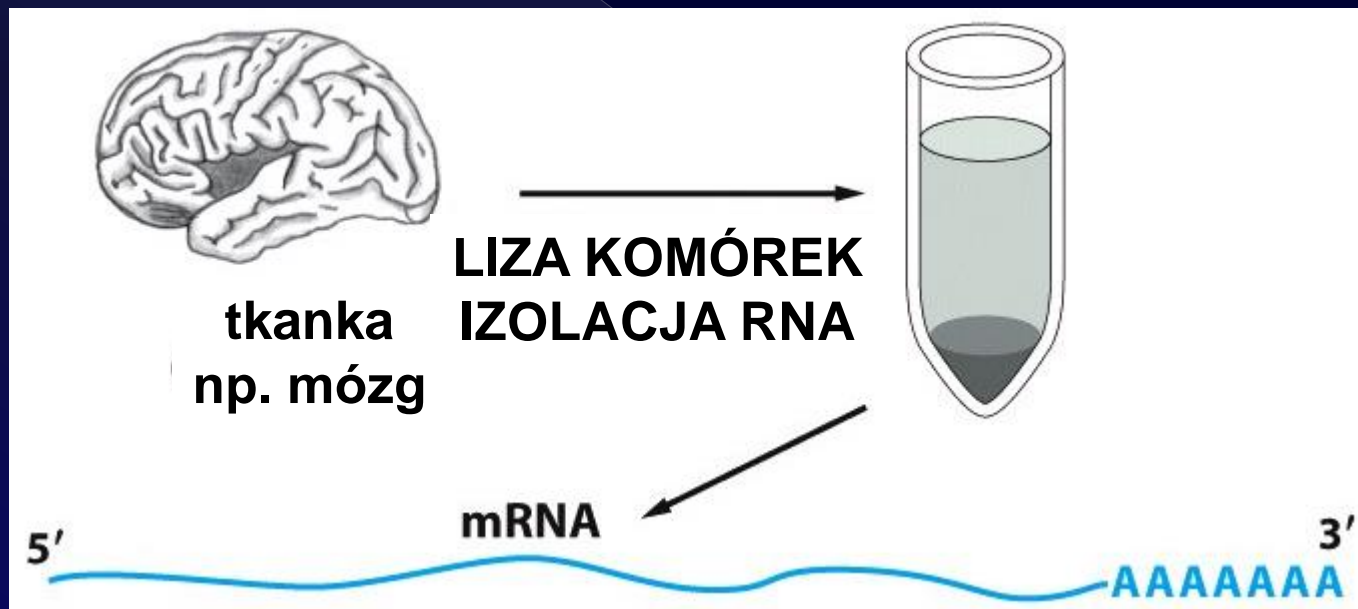
## Reakcja łańcuchowa polimerazy



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

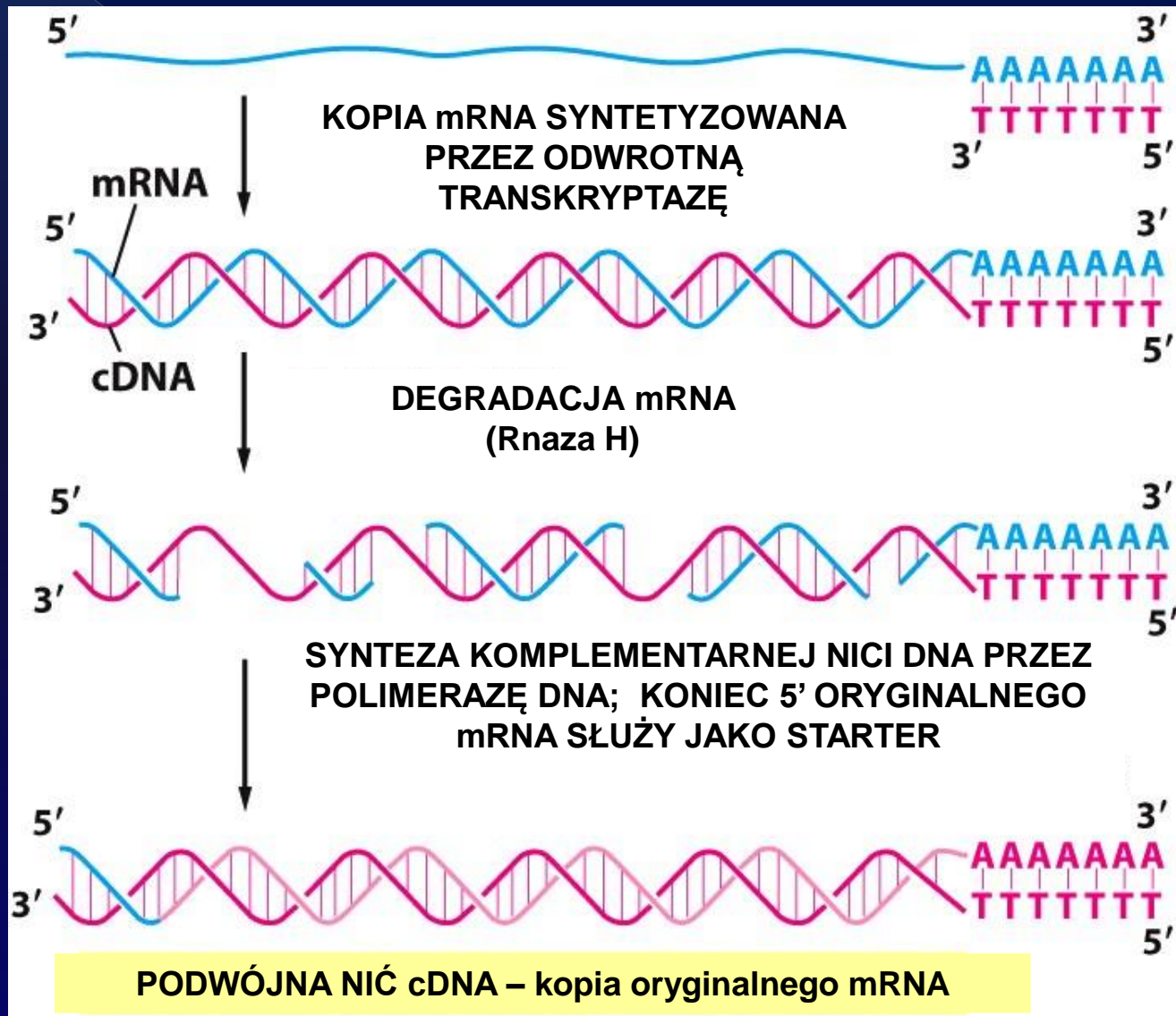
## ***Ekspresja genów***

### Wykrywanie swoistego mRNA



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

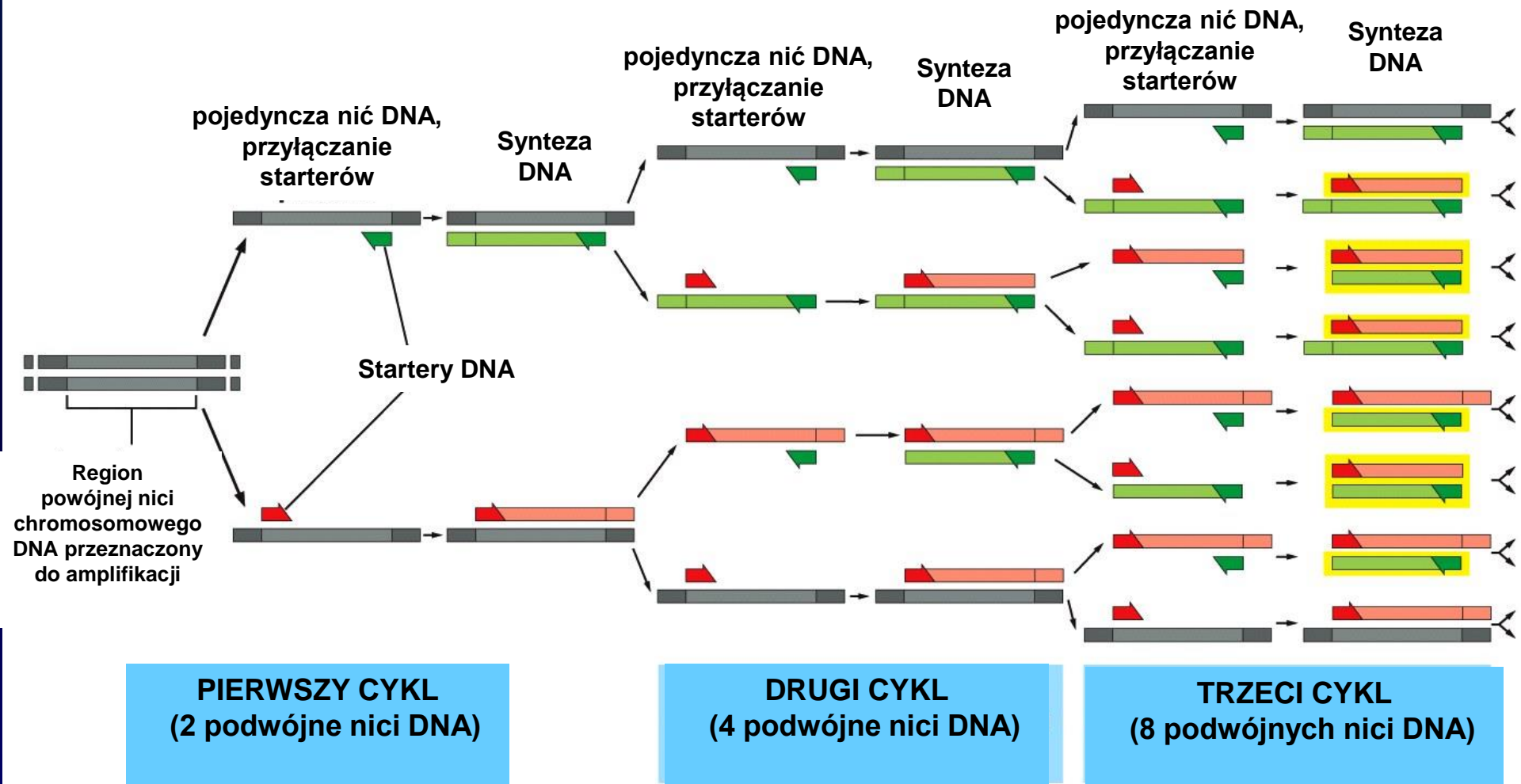
## Wykrywanie swoistego mRNA



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

## Wykrywanie swoistego mRNA/cDNA

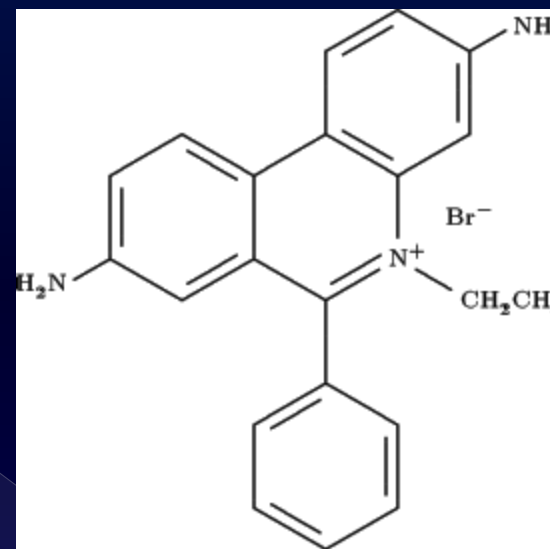
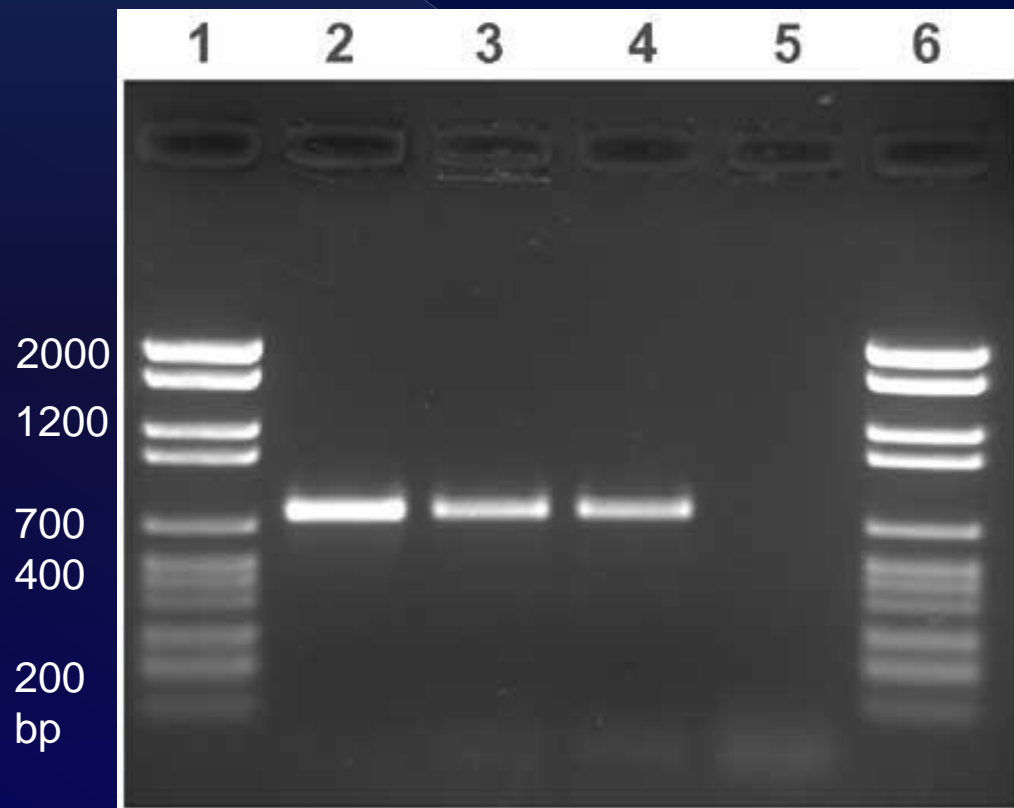
### Wykonanie reakcji PCR - cDNA jako matryca



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

## Wykrywanie swoistego mRNA

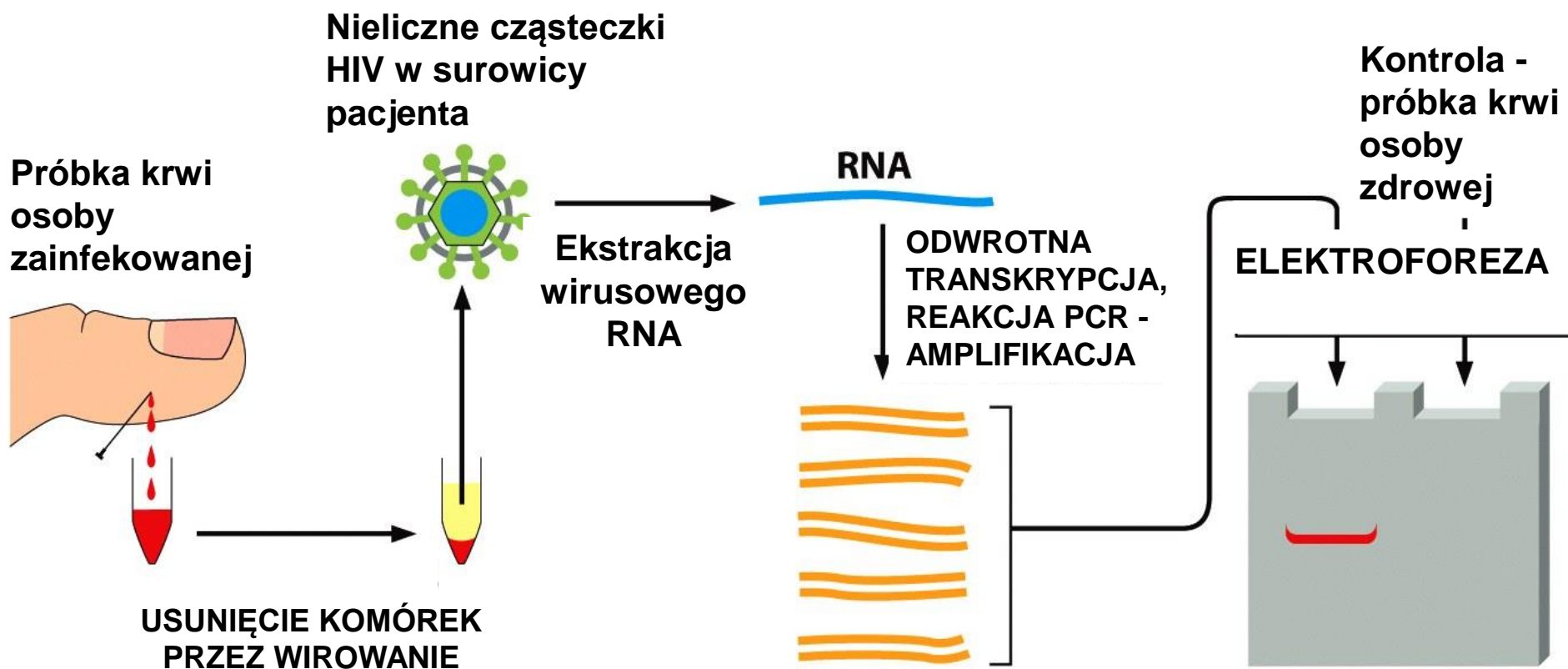
Elektroforeza produktu PCR w żelu agarozowym



DNA barwione  
bromkiem etydyny

# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

## Wykrywanie wirusowego RNA





# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

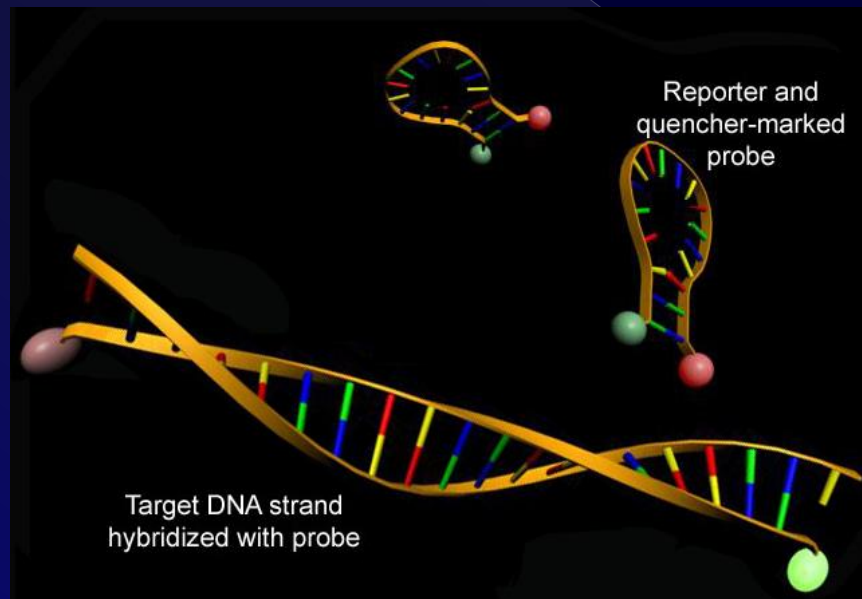
Ilościowa ocena ekspresji genu

**PCR w czasie rzeczywistym (Real time PCR)**

Pomiar po każdym cyklu

Obliczenia

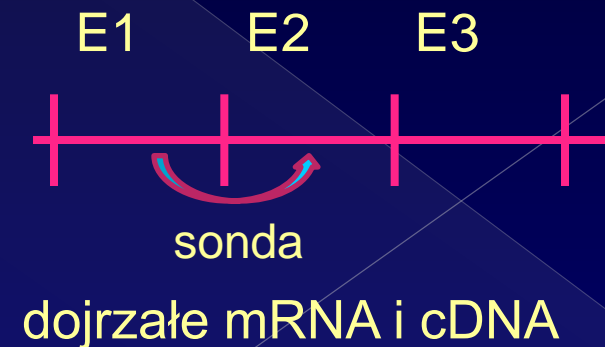
Znakowane sondy (odpowiednia sekwencja DNA)



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Ilościowa ocena ekspresji genu

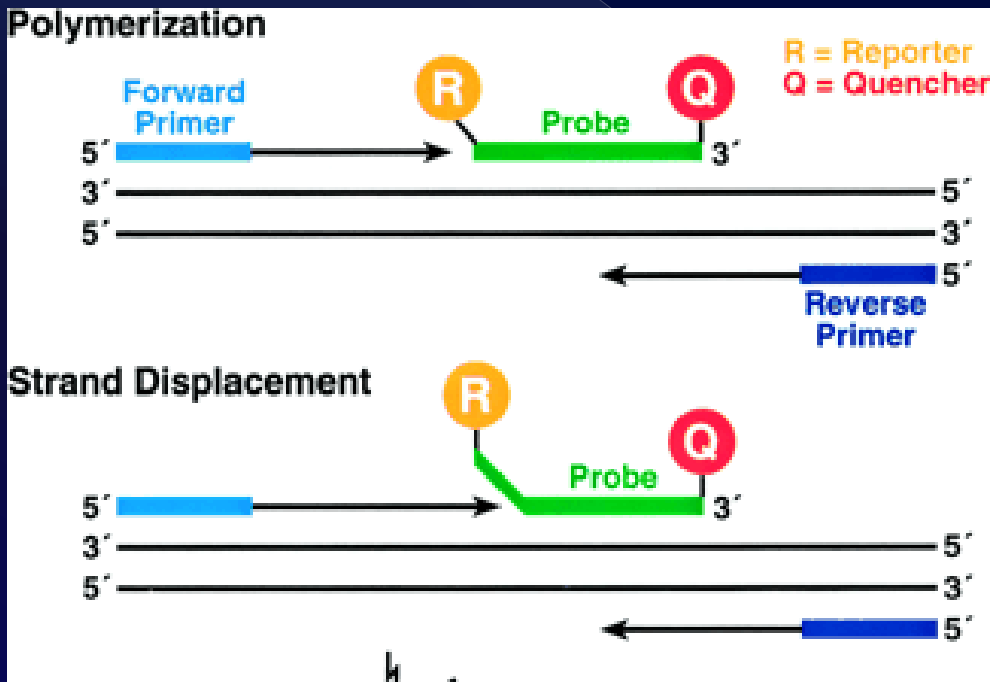
PCR w czasie rzeczywistym (Real time PCR)



# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

## Ilościowa ocena ekspresji genu

### Real-Time PCR



Fluorescencyjny barwnik (R), i wygaszacz (Q) są doczepione do końców 5' i 3" sondy.

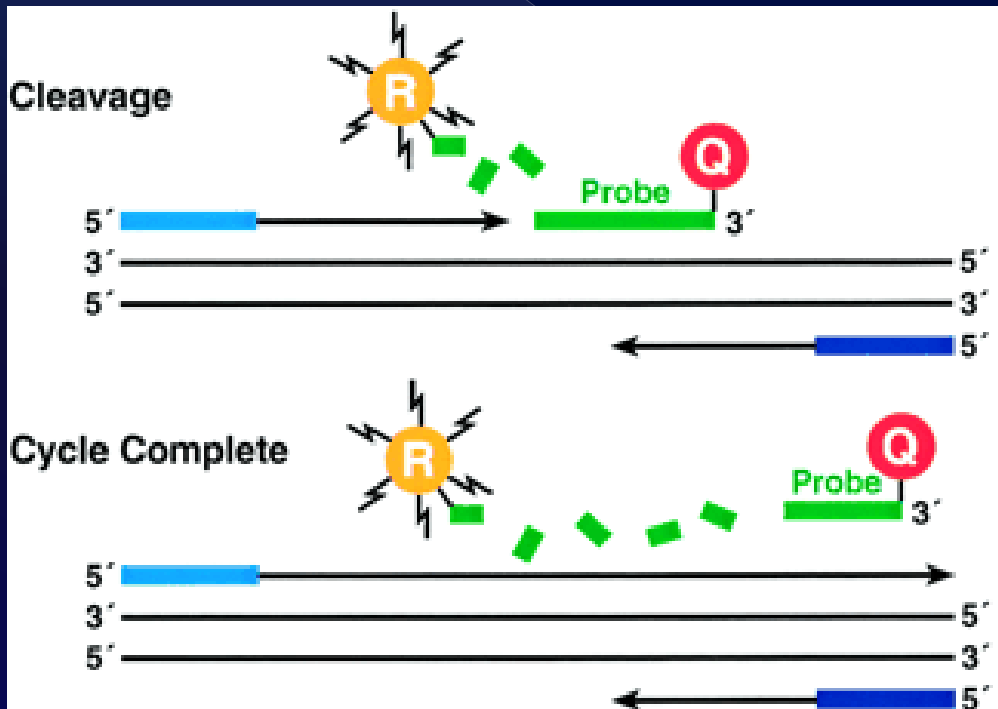
Gdy sonda jest nienaruszona emisja fluorescencji jest wygaszona.

Podczas każdego cyklu polimeraza DNA odcina R od sondy.

# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Ilościowa ocena ekspresji genu

## Real-Time PCR



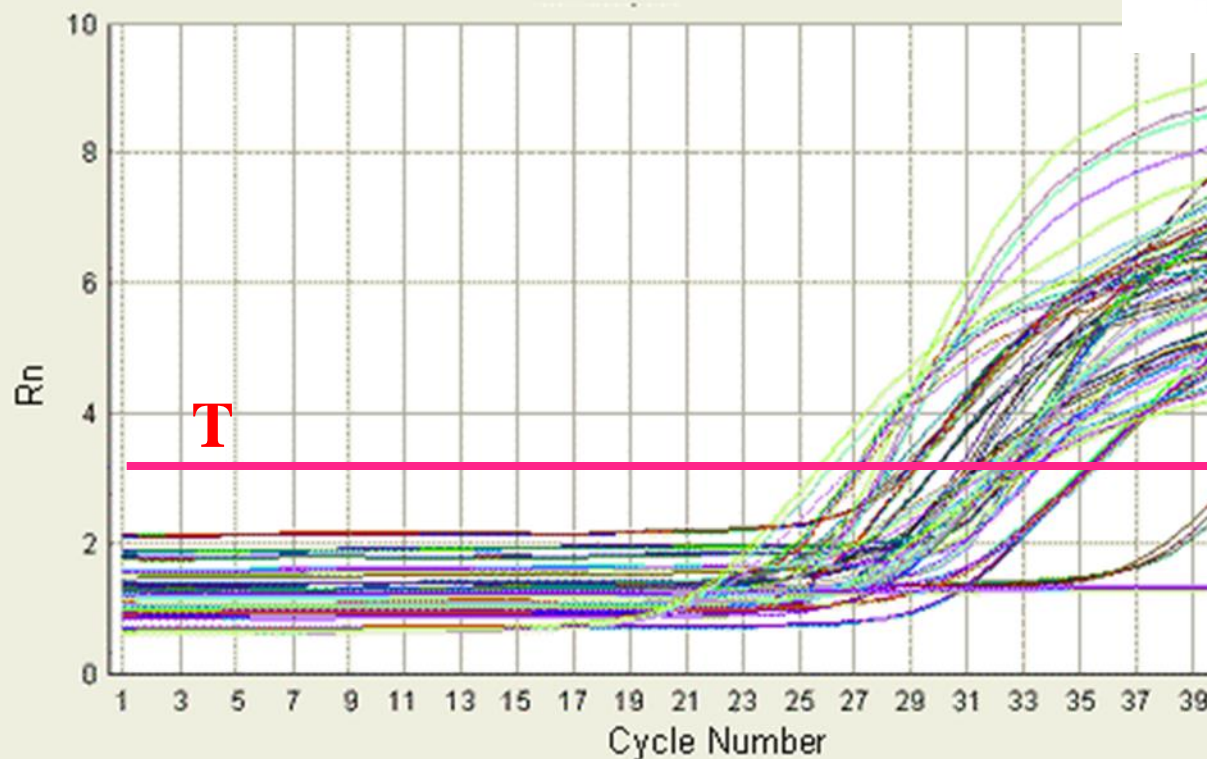
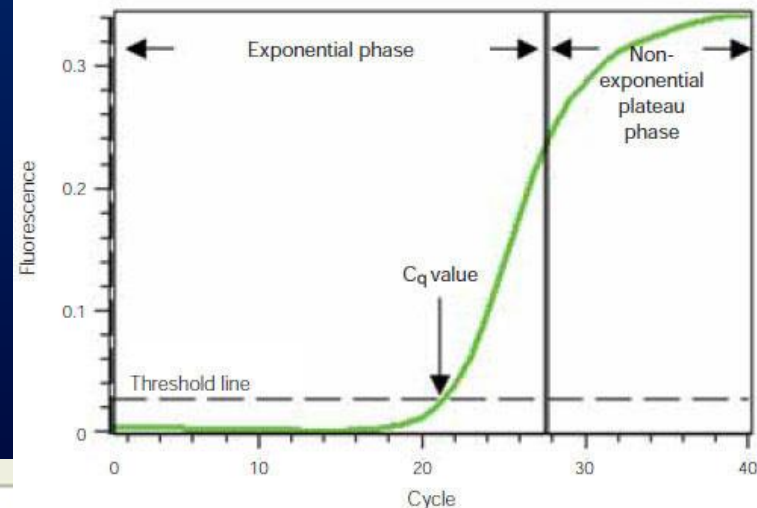
Wtedy następuje emisja fluorescencji charakterystyczna dla barwnika.

Emisja jest odczytywana, mierzona i analizowana przez specjalne oprogramowanie.

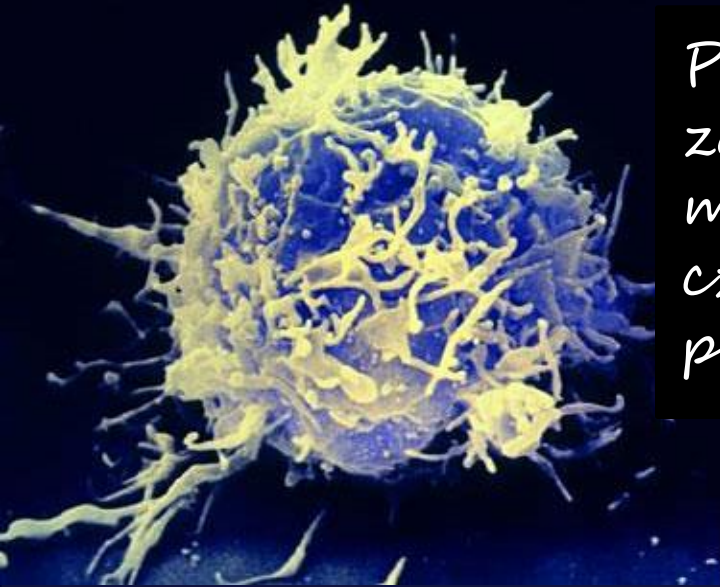
# BADANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Ilościowa ocena ekspresji genu

## Real-Time PCR



Krzywe obrazujące pomiary fluorescencji po każdym cyklu.

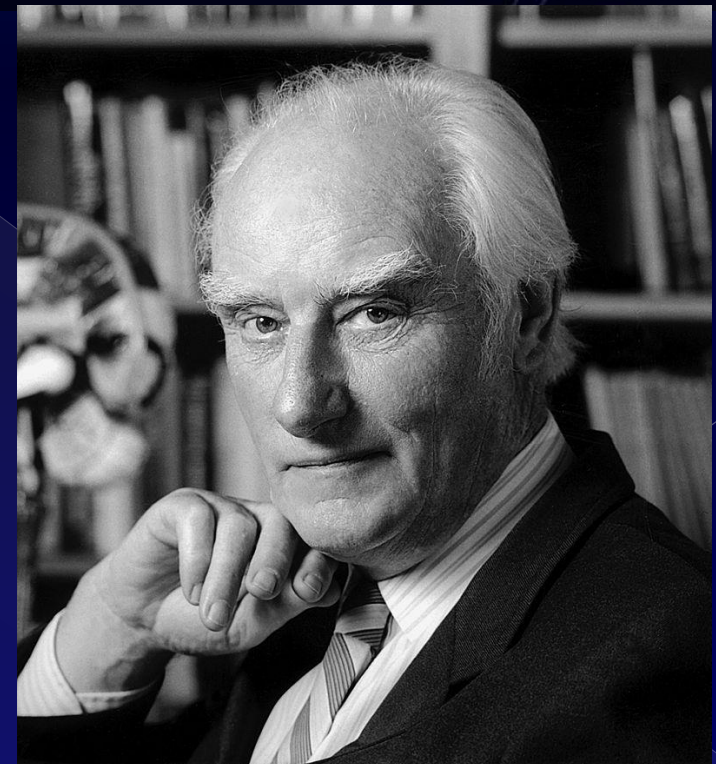


*Prawie wszystkie aspekty życia są zaprojektowane na poziomie molekularnym i bez zrozumienia cząsteczek możemy mieć tylko bardzo pobieżne zrozumienie samego życia.*

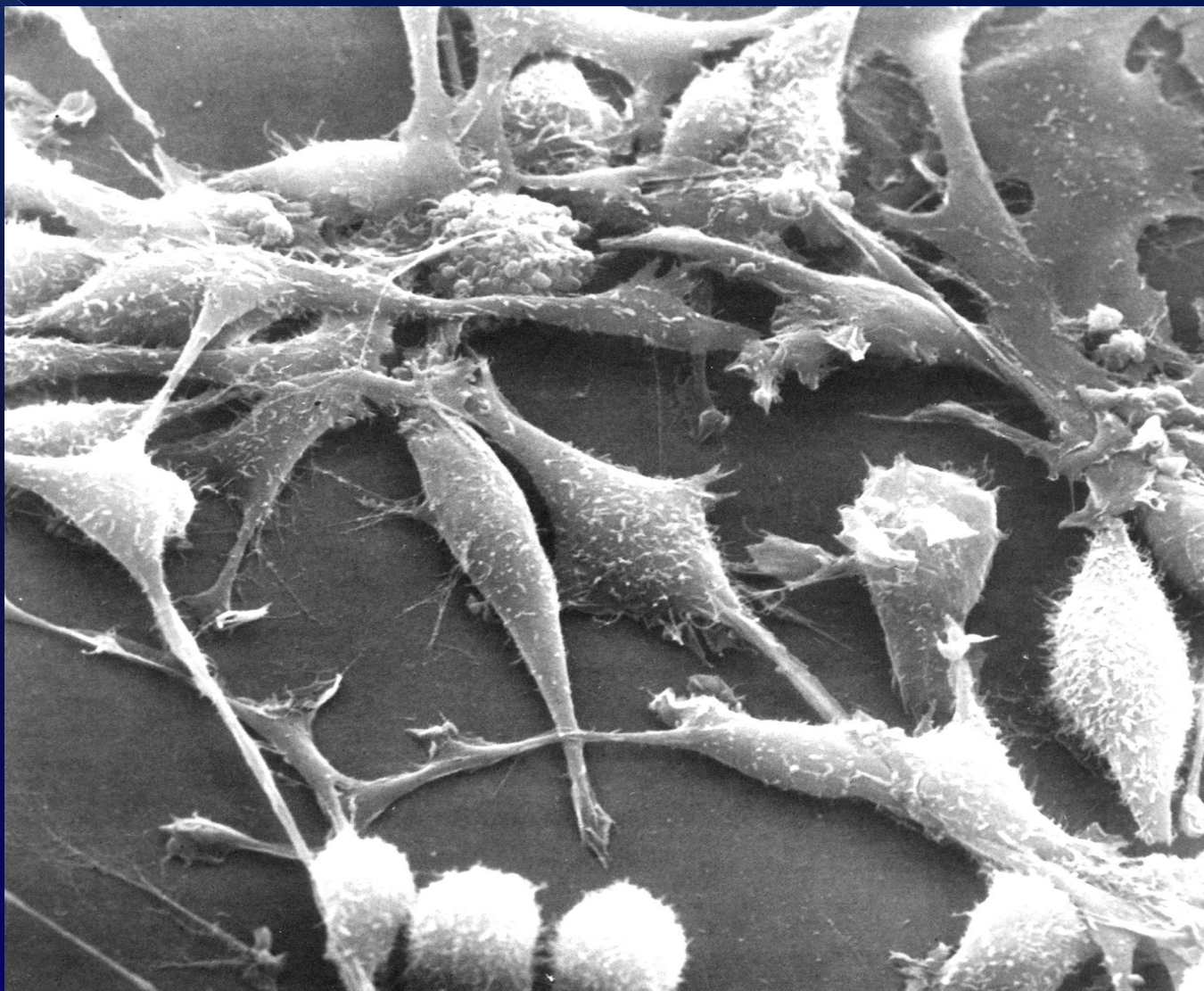
*Francis Crick*

*University of Texas MMB35*

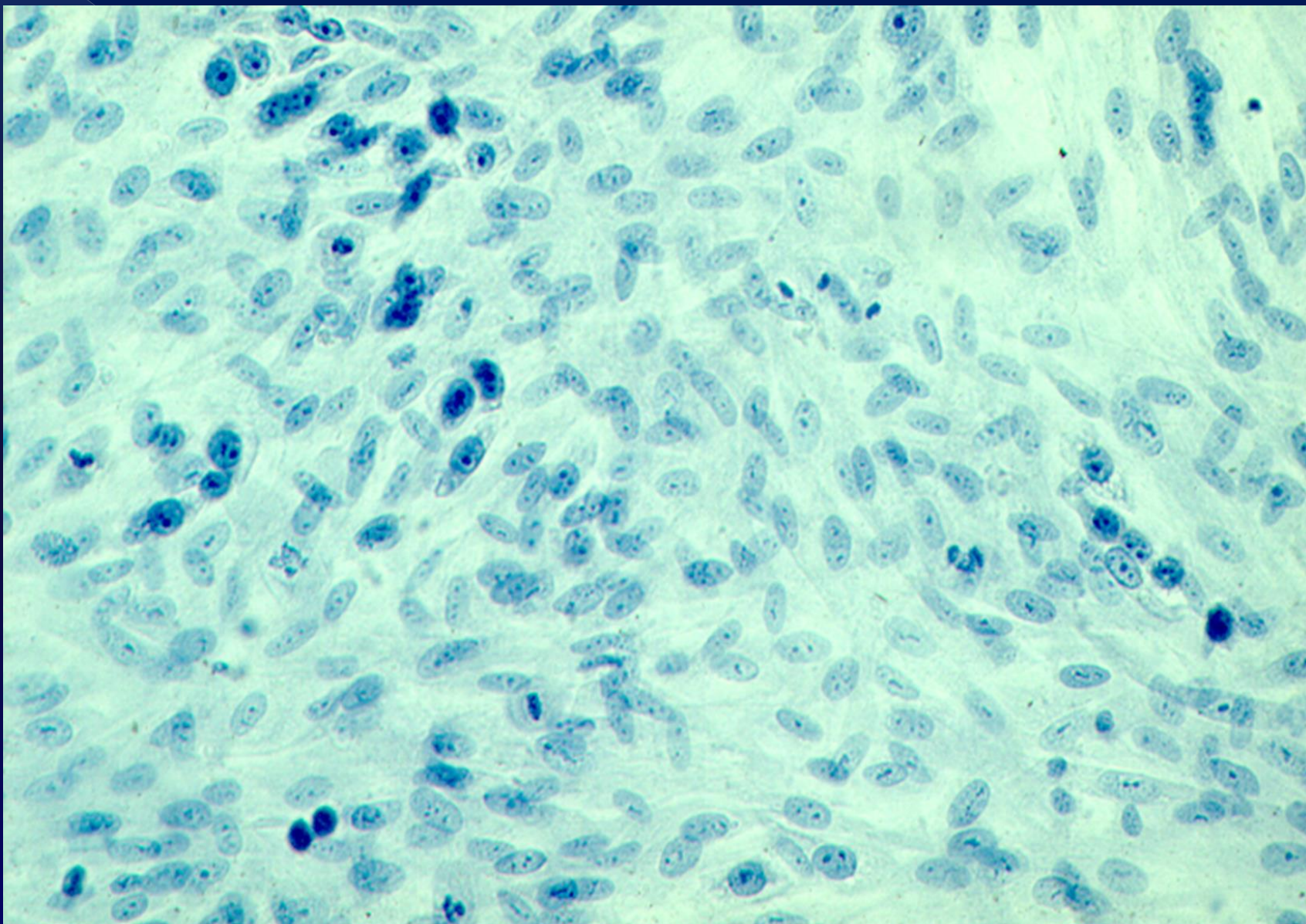
Francis Crick (1916 – 2004)  
angielski biolog molekularny,  
biofizyk, genetyk,  
współodkrywca struktury  
molekularnej DNA wraz z  
Jamesem Watsonem w 1953  
roku (Nagroda Nobla w 1962).



# FIBROBLASTY W HODOWLI

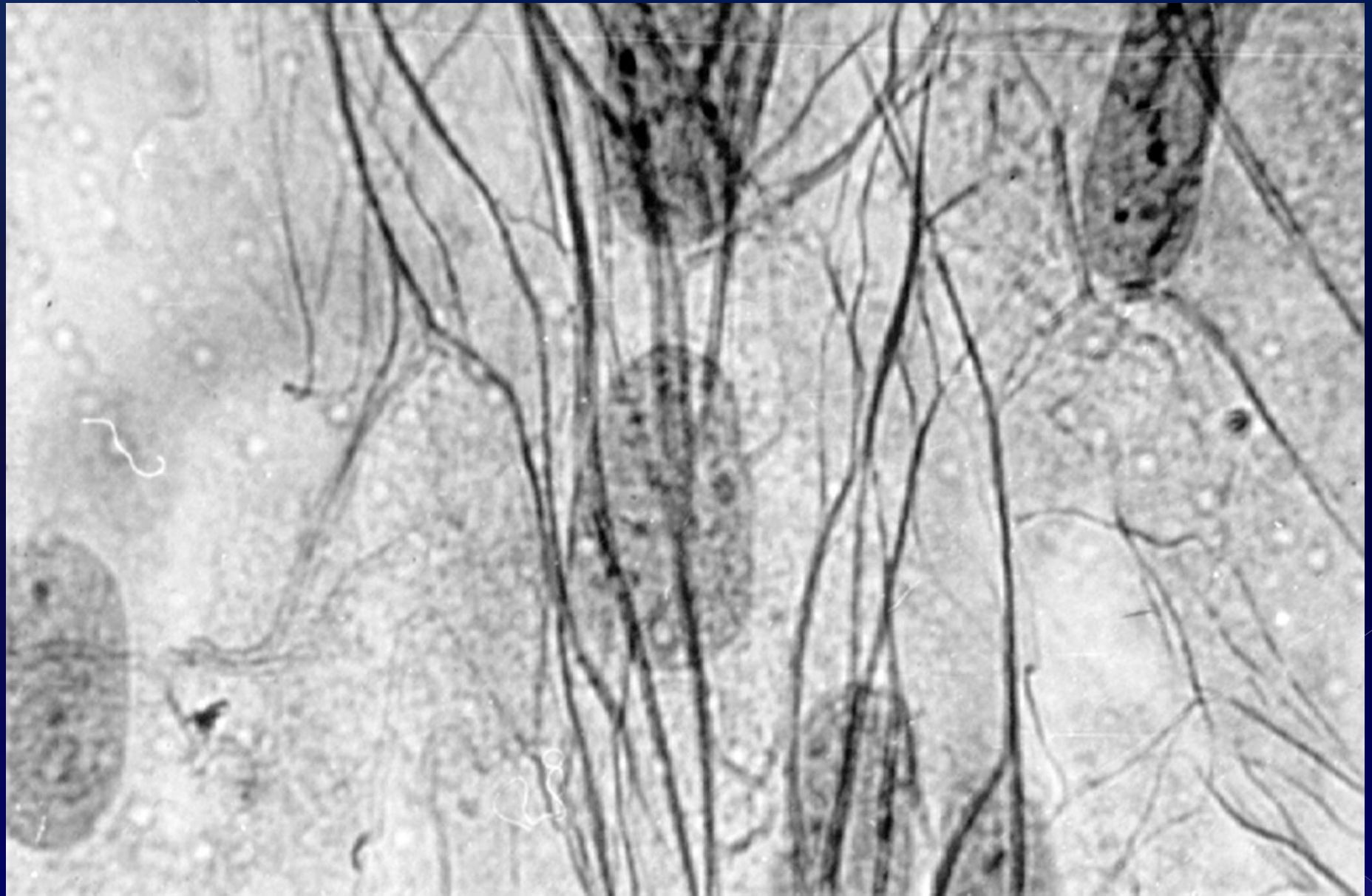


# FIBROBLASTY W HODOWLI

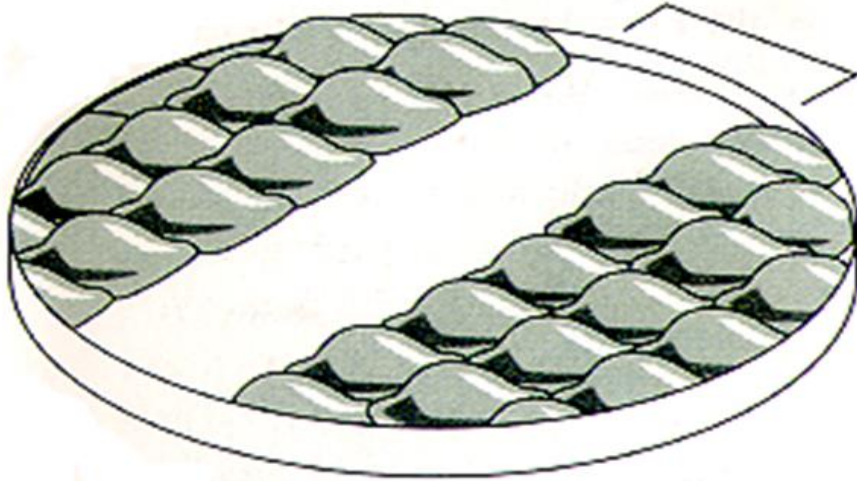




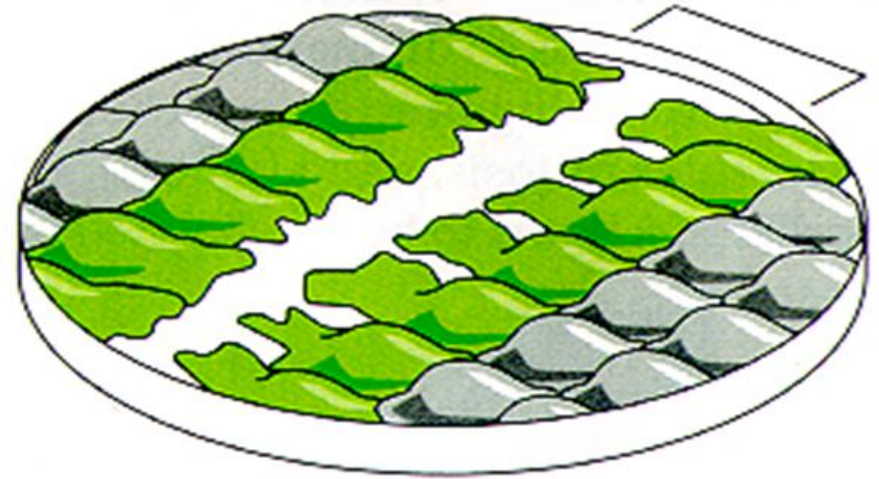
# CHONDROCYTY, WŁÓKNA SPRĘŻYSTE



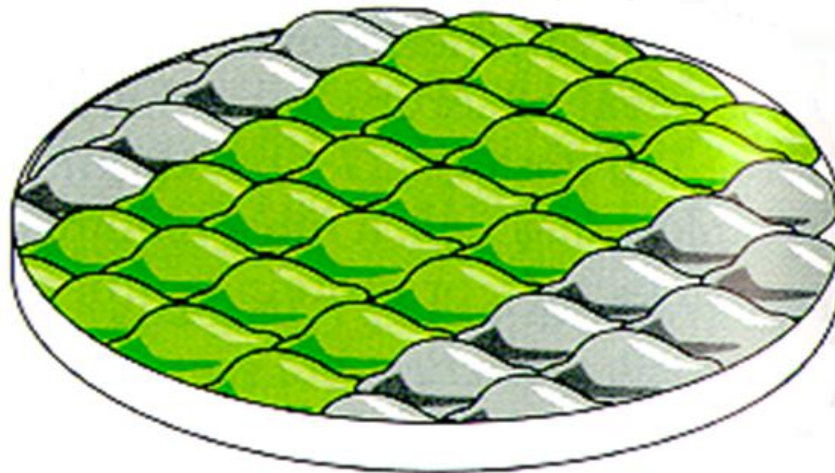
zlewna hodowla jednowarstwowa  
komórki zdrapane w środku



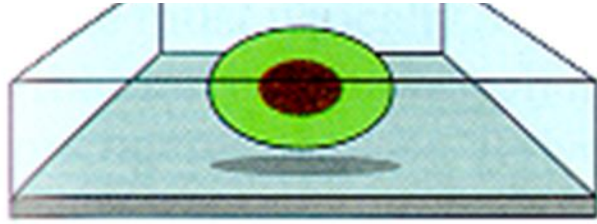
komórki spłaszczają się  
i zaczynają syntezę DNA



komórki wypełniły  
ubytek

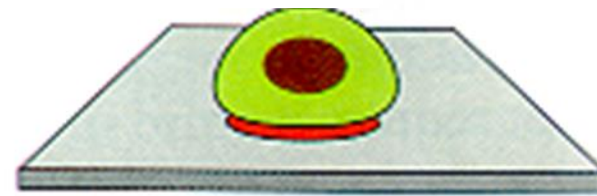


komórka zawieszona  
w agarze



8%

komórka umieszczona na kępcie adhezyjnej  
małej dużej



30%



90%

(A)

prawdopodobieństwo  
wejścia w fazę S

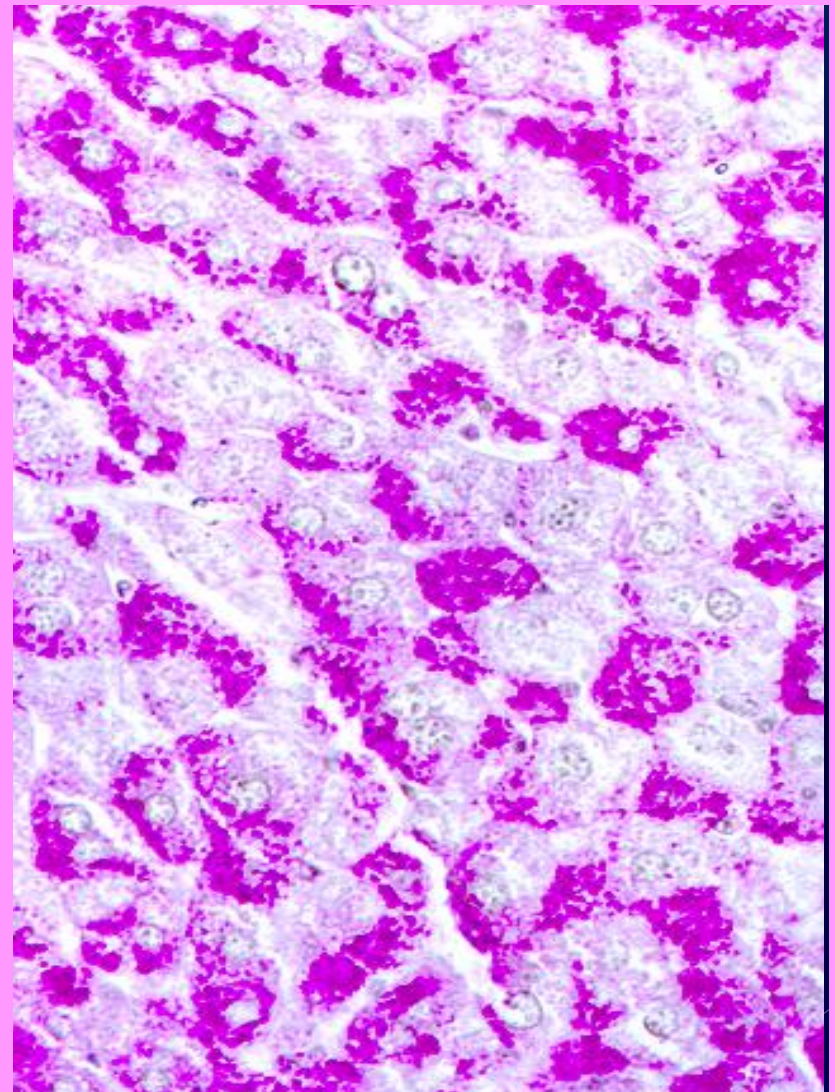
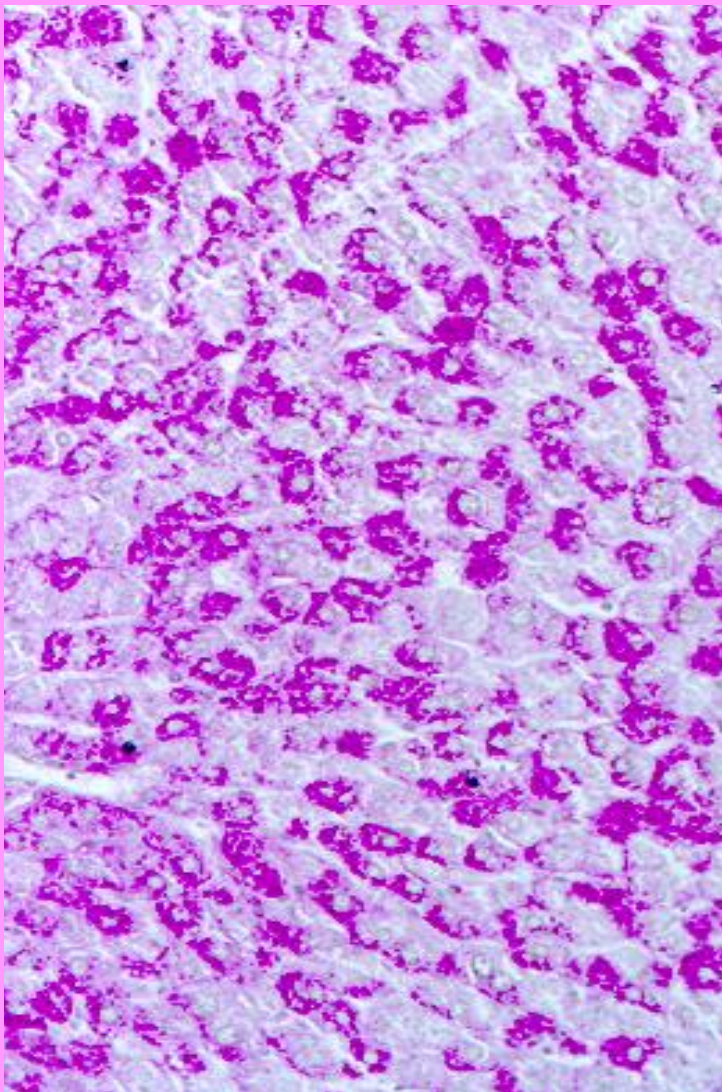


(B)



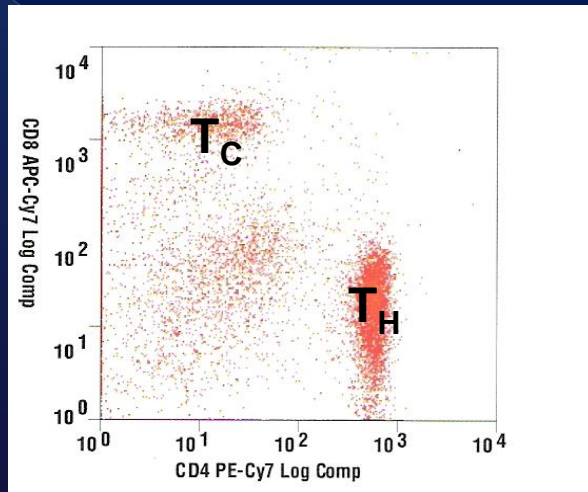
(C)

50  $\mu\text{m}$

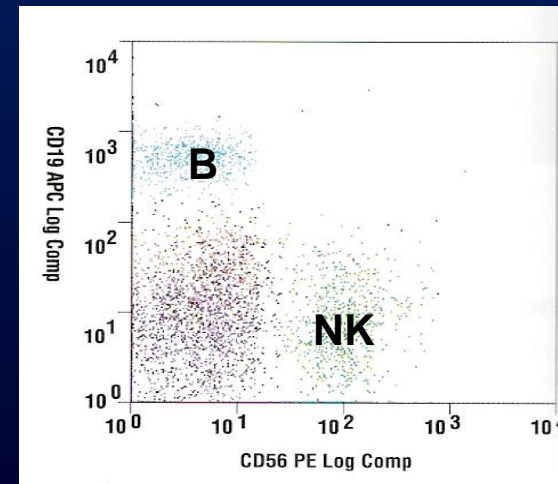


**Reakcja PAS - wątroba - glikogen**

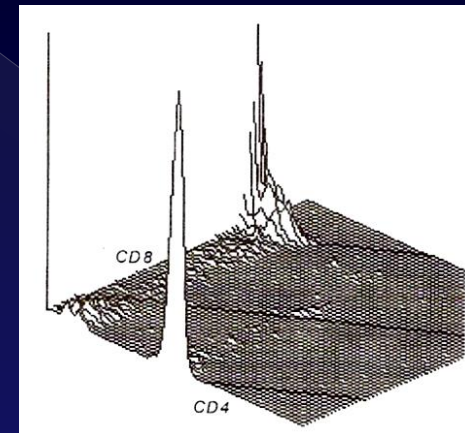
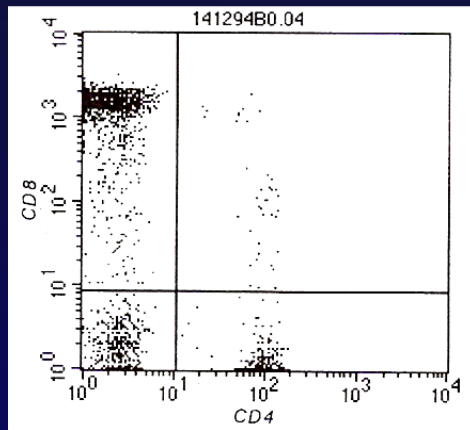
# CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



Anty-CD4 i anty-CD8.



Anty-CD56 i anty-CD19.



Barwienie anty-CD4 i anty-CD8. Limfocyty z wykresu kropkowego przedstawiono obok na histogramie (trzeci wymiar obrazuje liczbę komórek).

# CYTOMETR



# HISTORIA

-1895 – hodowla płytki nerwowej zarodka kurczęcia w ciepłym roztworze soli fizjologicznej (Wilhelm Roux)

-1907 - hodowla cewy nerwowej żaby w skrzepie żabiej limfy.

Wyrastanie wypustek z komórek nerwowych (Ross Harrison).

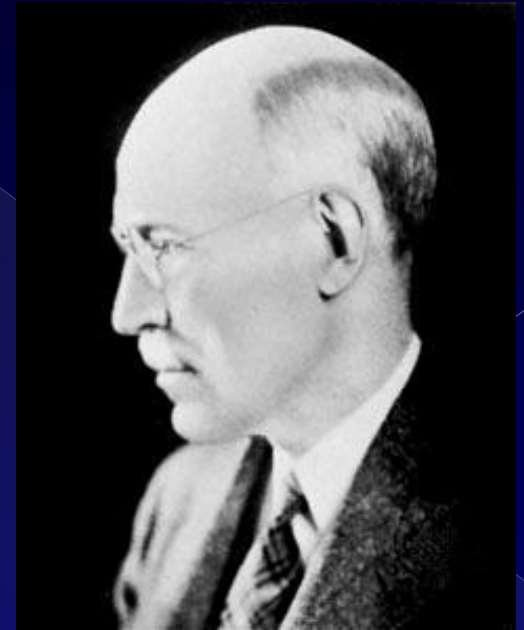
-optymalizacja warunków hodowli poprzez stosowanie różnych środowisk hodowlanych (osocza, surowicy, wyciągu z zarodków kurcząt) i określanie potrzeb komórek w zakresie ciśnienia osmotycznego, pH, zapotrzebowania na sole (Burrows, Carrel,

- Ebeling, Lewis).



Wilhelm Roux  
(1850 –1924)

Ross Granville Harrison  
(1870 –1959)



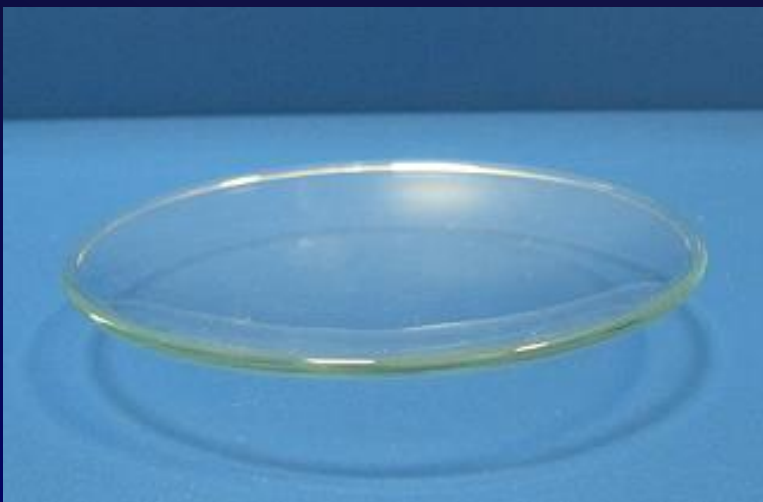
# HISTORIA

lata 20 XX wieku – hodowle tkanek zarodkowych.

Zaobserwowano zdolność komórek do różnicowania. Hodowla w skrzepie w szkiełku zegarkowym – hodowla narządowa.

-lata 40 XX wieku – pierwsze sztuczne pożywki zawierające sole mineralne, aminokwasy, witaminy.

-1952 – zastosowanie trypsyny jako czynnika rozdzielającego tkankę na pojedyncze komórki i umożliwiający oddzielanie ich od szkła (Moscona H, Moscona A)





# TELOMERY

Chromosomy liniowe są mniej stabilne niż koliste, ale warunkują różnorodność genetyczną żyjących organizmów (rekombinacje).

Jednak końce 3' oraz 5' są podatne na działanie enzymów degradujących DNA, a także chromosomy liniowe mogą ulegać fuzji.

Uszkodzeniom chromosomów zapobiegają – TELOMERY-  
powtarzające się sekwencje niekodującego DNA (TTAGGG) wraz z białkami zlokalizowane na końcach chromosomów.

Podczas każdego cyklu replikacyjnego komórka traci 50-200 bp telomerowego DNA.

Gdy telomery osiągną krytyczną długość – ETAP STARZENIA KOMÓRKI (zahamowanie cyklu komórkowego zależne od białka p53)

# Problem replikacji końców - utrata telomerowego DNA podczas replikacji

Polimeraza DNA może czytać i syntetyzować DNA tylko w jednym kierunku, zaczynając od startera.

