

Grupa.....

Wrocław, .....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

## Ćwiczenie nr 7.

### Programowana śmierć komórki, techniki analizy uszkodzeń DNA

#### Test kometkowy

Test kometkowy (ang. comet assay) jest testem służącym do wykrywania uszkodzeń DNA powstających podczas procesu apoptozy. Metoda polega na przeprowadzeniu elektroforezy pojedynczych unieruchomionych komórek zatopionych w żelu agarozowym. Niepocięte fragmenty pozostają w jądrze komórkowym, natomiast pocięte ujemnie naładowane fragmenty DNA migrują pod wpływem pola elektrycznego w kierunku anody (+), dając obraz przypominający kometę. Kształt powstałej komety zależy od ilości i jakości powstałych uszkodzeń DNA. Powstały ogon jest tym większy im większy jest stopień zaawansowania fragmentacji. Test kometkowy, zależnie od pH środowiska elektroforezy, pozwala na wykrycie różnych form uszkodzeń DNA i daje możliwość odróżnienia od siebie dwóch typów śmierci komórkowej, nekrotycznej od apoptotycznej (metoda alkaliczna). W warunkach alkalicznych wykrywane są pęknięcia pojedynczych nici DNA oraz podwójne pęknięcia łańcuchów DNA. Warunki neutralne umożliwiają identyfikację tylko podwójnych pęknięć łańcucha DNA, które charakterystyczne są dla procesu apoptozy, gdyż enzymy tną dwuniciowy DNA między nukleosomami.

Komórki przeznaczone do wykonania testu kometowego unieruchamia się w agarozie na szkiełkach mikroskopowych. Następnie w celu przerwania błony komórkowej komórki traktuje się buforem lizującym. Tak przygotowane komórki poddaje się elektroforezie (w warunkach neutralnych w standardowym buforze TBE lub w warunkach alkalicznych). Pod wpływem przyłożonego napięcia pofragmentowane DNA opuszcza komórkę i przemieszcza się w kierunku anody. Po zakończeniu elektroforezy wybarwia się DNA w celu uwidocznienia pociętego DNA. Jeżeli nie doszło do pocięcia DNA obserwuje się jedynie świecenie w obrębie głowy komety, gdyż nie pocięte DNA jest za duże by mogło opuścić komórkę.

Celem testu kometowego jest sprawdzenie czy przeprowadzone wcześniej doświadczenia na komórkach (np. ocena cytotoksyczności związków czy różnego rodzaju terapie przeciwnowotworowe) doprowadzają komórki do śmierci komórkowej: nekrotycznej czy apoptotycznej.

#### **Zadanie 1.** Analiza preparatów komórkowych po teście kometkowym.

Wykonaj ocenę i analizę komórek na szkiełkach mikroskopowych używając mikroskopu, na podstawie rozmiaru głowy i wielkości ogona. W tabeli poniżej przedstawiono kryteria oceny komet i przykładowe zdjęcia. Analizie poddaj od 100 do 200 komórek. Przeanalizuj 5 różnych pól widzenia, danego szkiełka.

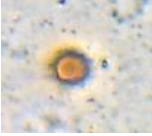
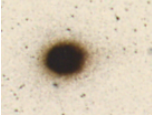
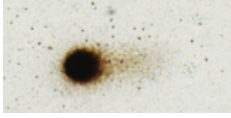
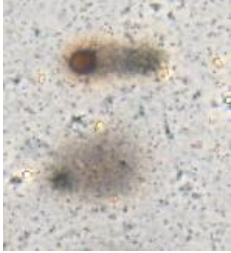
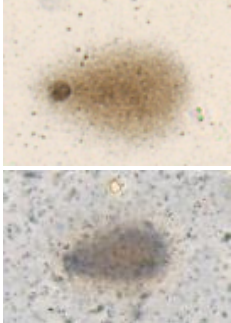
#### **Obraz kometek:**

Nieuszkodzone jądra obserwowane są jako sama głowa, bez ogona (okrągła kropka, kategoria 0).

Komórki o uszkodzeniach pośrednich należą do kategorii 1 i 2, niewielki ogon, nieprzekraczający dwóch wielkości jądra.

Komórki apoptotyczne i nekrotyczne należą do 3 i 4 kategorii. W apoptotycznym jądrze, małe fragmenty DNA migrują z głowy (pierwotne miejsce jądra) do ogona, tworząc obraz szerokiej komety. Może dojść do sytuacji, że głowa w ogóle nie będzie występować, a widoczny będzie jedynie sam ogon.

Ogony kometek powstałych z komórek nekrotycznych, nigdy nie są szersze niż głowa, przyjmują postać nieregularnej smugi i wyraźnie są połączone z głową, ponieważ podczas nekrozy dochodzi do przypadkowej, nieregularnej fragmentacji DNA.

Cechy Kategoria	Rozmiary głowy komety	Rozmiary ogona komety		
0	normalny rozmiar jądra	Brak		
1	jak wyżej	mniejszy niż normalny rozmiar jądra		
2	jak wyżej	do 2 wielkości normalnego rozmiaru jądra		
3	większy niż połowa normalnego rozmiaru jądra	2 - 3 wielkości normalnego rozmiaru jądra		Nekroza;  apoptoza.
4	mniejszy niż połowa normalnego rozmiaru jądra	> 3 wielkości normalnego rozmiaru jądra		apoptoza

Kategoria		Liczba	Oblicz procent komórek względem wszystkich policzonych komórek
0	Komórki nieuszkodzone		
1-2	Uszkodzenia pośrednie		
3-4	Apoptoza		
3-4	Nekroza		