



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

---

## Ειδικές Μέθοδοι Ανάλυσης Κυτταρικών Διεργασιών

Τίτλος Εργαστηριακής Άσκησης: Παρατήρηση κυτταρικής διαίρεσης με  
μικροσκοπία φθορισμού

Έλενα Κουιμτζόγλου  
Τμήμα Βιολογίας

---

## Παρατήρηση κυτταρικής διαίρεσης με μικροσκοπία φθορισμού

### **A. Μικροσκοπία φθορισμού**

Τα βιολογικά δείγματα (ευκαρυωτικά κύτταρα, βακτήρια, ιστοί, κ.λ.π.) και τα συστατικά τους είναι σχεδόν διαφανή. Προκειμένου λοιπόν να τα διακρίνουμε από το υπόβαθρο (background) και να τα παρατηρήσουμε χρειάζεται να δημιουργήσουμε κατάλληλες συνθήκες αντίθεσης. Στη *μικροσκοπία φθορισμού*, συστατικά του δείγματος σημαίνονται με ειδικές φθορίζουσες ουσίες και παρατηρούνται ως διαφορετικά χρώματα στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ανάλογα με το είδος του μικροσκοπίου μπορούμε να παρατηρήσουμε ταυτόχρονα μία, δύο ή περισσότερες φθορίζουσες ουσίες (χρώματα).

Κατά το φαινόμενο του φθορισμού, άτομα ή μόρια της φθορίζουσας ουσίας *διεγείρονται* από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, δηλαδή *απορροφούν* ενέργεια, με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια αυτών να μετακινούνται παροδικά σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα. Κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων στη βασική στοιβάδα *εκπέμπεται* ακτινοβολία (*φθορισμού*) μεγαλύτερου μήκους κύματος (δηλαδή μικρότερης ενέργειας,  $E = hc/\lambda$ ). Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά το φθορισμό είναι  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  seconds. Στην πράξη, κάθε φθορίζουσα ουσία εμφανίζει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής με συγκεκριμένα μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής τα οποία εξαρτώνται από τη δομή των ατόμων και ηλεκτρονίων αυτής (Εικόνα 1).

Στη μικροσκοπία φθορισμού, το παρασκεύασμα φωτίζεται με φως μεγάλης έντασης και κατάλληλου μήκους κύματος ώστε να διεγείρονται οι φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες το έχουμε σημάνει («βάψει»). Επίσης, επειδή οι φθορίζουσες χρωστικές συχνά έχουν φάσματα εκπομπής τα οποία επικαλύπτονται, το μικροσκόπιο

διαθέτει φίλτρα απομόνωσης ακτινοβολιών συγκεκριμένων μηκών κύματος ώστε να μπορούμε να παρατηρήσουμε διακριτά χρώματα μετά από χρώση του παρασκευάσματος με δύο ή περισσότερες φθορίζουσες χρωστικές.

## **B. Κυτταρική διαίρεση**

Με τη διαδικασία της *κυτταρικής διαίρεσης* από ένα μητρικό κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά με πανομοιότυπο γενετικό υλικό. Η κυτταρική διαίρεση περιλαμβάνει το διαχωρισμό του γενετικού υλικού (πυρηνική διαίρεση ή *Μίτωση*) και του κυτταροπλάσματος (*κυτταροκίνηση*) στα θυγατρικά κύτταρα. Ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων ονομάζεται *μεσόφαση*.

Στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα η μιτωτική διαίρεση διακρίνεται στις εξής φάσεις: *Πρόφαση*, *Προμετάφαση*, *Μετάφαση*, *Ανάφαση* και *Τελόφαση*, κάθε μία από τις οποίες έχει συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 2). Η κυτταροκίνηση ξεκινά κατά το τέλος της Ανάφασης και συνεχίζεται μετά την ολοκλήρωση της Τελόφασης έως τον πλήρη διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων (Εικόνα 2).

## **Γ. Σκοπός της άσκησης**

Σκοπός της άσκησης είναι η χρώση μικροσωληνίσκων και DNA σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά και η παρατήρηση μεσοφασικών και μιτωτικών κυττάρων με μικροσκοπία φθορισμού. Οι μικροσωληνίσκοι θα σημανθούν με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης α-τουμπουλίνης και φθορίζουσα χρωστική Fluorescein (FITC) η οποία φθορίζει στο πράσινο χρώμα, ενώ το DNA με την ουσία Propidium Iodide (PI) η οποία προσδέεται στο DNA και φθορίζει στο κόκκινο χρώμα.

## Δ. Μεθοδολογία

### *Την προηγούμενη ημέρα της άσκησης:*

Κύτταρα ΒΕ (κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου του ανθρώπου) καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM + 10% FBS, σε 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο.

### *Την ημέρα της άσκησης:*

1. *Μονιμοποίηση των κυττάρων με παγωμένη αιθανόλη.* Η αιθανόλη αφυδατώνει το κύτταρο και ανοίγει πόρους στην κυτταρική μεμβράνη ώστε να γίνει διαπερατή στα αντισώματα που θα χρησιμοποιήσουμε.

Προσοχή: σε κανένα στάδιο της διαδικασίας δεν πρέπει να αφήσετε τα κύτταρα να στεγνώσουν!! Επίσης, η προσθήκη/ αφαίρεση διαλυμάτων πρέπει να γίνεται αργά και όχι απευθείας πάνω στην αντικειμενοφόρο ώστε να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το παρασκεύασμα!!

Αφαιρέστε το θρεπτικό μέσο των κυττάρων από το τρυβλίο (με πιπέττα) και προσθέστε 15 ml αιθανόλης, -20 °C. Επώαστε στους -20 °C για 5 min.

2. *Πλύνετε τα κύτταρα 2 φορές με 15 ml διάλυμα PBS σε θερμοκρασία δωματίου (RT).*
3. *Blocking.* Επώαστε τα κύτταρα με 15 ml διαλύματος PBS 1% BSA για 15 min, σε RT. Το στάδιο αυτό μειώνει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις των αντισωμάτων με πρωτεΐνες του κυττάρου.
4. *Διάλυμα πρώτου αντισώματος (1<sup>st</sup> Ab):* Αραιώστε 1 μl μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στην α-τουμπουλίνη το οποίο δημιουργήθηκε σε ποντίκι (mouse anti-tubulin) σε 200 μl PBS 1% BSA (1:200). Αφαιρέστε το προηγούμενο διάλυμα από τα κύτταρα και επώαστε τα με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος, για 30 min, σε RT.

5. Πλύνετε 2 φορές με 15 ml διάλυμα PBS για 5 min σε RT.
6. Διάλυμα δεύτερου αντισώματος ( $2^{nd}$  Ab): Αραιώστε 1  $\mu$ l anti-mouse αντισώματος συνδεδεμένο με FITC το οποίο δημιουργήθηκε σε κασίκα (goat anti-mouse:FITC) σε 200  $\mu$ l PBS 1% BSA (1:200). Προσθέστε 1  $\mu$ l Propidium Iodide (από 10 mg/ ml stock). Το Propidium Iodide φθορίζει στο κόκκινο χρώμα όταν προσδεθεί στο DNA. Αφαιρέστε το PBS από τα κύτταρα και επώαστε τα με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος, για 30 min, σε RT.
7. Πλύνετε 2 φορές με 15 ml διάλυμα PBS για 5 min σε RT.
8. Αφαιρέστε το PBS και προσθέστε στην αντικειμενοφόρο 2 σταγόνες *mounting medium*. Το *mounting medium* ενισχύει το φθορισμό του παρασκευάσματος.
9. Βάλτε καλυπτρίδα στην αντικειμενοφόρο και σφραγίστε με βερνίκι.
10. Παρατηρήστε το παρασκεύασμα σε μικροσκόπιο φθορισμού.

#### **Δ. Διαλύματα**

##### **1. Phosphate Buffer Saline (PBS)**

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

σε 800 ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

Ρυθμίστε το pH στο 7.4 με HCl. Προσθέστε H<sub>2</sub>O έως το 1 λίτρο.

##### **2. PBS 1% BSA**

1 g BSA (bovine serum albumine, αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε 100 ml PBS.

## Σημειώματα

### Σημείωμα αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Κρήτης, Αντώνης Κούτης 2015. «Κοινωνία και Υγεία. Παραδείγματα διαταραχών υγείας». Έκδοση: 1.0. Ηράκλειο 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<https://opencourses.uoc.gr/courses/course/view.php?id=360>.

### Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση, Όχι Παράγωγο Έργο 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο.

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

### Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

## Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Κρήτης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.

