

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

MICRONUKLEUS TEST – MODIFIKACE S CYTOCHALASINEM B

O B S A H:

1. Princip Micronucleus testu
2. Chemikálie a spotřební materiál
3. Přístroje a pomocná zařízení
4. Pracovní postup
 - 4.1 Kultivace buněk
 - 4.2 Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů
 - 4.3 Barvení pro hodnocení fluorescenčním mikroskopem
 - 4.4 Barvení pro hodnocení optickým mikroskopem
5. Hodnocení preparátů
 - 5.1 Automatická mikroskopická analýza
 - 5.2 Manuální mikroskopická analýza

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

1. Princip Micronucleus testu

Micronucleus test je aplikován jako rychlá a citlivá metoda umožňující in vitro detekci cytogenetického poškození buněk. Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako mikrojádra, je projevem biologického účinku genotoxických faktorů. Mikrojádra jsou struktury viditelné v buněčné cytoplazmě během interfáze s podobnými charakteristikami barvení jaké vykazuje hlavní buněčné jádro. Obsahují buď celé chromozomy nebo chromozomální fragmenty. Mikrojádra se analyzují výhradně v těch buňkách, které prošly jedním buněčným dělením v důsledku inhibice cytokinézy pomocí cytochalasinu B. Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a z připravených a obarvených preparátů je analyzována frekvence mikrojader ve dvoujaderných buňkách.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

2. Chemikálie a spotřební materiál

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

Roztoky pro kultivaci buněk A549

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1.0 g/L glucose, with pyruvate, without L glutamine (LONZA BE12-707F/12)
Fetal bovine serum (FBS), EU standard (LONZA DE14-801F/12)
L-glutamine (200 mM) (LONZA BE17-605E)
Gentamicin sulfate 10 mg/ml (LONZA 17-519L)
Trypsin/EDTA (1x) contains 0.5 g/L trypsin 1:250 and 0.2 g/L Versene® (EDTA) (LONZA BE17-161E)
DMSO (Sigma D2650)

zásobní roztok cytochalasinu B 100 mg cytochalasinu B rozpustit ve 5 ml DMSO, uchovávat při minim. - 20°C

pracovní roztok cytochalasinu B 1 ml zásobního roztoku přidat k 9 ml DMSO

Chemikálie a roztoky pro zpracování buněk

Metanol reagent gr., Merck, USA
Kyselina octová, 99 % p.a., Penta Chrudim
Chlorid draselný p.a., Merck
Cytochalasin B reagent gr., Sigma - Aldrich Deionizovaná
deinizovaná voda LGE, Millipore

0,55 % roztok chloridu draselného 0.55 g KCl rozpustit ve 100 ml dH₂O
(hypotonický roztok) při 37°C uchovávat do spotřebování

metanol :kys.octová 3 díly : 1 dílu
(fixační roztok) neuchovávat

DAPI zásobní roztok 6 µg DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)
v 1 ml H₂O
uchovávat při -20°C

DAPI pracovní roztok 4 µl zásobního roztoku
100 µl antifade, uchovávat při 4°-10°C

montovací médium pro fluorescenci Vector Laboratories, Inc.
VECTASHIELD (H 1000) uchovávat při 4 °C

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

3. Přístroje a pomocná zařízení

Přístroje

- laminární box
- chladnička (4°C až 10°C)
- mraznička (od -20°C)
- centrifuga (od 1 000 ot/min)
- termostat (37°C ± 1°C) – teplota kontrolována teploměrem, při provozu denně
- fluorescenční mikroskop Axio Imager Z1 (Zeiss) ve spojení s Metaferem (MetaSystems)
- fluorescenční filtr pro DAPI
- optický mikroskop Olympus BX41
- vortex

Pomocná zařízení

- vodní vývěva
- automatické pipety
- laboratorní sklo a plast (kultivační láhve-Falcon, pipety atd.)
- podložní skříčka – před použitím jednotlivě promyta pod tekoucí vodou, naložena do destilované vody a vychlazena v chladničce
- germicidní zářivky
- analytické váhy
- digitální budíčky

4. Pracovní postup

Bezpečnost práce

Metodika vyžaduje práci s žíravinami (konc. kyselina octová), ostatními jedy (cytochalasinem B) a zvláště nebezpečnými jedy (metanol).

Je nutno dodržovat zásady běžné pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, navíc dochází ke kontaktu s chemickými látkami typu mutagenů a karcinogenů – vyžadováno používání pomůcek osobní ochrany (ochranný oděv, rukavice, roušky), dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, a s infekcí, včetně likvidace odpadu.

4.1 Kultivace buněk

Buňky A549 kultivujeme v 75 cm² lahvích s 15-30 ml kultivačního média (DMEM s 10% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) do 70-80% konfluence. Poté buňky inkubujeme v 15 ml aplikačního média (DMEM s 1% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) se vzorky extraktů v termostatu při teplotě 37°C, 72h. Ve 44. hodině od začátku kultivace se přidá 40 µl pracovního roztoku cytochalasinu B (výsledná koncentrace 5µg/ml). Obsah dobře promícháme. Po 72 h následuje nesterilní sklizení buněk.

4.2 Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů

1. Po ukončení kultivace slijeme 15 ml kultivačního média do 50 ml zkumavek. Kultivační lahvičky dvakrát propláchneme 5 ml PBS (phosphate buffered saline, pH=7.4), PBS přidáme do 50 ml zkumavky ke kultivačnímu médiu.
2. Buňky opláchneme 2 ml trypsinu a inkubujeme při 37°C cca 4 minuty. Po skončení inkubace dvakrát přidáme po 5 ml PBS, buňky v lahvičce resuspendujeme a přepipetujeme do téže 50 ml zkumavky.
3. Zkumavky uzavřeme víčkem a centrifugujeme 10 min., 1 000 ot/min., při 20°C.
4. Odsajeme supernatant, resuspendujeme pelet buněk a přepipetujeme do skleněných centrifugačních zkumavek. Za stálého vortexování přidáme 10 ml hypotonického roztoku vytemperovaného na 37°C, necháme stát 5 min při lab. teplotě.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

5. Centrifugujeme 5 min při 1 000 ot/min, odsajeme supernatant.
6. Pomalu přidáme 5 ml vychlazeného fixačního roztoku kapku po kapce, za stálého míchání na vortexu.
7. Centrifugujeme 5 min při 1 000 ot/min, odsajeme supernatant.
8. Přidáme 5 ml vychlazeného fixačního roztoku za stálého míchání na vortexu.
9. Centrifugujeme 5 min při 1 000 ot/min, odsajeme supernatant.
10. Přidáme 5 ml vychlazeného metanolu za stálého vortexování.
11. Centrifugujeme 5 min při 1 000 ot/min, odsajeme supernatant až na malý objem (0,5 ml).
12. Buněčný sediment resuspendujeme v malém množství metanolu a nakapeme na mokré vychlazené podložní sklo.
13. Skla popíšeme a necháme uschnout při laboratorní teplotě přes noc.

4.3 Barvení pro hodnocení fluorescenčním mikroskopem

Provádíme zamontováním fixovaných buněk do montovacího média VECTASHIELD firmy Vector LABORATORIES s fluoresceinem DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole).

1. Do eppendorfky odměříme 100 μ l montovacího média VECTASHIELD se 4 μ l zásobního roztoku DAPI o koncentraci 6 μ g/ml.
2. Montovací médium dobře promícháme vortexem, uchovááme v chladu a v temnu.
3. Na sklíčko na zafixované buňky kápneme 2 kapky à 10 μ l montovacího média a přiklopíme krycím sklem (24 x 50 mm).
Preparát můžeme hodnotit. Po dobu hodnocení skladujeme preparáty uzavřené v krabici v temnu a v chladu (v lednici).

4.4 Barvení pro hodnocení optickým mikroskopem

Po usušení skel volně na vzduchu barvíme preparáty 5% roztokem Giemsa. Doba barvení je 3 – 4 minuty, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou a necháme uschnout.

5% roztok Giemsa

Giemsa	5 ml
Sörensov pufř	15 ml
dH ₂ O	80 ml

5. Hodnocení preparátů

5.1 Automatická mikroskopická analýza

V rámci automatické analýzy jsou hodnoceny následující buňky:

1. Dvoujaderné buňky bez mikrojádra - hodnoceny jako nepoškozené (**obr. 1a**)
2. Dvoujaderné buňky s 1 mikrojádrem - hodnoceny jako poškozené (**obr. 1b, c**)
3. Dvoujaderné buňky se 2 a více mikrojádry - hodnoceny jako poškozené (**obr. 1d**)

Postup automatické analýzy

1. Provádíme automatickou obrazovou analýzu, při které hodnotíme 1 000 – 3 000 dvoujaderných buněk. K automatickému vyhledávání a identifikaci buněk s mikrojádrem je využit přístroj Metafer (MetaSystems), vybavený softwarem pro vysokorychlostní analýzu. Přístroj provádí vyhledávání na základě předdefinovaných parametrů, charakterizujících vlastnosti jader a mikrojader. (Více informací - D. Varga, T. Johannes, S. Jainta, S. Schuster, U. Schwarz-Boeger, M. Kiechle, B. Patino Garcia and W. Vogel, An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis* 19 (2004) 391-397.)
2. Doporučené nastavení klasifikátoru:
Pro jádra -: sharpen (3,4); object threshold: 20%; minimum area: 4000 in 1/100 μm^2 ; maximum area: 20 000 in 1/100 μm^2 ; maximum relative concavity depth: 120 in 1/1000; maximum aspect ratio: 1500 in 1/1000; maximum distance: 180 in 1/10 μm ; maximum area asymmetry: 90%; region of interest radius: 300 in 1/10 μm ; maximum object area in the region of interest (ROI): 2000 in 1/100 μm^2 .
Pro mikrojádra - medianv (3), medianh (3), average (3,1), sharpen (5,5); object threshold: 15%; minimum area: 100 in 1/100 μm^2 ; maximum area: 2100 in 1/100 μm^2 ; maximum relative concavity depth: 1000 in 1/1000; maximum aspect ratio: 1720 in 1/1000; maximum distance: 290 in 1/10 μm .
3. Na závěr je provedena manuální kontrola, vyhledaných objektů. Nalezené objekty je možno analyzovat, či konzultovat opakovaně.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

Kriteria analýzy

Přednastavené parametry klasifikátoru zohledňují kritéria pro výběr a analýzu dvoujaderných buněk a mikrojader. Zejména jsou to:

Pro výběr buněk:

1. Buňky musí být dvoujaderné.
2. Jádra jsou přibližně stejně velká s podobnou intenzitou zbarvení.
3. Jádra se nepřekrývají.

Pozn.: Při fluorescenčním barvení spojeným s automatickým hodnocením je cytoplazma nezřetelná a její oblast je v klasifikátoru vymezena na základě ROI (region of interest), podrobněji na <http://www.human.org>.

Pro výběr mikrojader:

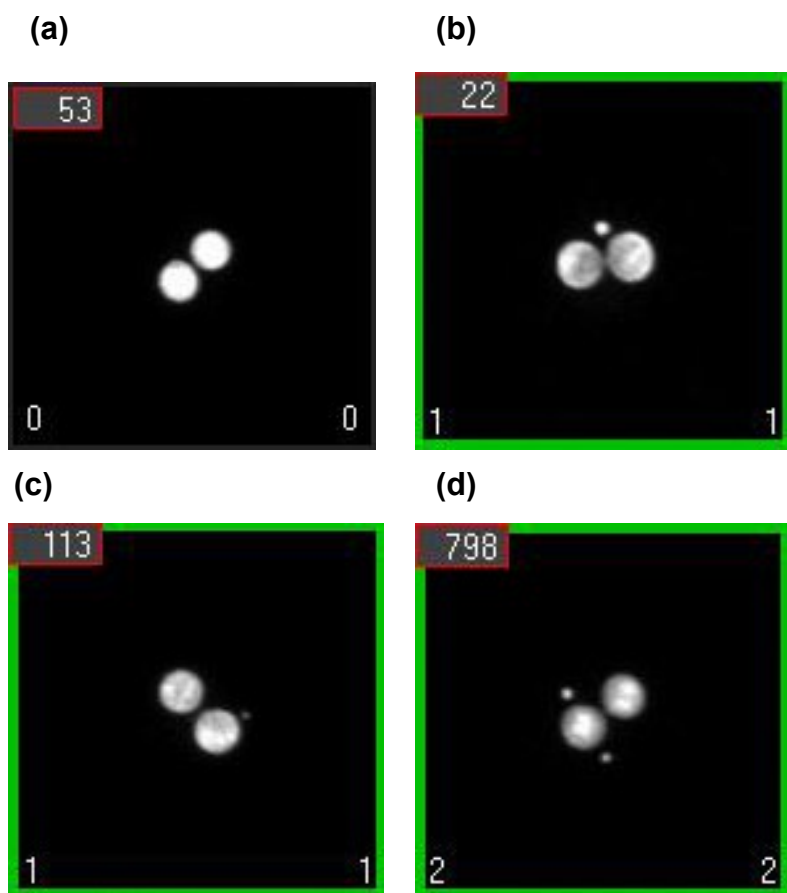
1. Morfologická shoda s hlavním jádrem.
2. Průměr mikrojádra je v rozmezí $1/16 - 1/3$ průměru hlavního jádra (tj. $1/256 - 1/9$ plochy hlavního jádra).
3. Intenzita zbarvení přibližně odpovídá zbarvení hlavního jádra, nebo je mírně intenzivnější.

Statistické hodnocení

Získané výsledky celého hodnoceného souboru jsou testovány na normalitu rozložení. Pokud hodnoty nemají normální rozložení, je aplikován neparametrický Mann Whitney test k porovnání hodnocených skupin. Lze využít např. software SPSS.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)



Obr.1 – Hodnocení dvoujaderných buněk při automatické obrazové analýze: **(a)** dvoujaderná buňka bez mikrojádra; **(b,c)** dvoujaderné buňky s jedním mikrojádrém rozdílné velikosti; **(d)** dvoujaderná buňka se 2 mikrojádry.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

5.2 Manuální mikroskopická analýza

V rámci manuální analýzy jsou hodnoceny následující buňky:

1. Dvoujaderné buňky bez mikrojádra - hodnoceny jako nepoškozené (**obr. 2a**)
2. Dvoujaderné buňky s 1 mikrojádrem - hodnoceny jako poškozené (**obr. 2b, c**)
3. Dvoujaderné buňky se 2 a více mikrojádry - hodnoceny jako poškozené (**obr. 2d**)

Při manuálním hodnocení mohou být též hodnoceny nukleoplasmatické můstky, indikující přítomnost dicentrických chromosomů, případně frevence tzv. buds (mikrojádra propojená s hlavním jádrem) a frekvence dalších druhů buněk (jednojaderné, vícejaderné, nekrotické a apoptotické).

Postup manuální analýzy

1. Výpočet CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) – poměr binukleárních a ostatních buněk umožňující odhad cytotoxicity aplikovaných látek a představující průměrný počet buněčných cyklů během expozice.

Buňky se hodnotí v mikroskopu Olympus BX41 při zvětšení 400x. Hodnotí se minimálně 500 buněk.

$$\text{CBPI} = \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3} + \text{M4})/\text{N}$$

M1 – počet jednojaderných buněk

M2 – počet dvoujaderných buněk

M3, M4 – počet tří- a vícejaderných buněk

N – počet hodnocených buněk (doporučeno 500 objektů)

2. Mikrojádra se hodnotí v mikroskopu Olympus BX41 při zvětšení 1000x pod imersním olejem. Hodnotí se 2000 dvoujaderných buněk a poté se stanoví frekvence mikrojader na 1000 dvoujaderných buněk ($\text{MN}/1000 \text{ BNC} = \text{micronuclei} / 1000 \text{ binucleated cells}$).

Kriteria analýzy

Pro výběr buněk:

1. Buňky musí být dvoujaderné.
2. Jádra jsou přibližně stejně velká s podobnou intenzitou zbarvení.

MEDETOX

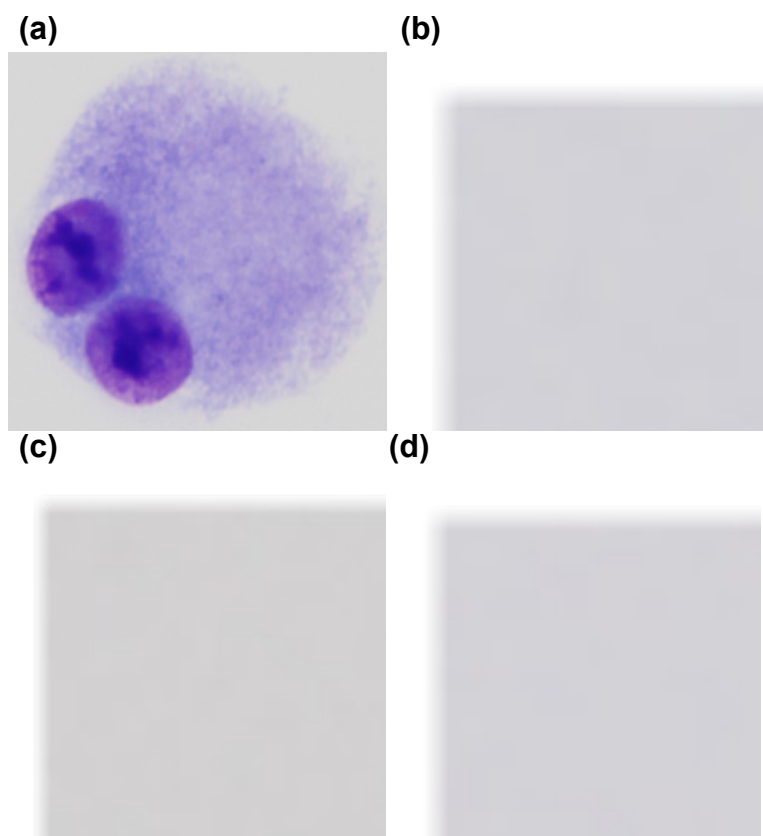
Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

3. Jádra se mohou dotýkat, ale ideálně se nepřekrývají – pokud ano, překrývající se části jader musí být viditelně ohraničené.
4. Jádra mohou být spojena nukleoplasmatickým mostem, který není širší než $\frac{1}{4}$ průměru jádra.

Pozn.: Pro manuální hodnocení, kde se využívá především nefluorescenční barvení je hodnocení ovlivněno též kvalitou cytoplazmy a jejím jasným rozlišením od jádra.

Pro výběr mikrojadra:

1. Morfologická shoda s hlavním jádrem.
2. Průměr mikrojadra je v rozmezí $\frac{1}{16}$ – $\frac{1}{3}$ průměru hlavního jádra (tj. $\frac{1}{256}$ – $\frac{1}{9}$ plochy hlavního jádra).
3. Intenzita zbarvení přibližně odpovídá zbarvení hlavního jádra, nebo je mírně intenzivnější.
4. Mikrojadro se s jádrem nesmí překrývat a může se ho dotýkat max. v jednom bodě, popř. musí být jasně ohraničené a odlišitelné od jádra.



Obr.2 – Hodnocení dvoujaderných buněk při manuální analýze: **(a)** dvoujaderná buňka bez mikrojadra; **(b,c)** dvoujaderné buňky s jedním mikrojádrom rozdílné velikosti; **(d)** dvoujaderná buňka se 2 mikrojádry.

Literatura:

MEDETOX

**Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)**

M. Fenech, A. A. Morley: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*147 (1985) 29-36.

M. Fenech: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol.2 No.5 (2007).