Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Test kometkowy (Comet Assay, SCGE) – elektroforeza pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym

Comet assay zaliczan jest do metod o dużym potencjale poznawczym. Pozwala ona na badanie pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym, dzięki czemu możliwe jest badanie uszkodzeń DNA spowodowanych działaniem czynników genotoksyczności. Jako pierwsi , którzy podjęli się ocenie uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach byli Rydberg i Johanson (1978). Właściwa metoda testu kometkowego wprowadzona została przez Östlinga i Johansona w 1984 roku. Test ten opiera się na badaniu komórek o różnym pochodzeniu, tak więc mogą to być komórki wątroby, krwi czy

nabłonka. Najważneijsze jednak jest by komórki te zawierały jądro zawierające DNA [9].

Ekspozycja komórek na działanie endogennych i egzogennych czynników genotoksycznych powoduje, że dochodzi do modyfikacji chemicznych DNA. Działania te uważane są za potencjalne źródła mutacji w komórkach. W wyniku ekspozycji na te fizyczne lub chemiczne czynniki może dochodzić do modyfikacji struktury DNA, a dalej do uszkodzeń typu:

- jednoniciowe lub dwuniciowe pęknięcia DNA, które powstają w wyniku działania promieniowania jonizującego, leków przeciwnowotworowyc h lub działania wolnych rodników;
- powstawanie tzw. miejsc apurynowych i pirymidynowych, określanych jako miejsca AP,
- czy wiązania krzyżowego typu: DNA-DNA bądź DNA-białko.

Ze względu na fakt występowania różnorodnych uszkodzeń DNA, konieczne jest stosowanie różnych technik badawczych. I tak, do pomiaru poziomu jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA wykorzystuje się elektroforezę pojedynczych komórek, określaną mianem comet assay (ang. single cellgel electrophoresis, SCGE). Metoda ta służy również do identyfikacji wszelkich modyfikacji DNA możliwych do przekształcenia w pęknięcia na drodze chemicznej lub enzymatycznej [1].

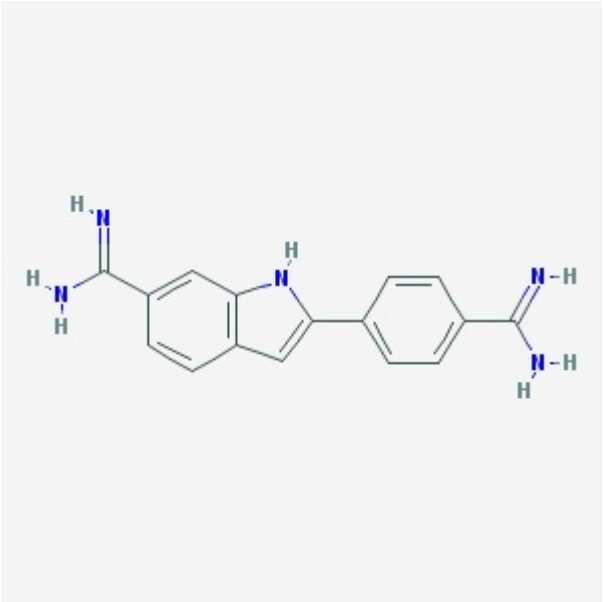
Comet assay- zasada metody

Metoda polega na elektroforetycznym rozdziale jądrowego DNA, dzięki czemu możliwe jest obserwowanie fragmentacji DNA. W trakcie analizy badane komórki unieruchomiane są w żelu agarozowym. Jednak nie ma to nic wspólnego z tradycyjną elktroforezą, ponieważ w przypadku comet assay agaroza znajduje się na szkiełkach mikroskopowych. Tak przygotowane preparaty poddawane sa następnie lizie alkalicznej, co powoduje uwolnienie DNA z jądra komórkowego. Zastosowanie buforu lizującego o wysokiej sile jonowej wspomaga dysocjację białek od DNA. Po tym etapie przeprowadzana jest elektroforeza, która prowadzona jest w warunkach neutralnych, w standardowym buforze TBE, lub w warunkach alkalicznych. Po rozdziale, DNA poddaje się barwieniu fluorescencyjnemu lub solami srebra, a następnie analizuje się uzyskany obraz pod mikroskopem fluorescencyjnym [1], [3].

W trakcie analizy parametrem bezpośrednio mierzonym jest zmiana właściwości elektroforetycznych zmodyfikowanego kwasu nukleinowego (co obserwuje się w postaci wędrówki nici DNA w polu elektrycznym). Badane DNA w trakcie elektroforezy migruje w stronę anody z prędkością, która zależna jest od stopnia jego fragmentacji. Szybkość przemieszczania się badanych fragmentów w trakcie analizy jest proporcjonalna do stopnia fragmentacji. Ostatnim etapem comet assay jest analiza mikroskopowa, gdzie obraz mikroskopowy uszkodzonej komórki poddanej procedurze elektroforezy wyglądem przypomina kometę tj. „głowa” odpowiada miejscu, w którym unieruchomiono komórkę przed lizą, zaś „ogon” stanowią pętle i fragmenty nici DNA zrelaksowane i uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć- stąd też bierze się nazwa tej techniki [3].

Fluorochromy wykorzystywane w technice comet assay

Najczęściej wykorzystywanymi a zarazem najbardziej znanymi barwnikami używanymi w teście kometkowym są: bromek etydyny i SYBR Green. Stosowany jest także DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole),jak również wszystkie inne barwniki, które wykazują powinowactwo do DNA [4].



Zdjęcie: Wzór DAPI ($C_{16}H_{15}N_5$) [7].

Przygotowanie barwników

Bromek etydyny:

Najczęściej wykorzystywany jest roztwór bromku etydyny o stężeniu 2µg/ml. Wykonuje się go ze stężonegp 10x roztworu roboczego (20µg/ml), który bezpośrednio przed użyciem rozcieńczany jest odpowiednio wodą. Barwnik ten emituje wysokie tło w analizie comet assay.

SYBR Green:

Przygotowywany jest w stosunku 10µl barwnika 1:100 z 90 µl 10 mM Trisu (o pH=7.5). Przed zmieszaniem odczynników, jako pierwszy w kolejności przygotowywany jest roztwór Sybr Green w DMSO(dimetylosulfotlenek) w stosunku: 1 µl stężonego barwnika z 99 µl DMSO. Tak przygotowany roztwór jest stabilny przez kilka godzin. Inną odmianą tego barwnika jest SYBR Gold, który przygotowywany jest w analogiczny sposób jak SYBR Green [1].

Znane są rónież inne metody wizualizacji, w tym np. barwienie praparatów z wykorzystaniem azotanu srebra, który pozwala na ich obserwcję w białym świetle [8].

Barwienie preparatów solami srebra (wg kucharczyk.com.pl):

1. Szkiełka podstawowe z naniesionymi preparatami poddać 10 minutowej inkubacji w roztworze utrwalającym (od czasu do czasu zamieszać). Po upływie czasu inkubacji, preparaty przemyć za pomocą wody destylowanej, po czym wysuszyć w 37°C (cieplarka) przez co najmniej 1 godzinę,
2. W tym czasie należy przygotować roztwór barwiący B (tj. 25 g węglanu sodu należy rozpuścić w 500 ml wody destylowanej), oraz roztwór C (tj. w 500 ml wody destylowanej należy rozpuścić kolejno: 100 mg azotanu amonu, 100 mg azotanu srebra, 500 mg kwasu wolframokrzemowego, a następnie dodać 0,25 ml 37% formaldehydu)
3. Następnie, przed samym użycim połączyć 68ml roztworu barwiącego C z 32 ml roztworu barwiącego B. Przygotowaną mieszaniną zalać szkiełka i prowadzić barwienie przez 10 do 20 minut, aż do momentu uzyskania brązowego lub szarego koloru.
4. Wybarwione szkiełka należy przemyć 2x za pomocą wody destylowanej, po czym zablokować

reakcję barwienia przez zanurzenie szkiełek w 1% kwasie octowym. Na koniec szkiełka osuszyć. Tak przygotowane preparaty są gotowe do oglądania pod mikroskopem świetlnym [1].

Wykorzystanie comet assay

Metoda kometowa znalazła bardzo szerokie zastosowanie m.in. do: badania mechanizmów uszkadzania i naprawy DNA, określania genotoksyczności,a także w analizie uszkodzeń DNA powstałych *in vivo* . Ponadto, metodę wykorzystuje się w diagnostyce schorzeń, których bezpośrednią przyczyną są zaburzenia naprawy DNA [1].Znalazła także zastosowanie w cytologii, biochemii kwasów nukleinowych oraz immunologii, z powodzeniem stosowane jest również w farmakologii, medycynie(głównie onkologia, diagnostyka DNA). Comet assay w ochronie środowiska wykorzystywana jest do monitorowania występowania czynników fizycznych i chemicznych, które uszkadzają DNA w środowisku człowieka, zaś wprzemyśle spożywczym znalazła zastosowanie w kontroli stopnia napromieniowania żywności (w procesie sterylizacji radiacyjnej) [2].

Przygotowanie szkiełek podstawowych do analizy- wykonanie:

Każde używane szkiełko na samym początku należy poddać odtłuszczeniu. W tym celu należy je zanurzyć w roztworze acetonu (chloroformu, etanolu lub metanol), po czym wysuszyć lub opalić na płomieniem. Następnie, w zlewce przygotować 1% roztwór agarozy NMP (zlewkę umieścić we wrzącej łaźni wodnej). W agarzoie zanurzać szkiełko, a po wyciągnięciu za pomocą bibuły należy zetrzeć nadmiar agarozy z dolnej powierzchni szkiełka, a tak przygotowe szkiełko pozostawić do wyschnięcia. Bardzo ważne na tym etapie jest, by zaznaczyć na której stronie szkiełka znajduje się agaroza, ponieważ po całkowitym wyschnięciu warstwa ta może być niewidoczna [1]. W celu większej oszczędności roztworu agarozy, zamiast zanurzania szkiełek, można na nie nanieść pipetą automatyczną 100 µl gorącej agarozy [1].

Utrwalanie i barwienie komórek:

Szkiełka z komórkami, bezpośrednio po etapie neutralizacji wybarwia się np. roztworem bromku etydyny w stężeniu 2 µg/ml. Na szkiełko nanosi się kroplę barwnika, po czym całość przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowany preparat należy oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym (z zastosowaniem odpowiedniego filtra). Ze względów praktycznych bardiej zalecane jest utrwalanie szkiełka w 96% alkoholu etylowym lub metanolu. Dzięki zastosowaniu tej metody utrwalania możliwe jest dłuższe przechowywanie preparatów. Przed samą analizą pod mikroskopem, szkiełka utrwalone w alkoholu wybarwia się z wykorzystaniem bromku etydyny (jak wyżej) [1].

Metoda elektroforezy kometkowej cieszy się bardzo dużą popularnością, ponieważ stosunkowo prosta i tania. Wraz z rozwojem technik badawczych, również comet assay doczekała się szerokiego wykorzystania- nie tylko w biologii molekularnej lecz również w medycynie, farmacji czy ochronie środowiska [4], [5].

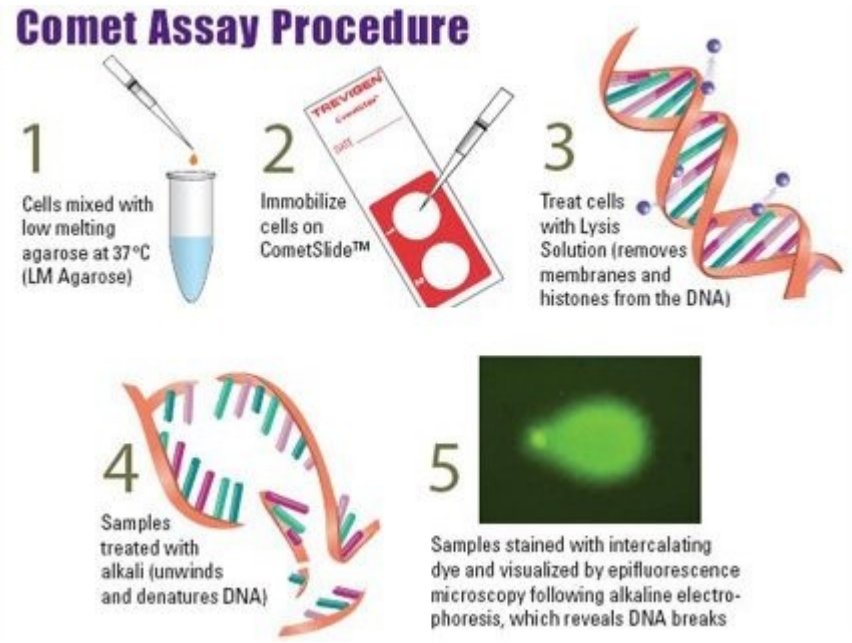
Analiza obrazu kometek

Analiza prowadzona jest przez zliczanie komórek z danego zakresu wielkości ogona komety. Jednakże, najczęściej do analizy obrazu wykorzystuje się specjalistyczne oprogramowanie. Do opisu zaobserwowanych uszkodzeń w badanych preparatach stosuje się %DNA w ogonie lub "intensywność" ogona. Wykorzystywany jest także tzw.współczynniki Tail Moment (=długość_ogona*%DNA_ w_

ogonie/100) bądź „Olive Moment”. Oba współczynniki stosowane są do opisywania wzrostu uszkodzeń DNA do pewnego zakresu. Przekroczenie tego zakresu powoduje, że zwiększenie uszkodzeń nie ma wpływu na wzrostu wartości badanych współczynników [1],[2].

CometAssay® Starter Kits – postępowanie (zdjęcie poniżej)

1. Komórki miesza się z agarozą o niskiej temperaturze topnienia
2. Unieruchomienie komórek na płytce (CometsSlides™)
3. Liza komórek w celu usunięcia DNA i związanych białek błonowych
4. Potraktowanie próbek zasadą, w celu rozwinięcia („relaksacji”) i denaturacji DNA
5. Rozdział elektroforetyczny w trakcie, którego uszkodzone, rozwinięte i „zrelaksowane” DNA migruje z komórki i może być zwizualizowane za pomocą barwienia z wykorzystaniem SybrGreen [6].



Zdjęcie: Comet assay, procedura wg **AMS Biotechnology**, **CometAssay® Starter Kits,** http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx [6].

Promieniowanie jonizujące

Rozróżnia się dwa mechanizmy działania promieniowania jonizującego:

1. Mechanizm bezpośredni (tzw. efekt tarczy)- polegający na uszkodzeniu najbardziej wrażliwych struktór komórkowych tj. DNA i błony komórkowej, poprzez działanie wolnych elektronów
2. Mechanizm pośredni- jego wynikiem jest radioliza wody, spowodowany jest uszkodzeniem struktór komórkowych przez wolne rodniki [5].

Promieniowanie jonizujące jest wszechobecnym fizycznym czynnikiem, którego działanie na organizmy żywe powoduje uszkodzenia w DNA – jest to zjawisko powszechnie znane. W trakcie fizyko-chemicznych interakcji z komórkowym DNA dochodzi do powstawania wielu pierwotnych

zmian, gdzie zazwyczaj rozróżnia się kilka typów uszkodzeń DNA:

- SSBs (single strand-breaks) - pojedynczoniciowe,

- DSBs (double strand-breaks) - podwójnoniciowe,

- wiązania krzyżowe DNA-DNA, DNA-białko,

- uszkodzenia purynowe i pirymidynowe [4], [5].

Test kometkowy pozwala na wykrycie uszkodzeń DNA oraz na badanie kinetyki naprawy DNA na poziomie pojedynczej komórki. Różnorodność możliwych modyfikacji tego testu ułatwia wykrywanie zarówno uszkodzeń typu SSBs, jak i DSBs, a także wiązań niestandardowych i wielu innych. Test kometkowy może być stosowany zarówno do dzielących się, jak i nie dzielących się komórek i komórek tkanek, które miały bezpośredni kontakt z czynnikiem genotoksycznym (środkiem genotoksyczności) [4].

W swoich badaniach Garaj-Vrhovac V. i Kopjar N (2002), wykorzystały metodę comet assay jako biomarker narażenia do oceny wpływu napromieniowania pracowników medycznych (50 osób), zawodowo narażonych na promieniowanie jonizujące. Jako kontrolę w swoich badaniach wykorzystały dane zaberane od 50 innych pracowników – nienarażonych na promieniowanie. Rodzaj uszkodzeń DNA badano przez pomiar stopnia migracji DNA w leukocytach krwi obwodowej (krew pobrana od grupy badanej i kontrolnej). Próbki krwi obwodowej od osób narażanych na promieniowanie i grupy kontrolnej pobrano przez nakłucie żyły do probówek zawierających heparynę. Alkaliczny test kometkowy przeprowadzono na pobranych próbach bezpośrednio po transporcie krwi.

Comet assay (procedura wg Garaj-Vrhovac V. i Kopjar N (2002))[4].

Test w przeprowadzonym badaniu prowadzono w warunkach zasadowych, opierając się na metodologii opisanej przez Singh i wsp. (1988).

Wykonanie:

Matowe szkiełko pokryto 1% agarozą (Sigma) o normalnej temperaturze topnienia (NMP), a po zestaleniu żel usunięto ze szkiełka. Następnie, szkiełko pokryto 0,6% agarozą NMP. Gdy warstwa ta się utrwaliła (zastygła), drugą warstwę zawierającą próbkę krwi zmieszano z 0,5% agarozą o niskiej temperaturze topnienia (LMP), po czym umieszczono na szkiełku. Po upływie 10 minut (zastyganie na lodzie) szkiełka pokryto 0,5% agarozą LMP.

Następnie, szkiełko zanurzono na 1 godzinę w świeżo przygotowanym lodowatym roztworze do lizy (tj.: 2,5M NaCl, 100mM Na_2EDTA; 10mM Tris-HCl; 1% Na-sarcosinate (Sigma), pH 10); 1% Triton X-100; 10% sulfotlenek dimetylu). Dodany świeży odczyynik do próbki spowoduował lizę komórek i rozkład DNA. Po etapie lizy, szkiełko umieszczono w aparacie do elektroforezy poziomej od strony anody, napełnionym świeżym buforem do elektroforezy (tj.: 300 mM NaOH; 1mM Na_2EDTA pH=13), a płytki umieszczono na 20 minut w buforze zasadowym, aby umożliwić odwijanie DNA. Proces denaturacji i elektroforezy prowadzono w temperaturze 4°C przy słabym świetle. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 20 minut przy 25V [[4].

Po elektroforezie szkiełka delikatnie przepłukano (3x) w buforze do zobojetniania (tj.: 0,4M Tris-HCl o pH=7,5) w celu usunięcia nadmiaru zasady i detergentów. Każdy preparat wybarwiono bromkiem

etydyny (o stężeniu 20µg/ml), po czym przykrywano je szkiełkiem nakrywkowym. Szkiełka przechowywano w temperaturze 4°C w zamkniętych pojemnikach, aż do momentu analizy [4].

Wyniki badań Garaj-Vrhovac V. i Kopjar N (2002)

Po analizie z wykorzystaniem comet assay, na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w grupie osób narażonych zawodowo na działanie promieniowania jonizującego (działanie z różną częstotliwością), znacząco wzrasta poziom uszkodzeń DNA, w porównaniu do grupy kontrolnej [4].

Rozdział elektroforetyczny preparatów (procedura wg Brzuzan P. i wsp. (2007)):

1. Do probówek zawierających badane komórki należy dodać po 65µl rozgrzanej 0,5% agarozy LMP, całość dokładnie wymieszać przez pipetowanie
2. Mieszaninę agarozy LMP z komórkami nałożyć na szkiełko podstawowe, pokryte 1% agarozą, po czym schłodzić je na płytce z lodem
3. Po upływie czasu chłodzenia, należy ponownie nałożyć na szkiełko (drugą warstwę) agarozy LMP, po czym czynność tą powtórzyć trzeci raz
4. Tak przygotowane preparaty umieścić w kominku wypełnionym odpowiednim buforem lizującym (1h).
5. Po upływie czasu lizy, preparaty umieścić w aparacie do elektroforezy (preparaty zalać buforem i pozostawić na 20 minut),następnie prowadzić rozdział elektroforetyczny przez 15 minut,
6. Rozdzielone elektroforetycznie preparaty poddać neutralizacji: w tym celu przenieś je na kratkę i neutralizować, polewając każde szkiełko 3x buforem w odstępach 5-minutowych. Jako neutralizator wykorzystać np. 0,4 Tris o pH=7.5
7. Tak przygotowane preparaty poddaje się następnie barwieniu za pomocą bromku etydyny (w stężeniu 20µl/ml). Na każde szkiełko nanosi się 50uL bromku, po czym nakrywa szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty są gotowe do analizy (analiza mikroskopowa) [8].

Bufor elektroforetyczny (alkaliczny):

- 300 mM NaOH (12g/L)
- 1 mM EDTA (0,371 g/L)
- ustalić pH >13 [1]

Ważne, by do zakończenia rozdziału elektroforetycznego wszystkie czynności prowadzone były przy przyciemnionym świetle , ponieważ intensywne światło powoduje uszkodzenia DNA [1].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. http://www.kucharczyk.com.pl/instrukcje/poradykometa.pdf . Dr Marcin Schmidt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, http://www.up.poznan.pl/~mschmidt/
[2]. http://www.kucharczyk.com.pl/

[3]. Shaposhnikov S.A. , Salenko V.B., Brunborg G., Nygren J.,Collins A.R., 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments? ELECTROPHORESIS Volume 29, Issue 14, pages 3005–3012, No. 14 July 2008, (abstract). http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.200700921/abstract;jsessionid=3C8F2CE80444FC705895101756E003C6.f04t04
[4], Garaj-Vrhovac V., Kopjar N., 2002. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. • Oxford Journals Life Sciences & Medicine Mutagenesis Volume 18, Issue 3 Pp. 265-271. http://mutage.oxfordjournals.org/content/18/3/265.full
[5]. Podstawy radioterapii nowotworów, sytuacje szczególne w leczeniu nowotworów. http://e-onkologia.am.wroc.pl/docs/PODSTAWY_RADIOTERAPII_SYTUACJE%20SZCZEGOLNE%20W%20LECZENIU%20NPL_WF.pdf
[6]. Standardised DNA Damage quantitation with the CometAssay® Electrophoresis System,AMS Biotechnology, http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx
[7]. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2954
[8].Brzuzan P., Woźny M., Łuczyński M.K., 2007. Toksykologia molekularna, przewodnik do ćwiczeń, Olsztyn 2001. http://biotechnology.keyland.biz/pdf/tox_mol_updated.pdf
[9]. Jurczyk Ł., Lewandowska R., Brzuzan P., Woźnicki P., 2003. Zastosowanie metody kometowej w wykrywaniu genotoksyczności substancji chemicznych u ryb. Komunikaty Rybackie, 5/2003. http://pracownicy.uwm.edu.pl/brzuzan/files/poz_19_Other_papers_Zastosowanie_metody_kometowej.pdf

https://laboratoria.net/artykul/20505.html
Informacje dnia: Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny

Partnerzy