

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ SKLENĚNÝCH MIKROELEKTROD PRO
SYSTÉM PATCH CLAMP

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

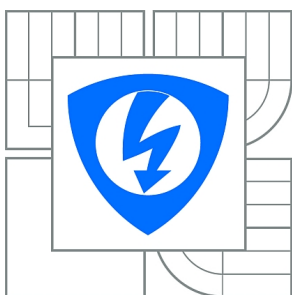
IVANA KLEPÁČOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ SKLENĚNÝCH MIKROELEKTROD PRO SYSTÉM PATCH CLAMP

THE FLUORESCENT MARKING OF GLASS MICROELECTRODES FOR THE PATCH CLAMP
SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

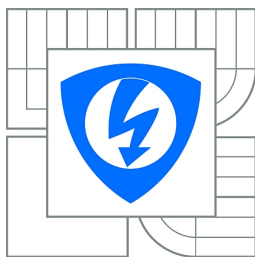
IVANA KLEPÁČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

LARISA BIAZITOVA

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Ivana Klepáčová

ID: 146192

Ročník: 3

Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Fluorescenční značení skleněných mikroelektrod pro systém patch clamp

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Nastudujte možnosti vytváření skleněných mikroelektrod od vzniku oboru až po aktuální problematiku. Zaměřte se především na elektrody pro patch clamp. 2) Seznamte se s metodami fluorescenčního značení zmíněných mikroelektrod. 3) K oběma oblastem sestavte literární rešerši. 4) Navrhněte postup vnějšího fluorescenčního značení mikroelektrod použitelný při měření se systémem patch clamp. 5) Navržený postup důkladně otestujte na odpovídající sadě vzorků. 6) Proveďte diskuzi dosažených výsledků a zhodnoťte využití navržené metody v praxi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Molleman, A.: Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. Chichester, West Sussex : John Wiley & Sons, Ltd., 0-471-48685-X, 2003.

[2] Ishikawa, D., Takahashi, N., Sasaki, T., Usami, A., Matsuki, N., Ikegaya, Y.: Fluorescent pipettes for optically targeted patch-clamp recordings. Neural Networks, s. 669-672, 2010. Dostupné na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223634).

Termín zadání: 10.2.2014

Termín odevzdání: 30.5.2014

Vedoucí práce: Larisa Baiazitova

Konzultanti bakalářské práce: Ing. Vratislav Čmiel

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Práca sa zaoberá problematikou fluorescenčného značenia sklenených mikroelektrod pre systém patch clamp. Bližšie analyzuje možnosti vytvárania sklenených mikroelektrod od výberu vhodného typu skla až po zostrojenie mikroelektrody, ktorá môže byť využitá v praxi pri experimentálnych meraniach. Etapy postupu vytvárania sklenených mikroelektrod dokumentujú možnosti vývoja danej techniky. Pri popise javu fluorescencie je uvedená klasifikácia a popis fluoroforov. Práca obsahuje teoretický rozbor uvedenej problematiky a predkladá ho v ucelenej podobe. Praktická časť práce popisuje návrh postupu vonkajšieho fluorescenčného značenia sklenených mikroelektrod použiteľných pri meraní so systémom patch clamp. Pojednáva o testovaní vytvoreného postupu a poskytuje zhodnotenie možného využitia navrhutej metódy v praxi.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Sklenené mikroelektrody, ťahač mikroelektrod, patch clamp, fluorescencia, fluorofory.

ABSTRACT

The paper deals with the issue of the fluorescent marking of glass microelectrodes for the patch clamp system. It analyses in more details the possibilities of creation of glass microelectrodes from the choice of appropriate glass type to the construction of a microelectrode, which can be used in practice in experimental measurements. Phases of creation process of glass microelectrodes document possibilities of the development of the given technique. The description of fluorescence phenomenon includes the classification and description of fluorophores. The paper contains a theoretical analysis of the given issues and presents it in its comprehensive form. The practical part of the thesis suggests the procedure of the external fluorescent marking of glass microelectrodes which can be used in the measurement by means of the patch clamp system. It is concerned with the testing of the established procedure and provides the evaluation of the possible application of the suggested procedure in practice.

KEYWORDS

Glass microelectrodes, microelectrode puller, patch clamp, fluorescence, fluorophores.

KLEPÁČOVÁ, I. *Fluorescenční značení skleněných mikroelektrod pro systém patch clamp*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Larisa Baiazitova.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému „Fluorescenční značení sklenených mikroelektrod pro systém patch clamp“ som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovení § 11 a nasledujúce zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákoníka č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej semestrálnej práce Larise Baiazitovej za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej semestrálnej práce.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

OBSAH

1	Úvod	9
2	Sklenené mikroelektrody	10
2.1	Výroba mikroelektrod.....	10
2.1.1	Výber skla kapilár.....	10
2.1.2	Rozdelenie kapiláry.....	11
2.1.3	Polišovanie mikroelektrod.....	14
2.1.4	Poťahovanie mikroelektrod.....	15
2.1.5	Plnenie mikroelektrod soľným roztokom.....	16
2.2	Dôležité parametre mikroelektrod.....	17
2.2.1	Dĺžka a priemer hrotu.....	18
2.2.2	Odpor mikroelektrody.....	18
2.2.3	Kapacitancia mikroelektrody.....	18
3	Fluorescencia	20
3.1	Jav fluorescencie.....	20
3.1.1	Jablonského diagram.....	21
3.1.2	Excitačné a emisné spektrum.....	21
3.2	Fluorofory.....	22
3.2.1	Vlastné fluorofory.....	22
3.2.2	Nevlastné fluorofory.....	23
3.2.3	Fotovyblednutie fluoroforov.....	24
3.3	Fluorescenčné značenie patch mikroelektrod.....	24
4	Proces postupu	26
4.1	Príprava mikroelektrody.....	26
4.1.1	Výber skla kapiláry.....	26

4.1.2	Rozdelenie kapiláry a polišovanie špičiek mikroelektrod	27
4.1.3	Plnenie mikroelektrody soľným roztokom	29
4.2	Fluorescenčné farbenie mikroelektrody.....	30
4.2.1	Výber fluorescenčného farbiva	30
4.2.2	Postup farbenia mikroelektrod.....	31
4.2.3	Snímanie mikroelektrod.....	31
5	Spracovanie výsledkov	33
5.1	Výber spôsobu farbenia	33
5.2	Výber trvania farbenia	34
5.3	Vplyv okolností na prípravu mikroelektrody.....	35
5.3.1	Životnosť žhaviaceho vlákna ťahača mikroelektrod	36
5.3.2	Použitie rôznych typov mikroelektrod.....	36
5.3.3	Povrch skla mikroelektrody	37
5.3.4	Viacnásobné používanie farbiva	38
5.4	Testovanie navrhnutého spôsobu farbenia.....	39
6	Záver	40
	Použitá literatúra	42

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 2.1-1 Dvojstupňové ťahanie kapiláry pri zhotovení patch mikroelektrody [3].....	12
Obr. 2.1-2 Tri typy ťahačov. A) horizontálny ťahač s pohybujúcimi sa oboma koncami s rovnakou silou, B) horizontálny ťahač s pohybujúcim sa jedným koncom a naň pôsobiace silou, C) vertikálny ťahač s využitím gravitačnej sily [5].	13
Obr. 2.1-3 Špička sklenenej mikroelektrody A – pred polišovaním, B – polišovaná metódou fokusácie iónového zväzku [7].	14
Obr. 2.1-4 Mikroelektroda pred a po nanosení vrstvy Sylgardu [3].	15
Obr. 3.1-1 Jablonského diagram [17].	21
Obr. 3.1-2 Ukážka excitačného spektra (absorbcie) a emisného spektra (fluorescencie) [18].	22
Obr. 4.1-1 DMZ-Universal Puller [20].	27
Obr. 4.1-2 Proces ťahania mikroelektrody, A – kapilára v svorkách ťahača, B – nahrievanie kapiláry žhaviacim vláknom [20].	28
Obr. 4.2-1 Konfiguračný vzorec farbiva DiO [25].	30
Obr. 4.2-2 Excitačné a emisné spektrum farbiva DiO [25].	31
Obr. 5.1-1 Snímky vybraných mikroelektrod nafarbených spôsobom A – 1, B – 2, C – 3.	34
Obr. 5.2-1 Snímky vybraných mikroelektrod nafarbených namočením špičky mikroelektrody do fluorescenčného farbiva na čas A – 1 minúta, B – 3 minúty, C – 5 minút.	35
Obr. 5.3-1 Snímky mikroelektrod farbené 5 minút, mikroelektroda A – snímaná na začiatku experimentu, B – snímaná v závere experimentu.	36
Obr. 5.3-2. Snímky mikroelektrod vytvorené z rôznych typov kapilár A – TW120F-3, B – TW150-3, farbené 5 minút.	37
Obr. 5.3-3 Snímky mikroelektrod farbené 5 minút, mikroelektroda farbená A – kontrolným farbivom, B – farbivom bežne používaným počas experimentu.	38

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 2.1-1 Príklad niektorých zložiek typického extracelulárneho (EC) a intracelulárneho (IC) roztoku pri patch clamp na bunkách cicavcov.....	17
Tab. 4.1-1 Parametre použitých kapilár.....	27
Tab. 4.1-2 Iónové zloženie solného roztoku.....	29
Tab. 5.1-1 Štatistika podľa spôsobu farbenia.....	34
Tab. 5.2-1 Štatistika podľa trvania farbenia.....	35
Tab. 5.3-1 Štatistika podľa zvoleného typu kapiláry.....	37
Tab. 5.3-2 Štatistika podľa výberu farbiva.....	38

1 ÚVOD

Obajv metódy patch clamp poskytol zefektívnenie merania membránových prúdov na bunkovej úrovni. Táto metóda umožňuje zaznamenávanie a analýzu elektrických iónových prúdov z jedného molekulárneho kanála. [1] Označenie sklenenej mikroelektrody fluorescenčným farbivom navyše umožní jednoduchšie zacielenie fluorescenčne označenej bunky záujmu. Práca poskytuje ucelený pohľad na problematiku fluorescenčného značenia sklenených mikroelektrod pre systém patch clamp.

V druhej kapitole práca teoreticky pojednáva o možnostiach vytvárania sklenených mikroelektrod. Analyzuje potrebné kroky, ktoré vedú k zostrojeniu mikroelektrod používaných v praxi. Etapy vytvorenia spomínaných mikroelektrod obsahujú viac možností, ktoré sú charakteristické rôznou dobou používania a teda aj technickou náročnosťou.

Tretia kapitola popisuje jav fluorescencie. Ďalej sa zameriava na fluorofory, charakteristiku fluoroforov vlastných a nevlastných. Následne je naznačená problematika fluorescenčného značenia sklenených mikroelektrod pre systém patch clamp.

Postup, ktorý vedie k vytvoreniu fluorescenčne označenej mikroelektrody, popisuje štvrtá kapitola. Je zameraná na prípravu sklenenej mikroelektrody, výber vhodného fluorescenčného farbiva a podmienky, ktoré musia byť dodržané pri farbení mikroelektrody a jej snímaní.

V piatej kapitole je definovaný postup fluorescenčného značenia sklenenej mikroelektrody, ktorá môže byť použitá pri meraní so systémom patch clamp. Kapitola ďalej zahŕňa výsledky testovania navrhnutého spôsobu farbenia a nastieňuje problematiku možných okolností vplývajúcich na postup vytvorenia mikroelektrody.

2 SKLENENÉ MIKROELEKTRÓDY

Využitie sklenených mikroelektród sa stalo medzníkom v rozvoji bunkovej elektrofyziológie. Umožňuje merať prúdy pretekajúce membránou živých buniek tak, že povrchová bunková membrána zostáva pri elektrickom kontakte s vnútorným prostredím bunky funkčne nepoškodená. Mikroelektródy tiež umožňujú aplikovať do buniek elektrický prúd a farbivá.

Sklenená mikroelektróda predstavuje sklenenú kapiláru naplnenú vhodným elektrolytom, ktorá sa na jednej strane kuželovito zužuje k priemeru rádovo 100 nm. [1] Ako prví publikovali metódu merania membránových napätí sklenenými mikroelektródami G. Ling a R. W. Gerard v roku 1949. [2]

Kapitola sa zaoberá stručným prehľadom spôsobu vytvárania sklenených mikroelektród, ich vlastnosťami a parametrami.

2.1 Výroba mikroelektród

Pri zhotovovaní mikroelektród sa ako materiál používajú sklenené kapiláry z rôznych druhov skla. Stred kapiláry sa zahrieva do teploty tavenia, kedy sa sklo správa plasticky, natiahne sa, prelomí a oddelí. [3] Výsledkom tohto procesu sú dve identické mikroelektródy. Vhodnou kombináciou teploty žhavenia, veľkosti a časového priebehu ťahu je možné dosiahnuť rôzne vlastnosti mikroelektródy, najmä v jej zakončení. [1] Mikroelektróda sa plní vhodným elektrolytom, ktorý sprostredkuje elektrický kontakt s vnútnom bunky. V elektróde je často zanorený tenký drôtik, najčastejšie strieborný s vrstvou chloridu strieborného, ktorý zamedzuje polarizácii. [3]

2.1.1 Výber skla kapilár

Sklo mikroelektród tvorí s bunkovou fosfolipidovou membránou veľmi tesný spoj. To znamená, že medzi nimi dochádza k hydrofóbnej chemickej interakcii. Zloženie skla môže mať vplyv na schopnosť vytvorenia tohoto spojenia. Zložením a vlastnosťami rôznych typov skla sa zaoberá štúdia od autorov Rae a Lewis (1992). [3]

Pri ťahaní skla je potrebné, aby bolo udržiavané čisté a odmastené, čím sa zabraňuje upchatiu hrotu mikroelektródy. Ušpineniu sa predchádza uskladnením mikroelektród do uzatvárateľných nádob. Zašpinené sklo sa pred ťahaním čistí kúpeľom v 95% etanolovom roztoku a následne sa opatrne vysuší v plameni. [2]

Sklenené kapiláry, ktoré sa používajú na výrobu mikroelektrod, sú predávané komerčne. Najčastejšie používaným typom skla, aj na výrobu patch mikroelektrod, je sklo borosilikátové. Ťahanie a polišovanie prebieha za vysokých teplôt, zväčša s využitím platinového drôtu. Možnosti tesnenia pre toto sklo sú hodnotené lepšie ako u mäkkých typov skiel, hoci niekedy je spoj označovaný za málo stabilný. Tenkostenné sklo umožňuje vytvorenie elektródy s nízkym odporom, elektródy vytvorené z hrubého skla lepšie tesnia a majú nižšiu hladinu hluku. [3]

Na prípravu veľmi jemných mikroelektrod sa používa sklo z kremeňa. Vyznačuje sa podstatne neutrálnejším lámaním svetla a lepšími elektrickými vlastnosťami. Je tiež mechanicky silnejšie ako borosilikátové sklo a drahšie. Pri jeho použití je nevyhnutné použiť špeciálne ťahače mikroelektrod s plynovým alebo kyslíkovým plameňom, resp. laserovým ťahačom. Mikroelektrody z kremeňa sa využívajú pri patch clamp v kombinácii s fluorescenčnými technikami. [2]

Sklo „mäkké“, t.j. sklo s nízkym bodom topenia, umožňuje ľahké ťahanie a tvarovanie pri pomerne nízkych teplotách. Vyprodukovaná mikroelektroda má veľký otvor a tupú špičku. Využitie nachádza pri čistení tkanivových plátov alebo nanášaní liečiv. Niektoré sklá obsahujú prímеси olova alebo bária. [3]

Pri využívaní mikroelektrod v experimentoch je potrebné zvážiť chemickú reaktivitu skla. Z pokusov, ktoré sa zaoberali touto tematikou vyplýva, že:

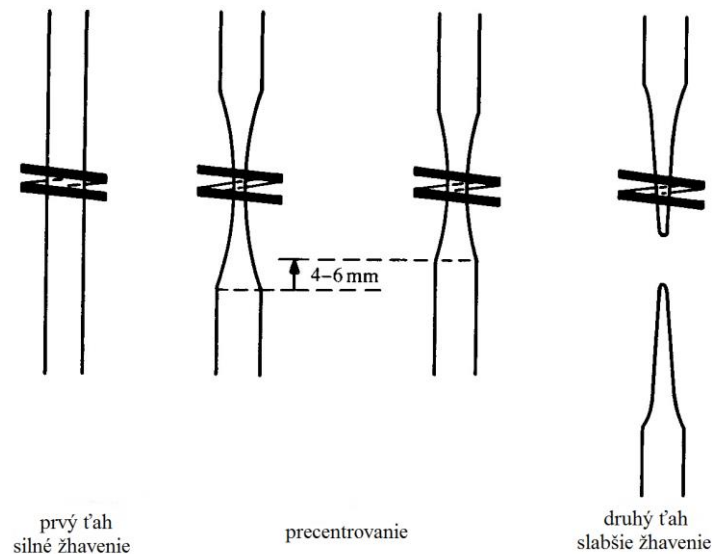
- žiadny typ skla nemôže byť považovaný za fyziologicky inertný,
- každý typ skla musí byť testovaný na rušivé účinky,
- prítomnosť alebo neprítomnosť fyziologických účinkov závisí od geometrie elektródy a môže mať na ňu vplyv ťahanie a polišovanie,
- fyziologické účinky je potrebné predpokladať a brať do úvahy. [4]

2.1.2 Rozdelenie kapiláry

Technicky najjednoduchším spôsobom rozdelenia kapilár je ručné ťahanie kapilár ohrievaných nad Bunsenovým kahanom. Tento spôsob však nie je v praxi odporúčaný, nakoľko nie je reprodukovateľný. [3]

V laboratóriách sa k príprave mikroelektrod používajú špeciálne prístroje – ťahače. Ich základnou črtou je, že rozdeľujú uniformnú sklenenú trubičku, k čomu využívajú žhaviaci prvok, ktorý zahrieva jej malú časť. Sklenená kapilára s vonkajším priemerom približne 1 mm sa upevní do držiakov ťahača a zahrieva sa. Keď je teplota skla dostatočne vysoká, jeho viskozita klesá a sklenená kapilára sa rozkladá. Nasleduje

mierne pretiahnutie, kedy sa zvýši ťah, trubička sa stane tenšou a pretrhne sa, ako vidíme na obrázku (Obr. 2.1-1). [3]



Obr. 2.1-1 Dvojstupňové ťahanie kapiláry pri zhotovení patch mikroelektrody [3].

Ťahače sa navrhujú s využitím ťažnej sily rôzneho pôvodu, prípadne s rôznym počtom ťahov použitých k rozdeleniu kapilár. V niektorých prípadoch prebieha ťahanie v dvoch a viac stupňoch, čím sa sleduje dosiahnutie malého polomeru otvoru špičky. Najnovšie ťahače poskytujú mnohé programy pre plne automatizované ťahanie mikroelektrod podľa požiadaviek zadaných užívateľom. [5]

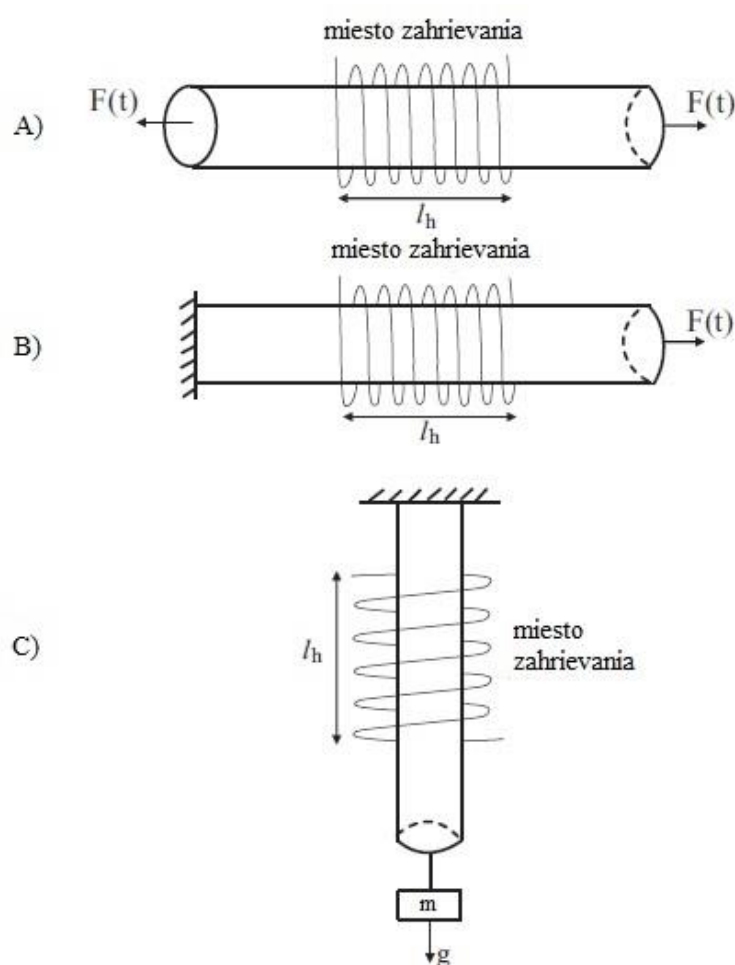
Ťahače rozdeľujeme podľa:

- veľkosti a tvaru vykurovacieho telesa,
- počtu pohybujúcich sa svoriek, ktoré držia kapiláru (jedna, obidve),
- typu sily použitej k natiahnutiu kapiláry (gravitačná, magnetická),
- počtu ťahov vedúcich k pretrhnutiu kapiláry,
- pomocných metód chladenia. [6]

Pri pohybe jednej svorky sa vyrobia vždy dve neidentické mikroelektrody, z ktorých jedna sa často musí zlikvidovať. Ak je umožnené, aby sa hýbali obidve svorky, vzniknuté elektrody sú identické. [2]

Podľa smeru sily pôsobiacej na kapiláru rozlišujeme rôzne typy vertikálnych a horizontálnych ťahačov. Na obrázku (Obr. 2.1-2) sú zobrazené tri typy ťahačov rozdelené práve podľa smeru sily pôsobiacej na kapiláru a tiež podľa počtu pohybujúcich sa svoriek.

Vertikálny ťahač zvyčajne pozostáva z dvoch nichrómových vlákien a dvoch ťahačov, gravitačného a elektromagnetického. Nevýhodou ťahača je, že nedokáže vytvárať mikroelektrody s tak jemnými špičkami, aké sú potrebné k meraniam na rozmerovo malých bunkách. Horizontálny ťahač typu Livingstone je poháňaný ozubeným prevodom a žhviaci prvok je tvorený platinovou fóliou. Produkuje ale pomerne dlhé rozstrapkané stopky. Horizontálne ťahače typu Brown-Flaming, Ensor, Industrial Science využívajú zvyčajne platinové alebo nichrómové žhviacie prvky s rozmedzím časových predhrievaní a jedným alebo dvoma ťahmi. Rozstrapkania špičiek elektród sú krátke a môže byť dosiahnutá dobrá reprodukovateľnosť. Správne nastavenie takýchto ťahačov však môže byť náročné. [3]



Obr. 2.1-2 Tri typy ťahačov. A) horizontálny ťahač s pohybujúcimi sa oboma koncami s rovnakou silou, B) horizontálny ťahač s pohybujúcim sa jedným koncom a naň pôsobiacou silou, C) vertikálny ťahač s využitím gravitačnej sily [5].

Ťahanie kapilár je založené na metóde pokus-omyl. Aby bol proces vytvárania jednoduchší, je v súčasnosti vytvorených mnoho modelov, ktoré sa snažia zohľadniť

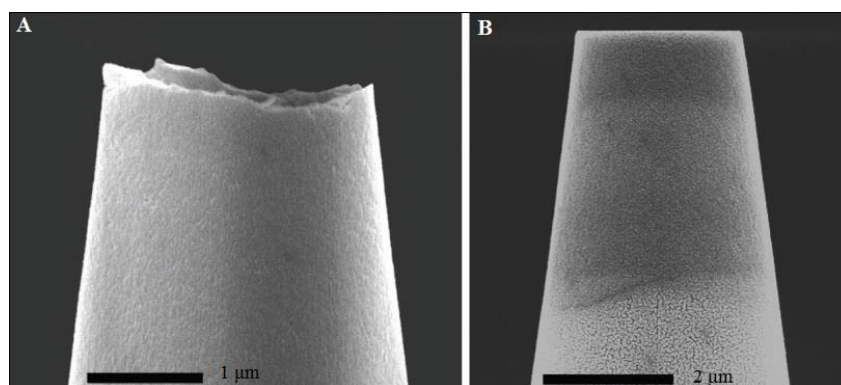
závislosť parametrov kapiláry a pomôcť tak pri nastavení ťahačov podľa parametrov požadovanej mikroelektrody. Získané hodnoty predstavujú aproximácie. [6]

2.1.3 Polišovanie mikroelektrod

Polišovanie predstavuje metódu, ktorá umožňuje zaoblenie a vyhladenie špičky vytvorenej mikroelektrody. Jemná špička je výhodná z hľadiska zníženia možnosti kontaminácie hrotu a poškodenia jemných biologických vzoriek. Polišované mikroelektrody vytvárajú lepšie spojenia medzi špičkou mikroelektrody a skúmaným biologickým materiálom. Dochádza k formácii membránových proteínov okolo skla, čím sa membrána dostáva bližšie ku sklu a vytvára tesnejšie spojenie. [7] Mikroelektrody bez úpravy polišovaním sú drsnejšie a membrána nedokáže vyplniť všetky ich škáry. To znamená, že zvyšujú hluk a znižujú odpor tesnenia. [9]

Pri polišovaní zahrievaním sa špička zahrieva, kým steny neexpandujú do požadovaného tvaru, kedy sa zahrievanie ukončí a elektróda sa nechá vychladnúť. Dochádza k taveniu skla, čo musí prebiehať s veľmi dobrým načasovaním a umiernením, aby sa zabránilo prehriatiu konca špičky, ktoré vedie k jeho uzavretiu alebo nepravidelnosti tvaru. Zahrievanie má tiež vplyv na otupenie špičky, mení sa jej tvar a ostrosť. [7] Polišovanie zahrievaním sa môže vykonávať v niektorých sťahovákoch alebo oddelene v komerčne dostupných zariadeniach. [2]

Polišovanie metódou fokusácie iónového zväzku poskytuje v porovnaní s predchádzajúcou metódou oveľa hladší povrch špičky a tým umožňuje dosiahnutie zlepšeného spojenia. [10] Umožňuje prácu na úplnom konci mikroelektrody, poslednom mikróne. Polišovanie nemení tvar a ostrosť mikroelektrody a proces je považovaný za viac kontrolovateľný. [7] Špičku mikroelektrody upravenú polišovaním fokusáciou iónového zväzku zobrazuje obrázok (Obr. 2.1-3).



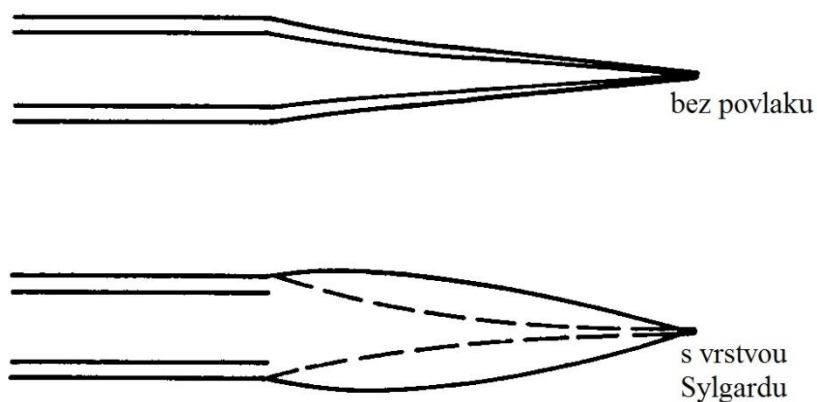
Obr. 2.1-3 Špička sklenenej mikroelektrody A – pred polišovaním, B – polišovaná metódou fokusácie iónového zväzku [7].

Technika tlakového polišovania predstavuje pretvarovanie mikroelektrody počas polišovania zahrievaním. Vykonáva sa na bežnom zariadení microforge, vybavenom kvalitným objektívom, ktorý umožňuje sledovať zmeny tvaru počas procesu. Tlakové polišovanie funguje prakticky s mikroelektrodami vyrobenými z akéhokoľvek typu skla a je využívané pri záznamoch z malých buniek. [7]

Na základe skúseností niektorých pracovníkov, ktorí sa zaoberajú metódou patch clamp, existujú pozorovania, pri ktorých je výhodnejšie použiť nepolišovanú alebo iba veľmi málo polišovanú mikroelektrodu. Príkladom je patchovanie v mozgových rezoch. Polišovanie zahrievaním sa neodporúča pravdepodobne z dôvodu, že úprava spôsobuje otupenie špičky, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť kontaminácie materiálu pri prechádzaní tkanivom v porovnaní s ostrejšími mikroelektrodami. [2]

2.1.4 Poťahovanie mikroelektrod

Pre zlepšenie vlastností sa povrch mikroelektrod poťahuje rôznymi látkami. Pre zredukovanie parazitickej vlastnosti – kapacitancie sa špičky mikroelektrod, ktoré sa používajú pri metódach patch clampu, poťahujú najčastejšie vrstvou Sylgardu. [3] Táto povrchová úprava vedie k redukcii šumu pozadia a kapacitných prúdov, ktoré zakrývajú nahrávaný signál. Sylgard predstavuje dvojzložkovú zmes živice a katalyzátora, ktoré sú zmiešané, ponechané pri izbovej teplote 2 – 3 hodiny a neskôr uskladnené v injekčnej striekačke v chlade (-18 °C) aj niekoľko mesiacov. Na špičku rotujúcej mikroelektrody je látka nanášaná pod mikroskopom, so snahou vyhnúť sa potiahnutiu otvoru špičky. Vo väčšine prípadov býva potiahnutých 5 – 7 mm skla. Po aplikácii môže byť špička so Sylgardom umiestnená napr. do prúdu horúceho vzduchu alebo zohriata, aby došlo k úplnej solidifikácii. [12] Na obrázku (Obr. 2.1-4) môžeme vidieť znázornenú patch mikroelektrodu pred a po nanosení vrstvy Sylgardu.



Obr. 2.1-4 Mikroelektroda pred a po nanosení vrstvy Sylgardu [3].

Patch clamp nahrávanie je možné spojiť s mikromanipuláciou pod online vizuálnou kontrolou. Pri sledovaní vlastností fluorescenčne označených neurónov v neurónovej sieti je potiahnutím špičiek mikroelektrod vhodnými fluorescenčnými farbivami umožnené jednoduchšie zacielenie požadovaného neurónu. Mikroelektrody a neuróny sú súčasne zobrazené pri rovnakej vlnovej dĺžke a nevznikajú chromatické aberácie alebo mechanické komplikácie v optike. Zároveň nie sú známe žiadne vplyvy vhodne zvolených fluorofórov na elektrické vlastnosti mikroelektrod alebo neurónov. [11]

2.1.5 Plnenie mikroelektrod soľným roztokom

Sklenené mikroelektrody sú najčastejšie plnené soľným roztokom. Zloženie tohto roztoku je určené samotným experimentátorom pre konkrétny protokol experimentu. V súčasnosti sa dáva prednosť plneniu mikroelektrod, ktoré sa ťahajú z kapilár obsahujúcich vlákno, než bez vlákna. [3] Plnenie mikroelektrod sa uskutočňuje pomocou injekčnej striekačky a dlhej ihly, čo najbližšie k špičke. Striekačky by mali obsahovať filter k predídeniu upchatia špičky nečistotami. Plniace ihly sú tenké a dlhé. Pri použití kovových ihliel môže dôjsť k ich rozpusteniu v roztoku a následnému poškodeniu skla mikroelektrody. Komerčne dostupné sú preto nekovové, ohybné plniace ihly. [2]

Mikroelektrody s vláknom môžu byť naplnené menším množstvom roztoku. Bublíny, ktoré pri plnení vzniknú, sú lokalizované po stranách vlákna a neuzavrú vnútro mikroelektrody úplne. [3] Vlákno tiež pomáha naplneniu zvýšením vzlínavosti, čo umožní naplniť špičku a minimalizuje riziko vzniku bublín. Existujú odporúčania nepreferovať mikroelektrody s vláknom pri niektorých metódach, napr. pri perforovanom patch clamp, z dôvodu plnenia špičky a zvyšku mikroelektrody rozdielnym typom roztoku. Je tu zvýšené riziko narušenia separácie vláknom. [2]

Sklenené mikroelektrody bez vlákna plnené dvoma typmi roztokov by mali byť plnené v dvoch krokoch. Prvým je naplnenie špičky. Tá sa ponorí do kadičky obsahujúcej roztok a následne sa do jej opačnej časti aplikuje negatívny tlak. S ohľadom na priemer špičky sa mikroelektroda plní niekoľko sekúnd až dve minúty. Pretlak sa uvoľní a špička sa vyberie z roztoku. Nasleduje ďalší krok – štandardné naplnenie mikroelektrody s použitím injekčnej striekačky, ktoré by nemalo presahovať 5 – 10 mm. Väčšie naplnenie môže zvýšiť kapacitanciu a elektrický šum. Vzduchové bubliny vzniknuté v špičke po naplnení je možné odstrániť jemným poklepaním po skúmavke. [12]

Pri metóde patch clamp roztoky používané na plnenie mikroelektrod zvyčajne napodobňujú iónové zloženie fyziologických tekutín, ktoré odhaľuje plazmatická

membrána. Extracelulárny roztok, ktorý sa používa ako kúpeľný roztok, pozostáva prevažne z chloridu sodného. Intracelulárny roztok využívaný pri whole-cell a outside-out patch clamp obsahuje najmä draslík. Typické zloženie uvedených roztokov zobrazuje tabuľka (Tab. 2.1-1). [2]

Tab. 2.1-1 Príklad niektorých zložiek typického extracelulárneho (EC) a intracelulárneho (IC) roztoku pri patch clamp na bunkách cicavcov.

Zložka	EC koncentrácia [mM]	IC koncentrácia [mM]
Na ⁺	126	5
K ⁺	6	147
Mg ²⁺	2,5	1,2
Ca ²⁺	1,2	0
Cl ⁻	125	150

Okrem iónového zloženia roztoku má vplyv na vytvorenie dobrého tesnenia pri patch clamping aj pH a osmolarita. U extracelulárneho roztoku sú tieto parametre rovnaké ako v prostredí, z ktorého preparáty pochádzajú. pH je udržiavané pomocou pufru, najčastejšie uhličitanového, ktorý sa zakladá na rovnováhe medzi CO₂ a HCO₃ a považuje sa za najviac fyziologický pre preparáty stavovcov. U ostatných pufov (fosfátový, HEPES) boli napriek ich širokému využitiu hlásené vedľajšie účinky v niektorých prípadoch použitia. U väčšiny stavovcov je fyziologické extracelulárne pH približne 7,4, intracelulárne je trochu kyslejšie. Rozdiel osmolarity medzi prostrediami na stranách bunkovej membrány určuje objem bunky a osmotickú silu na membráne. Pri veľkom rozdieli bunka umiera. V prípade malého rozdielu, kedy je intracelulárna osmolarita o niečo väčšia ako extracelulárna osmolarita bunky s vráskavými membránami, bunka mierne napučí a tak môže byť vhodnejšia pre patch clamp. [2]

2.2 Dôležité parametre mikroelektród

K parametrom mikroelektród, ktoré sú experimentálne relevantné a môžu byť merateľné, patria dĺžka a priemer hrotu, odpor a kapacitancia mikroelektródy.

2.2.1 Dĺžka a priemer hrotu

Dĺžka hrotu určuje fyzickú silu elektródy a to, ako ľahko bude prenikať do bunky. Krátky hrot so strmým zúžením neprenikne do bunky tak jednoducho ako mierne sa zužujúci hrot. [6]

Z hľadiska ďalšieho použitia mikroelektrod je dôležitý priemer hrotu. Na vnútrobunkové nahrávanie sa používajú veľmi úzke hroty, ktoré sa získavajú pomocou elektrodových ťahačov s využitím jedného ťahu. Patch clamp techniky zvyčajne vyžadujú väčší priemer hrotu, ktorý vznikne pri viacstupňovom ťahaní kapiláry. [6]

2.2.2 Odpor mikroelektrody

Elektrický odpor je sústredený v najužšej časti konca mikroelektrody. Sú snahy o dosiahnutie jeho najnižšej hodnoty pri zachovaní malého polomeru otvoru. U patch mikroelektrod sa využíva skrátenie úzkej časti mikroelektrody pomocou viacstupňového ťahania. [2]

Experimentmi bolo zistené, že po prieniku mikroelektrody do bunky sa odpor mikroelektrody mení. Tento jav je spôsobený tým, že odpor vnútorného prostredia bunky je asi dvakrát väčší ako odpor vonkajšieho média. Odpor mikroelektrody je teda funkciou odporu média okolo jej špičky. [13]

Vysoký odpor mikroelektrody nemusí byť problémom z dôvodu, že membránový potenciál bunky je v obvode vedený cez odpor pipety a vstup zosilovača. Podľa Kirchhoffovho zákona napätia platí, že najväčší pokles napätia v sériovom obvode vznikne pre najvyšší odpor. V prípade, že vstupný odpor zosilovača bude vysoký v porovnaní s odporom elektródy, bude možné sledovať väčšinu membránových potenciálov z bunky. [2]

2.2.3 Kapacitancia mikroelektrody

Medzi parazitickú vlastnosť mikroelektrod patrí pri odpore mikroelektrody i kapacitancia. Vzniká v dôsledku toho, že sklo elektródy vytvára izolátor medzi kúpeľovým roztokom a roztokom v elektróde. To znamená, že vytvárajú kondenzátor, ktorý oneskoruje zmeny potenciálu. Tak môže dôjsť k skresleniu rýchlych zmien membránového potenciálu. [2]

Ako kompenzačné systémy kapacitancie sa dajú nastaviť mnohé zosilovače, ktoré ju dokážu potlačiť. Nadmerná náhrada ale môže spôsobiť precitlivenosť na potencionálne zmeny a obvod ľahko osciluje. [2]

Pipety používané pre patch clamp metódu zvyčajne majú, kvôli zredukovaniu kapacitancie, steny potiahnuté vrstvou hydrofóbneho priesvitného elastoméru živice (vrstva Sylgard). Táto vrstva zahusťuje stenu pipety a znižuje tým plochu steny pipety, čím bráni kúpeľnému roztoku zmáčať ju. Vrstva by mala pokrývať elektródu od začiatku zúženia takmer po koniec špičky, najlepšie bližšie než 250 μm . Alternatívou k vrstve Sylgardu môže byť ponorenie pipety pred naplnením elektrolytom do roztavenej zmesi vosku v minerálnom oleji pri protitlaku, alebo ponorenie do silikónu, napr. Sigmacote, po naplnení elektrolytom. [3]

3 FLUORESCENCIA

Trendom súčasnosti je čoraz častejšie používanie fluorescenčných metód v biochemickom a biofyzikálnom výskume, klinickej chémii, genetických analýzach, pri monitorovaní prostredia a v ďalších odboroch. V biomedicíne sa fluorescencia používa najmä pri identifikácii a delení buniek v prietokovej cytometrii, zobrazovaní zložiek buniek vo fluorescenčnej mikroskopii a pri analýze obrazu, študovaní zmien konformácií a dynamiky bunkových systémov, aplikovaní v rôznych testoch ako ELISA a ďalšie, kedy sa fluorescenčnými metódami nahrádzajú metódy využívané rádionuklidové žiariče. [14]

Sľubnú metódu, ktorá využíva jav fluorescencie, predstavuje patch clamp nahrávanie využívajúce mikroelektrody označené fluorescenčným farbivom. Metóda umožňuje priamo reagovať na fyziologické vlastnosti neurónu uloženého v neurónovej sieti. [11]

Kapitola popisuje jav fluorescencie, analyzuje fluorofory a problematiku fluorescenčného značenia mikroelektrod pre systém patch clamp.

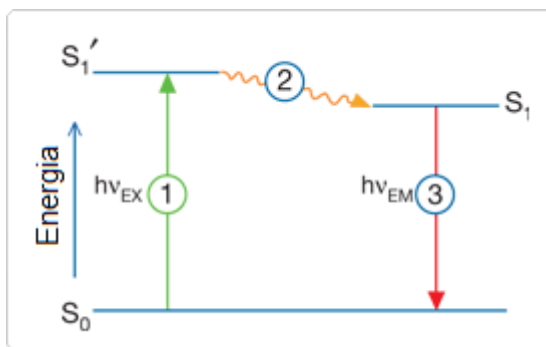
3.1 Jav fluorescencie

Atómy sa môžu nachádzať v základnom energetickom stave, ktorý je charakterizovaný minimálnou hodnotou energie elektrónov, alebo v stave excitovanom, kedy jeden alebo viac elektrónov obsadzuje vyššiu energetickú hladinu. K dosiahnutiu excitovaného stavu musí atóm absorbovať energiu, ktorej veľkosť je prinajmenšom rovná rozdielu medzi základným energetickým stavom a energiou stavu výsledného. Nadbytok energie sa zvyčajne mení na energiu tepla. Energia, ktorá dokáže priviesť atóm do excitovaného stavu, môže mať rôznu fyzikálnu povahu. Atóm, v ktorom došlo k excitácii, sa v danom stave nachádza väčšinou veľmi krátku dobu ($10^{-8} - 10^{-5}$ s). Existujú ale excitované stavy, ktoré sa vyznačujú vyššou pravdepodobnosťou a takéto stavy sa nazývajú metastabilnými. Atómy v metastabilnom stave môžu zotrvať dlhšiu dobu (viac ako 10^{-8} s). Atóm v excitovanom stave sa do svojho základného stavu vráti tak, že niektorý z elektrónov vo vyššej energetickej hladine, prípadne voľný elektrón, obsadí skokom voľný energetický stav. Popísaný jav je podstatou vzniku emisných spektier atómov a molekúl. Elektromagnetické žiarenie, ktoré vzniká pri prechode z metastabilného do

základného stavu, je označované ako jav luminiscencie. Ak metastabilný stav trvá krátko, jedná sa o fluorescenciu, pri dlhšej dobe trvania ide o fosforescenciu. [15]

3.1.1 Jablonského diagram

Proces, ktorý prebieha medzi absorpciou a emisiou svetla, je zvyčajne ilustrovaný pomocou Jablonského diagramu. Tento diagram, používaný v rôznych formách, sa využíva na objasnenie rôznych molekulárnych procesov, ktoré sa môžu vyskytnúť v excitovanom stave atómov. Diagram je pomenovaný po profesorovi Alexandrovi Jablonskom, ktorý je považovaný za otca fluorescenčnej spektroskopie. [16]

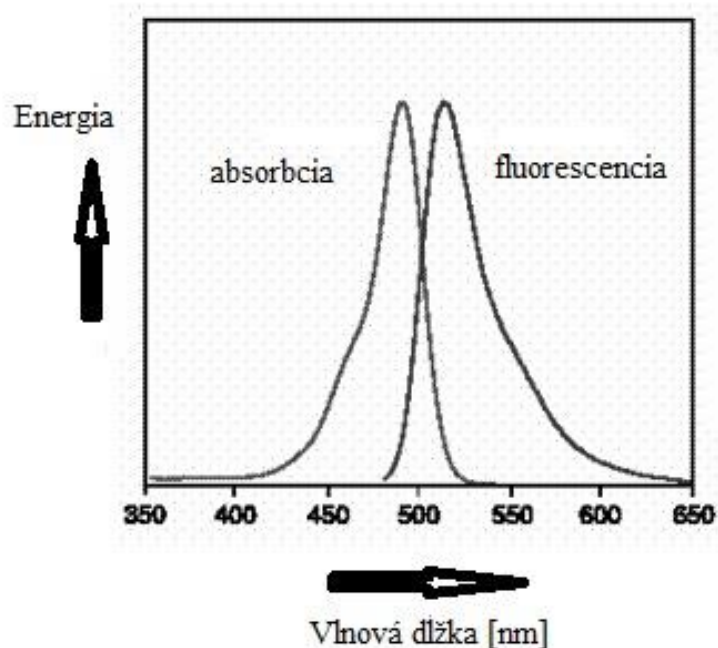


Obr. 3.1-1 Jablonského diagram [17].

Vybraný zjednodušený Jablonského diagram na obrázku (Obr. 3.1-1) zobrazuje tri fázy. V prvej fáze externý zdroj dodáva fotón s určitou energiou – energiou excitačnou. Tento fotón je absorbovaný fluoroforom, ktorý sa tak dostáva do excitovaného stavu S_1' . V druhej fáze je popísaný stav, kedy sa fluorofor počas určitej doby nachádza v excitovanom stave a podlieha konformačným zmenám i mnohým interakciám s molekulárnym prostredím. Takto je energia S_1' čiastočne rozptýlená a vzniká relaxovaný excitovaný stav S_1 , z ktorého pochádza fluorescenčná emisia. Tretia fáza zobrazuje emisnú fluorescenciu. Fotón s energiou – energiou emitačnou je emitovaný a tak sa fluorofor vracia do svojho základného stavu S_0 . V dôsledku straty energie počas stavu excitácie je energia emitovaného fotónu nižšia a fotón má dlhšiu vlnovú dĺžku ako fotón emitovaný. Rozdiel v energii sa nazýva Stokesov posun. [17]

3.1.2 Excitačné a emisné spektrum

Excitačné spektrum je závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke pri konštantnej vlnovej dĺžke emitovaného žiarenia. Emisné spektrum predstavuje závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke pri konštantnej vlnovej dĺžke budiaceho žiarenia. [18] Ukážka excitačného a emisného spektra je zobrazená na obrázku (Obr. 3.1-2).



Obr. 3.1-2 Ukážka excitačného spektra (absorbencie) a emisného spektra (fluorescencie) [18].

3.2 Fluorofory

Látky, ktoré pri excitácii svetlom určitej vlnovej dĺžky emitujú fotóny s inou vlnovou dĺžkou sa nazývajú fluorofory. Používané sú pre ne aj synonymické pojmy fluorochróm, prípadne fluorescenčná farbička. [19]

Pri rozlišovaní fluoroforov podľa pôvodu sa uvádzajú dve základné skupiny:

- vlastné fluorofory – objavujú sa prirodzene,
- nevlastné fluorofory – pridávajú sa ku vzorkám, aby zaistili fluorescenciu na miestach, kde neexistuje, alebo kvôli zmene spektrálnych možností vzorky. [16]

3.2.1 Vlastné fluorofory

Medzi vlastné fluorofory patria proteíny, redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NADH) a nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADPH), oxidované formy flavoproteínu a vitamín A. Hlavné fluorofory v proteínoch sú aromatické aminokyseliny tryptofan, tyrozin a fenylalanín. Poskytujú fluorescenciu v ultrafialovej oblasti, pričom ich absorbný pás leží v oblasti 240 až 300 nm. NADH

silno fluoreskuje a pri väzbe na proteíny sa tento jav obvykle niekoľkonásobne zvýši. Jeho oxidovaná forma NAD⁺ však nefluoreskuje. [14]

3.2.2 Nevlastné fluorofory

Molekuly záujmu často neposkytujú fluorescenciu, alebo ich fluorescencia nie je adekvátne k záujmom experimentu. V týchto prípadoch je fluorescencia získaná označením molekuly fluoroformi. Množstvo používaných fluoroforov rapídne narástlo za posledné desaťročie.

Nevlastné fluorofory môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- látky, ktorých kvantový výťažok fluorescencie, t.j. istá miera účinnosti fluorescencie definovaná ako pomer medzi emitovanými fotónmi a celkovým počtom excitovaných fotónov, sa po ich zavedení do biologického systému nemení – patria sem fluorescenčné farbivá používané v klasickej fluorescenčnej cytochémií,
- látky, ktorých kvantový výťažok fluorescencie závisí na bezprostrednom okolí fluoroforu a silno sa mení pri väzbe na bunkové štruktúry.

Pri použití nevlastných fluoroforov je potrebné zaoberať sa požiadavkou na vytvorenie špecifickej väzby fluoroforu k bunkovým zložkám a na citlivosť emisie fluoroforu na zmeny v okolí. Je dôležité, aby zavedením fluoroforu do bielkovín, nukleových kyselín, membrán a pod. nedošlo k narušeniu ich funkcie.

Podľa väzby k sledovanej biomolekule rozdeľujeme fluorofory na fluorescenčné značky viazané kovalentnou väzbou a fluorescenčné sondy viazané nekovalentne. Fluorescenčné značky sa najčastejšie využívajú pri značení proteínov, kde sa viažu na ich amínové, sulfhydrylové alebo histidínové bočné reťazce, thiolové skupiny atď. [16] Mnoho molekúl záujmu ale nemá špecifický fluorofor, s ktorým by došlo k naviazaniu. Z tohto dôvodu je možné využiť značenie protilátkami, ktoré má viacero výhod:

- možnosť viacnásobného značenia,
- dobré odlíšenie jednotlivých značiek (využitie rôznych excitačných a emisných spektier),
- vysoká špecificita značenia (polyklonálne aj monoklonálne protilátky, výroba protilátok na mieru),
- veľká variabilita použitia. [19]

Pri nekovalentnom naviazaní fluorescenčných sond často dochádza k zmene fluorescenčných vlastností fluoroforu. Je dôležité vhodné zvolenie typu fluorescenčnej sondy, nakoľko práve jej vlastnosti umožňujú získanie informácií o sledovanej vzorke. V praxi sa rozlišuje niekoľko druhov fluorescenčných sond, napr. iónové sondy, sondy pre polaritu prostredia, membránový potenciál, membránové sondy, sondy pre prenos energie alebo pre nukleové kyseliny. [16]

3.2.3 Fotovyblednutie fluoroforov

Po osvetlení fluoroforov svetlom s vysokou intenzitou dochádza k nenávratnej zmene ich štruktúry – fotovyblednutiu. Tento jav je primárnym faktorom, ktorý limituje detekovanie fluorescencie a je spôsobený viacerými reakciami, napr. reakciami medzi susediacimi molekulami farbív. [17]

Najúčinnejším opatrením pred fotovyblednutím je maximalizovanie citlivosti detekcie, čo umožní zníženie intenzity budenia. Zvýšenie citlivosti detekcie je umožnené použitím nízko osvetľovacích zariadení ako sú napr. CCD kamery. Pomôcť tiež môže použitie menej fotolabilných fluoroforov. [17]

3.3 Fluorescenčné značenie patch mikroelektród

Pri pozorovaní fluorescenčne značených vzoriek bez využitia fluorescenčne značených mikroelektród je nevyhnutné prepínať fluorescenčný mikroskop na transmitovaný svetelný mikroskop z dôvodu vizualizácie priehľadných mikroelektród. Toto prepínanie je často zodpovedné za vznik optických aberácií a sťažuje experimentátorovi získanie obrázkov pri rôznych vlnových dĺžkach a režimoch mikroskopu. [11]

V praxi je možné využiť farebné značenie vnútra mikroelektród. Metóda ale spôsobuje maskovanie fluorescenčne značených vzoriek farbou uvoľnenou pri tlaku mikroelektródy. Toto zodpovedá za zmenu vlnovej dĺžky farbiva. Na správne zobrazenie mikroelektródy a vzorky je tak v tomto prípade potrebný komplikovaný optický systém. S veľkou pravdepodobnosťou ale vzniknú chromatické aberácie. [11]

Fluorescenčné značenie povrchu mikroelektród vyžaduje naniesenie fluorescenčného farbiva na špičku mikroelektródy. Pri experimente sa používajú polišované mikroelektródy vyrobené z borosilikátového skla ťahaného horizontálnym ťahačom a naplnené vhodným roztokom. Požiadavkami na fluorofor sú netoxičita a adhezivita. Predpoklady správne zvoleného farbiva spĺňa Alexa Fluór 488 (BSA-Alexa). Naniesenie farbiva je potrebné vykonať bezprostredne pred každým

experimentom krátkym ponorením špičky mikroelektrody do roztoku pri aplikovaní pozitívneho vnútro pipetového tlaku. Touto procedúrou sa mikroelektrody stávajú viditeľnými pod konfokálnym mikroskopom. Značenie zároveň neprináša poškodenie alebo zašpinenie skleneného povrchu, zmeny pri patch clamp nahrávaní, či elektrofyziologické zmeny vzoriek. [11]

4 PROCES POSTUPU

Predpokladom k vyvíjaniu postupu vonkajšieho fluorescenčného značenia sklenených mikroelektrod, používaných pri meraní so systémom patch clamp, je dostupnosť vhodného technického vybavenia a potrebných materiálov. Experiment prebiehal v laboratóriu FEKT VUT v Brne. Návrh postupu zahŕňa vytvorenie sklenenej mikroelektrody s požadovanými parametrami a jej následné značenie vybraným fluorescenčným farbivom. Prehľad jednotlivých krokov poskytuje nasledujúca kapitola.

4.1 Príprava mikroelektrody

Príprava mikroelektrody zahŕňa výber typu a parametrov skla kapiláry, nastavenie ťahača, úpravu vytvorenej mikroelektrody polišovaním a jej naplnenie vhodným roztokom.

4.1.1 Výber skla kapiláry

Laboratórium FEKT VUT poskytuje ťahač mikroelektrod DMZ-Universal Puller. Na tomto ťahači je možné pracovať s dvoma typmi sklenených kapilár, t.j. zo skla borosilikátového a aluminosilikátového. [20]

Pri vytváraní postupu vonkajšieho fluorescenčného farbenia mikroelektrod boli použité štandardné, dobre dostupné kapiláry z borosilikátového skla TW150-3. Sú to tenkostenné kapiláry bez vnútorného vlákna, ktoré sa vyznačujú vynikajúcou pevnosťou. Mikroelektrody vytvorené z takýchto kapilár majú jemné špičky v tvare krátkeho kužela, sú jednotné a reprodukovateľné. Polišovanie nemá vplyv na ich mechanické ani elektrické vlastnosti. Plnenie soľným roztokom by malo prebiehať bezprostredne pred použitím mikroelektrod z dôvodu možného narušenia ich jemných špičiek.

Na overenie vytvoreného postupu farbenia mikroelektrod boli použité aj kapiláry TW120F-3. Oproti predchádzajúcemu typu kapilár obsahujú vlákno, ktoré prilieha k vnútornej stene kapiláry. Toto vlákno urýchľuje plnenie vytvorených mikroelektrod. [21] Porovnanie jednotlivých parametrov kapilár zobrazuje tabuľka (Tab. 4.1-1).

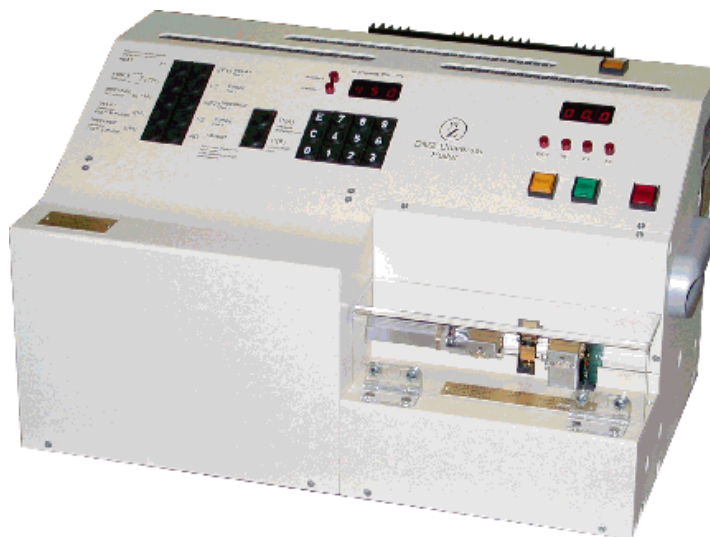
Tab. 4.1-1 Parametre použitých kapilár.

Typ kapiláry	TW150-3	TW120F-3
dĺžka [mm]	76	76
vonkajší priemer [mm]	1,5	1,2
vnútorný priemer [mm]	1,12	0,9

4.1.2 Rozdelenie kapiláry a polišovanie špičiek mikroelektród

Ťahač mikroelektród DMZ-Universal Puller od firmy Zeitz Instruments na obrázku (Obr. 4.1-1), používaný na vytvorenie mikroelektród zo sklenených kapilár, patrí medzi plne automatizované ťahače. Procesorom sú plne riadené nasledujúce premenné:

- pozdĺžna vzdialenosť ťahu,
- sila ťahu – časovo a vzdialenostne riadený program,
- tepelné aplikácie – časovo a vzdialenostne riadené aplikácie,
- výkon kúrenia upravený optickým senzorom,
- automatická fixácia a uvoľnenie sklenených kapilár,
- automatické polišovanie dvoch špičiek. [22]

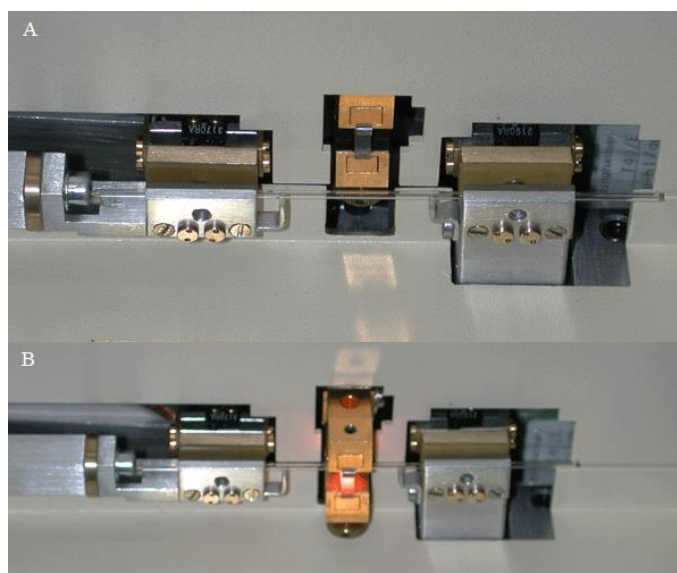


Obr. 4.1-1 DMZ-Universal Puller [20].

Ťahač umožňuje využitie troch ťahov aplikovaných na kapiláru pred tým, ako dôjde k jej pretrhnutiu. Obsahuje 80 uložených programov, pričom všetky premenné môžu byť nezávisle nastavené samotným užívateľom. [22]

Vykurovacie vlákno prístroja v tvare písmena U je vyrobené zo zliatiny KANTHAL[®]. Tento materiál je veľmi odolný a pri nahrievaní skla kapiláry sa zahrieva na vysoké teploty (1000 °C). Pre reprodukovateľnosť vytvárania pipiet je dôležité v prípade potreby vykurovacie vlákno včas vymeniť. [20]

Samotný proces ťahania kapiláry začína vložением sklenenej kapiláry do svoriek ťahača za pomoci pipety. Nasleduje výber programu. Pri experimente je použitý program P(A)50. Tento program je oproti pôvodnému nastaveniu upravený a v laboratóriu bežne používaný pri vytváraní patch mikroelektród. Po spustení programu tlačidlom „ŠTART“ nasleduje automatická fixácia kapiláry. Konce kapiláry sú zovreté presne definovanou silou dvoma mikromotormi, čím sa zabráni zlomeniu tenkostenných kapilár. Samotné ťahanie kapiláry prebieha v troch stupňoch. V každom stupni sa malá časť v strede kapiláry nahreje, ako vidíme na obrázku (Obr. 4.1-2), za čím nasleduje jej mierne potiahnutie a precentrovanie na stred. Pri poslednom potiahnutí sa kapilára rozdelí na dve identické mikroelektródy.



Obr. 4.1-2 Proces ťahania mikroelektródy, A – kapilára v svorkách ťahača, B – nahrievanie kapiláry žhaviacim vláknom [20].

Držiaky skla sa po finálnom ťahu neotvoria. Po rozdelení kapiláry so zvolením programu P(A)50 sa na displeji ťahača automaticky objaví program 650. Po stlačení tlačidla „ŠTART“ sa automaticky spustí proces polišovania prvej zo špičiek mikroelektród. Keď sa proces polišovania skončí, držiak mikroelektródu uvoľní a je potrebné ju pomocou pipety vybrať. Ďalším stlačením tlačidla „ŠTART“ prebehne proces polišovania s druhou špičkou vytvorenej mikroelektródy. Proces prípravy dvoch mikroelektród trvá 20 s. Polišovanie jednej špičky prebehne za 1,3 s.

4.1.3 Plnenie mikroelektrody soľným roztokom

Pri vytváraní postupu fluorescenčného farbenia mikroelektrod je soľný roztok nahradený destilovanou vodou. Táto varianta bola zvolená z toho dôvodu, že soľný roztok využívaný pri patch clamp je náročný na prípravu a cenovo nákladný. Zároveň táto zámena bola možná z dôvodu, že roztok, ktorým je naplnená mikroelektroda, nemá vplyv na farbenie jej vonkajška.

Výsledný postup farbenia je testovaný na mikroelektrodach naplnených soľným roztokom, ktorý sa bežne používa pri patch clamp v laboratóriu FEKT VUT. Iónové zloženie roztoku zobrazuje tabuľka (Tab. 4.1-2). pH roztoku je 7,4, čo zodpovedá hodnote extracelulárneho roztoku.

Tab. 4.1-2 Iónové zloženie soľného roztoku.

Zlúčenina	Molárna hmotnosť [g/mol]	Koncentrácia [mmol]	Množstvo [g/ml]
CsCl	168,40	130	0,5473
Na-ATP	551,14	5	0,0689
TEA-Cl	165,70	10	0,0414
HEPES	238,30	10	0,0596
EGTA	380,35	10	0,0951
MgCl ₂	203,30	5	0,0254

Na plnenie mikroelektrod sa používa striekačka so špeciálnou tenkou nekovovou ihlou. Táto ohybná ihla sa zavedie do mikroelektrody, čo najbližšie ku špičke a stlačením piestu striekačky ju naplní do polovice až troch štvrtín dĺžky.

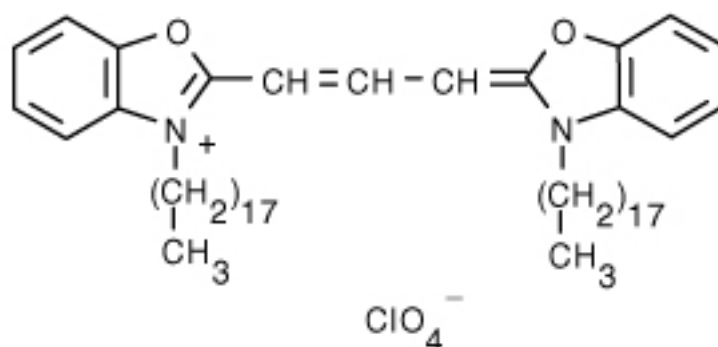
Po plnení mikroelektrod bez vlákna, t.j. vytvorených z kapilár typu TW150-3, zostáva v špičke vzduchová bublina, ktorú je potrebné odstrániť. Vhodným spôsobom je prejdenie po skle anatomickou pinzetou, ktorá má vrúbkované konce čeľustí. Vzniknutá bublina v špičke sa rozkmitá, rozdelí na menšie bubliny a tie vystúpia na hladinu roztoku. V niektorých prípadoch je potrebné prejsť po skle viackrát. Kapiláry typu TW120F-3, ktoré obsahujú vlákno, nezvyknú obsahovať po naplnení roztokom bublinu. V prípade výskytu stačí jemne poklepať po skle.

4.2 Fluorescenčné farbenie mikroelektrody

Potiahnutie špičiek mikroelektrody fluorescenčným farbivom zjednodušuje experimentátorovi zacielenie požadovanej fluorescenčne označenej bunky pri využívaní metódy patch clamp. Aby nedochádzalo k ovplyvneniu elektrických vlastností mikroelektrod alebo k zmenám samotných buniek, je potrebné okrem zvolenia správnych parametrov mikroelektrody zvoliť aj správne farbivo. Následne je experimentálne zvolený postup najvhodnejšieho nanosenia farbiva.

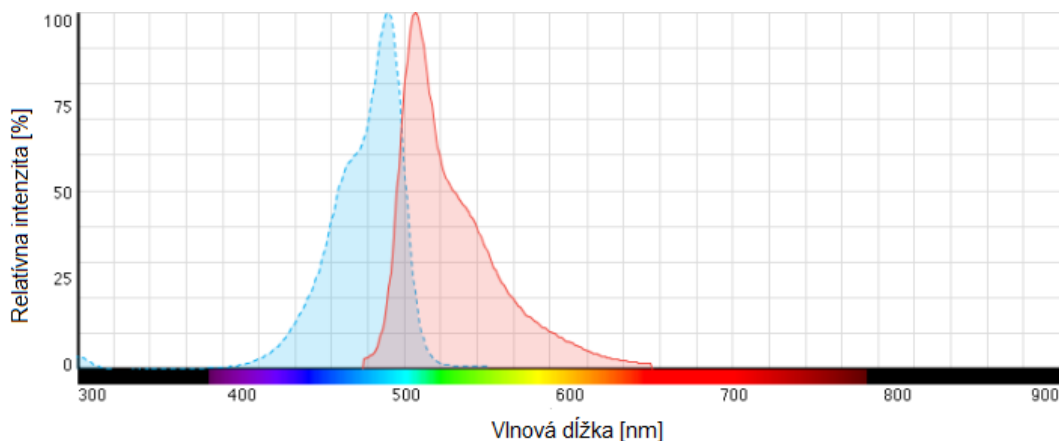
4.2.1 Výber fluorescenčného farbiva

V experimente je testované fluorescenčné farbivo DiO (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate), ktoré sa bežne používa pri farbení buniek v laboratóriu. Vzorec zobrazuje obrázok (Obr. 4.2-1). DiO je označované za farbivo s niekoľkými pozitívnymi vlastnosťami. Fluorescencia je jasná, relatívne odolná proti blednutiu a farbivo sa považuje za fyziologicky neškodné a relatívne netoxické aj pri excitácii svetlom. [23] Je komerčne dostupné u Molecular Probes.



Obr. 4.2-1 Konfiguračný vzorec farbiva DiO [25].

DiO farbivo patrí do tzv. rodiny lipofilných fluorescenčných farbív využívaných na označovanie membrán a hydrofóbných štruktúr, tiež do širokej skupiny karbocyaninových farbív. [24] Membránovo viazané farbivo má fluorescenčné excitačné maximum na vlnovej dĺžke 484 nm a emitačné maximum na vlnovej dĺžke 501 nm, ako zobrazuje obrázok (Obr. 4.2-2). [25] Je excitované modrou farbou a pri pozorovaní cez fluoresceinový filter fluoreskuje farbou zelenou. [26]



Obr. 4.2-2 Excitačné a emisné spektrum farbiva DiO [25].

Farbivo je uložené v centrifugačnej skúmavke s plochým uzatvárateľným viečkom, ktorá sa skladuje v chlade. Nakoľko sa jedná o fluorescenčné farbivo, ktoré je potrebné chrániť pred svetlom, skúmavka je obalená alobalom.

4.2.2 Postup farbenia mikroelektrod

Pred zahájením samotného farbenia mikroelektrod je nutné zabezpečiť, aby sa farbivo pri aplikácii nedostalo do ich špičky. To sa dosiahne aplikovaním pozitívneho vnútropipetového tlaku počas celého plnenia. Pri experimente je mikroelektroda vsunutá do držiaka zo setu pre patch clamp. Z držiaka vedie hadička k injekčnej striekačke bez ihly. Stlačením piestu striekačky a ponechaním ho v danej polohe sa zabezpečí potrebný tlak pre farbenie bez nasávania fluorescenčného farbiva, resp. prenikania farbiva do roztoku v mikroelektrode.

Po nafarbení je potrebné mikroelektrodu vybrať z držiaka a usušiť. Vhodné je uložiť ju na neprašné, vopred pripravené miesto, kde bude fixovaná, aby nedošlo k ulomeniu krehkej špičky. Mikroelektrody sú v laboratóriu zasunuté do penového materiálu s narezanými ryhami a ponechané na tmavom mieste aspoň na 10 minút.

4.2.3 Snímanie mikroelektrod

Nafarbené mikroelektrody sú fixované pomocou lepiacej gumy na podložné sklíčko. Takto pripravené sú pozorované inverzným fluorescenčným mikroskopom IX 71 Olympus. Pri pozorovaní a snímaní mikroelektrod je použitý objektív a okulár so zväčšením 10x, čo znamená, že mikroelektroda je zväčšená 100x. Do mikroskopu bola zaradená fluorescenčná kocka s excitačným a emisným flitrom a dichroickým zrkadlom,

ktorá umožňuje budiť farbivo na vlnových dĺžkach pod 500 nm a snímať emisiu farbiva na vlnových dĺžkach okolo 530 nm.

Snímky sú odfotené pripojeným fotoaparátom Nikon D3100 s odobratým objektívom. Doba expozície je nastavená na čas 10 sekúnd a rozlíšenie snímok je 300x300 dpi. Za túto dobu fotoaparát zachytí viac fluoreskujúceho svetla a tak je sfarbenie snímky jasnejšie, čo je výhodné, nakoľko je hodnotenie snímok subjektívne.

5 SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Cieľom experimentálnej časti práce je navrhnutie postupu vonkajšieho fluorescenčného značenia mikroelektród pre systém patch clamp a otestovanie tohto postupu na vhodne zvolenej sade vzoriek. Na začiatku experimentu boli zvolené tri spôsoby fluorescenčného farbenia. Výber najvhodnejšieho spôsobu prebiehal subjektívne podľa hodnotenia snímok nafarbených mikroelektród. Pri posudzovaní sa zohľadňuje:

- reprodukovateľnosť postupu farbenia,
- jas fluorescencie špičky mikroelektródy,
- počet použiteľných mikroelektród nafarbených daným spôsobom,
- homogenita jasů fluorescenčného farbiva na špičke mikroelektródy.

V práci sú prezentované vybrané snímky nafarbených mikroelektród, ktoré reprezentujú danú skupinu snímok. Počas vytvárania postupu bolo vytvorené veľké množstvo mikroelektród, ktoré boli následne dokumentované. Všetky snímky sa nachádzajú na CD priloženom k bakalárskej práci.

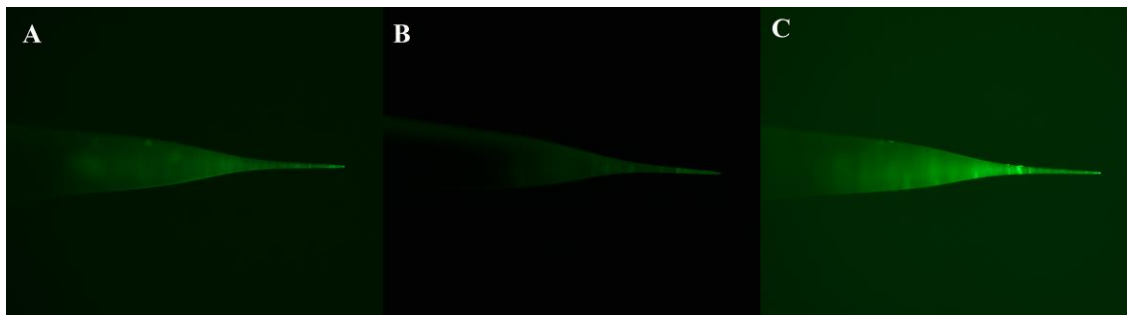
5.1 Výber spôsobu farbenia

Prvý spôsob farbenia spočíva v ponorení špičky mikroelektródy do farbiva na čas 5 minút. Druhý spôsob prebieha ponorením špičky do farbiva na čas 5 sekúnd a následným vytiahnutím špičky na 5 sekúnd, pričom tento proces sa zopakuje 10 ráz. Princípom tretieho spôsobu je aplikovanie farbiva na rozšírenú časť špičky mikroelektródy pomocou pipety. Použije sa toľko farbiva, aby sa na konci špičky vytvorila kvapka, ktorá spadne pod tiažou vlastnej váhy.

Podľa obrázka (Obr. 5.1-1), na ktorom sú zobrazené rôznym spôsobom potiahnuté mikroelektródy, môžeme konštatovať, že najvhodnejším spôsobom farbenia je spôsob 3. Svedčia o tom aj informácie z tabuľky (Tab. 5.1-1), podľa ktorej sú z piatich mikroelektród tri vhodné pre ďalšie použitie. Oproti tomu farbenie spôsobom 2 nevyhovuje kritériam, nakoľko jas fluorescencie je viditeľne nižší ako v ostatných prípadoch. Žiadna mikroelektróda nafarbená týmto spôsobom nie je vhodná pre ďalšie použitie.

Pri využití farbenia spôsobom 1 a 3 sa počet vhodne nafarbených mikroelektród zhoduje. Fluorescencia je jasnejšia pri spôsobe 3, rovnako ako homogenita jasů farbiva

na špičke mikroelektrod zvyšných snímok. Napriek tomu je spôsob 1 vybraný ako vhodnejší na farbenie sklenených mikroelektrod z dôvodu reprodukovateľnosti postupu farbenia. Pri spôsobe 3 nie je možné aplikovať farbivo vždy v rovnakom čase.



Obr. 5.1-1 Snímky vybraných mikroelektrod nafarbených spôsobom A – 1, B – 2, C – 3.

Tab. 5.1-1 Štatistika podľa spôsobu farbenia.

Spôsob farbenia	Počet nafarbených mikroelektrod	Počet použiteľných mikroelektrod
1	5	3
2	5	0
3	5	3

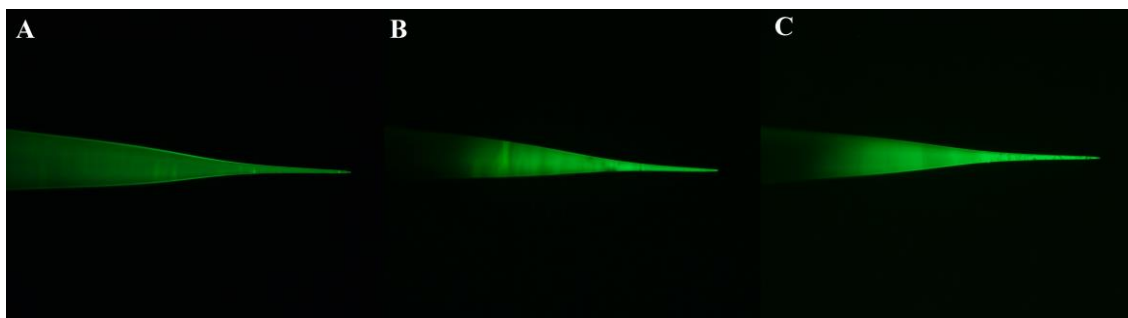
5.2 Výber trvania farbenia

Proces prípravy jednej použiteľnej mikroelektrody, od vloženia sklenenej kapiláry do ťahača, cez plnenie, odstránenie vzniknutých bubliniek, prípravy na farbenie a samotné farbenie, trvá minimálne 8 minút. Žiadny z procesov v príprave mikroelektrody nie je možné eliminovať. Preto, aby sme mohli skrátiť dobu celej prípravy, boli testované kratšie časy farbenia mikroelektrod.

Na obrázku (Obr. 5.2-1) sú zobrazené vybrané mikroelektrody nafarbené v rôznych časových intervaloch. Každým spôsobom je vytvorených 10 mikroelektrod. V tabuľke (Tab. 5.2-1) sú uvedené výsledné počty mikroelektrod, ktoré spĺňajú kritériá hodnotenia.

Podľa obrázka (Obr. 5.2-1) je možné usúdiť, že dobu potrebnú na nafarbenie mikroelektrody nie je vhodné skrátiť bez prejavu na kvalite pripravenej mikroelektrody. Jas fluorescence po minútovom farbení je viditeľne menší pri porovnaní s ďalšími mikroelektrodami. Mikroelektroda s farbením trvajúcim 3 minúty poskytuje jas

zrovnateľný s mikroelektrodou farbenou 5 minút, ale jas fluorescence nie je rozložený homogénne po celej špičke mikroelektrody.



Obr. 5.2-1 Snímky vybraných mikroelektrod nafarbených namočením špičky mikroelektrody do fluorescenčného farbiva na čas A – 1 minúta, B – 3 minúty, C – 5 minút.

Tab. 5.2-1 Štatistika podľa trvania farbenia.

Trvanie farbenia [min]	Počet nafarbených mikroelektrod	Počet použiteľných mikroelektrod
5	10	8
3	10	7
1	10	6

Podľa vyhodnotenia snímok nafarbených mikroelektrod je vhodným postupom na vytvorenie fluorescenčne značených sklenených mikroelektrod pre systém patch clamp postup, kedy sa špička mikroelektrody namočí do fluorescenčného farbiva DiO na čas 5 minút. Aj pri tomto postupe je možné, že niektoré mikroelektrody sú nevyhovujúce. Preto je potrebné nafarbenie vytvorenej mikroelektrody pred ďalším použitím skontrovať pod inverzným fluorescenčným mikroskopom.

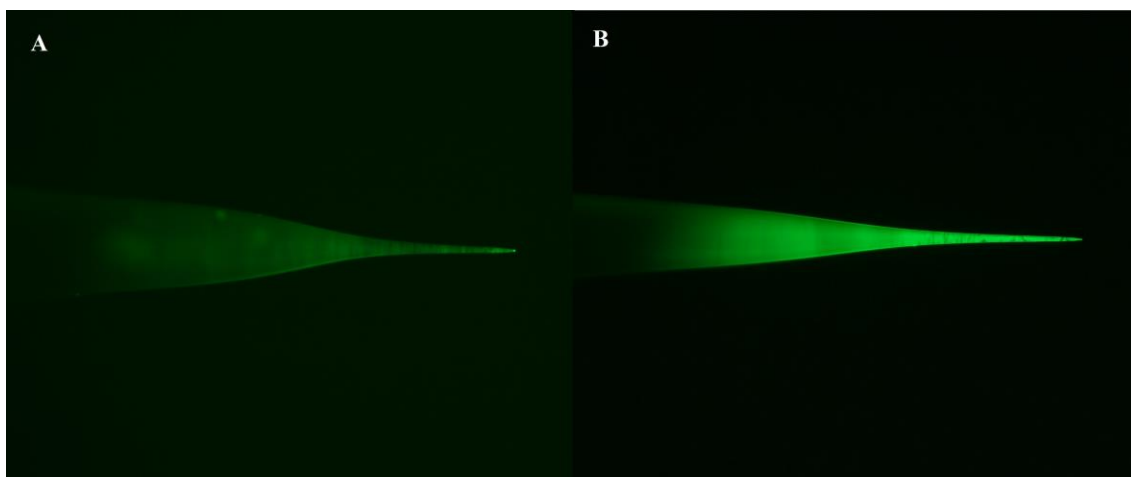
5.3 Vplyv okolností na prípravu mikroelektrody

Porovnaním snímky, kedy sa mikroelektroda farbila 5 minút pri výbere spôsobu farbenia na obrázku (Obr. 5.1-1) a pri výbere trvania farbenia na obrázku (Obr. 5.2-1), je viditeľný rozdiel v jase fluorescence špičky mikroelektrody. Dané mikroelektrody zobrazuje obrázok (Obr. 5.3-1).

Vytváranie oboch mikroelektrod prebiehalo pri rovnakom postupe farbenia, ktorý sa realizoval v laboratóriu FEKT VUT. Napriek tejto skutočnosti došlo pri experimente

k okolnostiam, ktoré zaťažili časť merania chybou. Určiť vhodný spôsob farbenia zo snímkov bolo aj napriek tejto skutočnosti možné.

Pri výbere trvania farbenia časť snímkov nie je zaradená do spracovania výsledkov. Jedná sa o blok snímkov, ktorý sa dokumentoval od ukončenia experimentovania s výberom spôsobu farbenia po experiment, kedy bol jas fluorescencie na snímkach optimálny. Snímky vyradené zo štatistiky sú priložené na CD.



Obr. 5.3-1 Snímky mikroelektrod farbené 5 minút, mikroelektroda A – snímaná na začiatku experimentu, B – snímaná v závere experimentu.

Ďalšie práce v laboratóriu sú zamerané na skúmanie okolností, ktoré môžu ovplyvňovať proces výroby a farbenia mikroelektrody.

5.3.1 Životnosť žhaviaceho vlákna ťahača mikroelektrod

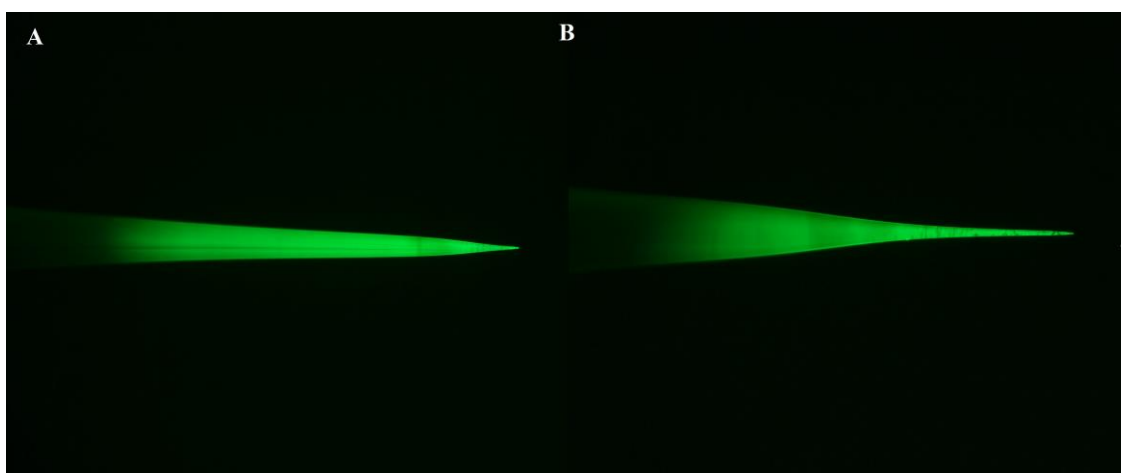
Z dôvodu zachovania reprodukovateľnosti mikroelektrod je dôležité včas vymeniť žhaviace vlákno ťahača. [20] Pri porovnaní snímkov na obrázku (Obr. 5.3-1) je viditeľné, že špička mikroelektrody B je viac predĺžená oproti mikroelektrode A. Tento jav by mohol vzniknúť pri nesprávne zvolenom programe ťahača. V tomto prípade je však pravdepodobne spôsobený používaním opotrebovaného žhaviaceho vlákna, ktoré bolo potrebné v priebehu používania ťahača vymeniť. Mikroelektroda ťahaná pri programe P(A)50 má mať tvar mikroelektrody B.

5.3.2 Použitie rôznych typov mikroelektrod

Pri vytváraní postupu farbenia mikroelektrod sú použité kapiláry z borosilikátového skla TW150-3. Pri jeho overení prebehlo aj nafarbenie mikroelektrod typu TW120F-3. Rozdiely medzi parametrami mikroelektrod popisuje časť práce 4.1.1 (viď str. 26).

Na obrázku (Obr. 5.3-2) vidíme mikroelektrody ťahané z kapiláry s rozdielnymi parametrami farbené spôsobom 1. Podľa snímok je možné usúdiť, že vybraný spôsob farbenia je možné aplikovať na mikroelektrody z borosilikátového skla s rôznymi tvarmi. Jas fluorescencie je vyhovujúci na celej ploche špičky mikroelektrody. Testovanie mikroelektrod z kapilár typu TW150-3 neprebieha ďalej, pretože program P(A)50 a ďalšie overovanie postupu, t.j. meranie odporu mikroelektrody, je overené iba pre mikroelektrody z kapilár typu TW120F-3, ktoré sa v laboratóriu bežne používajú.

Tabuľka (Tab. 5.3-1) informuje o počte vhodne nafarbených mikroelektrod. Tento výsledok dokazuje, že tvar mikroelektrod nemá vplyv na naviazanie farbiva.



Obr. 5.3-2. Snímky mikroelektrod vytvorené z rôznych typov kapilár A – TW120F-3, B – TW150-3, farbené 5 minút.

Tab. 5.3-1 Štatistika podľa zvoleného typu kapiláry.

Typ kapiláry	Počet nafarbených mikroelektrod	Počet použiteľných mikroelektrod
TW150-3	10	8
TW120F-3	10	7

5.3.3 Povrch skla mikroelektrody

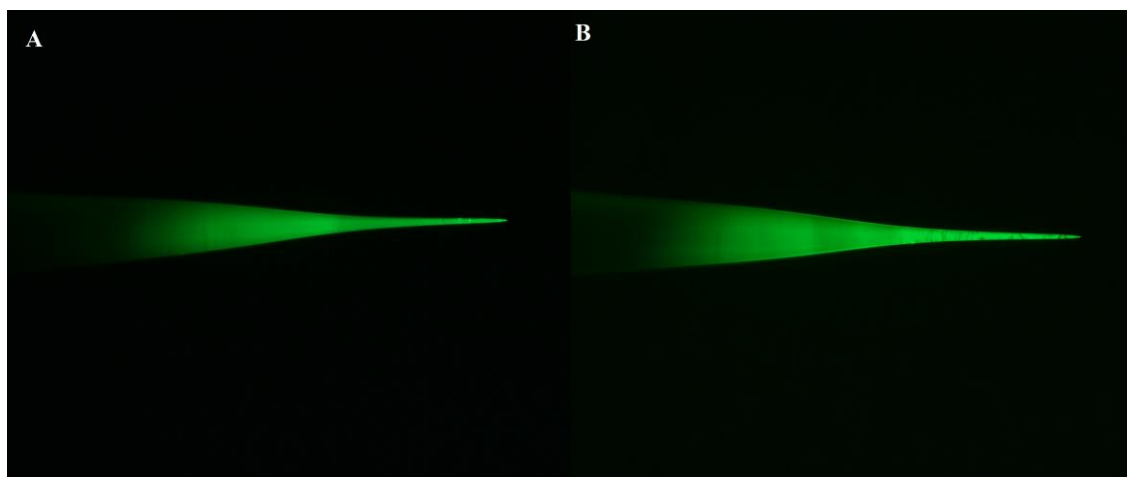
Pri skúmaní chyby, ktorá spôsobila zníženie jasnosti fluorescencie, bola zvažovaná možnosť znečistenia skla mikroelektrod. Z tohto dôvodu boli 4 mikroelektrody pred farbením ponorené na 30 sekúnd do roztoku etanolu, 2 minúty ponechané na vzduchu a až následne nafarbené. Tento proces nemal vplyv na výsledok farbenia.

5.3.4 Viacnásobné používanie farbiva

Pri správnom uskladnení podľa pokynov výrobcu zostáva farbivo DiO stabilné minimálne jeden rok. [24] Pri experimente je uvedené farbivo uskladnené v centrifugačnej skúmavke, ktorá je obalená alobalom a skladovaná na danom mieste v laboratóriu.

Nakoľko časť farbení vykazovala chybu, vzniklo podozrenie na degradovanie farbiva častým používaním. Preto boli dve mikroelektrody namočené do farbiva DiO, ktoré sa nepoužívalo. Snímky mikroelektrod nafarbených novým farbivom sú priložené na CD, nakoľko jas ich fluorescence je veľmi slabý.

Pri opätovnom fungovaní procesu farbenia bolo opäť použité kontrolné, inak nepoužívané farbivo. Na obrázku (Obr. 5.3-3) sú snímky vytvorených mikroelektrod, podľa ktorých viacnásobné používanie farbiva neznehodnotilo dané farbivo a nemalo vplyv na predchádzajúce výsledky. Tabuľka (Tab. 5.3-2) vyhodnocuje počty dobre nafarbených mikroelektrod pri použití kontrolného a pri pokusoch používaného farbiva.



Obr. 5.3-3 Snímky mikroelektrod farbené 5 minút, mikroelektroda farbená A – kontrolným farbivom, B – farbivom bežne používaným počas experimentu.

Tab. 5.3-2 Štatistika podľa výberu farbiva.

Typ farbiva	Počet nafarbených mikroelektrod	Počet použiteľných mikroelektrod
používané	10	8
kontrolné	10	7

5.4 Testovanie navrhnutého spôsobu farbenia

Zvolený postup fluorescenčného farbenia sklenených mikroelektród je potrebné otestovať. Takto sa overí účinnosť a reprodukovateľnosť vytvoreného postupu.

Pri fluorescenčnom farbení mikroelektród farbivom DiO bol ako najvhodnejší vybraný spôsob 1 – namočenie špičky mikroelektródy do farbiva na čas 5 minút. Najlepšie spĺňal vopred stanovené kritéria, t.j. reprodukovateľnosť postupu, počet vytvorených mikroelektród, ktoré môžu byť použité pri meraní so systémom patch clamp, jas fluorescencie špičky a homogenitu jasu na celom jej povrchu. Postup bol následne realizovaný pri vytvorení 37 mikroelektród, z čoho 27 mikroelektród nebolo vhodné zaradiť do štatistiky kvôli neobjasnenej chybe merania. 8 z 10 mikroelektród je vhodné použiť k ďalšiemu testovaniu.

Pred označením mikroelektródy za vhodnú na meranie so systémom patch clamp je potrebné určiť, či nedošlo k zmene jej elektrických vlastností. V laboratóriu sa na toto posúdenie používa meranie odporu mikroelektródy v programe Clampex 10.4 v režime Seal test a konfigurácii Patch. Podľa skúseností experimentátorov z laboratória VUT je správne rozmedzie odporu borosilikátovej mikroelektródy typu TW150-3 2 – 4 M Ω .

Mikroelektródy, u ktorých sa meria odpor, musia byť naplnené soľným roztokom, aby nimi mohol tiecť prúd. Destilovaná voda nie je vodičom prúdu. Soľný roztok je bližšie popísaný v časti práce 4.1.3 (viď str. 29). Kontrolná mikroelektróda mala odpor 3,6 M Ω . Odpor nafarbených mikroelektród spadá do daného rozmedzia a má hodnotu 2,8 M Ω a 2,9 M Ω . Na základe tohto merania je možné konštatovať, že farbenie mikroelektródy fluorescenčným farbivom nemení požadované elektrické vlastnosti mikroelektródy.

6 ZÁVER

Cieľom teoretickej časti práce bolo uvedenie do problematiky vytvárania sklenených mikroelektród a ich fluorescenčného značenia pre systém patch clamp. V práci sú popísané možnosti vytvárania mikroelektród, jav fluorescencie a spôsob fluorescenčného značenia sklenených mikroelektród.

Praktická časť zahŕňa návrh postupu vonkajšieho fluorescenčného značenia sklenených mikroelektród s jeho následným otestovaním a zhodnotením. V práci sú popísané jednotlivé kroky experimentu.

Ako prvé bolo potrebné pripraviť sklenenú mikroelektródu vhodnú pre systém patch clamp. Mikroelektróda bola vytvorená z komerčne dostupnej borosilikátovej kapiláry TW150-3 s využitím ťahača DMZ-Universal Puller. Ťahač umožnil aj polišovanie jej špičky. Na farbenie mikroelektród bolo použité farbivo DiO, ktoré má jasnú fluorescenciu, je relatívne odolné proti blednutiu a považuje sa za fyziologicky neškodné. Farbivo fluoreskuje zelenou farbou. Po výbere farbiva boli navrhnuté tri spôsoby fluorescenčného farbenia mikroelektród a určené podmienky ich pozorovania inverzným fluorescenčným mikroskopom i snímania s využitím fotoaparátu.

Subjektívnym hodnotením snímok fluorescenčne nafarbených mikroelektród bol zvolený postup farbenia – päťminútové ponorenie špičky mikroelektródy do fluorescenčného farbiva. Napriek presnému dodržiavaniu vybraného postupu prípravy mikroelektród a farbenia došlo v experimente k neobjasnenej chybe merania, ktorá spôsobila, že časť snímok mikroelektród nemohla byť zaradená do hodnotenia spôsobu farbenia. Práca preto podáva pohľad na niektoré okolnosti vplyvajúce na postup vytvorenia mikroelektródy.

Testovanie nafarbených mikroelektród dokázalo, že zvolené farbivo a spôsob jeho naniesenia nemajú vplyv na elektrické vlastnosti mikroelektródy. Poukázalo ale tiež na to, že metóda nie je stopercentná a preto je potrebné jas fluorescencie mikroelektródy pred použitím so systémom patch clamp skontrolovať s využitím inverzného fluorescenčného mikroskopu.

Pri rozšírení práce by bolo vhodné zaoberať sa ďalším testovaním fluorescenčne označených mikroelektród. Zaujímavé by bolo nafarbenie mikroelektród ďalšími farbivami bežne používanými v praxi pri farbení buniek, testovanie vplyvu nafarbenej mikroelektródy na vlastnosti bunky a uskutočnenie patch clampu s využitím nafarbenej mikroelektródy.

Pre metódu je vhodné predpokladať praktické využitie v odboroch, kde je potrebné priamo reagovať na fyziologické vlastnosti buniek. Sklenené mikroelektrody využité pri systéme patch clamp, pri ktorých značení sa využíva jav fluorescencie, totiž umožňujú jednoduchšie zacielenie bunky záujmu.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ŠIMURDA, J. *Bioelektrické jevy*. Elektronické skriptum. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií VUT v Brně. 2007. p. 1 - 72.
- [2] MOLLEMAN, A. *Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology*. New York: J. Wiley, 2003. ISBN 04-714-8685-X.
- [3] STANDEN, N.B., etc.: *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*. 2nd Edition. Edited by Ogden, D.C. Company of Biologists, Cambridge, UK, 1994. Dostupné na URL: <http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/me.html>
- [4] FURMAN, R.E., J.C. TANAKA, A. BHARGAVA a J. GORELIK. Patch electrode glass composition affects ion channel currents. *Biophysical Journal* [online]. 1988, roč. 53, č. 2, s. 189-197 [cit. 2014-01-04]. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-351-0_14. Dostupné na URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349588830911>
- [5] HUANG, H., J. J. WYLIE, R. M. MIURA a Peter D. HOWELL. On the Formation of Glass Microelectrodes. *SIAM Journal on Applied Mathematics* [online]. 2007, roč. 67, č. 3, s. 630-666 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1137/050640722. Dostupné na URL: <http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/050640722>
- [6] PUILL, E., H. HUANG, R. M. MIURA a W. P. IRELAND. Heat-Induced Stretching of a Glass Tube Under Tension: Application to Glass Microelectrodes. *SIAM Journal on Applied Mathematics* [online]. 2003, roč. 63, č. 5, s. 1499-1519 [cit. 2013-12-15]. ISSN 0036-1399. DOI: 10.1137/S0036139901393469. Dostupné na URL: <http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/S0036139901393469>
- [7] GOODMAN, M. B. a S. R. LOCKERY. Pressure polishing: a method for re-shaping patch pipettes during fire polishing. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2000, roč. 100, č. 1-2, s. 13-15 [cit. 2014-01-01]. DOI: 10.1016/S0165-0270(00)00224-7. Dostupné na URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349588830911>
- [8] MALBOUBI, M., Y. GU a K. JIANG. Surface properties of glass micropipettes and their effect on biological studies. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2011, roč. 6, č. 1, s. 401-411 [cit. 2014-01-01]. DOI: 10.1186/1556-276X-6-401. Dostupné na URL: <http://link.springer.com/article/10.1186%2F1556-276X-6-401>
- [9] MALBOUBI, M., Y. GU a K. JIANG. Experimental and simulation study of the effect of pipette roughness on giga-seal formation in patch clamping. *Microelectronic Engineering* [online]. 2010, roč. 87, č. 5-8, s. 778-781 [cit. 2014-01-02]. DOI: 10.1016/j.mee.2009.11.115. Dostupné na URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167931709007795>

- [10] AO, S. a L. GELMAN. *Electronic engineering and computing technology*. Dordrecht: Springer, 2010. ISBN 9789048187768.
- [11] ISHIKAWA, D., N. TAKAHASHI, T. SASAKI, A. USAMI, N. MATSUKI a Y. IKEGAYA. Fluorescent pipettes for optically targeted patch-clamp recordings. *Neural Networks*, [online]. 2010, roč. 23, č. 6, s. 669-672. [cit. 2013-12-15] DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neunet.2010.02.004>. Dostupné na URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223634>.
- [12] WINDHORST, U. a H. JOHANSSON. *Modern techniques in neuroscience research*. New York: Springer, 1999, 1325 p. ISBN 35-406-4460-1.
- [13] SCHANNE, O.F., M. LAVALLEE, R. LAPRADE a S. GAGNE. Electrical properties of glass microelectrodes: Application to Glass Microelectrodes. *Proceedings of the IEEE*. [online] 1968, roč. 56, č 6, s. 1072-1082. [2013-12-15] DOI: 10.1109/PROC.1968.6459. Dostupné na URL: <http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/S0036139901393469>
- [14] FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů. *Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze* [online] [cit. 2014-01-04] ISSN 1803-6619. Dostupné na URL: <http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskopie-v-neurovedach>
- [15] HRAZDIRA, I. a V. MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s. ISBN 80-902-8961-4.
- [16] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [17] *The Molecular Probes® Handbook: Fluorescence Fundamentals* [online]. Invitrogen. [cit. 2014-1-4]. Dostupné na URL: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>
- [18] KOLÁŘ, R. *Lékařská diagnostická technika*. Brno, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno. 2007. s. 1 - 92.
- [19] LACINOVÁ, Ľ. *Elektrofyzilogické metódy monitorovania iónových kanálov*. Kurz: Elektrofyzilogické metódy monitorovania iónových kanálov. Ed. Ľubica Lacinová. Vydal Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV 2008. 2008ISBN 978-80-970028-5-5.
- [20] Zeitz-inst.homepage.t-online. *Zeitz DMZ - Puller* [online]. 2008 [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: <http://www.zeitz-inst.homepage.t-online.de/TechSpecpuller/techspecpuller.html>
- [21] Wpiinc. *WPI Laboratory Equipment* [online]. [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: http://www.wpiinc.com/index.php?submenu=labglasscapthinwall&class0_0=&class1_0=&class2_0=374&class3_0=&class4_0=&submit=Filter&xsearch_id=products_type_search&src=directory&srctype=&view=products&submenu=labglasscapthinwall&hurl=n

- [22] Dagan. *Microelectrode Puller* [online]. [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: <http://www.dagan.com/puller.htm>
- [23] Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *The Journal Of Cell Biology* [online]. 1986, roč. 103, č. 1, s. 171-87 [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/detail?vid=10&sid=972047be-e70b-491a-b648-fbd6d6efd4ad%40sessionmgr4005&hid=4101&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT11aG9zdC1saXZl#db=cmedm&AN=2424918>
- [24] *DiO'*; *DiOC₁₈(3)* (*3,3'-Diocadecyloxacarboxyanine Perchloate*) [online]. Invitrogen. [cit. 2014-5-27]. Dostupné na URL: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D275?ICID=search-d275>
- [25] Aatbio. *DiD labeling solution [1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine] *5 mM DMSO solution** [online]. 2006 [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=22033>
- [26] Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends In Neurosciences* [online]. 1989, roč. 12, č. 9, s. 333-5, 340-1 [cit. 2014-05-27]. Dostupné na URL: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/detail?vid=6&sid=972047be-e70b-491a-b648-fbd6d6efd4ad%40sessionmgr4005&hid=4101&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT11aG9zdC1saXZl#db=cmedm&AN=2480673>