

## Praktikum z molekulární biologie eukaryot (Bi7312)

Cílem tohoto cvičení je seznámit studenty se základními technikami manipulace se živočišnými a lidskými buňkami *in vitro*. Studenti si mohou v těchto cvičeních zvolit jeden ze 4 tématických okruhů, jehož konkrétní úlohy následně vypracovávají. V rámci okruhu 1 studenti analyzují hladinu vybraného proteinu v buňkách monocytární řady westernovým přenosem, jeho lokalizaci a strukturní uspořádání následně metodou nepřímé fluorescence na fixovaných buňkách.

Úlohy celého druhého tématického seznámují studenty s metodami analýzy funkčních změn buněk v průběhu makrofágové diferenciaci (test fagocytické aktivity, test aktivity kyselých fosfatáz a analýza produkce superoxidových radikálů testem NBT).

Třetí tématický okruh je zaměřen především na morfologické změny během diferenciaci a apoptózy lidských leukemických buněčných linií (cytocentrifugace, test metabolické aktivity, barvení jader propidium iodidem).

V posledním okruhu se studenti seznámují s různými metodami transfekce eukaryotických buněk (elektroporace, precipitace fosforečnanem vápenatým, lipofekce), hodnotí účinnost transfekce a stanovují aktivitu vybraného transkripčního faktoru.

Tématické okruhy:

1. Proteiny: exprese a aktivita
2. Analýza funkčních změn provázejících diferenciaci buněk myelomonocytární řady
3. Diferenciaci a apoptóza hematopoetických buněk
4. Přenos DNA do živočišných buněk, transaktivační testy

Téma: **PROTEINY: EXPRESE A AKTIVITA**

Úvod:

Během diferenciaci buněk dochází k výrazným změnám v expresi a aktivitě celé řady proteinů. Tyto změny mohou být kvalitativní (syntéza proteinu, který v prekurzorech nebyl exprimován) nebo kvantitativní (změna v množství syntetizovaného proteinu). Diferenciaci může být také doprovázena změnami v lokalizaci či post-translačních modifikacích určitých proteinů ovlivňujících jejich aktivitu.

Cíl:

Definovat změny v expresi, lokalizaci a specifické aktivitě vybraných proteinů během makrofágové diferenciaci monoblastů BM2.

Otázky k nastudování:

1. Nastudujte z odborné literatury, které proteiny výrazně mění svou expresi, lokalizaci či aktivitu v průběhu myeloidní diferenciaci.
2. Která činidla se v literatuře používají k indukci diferenciaci leukemických (BM2, U937) myeloidních linií do stádia makrofágů?
3. Jaké jsou metodické možnosti analýzy hladiny určitého proteinu či mRNA v živočišných buňkách?
4. Jaké jsou možnosti detekce lokalizace a strukturního uspořádání proteinů v buňkách?
5. Jaké jsou možnosti sledování specifických aktivit vybraných skupin proteinů (enzymy, transkripční faktory ...)
6. Vysvětlete pojmy – monoklonální a polyklonální protilátka, epitop, primární a sekundární protilátka. Vysvětlete způsob přípravy monoklonálních a polyklonálních protilátek. Jaké jsou možnosti vizualizace protilátek v preparátech?

## Úloha č.1

### DETEKCE VIMENTINU V LYZÁTECH MONOCYTŮ BM2 POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

#### Vimentin:

Cytoskeletární protein o velikosti 57 kDa. Patří do skupiny intermediárních filament. Exprimován v buňkách mezodermálního původu. Jeho intracelulární hladina se mění během diferenciacce některých typů buněk (př. krevní buňky).

#### SDS elektroforéza proteinů:

- dělení proteinů dle jejich molekulové hmotnosti (pro určení MW využití markeru)
- migrace ovlivněna i modifikacemi proteinů (př. glykosylace ...)
- nejčastěji se používá diskontinuální systém (rozdílné pH a iontová síla elektroforetického pufru, horního a dolního gelu)
- horní a dolní gel (na jejich rozhraní dochází k zakoncentrování proteinů ze vzorku)
- gel: polyakrylamid – polymerace akrylamidu, kroslinkováno N,N'-metylen-bis-akrylamidem
- dělení proteinů dle MW – koncentrace gelu, počet kroslinek

#### Elektroforetický pufr:

Akrylamid a bisakrylamid – **neurotoxin (pracujeme v rukavicích)**

SDS, Tris pufr

Ammonium persulfát – poskytuje radikály pro polymerizaci

TEMED (tetramethylethyléndiamin) – akceleruje polymeraci akrylamidu

#### Vzorek:

SDS se váže na proteiny – ty pak mají záporný náboj

Redukční činidlo (merkptoethanol, dihidrotreitol) – disociace proteinových komplexů na podjednotky

#### Barvení proteinů:

Soli stříbra (nejcitlivější), Coomassie brilliant blue – nespecifická vazba na proteiny

Westernův přenos: - polosuchý, ponořený

Membrány: nitrocelulóza, PVDF, nylonové membrány

- liší se kapacitou vazby proteinů, vážou různě různé proteiny
- lze na ní i barvit proteiny (Ponceau S, India Ink, Amido Black ...)

#### Protilátky:

*Primární* – monoklonální, polyklonální

*Sekundární* – konjugované s enzymy (HRP, AP ...), biotinylované ...

#### Substráty:

Chromogenní, chemiluminiscence

#### Příprava vzorků:

$1 \times 10^6$  buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 5ml misce 24 hod. Zároveň kultivovat stejné množství BM2 buněk jako kontrolu. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při  $-20^\circ\text{C}$ . Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Ke vzorkům přidat alespoň dvojnásobek kompletního 2xCSB pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů v takto naředěných vzorcích byla stejná.

### Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A' (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 minu stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo nanášeno stejné množství proteinů od každého vzorku.

### Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacery a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

### Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

### Barvení gelu na proteiny:

1. Gel ponoříme do barvicího roztoku a ponecháme na kývačce 1 hod.
2. Odlijeme barvicí roztok a gel zalijeme roztokem odbarvovacím. Odbarvujeme opět na kývačce. Odbarvovací roztok měníme co 20-30 minut. Po odbarvení gel vysušíme na sušičce gelů.

### Sestavení blotovací aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
4. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
5. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
6. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastikové svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
8. Blotujeme 1 hod při 100 V.

### Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulózovou membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-vimentin ředěnou 1:1000 v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 7 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:10000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě, osušíme na ubrousku a umístíme na fólii.

7. Smícháme roztoky A a B z ECL kitu (Amersham) 1:1 a nakapeme na membránu. Inkubujeme 5 minut.
8. Osušíme membránu ubrouskem, přiklopíme folií a ve světlotěsné kazetě odneseme do temné komory.
9. Přiložíme fotografický papír a exponujeme 1 minutu (podle intenzity signálu upravíme délky dalších expozic)
10. Fotografický papír přeneseme do vývojky dokud se neobjeví signál.
11. Krátce opláchneme ve vodě a ponoříme jej na 5 minut do ustalovače.
12. Nakonec film promýváme alespoň 1 hodinu v destilované vodě a vysušíme.

### Použité roztoky

#### Transferový pufr:

48 mM Tris  
39 mM glycin  
20% methanol

#### TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0  
57,6 ml 5M NaCl  
doplnit vodou do 2 litrů

#### TBS-Tween:

přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

#### Odbarvovací roztok:

500 ml metanolu  
400 ml destilované vody  
100 ml kyseliny octové

#### Tris-glycin elektroforetický pufr (pH=8,3):

25 mM Tris  
250 mM glycine  
0,1% (w/v) SDS

#### Pufr pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl  
50 ul 1M MgCl<sub>2</sub>  
doplnit destilovanou vodou do 10ml

#### Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

#### Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)

H<sub>2</sub>O 4,9 ml  
40% Akrylamid 2,4 ml  
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml  
10% SDS 0,1 ml  
Ammonium persulfate 75 ul  
TEMED 7,5 ul

#### Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H<sub>2</sub>O 5,62 ml  
40% Akrylamid 0,79 ml  
1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml  
10% SDS 75 ul  
Ammonium persulfate 30 ul  
TEMED 10 ul

#### 2xCSB lyzační pufr

6,9 ml H<sub>2</sub>O  
2 ml glycerol  
1,2 ml 1M Tris pH=6,8  
0,4 ml 0,2% Bromfenolová modř v 1M Tris pH=6,8  
2 ml 20% SDS  
+ před použitím přidat 100 ul beta-merkaptioethanolu k 900 ul 2x CSB

## Úloha č.2

### **DETEKCE ZMĚN MNOŽSTVÍ, LOKALIZACE A STRUKTURNÍHO USPOŘÁDÁNÍ VIMENTINU BĚHEM MAKROFÁGOVÉ DIFERENCIACE MONOBLASTŮ BM2 POMOCÍ NEPŘÍMÉ IMUNOFLOURESCENCE**

Během makrofágové diference dochází k nárůstu exprese proteinu intermediárních filament – vimentinu. Ten vytváří u makrofágů hustou bohatě rozvinutou síť vláken v cytoplazmě.

#### **Nepřímá imunofluorescence:**

- detekce množství, lokalizace a strukturního uspořádání proteinů ve fixovaných buňkách nebo tkáních
- využití specifických primárních protilátek
- sekundární protilátky fluorescenčně značené (FITC, rhodamin, texas red...)
- fluorescenční molekula po excitaci zářením o určité vlnové délce emituje záření o jiné vlnové délce
- fluorescenční mikroskop – excitační filtr (záření dopadající na preparát)
  - emisní filtr (filtruje záření vycházející z preparátu)
- umožňuje detekci více proteinů naráz (více fluorescenčních molekul)
- lze lokalizovat detekovaný protein do buněčných organel značených specifickými sondami

#### **Fixační média**

Fixace je operace, prováděná za účelem zastavení všech procesů, probíhajících v buňce, zachování co možná nejpřesnějšího stavu a struktury tkáně. Fixační činidlo je voleno podle řešeného diagnostického problému, typu a velikosti dostupného materiálu a podle zvolené zalévací a barvicí metody.

Roztoky formaldehydu, paraformaldehydu, glutaraldehydu, methanol ...

#### **Montovací média**

Pro ochranné účely a následné optimální mikroskopické vyšetření jsou obarvené buňky montovány vhodnými montovacími činidly. Použitý typ závisí na daném protokolu. Jedním z nejdůležitějších parametrů montovacích médií je index lomu (nD); musí být okolo 1,5, čímž odpovídá indexu lomu skla.

Glycerol, Mowiol (Calbiochem), Vectashield (Vector), Fluoromont-G (Sothern Biotechnology Associates) ...

#### **Příprava vzorků**

$1 \times 10^6$  buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 5ml misce s krycím sklíčkem položeným na dno misky. Po 48 hod jsou buňky přisedlé na krycí sklíčko. Zároveň kultivovat stejné množství BM2 buněk jako kontrolu.

Po 48 hod kontrolní buňky, které zůstávají v suspenzi, sklidit centrifugací při 400 g/5 min. Buňky opláchnout roztokem PBS a  $5 \times 10^4$  buněk cytocentrifugovat na krycí sklíčko 400 g/ 5 minut. Sklíčka s buňkami (kontrolními i po kultivaci s TPA) opláchnout v TBS a fixovat ledovou směsí aceton/metanol (1:1) 10 minut při 4°C.

Po fixaci promýt sklíčka s buňkami 3x 5 minut v TBS a inkubovat 1 hodinu s anti-vimentin primární protilátkou ředěnou 1:100 v TBS-Tween. Sklíčka promýt 3x v TBS-Tween a inkubovat v temnu 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC ředěnou 1:100 v TBS-Tween. Sklíčka opět promýt – 2x TBS-Tween a 2x TBS.

Nakonec sklíčka opláchneme destilovanou vodou a montujeme na podloží sklíčka 3 ul Mowiolu (montovací médium od firmy Calbiochem). Preparáty pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu s vhodným emisním a excitačním filtrem pro FITC.

**Použité protilátky a roztoky:**

TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0  
57,6 ml 5M NaCl  
doplnit vodou do 2 litrů

TBS-Tween:

přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

Fixační směs:

Aceton:metanol 1:1

Montovací médium:

Mowiol (Calbiochem)

Protilátky:

myší monoklonální anti-vimentin protilátka (Sigma Aldrich)  
anti-myší IgG konjugovaná s FITC (Sigma Aldrich)

### Úloha č.3

## STANOVENÍ TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY RECEPTORŮ PRO KYSELINU RETINOVOU (RAR) V BUŇKÁCH BM2

### Úvod:

Mezi významné regulátory genové exprese patří transkripční faktory (TF). Jejich hladina a aktivita musí v buňkách podléhat přísné regulaci. Obecně lze říct, že změna v úrovni exprese určitého TF nemusí automaticky znamenat změnu v jeho aktivitě. Ta může být ovlivněna celou řadou faktorů – fosforylací, vazbou aktivátoru či inhibitoru, lokalizací v buňce ... Aktivita některých TF koreluje s jejich DNA vazebnou schopností a proto ji lze stanovit pomocí gel shift nebo gel supershift assaye. Obecně lze aktivitu libovolného TF stanovit přechodnou transfekcí reportérového plazmidu a následným měřením aktivity reportérových genů v buněčných lyzátech.

### Reportérový plazmid:

Plazmid obsahující reportérový gen (nejčastěji luciferázu) pod kontrolou promotoru, jehož aktivita je řízena specifickým TF. V našem případě budeme používat plazmid RARE $\beta$ 2-TK-LUC, kde genu kódujícímu luciferázu je předřazen minimální promotor s vazebným místem pro RAR.

### Postup:

#### A) TRANSFEKCE

1. Do mikrozkušavky napipetovat 250ul média OPTI-MEM a přidat 6 ul transfekčního činidla Fugene6.
2. Přidat směs plazmidových DNA sestávající se z 1,5 ug RARE $\beta$ 2-TK-LUC a 1,5 ug CMV- $\beta$ -gal a promíchat.
3. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
4. Přikapat tuto směs ke  $4 \times 10^6$  buňkám BM2 ve 2,5 ml kompletního média. Inkubovat v CO<sub>2</sub> inkubátoru do druhého dne.
5. Druhý den buňky rozdělit na dvě 5ml misky, přidat 5ul 10<sup>-3</sup>M kyseliny retinové a inkubovat v CO<sub>2</sub> inkubátoru do druhého dne.
6. Buňky sklídit, opláchnout v PBS a resuspendovat ve 100 ul 0,25M Tris pH 7,5.

#### B) TEST NA AKTIVITU $\beta$ -GALAKTOSIDÁZY

1. Buněčnou suspenzi lyzovat 3 cykly opakovaného zamrazování a rozmrazování .
2. Po posledním rozmražení centrifugovat buněčný lyzát 5 minut při max. otáčkách v chlazené mikrocentrifuze.
3. Přenést supernatant buněčného lyzátu do nové mikrozkušavky a uchovat v -70°C nebo provést vlastní testy.
4. Pro každý testovaný vzorek na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy připravit následující směs:

100x roztok Mg	4 $\mu$ l
1x ONPG	88 $\mu$ l
0,1M fosfátový mix pH 7,5	268 $\mu$ l
5. Směs rozpipetujte do zkumavek ke 40 ul buněčného lyzátu a inkubujte při 37°C se neobjeví žlutavé zbarvení.
6. Zastavte reakci přidáním 667  $\mu$ l 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
7. Stanovte optickou densitu měřením při vlnové délce 420 nm. (rozsah linearit je 0,2-0,8 OD).



### Roztoky:

100x roztok Mg: 0,1M MgCl<sub>2</sub>, 4,5 M β-merkaptoetanol

1x ONPG: 4 mg/ml o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosidu v 0,1 M fosfátovém mixu pH 7,5

0,1M fosfátový mix: 41 ml 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O a 9 ml 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 50ml H<sub>2</sub>O.

### C) TEST NA AKTIVITU LUCIFERÁZY

1. 10 μl lyzátu přenést do 90 μl 0,25M Tris pH 7,5.
2. Přidat 360 μl *luciferase assay buffer*, přenést do luminometrické kyvety a promíchat na vortexu.
3. Přenést do komůrky luminometru, přidat 200 μl roztoku luciferinu (*luciferin stock solution* ředěný 5x H<sub>2</sub>O) a zaznamenat údaj o absolutní luciferázové aktivitě na luminometru.
4. Relativní luciferázovou aktivitu každého vzorku stanovit jako podíl absolutní luc. aktivity a β-gal aktivity na 1 μl extraktu.

### Zásobní roztoky:

*Luciferase assay buffer:*

Výsledný roztok	Konc. zásobního roztoku	Příprava 5ml pracovního roztoku
25 mM Gly-Gly pH 7,8	250 mM	0,5 ml
15mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,8	0,1 M	750 μl
15 mM MgSO <sub>4</sub>	1 M	75 μl
4 mM EGTA	400 mM	50 μl
2 mM ATP	100 mM	100 μl
1 mM DTT	1 M	5 μl
ddH <sub>2</sub> O	-	3 520 μl

*Luciferine stock solution:*

1 mM D-luciferin

25 mM glycylglycine (Gly-Gly)

10 mM DTT

Téma: ANALÝZA FUNKČNÍCH ZMĚN PROVÁZEJÍCÍCH DIFERENCIACI BUNĚK MYELOMONOCYTÁRNÍ ŘADY

Úvod:

Expresí onkogenu *v-myb* viru ptačí myeloblastózy je typickým znakem kuřecích monoblastů BM2, který přispívá k aktivní proliferaci a zablokování terminální diferenciace těchto buněk BM2. Existují určité chemické látky, které dokážou zastavit proliferaci a vyvolat diferenciaci nejen buněk BM2 ale i dalších buněčných linií myeloidní řady. Podobný účinek může rovněž vyvolat zvýšená expresí některých transkripčních faktorů a koaktivátorů. Diferenční procesy jsou spjaty s funkčními změnami buněk, které úzce souvisí se změnami jejich enzymového vybavení a se změnami integrinů vystavených na jejich povrchu. Na detekci těchto změn jsou založeny diferenciální testy. Cílem této úlohy je osvojení poznatků týkajících se procesů provázejících diferenciaci hematopoietických buněk myeloidní řady a praktická aplikace těchto vědomostí při sledování diferenciace buněk BM2.

Otázky k nastudování:

1. Které chemické látky (uved'te nejméně tři) indukují diferenciaci lidských hematopoietických buněk myeloidní řady (např. U937, HL60, NB4)? V kterém stadiu diferenciace byly tyto buňky zablokovány? Jaké typy buněk vznikají působením jednotlivých diferenciálních infektorů? Mohou některé z těchto buněk diferencovat do různých buněčných typů, v závislosti na typu aplikovaného diferenciálního činidla?
2. Stručně vysvětlíte molekulární mechanismus účinku alespoň jednoho diferenciálního činidla (např. uveďte typ molekul, které ovlivňují, cílové geny, apod.).
3. Jakými chemickými látkami může být indukována diferenciace monoblastů BM2? Do jakého typu buněk patří diferencované buňky BM2?
4. Expresí určitých exogenních transkripčních faktorů a koaktivátorů může navodit diferenciaci buněk BM2 nebo změnit citlivost těchto buněk na diferenciální činidla. O které proteiny se jedná?
5. Vyjmenujte některé ze změn, které doprovázejí diferenciaci hematopoietických buněk, např. morfologické a funkční změny, změny hladiny povrchových antigenů a aktivity enzymů...
6. Jakými testy je možné tyto změny detekovat a diferenciaci buněk potvrdit?
7. Stručně vysvětlíte, na jakém principu jsou tyto testy založeny.

## Úloha č.1

### TEST AKTIVITY ACIDICKÝCH FOSFATÁZ

#### Úvod:

Tento test slouží pro cytologickou demonstraci aktivity acidických fosfatáz. Aktivní acidické fosfatázy katalyzují hydrolýzu fosforovaného substrátu (naftol AS-BI fosforové kyseliny), který v následujícím kroku reaguje s diazoniovou solí (fast garnet GBC) za tvorby nerozpustného barviva vyvíjejícího se v místě aktivity enzymu. Osteoklasty jsou typické přítomností acidických fosfatáz necitlivých na přítomnost inhibitoru tartrátu, zatímco většina buněk monocytární řady obsahuje tartrate-senzitivní fosfatázy.

#### Postup:

1. V 5 ml média kultivujte  $1 \times 10^6$  buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných forbolovým esterem PMA.
2. Buňky z kultivačních misek odeberte do 15 ml zkumavek (použijte EDTA/PBS), zcentrifugujte (1500rpm/5min.) a promyjte v PBS. Promyté buňky BM2 rozsuspendujte ve 2ml PBS, buňky BM2/PMA rozsuspendujte v 1ml PBS. 100  $\mu$ l buněčné suspenze (odpovídá asi  $1 \times 10^5$  buněk) naneste do cytocentrifugační aparatury. Centrifugujte 2000rpm/5min.
3. Buňky centrifugované na podložní skličko fixujte 30 sekund ve fixačním roztoku.
4. Fixované buňky pečlivě promyjte deionizovanou vodou. Sklička nesmí vyschnout!
5. Do ependorfy napipetujeme 500  $\mu$ l Fast Garnet GBC Base Solution a 500  $\mu$ l Sodium Nitrite Solution. Jemně promícháme (30 s) a necháme inkubovat při pokojové teplotě (2 min.).
6. Dvě 20 ml zkumavky označíme A a B a do každé z nich napipetujeme:

	A	B
Deionizovaná voda (37 °C)	18 ml	18 ml
Diazotized Fast Garnet GBC (z kroku 5)	0,4ml	0,4ml
NaphtholAS-BIPhosphateSolution	0,2ml	0,2ml
Acetate Solution	0,8ml	0,8ml
Tartrate Solution	–	0,4ml

7. Do dvou petriho misek označených A a B přelijeme celý objem připravených roztoků (z kroku 6) a vložíme sklička s fixovanými buňkami. Misky obložíme parafilmem a necháme inkubovat (37°C, 60min.) při zamezeném přístupu světla.
8. Sklička opláchneme v destilované vodě a pozorujeme pod světelným mikroskopem.

Fixační roztok: 25 ml citrate solution  
65 ml acetone  
8 ml 37% formaldehyde

Zpracováno podle: SIGMA ALDRICH Acid phosphatase, Leukocyte Kit

## Úloha č.2

### **NBT TEST**

#### Úvod:

Proces fagocytózy je následován sledem chemických reakcí, v jejichž průběhu vznikají látky jako peroxid vodíku a kyselina chlorná, které slouží k usmrcení fagocytující buňkou pohlceného organismu. Tvorba těchto sloučenin je doprovázena vznikem kyslíkových radikálů, jejichž vznik můžeme prokázat pomocí tetrazoliové soli, která je radikály redukována na barevný formazán. Reakci vyhodnotíme spektrofotometricky. Buňky mohou být k tvorbě kyslíkových radikálů stimulovány jako odpověď na probíhající fagocytózu stejně jako forbolovým esterem PMA.

#### Roztoky:

1. DMEM (bez séra), 37 °C
2. 1mg/ml NBT v PBS s 2 µl/ml PMA (zásobní koncentrace 1 mg/ml, přidat těsně před použitím). 200µl na vzorek, připravit dopředu, před použitím zcentrifugovat naplno)
3. 10% Triton X-100 s HCl ( na 5ml roztoku 36µl konc. HCl a 500µl Triton X)

#### Postup:

1. V 5 ml média kultivujte  $1 \times 10^6$  buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných forbolovým esterem PMA.
2.  $1 \times 10^6$  viabilních buněk z kultivační misky centrifugovat při 200g
3. Opatrně odsát supernatant (trocha supernatantu může zůstat)
4. Sediment rozsuspendovat ve 400µl DMEM bez séra, přidat 200µl NBT v PBS/PMA (roztok 2)
5. Lehkým protřepáním rozsuspendovat buňky
6. Jednu hodinu inkubovat v termostatu (37°C)
7. Přidat 200µl 10% Tritonu, lehce protřepat
8. Nechat 20-30 min. extrahovat při pokojové teplotě
9. Po skončení inkubace po 200µl na mikro-titrační destičku
10. Změřit absorbanci na ELISA-readeru při 620 nm jako referenci při 570 nm

### Úloha č.3

## FAGOCYTÓZA

#### Úvod:

Jednou ze základních vlastností makrofágů je schopnost fagocytózy. V současné době existuje řada metod pro stanovení fagocytické aktivity makrofágů. Jedna z nich je založena na kultivaci buněk s Dynabeads M-270 Epoxy kuličkami o velikosti 2,8 mikrometrů (Dynal Biotechnologies). Makrofágy jsou schopné tyto kuličky fagocytovat a počet fagocytovaných kuliček jednotlivými buňkami lze vyhodnotit pod mikroskopem.

#### Postup:

1. V 10 ml média kultivujte  $2 \times 10^6$  buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných forbolovým esterem PMA spolu s 10  $\mu$ l směsi Dynabeads M-270 Epoxy.
2. Sklizené buňky promýt 1x v 1x PBS, resuspendovat v 1 ml 1x PBS
3. Do zkumavky s 2 ml Histopaque přenést suspenzi buněk – nalévat po stěně, aby se vrstvy nepromíchaly
4. Cfg na centrifuze s výkyvným rotorem (Heraeus) 400g/30 min
5. Buňky vytvoří bělavý prstenec. Vrstvu nad ním opatrně odsajeme, fázi s buňkami odebereme do nové zkumavky a promyjeme 10 ml 1x PBS/EDTA
6. Pelet resuspendujeme v malém množství PBS (podle jeho velikosti...přibližně v 5  $\mu$ l)
7. 3  $\mu$ l nanese na doprostřed skla, překryjeme krycím sklíčkem a přitlačíme
8. Vyhodnocujeme ještě týž den 200 buněk z každého skla

#### Pozn:

1. Při sklizení dochází ke ztrátě buněk, proto kultivovat na 10 ml miskách
2. Poměr buňky:beads je 1:5, tj. 10 $\mu$ l kuliček na 10 ml misku
3. Dodržovat stejně dlouhou dobu kultivace s beadsy, aby bylo možné srovnání
4. Na sklíčko nenanášet víc než 3  $\mu$ l, jinak se barva příliš zředí

## Téma: DIFERENCIACE A APOPTÓZA HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK

### Úvod:

Protinádorové výzkumy se často zaměřují na hledání způsobů jak indukovat terminální diferenciaci, programovanou buněčnou smrt nebo zastavit proliferaci nádorových buněk. Například při hledání nových léčiv je prvním, nejjednodušším a nejlevnějším krokem studování jejich vlivu na základní fenotypové vlastnosti nádorových buněčných linií, jakými jsou především míra proliferace, viabilita a morfologie.

### Cíl:

Prokažte diferenciaci a buněčnou smrt hematopoetických buněk na úrovni jejich morfologie.

### **Diferenciace**

Buněčná linie: *HL-60*

Induktory diferenciace: *kyselina all-trans retinová (atRA)*, *forbolový ester PMA*

Otázky k nastudování:

1. Zjistěte informace o buněčné linii, ve kterém stádiu zrání je její diferenciace zablokována
2. Zjistěte základní mechanismus účinku obou induktorů diferenciace
3. Zjistěte z literatury jaké koncentrace induktorů a časové intervaly jsou pro indukci diferenciace této linie vhodné
4. Navrhněte hypotézu, do kterého zralého stadia budou buňky diferencovat

### **Apoptóza**

Buněčná linie: *U937*

Induktory buněčné smrti: *camptothecin*, *ethanol*

Otázky k nastudování:

1. Zjistěte informace o buněčné linii, ve kterém stádiu zrání je její diferenciace zablokována
2. Zjistěte základní mechanismus účinku camptothecinu
3. Zjistěte z literatury jaké koncentrace induktorů a časové intervaly jsou pro tuto linii vhodné
4. Navrhněte hypotézu, jaký typ buněčné smrti budou tyto látky indukovat (apoptóza, nekróza)

### **Kontrolní otázky**

1. uveďte základní rozdíly mezi apoptózou a nekrózou na úrovni morfologie.
2. jakou roli v indukci programované buněčné smrti hrají mitochondrie? Vyjmenujte některé proteiny spojené s procesem apoptózy, které se v nich nacházejí.
3. které proteázy jsou aktivovány typicky během apoptózy a které během nekrózy?
4. co jsou to kaspázy a jak lze detekovat jejich aktivitu?
5. jak se liší pozice fosfatidylserinu v membránách u živých a umírajících buněk? Lze tuto odlišnost využít při detekci programované buněčné smrti?
6. které enzymy jsou zodpovědné za internukleozomální štěpení DNA?
7. jaká je reakce okolních buněk na zbytky buněk zlikvidovaných programovanou buněčnou smrtí, a na nekrotické buňky?
8. jaké jiné typy programované buněčné smrti kromě apoptózy jsou zatím popsány? Najděte alespoň jeden příklad a uveďte tři vlastnosti kterými se odlišuje od apoptózy.

## Úloha č.1

### **MTT TEST – TEST CYTOTOXICITY A METABOLICKÉ AKTIVITY**

#### Úvod:

MTT je test metabolické aktivity. Oxidací na mitochondriích vzniká nerozpustná tetrazoliová sůl, která se následně extrahuje a měří se absorbance dosaženého zbarvení. Čím déle buňky žijí (a metabolizují) tím více barvy vyrobí. MTT test lze použít jak na stanovení cytotoxicity látek, tak také např. na určení proliferační aktivity buněk.

#### Cíl:

V buňkách linie U-937 může být programovaná buněčná smrt (apoptóza) indukována např. camptothecinem (CAM; inhibitor topoizomerázy I). Určete vhodnou koncentraci camptothecinu pro indukci apoptózy u buněk U-937 po 24 hodinách kultivace. Jakou koncentraci CAM musíme použít, abychom dosáhli hodnoty LD50, tedy 50% mrtvých buněk po 24 hodinách?

#### Postup:

1. Vyberte koncentrační řadu CAM k otestování (cca 7-10 koncentrací)
2. Nařed'te buňky U-937 v médiu (RPMI 1640) do výsledné koncentrace  $4 \times 10^5$ /ml
3. Napipetujte buněčnou suspenzi po 100  $\mu$ l do 96-jamkové destičky, každý vzorek v triplikátu. Nutné kontroly: neovlivněné buňky a čisté médium (blank)
4. Přidejte k buňkám zvolená množství induktoru (CAM)
5. Inkubujte při 37°C/10% CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin
6. Přidejte ke každému vzorku 10  $\mu$ l MTT Reagentu a inkubujte 2-4 hodiny při 37°C/10% CO<sub>2</sub>
7. Buňky pravidelně sledujte dokud se v nich neobjeví fialový precipitát
8. Poté přidejte 100  $\mu$ l Detergent Reagentu a destičku inkubujte ve tmě a pokojové teplotě nejméně 2 hodiny (nebo i přes noc). Inkubace při 37°C urychluje solubilizaci.
9. Odejměte víko destičky a změřte absorbanci při 570 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm.
10. Stanovte průměrnou hodnotu z triplikátů, odečtete blank. Vyneste absorbanci na osu Y versus koncentrace CAM na ose X a určete koncentraci při které se metabolická aktivita buněk snížila oproti kontrole o 50%.

## Úloha č.2

### **FIXACE BUNĚK A BARVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN PROPIDIUM IODIDEM**

#### Úvod:

Buňky z pokusné misky se fixují ve směsi metanolu s kyselinou octovou, čímž se permeabilizuje jejich buněčná membrána a barvivo může proniknout dovnitř buněk. Po přidání propidium iodidu dojde k obarvení nukleových kyselin. Vyhodnocuje se morfologie jádra, stupeň kondenzace chromatinu, přítomnost apoptotické fragmentace a apoptotických tělísek.

#### Cíl:

Přesvědčit se o změně jaderné morfologie myeloidních buněk během indukce buněčné smrti fluorescenční mikroskopií. V buňkách linie HL-60 může být programovaná buněčná smrt (apoptóza) indukována např. camptothecinem (CAM; inhibitor topoizomerázy II), nekróza pak může být indukována např. ethanolem.

#### Postup:

1. Indukovat apoptózu buněk HL-60 jejich inkubací s camptothecinem (1  $\mu$ M) a nekrózu inkubací s ethanolem (10%) po dobu 24 hodin.
2. Předem připravit směs složenou z metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1, směs uchovávat v  $-20^{\circ}\text{C}$  a používat vychlazenou.
3. Buňky z pokusné misky centrifugovat (400g/5 min)
4. Odsát supernatant, pelet resuspendovat v 0,5 ml 1xPBS
5. Za současného míchání na vortexu pomalu přikapat 5 ml ledové směsi
6. Inkubovat v  $-20^{\circ}\text{C}$  minimálně 30 minut (optimálně přes noc)
7. Centrifugovat při 200g/5 min (fixované buňky jsou křehké, nepoužívat při centrifugaci vyšší otáčky!)
8. Odsát supernatant, pelet resuspendovat ve 100  $\mu$ l ledové směsi
9. Kápnout jednu kapku z 30 cm výšky na podložní sklíčko a nechat zaschnout
10. Obarvit 10  $\mu$ l propidium iodidu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$
11. Přikrýt krycím sklíčkem, vyhodnotit pod fluorescenčním mikroskopem



### Úloha č.3

## CYTOCENTRIFUGACE

### Úvod:

Při studiu morfologie buněk různých typů je velmi užitečné provádět tzv. cytocentrifugaci, kterou lze původně trojrozměrné buňky převést na dvourozměrné. Studovaná buněčná suspenze se umístí do speciální cytocentrifugační kyvety spolu s podložním sklíčkem. Odstředivou silou jsou buňky nuceny sedimentovat na podložní sklíčko a roztáhnout se do šířky. Následnou fixací a obarvením se sedimentované buňky zviditelní pro rutinní mikroskopickou analýzu.

### Cíl:

Přesvědčit se o změně morfologie myeloidních buněk během diferenciaci světelnou mikroskopií. Buňky linie HL-60 mohou být stimulovány k diferenciaci na makrofágy prostřednictvím forbolového esteru (PMA) nebo k diferenciaci na granulocyty prostřednictvím kyseliny retinové (RA)

### Postup:

1. Buňky HL-60 kultivujte za přítomnosti PMA (150 nM) po dobu 48 hodin a za přítomnosti kyseliny *all-trans* retinové (atRA; 100 nM) po dobu 72 hodin.
2. Buňky spočítejte na hemocytometru (buňky které adherují k podkladu převedte do suspenze pomocí 1 mM EDTA v PBS),  $1 \times 10^5$  buněk přeneste do zkumavky, centrifugujte 400 g/5 min a resuspendujte ve 100  $\mu$ l PBS.
3. Vzorky přeneste do cytocentrifugačních kyvet, centrifugujte 4 minuty při 500 g.
4. Vzorky na sklíčkách nechte krátce oschnout, pak fixujte 5 x opakovaným ponořením sklíčka do fixačního roztoku (metanol) na 1 vteřinu.
5. Obarvení jádra 5 x opakovaným ponořením sklíčka do eosinu na 1 vteřinu.
6. Obarvení cytoplazmy 5 x opakovaným ponořením sklíčka do thiazinu na 1 vteřinu.
7. Přebytek barviva na sklíčku opatrně opláchněte vodou a vzorky nechte oschnout.
8. Morfologii buněk analyzujte mikroskopicky.

Fixační a barvicí roztoky jsou součástí kitu Diff-Quik.

## Téma: PŘENOS DNA DO ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK, TRANSAKTIVAČNÍ TESTY

### Úvod:

V současné době existuje velké množství metod pro přenos DNA (RNA) do eukaryotických buněk. Obecně je lze rozdělit do 3 kategorií:

Přenos fyzikálními metodami: elektroporace, mikroinjekce

Přenos pomocí virů

Přenos biochemickými metodami: precipitace fosforečnanem vápenatým, využití kationickým lipidových činidel (lipofekce), přenos pomocí DEAE-dextranu

Volba použité metody závisí na typu buněk, požadované účinnosti transfekce a v neposlední řadě také na možnostech laboratoře.

Transaktivační testy slouží ke sledování míry schopnosti transkripčních faktorů aktivovat transkripci a k analýze funkce dalších regulátorů, které transkripčně aktivační schopnost daného faktoru ovlivňují. Protože je obtížné měřit úroveň exprese přirozených cílových genů, jejichž exprese je podřízena sledovanému transkripčnímu faktoru, transaktivační testy se provádějí v prostřednictvím částečně umělého systému, který se přeneso do buněk transfekcí. Jeho složkami jsou:

gen, kódující daný transkripční faktor (tzv. *aktivátor*)

umělý cílový gen, který kóduje snadno detekovatelný produkt a kterému je předřazen promotor s vazebným místem pro daný transkripční faktor (tzv. *reportér*).

Často používanými reportéřskými geny jsou zejména geny kódující luciferázu a  $\beta$ -galaktozidázu. Aktivitu obou enzymů lze v buněčných extraktech snadno měřit:

Prítomnost aktivátoru  $\Rightarrow$  zvýšení úrovně exprese reportéřského genu v transfekovaných buňkách  $\Rightarrow$  detekce tohoto zvýšení úrovně exprese dle zvýšení luciferázové aktivity v buněčných extraktech ve srovnání s kontrolou.

Do transfekční směsi je možné také přidat plazmid, kódující protein, který transkripčně aktivační schopnost sledovaného faktoru ovlivňuje (tzv. modulátor) a míru této schopnosti vyhodnotit stejným testem.

Pozn.: plazmid kódující  $\beta$ -galaktozidázu pod kontrolou konstitutivního promotoru (v našem případě cmv promotoru) se do transfekční směsi přidává rovněž a to jako tzv. vnitřní standard pro sledování účinnosti transfekce. Naměřená luciferázová aktivita se u každého vzorku vztahuje na jednotkovou aktivitu  $\beta$ -galaktozidázy.

Otázky k nastudování:

1. Jaké znáte další reportéřské geny kromě výše zmíněných?
2. Zjistěte jaké existují metody transfekce živočišných buněk a pro který typ buněk (suspensní či adherentní) se tyto metody používají.
3. Zjistěte výhody a nevýhody jednotlivých metod.
4. Aktivita promotorů různých genů se mění v závislosti na událostech v životě buňky. Co může být příčinou změny aktivity promotoru genu?
5. Co je vimentin? Jakou má funkci?
6. Charakterizujte linie BM2 a QT6
7. Navrhněte uspořádání pokusu, kterým prokážete, že protein v-Myb funguje jako transkripční faktor v buňkách QT6
8. Navrhněte uspořádání pokusu, kterým prokážete účinnost transfekce buněk BM2

## Úloha č.1

### TRANSFEKCE ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK ELEKTROPORACÍ A LIPOFEKCIÍ

#### Úvod:

Elektroporace se používá pro přechodnou transfekci suspenzí i adheřujících buněk a je založena na vystavení buněk krátkému elektrickému šoku, jehož následkem dojde k přechodnému otevření pórů v plazmatické membráně. Těmito póry pronikne DNA do buňky.

Při lipofekci dochází nejprve k vytvoření komplexů záporně nabitě plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

#### Cíl:

Naučit se základy manipulace se suspenzími buňkami BM2, vytvořit přechodné transfektanty BM2cmv-EGFP a porovnat účinnost transfekce elektroporací a lipofekcí.

#### Postup- elektroporace:

1.  $5 \times 10^6$  exponenciálně rostoucích buněk BM2 centrifugovat 5 min/500g
2. resuspendovat pelet v 400 $\mu$ l média obsahujícím 1,25% DMSO
3. přidat transfekční směs (10  $\mu$ g cmv-GFP nebo tRNA)
4. nastavit elektroporační parametry  $U=260V$ ,  $C=1050 \mu F$ ,  $R=2310\Omega$
5. provést elektroporaci a okamžitě přenést buněčnou suspenzi do připraveného média obsahujícího 1,25% DMSO
6. 24 hod. po elektroporaci buňky promýt, pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, vyfotit a stanovit účinnost transfekce.

#### Postup- lipofekce:

1. Do mikrozkušavky napipetovat 250 $\mu$ l média OPTI-MEM a přidat 6  $\mu$ l transfekčního činidla Fugene6.
2. Přidat 3  $\mu$ g plazmidové DNA cmv-GFP.
3. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
4. Přikapat tuto směs ke  $4 \times 10^6$  buňkám BM2 ve 2,5 ml kompletního média. Inkubovat v  $CO_2$  inkubátoru do druhého dne.
5. Buňky pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, vyfotit a stanovit účinnost transfekce.

## Úloha č.2

### TRANSFEKCE ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK PRECIPITACÍ FOSFOREČNANEM VÁPENATÝM

#### Úvod:

Precipitace fosforečnanem vápenatým se používá pro přechodnou i stabilní transfekci fibroblastů a jiných adhezních i neadhezních buněk. Po smíchání DNA s chloridem vápenatým ve fosfátovém pufru dojde k tvorbě precipitátu DNA-fosforečnan vápenatý; tento precipitát je pohlcován buňkami endocytózou.

#### Cíl:

Naučit se základy manipulace s adherentními buňkami QT6 a způsob jejich transfekce a kotransfekce více plazmidy. Demonstrovat transaktivní schopnost proteinu Myb na *wild-type* promotoru (Ew5luc) a promotoru s mutacemi ve vazebných místech (Em5luc).

#### Postup:

1. Den před transfekcí pasážovat buňky QT6 z konfluentní misky na misku o průměru 5 cm v poměru 1:10. inkubovat přes noc v 10% CO<sub>2</sub> inkubátoru.
2. Druhý den odsát médium pasteurkou a nahradit je 5 ml čerstvého předehřátého média.
3. Ve sterilních eppendorfkách připravit transfekční směsi:

A: 1μg reportéru Ew5luc, 1μg reportéru cmv-βgal, 5μg NdGE

B: 1μg reportéru Em5luc, 1μg reportéru cmv-βgal, 5μg NdGE

C: 1μg reportéru Ew5luc, 1μg reportéru cmv-βgal, 5μg tRNA

D: 1μg reportéru, Em5luc, 1μg reportéru cmv-βgal, 5μg tRNA

4. Ke všem transfekčním směsím přidat 25μl 2,5M roztoku CaCl<sub>2</sub>, doplnit do H<sub>2</sub>O do finálního objemu 250μl, přidat 250μl roztoku BES a promíchat
5. inkubovat min.15 minut/RT
6. Směs přikapat k buňkám
7. Inkubovat přes noc v 37°C/3%CO<sub>2</sub>
8. Následující den odstranit precipitát 2 × promytím buněk 2,5ml média
9. Přidat 5ml média inkubovat přes noc v 37°C/10%CO<sub>2</sub>

#### **Roztoky:**

2x BES (pH=6,95): 50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
sterilizovat filtrací přes 0,45μm filtr, uchovávat v -20°C  
kritická je zde přesnost pH, úprava HCl v RT.

### Úloha č.3

## TEST LUCIFERÁZOVÉ A $\beta$ -GALAKTOSIDÁZOVÉ AKTIVITY V EXTRAKTECH ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK

### Příprava vzorků z úlohy 2:

1. Seškrábané nebo centrifugované buňky transfekované kultury v PBS stočit v mikrocentrifuze (5 minut, 500 g).
2. Odsát supernatant a buněčný pelet resuspendovat v 50  $\mu$ l 0,25 M roztoku Tris pH 7,5.
3. Lyzovat buňky třemi cykly opakovaného zamrazování v izopropanolové lázni a rozmrazování v pokojové teplotě. Vyhnout se ohřátí roztoku na pokojovou teplotu.
4. Po posledním rozmražení centrifugovat buněčný lyzát 5 minut při max. otáčkách v chlazené mikrocentrifuze.
5. Přenést supernatant buněčného lyzátu do nové mikrozkušavky a uchovat v  $-70^{\circ}\text{C}$  nebo provést vlastní testy.

### A) TEST NA AKTIVITU $\beta$ -GALAKTOSIDÁZY

1. Buněčnou suspenzi lyzovat 3 cykly opakovaného zamrazování a rozmrazování .
2. Po posledním rozmražení centrifugovat buněčný lyzát 5 minut při max. otáčkách v chlazené mikrocentrifuze.
3. Přenést supernatant buněčného lyzátu do nové mikrozkušavky a uchovat v  $-70^{\circ}\text{C}$  nebo provést vlastní testy.
4. Pro každý testovaný vzorek na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy připravit následující směs:

i. 100x roztok Mg	4 $\mu$ l
ii. 1x ONPG	88 $\mu$ l
iii. 0,1M fosfátový mix pH 7,5	268 $\mu$ l
5. Směs rozpipetujte do zkumavek ke 40  $\mu$ l buněčného lyzátu a inkubujte při  $37^{\circ}\text{C}$  se neobjeví žlutavé zbarvení.
6. Zastavte reakci přidáním 667  $\mu$ l 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
7. Stanovte optickou densitu měřením při vlnové délce 420 nm. (rozsah linearit je 0,2-0,8 OD).

### Roztoky:

100x roztok Mg: 0,1M  $\text{MgCl}_2$ , 4,5 M  $\beta$ -merkaptoetanol

1x ONPG: 4 mg/ml o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosidu v 0,1 M fosfátovém mixu pH 7,5

0,1M fosfátový mix: 41 ml 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 9 ml 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 50ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

### B) TEST NA AKTIVITU LUCIFERÁZY

1. 10  $\mu$ l lyzátu přenést do 90  $\mu$ l 0,25M Tris pH 7,5.
2. Přidat 360  $\mu$ l *luciferase assay buffer*, přenést do luminometrické kyvety a promíchat na vortexu.
3. Přenést do komůrky luminometru, přidat 200  $\mu$ l roztoku luciferinu (*luciferin stock solution* ředěný 5x  $\text{H}_2\text{O}$ ) a zaznamenat údaj o absolutní luciferázové aktivitě na luminometru.

4. Relativní luciferázovou aktivitu každého vzorku stanovit jako podíl absolutní luc. aktivity a  $\beta$ -gal aktivity na 1  $\mu$ l extraktu.

Zásobní roztoky:

*Luciferase assay buffer:*

<b>Výsledný roztok</b>	<b>Konc. zásobního roztoku</b>	<b>Příprava 5ml pracovního roztoku</b>
25 mM Gly-Gly pH 7,8	250 mM	0,5 ml
15mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,8	0,1 M	750 $\mu$ l
15 mM MgSO <sub>4</sub>	1 M	75 $\mu$ l
4 mM EGTA	400 mM	50 $\mu$ l
2 mM ATP	100 mM	100 $\mu$ l
1 mM DTT	1 M	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	-	3 520 $\mu$ l

*Luciferine stock solution:*

1 mM D-luciferin

25 mM glycylglycine (Gly-Gly)

10 mM DTT