

Sylabus Moderní metody buněčné biologie – nový

1. Buněčné kultury

Stanovení počtu a viability buněk: ukázka vybavení laboratoře, obsluha flow boxu, typy plastů pro buněčné kultury, bezpečnost práce, pasážování buněk, počítání částic na Coulter Counter, určení životnosti buněk barvením eosinem.

Detekce apoptotických buněk: stanovení apoptotického indexu - barvení pomocí DAPI (fluorescenční detekce buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem). Měření mitochondriálního membránového potenciálu apoptotických buněk pomocí barvení TMRE (tetrametyl rhodamin etylester) a detekce průtokovou cytometrií.

Stanovení stupně diferenciací leukemických buněk: detekce povrchových molekul CD11b a CD14 u buněk myeloidní linie HL-60 průtokovou cytometrií pomocí přímé imunocytochemie s protilátkami značenými fluorescenčními barvivami. Stanovení míry oxidativního vzplanutí jako ukazatele diferenciací u buněk HL-60 za použití různých aktivátorů fagocytózy (zymosan, forbol myristat acetat, Ca^{2+} ionofor) na destičkovém luminometru.

Stanovení diferenciací buněk nádoru kolonu (linie HT-29): stanovení alkalické fosfatázy kolorimetricky (alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení).

2. Fluorescenční a konfokální mikroskopie

Princip funkce fluorescenčního mikroskopu (výhody a limitace), rozdíly mezi konvenční a konfokální mikroskopii. Pozorování trojrozměrně fixovaných interfázních jader, ve kterých je fluorescenčně značený gen a jinou fluorescenční značkou obarven celý chromozom, na kterém se daný gen nachází.

3. Biochemické metody

Příprava buněčného lyzátu pro Western blotting a izolaci RNA: metodika přípravy buněčného lyzátu pro detekci proteinů a pro izolaci RNA, stanovení koncentrace proteinů pomocí kitu Bio-Rad DC protein.

Elektroforéza a transfer proteinů na membránu: separace stanoveného množství proteinů připravených v rámci předchozího cvičení pomocí SDS-PAGE, přenos na PVDF membránu pomocí semidry electroblotting.

Imunodetekce: imunodetekce beta-aktinu pomocí primární neznačené protilátky (anti-beta-aktin) a sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou ve vzorcích zpracovaných a separovaných v rámci předchozích cvičení, vizualizace bude provedena pomocí kitu ECL Plus.

Izolace celkové RNA, stanovení koncentrace a kvality: izolace RNA z připraveného buněčného lyzátu pomocí komerčního kitu, stanovení koncentrace RNA a její čistota na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer

pokračuje

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda: stanovení tumor nekrotizujícího faktoru alfa pomocí komerčního kitu od firmy R&D system Duoset v médiu získaného z diferencovaných myeloidních buněk THP-1 po aplikaci endotoxinu v různých koncentracích po dobu 24 hodin.

Časový harmonogram cvičení:

24. 11. 2008

Teoretický úvod:

- laboratoř buněčných kultur, kultivace buněk, typy buněčných kultur, měření základních parametrů cytokinetiky, vyjadřování výsledků atd.
- apoptóza a metody její detekce, diferenciací a její detekce

Praktické cvičení:

- seznámení s laboratoří buněčných kultur a jejím vybavením
- kultivace a pasážování různých typů buněčných linií
- detekce apoptotických buněk (stanovení apoptotického indexu - barvení pomocí DAPI a fluorescenční detekce buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem; měření mitochondriálního membránového potenciálu apoptotických buněk pomocí barvení TMRE (tetrametyl rhodamin etylester) a detekce průtokovou cytometrií
- stanovení stupně diferenciací epitelálních buněk z nádorové linie kolonu (HT-29) po indukci butyrátem sodným (NaBt) - kolorimetrické stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

1.12. 2008

Diferenciací leukemických buněk:

- stanovení počtu a viability buněk myeloidní linie HL-60
- detekce povrchových molekul CD11b a CD14 u buněk HL-60 průtokovou cytometrií
- stanovení míry oxidativního vzplanutí jako ukazatele diferenciací u buněk HL-60 za použití různých aktivátorů fagocytózy na destičkovém luminometru.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda:

- stanovení cytokinu - tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF) pomocí komerčního kitu v médiu získaného z diferencovaných myeloidních buněk po aplikaci endotoxinu v různých koncentracích po dobu 24 hodin.

8. 12. 2008

Fluorescenční a konfokální mikroskopie

- Princip funkce fluorescenčního mikroskopu (výhody a limitace), rozdíly mezi konvenční a konfokální mikroskopií. Pozorování trojrozměrně fixovaných interfázních jader - vysokorozlišovací cytometrie

- Izolace celkové RNA z připraveného buněčného lyzátu pomocí komerčního kitu, stanovení koncentrace a kvality na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.
- přehledné seznámení s dalšími metodami (detekce exprese specifických proteinů Western blotting, elektroforéza SDS-PAGE, imunodetekce)