

Téma: PROTEINY, BUNĚČNÉ STRUKTURY, POŠKOZENÍ DNA

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.

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 diferenciaci 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 (merkapt ethanol, dithiothreitol) – 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:

1×10^6 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 merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20°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 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno 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 spacersy 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 každých 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 plastické 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 nitrocelulóзовou 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:

48mM Tris
39mM 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):

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

Pufr pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl
50 ul 1M MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10 ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)

H₂O 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)

H₂O 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 H₂O
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-merkapt ethanolu 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

1×10^6 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 5×10^4 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 sekundárním protilátkou konjugovanou s FITC ředěnou 1:100 v TBS-Tween. Sklíčka opět

promýt – 2x TBS-Tween a 2x TBS. Na závěr inkubovat 5 minut v TBS s roztokem propidium iodidu (10 ug/ml) – barvení jader.

Nakonec sklíčka opláchneme destilovanou vodou a montujeme na podloží sklíčka 3 ul Mowiolu (montovací medium 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)

Doplňková úloha – barvení buněčných struktur na živých buňkách – jádra a lysozomy

Pro barvení struktur v živých buňkách lze využít fluorescence látky (sondy), které procházejí cytoplazmatickou membránou a následně se hromadí v určitém buněčném kompartmentu. Barvení může být úměrné některé z důležitých vlastností barvených organel (membránový potenciál u mitochondrií, acidifikace lysozomů ...). Další alternativou jsou vektory pro expresi fúzních proteinů (protein se specifickou buněčnou lokalizací + fluorescence protein). Existují pochopitelně i sondy pro detekci struktur ve fixovaných buňkách.

Příklady:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/tables/Molecular-Probes-organelle-selective-probes.html>

Jádra – Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYTO

Mitochondrie – MitoTracker red, MitoTracker orange, rhodamine 123, JC-1

Lysozomy – akridinová oranž, DND-153, DND-160

Hoechst 33342 – permeabilní, vazba na DNA do AT bohatých oblastí do maleho zlabku, excitace 350 nm, emise 461 nm

Akridinová oranž – permeabilní, protonuje se v lysozomech, excitace 503 nm, emise 530 nm

4×10^5 buněk MDA-MB-231 inkubovat v 5ml misce s krycím sklíčkem položeným na dno misky. Po 24 hod jsou buňky přisedlé na krycí sklíčko. Sklíčka s buňkami opláchnout v PBS a inkubovat 5 minut v PBS s akridinovou oranží (5ug/ml) a Hoechst33342 (5 ug/ml). Pozorovat pod fluorescence mikroskopem.

Úloha č.3

TRANSFEKCE ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK ELEKTROPORACÍ

Úvod:

V současné době existuje velké množství metod pro přenos DNA (RNA) do eukaryotických buněk. Obecně 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. Elektroporace se používá pro přechodnou transfekci suspenzních i adherujících 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 plasmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

Cíl:

Naučit se základy manipulace se suspenzními buňkami BM2, vytvořit přechodné transfektanty BM2cmv-EGFP metodou elektroporace.

Postup- elektroporace:

1. 10^7 exponenciálně rostoucích buněk BM2 centrifugovat 5 min/500g
2. resuspendovat pelet v 400 μ l média obsahujícím 1,25% DMSO
3. přidat transfekční směs (10 μ 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.

Úloha č.4

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 β 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 β 2-TK-LUC a 1,5 ug CMV- β -gal a promíchat.
3. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
4. Přikapat tuto směs ke 4×10^6 buňkám BM2 ve 2,5 ml kompletního média. Inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
5. Druhý den buňky rozdělit na dvě 5ml misky, přidat 5 ul 10⁻³M kyseliny retinové a inkubovat v CO₂ 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 β -GALAKTOSIDÁZY

1. Buněčnou suspenzi lyzovat 3 cykly opakovaného zamrazování a rozmrazování.
2. Po posledním rozmrazení 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 β -galaktosidázy připravit následující směs:

100x roztok Mg	4 μ l
1x ONPG	88 μ l
0,1M fosfátový mix pH 7,5	268 μ 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 μ l 1M Na₂CO₃.
7. Stanovte optickou densitu měřením při vlnové délce 420 nm. (rozsah linearit je 0,2-0,8 OD).

Roztoky:

100x roztok Mg: 0,1M MgCl₂, 4,5M β-merkaptoetanol

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

0,1M fosfátový mix: 41 ml 0,2M Na₂HPO₄ · 2H₂O a 9 ml 0,2M NaH₂PO₄ · 2H₂O + 50 ml H₂O.

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 H₂O) 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
25mM Gly-Gly pH 7,8	250mM	0,5 ml
15mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,8	0,1M	750 μl
15mM MgSO ₄	1M	75 μl
4mM EGTA	400mM	50 μl
2mM ATP	100mM	100 μl
1mM DTT	1M	5 μl
ddH ₂ O	-	3 520 μl

Luciferine stock solution:

1mM D-luciferin

25mM glycylglycine (Gly-Gly)

10mM DTT

Úloha č.4

STANOVENÍ POŠKOZENÍ DNA PO PŮSOBNÍ PEROXIDU VODÍKU NA BUŇKY KARCINOMU PRSU METODOU COMET ASSAY

Úvod:

Stanovení genotoxicity látek je důležité při posouzení jejich využití v praxi. V současné době existuje řada metod, které umožňují stanovit genotoxický účinek látek (Amesův test, test na chromozomové aberace, test výměny sesterských chromatid, testování mutaci v genu pro tymidinovou kinázu, stanovení mikrojadra ...). Jednou z možností testování genotoxických účinků na savčích buňkách je comet assay, který je založen na principu detekce migrace DNA v elektrickém poli. Výhodou této metody je jednoduchost, možnost detekce více typů poškození DNA, možnost testování buněk a tkání z in vivo organismů. Existuje celá řada modifikací tohoto testu, které umožňují detekci určitého typu poškození DNA. Asi nejuniverzálnější metodou je comet assay v alkalických podmínkách, která umožňuje současné stanovení dvou – a jedno-řetězcových zlomů ale také jiných typů DNA poškození (kroslinků ...). Podstatou této metody je ukotvení jednotlivých buněk v agarozovém gelu, jejich lyze v alkalickém prostředí a následná elektroforéza. Míru poškození DNA lze stanovit následně pomocí počítačového softwaru. V jasných případech rovněž „okometricky“.

Postup:

a) příprava buněk:

4×10^5 buněk MDA-MB-231 inkubovat v 5ml misce. Druhý den přidat 1 ul 3% peroxidu vodíku. Po 5-10 minutách buňky sklídit, opláchnout PBS a naředit na výslednou koncentraci 20 tis buněk/20 ul PBS.

b) příprava skel:

Na podložní skličko nanést tenkou vrstvu 1% agarózy v PBS a nechat přes noc zaschnout při pokojové teplotě. Druhý den nanést vrstvu 0,5% agarózy v PBS (110 ul), překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Smíchat 20 ul směsi buněk v PBS s 90 ul 0,5% LMP agarózy v PBS temperované na 37°C a nanést na skličko, opět překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Po zatuhnutí na tuto vrstvu nanést poslední vrstvu 0,5% LMP agarózy, překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Po zatuhnutí sundat krycí sklíčko a ponořit do lyzačního roztoku. Inkubovat přes 1 hodinu/přes noc.

c) elektroforéza a barvení:

Opláchnout skličko v elektroforetickém pufru a položit je do elektroforetické vany s pufrem na dobu 30 minut. Následně běžet elektroforézu na 20V 30 minut. Skličko poté neutralizovat 3 x 5 minut v neutralizačním pufru. Na skličko kápnout 50 ul roztoku propidium iodidu (2ug/ml) a překrýt krycím sklíčkem. Po 5 minutách sejmout krycí sklíčko a pozorovat pod flourescenčním mikroskopem.

Roztoky:

Lyzační roztok: 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris pH=10, 1% Triton X-100

Elektroforetický pufr: 1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13

Neutralizační roztok: 0,5 M Tris, pH=7,5

Téma: **APOPTÓZA**

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. Použitím některých metod pro sledování cytotoxického účinku protinádorových agens můžeme odlišit typ buněčné smrti (např. morfologie jader po fixaci a barvení proprium jodidem, detekce štěpení proteinu PARP). Jiné metody odlišit apoptózu od nekrotické buněčné smrti neumožňují (MTT test, eosin exclusion assay, monitorování cytotoxicity pomocí xCELLigence) a používají se zejména pro stanovení IC₅₀, či LC₅₀, dávky cytotoxické látky, která způsobí 50% inhibici nebo mortalitu.

Materiál:

Buněčná linie: *U937, MDA-MB-231*

Induktory buněčné smrti: *camptothecin, peroxid vodíku, TRAIL*

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 zabarvení. Čím déle buňky žijí (a metabolizují) tím více barvy vyrobí; snížení množství detekované tetrazoliové soli v buňkách je tedy přímo úměrné snížení jejich viability. MTT test lze použít jak na stanovení cytotoxicity látek, tak také např. na určení proliferační aktivity buněk.

Cíl:

V buňkách linie U937 může být buněčná smrt indukována např. camptothecinem (CAM). Určete vhodnou koncentraci camptothecinu pro indukci buněčné smrti u buněk U937 při 24-hodinové kultivaci, konkrétně, jakou koncentraci CAM musíme použít, abychom dosáhli hodnoty IC₅₀, tedy 50% mrtvých buněk po 24 hodinách?

Postup:

1. Vyberte koncentrační řadu CAM k otestování (cca 6 koncentrací)
2. Naředte buňky U937 v médiu (RPMI 1640) do výsledné koncentrace 4×10^5 /ml
3. Napipetujte buněčnou suspenzi po 100 μ l do 96-jamkové destičky, každý vzorek v triplicátu. Nutné kontroly: neovlivněné buňky a čisté médium (blank)
4. Přidejte k buňkám zvolená množství induktoru (CAM)
5. Inkubujte při 37°C/10% CO₂ po dobu 24 hodin
6. Přidejte ke každému vzorku 10 μ l MTT Reagentu a inkubujte 2-4 hodiny při 37°C/10% CO₂
7. Buňky pravidelně sledujte, dokud se v nich neobjeví fialový precipitát

8. Poté přidejte 100 μ 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 triplicátů, odečtěte 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

EOSIN EXCLUSION ASSAY – TEST VIABILITY

Úvod:

Viabilitu buněk je možné stanovit optickou mikroskopií po obarvení buněk eosinem. Do mrtvých buněk barvivo prochází narušenou cytoplazmatickou membránou, živé buňky zůstávají nezbarveny. Tímto testem nelze odlišit apoptózu od jiných forem buněčné smrti.

Cíl:

V buňkách linie U937 může být buněčná smrt indukována např. camptothecinem (CAM). Určete vhodnou koncentraci camptothecinu pro indukci buněčné smrti u buněk U937 při 24-hodinové kultivaci, konkrétně, jakou koncentraci CAM musíme použít, abychom dosáhli 50% mrtvých buněk po 24 hodinách?

Postup:

1. Vyberte koncentrační řadu CAM k otestování (cca 6 koncentrací)
2. Nařed'te buňky U937 v médiu (RPMI 1640) do výsledné koncentrace 4×10^5 /ml
3. Napipetujte buněčnou suspenzi po 2 ml do 6-jamkové destičky. Nutná kontrola: neovlivněné buňky. ($0,8 \times 10^6$ buněk / 2 ml = jamku)
4. Přidejte k buňkám zvolená množství induktoru (CAM)
5. Inkubujte při 37°C/10% CO₂ po dobu 24 hodin
6. Ke 20 μ l vzorku (buněčné suspenze) přidejte 20 μ l eosinu (pracovat v rukavicích), inkubujte 5 min při RT.
7. Spočítejte podíl mrtvých (zbarvených) buněk v jednotlivých vzorcích.
8. Určete koncentraci, při které se viabilita buněk snížila oproti kontrole o 50%.

Úloha č.3

FIXACE BUNĚK A BARVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN PROPIDIUM IODIDEM

Úvod:

Buňky 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. Určit typ buněčné smrti indukované v buňkách U937 camptothecinem a peroxidem vodíku.

Postup:

1. Indukovat buněčnou smrt buněk U937 inkubací s camptothecinem, resp. s peroxidem vodíku. (v 5 ml miskách, 2×10^6 buněk)
2. Předem připravit směs složenou z metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1, směs uchovávat v -20°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°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 μl ledové směsi
9. Kápnout jednu kapku na podložní sklíčko a nechat zaschnout
10. Obarvit 10 μl propidium iodidu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$
11. Přikrýt krycím sklíčkem, vyhodnotit pod fluorescenčním mikroskopem procento jader s apoptotickou morfologií

Úloha č.4

MONITOROVÁNÍ CYTOTOXICKÉHO ÚČINKU LÁTEK V REÁLNÉM ČASE - XCELLIGENCE

Úvod:

U buněk adherentních (přisedlých) je buněčná smrt doprovázena ztrátou adheze k podkladu. Tento účinek některých cytotoxických látek můžeme sledovat v reálném čase pomocí systému xCELLIGENCE. Principem této metody je kontinuální zaznamenávání signálu, který vytvářejí buňky kontaktem s elektrodami na dně kultivační jamky. Čím více buněk je v kontaktu s elektrodami a čím silněji tyto buňky adherují, tím vyšší signál změříme. Po přidání cytotoxické látky buňky postupně ztrácejí kontakt s pokladem, což pozorujeme jako pokles signálu (buněčného indexu).

Cíl:

Sledovat závislost mezi koncentrací buněk a intenzitou signálu (buněčným indexem). Pozorovat změnu signálu po přidání induktoru apoptózy (TRAIL).

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit buňky do výsledné koncentrace $4 \times 10^4/\text{ml}$, $1 \times 10^5/\text{ml}$, $2 \times 10^5/\text{ml}$, $4 \times 10^5/\text{ml}$ v médiu RPMI bez glutaminu.
2. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100 ul média RPMI bez glutaminu, změřit background.
3. Do jamek destičky (E-plate) přidat 50 ul buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 2000, 5000, 10 000, 20 000). Začátek měření.
4. Následující den přidat k vybraným jamkám TRAIL o vhodné koncentraci, naředený v RPMI bez glutaminu, v objemu 50 ul. Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.
5. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na počtu buněk, resp. přítomnosti cytotoxické látky.

Úloha č.5

DETEKCE ŠTĚPENÍ PROTEINU PARP POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

Úvod:

V průběhu apoptózy dochází k aktivaci efektorových kaspáz, jejichž substrátem je mimo jiné poly(ADP-ribose) polymeráza (PARP). Specifický fragment proteinu PARP (89 kDa) vznikající štěpením kaspázami lze detekovat westernovým přenosem pouze v apoptotických buňkách.

Cíl:

Potvrdit hypotézu o typu buněčné smrti indukované v buňkách U937 camptothecinem a peroxidem vodíku. Použít vhodné koncentrace CAM a EtOH k indukci buněčné smrti a ověřit, zda v buňkách dochází k apoptotickému štěpení proteinu PARP (kromě neštěpené formy o hmotnosti 116 kDa, lze detekovat také 89 kDa fragment).

Postup:

Příprava vzorků:

Indukovat buněčnou smrt buněk U937 vhodnou koncentrací CAM a H₂O₂. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20 °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 naředených 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 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.

Příprava gelu:

5. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
6. Sestavit skla se spacersy a sevřít je svorkami.

7. 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.
8. 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:

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

Sestavení blotovací aparatury:

9. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
10. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
11. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrům černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
12. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
13. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
14. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
15. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastikové svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrům a chladítkem.
16. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

13. 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.
14. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-PARP ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
15. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
16. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou (anti-rabbit IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
17. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
- 18.** Opláchneme membránu v destilované vodě.
19. Membránu inkubujeme ve vyvolávacím roztoku (10 ml AP pufru, 33 ul NBT, 83 ul BCIP)

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

Pufř pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl
50 ul 1M MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)

H₂O 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)

H₂O 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 pufř

6,9 ml H₂O
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-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB

Téma: ANALÝZA FUNKČNÍCH ZMĚN PROVÁZEJÍCÍCH DIFERENCIACI BUNĚK MYELOMONOCYTÁRNÍ ŘADY

Úvod:

Expres protoonkogenu *c-myb* je typická pro nezralé krevní buňky a pro jejich transformované varianty, přispívá k jejich aktivní proliferaci a zablokování terminální diferenciace. S průběhem diferenciace krevních buněk postupně klesá. Expres onkogenu *v-myb* je typická pro kuřecí monoblasty BM2, které byly transformované virem ptačí myeloblastózy. Existují určité chemické látky, které dokážou zastavit proliferaci a vyvolat diferenciaci nejen buněk promonocytárních buněk U937, ale i buněk BM2 a dalších buněčných linií myeloidní řady. Podobný účinek může rovněž vyvolat zvýšená exprese 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 U937 a BM2 .

Úloha č.1

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 5 ml roztoku 36 µl konc. HCl a 500 µl Triton X)

Postup:

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

Úloha č.2

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 2×10^6 buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných trichostatinem A spolu s 10 ul 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 μ l)
7. 3 μ 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 μ l kuliček na 10 ml misku
3. Dodržovat stejně dlouhou dobu kultivace s beadsy, aby bylo možné srovnání
4. Na sklíčko nenášet víc než 3 μ l, jinak se barva příliš zředí

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 U937 mohou být stimulovány k diferenciaci na makrofágy prostřednictvím forbolového esteru (PMA).

Postup:

1. Buňky U937 kultivujte za přítomnosti PMA (150nM) po dobu 48 hodin.
2. Buňky spočítejte na hemocytometru (buňky které adherují k podkladu převedte do suspenze pomocí 1 mM EDTA v PBS), 1×10^5 buněk přeneste do zkumavky, centrifugujte 400g/5 min a resuspendujte ve 100 μ l PBS.
3. Vzorky přeneste do cytocentrifugačních kyvet, centrifugujte 4 minuty při 500g.
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.

Úloha č.4

DETEKCE PROTEINU c-MYB POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

Příprava vzorků:

Indukovat diferenciaci buněk U937 vhodnou koncentrací forbolového esteru PMA. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 mikrotdestičku 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 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.

Příprava gelu:

9. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
10. Sestavit skla se spacersy a sevřít je svorkami.
11. 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.
12. 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:

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

Sestavení blotovací aparatury:

17. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
18. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
19. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
20. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
21. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
22. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
23. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
24. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

20. 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.
21. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-Myb ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
22. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
23. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
24. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
25. Opláchneme membránu v destilované vodě.
26. Membránu inkubujeme ve vyvolávacím roztoku (10 ml AP pufru, 33 ul NBT, 83 ul BCIP)

Použité roztoky

<u>Transferový pufr:</u>	<u>TBS:</u>	<u>TBS-Tween:</u>
48 mM Tris	50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0	přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS
39 mM glycin	57,6 ml 5M NaCl	
20%methanol	doplnit vodou do 2 litrů	

<u>Odbarvovací roztok:</u>	<u>Tris-glycin elektroforetický pufr (ph=8,3):</u>
500 ml metanolu	25 mM Tris
400 ml destilované vody	250 mM glycine
100 ml kyseliny octové	0,1% (w/v) SDS

<u>Pufr pro alkalickou fosfatázu:</u>	<u>Barvicí roztok: (barvení proteinů)</u>
1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl	2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku
50 ul 1M MgCl ₂	
doplnit destilovanou vodou do 10ml	

<u>Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)</u>	<u>Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)</u>
H ₂ O 4,9 ml	H ₂ O 5,62 ml
40% Akrylamid 2,4 ml	40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml	1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 0,1 ml	10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 75 ul	Ammonium persulfate 30 ul
TEMED 7,5 ul	TEMED 10 ul

2xCSB lyzační pufr

6,9 ml H₂O
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-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB