

# Moderní metody buněčné biologie 2013

## Průběh výuky na Oddělení cytokinetiky

Studenti budou seznámeni s provozem molekulárně biologické laboratoře na Oddělení cytokinetiky. Nejprve získají teoretický přehled o dostupných metodikách a vybavení laboratoře. Následně se budou prakticky podílet na přípravě a měření vzorků pomocí vybraných metod (viz níže). Studenti si vypracují protokol ke své práci, který bude součástí výstupu Moderních metod buněčné biologie.

Náplň cvičení:

1. **Komplexní seznámení studentů s metodami a přístrojovým vybavením** laboratoře buněčné a molekulární biologie – Prof. J. Hofmanová – v posluchárně
2. Rozdělení studentů do 3 skupin. Studenti se v těchto skupinách postupně prostrídají.
  1. skupina - Diferenciace epiteliálních buněk (Mgr. Z. Tylichová)
  2. skupina – Izolace RNA (Mgr. J. Svobodová)
  3. skupina – Průtoková cytometrie (Dr. N. Straková, Mgr. O. Zapletal)

### 1. skupina - Diferenciace epiteliálních buněk (Mgr. Z. Tylichová)

Stanovení diferenciace nádorové buněčné linie kolonu HT-29 po působení butyrátu sodného NaBt pomocí kolorimetrického stanovení alkalické fosfatázy. Alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení. Následně naměřená absorbance je přímoúměrná množství alkalické fosfatázy a tedy míře diferenciace epiteliálních buněk kolonu.

### 2. skupina - Izolace celkové RNA z kultivovaných buněk (Mgr. J. Svobodová)

Izolace celkové RNA bude provedena pomocí kitu NucleoSpin RNA II. Adherentně rostoucí buňky budou lyzovány na misce, následně bude provedeno přečištění vzorku, odstraněna kontaminující DNA. Přečištěná RNA bude eluována a stanovena koncentrace a přibližná čistota pomocí spektrofotometru Nanodrop.

### 3. skupina – Průtoková cytometrie (Dr. N. Straková, Mgr. O. Zapletal)

Nejprve bude provedeno stanovení počtu a viability nádorových buněk kolonu DLD-1 po působení nenasycené n-3 mastné dokosahexaenové kyseliny (DHA). Studenti si připraví vzorky a stanoví počet, viabilitu, velikost buněk, agregační faktor, apod. pomocí počítáče částic CASY. Následně si vzorky obarví pomocí selektivní fluorescenční barvy Nile Red, která barví intracelulární lipidové kapénky červeně. Detekce lipidových dropletů bude provedena na průtokovém cytometru srovnáním posunu mediánu fluorescence ovlivněných buněk ve srovnání s kontrolou v Nile Red Blue 527/32 kanálu.

V době inkubací jednotlivých praktických kroků v daných skupinách studenti dále ještě uvidí:

3. Vybavení laboratoře oddělení cytokinetiky, vysvětlení základů *in vitro* kultivace buněk a provozu **laboratoře tkáňových kultur**, obsluha flow boxu, typy plastů, typy pipet, pasážování buněk (Mgr. Z. Tylichová)
4. Ukázka **Western blot analýzy** (Mgr. O. Zapletal) – analýza exprese vybraných proteinů
5. Seznámení s **fluorescenční mikroskopii** (Mgr. J. Lauková) - **Barvení jader pomocí DAPI** (fluorescenční detekce apoptotických buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem).