

Moderní metody buněčné biologie 2013

Úkol č.1 - Stanovení počtu a viability buněk

Připravená buněčná linie byla kultivována na 40 mm kultivačních miskách v inkubátoru při teplotě, vlhkosti 95% a Počet buněk a jejich viabilita byly stanoveny pomocí přístroje CASY.

Princip detekce:

Princip měření je založen na základě

Vzorky :

Buněčná linie (doplňte):.....

1.

2.

Čas:

Postup:

1. Popsat zkumavky pro sběr vzorků.
2. Sebrat medium do příslušných zkumavek.
3. Přidat 1 ml PBS/EDTA do každé misky, sebrat do zkumavky.
4. Buňky uvolnit trypsinem (800 μ l, cca 3 min).
5. Neutralizace trypsinu pomocí média ze zkumavek.
6. Oplach misek cca 1ml PBS.
7. Vzorky zcentrifugovat (200 g/5 min).
8. Odsát supernatant.
9. Peletu důkladně resuspendovat v 1ml PBS.
10. Přidat ještě 2 x 1 ml PBS.
11. 20 μ l suspenze buněk odkápnout do kyvetky s 10 ml hemasolu.
12. Otáčením kyvetu promíchat.
13. Spočítat buňky v kyvetě na počítači částic CASY v příslušném programu pro naši buněčnou linii.
14. CASY proměří i viabilitu a další parametry.
15. Výsledky zapsat do tabulky

Výsledky:

buněčná linie	vzorek	počet živých buněk/ml	počet živých buněk

buněčná linie	vzorek	viabilita	agregace	velikost	objem

Závěr:

.....

Úkol č.2 - Detekce lipidových dropletů v cytoplasmě buněk pomocí Nile Red

Lipidové droplety (LD) jsou malé tukové kapénky uvnitř buňky. Tyto částice jsou syntetizovány na endoplasmatickém retikulu a jsou tvořeny monovrstvou fosfolipidů, která uvnitř obsahuje neutrální lipidy (triacylglyceroly, estery cholesterolu) jako zdroj energie a signálních molekul pro buňky. S LD jsou spojeny i některé specifické proteiny. LD mají důležitou funkci v udržení lipidové homeostázy, lipidovém metabolismu a vnitrobuněčném signálování. Lipidy uložené v LD jsou hydrolyzovány a mohou být využity pro β -oxidaci, syntézu membrán, modifikaci proteinů či tvorbu signálních molekul a jiných lipidových produktů. Zvýšená akumulace LD byla detekována v zánětlivých a nádorových buňkách.

Princip detekce:

Lipidové droplety jsou detekovány pomocí (FACS VERSE) s využitím Nilské červeně - Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo(alpha)phenoxazine-5-one). Jedná se o selektivní fluorescenční barvu, která barví vnitrobuněčné lipidové kapénky červeně. S rostoucím množstvím lipidových kapének sefluorescence.

Vzorky :

Buněčná linie (doplňte):.....

1.

2.

Čas:

Postup:

1. Vzorky opláchnout PBS/EDTA, rozvolnit a uvolnit trypsinem. Vzorky zcentrifugovat (200 g/5 min) a spočítat na přístroji CASY.
2. Vzorek centrifugovat (200 g, 5 min).
3. Odsát supernatant.
4. Přidat 3 ml PBS, opět centrifugovat (200g, 5min).
5. Supernatant odsát.
6. Poté přidat 450 μ l PBS a 50 μ l zředěné barvy Nile Red (ředění: 1 μ l do 1 ml , tzn. ředění).
7. Barvené buňky inkubovat 5 min ve tmě při teplotě a následně změřit fluorescenci pomocí FACS VERSE.
8. Analyzovat posun mediánu ovlivněných buněk ve srovnání s kontrolou v Nile Red Blue 527/32 kanálu.

Výsledky:

buněčná linie	vzorek	medián

Závěr:

.....
.....

Otázky a úkoly:

1. Jaké parametry lze měřit pomocí počítače částic CASY? Uveďte alespoň 3.

.....

2. Jak se rozeznají mrtvé a živé buňky pomocí „dye exclusion assay“?

.....

3. Co je a co lze měřit pomocí Nile Red?

.....