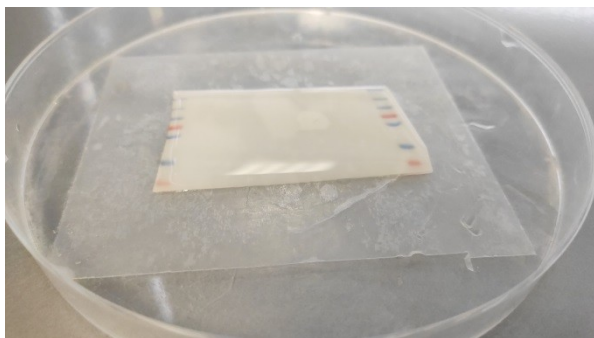


# 1. Western blott

- Po rozobratí blotovacieho „sendviča“ sa membránka inkubovala 1 hodinu v 5% mlieku (prášok rozpustený v roztoku TBS-Tween)
- Následne sa na membránku nakvapala primárna protilátka anti PARP nariedená v mlieku (finálne riedenie 1:1000), inkubácia cez noc pri 4°C

Pozn.: aby nám roztok s protilátkou držal pekne na membráne, dávame membránu do misky, ktorá je potiahnutá parafilmom, vid' obrázok:

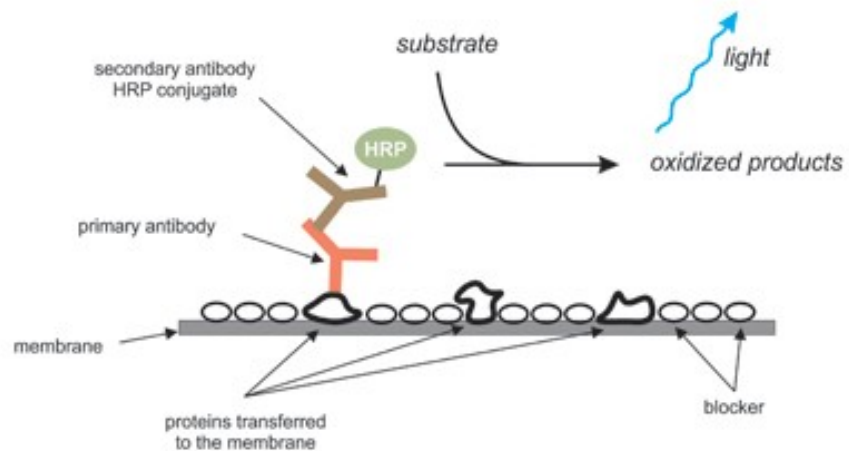


- Na druhý deň (streda) bol z membrány odmytý roztok s protilátkou 3x5 minút na trepačke:

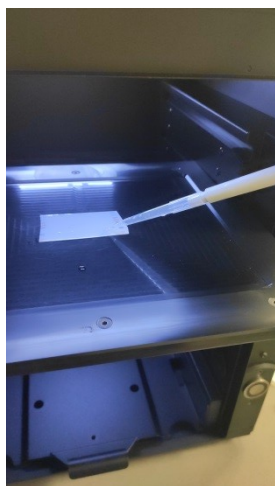
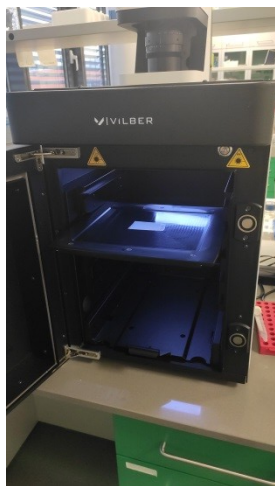


- Následne bola membrána inkubovaná na trepačke 1 hodinu v roztoku mlieka so sekundárnou protilátkou (obdobne ako obrázok vyššie). A potom premytá 3x5 min ako po primárnej protilátke. Nasleduje detekcia, kde je protilátka naviazaná.

# 1. Western blott

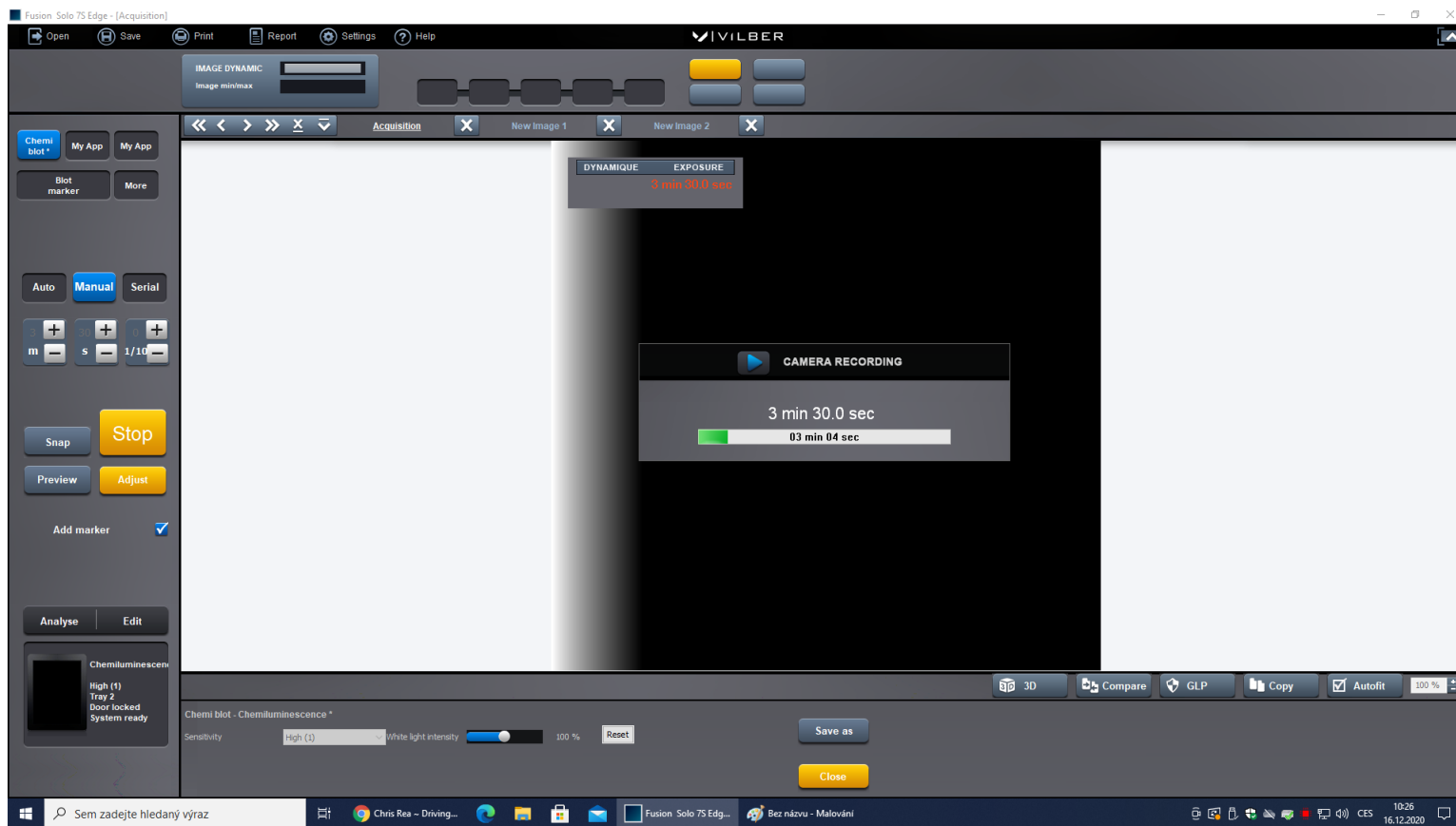


My používame chemiluminiscenčnú detekciu a snímame signál pomocou prístroja Vilber – čo je vlastne vysoko citlivá kamera, ktorú ovládame počítačom. Membránku vložíme na podložku do prístroja a nakvapeme naň substrát pre alkalickú fosfatázu, ktorá je konjugovaná so sekundárnou protilátkou. V mieste, kde je sekundárna protilátka (=aj primárna protilátka=aj cieľový proteín PARP), vznikne svetelný signál, ktorý nasníma kamera. A môžeme obdivovať, kde to svietilo viac a kde menej 😊



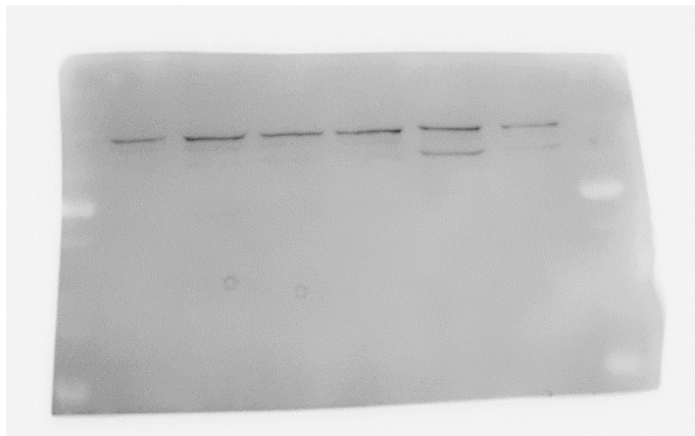
# 1. Western blott

Vilber software vyzera takto – zvolíte si, buď nech ideálnu expozíciu spočíta sám alebo si ju zvolíte sami – ja som zvolila 3,5 minúty. Sníma najskôr signál protilátky, potom urobí obyčajnú fotografiu membrány – aby sme videli, veľkostný marker a potom urobí prekryv týchto fotiek a vznikne krásny obrázok 😊



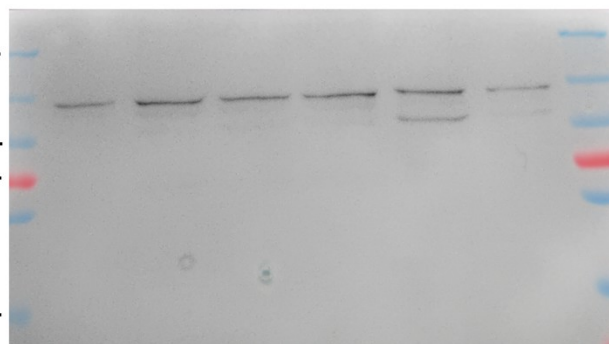
# 1. Western blott

Výsledok:



kDa

250 -  
130 -  
100 -  
70 -  
55 -  
35 -



PARP 116 kDa

štěpený PARP 89 kDa

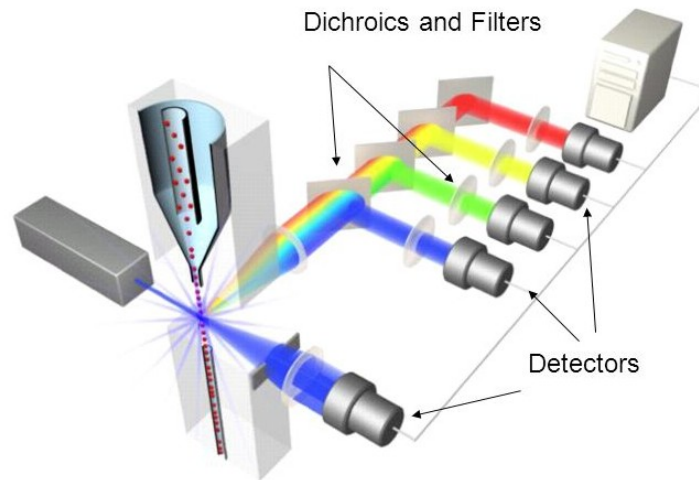


Bohužiaľ neviem, v akom poradí boli vzorky,  
to si prosím doplňte do prezentácie ☺

## 2. Cytometer – Sytox green

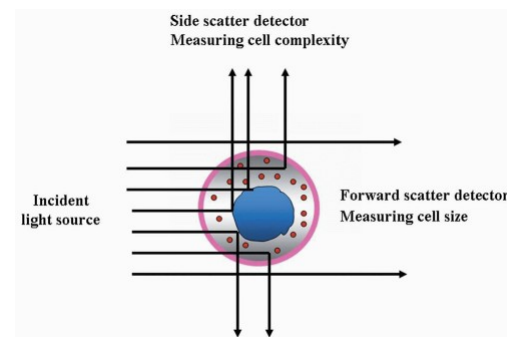
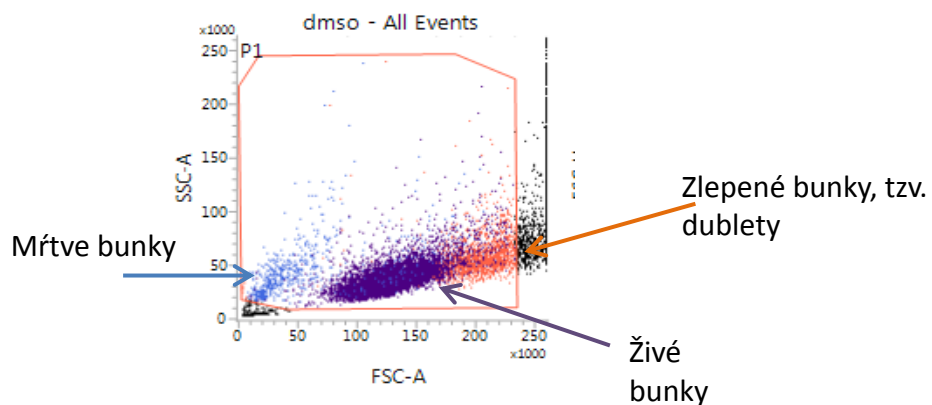
- Bunky sklidené nesterilne, pomocou trypsinu, podobne ako v pondelok (vtedy sme miesto trypsinu používali škrabku)
- Stočené a rozsuspendované v PBS s farbičkou sytox green, ktorá preniká len do mŕtvych buniek, bez ohľadu na to, či prešli apoptózou alebo iným typom bunkovej smrti. Detekcia na cytometru, v kanáli FITC.

Cytometer Optical system comprises:



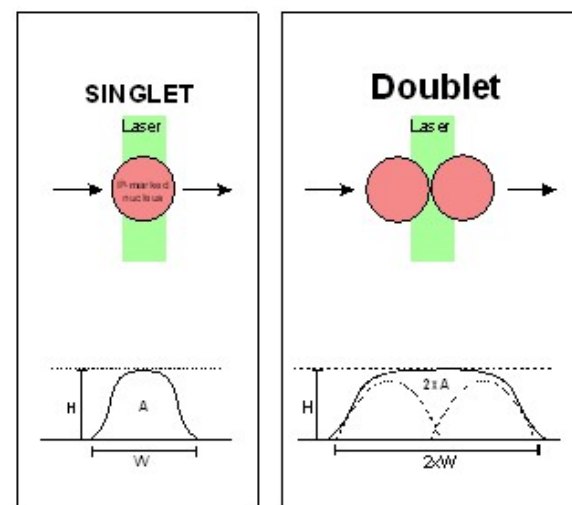
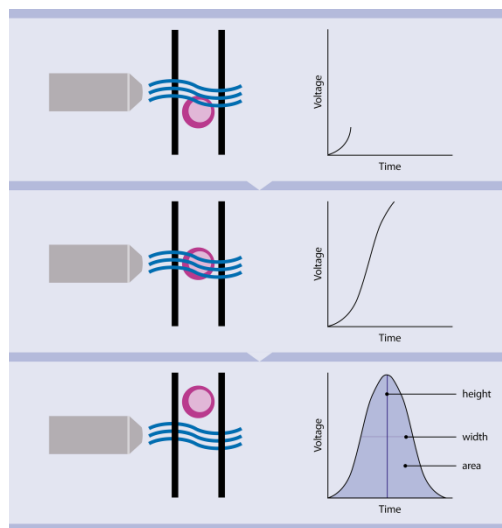
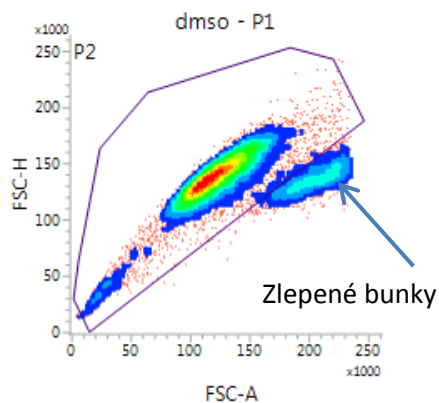
## 2. Cytometer – Sytox green

Výstup zo softwaru:



FSC – forward scatter = veľkosť buniek  
SSC – side scatter = granularita buniek

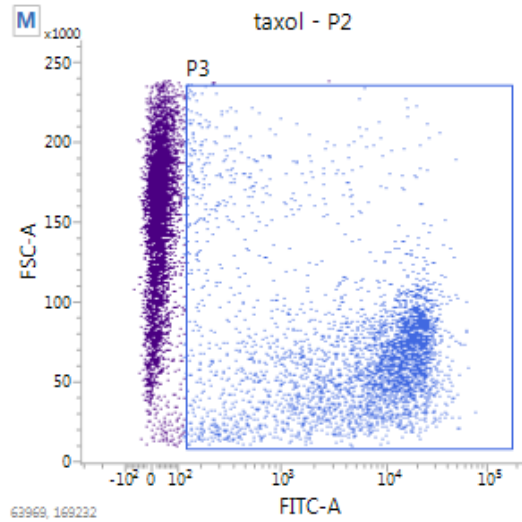
Chceme analyzovať len jednotlivé bunky (bez zlepenov, kde by bola analýza menej presná), preto sa dívame na nasledujúci graf:



Keď bunky cytometer detekuje jednotlivé, medzi každým signálom je pauza, keď pauza chýba (sú tam zlepené bunky), narastá plocha (A) histogramu, pretože signál trvá dlhšie. Ale intenzita signálu je stále rovnaká, preto nenarastá výška (H).

## 2. Cytometer – Sytox green

Analyzujeme 10 tisíc buniek označených ako P2 (single cells, bez zlepenčov).



Cytometer nastavíme tak, aby negatívne bunky mali hodnotu fluorescencie okolo  $10^2$

Bunky s vyššou fluorescenciou sú sytox green pozitívne = mŕtve.

## 2. Cytometer – Sytox green

Výsledok:

Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
dms0:P3	596	5,92	5,07	4,2
etoposid:P3	3 371	33,71	25,61	19,11
cisplatina:P3	625	6,25	5,34	4,39
taxol:P3	3 948	39,48	36,38	25,97
doxorubicin:P3	6 036	60,36	56,92	46,31

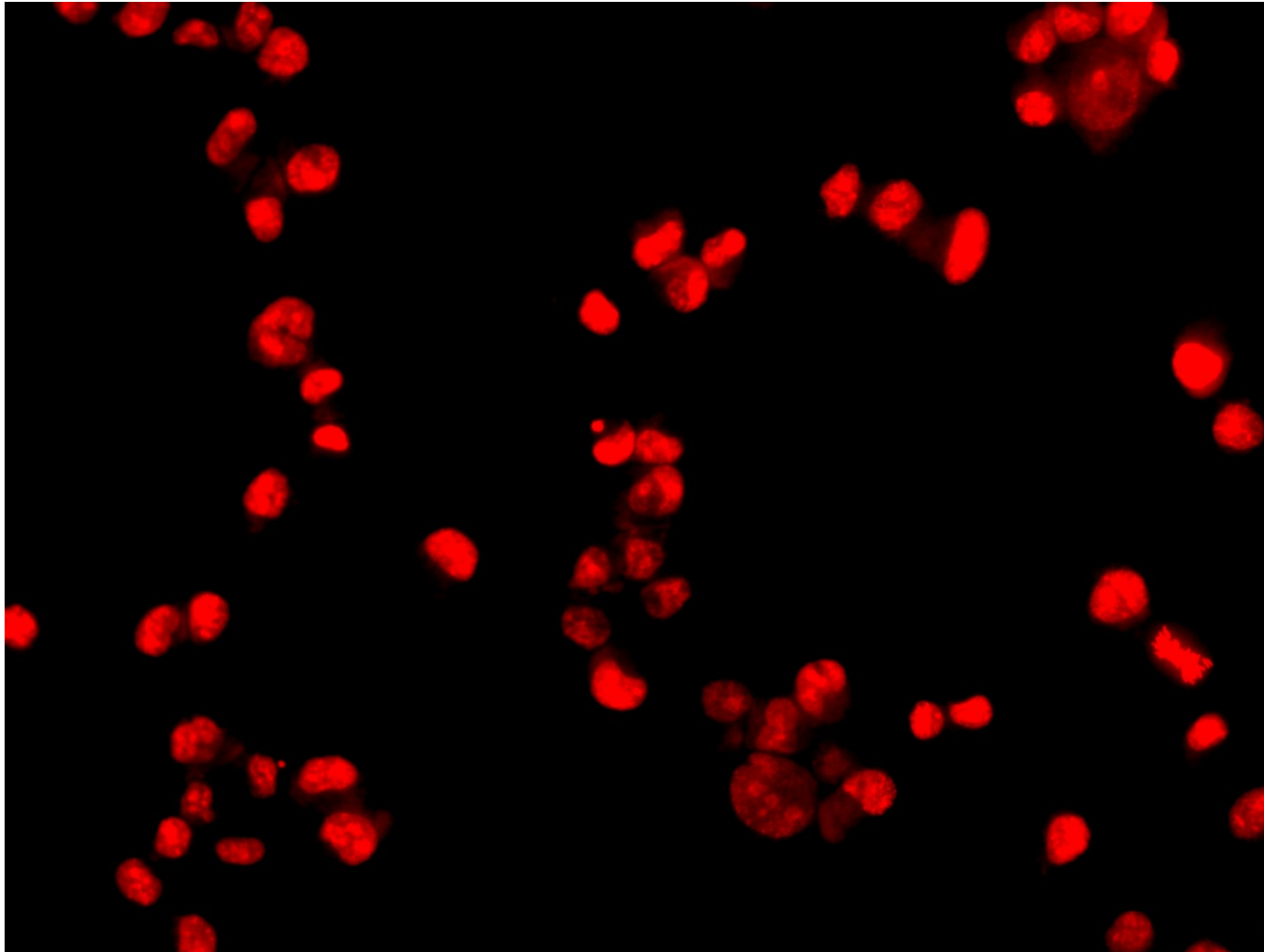
Dívame sa na % parent = % pozitívnych buniek z parentálnej populácie, ktorou sú jednotlivé bunky (single cells)



### 3. Jadrá značené propidium jodidom

Zafixované bunky boli kvapnuté na podložné sklíčko, po odparení fixačného roztoku sa na ne privapal roztok PI, priložilo sa krycie sklíčko a obrázky boli snímané na fluorescenčnom mikroskope.

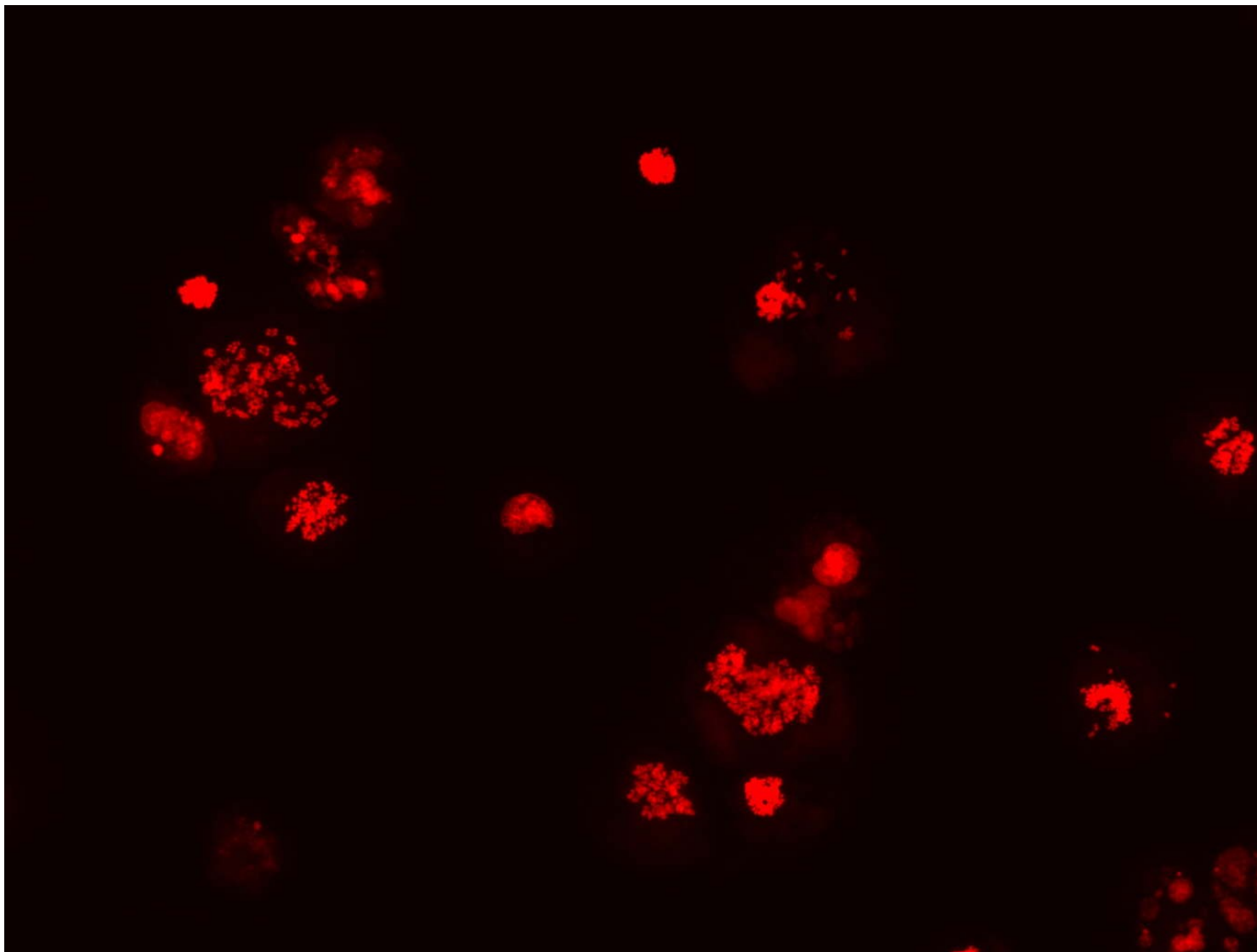
DMSO – pekné celistvé jadrá



Mitóza 😊

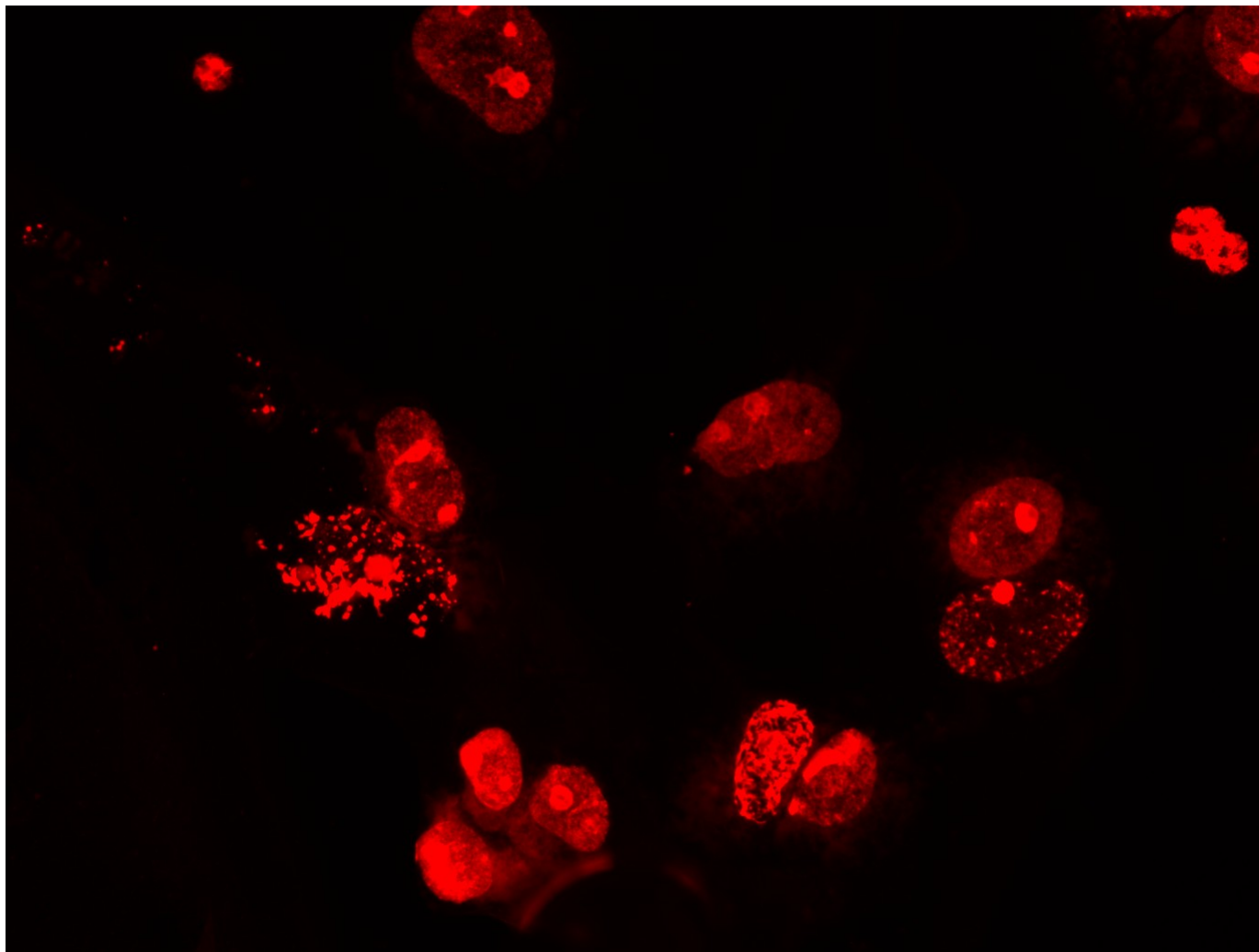
### 3. Jadrá značené propidium jodidom

TAXOL – kondenzované chromozómy z rôznych uhlov pohľadu ☺



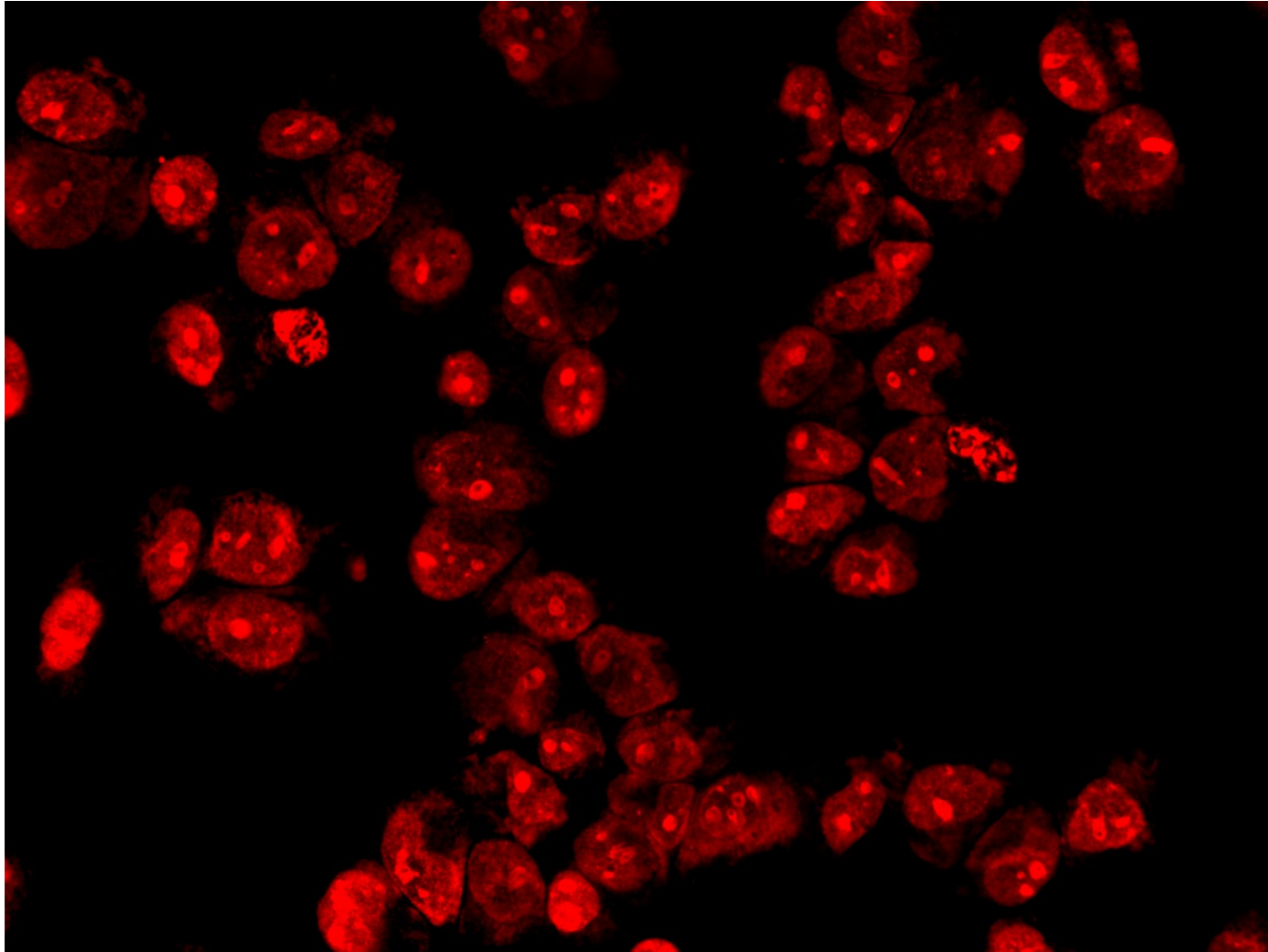
### 3. Jadrá značené propidium jodidom

ETOPOSID – 3 apoptózy



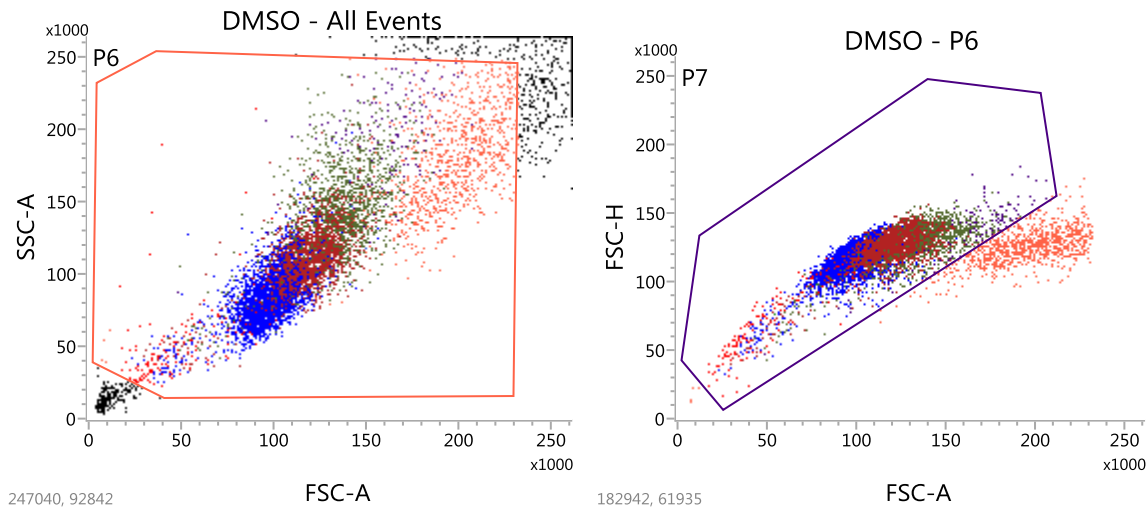
### 3. Jadrá značené propidium jodidom

CISPLATINA – minimálne 2 apoptózy

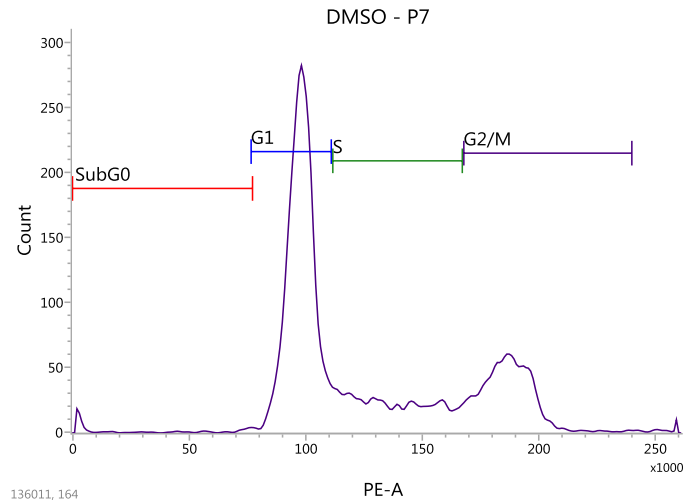


# 4. Cytometer- bunkový cyklus

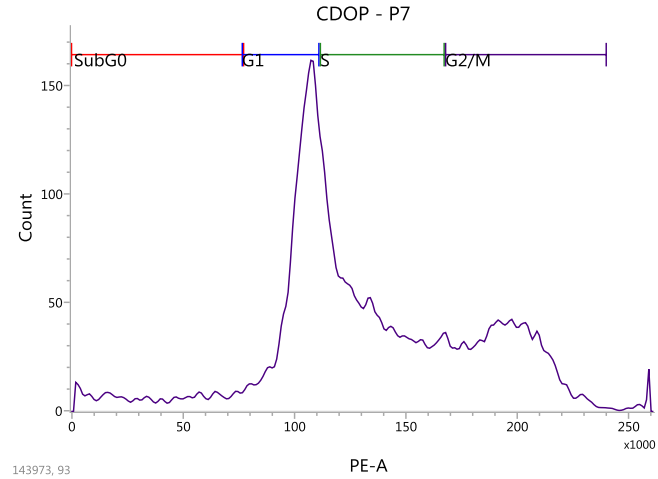
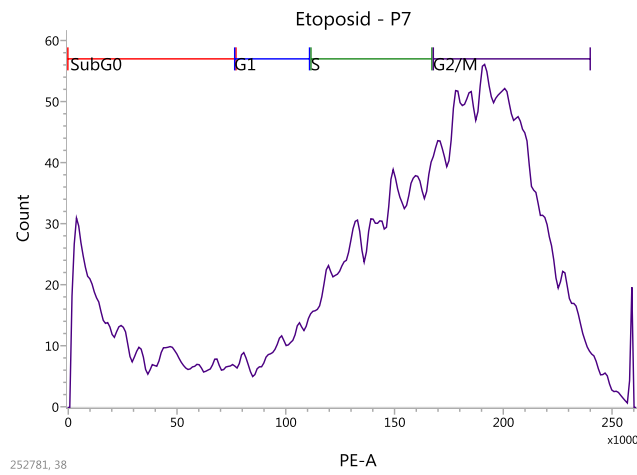
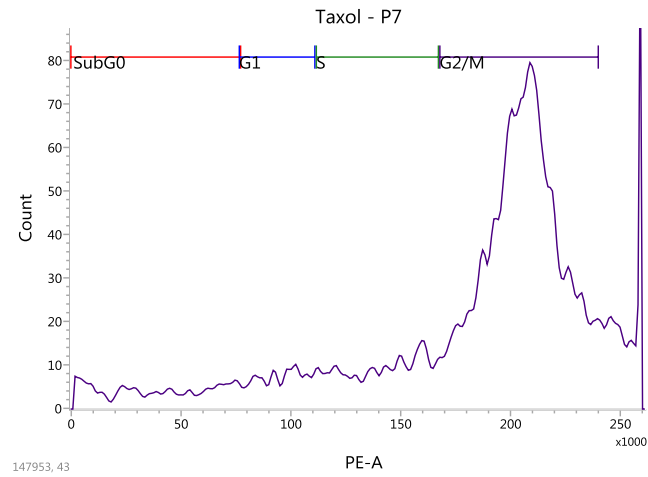
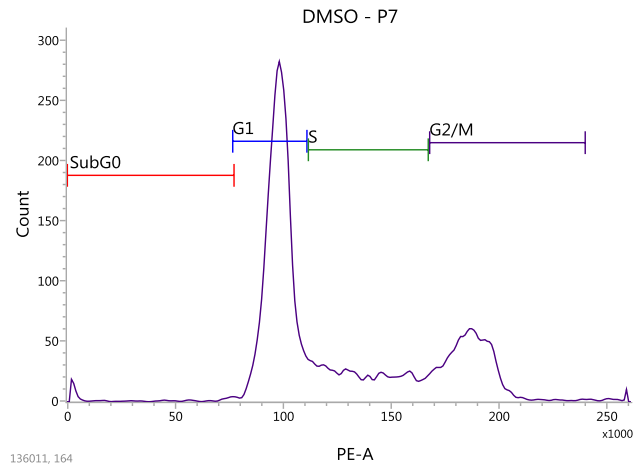
Najskôr vylúčime zlepené bunky z analýzy, podobne ako v úlohe č. 2



Potom sa dívame na signál v kanále PE (bunky sú značené propidium jodidom). Tento krát však nemáme exponenciálnu os, ale lineárnu – DNA sa počas cyklu zdvojnásobuje, tak malý rozdiel by sme na exponenciálnej ose nevideli (naopak, keď je rozdiel fluorescencie vysoký ako u farbenia sytox green, treba mať os exponenciálnu)



# 4. Cytometer- bunkový cyklus



## 4. Cytometer- bunkový cyklus

% buněk	DMSO	Etoposid	Taxol	Cisplatina
SubG0	2,02	14,8	6,71	7,27
G1	53,53	5,51	4,74	28,38
S	19,28	27,63	10,01	36,2
G2/M	22,86	47,72	53,73	24,69

