

Téma: **BUNĚČNÁ DIFERENCIACE**

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. Důsledkem diferenciaci jsou funkční změny buněk, které úzce souvisí se změnami jejich morfologie, proteinového/enzymového vybavení a se změnami proteinových markerů vystavených na jejich povrchu. Cílem této úlohy je osvojení poznatků týkajících se procesů provádějících diferenciaci hematopoietických buněk myeloidní řady a praktická aplikace těchto vědomostí při sledování diferenciaci monoblastů BM2 do monocytů/makrofágů.

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.

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 (merkaptioethanol, dithiothreitol) – disociace proteinových komplexů na podjednotky

Barvení proteinů:

Soli stříbra (nejcitlivější), Coomassie brilliant blue – nespecifická vazba na proteiny

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:

1x10⁶ buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 5ml misce 24/48 hod (od každé varianty 2 misky). Zároveň kultivovat stejné množství BM2 buněk jako kontrolu (stačí jedna miska). 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 minu stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo nanášeno 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 spacery 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 pufrům 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. (jako kontrolu nanášení použij anti-actin protilátku 1:1000).
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 fólií 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.
13. Membránu můžeme následně obarvit nespecificky na proteiny roztokem amidové černi.

Použité roztoky

Transferový pufr:

48mM Tris
39mM glycin
20% methanol

TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0
57,6 ml 5M NaCl
doplňit 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
doplňit destilovanou vodou do 10 ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů na gelu)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku
- pro barvení proteinů na membráně:
1g amidové černi 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-merkaptoethanolu 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 imunoflouescence:

- 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), Flouromont-G (Southern 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 24 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/65min. Buňky opláchnout roztokem PBS a 2×10^5 buněk/600 ul cytocentrifugovat na krycí sklíčko 2000 g/ 6 minut. Sklíčka s buňkami (kontrolními i po kultivaci s TPA) opláchnout v TBS a fixovat předchlazeným metanolem (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 sekundární protilátkou konjugovanou s FITC ředěnou 1:1000 v TBS-Tween. Sklíčka opět

promýt – 2x TBS-Tween a 3x TBS. V prostředním promytí TBS přidat roztok propidium iodidu (10 ug/ml) eventuálně Hoechst33342 (5 ug/ml) – barvení jader.

Nakonec sklíčka opláchneme destilovanou vodou a montujeme na podloží sklíčka 2 ul Mowiolu (montovací medium od firmy Calbiochem). Preparáty pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu s vhodným emisním a excitačním filtrem pro FITC a PI.

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

4x10⁵ buněk 143B 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 oranž (5ug/ml – 1ul na 1ml PBS) a Hoechst33342 (5 ug/ml – 1ul na 1ml PBS). Sklíčka opláchnout PBS a umístit na podložní sklíčko do 2 ul PBS. Pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem.

Úloha č.3

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). Makrofágové jsou schopni tyto kuličky fagocytovat a počet fagocytovaných kuliček jednotlivými buňkami lze vyhodnotit pod mikroskopem.

Postup:

1. V 5 ml média kultivujte 1×10^6 buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných forbolovým esterem TPA spolu s 6 μ l směsí Dynabeads M-270 Epoxy.
2. Buňky indukované TPA na jedné misce propláchněte EDTA/PBS a vyfotografujte pod mikroskopem. Vyhodnoťte počty fagocytovaných kuliček (min 200 buněk).
3. Do zkumavky s 3 ml Histopaque přeneste suspenzi kontrolních buněk – nalévat po stěně, aby se vrstvy nepromíchaly
4. Cfg na centrifuze s výkyvným rotorem (Heraeus) 400g/20-30 min
5. Buňky vytvoří bělavý prstenec. Vrstvu nad ním opatrně odsajeme, fázi s buňkami odebereme do nové zkumavky a promyjeme 5 ml 1x PBS/EDTA
6. Pelet resuspendujeme v malém množství PBS (podle jeho velikosti...přibližně v 5-10 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. Poměr buňky:beads je 1:5.
2. Dodržovat stejně dlouhou dobu kultivace s kuličkami, aby bylo možné srovnání

Úloha č.4

NBT TEST

Úvod:

Proces fagocytózy je provázen 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)

Postup:

1. V 5 ml média kultivujte 1×10^6 buněk BM2 po dobu 72 hodin indukovaných a neindukovaných kombinací okadaické a retinové kyseliny.
2. 2×10^6 viabilních buněk z kultivační misky centrifugovat při 200g
3. Opatrně odsát supernatant
4. Sediment rozsuspendovat ve 400 µl DMEM bez séra, přidat 200 µl NBT v PBS/PMA (roztok 2)
5. Lehkým protřepáním rozsuspendovat buňky
6. Inkubovat v termostatu (37°C) dokud se neobjeví tmavé zbarvení.
7. Centrifugovat 10 minut 500 g, buňky suspendovat ve 100 ul DMSO.
8. Centrifugovat 5 minut, 20.000 g.
9. Supernatant přepipetovat na mikro-titrační destičku.
10. Změřit absorbanci na ELISA-readeru při 570 nm proti DMSO jako blanku.

Úloha č.5

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 – post-translačními modifikacemi, 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. Jedním z možných způsobů stanovení aktivity libovolného TF je přechodná transfekce reportérového plazmidu a následné měření aktivity reportérového genu v buněčných lysátech.

Reportérový plazmid:

Plazmid obsahující reportérový gen (nejčastěji luciferáza) 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 2 mikrozkušavky napipetovat po 100 μ l média OPTI-MEM, do jedné přidat směs plazmidových DNA sestávající se z 1 μ g RARE β 2-TK-LUC a 1 μ g CMV- β -gal, k nim přidat 2 μ l *Plus reagentu* a promíchat. Inkubovat 10 minut. Do druhé mikrozkušavky přidat 4 μ l transfekčního činidla *Lipofectamine LTX*, lehce promíchat a inkubovat 3 minuty. Poté smíchat směsi z obou mikrozkušavek a inkubovat 20-30 minut při pokojové teplotě.
2. Přikapat tuto směs ke 4×10^6 buňkám BM2 ve 4 ml kompletního média. Inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
3. Druhý den buňky rozdělit na dvě 5ml misky, přidat 5 μ l 10⁻³M kyseliny retinové a inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
4. Buňky sklídit, opláchnout v PBS a resuspendovat ve 70 μ l 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 rozmražení centrifugovat buněčný lysát 5 minut při max. otáčkách v chlazené mikrocentrifuze.
3. Přenést supernatant buněčného lysátu 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 μ l buněčného lysátu a inkubujte při 37°C se neobjeví žlutavé zbarvení.

6. 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-merkaptóetanol

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.6

STANOVENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU NFAT V JÁDRĚ BUNĚK BM2 PO PŮSOBENÍ IONOMYCINU

Úvod:

Kromě mikroskopických technik lze pro stanovení lokalizace určitého proteinu v buňkách použít i metody tzv. buněčné frakcionace. Tyto metody spočívají v separaci jednotlivých frakcí buněk na základě jejich specifických vlastností (velikost organel, jejich vznášivá hustota při ultracentrifugaci v gradientu, odolnost vůči působení detergentů nebo jiných specifických látek, působení hypotonických/hypertonických roztoků ...). V dnešní době již existuje celá řada postupů pro oddělení cytoplazmy, jader, mitochondrií, lysozomů a dalších buněčných frakcí.

Cíl:

Cílem této úlohy je stanovení množství transkripčního faktoru NFAT1 v jádrech buněk BM2 ovlivněných/neovlivněných ionomycinem.

NFAT1 je transkripční faktor, který je udržován v cytoplazmě buněk ve fosforylované formě. Po zvýšení cytoplasmatické koncentrace vápenatých iontů, dochází k aktivaci fosfatázy kalcineurin, která defosforyluje u proteinu NFAT1 serinové zbytky ve specifických sekvencích. Tato defosforylace vede následně ke konformační změně proteinu NFAT1 a k odhalení signálu pro translokaci do jádra. Defosforylovaný NFAT1 je následně translokován do buněčného jádra. Pro zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů využijeme ionofor ionomycin (zvýšený transport vápenatých iontů do buněk).

Postup:

a) příprava buněk:

5×10^6 buněk BM2 zvýšeně exprimující protein NFAT1 inkubovat ve dvou 5ml miskách. Přidat k jedné misce 1 μM ionomycin + 1mM CaCl_2 a k druhé DMSO jako solvent.

b) frakcionace:

- 1) Odeberte veškeré médium s buňkami z misky a buňky centrifugujte 5 min, 300 g, 4 °C. Odstraňte médium.
- 2) Rozsuspendujte buňky v 1 ml PBS.
- 3) Centrifugace 4 min, 300 g, 4 °C. Odstraňte PBS.
- 4) Rozsuspendujte buňky ve 200 μl TMK.
- 5) Přidejte 150 μl TMK + 1% NP-40.
- 6) Inkubujte na ledu 5 min, občas krátce jemně promíchejte pomocí vortexu.
- 7) Centrifugace 5 min, 250 g, 4 °C.
- 8) Odeberte supernatant (cytoplasmatická frakce).
- 9) Pelet (jádra) rozsuspendujte v 500 μl S1 pufu.
- 10) Naneste S1 s jádry na 500 μl S2 pufu.
- 11) Centrifugace 5 min, 1400 g, 4 °C.
- 12) Odstraňte supernatant.
- 13) Rozsuspendujte pelet buněčných jader ve 50 μl PBS a poté lyzujte přidáním 50 μl bezbarvého 2x CSB lyzačního pufu.

Změř koncentraci proteinů v obou vzorcích pomocí DC Protein Assay Kitu a proved' elektroforézu proteinů a immunobloting se specifickou protilátkou proti proteinu NFAT1. Membránu následně obarvi nespecificky na proteiny roztokem amidové černi.

Roztoky:

TMK (finální koncentrace)

25 mM Tris-HCl pH 7,4

5 mM KCl

1 mM MgCl₂

destilovaná voda

TMK + 1% NP-40 (2 ml)

1.8 ml TMK

200 µl 10% NP-40

S1 pufr

0.25 M sacharóza

10 mM MgCl₂

S2 pufr

0.35 M sacharóza

0.5 mM MgCl₂

Úloha č.7

**STANOVENÍ ZMĚN PRŮBĚHU BUNĚČNÉHO CYKLU BĚHEM DIFERENCIACE BUNĚK
BM2 VYSTAVENÝCH TPA**

Úvod:

Během diferenciac buněk dochází k zástavě buněčného cyklu. Tuto změnu lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem pomocí průtokového cytometru FACSVersé. Propidium jodid je interkalující barvivo, které se váže k DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (> 560 nm). Množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se nacházejí.

Cíl:

Zjistit v jakým způsobem ovlivňuje TPA průchod buněk BM2 buněčným cyklem.

Postup:

1. Čtyři 5ml misky s 1×10^6 buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 24 hod. Zároveň kultivovat dvě 5ml misky s 1×10^6 buněk BM2 jako kontrolu.
2. Po 24/48 hod působení, odsát médium, sklídit buňky roztokem trypsinu, centrifugace 500g/5min
3. Buňky promýt 1xPBS
4. Pelet rozsuspendovat v 0,5 ml PBS a přikapat 4 ml vychlazeného 70% etanolu
5. Fixace min. 30 min v 4°C (lze i přes noc v lednici)
6. Centrifugace 290g/5 min, odsát supernatant
7. Promýt 4 ml 1xPBS

8. Rozsuspendovat v mikrozkuhavce v 500 ul Vindelova roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu) – spojte vzorky s TPA do jednoho vzorku a kontroly do druhého..
9. Barvit 30 min, 37°C, v temnu
10. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem