

- **0.1% gelatine**, prasečí želatina (porcine skin gelatine) v destilované vodě, MQ kvality, autoklavováno (sterilita + rozpuštění želatiny)
- **EB**, embryoidní tělíska (EB - embryoid bodies), plovoucí trojrozměrné sférické kolonie diferenciuujících EC nebo ES buněk
- **ES buňky**, pluripotentní embryonální kmenové (ES - embryonic stem) buňky odvozené z vnitřní buněčné masy blastocysty
- **DMSO**, dimethylsulfoxide, organické rozpouštědlo
- **ITS médium**, serum-free medium, DMEM : F12 media (1 : 1) + ITS supplement (insulin, transferin, selen)) + 1x antibiotika (penicilin/streptomycin, 100x SS)
- **ES médium**, DMEM + 16% séra (telecí fetální) + 1x antibiotika (penicilin/streptomycin, 100x SS) + 1x NEAA (100x SS) + 0.05 mM β -merkapt ethanol (7 μ L / L)
- **MTT** (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan), MTT stock solution, 2.5 mg MTT na 1 ml PBS
- **MTT extrakční pufr**, 10% Triton X-100 + 0.1 M HCl
- **PBS**, fosfátový pufr pro tkáňové kultury, 8 g NaCl + 0.2 g KCl + 0.2 g KH_2PO_4 + 2.16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (2.88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) na 1L MQ vody, pH 7.4
- **RA**, kyselina retinová - all-trans retinoic acid, zásobní roztok 5-15 mM v EtOH, pracovní zásobní roztok 50-100 μ M v PBS
- **SDS lyzační pufr**, 1% SDS, 100mM Tris pH 6.8, 10% glycerol
- **TC plastik**, plastik pro tkáňové kultury (TC – tissue culture)
- **Kit na stanovení ATP a luciferázové aktivity**
- Vhodné plasmidy a PEI (transfekční roztok)

TRYPSINIZACE ADHERENTNÍCH BUNĚK = PŘEVOD ADHERENTNÍCH BUNĚK DO SUSPENZE, PASÁŽOVÁNÍ

- 1) odsaj růstové médium a opláchni buňky PBS (stačí stejný objem jako byl růstového média)
- 2) přidej pracovní roztok trypsin (0.25 %) / EDTA tak, aby udělal tenkou vrstvu na dně kultivační misky (pro misku o průměru 60 mm 350 – 500 μ l, pro misku o průměru 100 mm 700 – 1000 μ l).
- 3) můžeš dát tuto misku do termostatu a nebo při R.T. přímo pozorovat uvolňování buněk od podkladu. Buňky by měly v trypsinu být tak 3 – 5 minut.
- 4) k uvolněným buňkám přidej kompletní růstové médium obsahující sérum (absolutní objem séra tak 1 : 1 k objemu roztoku trypsin / EDTA) nebo inhibitor trypsinu.
- 5) pipetou buňky jemně rozsuspenduj na homogení populaci, spočítej je a použij do experimentu nebo pasážuj v požadovaném množství.

Tvorba sféroidů – model 3D kultivace

- tvorba embryoidních tělíska -> model časně embryogeneze

- 1) připrav si suspenzi pluripotentních buněk o požadované koncentraci. Pro techniku vysících kapek optimálně 400 buněk na kapku = 13200 buněk /ml (30 μ l kapka) nebo 11400 buněk / ml (35 μ l kapka). Pro techniku využívající neadhezivní plastik 300-400 tis. buněk / ml.
- 2) V případě kapek nanášej kapky s buňkami na víčko kultivační misky pro TC, víčko pak překlop na spodní část misky naplněnou PBS (objem cirká jak pro kultivaci 60mm miska - ~5ml, 90mm miska ~ 10ml)

- 3) V případě neadhezivního povrchu (např. bakteriologická miska, může být i potažena vrstvou 0,5-1% agaru), nanes suspenzi buněk přímo
- 4) Suspenze buněk musí být co nejvíce homogenní a buňky v ní pokud možno jednotlivě.
- 5) Kultivuj potřebný čas. V případě kapek max 5dnů, v případě neadherentního povrchu dle potřeby s periodickou výměnou kultivačního média.

ÚLOHA

Vyšet (Po) ES buňky v podobě kapek a na neadhezivním plastiku (zde výměna média po 2 dnech - St)

Porovnání kvality/homogenity EBs (Pá).

DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY ADHERENTÍCH BUNĚK

Stanovené růstové aktivity buněčné populace je možno provést nejen sledováním počtu živých buněk v takové populaci, ale také analýzou aktivity některé z jejich metabolických drah, anebo jako celkového množství proteinů, které tato populace obsahuje.

Postup (např):

- 1) na 12 (1 jamka = 3.6 cm²) a 96 (1 jamka = 0.4 cm²) jamkovou destičku vysej buňky v kompletním DMEM médiu o hustotě 5000 buněk na cm². Počítej s tím, že na 12 jamkové destičce budou duplikáty a na 96 jamkové tripplikáty. V případě 96 jamkové destičky také buňky nevysévej do okrajových jamek, ale do středních a ty okolo naplň PBS. Finální objem pro 12 jamkovou desku je 2 ml, a pro 96 jamkovou 200 µl média v jedné jamce.
- 2) ovlivnění buněk na 96 jamkové desce proved' tak, že buňky vysej v objemu 100 µl a poté se k nim přidej dalších 100 µl média s naředěnými drugs o dvojnásobné koncentraci než je požadovaná finálně, v jamce tak bude celkem 200 µl média o požadované koncentraci drugs.
- 3) k buňkám na 12 jamkové desce přidej požadovaná látky o žádané koncentraci přímo ze zásobního roztoku, případně po jeho naředění, aby se přidávaný objem pohyboval v rozsahu do 20 µl, kdy ho na 1 ml celkového objemu média v jamce můžeme považovat za zanedbatelný*.
- 4) po 2 dnech kultivace 2x PBS opláchni buňky na 12 jamkové desce a zlyzuj je v SDS lyzačním pufru (150-300 µl, podle buněčné denzity u nejvíce rostoucí jamky).
- 5) pro optimální homogenizaci vzorku je tento lyzát vhodné sonikovat.
- 6) pomocí DC Protein Assay kitu fy Bio-Rad změř koncentraci proteinů v lyzátech.
- 7) u 96 jamkové destičky po 2 dnech kultivace k buňkám přidej do každé jamky 20 µl MTT roztoku a desku vrat zpět do termostatu (ted' bez víčka!!!!, na sterilitě již nezáleží).
- 8) po 2 hodinách kultivace v termostatu, zkontroluj vznik barevného formazanu v buňkách, pokud se ti zdá málo, nech kultivovat ještě 1 hodinu.
- 9) odstraň médium z jamek 96 jamkové desky (nejlépe vyklepnutím do umyvadla a pak na filtrační papír)
- 10) poté se do každé jamky napipetuje 50 – 100 µl (v závislosti na množství vytvořeného formazanu) MTT extrakčního pufru nebo DMSO a za mírného třepání se barevný formazan nechá extrahovat.
- 11) po vyextrahování formazanu se jeho absorbance změří na ELISA readeru při vlnové délce 570 nm.

- můžeš také buňky stanovit krystalovou violetí, kdy buňky po opláchnutí PBS fixuješ a barvíš roztokem krystalové violeti (0,05% w/v krystal. violeti, 1% formaldehydu, 1% metanolu v PBS) minimálně 20 minut při R.T. Po odstranění barvicího roztoku (lze použít opakovaně), buňky oplácheš vodou, necháš usušit a můžeš dokumentovat velikost kolonií nebo barvivo extrahovat do 10% kyseliny octové a kvantifikovat při 570nm na spektrofotometru.

* V případě že rozpouštědlo testované látky je biologicky aktivní, je nezbytné i je samotné přidat do kontrolních jamek.

Závěr:

Populace pomaleji rostoucích buněk obsahuje méně proteinů (12 jamková deska) a pomaleji rostoucí buňky mají i menší metabolickou aktivitu a je jich samozřejmě také méně (96 jamková deska). Metabolická aktivita je zde měřena jako schopnost oxidačně-redukčních systémů buňky měnit rozpustnou a žlutou tetrazoliovou sůl (zde MTT) na nerozpustný a fialově zbarvený formazan, akumulovaný uvnitř buněk. Je dobré si uvědomit, že stanovení celkového proteinu jako růstového parametru není vhodné u buněk tvořících nadměrné množství extracelulární matrix, např. chondrocyty. MTT test zase není vhodný v případě, kdy testovaná drugs jsou sama o sobě silnými oxidačně-redukčními činidly.

Analýza proliferace stanovením ATP

- celkové množství ATP velice přesně a citlivě vypovídá o kondici buněk a jejich počtu.
 - vyšetí buněk na 12-, 24-, nebo 96 wells plate, počet buněk dle jejich schopnosti proliferovat a potřebné délky testu/kultivace
 - buňky se ovlivní příslušnou látkou (zde RA) a ve vybraném čase se opláchnou PBS a zlyžují puřem pro stanovení ATP (viz. výše).

ÚLOHA

Vyset buňky na 24 jamkovou desku, 2000 buněk na cm² (Po). Ovlivnění buněk testovanými drugs (Ut). Vyhodnocení krystalovou violetí (A), MTT testem (B) (Pa).

Drugs M a A, SS – 10mM, testované koncentrace 1, 3, 10 uM a jejich kombinace.

Reportérový test

- A) test účinnosti transfekce pomocí vektoru/plasmidu kodujícího konstitutivně exprimovaný zelený (GFP) případně červený (RFP) fluorescenční protein
 - ověření účinnosti transfekce
- příslušné buňky vyset na poželatinovanou 6-wells plate, 3x10⁴ buněk na cm² v 1,5 ml media
- druhý den připravit transfekční směs = pro jednu jamku 3ug DNA(příslušný plasmid/vector) plus 200 uL serum/AB-free media s 6uL PEI (2x, pH 7.0), po 15-20 minutách nakapat na buňky v jamce
- po cca 4h vyměnit buňkám médium za čerstvé
- následující den pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu poměr buněk pozitivních k GFP/RFP proti negativním. Lépe lze použít analýzu pomocí flow-cytometru (FACS)
- samozřejmě dle potřeby je možné použít i kultivační plastik jiných rozměrů

B) reportérový test na aktivitu transkripce citlivé na působení kyseliny retinové (RA)
- analýza transkripční aktivity RA, transfekce buněk reportérem kódujícím gen pro luciferázu pod kontrolou promotoru citlivého k RA (RARE-luc; RARE-retinoic acid responsive element)

- příslušné buňky vyset na poželatinovanou 12-wells plate, 3×10^4 buněk na cm^2 v 0,7 ml media
- druhý den připravit transfekční směs = pro jednu jamku 0,7 μg DNA(příslušný plasmid/vector) plus 100 μL serum/AB-free media s 1,7 μL PEI (2x, pH 7.0), po 15-20 minutách inkubace při R.T. nakapat na buňky v jamce.
- Po cca 4h vyměnit médium za čerstvé a 8h po transfekci provést experimentální zásah (zde např. přidavek 0.1 μM RA v kombinaci s nějakou testovanou látkou)
- Druhý den opláchnout buňky PBS a zlyzovat v příslušném pufru (1 : 1; lyzační pufr pro luciferázu a lyzační pufr pro stanovení ATP)
- Změřit na luminometru luciferázovou aktivitu (vzorek + substrát – 50 + 50 μL) a následně ATP (vzorek + substrát – 30 + 30 μL). Výsledná hodnota je poměr signálu luciferázy ku signálu ATP (RA aktivita na buňku)

ÚLOHA

Luciferázový reportérový test (A) a fluorescenční reportérový test (B). Vyset buňky na 24 jamkovou desku na 5ml misku (Po). Transfekovat buňky příslušnými plasmidy + indukce reportéru (Po/Ut). Vyhodnocení luciferázové aktivity