

Základy kultivace buněk – cvičení (EMKB0311c)

Jméno a příjmení:		
Číslo skupiny:		
Studijní obor:		

DEN 4

Náplň cvičení:

- Sběr suspenzních buněk
- 2D fixace
- 3D fixace
- Barvení jader DAPI
- Fluorescenční mikroskopie

Teoretická příprava

2D fixace

1. Centrifugace 4 min/300 g, slijeme supernatant.
2. Resuspendujeme pomocí vortexu a za přidání KCl předeřátého na 37°C.
3. Inkubace 15 min.
4. Centrifugace 4 min/300 g, slijeme supernatant.
5. Po kapkách přidáme roztok fixační směsi (kyselina octová/methanol 1:3) o teplotě -20 °C.
6. Centrifugace 4 min/500 g, slijeme supernatant.
7. 3× opakujeme.
8. Nanese na podložní sklo vychlazené na -20 °C.

3D fixace (udržuje prostorovou strukturu vzorku)

1. Centrifugace 4 min/300 g, slijeme supernatant.
2. Resuspendujeme pomocí vortexu a za přidání PBS.
3. Inkubace 1 min.
4. Centrifugace 4 min/300 g, slijeme supernatant.
5. 2× opakujeme.
6. Buňky rozsuspendujeme v malém množství PBS (zbylé po slití supernatantu) a nakapeme na čistá odmaštěná podložní skla.
7. Skla fixujeme v 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 15 min.
8. Propláchneme 3×4 min v PBS.
9. Permeabilizace 5 min v 0,2% Tween a 5 min 0,2% Triton X v PBS.
10. Propláchneme 2 min v PBS.
11. Pokračujeme barvením.

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Ve fluorescenční mikroskopii se využívá kratších vlnových délek v oblasti UV záření, kdy látka absorbuje ultrafialové paprsky a emituje viditelné světlo delších vlnových délek, které je pak pozorovatelné světelným mikroskopem. Dochází k ozáření atomu, kde za normálních okolností obíhají elektrony kolem jádra ve vrstvách (orbitalech) s určitou energetickou hladinou. Při UV záření elektrony absorbují energii a jsou vybuzeny (excitovány) do vyšší energetické hladiny. Elektrony jsou na vyšší energetické hladině nestabilní a vracejí se zpět do základního stavu. Přesun elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší je doprovázen vyzářením fotonu

ÚKOL: PŘÍPRAVA MIKROSKOPICKÉHO PREPARÁTU, ZÁPIS VYHODNOCENÍ

Sběr suspenzních buněk, automatické počítání buněk a určení viability, 3D fixace suspenzních buněk, včetně permeabilizace (viz výše).

1. 3D fixované buňky ponoříme do DAPI o koncentraci 1 µg/ml.
2. 5 minut inkubujeme ve tmě.
3. Propláchneme 2 min v PBS.
4. Naneseme krycí sklo a zalepíme.

ÚKOL: PROVEĎ A ZAPIŠ VÝŠE UVEDENÉ LABORATORNÍ ÚKONY