

REJSTRÍK:

- **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
- **EC buňky**, pluripotentní embryonální nádorové (EC - embryonal carcinoma) buňky, kmenové buňky teratokarcinomu
- **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) + antibiotika (penicilin/streptomycin)
- **kompletní DMEM médium**, DMEM + 10% séra (telecí fetální) + antibiotika (penicilin/streptomycin) + 0.05 mM β -merkaptoethanol
- **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 μM v PBS
- **SDS lyzační pufr**, 1% SDS, 100mM Tris pH 6.8, 10% glycerol
- **TC plastik**, plastik pro tkáňové kultury (TC – tissue culture)
- **TSA**, trichostatin A, inhibitor acetyltransferáz, protinádorové léčivo

A. TRYPSINIZACE ADHERENTNÍCH BUNĚK = PŘEVOD ADHERENTNÍCH BUNĚK DO SUSPENZE

Většinu adherentních buněk lze převést do suspenze tzv. trypsinizací.

- 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 μl , pro misku o průměru 100 mm 700 – 1000 μl).
- 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.

B. DŮKAZ PLEIOTROPNÍHO PŮSOBENÍ KYSELINY RETINOVÉ (RA)

Model:

Diferenciace EC buněk linie P19 do buněk primitivního entodermu a buněk neuroektodermu působením RA.

Teorie:

RA je silným indukrotem diferenciacie buněk EC P19. V adherentní, jednovrstevné kultuře (monolayer) buněk P19, v závislosti na přítomnosti sérových faktorů/séra, RA (0.1-1 μM) indukuje vznik buněk primitivního entodermu a neuroektodermu. V přítomnosti séra vznikají buňky primitivního entodermu, za jeho nepřítomnosti buňky neurální.

Postup:

- 1) připrav si dvě želatinou potažené petriho misky pro TC (průměr 60 mm, plocha 20 cm^2).
- 2) na jednu tuto TC misku vysej 5000 (PE) a na druhou (NE) 10 000 buněk P19 na cm^2 v kompletním DMEM médiu, finální objem 5 ml.
- 3) 2-3 hodiny po vysetí vyměň kompletní DMEM na misce „NE“ za ITS médium.
- 4) do obou misek přidej RA do finální koncentrace 0.2 μM .
- 5) po 2 dnech kultivace u obou misek vyměň médium za čerstvé. Miska „PE“ kompletní DMEM, miska „NE“ ITS, v obou případech již bez RA.
- 6) po dalších dvou či více dnech pozoruj morfologické změny případně aplikuj detekci některého ze specifických markerů pro daný buněčný typ.

Závěr:

Na misce „PE“ by měly vznikat buňky primitivního entodermu (ploché buňky pozitivní na cytokeratin Endo A) a na misce „NE“ buňky neurální (neurony + glie, charakteristická morfologie a exprese specifických proteinů, N-cadherin, neuron specifický III β -tubulin, GAP-43, N-CAM, GFAP,...).

Literatura:

http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/2005/54_115.pdf

C. TECHNIKA EMBRYOIDNÍCH TĚLÍSEK - PŘÍPRAVA KARDIOMYOCYTŮ

Model:

Diferenciacie EC buněk linie P19 do kardiomyocytů technikou embryoidních tělísek v přítomnosti DMSO

Teorie:

Zabráníme-li EC (nebo ES) buňkám adherovat k podkladu, začnou vytvářet tzv. embryoidní tělíška, EB. Buňky obsažené v EB diferencují různými směry, prakticky do všech třech zárodečných listů. V hodných doplňky růstového média lze tuto diferenciaci více specifikovat. EB v přítomnosti DMSO diferencují zejména směrem do buněk mezodermu a posléze kardiomyocytů.

Postup:

- 1) připrav si suspenzi buněk P19 o hustotě 3 – 5 buněk v jednom μl kompletního DMEM s 1 % DMSO
- 2) 10 ml této suspenze vysej na bakteriologickou plastovou petriho misku (průměr 90-100 mm)
- 3) ze stejné suspenze jako v bodě „2“, nanes kapky o objemu 35 μl na vnitřní stranu víčka petriho misky pro TC (průměr 90-100 mm), víčko pak přiklop zpět na misku do které jsi dal/dala 10-15 ml PBS

- 4) po 4 dnech kultivace zkontroluj vytvořená EB, a přenes je na nové misky pro TC (radši potažené želatinou) do kompletního DMEM již bez DMSO.
- 5) po dalších 3-5 dnech, pozoruj objevení kardiomyocytů v podobě pravidelně tepajících kolonií na dně misky

Závěr:

Jak na bakteriologické misce, tak v kapkách by měly vzniknout EB. Po přenesení na TC misku s adhezivním povrchem, EB adherují na její dno a dávají vznik koloniím, které po 7 a více dnech celkové kultivace začínají pravidelně tepat v důsledku přítomnosti diferencovaných kardiomyocytů. Přítomnost kardiomyocytů lze dále potvrdit detekcí specifických proteinů (Sarkomerický alfa-aktin, Troponin I).

Literatura:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163207>

D. DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY ADHERENTÍCH BUNĚK

Model:

Analýza růstu EC buněk linie P19 po působení RA (0.1 a 1 μ M) a TSA (10, 50 a 100 nM).

Teorie:

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 a nebo jako celkového množství proteinů, které tato populace obsahuje.

Postup:

- 1) na 12 (1 jamka = 3.6 cm²) a 96 (1 jamka = 0.4 cm²) jamkovou destičku vysej buňky P19 v kompletním DMEM médiu o hustotě 5000 buněk na cm². Počítej stím, že na 12 jamkové destičce budou duplikáty a na 96 jamkové triplikáty. 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 μ l média v jedné jamce.
- 2) ovlivnění buněk na 96 jamkové desce proved' tak, že buňky vysej v objemu 100 μ l a poté se k nim přidej dalších 100 μ l média s naředěnými drugs o dvojnásobné koncentraci než je požadovaná finálně, v jamce tak bude celkem 200 μ l média o požadované koncentraci drugs.
- 3) k buňkám na 12 jamkové desce přidej požadovaná drugs o žádané koncentraci přímo ze zásobního roztoku, případně po jeho naředění, aby se přidávaný objem pohyboval v rozsahu 2 - 20 μ l, kdy ho na 2 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 μ l, 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 μ l MTT roztoku a desku vrat zpět do termostatu (teď 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 μ l (v závislosti na množství vytvořeného formazanu) MTT extrakčního pufru 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.

* V případě že rozpouštědlo drugs 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.

Literatura:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7868929>

E. DETEKCE AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY – ZNAK DIFERENCIAČNÍHO STAVU BUŇKY

Model: viz výše.

Teorie:

Detekce aktivity alkalické fosfatázy (AP) může v mnoha buněčných systémech sloužit k posouzení diferencovaného stavu buněk. V případě buněk EC P19, nediferencované buňky vykazují vysokou aktivitu tohoto enzymu, a to zejména jeho isoformy GCAP (Germ cell AP), označované také jako embryonální AP. Detekci lze provést jak kvalitativně, tak kvantitativně. Zde se zaměříme na semi-kvantitativní stanovení přímo v kultuře.

Postup:

- 1) buňky se vysejí na vhodný plastik, např. 2ml misky nebo 6-12 jamkovou desku pro TC v densitě 5000 buněk na cm^2 v kompletním DMEM.
- 2) po uchycení buněk (více jak 2-3 hodiny) se provedou příslušné experimentální zásahy, např. indukce diferenciace RA, odstraněním růstových faktorů a pod.
- 3) před vlastním stanovením, se z buněk odstraní médium a buňky se zafixují 2-4 % formaldehydem (v PBS) po dobu 5-15 minut (pro delší fixaci je vhodné fixovat při 4°C).
- 4) po fixaci se buňky 2x opláchnou reakčním pufrům (pufr, v kterém bude probíhat i stanovení aktivity AP)
- 5) stanovení se pak provede podle návodu, např.

<http://www.vectorlabs.com/products.details.asp?prodID=41&locID=662463>

6) vyhodnocení se provede srovnáním rozdílů v aktivitě AP pomocí mikroskopu

Závěr:

U diferencovaných buněk by mělo dojít k poklesu aktivity AP, zejména v důsledku snížení její exprese. Problémem však může být objevení se nových isoform AP, indukovaných diferenciací. Toto lze řešit např. použitím specifických protilátek k jednotlivým isoformám AP, případně změnami fyzikálních podmínek před vlastní detekcí (některé isoformy AP jsou termolabilní). Pro přesnou kvantifikaci je samozřejmě vhodné použití jiné, čistě kvantitativní metody, např.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974633>

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, 3×10^4 buněk na cm^2 v 1,5 ml media
- druhý den připravit transfekční směs = pro jednu jamku 3 μg DNA (příslušný plasmid/vector) plus 200 μL serum/AB-free media s 6 μL 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 přidavek 0.1 μM RA v kombinaci s N-acetyl cysteinem (NAC, 1, 3, 5 mM)
- 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)

Literatura:

Test - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492758>

RA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254103>

Analýza proliferace stanovením ATP

- celkové množství ATP velice přesně a citlivě vypovídá o kondici buněk a jejich počtu.

- vysetí buněk na 12-, 24-, nebo 96 wells plate, počet buněk dle jejich schopnosti proliferovat a potřebné délky testu/kultivace
- buňky s ovlivní příslušnou látkou (zde RA) a ve vybraném čase se opláchnou PBS a zlyžují puřem pro stanovení ATP (viz. výše).

Test klonogenicity (– mezní ředění)

Schopnost klonogenicity (expanze buněčné populace z jediné) buňky je významná např. pro přípravu transgenních buněčných linií, přípravu monoklonálních protilátek, pro testování klonogenního potenciálu genů (např. při hledání a studiu onkogenů), pro testování schopnosti látek klonogenicitu u konkrétních buněk narušit nebo vyvolat (naš případ) atd.

- buňky se vysévají v množství 1 buňka na 3 jamky 96-wells plate, čímž se zajistí vysoká pravděpodobnost, že skutečně bude v každé jamce jen jedna buňka. Alternativne lze buňky vyset do některého z polotekutých médií jako je agar nebo methylcelulósa. V závislosti na typu buněk je třeba často kultivovat i týden a déle.
- Posujuje se pak poměr očekávaného počtu kolonií proti skutečnému, případně v rámci experimentálních skupin
- V našem případě jedna skupina ovlivněn 0.5uM RA
- Pro snadnější vizualizaci vzniklých kolonií je vhodné buňky obarvit, buď barvivy/fluorochromy vázající mi se na např. proteiny nebo DNA, případně barevnými produkty enzymatických reakcí 9samozřejmě po přidavku vhodného substrátu (v našem případě využijeme MTT – viz. MTT test).

Pozn. Jisté odlišnosti oproti původnímu protokolu si vyžádal jiný typ použitých buněk.