

ÚLOHA 1: Interfázni FISH na buněčné suspenzi

1. Sklizení buněk

CHEMIKÁLIE

Fixativ – Methylalkohol p.a. a čistou kyselinu octovou ředit v poměru 3:1. Fixativ musí být připraven vždy čerstvý před sklizením buněk! Pro jiné účely lze krátkodobě uchovávat při 4 °C.

75mM KCl – 2,8 g chloridu draselného rozpustit v 500 ml sterilní destilované vody. Uchovávat při 4 °C. Před sklizením přehřát na 37 °C.

SKLÍZENÍ

- 1) Všechny centrifugace probíhají po dobu 10 minut při 1500 RPM a laboratorní teplotě.
- 2) Odstranit médium a dvakrát důkladně opláchnout buňky sterilním PBS (37 °C).
- 3) Převést buňky do suspenze a centrifugovat.
- 4) Odsát supernatant, pelet důkladně resuspendovat Pasteurovou pipetou a přidat 10 ml 75mM KCl přehřátého na 37 °C. Hypotonizace při 37 °C po dobu cca 30 minut.
- 5) Přidat 10 kapek fixativu, lehkým obrácením zkumavky promíchat a centrifugovat.
- 6) Odsát supernatant. Resuspendovat pouze lehkým zatřesením zkumavkou (buňky jsou v této chvíli náchylné k protržení!). Po kapkách přidat 10 ml fixativu. Promíchat kroužením.
- 7) Fixace 20 minut při pokojové teplotě. Poté centrifugovat.
- 8) Odsát supernatant a důkladně resuspendovat Pasteurovou pipetou. Po kapkách přidat 5 ml fixativu.
- 9) Fixace 10 minut při pokojové teplotě, centrifugovat.
- 10) Maximálně odsát supernatant. Doplnit fixativem na cca 1 ml (mléčné zakalení suspenze) a uskladnit při teplotě 4 °C.

2. Příprava preparátu

Příprava podložních skel

- Oplach v 70% etanolu, mechanické očištění kartáčkem.
- Oplach v destilované vodě.
- Naložit do skleněné kyvety s 70% etanolem a skladovat při 4 °C.
- Optimální je ponechat skla před použitím takto alespoň přes noc. Před nakapáním suspenze sklo důkladně utřít do sucha utěrkou na optiku (Micro Optic-Cleaner, Hama).

Příprava krycích skel

- Oplach v 70% etanolu, mechanické očištění, oplach v destilované vodě.
- Utřít do sucha utěrkou na optiku.

Příprava preparátu

Na vychlazené a nadýchnuté podložní sklo kápnout z výšky 1–3 kapky suspenze (dle hustoty suspenze) pod úhlem cca 40 °. Nechat volně schnout – ideálně alespoň do druhého dne.

3. FISH

CHEMIKÁLIE

Ethanolová řada – 70%, 80% a 96% ethanol

0,5xSSC (pH 7,2) – zásobní roztok 20xSSC ředit v dH₂O, upravit na pH 7,2

2xSSC (pH 7) – zásobní roztok 20xSSC ředit v dH₂O, přidat Tween-20 do finální koncentrace 0,05%, upravit na pH 7

FISH – optimalizovaný protokol

- 1) Zestáršení preparátu pomocí 2xSSC (Saline-sodium citrate, solný roztok citrátu sodného) při 37°C po dobu 30 minut. Rychlý oplach v destilované vodě.
- 2) Dehydratace v etanolové řadě (70 %, 80 % a 96 %) při laboratorní teplotě (RT), 2 minuty pro každou koncentraci.
- 3) Nechat volně schnout – ideálně do druhého dne. Poté aplikace sondy.
Od bodu 4 dále chránit preparát před světlem.
- 4) Na krycí sklo aplikovat sondu – pozor na vzduchové bubliny (typ sondy a aplikovaný objem bude upřesněn během cvičení). Preparát přiložit ve spodní polovině ke krycímu sklu se sondou a vyčkat až se sonda rozprostře po celé ploše krycího skla. Poté krycí sklo oblepit rámovací hmotou Fixogum.
- 5) Kodenaturace (sondy a DNA preparátu) na kovové plotýnce při teplotě 75°C po dobu 3 minut.
- 6) Hybridizace ve vlhké komůrce při 37 °C přes noc.
Lze nahradit cca 4h hybridizací. Lepší výsledky jsou ale dosaženy hybridizací přes noc.
- 7) Odstranit rámovací hmotu a opatrně sejmut krycí sklo.
- 8) Odmytí nenavázané sondy – 0,5xSSC při 73°C po dobu 2 minut, opláchnutí v 2xSSC při RT po dobu 30 sekund. Rychlý oplach v destilované vodě.
- 9) Nechat oschnout ve tmě.
- 10) Aplikovat 10 µl DAPI a hotový preparát uzavřít krycím sklem. Orámovat.

ÚLOHA 2: Fluorescenční detekce cytoskeletálních proteinů

CHEMIKÁLIE

Fixativum – 3% paraformaldehyd v PBS

Permeabilizace – 0,2% triton TX-100 v PBS

Blokovací roztok – 3% BSA (bovinní sérový albumin) v PBS

A. Nepřímá imunocytochemická detekce α -tubulinu (mikrotubuly, MT)

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS - 2 x 1 min
- 2) Fixace 3% PFA - 20 min
- 3) Permeabilizace 0,2% triton TX-100 - 1 min
- 4) Oplach v PBS - 1 x rychlý, + 2 x 3 min
- 5) Blokování 3% BSA - 10 min (15 μ l na parafilmu)
- 6) Inkubace s 12 μ l primární Ab (anti- α tubulin) - 60 min / 37°C (na parafilmu)
- 7) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 8) Inkubace s 12 μ l sekundární Ab (anti-myší IgG-Alexa Fluor 488 nebo Alexa Fluor 568) - 45 min / 37°C (na parafilmu) - lze kombinovat s detekcí F-aktinu viz. krok 5 následující úlohy
- 9) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 10) Detekce DNA – Hoechst33342 – 3 min
- 11) Oplach v PBS – 1 x rychlý, + 1 x 3 min
- 12) Montovat v montovacím médiu DAKO

B. přímá detekce F-aktinu (mikrofilamenta, MF)

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS – 2 x 1 min
- 2) Fixace 3% PFA - 20 min
- 3) Permeabilizace 0,2% triton TX-100 - 1 min
- 4) Oplach v PBS - 1 x rychlý, + 2 x 3 min
- 5) Inkubace s 12 μ l phalloidin-FITC/TRITC - 45min / 37°C (na parafilmu)
- 6) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 7) Detekce DNA – Hoechst33342 – 3 min
- 8) Oplach v PBS – 1 x rychlý, + 1 x 3 min
- 9) Montovat v montovacím médiu DAKO

ÚLOHA 3: Pozorování autofluorescence rostlinného a živočišného původu

MATERIÁL

pylová zrna, listy rostlin, řasy, šupiny z motýlího křídla.

ÚLOHA 4: Fluorescenční odlišení živých a mrtvých buněk

CHEMIKÁLIE

Akridinová oranž (AO) – 5 mg/ml – prochází přes membránu

Propidium jodid (PI) – 3mg/ml – neprochází přes membránu živých buněk

Barvicí roztok: AO : PI : voda – 1 : 1 : 1000

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS
- 2) 10 μ l barvicího roztoku na podložní sklo
- 3) Přiklopit krycí sklo s buňkami / inkubace 5 min