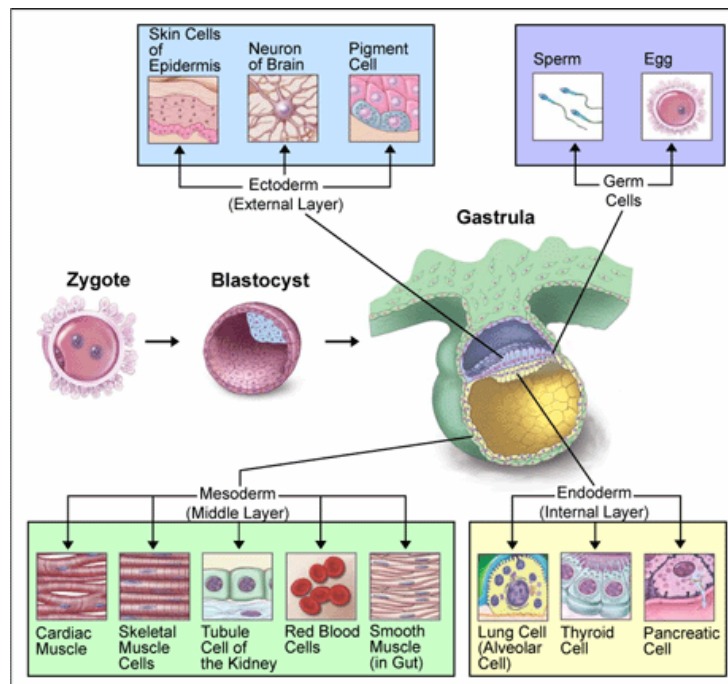


2. Obecné principy diference

Diference je vývojový proces, během kterého se mění morfologie a funkce buněk, přičemž až na malé výjimky typu přeskupování subgenů u B-lymfocytů, zůstává genetický materiál beze změn. Nespecializované (prekurzorové, progenitorové buňky) se tak mění na konečné specializované funkční typy. Diference je podmíněna změnami genové exprese, které vedou ke změnám velikosti, tvaru, polarity, metabolické aktivity nebo citlivosti k různým signálům. Na začátku vývoje člověka nebo jakéhokoli mnohobuněčného organismu je jediná buňka - oplozené vajíčko (zygota), která se dělí a postupně rozrůžňuje podle přesných pravidel genetického programu. V dospělosti je lidské tělo složeno ze zhruba 10^{14} buněk a více než 200 různých buněčných typů. Diference je přesně řízený proces, s dokonalým časováním i prostorovou závislostí. Podle schopnosti diference do různých buněčných typů se rozlišuje několik typů prekurzorových buněk.

Totipotentní prekurzorová buňka je schopná diferencovat do všech buněčných typů v organismu). **Pluripotentní** buňky vznikají z totipotentních a dávají vznik všem třem zárodečným listům. Mohou tedy iniciovat vznik jak buněk endodermu, mezodermu i ektodermu. **Multipotentní** buňky mají již omezenou schopnost sebeobnovy i omezené spektrum buněčných typů, které z nich může vzniknout, Multipotentní jsou např. některé specializované hematopoetické kmenové buňky. **Unipotentní** buňky dávají vznik jedinému buněčnému typu.

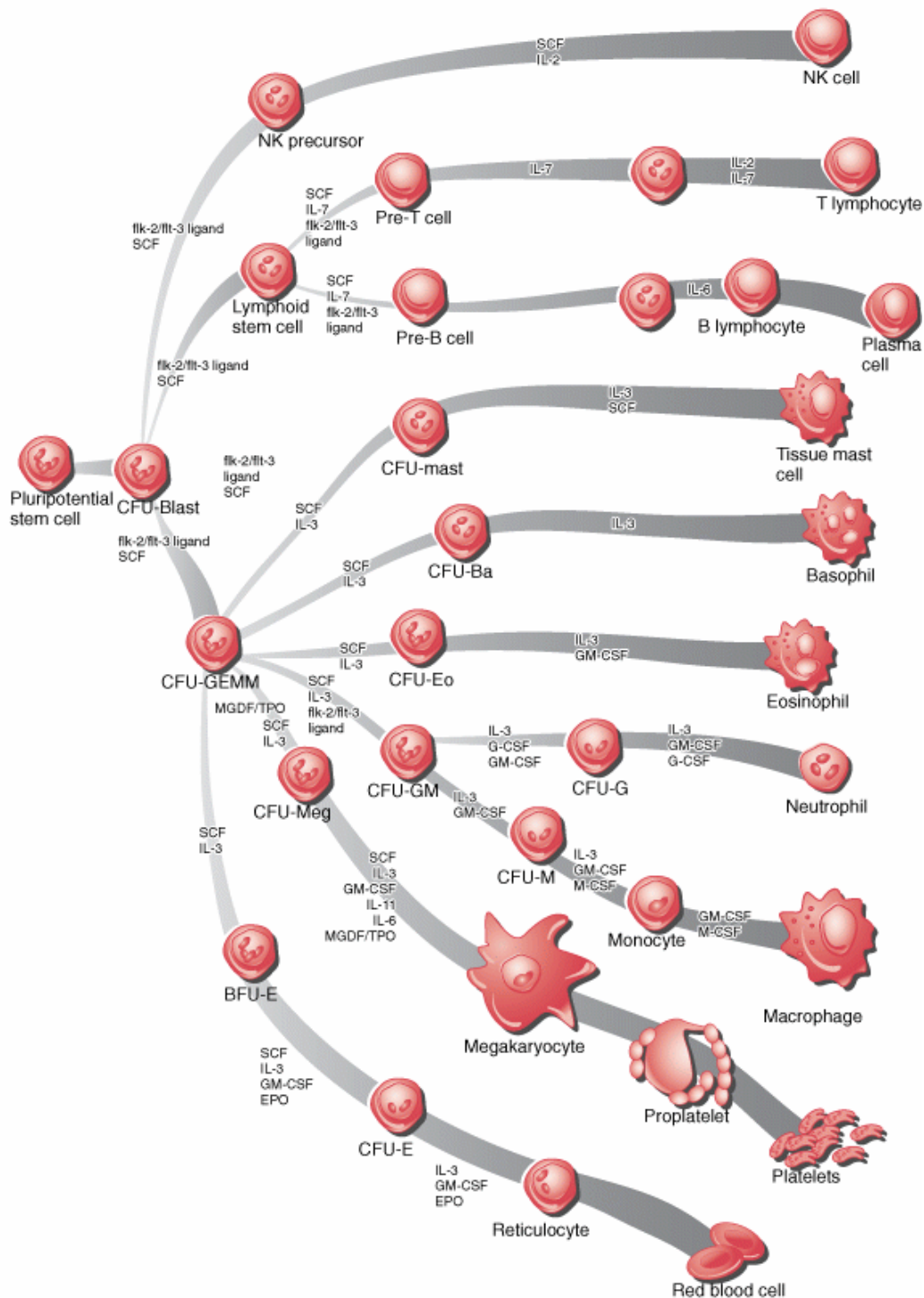
Jako kmenová buňka, se označuje primární nediferencovaná buňka schopná sebeobnovy (tedy umožňuje vznik identické kopie sebe sama) a zároveň i diference do pokročilejších stádií.



Obr. 15. Diference zygoty do zárodečných listů jednotlivých buněčných typů.

Hematopoeze

Typickým příkladem toho, jak fungují principy buněčné diferenciace je vznik imunitního systému a krvetvorba - **hematopoeze**. Všechny krevní buňky vznikají sériemi mnoha buněčných dělení z jediné hematopoetické kmenové buňky. Během diferenciace krevních buněk a tvorby imunitního systému se vytváří složitá informační síť řízená mezibuněčnými signály – zejména cytokiny nebo různými chemickými látkami.



Obr. 16. Hematopoeze.

Stručný přehled některých cytokinů, které se účastní krvetvorby

Rodina	Cytokin	Receptor	Produkující buňky	Funkce	Účinek vyřazení z funkce
Hematopoetiny	Epo (erythropoietin)	EpoR	Buňky ledvin, hepatocyty	Stimuluje tvorbu erytrocytů	Epo i EpoR: letální
	IL-2 (Růstový faktor T-buněk)	CD25 (α), CD122 (β), CD132 (γ_c)	T lymfocyty	Proliferace T-lymfocytů	Deregulovaná proliferace a vývoj T-buněk, autoimunitní poruchy
	IL-3	CD123, β_c	T lymfocyty, epiteliální buňky thymu	Řídí rané fáze hematopoeze	Poruchy vývoje eozinofilů
	IL-4 (BCGF-1, BSF-1)	CD124, CD132 (γ_c)	T lymfocyty, žírné buňky	Aktivace B lymfocytů, tvorba IgE, regulace T _H 1 buněk	Snížená syntéza IgE
	IL-5 (BCGF-2)	CD125, β_c	T lymfocyty, žírné buňky	Tvorba a diferenciac eozinofilů	Poruchy tvorby IgE a cytokinů IL-9 a IL-10, poruchy tvorby eozinofilů
	IL-6 (IFN- β_2 , BSF-2, BCDF)	CD126, CD130	T lymfocyty, makrofágy, endoteliální buňky	Tvorba T- a B-lymfocytů, tvorba proteinů akutní fáze zánětů	IL-6: poruchy produkce IgA
	IL-7	CD127, CD132 (γ_c)	Tzv. non-T-lymfocyty	Tvorba preB- a preT-lymfocytů	Poruchy tvorby preB- a preT-lymfocytů
	IL-9	IL-9R, CD132 (γ_c)	T lymfocyty	Aktivace T _H 2 zprostředkovaná žírnými buňkami	
	IL-11	IL-11R, CD130	Stromální fibroblasty	Spolu s IL-3 a IL-4 regulace hematopoeze	
	IL-13 (P600)	IL-13R, CD132 (γ_c)	T lymfocyty	Růst a diferenciac B-lymfocytů, inhibice tvorby prozánětlivých cytokinů makrofágy a T _H 1 buňkami	
	G-CSF	G-CSFR	Fibroblasty a monocyty	Stimuluje vývoj a diferenciac neutrofilů	Poruchy myelopoeze, neutropenie
	IL-15 (Růstový faktor T-buněk)	IL-15R, CD122 (IL-R β) CD132 (γ_c)	Řada tzv. non-T-lymfocytů	Podobný IL-2-like, stimuluje růst střevního epitelu, T- a NK buněk	
	GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	CD116, β_c	Makrofágy, T-lymfocyty	Stimuluje růst a diferenciac myelomonocytárních linií, zvláště dendritických buněk	GM-CSF, GM-CSFR: Pulmonální alveolární proteinóza
	OSM (OM, onkostatin M)	OSMR or LIFR, CD130	T-lymfocyty, makrofágy	Stimuluje buňky Kaposiho sarkomu, inhibuje růst melanomu	
	LIF (leukemia inhibitory factor)	LIFR, CD130	Stroma kostní dřeně, fibroblasty	Udržuje embryonální kmenové buňky, podobný IL-6, IL-11, OSM	LIFR: smrt krátce po narození nebo <i>in utero</i> , nízké množství hematopoetických kmenových buněk

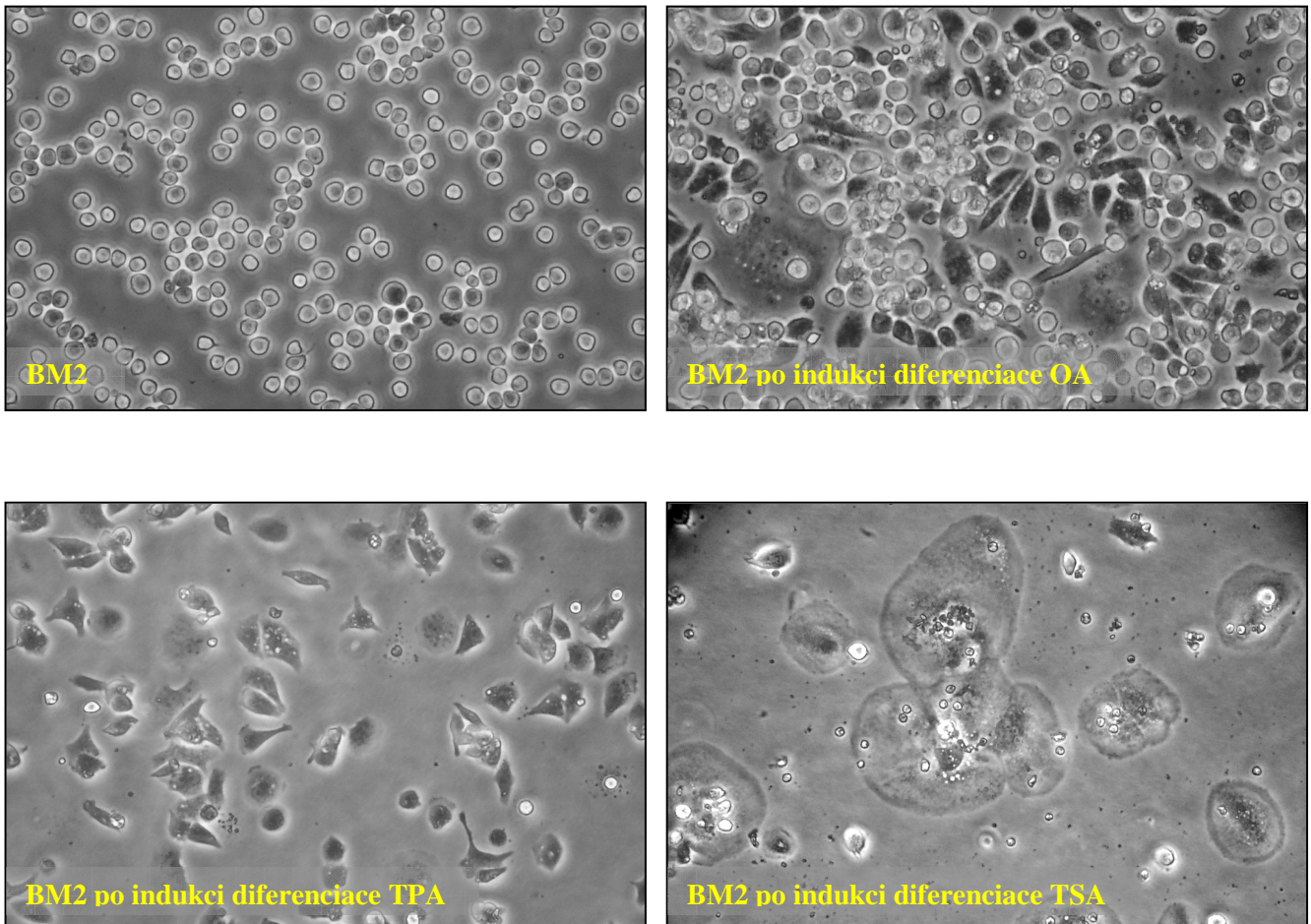
Interferony	IFN- γ	CD119, IFNGR2	T-lymfocyty, NK	Aktivace makrofágů, regulace MHC	Snížená T _H 1 odpověď, vnímavost k bakteriálním a virovým infekcím
	IFN- α	CD118, IFNAR2	Leukocyty	Protivirové, zvýšená exprese MHCI	vnímavost k virovým infekcím
	IFN- β	CD118, IFNAR2	Fibroblasty	Protivirové, zvýšená exprese MHCI	
Imunoglobuliny	B7.1 (CD80)	CD28, CTLA-4	Antigen prezentující buňky	Kostimulace T-lymfocytů	CD28: snížená aktivita T-lymfocytů
	B7.2 (B70, CD86)	CD28, CTLA-4	Antigen prezentující buňky	Kostimulace T-lymfocytů	B7.2: snížená odpověď na alloantigeny CTLA-4: masivní lymfoproliferace, raná smrt
Rodina TNF	TNF- α (kachektin)	p55, p75, CD120a, CD120b	Makrofágy, NK, T-lymfocyty	Lokální zánět, endoteliální aktivace	TNF- α R: odolnost k septickému šoku, vnímavost k infekci <i>Listeria</i>
	TNF- β (lymfotoxin, LT, LT- α)	p55, p75, CD120a, CD120b	T-lymfocyty, B-lymfocyty	Endoteliální aktivace	TNF- β : chybí lymfatické uzliny, snížená tvorba protilátek, zvýšená tvorba IgM
	LT- β	LT β R nebo HVEM	T-lymfocyty, B-lymfocyty	Vývoj lymfatických uzlin	Chybný vývoj periiferních lymfatických uzlin, Peyerových plaků a sleziny
	CD40 ligand (CD40L)	CD40	T-lymfocyty,	Aktivace B-lymfocytů	Slabá protilátková odpověď,
	Fas ligand (FasL)	CD95 (Fas)	T-lymfocyty	Apoptóza, cytotoxicita nezávislá na Ca ²⁺	Fas, FasL: mutantní formy vedou k lymfoproliferaci a autoimunitním poruchám
	CD27 ligand (CD27L)	CD27	T-lymfocyty	Stimuluje proliferaci T-lymfocytů	
	CD30 ligand (CD30L)	CD30	T-lymfocyty	Stimuluje proliferaci T-a B-lymfocytů	Zvětšený thymus, alloreaktivita
	4-1BBL	4-1BB	T-lymfocyty	Kostimuluje T- a B-lymfocyty	
	Trail	DR4, DR5, DCR1, DCR2 a OPG	T-lymfocyty, monocyty	Apoptóza aktivovaných T-lymfocytů a nádorových buněk	
	OPG-L (RANK-L)	RANK/OPG	Osteoblasty, T-lymfocyty	Stimuluje diferenciaci osteoklastů a resorpci kostní tkáně	OPG-L: osteopetróza OPG: osteoporóza
Nezařazené	TGF- β	TGF- β R	Chondrocyty, monocyty, T-lymfocyty	Inhibuje proliferaci, působí protizánětlivě, indukuje sekreci IgA	TGF β : letální záněty
	IL-1 α	CD121a (IL-1RI) a CD121b (IL-1RII)	Makrofágy, epiteliální buňky	Horečka, aktivace makrofágů a T-lymfocytů	IL-1RI: snížená produkce IL-6
	IL-1 β	CD121a (IL-1RI) a CD121b (IL-1RII)	Makrofágy, epiteliální buňky	Horečka, aktivace makrofágů a T-lymfocytů	
	IL-1 RA	CD121a	Monocyty, makrofágy, neutrofily, hepatocyty	Váže se na IL-1 receptor, ale neaktivuje jej. Přirozený antagonist funkce IL-1	IL-1RA: nízká hmotnost, vnímavost k septickému šoku (endotoxinům)

IL-10 (cytokine synthesis inhibitor F)	IL-10R α , CRF2–4 (IL-10R β)	T-lymfocyty, makrofágy, B-lymfocyty transformované EBV	Inhibuje funkci makrofágů	IL-10 nebo CRF2–4: snížený růst, anémie, chronická enterokolitida
IL-12 (NK cell stimulatory factor)	IL-12R β 1 IL-12R β 2	B-lymfocyty, makrofágy	Aktivuje NK buňky, indukuje diferenciaci CD4 T-lymfocytů do T _H 1-podobných buněk	IL-12: narušená produkce in IFN- γ a funkce T _H 1 podobných buněk
MIF		T-lymfocyty, buňky hypofýzy	Inhibuje migraci makrofágů, stimuluje jejich aktivaci. Indukuje rezistenci ke steroidům.	Rezistence k septickému šoku.
IL-16	CD4	T-lymfocyty, eosinofily	Chemoatraktant pro CD4 T-lymfocyty, monocyty a eosinofily, antiapoptotický faktor pro T-lymfocyty stimulované IL-2-	
IL-17 (mCTLA-8)		CD4 paměťové buňky	Indukuje syntézu cytokinů epitely, endotelem a fibroblasty	
IL-18 (IGIF, interferon- γ inducing factor)	IL-1Rrp (IL-1R related protein)	Aktivované makrofágy a Kupfferovy buňky	Indukuje produkci IFN- γ T-lymfocyty a NK, aktivace T _H 1, imunitní odpověď zprostředkovaná T _H 2	Narušená aktivita NK a T _H 1

Modelové linie

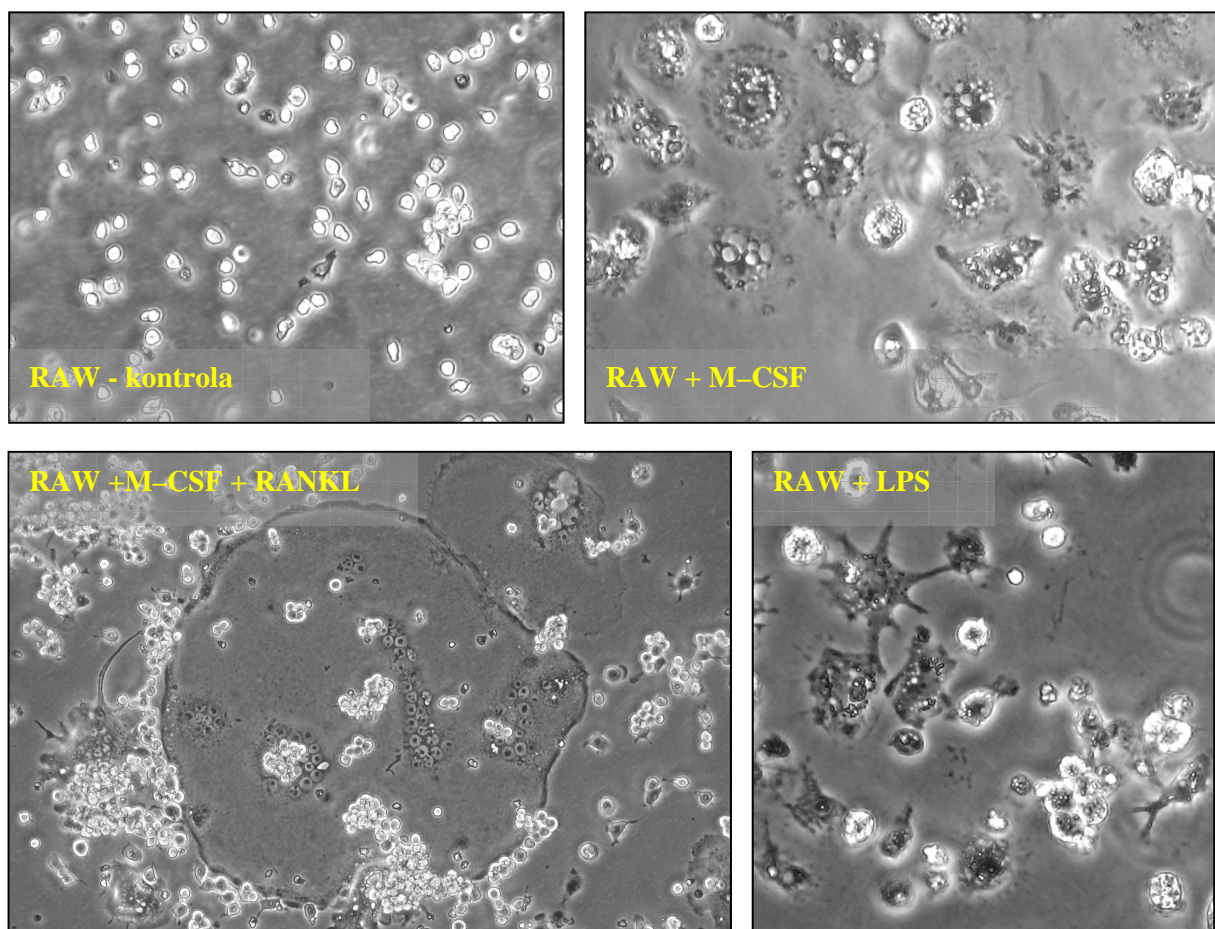
V Laboratoři buněčné diferenciace UEB PřF MU se využívá několik buněčných linií, jejichž diferenciaci lze indukovat různými chemickými látkami nebo cytokiny.

Základním modelem je buněčná linie kuřecích monoblastů **BM2**, které jsou transformovány virem ptačí myeloblastózy. Zásadní genetickou změnou, kterou tyto buňky prodělaly a která způsobila jejich leukemický fenotyp, bylo začlenění onkogenního genu *v-myb* do genomu. Jeho buněčný homolog *c-myb* kóduje klíčový regulátor diferenciace makrofágů. Buňky BM2 tak exprimují velká množství genu *v-myb*, nedokončují diferenciaci a trvale zůstávají ve stádiu proliferačně aktivních monoblastů. Pomocí chemické látky tetradekanoylforbolacetátu (TPA) je možné překonat diferenciační blok a indukovat tak diferenciaci do funkčních makrofágů. Další látky, např. kyselina okadaová (OA, inhibitor proteinových fosfatáz) nebo trichostatin A (TSA, inhibitor histonových deacetyláz) také umožňují diferenciaci buněk BM2 do mono – nebo multinukleárních makrofágů.



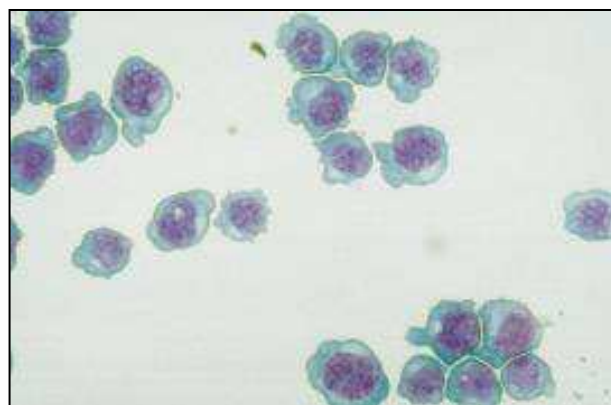
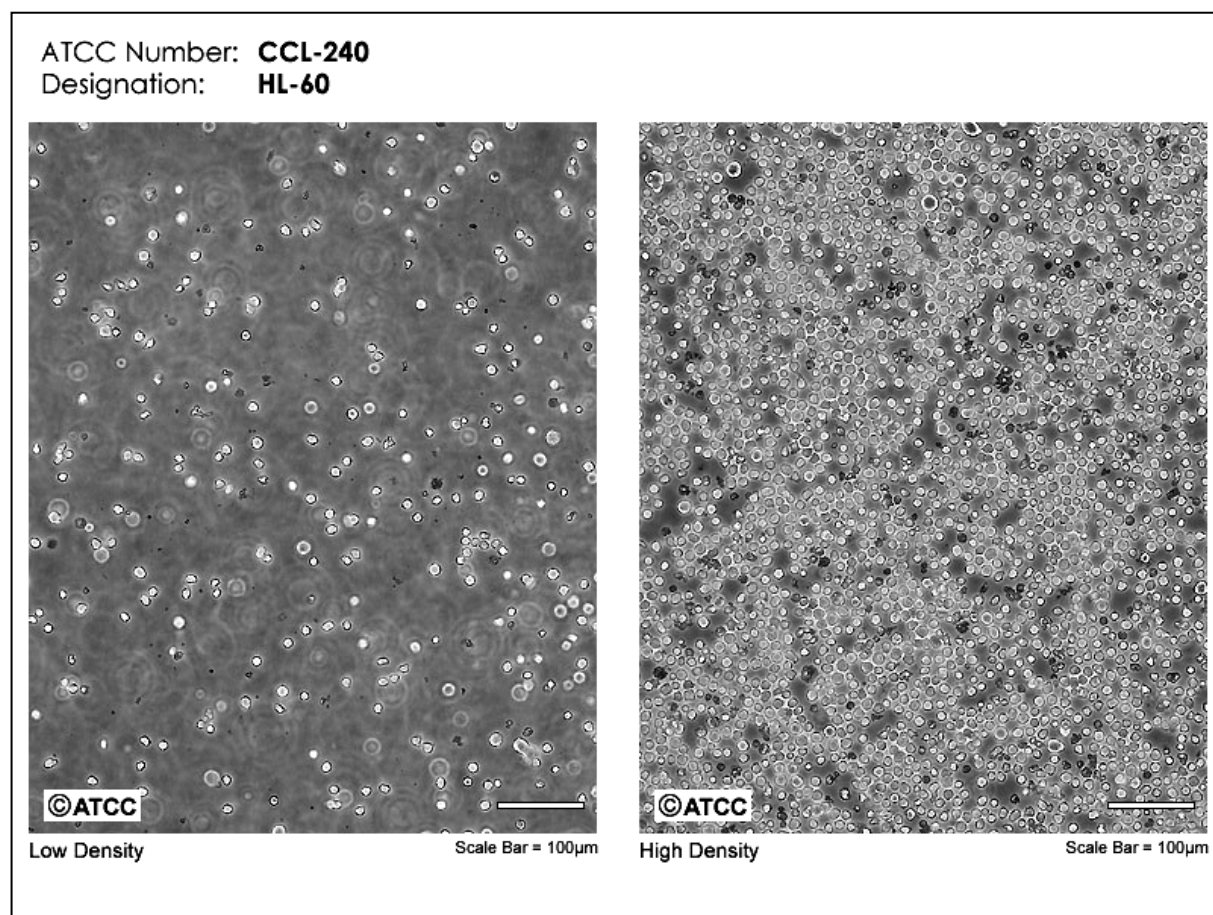
Obr. 17. Buněčná linie kuřecích monoblastů BM2.

Další zajímavou linií imortalizovaných hematopoetických buněk jsou myšič makrofágy **RAW264.7**, které byly odvozeny z ascitu tumoru myšič infikované virem Abelsonovy myšič leukémie. Buňky RAW sice neprodukují virové částice a chovají se jako nádorové s neomezeným proliferačním potenciálem, ale zároveň si podržely schopnost diferencovat do mnohojaderných makrofágů, osteoklastů i do dendritických buněk. Buňky RAW jsou senzitivní zejména k molekulám cytokinů M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) a RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand), které indukují diferenciaci do obřích osteoklastů, buněk které jsou *in vivo* zodpovědné za resorpci kostní tkáně. Použitím samotného M-CSF získáme mnohojaderné makrofágy. Tyto buňky také citlivě reagují na přítomnost některých bakteriálních látek, např. lipopolysacharidu (LPS, endotoxin), tvorbou antigen prezentujících dendritických buněk.



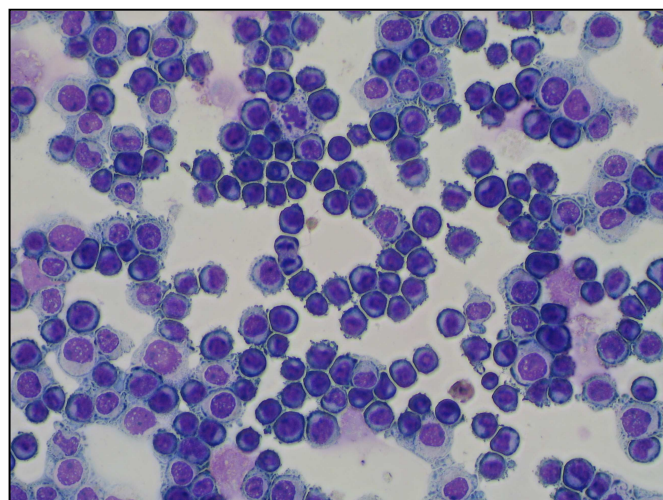
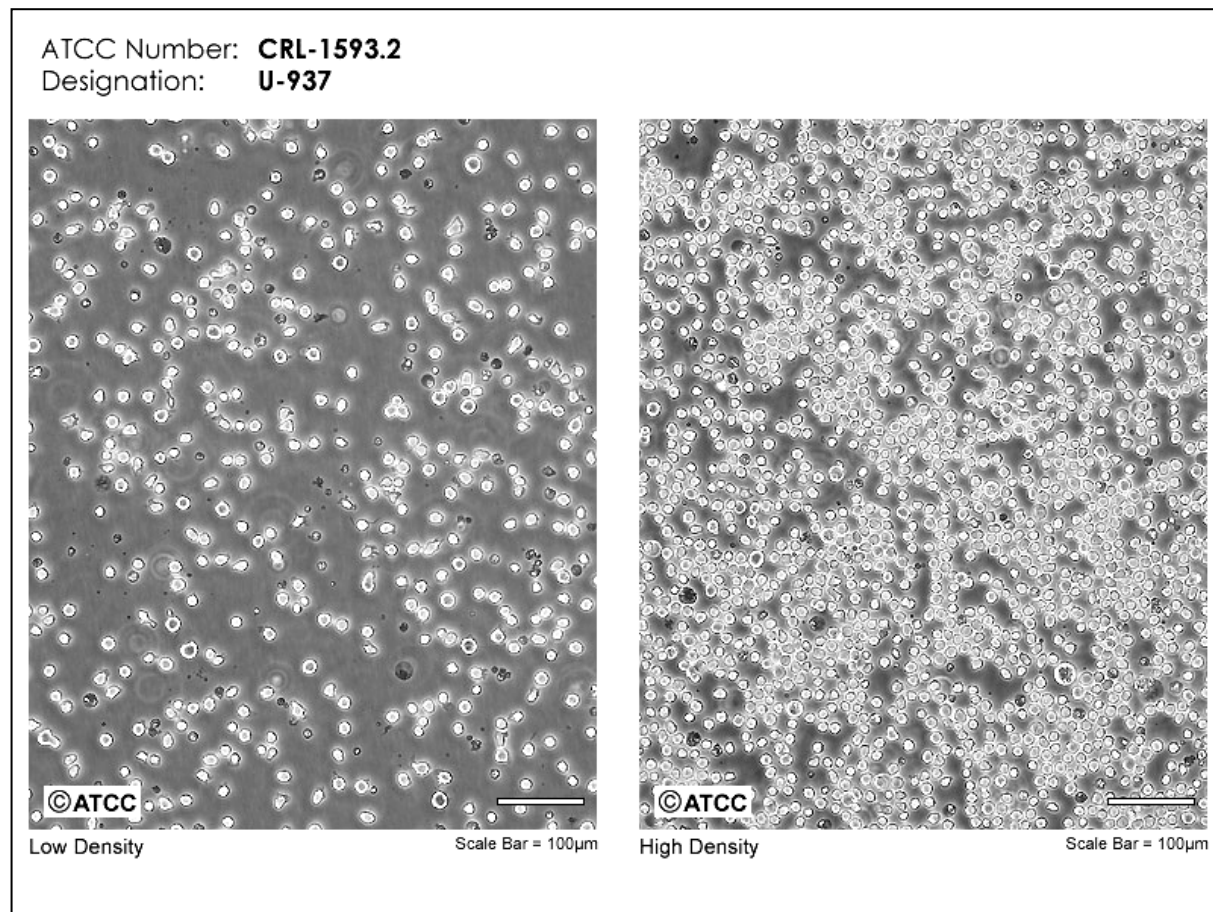
Obr. 18. Buněčná linie myšič makrofágů RAW264.7..

Buněčná linie **HL-60** patří mezi dnes už klasické modely nádorové molekulární a buněčné biologie, o čemž svědčí téměř 11000 dosud publikovaných prací zabývajících se HL-60 v databázi Pubmed. Linie HL-60 byla odvozena z nádorových buněk pacientky trpící akutní promyelocytární leukémií. Představuje významný systém umožňující studium fyziologie i nádorové transformace leukemických buněk na úrovni granulocytů, monocytů a makrofágů. Genom HL-60 obsahuje amplifikovaný protoonkogen *c-myc*, který patří k významným regulátorům buněčné diferenciaci a proliferace. Narušení kontroly jeho exprese a funkce vede k nádorovému fenotypu. Uměle lze diferenciaci navodit působením např. DMSO, TPA nebo kyselinou retinovou.



Obr. 19. Lidská promyelocytární linie HL-60

Buňky **U937** byly izolovány z pleurálního výplachu pacienta trpícího generalizovaným histiocytárním lymfomem. U937 mají velké množství monocytárních znaků a využívají se jako *in vitro* systém diferenciacie monocytů a makrofágů, resp. granulocytů a dalších buněčných typů. Diferenciace U937 může být navozena řadou látek, mj. forbolovými estery, kyselinou retinovou, TNF α , vitamínem D3 nebo IFN γ .



Obr. 20. Lidská linie U937.

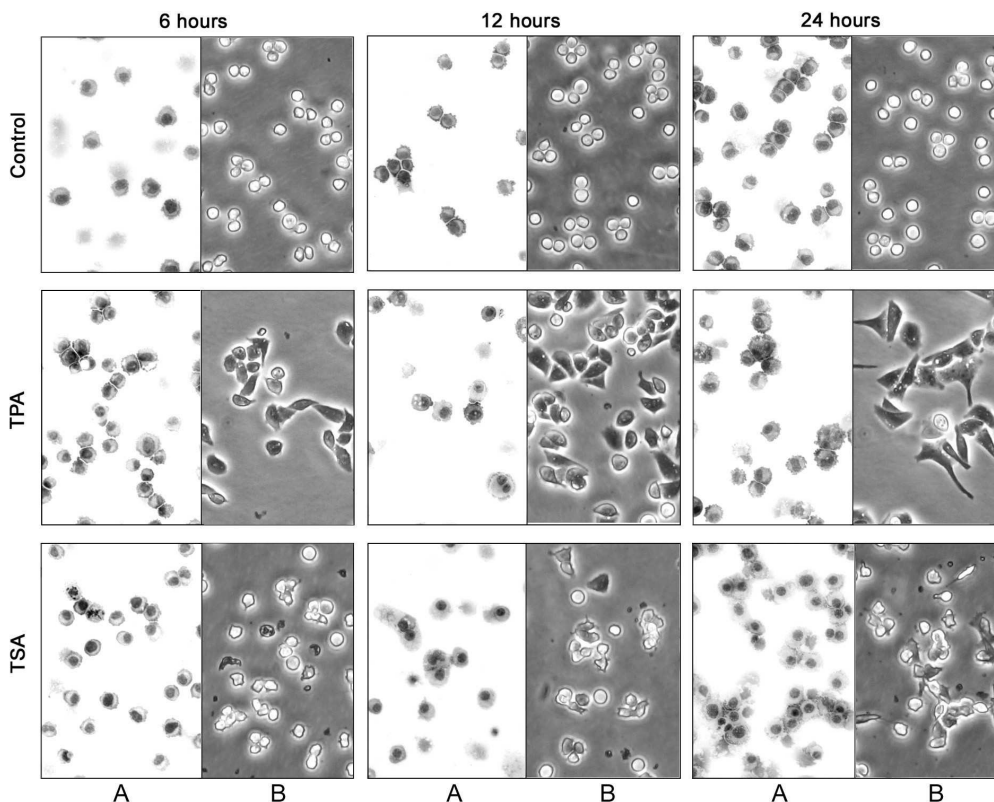
Funkční změny provázející diferenciaci některých hematopoetických buněk

Cytocentrifugace

Cytocentrifugace (Cytospin) umožňuje převedení buněk ze suspenze na mikroskopické sklíčko a vyhodnocení jejich morfolgie, jejíž změny diferenciaci provázejí.

Postup:

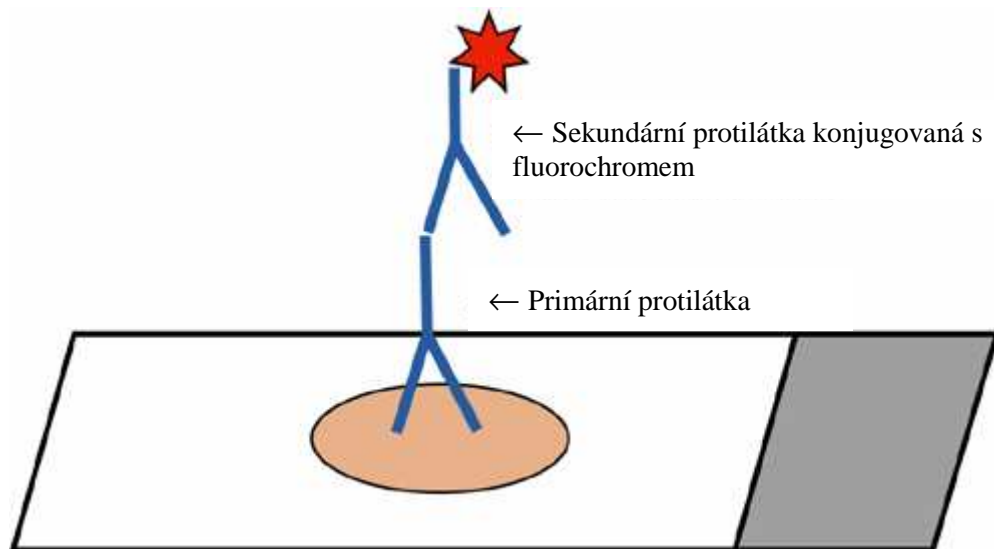
1. Stanovit koncentraci buněk na hemocytometru
2. Odebrat 5×10^4 buněk, centrifugovat 600g/5 min.
3. Resuspendovat pelet ve 100 μ l $1 \times$ PBS
4. Sestavit cytocentrifugační komůrku a suspenzi centrifugovat 500g/4 min
5. Rozebrat aparaturu, sklíčka nechat krátce oschnout
6. Obarvit pomocí setu DiffQuick
7. Jemně opláchnout vodou, nechat uschnout, vyhodnotit



Obr. 21. U buněk BM2 byla indukována diferenciace činidly TPA a TSA a následně provedena cytocentrifugace. Na mikrofotografiích v části „A“ jsou cytocentrifugované, fixované a obarvené buňky, v části „B“ jsou živé buňky rostoucí na misce. Jasně je vidět změna tvaru buněk i preference adheze před růstem v suspenzi.

Imunofluorescenční mikroskopie

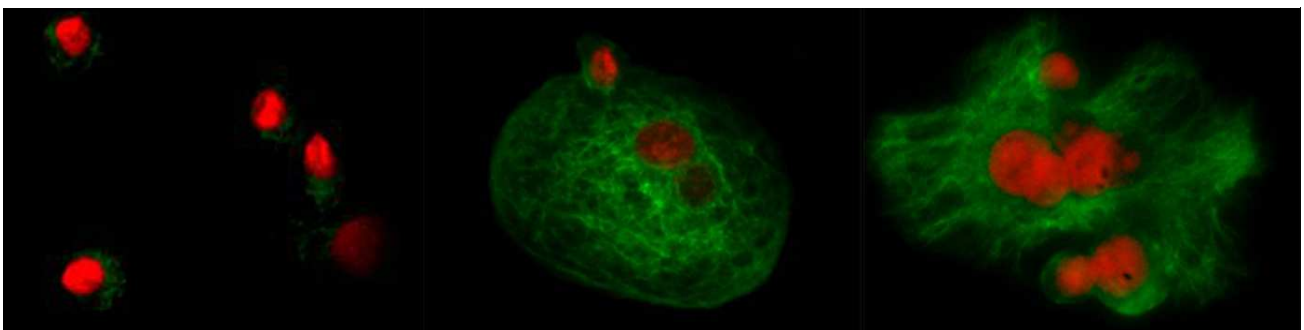
Imunofluorescenční mikroskopie umožňuje detekci specifických antigenů pomocí protilátky s konjugovaným fluorescenčním barvivem. Specifita je dána právě protilátkou, konjugovaný fluorochrom umožňuje amplifikaci signálu a zviditelnění cílových antigenů na klasickém fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopu. V praxi se využívá většinou systému dvou protilátek, tzv. primární, je specifická pro svůj jedinečný cíl, epitop antigenu, druhá, tzv. sekundární, která nese fluorochrom, se váže pouze na primární protilátky. Využití sekundárních protilátek je výhodné, protože můžeme mít pro několik různých primárních protilátek pouze jedinou označenou sekundární (která je pochopitelně dražší než neoznačená primární). Specifita sekundární protilátky je dána živočišným druhem, ve kterém byla vytvořena primární, např. myš (sekundární protilátka je označena jako anti-mouse), králik (anti-rabbit), koza (anti-goat), ale také třeba křeček (anti-hamster) nebo osel (anti-donkey). Imuofluorescenčním zviditelněním tak lze sledovat přítomnost specifických antigenů závislých na stupni diferenciaci.



BM2

BM2 + TPA

BM2 + TSA



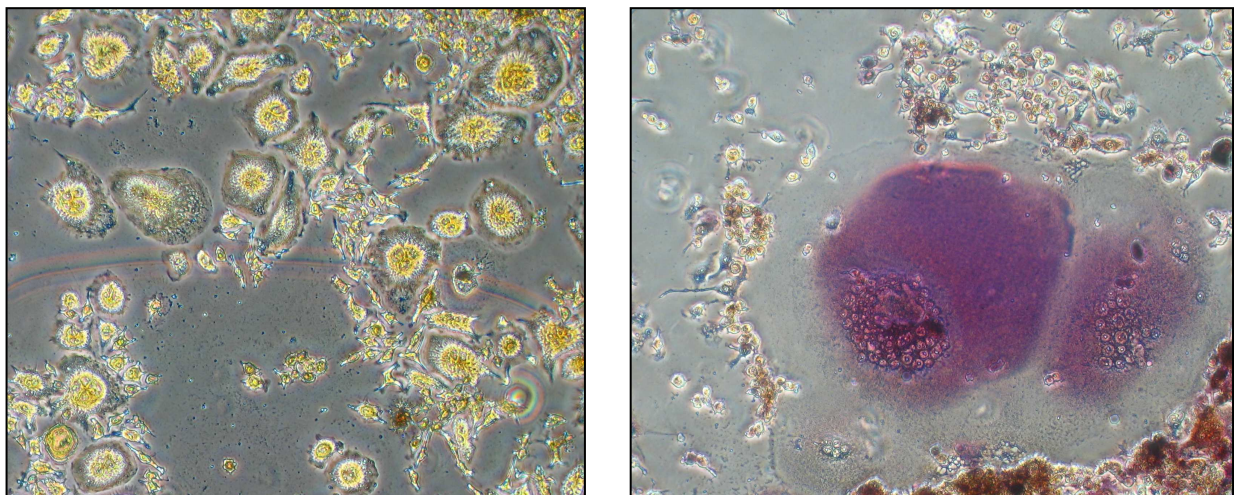
Obr. 22. Detekce jednoho z proteinů intermediálních filament – vimentinu v buňkách BM2 pomocí nepřímé imunofluorescence. Primární protilátka detekovala vimentin v různém množství v závislosti na stupni diferenciaci buněk BM2. Sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem FITC potom zviditelnila místa s navázanou primární protilátkou – a tedy i lokalizaci vimentinu. Propidium jodidem - červeně je označena DNA.

Postup:

1. Kultivovat 0.3×10^6 buněk na 2ml miskách s krycím sklíčkem a indukčními činidly.
2. Pokud buňky adherují na povrch sklíčka, odsát médium a misku se sklíčkem promýt 2ml $1 \times \text{PBS}$. Pokud buňky přisedlé nejsou, provést cytocentrifugaci na krycí sklíčko.
3. Fixace (aceton:metanol 1:1).
4. Pečlivě odsát fixační směs.
5. Opláchnout $3 \times 5 \text{min}$ v $1 \times \text{PBS}$.
6. Blok v 5% mléku (není nutné)
7. Opláchnout v TBS
8. Sklíčko inkubovat s primární protilátkou (většinou 1:200) 2hod/RT
9. Opláchnout $3 \times 5 \text{min}$ v TBS
10. Nanést sekundární protilátku konjugovanou s FITC (1:100), inkubovat 1hod/RT
11. Opláchnout $1 \times 5 \text{min}$ v TBS
12. Opláchnout $1 \times 5 \text{min}$ v TBS + RNázou A (1:500)
13. Opláchnout $2 \times 5 \text{min}$ v TBS
14. Odsát TBS, přidat $400 \mu\text{l}$ propidium jodidu ($50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), inkubovat 5 min.
15. Opláchnout $1 \times 5 \text{min}$ v TBS
16. Sklíčko osušit, umístit buňkami dolů s cca $4 \mu\text{l}$ montovacího média MOWIOL[®] (Calbiochem)
17. Buňky pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem

Detekce přítomnosti specifických enzymů

Diferenciace některých buněčných typů je provázena přítomností specifických proteinů s enzymovou aktivitou. Tyto enzymy jsou obvykle nezbytné pro správnou funkci diferencovaných buněk – příkladem může tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP), která je ve velkém množství produkována zralými osteoklasty, které ji využívají jako jednu ze složek enzymového aparátu při degradaci kostní tkáně. Detekce TRAP se provádí na cytocentrifugovaných nebo jiným způsobem imobilizovaných buňkách tak, že permeabilizované buňky jsou inkubovány za vhodných podmínek v pufru obsahujícím substrát, který TRAP přeměňuje na barevný (červený) produkt. Jednoduchým vyhodnocením pod mikroskopem jsme tak schopni potvrdit přítomnost tohoto enzymu a stanovit tak příslušný buněčný typ.



Obr. 23. Buňky RAW264,7 kultivované v přítomnosti M-CSF (vlevo) nebo M-CSF+RANKL (vpravo). Pouze u zralých osteoklastů (vpravo) produkují TRAP a akumulují červený pigment v cytoplasmě. Mnohjaderné makrofágy, které mohou osteoklasty připomínat, TRAP nevytvářejí.

Postup (optimalizovaný protokol pro misky):

(Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit, # 387A, Sigma Aldrich)

1. Připravit 5ml misky s diferencovanými osteoklasty.
2. Promýt 1×PBS.
3. Do misky napipetovat 3ml fixačního roztoku, fixovat 30sec.
4. Promýt sterilní deionizovanou vodou.
5. Inkubovat v pracovním roztoku bez přístupu světla 1hod/37°C
6. Promýt deionizovanou vodou
7. Případně podbarvit hematoxylinem, promýt deionizovanou vodou, vysušit.
8. Místa s aktivními kyselými fosfatázami, případně TRAP jsou zbarvena červeně.

Roztoky:

Fixační roztok: 20ml citrátového roztoku (#91-51) + 30ml acetonu

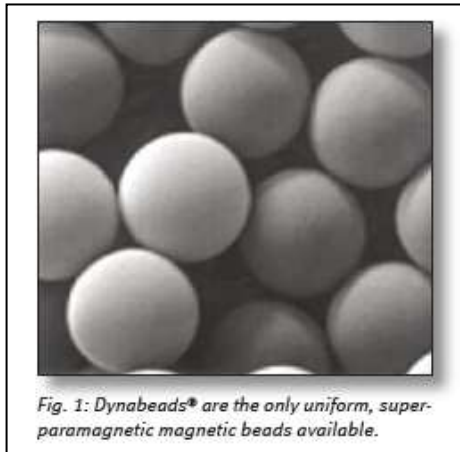
Pracovní roztoky:

1. Připravit směs 0,5ml Fast Garnet GBC Base Solution (#387-2) a 0,5ml Sodium Nitrite Solution (#91-4). (Diazotace) Inkubovat 2 min/RT.
2. Připravit roztoky podle tabulky:

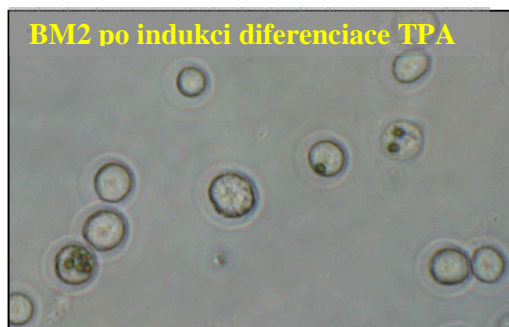
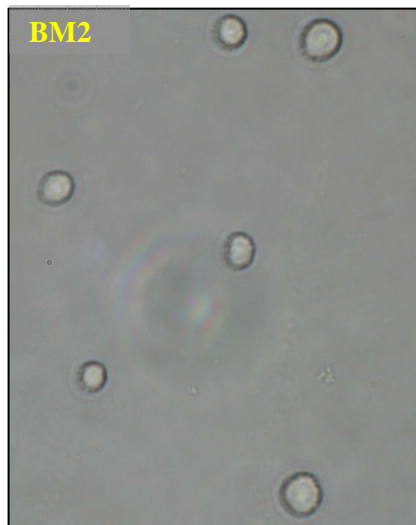
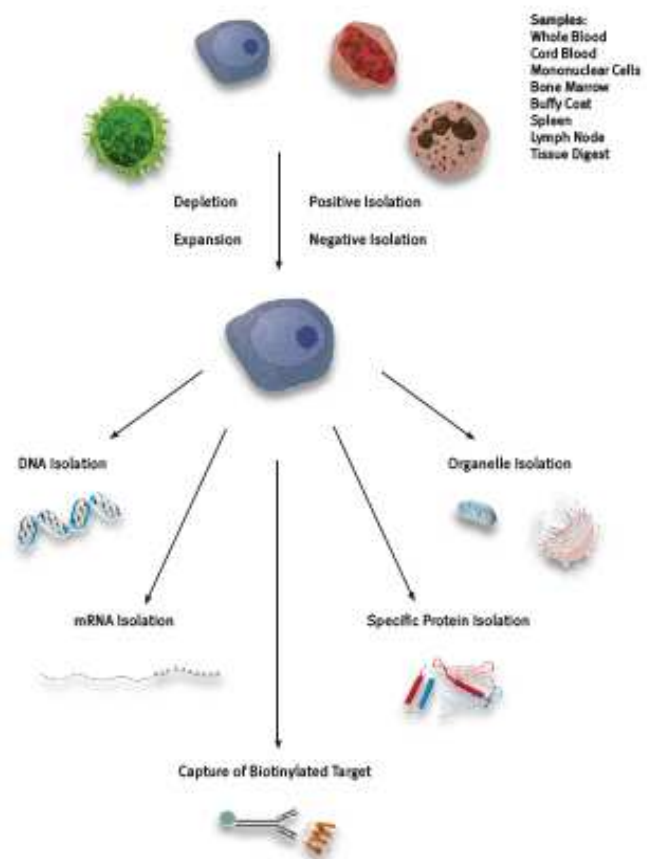
	Detekce všech kyselých fosfatáz	Detekce TRAP
Deionizovaná voda 37°C	45ml	45ml
Diazotizovaný Fast Garnet GBC Solution (krok 1)	1,0ml	1,0ml
Naphthol AS-BI Phosphate Solution (#387-1)	0,5ml	0,5ml
Acetate Solution (#386-3)	2,0ml	2,0ml
Tartrate Solution (#387-3)	-	1,0ml

Fagocytóza

Diferenciace některých krevních buněk je provázána získáním schopnosti fagocytózy. Samotný test je velmi jednoduchý, příslušným způsobem diferencované buňky jsou inkubovány v přítomnosti silikátových mikročástic (DynaBeads), které jsou buňkami pohlceny.



Obr. 24. DynaBeads mohou být využity k řadě separačních metod k izolaci různých buněčných typů, DNA, RNA, proteinů apod. V jednoduché úpravě mohou sloužit právě k analýze fagocytózy. → www.invitrogen.com



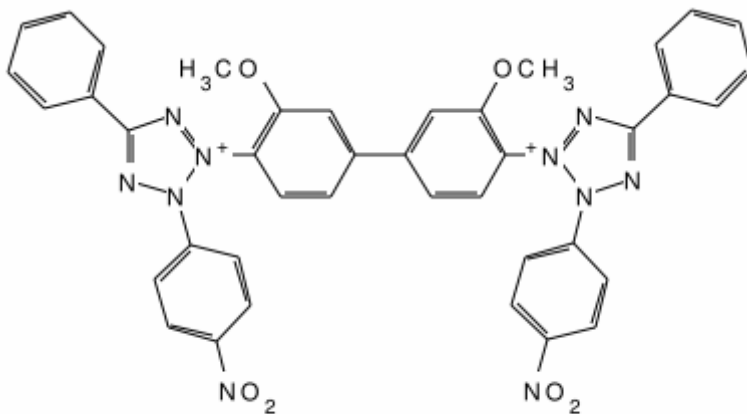
Obr. 25. Nediferencované buňky BM2 (nahore) a buňky BM2 u nichž byla indukována diferenciaci do makrofágů pomocí TPA. Během diferenciaci buňky získaly schopnost fagocytózy.

Postup:

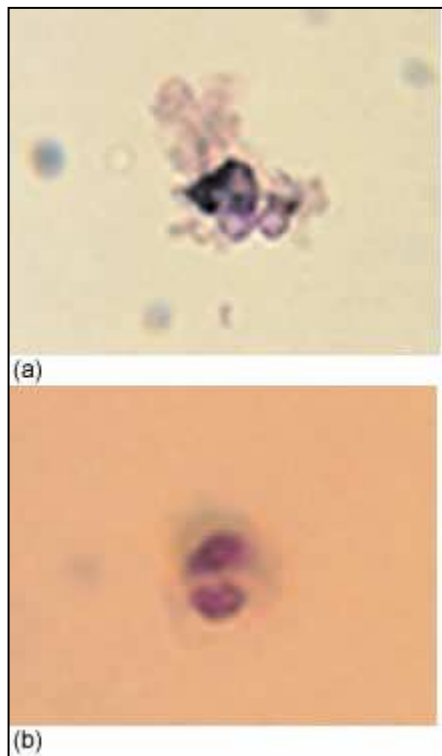
1. K buňkám přidat Dyna(Fago)-beads v poměru 1:5000, tedy 10 μ l beads na 10ml misku
2. Sklizené buňky promýt v 1 \times PBS
3. Do zkumavky s Histopaque přenést buněčnou suspenzi; vrstvy se nesmí promíchat.
4. Cfg na centrifuze s výkyvným rotorem (Heraeus, 400g/30min)
5. Odebrat buňky z rozhraní obou vrstev, promýt 10 ml 1 \times PBS/EDTA
6. Resuspendovat pelet v malém množství PBS a připravíme preparát.
7. Ihned vyhodnotit minimálně 200 buněk

NBT test (Nitroblue tetrazolium test)

Pomocí tzv. NBT testu lze detekovat tzv. oxidativní vzplanutí (*oxidative burst*), kterým vznikají reaktivní kyslíkové radikály, podílející se na odbourávání fagocytovaných částic. Podstatou testu je přeměna bezbarvé látky (nitroblue tetrazolium, tetrazoliová modř) na tmavě modrý formazan. Vyhodnocení se provádí změřením absorbance v buněčném lyzátu, případně vizuálně v intaktních buňkách pod mikroskopem.



Obr. 26. Nitroblue tetrazolium



Obr. 27. Aktivované neutrofilů (a) fagocytují a redukuje molekuly NBT na tmavě modré krystaly formazanu. Pro kontrolu slouží neaktivované neutrofilů (b). Pacienti trpící CGD (*Chronic Granulomatous Disease*), mají poškozený mechanismus „zážehu“ oxidativního vzplanutí, nemohou likvidovat fagocytované bakterie a jejich NBT test je tedy negativní a ve výsledku podobný obrázku (b).

→ Chapel H. et al. 2006. Essentials of clinical immunology. Blackwell Publishing.

Postup:

1. 1×10^6 buněk cfg. 1500rpm/5min.
2. Odsát supernatant
3. K peletu přidat roztoky I a II
4. Rozsuspendovat buňky
5. Inkubovat 1 hod/37°C (inkubátor)
6. Přidat 200 μ l 10% Tritonu , lehce roztřepat
7. Extrahovat 20-30 min./RT
8. Po skončení inkubace 200 μ l na mikrotitrační destičku
9. změřit absorbanci na ELISA readeru při 620nm (reference) a 570nm (measurement)

Roztoky:

I: $1 \times$ PBS

II: 1mg/ml NBT v PBS + 8 μ l/ml zásobního roztoku PMA (TPA 100 μ M)

10% Triton X-100 v 100mM HCl