

Test aktivity lymfocytů

Teorie: Proliferace je jedním z fyziologických jevů buněčné aktivace. Použitím radioaktivně značeného thymidinu (^3H -thymidin) jsme schopni v laboratoři proliferaci lymfocytů kvantitativně vyšetřit, neboť thymidin se zabuduje do DNA dělicích se buněk a takto je označí. Tvorba nové DNA je úměrná množství buněčných dělení. Další variantou pro rychlé stanovení proliferace a cytotoxicity savčích buněk je stanovení množství buněčného ATP (adenosin trifosfát). Tento test nahrazuje inkorporaci ^3H thymidinu..

K dělení můžeme lymfocyty stimulovat in vitro polyklonálně a nebo specificky. Lektiny, rostlinné proteiny vážící se na membránové glykoproteiny buňky, působí jako polyklonální mitogeny. Aktivují lymfocyt nezávisle na jeho antigenní specifitě. Pro stimulaci T-buněk se používají phytohemaglutinin (PHA) a konkavalin A (Con A), k aktivaci B-buněk pak pokeweed mitogen (PWM). Monoklonálních protilátek lze také použít, příkladem může být anti-CD3 protilátka. Tetanického toxoidu (antigenu) využíváme ke specifické stimulaci, podobně též *E. coli* nebo tuberkulinu. Přítomnost buněk prezentujících antigen, jako jsou monocyty, je zde nezbytná.

Při vyšetření inkubujeme izolované buňky nebo plnou krev pacienta s příslušným stimulantem. Po několikadenní kultivaci přidáme do suspenze triciem značený thymidin a po několika hodinách oddělíme buněčnou suspenzi (s navázaným označeným thymidem) od kultivačního media (v němž se nachází thymidin, který nebyl do DNA inkorporován). Energii radiace převedeme na světelný signál, testované buněčné vzorky vyhodnocujeme ve scintilačním počítači. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet světelných impulzů za minutu. Celá metodika je náročná na sterilitu i přesnost provedení a je používána zejména při vyšetření nemocných s podezřením na závažnou primární nebo sekundární imunodeficienci.

Test blastické transformace na webu - <http://www.biothema.com/>

Cíl: Stanovení množství ATP u lymfocytů

Izolace lymfocytů ze sleziny myši

Myši jsou vykrváčeny krční tepnou a slezina odstraněna

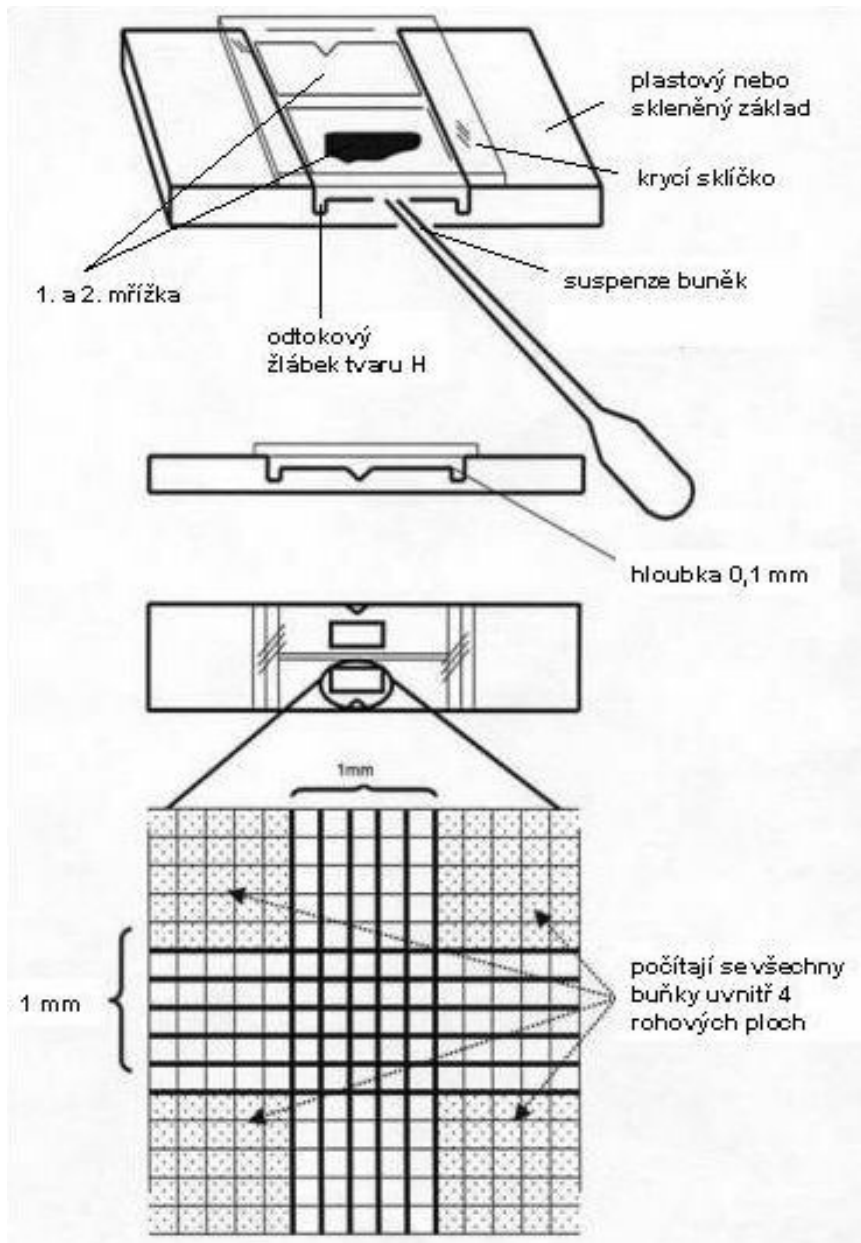
Slezina je jemně homogenizována v PBS. Suspenzi buněk se zbytky sleziny přelejeme opatrně přes gázu. Centrifugujeme 10 min. při 1000 ot/min. Sediment resuspendujeme v asi 300 μl NH_4Cl . Centrifugujeme 10 min při 1500 ot/min. Sediment resuspendujeme v asi 300 μl PBS. Konečné promytí 3x. Nakonec buňky resuspendujeme v cca 1,5 ml PBS a spočítáme.

Doředíme na potřebnou koncentraci. Pro zachování a kultivaci buněk používáme MEM médium. V roztoku se nachází kromě lymfocytů také mono a gra.

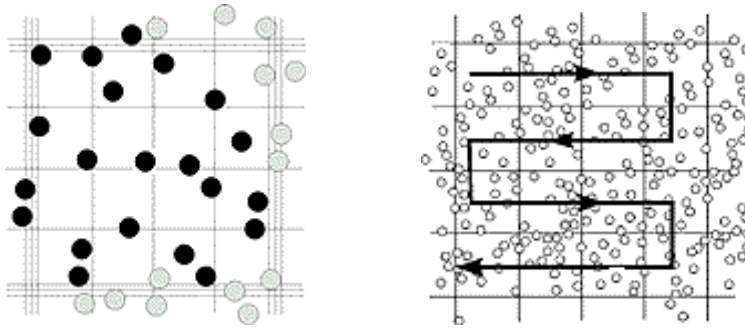
Pomůcky: centrifuga s malým rotorem, komůrky na počítání buněk, eppendorfky, umělohmotné testovací nádoby - kalibrované, nastavitelné mikropipety a špičky

Chemikálie: ajatin, 0,87% NH_4Cl , PBS roztok na uchování lymfocytů, myší slezina, MEM médium

Počítání v Bürkerově komůrce:



upraveno podle http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Figure_4.2.htm



Převzato z <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>

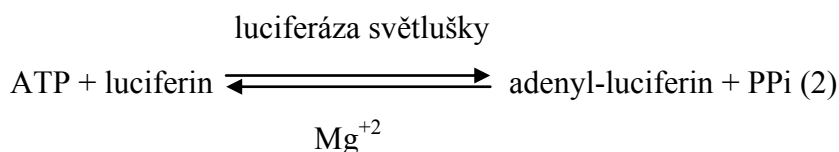
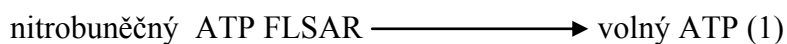
(viz též http://www.superior.de/pgr06_info_e.htm)

K výpočtu množství buněk v 1 ml suspenze je třeba znát tloušťku vzorku nad mřížkou. Každý z 25 čtverců obvykle měří 0,2 x 0,2 x 0,1 mm a má tedy objem 0,004 mm³. Takže v 25 čtverců má objem 0,1 mm³. Po vynásobení zjištěného počtu buněk v 25 čtvercích hodnotou 10 000 dostaneme tedy počet buněk v 1 ml suspenze.

Technický přehled

Tento kit se dá použít pro detekci bioluminiscence adenosin 5'-trifosfátu (ATP) uvolněného ze suspenze živých somatických buněk. Koncentrace buněk se dá vypočítat za předpokladu, že se množství ATP na každou buňku příliš nemění. Množství živých somatických buněk se počítá selektivně, protože, když buňka zemře, její ATP se významně sníží.

Obecně vzato, živá somatická buňka obsahuje 1 pikogram (10⁻¹² gramů) nebo 2 femtomoly (2 x 10⁻¹⁵ molů) ATP. Přesnější údaj pro určitou buněčnou linii a růstové médium lze získat z literatury nebo obarvením a počítáním živých buněk. ATP živé somatické buňky může být definován jako:



Reakce 1 a 3 jsou v podstatě nevratné, reakce 2 ano s rovnováhou daleko vpravo. Když je ATP limitujícím faktorem, vyzářené světlo je úměrné množství přítomného ATP, které je postupně úměrné počtu somatických buněk ve vzorku.

S využitím předchozího postupu tento kit měří ATP uvolněný méně než 10^5 nebo až 2×10^5 živými somatickými buňkami (vzorek obsahující od 400 do 8×10^6 buněk na mililitr). To se velice dobře shoduje s citlivostí mikroskopu s použitím hemocytometru, který může detekovat pouze 2×10^5 buněk na 1 ml. Výsledky získané tímto kitem závisí především na míře zhášení médiem, ve kterém jsou buňky.

Materiál:

ATP Assay Mix - lyofilizovaný prášek obsahující luciferázu, luciferin, $MgSO_4$, DTT, EDTA, BSA a tricínové soli. **ATP Assay Mix Stock Solution** - obsah lahvičky s ATP Assay Mix rozpustit v 5 ml předestilované vody, aby vznikl zásobní roztok o pH 7,8. Jemným obracením lahvičky nebo krouživými pohyby úplně rozpustit obsah lahvičky. Během této doby je možné pozorovat úbytek pozadí. **ATP Assay Mix Working Solution** - pro většinu somatických buněk se doporučuje 25x naředit pomocí ATP Assay Mix Dilution Buffer. Jestliže jsou pro stanovení použity buňky přímo z buněčné kultury, pak je při tomto 25 násobném ředění možné měřit ATP uvolněné z 500 až 2×10^5 buněk v jednom vzorku nebo z 2×10^4 až 8×10^6 buněk v 1 ml. Změřené světlo nezávisí pouze na počtu buněk a množství ATP na jednu buňku, ale i na stupni zhášení světla médiem, ve kterém buňky jsou.

ATP Assay Mix Dilution Buffer - lyofilizovaný prášek obsahující $MgSO_4$, DTT, EDTA, BSA a tricínové soli. **ATP Assay Mix Dilution Buffer** - obsah lahvičky rozpustit v 50 ml předestilované vody. Tento roztok je stabilní nejméně dva týdny při teplotě 2-8 °C.

ATP Standard - předvážená lahvička obsahuje 1 mg (2×10^{-6} molů). Aktuální obsah ATP je uveden na štítku. **ATP Standard Stock Solution** - připravit rozpuštěním obsahu lahvičky s ATP standardem v 10 ml předestilované vody. Tento zásobní roztok je stabilní nejméně 24 hodin při teplotě 2-8 °C nebo dva týdny při -20 °C. **ATP Standard Working Solutions** - připravit různým ředěním ATP Standard Stock Solution předestilovanou vodou. Rozsah ředění závisí na požadované citlivosti testu. ATP Standard Working Solutions jsou při uchování v ledu stabilní až 8 hodin.

Somatic Cell ATP Releasing Reagent - 10x koncentrovaný přípravek, který zvyšuje průchodnost různých malých molekul membránami. Buněčný ATP je uvolňován téměř okamžitě. Před použitím 10x zředit předestilovanou vodou. Je stabilní 6 týdnů při teplotě 25 °C a delší nedefinovanou dobu při teplotě 2-8 °C. Zmrazení roztoku neovlivňuje jeho vzhled nebo schopnost uvolňovat ATP.

Postup:

Pro přípravu složek a během celé procedury používejte 0,2 µm filtrovanou predestilovanou vodu (17 MΩ .cm nebo ekvivalentní).

Najednou může být vyšetřeno až 15 vzorků.

1. Přidat 0,1 ml ATP Assay Mix Working Solution do reakční nádoby. Zamíchat a nechat stát při pokojové teplotě 3 minuty. Během této doby se bude endogenní ATP hydrolyzovat, čímž se sníží pozadí

2. Do oddělené nádoby obsahující 0,1 ml 1x Somatic Cell ATP Releasing Reagent, přidat 0,05 ml redestilované vody stejného ředění, jaké je použito pro ATP standard. Pak přidat 0,05 ml vzorku obsahujícího buňky na měření, rychle zamíchat, přenést 0,1 ml do reakční nádoby a ihned změřit množství emitovaného světla [$L_{(sam)}$] luminometrem.

Poznámka: Podobně jako v případě jednoduchého ATP Standard Assay, přidání média a 1x Somatic Cell ATP Releasing Reagent může způsobit zhášení. Ačkoliv by toto zhášení nemělo snižovat efektivitu testu, je možné snížit míru zhášení zředěním vzorku buněk v destilované vodě nebo zředěním pufru s pH asi 7,8.

3. Množství uvolněného ATP je nejlepší stanovit pomocí vnitřního standardu. Přidat 0,1 ml ATP Assay Mix Working Solution do reakční nádoby a nechat stát při pokojové teplotě 3 minuty. Do oddělené nádoby obsahující 0,1 ml 1x Somatic Cell ATP Releasing Reagent přidat 0,05 ml vhodného ATP standardu a 0,05 ml vzorku buněk. Rychle zamíchat, přenést 0,1 ml do reakční nádoby a okamžitě změřit množství emitovaného světla [$L_{(SAM+IS)}$] luminometrem.

Poznámka: Pro nejlepší výsledky by množství ATP v přidaném standardu mělo být asi ekvivalentní množství ATP v měřeném vzorku buněk. Jinak řečeno, světlo emitované vzorkem plus interní standard by mělo být dvakrát vyšší než u vzorku samotného.

Výsledky

Množství ATP ve vzorku buněk lze vypočítat pomocí následující rovnice:

$$\text{ATP}_{(\text{SAM})} = \frac{\text{ATP}_{(\text{IS})} \times \text{L}_{(\text{SAM})}}{\text{L}_{(\text{SAM}+\text{IS})} - \text{L}_{(\text{SAM})}}$$

$\text{ATP}_{(\text{SAM})}$ je ATP ve vzorku buněk (v molech)

$\text{ATP}_{(\text{IS})}$ je ATP v přidaném vnitřním standardu (v molech)

$\text{L}_{(\text{SAM})}$ je světlo emitované vzorkem buněk

$\text{L}_{(\text{SAM}+\text{IS})}$ je světlo emitované vzorkem buněk plus vnitřní standard