

Téma: PROTEINY, BUNĚČNÉ STRUKTURY, POŠKOZENÍ DNA

Úvod:

Během diferenciaci buněk dochází k výrazným změnám v expresi a aktivitě celé řady proteinů. Tyto změny mohou být kvalitativní (syntéza proteinu, který v prekurzorech nebyl exprimován) nebo kvantitativní (změna v množství syntetizovaného proteinu). Diferenciaci může být také doprovázena změnami v lokalizaci či post-translačních modifikacích určitých proteinů ovlivňujících jejich aktivitu.

Cíl:

Definovat změny v expresi, lokalizaci a specifické aktivitě vybraných proteinů během makrofágové diferenciaci monoblastů BM2.

Úloha č.1

DETEKCE VIMENTINU V LYZÁTECH MONOCYTŮ BM2 POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

Vimentin:

Cytoskeletární protein o velikosti 57 kDa. Patří do skupiny intermediárních filament. Exprimován v buňkách mezodermálního původu. Jeho intracelulární hladina se mění během diferenciaci některých typů buněk (př. krevní buňky).

SDS elektroforéza proteinů:

- dělení proteinů dle jejich molekulové hmotnosti (pro určení MW využití markeru)
- migrace ovlivněna i modifikacemi proteinů (př. glykosylace ...)
- nejčastěji se používá diskontinuální systém (rozdílné pH a iontová síla elektroforetického pufru, horního a dolního gelu)
- horní a dolní gel (na jejich rozhraní dochází k zakoncentrování proteinů ze vzorku)
- gel: polyakrylamid – polymerace akrylamidu, kroslinkováno N,N'-metylen-bis-akrylamidem
- dělení proteinů dle MW – koncentrace gelu, počet kroslinek

Elektroforetický pufr:

Akrylamid a bisakrylamid – **neurotoxin (pracujeme v rukavicích)**

SDS, Tris pufr

Ammonium persulfát – poskytuje radikály pro polymerizaci

TEMED (tetramethylethyléndiamin) – akceleruje polymeraci akrylamidu

Vzorek:

SDS se váže na proteiny – ty pak mají záporný náboj

Redukční činidlo (merkapt ethanol, dithiothreitol) – disociace proteinových komplexů na podjednotky

Barvení proteinů:

Soli stříbra (nejcitlivější), Coomassie brilliant blue – nespecifická vazba na proteiny

Westernův přenos: - polosuchý, ponořený

Membrány: nitrocelulóza, PVDF, nylonové membrány

- liší se kapacitou vazby proteinů, vážou různě různé proteiny
- lze na ní i barvit proteiny (Ponceau S, India Ink, Amido Black ...)

Protilátky:

Primární – monoklonální, polyklonální

Sekundární – konjugované s enzymy (HRP, AP ...), biotinylované ...

Substráty:

Chromogenní, chemiluminiscence

Příprava vzorků:

1×10^6 buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 5ml misce 24 hod. Zároveň kultivovat stejné množství BM2 buněk jako kontrolu. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20°C . Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Ke vzorkům přidat alespoň dvojnásobek kompletního 2xCSB pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů v takto naředěných vzorcích byla stejná.

Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A' (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo nanášeno stejné množství proteinů od každého vzorku.

Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacery a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

Barvení gelu na proteiny:

1. Gel ponoříme do barvicího roztoku a ponecháme na kývačce 1 hod.
2. Odlijeme barvicí roztok a gel zalijeme roztokem odbarvovacím. Odbarvujeme opět na kývačce. Odbarvovací roztok měníme každých 20-30 minut. Po odbarvení gel vysušíme na sušičce gelů.

Sestavení blotovací aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
4. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
5. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
6. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.

8. Blotujeme 1 hod při 100 V.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulóзовou membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-vimentin ředěnou 1:1000 v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 7 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:10000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě, osušíme na ubrousku a umístíme na fólii.
7. Smícháme roztoky A a B z ECL kitu (Amersham) 1:1 a nakapeme na membránu. Inkubujeme 5 minut.
8. Osušíme membránu ubrouskem, přiklopíme folií a ve světlotěsné kazetě odneseme do temné komory.
9. Přiložíme fotografický papír a exponujeme 1 minutu (podle intenzity signálu upravíme délky dalších expozic)
10. Fotografický papír přeneseme do vývojky dokud se neobjeví signál.
11. Krátce opláchneme ve vodě a ponoříme jej na 5 minut do ustalovače.
12. Nakonec film promýváme alespoň 1 hodinu v destilované vodě a vysušíme.

Použité roztoky

Transferový pufr:

48mM Tris
39mM glycin
20% methanol

TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0
57,6 ml 5M NaCl
doplnit vodou do 2 litrů

TBS-Tween:

přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

Odbarvovací roztok:

500 ml metanolu
400 ml destilované vody
100 ml kyseliny octové

Tris-glycin elektroforetický pufr (pH=8,3):

25mM Tris
250mM glycine
0,1% (w/v) SDS

Pufr pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl
50 ul 1M MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10 ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)

H₂O 4,9 ml
40% Akrylamid 2,4 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml
10% SDS 0,1 ml
Ammonium persulfate 75 ul
TEMED 7,5 ul

Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H₂O 5,62 ml
40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 30 ul
TEMED 10 ul

2xCSB lyzační pufr

6,9 ml H₂O
2 ml glycerol
1,2 ml 1M Tris pH=6,8
0,4 ml 0,2% Bromfenolová modř v 1M Tris pH=6,8
2 ml 20% SDS
+ před použitím přidat 100 ul beta-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB

Úloha č.2

DETEKCE ZMĚN MNOŽSTVÍ, LOKALIZACE A STRUKTURNÍHO USPOŘÁDÁNÍ VIMENTINU BĚHEM MAKROFÁGOVÉ DIFERENCIACE MONOBLASTŮ BM2 POMOCÍ NEPŘÍMÉ IMUNOFLOURESCENCE

Během makrofágové diference dochází k nárůstu exprese proteinu intermediárních filament – vimentinu. Ten vytváří u makrofágů hustou bohatě rozvinutou síť vláken v cytoplazmě.

Nepřímá imunofluorescence:

- detekce množství, lokalizace a strukturního uspořádání proteinů ve fixovaných buňkách nebo tkáních
- využití specifických primárních protilátek
- sekundární protilátky fluorescenčně značené (FITC, rhodamin, texas red...)
- fluorescenční molekula po excitaci zářením o určité vlnové délce emituje záření o jiné vlnové délce
- fluorescenční mikroskop – excitační filtr (záření dopadající na preparát)
 - emisní filtr (filtruje záření vycházející z preparátu)
- umožňuje detekci více proteinů naráz (více fluorescenčních molekul)
- lze lokalizovat detekovaný protein do buněčných organel značených specifickými sondami

Fixační média

Fixace je operace, prováděná za účelem zastavení všech procesů, probíhajících v buňce, zachování co možná nejpřesnějšího stavu a struktury tkáně. Fixační činidlo je voleno podle řešeného diagnostického problému, typu a velikosti dostupného materiálu a podle zvolené zalévací a barvicí metody.

Roztoky formaldehydu, paraformaldehydu, glutaraldehydu, methanol ...

Montovací média

Pro ochranné účely a následné optimální mikroskopické vyšetření jsou obarvené buňky montovány vhodnými montovacími činidly. Použitý typ závisí na daném protokolu. Jedním z nejdůležitějších parametrů montovacích médií je index lomu (nD); musí být okolo 1,5, čímž odpovídá indexu lomu skla.

Glycerol, Mowiol (Calbiochem), Vectashield (Vector), Fluoromont-G (Southern Biotechnology Associates) ...

Příprava vzorků

1×10^6 buněk BM2 inkubovat s forbolovým esterem TPA (7.5 ng/ml kultivačního media) v 5ml misce s krycím sklíčkem položeným na dno misky. Po 48 hod jsou buňky přisedlé na krycí sklíčko. Zároveň kultivovat stejné množství BM2 buněk jako kontrolu.

Po 48 hod kontrolní buňky, které zůstávají v suspenzi, sklidit centrifugací při 400 g/5 min. Buňky opláchnout roztokem PBS a 5×10^4 buněk cytocentrifugovat na krycí sklíčko 400 g/ 5 minut. Sklíčka s buňkami (kontrolními i po kultivaci s TPA) opláchnout v TBS a fixovat ledovou směsí aceton/metanol (1:1) 10 minut při 4°C.

Po fixaci promýt sklíčka s buňkami 3x 5 minut v TBS a inkubovat 1 hodinu s anti-vimentin primární protilátkou ředěnou 1:100 v TBS-Tween. Sklíčka promýt 3x v TBS-Tween a inkubovat v temnu 1 hodinu se sekundárním protilátkou konjugovanou s FITC ředěnou 1:100 v TBS-Tween. Sklíčka opět

promýt – 2x TBS-Tween a 2x TBS. Na závěr inkubovat 5 minut v TBS s roztokem propidium iodidu (10 ug/ml) – barvení jader.

Nakonec sklíčka opláchneme destilovanou vodou a montujeme na podloží sklíčka 3 ul Mowiolu (montovací medium od firmy Calbiochem). Preparáty pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu s vhodným emisním a excitačním filtrem pro FITC.

Použité protilátky a roztoky:

TBS:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0
57,6 ml 5M NaCl
doplnit vodou do 2 litrů

TBS-Tween:

přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

Fixační směs:

Aceton:metanol 1:1

Montovací médium:

Mowiol (Calbiochem)

Protilátky:

myší monoklonální anti-vimentin protilátka (Sigma Aldrich)

anti-myší IgG konjugovaná s FITC (Sigma Aldrich)

Doplňková úloha – barvení buněčných struktur na živých buňkách – jádra a lysozomy

Pro barvení struktur v živých buňkách lze využít fluorescenční látky (sondy), které procházejí cytoplazmatickou membránou a následně se hromadí v určitém buněčném kompartmentu. Barvení může být úměrné některé z důležitých vlastností barvených organel (membránový potenciál u mitochondrií, acidifikace lysozomů ...). Další alternativou jsou vektory pro expresi fúzních proteinů (protein se specifickou buněčnou lokalizací + fluorescenční protein). Existují pochopitelně i sondy pro detekci struktur ve fixovaných buňkách.

Příklady:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/tables/Molecular-Probes-organelle-selective-probes.html>

Jádra – Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYTO

Mitochondrie – MitoTracker red, MitoTracker orange, rhodamine 123, JC-1

Lysozomy – akridinová oranž, DND-153, DND-160

Hoechst 33342 – permeabilní, vazba na DNA do AT bohatých oblastí do maleho zlabku, excitace 350 nm, emise 461 nm

Akridinová oranž – permeabilní, protonuje se v lysozomech, excitace 503 nm, emise 530 nm

4×10^5 buněk MDA-MB-231 inkubovat v 5ml misce s krycím sklíčkem položeným na dno misky. Po 24 hod jsou buňky přisedlé na krycí sklíčko. Sklíčka s buňkami opláchnout v PBS a inkubovat 5 minut v PBS s akridinovou oranží (5ug/ml) a Hoechst33342 (5 ug/ml). Pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem.

Úloha č.3

TRANSFEKCE ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK ELEKTROPORACÍ

Úvod:

V současné době existuje velké množství metod pro přenos DNA (RNA) do eukaryotických buněk. Obecně je lze rozdělit do 3 kategorií:

Přenos fyzikálními metodami: elektroporace, mikroinjekce

Přenos pomocí virů

Přenos biochemickými metodami: precipitace fosforečnanem vápenatým, využití kationickým lipidových činidel (lipofekce), přenos pomocí DEAE-dextranu

Volba použité metody závisí na typu buněk, požadované účinnosti transfekce a v neposlední řadě také na možnostech laboratoře. Elektroporace se používá pro přechodnou transfekci suspenzních i adherujících buněk a je založena na vystavení buněk krátkému elektrickému šoku, jehož následkem dojde k přechodnému otevření pórů v plazmatické membráně. Těmito póry pronikne DNA do buňky. Při lipofekci dochází nejprve k vytvoření komplexů záporně nabitě plasmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

Cíl:

Naučit se základy manipulace se suspenzními buňkami BM2, vytvořit přechodné transfektanty BM2cmv-EGFP metodou elektroporace.

Postup- elektroporace:

1. 10^7 exponenciálně rostoucích buněk BM2 centrifugovat 5 min/500g
2. resuspendovat pelet v 400 μ l média obsahujícím 1,25% DMSO
3. přidat transfekční směs (10 μ g cmv-GFP nebo tRNA)
4. nastavit elektroporační parametry $U=260V$, $C=1050 \mu F$, $R=2310\Omega$
5. provést elektroporaci a okamžitě přenést buněčnou suspenzi do připraveného média obsahujícího 1,25% DMSO
6. 24 hod. po elektroporaci buňky promýt, pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, vyfotit a stanovit účinnost transfekce.

Úloha č.4

STANOVENÍ TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY RECEPTORŮ PRO KYSELINU RETINOVOU (RAR) V BUŇKÁCH BM2

Úvod:

Mezi významné regulátory genové exprese patří transkripční faktory (TF). Jejich hladina a aktivita musí v buňkách podléhat přísné regulaci. Obecně lze říct, že změna v úrovni exprese určitého TF nemusí automaticky znamenat změnu v jeho aktivitě. Ta může být ovlivněna celou řadou faktorů – fosforylací, vazbou aktivátoru či inhibitoru, lokalizací v buňce ... Aktivita některých TF koreluje s jejich DNA vazebnou schopností a proto ji lze stanovit pomocí gel shift nebo gel supershift assaye. Obecně lze aktivitu libovolného TF stanovit přechodnou transfekcí reportérového plazmidu a následným měřením aktivity reportérových genů v buněčných lyzátech.

Reportérový plazmid:

Plazmid obsahující reportérový gen (nejčastěji luciferázu) pod kontrolou promotoru, jehož aktivita je řízena specifickým TF. V našem případě budeme používat plazmid RARE β 2-TK-LUC, kde genu kódujícímu luciferázu je předřazen minimální promotor s vazebným místem pro RAR.

Postup:

A) TRANSFEKCE

1. Do mikrozkušavky napipetovat 250ul média OPTI-MEM a přidat 6 ul transfekčního činidla Fugene6.
2. Přidat směs plazmidových DNA sestávající se z 1,5 ug RARE β 2-TK-LUC a 1,5 ug CMV- β -gal a promíchat.
3. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
4. Přikapat tuto směs ke 4×10^6 buňkám BM2 ve 2,5 ml kompletního média. Inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
5. Druhý den buňky rozdělit na dvě 5ml misky, přidat 5 ul 10⁻³M kyseliny retinové a inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
6. Buňky sklídit, opláchnout v PBS a resuspendovat ve 100 ul 0,25M Tris pH 7,5.

B) TEST NA AKTIVITU β -GALAKTOSIDÁZY

1. Buněčnou suspenzi lyzovat 3 cykly opakovaného zamrazování a rozmrazování.
2. Po posledním rozmražení centrifugovat buněčný lyzát 5 minut při max. otáčkách v chlazené mikrocentrifuze.
3. Přenést supernatant buněčného lyzátu do nové mikrozkušavky a uchovat v -70°C nebo provést vlastní testy.
4. Pro každý testovaný vzorek na aktivitu β -galaktosidázy připravit následující směs:

100x roztok Mg	4 μ l
1x ONPG	88 μ l
0,1M fosfátový mix pH 7,5	268 μ l
5. Směs rozpipetujte do zkumavek ke 40 ul buněčného lyzátu a inkubujte při 37°C se neobjeví žlutavé zbarvení.
6. Zastavte reakci přidáním 667 μ l 1M Na₂CO₃.
7. Stanovte optickou densitu měřením při vlnové délce 420 nm. (rozsah linearit je 0,2-0,8 OD).

Roztoky:

100x roztok Mg: 0,1M MgCl₂, 4,5M β-merkaptoetanol

1x ONPG: 4 mg/ml o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosidu v 0,1M fosfátovém mixu pH 7,5

0,1M fosfátový mix: 41 ml 0,2M Na₂HPO₄ · 2H₂O a 9 ml 0,2M NaH₂PO₄ · 2H₂O + 50 ml H₂O.

C) TEST NA AKTIVITU LUCIFERÁZY

1. 10 μl lyzátu přenést do 90 μl 0,25M Tris pH 7,5.
2. Přidat 360 μl *luciferase assay buffer*, přenést do luminometrické kyvety a promíchat na vortexu.
3. Přenést do komůrky luminometru, přidat 200 μl roztoku luciferinu (*luciferin stock solution* ředěný 5x H₂O) a zaznamenat údaj o absolutní luciferázové aktivitě na luminometru.
4. Relativní luciferázovou aktivitu každého vzorku stanovit jako podíl absolutní luc. aktivity a β-gal aktivity na 1 μl extraktu.

Zásobní roztoky:

Luciferase assay buffer:

Výsledný roztok	Konc. zásobního roztoku	Příprava 5ml pracovního roztoku
25mM Gly-Gly pH 7,8	250mM	0,5 ml
15mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,8	0,1M	750 μl
15mM MgSO ₄	1M	75 μl
4mM EGTA	400mM	50 μl
2mM ATP	100mM	100 μl
1mM DTT	1M	5 μl
ddH ₂ O	-	3 520 μl

Luciferine stock solution:

1mM D-luciferin

25mM glycylglycine (Gly-Gly)

10mM DTT

Úloha č.5

STANOVENÍ POŠKOZENÍ DNA PO PŮSOBNÍ PEROXIDU VODÍKU NA BUŇKY KARCINOMU PRSU METODOU COMET ASSAY

Úvod:

Stanovení genotoxicity látek je důležité při posouzení jejich využití v praxi. V současné době existuje řada metod, které umožňují stanovit genotoxický účinek látek (Amesův test, test na chromozomové aberace, test výměny sesterských chromatid, testování mutací v genu pro tymidinovou kinázu, stanovení mikrojadra ...). Jednou z možností testování genotoxických účinků na savčích buňkách je comet assay, který je založen na principu detekce migrace DNA v elektrickém poli. Výhodou této metody je jednoduchost, možnost detekce více typů poškození DNA, možnost testování buněk a tkání z in vivo organismů. Existuje celá řada modifikací tohoto testu, které umožňují detekci určitého typu poškození DNA. Asi nejuniverzálnější metodou je comet assay v alkalických podmínkách, která umožňuje současné stanovení dvou – a jedno-řetězcových zlomů ale také jiných typů DNA poškození (kroslinků ...). Podstatou této metody je ukotvení jednotlivých buněk v agarozovém gelu, jejich lyze v alkalickém prostředí a následná elektroforéza. Míru poškození DNA lze stanovit následně pomocí počítačového softwaru. V jasných případech rovněž „okometricky“.

Postup:

a) příprava buněk:

4×10^5 buněk MDA-MB-231 inkubovat v 5ml misce. Druhý den přidat 1 ul 3% peroxidu vodíku. Po 5-10 minutách buňky sklídit, opláchnout PBS a naředit na výslednou koncentraci 20 tis buněk/20 ul PBS.

b) příprava skel:

Na podložní skličko nanést tenkou vrstvu 1% agarózy v PBS a nechat přes noc zaschnout při pokojové teplotě. Druhý den nanést vrstvu 0,5% agarózy v PBS (110 ul), překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Smíchat 20 ul směsi buněk v PBS s 90 ul 0,5% LMP agarózy v PBS temperované na 37°C a nanést na skličko, opět překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Po zatuhnutí na tuto vrstvu nanést poslední vrstvu 0,5% LMP agarózy, překrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout v lednici. Po zatuhnutí sundat krycí sklíčko a ponořit do lyzačního roztoku. Inkubovat přes 1 hodinu/přes noc.

c) elektroforéza a barvení:

Opláchnout skličko v elektroforetickém pufru a položit je do elektroforetické vany s pufrem na dobu 30 minut. Následně běžet elektroforézu na 20V 30 minut. Skličko poté neutralizovat 3 x 5 minut v neutralizačním pufru. Na skličko kápnout 50 ul roztoku propidium iodidu (2ug/ml) a překrýt krycím sklíčkem. Po 5 minutách sejmout krycí sklíčko a pozorovat pod flourescenčním mikroskopem.

Roztoky:

Lyzační roztok: 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris pH=10, 1% Triton X-100

Elektroforetický pufr: 1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13

Neutralizační roztok: 0,5 M Tris, pH=7,5