

## PROTOKOL: **DIFERENCIACE**

Diferenciace je rozrůznění buněk vlivem faktorů okolního prostředí.

Při diferenciaci

- se mění morfolgie buněk
- stoupá aktivita specifických enzymů (např. alkalické fosfatázy)
- stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14)
- vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)
- 

### **Metody detekce diferenciace:**

#### Změna enzymového vybavení buněk

- **Nespecifické esterázy** - Hydrolyza a-naftyl acetátu esterázami vede k vzniku hnědého zbarvení
- **Detekce myeloperoxidázy** - myeloperoxidáza štěpí peroxid kyslíku za vzniku kyslíkových radikálů, které pak oxidují o-dianisidin za vzniku barevných látek chinonového charakteru
- **Detekce alkalické fosfatázy** - alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení, které je detekováno spektrofotometrem. Intenzita zbarvení odpovídá množství alkalické fosfatázy ve vzorku.

#### Produkce ROS při oxidativním vzplanutí (monocyty)

- **Redukce NBT (nitroblue tetrazolium)** - NBT je redukován superoxidem produkovaným monocytami. Redukce vede k změně barvy ze žluté na modrou
- **Oxidace/redukce luminolu** - ROS produkované monocytami oxidují luminol při redukci – chemiluminiscence

#### Změna povrchových molekul

- **Expese CD11b** (R proC3b složku komplementu) a **CD14** (vazba LPS)

#### Změna morfolgie Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace

**Cíl:** Stanovení diferenciace měřením aktivity alkalické fosfatázy u střevní nádorové linie HT-29 po působení mastné kyseliny butyrátu sodného.

### **Chemikálie:**

- substrátový pufr
- 4-p-nitrophenylphosphate ředěný 2mg/1ml substrátového pufru
- ALP ss 5U/ml
- 3mM NaOH

### **pracovní postup:**

- potřebujeme  $0,5 \cdot 10^6$  buněk
- stočit (200G/5min) a odsát médium (v tomto kroku je možné pelet zamrazit a pokračovat jindy)
- opláchnout substrátovým pufrem
- pelet rozpipetovat v 500ul substrátového pufru a dát na led

- sonikovat 5x10s (s mezichlazením) při nastavení 1 (25W)
- stočit
- vzorky nakapat do jamek (96-jamková deska) po 50ul
- stejně nakapat i blank (substrátový pufr) a kalibrační křivku (ředění ALP)
- přidat do jamek **50ul substrátu** (4-p-nitrophenylphosphate - ředěný 2mg/1ml substrátového pufru)
- inkubovat 30min v 37°C
- přidat **50ul 3mM NaOH**
- změřit absorbanci na Fluostaru při 405nm

### **Ředění pro kalibrační křivku:**

- zásobní roztok ALP 5U/ml = 0,25U/50ul ředit 250x substrátovým pufrům (do 500ul dát 2ul ALP) a dostanu 0,001U/50ul. Dále ředit substrátovým pufrům 1:1 :

- 0,0005U/50ul
- 0,00025U/50ul
- 0,000125U/50ul
- 0,0000625U/50ul
- 0,00003125U/50ul
- 0,000015625U/50ul

### **Substrátový pufr:**

- rozpustit 10,05ml diethanolaminu v 70ml destilované vody
- nastavit pH na 9,7
- navážit 0,1016g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O a rozpustit ho v 10ml destilované vody
- smíchat s diethanolaminem a dlouho míchat
- doředit destilovanou vodou na 100ml