

PROTOKOL: **Barvení jader pomocí DAPI**

Během interfáze je DNA dekonzenzována a v jádře probíhá transkripce. Zatímco během mitózy, která předchází buněčnému dělení, je DNA vysoce kondenzovaná a pozorovatelné jsou jednotlivé chromozómy. V mitóze dochází ke zdvojení obsahu DNA a jejímu následnému rozdělení do dceřiných buněk.

K zviditelnění DNA se využívají barviva fluorescenční. Fluorescence je schopnost některých látek po ozáření světlem o kratší vlnové délce (excitační záření) emitovat světlo o delší vlnové délce. Lze rozlišit dva typy fluorescence primární/autofluorescenci a sekundární fluorescenci. Autofluorescence je schopnost některých přirozeně se vyskytujících látek, jako je například chlorofyl, fluoreskovat po dopadu UV záření. Sekundární fluorescenci rozumíme fluorescenci barviva tzv. fluorochromu kovalentně navázaného na sledované buněčné struktury. Fluorochrom DAPI prochází buněčnou membránou se váže do A-T oblastí DNA (1 molekula DAPI na 3 AT-páry) a po ozáření UV světlem dochází k excitaci a následné emisi fluorescence. Po vazbě DAPI na DNA se až 20× zesiluje intenzita fluorescence, protože nedochází ke zhášení fluorescence molekulami vody v roztoku. Po navázání má DAPI 4,6-diamino-2-fenylindol excitaci 358nm emisi 461nm.

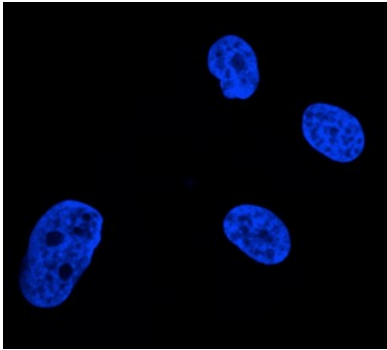
Materiál: kultura epitelálních adherentních buněk WB-F344 (in vitro model jaterních oválných buněk)

Chemikálie:

- DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) c = 1 µg/ml – váže se na DNA
- Mowiol – fixace na skle

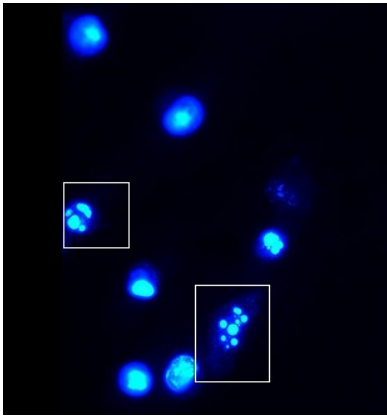
Pracovní postup:

- oplach buněk EDTA/PBS
- sběr buněk pomocí trypsinu
- 100 µl buněčné suspenze opláchnout PBS
- centrifugace 200g/5min, odsát
- přidat 1 ml EtOH zafixovat 1 hod při 4 °C
- **přidat 1 µl DAPI a inkubovat 20 min ve tmě**
- centrifugace 200g/5min, odsát
- resuspendovat v 1 ml PBS
- centrifugace 200g/5min, odsát
- k peletu přidat 6 µl Mowiolu, promíchat a odkápnout na sklíčko
- přikrýt krycím sklíčkem a nechat zatuhnout 24h
- sledování jader pomocí fluorescenčního mikroskopu
- počítání 200 jader / na vzorek



cell nukleus

<http://sciencehastheanswer.blogspot.cz/2012/11/seeing-cells.html>



apoptotic cell - in box

<http://www.flickr.com/photos/exothermic/2560318717/>