

Téma: PROTEINY, BUNĚČNÉ STRUKTURY, BUNĚČNÁ DIFERENCIACE

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. Důsledkem diferenciaci jsou funkční změny buněk, které úzce souvisí se změnami jejich morfologie, proteinového/enzymového vybavení a se změnami proteinových markerů vystavených na jejich povrchu. Cílem této úlohy je osvojení poznatků týkajících se procesů provádějících diferenciaci hematopoietických buněk myeloidní řady a praktická aplikace těchto vědomostí při sledování diferenciaci monoblastů BM2 do monocytů/makrofágů.

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.

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) – akceleroje polymeraci akrylamidu

Vzorek:

SDS se váže na proteiny – ty pak mají záporný náboj

Redukční činidlo (merkptoethanol, 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:

1x10⁶ 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 nitrocelulóзовou 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 pufrům 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 pórézní 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 nitrocelulózovou 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 fólií a ve světlotěsné kazetě odneseme do temné komory.
9. Přiložíme fotografický papír a exponujeme 1 minutu (podle intenzity signálu upravíme délky dalších expozií)
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 nej přesnějšího 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

STANOVENÍ SCHOPNOSTI FAGOCYTOVAT PO INDUKCI DIFERENCIACE BUNĚK BM2 FORBOLOVÝM ESTEREM TPA

Úvod:

Jednou ze základních vlastností makrofágů je schopnost fagocytózy. V současné době existuje řada metod pro stanovení fagocytické aktivity makrofágů. Jedna z nich je založena na kultivaci buněk s Dynabeads M-270 Epoxy kuličkami o velikosti 2,8 mikrometrů (DynaL Biotechnologies). Makrofágy jsou schopné tyto kuličky fagocytovat a počet fagocytovaných kuliček jednotlivými buňkami lze vyhodnotit pod mikroskopem.

Postup:

1. V 10 ml média kultivujte 2×10^6 buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných forbolovým esterem TPA spolu s 10 μ l směsi Dynabeads M-270 Epoxy.
2. Sklizené buňky promýt 1x v 1x PBS, resuspendovat v 1 ml 1x PBS
3. Do zkumavky s 2 ml Histopaque přenést suspenzi buněk – nalévat po stěně, aby se vrstvy nepromíchaly
4. Cfg na centrifuze s výkyvným rotorem (Heraeus) 400g/30 min
5. Buňky vytvoří bělavý prstenec. Vrstvu nad ním opatrně odsajeme, fázi s buňkami odebereme do nové zkumavky a promyjeme 10 ml 1x PBS/EDTA
6. Pelet resuspendujeme v malém množství PBS (podle jeho velikosti...přibližně v 5 μ l)
7. 3 μ l nanese do prostředku skla, překryjeme krycím sklíčkem a přitlačíme
8. Vyhodnocujeme ještě týž den 200 buněk z každého skla

Pozn:

1. Při sklizení dochází ke ztrátě buněk, proto kultivovat na 10 ml miskách
2. Poměr buňky:beads je 1:5, tj. 10 μ l kuliček na 10 ml misku
3. Dodržovat stejně dlouhou dobu kultivace s beadsy, aby bylo možné srovnání
4. Na sklíčko nenanášet víc než 3 μ l, jinak se barva příliš zředí

Úloha č.4

STANOVENÍ ZMĚN V PRODUKCI KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ PO INDUKCI DIFERENCIACE BUNĚK BM2 FORBOLOVÝM ESTEREM TPA POMOCÍ NBT TESTU

Úvod:

Proces fagocytózy je následován sledem chemických reakcí, v jejichž průběhu vznikají látky jako peroxid vodíku a kyselina chlorná, které slouží k usmrcení fagocytující buňkou pohlceného organismu. Tvorba těchto sloučenin je doprovázena vznikem kyslíkových radikálů, jejichž vznik můžeme prokázat pomocí tetrazoliové soli, která je radikály redukována na barevný formazán. Reakci vyhodnotíme spektrofotometricky. Buňky mohou být k tvorbě kyslíkových radikálů stimulovány jako odpověď na probíhající fagocytózu stejně jako forbolovým esterem PMA.

Roztoky:

1. DMEM (bez séra), 37°C
2. 1mg/ml NBT v PBS s 2 µl/ml PMA (zásobní koncentrace 1 mg/ml, přidat těsně před použitím). 200µl na vzorek, připravit dopředu, před použitím zcentrifugovat naplno)
3. 10% Triton X-100 s HCl (na 5 ml roztoku 36 µl konc. HCl a 500 µl Triton X)

Postup:

1. V 5 ml média kultivujte 1×10^6 buněk BM2 po dobu 24 hodin indukovaných a neindukovaných trichostatinem A.
2. 1×10^6 viabilních buněk z kultivační misky centrifugovat při 200g
3. Opatrně odsát supernatant (trocha supernatantu může zůstat)
4. Sediment rozsuspendovat ve 400 µl DMEM bez séra, přidat 200 µl NBT v PBS/PMA (roztok 2)
5. Lehkým protřepáním rozsuspendovat buňky
6. Jednu hodinu inkubovat v termostatu (37°C)
7. Buňky centrifugovat, promýt v PBS a extrahovat ve 400 ul DMSO 15 minut.
8. Centrifugovat na maximum otáček a odebrat supernatant.
9. Změřit absorbanci na ELISA-readeru při 570 nm

Úloha č.5

STANOVENÍ ZMĚN V PRŮCHODU BUNĚČNÝM CYKLEM PO INDUKCI DIFERENCIACE BUNĚK BM2 FORBOLOVÝM ESTEREM TPA

Úvod:

Během terminální diferenciaci dochází u buněk obvykle k zástavě průchodu buněčným cyklem. Zástavu nebo změnu buněčného cyklu lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem pomocí průtokového cytometru FACSVerse. Propidium jodid je interkalující barvivo, které se váže k DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (> 560 nm). Množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se nacházejí.

Postup:

1. V 10 ml média kultivovat 2×10^6 buněk BM2 s a bez přísady TPA.
2. Po 24 hod působení, odsát médium, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS
3. Centrifugace 500g/5min
4. Buňky promýt 1xPBS
5. Pelet rozsuspendovat v 0,5 ml PBS a přikapat 4 ml vychlazeného 70% etanolu
6. Fixace min. 30 min v 4°C
7. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
8. Promýt 4 ml 1xPBS
9. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
10. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
11. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

Úloha č.6

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 100 μ l média OPTI-MEM a přidat 5 μ l transfekčního činidla Lipofectamine2000.
2. Do druhé mikrozkušavky napipetovat 100 μ l média OPTI-MEM a přidat směs plazmidových DNA sestávající se z 1 μ g RARE β 2-TK-LUC a 1 μ g CMV- β -gal.
3. Po 5 minutách smíchat obsah obou mikrozkušavek dohromady.
4. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
5. Přikapat tuto směs ke 4×10^6 buňkám BM2 ve 2,5 ml kompletního média. Inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
6. Druhý den buňky rozdělit na dvě 5ml misky, přidat 5 μ l 10^{-3} M kyseliny retinové a inkubovat v CO₂ inkubátoru do druhého dne.
7. Buňky sklídit, opláchnout v PBS a resuspendovat ve 100 μ l 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 μ l buněčného lyzátu a inkubujte při 37°C se neobjeví žlutavé zbarvení.

6. Zastavte reakci přidáním 667 μl 1M Na_2CO_3 .
7. Stanovte optickou densitu měřením při vlnové délce 420 nm. (rozsah linearit je 0,2-0,8 OD).

Roztoky:

100x roztok Mg: 0,1M MgCl_2 , 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 9 ml 0,2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 50 ml H_2O .

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 H_2O) 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_2PO_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
dd H_2O	-	3 520 μl

Luciferine stock solution:

1mM D-luciferin

25mM glycylglycine (Gly-Gly)

10mM DTT

Úloha č.7

STANOVENÍ ZMĚN V PRODUKCI PROTEINU TROP2 NA POVRCHU BUNĚK 4T1 VYSTAVENÝCH ÚČINKU HYPOXIE

Úvod:

Kromě imunoblotingu existuje řada dalších metod pro stanovení produkce specifického proteinu v buňkách. Jedním z hojně využívaných metodických přístupů je průtoková cytometrie. Podobně jako v případě imunoblotingu je detekce založená na reakci specifické primární protilátky a cílovým proteinem. Následuje inkubace se sekundární protilátkou značenou fluorescenčně. Intenzita fluorescence je následně změřena na průtokovém cytometru. Výhodou této metody je, že množství vybraného proteinu lze určit pro každou jednotlivou analyzovanou buňku. V případě, že pracujeme s živými buňkami, lze buňky na základě produkce tohoto proteinu „roztřídit“ na speciálním sorteru a využít pro další experimenty.

Cíl:

Cílem této úlohy je stanovení množství povrchového antigenu Trop2 v buňkách 4T1 vystavených účinkům hypoxie.

Trop2 je povrchový glykoprotein jehož funkce není dosud úplně známa. Účastní se regulace buněčných signalizací a ovlivňuje buněčnou adhezi a migraci. U některých typů nádorových onemocnění jeho exprese koreluje se špatnou prognózou.

Postup:

a) příprava buněk:

1×10^5 buněk 4T1 nasadit na dvě 5ml misky, jednu umístit do prostředí s normální hladinou kyslíku a druhou do hypoxické komory s hladinou kyslíku 1%. Po 48 hodinách buňky sklídit pomocí roztoku Trypsin/EDTA, přenést do 15ml zkumavky a opláchnout vychlazeným roztokem PBS.

b) příprava kontrolních buněk:

2×10^5 buněk 4T1 nasadit na dvě 5ml misky a transfekovat je jak je popsáno v úloze 6. Jedna miska bude transfekována prázdným vektorem (negativní kontrola), druhá plazmidem kódujícím gen trop2. 48 hodinách buňky sklídit pomocí roztoku Trypsin/EDTA, přenést do 15ml zkumavky a opláchnout vychlazeným roztokem PBS.

Buňky inkubovat s primární protilátkou proti Trop2 (1:50, 30 minut, lednice) v PBS, následně promýt 3x PBS a inkubovat se sekundární protilátkou (1:1500, 30 minut, lednice) značenou PE/Cy7. Opět promýt 3x PBS a analyzovat na průtokovém cytometru.