

# DIFERENCIACE

Diferenciace je rozruznění buněk do specifických typů během vývoje organismu nebo při obnovování tkání.

K obnovným buněčným populacím v dospělém organismu patří krvetvorná tkáň, epitel střeva, epitel kůže, zárodečná tkáň.

Během diferenciace

- se mění morfologie buněk
- **stoupá aktivita specifických enzymů (např. alkalické fosfatázy)** – např. epiteliální buňky střeva
- stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14) – např. krevní buňky
- vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně) – např. buňky imunitního systému

## MĚŘENÍ DIFERENCIACE EPITELIÁLNÍCH BUNĚK

Buněčná linie odvozená z .....byla kultivována na 40 mm kultivačních miskách v inkubátoru při teplotě ....., vlhkosti..... a ..... CO<sub>2</sub>.

Buňky byly indukovány do diferenciace, jejíž úroveň byla následně stanovena jako .....

### Vzorky:

Buněčná linie: .....

Ovlivněná: .....

Čas: .....

Alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení, které je detekováno .....

Intenzita zbarvení odpovídá množství alkalické fosfatázy ve vzorku.

### potřebujeme:

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

### pracovní postup: potřebujeme 0,5 . 10<sup>6</sup> buněk

-stočit (200G/5min) a odsát médium (v tomto kroku je možné pelet zamrazit a pokračovat jindy)

-opláchnout substrátovým pufrem

-pelet rozpipetovat v 500μl substrátového pufru a dát na led

-sonikovat 5x10s (s mezichlazením) při nastavení 1 (25W)

- stočit
- vzorky nakapat do jamek (96-jamková deska) po 50 $\mu$ l
- stejně nakapat i blank (substrátový pufr) a kalibrační křivku (ředění ALP)
- přidat do jamek **50 $\mu$ l substrátu** (4-p-nitrophenylphosphate - ředěný 2mg/1ml substrátového pufru)
- inkubovat 30min v 37°C
- přidat **50 $\mu$ l 3mM NaOH**
- změřit absorbanci na přístroji Fluostar při 405nm

#### **Ředění pro kalibrační křivku:**

- zásobní roztok ALP 5U/ml = 0,25U/50 $\mu$ l ředit 250x substrátovým pufrém (do 500 $\mu$ l dát 2 $\mu$ l ALP) a dostanu 0,001U/50 $\mu$ l. Dále ředit substrátovým pufrém 1:1 :
  - 0,0005U/50 $\mu$ l
  - 0,00025U/50 $\mu$ l
  - 0,000125U/50 $\mu$ l
  - 0,0000625U/50 $\mu$ l
  - 0,00003125U/50 $\mu$ l
  - 0,000015625U/50 $\mu$ l

#### **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

#### **Výsledky:**