

Hodnocení jaderné morfologie pomocí fluorescenční mikroskopie – detekce apoptických buněk po obarvení DNA pomocí DAPI

Princip metody

- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) – barvivo, které se silně váže na DNA (zejm. v oblastech bohatých na A-T), po vazbě na DNA dochází k výraznému nárůstu fluorescence buněčných jader!
- DAPI navázané na DNA má absorpční/excitační maximum o vln. délce 358nm (ultrafialová oblast) a emisní spektrum 461nm (modrá barva), proto je ve fluorescenčním mikroskopu DAPI excitováno UV světlem a detekujeme pak modré světlo.
- DAPI prochází přes plazmatickou membránu, barví tedy jak živé tak permeabilizované buňky (u živých b. je však vstup barvy do buňky méně efektivní, proto je třeba b. membránu permeabilizovat, což zajistí lepší proniknutí barvy do jádra a konstantní signál ve všech buňkách).

Postup:

1. sebrat buňky do zkumavek (trypsinizace, neutralizace médiem, centrifugace 200g/5min)
2. oplach v PBS, centrifugace 200g/5min
3. odsát supernatant a pelet buněk zafixovat – přidat 3ml 70% EtOH (500ul/zkumanka, 4°C), jemně promíchat, nechat fixovat min. 30 min
4. nachystat 1ml zvortexované suspenze buněk v ETOH do zkumavky a přidat 1ul DAPI (1mg/ml)
5. inkubace 5min ve tmě!
6. zcentrifugovat 5min/200g, odsát EtOH
7. přidat k peletu buněk cca 15ul MOWIOLU (montovací médium), promíchat pipetou a kápnout kapku na podložní sklíčko, přiklopit krycí sklíčko
8. nechat ztuhnout do 2. dne ve 4°C
9. detekce apoptických jader (**kondenzovaný a fragmentovaný jaderný chromatin**) pomocí fluor. mikroskopie

10. hodnocení:

počítá se procento buněk s **apoptickým jádrem** z celkového počtu **200 buněk** na vzorek

