

Moderní metody buněčné biologie 2015

Separace živých a mrtvých buněk HEK 293 pomocí buněčného sorteru

Stanovení viability buněk bývá součástí téměř každého protokolu v oblasti průtokové cytometrie. Mrtvé buňky nescificky vážou protilátky a zvyšují tak procento pozitivních buněk při detekci příslušného markeru. Rozlišení mrtvých a živých buněk je proto klíčové pro správný výpočet pozitivní a negativní frakce buněk daného markeru. Nejsnáze lze určit mrtvé buňky pomocí značení Propidium jodidem (PI). PI je fluorescenční látka schopná prostoupit permeabilizovanou (porušenou) buněčnou membránou a vázat se uvnitř buňky na DNA. U živých buněk je membrána intaktní a PI membránou v důsledku velikosti molekuly neprochází. Nárůst intenzity fluorescence u mrtvých buněk je měřen pomocí průtokového cytometru/buněčného sorteru po excitaci laserem o vlnové délce 561 nm, následně detekujeme emitované fotony v oblasti vlnových délek 600-630 nm. Na buněčném sorteru tak lze s využitím dalších parametrů (FSC, SSC) odseparovat kompaktní populaci jednotlivých živých buněk a použít je pro další analýzu.

Vzorek: Adherentní buněčná linie HEK293 (human embryonic kidney)

Příprava suspenze a značení na viabilitu:

- 1) Odsát médium z misky
- 2) Opláchnout buňky pomocí EDTA/PBS
- 3) Odsát EDTA/PBS z misky
- 4) Přidat 0,5ml Trypsinu a ponechat max.5 min/37 °C
- 5) Inaktivovat Trypsin přidáním 5x množstvím kompletního média se sérem
- 6) Stočit 200g/5min
- 7) Odsát, rozsuspendovat v PBS+1%BSA a stanovit koncentraci buněk v suspenzi (např. pomocí počítáče buněk)
- 8) Připravit suspenzi v koncentraci 1×10^6 buněk/ml média.
- 9) Přefiltrovat přes 100 μ m sterilní filtr
- 10) 5 min. před měřením přidat do zkumavky Propidium jodid (stock 0,1mg/ml) 1:100 (=značení na viabilitu)

Schéma gatingu jednotlivých živých buněk:

Výsledky:

Populace	Tato populace představuje	Velikost populace (%)
P1		
P2		
P3		

Otázky a úkoly:

- Popište, co představuje parametr Forward scatter (FSC)?

Relativní velikost částic/buněk.

- Popište, co představuje parametr Side scatter (SSC)?

Granularitu, tzn. vnitřní a vnější strukturu částic.

- Jaká látka se nejčastěji používá ke stanovení viability buněk v oblasti průtokové cytometrie, na jakém principu je založena detekce mrtvé populace buněk?

Propidium jodid, prostupuje porušenou membránou a váže se na DNA.