
CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2020/2021

17. – 20. 5. 2021, BFÚ

Vyučující: Mgr. Barbora Kvokačková, Mgr. Markéta Pícková, Mgr. Ondřej Vacek, Ing. Michaela Chorvátová, Mgr. Radek Fedr, Mgr. Karel Souček PhD.

Skupina A

Bartošíková, Jana, učo 473848 [IMUNO]
Bogdanovič, Adam, učo 474425 [VYBIO]
Böhmová, Martina, učo 474557 [VYBIO]
Čimborová, Katarína, učo 474481 [VYBIO]
Holubová, Barbora, učo 473850 [VYBIO]

Skupina B

Jandová, Nela, učo 468058 [VYBIO]
Jelínek, Matyáš, učo 451421 [IMUNO]
Kramářová, Jana, učo 460918 [VYBIO]
Kučerová, Eliška, učo 474355 [IMUNO]
Marciniak, Jacek, učo 450943 [IMUNO]

Skupina C

Mlčáková, Markéta, učo 508088 [VYBIO]
Motúzová, Veronika, učo 508077 [IMUNO]
Šebestíková, Jana, učo 473806 [FYZIO]
Šmídová, Lucie, učo 460479 [IMUNO]
Voleková, Tereza, učo 451735 [N-EXB SPBI]
Vysloužil, David, učo 447656 [VYBIO]

Den 1 (17.5.)	A)	B)	C)
9 - 12 hod	<ul style="list-style-type: none">▪ Úvod, HeLa 8 Fucci - cytometer▪ MLN-4924 treatment		
13- 16 hod		<ul style="list-style-type: none">▪ Úvod, HeLa 8 Fucci - cytometer▪ MLN-4924 treatment	

Den 2 (18.5.)	A)	B)	C)
9 – 12 hod	<ul style="list-style-type: none">▪ Proliferace a bun. cyklus		<ul style="list-style-type: none">▪ Úvod▪ Imunofenotypizace
12-15 hod	<ul style="list-style-type: none">▪ HeLa 8 Fucci - mikroskop	<ul style="list-style-type: none">▪ HeLa 8 Fucci - mikroskop	
15-18 hod		<ul style="list-style-type: none">▪ Proliferace a bunkový cyklus	

Den 3 (19.5.)	A)	B)	C)
9 – 13 hod	▪ Imunofenotypizace		▪ HeLa 8 Fucci- cytometer ▪ MLN-4924 treatment
13 – 17 hod		▪ Imunofenotypizace	

Den 4 (20.5.)	A)	B)	C)
9 – 15 hod			▪ HeLa 8 Fucci – mikroskop ▪ Proliferace a bunkový cyklus

Protokol 1

Fucci 8 buňky - sběr, měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenčních proteinů, analýza na konfokálním mikroskopu

Protokol 2

Detekce proliferace, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk DU-145 inhibitorem neddylace

Protokol 3

Imunofenotypizace lidské krve

Protokol 1

Model HeLa 8 Fucci cells – měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenčních proteinů

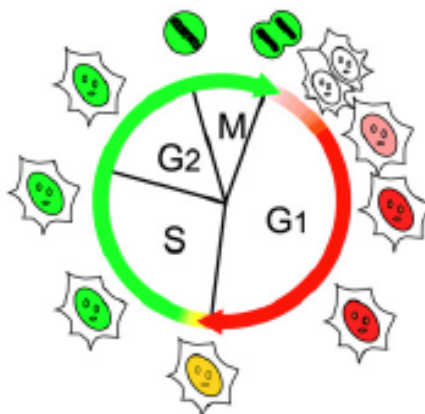
Cíl

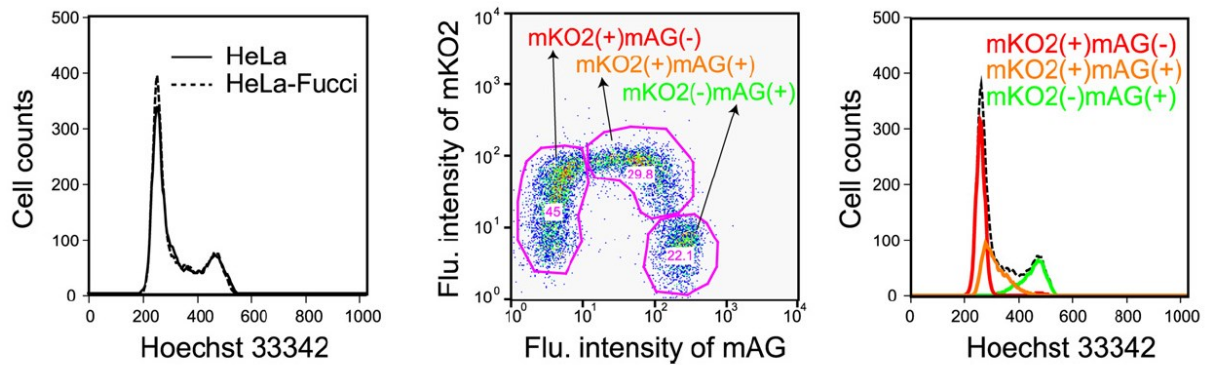
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- měření proběhne na přístroji BD FACS Verse
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo
- analýza buněk na konfokálním mikroskopu po ovlivnění různými látkami

Teorie

Buněčná linie HeLa 8 Fucci

- buněčná linie HeLa – lidská permanentní buněčná linie odvozená z karcinomu děložního čípku
- nejstarší a jedna z nejčastěji používaných lidských buněčných linií
- Fucci próba (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) – umožňuje vizualizovat progresi buněčného cyklu u živých buněk
- buňky s Fucci ve fázi G1 emitují červené světlo, ve fázi S/G2/M zelené světlo
- více – viz pdf. souboru uložené ve studijních materiálech





(Sakaue-Sawano et al., 2008; viz studijní materiály)

1) ANALÝZA NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Materiál

- připravená buněčná line **HeLa 8 Fucci**
- **roztok PBS+EDTA** (kyselina ethylendiamintetraoctová). EDTA je chelatační činidlo, které mimo jiné vychytává Ca^{2+} ionty, čímž rozrušuje mezibuněčné spoje
- **trypsin** - pankreatický enzym (serinová proteáza), štěpí amidové a esterové vazby argininu a lysinu. Působení trypsinu uvolňuje adherentní buňky od kultivačního povrchu
- **nesterilní médium se sérem** – inaktivace trypsinu
- **PBS** – oplach buněčné suspenze

Postup:

Sběr a příprava vzorků

- odsát médium z buněk
- přidat 2 ml PBS+EDTA – 1-2 minuty nechat působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat v termostatu (37°C) dokud se buňky neuvolní (cca 1-2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- misku opláchnout 1 ml PBS, přenést do zkumavky k buněčné suspenzi
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 1 ml PBS
- stočit 200g 5 min
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 300 μl PBS a měřit

Výsledky

Popište postup měření buněčného cyklu u této linie + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

2) ANALÝZA NA KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPU

Postup:

den 1: Výsev buněk HeLa 8 Fucci na mikroskopickou analýzu

den 2: Ovlivnění látkami

MLN-4924 (zásobní koncentrace 10 mM, výsledná koncentrace 1 μ M)

TRAIL (100 ug/ml zásobní koncentrace, 50 ng/ml výsledná koncentrace)

Mitomycin (zásobní koncentrace 1 mg/ml, výsledná koncentrace 1 μ g/ml)

Doplňte poznámky k látkám TRAIL a Mitomycin (co to je za látky, co způsobují a k čemu se používají), viz poznámky u MLN-4924 v protokolu č. 2)

Dopočtěte množství látek, které se bude k buňkám přidávat (V celk.= 300uL)

den 3: Analýza buněk na mikroskopu

Popište postup analýzy na mikroskopu a změny, které jste pozorovali u buněk ovlivněných látkami

Protokol 2

Detekce proliferace, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk DU-145 inhibitorem neddylace

Cíle

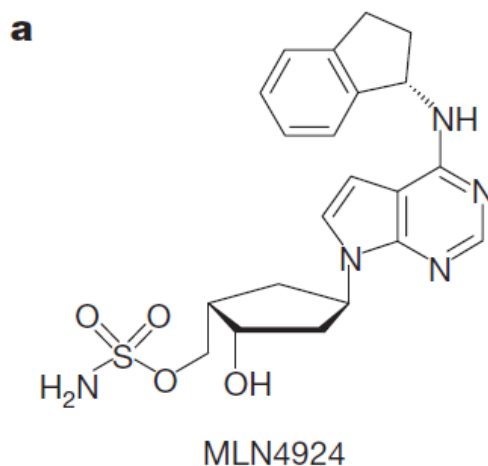
- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii DU-145 inhibitorem neddylace (MLN-4924 – **0,11uM**) a vyšetřit účinky jeho působení
- působení MLN-4924 po dobu 24 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu
- měření proběhne na přístroji Attune Flow Cytometer

Teorie

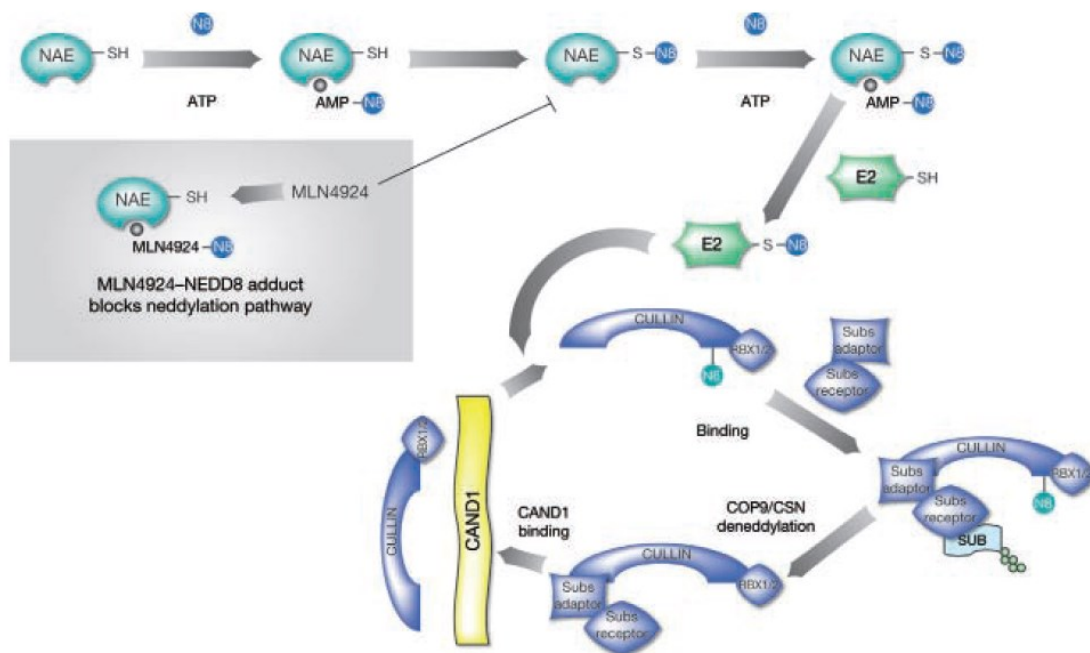
MLN-4924

- ATP kompetitivní inhibitor
- I. fáze klinického testování pro lymfom, mnohočetný myelom, AML, ALL, melanom a další nehematologické nádory
- Tvoří velmi stabilní adukt mezi NEDD8 a MLN-4924 vede k zastavení dráhy neddylace (viz obrázek). Dráha neddylace je nezbytná pro aktivitu ubikvitin ligázy Skp2^{SCF}, která se účastní regulace různých buněčných pochodů. Mezi její významné substráty patří proteiny řídící procesy, jako jsou buněčný cyklus (p27^{Kip1}, p21^{cip1}), buněčné replikace (Cdt1) a další.

Struktura inhibitoru MLN-4924 (Soucy et al., 2009):



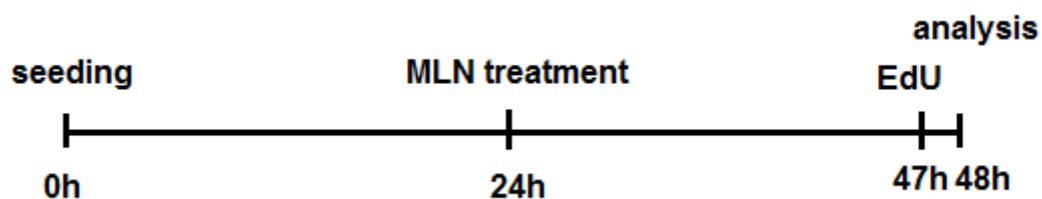
Působení inhibitoru MLN-4924 na zastavení dráhy neddylace (Soucy et al., 2010):



MĚŘENÍ PROLIFERACE A BUNĚČNÉHO CYKLU

Materiál

- buněčná linie DU-145 (kontrola a ovlivněné buňky)
- roztok PBS+EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- trypsin
- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety
- PBS + 1% BSA
- Live Dead Fixable stain kit Red
- Edu click-iT AF488 kit
- PO-PRO-1



Postup

1. Sběr a příprava vzorků

- odsát médium z buněk
- přidat 3 ml PBS+EDTA – nechat 2 minuty působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat v termostatu (37°C) dokud se buňky neuvolní (cca 2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- stočit 200g 5 minut, odsát supernatant

2. Značení viability – LD Green/LD Yellow

- naředit značku pro viabilitu v PBS (1:1000)
- přidat 100 μ l/vzorek, inkubovat 15 min, 4°C
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

3. Fixace

- rozsuspendovat buňky ve 100 μ l 4% PFA
- inkubovat 15 min, RT
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

4. Permeabilizace

- rozsuspendovat buňky ve 100 μ l 0,15% Tritonu X-100
- inkubovat 15 min, RT
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

5. Click-iT reakce

- rozdělit vzorky do dvou zkumavek, do jedné přidat pouze PBS + 1% BSA, do druhé připravenou click-iT reakční směs
- připravit click-iT reakční směs dle rozpisu
- přidat 125 μ l směsi/vzorek
- inkubovat 30 min, RT ve tmě
- do obou zkumavek přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

	1 reakce
PBS	109,5 μ l
CuSO ₄	2,5 μ l
Fluorescent dye azide	0,625 μ l
Reaction buffer additive (diluted 10x)	12,5 μ l
Total reaction volume	125 μ l

6. Značení buněčného cyklu

- naředit značku PO-PRO-1 (s.s. 1mM) v PBS (1:10 000)
- přidat 500 µl/vzorek
- inkubovat 30 min, RT ve tmě

Výsledky

Popište postup měření a vyhodnocování buněk na průtokovém cytometru + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

Protokol 3

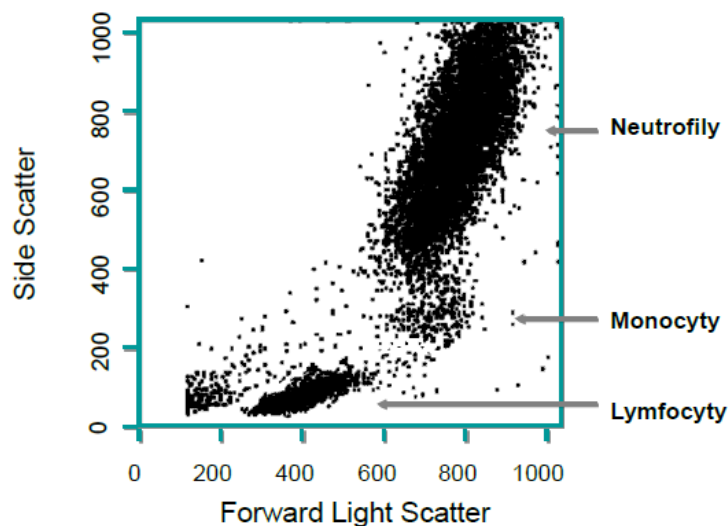
Imunofenotypizace lidské krve

Cíl

- Cílem experimentu je stanovit zastoupení jednotlivých populací buněk v krvi na základě exprese, pro tyto buňky typických, povrchových markerů.
- Dále u neutrofilních granulocytů bude stanovena míra aktivace po stimulaci s G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), prozánětlivým cytokinem, který aktivuje buňky myeloidní řady.
- Měření proběhne na průtokovém cytometru SONY SP6800 s následným vyhodnocení ve FlowJo.

Teorie

- Pojem imunofenotypizace představuje stanovení jednotlivých subpopulací buněk (primárně leukocytů) na základě exprese vybraných povrchových CD antigenů (markerů), a to s použitím fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti daným antigenům.
- Na základě rozptylu světla jsou populace rozděleny dle velikosti a granularity (Obr. 1).
- CD antigeny jsou povrchové molekuly buněk, které mají stejný epitop, identifikovatelný stejnou protilátkou umožňující rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci. Většinou jsou to receptory nezbytné pro funkci dané buňky.



Obr. 1: FS a SS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů

Postup

- krev zdravého dobrovolníka bude odebrána zdravotní sestrou do antikoagulačního činidla (40 µl heparinu/1 ml krve)
- krev rozdělit na dva vzorky, přičemž jeden vzorek otreatovat s G-CSF na 120 min
- připravit si mix protilátek – viz Tab. 1
- po uplynulé době ze suspenze přidat do každé flow zkumavky po 100 µl (1. zkumavka nebarvená + 2. izotyp + 3. barvená)
- buňky ve zkumavce zafixovat 3,2% formaldehydem 1:1 na 15 min, RT
- následně zlyzovat erythrocyty s dH₂O 5 min, RT
- takto připravené suspenze stočit (400g, RT, 7 min) a resuspendovat ve 120 µl PBS s 0,1 % BSA
- přidat mix protilátek do zkumavek 2 a 3 a inkubovat 15-20 min, led
- přidat 4 ml PBS na přemytí
- stočit (400g, RT, 7 min) a resuspendovat ve 120 PBS µl, led
- analýza na FC

Tab. 1: Použité protilátky pro FC

zkumavka č.	CD marker	fluorochrom	populace buňek	ředění	excitace/emise (nm)
1	nebarvená ctrl	---	---	---	---
2	Izotyp	PerCP	---	1:40	482/675
	Izotyp	PE	---	1:40	496/578
	Izotyp	PE/Cy7	---	1:40	496/785
	Izotyp	APC/Cy7	---	1:40	650/785
	Izotyp	APC	---	1:40	650/660
3	CD11b	PerCP	Neutrofil - aktivace	1:40	482/675
	CD3	PE	T-lymfocyt	1:40	496/578
	CD4	PE/Cy7	Pomocný T lymfocyt	1:40	496/785
	CD8	APC/Cy7	Cytotoxický T lymfocyt	1:40	650/785
	CD19	APC	B-lymfocyt	1:40	650/660

Výsledky

Popište postup měření a „gatování“ jednotlivých populací + přiložte výsledky měření vyhodnoceny pomocí programu FlowJo.