

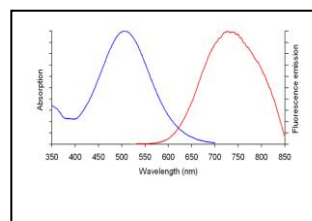
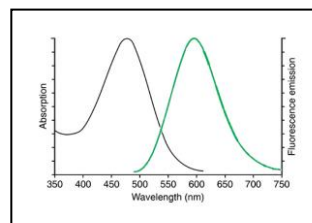
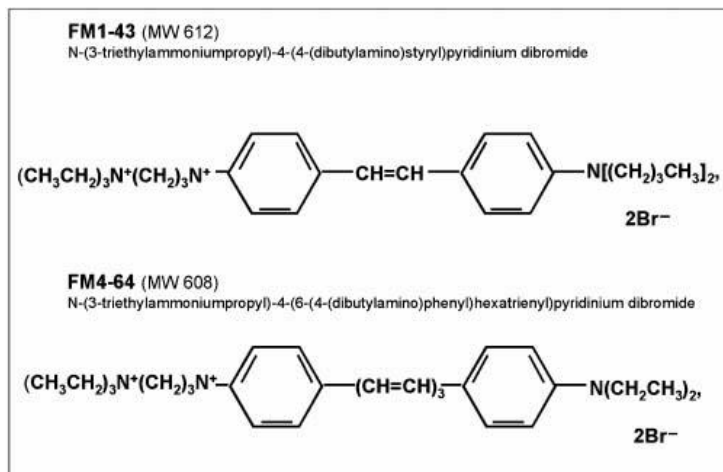
Fluorescenční mikroskopie při analýze organelové struktury buněk (Vitální barvení savčích buněk HEK293T fluorescenčním barvivem - FM 4-64 pro sledování endocytózy a SYTO 16 pro lokalizace DNA)

Cíl praktické úlohy:

Jednoduchá manipulace se savčí buněčnou linií HEK293T a její vitální barvení fluorescenčními barvivy, pozorování buněčných struktur fluorescenčním mikroskopem.

Teorie:

Název **FM fluorescenčních markerů biologických membrán** je odvozen od zkratky jména chemika, Fei Mao, který tyto sloučeniny vyvinul modifikací příbuzných sond (dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine - DASPMI). FM tak patří mezi styrylová barviva (styryl dye), což je velká skupina sloučenin s barevnými vlastnostmi závislými na napětí. FM4-64 je amfifilní molekula, tzn. že má hydrofilní a hydrofóbní oblast (známá vlastnost stavebních prvků biologických membrán). Lipofilní část (konec, tail) je tvořena dvěma uhlovodíkovými řetězci na alkylované styrylové skupině. Pozitivně nabitá část je označována jako hlava sloučeniny (head). Jádrem molekuly je fluorofor se dvěma aromatickými kruhy spojenými dvojnými vazbami. Hydrofóbní oblast umožňuje zabudování barviva do membrány, pozitivně nabitá část brání dalšímu pronikání do lipidické dvojvrstvy a takovéto ukotvení a interakce vede ke změně jasu barviva (rozsvítí se).



Heslovitě o FM:

- membránové markery využívané pro sledování endocytózy a exocytózy.
- Rozpustné ve vodě
- Netoxické pro buňku (pro vitální barvení)
- Vmezeřují se do vnější vrstvy cytoplazmatické membrány
- Teprve po začlenění do membrány intenzivně fluoreskují
- Nespecifická fluorescence může být odstraněna oplachem před detekcí
- Analogy (FM2-10, FM5-95...) se liší ex/em spektry, stupněm polarizace, stupněm signálu pozadí, doporučenou pracovní koncentrací, rychlostí zabudování do membrány atd.

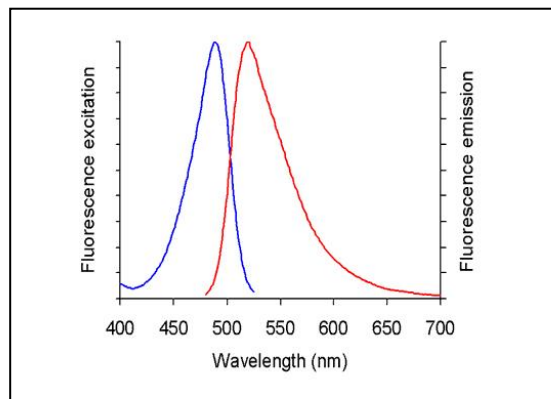
Compound Properties

Cat #	Dye	Unit Size	MW	Ex	Em
T3163	FM [®] 1-43 †	1 mg	611.55	510	626
T35356	FM [®] 1-43 †	10 x 100 µg	611.55	510	626
F35355	FM [®] 1-43FX	10 x 100 µg	560.09	510	626
T7508	FM [®] 2-10	5 mg	555.44	506	620
T3166	FM [®] 4-64	1 mg	607.51	558	734
T13320	FM [®] 4-64	10 x 100 µg	607.51	558	734
F34653	FM [®] 4-64FX	10 x 100 µg	788.75	565	744
T23360	FM [®] 5-95	1 mg	565.43	560	734

Pro vitální fluorescenční barvení DNA bude použito **cyaninové barvivo SYTO 16** (detaily jako chemický vzorec a strukturu výrobce neuvádí).

Heslovitě o SYTO 16

- Chemické složení výrobce neuvádí
- Selektivní barvivo nukleových kyselin (DNA i RNA)
- Pasivně proniká biologickými membránami
- Jsou využívány pro *in vivo* barvení i fixované preparáty
- Nízký kvantový výtěžek pokud nejsou navázány na nukleové kyseliny
- Naopak velký kvantový výtěžek, pokud jsou navázány na NK
- Dostupné analogy s velkým výběrem em spekter (od modré až do červené)
- Analogy se liší permeabilitou, DNA/RNA selektivitou, vazebnou afinitou atd.
- Eukaryotické buňky vykazují silné jaderné barvení a slabší cytoplasmatický difúzní signál, mohou obarvit mitochondrie
- Využívají se při detekci apoptózy, multidrug-resistant buněk



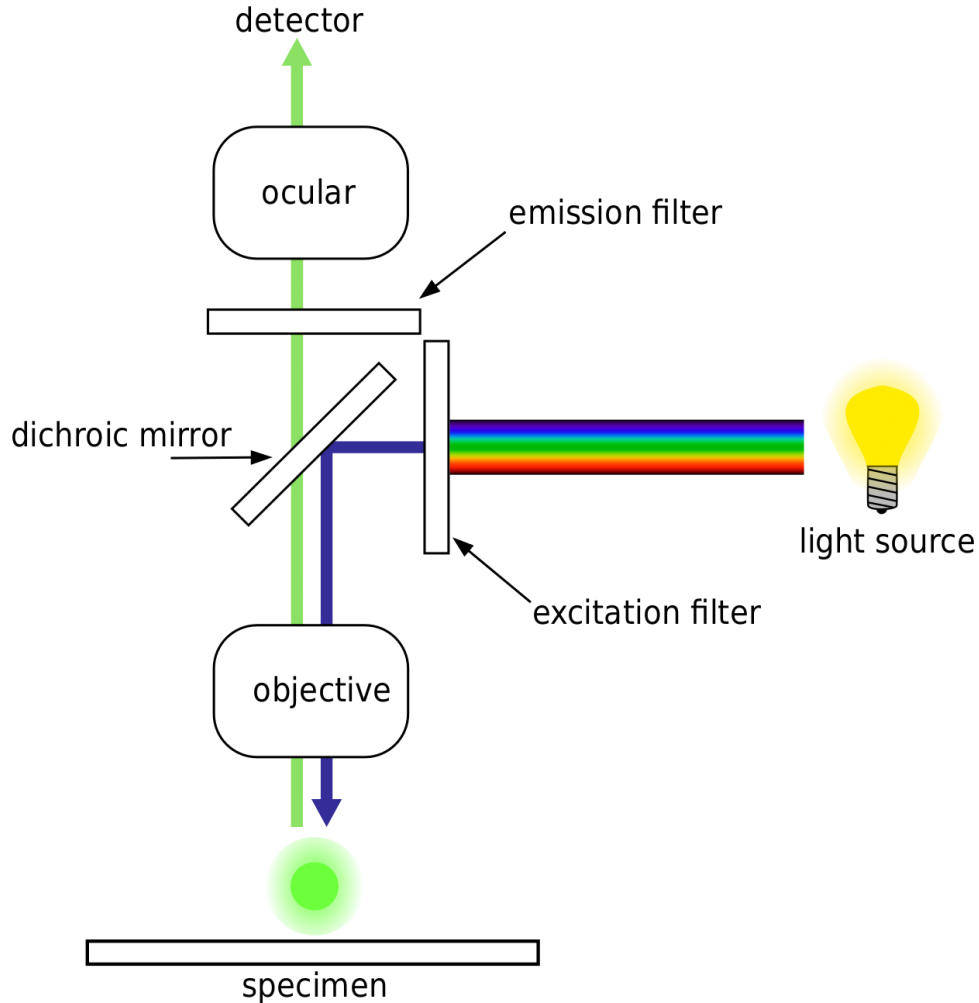
Linie buněk HEK293T

Jedná se o lidské buňky jejichž zkratka znamená Human Embryonic Kidney Cells. Je to tedy specifická buněčná linie originálně odvozená z lidských embryonických buněk ledvin rostoucí v tkáňové kultuře. HEK293T buňky jsou v biologickém výzkumu velmi rozšířené po mnoho let, a to především díky jejich stabilnímu a spolehlivému růstu a jednoduchosti pro transfekci. Jedná se o adherentní buňky což je předurčuje k jednoduché kultivaci na krycím sklíčku pro následnou mikroskopickou analýzu.

Fluorescenční mikroskopie:

Princip každého fluorescenčního mikroskopu je schopnost excitace preparátu pomocí světla o určité vlnové délce a snímání světla jiné vlnové délky díky vzniklé fluorescenci. Základními a nutnými komponenty jsou především excitační filtr, který dokáže filtrovat (vybrat) vhodnou část spektra ze světelného zdroje. Poté srdcem je dichroické zrcadlo, které excitační světlo odrazí na preparát, kde vznikne fluorescence a toto záření už dichroickým zrcadlem projde, následně je ještě filtrováno pomocí emisního filtru, který přesně vybere oblast spektra vzniklé fluorescenci, a to finálně dopadne na detektor. Schéma fluorescenčního mikroskopu znázorňuje Obrázek 1.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obrázek 1: Schéma fluorescenčního mikroskopu.

Postup:

SYTO 16 – 1mM zásobní roztok v DMSO (ředit 1250x)

FM 4 – 64 10 mM zásobní roztok v DMSO (ředit 500x)

1. Odeberte DMEM medium z buněčné kultury.
2. Promyjte buňky 2x s PBS pufrem, vždy inkubujte cca 2min.
3. Nechte buňky v PBS pufru.
4. Připravte si Petriho misku s vlhkým filtračním papírem a parafilmem.
5. Přidejte 8ul vyředěného barviva SYTO 16 na parafilm.
6. Přidejte 8ul vyředěného barviva FM 4-64 do stejné kapky na parafilm.
7. Opatrně přiložte krycí sklíčko na kapku barviv (buňky směrem dolů).
8. Inkubujte cca 10min v temném prostředí.
9. Přidejte 7ul montovacího média (Mowiol) na podložní sklíčko.
10. Opatrně přiložte krycí sklíčko na kapku montovacího média (buňky směrem dolů).
11. Pozorujte preparát pomocí fluorescenčního mikroskopu.