

**Reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_015/0002362**

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

**Příloha 3: Protokoly pro praktika z buněčné a molekulární biologie (ČJ)**



Toto dílo podléhá licenci [Creative Commons licenci 4.0 Mezinárodní Licence](http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

**1. FLUORESCENČNÍ BARVENÍ MIKROFILAMENT A DNA V RAKOVINNÝCH BUŇKÁCH**

**1.1 PERMEABILIZACE BUNĚK**

**1)** Nalijte celý objem (asi 5 ml) roztoku **Tritonu X** do Petriho misky obsahující krycí sklíčko se zafixovanými nádorovými buňkami, tím buňky permeabilizujete. Inkubujte 10 − 15 minut při pokojové teplotě.

*Pokud bychom buňky nepermeabilizovali, mohli bychom je barvit pouze na povrchu. Takto je možné barvit i jejich vnitřní struktury.*

*(Aby nedošlo při barvení k lýze buněk, používáme izoosmotické roztoky, např. PBS - phosphate buffered saline.)*

**2)** Vylijte roztok **Tritonu X** z Petriho misky do kelímku **bez sáčku**, sklíčko zůstane přichycené na dně misky.

**3)** Promyjte krycí sklíčko s buňkami v Petriho misce roztokem **PBS**.

Promýt buňky roztokem PBS znamená: Nalít do Petriho misky s krycím sklíčkem přibližně 5 ml PBS (odhadněte podle stupnice na zkumavce), inkubovat přibližně 5 minut, poté vylít PBS do kelímku bez sáčku.

**Tento postup opakujte nejméně třikrát**.

*Pomocí promývání je z preparátu odstraněn přebytečný Triton X, takže nemůže dále rozvolňovat membrány a případně ovlivňovat barvení buněk.*

**1.2 BARVENÍ BUNĚK**

**1)** Vylijte PBS z Petriho misky jako v předchozím kroku a vysušte opatrně buničinou okolí krycího sklíčka (ne přímo sklíčko, setřeli byste buňky!!!). Pak přímo na buňky na sklíčku opatrně napipetujte barvicí roztok (cca 60 µl) obsahující barvící konjugát (faloidin + TRITC). Sklíčko přikryjte parafilmem a inkubujte 20 minut.

*Čtvereček parafilmu snižuje objem barvicího roztoku nutného k zalití buněk na sklíčku a zároveň brání odpařování barvicího roztoku.*

*Faloidin se specificky váže na polymerizovaný aktin, konjugovaný fluorofor TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate) po excitaci emituje červené světlo. Aktinová filamenta s navázaným komplexem faloidin-TRITC budou tedy v mikroskopu svítit červeně.*

**2)** Promyjte sklíčko s buňkami stejně jako v kroku **1. 1. 3)**, nejméně třikrát (pokaždé 5 minut) roztokem PBS.

*Promýváním se odstraní z preparátu nenavázaný konjugát, který by jinak způsoboval nespecifickou fluorescenci preparátu.*

**3)** Sklíčko s buňkami pomocí jehly odchlípněte ze dna misky. Sklíčko otočte **buňkami dolů** a opatrně položte do kapky komerčního montovacího média na podložním skle.

*Montovací médium obsahuje také DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), které se váže na, dvouřetězcovou DNA. Po vazbě na DNA je DAPI excitovatelné UV světlem a vyzařuje modré světlo.*

Pozorujte preparát pomocí fluorescenčního mikroskopu.

**Otázky a úkoly:**

**1) Stručně popište tvar buněk a buněčných jader. Podle toho určete, zda jste barvili**

 **rostoucí nebo nerostoucí populaci buněk.**

* **Některé buňky mají nepravidelný tvar a kulatá jádra. Tyto buňky normálně rostou.**
* **Některé buňky mají kulatý tvar a fragmentovaná jádra. Tyto buňky nerostou, nebo přímo umírají.**

**2) Rozhodněte, jestli byly buňky, které jste barvili, senzitivní nebo rezistentní k účinkům**

 **testovaného cytostatika.**

**3) Co můžete říci o účinku cytostatika na senzitivní nádorové buňky (jaký je poměr**

 **rostoucích a umírajících buněk)?**

**POUŽITÉ ROZTOKY:**

**PBS (phosphate buffered saline pH 7,4)**

**roztok 0,1% Tritonu X-100 v PBS**

**barvicí roztok obsahující phalloidin-rhodamine**

**komerční montovací médium (Vectashield) obsahující DAPI**

**2. POROVNÁNÍ HLADINY PROTEINŮ VE VZORCÍCH - část I**

**2.1 IZOLACE PROTEINŮ**

**1)** Popište čtyři 1,5 ml mikrozkumavky (**na víčko**) číslem vašeho studijního kruhu, označením pracovní skupiny (písmeno na stojanu s pipetami) a typem vzorku:

**S**val…**S**

**J**átra…**J**

**M**léko…**M**

**P**řečištěné sérum…**P**

**2)** Napipetujte 900 µl lyzačního pufru do mikrozkumavek popsaných „**S**“a „**J**“.

**3)** Pomocí skalpelu odeberte podle instrukcí malé kousky tkáně svalu a jater a přeneste je do příslušných popsaných mikrozkumavek s 900 µl lyzačního pufru.

*Lyzační pufr obsahuje detergent (SDS - sodium dodecylsulfát), který lyzuje buněčné membrány.*

*Dezintegrace na malé kousky umožňuje lepší přístup lyzačního pufru k tkáni.*

**Kroky 3) a 4) lze dělat současně**

**4)** Do mikrozkumavky popsané „M“ dále napipetujte 200 µl roztoku simulující mateřské mléko. Přečištěné sérum nařeďte 2x do lyzačního pufru (výsledný objem bude 200 µl).

**5)** Obsah zkumavek zmixujte - zvortexujte.

*Vortexování napomáhá také další dezintegraci tkání a zefektivňuje lýzi buněk.*

**6)** Inkubujte vzorky ve zkumavkách 10 až 20 minut na ledu za občasného vortexování.

*Inkubace na ledu inhibuje štěpení proteinů proteázami uvolněnými ze zlyzovaných buněk.*

**7)** Mikrozkumavky obsahující vzorky svalu a jater centrifugujte 14 000 ot/min 15 − 20 minut při 4°C.

*Supernatant bude obsahovat proteiny a do pelety klesnou nezlyzované zbytky tkání a buněk.*

**8)** Popište dvě nové 1,5 ml zkumavky stejně jako vzorky „S“ a „J“ v bodě **2.1 1)**

**9)** Přeneste 400 µl supernatantu, neboli suspenze proteinů, z centrifugovaných vzorků (bez kousků tkáně!) do nově popsaných 1,5 ml zkumavek.

**10)** viz sekce **2.2 (druhá strana)**

**11)** Po změření koncentrace vložte proteinové suspenze do krabičky. V krabičce budou zamraženy a uskladněny v -20°C.

(V*zorky lze skladovat při -20°C několik týdnů).*

**POUŽITÉ ROZTOKY:**

**lyzační pufr obsahující SDS**

**2.2 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU DLE BRADFORDA**

**PRINCIP:**

*Tato metoda je založená na kolorimetrické reakci, která proběhne po smíchání Bradfordova činidla s roztokem obsahujícím proteiny. Činidlo Bradforda obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue, které se váže na bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech (Vzniklé komplexy proteinů a barvičky mají absorbční maximum při 595 nm).*

*Pokud vytvoříme ředicí řadu, je možné sestavit ze známých hodnot koncentrace proteinu a jim příslušejících absorbancí kalibrační přímku. Z ní lze stanovit koncentraci proteinu v neznámých vzorcích na základě znalosti hodnoty jejich absorbance.*

**1)** Popište čtyři nové 0,5 ml mikrozkumavky stejně jako v bodě **2.1 1)**. Do mikrozkumavek napipetujte 95 µl destilované vody.

**2)** Zvortexujte vaše proteinové lyzáty. Do 0,5 ml mikrozkumavek poté napipetujte 5 µl z příslušného proteinového lyzátu. Kolikrát tedy vzorky zředíte do destilované vody?Tyto naředěné vzorky budou použity pro stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradforda.

*Vzorky je nutno naředit tak, aby se jejich koncentrace pohybovala v detekčních mezích metody.*

**3)** Popište 4 mikrozkumavky s 1 ml Bradfordova činidla, které dostanete, stejně jako v bodě **2.1 1**)

**4)** Z 0,5 ml mikrozkumavek odeberte 20 µl naředěných vzorků a přepipetujte je do příslušných zkumavek obsahující činidlo Bradforda. Důkladně zvortexujte.

**5)** Inkubujte vzorek minimálně 5 minut (maximálně 45 minut) při pokojové teplotě.

**6)** Podle instrukcí přepipetujte roztoky Bradforda do kyvet a změřte jejich absorbanci při 595 nm na spektrofotometru Nano Photometer IMPLEN.

*Přístroj z hodnoty absorbance vzorku a z kalibrační rovnice, vytvořené vedoucími praktika vypočte koncentraci měřeného vzorku.*

*(Hodnoty absorbance vzorků jsou přímo úměrné množství proteinů v nich obsažených).*

**Pro stanovení koncentrace neředěných vzorků je nutné výsledek měření vynásobit ředěním vzorku!**

**Hodnotu koncentrace vzorku si zapište.**

**5)** Podle změřené koncentrace proteinů vypočítejte objem každého vzorku tak, aby obsahoval **6** a **60 μg** proteinů. Vypočítané objemy budete nanášet do gelu v příští části praktik.

**I tyto objemy si zapište.**

**POUŽITÉ ROZTOKY: Bradfordovo činidlo**

**2. POROVNÁNÍ HLADINY PROTEINŮ VE VZORCÍCH - část II**

**2.3 SEPARACE PROTEINŮ POMOCÍ SDS-PAGE ELEKTROFORÉZY**

**2.3.1 Příprava vzorků na nanášení do gelu**

**1)** Popište čtyři nové 0,5 ml mikrozkumavky (písmenem vaší pracovní skupiny a typem proteinového roztoku: **S**val, **M**léko, **J**átra**,** **P**řečištěné sérum) a do každé napipetujte 30 µl vzorkového pufru.

**2)** Nejprve řádně promíchejte proteinové roztoky, které jste připravili v předchozí části praktik(**S**val, **M**léko, **J**átra**,** **P**řečištěné sérum). Poté napipetujte 30 µl z příslušných roztoků proteinů do mikrozkumavek, které obsahují 30 µl vzorkového pufru (viz předchozí krok).

**3)** Vzorky povařte nejméně 5 minut při 95°C ve vyhřátém termobloku.

*Výsledně získávají proteiny vláknitý tvar a stejný náboj na jednotku délky. Proteiny se během SDS-PAGE separují pouze podle své molekulové hmotnosti.*

*Teplo denaturuje proteiny ve vzorkovém pufru, který obsahuje sodium dodecyl sulfát (SDS) a 2-mercaptoethanol, látku redukující disulfidické můstky*

 **4)** Použijte takové objemy vzorků, abyste nanášeli **30 μg** proteinů **S**valu a **3** a **30 μg** proteinů

 **M**léka**, J**atera **P**řečištěného séra. Nezapomeňte, že jste proteinové roztoky ředili do vzorkového

 pufru.

.

**2.3.2 Nanášení vzorků do gelu**

**1)** Dle instrukcí připravte elektroforetickou jednotku pro nanesení vzorků a následnou elektroforézu.

**2)** Po složení celé elektroforetické jednotky naplňte vnitřní nádržku elektrolytickým pufrem (Running buffer) tak, aby pufr naplnil vnitřní nádržku a poté lijte pufr dál, až pufr začne plnit také vnější nádržku (do el. jednotky tedy nalijete přibližně 1 litr pufru).

*Pokud bude hladina pufru níže než kratší sklo, nebude systémem procházet elektrický proud, a tudíž nebude probíhat separace proteinů.*

**3)** V jednotlivých jamkách gelu budou separovány tyto vzorky:

**1.** Směs markerů molekulových hmotností

**2.** Vzorek **S**valu

**3. ̶ 8.** Vzorky **M**léka, **J**atera **P**řečištěného séra, po dvojicích (**3 a 30 μg** proteinů), nanášejte výše spočítané objemy vzorků (viz **2.3.1 4**).

**9.** Vzorek mozku pacienta X (**XB**)

**10.**  Vzorek séra pacienta X, odebraný měsíc po chemoterapii (**XS**)

***Markery molekulových hmotností*** *používáme pro poměrně přesný odhad molekulové hmotnosti separovaných proteinů.*

***Molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů*** *v námi použitém markeru jsou* ***25****,* ***37****,* ***50, 75, 100, 150 a 250* kDa***. Markery molekulových hmotností nám zároveň umožní sledovat průběh separace proteinů, protože jsou barevné a tudíž viditelné v gelu během separace.*

**2.3.3Začátek a ukončení elektroforetické separace proteinů**

1) Po nanesení vzorků uzavřete elektroforetickou jednotku víkem. Na zdroji elektrického proudu nastavte konstantní napětí 200 V a nechte proteiny separovat přibližně 45 minut (je důležité průběžně sledovat pohyb čela vzorků na gelu).

*Bromfenolová modř obsažená ve vzorkovém pufru je ze všech složek nanesených na gel nejrychlejší.*

***Ve chvíli, kdy dosáhne Bromfenolová modř******spodního okraje gelu, je nutné separaci proteinů zastavit, jinak hrozí únik proteinů z gelu do pufru!***

2) Po doběhnutí elektroforézy vypněte zdroj a odpojte elektrické kabely. Vyjměte vnitřní část elektroforetické jednotky a z ní skla s oběma gely.

**2.4 BARVENÍ PROTEINŮ A IDENTIFIKACE PROTEINŮ**

**1)** Pomocí otvíráčku rozevřete skla a nechte gel přichycený k jednomu ze skel.

**2)** Gel opatrně chyťte a ponořte do nádobky s **barvícím roztokem**. Barvěte gel přibližně 5 **̶** 10 minut za občasného kývání.

*Coomassie Briliant Blue, která je součástí  barvícího roztoku je barvivo vázající se nespecificky na proteiny a umožňující tak jejich vizualizaci.*

**3)** Vyměňte **barvící roztok** za **odbarvovací roztok**. Po 10 min. slijte **odbarvovací roztok** a pokračujte v odbarvování horkou vodou.

*Postupným odbarvováním nespecifického zbarvení gelu se zviditelňují jednotlivé proužky proteinů.*

**Otázky**

**1) Podle markerů molekulové hmotnosti identifikujte aktin a myosin ve vzorcích svalu.**

 ***Aktin a myosin jsou evolučně konzervované proteiny, aktin má molekulovou hmotnost***

 ***cca 43 kDa, myosin je tvořen těžkým řetězcem o velikosti 210 kDa a několika lehkými***

 ***řetězci o velikosti 15─20 kDa.***

**2) Určete, jestli vaše vzorky mléka, jater, přečištěného séra a vzorky XB a XS obsahují**

 **testované cytostatikum**

 ***Jako pozitivní kontrolu použijte váš vzorek přečištěného séra, jako negativní kontrolu***

 ***vzorek svalu.***

**3)Jestliže se cytostatikum v některých vzorcích nachází, určete jeho přibližné množství.**

 ***Srovnejte hladinu cytostatika v daném vzorku s hladinami v přečištěném séru.***

**2.5 PŘÍPRAVA GELU PRO DALŠÍ STUDIJNÍ KRUH**

**2.5.1 Příprava 10%, separačního, gelu**

**1)** Vezměte sklo s přilepenými “spacery” a tenké sklo a vyčistěte je pomocí etanolu a gázy.Dle instrukcísestavte skla a vložte je do kazety na nalévání gelů.

**2)** Nalijte do prostoru mezi skly pomocí střičky malé množství etanolu pro kontrolu těsnosti aparatury. Jestliže nedochází k úniku etanolu, etanol vylijte do dřezu a zbytek etanolu odsajte čtverečkem buničiny.

*Po ověření těsnosti aparatury jsou skla připravena k nalití gelu.*

**3)** Do zkumavky s nezpolymerovaným 10% gelem přidejte **3,5 µl** TEMEDu a **35 µl** 10% APS a promíchejte jemným převracením zkumavky. **Nevortexujte!**

*Přidáním APS a TEMEDu je započata polymerizace gelu, je třeba proto pracovat rychle, neboť jinak gel ztuhne už ve zkumavce.*

**4)** Napipetujte tento roztok do prostoru mezi skly pipetou s modrou špičkou až do úrovně **určené lektory** (přibližně čtyřikrát 800 μl). Při nalévání gelu se vyvarujte vzniku bublin.

**5)** Na gel pomocí střičky opatrně nalijte vrstvu etanolu.

*Etanol zabraňuje kontaktu polymerujícího gelu s kyslíkem, který polymerizaci inhibuje. Dále odstraňuje bubliny na povrchu gelu, pomocí něho se také vytvoří vodorovný povrch gelu.*

**6)** Gel nechte polymerovat asi 30 minut.

*Rychlost polymerizace lze sledovat na zbytku gelu ve zkumavce. Ve chvíli, kdy je tento zbytek kompletně zpolymerovaný, je možno přikročit k nalévání druhého gelu.*

**2.5.2 Příprava 4%, zaostřovacího, gelu**

**1)** Po kompletní polymerizaci 10% gelu vylijte etanol do výlevky jako v kroku **2.5.1 2)**.

**2)** Do zkumavky s nezpolymerovaným 4% gelem přidejte **3 µl** TEMEDu a **20 µl** 10% APS a promíchejte jemným převracením zkumavky. **Nevortexujte!**

**3)** Napipetujte na zpolymerovaný 10% (separační gel) tento 4% (zaostřovací) gel až po okraj skla se spacery pomocí pipety s modrou špičkou.

**4)** Vložte zelený plastový hřebínek do prostoru mezi skly, aby se v gelu vytvořily jamky. Vyvarujte se vzniku bublin.

**5)** Nechte zaostřovací gel polymerovat asi 30 minut.

*Kompletní polymeraci lze předpokládat ve chvíli, kdy je i zbytek gelu ve zkumavce ztuhlý. Použití dvou různých gelů s různým pH a různým procentuálním zastoupením akrylamidu umožní proteinům naneseným ve vzorku dosáhnout rozhraní gelů ve stejnou dobu.*

*Pohyb proteinů je tedy výsledně závislý pouze na jejich molekulární hmnotnosti.*

**6)** Takto vytvořený gel ponechte ve stojanu, bude použit následující skupinou. Pro vaši proteinovou elektroforézu jste použili gel, který pro vás připravila předchozí studijní skupina (kruh).

**POUŽITÉ ROZTOKY:**

**Vzorkový pufr**

**Elektrolytický pufr - Running buffer**

**Barvící roztok**

**Odbarvovací roztok**

**10% polyakrylamidový gel**

**4% polyakrylamidový gel**