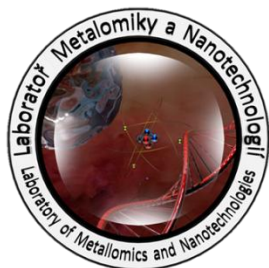


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Praktický kurz monitorování apoptózy a autofágie u nádorových prostatických buněk pomocí průtokové cytometrie

Nastavení průtokového cytometru a jeho optimalizace

Vyučující: RNDr. Jan Balvan, MUDr. Jaromír Gumulec

Optimalizace toku buněk v kapiláře

Po originalním nastavení operačního rozhraní firemním specialistou není většinou potřeba upravovat nastavení laseru a optiky. Pro získání optimálních výsledků však může být mírné doladění nezbytné.

1. Odklopit vrchní kryt přístroje Partec CyFlow ML.
2. Zapnout software FloMax[®] a vložit vzorek obsahující kalibrační částice o rozměru 3 μ m.
3. V nabídce nastavení přístroje vybrat odpovídající nastavení pro kalibrační částice.
4. Zatímco částice procházejí detekčním systémem, opatrně nastavíme průtokovou komoru zarovnávacím šroubem a sledujeme píky (viz Obr.1).
5. Je důležité, aby analyzované částice procházely přímo laserovým paprskem.
6. V krátkých intervalech (několik sekund) vyčistíme histogramy kliknutím na tlačítko *CLEAR* v nabídce nastavení přístroje.
7. Sledujeme tvar píků v histogramech



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



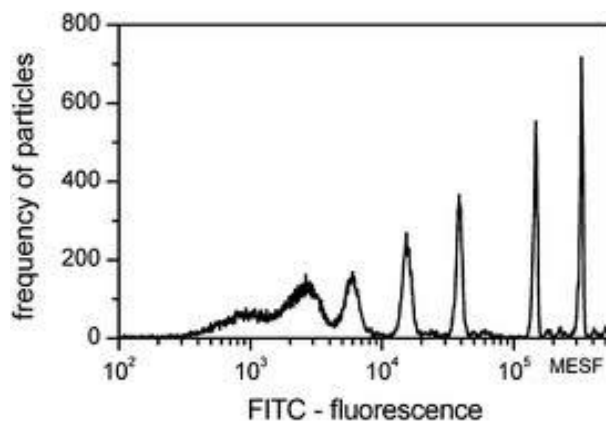
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

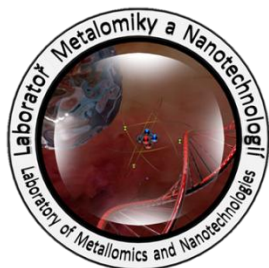
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

8. Nastavení je optimální, když je intenzita maximální a zobrazené píky jsou tak úzké, jak je to možné (viz Obr.1)



Obr. 1 Píky při kalibraci cytometru kalibračními částicemi o průměru 3 μm

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

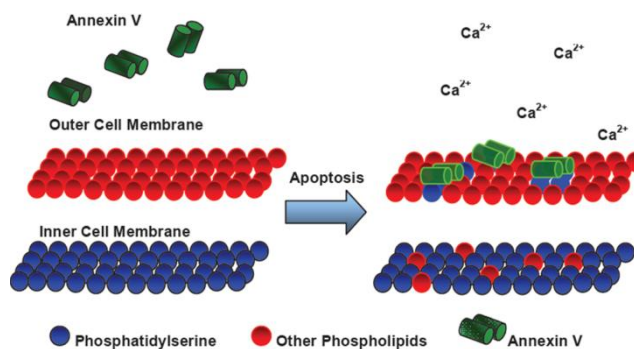
Praktický kurz monitorování apoptózy a autofágie u nádorových prostatických buněk pomocí průtokové cytometrie

Příprava a značení buněk pro detekci apoptózy

Vyučující: RNDr. Jan Balvan, Ing. Hana Polanská

Apoptóza je proces programované buněčné smrti doprovázený typickými morfologickými změnami. Mezi tyto změny patří také asymetrie lipidové membrány způsobená translokací fosfatidylserinů (PS) na vnější list buněčné membrány. PS na vnější straně buněčné membrány slouží jako „eat me“ signál pro fagocytující buňky.

Pro detekci translokace PS využíváme fluorescenčně značený protein Annexin V. Tento protein za přítomnosti iontů Ca^{2+} vytváří vazbu s PS. V neapoptických buňkách tento protein kotví proteiny cytoskeletu k lipidovým membránám.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Jelikož k expozici PS na vnějším listu buněčné membrány dochází také u nekrotických buněk, používáme v kombinaci s Annexinem V také propidiumjodid (PI), který u nekrotických buněk s perforovanou buněčnou membránou vstupuje do buněk a barví nukleové kyseliny.

Postup přípravy buněk pro analýzu apoptózy:

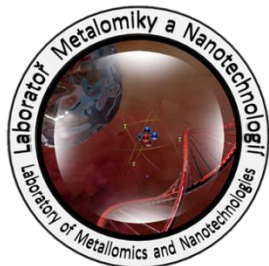
	Annexin V	Propidiumjodid
Excitační spektrum	488 nm	488-540 nm
Emisní spektrum	518 nm	617 nm

Příprava barvicího roztoku:

20 μ l Annexinu V rozpustíme v 1 ml inkubačního pufru, přidáme 20 μ l propidiumjodidu a promícháme opakovaným pipetováním.

1. Buňky z kultivační nádoby spláchneme opakovaným pipetováním (1000 μ l) do média, ve kterém byly kultivovány
2. Centrifugace 5 min/2000rpm/7 °C
3. Buněčná pelet propláchneme 500 μ l PBS
4. Centrifugace 5 min/2000rpm/7 °C
5. Buněčný pelet rozsuspendujeme ve 100 μ l barvicího roztoku
6. Inkubujeme ve tmě 15 min. při 15-20 °C
7. Analyzujeme buňky průtokovým cytometrem

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

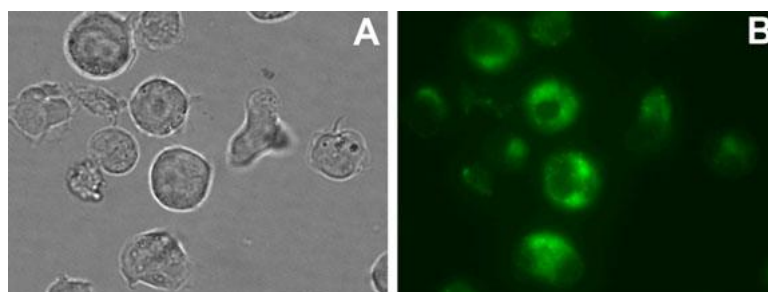
Praktický kurz monitorování apoptózy a autofágie u nádorových prostatických buněk pomocí průtokové cytometrie

Příprava a značení buněk pro detekci autofágie

Vyučující: Ing. Markéta Sztalmachová, Mgr. Michaela Fojtů

Autofágie je geneticky kontrolovaný katabolický proces, při kterém buňka obklopuje části cytoplazmy včetně organel lipidovou membránou do autofagosomu. Ten následně splývá s lysosomem. Obsah autofagosomu je pak enzymatický v kyselém prostředí rozštěpen a vzniklé látky využity k produkci energie a recyklaci buněčných komponent.

Vznikající autofagosomy jsou barveny pomocí CytoID (Enzo, Life Sciences). Toto barvení umožňuje také kvantifikaci intenzity fluorescenčního signálu.



Obr1. Autofagické buňky barvené CytoID



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Postup přípravy buněk pro analýzu apoptózy:

	Cyto ID	Hoechst 33342
Excitační spektrum	486 nm	361 nm
Emisní spektrum	527 nm	486 nm

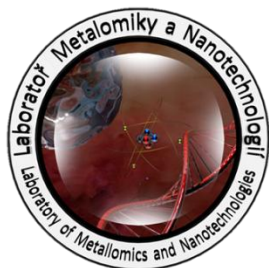
Příprava barvicího roztoku:

1 µl CytoID Green Detection Reagent rozpustíme v 1 ml kultivačního média bez indikátoru s 5% FBS.

10x detekční pufr naředíme na 1x (1:9, H₂O pro potřeby molekulární biologie)

1. Buňky z kultivační nádoby spláchneme opakovaným pipetováním (1000 µl) do média, ve kterém byly kultivovány
2. Centrifugace 5 min/2000rpm/7 °C
3. Buněčná pelet propláchneme 500 µl PBS
4. Centrifugace 5 min/2000rpm/7 °C
5. Buněčný pelet rozsuspendujeme ve 250 µl kultivačního média bez indikátoru s 5% FBS
6. Přidáme 250 µl barvicího roztoku
7. Buňky v roztoku pečlivě promícháme jemným opakovaným pipetováním
8. Inkubujeme ve tmě 30 min. při 37 °C, během této doby vzorek promícháváme (interval 5 min.)
9. Centrifugace 2000rpm/5 min/ 7°C
10. Pelet rozsuspendujeme v 500 µl čerstvě připraveného 1x detekčního pufru
11. Analyzujeme buňky průtokovým cytometrem

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Praktický kurz monitorování apoptózy a autofágie u nádorových prostatických buněk pomocí průtokové cytometrie

Zpracování a vyhodnocení získaných experimentálních dat

Vyučující: Mgr. Monika Holubová, Mgr. Kristýna Hudcová, RNDr. Jan Balvan,
RNDr. Michal Masařík, Ph.D.

Častým cílem cytometrické analýzy je klasifikace buněk pozitivních či negativních na nějaký marker a určení hranice mezi pozitivní a negativní populací buněk. Pro dosažení kvalitních výsledků je nutné reprodukovatelné nastavení přístroje a zejména použití vhodných kontrolních souborů pro analýzu a interpretaci získaných dat.

Důležitým faktorem určujícím kvalitu výsledků je pečlivost při zpracování vzorků (jemnost při sklizení buněk, rychlost sklizení, teplota, délka pobytu mimo termobox, ...)

Detekce apoptózy a nekrózy

1. Kontrolní soubor pro detekci apoptózy a nekrózy je tvořen nebarvenými (bez Annexinu V i propidiumjodidu) buňkami, Obr. 1 (A,B).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



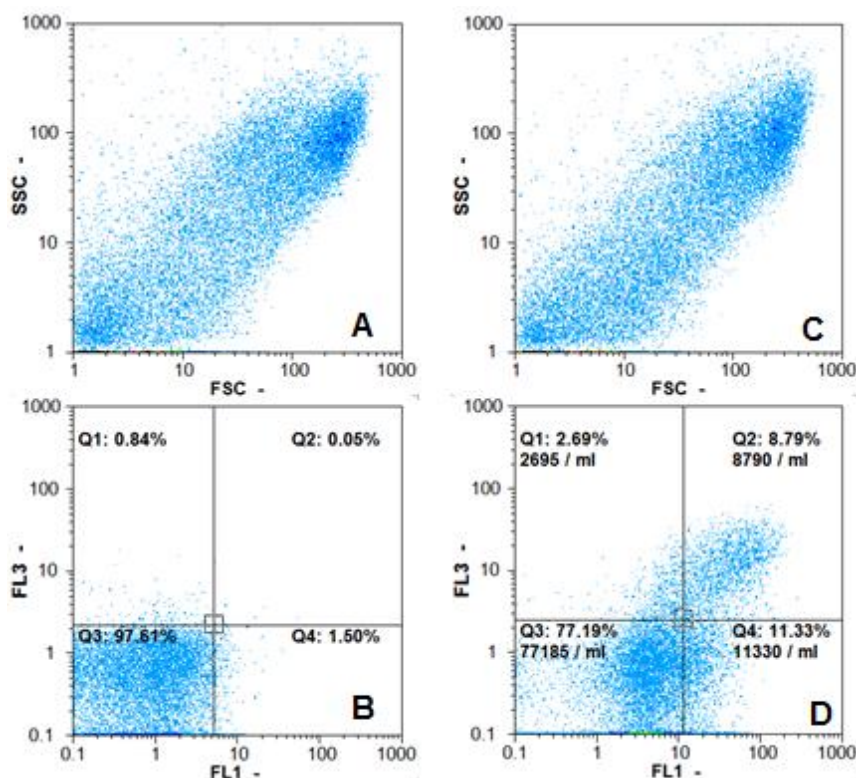
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2. Kontrolní vzorek buněk porovnááme s buňkami značenými Annexinem V a propidiumjodidem (Obr.1 (C,D)). Toto porovnání nám poskytne informace pro správný gating a vymezení hranic mezi buňkami pozitivními a negativními pro zánění.
3. Odečteme hodnoty jednotlivých buněčných populací (kvadrantů Q1, Q2, Q3 a Q4)

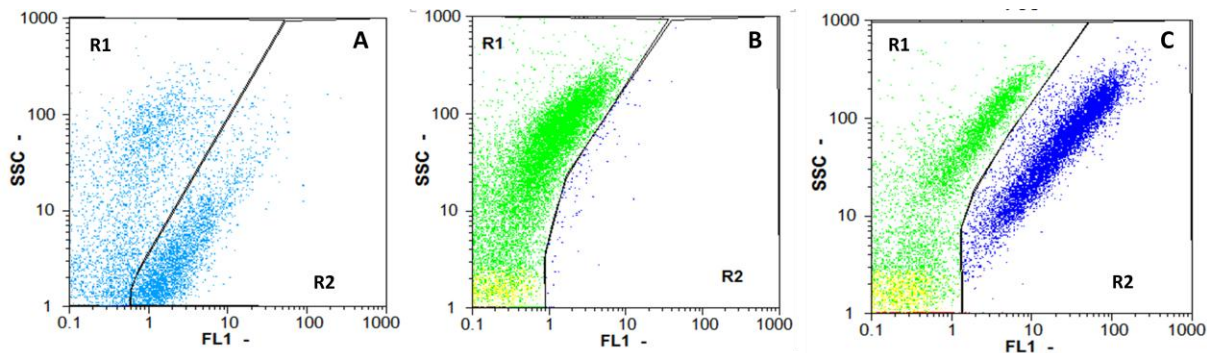


Obr. 1 Porovnání dotplotů kontrolního vzorku buněk bez použití barevného značení (A,B) a dotplotů buněk značených Annexinem V a propidiumjodidem (C,D)

Detekce autofágie

1. Připravíme pozitivní kontrolu. Buňky kultivujeme s induktorem autofágie (rapamycinem, 500 nM) po dobu 18 hodin za standardních kultivačních podmínek
2. Připravíme negativní kontrolu (buňky bez přidaného barviva)
3. Analyzujeme vlastní vzorek
4. Pomocí dotplotů získaných na kontrolních vzorcích provádíme gating na analyzovaném vrorku

5. Odečteme hodnoty jednotlivých regionů



Obr. 2 Porovnání dotplotů při analýze autofágie průtokovou cytometrií: **(A)** Pozitivní kontrola. Buňky byly inkubovány 18 h s 500 nM rapamycinem (induktorem autofágie). Polygon R1 značí buňky negativní na barvení CytoID, polygon R2 značí buňky pozitivní na barvení CytoID). **(B)** Negativní kontrola. Buňky bez přidání barviv. **(C)** Analyzovaný vzorek