



Studium efektu iontů těžkých kovů, především zinku, kadmia, olova a rtuti na buněčné linie

Ionty kadmia, charakterizace a aplikace na buněčné kultury

Ionty kadmia, sledování distribuce na buněčné kultury

Mgr. Renáta Kenšová, Ph.D., Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Michal Masařík, Ph.D., Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D., Bc. Michal Žůrek, Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.

Před začátkem experimentu jsou buňky uchovávány při -80°C ve směsi s FBS (PAA, Rakousko) a DMSO (dimethyl sulfoxid). Po rozmrznutí buněk ve vodní lázni se suspenze buněk napipetuje do živného media a takto vzniklá suspenze se centrifuguje při 2 700 rpm, 4°C , 7 minut. Vzniklý supernatant se odsaje a usazené buňky se rozsuspendují v mediu. Z této suspenze se část odebere a napipetuje do připravených Petriho misek s médiem nebo do krabiček. Popsané misky se vloží do termoboxu a nechají se inkubovat, dokud buňky nenarostou do požadované koncentrace. Dvakrát za týden se buňkám mění médium. V případě, že potřebujeme větší množství misek či krabiček, tak se narostlé buňky rozpasážují na více misek nebo krabiček. Narostlým buňkám se odsaje médium, buňky se propláchnou EDTA, která se opět odsaje, a dále





se buňky propláchnou trypsinem. Trypsin (PAA, Rakousko) se odsaje a krabička nebo miska se vloží na tři minuty do termoboxu. Buňky se začnou odlupovat od povrchu. Poté se k buňkám přidá trochu média a buňky se do něj uvolní. Tato suspenze se přepipetuje do centrifugační zkumavky a centrifuguje se. Poté se postupuje stejně jako v případě rozmrazení buněk. V případě potřeby se buňky počítají v Bürkerově komůrce. Jakmile máme buňky narostlé na 70% konfluenci, můžeme začít s experimenty. Pro analýzu cytotoxicity kadmia používáme MTT test a real-time monitoring s využitím systému xCELLigence. Po určení hodnoty IC50 určíme koncentrační řadu a kadmium v požadované koncentraci aplikujeme na buňky, které jsou narostlé na 70% konfluenci. Po 48 hodinách působení se udělají další potřebné analýzy.

MTT test se používá k určení toxicity látek vůči buněčným liniím. Princip testu je založen na redukci MTT na formazan a hodnotí viabilitu buněk v daném prostředí. MTT látka je žluté vodorozpustné tetrazolium barvivo, které živé buňky metabolizují na fialový formazan. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byla napipetována suspenze buněk, přičemž jamky ve sloupci 1 a 12 obsahovaly pouze čisté médium bez buněk. Na jednu jamku je počítáno s 10 000 buňkami. Takto naplněná destička byla vložena do CO₂ termoboxu a buňky se nechali narůst na 70% konfluenci. Po této době byla k buňkám přidána zvolená koncentrační řada kadmia. V této fázi byla destička opět uložena na 48 hodin do CO₂ termoboxu. Po této inkubační fázi byl odstraněn obsah jamek 1–12 a do jamek bylo napipetováno 200 µl čistého média a 50 µl MTT (5mg/ml destilované vody). Destička byla zabalena do alobalu, jelikož MTT látka se na světle rozkládá, a vložena do CO₂ termoboxu na 4 hodiny. Poté byl obsah jamek opět odstraněn a do jamek bylo přidáno 200 µl DMSO a 25 µl glycinového pufru. V takto zhotovené destičce byla změněna absorbance při 570 nm (Versa Max tunable microplate reader).

Další použitou metodou je real-time monitoring buněčné adheze a proliferace pomocí přístroje xCELLigence (Roche, Švýcarsko). Tato metoda umožňuje nepřetržitě sledovat buněčnou proliferaci, životaschopnost a cytotoxicitu. Během celého experimentu jsou nám podávány informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti. Použitá mikrotitrační destička má na dně jamek zlaté elektrody, které zaznamenávají buněčný index. Na začátku experimentu je v každé



jamce 10 000 buněk, což je koncentrace, při které nedochází k inhibici měření kontaktem. V mikrotitrační destičce se do každé jamky napipetuje suspenze buněk a destička se vloží do přístroje, který je uložen v CO₂ termoboxu. Dle rychlosti růstu buněk se po určité době přidá kadmium v námi zvolených koncentracích a destička se opět uloží do CO₂ termoboxu. Výsledkem tohoto přístroje jsou růstové křivky.



Obrázek č. 1: Výsledek MTT testu



Ionty olova a rtuť, charakterizace a aplikace na buněčné kultury

Ionty olova a rtuť, sledování distribuce na buněčné kultury

*Mgr. Renáta Kenšová, Ph.D., Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Michal Masařík, Ph.D.,
Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D., Bc. Michal Žůrek,
Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.*

Před začátkem experimentu jsou buňky uchovávány při -80°C ve směsi s FBS (PAA, Rakousko) a DMSO (dimethyl sulfoxid). Po rozmrznutí buněk ve vodní lázni se suspenze buněk napipetuje do živného media a takto vzniklá suspenze se centrifuguje při 2 700 rpm, 4°C , 7 minut. Vzniklý supernatant se odsaje a usazené buňky se rozsuspendují v mediu. Z této suspenze se část odebere a napipetuje do připravených Petriho misek s médiem nebo do krabiček. Popsané misky se vloží do termoboxu a nechají se inkubovat, dokud buňky nenarostou do požadované koncentrace. Dvakrát za týden se buňkám mění médium. V případě, že potřebujeme větší množství misek či krabiček, tak se narostlé buňky rozpasážují na více misek nebo krabiček. Narostlým buňkám se odsaje médium, buňky se propláchnou EDTA, která se opět odsaje, a dále se buňky propláchnou trypsinem. Trypsin (PAA, Rakousko) se odsaje a krabička nebo miska se vloží na tři minuty do termoboxu. Buňky se začnou odlupovat od povrchu. Poté se k buňkám přidá trochu média a buňky se do něj uvolní. Tato suspenze se přepipetuje do centrifugační zkumavky a centrifuguje se. Poté se postupuje stejně jako v případě rozmražení buněk. V případě potřeby se buňky počítají v Bürkerově komůrce. Jakmile máme buňky narostlé na 70% konfluenci, můžeme začít s experimenty. Pro analýzu cytotoxicity olova (rtuť) používáme MTT test a real-time monitoring s využitím systému xCELLigence. Po určení hodnoty IC50 určíme koncentrační řadu a olovo (rtuť) v požadované koncentraci aplikujeme na buňky, které jsou narostlé na 70% konfluenci. Po 48 hodinách působení se udělají další potřebné analýzy.

MTT test se používá k určení toxicity látek vůči buněčným liniím. Princip testu je založen na redukci MTT na formazan a hodnotí viabilitu buněk v daném prostředí. MTT látka je žluté



vodorozpustné tetrazolium barvivo, které živé buňky metabolizují na fialový formazan. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byla napipetována suspenze buněk, přičemž jamky ve sloupci 1 a 12 obsahovaly pouze čisté médium bez buněk. Na jednu jamku je počítáno s 10 000 buňkami. Takto naplněná destička byla vložena do CO₂ termoboxu a buňky se nechali narůst na 70% konfluenci. Po této době byla k buňkám přidána zvolená koncentrační řada olova (rtuti). V této fázi byla destička opět uložena na 48 hodin do CO₂ termoboxu. Po této inkubační fázi byl odstraněn obsah jamek 1–12 a do jamek bylo napipetováno 200 µl čistého média a 50 µl MTT (5mg/ml destilované vody). Destička byla zabalena do alobalu, jelikož MTT látka se na světle rozkládá, a vložena do CO₂ termoboxu na 4 hodiny. Poté byl obsah jamek opět odstraněn a do jamek bylo přidáno 200 µl DMSO a 25 µl glycinového pufru. V takto zhotovené destičce byla změřena absorbance při 570 nm (Versa Max tunable microplate reader).

Další použitou metodou je real-time monitoring buněčné adheze a proliferace pomocí přístroje xCELLigence (Roche, Švýcarsko). Tato metoda umožňuje nepřetržitě sledovat buněčnou proliferaci, životaschopnost a cytotoxicitu. Během celého experimentu jsou nám podávány informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti. Použitá mikrotitrační destička má na dně jamek zlaté elektrody, které zaznamenávají buněčný index. Na začátku experimentu je v každé jamce 10 000 buněk, což je koncentrace, při které nedochází k inhibici měření kontaktem. V mikrotitrační destičce se do každé jamky napipetuje suspenze buněk a destička se vloží do přístroje, který je uložen v CO₂ termoboxu. Dle rychlosti růstu buněk se po určité době přidá olovo (rtuť) v námi zvolených koncentracích a destička se opět uloží do CO₂ termoboxu. Výsledkem tohoto přístroje jsou růstové křivky.



Obrázek č. 1: E-plate destička do systému xCELLigence



Obrázek č. 2: RTCA stanice systému xCELLigence



Zinečnaté ionty a zinkové nanočástice, charakterizace a aplikace na buněčné kultury

Zinečnaté ionty a zinkové nanočástice, sledování distribuce na buněčné kultury

*Mgr. Renáta Kenšová, Ph.D., Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Michal Masařík, Ph.D.,
Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D., Bc. Michal Žůrek,
Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.*

Před začátkem experimentu jsou buňky uchovávány při -80°C ve směsi s FBS (PAA, Rakousko) a DMSO (dimethyl sulfoxid). Po rozmrznutí buněk ve vodní lázni se suspenze buněk napipetuje do živného media a takto vzniklá suspenze se centrifuguje při 2 700 rpm, 4°C , 7 minut. Vzniklý supernatant se odsaje a usazené buňky se rozsuspendují v mediu. Z této suspenze se část odebere a napipetuje do připravených Petriho misek s médiem nebo do krabiček. Popsané misky se vloží do termoboxu a nechají se inkubovat, dokud buňky nenarostou do požadované koncentrace. Dvakrát za týden se buňkám mění médium. V případě, že potřebujeme větší množství misek či krabiček, tak se narostlé buňky rozpasážují na více misek nebo krabiček. Narostlým buňkám se odsaje médium, buňky se propláchnou EDTA, která se opět odsaje, a dále se buňky propláchnou trypsinem. Trypsin (PAA, Rakousko) se odsaje a krabička nebo miska se vloží na tři minuty do termoboxu. Buňky se začnou odlupovat od povrchu. Poté se k buňkám přidá trochu média a buňky se do něj uvolní. Tato suspenze se přepipetuje do centrifugační zkumavky a centrifuguje se. Poté se postupuje stejně jako v případě rozmražení buněk. V případě potřeby se buňky počítají v Bürkerově komůrce. Jakmile máme buňky narostlé na 70% konfluenci, můžeme začít s experimenty. Pro analýzu cytotoxicity zinku používáme MTT test a real-time monitoring s využitím systému xCELLigence. Po určení hodnoty IC50 určíme koncentrační řadu a zinek v požadované koncentraci aplikujeme na buňky, které jsou narostlé na 70% konfluenci. Po 48 hodinách působení se udělají další potřebné analýzy.

MTT test se používá k určení toxicity látek vůči buněčným liniím. Princip testu je založen na redukci MTT na formazan a hodnotí viabilitu buněk v daném prostředí. MTT látka je žluté



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



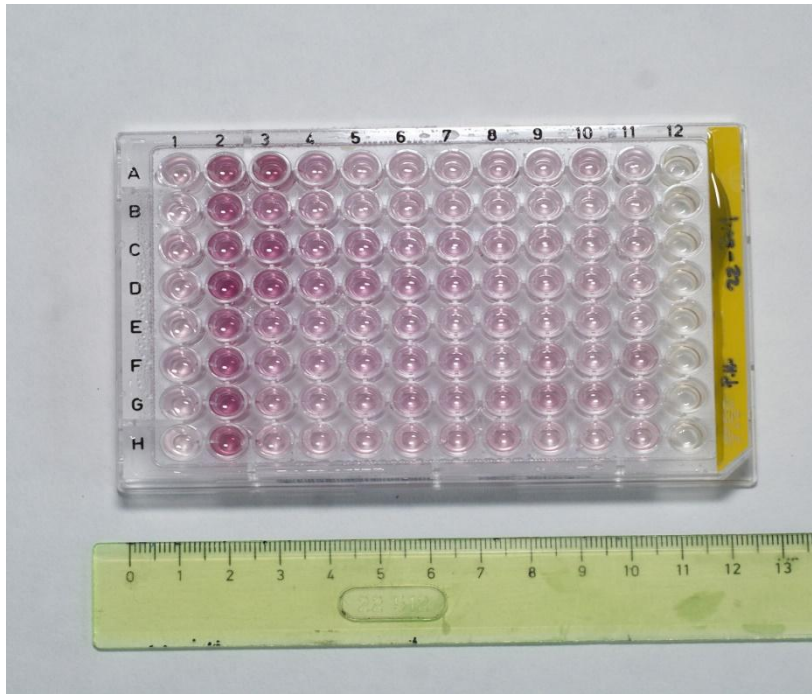
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

vodorozpustné tetrazolium barvivo, které živé buňky metabolizují na fialový formazan. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byla napipetována suspenze buněk, přičemž jamky ve sloupci 1 a 12 obsahovaly pouze čisté médium bez buněk. Na jednu jamku je počítáno s 10 000 buňkami. Takto naplněná destička byla vložena do CO₂ termoboxu a buňky se nechali narůst na 70% konfluenci. Po této době byla k buňkám přidána zvolená koncentrační řada zinku. V této fázi byla destička opět uložena na 48 hodin do CO₂ termoboxu. Po této inkubační fázi byl odstraněn obsah jamek 1–12 a do jamek bylo napipetováno 200 µl čistého média a 50 µl MTT (5mg/ml destilované vody). Destička byla zabalena do alobalu, jelikož MTT látka se na světle rozkládá, a vložena do CO₂ termoboxu na 4 hodiny. Poté byl obsah jamek opět odstraněn a do jamek bylo přidáno 200 µl DMSO a 25 µl glycinového pufru. V takto zhotovené destičce byla změněna absorbance při 570 nm (Versa Max tunable microplate reader).

Další použitou metodou je real-time monitoring buněčné adheze a proliferace pomocí přístroje xCELLigence (Roche, Švýcarsko). Tato metoda umožňuje nepřetržitě sledovat buněčnou proliferaci, životaschopnost a cytotoxicitu. Během celého experimentu jsou nám podávány informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti. Použitá mikrotitrační destička má na dně jamek zlaté elektrody, které zaznamenávají buněčný index. Na začátku experimentu je v každé jamce 10 000 buněk, což je koncentrace, při které nedochází k inhibici měření kontaktem. V mikrotitrační destičce se do každé jamky napipetuje suspenze buněk a destička se vloží do přístroje, který je uložen v CO₂ termoboxu. Dle rychlosti růstu buněk se po určité době přidá zinek v námi zvolených koncentracích a destička se opět uloží do CO₂ termoboxu. Výsledkem tohoto přístroje jsou růstové křivky.



Obrázek č. 1: Výsledek MTT testu

Ionty železa a mědi, charakterizace a aplikace na buněčné kultury

Ionty železa a mědi, sledování distribuce na buněčné kultury

*Mgr. Renáta Kenšová, Ph.D., Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Michal Masařík, Ph.D.,
Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D., Bc. Michal Žůrek,
Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.*

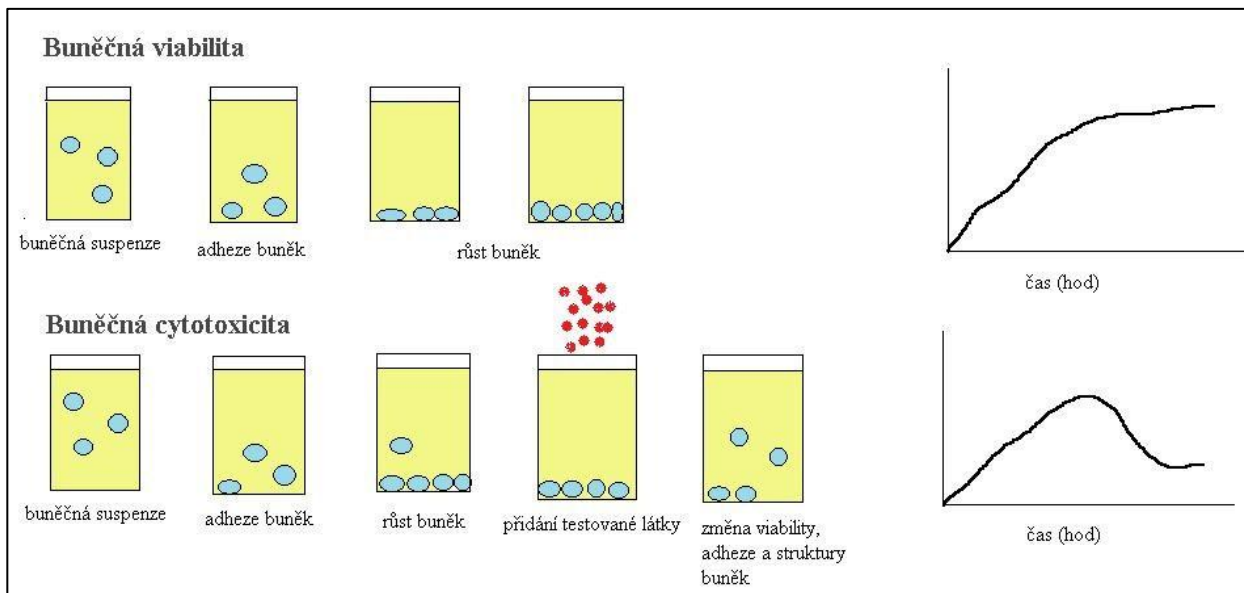
Před začátkem experimentu jsou buňky uchovávány při -80°C ve směsi s FBS (PAA, Rakousko) a DMSO (dimethyl sulfoxid). Po rozmrznutí buněk ve vodní lázni se suspenze buněk napipetuje do živného media a takto vzniklá suspenze se centrifuguje při 2 700 rpm, 4°C , 7 minut. Vzniklý supernatant se odsaje a usazené buňky se rozsuspendují v mediu. Z této suspenze se část odebere a napipetuje do připravených Petriho misek s médiem nebo do krabiček. Popsané misky se vloží do termoboxu a nechají se inkubovat, dokud buňky nenarostou do požadované koncentrace. Dvakrát za týden se buňkám mění médium. V případě, že potřebujeme větší množství misek či krabiček, tak se narostlé buňky rozpasážují na více misek nebo krabiček. Narostlým buňkám se odsaje médium, buňky se propláchnou EDTA, která se opět odsaje, a dále se buňky propláchnou trypsinem. Trypsin (PAA, Rakousko) se odsaje a krabička nebo miska se vloží na tři minuty do termoboxu. Buňky se začnou odlupovat od povrchu. Poté se k buňkám přidá trochu média a buňky se do něj uvolní. Tato suspenze se přepipetuje do centrifugační zkumavky a centrifuguje se. Poté se postupuje stejně jako v případě rozmražení buněk. V případě potřeby se buňky počítají v Bürkerově komůrce. Jakmile máme buňky narostlé na 70% konfluenci, můžeme začít s experimenty. Pro analýzu cytotoxicity železa (mědi) používáme MTT test a real-time monitoring s využitím systému xCELLigence. Po určení hodnoty IC50 určíme koncentrační řadu a železo (měď) v požadované koncentraci aplikujeme na buňky, které jsou narostlé na 70% konfluenci. Po 48 hodinách působení se udělají další potřebné analýzy.

MTT test se používá k určení toxicity látek vůči buněčným liniím. Princip testu je založen na redukci MTT na formazan a hodnotí viabilitu buněk v daném prostředí. MTT látka je žluté vodorozpustné tetrazolium barvivo, které živé buňky metabolizují na fialový formazan. Do 96



jamkové mikrotitrační destičky byla napipetována suspenze buněk, přičemž jamky ve sloupci 1 a 12 obsahovaly pouze čisté médium bez buněk. Na jednu jamku je počítáno s 10 000 buňkami. Takto naplněná destička byla vložena do CO₂ termoboxu a buňky se nechali narůst na 70% konfluenci. Po této době byla k buňkám přidána zvolená koncentrační řada železa (mědi). V této fázi byla destička opět uložena na 48 hodin do CO₂ termoboxu. Po této inkubační fázi byl odstraněn obsah jamek 1–12 a do jamek bylo napipetováno 200 µl čistého média a 50 µl MTT (5mg/ml destilované vody). Destička byla zabalena do alobalu, jelikož MTT látka se na světle rozkládá, a vložena do CO₂ termoboxu na 4 hodiny. Poté byl obsah jamek opět odstraněn a do jamek bylo přidáno 200 µl DMSO a 25 µl glycinového pufru. V takto zhotovené destičce byla změřena absorbance při 570 nm (Versa Max tunable microplate reader).

Další použitou metodou je real-time monitoring buněčné adheze a proliferace pomocí přístroje xCELLigence (Roche, Švýcarsko). Tato metoda umožňuje nepřetržitě sledovat buněčnou proliferaci, životaschopnost a cytotoxicitu. Během celého experimentu jsou nám podávány informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti. Použitá mikrotitrační destička má na dně jamek zlaté elektrody, které zaznamenávají buněčný index. Na začátku experimentu je v každé jamce 10 000 buněk, což je koncentrace, při které nedochází k inhibici měření kontaktem. V mikrotitrační destičce se do každé jamky napipetuje suspenze buněk a destička se vloží do přístroje, který je uložen v CO₂ termoboxu. Dle rychlosti růstu buněk se po určité době přidá železo (měď) v námi zvolených koncentracích a destička se opět uloží do CO₂ termoboxu. Výsledkem tohoto přístroje jsou růstové křivky.



Obrázek č. 1: Schématické znázornění principu xCELLigence