

Téma: Průtoková cytometrie – analýza buněčného cyklu

Úvod:

Průtoková cytometrie je metoda umožňující multiparametrickou analýzu fyzikálně-chemických vlastností mikroskopických částic, kterými jsou nejčastěji buňky, v suspenzi, které procházejí jedna za druhou úzkým paprskem světla o určité vlnové délce. Nesmírnou výhodou této metody je možnost simultánní analýzy až několika tisíců částic za sekundu. U paprsku dopadajícího na částici dochází k lomu a rozptylu světla. Přímý rozptyl, označovaný jako forward scatter, koreluje s velikostí částice. Tento parametr je někdy měřen elektricky a je poté označován jako elektronický objem (electronic volume). Boční rozptyl neboli side scatter odráží charakter buňky, její vnitřní strukturu a granularitu. Pro bližší analýzu některých vlastností částic je možné použití fluorescenčních značek, které po ozáření světlem o vhodné vlnové délce emitují záření, které je zachycováno detektory za filtry propouštějícími světlo pouze o určité vlnové délce.

Průtoková cytometrie nachází uplatnění v celé řadě analýz. Jednou z nejčastěji využívaných je analýza buněčného cyklu. Buněčný cyklus je sled událostí, kterými buňka prochází mezi dvěma děleními. Je rozdělen do 4 fází: G1, S, G2 a M. Při analýze buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie je měřen obsah DNA jednotlivých buněk ve vzorku, proto je nezbytné DNA nejprve naznačit vhodnou fluorescenční sondou. Jednou z nejběžněji používaných je například propidium jodid. Propidium jodid je fluorescenční interkalační činidlo, které se zabudovává do struktury dvoušroubovice DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (> 560 nm). Během S fáze buněčného cyklu dochází k replikaci DNA a tedy k postupnému zvyšování jejího obsahu v buňce až na dvojnásobek. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je poté možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se nacházejí.

Úkol č. 1: Příprava buněčné linie K562 odvozené od chronické myeloidní leukémie pro průtokový cytometr

Materiál: kultura buněk K562

Chemikálie: kultivační médium DMEM, látky ovlivňující buněčný cyklus, PBS, 70% ethanol

Pomůcky: flowbox, kultivační nádoby, zkumavky

1. *Pracujte ve sterilním prostředí (flowbox).*
2. *Kultivujte buňky buněčné linie K562 v Petriho miskách o průměru 60 mm (násada na jednu misku 1 000 000 buněk do 5 ml kultivačního média).*
3. *Po asi 2 hodinách buňky ovlivněte přidáním látek majících vliv na buněčný cyklus a inkubujte potřebnou dobu v inkubátoru (37 °C obsah CO₂ 5%), délka inkubace a koncentrace závisí na zvolené látce.*
4. *Po inkubaci převed'te médium s buňkami do zkumavek, kultivační misku opláchněte 2 ml PBS a přidejte do odpovídajících zkumavek.*
5. *Vzorky centrifugujte (10 min, 1000 g, 4 °C).*
6. *Odsajte supernatant a pelet resuspendujte v 1 ml PBS.*

7. *Vzorky centrifugujte (10 min, 1000 g, 4 °C).*
8. *Odsajte supernatant, pelet resuspendujte ve 100 µl PBS a za mírného vortexování do zkumavky pomalu přikapávejte 1 ml vychlazeného 70% etanolu (- 20 °C).*
9. *Takto zafixované buňky umístěte do - 20 °C.*

PROVEDL VEDOUCÍ CVIČENÍ

Úkol č. 2: Analýza buněčného cyklu buněčné nádorové linie K562

Materiál: 70% ethanolem zafixovaná kultura buněk K562

Chemikálie: filtrovaný roztok 1x PBS, propidium jodid (1 mg/ml), RNáza (10 mg/ml)

Pomůcky: Zkumavky, centrifuga, vakuová pumpa, vortex, Průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC – MPL (Beckman Coulter)

Postup:

1. Buněčnou kulturu K562 zafixovanou 70% ethanolem centrifugujte (8 min, 1000 g, 4 °C).
2. Odsajte supernatant a pelet resuspendujte v 1 ml filtrovaného PBS.
3. Opět centrifugujte (8 min, 1000 g, 4 °C) a odsajte supernatant.

POZOR! Pro další práci používejte ochranné rukavice. Propidium jodid je MUTAGEN!!!

4. Pelet resuspendujte v 1 ml filtrovaného PBS, připipetujte 10 µl roztoku propidium jodidu a 20 µl roztoku RNázy.
5. Vzorky nechejte inkubovat 30 minut při pokojové teplotě ve tmě.
6. Po 30ti minutové inkubaci přepipetujte vzorky do speciálních vialek pro průtokový cytometr.
7. Analýza na průtokovém cytometru,

Otázky:

1. Stručně charakterizujte jednotlivé fáze buněčného cyklu.
2. Jaké další fluorescenční značky by mohly být použity pro naznačení DNA? Jaké vlnové délky mají jejich excitační a emisní spektra? Uveď alespoň 3.

Použitá literatura:

AescuLab - systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-214 Průtoková cytometrie – analýza buněčného cyklu, Dolečková.