PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2017-233

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68	(2006.01)
G01N 1/30	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.04.2017**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **01.08.2018**

(Věstník č. 31/2018)

(71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
RNDr. Karel Koberna, CSc., Olomouc, CZ
RNDr. Anna Ligasová, Ph.D., Olomouc, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob stanovení množství DNA ve vzorcích a jeho využití pro stanovení množství buněk

(57) Anotace:

Řešení poskytuje způsob stanovení množství DNA ve vzorcích, ve kterých je tato DNA pevně ukotvena. Příkladem jsou především vzorky obsahující DNA, která je ukotvená na částicích nebo površích, a vzorky obsahující buňky. Jelikož je množství DNA v buňkách přímo úměrné jejich množství, je přístup využitelný pro stanovení množství buněk ve vzorcích obsahujících buňky. Jak v případě vzorků obsahujících ukotvenou DNA, tak v případě vzorků obsahujících buňky, popsaný přístup poskytuje lineární závislost signálu na množství DNA v širokém rozmezí hodnot. Např. v 96-jamkové destičce poskytuje plně lineární výsledky již od cca 100 buněk až po plně narostlou jamku. Popsaný přístup je založen na značení DNA pomocí fluorescenčních látek, které se váží na DNA, promytí vzorků v promývacím roztoku a vymytí fluorescenčních látek pomocí vymývacího roztoku. Vyjmenované kroky jsou základními kroky popsaného postupu. Díky vhodně zvolenému složení vymývacích roztoků, které zabezpečuje vysoké vymytí a současně vysokou fluorescenci použitých fluorescenčních látek, pak fluorescenční signál naměřený ve vymývacím roztoku odráží množství DNA.

CZ 2017 - 233 A3

PV 2017-233

Způsob stanovení množství DNA ve vzorcích a jeho využití pro stanovení množství buněk

Oblast techniky

Vynález se týká stanovení množství DNA ve vzorcích a jeho využití pro stanovení buněk.

Dosavadní stav techniky

Pro stanovení množství DNA ve vzorcích se používá řada metod. Nejčastějším způsobem je izolace DNA ze vzorku a následné měření koncentrace pomocí absorbance určitých vlnových délek. Tato technologie však vyžaduje izolaci DNA, a je tudíž nepříliš vhodná např. pro stanovení množství buněk nebo v případech, kdy se jedná o jinak vázanou DNA ve vzorku, např. na povrchu destiček. V případě stanovení množství buněk je jednou z nejrozšířenějších metod varianta, která spoléhá na přímé počítání buněk pomocí mikroskopu a hemocytometru. Ačkoli se jedná o levnou metodu, její hlavní nevýhodou je časová náročnost. Proto byly vyvinuty a dále jsou vyvíjeny alternativní přístupy pro stanovení množství buněk. Tyto přístupy jsou založeny např. na přeměně některých substrátů pomocí buněčných enzymů a měření změny koncentrace produktu této reakce. Příkladem jsou přístupy označované jako MTT, MTS, WST-1 a přístupy založené na alamarové modři (*J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 1003–1013). Nevýhodou uvedených přístupů je jejich závislost na metabolickém stavu buněčné populace. Ta může kromě jiného souviset i s hustotou buněčné populace (*Tissue Eng.*, **11**, 182-191) a nemusí tudíž poskytovat lineární průběh závislosti signálu na množství buněk. Proto byly vyvinuty a jsou používány přístupy založené právě na detekci buněčné DNA. Příkladem jsou fluorescenční látky, které se vážou k DNA a po jejich navázání na DNA dochází k výraznému zvýšení jejich fluorescence. Typickým příkladem jsou cyaninová barviva CyQuant a PicoGreen (*J. Immunol. Methods*, **254**, 85-98). Na podobném principu byly vypracovány postupy založené na DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol; obrázek 1) nebo barvivech Hoechst (*In Vitro Cell Dev. Biol.*, **24**, 247-252; *J. Immunol. Methods*, **162**, 41-45; *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 493-505; *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 24-33; obrázek 1). Minimální počet buněk, které je možné stanovit jednotlivými metodami, je různý a obecně se pohybuje od několika desítek po 1 000 buněk v jamce 96-jamkové destičky. Nevýhodou těchto přístupů je potřeba zajištění měření v celé jamce nebo v celém objemu vzorku, aby byla zajištěna co nejvyšší přesnost měření. Jednotlivé přístupy se rovněž liší rychlostí provedení, možností sledování dalších parametrů, např. replikační aktivity a materiálovou náročností, přičemž rozhodujícím faktorem není v řadě

aplikací citlivost metod, ale spíše potřeba zajistit vysokou linearitu v širokém rámci buněčných koncentrací.

Podstata vynálezu

Předkládaná přihláška vynálezu popisuje způsob stanovení množství DNA ve vzorcích, ve kterých je tato DNA ukotvena. Příkladem jsou především vzorky obsahující DNA, která je ukotvená na částicích nebo površích, a vzorky obsahující buňky. Příkladem částic mohou být magnetické nebo křemíkové nebo skleněné částice, příkladem povrchů mohou být povrchy mikrotitračních destiček. Vzorky obsahujícími buňky mohou být např. tkáně, buňky přisedlé na podložkách typu Petriho misek, kultivačních láhví, mikroskopických skel nebo více jamkových destiček nebo buňky v suspenzní kultuře. Jelikož je množství DNA v buňkách přímo úměrné jejich množství, je přístup využitelný pro stanovení množství buněk ve vzorcích obsahujících buňky. Jak v případě vzorků obsahujících ukotvenou DNA, tak v případě vzorků obsahujících buňky popsaný přístup poskytuje lineární závislost signálu na množství DNA v širokém rozmezí hodnot. Např. v 96-jamkové destičce poskytuje plně lineární výsledky již od cca 100 buněk až po plně narostlou jamku.

Popsaný přístup je založen na značení DNA pomocí fluorescenčních látek, které se váží na DNA, promytí vzorků v promývacím roztoku a vymytí fluorescenčních látek pomocí vymývacího roztoku. Vlastní měření fluorescence pak probíhá ve vymývacím roztoku, který může, ale nemusí obsahovat i stanovovanou DNA. Inkubace vzorků s fluorescenčními látkami, promytí v promývacím roztoku a vymytí fluorescenčních látek vymývacím roztokem jsou základními kroky popsaného postupu. Tyto kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně po sobě. Díky vhodně zvolenému složení vymývacích roztoků, které zabezpečuje vysoké vymytí, linearitu závislosti signálu na množství DNA a současně vysokou fluorescenci použitých fluorescenčních látek, pak fluorescenční signál naměřený ve vymývacím roztoku odráží množství DNA.

V popsaném přístupu jsou vzorky obsahující DNA inkubovány v roztoku, výhodně vodném roztoku, těchto fluorescenčních látek: DAPI (obrázek 1; *Biotech. Histochem.*, **70**, 220-233) a/nebo Hoechst 33258 (4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochlorid) a/nebo Hoechst 33342 (2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid) a/nebo Hoechst 34580 (2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-

metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazol); dále jen Hoechst; obrázek 1; *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 493-505, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 24-33, *Cytometry*, **44**, 133-136. Tyto látky jsou běžně používány k detekcím a kvantifikacím DNA díky výraznému nárůstu fluorescence po jejich navázání na molekuly DNA. Ačkoli z hlediska ceny a manipulace je výhodné použít vodné roztoky DAPI a/nebo Hoechst, je možné použít i další roztoky. Příkladem jsou roztoky DAPI a/nebo Hoechst v etanolu, metanolu nebo dimetylsulfoxidu (DMSO). Rovněž je možné použít směsi různých roztoků a rozpouštědel. Příkladem může být směs etanolu a vody nebo etanolu a vodných roztoků nebo směs metanolu a vodných roztoků. V případě buněčných kultur může být inkubace s DAPI a/nebo Hoechst provedena např. v růstovém médiu buněk nebo až po jejich dalším zpracování. V případě kousků tkání může být inkubace s DAPI a/nebo Hoechst rovněž provedena okamžitě po vyjmutí z organismu nebo až po dalším zpracování. Příkladem dalšího zpracování je usušení, fixace např. ve formaldehydu nebo etanolu, permeabilizace detergenty, nebo inkubace v roztoku jednomocné mědi. Tyto kroky mohou být vzájemně kombinovány. Obecně je možné přístup použít pro různě opracované vzorky obsahující DNA.

Optimální koncentrace DAPI a Hoechst pro stanovení množství DNA se pohybuje mezi 0,1 až 20 $\mu mol.l^{-1}$.

Jelikož se DAPI i Hoechst mohou v různě velké míře vázat i na RNA, je výhodné v případech, kdy je nutné přesné stanovení DNA a vzorky obsahují i RNA, odstranit RNA, např. pomocí RNázy, výhodně RNázy A. Použitá koncentrace RNázy A je s výhodou 0,1 až 0,5 $mg.ml^{-1}$. Vzorky se s RNázou A výhodně inkubují 10 až 60 minut při teplotě 20 až 37 °C. Tento krok je optimálně proveden ještě před promývacím krokem.

Součástí popsaného přístupu je promývací krok, který je proveden až po inkubaci vzorků s DAPI a/nebo Hoechst. V jeho průběhu dochází k odstranění použitých, nespecificky navázaných fluorescenčních látek - DAPI a/nebo Hoechst. Ty mohou být nespecificky navázané např. na samotné vzorky, povrchy inkubačních nádob a jejich součásti, případně další části, které byly v průběhu aplikace přístupu inkubovány s DAPI a/nebo Hoechst. Jedná se např. o krycí nebo podložní skla nebo filtry. Podle našich zjištění např. povrchy běžných polystyrénových kultivačních nádob poměrně silně váží DAPI i Hoechst. Obvykle dostatečná je inkubace vzorků po dobu 15 minut až jedné hodiny při třech až čtyřech výměnách promývacího roztoku. V případě, že tyto fluorescenční látky nebyly dokonale odstraněny, došlo

k nárůstu nespecifického signálu, což vedlo ke snížení citlivosti metody. Ačkoli bylo možné pro promytí použít např. vodu, výhodné se ukázaly promývací roztoky založené na vodných roztocích pufrů s pH výhodně mezi 6 až 8, které současně obsahovaly detergent. Výhodně byl tímto detergentem Tween 20 (polyoxyetylen sorbitan monolaurát, Obrázek 2). Experimenty ukázaly, že je rovněž možné použít další látky typů detergentů jako je Tween 80 (polyoxyetylen sorbitan monooleát, Obrázek 2), Triton X-100 (2-[4-(2,4,4-trimetylpentan-2-yl)fenoxy]etanol, Obrázek 3), saponiny (skupina amfipatických glykosidů), Nonidet P-40 (4-tert-octylfenol dietoxylát, Obrázek 3) nebo jejich kombinace. Pro promytí vzorku byla dostačující koncentrace detergentu nad 0,05 % (obj./obj.). Z pufrů byl z hlediska ceny výhodný např. fosfátový pufr připravený z dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu disodného nebo dihydrogenfosforečnanu draselného a hydrogenfosforečnanu didraselného nebo dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu didraselného nebo dihydrogenfosforečnanu draselného a hydrogenfosforečnanu disodného, případně fosfátový pufr obsahující chlorid sodný a/nebo chlorid draselný a/nebo chlorid hořečnatý. Úspěšně byly testovány i další pufry, např. pufry obsahující Tris (2-Amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol) nebo HEPES (kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonová). Obecně jsme nepozorovali, že by některý z testovaných pufrů vykazoval významný vliv na rychlost a účinnost vymývaní. Naopak přídavek detergentů účinnost zvyšoval.

V dalším, vymývacím kroku jsou vzorky inkubovány ve vodném, výhodně pufrovaném, roztoku dodecylsíranu sodného ($NaC_{12}H_{25}SO_4$, rovněž označovaný jako sodiumdodecylsulfát, SDS) a/nebo dodecylsíranu litného ($LiC_{12}H_{25}SO_4$, litiumdodecylsulfát, LiDS) a/nebo [dodecanoyl(metyl)amino]acetátu sodného ($C_{15}H_{28}NNaO_3$, sodiumlaurylsarkosinát, sarkosyl); dále jen vymývací látky. Tento krok zajišťuje vymytí fluorescenčních látek navázaných na DNA do roztoku. Inkubace vede k úplnému vymytí fluorescenčních látek jak z DNA navázané na nosič, tak z buněk. Rozhodující pro důkladné vymytí je koncentrace vymývacích látek. Minimální koncentrace, které vedou k efektivnímu vymytí DAPI a Hoechst, jsou 0,1 % (hmotnost/obj.). S výhodou se tyto koncentrace pohybují od 0,1 % do 10 % (hmotnost/obj.) SDS a LiDS a od 1 % do 10 % (hmotnost/obj.) sarkosylu. Pro většinu testovaných protokolů postačovalo pro efektivní vymytí fluorescenčních látek 0,5 % až 2 % (hmotnost/obj.) roztoku vymývací látky.

Obecně platilo, že se zvyšující se koncentrací vymývacích látek, docházelo ke zvýšení rychlosti vymývání. Bylo možné použití i kombinace více vymývacích látek. K vymytí největší části

fluorescenčních látek docházelo nejčastěji v průběhu několika minut. Jen v případě vysušených preparátů bylo nutné použít časy, které se pohybovaly od několika desítek minut až do jedné hodiny.

Vymývací látky je možné rovněž v nízké koncentraci, kdy ještě nedochází k efektivnímu vymytí fluorescenčních látek z DNA, použít v promývací roztoku promývacího kroku, který předchází vymývacímu kroku. V tomto případě promývací roztoky obsahují maximálně 0,05 % (hmotnost/obj.) vymývacích látek a zároveň jsou použité koncentrace vymývacích látek v promývacím roztoku výhodně nejméně 10x nižší, než jsou koncentrace použité ve vymývacím roztoku. Takto nízké koncentrace nemají signifikantní vliv na chybu stanovení množství DNA, protože se při promývání vymyje pouze zanedbatelné množství fluorescenčních látek.

Již dříve bylo zjištěno, že přítomnost SDS vede ke zvýšení fluorescence jak DAPI, tak Hoechst (*Nucleic Acids Res.*, **5**, 3775-3799; *Photochem. Photobiol.*, **73**, 339-348). Nicméně bylo třeba určit, při jakých koncentracích vymývacích látek bude signál nejvyšší, zda bude dostatečný pro přesné stanovení DNA, zda nebude ovlivněn přítomností DNA, případně dalších částí vzorku, zda dojde k průniku koncentrace, která je nutná pro vymytí a koncentrace pro dostatečné zvýšení signálu a nakolik bude výsledný signál lineární z hlediska množství DNA ve vzorku. V přístupu obecně není důležitý nárůst fluorescence oproti stavu bez přidané vymývací látky, ale absolutní naměřená hodnota. Optimálně bylo třeba, aby se maximální fluorescenční signál překrýval s hodnotami, které jsou nutné pro vymytí DAPI a/nebo Hoechst z DNA vzorků a současně aby se fluorescenční signál lineárně zvyšoval s narůstající koncentrací DNA. Analýza signálu DAPI v různých koncentracích SDS ukázala vysokou absolutní fluorescenci již u hodnot kolem 0,3125 % (hmotnost/obj.) SDS. V případě sarkosylu a DAPI byla vysoká hodnota absolutní fluorescence naměřena u 0,625 % (hmotnost/obj.) sarkosylu. Dále se již signál v SDS ani sarkosylu výrazněji neměnil (obrázek 4 a 5). Podobný výsledek jako v případě SDS jsme obdrželi i v případě LiDS. Z tohoto pohledu jsou pro vymývání DAPI výhodné koncentrace nad 0,3 % (hmotnost/obj.) SDS nebo LiDS nebo koncentrace nad 0,6 % (hmotnost/obj.) sarkosylu. Navíc bylo patrné, že signál u DAPI v SDS je obecně více než 2x vyšší než signál naměřený v sarkosylu (obrázek 6). Podobně to bylo v případě poměru signálu DAPI v LiDS a sarkosylu. Signál Hoechst rovněž vykazoval závislost na koncentraci vymývacích látek (obrázek 4 a 5). Nejvyšší signál Hoechst byl naměřen při koncentracích 5 až 10 % (hmotnost/obj.) SDS. Podobně to bylo v případě LiDS. Nejvyšší signál Hoechst v roztocích obsahujících sarkosyl byl naměřen při koncentracích kolem 0,6 % (hmotnost/obj.) sarkosylu.

S výjimkou 0,625 % koncentrace byl signál Hoechst v SDS vyšší než signál v sarkosylu (obrázek 5). Obdobně to platilo i pro LiDS.

Naše experimenty ukázaly, že v případě DAPI je ve většině případů z hlediska rychlosti vymývání a dosaženého signálu optimální koncentrace SDS a LiDS 1 ÷ 2 % (hmotnost/obj.). Při použití DAPI a sarkosylu byla tato hodnota podobná. U Hoechst a SDS nebo LiDS jsou optimální koncentrace mezi 5 ÷ 10 % (hmotnost/obj.) SDS nebo LiDS. V případě Hoechst a sarkosylu jsou tyto koncentrace minimálně 0,6 % (hmotnost/obj.) sarkosylu. 0,6 % (hmotnost/obj) koncentrace sarkosylu však nebyla v některých případech dostatečná pro rychlé vymytí DAPI a/nebo Hoechst z DNA. Obecně použití SDS a LiDS bylo výhodnější než použití sarkosylu. Výsledky rovněž ukázaly, že naměřený signál DAPI v SDS a LiDS byl obecně významně vyšší než naměřený signál u Hoechst. Rovněž jsme testovali možnost použití vzájemných směsí vymývacích látek SDS, LiDS a sarkosylu. Tyto směsi rovněž vedli k vymytí DAPI a/nebo Hoechst a ke zvýšení fluorescence.

Pro urychlení vymytí je optimální v průběhu vymývání třepat vzorky na laboratorní třepačce výhodně při 300 až 600 rpm. Příměsi etanolu, metanolu, isopropanolu nebo složek pufrů např. fosforečnanů nebo Tris nemají na vymývání ani následnou výši fluorescence významný vliv. V průběhu vývoje se ukázalo, že v rozporu s dříve publikovanými výsledky, etanol nevedl k vymytí ani DAPI ani Hoechst (*J. Immunol. Methods*, **162**, 41-45). Z naměřených dat je zřejmé, že signál poskytovaný DAPI je v oblasti pH 6 ÷ 8 nezávislý na pH. U Hoechst je optimem hodnota pH 6,5 ÷ 7,5. Současně bylo zjevné, že fluorescenční signál byl stabilní přinejmenším po dobu několika dnů, což je významné jak z hlediska možnosti případného transportu vzorku do vhodně vybavené laboratoře, tak z hlediska možnosti opakovaného měření a uchování vzorků pro následná vyhodnocení.

V případě použití přístupu pro stanovení množství fixovaných buněk ve vzorcích buněk nebo tkání, je pro fixaci buněk možné použít celou řadu přístupů. Buňky mohou být např. fixované roztokem formaldehydu, výhodně vodným 1 až 8 % (hmotnost/obj.) pufrovaným roztokem formaldehydu. Jako pufr pro přípravu fixačního roztoku formaldehydu je výhodně použit fosfátový pufr nebo fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (1x PBS). Pro přípravu 1 až 8 % (hmotnost/obj.) roztoku formaldehydu je rovněž výhodně použit metanolem stabilizovaný roztok formaldehydu. Jiným výhodný a rychlým způsobem fixace je inkubace vzorků obsahujících buňky v 50 až 100 % roztoku etanolu nebo metanolu výhodně ve vodě nebo ve vodném pufrovaném roztoku, např. pomocí fosfátového pufru nebo 1x PBS. Doba fixace ani

teplota fixačních roztoků není pro popsaný způsob stanovení DNA důležitá. Např. pro formaldehydickou fixaci je dostatečná doba inkubace již od 30 sekund a teplota se výhodně pohybuje od 4 do 30 °C. Pro etanolovou fixaci je výhodné používat dobu fixace delší než 10 minut. Vzorky mohou být uchovány v etanolové nebo metanolové fixaci i po dobu několika měsíců až několika let a to výhodně při nízkých teplotách, např. při -10 až -20 °C. Přístup je možné použít i pro buňky vysušené nebo pro nefixované buňky.

Naše výsledky dále ukázaly, že je výhodné vzorky obsahující buňky v průběhu zpracování inkubovat ve vodném roztoku jednomocné mědi. Ačkoli je možné inkubaci v roztoku jednomocné mědi provést současně s inkubací s DAPI a/nebo Hoechst nebo kdykoli před vymývacím krokem, jeho efekt je nejvyšší při použití před inkubací s DAPI a/nebo Hoechst. Tento krok zvyšuje signál a současně je možné tento krok použít namísto fixačního kroku. Při použití roztoku jednomocné mědi a přisedlých populací buněk docházelo ke stabilizaci buněk k podkladu do té míry, že nebylo nutné buňky fixovat, aby nedošlo k jejich uvolnění z podkladu působením vymývacích látek. Tento krok současně významně snižoval, v případech, kdy byla DNA ze vzorků obsahující buňky uvolněna do roztoku, viskozitu tohoto roztoku v důsledku štěpení DNA (*PLoS One*, 7, e52584), což usnadňovalo manipulaci s roztokem při jeho případném přenesení do jiné nádoby určené pro měření. Inkubace ve vodném roztoku jednomocné mědi neměla vliv na linearitu měření. Byly testovány roztoky obsahující jednomocnou měď včetně těch, které jsou uvedeny v patentu CZ 303230. Jako nejvýhodnější se ukázalo použití vodného roztoku připraveného smícháním vodného roztoku hydrochinonu a vodného roztoku síranu měďnatého. Tento systém na rozdíl od poměrně hojně používaného systému založeného na smíchání vodného roztoku síranu měďnatého a vodného roztoku askorbátu sodného nevyžadoval přítomnost dalších látek bránících vytvoření viditelného precipitátu. Konečná koncentrace síranu měďnatého v roztoku, ve kterém došlo k vytvoření jednomocné mědi, byla v okamžiku přidání výhodně 0,1 až 50 mmol.l^{-1} a konečná koncentrace hydrochinonu byla v okamžiku přidání výhodně 0,5 až 100 mmol.l^{-1}. Pro přípravu roztoku jednomocné mědi je výhodné nejprve připravit zásobní vodný roztok hydrochinonu a zásobní vodný roztok síranu měďnatého. Tyto dva roztoky jsou smíchány těsně před použitím roztoku jednomocné mědi. Výhodně je připraven zásobní vodný roztok síranu měďnatého v koncentracích 4 až 200 mmol.l^{-1} a zásobní vodný roztok hydrochinonu v koncentracích 20 až 200 mmol.l^{-1}. Inkubace vzorku v roztoku jednomocné mědi probíhá s výhodou po dobu 1 minuty až 1 hodiny při teplotách 0 až 45 °C.

Vzhledem k okolnosti, že veškeré fluorescenční látky se po skončení popsaného postupu nacházejí ve vymývacím roztoku, je možné provést měření fluorescence jak přímo v nádobě, kde došlo k vymytí fluorescenčních látek, tak v jiné nádobě, a to po přenesení roztoku. To je výhodné ve všech případech, kdy jsou vzorky v nádobách, které nejsou vhodné pro měření fluorescence. Současně tento přístup poskytuje homogenní signál v celém objemu vymývacího roztoku, což významně zvyšuje spolehlivost obdržených výsledků a snižuje potřebu opakovaných měření. Rovněž je možné uchování těchto vymývacích roztoků po delší čas, např. po dobu několika týdnů a jejich následné měření.

Výsledky ukázaly, že signál poskytovaný DNA se lineárně zvyšoval s narůstající koncentrací DNA a tato linearita byla zachována v širokém pásmu testovaných koncentrací SDS, LiDS i sarkosylu od 0,1 % do 20 % (hmotnost/obj.). Přístup poskytuje poměrná data. Po provedení kalibrace např. v případě stanovení DNA pomocí absorbance při 260 nm nebo v případě stanovení množství buněk prostřednictvím hemocytometru, je možné určit i absolutní množství DNA nebo absolutní počet buněk. Podle našich zjištění současná přítomnost DNA, RNA, proteinů a cukrů v okamžiku měření neinterferuje se signálem DAPI a Hoechst ve vymývacích roztocích a nemá vliv na linearitu měření. Ačkoli se DAPI i Hoechst vážou k RNA, přičemž v případě Hoechst se jedná převážně o interakci s dvojřetězcovými úseky RNA, není v případě použití přístupu pro stanovení množství buněk nutné RNA v průběhu přístupu nebo ještě před ním zpravidla odstraňovat. Důvodem je podobný obsah RNA u různě narostlých populací. V případě potřeby je možné obsah RNA zcela nebo výrazně eliminovat pomocí inkubace ve vodném roztoku jednomocné mědi a/nebo použitím RNázy.

Pro určení pozadí, které je způsobeno vazbou fluorescenčních látek na vzorky a další části, které byly použity v průběhu aplikace přístupu, je výhodné provést celý přístup současně v nádobě bez vzorků obsahujících DNA např. bez ukotvené DNA nebo bez buněk a po změření signálu odečíst tento signál od signálu, který byl naměřen ve vzorcích s DNA.

Přístup je výhodně použitelný i v případě, kdy jsou pomocí fluorescenčních sond stanovovány další buněčné složky, např. proteiny a/nebo RNA a/nebo látky, které se inkorporují do buněk, a je třeba vztáhnout tento signál na počet buněk. Těmito fluorescenčními sondami mohou být protilátky konjugované s fluorochromem nebo sekvence DNA nebo RNA značené fluorochromem nebo azidované fluorochromy. Fluorochromy mohou být výhodně karboxyfluorescein (FAM) nebo fluorescein ~~isotiocyanát~~ isothiokyanát (FITC) nebo Alexa Fluor 488 nebo

kumarin 343 nebo Cyanin3 (Cy3) nebo Cyanin3.5 (Cy3.5) nebo Cyanin5 (Cy5) nebo Cyanin5.5 (Cy5.5) nebo Cyanin7 (Cy7) nebo Cyanin7.5 (Cy7.5) nebo fenyletynylpyren (PEP) nebo rodamin 101 (ROX) nebo tetrametylrodamin 5-karboxamido-(6-azidohexanyl) (TAMRA) nebo Alexa Fluor 555 nebo Alexa Fluor 594 nebo Alexa Fluor 647 nebo Oregon Green® 6-karboxamido-(6-azidohexanyl) (Oregon Green) nebo DyLight 488 nebo DyLight 649. Přístup je rovněž využitelný v případě, kdy se jedná o tzv. nepřímé průkazy, kdy je nejprve použita nefluorescenční sonda reagující s detekovanou molekulou nebo několik po sobě následujících nefluorescenčních sond a teprve proti poslední z těchto sond je použita fluorescenční sonda. Typickým příkladem je např. detekce buněčných proteinů pomocí první protilátky, která se nejprve naváže na protein a následně je použita druhá protilátka, která je konjugována s fluorochromem a reaguje s první protilátkou. Příkladem látek, které se stanovují po jejich inkorporaci do DNA buněk je 5-etynyl-2'-deoxyuridin (EdU) nebo 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) nebo 5-chloro-2'-deoxyuridin (CldU) nebo 5-jodo-2'-deoxyuridin (IdU). EdU, BrdU, CldU i IdU se inkorporují do buněčné DNA a na základě množství inkorporovaného EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU je možné rozhodnout o replikační aktivitě buněk. Ve všech těchto případech je výhodné současné stanovení DNA a následně množství buněk pomocí popsaného přístupu. Popsaný přístup dovoluje vztáhnout velikost signálu fluorescenčních sond na množství buněk. Vydělením signálu fluorescenčních sond signálem DAPI a/nebo Hoechst ve vymývacím roztoku je pak odstraněn vliv množství buněk na signál poskytovaný fluorescenčními sondami. Po kalibraci signálu DAPI a/nebo Hoechst na skutečný počet buněk, např. pomocí hemocytometru, je pak možné určit i průměrný signál v buňce. EdU, BrdU, CldU i IdU navíc interferují s Hoechst a snižují jejich fluorescenci, aniž by byla snížena vaznost barvících látek na DNA. Pokud je v těchto případech použit odhad počtu buněk prostým měřením fluorescence navázaných fluorescenčních látek Hoechst na DNA, vede to k podcenění množství buněk. Ještě k vyšší interferenci může dojít při navázání některých azidovaných fluorochromů na EdU. V tomto případě dochází k interferenci i v případě, že se použijí nejenom Hoechst ale i DAPI (Obrázek 7). Např. při použití azidovaného FAM, dochází k prudkému poklesu fluorescence DAPI a následně opět k podcenění počtu buněk. Ve všech těchto případech je výhodné použití námi popsaného přístupu stanovení množství buněk, kdy se stanovuje signál DAPI a/nebo Hoechst ve vymývacím roztoku. Námi popsaný přístup pak umožnuje nejen přesné stanovení množství buněk bez vztahu k obsahu látek typu EdU nebo BrdU nebo CldU nebo IdU, ale rovněž následně vztáhnout signál použitých fluorescenčních sond na počet buněk.

V průběhu detekce buněčných složek a/nebo inkorporovaných látek pomocí fluorescenčních sond se provede inkubace s fluorescenčními látkami (DAPI a/nebo Hoechst), dále se provede promytí pomocí promývacích roztoků a dále se provede inkubace ve vymývacím roztoku. V případě, že jsou použity fluorescenční sondy nekovalentně vázané k detekovaným buněčných složkám, zpravidla vede přidání vymývací látky k přechodu fluorescenční sondy do roztoku. V některých případech přidání vymývací látky vede k lyzi buněk. Je to zejména v případě, kdy nebyl pro fixaci buněk použit roztok obsahující činidla vytvářející kovalentní vazby mezi různými buněčnými složkami, např. proteiny. Příkladem činidla vytvářejícího kovalentní vazby je formaldehyd. Rovněž použití roztoku jednomocné mědi vede ke stabilizaci buněk, která brání jejich lyzi v roztoku vymývací látky. Obecně je výhodné uvolnit fluorescenční sondy do roztoku ať již působením vymývacího roztoku nebo vyvoláním buněčné lyze. V případech, kdy jsou použity fluorescenční sondy vázané kovalentně k buněčným detekovaným složkám a vymývací roztoky nevedou k přechodu buněčného obsahu do vymývacího roztoku, je výhodné použít proteinázu K. Jedná se například o případ, kdy je použito EdU a v některém kroku je použit formaldehyd a/nebo roztok jednomocné mědi. V těchto případech není zpravidla možné pomocí vymývacích látek efektivně uvolnit fluorescenční sondy do vymývacího roztoku a zajistit, aby kromě DAPI a/nebo Hoechst, byly v roztoku i fluorescenční sondy. Proteináza K může být aplikována ve vymývacím roztoku. S výhodou jsou vymývací roztoky přidány ke vzorku, až po jeho inkubaci s proteinázou K. Rovněž výhodně jsou vymývací látky přidány k roztoku, který obsahuje buňky ovlivněné proteinázou K až po jeho přednesení do nové nádoby. Tím dojde k významnému snížení pozadí. Následně je změřena fluorescence fluorescenčních sond a DAPI a/nebo Hoechst ve vymývacím roztoku. Signál poskytovaný navázanými fluorescenčními sondami je vydělen signálem DAPI a/nebo Hoechst. Signál DAPI a/nebo Hoechst je před tím výhodně snížen o signál změřený v kontrolních vzorcích bez DNA. Rovněž je možné změřit signál poskytovaný fluorescenčními sondami ještě před přidáním vymývacích látek.

Proteinázu K je rovněž výhodné použít v případě stanovení množství buněk ve všech případech, kdy povrchy nádob silně váží DAPI a Hoechst a aplikace vymývacích roztoků by vedla k vymytí DAPI a Hoechst z těchto povrchů a tím by došlo ke zvýšení pozadí. Za tímto účelem je před vymývacím krokem použita inkubace s proteinázou K, kdy jejím působením dojde k přechodu buněčného obsahu do roztoku. Část nebo veškerý roztok je následně přemístěn do jiné nádoby a teprve pak je přidán vymývací roztok. Tím je sníženo pozadí.

Obecně je vždy výhodné odstranit vzorky z nádoby, kde probíhala inkubace s fluorescenčními látkami, ještě před přidáním vymývacího roztoku.

Koncentrace proteinázy K je s výhodou 0,05 až 0,2 $mg.ml^{-1}$, přičemž proteináza K je výhodně ředěna v 50 $mmol.l^{-1}$ vodním roztoku Tris-HCl, pH = 8. Vzorky jsou inkubovány v roztoku proteinázy K 5 až 120 minut, výhodně při teplotě 37 °C. Rovněž výhodně jsou vzorky při inkubaci třepány na laboratorní třepačce.

Dalším využitím popsaného přístupu stanovení množství DNA a následně i počtu buněk je jeho použití pro stanovení replikační aktivity. V těchto případech jsou vzorky obsahující buňky nejprve inkubovány v kultivačním médiu s 0,1 až 100 $\mu mol.l^{-1}$ BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo EdU výhodně po dobu rovnou nejméně 1/3 buněčného cyklu testované buněčné populace. Dále se provede inkubace s Hoechst stejně jako v případě stanovení množství DNA. Tato inkubace může proběhnout ještě v médiu nebo výhodně až po fixaci vzorků např. etanolem. Je možné ovšem použít i další způsoby fixace nebo vzorky obsahující buňky usušit nebo vzorky obsahující buňky inkubovat ve vodném roztoku, který obsahuje jednomocné ionty mědi stejně jako v přístupu pro stanovení množství DNA ve vzorcích obsahujících buňky. Dále je provedeno promytí pomocí promývacích roztoků stejně jako v přístupu pro stanovení množství DNA. Dále je provedena inkubace s proteinázou K, tato inkubace probíhá stejně jako v případě, kdy je proteináza K použita pro stanovení DNA ve vzorcích obsahujících buňky. Následně je změřen fluorescenční signál Hoechst. Jelikož inkorporace uvedených nukleosidů silně potlačuje fluorescenci Hoechst, signál se snižuje se zvyšující se mírou inkorporace těchto nukleosidů. Signál Hoechst v sobě nicméně rovněž zahrnuje vliv různého počtu buněk. Signál Hoechst je následně výhodně snížen o signál změřený v kontrolních vzorcích bez DNA. Následně je ke vzorkům přidán vymývací roztok. Přidání vymývacího roztoku vede k vymytí molekul Hoechst navázaných na DNA do vymývacího roztoku. Pak je změřen fluorescenční signál Hoechst ve vymývacím roztoku. Tento signál je úměrný počtu buněk a nezávisí na množství inkorporovaných použitých nukleosidů. Signál Hoechst je následně výhodně snížen o signál změřený v kontrolních vzorcích bez DNA. Jelikož uvedené nukleosidy nepotlačují vazbu Hoechst na DNA, ale pouze jejich fluorescenci, naměřený signál je úměrný počtu buněk. Vydělením signálu naměřeného po působní proteinázy K signálem naměřeným po aplikaci vymývacích roztoků je získána hodnota, která přesně odráží replikační aktivitu bez závislosti na počtu buněk s tím, že vyšší signál znamená nižší replikační aktivitu.

Popsaný přístup stanovení DNA je rychlý a díky nízké materiálové náročnosti a faktu, že měření může probíhat v jiné nádobě, než se nachází vzorek DNA, např. vzorek obsahující buňky, je vhodný pro zpracování vysokých počtů a/nebo velkých vzorků. Přístup rovněž umožňuje zpracovat buňky v suspenzi nebo vzorky tkání. Nespornou výhodou celého přístupu je možnost některých provedení opětovného použití vzorku s DNA např. vzorku obsahujícího buňky pro další zpracování bez toto, že by došlo ke ztrátě DNA nebo schopnosti dalších reakcí DNA. Další výhodou je fakt, že v případě současné detekce replikační aktivity pomocí halogenových derivátů 2'-deoxyuridinu nebo EdU dochází k poklesu signálu poskytovaného Hoechst a/nebo DAPI, který není způsoben nižší vazností fluorescenčních látek k DNA, ale poklesem fluorescence vázaných fluorescenčních látek na značenou DNA (Obrázek 7). Vymytí proto eliminuje pokles fluorescence použitých fluorescenčních látek. Jak je patrné, zvláště významný je tento efekt v případě, kdy je pro detekci EdU pomocí tzv. „click reakce" použit azidovaný fluorochrom. Přitom právě použití fluorochromů je výhodné z hlediska rychlosti detekce EdU. Popsaná technologie zcela odstraňuje problémy s detekcí EdU a současné kvantifikace množství buněk pomocí DAPI a Hoechst. Jak bylo ukázáno, technologie je rovněž využitelná při detekci replikační aktivity pomocí BrdU, CldU, IdU a EdU, kdy se využívá poklesu fluorescence Hoechst při vazbě na DNA, která obsahuje uvedené nukleosidy. Některé zjednodušené možnosti použití pro stanovení množství buněk jsou schematicky znázorněny na Obrázcích 8 až 12. Promývací roztok ve schématech obsahuje výhodně látky, kterými jsou detergenty, s výhodou Tween 20, Tween 80, Triton X-100, saponiny, Nonidet P-40, nízké koncentrace SDS, LiDS nebo sarkosylu.

Jedno z výhodných provedení stanovení množství DNA je založeno na inkubaci vzorků obsahujících DNA ukotvenou na površích nebo částicích s vodným, výhodně pufrovaným roztokem DAPI a/nebo Hoechst, následném promytí ve vodném, výhodně pufrovaném promývacím roztoku obsahujícím s výhodou detergent, např. Tween 20, a vymytí ve vodném, výhodně pufrovaném vymývacím roztoku obsahujícím SDS a/nebo LiDS.

Z hlediska ceny, síly signálu a rychlosti je v případě vzorků obsahujících buňky výhodné provedení, kdy jsou vzorky fixovány etanolem nebo metanolem, výhodně 50 až 100 % (obj./obj.) roztokem etanolu nebo metanolu ve vodě nebo fosfátovém pufru nebo 1x PBS, inkubovány s vodným, výhodně pufrovaným roztokem DAPI a/nebo Hoechst, promyty ve vodném, výhodně pufrovaném promývacím roztoku, který s výhodou obsahuje Tween 20 a

následně vymyty ve vodném, výhodně pufrovaném vymývacím roztoku obsahujícím SDS a/nebo LiDS.

V jiném provedení obsahuje fixační roztok etanolu nebo metanolu DAPI a/nebo Hoechst.

V případě přisedlých buněčných kultur, kdy je třeba, aby byly buňky po celou dobu přístupu uchovány na kultivačním povrchu, je výhodné provedení, kdy jsou buňky fixované v roztoku formaldehydu, výhodně ve fosfátovém pufru nebo 1x PBS, nebo jsou buňky fixované etanolem nebo metanolem, výhodně 50 až 100 % (obj./obj.) roztokem etanolu nebo metanolu ve vodě nebo fosfátovém pufru nebo 1x PBS. Následně nebo ještě před fixací je výhodně provedena inkubace ve vodném roztoku jednomocné mědi. Případně je možné buňky fixovat jen roztokem jednomocné mědi nebo např. prostým vysušením. Roztok jednomocné mědi je výhodně připraven z vodného roztoku hydrochinonu a vodného roztoku síranu měďnatého. Roztok jednomocné mědi je výhodně použit rovněž ve všech případech, kdy je třeba zvýšit signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst.

V jednom z výhodných provedení je stanovení DNA provedeno v několika krocích, které mohou, ale nemusejí následovat těsně za sebou:

(i) Vzorky se inkubují v roztoku, výhodně vodném a rovněž výhodně pufrovaném roztoku, alespoň jedné fluorescenční látky vybrané ze skupiny sestávající z DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580, která se v průběhu této inkubace naváže na DNA přítomnou ve vzorku, přičemž pro pufrování je výhodně použit fosfátový pufr, 1x PBS nebo pufry obsahující Tris nebo HEPES. V případě stanovení DNA ve vzorcích obsahujících buňky je výhodně fluorescenční látka rozpuštěna v kultivačním médiu.

(ii) Vzorky se promyjí promývacím vodným roztokem, výhodně roztokem pufru, jehož pH je rovněž výhodně 6 až 8, promývací roztok dále s výhodou obsahuje alespoň jeden detergent. Pufrem je výhodně fosfátový pufr nebo 1x PBS.

(iii) Fluorescenční látky navázané na DNA ve vzorku se z DNA vymyjí vymývacím vodným s výhodou pufrovaným roztokem alespoň jedné látky vybrané ze skupiny SDS, LiDS a sarkosyl. Pufr výhodně obsahuje Tris.

(iv) Stanoví se množství DNA ve vymývacím roztoku z předchozího kroku měřením fluorescenčního signálu fluorescenční látky použitého v kroku (i).

V dalším výhodném provedení promývací roztok obsahuje alespoň jeden detergent, který je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující Tween 20, Tween 80, Triton X-100, saponiny, Nonidet P-40, SDS, LiDS, sarkosyl, přičemž koncentrace detergentu v promývacím roztoku je výhodně v rozmezí od 0,01 % (hmotnost/obj.) do 5 % (hmotnost/obj.) a v případě použití SDS a/nebo LiDS a/nebo sarkosylu jako detergentu je jejich koncentrace maximálně 0,05 % (hmotnost/obj.) a zároveň jsou použité koncentrace těchto látek v promývacím roztoku výhodně nejméně 10x nižší než jsou koncentrace použité ve vymývacím roztoku.

V jiném výhodném provedení se před inkubací s DAPI nebo Hoechst a/nebo kdykoli před inkubací ve vymývacím roztoku provede inkubace vzorku s RNázou, s výhodou s RNázou A.

V dalším výhodném provedení jsou vzorkem buňky nebo tkáně nebo ukotvená DNA, přičemž v případě, že vzorkem jsou buňky nebo tkáně, je vzorek s výhodou fixován.

V jiném výhodném provedení se provádí inkubace vzorku s DAPI a/nebo Hoechst při teplotě 0 °C až 45 °C po dobu delší než 2 minuty.

V dalším výhodném provedení se provádí promytí vzorku promývacím vodným roztokem výhodně při teplotě 0 °C až 45 °C po dobu delší než 10 minut, přičemž v průběhu této doby se promývací roztok alespoň 2x vymění za nový, výhodněji se tento krok provádí po dobu 15 až 60 minut a vymývací roztok se alespoň 3x vymění za nový.

V dalším výhodném provedení se vymytí fluorescenční látky z DNA provádí výhodně při teplotě 0 °C až 45 °C po dobu delší než 2 minuty.

V jiném výhodném provedení se v případě, že vzorkem jsou buňky nebo tkáně, kdykoliv před vymytím DAPI a/nebo Hoechst vymývacím roztokem, výhodněji před inkubací s DAPI a/nebo Hoechst provede inkubace vzorku ve vodném roztoku obsahujícím ionty jednomocné mědi, přičemž roztok jednomocné mědi se výhodně připraví smícháním vodného roztoku síranu měďnatého a vodného roztoku hydrochinonu.

V dalším výhodném provedení se v případě, že vzorkem jsou buňky nebo tkáně, mezi promytím vzorku v promývacím roztoku a vymytím DAPI a/nebo Hoechst z DNA nebo současně

s vymytím DAPI a/nebo Hoechst z DNA ve vymývacím roztoku vzorek inkubuje s proteinázou K.

V dalším výhodném provedení je korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst u buněk pěstovaných v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12- nebo 24- nebo 96-jamkových destiček nebo na sklech provedena změřením signálu z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování, je výhodně stanoven průměrný signál ~~v jamkách~~ z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a dále je pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál je následně odečten od jednotlivých signálů vzorků s buňkami. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů vypočtené pro jednotlivé vzorky pak odrážejí poměrné hodnoty množství buněk v jednotlivých vzorcích. V případě, že je nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, je současně u některých vzorků stanoveno množství buněk výhodně pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně je vypočítán průměrný signál DAPI a/nebo Hoechst v jedné buňce. Tímto signálem jsou pak děleny korigované signály DAPI a/nebo Hoechst poskytované jednotlivými vzorky a stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně jsou použity vzorky buněk obsahující známá množství buněk, např. seriálně ředěné vzorky buněk, které jsou zpracovány podle popsaného přístupu, pak je vypočítána kalibrační křivka a následně je s její pomocí určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích.

V dalším výhodném provedení je stanoveno množství do DNA inkorporovaného EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU a/nebo proteinů a/nebo RNA v buňkách a tkáních pomocí detekčních přístupů založených na specifické přímé nebo nepřímé vazbě fluorescenčních sond s výše vyjmenovanými látkami a změřený signál poskytovaný fluorescenčními sondami je vztažen na signál odrážející počet buněk změřený pomocí popsaného přístupu stanovení množství buněk. V těchto případech se v průběhu těchto detekčních přístupů nebo po jejich skončení provede inkubace s DAPI a/nebo Hoechst, promytí vzorku v promývacím roztoku, dále se provede vymytí DAPI a/nebo Hoechst pomocí vymývacího roztoku, změří se fluorescenční signál poskytovaný fluorescenčními sondami, které se v průběhu detekce navázaly na inkorporované EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU a/nebo proteiny a/nebo RNA, a signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst. Dále se signál poskytovaný navázanými fluorescenčními sondami vydělí signálem poskytnutým DAPI a/nebo Hoechst. Výhodně je

fluorescenční signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst snížen o signál z kontrolních vzorků neobsahujících buňky nebo tkáně, přičemž se výhodně před inkubací ve vymývacím roztoku nebo v průběhu inkubace provede inkubace s proteinázou K, a přičemž před inkubací s DAPI a/nebo Hoechst se výhodně provede inkubace vzorku v roztoku jednomocné mědi.

V dalším výhodném provedení je v případě stanovení množství EdU inkorporovaného do DNA a odvozené replikační aktivity pomocí azidovaných fluorochromů reagujících s EdU, kde fluorochromem může být např. FAM nebo FITC nebo Alexa Fluor 488 nebo kumarin 343 nebo Cy3 nebo Cy3.5 nebo Cy5 nebo Cy5.5 nebo Cy7 nebo Cy7.5 nebo PEP nebo ROX nebo TAMRA nebo Alexa Fluor 555 nebo Alexa Fluor 594 nebo Alexa Fluor 647 nebo Oregon Green, signál poskytovaný azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení několika opakování, je v některých provedeních stanoven průměrný signál poskytovaný azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU a průměrný korigovaný signál poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk u těchto vzorků a teprve následně je vydělen průměrný signál poskytovaný azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU průměrným korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrným počtem buněk. Vypočtená hodnota pak je použita pro porovnání obsahu EdU a vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy se použité azidované fluorochromy reagující s EdU neváží silně na buněčné struktury a/nebo na Petriho misky, nebo kultivační láhve nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla a/nebo je lze lehce odstranit promytím.

V provedeních, kdy je nutné provést korekci na pozadí v případě stanovení množství EdU v buněčné DNA a odvozené replikační aktivity, je možné postupovat např. těmito dvěma způsoby:

a) nejprve je změřen signál poskytovaný azidovaným fluorochromem u vzorků s buňkami, které byly kultivovány s EdU a současně u vzorků buněk, které nebyly kultivovány s EdU. Následně je signál u vzorků kultivovaných bez EdU i vzorků kultivovaných s EdU vydělen hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy je provedeno několik opakování vzorků buněk kultivovaných s nebo bez EdU, je výhodně nejprve vypočten průměrný signál azidovaného fluorochromu reagujícího s EdU a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten je použit při těchto i následných výpočtech.

Zvláště výhodný je tento postup v případě buněk, které byly pěstovány bez EdU. Následně je signál poskytovaný azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami kultivovanými bez EdU jsou odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami kultivovanými s EdU. Vypočtené hodnoty jsou, pokud to je nutné a nevyplynou přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty jsou použity pro porovnání obsahu EdU a vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby azidovaného fluorochromu na buněčné složky a jen malá část pozadí je způsobena její vazbou na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

b) Ve druhém případě je nejprve změřen signál poskytovaný azidovaným fluorochromem u vzorků s buňkami, které jsou kultivovány s EdU a současně u vzorků buněk, které nejsou kultivovány s EdU. Mimoto je změřen signál ve vzorcích bez buněk. Signál ve vzorcích bez buněk je následně odečten od signálu poskytovaných azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU ve vzorcích s buňkami. V případě, že vzorky bez buněk byly zpracovány v několika opakováních, je pro výpočty výhodně použit průměr naměřených hodnot signálů. Následně jsou vypočtené hodnoty signálů u vzorků kultivovaných bez EdU i vzorků kultivovaných s EdU vyděleny hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy je provedeno několik opakování vzorků buněk kultivovaných s nebo bez EdU, je výhodně nejprve vypočten průměrný signál azidovaného fluorochromu reagujícího s EdU a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten je použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný je tento postup v případě buněk, které jsou kultivovány bez EdU. Následně je signál poskytovaný azidovaným fluorochromem reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami kultivovanými bez EdU jsou odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami kultivovanými s EdU. Vypočtené hodnoty jsou, pokud to je nutné a nevyplývají přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty jsou použity pro porovnání obsahu EdU a vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy významná část pozadí je odvozena od silné vazby azidovaného fluorochromu na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

V jiném provedení je stanoveno množství proteinu v buňkách pomocí primární protilátky, která reaguje s tímto proteinem a sekundární protilátky reagující s primární protilátkou, přičemž sekundární protilátka je konjugována s fluorochromem např. FAM nebo FITC nebo Alexa Fluor 488 nebo Cy3 nebo Cy3.5 nebo Cy5 nebo Cy5.5 nebo Cy7 nebo Cy7.5 nebo TAMRA nebo Texas Red nebo Alexa Fluor 555 nebo Alexa Fluor 594 nebo Alexa Fluor 647 nebo DyLight 488 nebo DyLight 649, vydělením signálu poskytovaném protilátkou konjugovanou s fluorochromem korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení několika opakování, je v některých provedeních stanoven průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem a průměrný korigovaný signál poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk u těchto vzorků a teprve následně je vydělen průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem průměrným korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrným počtem buněk. Vypočtená hodnota je pak použita pro porovnání vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy se použité protilátky a/nebo protilátky konjugované s fluorochromem neváží silně na buněčné struktury a/nebo na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla a/nebo je lze lehce odstranit promytím.

V provedeních, kdy je stanoveno množství proteinu v buňkách pomocí primární protilátky, která reaguje s tímto proteinem a sekundární protilátky reagující s primární protilátkou, přičemž sekundární protilátka je konjugována s fluorochromem a je nutné provést korekci na pozadí, je možné postupovat např. těmito dvěma způsoby:

a) Nejprve je změřen signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem u vzorků s buňkami, které byly inkubovány jak s primární, tak sekundární protilátkou a u vzorků s buňkami, kde byla inkubace s primární protilátkou vynechána. Následně je signál u vzorků s buňkami inkubovanými jak s primární, tak sekundární protilátkou a u vzorků s buňkami, kde byla inkubace s primární protilátkou vynechána vydělen hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy bylo provedeno několik opakování vzorků s buňkami inkubovaných nebo neinkubovaných s primární protilátkou, je výhodně nejprve vypočten průměrný signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten je použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný je tento postup

v případě buněk, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Následně je signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou, jsou odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami inkubovanými s primární protilátkou. Vypočtené hodnoty jsou, pokud to je nutné a nevyplývá to přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty jsou použity pro porovnání vzájemného obsahu detekovaného proteinu v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby protilátek na buněčné složky a jen malá část pozadí je způsobena vazbou na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

b) Ve druhém případě je nejprve změřen signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem u vzorků s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou, a současně u vzorků s buňkami, které byly inkubovány s primární protilátkou. Dále je změřen signál ve vzorcích bez buněk. Signál ve vzorcích bez buněk je následně odečten od signálu poskytovaného sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem ve vzorcích s buňkami. V případě, že vzorky bez buněk byly zpracovány v několika opakováních, je pro výpočty výhodně použit průměr naměřených hodnot signálů. Následně jsou vypočtené hodnoty signálů u vzorků s buňkami neinkubovanými s primární protilátku i vzorků s buňkami inkubovanými s primární protilátkou vyděleny hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy je provedeno několik opakování vzorků s buňkami inkubovanými a neinkubovanými s primární protilátkou, je výhodně nejprve vypočten průměrný signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten je použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný je tento postup v případě vzorků s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Následně je signál poskytovaný sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami bez primární protilátky jsou odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami inkubovanými s primární protilátkou. Vypočtené hodnoty jsou, pokud to je nutné a nevyplývají přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty jsou použity pro porovnání obsahu proteinů v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především

v případě, kdy významná část pozadí je odvozena od silné vazby na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

V jiném provedení se stanoví množství inkorporovaného EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU a následně odvozené replikační aktivity v buňkách a tkáních pomocí fluorescenčních látek Hoechst 33258 a/nebo Hoechst 33342 a/nebo Hoechst 34580 a změřený signál poskytovaný fluorescenčními látkami je vztažen na signál odrážející počet buněk změřený pomocí popsaného přístupu stanovení množství buněk. V těchto případech se v průběhu stanovení množství inkorporovaného EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU a následně odvozené replikační aktivity v buňkách a tkáních vzorek buněk nebo tkání s inkorporovaným EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU inkubuje s Hoechst, následně se vzorky promyjí promývacím roztokem, dále se provede inkubace s proteinázou K, po inkubaci s proteinázou K je změřen fluorescenční signál poskytnutý Hoechst, následně se provede inkubace ve vymývacím roztoku a znovu se změří signál poskytnutý Hoechst, dále se stanoví množství do DNA inkorporovaného EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU tak, že se první změřený fluorescenční signál sníží o signál změřený v kontrolních vzorcích bez buněk nebo tkání a pak se vydělí druhým změřeným signálem sníženým o signál změřený v kontrolních vzorcích bez buněk nebo tkání.

Korekce na pozadí je u stanovení replikační aktivity pomocí EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU v některých provedeních výhodně provedena po změření signálu pocházejícího z Petriho misek, nebo kultivačních lahví, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování, je výhodně stanoven průměrný signál pocházejících z Petriho misek, nebo kultivačních lahví, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a je pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál je následně odečten od jednotlivých signálů vzorků s buňkami, a tak jsou získány korigované hodnoty. Poměrné korigované hodnoty z měření po působení proteinázy K jsou nepřímo úměrné obsahu EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU a replikační aktivitě a přímo úměrné počtu buněk. Poměrné korigované hodnoty Hoechst signálů po přidání vymývacího roztoku jsou přímo úměrné množství buněk v jednotlivých vzorcích. V případě, že je nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, je současně u některých vzorků stanoveno množství buněk například pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně vypočítán průměrný Hoechst signál v jedné buňce. Tímto signálem jsou pak děleny korigované Hoechst signály po přidání roztoku vymývací látky poskytované jednotlivými vzorky a

stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně jsou použity vzorky buněk obsahující známá množství buněk, např. seriálně ředěné vzorky buněk, které jsou zpracovány podle zde popsaného protokolu, následně je vypočítána kalibrační křivka a pak je určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Pokud jsou vzorky zhotoveny v několika opakováních, jsou výhodně vypočteny průměry z těchto opakování a použity v dalším výpočtu. Dále je vydělen korigovaný signál naměřený po inkubaci vzorků s proteinázou K korigovaným signálem naměřeným po inkubaci vzorků ve vymývacím roztoku nebo vypočteným počtem buněk. Získané hodnoty pak jsou nepřímo úměrné obsahu EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU a rovněž nepřímo úměrné replikační aktivitě.

Předmětem vynálezu je rovněž sada pro stanovení množství DNA ve vzorku obsahujícím buňky, která obsahuje alespoň jednu fluorescenční látku vybranou ze skupiny sestávající z DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580; alespoň jeden detergent, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující Triton X-100, saponiny, Nonidet P-40, Tween 80 a Tween 20 nebo jejich vodné roztoky; a alespoň jeden vymývací roztok nebo látku pro přípravu vymývacího roztoku, přičemž vymývací roztok je vybraný ze skupiny obsahující vodný roztok SDS, LiDS a/nebo sarkosyl nebo jejich kombinaci, přičemž látkou pro přípravu vymývacího roztoku je SDS, LiDS a/nebo sarkosyl. Dále tato sada výhodně obsahuje látku pro fixaci vzorku, s výhodou etanol nebo metanolem stabilizovaný roztok formaldehydu; a/nebo proteinázu, s výhodou proteinázu K; a/nebo RNázu, s výhodou RNázu A; a/nebo síran měďnatý a hydrochinon.

Předmětem vynálezu je rovněž sada pro stanovení EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU inkorporovaných do DNA a/nebo pro stanovení odvozené replikační aktivity ve vzorku obsahujícím buňky, která obsahuje alespoň jednu fluorescenční látku vybranou ze skupiny sestávající z Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580; alespoň jednu látku vybranou ze skupiny sestávající z EdU, BrdU, CldU a IdU; alespoň jeden detergent, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující Triton X-100, saponiny, Nonidet P-40, Tween 80 a Tween 20 nebo jejich vodné roztoky; a alespoň jeden vymývací roztok nebo látku pro přípravu vymývacího roztoku, přičemž vymývací roztok je vybraný ze skupiny obsahující vodný roztok SDS, LiDS, sarkosyl nebo jejich kombinaci, přičemž látkou pro přípravu vymývacího roztoku je SDS, LiDS, sarkosyl; proteinázu, s výhodou proteinázu K; dále výhodně obsahuje látku pro fixaci vzorku, s výhodou etanol nebo metanolem stabilizovaný roztok formaldehydu; a dále s výhodou obsahuje síran měďnatý a hydrochinon.

Předmětem vynálezu je rovněž použití způsobu stanovení množství DNA ve vzorku pro stanovení množství buněk a/nebo množství EdU a/nebo BrdU a/nebo IdU a/nebo CldU inkorporovaných do DNA a/nebo pro stanovení odvozené replikační aktivity a/nebo pro stanovení množství RNA a/nebo pro stanovení množství proteinů.

Objasnění ~~Přehled obrázků na~~ výkresů~~ech~~

Obr~~ázek~~ 1 Vzorce DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580.

Obr~~ázek~~ 2 Vzorce Tween 20 a Tween 80,

Obr~~ázek~~ 3 Vzorce Triton X-100 a Nonidet P-40

Obr~~ázek~~ 4 Analýza signálu DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 v různých koncentracích SDS. Signál je normalizován pro hodnotu signálu při použití 10 % (hmotnost/obj.) SDS = 100 %.

Obr~~ázek~~ 5 Analýza signálu DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 v různých koncentracích sarkosylu. Signál je normalizován pro hodnotu signálu při použití 10 % (hmotnost/obj.) sarkosylu = 100 %.

Obr~~ázek~~ 6 Poměr signálu DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 v různých koncentracích SDS a sarkosylu.

Obr~~ázek~~ 7 Poměr signálu DAPI a Hoechst 33342 v buňkách inkubovaných v médiu s EdU nebo bez EdU po reakci s azidovanými fluorochromy. Po přidání vymývacích látek se tento poměr ve všech případech blížil signifikantně k hodnotě 1.

Obr~~ázek~~ 8 Zjednodušené schéma postupu stanovení množství DNA ve vzorcích. DAPI a/nebo Hoechst jsou označeny jako barvící látky. Kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně za sebou.

Obr~~ázek~~ 9 Zjednodušené schéma postupu pro stanovení množství buněk v nefixovaných vzorcích inkubovaných v roztoku jednomocné mědi. Do postupu mohou být vřazeny další kroky, výhodně např. permeabilizace pomocí detergentů nebo inkubace s proteinázou K. DAPI a/nebo Hoechst jsou označeny jako barvící látky. Kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně za sebou. V kroku označeném jako promytí, je výhodné použít vodné, výhodně pufrované roztoky, např. fosfátem pufrovaný roztok nebo 1x PBS.

Obr~~ázek~~ 10 Zjednodušené schéma postupu pro stanovení množství buněk ve fixovaných vzorcích. Do postupu je možné vřadit další kroky, výhodně např. permeabilizaci pomocí detergentů inkubaci s proteinázou K nebo inkubaci v roztoku jednomocné mědi. DAPI a/nebo

Hoechst jsou označeny jako barvící látky. Kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně za sebou. V kroku označeném jako promytí, je výhodné použít vodné, výhodně pufrované roztoky, např. fosfátem pufrovaný roztok nebo 1x PBS.

Obr~~ázek~~ 11 Zjednodušené schéma postupu pro stanovení množství buněk ve fixovaných vzorcích inkubovaných v roztoku jednomocné mědi. Do postupu je možné vřadit další kroky, např. permeabilizaci pomocí detergentů nebo inkubaci s proteinázou K. DAPI a/nebo Hoechst jsou označeny jako barvící látky. Kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně za sebou. V kroku označeném jako promytí, je výhodné použít vodné, výhodně pufrované roztoky, např. fosfátem pufrovaný roztok nebo 1x PBS.

Obr~~ázek~~ 12 Zjednodušené schéma postupu pro stanovení množství buněk společně se stanovením EdU ve vzorcích. Do protokolu je možné vřadit další kroky, např. permeabilizaci pomocí detergentů. DAPI a/nebo Hoechst jsou označeny jako barvící látky. Kroky mohou, ale nemusejí, následovat těsně za sebou. V kroku označeném jako promytí, je výhodné použít vodné, výhodně pufrované roztoky, např. fosfátem pufrovaný roztok nebo 1x PBS.

Seznam použitých zkratek

HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
HeLa S3	buněčná linie lidských epiteliálních buněk rostoucí v suspenzi
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
S-MEM	modifikace Eaglova minimálního média pro suspenzní buňky
PBS	fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
EdU	5-etynyl-2′-deoxyuridin
BrdU	5-bromo-2′-deoxyuridin
IdU	5-jodo-2′-deoxyuridin
CldU	5-chloro-2′-deoxyuridin

Příklady ~~provedení~~ uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Stanovení množství DNA v mikrotitračních destičkách.

Následující postup popisuje stanovení množství DNA vázané na povrchu jamek mikrotitračních destiček. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v jamkách mikrotitračních destiček bez navázané DNA.

A) Z jamek mikrotitračních destiček s navázanou DNA nebo bez navázané DNA byl odstraněn pufr a byl nahrazen roztokem DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 nebo roztokem obsahujícím jejich kombinace (alternativně byly použity koncentrace fluorescenčních látek 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo vodě nebo ve 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl nebo etanolu nebo metanolu nebo DMSO nebo alternativně v 50 % nebo 70 % roztoku (obj./obj.) etanolu nebo metanolu ve vodě (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky). Vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut.

B) Roztok fluorescenční látky byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem: 1x PBS (složení viz část Použité roztoky a chemikálie) bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj., přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky). Vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl bez nebo s přídavkem Tween 20 nebo roztok vody bez nebo s přídavkem Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně v koncentraci 0,1 nebo 0,2 % (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl, všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

C) Promývací roztok by odstraněn a nahrazen alternativně 0,1 %; 0,2 %; 1 %; 2 %; 5 %; 10 % nebo 20 % roztokem vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl (hmotnost/obj.), byly přidány přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

D) Měření proběhlo přímo v mikrotitrační destičce nebo bylo 20 až 200 µl roztoku odebráno a přeneseno do jamky černé mikrotitrační destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky

destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 ÷ 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 ÷ 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 ÷ 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst byla provedena po změření signálu pocházejícího z jamek mikrotitračních destiček bez navázané DNA. V případě provedení několika opakování, byl výhodně stanoven průměrný signál v jamkách bez navázané DNA a bylo pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých signálů z jamek s navázanou DNA. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů z jednotlivých jamek pak odrážely poměrné hodnoty množství DNA v těchto jamkách.

Příklad 2

Stanovení množství DNA navázané na povrchu magnetických částic.

Následující postup popisuje stanovení množství DNA navázané na povrchu magnetických částic. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden s magnetickýma částicemi bez navázané DNA.

A) Magnetické částice s navázanou DNA nebo bez navázané DNA ve zkumavkách o objemu 1,5 ml byly přeneseny na magnetický separátor a byly zde ponechány 2 minuty, aby došlo k separaci magnetických částic s navázanou DNA nebo bez navázané DNA (dále jen magnetické částice) z pufru. Pufr byl pomocí pipety odstraněn, zkumavky byly přeneseny na běžný, nemagnetický stojan a k magnetickým částicím bylo přidáno 0,5 ml roztoku DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo ve vodě nebo ve 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl nebo etanolu nebo metanolu nebo DMSO nebo alternativně v 50 % nebo 70 % roztoku (obj./obj.) etanolu nebo metanolu ve vodě a vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut na třepačce při 300 rpm.

B) Zkumavky s magnetickými částicemi byly po inkubaci přeneseny na magnetický separátor a byly zde ponechány 2 minuty, aby došlo k separaci magnetických částic z roztoku.

Roztok fluorescenčních látek byl pomocí pipety odstraněn, zkumavky byly přeneseny na běžný, nemagnetický stojan a k magnetickým částicím byl přidán 1 ml promývacího roztoku: 1x PBS bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj.) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok vody bez nebo s přídavkem Tween 20 nebo roztok 25 mmol.l^{-1} Tris-HCl, pH 7,4 a 150 mmol.l^{-1} NaCl bez nebo s přídavkem Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (0,1 nebo 0,2 %, (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl, všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

C) Zkumavky s magnetickými částicemi byly po inkubaci přeneseny na magnetický separátor a byly zde ponechány 2 minuty, aby došlo k separaci magnetických částic z roztoku. Promývací roztok by odstraněn, zkumavky byly přeneseny na běžný, nemagnetický stojan a k magnetickým částicím bylo přidáno 0,3 ml alternativně 0,1%; 0,2%; 1%; 2%; 5%; 10% nebo 20% roztoku vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl (hmotnost/obj.)) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

D) Zkumavky s magnetickými částicemi byly po inkubaci přeneseny na magnetický separátor a byly zde ponechány 2 minuty, aby došlo k separaci magnetických částic z vymývacího roztoku. Bylo odebráno 200 µl vymývacího roztoku a přeneseno do jamek černé 96-jamkové mikrotitrační destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 - 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 - 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 - 396 u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 - 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 - 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí byla provedena změřením signálu ze vzorků bez navázané DNA tak jako v příkladu 1 bod D.

Příklad 3

Stanovení množství buněk ve tkáních.

Následující postup popisuje stanovení množství buněk ve tkáních. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v zkumavce bez tkání.

A) Vzorky tkáně byly přeneseny do zkumavky o objemu 2 ml a byly fixovány 30 minut v roztoku etanolu (bylo přidáno 1,5 ml roztoku etanolu), alternativně byl použit 70 % nebo 100 % (obj./obj.) roztok etanolu. Alternativně byla fixace provedena na -20 °C po dobu 30 minut nebo 24 hodin nebo několika týdnů. V některých provedeních fixační roztok obsahoval DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$). V provedeních, kdy roztok obsahoval DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580, následoval krok D.

B) Fixační roztok byl pomocí pipety odstraněn a byl nahrazen 1,5 ml roztoku 1x PBS. Roztok 1x PBS byl odstraněn a nahrazen 1,5 ml nového roztoku 1x PBS. Tento krok byl ještě jednou opakován.

C) 1x PBS bylo odstraněno a bylo přidáno 0,5 ml roztoku DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo ve vodě nebo ve 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl nebo etanolu nebo metanolu nebo DMSO nebo alternativně v 50 nebo 70 % roztoku (obj./obj.) etanolu nebo metanolu ve vodě. Vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut na třepačce při 300 rpm.

D) Roztok fluorescenční látky byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem: 1x PBS bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 a vzorky byly inkubovány 10 minut. Promývací roztok byl odstraněn a nahrazen novým a vzorky v něm byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě dvakrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok vody bez nebo s přídavkem Tween 20 nebo roztok 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl bez nebo s přídavkem Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto detergentu Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně v koncentracích 0,1 nebo 0,2 %, (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

E) Promývací roztok byl odstraněn a byl nahrazen 0,3 ml alternativně 0,1 %; 0,2 %; 1 %; 2 %; 5 %; 10 % nebo 20 % roztoku vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl

(hmotnost/obj.) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

F) Ze zkumavky bylo odebráno 200 µl roztoku a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 ÷ 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 ÷ 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 ÷ 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst byla provedena po změření signálu pocházejícího ze zkumavky bez vzorku tkáně. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých naměřených signálů vzorků s tkáněmi. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů pak odrážely poměrné hodnoty množství buněk v jednotlivých vzorcích.

Příklad 4

Stanovení množství přisedlých buněk po etanolové fixaci.

Následující postup popisuje stanovení množství přisedlých buněk po etanolové fixaci. Kultivace buněk byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na sklech bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1 % (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l $NaHCO_3$ v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.

B) Růstové médium bylo odstraněno a nahrazeno pufrem (1x PBS, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě jednou opakován.

C) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 30 minut fixovány alternativně 70 % nebo 100 % (obj./obj.) roztokem etanolu (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml fixačního roztoku na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Alternativně byla fixace provedena na -20 °C po dobu 30 minut nebo 24 hodin nebo několika týdnů. V některých provedeních fixační roztok obsahoval DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 nebo roztokem obsahujícím jejich kombinace (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$). V provedeních, kdy roztok obsahoval DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580, následoval krok H.

D) Fixační roztok byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

E) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem jednomocné mědi (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 20 minut.

F) Roztok jednomocné mědi byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

G) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 nebo roztokem obsahujícím jejich kombinace (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo vodě nebo 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl, pH 7,4, nebo etanolu nebo metanolu nebo DMSO nebo alternativně v 50 % nebo 70 % roztoku (obj./obj.) etanolu nebo metanolu ve vodě (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut.

H) Roztok byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem, který obsahoval 1x PBS bez nebo s alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj., přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

V některých provedeních byl namísto 1x PBS použit roztok vody bez nebo s Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS) nebo roztok 25 mmol.l^{-1} Tris-HCl, pH 7,4 a 150 mmol.l^{-1} NaCl bez nebo s Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně 0,1 % nebo 0,2 %, (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

I) Promývací roztok by odstraněn a nahrazen roztokem proteinázy K (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy) a vzorky byly inkubovány 30 nebo 60 minut na laboratorní třepačce při 300 rpm na 37 °C. Alternativně byly vzorky inkubovány při teplotě 56 °C.

J) K roztoku proteinázy K byl přidán alternativně 10 % nebo 20 % roztok vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl, (hmotnost/obj.)). Velikost přidaného objemu byla alternativně rovna jedné devítině, čtvrtině nebo celému objemu roztoku proteinázy K. Alternativně byla použita kombinace vymývacích látek. Vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

K) 20 až 200 µl roztoku bylo přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 ÷ 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 nm u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 ÷ 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 ÷ 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst byla provedena po změření signálu pocházejícího z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování, byl výhodně stanoven průměrný signál ~~v jamkách~~ pocházejících z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a bylo pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých signálů změřených u vzorků s buňkami. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů pak odrážely poměrné hodnoty množství buněk v jednotlivých jamkách. V případě, že bylo nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, bylo současně u některých vzorků stanoveno množství buněk pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně vypočítán průměrný DAPI a/nebo Hoechst signál v jedné buňce. Tímto

signálem pak byly děleny korigované DAPI a/nebo Hoechst signály poskytované jednotlivými vzorky a stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně byly použity vzorky buněk obsahující známá množství buněk, např. seriálně ředěné vzorky buněk, které byly zpracovány podle zde popsaného protokolu a byla vypočítána kalibrační křivka a následně bylo určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích.

V některých provedeních byl vynechán inkubační krok s roztokem jednomocné mědi a následný promývací krok.

V některých provedeních byly vymývací látky přidány do roztoku proteinázy K nebo byl krok s proteinázou K zcela vynechán a namísto kroku s proteinázou K a následným přidáním vymývacích látek byl použit krok, při kterém byla provedena inkubace v roztoku vymývacích látek (SDS, nebo LiDS nebo sarkosyl) bez přítomnosti proteinázy K. Koncentrace vymývacích látek v tomto kroku byla alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 10 % nebo 20 % (hmotnost/obj.) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 5, 10, 30 nebo 60 minut. V některých provedeních bylo odebráno 20 až 200 µl roztoku těsně po inkubaci s proteinázou K a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky a až následně byl přidán roztok vymývacích látek.

Příklad 5

Stanovení množství buněk rostoucích v suspenzi po etanolové fixaci.

Následující postup popisuje stanovení množství buněk rostoucích v suspenzi po etanolové fixaci. Kultivace byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách bez buněk.

A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly kultivovány v růstovém médiu S-MEM (Sigma) s 3 % (hmotnost/obj.) L-glutaminem, 5 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories) a 50 µg/ml gentamicinem v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10^5 buněk na 1 mililitr.

B) Druhý den po pasáži byla suspenze buněk přenesena do 15 mililitrové centrifugační zkumavky (v případě kultivace v Petriho miskách nebo kultivačních lahvích) a vzorky byly odstřeďovány 10 minut při 300g. V případě kultivace buněk v kultivačních destičkách byly vzorky přímo odstřeďovány 10 minut při 300g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl média, z kultivační destičky bylo odstraněno veškeré médium) a ke vzorkům byl přidán roztok 1x PBS (10 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky). Vzorky byly rozsuspendovány a následně opět odstřeďovány 10 minut při 300g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl pufru, z kultivační destičky byl odstraněn veškerý pufr).

C) Další postup byl stejný jako v příkladu 4 body C až K s tím, že při odstraňování veškerých roztoků, přidávání nových a při promývání byly buňky odstřeďovány 10 minut při 300g, následně byl odstraněn supernatant (ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl roztoku, z kultivační destičky byl odstraněn veškerý roztok), k buňkám byl přidán nový roztok dle rozpisu v Příkladu 4 (2 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky), buňky v něm byly rozsuspendovány a inkubovány po doby uvedené v jednotlivých bodech Příkladu 4.

Příklad 6

Stanovení množství přisedlých buněk po fixaci formaldehydem.

Následující postup popisuje stanovení množství přisedlých buněk po fixaci formaldehydem. Kultivace byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na sklech bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

Postup byl stejný jako v příkladu 4 s následujícími změnami:

Namísto inkubace v etanolu byly vzorky inkubovány10 minut v 2% (hmotnost/obj.) roztoku formaldehydu v 1x PBS (pH 7,4; přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy,

množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a následně byly promyty v 1x PBS (3x; přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby). V následujícím kroku byly vzorky 10 minut inkubovány s 0,1% Tritonem X-100 v 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a následně byly promyty v 1x PBS (3x; přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, množství se odvíjelo od kapacity nádoby).

V některých provedeních nebyl inkubační krok s Tritonem X-100 proveden.

Příklad 7

Stanovení množství buněk rostoucích v suspenzi po fixaci formaldehydem.

Následující postup popisuje stanovení množství buněk rostoucích v suspenzi po fixaci formaldehydem. Kultivace byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách bez buněk.

Postup byl stejný jako v příkladu 5 s následujícími změnami:

Namísto inkubace v etanolu byly vzorky inkubovány 10 minut v 2% (hmotnost/obj.) roztoku formaldehydu v 1x PBS (pH 7,4; 10 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky v kultivační destičce) a následně byly promyty v 1x PBS (3x, 10 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky v kultivační destičce). V následujícím kroku byly vzorky 10 minut inkubovány s 0,1% Tritonem X-100 v 1x PBS (10 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky v kultivační destičce) a následně byly promyty v 1x, PBS (3x, 10 ml/zkumavka, 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity jamky v kultivační destičce).

V některých provedeních nebyl inkubační krok s Tritonem X-100 proveden.

Příklad 8

Stanovení množství buněk po fixaci metanolem.

Následující postup popisuje stanovení množství buněk po metanolové fixaci. Kultivace byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách a v případě přisedlých buněk i na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na sklech bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

Postup byl stejný jako v příkladech 4 a 5 s těmito změnami:

Namísto fixace etanolem byl použit metanol.

Příklad 9

Stanovení množství nefixovaných buněk inkubovaných s roztokem jednomocné mědi.

Následující postup popisuje stanovení množství nefixovaných buněk inkubovaných s roztokem jednomocné mědi. Kultivace byla provedena v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách a v případě přisedlých buněk i na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách nebo na sklech bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

Postup byl stejný jako v příkladu 4 nebo v příkladu 5 s těmito změnami:

Byla vynechána fixace pomocí etanolu a rovněž následné promytí vzorků v 1x PBS.

Příklad 10

Stanovení množství nefixovaných přisedlých buněk.

Následující postup popisuje stanovení množství nefixovaných přisedlých buněk. Buňky byly kultivovány v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách nebo na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo se skly bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1 % (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l $NaHCO_3$ v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.

B) Růstové médium bylo odstraněno a nahrazeno roztokem Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 v 1x PBS (alternativně byly použity koncentrace Hoechst 0,1; 0,5; 1, 2 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$, byly přidány přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy) a vzorky byly inkubovány alternativně 5 nebo 10 nebo 30 minut.

C) Roztok Hoechst byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy) a vzorky byly inkubovány 5 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován.

D) Promývací roztok by odstraněn a nahrazen alternativně 0,1 %, 0,2 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 % nebo 20 % roztokem vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl (hmotnost/obj.), byly přidány přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

E) 200 µl roztoku bylo odebráno a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 ÷ 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 nm u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 ÷ 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 ÷ 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí byla provedena změřením signálu z nádob bez buněk a byla provedena jako v příkladu 4.

Příklad 11

Stanovení množství nefixovaných buněk rostoucích v suspenzi.

Následující postup popisuje stanovení množství nefixovaný/buněk rostoucích v suspenzi v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách.

A) Lidské HeLa S3 buňky (dále jen vzorky) byly kultivovány v růstovém médiu S-MEM (Sigma) s 3 % (hmotnost/obj.) L-glutaminem, 5 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories) a 50 µg/ml gentamicinem v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10^5 buněk na 1 mililitr.

B) Druhý den po pasáži byla suspenze buněk přenesena do 15 mililitrové centrifugační zkumavky (v případě kultivace v Petriho miskách nebo kultivačních lahvích) a vzorky byly odstřeďovány 10 minut při 300g. V případě kultivace buněk v kultivačních destičkách byly vzorky přímo odstřeďovány 10 minut při 300g. Supernatant byl odstraněn (ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl média, z kultivační destičky bylo odstraněno veškeré médium).

Další postup byl stejný jako v příkladu 10 s tím, že při odstraňování veškerých roztoků, přidávání nových a při promývání byly buňky odstřeďovány 10 minut při 300g, následně byl odstraněn supernatant (ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl roztoku, z kultivační destičky byl odstraněn veškerý roztok), k buňkám byl přidán nový roztok dle rozpisu v příkladu 10 (2 ml/zkumavka, 0,2 – 0,4 ml roztoku v závislosti na kapacitě jamky v kultivační destičce), buňky v něm byly rozsuspendovány a inkubovány po doby uvedené v jednotlivých bodech příkladu 10.

Příklad 12

Stanovení relativní replikační aktivity a replikační aktivity vztažené na buňku.

Následující postup popisuje stanovení relativní replikační aktivity a replikační aktivity vztažené na buňku pomocí EdU v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech o průměru 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí způsobeného vazbou DAPI a/nebo Hoechst a/nebo azidovaných fluorochromů na kultivační a inkubační povrchy byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo se skly bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1 % (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l $NaHCO_3$ v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.

B) Druhý den byl do média přidán 10 $\mu mol.l^{-1}$ EdU a buňky byly inkubovány 30 minut v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. V některých provedeních nebylo do některých vzorků přidáno EdU. V dalších provedeních bylo EdU přidáno i do vzorků, kde nebyly buňky.

C) Růstové médium bylo odstraněno a nahrazeno pufrem (1x PBS, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě jednou opakován.

D) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 30 minut fixovány alternativně 70 % nebo 100 % (hmotnost/obj.) roztokem etanolu v 1x PBS (pH 7,4; přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml fixačního roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Alternativně byla fixace provedena na -20° C po dobu 30 minut nebo 24 hodin nebo několika týdnů.

E) Fixační roztok byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

F) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem jednomocné mědi s 10 $\mu mol.l^{-1}$ azidovaným fluorochromem (5-FAM; složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně

0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby, příklady dalších azidovaných fluorochromů jsou uvedeny v podstatě vynálezu) a vzorky byly inkubovány 20 minut.

G) Roztok jednomocné mědi byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

H) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut.

I) Roztok byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem 1x PBS bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj., přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok vody bez nebo s Tween 20 nebo roztok 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl bez nebo s Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně v koncentraci 0,1 % nebo 0,2 % (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl, všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

J) Promývací roztok byl odstraněn a byl nahrazen roztokem proteinázy K (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 30 nebo 60 minut na laboratorní třepačce při 300 rpm na 37 °C. Alternativně byly vzorky inkubovány při teplotě 56 °C.

K) K roztoku proteinázy K byl alternativně přidán 10 % nebo 20 % vodný roztok vymývacích látek (SDS a/nebo LiDS a/nebo sarkosyl (hmotnost/obj.)), velikost přidaného objemu byla alternativně rovna jedné devítině, čtvrtině nebo celému objemu roztoku proteinázy

K): Vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

L) 120 µl roztoku bylo odebráno a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 až 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 až 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 až 396 nm u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 až 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 až 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst byla provedena po změření signálu pocházejícího z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování, byl výhodně stanoven průměrný signál ~~v jamkách~~ pocházejících z Petriho misek, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a bylo pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých signálů naměřených ve vzorcích s buňkami. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů pak odrážely poměrné hodnoty množství buněk v jednotlivých jamkách. V případě, že bylo nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, bylo současně u některých vzorků stanoveno množství buněk pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně vypočítán průměrný DAPI a/nebo Hoechst signál v jedné buňce. Tímto signálem pak byly děleny korigované DAPI a/nebo Hoechst signály poskytované jednotlivými vzorky s buňkami a bylo stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně byly použity seriálně ředěné vzorky s buňkami, které byly zpracovány podle zde popsaného protokolu, byla vypočítána kalibrační křivka a následně bylo určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích.

Signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU byl rovněž změřen pomocí čtečky destiček, a to při excitační vlnové délce 490 až 498 nm a emisní vlnové délce 510 až 530 nm. Následně byla nebo nebyla provedena korekce na pozadí tohoto signálu. Stanovení replikační aktivity a korekce byly provedeny několika způsoby:

- V případě, že nebyla provedena korekce na pozadí u signálu poskytovaného azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU, byl signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení několika opakování, byl v některých provedeních stanoven průměrný signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU a průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI

a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk u těchto vzorků a teprve následně byl průměrný signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU vydělen průměrným korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrným počtem buněk. Vypočtená hodnota pak byla použita pro porovnání vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy se použitý azidovaný fluorochrom reagující s EdU neváže silně na buněčné struktury, a/nebo na Petriho misky, nebo na kultivační láhve, nebo na 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo na skla, a/nebo jej lze lehce odstranit promytím.

- V případech, že bylo nutné provést korekci na pozadí, bylo postupováno dvěma různými způsoby.

V prvním případě byl nejprve změřen signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) u vzorků s buňkami, které byly kultivovány s EdU a současně u vzorků s buňkami, které nebyly kultivovány s EdU. Následně byl signál u vzorků s buňkami kultivovaných bez EdU i u vzorků s buňkami kultivovaných s EdU vydělen hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě, kdy bylo provedeno několik opakování vzorků s buňkami pěstovanými a nepěstovanými s EdU, byl výhodně nejprve vypočten průměrný signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten byl použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný byl tento postup v případě buněk, které byly pěstovány v médiu bez EdU. Následně byl signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami kultivovanými bez EdU byly odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami pěstovanými s EdU. Vypočtené hodnoty byly, pokud to bylo nutné a nevyplynuly přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty byly použity pro porovnání vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby azidovaných fluorochromů na buněčné složky a jen malá část pozadí je způsobena jejich vazbou na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

Ve druhém případě byl nejprve změřen signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU u vzorků s buňkami, které byly kultivovány s EdU a současně u vzorků s buňkami, které nebyly kultivovány s EdU. Mimoto byl změřen signál ve vzorcích bez buněk. Signál ve vzorcích bez buněk byl následně odečten od signálu poskytovaného azidovaným

fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU ve vzorcích s buňkami. V případě, že vzorky bez buněk byly zpracovány v několika opakováních, byl pro další výpočty výhodně použit průměr naměřených hodnot signálů. Následně byly vypočtené hodnoty signálů u vzorků s buňkami kultivovaných bez EdU i u vzorků s buňkami kultivovaných s EdU vyděleny hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy bylo provedeno několik opakování vzorků s buňkami pěstovaným a nepěstovaným s EdU, byl výhodně nejprve vypočten průměrný signál azidovaného fluorochromu (5-FAM) reagujícího s EdU a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten byl použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný byl tento postup v případě vzorků s buňkami, které byly pěstovány bez EdU. Následně byl signál poskytovaný azidovaným fluorochromem (5-FAM) reagujícím s EdU vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami kultivovanými bez EdU byly odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami pěstovanými s EdU. Vypočtené hodnoty byly, pokud to bylo nutné a nevyplynuly přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty byly použity pro porovnání vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby azidovaných fluorochromů na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

V některých provedeních byly vymývací látky přidány do roztoku proteinázy K. Koncentrace vymývacích látek v tomto kroku byla alternativně 0,2 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 10 % nebo 20 % (hmotnost/obj.) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut. V dalších provedeních bylo okamžitě po inkubaci s proteinázou K přeneseno 120 µl vzorků do jamek černé 96-jamkové destičky a teprve pak byl k jednotlivým vzorkům přidán roztok vymývacích látek. V některých provedeních byl namísto etanolu použit metanol nebo byla použita fixace formaldehydem a permeabilizace Tritonem X-100 podle příkladu 6.

Příklad 13

Stanovení obsahu EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA buněk a odvozené replikační aktivity těchto buněk.

Následující postup popisuje stanovení množství EdU a/nebo BrdU a/nebo CldU a/nebo IdU v DNA přisedlých buněk a odvozené replikační aktivity těchto buněk v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech s průměrem 12 mm. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí způsobeného vazbou Hoechst na kultivační a inkubační povrchy byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo se skly bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1 % (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l $NaHCO_3$ v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.

B) Druhý den byl do média přidán 10 $\mu mol.l^{-1}$ EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU a buňky byly inkubovány alternativně 8 nebo 20 hodin v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C. V některých provedeních nebylo do některých vzorků přidáno ani EdU ani IdU ani CldU ani BrdU. V dalších provedeních bylo EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU přidáno i do vzorků, kde nebyly buňky.

C) Růstové médium bylo odstraněno a nahrazeno pufrem (1x PBS, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě jednou opakován.

D) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 30 minut fixovány alternativně 70 % (obj./obj.) roztokem etanolu v 1x PBS, pH 7,4, nebo 100 % etanolem (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml fixačního roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Alternativně byla fixace provedena na -20° C po dobu 30 minut nebo 24 hodin nebo několika týdnů.

E) Fixační roztok byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

F) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem jednomocné mědi (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 20 minut.

G) Roztok jednomocné mědi byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

H) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$) v 1x PBS nebo 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly alternativně inkubovány 5, 10 nebo 30 minut.

I) Roztok byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem 1x PBS bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj., přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok vody bez nebo s Tween 20 nebo roztok 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl bez nebo s Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně 0,1 % nebo 0,2 %, (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

J) Promývací roztok by odstraněn a byl nahrazen roztokem proteinázy K (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 30 nebo 60 minut na laboratorní třepačce při 300 rpm na 37 °C. Alternativně byly vzorky inkubovány při teplotě 56 °C.

K) 120 µl roztoku bylo odebráno a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 nm u Hoechst 33258 a rovněž

výhodně při emisní vlnové délce 451 až 471 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 až 450 nm u Hoechst 34580.

L) K roztoku byl alternativně přidán 10 ~~%~~ nebo 20 % roztok vymývacích látek (SDS nebo LiDS nebo sarkosyl (hmotnost/obj.), velikost přidaného objemu byla alternativně rovna jedné devítině, čtvrtině nebo celému objemu roztoku proteinázy K~~)~~. Vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

M) Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 346 až 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 až 396 nm u Hoechst 33258 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 až 471 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 až 450 nm u Hoechst 34580.

Pro stanovení obsahu EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU a odvozené replikační aktivity byly použity hodnoty naměřené v kroku K a M. Korekce na pozadí u těchto hodnot byla provedena po změření signálu pocházejícího z Petriho misek, nebo kultivačních lahvíc~~h~~, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování, byl výhodně stanoven průměrný signál ~~v jamkách~~ pocházejíc~~ích~~ z Petriho misek, nebo kultivačních lahvíc~~h~~, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a bylo pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých signálu vzorků s buňkami a byly tak získány korigované hodnoty. Zatímco poměrné korigované hodnoty z kroku K byly nepřímo úměrné obsahu EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU a rovněž nepřímo úměrné replikační aktivitě, korigované hodnoty Hoechst signálů z kroku M byly přímo úměrné množství buněk v jednotlivých vzorcích. V případě, že bylo nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, bylo současně u některých vzorků stanoveno množství buněk pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně byl vypočítán průměrný Hoechst signál v jedné buňce. Tímto signálem pak byly děleny korigované Hoechst signály z kroku M poskytované jednotlivými vzorky a bylo stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně byly použity vzorky seriálně ředěných buněk, které byly zpracovány podle zde popsaného protokolu, byla vypočítána kalibrační křivka a následně bylo určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Pokud byly vzorky zhotoveny v několika opakováních, byly výhodně vypočteny průměry z těchto opakování a použity v dalším výpočtu.

Dále byl vydělen korigovaný signál z kroku K korigovaným signálem z kroku M nebo vypočteným počtem buněk. Získané hodnoty pak byly nepřímo úměrné obsahu EdU a/nebo IdU a/nebo CldU a/nebo BrdU a rovněž nepřímo úměrné replikační aktivitě.

V některých provedeních byl namísto etanolu použit metanol nebo byla použita fixace formaldehydem a permeabilizace Tritonem X-100 podle příkladu 6.

Příklad 14

Stanovení obsahu proteinů v buňkách pomocí protilátky reagující s tímto proteinem.

Následující postup popisuje stanovení obsahu proteinů v buňkách pěstovaných v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech s průměrem 12 mm pomocí protilátky reagující s tímto proteinem. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev. Pro stanovení pozadí způsobeného vazbou DAPI a/nebo Hoechst a/nebo protilátek reagujících s proteinem a/nebo protilátek konjugovaných s fluorochromy na kultivační a inkubační povrchy byl celý přístup současně proveden v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo se skly bez buněk. V případě skel byla skla po inkubaci v médiu umístěna do nádoby s celkovým objemem 2 ml.

A) Lidské HeLa buňky (dále jen vzorky) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM s L-glutaminem (Gibco) s 10 % (obj./obj.) fetálním telecím sérem (PAA Laboratories), 1 % (obj./obj.) gentamicinem a 0,85 g/l $NaHCO_3$ v atmosféře s 5 % (obj./obj.) CO_2 při 37 °C.

B) Růstové médium bylo odstraněno a nahrazeno pufrem (1x PBS, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě jednou opakován.

C) Pufr byl odstraněn a vzorky byly 30 minut fixovány alternativně 70 % (obj./obj.) roztokem etanolu v 1x PBS, pH 7,4 nebo 100 % etanolem (přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml fixačního roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Alternativně byla fixace provedena na -20 °C po dobu 30 minut nebo 24 hodin nebo několika týdnů.

D) Fixační roztok byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

E) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem jednomocné mědi (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 20 minut. V některých provedeních byl tento a následující krok vynechán.

F) Roztok jednomocné mědi byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

G) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem 1x PBS a primární protilátky reagující s detekovaným proteinem. Optimální koncentrace protilátky byly určena seriálním ředěním. Přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru s protilátkou na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby. V některých provedeních nebyla v roztoku 1x PBS obsažena protilátka.

H) Roztok 1x PBS a protilátky byl odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,4 ml pufru na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby). Tento krok byl ještě dvakrát opakován.

I) Pufr byl odstraněn a nahrazen roztokem sekundární protilátky konjugované s fluorochromem Alexa Fluor 488, přičemž tato protilátka reagovala s protilátkou z kroku G. Koncentrace sekundární protilátky byla 10 μg/ml. Sekundární protilátka byla ředěna v 1x PBS nebo 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl a roztok rovněž obsahoval DAPI a/nebo Hoechst 33342 a/nebo Hoechst 33258 a/nebo Hoechst 34580 (alternativně byly použity koncentrace 0,1; 0,5; 1; 5 nebo 10 $\mu mol.l^{-1}$). Ke vzorkům byly přidány přibližně 0,2 až 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby a vzorky byly alternativně inkubovány 10 nebo 30 nebo 60 minut.

J) Roztok sekundární protilátky byl odstraněn a nahrazen promývacím roztokem 1x PBS bez nebo s přídavkem alternativně 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 1 % nebo 10 % Tween 20 (obj./obj.,

přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Tento krok byl ještě třikrát opakován. Namísto 1x PBS byl v některých provedeních použit roztok vody bez nebo s Tween 20 nebo roztok 25 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,4, a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl bez nebo s Tween 20 (použité koncentrace byly stejné jako při použití 1x PBS). V dalších provedeních byl namísto Tween 20 použit Triton X-100 (alternativně 0,1 % nebo 0,2 %, (obj./obj.)) nebo SDS nebo LiDS nebo sarkosyl všechny alternativně v koncentracích 0,01 %; 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % nebo 0,05 % (hmotnost/obj.).

K) Promývací roztok by odstraněn a byl nahrazen roztokem proteinázy K (složení viz část Použité roztoky a chemikálie, přidány byly přibližně 0,2 ÷ 0,4 ml roztoku na 1 cm^2 plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity nádoby) a vzorky byly inkubovány 30 nebo 60 minut na laboratorní třepačce při 300 rpm na 37 °C. Alternativně byly vzorky inkubovány při teplotě 56 °C.

L) K roztoku proteinázy K byl alternativně přidán 10 % nebo 20 % vodný roztok vymývacích látek (SDS a/nebo LiDS a/nebo sarkosyl (hmotnost/obj.)), velikost přidaného objemu byla alternativně rovna jedné devítině, čtvrtině nebo celému objemu roztoku proteinázy K). Vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

M) 120 µl roztoku bylo odebráno a přeneseno do jamek černé 96-jamkové destičky. Signál byl změřen pomocí čtečky destiček, výhodně při excitační vlnové délce 354 ÷ 362 nm u DAPI, při excitační vlnové délce 346 ÷ 354 nm u Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a při excitační vlnové délce 388 ÷ 396 nm u Hoechst 34580 a rovněž výhodně při emisní vlnové délce 451 ÷ 471 nm pro DAPI, Hoechst 33342 a Hoechst 33258 a emisní vlnové délce 430 ÷ 450 nm u Hoechst 34580. Korekce na pozadí u signálu poskytovaném DAPI a/nebo Hoechst byla provedena po změření signálu pocházejícího z Petriho misek, nebo kultivačních lahviček, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk. V případě provedení několika opakování byl výhodně stanoven průměrný signál ~~v jamkách~~ pocházejících z Petriho misek, nebo kultivačních lahviček, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkových destiček, nebo skel bez buněk a bylo pracováno s průměrnými hodnotami těchto signálů. Tento signál byl následně odečten od jednotlivých signálů vzorků s buňkami. Poměrné hodnoty těchto korigovaných DAPI a/nebo Hoechst signálů pak odrážely poměrné hodnoty množství buněk v jednotlivých jamkách.

V případě, že bylo nutné provést přesné stanovení buněk v jednotlivých vzorcích, bylo současně u některých vzorků stanoveno množství buněk pomocí mikroskopu a CCD kamery a následně vypočítán průměrný DAPI a/nebo Hoechst signál v jedné buňce. Tímto signálem pak byly děleny korigované DAPI a/nebo Hoechst signály poskytované jednotlivými vzorky a bylo stanoveno množství buněk v jednotlivých vzorcích. Alternativně byly použity seriálně ředěné vzorky buněk, které byly zpracovány podle zde popsaného protokolu, byla vypočítána kalibrační křivka a následně bylo určeno množství buněk v jednotlivých vzorcích.

Signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem Alexa Fluor 488 byl změřen rovněž pomocí čtečky destiček při excitační vlnové délce 490 až 498 nm a emisní vlnové délce 510 až 530 nm. Následně byla nebo nebyla provedena korekce na pozadí tohoto signálu. Stanovení vzájemného množství proteinu a případná korekce bylo provedeno několika způsoby.

- V případě, že nebyla provedena korekce na pozadí u signálu poskytovaného protilátkou konjugovanou s fluorochromem, byl vydělen signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení několika opakování, byl v některých provedeních stanoven průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem a průměrný korigovaný signál poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk u těchto vzorků a teprve následně byl vydělen průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem průměrným korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrným počtem buněk. Vypočtená hodnota pak byla použita pro porovnání vzájemné replikační aktivity v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy se použité protilátky namířený proti sledovanému proteinu a/nebo protilátky konjugované s fluorochromem neváží silně na buněčné struktury a/nebo na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla, a/nebo je lze lehce odstranit promytím.

- V případech, že bylo nutné provést korekci na pozadí, bylo postupováno dvěma různými způsoby.

V prvním případě byl nejprve změřen signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem u vzorků s buňkami, které byly inkubovány jak s primární, tak sekundární protilátkou a u vzorků s buňkami, kde byla inkubace s primární protilátkou vynechána. Následně byl signál u vzorků s buňkami inkubovanými jak s primární, tak sekundární protilátkou a u vzorků s buňkami, kde byla inkubace s primární protilátkou vynechána vydělen hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk.

V případě, že bylo provedeno několik opakování vzorků s buňkami inkubovanými nebo neinkubovanými s primární protilátkou, byl výhodně nejprve vypočten průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten byl použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný byl tento postup v případě vzorků s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Následně byl signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou, byly odečteny od hodnot vypočtených pro vzorky s buňkami inkubovanými s primární protilátkou. Vypočtené hodnoty byly, pokud to bylo nutné a nevyplynuly přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty byly použity pro porovnání vzájemného obsahu sledovaného proteinu detekovaného v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby protilátek na buněčné složky a jen malá část pozadí je způsobena jejich vazbou na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

Ve druhém případě byl nejprve změřen signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem u vzorků s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou a současně u vzorků s buňkami, které byly inkubovány s primární protilátkou. Dále byl změřen signál ve vzorcích bez buněk. Signál ve vzorcích bez buněk byl následně odečten od signálu poskytovaného protilátkou konjugovanou s fluorochromem ve vzorcích s buňkami. V případě, že vzorky bez buněk byly zpracovány v několika opakováních, byl pro další výpočty výhodně použit průměr naměřených hodnot signálů. Následně byly vypočtené hodnoty signálů u vzorků s buňkami neinkubovanými s primární protilátkou i vzorků s buňkami inkubovanými s primární protilátkou vyděleny hodnotou korigovaného signálu DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. V případě provedení, kdy bylo provedeno několik opakování vzorků s buňkami inkubovanými a neinkubovanými s primární protilátkou, byl výhodně nejprve vypočten průměrný signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem a rovněž průměrný korigovaný signál poskytovaný DAPI a/nebo Hoechst a/nebo průměrný počet buněk z těchto opakování a ten byl použit při těchto i následných výpočtech. Zvláště výhodný byl tento postup v případě vzorku s buňkami, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Následně byl signál poskytovaný protilátkou konjugovanou s fluorochromem vydělen korigovaným signálem poskytovaným DAPI a/nebo Hoechst a/nebo vypočteným počtem buněk. Vypočtené hodnoty pro vzorky s buňkami bez primární protilátky byly odečteny od hodnot vypočtených

pro vzorky s primární protilátkou. Vypočtené hodnoty byly, pokud to bylo nutné a nevyplynuly přímo z předchozího výpočtu, průměrovány pro jednotlivá opakování. Vypočtené hodnoty byly použity pro porovnání obsahu proteinů v různých vzorcích. Tato metoda je vhodná především v případě, kdy hlavní část pozadí je odvozena od silné vazby protilátek na Petriho misky, nebo kultivační láhve, nebo 12-, nebo 24-, nebo 96-jamkové destičky, nebo skla.

V některých provedeních byly vymývací látky přidány do roztoku proteinázy K nebo byl krok s proteinázou K vynechán. Koncentrace vymývacích látek v tomto kroku byla alternativně 0,2 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 10 % nebo 20 % (hmotnost/obj.) a vzorky byly inkubovány na laboratorní třepačce při 300 rpm po dobu alternativně 10, 30 nebo 60 minut.

V dalších provedeních bylo okamžitě po inkubaci s proteinázou K přeneseno 120 µl vzorku do jamek černé 96-jamkové destičky a teprve pak byl přidán roztok vymývacích látek.

V některých provedeních byl namísto etanolu použit metanol nebo byla použita fixace formaldehydem a permeabilizace Tritonem X-100 podle příkladu 6.

Použité roztoky a chemikálie:

1. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

10x PBS (desetinásobně koncentrovaný roztok PBS):

1,4 mol.l^{-1} NaCl

26 mmol.l^{-1} KCl

90 mmol.l^{-1} Na_2HPO_4

14 mmol.l^{-1} KH_2PO_4

Uvedené složky byly rozpuštěny v destilované vodě a pH bylo upraveno do rozmezí 7,3÷7,4

1x PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok v obvyklé koncentraci)

2. Roztok jednomocné mědi

Pro přípravu vodného roztoku jednomocné mědi byly použity dva postupy.

V prvním postupu byla směs připravena smícháním stejných množství 8 mmol.l^{-1} vodného roztoku síranu měďnatého a 20 mmol.l^{-1} vodného roztoku askorbátu sodného a 40 mmol.l^{-1} vodného roztoku glycinu. Směs byla po smíchání okamžitě použita.

Ve druhém postupu byla směs připravena smícháním stejných množství 4 mmol.l^{-1} vodného roztoku síranu měďnatého a 20 mmol.l^{-1} vodného roztoku hydrochinonu. Směs byla po smíchání okamžitě použita.

3. Roztok proteinázy K

Roztok proteinázy K byl připraven ze zásobního roztoku proteinázy K (20 mg.ml^{-1}, ThermoFisher Scientific) ředěním v 50 mmol.l^{-1} Tris, pH 8. Konečné roztoky alternativně obsahovaly 0,05; 0,1; 0,2; 1 a 2 mg.ml^{-1} proteinázy K.

4. Roztok jednomocné mědi s azidovaným fluorochromem

Roztok jednomocné mědi a azidovaného fluorochromu obsahoval:

2 mmol.l^{-1} síran měďnatý

10 mmol.l^{-1} hydrochinon

10 μmol.l^{-1} azidovaný fluorochrom (5-karboxyfluorescein; 5-FAM)

Použitá literatura

1. Quent VM a spol., 2010, *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 1003–1013
2. Ng KW a spol., 2005, *Tissue Eng.*, **11**, 182-191
3. Jones LJ a spol., 2001, *J. Immunol. Methods*, **254**, 85-98
4. McCaffrey TA a spol., 1988, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **24**, 247-252
5. Papadimitriou E a Lelkes PI., 1993, *J. Immunol. Methods*, **162**, 41-45
6. Latt SA a spol., 1975, *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 493-505
7. Latt SA a Stetten G, 1976, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 24-33
8. Shapiro HM a Perlmutter NG, 2001, *Cytometry*, **44**, 133-136
9. Kapuscinski J, 1995, *Biotech. Histochem.*, **70**, 220-233
10. Barcellona ML and Gratton E, 1996, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3775-3799
11. Görner H, 2001, *Photochem. Photobiol.*, **73**, 339-348
12. Ligasová a spol., 2012, *PLoS One*, **7**: e52584

Průmyslová využitelnost:

Přístup je využitelný v oblastech studia toxického působení látek např. při vývoji nových léčiv nebo v laboratořích zabývajícími se buněčnými kultivacemi, technologiemi využívajícími DNA a vlivem různých látek na buněčný růst. Přístup je vhodný jako součást kitů pro stanovení množství DNA a buněk.

09.03.18
PV 2017-233

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku pomocí fluorescenčních látek 4',6-diamidin-2-fenylindolu a/nebo 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridu a/nebo 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridu a/nebo 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolu, **vyznačující se tím**, že obsahuje následující kroky:

(i) vzorky se inkubují v roztoku, výhodně vodném roztoku, alespoň jedné fluorescenční látky vybrané ze skupiny sestávající ze 4',6-diamidin-2-fenylindolu, 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridu, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridu a 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolu, která se v průběhu této inkubace naváže na DNA přítomnou ve vzorku;

(ii) vzorky se promyjí promývacím vodným roztokem, výhodně roztokem pufru, jehož pH je rovněž výhodně 6 až 8, promývací roztok dále s výhodou obsahuje alespoň jeden detergent;

(iii) fluorescenční látky navázané na DNA ve vzorku se z DNA vymyjí vymývacím vodným, s výhodou pufrovaným roztokem, alespoň jedné látky vybrané ze skupiny dodecylsíran sodný, dodecylsíran litný a [dodecanoyl(metyl)amino]acetát sodný;

(iv) stanoví se množství DNA ve vymývacím roztoku z předchozího kroku měřením fluorescenčního signálu fluorescenční látky použité v kroku (i).

2. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že promývací roztok v kroku (ii) obsahuje alespoň jeden detergent, který je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující polyoxyetylen sorbitan monolaurát, polyoxyetylen sorbitan monooleát, 2-[4-(2,4,4-trimetylpentan-2-yl)fenoxy]etanol, 4-tert-octylfenol dietoxylát, dodecylsíran sodný, dodecylsíran litný, [dodecanoyl(metyl)amino]acetát sodný, přičemž koncentrace detergentu v promývacím roztoku je výhodně v rozmezí od 0,01 % (hmotnost/obj.) do 5 % (hmotnost/obj.) a v případě použití dodecylsíranu sodného, dodecylsíranu litného a/nebo [dodecanoyl(metyl)amino]acetátu sodného jako detergentu je jejich koncentrace maximálně 0,05 % (hmotnost/obj.).

3. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se před inkubací s 4',6-diamidin-2-fenylindolem a/nebo 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridem a/nebo 2'-(4-etoxyfenyl)-

-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridem a/nebo 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolem a/nebo kdykoli před krokem (iii) provede inkubace vzorku s RNázou, s výhodou s RNázou A.

4. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku, podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že vzorkem jsou buňky nebo tkáně nebo ukotvená DNA, přičemž v případě, že vzorkem jsou buňky nebo tkáně, je vzorek s výhodou fixován.

5. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku, podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že inkubace vzorku s alespoň jednou fluorescenční látkou v kroku (i) se provádí při teplotě 0 až 45 °C po dobu delší než 2 minuty; promytí vzorku promývacím vodným roztokem v kroku (ii) se provádí výhodně při teplotě 0 až 45 °C po dobu delší než 10 minut, přičemž v průběhu této doby se promývací roztok alespoň 2x vymění za nový, výhodněji se tento krok provádí po dobu 15 až 60 minut a vymývací roztok se alespoň 3x vymění za nový; vymytí fluorescenční látky z DNA v kroku (iii) se provádí výhodně při teplotě 0 až 45 °C po dobu delší než 2 minuty.

6. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku, podle kteréhokoli z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že pokud jsou vzorkem buňky nebo tkáně, tak se před krokem (iii), výhodněji před krokem (i), provede inkubace vzorku ve vodném roztoku obsahujícím ionty jednomocné mědi, přičemž roztok jednomocné mědi se výhodně připraví smícháním vodného roztoku síranu měďnatého a vodného roztoku hydrochinonu.

7. Způsob stanovení množství DNA ve vzorku, podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že pokud jsou vzorkem buňky nebo tkáně, tak se mezi kroky (ii) a (iii) nebo současně s krokem (iii) vzorek inkubuje s proteinázou K.

8. Způsob stanovení množství do DNA inkorporovaného 5-etynyl-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinu a/nebo proteinů a/nebo RNA v buňkách a tkáních pomocí detekčních přístupů založených na přímé nebo zprostředkované vazbě fluorescenčních sond s vyjmenovanými látkami, **vyznačující se tím**, že se v průběhu těchto přístupů nebo po jejich skončení provedou kroky (i) a (ii) způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7; následně se provede krok (iii) způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7; dále se změří fluorescenční signál poskytovaný

fluorescenčními sondami a signál poskytovaný fluorescenční látkou, přičemž před krokem (iii) nebo v jeho průběhu se výhodně provede inkubace s proteinázou K, a před krokem (i) se výhodně provede inkubace vzorku v roztoku jednomocné mědi.

9. Způsob stanovení množství do DNA inkorporovaného 5-etynyl-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinu a odvozené replikační aktivity v buňkách a tkáních pomocí fluorescenčních látek 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridu a/nebo 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridu a/nebo 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolu, **vyznačující se tím**, že se se vzorkem buněk nebo tkání s inkorporovaným 5-etynyl-2'-deoxyuridinem a/nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinem a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridinem a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinem provedou kroky (i) a (ii) způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7; dále se provede inkubace s proteinázou K; po inkubaci s proteinázou K je změřen fluorescenční signál poskytnutý 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridem a/nebo 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridem a/nebo 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolem z kroku (i); následně se provede krok (iii) způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a znovu se změří signál poskytnutý fluorescenční látkou z kroku (i).

10. Sada pro stanovení množství DNA ve vzorku způsobem podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jednu fluorescenční látku vybranou ze skupiny sestávající z 4',6-diamidin-2-fenylindolu, 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridu, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridu a 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolu; alespoň jeden detergent, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující 2-[4-(2,4,4-trimetylpentan-2-yl)fenoxy]etanol, 4-tert-octylfenol dietoxylát, polyoxyetylen sorbitan monooleát a polyoxyetylen sorbitan monolaurát nebo jejich vodné roztoky; a alespoň jeden vymývací roztok nebo látku pro přípravu vymývacího roztoku, přičemž vymývací roztok je vybraný ze skupiny obsahující vodný roztok dodecylsíranu sodného, dodecylsíranu litného, [dodecanoyl(metyl)amino]acetátu sodného nebo jejich kombinaci, přičemž látkou pro přípravu vymývacího roztoku je dodecylsíran sodný, a/nebo dodecylsíran litný, a/nebo [dodecanoyl(metyl)amino]acetát sodný.

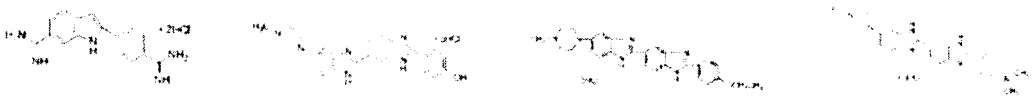
11. Sada podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje látku pro fixaci vzorku, s výhodou etanol nebo metanolem stabilizovaný roztok formaldehydu; a/nebo proteinázu, s výhodou proteinázu K; a/nebo RNázu, s výhodou RNázu A; a/nebo síran měďnatý a hydrochinon.

12. Sada pro stanovení 5-etynyl-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinu inkorporovaných do DNA a/nebo pro stanovení odvozené replikační aktivity ve vzorku způsobem podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jednu fluorescenční látku vybranou ze skupiny sestávající z 4-[5-(4-metyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-fenol trihydrochloridu, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloridu a 2'-(4-dimetylaminofenyl)-5-(4-metyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-benzimidazolu; alespoň jednu látku vybranou ze skupiny sestávající z 5-etynyl-2'-deoxyuridinu, 5-bromo-2'-deoxyuridinu, 5-chloro-2'-deoxyuridinu a 5-jodo-2'-deoxyuridinu; alespoň jeden detergent, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující 2-[4-(2,4,4-trimetylpentan-2-yl)fenoxy]etanol, 4-tert-octylfenol dietoxylát, polyoxyetylen sorbitan monooleát a polyoxyetylen sorbitan monolaurát nebo jejich vodné roztoky; a alespoň jeden vymývací roztok nebo látku pro přípravu vymývacího roztoku, přičemž vymývací roztok je vybraný ze skupiny obsahující vodný roztok dodecylsíranu sodného, dodecylsíranu litného, [dodecanoyl(metyl)amino]acetátu sodného nebo jejich kombinaci, a přičemž látkou pro přípravu vymývacího roztoku je dodecylsíran sodný, a/nebo dodecylsíran litný, a/nebo [dodecanoyl(metyl)amino]acetát sodný; proteinázu K; dále výhodně obsahuje látku pro fixaci vzorku, s výhodou etanol nebo metanolem stabilizovaný roztok formaldehydu; a dále s výhodou obsahuje síran měďnatý a hydrochinon.

13. Použití způsobu stanovení množství DNA ve vzorku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a/nebo sady pro stanovení množství DNA ve vzorku podle nároků 10 až 12 pro stanovení množství buněk a/nebo 5-etynyl-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-chloro-2'-deoxyuridinu a/nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinu inkorporovaných do DNA a/nebo pro stanovení odvozené replikační aktivity a/nebo pro stanovení množství RNA a/nebo pro stanovení množství proteinů.

PV 2017 - 233

Obrázek 1



DAPI Hoechst 33258 Hoechst 33342 Hoechst 34580

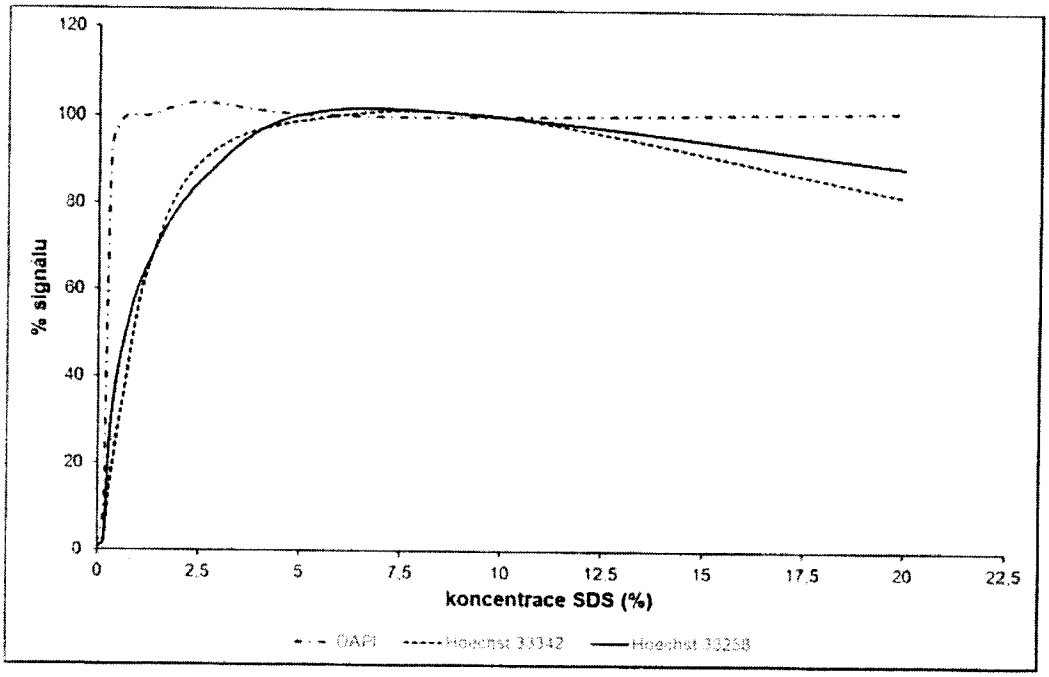
Obrázek 2

Tween 20 Tween 80

Obrázek 3

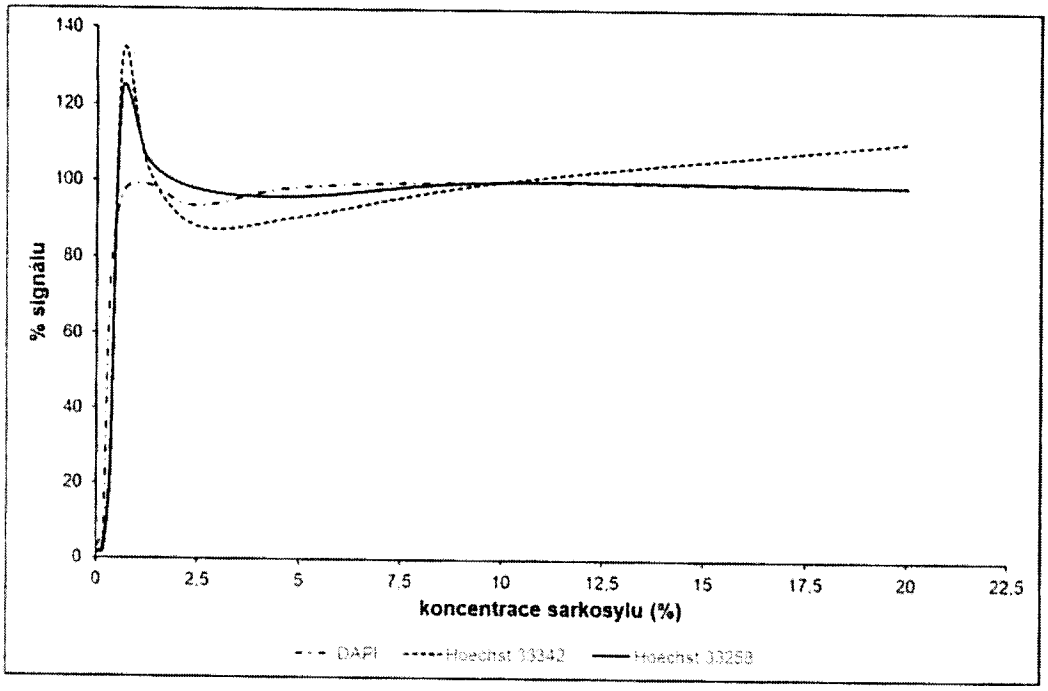
Triton X-100 Nonidet P-40

Obrázek 4

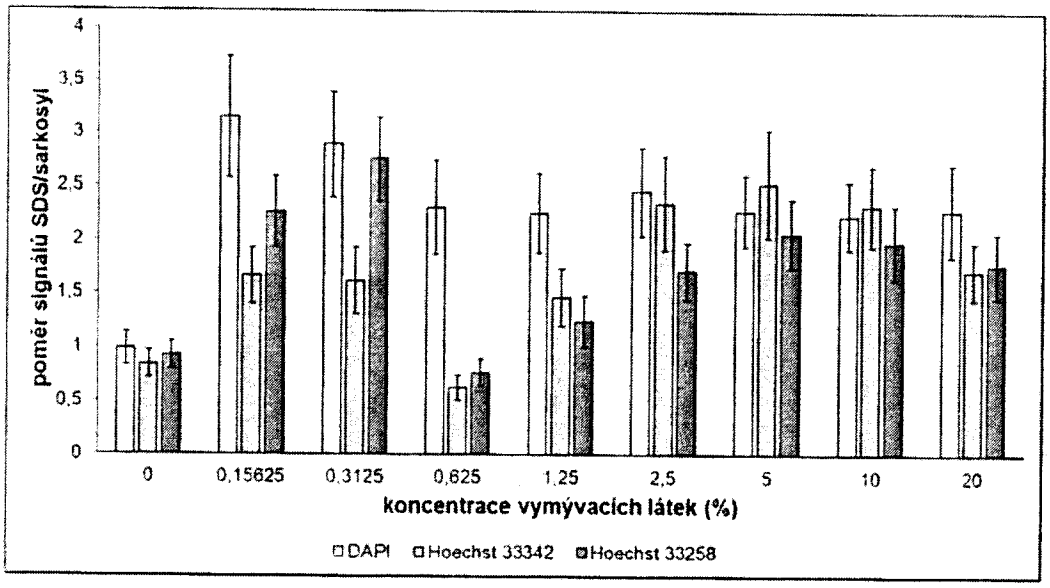


27.04.17

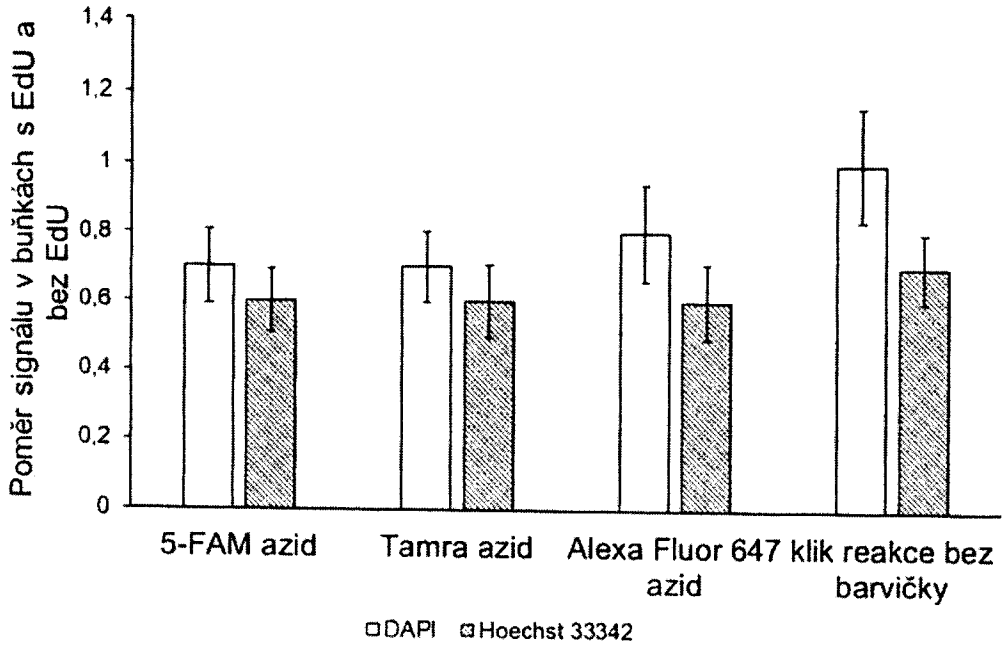
Obrázek 5



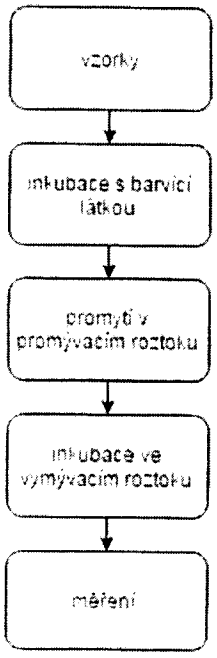
Obrázek 6



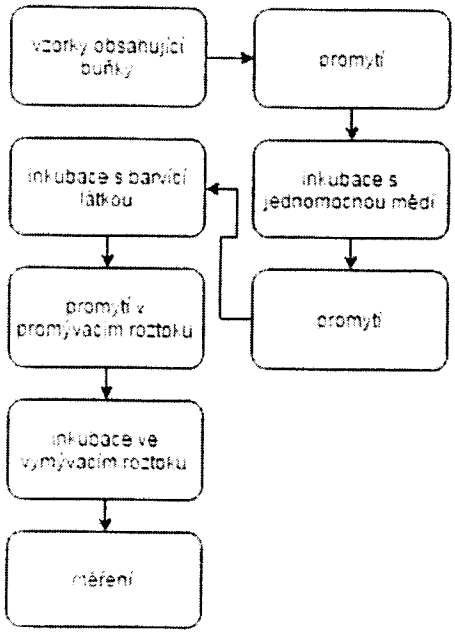
Obrázek 7



Obrázek 8

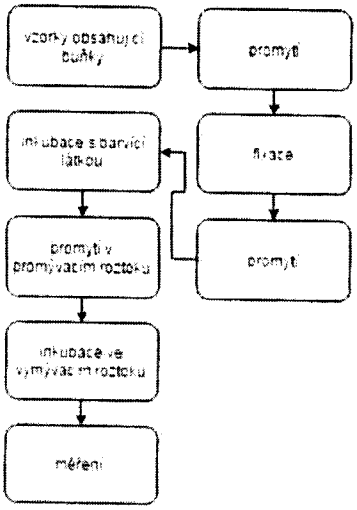


Obrázek 9

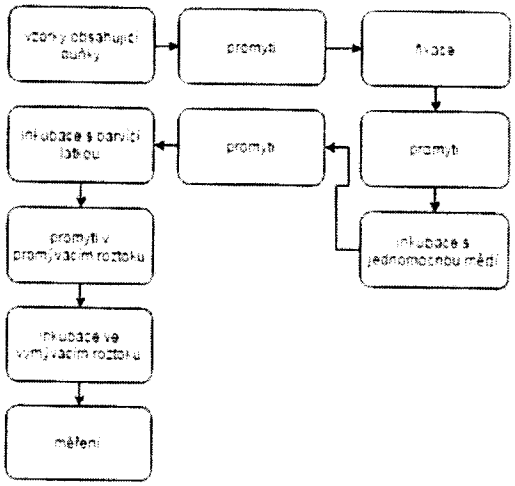


27.04.17

Obrázek 10



Obrázek 11



Obrázek 12