

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2018-609
(22) Přihlášeno: 07.11.2018
(40) Zveřejněno: 20.05.2020
(Věstník č. 21/2020)
(47) Uděleno: 09.09.2020
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 21.10.2020
(Věstník č. 43/2020)

G01N 1/28 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C01G 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

- (56) Relevantní dokumenty:
NERI L. M. et al.: „Nuclear scaffold proteins are differently sensitive to stabilizing treatment by heat or Cu⁺⁺,“ The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, vol. 45, no. 2, 1997, str. 295 – 305, ISSN 0022-1554; NERI L. M. et al.: „Spatial distribution of lamin A and B1 in the K562 cell nuclear matrix stabilized with metal ions,“ Journal of Cellular Biochemistry, vol. 75, no. 1, 1999, str. 36 – 45, ISSN 0730-2312; PETERS K. et al.: „Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β-lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins,“ PNAS, vol. 115, no. 42, 16.10.2018, str. 10786 – 10791, ISSN 0027-8424; LÖSCHBERGER A. et al.: „Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins: ClickOx,“ Biotechnology Journal, vol. 9, no. 5, 2014, str. 693 – 697, ISSN 1860-6768.
CZ 307415; CZ 307016.

- (73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

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

- (54) Název vynálezu:
Způsob stabilizace buněk a jeho použití

- (57) Anotace:
Předkládané řešení se týká způsobu stabilizace buněk pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti vzorků obsahujících buňky. Popsaný přístup stabilizace je založen na inkubaci jak neovlivněných buněk, tak buněk inkubovaných v etanolu a/nebo v metanolu, formaldehydem ovlivněných vzorků a usušených vzorků, s roztokem obsahujícím dvoj mocné ionty mědi, přičemž jejich zdrojem je výhodně síran měďnatý, chlorid měďnatý nebo dusičnan měďnatý. Vyvinutý přístup poskytuje vzorky s vysokou odolností vůči různým detergentům včetně polyoxyetylen-sorbitan monolaurátu, polyoxyetylen-sorbitan monooleátu, 4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenyl-polyetylen glykolu, saponinům, 4-nonylfenyl-polyetylen glykolu, dodecylsíranu sodnému, dodecylsíranu litnému a [dodecanoyl(metyl)amino]acetátu sodnému a v případě vzorků, které jsou tvořeny buňkami na podložkách, významně snižuje nebo zcela zamezuje jejich odstranění z povrchů podložek použitými detergenty. Současně tento způsob umožňuje přípravu vysoce stabilních vzorků fixovaných formaldehydem pomocí sedimentace buněk z buněčných suspenzí.

Způsob stabilizace buněk a jeho použití

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká stabilizace buněk, sady pro stabilizaci buněk a jejich použití.

Dosavadní stav techniky

10

Pro zpevnění vzorků obsahujících buňky (fixaci) se používá celá řada protokolů. Fixace rovněž zastavuje nebo alespoň výrazně zpomaluje různé degradační procesy probíhající v buňkách. Kromě toho slouží k uchování buněčné morfologie. V případě, že se jedná o buňky uchycené na podložkách, slouží fixace i k pevnějšímu uchycení buněk na podložky a brání jejich odstranění v průběhu dalšího zpracování. Velice jednoduchou technikou, která našla uplatnění při celé řadě buněčných analýz, je fixace vzorků pomocí etanolu, metanolu nebo acetonu. Fixace pomocí těchto látek je založena na precipitaci a dehydrataci velkých proteinů (např. *Vib. Spectrosc.*, **91**, 31-45). Nevýhodou fixace pomocí těchto činidel je malá odolnost takto fixovaných vzorků vůči některým detergentům. Pro zvýšení odolnosti je možné použít např. přístup, který spoléhá na použití jednomocných iontů mědi (patent č. CZ307415). Nevýhodou tohoto způsobu je ovšem produkce radikálů (*PLoS One*, **7(12)**, e52584; *Cytometry A*, **83**, 989-1000), což může vést k nežádoucím vlivům jako např. poškození buněčných složek. Jinou používanou technikou pro fixaci je prosté usušení buněk. Ačkoli je tato technologie často používána při přípravě preparátů buněk sedimentovaných z buněčných suspenzí, odolnost usušených vzorků vůči některým detergentům je rovněž nízká. Sedimentační techniky jsou přitom velice často používány i v klinické diagnostice. Pro sedimentaci se používá gravitační nebo centrifugační síla (např. *Ned. T. Geneesk.*, **107**, 445-446; *Immunology*, **9**, 403-405) a buňky jsou díky těmto silám zachytávány na podložky, kterými jsou nejčastěji mikroskopická skla. Dalším poměrně často používaným fixačním činidlem je roztok formaldehydu, který reaguje s primárními aminy proteinů a nukleových kyselin a vytváří s nimi metylenové můstky (např. *Am. J. Pathol.*, **161(6)**, 1961-1971; *Vib. Spectrosc.*, **91**, 31-45). Ačkoli použití formaldehydu je z hlediska odolnosti vůči detergentům obecně efektivnější než použití etanolu nebo usušení, v případě nutnosti použití nízkých koncentrací formaldehydu a/nebo krátkých časů fixace a/nebo sedimentačních technik je tento způsob fixace nedostatečný pro uchycení buněk, pokud není doprovázen usušením buněk nebo nejsou použita speciálně pokrytá skla.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález popisuje způsob stabilizace buněk pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti buněk, v různých vzorcích. Předkládaná technologie významně stabilizuje jak neovlivněné buňky, tak buňky inkubované v etanolu a/nebo v metanolu, formaldehydem ovlivněné vzorky a usušené vzorky. Podle našich nálezů umožňuje popsany přístup mimo jiné vysoce efektivně přichytit formaldehydem fixované buňky k různým podložkám za použití sedimentace.

Popsaný způsob stabilizace účinně zvyšuje odolnost buněk proti mechanickému namáhání a/nebo působení různých látek a efektivně zabraňuje jejich odpadnutí z podložek při mechanickém namáhání a/nebo působení různých látek. Příkladem mechanického namáhání je působení proudu kapaliny nebo působení centrifugační síly. Příkladem látek, u nichž je pozorováno zvýšení odolnosti buněk po použití popsaneho způsobu jsou kyseliny, zásady a/nebo detergenty.

Vzorky mohou být kousky tkáně, buňky v roztoku nebo buňky na podložkách. Buňky mohou být na podložkách kultivovány nebo mohou být na podložky naneseny např. pomocí sedimentace prostřednictvím gravitačních nebo centrifugačních sil. Podložkami mohou být např. podložní

nebo krycí skla, nebo další materiály, které jsou použity pro pěstování nebo záchyt buněk např. pomocí sedimentace prostřednictvím gravitačních nebo centrifugačních sil. Jedná se např. o různé destičky ze skla nebo termoplastů např. polystyrenu, polyamidu nebo polymethylmetakrylátu, případně láhve nebo misky ze skla nebo termoplastů. Příkladem jsou kultivační láhve, Petriho misky nebo více-jamkové destičky.

Popsaný přístup stabilizace buněk je založen na inkubaci vzorků s dvojmocnými ionty mědi. Výhodně je tato inkubace provedena ve vodných nebo etanolových nebo metanolových roztocích, případně v různých kombinacích těchto roztoků. Příkladem je roztok dvojmocných iontů mědi v roztoku obsahujícím vodu i etanol a/nebo metanol. Dále je roztok obsahující dvojmocné ionty mědi nazýván jako stabilizační roztok.

Zvláště výhodná je kombinace předkládaného způsobu stabilizace buněk pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti buněk s dalšími přístupy zvyšujícími mechanickou a chemickou odolnost. Příkladem dalších přístupů je ovlivnění vzorků po aplikaci nebo před aplikací stabilizačního roztoku etanolem a/nebo metanolem a/nebo formaldehydem a/nebo usušením. Ovlivnění vzorků etanolem a/nebo metanolem a/nebo formaldehydem je výhodně provedeno inkubací vzorků v roztocích obsahujících etanol a/nebo metanol a/nebo formaldehyd. Výhodně se jedná o vodné roztoky uvedených látek.

Zdrojem dvoj mocných iontů mědi je výhodně síran měďnatý, chlorid měďnatý nebo dusičnan měďnatý. Zdroje dvojmocných iontů mědi jsou přidány do stabilizačního roztoku, a to buď v nerozpuštěné podobě, nebo je možné nejprve připravit jejich zásobní koncentrované roztoky např. ve vodě a/nebo etanolu a/nebo metanolu a/nebo v různých směsích obsahujících vodu a/nebo etanol a/nebo metanol a ty potom použít pro přípravu stabilizačního roztoku. Výhodně jsou tyto zásobní roztoky připraveny ve vodě nebo vodných směsích. Je možné použít i jiné zdroje dvojmocné mědi, jako je např. octan měďnatý. Ten je však hůře rozpustný, a tudíž méně vhodný.

V případě kombinace přístupu stabilizace vzorků s ovlivněním vzorků etanolem a/nebo metanolem je výhodně použít takové koncentrace etanolu a/nebo metanolu, aby jejich koncentrace a/nebo součet jejich koncentrací byl roven nebo vyšší než 10 % (obj./obj.) a čas inkubace s etanolem a/nebo metanolem roven nebo vyšší než 5 sekund. Výhodně jsou použity vodné roztoky etanolu a/nebo metanolu.

V případě kombinace přístupu s ovlivněním vzorků formaldehydem je výhodně koncentrace formaldehydu rovna nebo vyšší než 0,1 % (hmotn./obj.) a čas inkubace s formaldehydem roven nebo vyšší než 10 sekund. Výhodně se jedná o vodné roztoky formaldehydu.

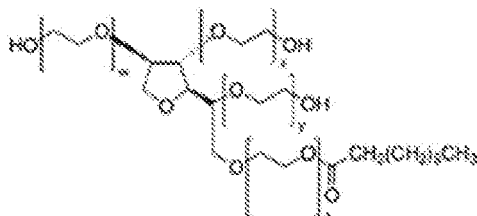
Výhodně je koncentrace zdrojů dvojmocných iontů rovna nebo vyšší než $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a čas inkubace s dvojmocnými ionty mědi roven nebo vyšší než 1 sekunda.

Přístup je proveditelný v širokém rozmezí teplot. Úspěšně byly testovány teploty od -25°C do 50°C . Výhodně je přístup možné použít v oblasti běžných laboratorních teplot, to je od 18°C to 30°C .

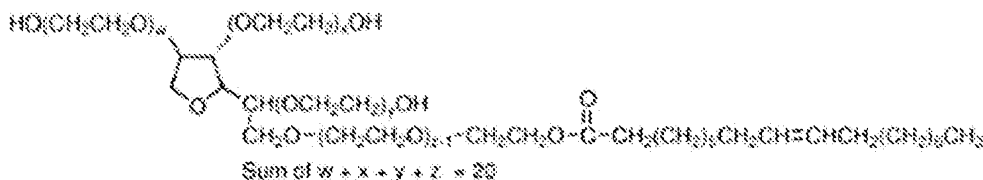
Ačkoli z hlediska uchování buněčné struktury je výhodné pracovat s roztoky dvojmocné mědi, jejichž pH je blízko 7, přístup je proveditelný v širokém rozmezí pH. Úspěšně byla testována i pH pod hodnotou 2 nebo nad hodnotou 13.

Přístup je výhodně využitelný např. při všech procedurách, kde se vyžadují inkubace v kyselých nebo zásaditých roztocích a/nebo v roztocích obsahujících detergenty, což jsou kroky, které mohou vést k destrukci buněk. Přístup je rovněž výhodně použitelný v případech, kdy se používají centrifugace a/nebo dochází k proudění různých roztoků kolem vzorku. Příkladem procedury, kdy dochází k proudění, je např. výměna roztoků pomocí pipety. Popsaný způsob

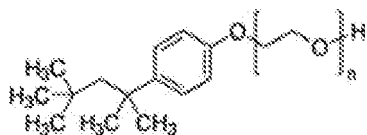
stabilizace je zvláště výhodný v případě, že je vyžadována inkubace buněk s detergenty. Příkladem detergentů je např. polyoxyetylsorbitan monolaurát (Tween 20; Schéma 1), polyoxyetylsorbitan monooleát (Tween 80; Schéma 1), 4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenyl-polyetylen glykol (Triton X 100; Schéma 1), saponiny (skupina amfipatických glykosidů), 4-nonylfenyl-polyetylen glykol (Nonidet P 40; Schéma 1), dodecylsírán sodný ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, rovněž označovaný jako sodiumdodecylsulfát, SDS), dodecylsírán litný ($\text{LiC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, litiumdodecylsulfát, LiDS) a [dodecanoyl(metyl)amino]acetát sodný ($\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NNaO}_3$, sodiumlaurylsarkosinát, sarkosyl).



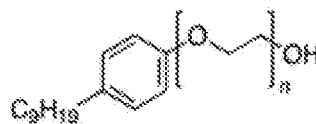
Tween 20



Tween 80



Triton X-100



Nonidet P-40

Schéma 1

Oproti stabilizaci jednomocnými ionty mědi (CZ307415) je stabilizace za pomoci dvojmocných iontů mimo jiné výhodná díky možnosti současného značení DNA pomocí skupiny barviv DNA sestávající z 4',6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI, Schéma 2; *Biotech. Histochem.*, **70**, 220-233), 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-l-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazolu (Hoechst 33258), 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-l-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazolu (Hoechst 33342) a *N,N*-dimetyl-4-[5-(4-metyl-l-piperaziny)[2,5'-bi-1*H*-benzimidazol]-2'-yl]benzenaminu (Hoechst 34580; Schéma 2; *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 493-505, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 24-33, *Cytometry*, **44**, 133-136).

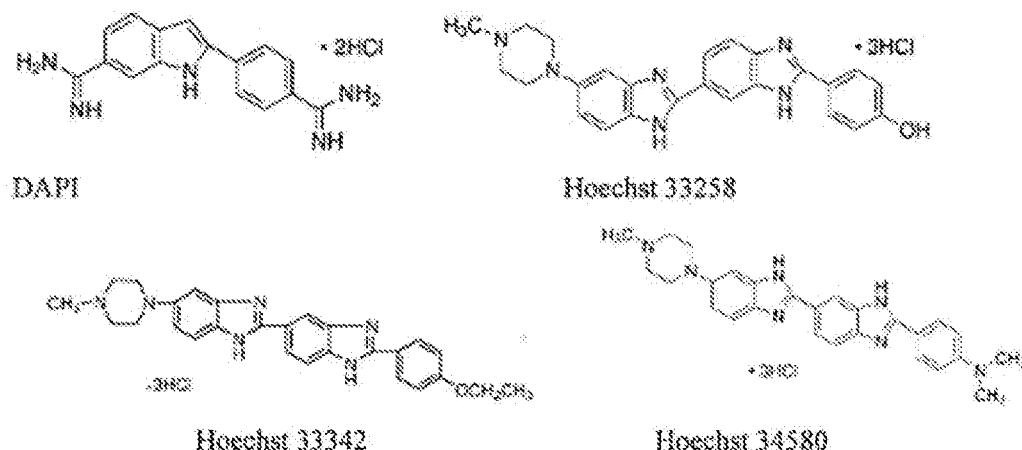


Schéma 2

5 Zatímco přítomnost jednomocných iontů mědi vede k výraznému snížení až k úplnému zabránění značení pomocí těchto barviv, dvojmocné ionty tento efekt nevykazují, naopak umožňují současnou aplikaci barviv DNA a tím zkrácení celého přístupu.

Předmětem vynálezu je rovněž sada pro stabilizaci buněk obsahující vodný roztok síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého a volitelně vodný roztok
10 etanolu a/nebo metanolu nebo sada pro stabilizaci buněk obsahující vodný roztok síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého obsahující současně etanol a/nebo metanol. Výhodně je koncentrace síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého 0,02 až 1 mol.l⁻¹.

15 Přístup je výhodně využitelný v případě stanovení množství buněk pomocí technologie založené na vymytí barviv DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580 dle patentu CZ 307415, přičemž je lhostejné, zda je přístup použit před aplikací barviv, současně s aplikací barviv nebo až po aplikaci barviv. Výhodně jsou zdroje dvojmocných iontů mědi přítomny v promývacích roztocích.

20 Výhodným provedením předkládaného vynálezu je inkubace vzorků obsahujících buňky s vodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po dobu 1 sekundy až 40 minut při teplotě 0 až 40 °C. Výhodně tento roztok obsahuje etanol a/nebo metanol. V případě, že tento roztok obsahuje etanol
25 a/nebo metanol, je možné použít i teploty nižší než 0 °C.

Dalším výhodným provedením předkládaného vynálezu je inkubace vzorků obsahujících buňky po dobu 10 sekund až 1 hodiny v 50 až 90% (obj./obj.) roztoku etanolu a/nebo metanolu ve vodě
30 při teplotě 0 až 40 °C a následná inkubace vzorku s vodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po dobu 1 sekundy až 40 minut rovněž při teplotě 0 až 40 °C.

V jiném výhodném provedení inkubace s dvojmocnými ionty mědi předchází inkubaci s roztokem etanolu a/nebo metanolu.

35 Jiným výhodným provedením předkládaného vynálezu je inkubace vzorků obsahujících buňky po dobu 30 minut až několika měsíců v 50 až 90% (obj./obj.) roztoku etanolu a/nebo metanolu ve vodě při teplotě -25 až 0 °C a následná inkubace vzorků s vodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po
40 dobu 1 sekundy až 40 minut při teplotě 0 až 40 °C.

Dalším výhodným příkladem provedení je inkubace vzorků obsahujících buňky po dobu 10

sekund až 1 hodiny v 50 až 90% (obj./obj.) roztoku etanolu a/nebo metanolu ve vodě při teplotě -25 až +40 °C, následné usušení vzorků a následná inkubace svodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po dobu 1 sekundy až 40 minut při teplotě 0 až 40 °C.

5

Jiným výhodným provedením předkládaného vynálezu je usušení vzorků obsahujících buňky a jejich následná inkubace s vodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po dobu 1 sekundy až 40 minut při teplotě 0 až 40 °C.

10

Dalším výhodným příkladem provedení předkládaného vynálezu je inkubace vzorků obsahujících buňky po dobu 10 sekund až 1 hodiny ve vodném roztoku obsahujícím 0,1 až 10% (hmotn./obj.) formaldehyd při teplotě 0 až 40 °C a následná inkubace s vodným roztokem obsahujícím 0,01 až 100 mmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého po

15

dobu 1 sekundy až 40 minut při teplotě 0 až 40 °C.

Výhodným příkladem provedení předkládaného vynálezu je inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi, která proběhne ve vodném roztoku, který vedle dvojmocných iontů mědi dále obsahuje alespoň jednu látku, vybranou ze skupiny zahrnující 4',6-diamidin-2-fenylindol, 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-l-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazol, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-l-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazol a *N,N*-dimetyl-4-[5-(4-metyl-l-piperaziny)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]benzenamin, přičemž koncentrace těchto látek je v rozmezí od 0,1 μmol.l⁻¹ do 0,1 mol.l⁻¹.

20

Popsaný způsob stabilizace buněk ve vzorku pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti buněk, se obecně vyznačuje tím, že se vzorek obsahující buňky inkubuje s dvojmocnými ionty mědi.

25

Ve výhodných případech se dvojmocné ionty mědi připraví rozpuštěním síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého ve vodě a/nebo metanolu a/nebo etanolu nebo ve směsích obsahujících vodu a/nebo etanol a/nebo metanol, na koncentraci dvojmocných iontů mědi rovnou nebo vyšší než 0,1 μmol.l⁻¹.

30

Výhodně je doba inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi rovna nebo vyšší než 1 sekunda.

35

Výhodně se inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi provede při teplotě v rozmezí od -25 °C do 50 °C.

Rovněž výhodně se inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi provede před inkubací nebo po inkubaci vzorku s etanolem a/nebo metanolem nebo formaldehydem nebo před nebo po usušení vzorku.

40

Ve výhodném provedení se inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi provede před inkubací nebo po inkubaci vzorku s vodným roztokem etanolu a/nebo metanolu nebo formaldehydu, přičemž celková koncentrace etanolu a/nebo metanolu je rovna nebo vyšší než 10 % (obj./obj.) a doba inkubace v tomto roztoku je rovna nebo vyšší než 5 sekund a koncentrace formaldehydu ve vodném roztoku je rovna nebo vyšší než 0,1 % (hmotn./obj.) a doba inkubace v tomto roztoku je rovna nebo vyšší než 10 sekund.

45

V některých výhodných provedeních se mezi inkubací vzorku s etanolem a/nebo metanolem a inkubací vzorku s dvojmocnými ionty mědi vzorek obsahující buňky usuší.

50

V dalších výhodných provedeních krok inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi proběhne ve vodném roztoku, který vedle dvojmocných iontů mědi dále obsahuje alespoň jednu látku, vybranou ze skupiny zahrnující 4',6-diamidin-2-fenylindol, 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-l-

55

piperaziny]-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol a *N,N*-dimetyl-4-[5-(4-metyl-1-piperaziny)[2,5'-bi-1*H*-benzimidazol]-2'-yl]benzenamin. Výhodně je koncentrace látky, vybrané ze skupiny zahrnující 4',6-diamidin-2-fenylindol, 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol a *N,N*-dimetyl-4-[5-(4-metyl-1-piperaziny)[2,5'-bi-1*H*-benzimidazol]-2'-yl]benzenamin, v rozmezí od 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ do 0,1 mol.l^{-1} . Rovněž výhodně je popsán způsob stabilizace buněk ve vzorku pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti buněk použit pro stanovení množství buněk ve vzorcích.

10 Seznam použitých zkratk

PBS fosfátem pufovaný fyziologický roztok

15 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Stabilizace buněk v tkáních pomocí dvojmocných iontů mědi.

Následující postup popisuje stabilizaci buněk ve tkáních pomocí dvojmocných iontů mědi. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Vzorky tkáně byly promyty v 10 ml 1x PBS (složení viz část Použité roztoky a chemikálie) a následně byly přeneseny do zkumavky o objemu 2 ml, ve které bylo 1,5 ml 1x PBS.

B) 1x PBS bylo odsáto a vzorky byly inkubovány v 1,5 ml alternativně 10% nebo 50% nebo 70% nebo 90% vodném roztoku (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo ve 100% etanolu a/nebo metanolu. Pokud byl použit roztok obsahující současně etanol a metanol, jednalo se o součet jejich koncentrací. Doba inkubace byla alternativně 1 minuta, 10 minut nebo jedna hodina. V případě použití 50% nebo 70% nebo 90% vodného roztoku (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo 100% etanolu a/nebo metanolu byla doba inkubace alternativně i několik měsíců. Inkubace probíhala alternativně i při -25 °C nebo -20 °C nebo 0 °C nebo 25 °C nebo 40 °C nebo 50 °C. V některých provedeních byly vzorky inkubovány v roztoku 0,1% nebo 2% nebo 8% formaldehydu (hmotn./obj., přidáno bylo 1,5 ml roztoku) v 1x PBS alternativně po dobu 10 sekund nebo 1 minuty, 10 minut nebo 30 minut.

V některých provedeních byl krok B) vynechán a následoval krok C).

C) Fixační roztok nebo 1x PBS byly odsáty a vzorky byly inkubovány v roztoku 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého (alternativně byly použity koncentrace 0,1 nebo 0,2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ nebo 0,1 nebo 1 nebo 50 nebo 100 mmol.l^{-1} , přidáno bylo 1,5 ml roztoku) ve vodě nebo ve vodném roztoku 20 mmol.l^{-1} citrátového pufru, pH 5 nebo 6, nebo 20 mmol.l^{-1} Tris, pH 7, nebo 10 nebo 20 nebo 50 mmol.l^{-1} kyseliny citrónové nebo kyseliny octové nebo kyseliny chlorovodíkové nebo 10 mmol.l^{-1} hydroxidu sodného nebo ve 100% etanolu a/nebo metanolu nebo v 10% nebo 50% nebo 70% nebo 90% (obj./obj.) roztoku etanolu a/nebo metanolu ve vodě. Pokud byl použit roztok metanolu a současně etanolu, jednalo se o součet jejich koncentrací.

V některých provedeních obsahoval roztok s dvojmocnými ionty mědi DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (v koncentracích 0,5 až 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Inkubace probíhala alternativně po dobu 10 sekund nebo 10 minut nebo 20 minut nebo jedné hodiny.

V některých provedeních byly vzorky v průběhu inkubace třepány na třepačce.

D) Roztok byl odstraněn a byl nahrazen 1,5 ml 1x PBS.

5 E) Roztok 1x PBS byl odstraněn a nahrazen 1,5 ml nového roztoku 1x PBS. Tento krok byl ještě jednou opakován.

Příklad 2

10 Stabilizace přisedlých buněk nebo buněk sedimentovaných na podložkách pomocí dvojmocných iontů mědi a použití způsobu stabilizace buněk pro stanovení počtu buněk.

Následující postup popisuje stabilizaci přisedlých buněk nebo buněk sedimentovaných na podložkách pomocí dvojmocných iontů mědi a použití způsobu stabilizace pro stanovení počtu buněk. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky
15 následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Vzorky s buňkami pěstovanými v Petriho miskách, nebo kultivačních lahvích, nebo 12-, nebo 24-, nebo 48-, nebo 96-jamkových destičkách, nebo na kruhových sklech o průměru 12 mm nebo vzorky s buňkami sedimentovanými na mikroskopických kruhových sklech o průměru 12 mm byly promyty v 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby).
20

B) 1x PBS bylo odstraněno a vzorky byly inkubovány alternativně v 10% nebo 50% nebo 70% nebo 90% vodném roztoku (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo ve 100% etanolu a/nebo metanolu (přidány byly přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby). Pokud byl použit roztok metanolu a současně etanolu, jednalo se o součet jejich koncentrací. Doba inkubace byla alternativně 1 minuta, 10 minut nebo jedna hodina.
25

30 V případě použití 50% nebo 70% nebo 90% vodného roztoku (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo 100% etanolu a/nebo metanolu byla doba inkubace alternativně i několik měsíců. Inkubace probíhala alternativně i při -25 °C nebo -20 °C nebo 0 °C nebo 25 °C nebo 40 °C nebo 50 °C.

35 V některých provedeních byly vzorky inkubovány v roztoku 0,1% nebo 2% nebo 8% formaldehydu (hmotn./obj.) v 1x PBS (přidány byly přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby) alternativně po dobu 10 sekund, 1 minuty, 10 minut nebo 30 minut.

40 V některých provedeních byly buňky inkubovány v roztoku 0,1% nebo 2% nebo 8% formaldehydu (hmotn./obj.) v 1x PBS v průběhu sedimentace nebo ještě před sedimentací před krokem A).

V některých provedeních byl krok B) vynechán a následoval krok C).

45 V dalších provedeních byly vzorky po kroku B) nebo před krokem B) usušeny.

C) Fixační roztok nebo pufr byly odstraněny a vzorky byly inkubovány v roztoku 10 μmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého (alternativně byly použity koncentrace 0,1 nebo 0,2 μmol.l⁻¹ nebo 0,1 nebo 1 nebo 50 nebo 100 mmol.l⁻¹, přidány byly přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby) ve vodě nebo ve vodném roztoku 20 mmol.l⁻¹ citrátového pufru, pH 5 nebo 6, nebo 20 mmol.l⁻¹ Tris, pH 7, nebo 10 nebo 20 nebo 50 mmol.l⁻¹ kyseliny citrónové nebo kyseliny octové nebo kyseliny chlorovodíkové nebo 10 mmol.l⁻¹ hydroxidu sodného nebo ve 100% etanolu a/nebo metanolu nebo v 10% nebo 50% nebo 70% nebo 90% (obj./obj.) roztoku etanolu nebo metanolu ve vodě. Pokud byl použit roztok metanolu a současně etanolu, jednalo se o
55

součet jejich koncentrací. V některých provedeních obsahoval roztok s dvojmocnými ionty mědi DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (v koncentracích 0,5 až 20 mol.l⁻¹). Inkubace probíhala alternativně po dobu 10 sekund nebo 10 minut nebo 20 minut nebo jedné hodiny.

V některých provedeních byly vzorky v průběhu inkubace třepány na třepačce.

V některých provedeních byly buňky před aplikací dvojmocných iontů mědi (krok C) pouze usušeny.

V některých provedeních byl postup popsany v tomto příkladu použit pro stanovení počtu buněk dle patentu CZ 307415. V těchto provedeních byly roztoky obsahující dvojmocné ionty mědi aplikovány ještě před vymytím barviv DAPI a/nebo Hoechst z DNA.

D) Roztok byl odstraněn a byl nahrazen 1x PBS (přidáno bylo přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby).

E) Roztok 1x PBS byl odstraněn a nahrazen novým roztokem 1x PBS (přidáno bylo přibližně 0,2 až 0,8 ml roztoku na 1 cm² plochy, použité množství se odvíjelo od kapacity použité nádoby).

Tento krok byl ještě jednou opakován.

Příklad 3

Stabilizace suspenzních buněk pomocí dvojmocných iontů mědi.

Následující postup popisuje stabilizaci buněk rostoucích v suspenzi pomocí dvojmocných iontů mědi. Není-li uvedeno jinak, veškeré kroky byly prováděny při teplotě místnosti, přičemž kroky následovaly po sobě bez dalších prodlev.

A) Suspenze buněk v médiu byla umístěna do 15 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut při 300x g. Buněčná suspenze obsahovala přibližně 5 až 8 x 10⁵ buněk na 1 mililitr.

B) Médium bylo odsáto a k peletě buněk byl přidán 1x PBS (2 ml). Buňky byly rozsuspendovány a centrifugovány 5 minut při 300x g.

C) 1x PBS bylo odsáto a ke vzorkům byl přidán alternativně 10% nebo 50% nebo 70% nebo 90% vodný roztok (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo 100% etanol a/nebo metanol (přidány byly 2 ml roztoku). Vzorky byly rozsuspendovány. Pokud byl použit roztok metanolu a současně etanolu, jednalo se o součet jejich koncentrací. Doba inkubace byla alternativně 1 minuta nebo 10 minut nebo jedna hodina. V případě použití 50% nebo 70% nebo 90% vodného roztoku (obj./obj.) etanolu a/nebo metanolu nebo 100% etanolu a/nebo metanolu byla doba inkubace alternativně i několik měsíců. Inkubace probíhala alternativně i při -25 °C nebo -20 °C nebo 0 °C nebo 25 °C nebo 40 °C nebo 50 °C. V některých provedeních byly vzorky inkubovány v roztoku 0,1% nebo 2% nebo 8% formaldehydu (hmotn./obj.) v 1x PBS alternativně po dobu 10 sekund nebo 1 minuty nebo 10 minut nebo 30 minut. Následně byly buňky centrifugovány 5 minut při 300x g.

V některých provedeních byl krok C) vynechán a následoval krok D)

D) Fixační roztok nebo pufr byly odsáty a k buňkám byl přidán roztok 10 μmol.l⁻¹ síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého (alternativně byly použity koncentrace 0,1 nebo 0,2 μmol.l⁻¹ nebo 0,1 nebo 1 nebo 50 nebo 100 mmol.l⁻¹, přidány byly 2 ml roztoku) ve vodě nebo ve vodném roztoku 20 mmol.l⁻¹ citrátového pufru, pH 5 nebo 6, nebo 20 mmol.l⁻¹ Tris, pH 7, nebo 10 nebo 20 nebo 50 mmol.l⁻¹ kyseliny citrónové nebo kyseliny octové nebo kyseliny chlorovodíkové nebo 10 mmol.l⁻¹ hydroxidu sodného nebo ve 100%

etanolu nebo metanolu nebo 10% nebo 50% nebo 70 % nebo 90 % (obj./obj.) roztoku etanolu a/nebo metanolu ve vodě. Buňky byly rozsuspendovány. Pokud byl použit roztok metanolu a současně etanolu, jednalo se o součet jejich koncentrací. V některých provedeních roztok s dvojmocnými ionty mědi obsahoval DAPI nebo Hoechst 33342 nebo Hoechst 33258 nebo Hoechst 34580 (v koncentracích 0,5 až 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Inkubace probíhala alternativně po dobu 10 sekund nebo 10 minut nebo 20 minut nebo jedné hodiny.

V některých provedeních byly vzorky v průběhu inkubace třepány na třepáče.

- 10 E) Následně byly buňky centrifugovány 5 minut při 300x g. Roztok byl poté odstraněn a nahrazen 1x PBS (přidány byly 2 ml roztoku). Buňky byly rozsuspendovány a po opětovné centrifugaci (5 minut při 300x g) byl roztok 1x PBS odstraněn a nahrazen novým roztoku 1x PBS (přidány byly 2 ml roztoku). Tento krok byl ještě jednou opakován.

15 Příklad 4

Sada pro stabilizaci buněk.

Následující příklad popisuje sadu pro stabilizaci buněk.

- 20 Sada obsahuje vodný roztok síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého a volitelně vodný roztok etanolu a/nebo metanolu. Koncentrace síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého je alternativně 0,001 nebo 0,1 nebo 1 mol.l^{-1} . Koncentrace vodného roztoku etanolu a/nebo metanolu je alternativně 70 % nebo 80 % nebo 90 % (obj./obj.).

- 30 V jiném provedení obsahuje sada vodný roztok síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého obsahující současně etanol a/nebo metanol. Koncentrace síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého je alternativně 0,001 nebo 0,1 nebo 1 mol.l^{-1} . Koncentrace etanolu a/nebo metanolu je alternativně 70 % nebo 80 % nebo 90 % (obj./obj.).

Použité roztoky a chemikálie:

- 35 1. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

10x PBS (desetinásobně koncentrovaný roztok PBS):

- 40 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

- 45 Uvedené složky byly rozpuštěny v destilované vodě a pH bylo upraveno do rozmezí 7,3 až 7,4 1x PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok v obvyklé koncentraci).

2. Roztoky dvojmocné mědi

- 50 Pro přípravu pracovních roztoků byly připraveny zásobní roztoky 0,5 mol.l^{-1} síranu měďnatého, chloridu měďnatého a dusičnanu měďnatého ve vodě.

Průmyslová využitelnost:

- 55 Přístup je využitelný v laboratořích, které se zabývají buněčnými kultivacemi a jejich dalším

zpracováním pro mikroskopické účely a dále v laboratořích, které využívají sedimentaci pro záchyt buněk na různé podložky, např. v klinické diagnostice.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stabilizace buněk ve vzorku pro zvýšení mechanické a chemické odolnosti buněk,
5 **vyznačující se tím**, že se vzorek obsahující buňky inkubuje s dvojmocnými ionty mědi.
2. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se dvojmocné ionty mědi připraví rozpuštěním síranu měďnatého a/nebo chloridu měďnatého a/nebo dusičnanu měďnatého ve vodě a/nebo metanolu a/nebo etanolu nebo ve směsích obsahujících vodu a/nebo
10 etanol a/nebo metanol, na koncentraci dvojmocných iontů mědi rovnou nebo vyšší než $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$.
3. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že doba inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi je rovna nebo vyšší než 1 sekunda.
- 15 4. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi proběhne při teplotě v rozmezí od -25°C do 50°C .
5. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi se provede před inkubací nebo po inkubaci
20 vzorku s etanolem a/nebo metanolem nebo formaldehydem nebo před nebo po usušení vzorku.
6. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi se provede před inkubací nebo po inkubaci vzorku ve vodném roztoku
25 etanolu a/nebo metanolu nebo formaldehydu, přičemž celková koncentrace etanolu a/nebo metanolu je rovna nebo vyšší než 10 % (obj./obj.) a doba inkubace v tomto roztoku je rovna nebo vyšší než 5 sekund a koncentrace formaldehydu ve vodném roztoku je rovna nebo vyšší než 0,1 % (hmotnost/obj.) a doba inkubace v tomto roztoku je rovna nebo vyšší než 10 sekund.
- 30 7. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že se mezi inkubací vzorku s etanolem a/nebo metanolem a inkubací vzorku s dvojmocnými ionty mědi vzorek obsahující buňky usuí.
8. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**,
35 že krok inkubace vzorku s dvojmocnými ionty mědi proběhne ve vodném roztoku, který vedle dvojmocných iontů mědi dále obsahuje alespoň jednu látku, vybranou ze skupiny zahrnující 4',6-diamidin-2-fenylindol, 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol a *N,N*-dimetyl- 4-[5-(4-metyl-1-piperaziny)[2,5'-bi-1*H*-benzimidazol]-2'-yl]benzenamin.
40
9. Způsob stabilizace buněk ve vzorku podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že koncentrace látky, vybrané ze skupiny zahrnující 4',6-diamidin-2-fenylindol, 2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, 2'-(4-etoxyfenyl)-5-(4-metyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol a *N,N*-dimetyl-4-[5-(4-metyl-1-piperaziny)[2,5'-bi-1*H*-benzimidazol]-2'-yl]benzenamin, je v rozmezí od $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do $0,1 \text{mol.l}^{-1}$.
45
10. Použití způsobu stabilizace buněk ve vzorku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9 pro stanovení množství buněk ve vzorcích.