

COMET ASSAY

(SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS)

OBSAH

1. Princip metody
2. Přístroje a zařízení
3. Příprava vzorků
 - 3.1 Kultivace a sklízení buněk A549
 - 3.2 Výpočet koncentrace buněk
 - 3.3 Hodnocení viability buněk trypanovou modří
4. Základní chemikálie a příprava roztoků
5. Vlastní pracovní postup
 - 5.1 Standardní alkalická verze
 - 5.2 Modifikovaná verze pro detekci oxidačního poškození
6. Hodnocení
7. Nebezpečné látky

1. PRINCIP METODY

Alkalická verze jednobuněčné gelové elektroforézy neboli kometového testu (Comet assay) umožňuje detekci jedno- a dvouřetězcových zlomů DNA na úrovni jednotlivých buněk. V alkalickém prostředí dochází k denaturaci DNA a při následné elektroforéze je DNA uvolňována z jádra a jako polyanion migruje ke kladné elektrodě. Čím větší je počet zlomů v DNA, tím větší množství DNA vycestovává z jádra., takže po obarvení objekty připomínají komety s hlavou obsahující zdravou DNA a ohonem obsahujícím poškozenou DNA. Po obarvení lze množství poškozené DNA kvantifikovat pomocí obrazové analýzy.

2. PŘÍSTROJE a ZAŘÍZENÍ

Elektroforéza

Zdroj napětí : model OSP-300, Owl, USA

Box na horizontální elektroforézu: model A-5, Owl, USA

Obrazová analýza

Fluorescenční mikroskop VANOX – BHS, Olympus, Japonsko

Černobilá kamera UDS CCD – 1300B

Software - Comet assay analyser Lucia G , LIM, Praha

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

3. PŘÍPRAVA VZORKŮ

3.1 Kultivace a sklizení buněk A549

Buňky A549 kultivujeme v 25 cm² lahvích s 10 ml kultivačního média (DMEM s 10% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) do 70-80% konfluence. Poté buňky inkubujeme v 10 ml aplikačního média (DMEM s 1% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) se vzorky testované látky v termostatu při teplotě 37°C, 4 a 24h. Po 4/24 hodinách následuje nesterilní sklizení buněk.

- 1) Z kultivační lahvičky slijeme médium, přidáme 1 ml trypsinu, slijeme, opět přidáme 1 ml trypsinu a slijeme.
- 2) Buňky inkubujeme v termostatu při 37°C 5-10 minut.
- 3) Přidáme 1 ml vychlazeného PBS a přeneseme Pasteurovou pipetou do popsaných zkumavek. Chráníme před světlem a uchováváme v lednici. Následuje zpracování na Comet Assay (standardní alkalická verze či modifikovaná verze pro oxidační poškození).

Chemikálie a roztoky

Inkubace buněk A549

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1.0 g/L glucose, with pyruvate,
without L glutamine (LONZA BE12-707F/12)

Fetal bovine serum (FBS), EU standard (LONZA DE14-801F/12)

L-glutamine (200 mM) (LONZA BE17-605E)

Gentamicin sulfate 10 mg/ml (LONZA 17-519L)

Trypsin/EDTA (1x) contains 0.5 g/L trypsin 1:250 and 0.2 g/L Versene® (EDTA) (LONZA
BE17-161E)

DMSO (Sigma D2650)

PBS (Phosphate Buffered Saline, pH=7.4)

3.2 Výpočet koncentrace buněk

- 1) Do Bürkerovy komůrky dát 50 µl buněčné suspenze, přikrýt krycím sklem a nechat stát cca 2 – 5 min
- 2) Spočítat buňky v **16 velkých čtvercích** (= 0.064 mm³, tj. **0.064 µl**)
- 3) Spočítat koncentraci buněk v 1 ml (**X**) podle vzorce:

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

$$X = \frac{N \text{ (počet buněk)}}{0.064} \times 1000 \text{ (x 2)}$$

2x se násobí, je-li suspenze ředěná 1 : 1 trypanovou modří pro výpočet viability

3.3 Hodnocení viability buněk trypanovou modří

Příprava trypanové modří:

0.2% roztok v PBS

Postup:

- 1) 50 μ l vzorku + 50 μ l 0.2% roztoku trypanové modří.
- 2) 50 μ l obarvené suspenze kápnout na sklíčko s mřížkou.
- 3) Přikrýt krycím sklíčkem.
- 4) Hodnotit poměr živých buněk (neobarvené, silně světlolomné) a mrtvých buněk (modré) z celkového počtu 100 hodnocených buněk na vzorek.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

4. ZÁKLADNÍ CHEMIKÁLIE a PŘÍPRAVA ROZTOKŮ:

(vše Sigma Aldrich, pouze NaCl – Lachema)

Na₂EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate)

Triton X-100

TRIS (trispufr hydrochlorid, trizma hydrochloride)

NaOH

NaCl

DMSO

Ethidium bromid

ZÁSOBNÍ ROZTOKY

Pufrovaný fyziologický roztok PBS (bez Ca⁺⁺ a Mg⁺⁺)

pH 7.4, skladovat při 4°C

NaCl 8.00 g

KCl 1.44 g

KH₂PO₄ 0.24 g

Na₂HPO₄ 1.44 g

Přidat 800 ml destilované deionizované vody, upravit pH na 7.4 a doplnit do 1 l

Lyzující roztok (zásobní)

pH 10, skladovat při pokojové teplotě

2.5 M NaCl 146.40 g

100 mM EDTA 37.20 g

10 mM Tris 1.20 g

upravit pH na 10 cca 8.00 g pevného NaOH

přidat 800 ml deioniz. H₂O, doladit pH na 10, doplnit objem do 1 l, autoklávovat

Pufr na alkalickou elektroforézu (300 mM NaOH/1 mM EDTA)

Připraví se těsně před pokusem z následujících zásobních roztoků:

1) 10 N NaOH

2) 200 mM EDTA (7.4448 g EDTA ve 100 ml deioniz. H₂O)
životnost cca 2 týdny!!!

Neutralizační pufr (TRIS)

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

pH 7.5, skladovat při pokojové teplotě – nestabilní pH !

0.4 M TRIS 48.5 g

doplnit do 1000 ml deioniz. H₂O

upravit pH na 7.5 koncentrovanou HCl

Barvicí roztok (zásobní)

0.1% roztok ethidium bromidu (0.1 g ve 100 ml deioniz. H₂O), skladovat při pokojové teplotě

LMP (low melting point) agaróza (červená)

(Amresco, USA: Agarose II for low –gel applications

Skladovat při 4°C, expirace po 2 měsících – každou várku označit datem !

0.75% agaróza: 0.15 g ve 20 ml PBS

- 1) zahřívát na magnetické míchačce až k bodu varu, kdy se agaróza rozpustí
- 2) odstavit, znovu zahřát k bodu varu
- 3) bod 2) zopakovat
- 4) **rozplnit po 160 µl** do červených eppendorfek

NMP (normal melting point) agaróza (modrá)

(Sigma: Agarose Type I, low EEO)

Skladovat při 4°C, expirace po 2 měsících – každou várku označit datem !

0.75% agaróza: 0.15 g ve 20 ml PBS

příprava stejná jako u LMP agarózy až po bod 3

- 4) **rozplnit po 250 µl** do zelených eppendorfek

Potahování podložních skel agarózou

- 1% vodný roztok obyčejné agarózy nalít do úzké, vysoké kádinky
- namočit sklíčko, otřít spodní stranu, nechat zaschnout a 20 min sušit v pícece při 60°C
- stranu bez agarózy označit diamantem

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

V den pokusu připravit:

A) LYZUJÍCÍ ROZTOK:

- 1) čerstvý Triton X-100 100x ředit v zásobním lyzujícím roztoku, mixovat na magnetické míchačce
- 2) 17 ml 10% DMSO
- 3) promíchat a vychladit na 4°C v ledničce !

Propočet:

1 fotomiska = 10 preparátů = 168.5 ml roztoku

- 1.5 ml Triton X-100
- 150 ml zásobní lyzující roztok
- 17 ml 10% DMSO (2 ml DMSO + 18 ml deioniz. dest. H₂O)

2 fotomisky = 20 preparátů = 337 ml roztoku

- 3 ml Triton X-100
- 300 ml zásobní lyzující roztok
- 34 ml 10% DMSO (4 ml DMSO + 36 ml deioniz. dest. H₂O)

2 fotomisky + 1 malá fotomiska (24 preparátů) = 421.25 ml

- 3.75 ml Triton X-100
- 375 ml zásobní lyzující roztok
- 42.5 ml 10% DMSO (5 ml DMSO + 45 ml deioniz. dest. H₂O)

B) PUFŘ NA ELEKTROFORÉZU:

Zásobní roztok NaOH 60 ml

Zásobní roztok EDTA (200 mM) 10 ml

Doplnit v odměrné baňce deioniz. dest. H₂O do 2000 ml

C) ETHIDIUM BROMID

zásobní roztok EB 50 µl

destil. voda 900 µl

D) OSTATNÍ

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

- podložní skla potažená agarózou + mikrotužka na popis
- krycí skla 22 x 22 mm
- LMP agaróza
- NMP agaróza
- mikropipety a sterilní špičky
- ledová tříšť, polystyrénová krabice
- minutka

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

5. VLASTNÍ PRACOVNÍ POSTUP

5.1 Standardní alkalická verze

(detekce alkalilabilních míst, jedno- a dvouřetězcových zlomů v DNA)

- 1) rozehrát agarózu NMP i LMP při 90°C a po roztavení přemístit LMP do vodní lázně 37°C
- 2) kápnout 110 µl NMP agarózy (min. 60°C teplé) na podložní sklo (předehřáté na ploténce na 50°C) a ihned překrýt krycím sklíčkem, nechat ztuhnout na ledu 5 min (z 1 eppendorfky připravíme 2 skla)

Následující kroky při žlutém světle !

- 3) do eppendorfky se 150 µl LMP přidáme 20 µl buněčné suspenze (koncentrace buněk 10⁶/ml) a dobře promíchat
- 4) opatrně odstranit krycí sklo z vrstvy NMP a kápnou 75 µl LMP agarózy s buňkami, přikrýt krycím sklem a nechat ztuhnout na ledu 5 min (z 1 eppendorfky 2 preparáty)
- 5) opatrně odstranit krycí sklo a pomalu ponořit preparát do vychlazeného lyzujícího roztoku, chránit před světlem – umístit do ledničky minimálně na 1 hod (maximálně 24 hod)
- 6) vyjmout preparáty z lyzujícího roztoku a ponořit do alkalického pufru na elektroforézu na 20 min = **unwinding** (čas nutno otestovat pro různé typy buněk; obecně – čím delší unwinding, tím větší množství DNA vycestuje z jádra)
- 7) naplnit box na elektroforézu alkalickým pufrem a nastavit napětí na 36 V a proud 300 mA (hodnota napětí závisí na velikosti použitého boxu, hodnota proudu se reguluje objemem pufru)
- 8) preparáty umístit do boxu popisem směrem k anodě (kladná elektroda – směr migrace DNA)
- 9) elfo 30 min při 4°C (16°C)
- 10) 3x neutralizace 1 ml 0.4 M TRIS pufru po 5 min
- 11) slít neutralizační pufr, kápnout 100 µl roztoku ethidium bromidu a přikrýt krycím sklem – 8 min.
- 12) stáhnout krycí sklo, promýt dest. vodou 3 x 5 min a po posledním promytí kápnout 100 µl dest. vody a přikrýt krycím sklem

Preparáty mohou být uchovávány v ledničce ve vlhkém prostředí, optimální je hodnocení po 1 – 24 hodinách.

Sušené preparáty pro pozdější hodnocení

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

A) Fixace a sušení

- po ukončení elektroforézy 2x promýt 0.4 M TRISem (a 1 ml, 5 min)
- fixace methanolem – 100 µl, 15 min
- 2x promýt dest. vodou (1 ml, 5 min.)
- sušit na filtračním papíru přes noc

B) Hydratace a barvení

- agarózovou vrstvu opakovaně smáčet sterilní dest. vodou cca 1 hod
- slít vodu a standardně obarvit

5.2. Modifikovaná verze pro detekci oxidačního poškození

- 1) Standardní příprava preparátů
- 2) Ponoření preparátů do lysujícího roztoku
- 3) Za 1 hod - preparáty připravené pro Endo III a polovinu kontrolních promýt endopufrem (4°C) – 3x po 5 min
- 4) Přidat 40 µl roztoku Endo III (do kontrol endopufř), přikrýt krycím sklem a dát na 45 min do termostatu (37°C)
- 5) Za 1 hod 15 min - preparáty připravené pro FPG a druhou polovinu kontrolních promýt endopufrem (4°C) – 3x po 5 min
- 6) Přidat 40 µl roztoku FPG (do kontrol endopufř), přikrýt krycím sklem a dát na 30 min do termostatu (37°C)
- 7) Všechny preparáty přenést do roztoku na elektroforézu – unwinding 20 min
- 8) Elektroforéza 30 min, 36 V, 300 mA
- 9) Dále jako při standardním zpracování

Pozitivní kontrola: 100 µM H₂O₂

Rozpis na endopufř:

KCl (g)	7,45	14,9	29,8	37,25	44,7
Hepes (g)	9,53	19,06	38,12	47,65	57,18
EDTA (g)	1,46	2,92	5,84	7,30	8,76
BSA (g)	0,2	0,4	0,8	1,0	1,2
Objem (ml)	1000	2000	4000	5000	6000

Příprava enzymů:

Endo III (z r.1998, A. Collins, crued extract)

Ke 2 µl extraktu přidat 1000 µl endopufřu s BSA a rozplnit po 250 µl do eppendorfek a zamrazit. Před aplikací ředit 1 : 1 (250 µl + 250 µl endopufřu s BSA).

Na skličko se přidává **40 µl** – připravený roztok stačí na 12 skliček, celá dávka na 48 skliček. Zbylý pracovní roztok je možné zamrazit a znovu použít.

MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

FPG (z r.1998, A. Collins, crued extract)

Ke 2 μl extraktu přidat 600 μl endopufu s BSA a rozplnit po 50 μl do eppendorfek a zamrazit. Před aplikací ředit 1 : 10 (50 μl + 450 μl endopufu s BSA).

Na sklíčko se přidává **40 μl** – připravený roztok stačí na 12 sklíček, celá dávka na 144 sklíček. Zbylý pracovní roztok se vyhazuje.

6. HODNOCENÍ

Od každého vzorku se připravují dva preparáty, z každého preparátů se hodnotí 50 buněk, tj. celkem 100 buněk na vzorek. Stupeň poškození DNA se vyjadřuje jako %, „tail DNA“.

7. NEBEZPEČNÉ LÁTKY

Při manipulaci s ethidium bromidem (látka mutagenní a potencionálně karcinogenní) je třeba používat gumové rukavice a při vážení se vyvarovat vdechnutí jemných krystalků. Roztoky ethidium bromidu lze likvidovat filtrací přes aktivní uhlí.

NaOH a HCl leptají sliznice a kůži – veškeré manipulace s těmito látkami se provádějí v digestoři.