

## **MEDETOX**

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu  
(LIFE10 ENV/CZ/651)

# **ANALÝZA MARKERŮ OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ DNA, PROTEINŮ A LIPIDŮ PO *IN VITRO* APLIKACI LÁTEK NA BUNĚČNÉ KULTURY HEL a A549**

## **OBSAH**

1. Aplikace testovaných látek na buněčné kultury
2. Oxidační poškození DNA stanovené metodou ELISA
3. Detekce 8-oxodG v DNA
4. Oxidační poškození proteinů a lipidů
  - 4.1. Příprava buněčných lyzátů
  - 4.2. Stanovení koncentrace proteinů
  - 4.3. Stanovení oxidace proteinů v buněčných lyzátech metodou ELISA  
(karbonyl ELISA)
  - 4.4. Stanovení koncentrace 15-F<sub>2t</sub>-isoprostanu v buněčných lyzátech metodou  
ELISA (kit firmy Cayman, kat. č. 516351)

## **MEDETOX**

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

### **1. Aplikace testovaných látek na buněčné kultury**

1. Buňky kultivujeme v 75 cm<sup>2</sup> lahvích s 15-30 ml kultivačního média (S 10% FCS) do 80-90% konfluence.
2. Nahradíme médium 10 ml čerstvého média s 1% fetálního séra (FCS), přidáme testované látky a inkubujeme příslušnou dobu v inkubátoru (37°C).
3. Buňky seškrábeme pomocí škrabky, převedeme do 15 ml zkumavky a opláchneme kultivační láhev 5 ml roztoku PBS (pH 7,4).
4. Zcentrifugujeme 3000 ot./min, 5 min. při 4 °C.
5. Odsajeme supernatant, resuspendujeme ve 13 ml PBS (pH 7,4) a opakujeme krok 4.
6. Odsajeme supernatant, resuspendujeme ve 4 ml PBS (pH 7,4), odebereme 1 ml do mikrozkušavky označené názvem projektu Medetox a číslem vzorku (suspenze bude použita pro stanovení oxidace proteinů a peroxidaci lipidů), zbylou suspenzi ponecháme v 15 ml zkumavce.
7. Zopakujeme krok 4, odsajeme supernatant a uchováme pelety při -70 °C, dokud nebude provedena analýza.

## MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

## 2. Oxidační poškození DNA stanovené metodou ELISA

### Roztoky

#### *Deferoxamine mesylate (DFA) (100 ml)*

0.1 mM deferoxamine mesylate (MW=656.8) 6.6 mg  
Skladovat při 4 °C.

#### *50 mM Tris*

Trizma-base 1.21 g  
0.1 mM DFA 200 ml  
Upravit pH na 7.4, skladovat při 4 °C.

#### *Extrakční pufr*

Trizma-base (MW 121.1) 2.42 g  
EDTA (MW 372.3) 3.72 g  
SDS-Sodiumdodecylsulphate (MW 268.4) 10.0 g  
Deferoxamine mesylate 66 mg  
dH<sub>2</sub>O 1.0 liter  
Skladovat při 4 °C

#### *RNáza mix*

Ribonuclease A (Sigma, R-5125) 10 mg  
50 mM Tris 1 ml  
Smíchat a inkubovat 10 min při 80 °C. Ochladit a napipetovat do lahvičky s Ribonuclease T1 (5000 u/ml, Sigma, R-1003), jemně promíchat. Rozdělit do mikrozkušavek a skladovat při -20 °C.

#### *Proteináza K*

10 mg/ml 0.1 mM DFA (for 40U/mg)  
Připravit před použitím

#### *5M NaCl*

NaCl 29.23g  
0.1 mM DFA 100 ml  
Skladovat při 4 °C

#### *CI (poměr 24 : 1)*

Chloroform 240 ml  
3-methyl-1-butanol 10 ml

## MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

Smíchat a přidat 80 ml of 50 mM Tris, skladovat při 4 °C

### *Phosphate-buffered saline (1x PBS)*

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Upravit pH na 7.4	
Přidat dH <sub>2</sub> O do	1 litr

### *PBS-DFA (0.1 mM DFA in 1x PBS)*

DFA	6.6 mg
1xPBS	100 ml

## Postup izolace DNA pro analýzu 8-oxodG

1. Zkumavky s peletami buněk vyjmeme z mrazáku a po rozmražení přidáme 1 ml extrakčního pufru, promícháme a přidáme 20 µl RNáza mix, inkubujeme 1 h při 37°C.
2. Ke každému vzorku přidáme 20 µl proteinázy K (5 mg/500 µl dH<sub>2</sub>O), inkubujeme 1,5 h při 37 °C.
3. Převědeme supernatant do 15 ml zkumavek obsahujících Phase Lock Gel, přidáme stejný objem (1 ml) roztoku CI s antioxidantem a intenzivně promícháme.
4. Centrifugujeme 5 minut při 3000 ot./min.
5. Převědeme horní fázi do 15 ml zkumavky a vysrážíme DNA přidáním 5M NaCl (100 µl; 1/10 objemu) a ledově studeného etanolu (2.2 ml; 2 objemy), důkladně promícháme.
6. Centrifugujeme 5 minut při 4000 ot./min. a převědeme DNA do mikrozkušavek pomocí špiček.
7. Ke vzorkům v mikrozkušavkách přidáme 1 ml 70% etanolu a zcentrifugujeme 5 minut při 6000 ot./min.
8. Vysušíme vzorky DNA ve vakuové odparce (20-25 min) a skladujeme při -70 °C, případně rozpustíme v roztoku PBS-DFA podle dále uvedeného postupu.
9. Ke vzorkům DNA přidáme PBS-DFA (50-100 µl pro DNA izolované z 75 cm<sup>2</sup> kultivačních lahví) a uchováme 30-60 min při 4 °C.

## **MEDETOX**

### **Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu**

**(LIFE10 ENV/CZ/651)**

10. Peletu DNA rozbijeme pomocí homogenizátoru (Pellet Pestle Motor, Sigma) a inkubujeme 40 min při 55 °C, v průběhu inkubace mícháme, aby se usnadnilo úplné rozpuštění DNA.
11. Případné nerozpuštěné části pelety odstraníme centrifugací 2 minuty při 6000 ot./min. a převedením supernatantu do nové mikroskopické kumavky.
12. Denaturujeme DNA 5 min při 100 °C, necháme schladnout 5 min při pokojové teplotě a fragmentujeme pomocí injekční stříkačky a jehly velikosti 22G.
13. Roztok naředíme 20x (2  $\mu$ l + 38  $\mu$ l PBS) a změříme absorbanci při 260 nm a 280 nm. Upravíme koncentraci přidáním PBS-DFA na výslednou hodnotu 0.75 – 1.25  $\mu$ g/ $\mu$ l.
14. Roztok skladujeme při -70 °C.

## MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

### 3. Detekce 8-oxodG v DNA

#### Roztoky

##### *Phosphate-buffered saline (PBS) (1000 ml)*

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
pH 7.4	

##### *Promývací pufr*

1x PBS	997.5 ml
10% NaN <sub>3</sub>	2 ml
Tween	500 µl

##### *PBS/Tween*

1x PBS	499.75 ml
Tween	250 µl

##### *Blokovací roztok (1% FCS v PBS/Tween)*

PBS/Tween	49.5 ml
FCS	500 µl

##### *1M diethanolamine*

52.5 g in 500 ml dH<sub>2</sub>O  
pH 8.6 pomocí konc. HCl

##### *0.01M diethanolamine*

1M diethanolamine	1 ml
dH <sub>2</sub> O	99 ml

##### *PBS-DFA (0.1 mM DFA in 1x PBS)*

DFA	6.6 mg
1xPBS	100 ml

## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

#### Postup detekce 8-oxodG v DNA

1. Vazba konjugátu 8-oxoG-BSA na mikrotitrační destičky (Corning Costar, cat. # 3690, Half Area Plates): použijeme 5 ng konjugátu 8-oxoG-BSA/jamku/25  $\mu$ l PBS, přednostně použijeme jen 60 vnitřních jamek, inkubujeme při 37 °C přes noc, destičku nezakrýváme víčkem.
2. Promyjeme destičku, blokuje přidáním 100  $\mu$ l blokovacího roztoku/jamku, 1 hod, při pokojové teplotě.
3. Naředíme primární protilátku (JaICA, Japonsko; 1:500 (výsledná konc. 0.2  $\mu$ g/ml) v blokovacím roztoku). Naředíme standard 8-oxodG (Sigma, cat. # H5653) v PBS a použijeme ho pro přípravu kalibrační křivky (koncentrace zásobního roztoku 8-oxodG je 1 mg/ml; 5 mg v 5 ml PBS):

8-oxodG (výsledná konc.)	8-oxodG (zásobní roztok, nebo předchozí ředění, $\mu$ l)	PBS ( $\mu$ l)
10 $\mu$ g/ml	10 (1 mg/ml)	990
100 ng/ml	10 (10 $\mu$ g/ml)	990
80 ng/ml	800 (100 ng/ml)	200
60 ng/ml	600 (80 ng/ml)	200
40 ng/ml	480 (60 ng/ml)	240
20 ng/ml	400 (40 ng/ml)	400
10 ng/ml	400 (20 ng/ml)	400
5 ng/ml	200 (10 ng/ml)	200
2.5 ng/ml	200 (5 ng/ml)	200
1.25 ng/ml	200 (2.5 ng/ml)	200

Připravíme vzorky bez kompetitoru (určují celkovou vazbu protilátky na destičku, 25  $\mu$ l PBS + 25  $\mu$ l roztoku protilátku/jamku) a vzorky bez protilátky (blank, absorbance pozadí, 25  $\mu$ l PBS + 25  $\mu$ l blokovacího roztoku/jamku).

4. Z destičky odstraníme blokovací roztok, přidáme 25  $\mu$ l vzorků DNA (konc. 0.75–1.25 mg/ml) a standardů 8-oxodG, 50  $\mu$ l vzorků bez kompetitoru a bez protilátky; po přidání vzorků a

## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu

(LIFE10 ENV/CZ/651)

standardů připipetujeme 25  $\mu$ l primární protilátky do všech jamek s výjimkou jamek bez kompetitoru a bez protilátky; inkubujeme 90 min při pokojové teplotě.

5. Promyjeme destičku, přidáme sekundární protilátku (anti-mouse, alkaline phosphatase conjugated, Sigma, cat. # A-4656) (50  $\mu$ l/jamku) naředěnou 1:750 v blokovacím roztoku a inkubujeme 90 min při pokojové teplotě.
6. Promyjeme destičku, propláchneme roztokem 0.01M diethanolaminu, přidáme 50  $\mu$ l substrátu (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium, 5 mg/tablet, Sigma) na jamku (2 tablety/10 ml of 1M diethanolaminu).
7. Inkubujeme 20-60 min při pokojové teplotě, změříme absorbanci při 405 nm (absorbance jamek bez kompetitoru má být mezi 0,5-1,0).
8. Vypočítáme koncentrace 8-oxodG ve vzorcích pomocí kalibrační křivky.



## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

#### 4. Oxidační poškození proteinů a lipidů

##### 4.1. Příprava buněčných lyzátů

1. Smícháme vzorek (minimální množství buněk:  $0.5-1 \times 10^6$ ) s 50-100  $\mu$ l CellLytic reagent (Sigma), inkubujeme 15 min při pokojové teplotě, opakovaně mícháme; centrifugujeme 15 min při 12,000 – 20,000 ot./min, 4 °C.
2. Opatrně odebereme buněčný lyzát (supernatant), skladujeme při -70 °C; použijeme 5  $\mu$ l lyzátu + 20  $\mu$ l vody (ředění 5x) pro stanovení koncentrace proteinů.

##### 4.2. Stanovení koncentrace proteinů

1. Rozpustíme hovězí sérový albumin (BSA) ve vodě (konc. zásobního roztoku 30 mg/ml) a připravíme kalibrační křivku:

BSA (výsledná konc. mg/ml)	BSA (zásobní roztok, nebo předchozí ředění, $\mu$ l)	Voda ( $\mu$ l)
3.0	100	900
2.5	500	100
2.0	400	200
1.5	300	100
1.0	200	100
0.5	150	150
0.0	0	300

2. Naředíme analyzované vzorky ve vodě 5x (5  $\mu$ l + 20  $\mu$ l water).
3. Smícháme bicinchoninic acid a  $\text{CuSO}_4$  (20 ml + 400  $\mu$ l/mikrotitrační destičku).
4. Napipetujeme na destičku v duplikátech 10  $\mu$ l naředěných vzorků a standardů.
5. Ke každému vzorku přidáme 200  $\mu$ l roztoku bicinchoninic acid +  $\text{CuSO}_4$  a inkubujeme 30 min při 37 °C.

## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

- Změříme absorbanci při 562 nm a s pomocí kalibrační křivky vypočítáme koncentraci proteinů ve vzorcích.

#### 4.3. Stanovení oxidace proteinů v buněčných lyzátech metodou ELISA (karbonyl ELISA)

##### Roztoky pro metodu Karbonyl ELISA

###### ***PBS - 10mM sodium phosphate buffer v 140 mM NaCl - pH 7.0 (Coating buffer)***

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (M.W. 141.96) = 1.4196 g/l

140mM NaCl (M.W. 58.44) = 8.1816 g/l

pH upravit na 7.0 pomocí HCl

###### ***0.1% BSA v PBS***

100 mg BSA v 100 ml PBS, pH 7.0

###### ***0.1% BSA, 0.1% Tween 20 v PBS***

100 mg BSA, 100 µl Tween 20 v 100 ml PBS, pH 7.0

###### ***Derivatizační roztok (100 ml) -10mM 2,4 DNPH, 6.0M Guanidine Hydrochloride, 0.5M Potassium Phosphate, pH 2.5***

198 mg 2,4-DNPH v 3.33 ml konc. kyselině fosforečné (85%)

57.318 g guanidine hydrochloride ve 25 ml vody (nutno zahřát, aby došlo k úplnému rozpuštění)

Přidat po kapkách roztok 2,4- DNPH za současného míchání

Upravit pH na 2,5 pomocí 10M KOH, přidat vodu do 100 ml.

###### ***10x PBS pro promývací roztok (1000 ml)***

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g

Rozpusť v 800 ml destilované vody, upravit pH na 7.4, doplnit do 1000 ml.

###### ***Promývací roztok (5000 ml)***

## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

10x PBS promývací roztok	500 ml
voda	4500 ml
10% NaN <sub>3</sub>	10 ml
Tween-20	2.5 ml

#### **2M TRIS**

24.2 g ve 100 ml vody

#### **2.5 M kyselina sírová**

2.68 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%)/100ml

### Postup derivatizace proteinů

1. S použitím standardu (oxidovaný BSA) připravíme kalibrační křivku. Naředíme zásobní roztok standardu (obsahuje asi 1,9-2,0 nmol karbonylových skupin/mg proteinu) pomocí PBS:

Konc. karbonylových skupin (nmol/mg proteinu)	Standard BSA (μl)	PBS (μl)
0.612	30	170
0.510	25	175
0.408	20	180
0.306	15	185
0.204	10	190
0.102	5	195
0	0	100

2. Naředíme analyzované vzorky v PBS tak, aby výsledná koncentrace proteinů ve vzorcích byla 2 mg/ml; v případě, že koncentrace proteinů je příliš nízká, mohou být vzorky naředěny až na výslednou koncentraci 0,4 mg/ml.
3. V mikrozkuvkách, nebo v 96-jamkových mikrodestičkách smícháme 10 μl derivatizačního roztoku (DNPH) a 10 μl vzorku naředěného v kroku 2; po naředění je výsledná koncentrace proteinů 1 mg/ml (příp. při nízké koncentraci 0,2 mg/ml).

## MEDETOX

### Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu (LIFE10 ENV/CZ/651)

4. Inkubujeme vzorky při pokojové teplotě ve tmě po dobu 45 min, mícháme každých 10-15 minut.
5. Zastavíme derivatizaci přidáním 30  $\mu\text{l}$  (tj. 1,5 objemu) 2M Tris, zamícháme.
6. Přidáme 5  $\mu\text{l}$  derivatizovaných vzorků do 1 ml Coating buffer (příp. při nízké koncentraci proteinů použít 25  $\mu\text{l}$  vzorku), celkový obsah proteinů ve vzorku je 2  $\mu\text{g}$ ; naředíme 12.5  $\mu\text{l}$  standardu a 1 ml Coating buffer; vzorky promícháme a napipetujeme na mikrotitrační destičku; další postup viz níže.

### Postup Karbonyl ELISA

1. Napipetujeme 200  $\mu\text{l}$  vzorků a standardů na mikrotitrační destičku (v duplikátech, nebo v triplicátech) a inkubujeme při 4 °C přes noc; jako blank použijeme derivatizovaný roztok PBS.
2. Promyjeme destičku promývacím puftrem (350  $\mu\text{l}$ /jamku) a blokuje v 0.1% BSA/PBS (250  $\mu\text{l}$ /jamku) 1,5 hod při pokojové teplotě.
3. Promyjeme destičku a přidáme primární protilátku anti-DNP (ředění 1:1500 v 0.1% BSA/0.1% Tween 20/PBS; tj. 16.6  $\mu\text{l}$ /25 ml pro 96-jamkovou destičku) (200  $\mu\text{l}$ /jamku); inkubujeme 1 hod při 37 °C.
4. Promyjeme destičku a přidáme konjugát streptavidin-křenová peroxidáza (ředění 1:4000 v 0.1% BSA/0.1% Tween 20/PBS; tj. 6.25  $\mu\text{l}$ /25 ml pro 96-jamkovou destičku) (200  $\mu\text{l}$ /jamku); inkubujeme 1 hod při pokojové teplotě.
5. Promyjeme destičku, přidáme substrát TMB (200  $\mu\text{l}$ /jamku) a inkubujeme při pokojové teplotě ve tmě po dobu 15-25 min.
6. Zastavíme reakci přidáním 2.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100  $\mu\text{l}$ /jamku).
7. Změříme absorbanci při 450 nm, odečteme absorbanci blanku a pomocí kalibrační křivky vypočítáme koncentrace karbonylových skupin ve vzorcích.

## MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu  
(LIFE10 ENV/CZ/651)

### 4.4. Stanovení koncentrace 15-F<sub>2t</sub>-isoprostanu v buněčných lyzátech metodou ELISA (kit firmy Cayman, kat. č. 516351)

#### Postup purifikace vzorků a ELISA

1. Napipetujeme buněčné lyzáty obsahující 50 µg proteinu do mikrozkušavek, přidáme vodu do objemu 100 µl, dále přidáme 100 µl of 15% KOH a inkubujeme 60 min při 40 °C.
2. Upravíme pH přidáním 300 µl 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (výsledné pH ~ 7.3), přidáme 100 µl roztoku Column buffer (Cayman, kat. č. 416358) (celkový objem je 600 µl; původní vzorek je naředěn 5x), zamícháme.
3. Přidáme 50 µl Isoprostane Affinity Sorbent (Cayman, kat. č. 416359), inkubujeme na třepačce 60 min při pokojové teplotě.
4. Centrifugujeme 1 min při 4000 ot./min, opatrně slijeme supernatant.
5. Přidáme 1 ml vody, zamícháme a centrifugujeme 1 min při 4000 ot./min, opatrně slijeme supernatant.
6. Resuspendujeme sediment v 0,5 ml Elution Solution (95% etanol ve vodě), promícháme a centrifugujeme 1 min při 4000 ot./min.
7. Supernatant přelijeme do nové mikrozkušavky; opakujeme promytí sedimentu v Elution Solution a spojíme oba supernatanty dohromady.
8. Centrifugujeme 1 min při 4000 ot./min, převedeme supernatant do nové mikrozkušavky.
9. Supernatant skladujeme při -70 °C až do doby analýzy. Případně okamžitě odpaříme ve vakuové odparce (trvá asi 2 hod), resuspendujeme ve 110 µl of EIA pufru (součást 8-Isoprostane EIA kitu) a hned použijeme pro analýzu.
10. Provedeme analýzu metodou ELISA podle návodu dodaného výrobcem (Cayman, 8-Isoprostane EIA Kit, cat. # 516351).