

## MEDETOX

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

### HODNOCENÍ VIABILITY BUNĚK TRYPANOVOU MODŘÍ

Živé a mrtvé buňky je možno rozlišit barvením. U buněk s narušenou plazmatickou membránou dochází k hromadění barviva a tím k obarvení buňky, nepoškozené živé buňky zůstávají neobarvené. Nejčastěji používanými metodami jsou barvení trypanovou modří a barvení fluoreskujícím propidium jodidem. Test vylučování trypanové modři je používán pro určení porušení strukturální integrity buněčné membrány. Barvivo nemůže vstoupit do buněk s neporušenou buněčnou membránou (živých buněk), proto tyto buňky zůstávají neobarvené. Pro prostup barvy musí být buněčná membrána již značně poškozená (mrtvé buňky), makromolekuly barviva těmito mezerami prochází a buňku obarví modře.

#### Roztoky

##### *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

##### *Trypanová modř*

0.2% roztok v PBS

#### Potřebné přístroje

Mikroskop Olympus CKX41

#### Materiál

Bürkerova komůrka

#### Postup hodnocení viability

- 1) Smícháme 50 µl vzorku s 50 µl 0.2% roztoku trypanové modři.
- 2) Kápneme 50 µl obarvené suspenze na sklíčko s mřížkou.
- 3) Přikryjeme krycím sklíčkem a hodnotíme pod mikroskopem.
- 4) Zhodnotíme 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)

### HODNOCENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE, VIABILITY A CYTOTOXICITY KOLORIMETRICKOU METODOU WST-1

Kolorimetrická metoda WST-1 je metoda, při které jsou tetrazoliové soli živých buněk metabolizovány mitochondriálními dehydrogenázami na formazan. Bunky inkubujeme s roztokem WST-1 (4-[3-(4-Iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen) 2h při 37°C na 96-jamkových destičkách a poté změříme absorbanci na spektrofotometru při 440 nm a při referenční vlnové délce 620 nm (referenční délka má být více než 600 nm - tam mají WST-1 i formazan stejnou absorpci).

#### Chemikálie a roztoky

***Cell proliferation reagent WST-1 (ROCHE Cat. No. 05015944001)*** (Colorimetric assay for the quantification of cell proliferation, cell viability, and cytotoxicity)  
Neotevřená lahvička vydrží skladovaná při -15 až -25 °C chráněna před světlem do data expirace. Po rozmrazení skladujeme při +2 až +8 °C, chráněné před světlem. Takto vydrží několik týdnů. Pro delší skladování je lépe skladovat alikvoty zamražené při -15 až -25 °C.

#### ***Etoposid ( $M_r=588.6$ )***

Připravit zásobní 20 mM roztok v DMSO: 11.8 mg/ml DMSO. Pro test cytotoxicity použít 2.5  $\mu$ l, resp. 5  $\mu$ l zásobního roztoku.

#### ***EOM (extractable organic mass) pro aplikaci***

EOM naředíme na zásobní roztok 10  $\mu$ g/ $\mu$ l v DMSO, zásobní roztok pak dále ředíme pomocí DMSO na pracovní roztoky: 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l.  
Pro test cytotoxicity použijeme vždy 10  $\mu$ l příslušného pracovního roztoku.

#### Potřebné přístroje a materiál

Inkubátor Jouan IG150 (37 °C)  
Centrifuga Eppendorf 5810 R  
Spektrofotometr na mikrotitrační destičky Spectra Max M5°  
Mikroskop Olympus CKX41  
Bürkerova komůrka  
Multikanálová pipeta Eppendorf (10, 50, 100  $\mu$ l)  
96-jamkové destičky, sterilní špičky

## **MEDETOX**

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

#### **Postup hodnocení cytotoxicity**

1. Napěstujeme buňky na 96-jamkové destičce v koncentraci  $1 \times 10^4$  / jamku ve 100  $\mu$ l media.
2. Přidáme 10  $\mu$ l / jamku reagentu WST-1.
3. Inkubujeme buňky 2 h v inkubátoru 37 °C.
4. Řádně protřepeme na třepačce 1 min.
5. Změříme absorbanci vzorků při 440 nm. Poté změříme absorbanci při 620 nm (referenční vlnová délka, která by měla být více než 600 nm - tam mají WST-1 i formazan stejnou absorpci).