



Cvičení 6 a 7: Metabolický test a jeho vyhodnocení

Cílem cvičení je provést metabolický CCK-8 test na připravené koncentrační řadě a následné vyhodnocení testu pomocí spektrofotometru. 24 hodin před cvičením, jsou nasazeny buňky do 96 jamkové destičky o různých koncentracích. V rámci cvičení je k buňkám přidána látka CCK-8, která je buňkami zpracována na jinak barevný formazan. Následně je měřena absorbance produkovaného formazanu, kdy naměřená absorbance odpovídá metabolické aktivitě buněk.

Spektrofotometr

Spektrofotometrie je analytická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s měřeným roztokem molekul. Je to metoda absorpční, která sleduje pohlcování (absorpci) záření vzorkem. Využívá vlnové délky (λ , nm) - z různých oblastí spektra elektromagnetického záření (UV/VIS) - každé barvě světla odpovídá určitá vlnová délka. Měříme tzv. absorbanci (A) vzorku – „jak moc světla bylo pohlceno měřeným vzorkem“. Výsledkem měření je absorpční spektrum, které zobrazuje závislost absorbance na vlnové délce látky - absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky (Lambert – Beerův zákon).

$$A = \epsilon bC$$

A .. absorbance

ϵ .. molární absorbanční koeficient

b .. tloušťka vrstvy (kyvety)

C .. molární koncentrace



Obrázek č. 1: spektrofotometr Tecan

CCK-8

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) je metabolický test, který umožňuje testování s použitím ve vodě vysoce rozpustné tetrazoliové soli WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfonfenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl] vytváří po redukci v přítomnosti elektronového nosiče ve vodě rozpustné formazanové barvivo. WST-8 je redukován dehydrogenázami v buňkách za vzniku žlutě zbarveného produktu (formazanu), který je rozpustný v kultivačním médiu. Množství formazanového barviva generovaného aktivitou dehydrogenáz v buňkách je přímo úměrné počtu živých buněk. Citlivost detekce CCK-8 je vyšší než u jiných tetrazoliových solí, jako jsou MTT, XTT, MTS nebo WST-1.



<https://www.youtube.com/watch?v=7u7cMZyKG9E>

Postup přípravy:

- 1) Připravte 10% roztok CCK-8 v kompletním médiu o požadovaném objemu a nechte ho cca 5 min nahřát v 37°C lázni.
- 2) Vyjměte předem připravenou 96jankovou destičku z inkubátoru. V této destičce jsou v jednotlivých řádcích nasazeny buňky v různých počtech na ml.
- 3) Odsajte médium v jednotlivých jamkách (postupujte maximálně po řádku) a po odsátí co nejrychleji napipetujte 100 µl roztoku CCK-8.
- 4) Takto připravenou destičku nechte alespoň 40 min inkubovat.
- 5) Po uplynutí časové lhůty vložte destičku do spektrofotometru a změřte absorbanci v jednotlivých jamkách.
- 6) Dokument s výsledky uložte.
- 7) **Během následujícího cvičení zpracujte získaná data, vyhodnoťte závislost absorbance na koncentraci buněk a diskutujte naměřené hodnoty.**

Vypracování protokolu (ze cvičení 6 a 7 dohromady)

- 1) Formální stránka (úprava, hlavička, úvod, popis praktické části, závěr)
- 2) Faktická stránka (potřebné chemikálie, buněčná linie a číslo pasáže, potřebný plastik, zpracování výsledků do tabulky a grafu)
- 3) Úvod – zadání cvičení, praktická část – popis cvičení a jednotlivých kroků, závěr – shrnutí cvičení, komentář a odpověď na případné otázky