Buněčné eseje a buněčná biologie 2021

Buněčná viabilita a toxicita
Apoptóza
Metabolické eseje
Kultivace buněk
Přístrojová technika

Promega Lonza cyto smart MOLECULAR DEVICES EASTPORT LIFESCIENCE

Tři nastupující trendy v oblasti buněčných esejí

Testování cytotoxicity, odhalování funkce proteinů, interakce biomolekul, měření buněčné signalizace, metabolismu, imunitní odpovědi, cílení léčiv a mnoho dalších experimentů závisí na buněčných esejích. V posledních letech sledujeme v oblasti moderních buněčných esejí několik trendů, které shrnujeme v následujícím textu. Zároveň vám představíme několik nových esejí, jimiž společnost Promega reaguje na vývoj v oboru a aktuální poptávku ze strany zákazníků.

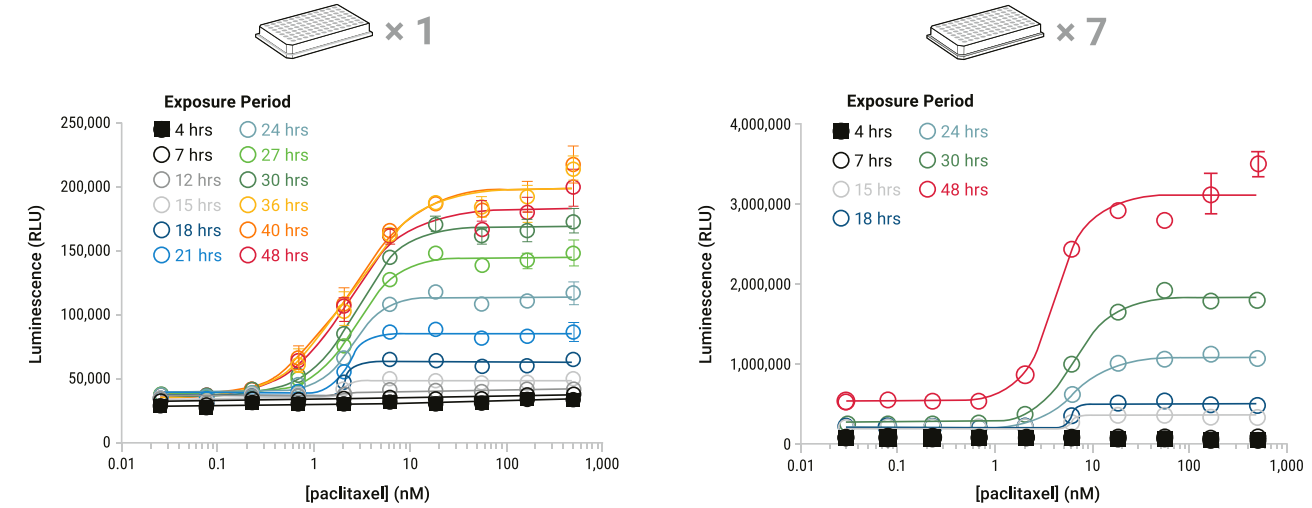
Kinetické eseje

U klasických end-point esejí získáme z každé jamky na destičce pouze jedno číslo. To může stačit, ale jen pokud přesně víme, kdy je ten správný moment pro měření sledovaného parametru. Častěji si nejsme jistí, kdy např. testovaná molekula začne působit na buňky toxicky nebo nás zajímá i kinetika buněčné odpovědi a ne jen konečný výsledek.

Pro tyto případy vyvinula firma Promega několik kinetických esejí pro sledování buněčné viability a apoptózy, které využívají luciferázu s nejlepšími parametry na trhu – NanoLuc. Příkladem takové eseje je **RealTime-Glo MT Cell Viability Assay**. Ta využívá NanoLuc prosubstrátu MT, který proniká do buněk, kde je redukován a uvolněn zpět do média. V médiu je pak zpracován NanoLuc luciferázou za emise záření. Další esej, **LDH-Glo**, která měří cytotoxicitu pomocí detekce laktát dehydrogenázy uvolněné z poškozených buněk, je také snadno adaptovatelná pro kinetická měření. Kinetické eseje jsou postupně uváděny na trh již od roku 2015 a ve světě i v Česku si tento přístup našel spoustu příznivců. V konečném součtu můžou pro vás kinetické eseje znamenat úsporu reagencií, plastu, buněk i času, jak je ilustrováno na **Obr. 1**.

Pro sledování kinetiky působení látek na buňky lze využít i tzv. label-free metody, kdy se viabilita buněk posuzuje čistě na základě analýzy obrazu buněk. Z fotografií buněk z time lapse experimentů lze pak vyhodnotit změny v konfluenci případně morfologii buněk. Pro label-free monitorování viability buněk jsou ideálními společníky kompaktní mikroskopy od firmy Cytosmart.

Katalogové číslo	Název
JA1011, JA1012	RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay
G9711, G9712, G9713	RealTime-Glo MT Cell Viability Assay
J2380, J2381	LDH-Glo Cytotoxicity Assay



Obr. 1 *Srovnání kinetických a endpoint esejí z hlediska spotřeby materiálu, buněk a reagencií*

3D eseje

Klasické 2D kultury imortalizovaných buněk špatně modelují mnoho procesů, které zajímají biomedicínu. Proto se začínají čím dál více prosazovat 3D modely ve formě organoidů, sféroidů, nebo orgánů na čipu, které mnohem lépe imitují přirozené podmínky v tkáních a nádorech.

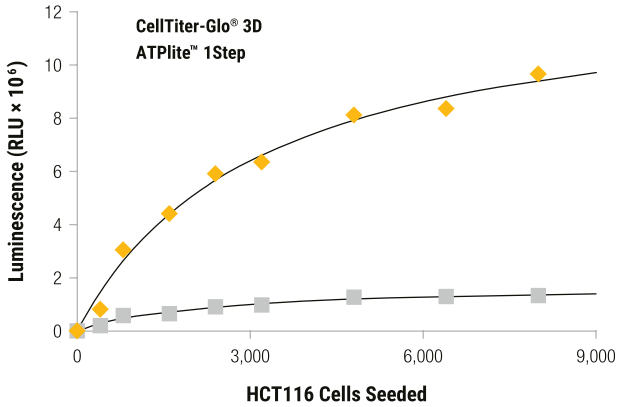
3D buněčné modely vyžadují modifikovanou chemii esejí, zejména pak intenzivnější podmínky pro lýzi, aby se materiál uvolnil skutečně ze všech buněk sféroidu/organoidu. Promega postupně optimalizuje své eseje pro 3D a již nyní můžete získat upravené verze nejpopulárnějších esejí pro měření buněčné viability a apoptózy CellTiter-Glo 3D a Caspase-Glo3/7 3D. Jsou to jediné eseje na trhu, které jsou skutečně optimalizované a validované pro 3D buněčné kultury.

Katalogové číslo	Název
G9681, G9682, G9683	CellTiter-Glo 3D Assay
G8981, G8982, G8983	Caspase-Glo 3/7 3D Assay

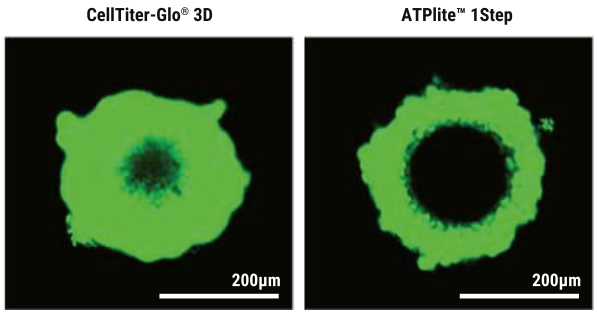
Studium proteinů na jejich přirozené úrovni exprese

Pokud studujeme proteiny pomocí overexprese, mohou být naše data zatížena řadou artefaktů. Nadbytek proteinu například způsobí jeho nesprávnou lokalizaci v buňce a narušení tvorby proteinových komplexů. Naštěstí máme v současnosti k dispozici lepší experimentální metody, které se více blíží přirozené situaci v buňce. Řešením je vložit peptidový nebo proteinový tag pomocí CRISPR-Cas9 přímo do genomu na C- nebo N-konec proteinu našeho zájmu. Takto zachováme jednak přirozenou úroveň exprese a také transkripční regulaci spojenou s genovým lokusem. Promega nabízí hned dvě praktické proteinové značky. Jednak krátký fragment NanoLuc luciferázy HiBiT (jen 11 aminokyselin), který lze pak jednoduše a specificky detekovat rekombinací s druhou LgBiT podjednotkou NanoLuc, anebo univerzální značku HaloTag. HaloTag je 34kDa monomerní proteinová značka odvozená od bakteriální dehalogenázy, která rychle a efektivně tvoří kovalentní vazbu s příslušnými ligandy obsahujícími chlorovaný halogenalkanový řetězec. Takovým ligandem pak může být fluorescenční barvivo nebo částice pro purifikaci a HaloTag tak lze použít pro široké spektrum aplikací včetně purifikace proteinů, superrozlišovací mikroskopie a nově i pro cílenou degradaci proteinů díky technologii PROTAC. Pokud chcete začít se značením endogenních alel pomocí CRISPR, nabízíme bezplatnou pomoc s návrhem sekvencí guide RNA a opravných DNA templátů.

Katalogové číslo	Název
N2420, N2421, N2422	Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System
N3030, N3040, N3050	Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System
N2410	Nano-Glo HiBiT Blotting System
G6270, G6280	HaloTag Protein Purification System
GA1110, GA1120, G1001, G8472	HaloTag Fluorescent Ligands



Obr. 2A *Srovnání signálu CellTiter-Glo 3D a konkurenční eseje na sféroidech různé velikosti*

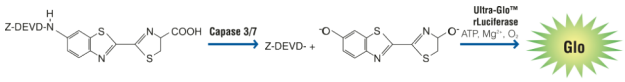


Obr. 2B *Průnik fluorescenčního indikátoru buněčné lýze CellTox Green do sféroidů 30 min po inkubaci v eseji*

Buněčné eseje pro sledování nástupu apoptózy

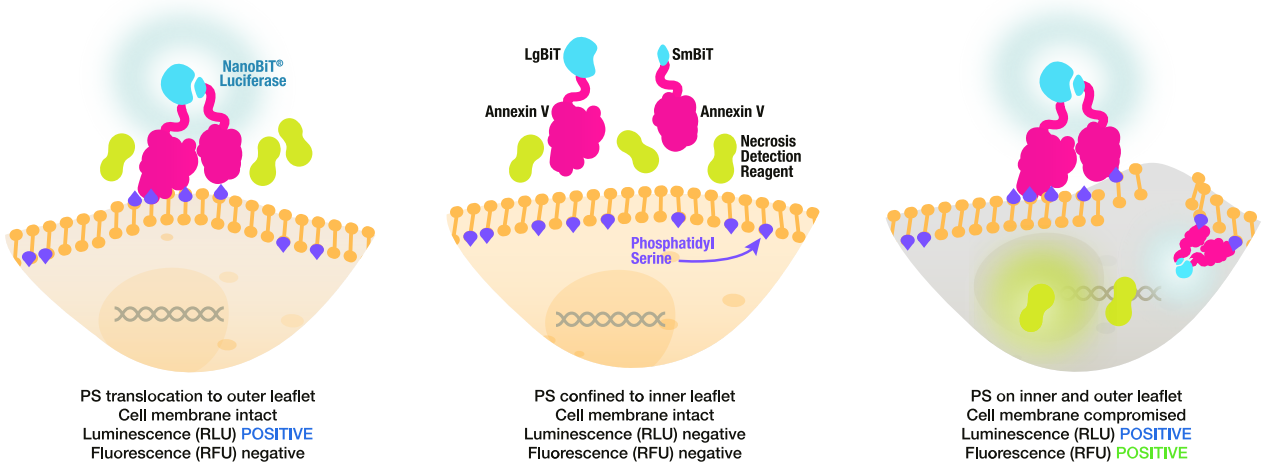
Apoptóza je spolu s nekrózou jedním ze dvou převažujících typů buněčné smrti. Nekróza je nejčastěji způsobena faktory jako je působení toxinů, infekce nebo trauma a je nezávislá na energii buňky v podobě ATP. Jedná se o nekontrolovaný proces rozkladu organel, který je završen prasknutím buňky a vylitím jejího obsahu do okolí, což může vyvolat zánětlivou odpověď. Apoptóza je oproti tomu čistý a přísně regulovaný proces, kterým se mnohobuněčné organismy zbavují poškozených nebo nepotřebných buněk. Při apoptóze je buňka rozložena zevnitř vlastními enzymy a po celou dobu si zachovává integritu buněčné membrány. Jedná se o energeticky náročný proces a buňky si po celou dobu apoptotického rozkladu zachovávají vyšší hladinu ATP. Nakonec dochází k rozpadu buňky na tzv. apoptotická tělíska, která jsou fagocytována makrofágy nebo okolními buňkami.

Na molekulární úrovni je apoptóza aktivovaná buď vnitřní nebo vnější drahou. Při aktivaci vnitřní dráhy dochází vlivem vnitřního poškození (např. poškozením DNA nebo virální infekcí) k uvolnění cytochromu c z membrány mitochondrií a následné tvorbě proteinového komplexu apoptozomu. Apoptozom aktivuje proteolytickou kaskádu, kde iniciátorová kaspáza-9 aktivuje efektorové kaspázy, které následně zajistí proteolytický rozklad buňky. Vnější dráha je spuštěna vazbou ligandů na receptory smrti na vnější straně cytoplazmatické membrány. To vede k aktivaci iniciátorové kaspázy-8, která přímo aktivuje efektorové kaspázy a zároveň zesiluje signál aktivací vnitřní dráhy. Efektorové kaspázy, zejména kaspáza-3 a 7, se staly jakožto klíčové molekuly jedním z významných markerů aktivace apoptózy a jejich detekce se často využívá pro testování účinku potenciálních léčiv proti rakovině. Dalším významným znakem apoptotických buněk je fosfolipid fosfatidylserin (PS) přítomný ve vnějším listu cytoplazmatické membrány. V apoptotické buňce se činností enzymů scrambláz ztrácí asymetrické rozložení fosfolipidů v cytoplazmatické membráně a dochází k otočení PS, který je za normálních okolností z 96 % na vnitřní straně membrány, ven z buňky. Zde pak slouží jako signál pro sousední buňky a makrofágy, aby apoptotické váčky fagocytovali.



Obr. 3 *Princip bioluminiscenčních Caspase-Glo esejí pro sledování nástupu apoptózy*

Aktivaci apoptotických kaspáz lze jednoduše sledovat pomocí bioluminiscenčních **Caspase-Glo** esejí od firmy Promega. Jedná se o endpoint eseje (měří se kaspázová aktivita v buněčném lyzátu) využívající modifikovaného substrátu aminoluciferinu, který je konjugovaný s peptidy specificky štěpenými jednotlivými kaspázami. Promega nabízí modifikované substráty s peptidy specifickými pro všechny typy kaspáz–iniciátorové i efektorové enzymy, vnější i vnitřní dráhy. Po odštěpení peptidu je aminoluciferin oxidován pomocí modifikované firefly luciferázy a generuje se luminiscenční signál. Eseje mají velmi vysokou citlivost a jednoduchý protokol, kdy stačí reagent přidat k buňkám v mikrotitrační destičce a po krátké inkubaci ihned měřit.



Obr. 4 *Princip detekce nástupu apoptózy pomocí RealTime-Glo Annexin V Apoptosis Assay*

Pro sledování nástupu apoptózy v reálném čase lze použít **RealTime-Glo Annexin V Apoptosis Assay**. Ta je založená na detekci PS na povrchu apoptotických buněk pomocí rozdělené NanoLuc luciferázy. Jednotlivé podjednotky NanoLuc jsou konjugovány s Annexinem V, který se specificky váže na PS. Při otočení většího počtu molekul PS ven z buňky dojde k vazbě Annexinu V a komplementaci sousedních podjednotek luciferázy (LgBiT a SmBiT), čímž se generuje luminiscenční signál.

Katalogové číslo	Název
G8090, G8091, G8092, G8093	Caspase-Glo 3/7
G8981, G8982, G8983	Caspase-Glo 3/7 3D
G8200, G8201, G8202, G8203	Caspase-Glo 8
G8210, G8211, G8212	Caspase-Glo 9
JA1000, JA1001, JA1011, JA1012	RealTime-Glo Annexin V Apoptosis Assay

Multiplexing

Všechny luminiscenční eseje lze kombinovat s komplementárními fluorescenčními esejemi. Příkladem takové eseje je např. **CellTox Green Cytotoxicity Assay**, což je netoxické interkalační barvivo, které neprochází přes membránu zdravých buněk. Při narušení integrity membrány se váže na jadernou DNA a násobně se zesílí jeho fluorescence. Lze tak detekovat nástup nekrózy a získat z jediného experimentu další informaci o probíhající buněčné smrti. Díky minimální toxicitě lze CellTox Green použít i pro kinetické měření v jediné jamce po dobu až 72 hodin.

Katalogové číslo	Název
G8741, G8742, G8743	CellTox Green Cytotoxicity Assay

Kombinace esejí pro multiplexní měření

	První esej, kterou používáte:	Komplementární eseje:	
Buněčná viabilita	**RealTime-Glo MT Cell Viability Assay**	**Cytotoxicita**	CellTox Green Cytotoxicity, CytoTox-Fluor Assays
		Buněčná viabilita	CellTiter-Glo 2.0 Assay
		Apoptóza	Caspase-Glo Assays
		Zánětlivé eseje	Caspase-Glo 1 Inflammation Assay
		Metabolické eseje	Glucose Uptake-Glo, Glucose-Glo, Lactate-Glo, Glutamate-Glo, NAD(P)/NAD(P)H-Glo Assays
		Aktivita CYP	P450-Glo Assays
		Exprese genů	ONE-Glo, Bright-Glo, Steady-Glo Assays
Apoptóza	**RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay**	**Buněčná viabilita**	CellTiter-Glo 2.0 Assay, CellTiter-Glo 3D, CellTiter-Fluor Assays
		Apoptóza	Caspase-Glo Assays
Buněčná toxicita	**CellTox Green Cytotoxicity Assay**	**Buněčná viabilita**	CellTiter-Glo 2.0 Assay, CellTiter-Glo 3D, RealTime-Glo MT Viability Assays
		Apoptóza	Caspase-Glo Assays
		Oxidační stres	ROS-Glo H2O2, NADP/NADPH-Glo, NAD/NADH-Glo Assays
		Glo reportérové eseje	Bright-Glo, Steady-Glo, ONE-Glo, Dual-Glo, Dual Luciferase Reporter Assays
		Signalizace	cAMP-Glo Assay
		Zánětlivé eseje	Caspase-Glo 1 Inflammation Assay
Buněčná viabilita nebo toxicita	**CellTiter-Fluor or CytoTox-Fluor Assays**	**Buněčná viabilita**	CellTiter-Glo 2.0 Assay
		Cytotoxicita	CytoTox-Glo, CytoTox-Fluor Assays
		Apoptóza	Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7, Caspase-Glo Assays
		Oxidační stres	GSH-Glo, ROS-Glo H2O2 Assays
		Metabolické eseje	Glucose Uptake-Glo, Glucose-Glo, Lactate-Glo, Glutamine/Glutamate-Glo Assays
		Exprese genů	Bright-Glo, Steady-Glo, ONE-Glo, Dual-Glo, Dual Luciferase Reporter Assays
		Aktivita CYP	P450-Glo Assays

Tab. 1 *Možné kombinace esejí pro měření v multiplexu*

Jak vybrat správný buněčný model

Buňky používané v buněčných esejích musí splnit několik základních podmínek. Především musí věrně modelovat systém, který je předmětem výzkumu. Musí exprimovat příslušné receptory a signální molekuly a být responsivní k testovaným signálům. Různé typy buněk se mohou lišit v citlivosti na stres nebo testované sloučeniny, které jsou cytotoxické nebo způsobují apoptózu. Stejné činidlo, které indukuje apoptózu v jedné buněčné linii, nemusí mít žádný účinek na jinou buněčnou linii, nebo činidlo, které indukuje apoptózu ve dvou různých buněčných liniích, tak může činit s radikálně odlišnými časovými průběhy.

Nejčastěji používané jsou imortalizované buňky, např. fibroblasty nebo rakovinné linie. Tyto buňky se snadno pěstují a transfekují, nicméně mohou mít nestabilní genom či mutace v důležitých signálních proteinech způsobující nefyziologickou aktivaci proliferativní signalizace nebo blokaci apoptotické dráhy. Alternativou k buněčným liniím jsou primární buňky, např. hepatocyty, HUVEC nebo keratinocyty, které mohou poskytovat přesnější obraz typické situace *in vivo*, ale může být obtížnější je pěstovat a transfektovat. Nicméně i pro primární buňky máme v nabídce řešení od firmy Lonza a to pro kultivaci i transfekci.

Primární a kmenové buňky + média Lonza

Speciální médium Lonza

- Primární buňky a média Clonetics™ – přes 150 lidských a živočišných buněčných typů
- Špičková kultivační média a růstové faktory optimalizované pro širokou škálu primárních buněk
- Kmenové buňky a média pro jejich růst a diferenciaci
- Krevní a imunitní buňky (pestrý fond dárců, doporučená média pro kultivaci: X-VIVO™. Typy tkání, z nichž jsou buňky získávané: kostní dřeň, periferní krev – získaná aferezí, mobilizovaná krev, plná krev, pupečníková krev)
- Klasická média a pufry

Primární buňky Lonza

Katalogové číslo	Název
CC-3150	MEGM BulletKit (CC-3151 & CC-4136)
CC-3170	BEGM BulletKit (CC-3171 & CC-4175)
CC-3162	EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176)
CC-4127	REGM SingleQuot Kit Suppl&Growth Factors
CC-2511	NHDF-Ad-Der Fibroblasts FGM-2, cryo amp
00192627B	Adult Keratinocyte Cell Culture Kit
BELN12-730Q	Insect-XPRESS w/ L-Gln 1 L
BE04-380Q	X-Vivo 10 w/ Gentamycin and PR, 1L
12-604F	DMEM 4.5 g/L Glucose w/ L-Gln, 500 ml
17-516F	PBS-1X, w/o Ca++, Mg++ 500 ml
17-737E	HEPES Buffer,1M in normal saline,100ml
17-512F	DPBS-1X w/o Ca++, Mg++ 500 ml

Séra Capricorn Scientific

Capricorn Scientific je inovativní německá firma založená v roce 2013 a její snahou je zvýšit standard na poli buněčných kultur. Firma vyrábí a dodává pro-

Séra Capricorn

dukty pro kultivace, skladování a separace buněk a to pro vědecké i pro výrobní účely. Hlavní produktové řady jsou lidská a zvířecí séra (hovězí, koňské, kozí, prasečí, myší a králičí).

Katalogové číslo	Název
FBS-HI-11B	Fetal Bovine Serum Advanced, Collected in South America, Heat Inactivated
HUM-3B	Human Serum, Type AB

3D kultivace a kokultivace buněk pomocí systému RAFT™ 3D Lonza

Jak už bylo řečeno dříve, 3D buněčné kultury poskytují přesnější experimentální model než klasické 2D kultury díky vzájemnému kontaktu buněk, interakci buněk s mezibuněčnou hmotou a mechanickým vlastnostem prostředí, které jsou bližší fyziologické situaci než sklo nebo plast. Nejčastěji používanými modely jsou sféroidy, které mohou být kultivované v adhezivních destičkách, visících kapkách nebo na strukturovaných površích. Druhou možností je pak kultivace v hydrogelech tvořených proteiny mezibuněčné hmoty nebo složených ze syntetických materiálů, které fungují jako mechanická opora pro buňky a umožňují jim růst ve všech směrech a zaujmout přirozenější tvar.

Firma Lonza nabízí řešení pro jednoduchou a standardizovanou přípravu 3D kultur v hustém kolagenovém gelu v klasických kultivačních destičkách.

RAFT 3D kit Lonza

Pomocí RAFT 3D systému lze za méně než hodinu připravit robustní 3D kultury pro rozličné následné aplikace. Snadno lze připravit např. 3D model rohovky, průdušek nebo dalších tkání a lze kokultivovat i více typů primárních buněk. Systém se dodává jako sada se všemi reagenciemi a materiálem (destička, kolagen typu 1, MEM médium, absorbéry, neutralizační roztok, nádoby na míchání) a „start-up“ protokoly. K dispozici je formát 24 jamek, 24 jamek s „trans-well“ insertem a 96 jamek.

Katalogové číslo	Název
016-1R10	RAFT™ 96-well Kit
016-1R24	RAFT™ 24-well Kit
016-1R25	RAFT™ 24-well Insert Kit

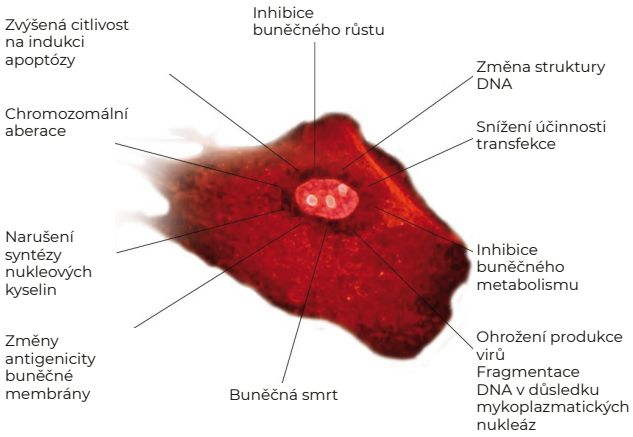
Spokojené buňky – nutná podmínka pro úspěšné buněčné eseje Lonza

Pro úspěšné a opakovatelné buněčné eseje je klíčové používat jen buňky v dobré kondici. Doporučujeme proto nastavit si pro vaše buněčné kultury standardní postupy, které zaručí, že minimalizujete proměnlivost buněk mezi jednotlivými experimenty. Pokud budete pasážovat buňky včas, ve stejných intervalech a vždy ředit na stejnou hustotu, omezíte na minimum tento potenciální zdroj variability vašich dat. Důležité je také používat kvalitní média s přísně kontrolovaným složením a minimálními rozdíly mezi šaržemi. Je vhodné buňky pravidelně testovat na přítomnost mykoplazmat.

MycoAlert™ kity Lonza

MycoAlert kit je univerzální bioluminiscenční metodou pro testování kontaminací mykoplazmou v buněčných kulturách. Detekuje všechny běžné

řády třídy *Mollicutes* (*Mycoplasma, Acholeplasma*, *Entomoplasma* a *Spiroplasma*, kromě *Ureaplasma*) a je určen pro měření v kyvetových nebo destičkových luminometrech a multi-mode readerech. Jedná se o pohodlnou a rychlou metodu.



Obr. 5 *Nebezpečí, která přinášejí buňkám Mykoplazmata*

- Jednoduše přidejte dvě reagencie do supernatantu kultivačního média
- Proveďte dvě měření luminiscence
- Výsledky za méně než 20 minut
- Jednoduchá interpretace výsledků

Lucetta™ 2 Luminometr Lonza

Lucetta 2 je malý a snadno přenosný přístroj pro měření chemiluminiscence a bioluminiscence ve zkumavkách. Mezi hlavní výhody přístroje patří:

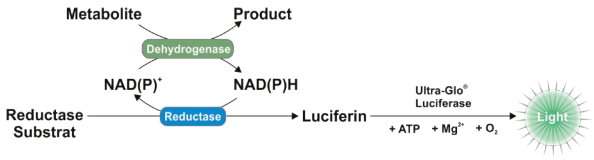
- Vysoká citlivost a linearita
- Přednastavený mód pro detekci mykoplazmat pomocí MycoAlert™ kitu
- Vhodný i pro měření buněčné proliferace, cytotoxicity nebo reportérových esejí

Katalogové číslo	Název
LT07-701	MycoAlert PLUS detection kit
AAL-1002	Lucetta™ 2 Luminometer

Lucetta 2 Luminometer Lonza

Metabolické eseje

Glukóza je klíčovou energetickou molekulou pro většinu buněk. Za normálního stavu je metabolizována na acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu a následně je generována energie v podobě ATP skrze oxidativní fosforylaci. V době růstu a proliferace zvyšují buňky svůj příjem glukózy, metabolizují ji primárně glykolýzou s tvorbou laktátu a vznikající meziprodukty jsou odváděny do syntetických drah. Rostoucí buňky přijímají ve větší míře glutamin, který dodává palivo do citrátového cyklu, aby se udržela produkce ATP. Glutamin může být konvertován na další aminokyseliny (hlavně glutamát), které jsou potřebné pro syntézu nových proteinů. Navíc je i jedním ze stavebních kamenů glutathionu, který pomáhá kontrolovat hladinu volných radikálů. U proliferujících buněk, jako jsou rakovinné buňky, dochází k metabolickému posunu k tzv. aerobní glykolýze. Ta je charakteristická výrazně vyšším příjmem glukózy a kyslíku a sekrecí laktátu. U takových buněk dochází ke zvýšenému příjmu glutaminu z důvodu vyšší potřeby energie a aminokyselin pro proteosyntézu. Zvýšená glykolýza je také indikátorem aktivace imunitních buněk, které se musí rychle množit, aby chránily organismus před patogeny.



Obr. 5 *Princip detekce metabolitů pomocí luminiscenčních esejí firmy Promega. Metabolit je oxidován svojí specifickou dehydrogenázou a ve spřažené reakci je z něj přenášen proton na luciferinový prosubstrát. Ten je pak zpracován Ultra-Glo luciferázou a generuje luminiscenční signál.*

Zajímají vás změny metabolismu v nádorech, u metabolických poruch, diabetu nebo třeba v průběhu embryonálního vývoje? Luminiscenční metabolické Glo eseje od firmy Promega vám pomohou získat kvantitativní a opakovatelná data. Všechny eseje jsou založeny na identickém principu, kdy je sledovaný metabolit specificky oxidován příslušnou dehydrogenázou, která přenáší elektrony na oxidovaný kofaktor NAD+. Ve spřažené reakci je pak speciální reduktázou redukován proluciferinový substrát na luciferin a generuje se luminiscenční signál pomocí Ultra-Glo luciferázy. Díky luminiscenční detekci vykazují eseje vysokou citlivost, nízké pozadí a jsou

vhodné i pro „high-throughput“ screening v 96 a 384-jamkových destičkách. Promega je jediná firma, která v současnosti nabízí luminiscenční varianty metabolických esejí. Sledovat lze celou řadu metabolitů – **Lactate-Glo, Glucose-Glo**, **Glutamate-Glo, Glutamine/Glutamate-Glo**. Nově lze využít i luminiscenční eseje pro sledování metabolismu lipidů **Glycerol-Glo**, **Triglyceride-Glo** a **Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo.** Brzy budou na trh uvedeny i eseje pro stanovení glykogenu a aminokyselin s rozvětveným postranním řetězcem **Glycogen-Glo** a **BCAA-Glo**. Na podobném principu, jako je popsáno výše, funguje i esej pro měření vstupu glukózy do buněk **Glucose Uptake-Glo**, která se svojí citlivostí blíží radioaktivním esejím, ale nemá jejich nevýhody (nutnost důkladného promývání, radioaktivní odpad).

Katalogové číslo	Název
J5021, J5022	Lactate-Glo
J6021, J6022	Glucose-Glo
J7021, J7022	Glutamate-Glo
J8021, J8022	Glutamine/Glutamate-Glo
J3150, J3151	Glycerol-Glo
J3160, J3161	Triglyceride-Glo
J3190, J3191	Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo
J1341, J1342, J1343	Glucose Uptake-Glo
	Glycogen-Glo*
	BCAA-Glo*

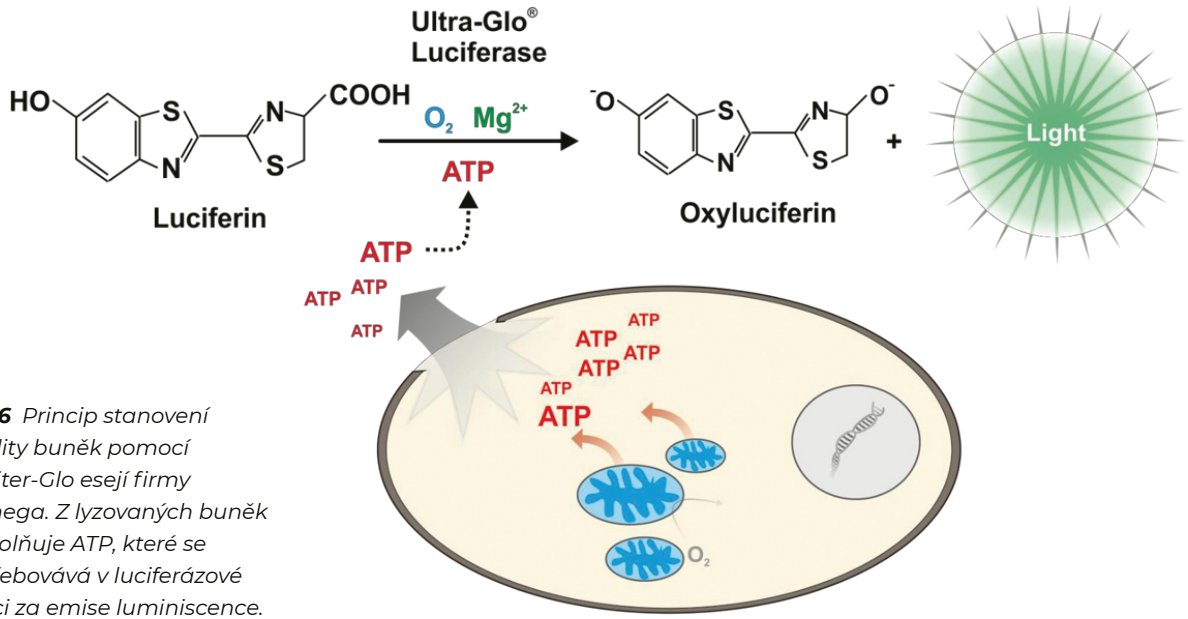
** Custom produkt dostupný na vyžádání, pro objednávku a vyzkoušení nás kontaktujte*

CellTiter-Glo – osvědčené řešení pro váš drug screening

CellTiter-Glo Assay je již dlouhou dobu nejcitlivějším mikrodestičkovým testem viability buněk na trhu. V této endpoint eseji se měří množství ATP uvolněné z živých buněk po lyzi. ATP vstupuje do ATP-dependentní luminiscenční reakce, kterou katalyzuje Ultra-Glo luciferáza (moderní varianta Firefly luciferázy) za vzniku luminiscence. Tato esej má schopnost detekovat 10 živých buněk v klasické 2D buněčné kultuře. Navíc má tato metoda díky luminiscenční modalitě detekce bezkonkurenční lineární rozsah 10 – 50 000 buněk. Esej nemusí sloužit pouze ke kvantifikaci buněčné viability, ale pro mnoho výzkumníků je zajímavá i přímo pro stanovení hladiny ATP v buňkách (za pomoci ATP kalibrační přímky).

Novější verzí této eseje je CellTiter-Glo 2.0, které poskytuje vyšší stabilitu signálu a pohodlí při měření viability vašich buněk. Oproti klasické verzi má verze 2.0 vyšší stabilitu, jak za laboratorní teploty, tak i ve 4 °C při zachování citlivosti a širokého lineárního rozsahu. Reagent lze dlouhodobě skladovat v chladničce, čímž se eliminuje nutnost následného rozmrazování alikvotů před každým měřením.

Katalogové číslo	Název
G7570, G7571, G7572, G7573	CellTiter-Glo
G9241, G9242, G9243	CellTiter-Glo 2.0



Obr. 6 *Princip stanovení viability buněk pomocí CellTiter-Glo esejí firmy Promega. Z lyzovaných buněk se uvolňuje ATP, které se spotřebovává v luciferázové reakci za emise luminiscence.*

Jak citlivost a crosstalk ovlivňují výsledky bioluminiscenčního měření

Široká škála aplikací ve farmakologii a molekulární biologii vyžaduje citlivé kvantitativní testy. Například studium buněčných signálních drah pro vývoj a pochopení nových lékových terapií vyžaduje testy, které jsou schopné rozlišit malé změny v transkripci, molekulárních interakcích a zdravotním stavu buněk. Studium transkripce může zahrnovat charakterizaci promotorů, enhancerů nebo transkripčních faktorů, identifikaci bodových mutací nebo delecí případně měření buněčné odpovědi na stresory z vnějšího prostředí. Měření toho, jak tyto faktory ovlivňují signální dráhy, vyžaduje sledování jemných rozdílů mezi experimentálními a kontrolními vzorky.

Obr. 7 *Crosstalk je vedle citlivosti a dynamickém rozsahu detektoru důležitým parametrem při výběru mikrodestičkového luminometru*

Citlivost

Luminiscence, fluorescence a absorbance jsou tři nejběžnější metody používané v těchto testech. Obecně jsou luminiscenční testy citlivější než fluorescenční testy a fluorescenční testy jsou citlivější než testy založené na absorbanci. Vyšší citlivost luminiscenčních měření je dána především nižším pozadím. Luminiscence nepotřebuje žádný druh excitačního záření na rozdíl od fluorescence nebo absorbance. V buňkách navíc není přítomno nic, co by vydávalo světlo samo o sobě, na rozdíl od mnoha molekul, které svojí autofluorescencí přispívají k vyššímu pozadí fluorescenčních esejí.

Bez ohledu na metodu stanovení vyžaduje detekce slabých signálů či malých změn citlivou analýzu. Například při studiu enzymatické reakce nechcete přidávat vysokou hladinu substrátu nebo enzymu, abyste reakci zesílili na zjistitelnou úroveň, protože to vytváří umělý systém, který neodráží fyziologické podmínky a plýtvá se drahocennými reagenciemi. Místo toho chcete, aby váš test byl dostatečně citlivý na to, aby byl proveden v téměř fyziologických podmínkách, čímž získáte biologicky relevantnější údaje. Vysoká citlivost luminiscence umožňuje kvantifikovat signály, které by méně citlivé metody nedokázaly odlišit od pozadí. Co se ale stane, když máte mikrodestičku se vzorky s různou silou signálu? Jak si můžete být jisti, že detekovaný signál z jedné jamky není částečně výsledkem silného signálu ze sousední jamky? Tento jev je definován smysluplně nepřeložitelným slovem „crosstalk“.

Crosstalk mezi jamkami

Crosstalk je minimalizován neprůhledností destiček a maskováním nebo izolací jedné jamky od druhé přístrojem v průběhu čtení. Luminiscenční měření se obvykle provádějí na neprůhledných bílých destičkách pro maximální sílu luminiscenčního signálu. Bohužel tyto bílé destičky nejsou zcela světlu nepropustné. Silný luminiscenční signál v jedné jamce může ovlivnit naměřený signál v sousední jamce se slabým nebo žádným signálem.

Hlavním faktorem výše crosstalku je to, jak dobře luminometr izoluje signál právě měřené jamky od signálu přicházejícího ze sousedních jamek. Netěsnost mezi jamkou a měřicím zařízením umožňuje vstup světla do detektoru a tím ovlivnění naměřené hodnoty. Chcete-li tento problém obejít, můžete svůj experiment navrhnout tak, aby mezi vzorky byly prázdné jamky. To však výrazně snižuje počet vzorků, které můžete měřit v jedné mikrodestičce. Elegantnějším a efektivnějším řešením je použít luminometr s nižším crosstalkem. Nicméně je vždy vhodné dobře naplánovat umístění vzorků na destičce, ide-

Obr. 8 *GloMax Navigator je jednim z nejcitlivějších luminometrů na současném trhu*

álně se držet instrukcí v technických manuálech k esejím. Pokud bychom např. negativní kontrolu napipetovali do jamky sousedící s pozitivní kontrolou, došlo by k velkému zkreslení dat u jakéhokoli přístroje.

Je snadné se zaměřit na citlivost vašeho testu a zapomenout, že výsledky testu jsou jen tak citlivé, jak umožní citlivost použitého přístroje. Kombinace citlivosti přístroje a testu poskytuje skutečnou úroveň detekce vašeho experimentu. Máte-li přístroj s odpovídající mírou citlivosti detekce znamená to, že k uskutečnění experimentů budete moci použít méně vzorku, méně enzymu či méně substrátu. Budete také schopni detekovat méně buněk, nižší úrovně transkripce a jemnější změny v molekulárních interakcích za téměř fyziologických podmínek.

GloMax luminometry –
máme řešení pro každého

GloMax® luminometry a multimode readery Promega

GloMax luminometry od firmy Promega jsou multimode readery s nejcitlivější detekcí luminiscence na trhu. Nízké hodnoty pozadí a celková konstrukce našich přístrojů znamená, že výsledky detekované pro každou jamku přístroji GloMax® vám umožňují používat luminiscenční eseje za téměř fyziologických podmínek. Výměnné clonky pro různé typy destiček zajišťují redukci cross-talku v sousedících jamkách. Přístroj také disponuje automatickým nastavením gainu, kdy si přístroj automaticky nastavuje gain pro každou jamku zvlášť bez nutnosti zdlouhavého ladění ideální hodnoty pro celou destičku. Výsledkem je ideální citlivost pro celý dynamický rozsah měřených signálů, což zabraňuje saturaci detektoru nebo falešně negativním výsledkům v případě slabých signálů. Readery GloMax jsou dostupné v různých konfiguracích. Základní Navigator disponuje pouze detekcí luminiscence, modely Explorer a Discover pak i detekcí fluorescence a absorbance (viz **Tab. 2**).

- Intuitivní ovládání přístroje prostřednictvím tabletu
- Vysoká citlivost a dynamický rozsah, nízký crosstalk
- Automatické nastavení gainu
- Otevřený systém s přednastavenými protokoly pro všechny luciferázové eseje a buněčné eseje Promegy
- Kompletní řešení GloMax® – přístroje, reagencie i podpora od jednoho dodavatele

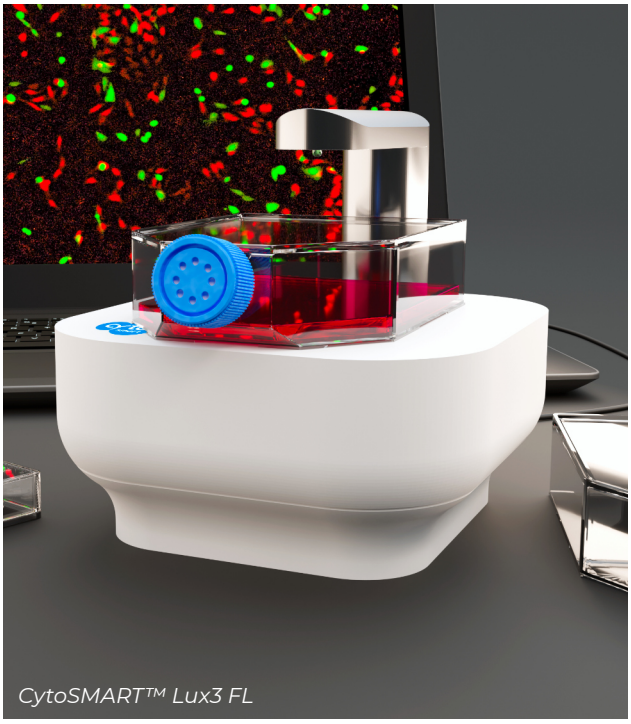
GloMax® – model	luminiscence	fluorescence	VIS absorbance	UV-VIS absorbance	BRET a FRET
GloMax® Navigator (GM2000/2010)	✓				
GloMax® Explorer (GM3510)	✓	✓	upgrade	upgrade	upgrade
GloMax® Explorer (GM3500)	✓	✓	✓	upgrade	upgrade
GloMax® Discover (GM3000)	✓	✓		✓	✓

Tab. 2 *Porovnání jednotlivých modelů přístrojů GloMax*

Flexibilní řešení pro monitorování buněk v reálném čase

CytoSMART™ Lux3 FL
CytoSMART Technologies

CytoSMART Lux3 FL je kompaktní fluorescenční mikroskop, který disponuje kromě kanálu pro viditelné světlo i dvěma fluorescenčními kanály (zeleným a červeným). Zařízení umožňuje sledovat dynamické buněčné procesy v kontrolovaném prostředí uvnitř standardního inkubátoru a poskytuje spoustu cenných dat o vašich buňkách díky obrázkům s vysokým rozlišením a vytváření videí v reálném čase. Pořízené snímky jsou následně nahrány na neomezené cloudové úložiště, kde je můžete pří-



CytoSMART™ Lux3 FL

mo zpracovat pomocí automatizovaných algoritmů „confluency“ nebo nově i „object count“. nebo si data stáhnout a použít na ně vaše zavedené metody analýzy obrazu. Cloudové úložiště umožňuje vzdálený přístup k datům na vašem smartphonu, tabletu nebo notebooku, i když jste zrovna mimo laboratoř. Mikroskop je k dispozici ve dvou variantách: s licencí s neomezeným přístupem na cloud a s licencí pro přístup na cloud na 1 rok.

CytoSMART™ Lux2
CytoSMART Technologies

Kompaktní světelný mini-mikroskop CytoSMART™ Lux2 umožňuje snadné a cenově dostupné time lapse zobrazování živých buněk. Nabízí sledování viability buněk pomocí měření konfluence a má využití v mnoha různých oblastech, jako jsou:

CytoSMART™ Lux2

- Farmakologický výzkum
- Regenerativní medicína
- Tkáňové inženýrství
- Rutinní kultivace buněk

Mikroskop je k dispozici ve dvou variantách: S licencí s neomezeným přístupem na cloud a s licencí pro přístup na cloud na 1 rok. Také je dostupný jako set dvou nebo čtyř přístrojů: CytoSMART™ Lux2 – Duo Kit a CytoSMART™ Lux2 Multi kit, což je ideální konfigurace pro simultánní měření několika vzorků, např. replikátů a kontrol.

CytoSMART™ OMNI
CytoSMART Technologies

Omni je automatizovaný světelný mikroskop, který vizualizuje kompletní kultivační nádoby. Je možné použít 6–384 jamkovou mikrotitrační destičku, T25–T225 lahve, Petriho misky nebo mikrofluidní čipy a pracuje uvnitř standardních CO_2 inkubátorů pro kultivaci buněk. Je vhodný pro sledování 2D i 3D buněčných kultur v průběhu kultivace bez nutnosti manipulace s buňkami.

CytoSMART™ OMNI

- Snímky (frekvenci je možné nastavit v intervalu 1–24 hodin) jsou ukládány na cloudové úložiště a je možné je zde rovnou analyzovat (průběh konfluence, „scratch“ testy, detekce kolonií).

— Pomocí speciálních algoritmů je možné provádět kontrolu kvality buněčné kultury, proliferace, cytotoxicity a buněčné migrace několika kliknutími.

— Cloudové úložiště umožňuje přístup z chytrého telefonu, tabletu či počítače odkudkoliv

— Přístroj nemá vliv na teplotu a proudění vzduchu uvnitř inkubátoru, což umožňuje provádět experimenty za optimálních kultivačních podmínek, bez kolísání teploty nebo hladiny CO_2, lze monitorovat i buňky kultivované v podmínkách hypoxie.

— Díky vhodné konstrukci přístroje lze provádět experimenty založené i na průtoku v mikrofluidních zařízeních.

Katalogové číslo	Název
MAB -1008	CytoSMART™ Lux 3 FL
JAB-1004	CytoSMART™ Lux 2
JAC-1008	CytoSMART™ Lux 2 Duo Kit
JED-1008	CytoSMART™ Lux 2 Multi Kit
XAB-1002	CytoSMART™ OMNI

SpectraMax MiniMax 300 Imaging Cytometer + SpectraMax i3x Microplate Reader
Molecular Devices

SpectraMax i3x multimode reader a MiniMax 300 cytometr

Společnost Molecular Devices spojila cytometr a mikrodestičkový multi-mode reader a vytvořila tak jediný přístroj ovládaný jediným softwarem SoftMax Pro. Cytometr (na obrázku spodní oranžová část přístroje) přináší možnost brightfield segmentace buněk a umožňuje cell-counting a měření konfluence buněk bez nutnosti jejich barvení. Dále přístroj disponuje dvěma fluorescenčními kanály (červený a zelený), jejichž kombinací lze měřit kondici vašich buněk. Můžete například testovat viabilitu, cytotoxicitu nebo účinnost transfekce. Díky tomuto systému nemusíte investovat finance ani prostor na dva přístroje a můžete si pořídit vše v jednom.

ImageXpress® Pico
Molecular Devices

ImageXpress® Pico

ImageXpress® Pico je plně automatizovaný systém pro zobrazovaní buněk s vlastní teplotní regulací, kontrolou hladiny CO_2, O_2 a vlhkosti. Přístroj disponuje vlastním softwarem na vyhodnocování dat s více než 25 přednastavenými protokoly od jednoduchého počítání buněk, přes měření apoptózy, sledování mitochondrií a 3D buněčných modelů, až po složitější analýzy např. trasování axonů či kvantifikaci infektivity virů. ImageXpress® Pico měří v 6–384-jamkových mikrodestičkách, na mikroskopických sklíčkách i v 35 mm miskách.

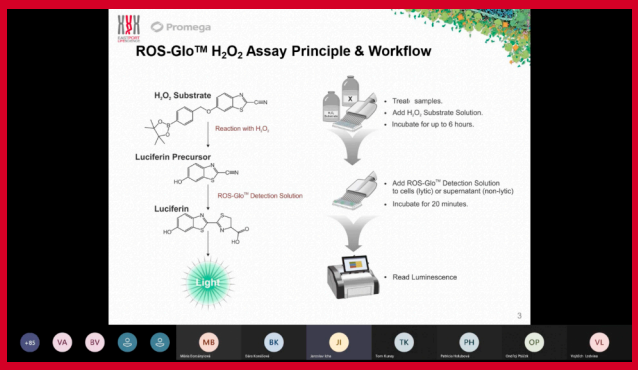
— Zvýšené rozlišení a kontrast díky Digital Confocal 2D dekonvoluci

— Ostřejší obraz díky možnosti upravit vzdálenost optiky od vzorku

— Možnost získání multiparametrického fenotypového profilu pomocí měření jednoho vzorku při více vlnových délkách

— Zjednodušené hledání oblasti zájmu pomocí funkce Live Preview

Seminář / webinář šitý na míru pro váš tým



Máte zájem o buněčné eseje od Promegy, ale nemáte zkušenosti s měřením luminiscence nebo by vás jen zajímaly novinky od Promegy, ale nestíháte je sledovat? Rádi pro vás připravíme seminář / webinář přesně na témata, která vás zajímají. Je možné zahrnout informace i o výrobcích našich dalších dodavatelů. Seminář připraví náš aplikační specialista, možné je domluvit i účast odborníků přímo z Promegy. Takovýchto seminářů jsme v roce 2020 uspořádali již spoustu, jak na akademických institucích, tak v soukromých firmách.

- bezplatný online seminář jen pro vaší vědeckou skupinu
- obsah, který si zvolíte sami
- privátní atmosféra k projednání jednotlivých otázek a problémů
- poradenství při plánování nadcházejících experimentů
- doba trvání 30 až 45 minut

Sleva 10 % na první objednávku z e-shopu

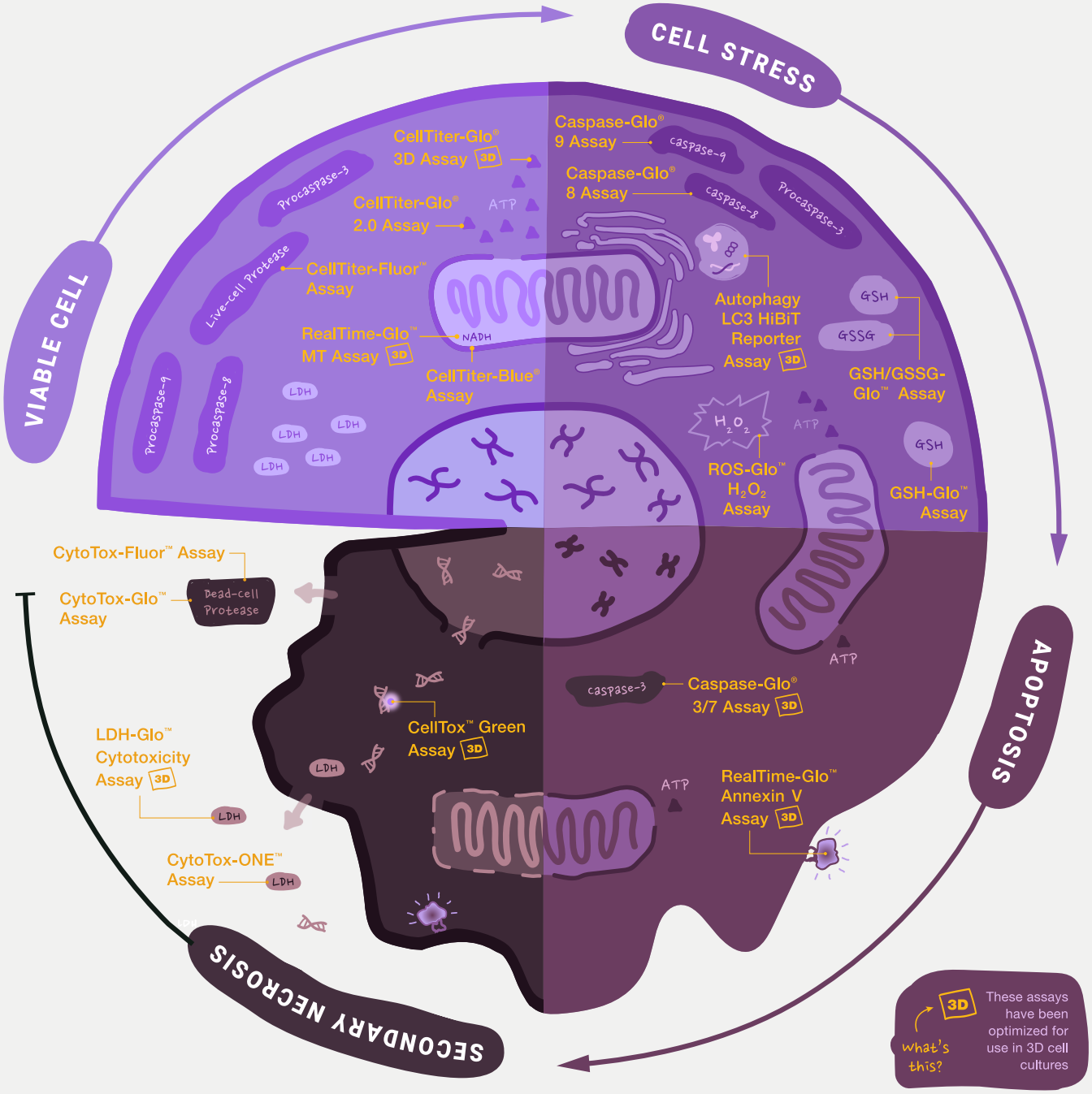
Už stovky zákazníků pravidelně využívá k nakupování naše webové stránky. Už jste mezi nimi? Jaké jsou hlavní výhody nakupování přes náš e-shop? Aktuální ceny až u 8 000 produktů. Pravidelné akce a zlevněné zboží. Úspora času a pohodlí při objednávání. Všechny produkty přehledně na jednom místě. Pokud tedy patříte mezi ty, kteří ještě nevyzkoušeli nakupování přes náš e-shop. Nabízíme vám **10% slevu** na první objednávku. Stačí zadat v košíku **slevový promo kód**:

prvninakup

a sleva se vám automaticky započítá. **Platnost promo kódu je do 31. 5.** Pokud nemáte možnost přímého nakupování přes náš e-shop například kvůli organizační struktuře. Přečtěte si článek vpravo, který tento problém řeší.

Ještě stále si o nabídky píšete e-mailem?

Někteří naši zákazníci se na nás obraceli s tím, že nemají možnost přímého objednávání zboží z našeho e-shopu. Přesně pro ně jsme vytvořili zcela novou možnost generování nabídek. Pokud vás už tedy nebaví si o každou nabídku psát emailem. Pak pro vás máme řešení! Jednoduše se přihlásíte do svého účtu a vložíte si zboží do košíku, přesně tak jako kdybyste ho nakupovali přes e-shop. Po výběru zboží přejdete do košíku a kliknete na tlačítko **„stáhnout obsah košíku jako nabídku do PDF“** a je hotovo. Takto vytvořenou nabídku, můžete obratem zaslat třeba na vaše objednávkové oddělení. Doufáme, že vám tato inovace usnadní nakupování u nás.



Obr. 9 *Přehled esejí pro sledování viability, cytotoxicity, apoptózy a oxidačního stresu*