

Bioluminiscenční reportéry a transfekce 2021

Bioluminiscenční reportéry a eseje

HiBiT a NanoBiT technologie

Transfekční činidla

Nukleofekce

Přístrojová technika



LONZA



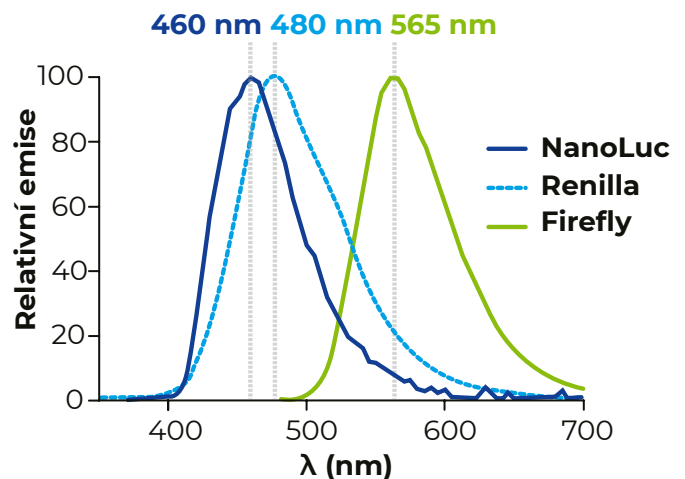
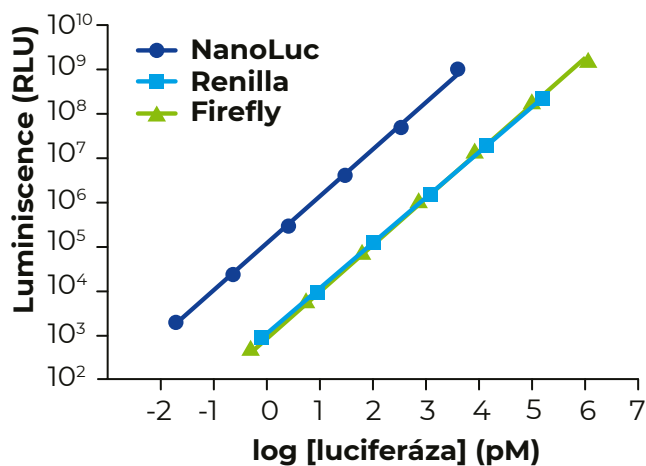
Luciferázové reportéry a jejich využití

Reportérové eseje jsou jednou z účinných metod pro měření biologické odpovědi organismů. Připojením reportérové sekvence ke sledovanému genu lze snadno měřit míru exprese daného genu, případně kvantifikovat a sledovat interakce proteinu

kódovaného daným genem. Reportérových genů je celá řada, ale v současnosti nejpoužívanějšími jsou jednoznačně fluorescenční proteiny, jako je GFP, YFP nebo mCherry a luciferázové enzymy. Luciferázové reportéry mají oproti fluorescenčním několik zásadních výhod. Jsou citlivější, kvantitativní v širokém rozsahu koncentrací a díky absenci potřeby excitačního světla mají jen minimální pozadí. Nejčastěji používanými luciferázami jsou *Renilla* luciferáza (Rluc), tzv. firefly luciferáza izolovaná ze světlušek druhu *Photinus pyralis* (Fluc) a NanoLuc (Nluc), což je modifikovaná luciferáza z mořské krevety *Oplophorus gracilirostris*.

Jednotlivé luciferázy se liší zejména svojí velikostí, stabilitou, spektrem emitovaných vlnových délek, jasem

Firefly (Fluc) 60,6 kDa		Luciferin + ATP + O ₂	$\xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{Fluc}}$	Oxyluciferin + AMP + PP _i + CO ₂	Em _{max} = 565 nm
Renilla (Rluc) 36,0 kDa		Coelenterazine + O ₂	$\xrightarrow{\text{Rluc}}$	Coelenteramide + CO ₂	Em _{max} = 480 nm
NanoLuc (Nluc) 19,1 kDa		Furimazine + O ₂	$\xrightarrow{\text{Nluc}}$	Furimamide + CO ₂	Em _{max} = 460 nm



Obr. 1 Srovnání vlastností jednotlivých luciferáz. NanoLuc luciferáza je nejmenší luciferáza s nejintenzivnější luminiscencí a nejkratší emitovanou vlnovou délkou.

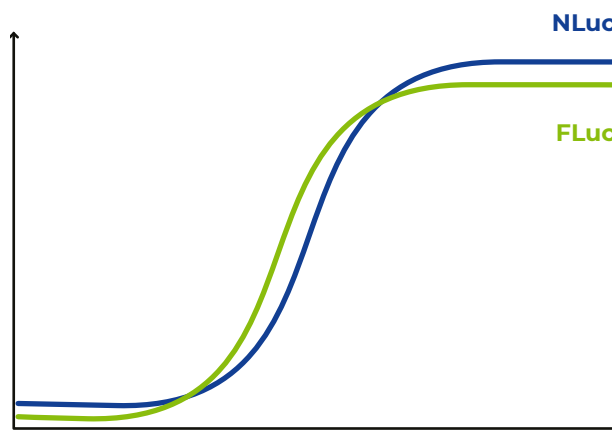
a typem zpracovávaného substrátu (viz Obr. 1). Nluc má kromě nejmenší velikosti výhodu i v tom, že poskytuje asi 100× intenzivnější signál než zbylé dvě luciferázy a je tedy vhodná i pro sledování genů s nízkou hladinou exprese. Vysoký jas navíc umožňuje její snadné použití jako donoru v NanoBRET esejích v kombinaci s fluorescenčními značkami.

Při klasických experimentech s využitím overexprese se prvně vytvoří reportérový vektor, který je poté vpraven do buněk pomocí stabilní nebo přechodné transfekce a sleduje se odezva buněk po specifickém treatmentu. Kvantifikace luciferázy se provádí přidáním lyzačního pufru s obsahem detergentu a luminescenčního substrátu. Díky vysoké citlivosti luminescenčního stanovení lze detekovat už asi 10^{-20} mol luciferázy a stanovení má široký lineární rozsah. Při použití luciferázového reportéru s IL-6 sekrečním signálem je luciferáza uvolňována z buněk a stanovení lze provést po odběru vzorku média v separátní mikrotitrační destičce. Rluc a Nluc luciferázy lze navíc použít i pro kinetické měření v živých buňkách, protože jejich substráty jsou schopny pronikat přes membránu buněk.

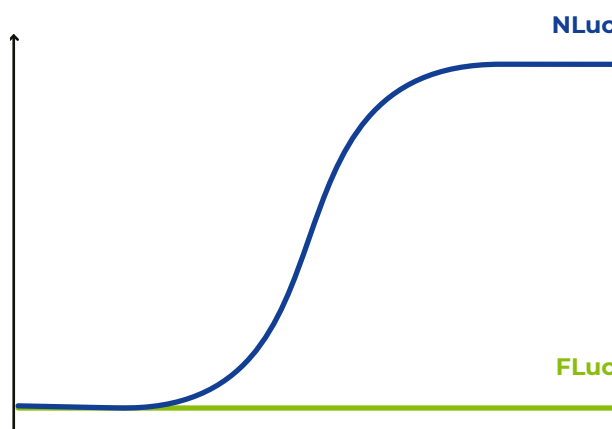
Většina reportérových esejí využívá jeden nebo dva reportérové geny. Při použití dvou reportérů je spolu s experimentálním vektorem kotransfekován i kontrolní vektor. Ten je většinou řízen konstitutivním promotorem, je kontinuálně exprimován a slouží k normalizaci signálu na počet buněk nebo na procento účinnosti transfekce. Další možností použití dvou reportérů je pro eliminaci falešně pozitivních výsledků při testování látek na buňkách. Některé látky totiž mohou přímo interagovat s luciferázami a stabilizovat je. Použitím koincidenčních reportérových vektorů, které kódují dvě odlišné luciferázy – Fluc a Nluc, lze snadno posoudit, jestli testovaná látka opravdu indukuje expresi sledovaného genu nebo pouze stabilizuje některou z luciferáz. Pokud po treatmentu detekujeme nárůst signálu obou luciferáz, jedná se o pozitivní výsledek. Pokud narůstá signál jen jedné z luciferáz, jedná se o stabilizaci luciferázy danou látkou (viz Obr. 2). Poslední možností využití dvou reportérů je sledování dvou různých odpovědí buněk v jednom vzorku. Při použití dvou reportérů je samozřejmě nutné použít rozdílné reportérové geny, aby bylo možné stanovit zvlášť aktivity obou reportérů. Nejčastějšími kombinacemi experimentální-kontrolní reportér jsou Fluc-Rluc nebo Nluc-Fluc.

Promega nabízí široký výběr hotových vektorů se všemi zmíněnými luciferázami, přičemž jsou dostupné kombinace různých forem enzymů (sekretovaná, destabilizovaná, stabilní), promotorů, markerů pro selekci pomocí antibiotik a (ne)přítomnosti mnohočetného klonovacího místa. Nejaktuálnější nabídka vektorů je vždy dostupná na webu Promegy.

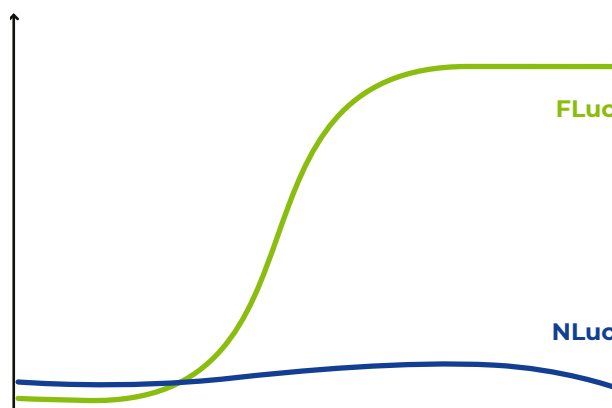
Pozitivní výsledek



Stabilizace Nluc



Stabilizace Fluc



Obr. 2 Schématické zobrazení aktivity Nluc a Fluc luciferáz po treatmentu třemi domnělými aktivátory. Nárůst aktivity obou luciferáz indikuje skutečný aktivační účinek dané látky. Pokud se nárůst signálu obou luciferáz neshoduje a dochází k aktivaci pouze jedné z nich, jedná se o nespecifický účinek.

Tabulka 1 pGL4 firefly luciferázové reportérové vektory

Vektor	Reportérový gen	Mnohočetné klonovací místo	Sekvence pro degradaci proteinu	Genový promotor	Selekční marker
pGL4.10	<i>luc2</i>	Ano	Ne	Ne	Ne
pGL4.11	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	Ne	Ne
pGL4.12	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	Ne	Ne
pGL4.13	<i>luc2</i>	Ne	Ne	SV40	Ne
pGL4.14	<i>luc2</i>	Ano	Ne	Ne	Hygro
pGL4.15	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	Ne	Hygro
pGL4.16	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	Ne	Hygro
pGL4.17	<i>luc2</i>	Ano	Ne	Ne	Neo
pGL4.18	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	Ne	Neo
pGL4.19	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	Ne	Neo
pGL4.20	<i>luc2</i>	Ano	Ne	Ne	Puro
pGL4.21	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	Ne	Puro
pGL4.22	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	Ne	Puro
pGL4.23	<i>luc2</i>	Ano	Ne	minP	Ne
pGL4.24	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	minP	Ne
pGL4.25	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	minP	Ne
pGL4.26	<i>luc2</i>	Ano	Ne	minP	Hygro
pGL4.27	<i>luc2P</i>	Ano	hPEST	minP	Hygro
pGL4.28	<i>luc2CP</i>	Ano	CLI-hPEST	minP	Hygro
pGL4.29	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + CRE	Hygro
pGL4.30	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + NFAT RE	Hygro
pGL4.31	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	adenovirus major late + GAL4 UAS	Hygro
pGL4.32	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + NF-kB RE	Hygro
pGL4.33	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	serum response element	Hygro
pGL4.34	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	SRF RE	Hygro
pGL4.35	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	GAL4 UAS	Hygro
pGL4.36	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	murine mammary tumor virus long terminal repeat	Hygro
pGL4.37	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + antioxidant RE	Hygro
pGL4.38	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + p53 RE	Hygro
pGL4.39	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + ATF6 RE	Hygro
pGL4.40	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + metal RE	Hygro
pGL4.41	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + heat shock RE	Hygro
pGL4.42	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + hypoxia RE	Hygro
pGL4.43	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + xenobiotic RE	Hygro
pGL4.44	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + AP1 RE	Hygro
pGL4.45	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + interferon stimulated RE	Hygro
pGL4.47	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + Sis-inducible element RE	Hygro
pGL4.48	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + SMAD3/SMAD4 binding element RE	Hygro
pGL4.49	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + TCF-LEF RE	Hygro
pGL4.50	<i>luc2</i>	Ne	Ne	CMV	Hygro
pGL4.51	<i>luc2</i>	Ne	Ne	CMV	Neo
pGL4.52	<i>luc2P</i>	Ne	hPEST	minP + STAT5 RE	Hygro
pGL4.53	<i>luc2</i>	Ne	Ne	phosphoglycerate kinase (PGK)	Ne
pGL4.54	<i>luc2</i>	Ne	Ne	thymidine kinase (TK)	Ne

Tabulka 2 pGL4 Renilla a pNL NanoLuc luciferázové reportérové vektory

Vektor	Reportérový gen	Mnohočetné klonovací místo	Sekvence pro degradaci proteinu	Genový promotor	Selekční marker
pGL4.70	hRluc	Ano	Ne	Ne	Ne
pGL4.71	hRlucP	Ano	hPEST	Ne	Ne
pGL4.72	hRlucCP	Ano	CLI-hPEST	Ne	Ne
pGL4.73	hRluc	Ne	Ne	SV40	Ne
pGL4.74	hRluc	Ne	Ne	HSV-TK	Ne
pGL4.75	hRluc	Ne	Ne	CMV	Ne
pGL4.76	hRluc	Ano	Ne	Ne	Hygro
pGL4.77	hRlucP	Ano	hPEST	Ne	Hygro
pGL4.78	hRlucCP	Ano	Ne	Ne	Hygro
pGL4.79	hRluc	Ano	Ne	Ne	Neo
pGL4.80	hRlucP	Ano	hPEST	Ne	Neo
pGL4.81	hRlucCP	Ano	CLI-hPEST	Ne	Neo
pGL4.82	hRluc	Ano	Ne	Ne	Puro
pGL4.83	hRlucP	Ano	hPEST	Ne	Puro
pGL4.84	hRlucCP	Ano	CLI-hPEST	Ne	Puro
pNL1.1[Nluc]	Nluc	Ano	Ne	Ne	Ne
pNL1.1.CMV[Nluc/CMV]	Nluc	Ne	Ne	CMV	Ne
pNL1.2[NlucP]	NlucP	Ano	hPEST	Ne	Ne
pNL1.3[secNluc]	secNluc	Ano	Ne	Ne	Ne
pNL1.3.CMV [secNluc/CMV]	secNluc	Ne	Ne	CMV	Ne
pNL2.1[Nluc/Hygro]	Nluc	Ano	Ne	Ne	Hygro
pNL2.2[NlucP/Hygro]	NlucP	Ano	hPEST	Ne	Hygro
pNL2.3[secNluc/Hygro]	secNluc	Ano	Ne	Ne	Hygro
pNL3.1[Nluc/minP]	Nluc	Ano	No	minP	Ne
pNL3.2.CMV	NlucP	Ne	hPEST	CMV	Ne
pNL3.2.NF-κB-RE [NlucP/NF-κB-RE/Hygro]	NlucP	Ne	hPEST	minP	Hygro
pNL3.2[NlucP/minP]	NlucP	Ano	hPEST	minP	Ne
pNL3.3[secNluc/minP]	secNluc	Ano	Ne	minP	Ne
pNLCo1[luc2-P2A-NlucP/Hyg]	luc2, NlucP	Ano	Ano pro NlucP, Ne pro luc2	Ne	Hygro
pNLCo2[luc2-P2A-Nluc/minP/Hyg]	luc2, NlucP	Ano	Ano pro NlucP, Ne pro luc2	minP	Hygro
pNLCo3[luc2-P2A-NlucP/CMV/Hyg]	luc2, NlucP	Ne	Ano pro NlucP, Ne pro luc2	CMV	Hygro
pNLCo4[luc2-P2A-NlucP/PGK/Hyg]	luc2, NlucP	Ne	Ano pro NlucP, Ne pro luc2	PGK	Hygro

Technologie HiBiT a NanoBiT – moderní nástroje pro analýzu proteinů

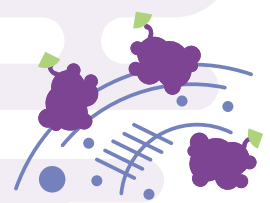
Technologie HiBiT vyvinutá firmou Promega je založená na NanoLuc luciferáze a přináší nový přístup pro sledování exprese proteinů. Tato technologie využívá NanoLuc luciferázu, která byla pomocí proteinového inženýrství zredukována na co nejmenší velikost a rozdělena na dvě samostatné podjednotky, velkou LgBiT (159 aminokyselin) a malou HiBiT (11 aminokyselin). Obě podjednotky mají vysokou vzájemnou vazebnou afinitu a po jejich spontánní rekombinaci dochází k obnovení luciferázové aktivity. Detekce pak probíhá jednoduše přidáním LgBiT podjednotky a luciferázového sub-

strátu. V případě vnitrobuněčných proteinů se buňky buď lyzují nebo kotransfekují vektorem kódujícím LgBiT. Sekretované a membránové proteiny lze detekovat přidáním LgBiT do média a v případě nutnosti prvotní separace a izolace proteinu na gelu lze sledovaný protein detekovat po přenosu na membránu a přidání LgBiT a furimazinu. HiBiT značení lze použít pro klasickou detekci exprese po vpravení do plazmidu nebo ho lze použít jako endogenní značku po vpravení jeho sekvence do příslušného místa genomu pomocí CRISPR/Cas9. Díky své malé velikosti má značka jen minimální vliv na funkci sledovaného proteinu a lze tak sledovat expresi téměř za fyziologických podmínek. Využití HiBiT se ale neomezuje jen na expresní studie ale lze sním sledovat i jiné biologické děje (viz obr. 5). Skrz pokles luminiscenčního signálu lze sledovat degradaci nebo autofagii daného proteinu, detekci v médiu můžeme pozorovat zda je daný protein uvolňován z buněk ven, při vsunutí LgBiT podjednotky do virové částice můžeme vidět pronikání viru do buněk nebo sledujeme internalizaci a cyklování membránových receptorů.

Navrhněte si a objednejte guide RNA, Cas9 a HiBiT donorovou DNA



Protein je exprimován v buňce



Přidejte Nano-Glo® HiBiT detekční reagent a inkubujte 2–10 minut.

Změřte luminiscenci



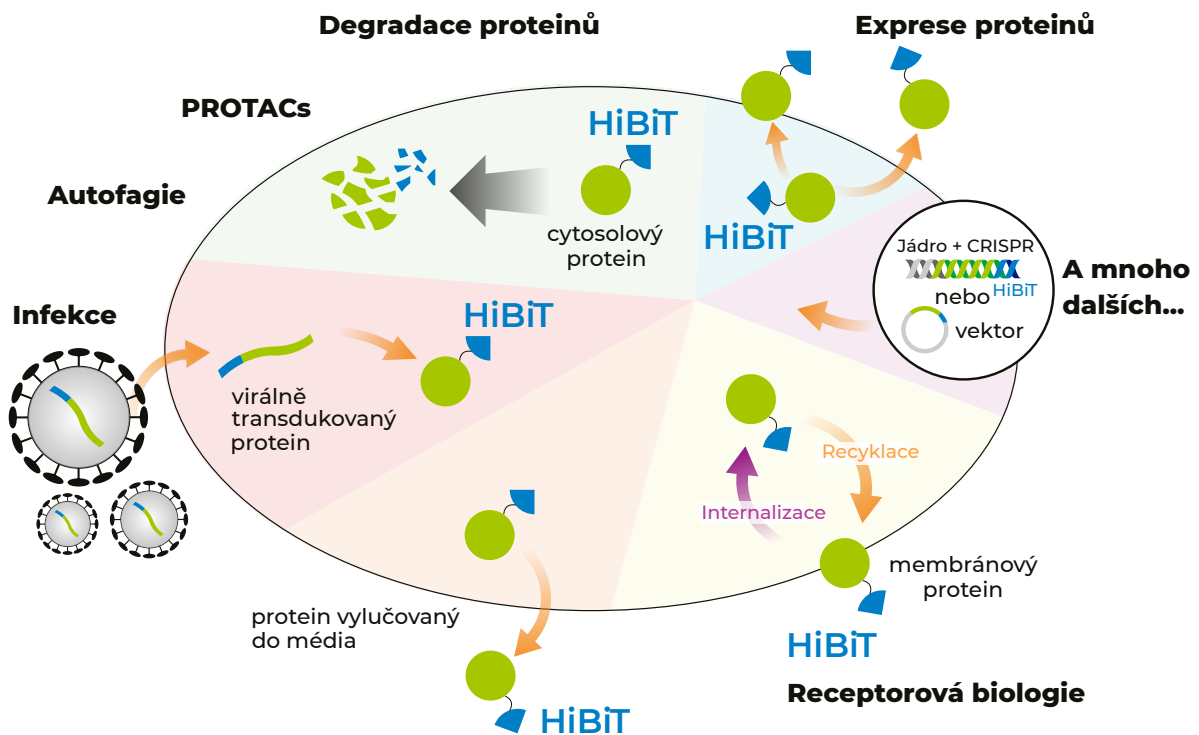
Obr. 3 HiBiT technologie poskytuje velmi jednoduchou a efektivní metodu pro detekci proteinů.

Na principu rozdělené NanoLuc luciferázy je založená i NanoBiT technologie firmy Promega. V tomto případě je NLuc luciferáza opět rozdělena na velkou LgBiT a malou SmBiT podjednotku, která má oproti HiBiT, velmi nízkou vazebnou afinitu. K obnovení luciferázové aktivity dochází pouze při přiblížení obou podjednotek na velmi krátkou vzdálenost. Systém je tak ideální pro studium proteinových interakcí. Při reálném experimentu se do buňky kotransfekují dva vektory, přičemž každý z nich kóduje jeden z páru interagujících proteinů fúzovaný s LgBiT nebo SmBiT podjednotkou. Následně se ke kultivovaným buňkám přidá luciferázový substrát furimazin, který prochází do buněk a v případě proteinové interakce dojde k přiblížení obou podjednotek NLuc, obnovení její aktivity a rozsvícení jamky. Díky vysokému jasů NanoLuc luciferázy lze použít vektory se slabým promotorem a sledovat interakce při velmi nízké úrovni exprese proteinů, která se blíží přirozenému stavu.

Katalogové číslo	Název
N2011, N2012, N2013	Nano-Glo® Live Cell Assay System
N2410	Nano-Glo® HiBiT Blotting System
N2420, N2421, N2422	Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System
N2681	LgBiT Expression Vector
N3030, N3040, N3050	Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System



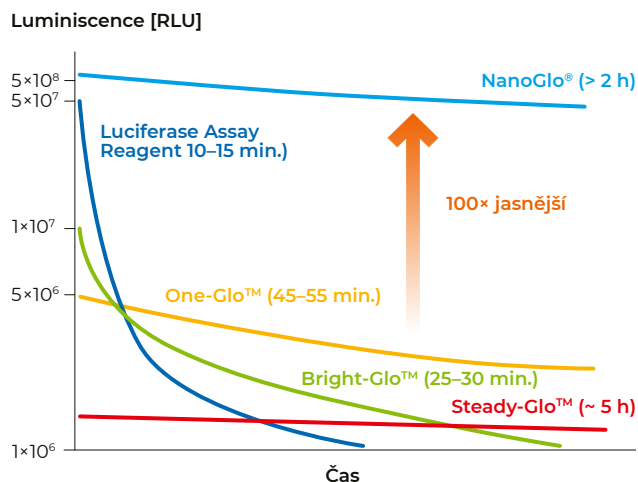
Obr. 4 Základní princip HiBiT a NanoBiT technologií, jež jsou založené na NanoLuc luciferáze. Obě technologie využívají NanoLuc rozdělenou na velkou (LgBiT) a malou podjednotku (HiBiT/SmBiT). HiBiT má velkou afinitu k LgBiT a rekombinuje samovolně. Je tak vhodný pro kvantifikaci vybraných proteinů. SmBiT má nízkou afinitu k LgBiT a rekombinuje pouze po přiblížení na velmi krátkou vzdálenost v důsledku proteinové interakce fúzních proteinů.



Obr. 5 Příklady aplikací HiBiT značky v proteinové biologii

Reportérové eseje pro kvantifikaci luciferáz

Promega



Obr. 6 Srovnání intenzity a stability signálu jednotlivých luciferázových esejí od firmy Promega

O luciferázách bylo mnoho řečeno v úvodním článku, ve kterém byl zmíněn i princip kvantifikace. Aktivita luciferázy se běžně stanovuje přidávkem reagentu obsahujícího lyzační pufr a luminiscenční substrát pro danou luciferázu. Promega vyvinula několik typů tzv. „glow-type“ esejí generujících bioluminiscenční signál s dlouhou dobu dosvitu. Výhodou oproti klasickým „flash“ esejím je, že pro stanovení není nutný reader s injektory a experimenty lze provádět i v „high-throughput“ formátu, jelikož nedochází ke zkreslení výsledků vlivem poklesu signálu.

První luciferázovou esejí je **Nano-Glo® Luciferase Assay System**, která jako jediná slouží ke stanovení aktivity NanoLuc® luciferázy. Jedná se o nejcitlivější esej, která je asi 100× citlivější než *Renilla* a firefly eseje a má široký dynamický rozsah, ve kterém je signál lineární přes cca 6 řádů. Zároveň je vysoce stabilní a generuje signál s dlouhým poločasem poklesu signálu asi 120 minut. Substrátem je v tomto případě furimazin. Ten je schopen pronikat přes membránu buněk a je tedy možné provádět i kinetická stanovení s živými buňkami pomocí **Nano-Glo® Live Cell Assay System**.

Systémů kompatibilních s klasickou „světluškovou“ firefly luciferázou je hned několik a liší se zejména intenzitou a stabilitou signálu. Nejstarší a nejcitlivější firefly esejí je **Luciferase Assay System**. Jedná se o „flash“ esej s intenzivním signálem, ale velmi krátkým poločasem poklesu signálu (10–15 min.), která je určená pro měření v luminometrech s injektory. Druhou nejcitlivější esejí je **Bright-Glo™ Luciferase Assay System**, která má oproti ostatním firefly luciferázovým „glow“ esejím nejvyšší citlivost a zároveň kratší dobu dosvitu, kdy signál klesne na polovinu asi po 30 minutách. Hojně využívanou zlatou střední

cestou je **ONE-Glo™ Luciferase Assay System**, který je o něco méně citlivější než Bright-Glo, ale poločas poklesu signálu je vyšší – více než 45 minut. Tento systém je založen na modifikovaném substrátu, díky němuž vykazuje vyšší odolnost vůči složkám kultivačního media a je tak stabilnější. Lze jej proto dlouhodobě uchovávat i při 4 °C, díky čemuž je snadno adaptovatelný na high-throughput aplikace. Nejstabilnějším systémem je pak **Steady-Glo™ Luciferase Assay System**. Pokles signálu na polovinu je v tomto případě patrný až po 5 hodinách. Steady-Glo tedy poskytuje reprodukovatelné výsledky po dobu několika hodin výměnou za slabší signál.

Pro případy současného použití dvou reportérů nabízí Promega i duální luciferázové eseje. Během stanovení se ke vzorku přidá nejprve činidlo pro stanovení prvního reportéru a změří se hodnota signálu. V druhém kroku se pak přidá druhé činidlo, které zastaví první reportér a zároveň obsahuje pufr a substrát pro druhou luciferázu. Jak už bylo uvedeno dříve, nejčastějšími kombinacemi luciferáz jsou dvojice Fluc-Rluc a Nluc-Fluc. V případě současného použití Fluc a Rluc je možnost detekce pomocí „flash“ nebo „glow“ esejí. „Flash“ esej **Dual-Luciferase Reporter Assay System** má intenzivní signál ale velmi krátkou dobu dosvitu a vyžaduje reader vybavený injektory. „Glow“ esej **Dual-Glo Luciferase Assay System** má pak o trochu slabší signál, ale mnohem delší dobu dosvitu a je tak vhodná pro měření více vzorků i na readerech bez injektorů. V případě kombinace Nluc-Fluc je dostupná jen „glow“ esej **Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System**, která je díky vysokému jasů Nluc velmi citlivá a zároveň pohodlná na provedení (pouze dva pipetovací kroky). Pro přehlednost jsou všechny dostupné eseje od Promegy včetně základních parametrů shrnuté v Tabulce 3.

Tabulka 3 Přehled reportérových esejí pro stanovení jedné a kombinace dvou luciferáz od firmy Promega

Název produktu	Reportérový gen	Glo / Flash	Formát esejě	Lum. Substrát	Poločas signálu	Intenzita signálu	Kat. číslo
Reportérové esejě (lytická endpoint měření)							
Nano-Glo Luciferase Assay System	NanoLuc: Nluc, secNluc	Glo	Homogenní	Furimazine	≥ 2 h	6+	N1110
Luciferase Assay System	Firefly: luc, luc+, luc2	Flash	Vyžaduje bun. lyzát	Hmyzí luciferin	5–10 min	5+	E1483
Bright-Glo Luciferase Assay System	Firefly: luc, luc+, luc2	Glo	Homogenní	Hmyzí luciferin	30 min	4+	E2610
ONE-Glo Luciferase Assay System	Firefly: luc, luc+, luc2	Glo	Homogenní	5'-fluoroluciferin	≥ 45 min	3+	E6110
ONE-Glo EX Luciferase Assay System	Firefly: luc, luc+, luc2	Glo	Homogenní	5'-fluoroluciferin	≥ 2 h	2+	E8110
Steady-Glo Luciferase Assay System	Firefly: luc, luc+, luc2	Glo	Homogenní	Hmyzí luciferin	> 5 h	1+	E2510
Renilla Luciferase Assay System	Renilla: Rluc, hRluc	Flash	Vyžaduje bun. lyzát	Coelenterazine	5-10 min	4+	E2810
Renilla-Glo Luciferase Assay System	Renilla: Rluc, hRluc	Glo	Homogenní	Coelenterazine-h	> 60 min	2+	E2710
Duální reportérové esejě (lytická endpoint měření)							
Nano-Glo Dual Luciferase Reporter Assay System	NanoLuc / Firefly	Glo	Homogenní	Furimazine/ Hmyzí luciferin	Nluc: 2h Fluc: 2 h	6+/3+	N1610
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Firefly / Renilla	Flash	Vyžaduje bun. lyzát	Hmyzí luciferin/ Coelenterazine	Flux: 8 min Rluc 8 min	4+/4+	E1910
Dual-Glo Luciferase Assay System	Firefly / Renilla	Glo	Homogenní	Hmyzí luciferin/ Coelenterazine	Fluc: 2h Rluc: 2 h	2+/2+	E2920
Esejě pro živé buňky (kinetická i jednobodová měření)							
Nano-Glo Live Cell Assay System	NanoLuc: NanoBiT	Glo	Stačí přidat reagent	Furimazine	2 h	6+	N2011
Vivo-Glo Luciferin, In Vivo Grade	Firefly: luc, luc+, luc2	Nedef.	Stačí přidat reagent	Draselná sůl D-luciferinu	nedef.	nedef.	P1041
Luciferin-EF Endotoxin-Free Luciferin Na	Firefly: luc, luc+, luc2	Nedef.	Stačí přidat reagent	Luciferin	nedef.	nedef.	E6551
ViviRen Live Cell Substrate	Renilla: Rluc, hRluc	Flash	Stačí přidat reagent	Modifikovaný coelenterazine	8-15 min	4+	E6491
EnduRen Live Cell Substrate	Renilla: Rluc, hRluc	Glo	Stačí přidat reagent	Modifikovaný coelenterazine	> 24 h	2+	E6481

Transfekce a CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 technologie přinesla bez jakýchkoliv pochyb revoluci v genomovém inženýrství. Poskytuje nespočetné možnosti editace genomu a díky širokému spektru aplikací a relativní jednoduchosti se etablovala v laboratořích po celém světě. Tato technologie je založená na programovatelné guide RNA (gRNA), která směřuje Cas9 nukleázu na konkrétní místo v genomové DNA. Ta je následně v daném místě rozštěpena působením Cas9 a za pomoci přirozených opravných mechanismů buňky dojde ke specifické úpravě genomu. Klíčovým krokem při práci s CRISPR je transfekce a dopravení gRNA a Cas9 enzymu do cytoplazmy nebo jádra buněk. Tento krok může být v závislosti na konkrétní aplikaci a typu buněk větší či menší výzvou, a proto bylo vyvinuto několik základních metod, jak nukleové kyseliny do buněk dostat při současném zachování jejich viability. Tyto metody se dají rozdělit na tři základní skupiny – virální, chemické a fyzikální. Úhlavními nepřáteli při transfekci jsou obranné mechanismy buněk, které rychle štěpí cizorodou DNA a RNA. V případě, že transfekční metoda přenáší externí nukleovou kyselinu pouze do cytoplazmy (např. lipofekce, elektroporace), závisí úspěch transfekce na tom, jestli proběhne v krátkém časovém intervalu mitóza. Pouze tehdy totiž dochází k rozvolnění jaderné membrány a exogenní DNA má možnost vstoupit do jádra. V opačném případě dochází k rychlé degradaci DNA a neúspěšné transfekci. Tento problém je nejvýraznější u primárních buněk, které se dělí velmi pomalu nebo vůbec (neurony). Pokud je metoda schopná doručit DNA přímo do jádra (nukleofekce, virální vektory, mikroinjekce), mitóza pro úspěch není nutná a lze transfekovat i pomalu se dělící a nedělící buňky. V dalších odstavcích si blíže popíšeme jednotlivé metody spolu s jejich výhodami a nevýhodami.

Virální vektory doručují DNA a RNA do buněk pomocí procesu tzv. transdukce. Tento proces zahrnuje nejprve zabalení nukleové kyseliny do virálních částic, ty jsou pak namnoženy pomocí vybraných buněčných linií (např. HEK293T), izolovány a přidány k buňkám, které chceme transfekovat. Virální vektory jsou velmi efektivní, jsou schopny doručit DNA přímo do jádra a lze je použít pro mnoho typů buněk. Jejich hlavní nevýhodou je ale časově náročná a pracná příprava virálních částic, navíc některé viry vyžadují dodatečné bezpečnostní opatření v laboratoři. Nejčastěji používanými typy virů jsou lentiviry, adenoviry, adeno-asociované viry (AAV) a herpes viry. AAV jsou nejčastěji

používané pro editaci genomu pomocí CRISPR, protože jsou relativně bezpečné, jejich DNA se z většiny neintegruje do genomu buněk a nehrozí tak náhodné porušení funkce životně důležitých genů. Nevýhodou je, že horní limit velikosti transfekované DNA je asi 4,5 kb, což může být limitní pro některé aplikace.

Mezi chemické metody patří zejména lipofekce, která využívá kationtové lipidy tvořící komplex se záporně nabitými nukleovými kyselinami. DNA nebo RNA se při lipofekci uzavře do lipozomů, které pak fúzí s cytoplazmatickou membránou a vylijí svůj obsah do cytoplazmy. Hlavní výhody lipofekce jsou jednoduchost, nízká cena, nízká toxicita pro buňky a možnost použití i pro high-throughput experimenty. Na druhou stranu má tato metoda o něco nižší účinnost, při lipofekci se DNA nedostává přímo do jádra buněk a je tak závislá na jejich dělení. Mezi stálíce na poli lipofekce patří jednoznačně transfekční činidla **Fugene 6**, **Fugene HD** a **Viafect** od firmy Promega, o čemž svědčí vysoký počet publikací, ve kterých byla použita. Všechna tři činidla nabízí široké možnosti použití, vysokou účinnost a nízkou toxicitu pro buňky. **Fugene 6** je nejstarší formulací a poskytuje robustní výsledky při transfekci běžně používaných buněčných linií. **Fugene HD** je novější formulací a je vhodný i pro náročnější buňky jako jsou rozličné rakovinné linie, kmenové buňky nebo hmyzí buňky a je použitelný i pro produkci virů a proteinů. **Viafect** je pak nejnovějším činidlem, které díky vylepšenému složení poskytuje srovnatelné nebo lepší výsledky než Fugene s ještě nižší toxicitou pro buňky. Protokol při transfekci všemi třemi činidly je velmi jednoduchý. Stačí smíchat transfekovanou DNA s činidlem a po krátké inkubaci přidat přímo k buňkám v růstovém médiu. Srovnání jednotlivých reagentů pro běžně používané buněčné linie je uvedeno v Tabulce 4. Pro běžně používané buněčné linie jsou na stránkách Promegy navíc dostupné optimalizované protokoly, které vám značně zjednoduší zavedení metody do vaší laboratoře. Vždy je samozřejmě potřeba hlídat i další parametry transfekce jako je kvalita vstupní DNA, číslo pasáže a konfluence vašich buněk.

Katalogové číslo	Název
E4981, E4982	ViaFect™ Transfection Reagent
E2311, E2312	FuGENE® HD Transfection Reagent
E2691, E2692	FuGENE® 6 Transfection Reagent

Fyzikální metody vytváří dočasné póry v buněčné, případně i jaderné membráně, skrz které se do buněk dostává transfekovaná DNA. Do fyzikálních metod je zahrnuta mikroinjekce, elektroporace a nukleofekce. Mikroinjekce je speciální metodou, při které se pod mikroskopem vstříkne velmi tenkou kapilárou genetický materiál do cytoplazmy nebo jádra buněk. Vy-

Buněčná Linie	Fugene 6		Fugene HD		Viafect		Lipofectamine 2K	
	Exprese	Viabilita	Exprese	Viabilita	Exprese	Viabilita	Exprese	Viabilita
A549	++	++	+++	+++	+++	+++		
C2C12					+++	+++		
CHO	++				+++	++	++	++
COS7			+++	+++	+++	+++	+++	+++
H9C2					+++	+++	++	+++
HCT116			+++	++	+++	+++	++	++
HEK293	++	++			+++	+++		
HeLa			+++	+++	++	+++		
HepG2					+++	++		
HT-29					+++	+++	+++	+++
Huh7					+++	++	++	++
Jurkat					+++	+++	++	+++
K562							+++	+++
LNCaP					+++	+++		
MCF7					+++	+++	+++	+++
NIH 3T3					++	+++	+++	+++
PC-12			++	+++	+++	+++	+++	+++
PC-3			+++	+++	+++	+++		
RAW 264.7	+++	++	+++	++			++	++
U2OS			++	+++	+++	+++		
Legenda	+++	>80 % maximální RLU			++	50%–80% maximální RLU		
		>80 % viabilních buněk				50%–80% viabilních buněk		

Tabulka 4 Srovnání transfekčních činidel firmy Promega a konkurence. Účinnost transfekce byla posuzována pomocí exprese transfekovaného firefly luciferázového reportéru. Nejlepší podmínky transfekce (nejvyšší RLU) bylo vybráno pro každé činidlo. Pro každou buněčnou linii byl výsledek s nejvyšším RLU počítán jako 100% a výsledky ostatních činidel byly vztahy k této hodnotě. Transfekce s účinností menší než 50 % nejsou v tabulce uvedeny.

užívá se zejména pro tvorbu transgenních organismů, kdy se genetický materiál vstříkne do jádra oplozených oocytů. Častěji používanou metodou je elektroporace, při které se buňky suspendují ve vodivém pufru a vložení krátkých, vysokonapěťových pulzů dojde k tvorbě pórů v cytoplazmatické membráně. Elektrický potenciál na membráně pak způsobuje, že nabitě molekuly (nukleové kyseliny) přechází skrz póry do cytoplazmy. Elektroporace je metoda rychlá a jednoduchá s poměrně vysokou účinností. Vyžaduje ale speciální zařízení (elektroporátor) a optimalizaci pulzů pro každou buněčnou linii. Vzhledem k tomu, že dochází k porušení cytoplazmatické membrány, mohou mít transfekované buňky kvůli nedokonalé opravě membrány výrazně nižší viabilitu ve srovnání

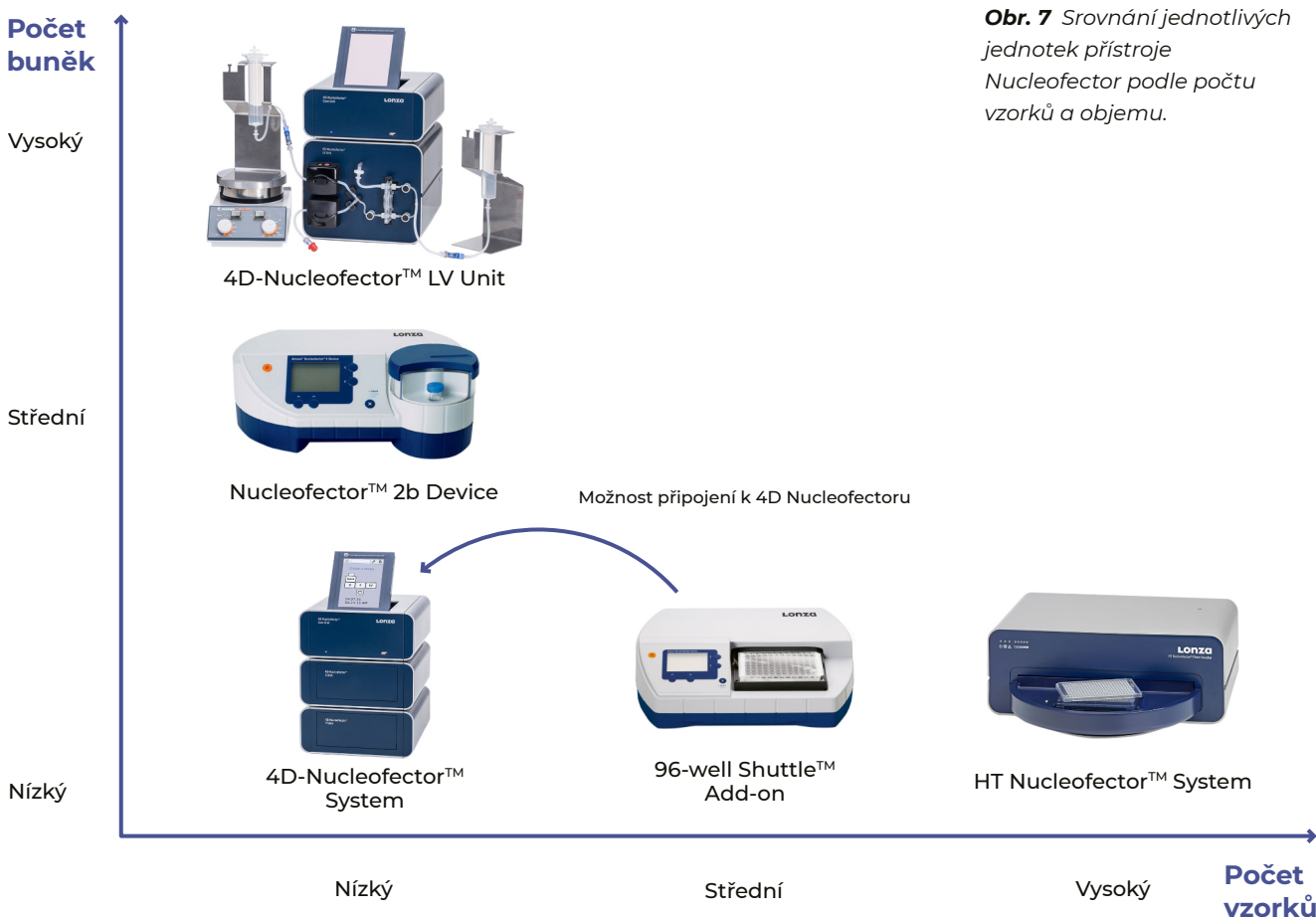
s chemickými a virálními metodami. Zvláštním typem elektroporace je nukleofekce firmy Lonza. Ta probíhá ve speciálním přístroji **Nucleofector** a využívá také elektrických pulzů. Díky jejich optimalizaci a optimalizovanému složení pufru pro každý typ buněk ale vstupuje transfekovaná DNA přímo do jádra buněk. Díky tomu není tento typ transfekce závislý na mitóze, je vhodný i pro nedělící se buňky a při použití konvenční 24-jamkové kultivační desky s ponornými elektrodami lze transfekovat i buňky adherentní (např. neurony). Optimalizované podmínky mají za výsledek také to, že je nukleofekce šetrnější a buňky vykazují po transfekci vyšší viabilitu než po klasické elektroporaci. V závislosti na počtu a objemu vzorků lze transfekce škálovat pro větší počty i objemy vzorků.

4D Nucleofector™ System Lonza

4D Nucleofector System od firmy Lonza je unikátní technologie založená na elektroporaci, která je schopna doručit transfekovanou DNA přímo do jádra buněk s vysokou účinností a za zachování viability buněk. To vše je zajištěno unikátní kombinací přístroje Nucleofector, specifických kitů pro jednotlivé typy buněk a detailních optimalizovaných protokolů. Díky tomu dokáže Nucleofector účinně transfekovat i obtížně transfekovatelné linie, primární a kmenové nebo adherentní buňky. Otevírá tak nové možnosti ve výzkumu chorob, genové terapie, imunoterapie nebo produkci a použití kmenových buněk. Samotný přístroj se skládá z řídicí jednotky **4D-Nucleofector™ Core Unit**, ke které se pak připojují jednotky pro jednotlivé formáty transfekce. **X Unit** je určená pro transfekci suspenzních buněk v kvjetách a 16-jamkových stripech, **Y Unit** pro transfekci adherentních buněk v 24-jamkovém formátu, **96-well Shuttle™**

Device pro transfekci v 96-jamkových destičkách a **LV Unit** pro velkoobjemové transfekce až 10^9 buněk.

- Vynikající transfekční účinnost až 90 % pro plazmidovou DNA a 99 % pro oligonukleotidy v kombinaci s vysokou funkcí
- Schopnost kotransfekce nebo transfekce větších plazmidů – vhodné i pro velké proteiny
- Možnost transfekce v kvjetách, 16-jamkových stripech nebo ve větších objemech (2–3 ml)
- Možnost snadného rozšíření přístroje = vysoká flexibilita
- Umožňuje transfekci CRISPR/Cas9 a sledování cílených genomových editací
- Jednoduchá obsluha s více než 650 specifickými protokoly, které garantují úspěšnou transfekci už při prvních experimentech
- Nevyžaduje vyšší úroveň biologické bezpečnosti



Obr. 7 Srovnání jednotlivých jednotek přístroje Nucleofector podle počtu vzorků a objemu.

Jaké jsou aplikace kinetických fluorescenčních esejí?

Alternativou k bioluminiscenčním reportérovým esejím zmíněných v předchozích článcích je využití geneticky kódovaných fluorescenčních proteinů nebo syntetických fluorescenčních značek, které poskytují cenné informace o expresi sledovaných proteinů nebo molekulových interakcích. Mikroskopická videa a fotografie z experimentů s živými buňkami poskyt-

nou zcela odlišný pohled na vaše experimenty. Fluorescenční zobrazování živých buněk se stává stále cennějším i v oblastech jako je vývoj léků, tkáňové inženýrství, imunologie, imunoterapie a výzkum rakoviny. Z fluorescenčních barviv a jejich podrobné kinetické vizualizace mohou vědci těžit v různých aplikacích, jako je sledování životaschopnosti buněk, stanovení účinnosti transfekce, ko-kultivace a další analýza buněčných procesů.

Pro podobné experimenty se běžně používají drahé konfokální mikroskopy (skenovací nebo s rotujícím diskem) vybavené kultivační komorou, které umožňují sledovat buňky dlouhodobě a s vysokým rozlišením. Při rutinních experimentech ale není vždy vysoké rozlišení potřeba a stejně tak není potřeba blokovat často velmi vytížený konfokální mikroskop. Alternativou je použití kompaktních fluorescenčních mikroskopů, které lze umístit přímo do inkubátoru a experimenty pozorovat na dálku přímo z tepla vaší kanceláře nebo domova. O těchto mikroskopech se dozvíte více v následujícím článku.

Aplikace	Oblast výzkumu			
	Vývoj léčiv	Tkáňové inženýrství	Sledování imunitní odpovědi	Výzkum rakoviny
Buněčná viabilita	Zkoumání vlivu léků na životaschopnost buněk	Zkoumání životaschopnosti (3D) buněčného modelu	Studování vlivu infekcí na životaschopnost imunitních buněk	Testování míry přežití rakovinných buněk v závislosti na koncentraci léčiva
Transfekce	Zkoumání účinku léků na specifické geny	Rozlišování různých druhů buněk v konstruktech v oblasti tkáňového inženýrství	Sledování vlivu určitých genů na imunitní odpověď organismu	Zkoumání vliv určitých genů na vývoj rakoviny
Ko-kultivace	Testování zmírňujících / inhibičních účinků léků na jiné buňky	Sledování vývoje krevních cév v konstruktu	Zkoumání reakcí mezi imunitními a epitelovými buňkami během infekce	Studování vlivu imunitních buněk na životaschopnost rakovinných buněk
Buněčné procesy / interakce	Studování morfologických změn vyvolaných léčivem	Sledování buněčné migrace do biomateriálů	Studování imunologických spouštěčů	Zkoumání abnormálního buněčného cyklu
Markery oxidačního stresu	Zkoumání účinků léku, který je ovlivněn gradienty prostředí	Sledování důsledků narušení hladin kyslíku nebo živin	Monitorování aktivity imunitní odpovědi oxidačním stresem	Studování patofyziologického prostředí lidských nádorových tkání
Nanočástice	Sledování lokalizace transportu léčiv	Zlepšení buněčné specifity biomateriálů	Studování použití nanočástic jako mediátorů zánětu	Zkoumání cílené léčby rakovinných buněk

CytoSMART Lux3 FL CytoSMART Technologies

Jak už jsme uvedli výše, ne vždy je potřeba při časosběrných experimentech s fluorescenčně značenými buňkami znát jejich detailní strukturu. Fluorescenční mikroskop **CytoSMART Lux3 FL** je cenově dostupný kompaktní mikroskop pro sledování dynamických buněčných procesů, který disponuje brightfield módem a dvěma fluorescenčními kanály. Umísťuje se přímo do inkubátoru, kde udržuje buňky v kontrolovaném prostředí a není tak nutné dokupovat nákladné kultivační komory. Mikroskop disponuje 10× objektivem s možností 20× digitálního zoomu a obraz je sbírán 6,4 MPx monochromatickou CMOS kamerou. Ke sledování fluorescence jsou určené dva fluorescenční kanály pro zelenou a červenou fluorescenci. Kanál pro zelenou fluorescenci má pás excitačních vlnových délek 452/45 nm a emisních 512/23 nm. Kanál pro červenou má pak excitační pás 561/14 nm a emisní 630/90 nm. Pro experimenty lze tedy použít jakákoliv fluorescenční barviva, která od-

povídají těmto vlnovým délkám. CytoSMART Lux3 FL umožňuje monitorování buněk v různých kultivačních nádobách, ať už se jedná o T-kultivační lahvičky (T-25 až T-250), destičky (6-384 jamkové destičky), mikrofluidní čipy, Petriho misky nebo mikroskopická sklíčka. Jedinou limitací je výška kultivační nádoby, která se musí vejít pod rameno osvětlující vzorek.

Další devízou tohoto mikroskopu je neomezené cloudové úložiště. Pořízené snímky jsou automaticky nahrávány na cloud, kde lze skrz váš účet sledovat experimenty na dálku např. na vašem mobilním telefonu nebo počítači. Na cloudu jsou navíc dostupné nástroje a algoritmy pro analýzu obrazu, zpracování videí a export dat v různých formátech. Pro použití mikroskopu je samozřejmě potřeba počítač nebo notebook se systémem Windows 10, s portem USB3 a aktivním připojením k internetu. Je možné si zakoupit balíček s počítačem, případně můžete využít svůj vlastní počítač.

Mikroskop je dostupný i v setu dvou nebo čtyř přístrojů: CytoSMART™ Lux3 FL – Duo Kit a CytoSMART™ Lux3 FL Multi kit, což je ideální konfigurace pro simultánní měření několika vzorků, např. replikátů a kontrol za stejných startovacích podmínek.



Obr. 8 Fluorescenční mikroskop Cytosmart Lux3 FL

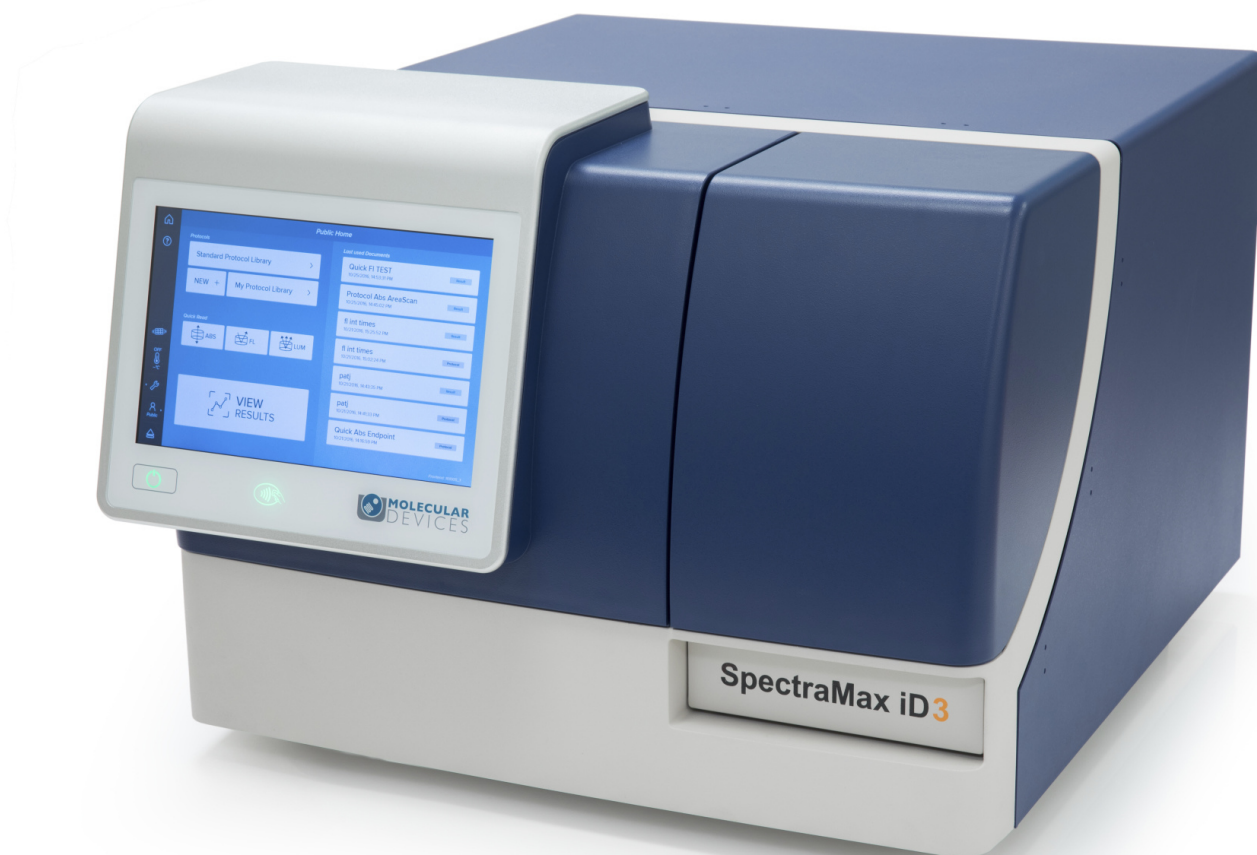
Fluorescenční i jiné kinetické testy v mikrodestičkách SpectraMax iD3 a iD5 MolDev

Jiným pohledem na Váš vzorek, než je fluorescenční zobrazování, může být kvantitativní měření fluorescence v mikrodestičkách. Tuto aplikaci i mnoho jiných přináší řada nejnovějších mikrodestičkových multimode readerů řady SpectraMax iD. Z hlediska fluorescence se jedná o nejflexibilnější readery na trhu. Unikátní vlastností je možnost nastavení fotonásobiče (PMT) na automatický mód. Díky tomu umožňují SpectraMax iD readery porovnávat hodnoty relativních fluorescenčních jednotek (RFU) mezi jednotlivými experimenty (destičkami) a zároveň použití AutoPMT zvyšuje dynamický rozsah. Již tak

vysokou citlivost fluorescenčního měření ještě zvyšují dva parametry přístroje. Tím prvním je schopnost iD readerů nastavit optimální výšku optiky nad vzorkem, což je důležité nejen kvůli variabilitě ve výšce destiček mezi výrobci, ale i pro redukci „cross-talku“ mezi jednotlivými jamkami. Druhou vlastností zvyšující citlivost je fotonásobič, který je chlazený na -5 °C. Zchlazením fotonásobiče dochází ke snížení šumu pozadí a tím ke zvýšení citlivosti v celém spektru, zejména v blízkém infračerveném pásmu. V případě, že je potřeba najít ideální excitační a emisní vlnovou délku fluoroforu, je možné použít nástroj Spectral Optimization Wizard. Tato pomůcka velice rychle najde pár vlnových délek, při kterých byla naměřena maximální RFU.

Součástí přístroje může být také systém injektorů pro rychlou kinetiku. Injektory mají unikátní vlastnosti „add and mix“ a také „reverse prime“ díky kterému je mrtvý objem několikanásobně menší než u konkurenčních injektorů, a to menší než 10 µl.

Kromě fluorescence lze měřit v modech absorbance a luminiscence v případě SpectraMax iD3. SpectraMax iD5 má navíc ještě schopnost měřit zpožděnou fluorescenci (TRF) a fluorescenční polarizaci.



Obr. 9 SpectraMax iD3

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. Stejně činidlo, které indukuje apoptózu v jedné buněčné linii, nemusí mít žádný účinek na jinou buněčnou linii. Činidlo, které indukuje apoptózu ve dvou různých buněčných liniích, může mít radikálně odlišný časový průběh působení.

Nejčastěji používané jsou immortalizované 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 nebo blokaci apoptotické dráhy. Alternativou k buněčným liniím jsou primární

buňky, např. hepatocyty, endotelové buňky izolované z pupečníku (HUVEC) nebo keratinocyty, které mohou poskytovat přesnější obraz typické situace *in vivo*, ale může být obtížnější je pěstovat a transfekovat. Nicméně i pro kultivaci a transfekci primárních buněk nabízíme řešení v podobě speciálních médií a technologie nukleofekce od firmy Lonza.

Primární a kmenové buňky + média Lonza

Firma Lonza nabízí širokou nabídku primárních buněk a specializovaných médií pro zajištění maximální spokojenosti vašich buněk. V nabídce jsou následující:

- 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

Obr. 10 Speciální média Clonetics pro primární buňky od společnosti Lonza



Obr. 11 Krevní a imunitní buňky od společnosti Lonza



- Krevní a imunitní buňky (pestrý fond dárců, doporučená média pro kultivaci: X-VIVO™ – Lonza. Typy tkání, z nichž jsou buňky získávány: kostní dřeň, periferní krev (získaná aferezí), mobilizovaná krev, plná krev, pupečnicková krev)
- Klasická média a pufry jako RPMI, DMEM aj.

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, 100 ml
17-512F	DPBS-1X w/o Ca++, Mg++ 500 ml

Séra Capricorn Scientific



Obr. 12
Fetální séra
Capricorn

Capricorn Scientific je inovativní německá firma založená v roce 2013 a její snahou je zvýšit standard na poli buněčných kultur. Firma vyrábí a dodává produkty pro kultivace, skladování a separaci buněk jak pro vědecké, tak i pro výrobní účely. Hlavní produktové řady jsou lidská a zvířecí séra (hovězí, koňské, kozi, 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

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 léčiv vyžaduje testy, které jsou schopné rozlišit malé změny v transkripci, molekulárních interakcích a zdravotním stavu buněk. Studium transkripce může zahrnovat charakterizaci promotorů, enhancerů a transkripčních faktorů, identifikaci bodových mutací nebo delecí a 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.

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 měření absorbance. Vyšší citlivost luminiscenčních měření je dána především nižším pozadím. Luminiscence totiž na rozdíl od fluorescence a absor-

bance nevyžaduje žádný druh excitačního záření. V buňkách navíc není přítomno nic, co by vydávalo světlo samo o sobě (samozřejmě s výjimkou lumineskujících živočichů). Oproti tomu autofluorescence proteinů, kofaktorů a dalších běžně přítomných molekul je běžným jevem, který přispívá k vyššímu pozadí fluorescenčních esejí.

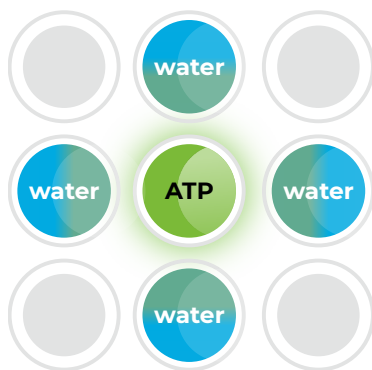
Bez ohledu na metodu stanovení vyžaduje detekce slabých signálů či malých změn citlivou analýzu. Například při studiu enzymatické reakce nechcete přidávat vysokou hladinu substrátu nebo enzymu, abyste reakci zesílili na zjiitelnou úroveň, protože to vytváří umělý systém, který neodráží fyziologické podmínky a plýtvá se drahocennými reagensy. 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.

Obr. 13
Luminometry
GloMax – flexibilní
řešení pro každého





Obr. 14
Crosstalk je vedle citlivosti a dynamického rozsahu detektoru důležitým parametrem při výběru mikrodestičkového luminometru.

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. Takové luminometry jsou většinou vybavené aperturou, která zabraňuje vstupu světla ze sousedních jamek k detektoru. Nicméně je vždy vhodné dobře naplánovat i umístění vzorků na destičce, ideálně 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 úroveň transkripce a jemnější změny v molekulárních interakcích za téměř fyziologických podmínek.

GloMax luminometry Promega

GloMax luminometry od firmy Promega jsou multi-mode readers 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 má schopnost automatického nastavení gainu pro každou jamku zvláště bez nutnosti zdlouhavého ladění ideální hodnoty pro celou destičku. Výsledkem je optimalizovaná citlivost pro celý rozsah měřených signálů, což zabraňuje saturaci detektoru nebo vzniku falešně negativních výsledků v případě slabých signálů. Readers GloMax jsou dostupné v různých konfiguracích. Základní Navigator disponuje pouze detekcí luminiscence, modely Explorer a Discover pak i detekcí fluorescence a absorbance (viz Tabulka 5).

- Intuitivní ovládání přístroje prostřednictvím připojeného tabletu
- 10–1000× vyšší citlivost a o 2–3 řády širší lineární dynamický rozsah než u konkurenčních přístrojů, nízký crosstalk
- Světelný signál detekovaný prostřednictvím fotonásobiče s nízkou hladinou šumu
- Automatické nastavení gainu
- Otevřený systém s přednastavenými protokoly pro všechny luciferázové eseje a buněčné eseje Promegy
- Kompletní řešení GloMax® – přístroje, reagentie i podpora od jednoho dodavatele

Tabulka 5 Srovnání jednotlivých modelů přístrojů řady GloMax

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)	✓	✓		✓	✓

