**UTJECAJ PROBIOTSKIH BAKTERIJA NA Caco-2 STANICE:**

**IZRAZAJ ZO-1, OCCLUDIN, JAM-A TE ANTI-UPALNI UCINAK**

**Cilj:**

odrediti utjecaj 12 sati prime TNF-a i dodatkom LPS iz E. coli na ekspresiju JAM-A, occludin i ZO-1

**Kompletni medij 1: DMEM/F12 + glutamine + 10% FBS + Pen/Strep**

**Kompletni medij 2: DMEM/F12 + glutamine + 10% FBS**

**Kompletni medij 3: DMEM/F12 + glutamine + 10% FBS + 2x Pen/Strep**

**Postupak**

Priprema reagencija

1. LPS u kompletnom mediju 2.

LPS stock (LPS porijeklom iz E. coli (Sigma, 0.111:B4) - 5 mg/ml**.**

Pripremiti 2 g/ml (2x) otopine LPS u kompletnom mediju 2.

U **10 ml kompletnog medija 2.** dodati **4 l LPS stock (5 mg/ml)** kojeg nakon otapanja dobro vortexirati (5 min)

**Prenijeti 100 L/well**

1. Probiotske bakterije u kompletnom mediju 2. MOI 2

Total 2 ml; 4x106 CFU u 2 ml kompl. mediju 2. (0.2x106 CFU u 0.1 ml=MOI 2)

Bakt stock 107 CFU/ml (OD 0.5), 2 ml volume u MRS

Pripremiti 6 epp tubica od 2 ml. Oznaciti.

Dodati 1.6 ml PBS

Prebaciti po 0.4 ml dobro vorteksirane suspenzije bakterija

Centrifugirati 10 min RT 4000xg

Ukloniti nadtalog

Vortex

Dodati po 2 ml kompl. medija 2.

1. 2x (50 g/ml) S-proteini/egzopolisaharidi u kompl. mediju 2.

Total 2 ml; 10 l S-protein/EPS stock (10 mg/ml) + 2 ml kompl. medija 2. (wc 25g/ml)

|  |  |
| --- | --- |
| ***Sojevi probiotika (svjeze pripremljene 107 CFU/ml)***  1. L. brevis MB1=medij 1.  2. L. brevis MB2=medij 2.  3. L. brevis MB13=medij 3.  4. L. brevis MB20=medij 4.  9. L. fermentum D12=medij 9.  10. L. fermentum MC1=medij 10. | ***Izolirani protein/polisaharidi (10mg/vial; -20°C)***  11. S protein L. brevis MB1=medij 11.  12. S protein L. brevis MB2=medij 12.  13. S protein L. brevis MB13=medij 13.  14. S protein L. brevis MB20=medij 14.  15. egzopolisaharid L. fermentum D12=medij 15.  16. egzopolisaharid L. fermentum MC1=medij 16. |

**1.9.2022.**

Caco-2 stanice (7500/well) su nasadene u 96 well plocicu u 0.2 ml kompletnom mediju 1. Medij je mijenjan svakih 2 dana.

**7.9.2022.**

Zamjena medija s 0.2 ml kompletnim medijem 2.

**9.9.2022.**

**A)**

***Plocica 1. Bez LPS-a***

Pazljivo pokupiti medij iz svih wellova (pazi da se ne odvoji monosloj) i dodati 0.1 ml kompletnog medija 2.

**B)**

***Plocica 2. s LPS-om***

Pazljivo pokupiti medij iz svih wellova (pazi da se ne odvoji monosloj) i dodati 0.1 ml kompletnog medija 2. s LPS-om 2 g/ml (konacna radna konc. 1 g/ml).

***Obje Plocice***

Dodati *po 0.1 ml*

a) kompl. medija 2. u kolone A

b) pripremljenih kompl. medija 2. s dodanim S proteinima ili EPS 2x (50 g/ml)

c) pripremljenih kompl. medija 2. s dodanim prob. bakterijama (MOI 2; 200,000)

Inkubirati plocicu na 37°C 20 sati

Shema tretmana obje Plocice

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Lista prob.**  **MOI 2** | **S probioticima** | | | | | | | **Bez prob** |  |
|  | ***H*** | ***G*** | ***F*** | ***E*** | **D** | **C** | **B** | **A** |  |
| **MB1** |  |  |  |  |  |  |  |  | **1** |
| **MB2** |  |  |  |  |  |  |  |  | **2** |
| **MB13** |  |  |  |  |  |  |  |  | **3** |
| **MB20** |  |  |  |  |  |  |  |  | **4** |
| **D12** |  |  |  |  |  |  |  |  | **5** |
| **MC1** |  |  |  |  |  |  |  |  | **6** |
| **S-MB1** |  |  |  |  |  |  |  |  | **7** |
| **S-MB2** |  |  |  |  |  |  |  |  | **8** |
| **S-MB13** |  |  |  |  |  |  |  |  | **9** |
| **S-MB20** |  |  |  |  |  |  |  |  | **10** |
| **EPS-D12** |  |  |  |  |  |  |  |  | **11** |
| **EPS-MC1** |  |  |  |  |  |  |  |  | **12** |

**10.9.2022.**

Nakoninkubacije lagano vertikalnim naginjanjem izmjesati sadrzaj well-ova te pokupiti 0.1 ml medija iz svakog well-a u PP microtubice (pulirati istovjetne) I zamrznuti -80C (ostalo baciti).

Dodati svjezi 0.2 ml/well kompletni medij 3. s 2x pen/strep i dodatno inkubirati 2 sata.

Nakon inkubacije ukloniti medij (BACITI) I nastaviti immunostaining……… fiksirati I nakon ispiranja pohraniti na 4C

**11.9.2022.**

**Imunoobiljezavanje**

Shema obiljezavanja za obje plocice

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **H** | **G** | **F** | **E** | **D** | **C** | **B** | **A** |  |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  | Isotype Occludin/ZO-1 | **1** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  | Isotype JAM-A | **2** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  | ZO-1 | **3** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  | Occludin | **4** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  | JAM-A | **5** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **6** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **7** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **8** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **9** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **10** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **11** |
| Isotype Occludin/ZO-1 | Isotype JAM-A | ZO-1 | Occludin | JAM-A |  |  |  | **12** |

**ZOI-1** pgtlab#CL488-21773 **1:200**

**Occludin** pgtlab #CL488-27260 **1:500**

**JAM-A 1:100** abcam #ab269948 **+sekundarno** pgtlab **#**srbAF488-1 **1:1000**

**Isotype JAM-A (rabbit IgG) 500 µg/ml 1:100 + sekundarno 1:1000;** stock je 13,6mg/ml; 3,67µl stock+100 µl PBS=500 µg/ml

**Isotype ZOI-1/Occludin 1:500** pgtlab #CL488-30000

Prije bojanja stanica, cca 10 min ranije (dok je inkubacija sa blocking bufferom) pripremiti razrjeđenja antitijela u u PBS-u! Obiljažava se 26 wella sa svakim antitijelom. Pripremiti volumen za obilježavanje 30 wellova; 50µl/well =1500µl. Za izotipske je potrebno 100 µl otopine.

**ZOI-1 1:200** = 1500 µl PBS + 7,8µl ZOI-1

**Occludin 1:500** = 1500 µl PBS + 3µl Occludin

**JAM-A 1:100** = 1500 µl PBS +15µl JAM-A + 1,5 µl sekundarnog antitjela

**Isotype JAM-A 500 µg/ml 1:100** = 500 µl PBS + 5µl Rabbit IgG + 0,5 µl sekundarnog antitjela

**Isotype ZOI-1/Occludin 1:500 =** 500 µl PBS + 0,25µl Phalloidin + 1µl Isotype IgG

**Protokol za bojenje:**

1. Isprati stanice 2X sa 200µl PBS-a
2. Fiksirati stanice sa sa ice cold 70% etanolom, 15min, RT
3. Isprati 3X sa 200µl PBS
4. Inkubirati sa 100µl 0,1% Triton-X 100, 5min, RT
5. Isprati 3X sa 200µl PBS
6. Inkubirati sa 100 µl blocking buffer (4% BSA) 1h, RT
7. Aspirirati blocking buffer i inkubirati sa antitijelima 2h RT
8. Isprati 3X sa 200µl PBS
9. Dodati 50µl 100nM DAPI/well, inkubirati 5min, RT
10. Isprati sa 1X 200µl PBS-a
11. Dodati 50µl PBS-a/well
12. Analiza EVOS!