

# FYS3710 Cellelab

Kristian Tuv

November 15, 2017

## 1 Innledning

Vi har i dette eksperimentet brukt et flowcytometer til å måle DNA mengdene i celler som har blitt bestrålet med 1 Grey og 5 Grey, samt å måle DNA mengden i celler som ikke er bestrålt som kontroll.

## 2 Teori

Ved bestråling av celler av normale celler i kroppen, vil enten cellene forsøke å reparere seg selv eller begå selvmord ved apoptose, og dermed omdannes til mat for for nabocellene. Det kan ofte være bedre å la de skadede cellene gå inn i apoptose enn å reparerer skader, som kan føre til feil under reparasjonen og senere mutasjon og kreftutvikling.

For at cellen skal kunne gå inn i mitose og dele seg, er det flere checkpointer i celledelingssyklusen cellen må komme seg igjennom. Dette er for å sikre at celler med skader på DNA deler seg.

Vi kan dele cellesyklusen inn i 4 deler, se figur 1. Dersom cellen rekker frem til mitose før den dør vil dette kunne føre til nekrose, cellesprekking og tok-

sisek produkter.

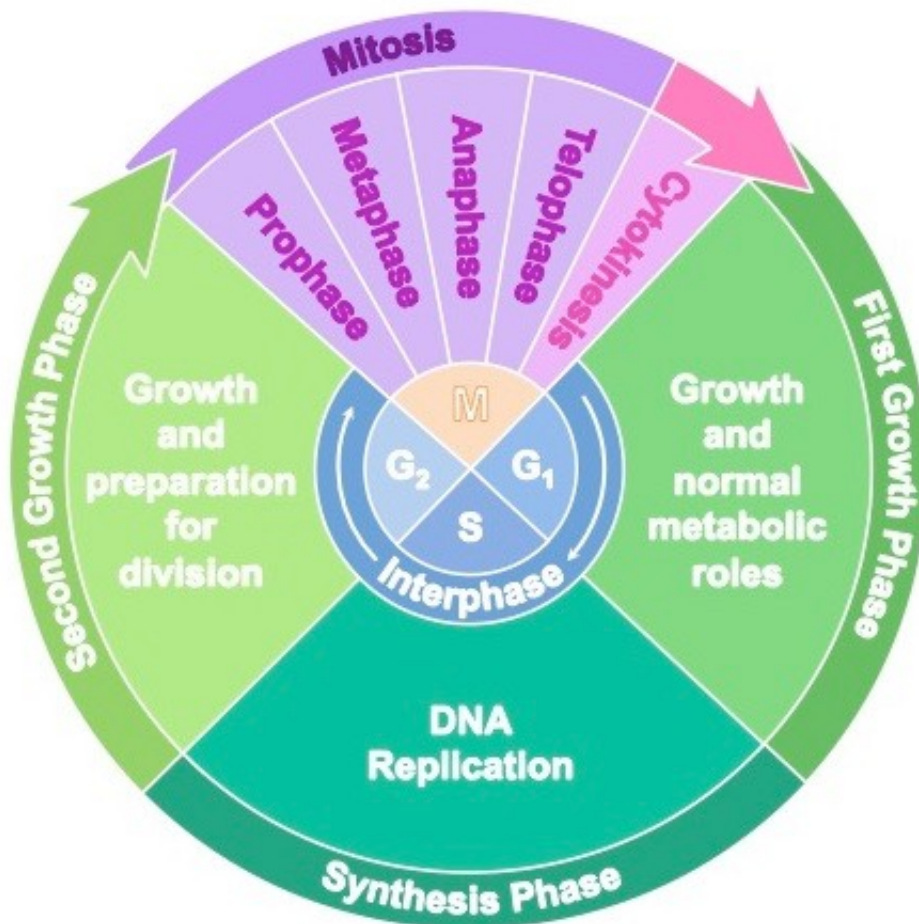


Figure 1: Illustrasjon av celledyklusen delt inn i 4 faser.

G<sub>1</sub>: Vanlig vekst.

S: DNAet doubles.

G<sub>2</sub>: Videre vekst og forberedelse til celledeling.

M: Cellen deles.

En celledyklus tar ca 24 timer, der cellen befinner seg mesteparten av tiden i fase G<sub>1</sub>.

Kilde:[http://ib.bioninja.com.au/standard-level/](http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-cycle.html)

[topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-cycle.html](http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-cycle.html), 15.11.2017

### 3 Flowcytometer

I flowcytometeret sendes cellene enkeltvis forbi en laserstråle som kan eksitere fluorescerende stoffer. Cellen har på forhånd blitt merket med propidium iodid (PI), som er et fluorescerende stoff som binder seg til DNA. PI eksiteres og sender ut lys når stoffet deeksiteres. Vi bruker metoden til å måle DNA mengden i en celle, og utifra hvor mye DNA det er vet vi også hvilken fase av celledyklusen cellen er i.

### 4 Gjennomføring

6 flasker med mellom 0.5 og 1 million celler analyseres.

- 2 flasker er kontrollflasker
- 2 flasker bestråles med 1 Gy på 220 kV
- 2 flasker bestråles med 5 Gy på 220 kV

#### Prosedyre:

Dagen før:

- Cellene bestråles med 220 keV røntgen og inkuberes i 4 timer
- Cellene trypsineres og sentrifugeres
- Vaskes 2 ganger med 5 ml PBS og sentrifugeres
- Pellet resuspenderes i 200  $\mu$ l PBS, vortex. 5 ml fyserkald 70 % ethanol tilsettes drålevis. 24-48 timer i kjøleskap.

På dagen:

- Alle prøver sentrifugeres og vaskes 2 ganger i PBS

- Sentrifugeres og resuspenderes i 500  $\mu$ l PBS med 35  $\mu$ g PI + 100  $\mu$ g/ml RNase
- Vente i 45 min med prøvene i mørkt rom
- Prøvene filtreres og kjøres på flowcytometer

## 5 Resultater

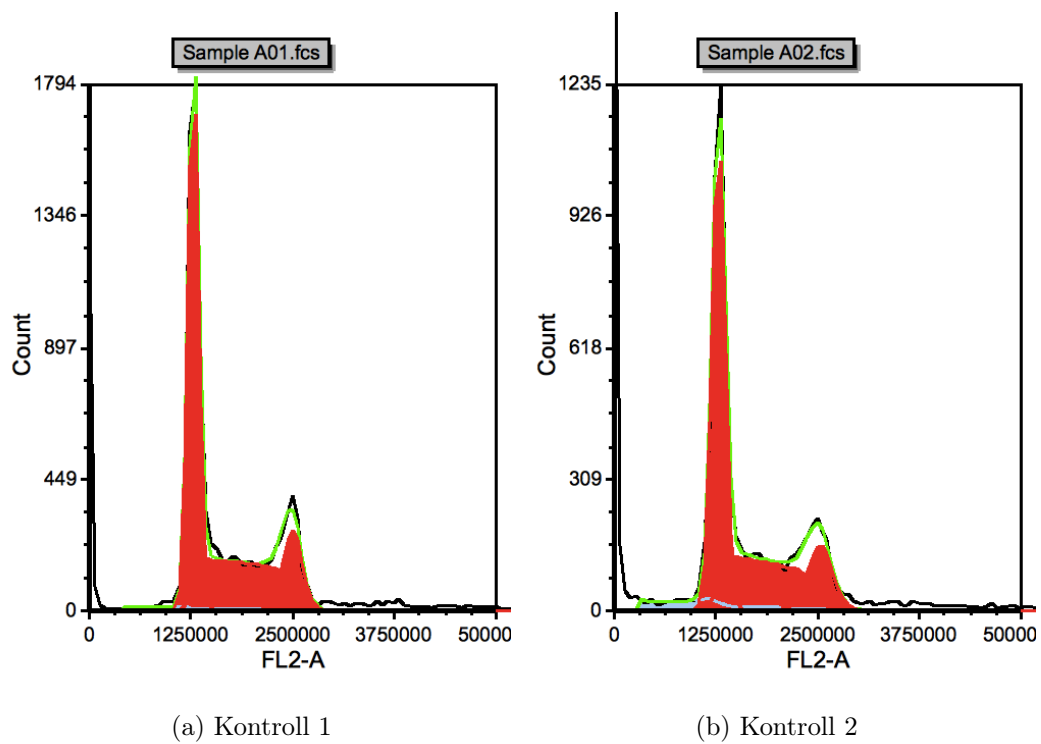


Figure 2: Kontrollprøver. Vi ser her at antall celler i G1 fase (første topp) er langt større en antall celler i G2 fase (andre topp)

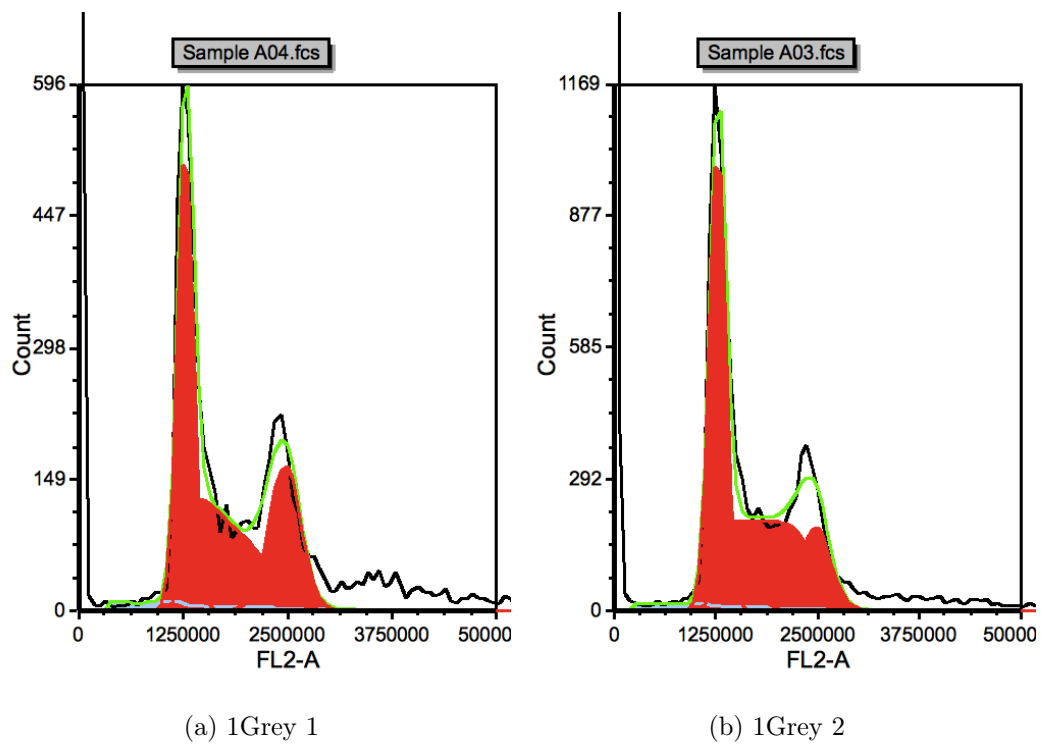


Figure 3: Prøver bestrålt med 1 Gy. Vi ser her at forholdet mellom antall celler i G1 fase og G2 fase har sunket sammenlignet med kontrollprøvene

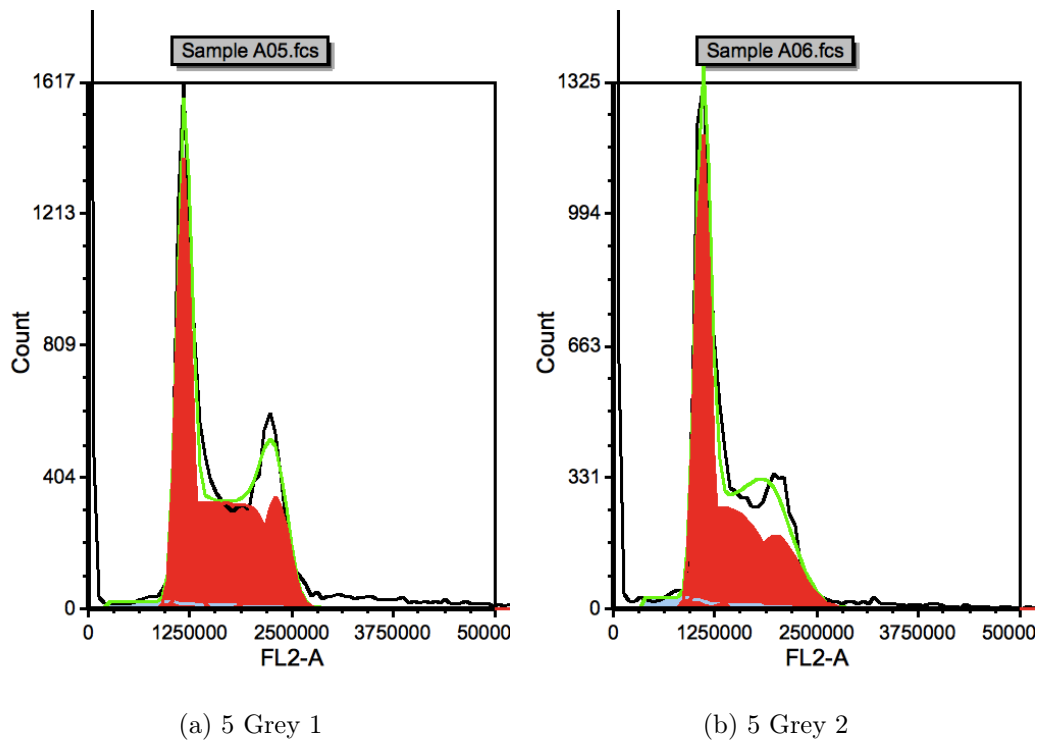


Figure 4: Prøver bestrålt med 5 Gy. Vi ser her at forholdet mellom antall celler i G1 fase og G2 fase har sunket sammenlignet med kontrollprøvene

Prøve	% G1	% S	% G2
Kontroll 1	51.743	33.671	14.586
Kontroll 2	52.978	32.864	14.159
1 Grey 1	40.548	35.539	23.913
1 Grey 2	44.261	40.660	15.079
5 Grey 1	37.268	45.466	17.266
5 Grey 2	43.638	35.772	20.371

Figure 5: Tabell over prøveresultater. Antall celler i hver fase er oppgitt i prosent

## 6 Diskusjon og konklusjon

Fra tabellen i Figur 5 ser vi at kontrollprøven har flest celler i G1 fase. Dette stemmer godt med hva vi bør forvente, siden kontrollprøvene ikke har blitt

bestrålt, og de aller fleste cellene derfor bør gå igjennom cellesyklusen uten problemer og starte på en ny cellesyklus. Siden G1-fasen tar lengst tid, er det også å forvente at de fleste cellene befinner seg i denne fasen.

For prøvene som har blitt bestrålt ser vi at antall celler i G1 fase synker desto mere vi har bestrålt prøvene. For S fase og G2 fase ser vi at antallet celler stiger fordi de bestrålte cellene stanser sin cellesyklus for å enten kunne reparere cellen eller kunne gå inn i apoptose.