

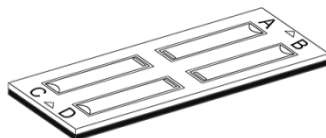
EASYCOUNTER YC KIT VITALITY


Инструкция за употреба

В много случаи токсичните ефекти на химичните или физичните фактори не водят директно до клетъчна смърт на дрождите. Такива фактори могат да причинят редица морфологични, вътрешноклетъчни или метаболитни изменения, които ще доведат до неспособността на клетката да се дели, но самата клетка все още може да бъде жива. Методът за оценка на клетъчната жизнеспособност (Viability), предоставя информация само за броя на живите и мъртви дрождени клетки в клетъчната суспензия, но не дава информация за броя на жизнените клетки. В този аспект клетъчната жизненост (Vitality), определяща физиологичните възможности на клетката е много важен параметър. Измерването на жизнеността на клетките е препоръчително, за провеждане на ефективен контрол на ферментационния процес при значима концентрация на инхибиращите вещества, които се продуцират по-време на процеса. Той е много необходим за контролиране на метаболитната активност на дрождевите клетки при провеждане на ферментацията в пивопроизводството, при производството на биоетанол, в хлебопроизводството и др. Методът за определяне жизнеността (Vitality) на дрождите се базира на определяне на активността на ензима естераза с помощта на естеразният субстрат 5-карбоксифлуоресцеин диацетат (CFDA). Паралелно с този анализ е важно да се определи общия брой клетки в дрождевата суспензия. Това може да се постигне чрез използването на флуоресцентното багрило Sofia-Green, което оцветява само мъртвите клетки. За определяне на общия брой на клетките е необходимо клетките да се обработят така, че мембраната на живите клетки да стане проницаема за Sofia-Green. Това се постига чрез смесване на клетъчната суспензия с лизиращ реагент за 10 минути. Съчетаването на тези два анализа води до осигуряване на ефективен ферментационен контрол и до повишаване на добива и качеството на получавания биопродукт.


Комплектът съдържа следните консумативи:

- 25 бр. CELLCHIP



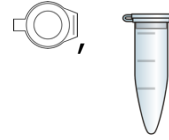
- 50 бр. прозрачни епендорфки с оранжева капачка  с изсушени SOFIA GREEN флуоресцентно багрило и лизиращ реагент



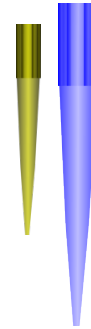
- 50 бр. прозрачни епендорфки с синя капачка  с изсушен 5-карбокси- флуоресцеин диацетат (CFDA)



- 50 бр. празни прозрачни епендорфки с прозрачна капачка необходими за смесване на пробата с цитратния буфер



- 250 бр. накрайници за автоматична пипета – до 100 µL
- 100 бр. накрайници за автоматична пипета – до 1000 µL



- 5 броя епендорфки, съдържащи соли в сух вид за получаване на цитратно-фосфатен буфер с pH 4 (Macilvaine buffer)

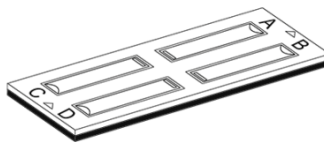


- 1 празна епруветка с обем 15 mL, необходима за разреждане на цитратния буфер



За приготвянето на пробата за анализ са необходими:

- 1 бр. CELLCHIP




- 1 бр. прозрачна епендорфка с оранжева капачка с изсушени SOFIA GREEN флуоресцентно багрило и лизиращ реагент

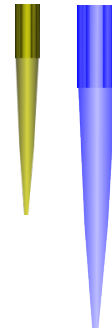


- 1 бр. прозрачна епендорфка с синя капачка с изсушен 5-карбокси-флуоресцеин диацетат (CFDA).



- 1 бр. празна прозрачна епандорфка с прозрачна капачка , необходима за смесване на пробата с цитратния буфер

- 5 бр. накрайници за автоматична пипета до 100 μL
- 2 бр. накрайници за автоматична пипета до 1000 μL



- 1 бр. автоматична пипета от 100 μL
- 1 бр. автоматична пипета от 1000 μL
- Бъркалка Mini Vortex
- Хомогенизирана дрождева култура

- Една епандорфка, съдържаща соли в сух вид за получаване на цитратно-фосфатен буфер с pH 4 (Macilvaine buffer)



- 8 μL Ацетон
- 1бр. празна епруетка с обем 15 mL, необходима за разреждане на цитратния буфер

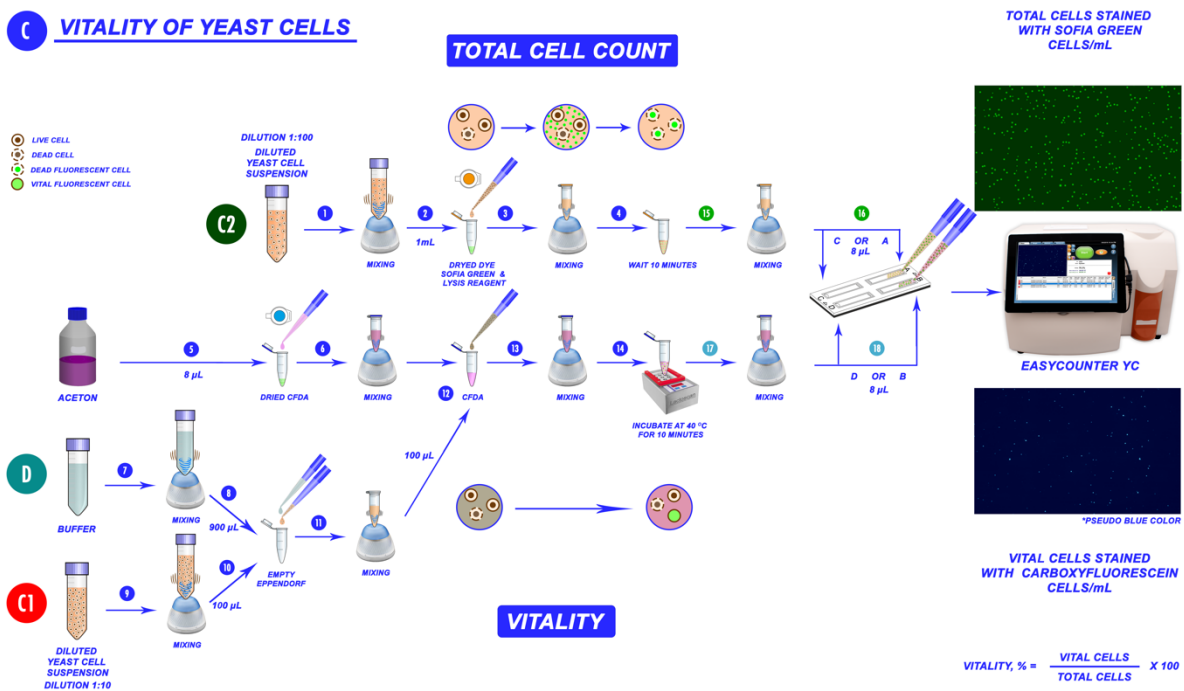


- Термостат



Принцип на анализа

Естеразният субстрат 5-карбоксивлуоресцеин диацетат (CFDA) се използва за определяне на жизнеността (Vitality) на дрождите. CFDA прониква през клетъчните мембрани на живите клетки, диацетатните му групи се разцепват от неспецифични естерази и се получава флуоресцентна, заредена форма на субстрата (карбоксивлуоресцеин), която оцветява клетките в зелено и изтича от вътрешността на клетките много бавно. Паралелно в отделна проба с дрождева клетъчна суспензия се определя общия брой дрождеви клетки с помощта на флуоресцентното багрило Sofia Green. За определяне на общия брой на клетките е необходимо мембраната на живите клетки да стане проницаема за Sofia Green. Това се постига чрез смесване на клетъчната суспензия с лизиращ реагент за 10 минути. Sofia Green прониква през повредените клетъчни мембрани, свързва се с ДНК на ядрото и клетките с увредени мембрани се оцветяват зелено.



Подготвяне на необходимите реагентни разтвори за анализ

1. Приготвяне на CFDA разтвора

Добавете 8 µL Ацетон към една прозрачна епендорфка съдържаща изсушения CFDA. Разбъркайте сместа на Вортекс.



Внимание:

Не добавяйте повече от 8 µL Ацетон, тъй като чувствителността на теста се намалява.



Внимание:

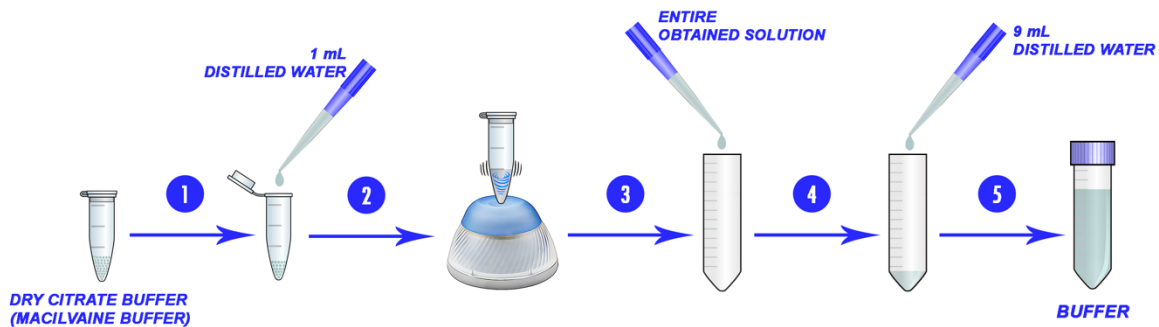
След получаването на кита, **50-те броя прозрачни епендорфки с синя капачка** с изсушен 5-карбоксифлуоресцеин диацетат (CFDA) трябва да бъдат съхранявани замразени при $\leq -20 \text{ }^\circ\text{C}$, защитени от светлина. Ако съхранявате правилно, този реактив, той трябва да остане стабилен за шест месеца. Преди отваряне на епендорфките, те трябва да се затоплят до стайна температура.

2. Приготвяне на буферния разтвор

Добавете 1mL дестилирана вода към епендорфката, съдържаща сухия цитратен буфер (Macilvaine buffer). Разбъркайте на Вортекс сместа. Пипетирайте изцяло разтворената смес (1 mL) и я прехвърлете в празна епруветка с обем 15 mL.

Добавете 9 mL дестилирана вода в епруетката. Съхранявайте приготвения буфер в хладилник при 4°C.

D PREPARATION OF BUFFER SOLUTION



Внимание:

Трайността на приготвения буферен разтвор е 10 дни. С цел избягване на помътняването на буфера, солите на буфера са в сух вид и са разпределени в четири отделни епандорфки.

Разреждане на дрождевата проба за анализ

Разредена дрождева проба 1. Разреждане на дрождевата проба за определяне на общ брой дрождеви клетки (Total):

Разредете изходната дрождева проба с дестилирана вода в епруетка с обем 15 mL по описаният начин при определяне на жизнеспособност (Viability) на дрождите, разреждане за общ брой клетки (виж таблица 1, от EASYCOUNTER YC KIT VIABILITY).

Разредена дрождева проба 2. Разреждане на дрождевата проба за определяне на жизненост (Vitality):

Разредена дрождева проба 2.1. Разредете изходната дрождева проба с дестилирана вода в епруетка с обем 15 mL с 10 пъти по малко разреждане от разредената дрождева проба 1.

Разредена дрождева проба 2.2. За определяне на жизненост (Vitality) на дрождите се прави 10 пъти по-голямо разреждане от разредена дрождева проба 2.1. Вземете 100 μL от разредена дрождева проба 2.1, поставете ги в празна прозрачна епандорфка и добавете 900 μL цитратно-фосфатен буфер с pH 4 (Macilvaine buffer).




Внимание:

За да се осигури статистически достоверен резултат се препоръчва общият брой на клетките в разредената клетъчна суспензия да бъде в интервала от 1×10^5 до 1×10^7 клетки/mL:



- **оптимален интервал - от 1×10^5 до 1×10^7 клетки/ml**

Провеждане на анализа

Анализ за определяне общ брой клетки

1. Вземете 1 mL от разредената и добре хомогенизирана дрождева проба 1, предназначена за определяне на общ брой клетки и го поставете в прозрачна епендорфка с оранжева капачка  , която съдържа изсушено багрило SOFIA GREEN и лизиращ реагент.


2. Затворете прозрачна епендорфка с оранжева капачка  .

3. Вземете прозрачна епендорфка с оранжева капачка  от статива и поставете върха на всяка прозрачна епендорфка с оранжева капачка  в отвора на бъркалката Mini Vortex. Натиснете и задръжте натиснат върха за 1-2 секунди и след това я отдръпнете. Повторете 8-9 пъти.



Внимание!


Прозрачната епруветка съдържа по-голямо количество анализи и за разтварянето и е нужно повече време. Разбърквайте до пълното разтваряне на сухия анализ.

4. Оставете прозрачната епендорфка с оранжева капачка  на статива за 10 минути за взаимодействие на пробата с лизирация разтвор и за оцветяване на клетките с багрилото SOFIA GREEN.


5. Разбъркайте отново пробата на бъркалката Mini Vortex. Натиснете и задръжте натиснат върха за 1-2 секунди и отдръпнете. Повторете 2-3 пъти

6. Пипетирайте 8 μ L от пробата в **камера А** на CELLCHIP-а.

Анализ за определяне броя на жизнените клетки (Vitality)

1. Добавете 8 μ L Ацетон към изсушения CFDA съдържащ се в **прозрачната епендорфка с синя капачка**  .

2. Разбъркайте пробата на вортекс.

3. Отпипетирайте 100 μ L от разредената дрождева проба 2.2 за определяне на жизнените клетки (Vitality) и ги поставете в **прозрачната епендорфка с синя капачка**  , която съдържа разтворения CFDA.

4. Разбъркайте пробата на вортекс

5. Инкубирайте пробата 10 min при 40°C.

**Внимание:**

Не бива да се инкубира пробата повече от 20 мин, тъй като оцветяването на клетките отслабва, поради изтичане на багрилото от вътрешността на клетките.

6. Отново разбъркайте пробата на вортекс.
7. Пипетирайте 8 μ L от пробата в **камера В** на CELLCHIP-а.
8. Поставете CELLCHIP-а в апарата EasyCounter YC и направете измерването.
9. С помощта на софтуера, преминете към анализ на пробата.


**Внимание!**

Препоръчително е да поставите зареденият CELLCHIP в апарата и да стартирате анализа в рамките на **20 – 60 секунди**. Не навременното поставяне на CELLCHIP в апарата и стартирането на анализа ще доведе до неточни резултата поради изпаряване на пробата и попадане на въздух в нея.

Изхвърляне на отпадъците:

С помощта на бутона на автоматичната пипета се отстранява накрайника в подходящ контейнер. Изхвърлете микроепруветката с останалото количество проба и използвания за анализ CELLCHIP в подходящ контейнер.

Съхранение на EASYCOUNTER YC KIT VITALITY :

50-те броя **прозрачни епендорфки с синя капачка**  с изсушен 5-карбоксивлуоресцентен диацетат (CFDA) трябва да бъдат съхранявани замразени при $\leq -20^{\circ}\text{C}$, защитени от светлина. Останалите компоненти на EASYCOUNTER YC KIT трябва да бъдат съхранявани при температура -10°C до $+40^{\circ}\text{C}$, защитени от пряка слънчева светлина.

За повече информация и видео инструкции за работа с EASYCOUNTER YC KIT посетете www.autocellcount.com или www.youtube.com/easycounter

Срок на годност: виж етикета на кутията
Произведено от „Милкотроник“ ООД