

Unieśmiertelniona linia komórek nabłonkowych bydłęcego gruczołu mlekowego (MAC-T) – analiza proteomiczna komórek hodowanych w medium suplementowanym Paneksyną

I. Wstęp4

II. Cel pracy6

III. Przegląd piśmiennictwa

3.1. Hodowle komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego (MEC)
.....7

3.2. Hodowle pierwotne komórek epitelialnych gruczołu
mlekowego (PMEC)8

3.2.1. Hodowle komórek gruczołu mlekowego typu 2D9

3.2.1.1. Hodowle jednowarstwowe komórek nabłonkowych koziego
gruczołu mlekowego (CMEC)..... 9

3.2.1.2. Hodowle jednowarstwowe komórek nabłonkowych bydłęcego
gruczołu mlekowego (BMEC)..... 9

3.2.1.3. Hodowle jednowarstwowe komórek nabłonkowych gruczołu
mlekowego jaka (YMEC)10

3.2.1.4. Hodowle jednowarstwowe komórek nabłonkowych ludzkiego
gruczołu mlekowego (HMEC)..... 11

3.2.1.4.1. Linia komórkowa gruczolakoraka piersi MCF-711

3.3. Trójwymiarowe (3D) hodowle komórek epitelialnych11

3.3.1. Organoidy – przestrzenne hodowle komórek nabłonkowych
.....12

3.4. Ustalone i immortalizowane linie bydłęcych komórek

gruczołu mlekowego	13
3.4.1. Linia komórek MAC-T	13
3.4.2. Inne linie bydlęcych komórek gruczołu mlekowego	16
3.5. Badania proteomiczne – zarys ogólny	17
3.5.1. Badania proteomiczne w kontekście poznania fizjologii gruczołu mlekowego	17
3.5.2. Kierunek wykorzystania analiz proteomicznych w hodowlach komórek gruczołu mlekowego	19

IV. Materiał i metody

4.1. Materiał	21
4.1.1. Charakterystyka materiału badawczego	21
4.2. Metodyka badań.....	21
4.2.1. Hodowla komórek linii MAC-T	21
4.2.2. Adaptacja hodowli komórek MAC-T do wzrostu w medium suplementowanym Paneksyną	22
4.2.3. Plan przeprowadzonego doświadczenia	23
4.2.4. Izolacja białka całkowitego wg. Srivastava (metoda I).....	24
4.2.4.1. Etap I – Założenie hodowli komórkowej.....	24
4.2.4.2. Etap II – Izolacja białka całkowitego.....	25
4.2.5. Izolacja białka całkowitego wg. (Simões i in. 2013) (metoda II).....	27
4.2.6. Oznaczanie koncentracji białka.....	28
4.2.7. Elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).....	29
4.2.8. Elektroforeza dwukierunkowa (2-DE).....	30
4.2.9. Analiza spektrometryczna MALDI-TOF	32

V. Wyniki i ich omówienie

5.1. Morfologia linii komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego bydła MAC-T.....	33
5.2. Porównanie metod izolacji białka całkowitego: metoda I (wg. Srivastava) oraz metoda II (wg. Simões i in. 2013)	34
5.3. Ocena ilościowa wyizolowanego białka całkowitego (metoda Bradford)	35

5.4. Ocena jakościowa wyizolowanego białka całkowitego (Elektroforeza SDS-PAGE).....	36
5.5. Elektroforeza dwukierunkowa (2-DE)	36
5.6. Analiza proteomiczna MALDI-TOF	37
 Podsumowanie i wnioski	67
Piśmiennictwo	68
Wykaz tabel i rycin	74