

Jméno:

Datum:

PROTOKOL TRANSFEKCE

A. TRANSFEKCE POMOCÍ PEI, LIPOFECTAMINU a FUGENE

Postup 2 dny předem: Uvolníme buňky HEK293 pomocí TRYPSIN/EDTA (viz níže), vysejeme je na 2 ml misky tak, aby druhý den dosáhly cca 50 % konfluence.

Postup den předem: Smícháme transfekční činidlo - PEI/Lipofectamin/Fugene - s DMEM (65 ul) mediem bez séra a dalších suplementů, zvortexujeme, centrifugujeme a necháme 10 min stát v RT. Mezitím si nachystáme DNA s DMEM (65 ul, opět bez suplementů) do jednotlivých zkumavek. Přidáme směs transfekčního činidla s DMEM k DNA. Důkladně zvortexujeme a necháme dalších 10 min stát v RT, aby činidlo a DNA vytvořilo komplexy. Pak celou dávku přidáme k nachystané buněčné kultuře (2 ml). Po 4 hodinách, kdy se komplexy dostávají do buněk, se vymění médium za čerstvé (PEI, Lipofectamin). Kultivace 24 hodin v 37°C/5% CO₂ v inkubátoru.

	PEI pH7,0	LIPOFECTAMIN	FUGENE
Medium	130 ul	130 ul	130 ul
Transfekční činidlo	7,5 ul	7,5 ul	7,5 ul
DNA (pMax GFP)	2,5 ug	2,5 ug	2,5 ug
Poměr transfekční činidlo:DNA	3:1	3:1	3:1

SS plazmidu pmax GFP (amaxa): 1,1 ug/ul

Spočítej kolik ul plazmidu bylo přidáno do reakce:

B. NUKLEOFEKCE POMOCÍ PŘÍSTROJE NEON

Postup den předem: Uvolníme buňky pomocí TRYPSIN/EDTA (viz níže). Buňky spočítáme a opláchneme v PBS. 1×10^6 buněk resuspendujeme v 100 ul „Resuspension buffer R“. Před vlastní elektroporací si připravíme misku s růstovým médiem a FBS, do které elektroporované buňky finálně přeneseme (2 ml). Naplníme elektroporační trubici 3 ml „Electrolytic buffer E“. Nastavíme vhodnou kombinaci pro elektroporaci (1150 V/ 20 ms/1pulz). Přeneseme 2,5 ug DNA do sterilní zkumavky a přidáme k ní buněčnou suspenzi a jemně zamícháme. Nasajeme suspenzi buněk a DNA do elektroporační jehly. Vložíme elektroporační pipetu do elektroporátoru a necháme proběhnout elektroporaci. Následně buňky „vypustíme“ do přehřátého media bez antibiotik. Kultivace 24 hodin v 37°C/5% CO₂ v inkubátoru.

Postup aktuálně:

1. Pomocí fluorescenčního mikroskopu odhadni účinnost transfekce vzorků (v %):

1. FUGENE	2. NEON	3. PEI	4. LIPOFECTAMIN

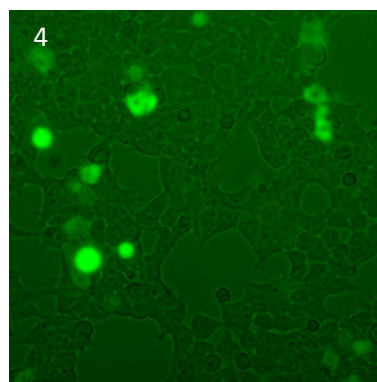
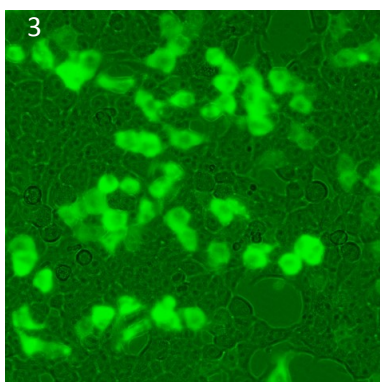
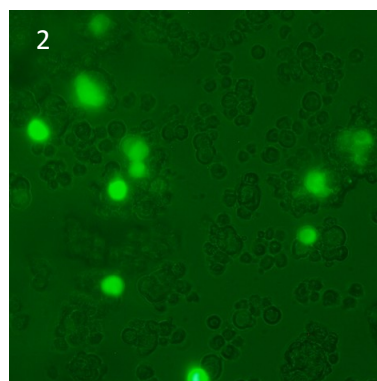
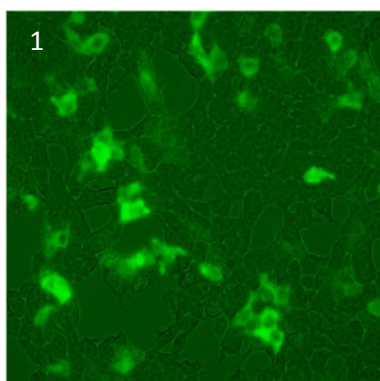
2. Uvolnění buněk pomocí TRYPsin/EDTA: Do připravené zkumavky přenes 750 ul media z kultury. Zbytek přenes do odpadu. Opláchni misku 2 ml PBS, přidej 500 ul TRYPsin/EDTA, inkubuj 3-5' v 37 °C, přenes uvolněné buňky do zkumavky s mediem, důkladně rozsuspenduj.

3. Pomocí průtokového cytometru Accuri C6 urči procento GFP pozitivních buněk.

4. Ze všech výsledků doplň tabulku a urči pořadí efektivity transfekce:

Transfekční činidlo	Odhad % GFP+ buněk	% GFP+ buněk (accuri)	Pořadí efektivity
1. Fugene			
2. Neon nukleofekce			
3. PEI			
4. Lipofectamin			

Výsledky:



Závěr: