

TRANSFEKCE

Izolace DNA

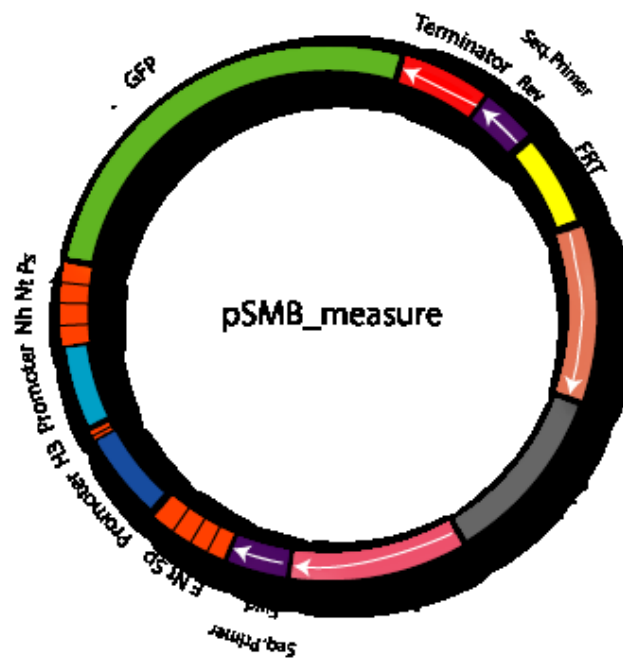
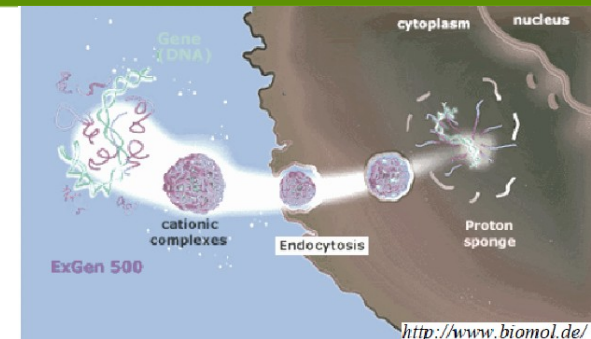
Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

jipro@sci.muni.cz

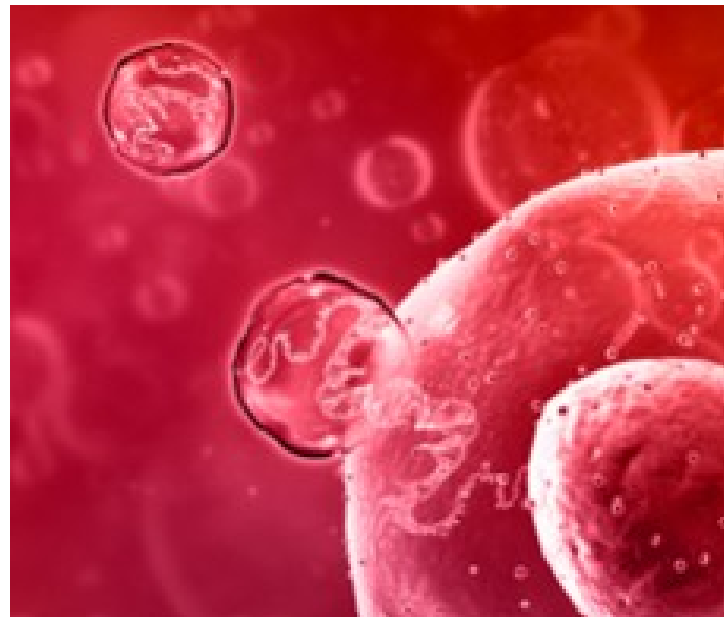
TRANSFEKCE

- Přenos cizorodé DNA pomocí vektorů
- Vektory - molekuly DNA do nichž je včleněn gen zájmu
- Nejčastěji se používají **plazmidy** - malé bakteriální kruhové molekuly DNA
- **SiRNA** (*in vitro* i *in vivo*)



TRANSFEKTANTI

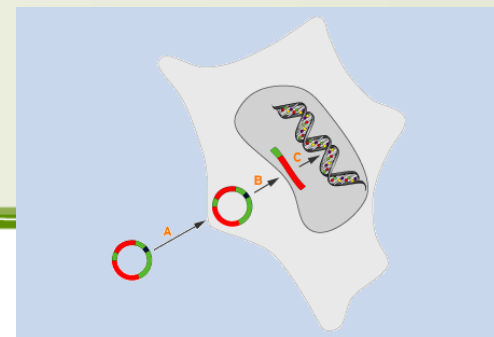
- ▶ Cílem je vnesení cizorodé DNA do jádra eukaryotických buněk
- ▶ Transfektanti – buňky obsahující cizorodou DNA
 - **Stabilní transfektanti:** cizorodá DNA se včlenila do buněčného genomu
 - **Tranzientní transfektanti:** cizorodá DNA není integrovaná do genomu, geny v plazmidu jsou přepisovány jen po omezenou dobu cca 24 až 96 hodin



DŮLEŽITÉ PARAMETRY

- ▶ Pro transfekci je vhodná 40 – 80 % konfluence buněk
 - Málo buněk – buňky nejsou v kontaktu a rostou špatně
 - Mnoho buněk – kontaktní inhibice, zastavení v G0 vede k rezistenci k průniku DNA i jiných makromolekul
- ▶ DNA proniká lépe do aktivně se dělících buněk než do G0
 - V průběhu mitózy dochází k rozložení jaderné membrány, což umožní průnik DNA do jádra
- ▶ U primárních kultur je kritické číslo pasáže
- ▶ Snaha o co nejnižší pasáž i u stabilních linií (<50)
- ▶ V sadě experimentů by se číslo pasáže nemělo příliš lišit
 - U immortalizovaných linií se mění charakteristika buněk v průběhu času a proto je možné že nereagují stejně i když se transfekce provádí při stejných podmínkách

Stabilní transfektanti



- Inkorporace plazmidové DNA nesoucí gen zájmu do genomu tak, aby nebyla umlčena, byla správně zařazená do čtecího rámce a rychle překládaná
- Nutný selekční marker (rezistence k antibiotiku) – buď ve stejném plazmidu nebo transfekce dvou plazmidů zároveň (5:1 ve prospěch genu zájmu)
- Postup:
 1. Elektroporace genu zájmu a selekčního markeru
 2. 48 h inkubace v médiu bez selekčního ATB
 3. Pasážování naředěných buněk (1:100, 1:500) do média se selekčním ATB – výměna po 3 dnech (do 10 dnů by měly zahynout buňky bez inkorporovaného selekčního markeru)
 4. Za 2 – 5 týdnů se objeví ostrůvky rezistentních buněk
 5. Vypíchnutí těchto dobře rostoucích kolonií a jejich další kultivace v médiu s ATB
 6. Naředit rezistentní buňky tak, aby byla 1 b. na 100 ul média a rozpipetovat je do 96 jamkové desky. Ujistit se, že není v jamce více jak jedna buňka. Pod tlakem ATB vybrat nejlépe rostoucí kolonii.

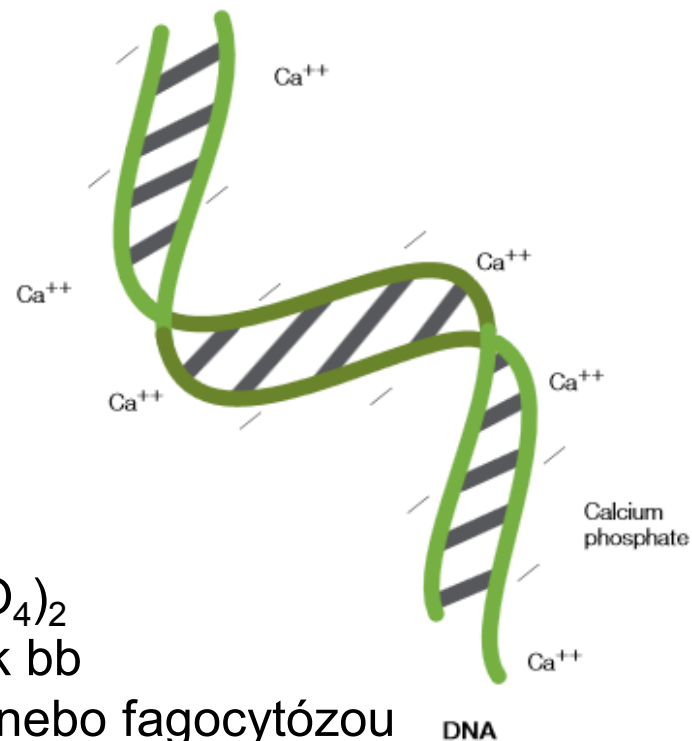
NEJČASTĚJŠÍ METODY TRANSFEKCE

- Směs negativně nabitého $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ a pozitivně nabitého CaCl_2 tvoří precipitát, do kterého se naváže DNA
- Kationické polymery DEAE-dextran, **polyetylenimin (PEI)** – negativně nabitá DNA se naváže na polykation a endocytózou se přenesou do buněk
- Liposomy (**lipofectamin**) – DNA je obalena lipidovou kapsulkou, která může fúzovat s membránou
- **Fugene** – neznámé složení neliposomálního typu, etanol
- Elektroporace – vytvoření pórů (**Neon**)

Krevní buňky je možné transfekovat jen elektroporací

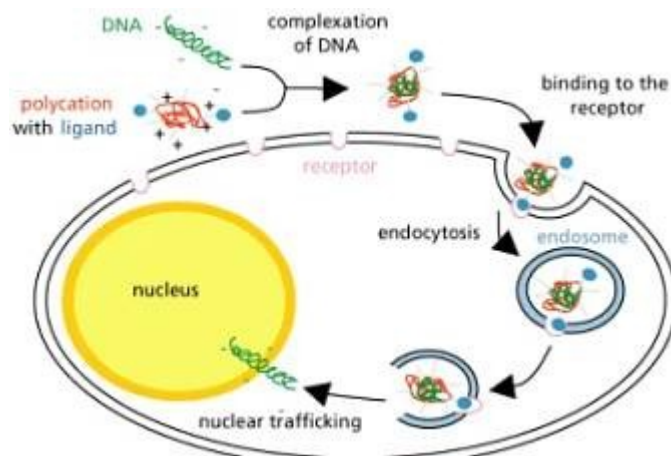
VÁPENATÉ IONTY

- ▶ Smíchání DNA s CaCl_2
- ▶ Přidání směsi do roztoku $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
- ▶ Tvorba precipitátu, který se přidá k bb
- ▶ Pohlcení precipitátu endocytózou nebo fagocytózou



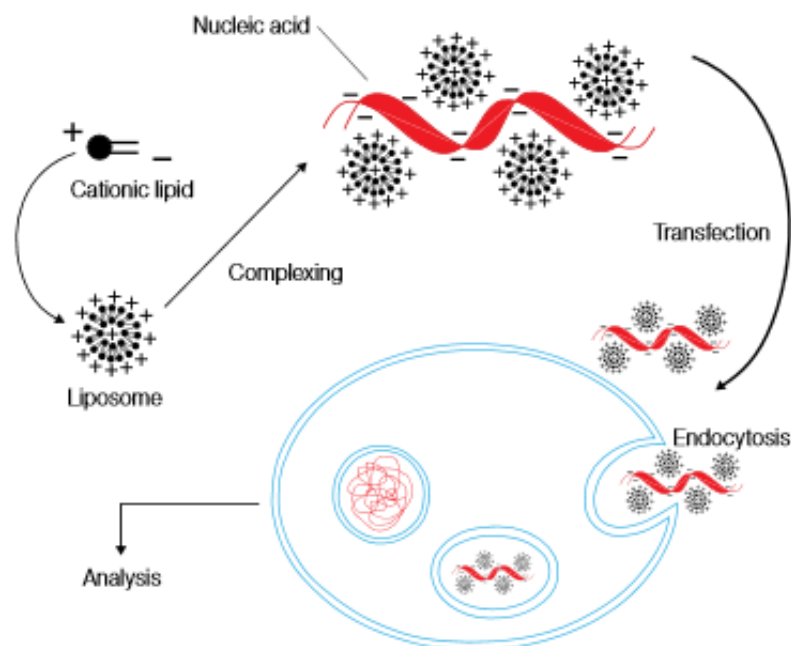
PEI

- Kationické polymery jsou hydrofilické, a proto jsou rozpustné ve vodě
- Jsou schopné velmi efektivně kondenzovat DNA (záporný náboj)
- Komplexy DNA/PEI musí být malé (< 100 nm)
- Internalizace endocytózou
- Akumulace v endosomech a lyzosomech kolem jádra
- Jen malé množství komplexů z těchto organel unikne a dostane se do jádra



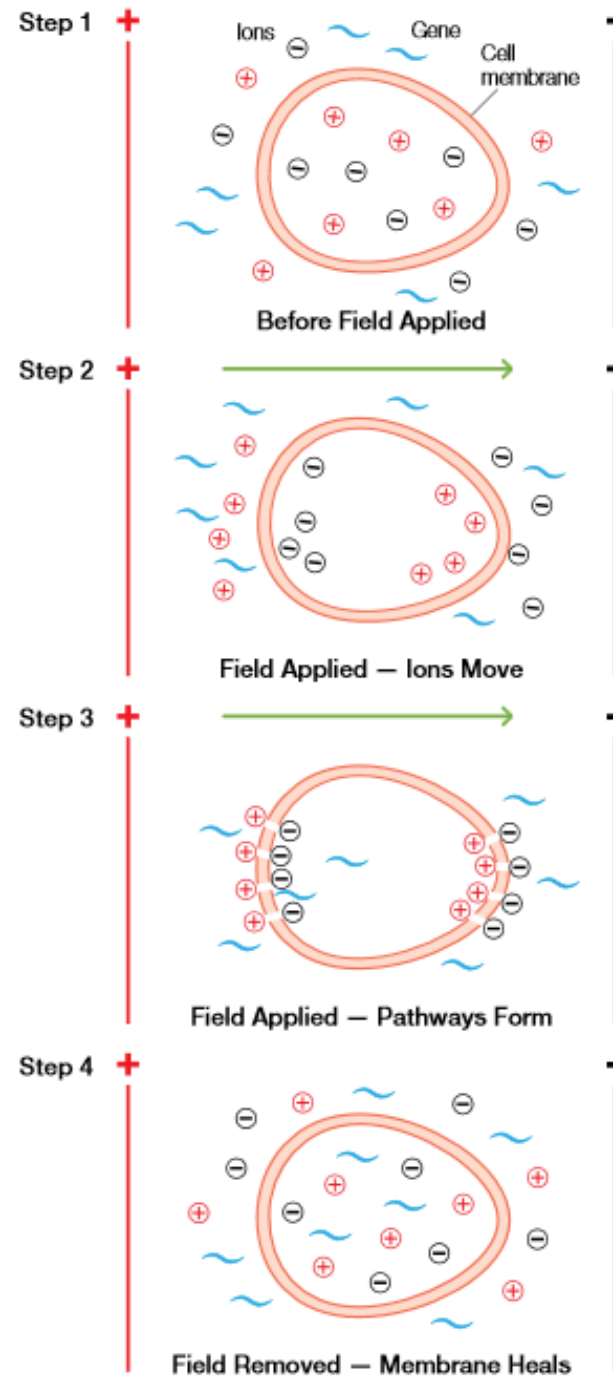
LIPOFEKCE

- ▶ Kationické lipidy – liposomy/lipoplexy (Lipofectamin)
- ▶ Jsou to amfifilické molekuly s kladně nabitou polární částí, která je spojena s nepolární hydrofobickou doménou
- ▶ Elektrostatické interakce mezi kladnou částí a negativně nabitou DNA vede k tvorbě komplexů pohlcených endocytózou



ELEKTROPORACE

- Vystavení buněk elektrickému poli vede ke zvýšení permeabilizace membrány
- Směs buněk a plazmidu v pufru se v kyvetě vloží do elektroporátoru
- Podmínky
 - proud kV/cm
 - délka pulsu μs -ms



ELEKTROPORACE - NUKLEOFEKCE

- ▶ Kombinace elektroporace a dalších činidel (Resuspension buffer R/T) pro zvýšení účinnosti transfekce



- ▶ Elektrickým pulzem se naruší i jaderná membrána a plazmid se dostane přímo do jádra buněk – vysoká efektivita

MÉNĚ ČASTÉ METODY

- **Magnetické kuličky**
 - Paramagnetické kuličky pokryté vektorovou DNA jsou pomocí magnetu vneseny do buněk
- **Balistické technologie** (gene gun/bioballistic=biolistic)
 - Částičky zlata s navázaným genem se vstřelí do buněk
- **Mikroinjekce**
 - Skleněnou pipetou je vnesen roztok s DNA propíchnutím membrány (mikromanipulátory)
- **Laserfekce/optoinjekce**
 - Pomocí objektivou s vysokou aperturou je světlo zaostřeno na bod (cca 1 μm v průměru) po setinu sekundy, čímž se naruší cytoplazmatická membrána

- *Metody založené na použití virů (infekce)*

PLUSY A MÍNUSY

- ▶ PEI
 - + cena/efektivita
 - nutnost výměny média (toxicita)
- ▶ Lipofectamine
 - + efektivita
 - nutnost výměny média, cena
- ▶ NEON
 - + efektivita, není nutno měnit médium, použití na krevní buňky
 - cena
- ▶ Fugene
 - + efektivita, není nutno měnit médium
 - cena

Rozhodující je poměr efektivita : cena

MOŽNOSTI VYUŽITÍ TRANSFEKCE

Transfekcí je možné ovlivnit

- Molekulární mechanismy zahrnuté v kontrole buněčné proliferace, diferenciaci, přežití/smrti
- změnu buněčného fenotypu a mezibuněčné komunikace
- **Uvedené procesy hrají úlohu ve vývoji nádorových onemocnění a mohou být potencionálně využity v protinádorové terapii.**

Transfekcí můžeme vnést do buněk také

- Reportérový plazmid (β GAL, LUC, CAT...)
- Expresní plazmid (konjugát proteinu a fluorescenčního proteinu – GFP, YFP, mCherry...)
- SiRNA (cílený knock-out genů)

Experiment

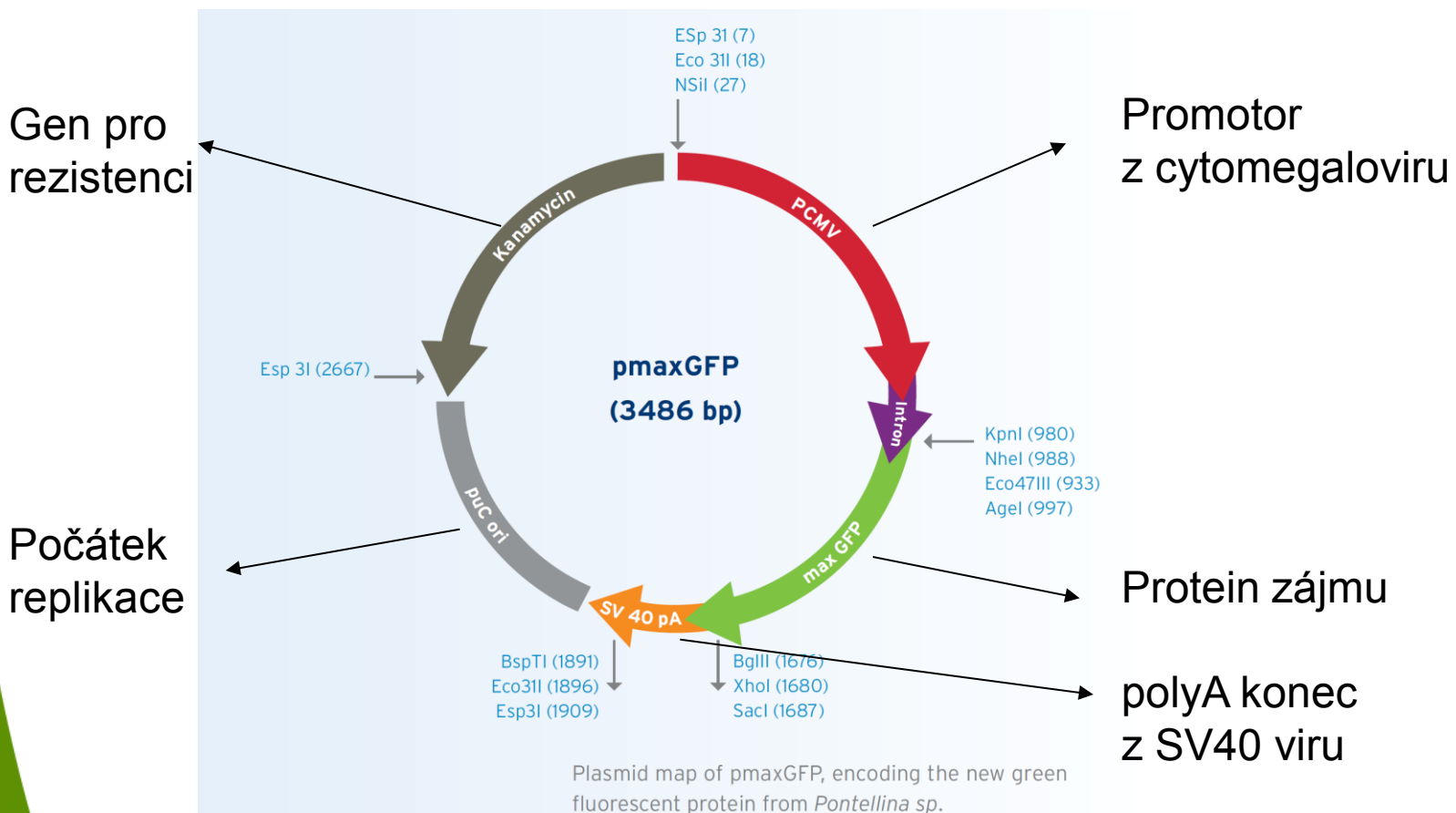
- ▶ Transfekce buněk různými transfekčními činidly:
 - PEI
 - Lipofectamin
 - Fugene
 - Nukleofekce Neonem

- ▶ Vektor: konstrukt s GFP (koncentrace 1,1 ug/ul)

- ▶ Hodnocení účinnosti
 - Odhad pomocí fluorescenčního mikroskopu
 - Kvantifikace pomocí průtokového cytometru

Vektor pMaxGFP (AMAXA)

- GFP izolovaný z planktonového koryše *Pontellina Plumata*

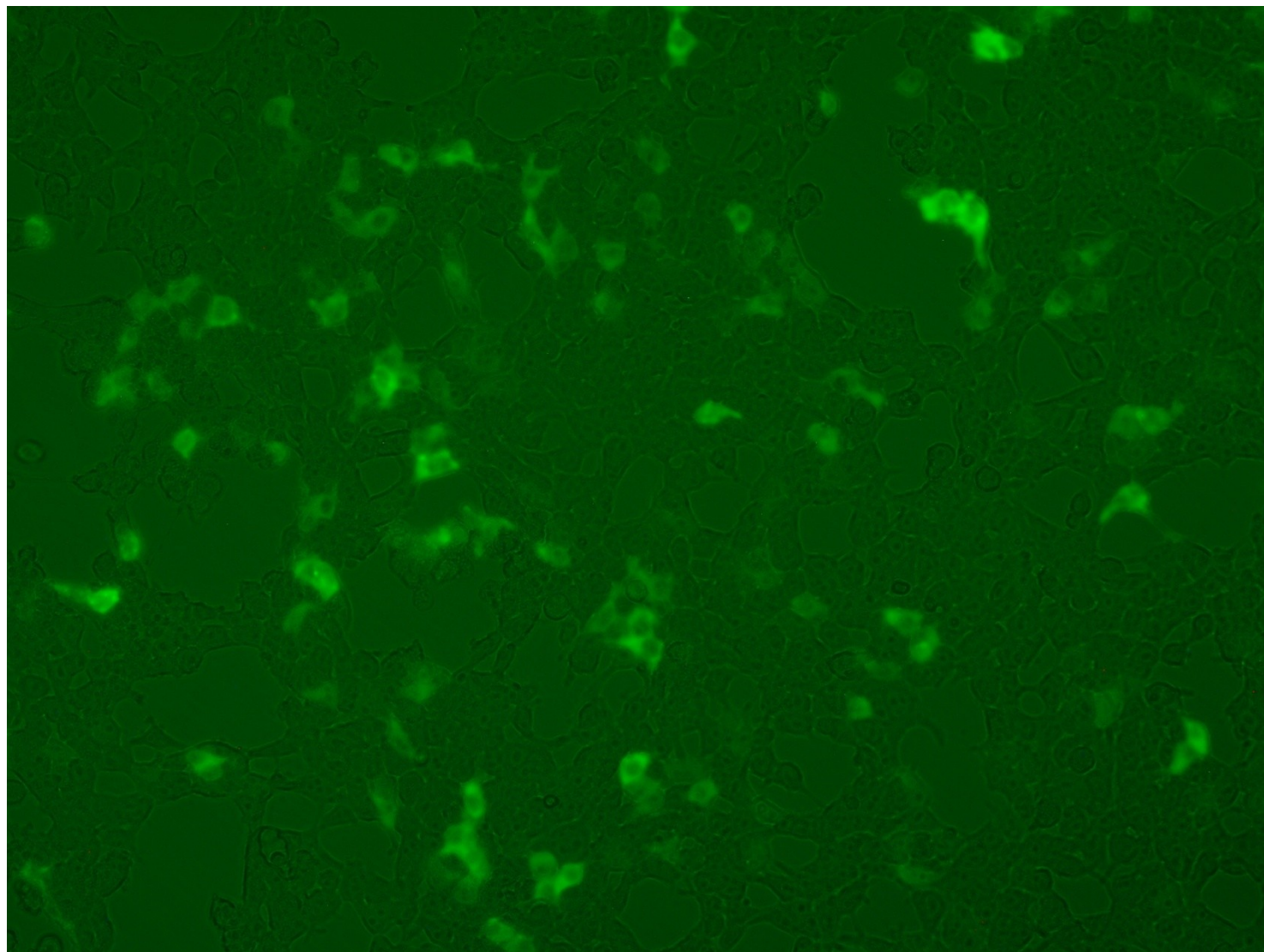


Postup experimentu

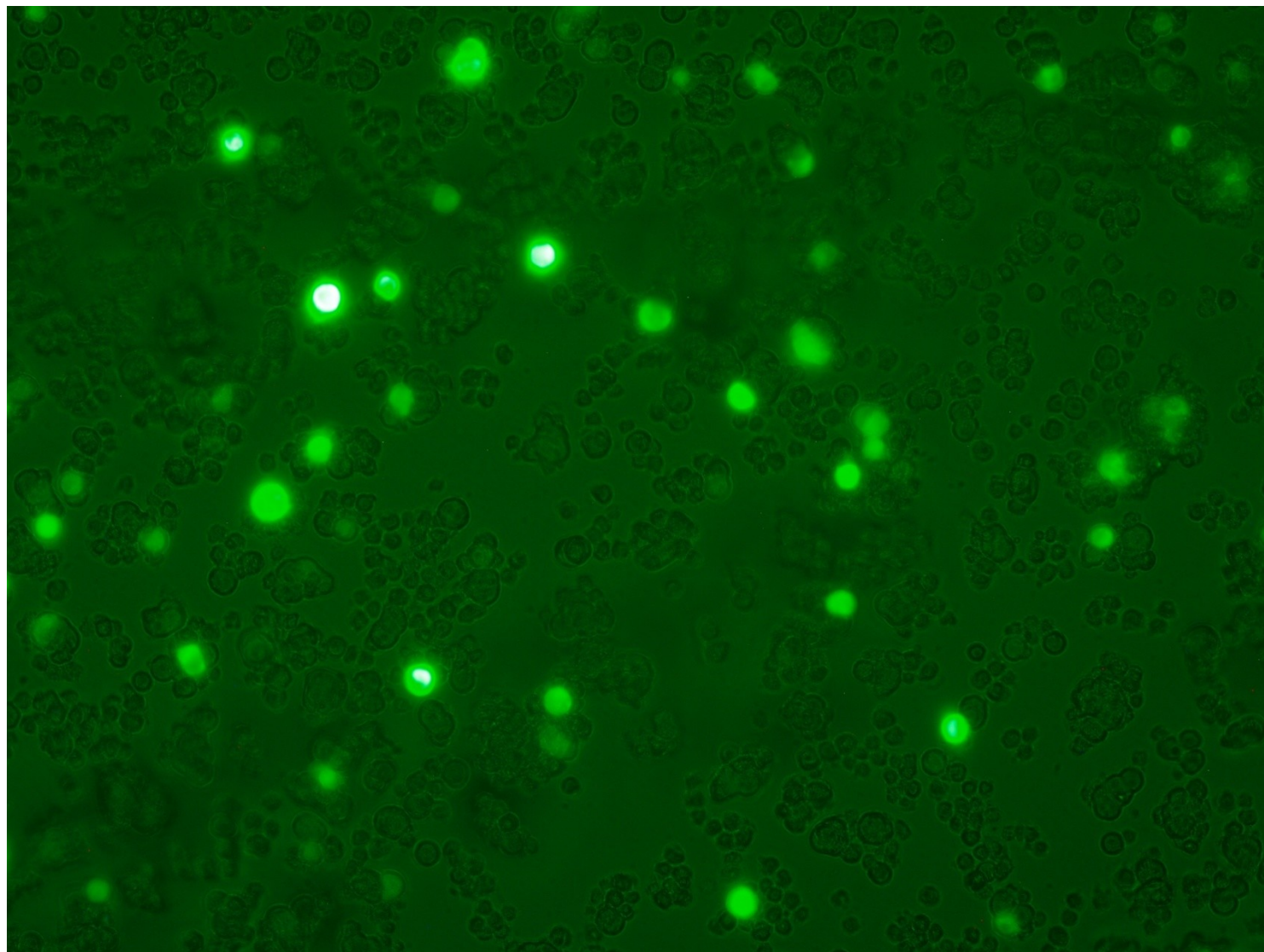
- Transfekce provedena 24 předem
- Odhad účinnosti transfekce pomocí fluorescenčního mikroskopu
- Uvolnění bb z povrchu misek – trypsin/EDTA 5 min/37 C
- Suspenze buněk hodnocena kvantitativně pomocí průtokového cytometru Accuri, kanál FL1
- Srovnání výsledků

ODHAD ÚČINNOSTI TRANSFEKCE GFP

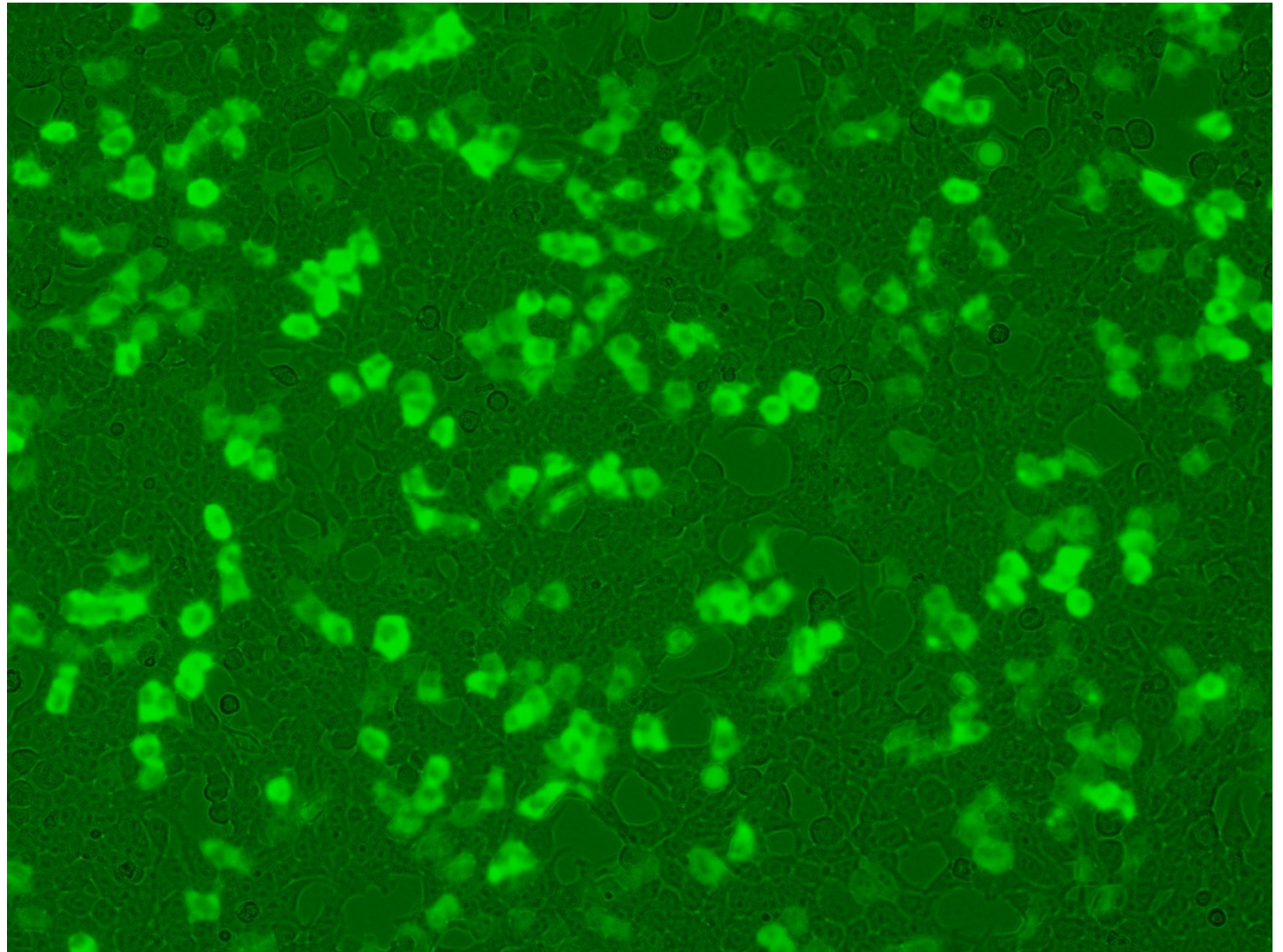
1. FUGENE



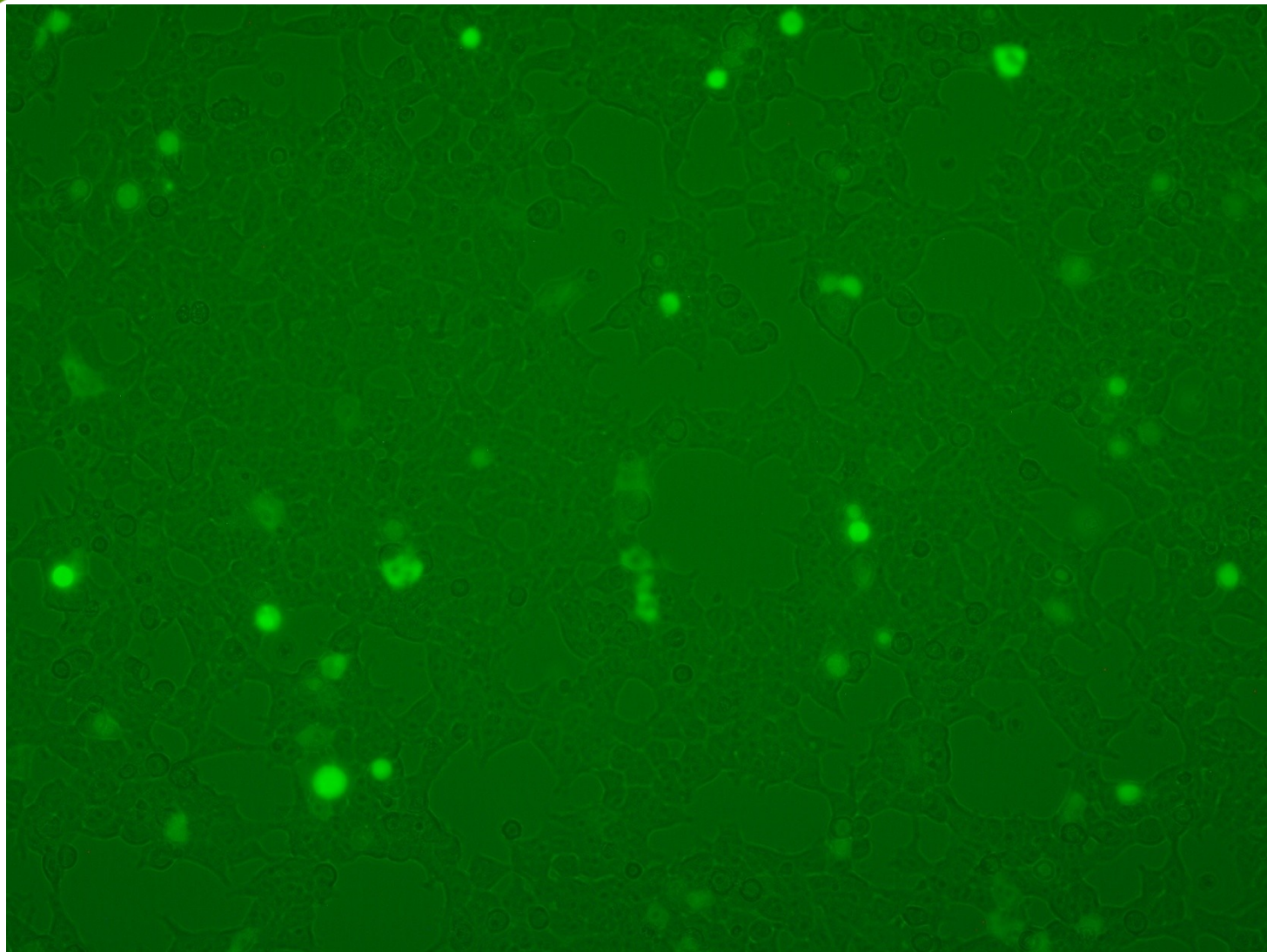
2. NEON



3. PEI

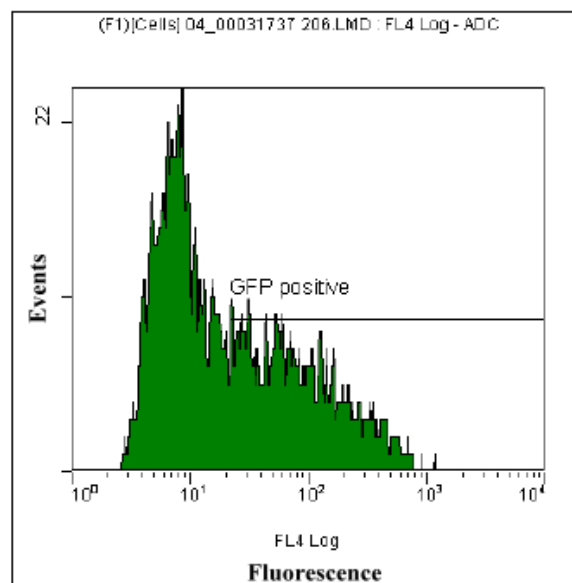


4. Lipofectamine



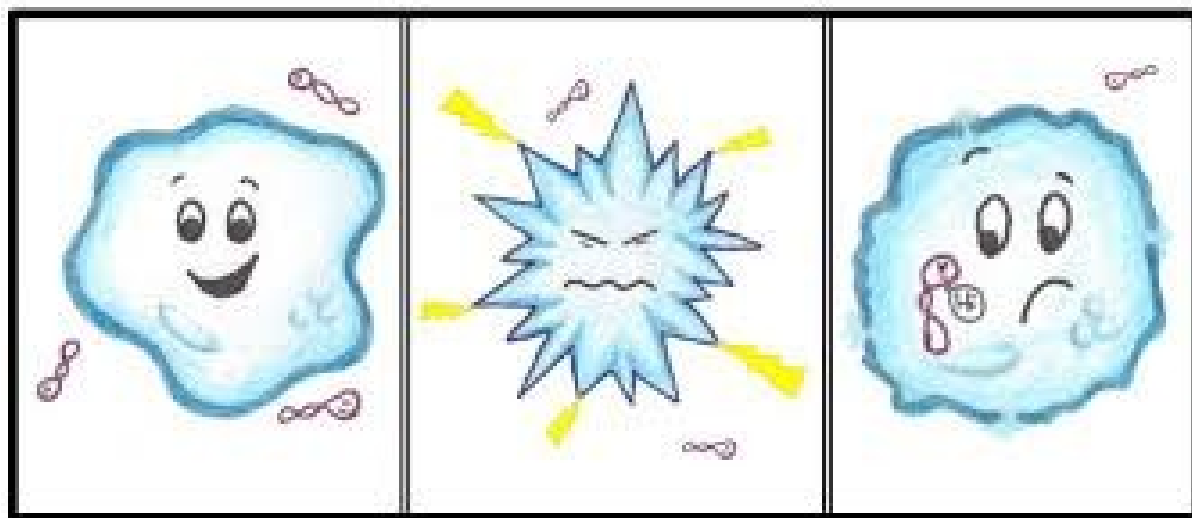
KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ ÚČINNOSTI

Měření zelené fluorescence GFP proteinu (kanál F1)
průtokovým cytometrem Accuri C6



(F1)[Cells] 04_00031737 206.LMD : FL4 Log						
Region	Number	%Total	%Gated	X-Median 50.0	X-Mean	X-CV
ALL	5725	90.82	100.00	18.3	123	0.00
GFP positive	2721	43.16	47.53	89	250	0.00

SHRNUTÍ



IZOLACE DNA POMOCÍ KOLONKOVÉHO KITU

video návod on line

https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video

ke stažení

https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4

STRUČNÝ POSTUP IZOLACE DNA

- ▶ Plazmidy (i jinou nízkomolekulární DNA) je možné množit pomocí kompetentních bakterií a následně izolovat pomocí kolonkových kitů (mini-, midi- a maxiprep)
- ▶ Heat shock kompetentních bakterií E. Coli plazmidem zájmu
- ▶ Růst bakterií na selekční půdě (antibiotikum)
- ▶ Izolace rezistentní kolonie a její namnožení v selekčním LB médiu
- ▶ Izolace nízkomolekulární DNA pomocí kolonkového kitu:
 - ▶ Lyzace bakteriálního peletu a RNA
 - ▶ Precipitace proteinů a genomové DNA
 - ▶ Přenos supernatantu na kolonu a vazba plazmidu na pryskyřičných kuliček (promytí)
 - ▶ Eluce plazmidové DNA a její přečištění

KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny

Widefield Versus Point Scanning of Specimens

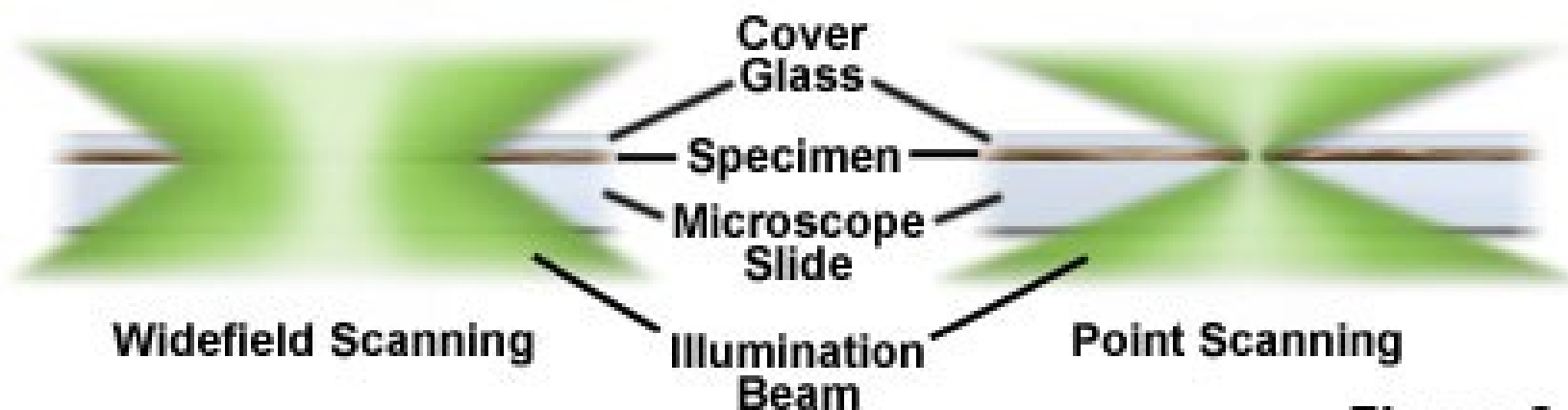
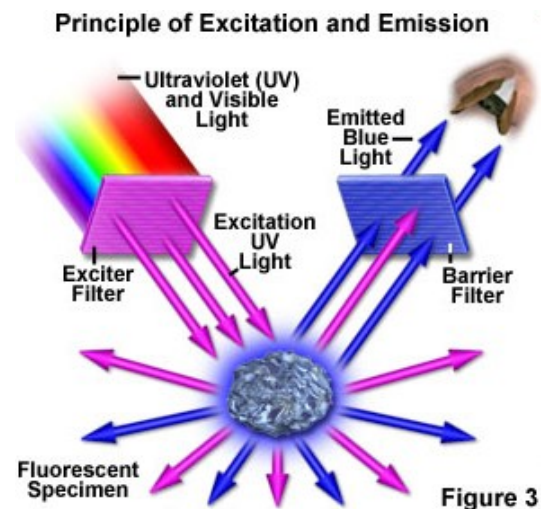
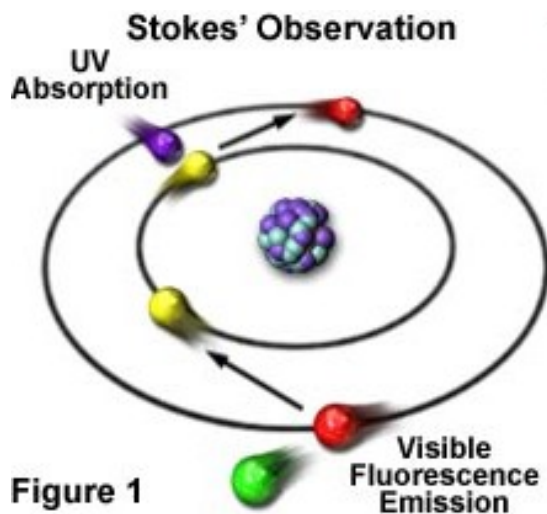


Figure 2

Princip fluorescence

- Ozáření fluorochromu zářením příslušné vlnové délky vede k excitaci molekul na orbital s vyšší energií a návrat do původní energetické roviny je doprovázen vyzářením energie ve formě fotonů.
- Vyzářené (emitované) světlo má vždy delší vlnovou délku než excitační paprsek (Stokesův posun).



Skenovací (rastrovací) konfokální mikroskop

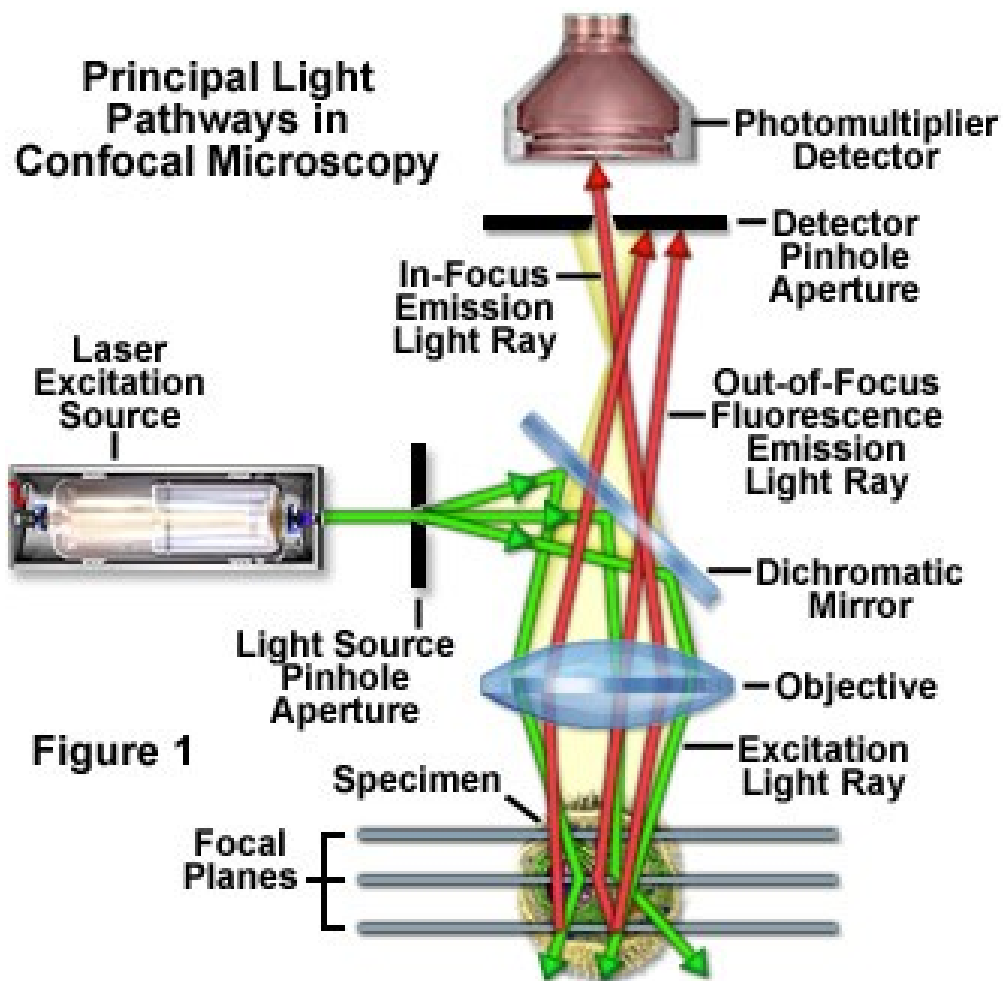
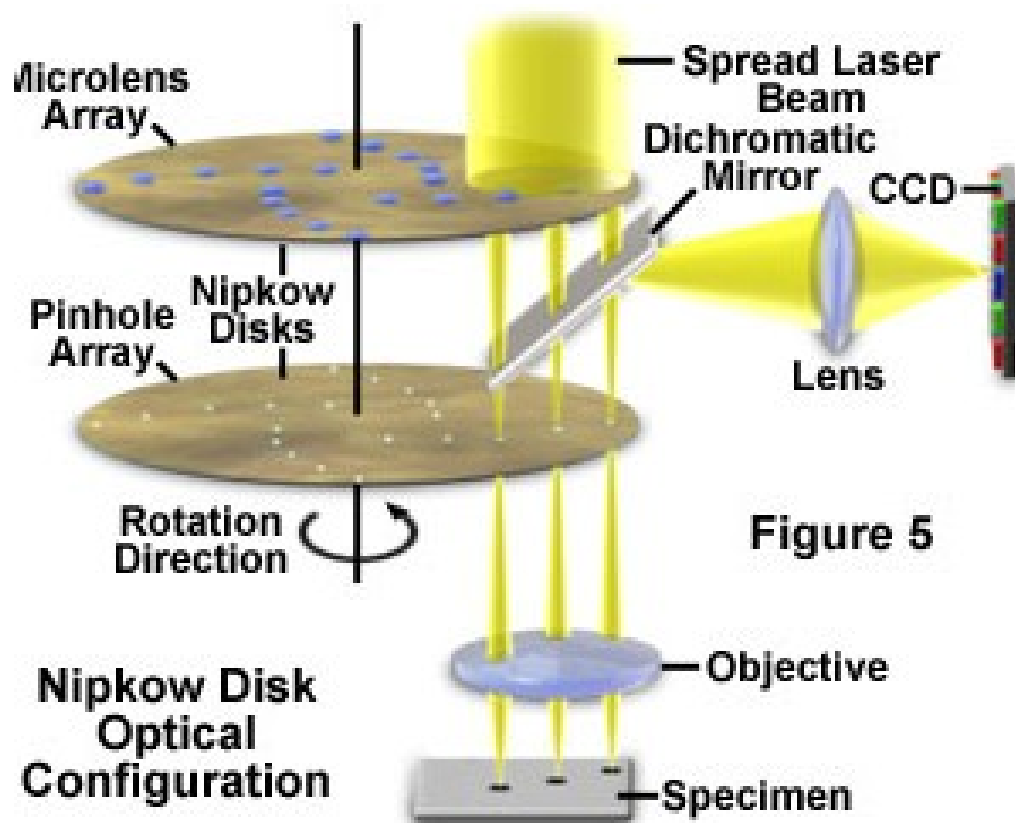
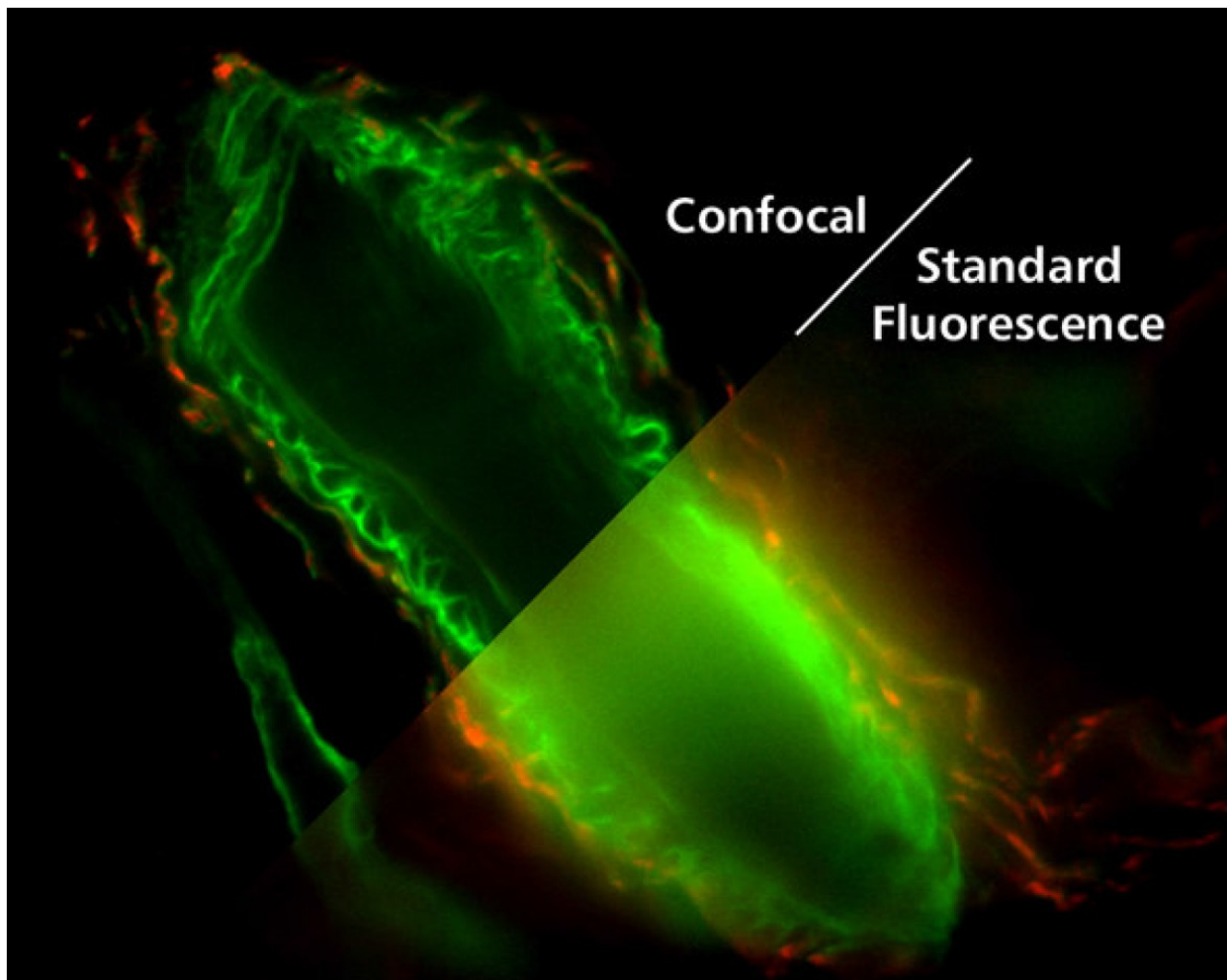


Figure 1

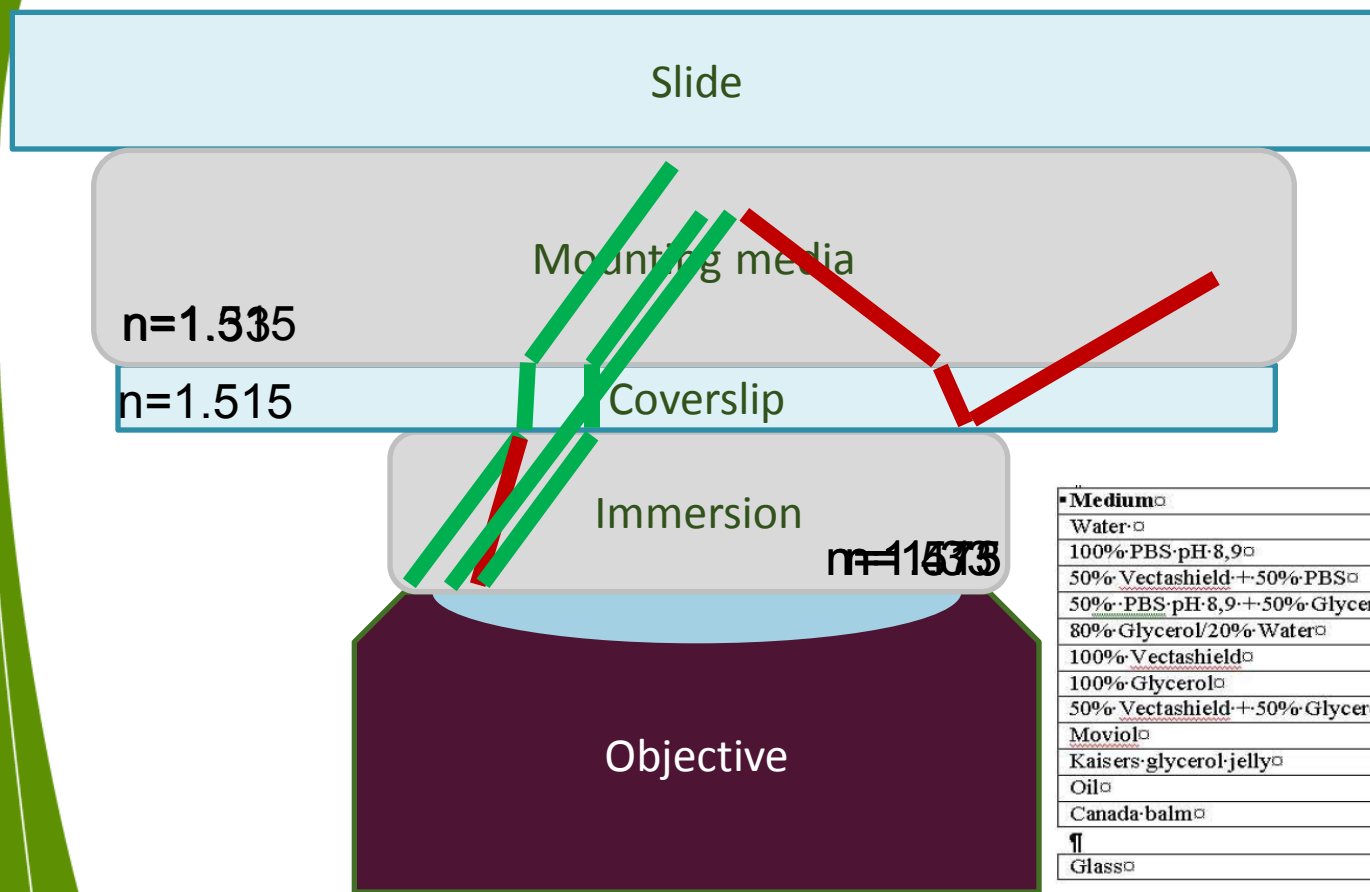
Rotující (Nipkowův) disk



Rozdíl mezi fluorescenční a konfokální mikroskopií



Příprava vzorku



Medium	Refractive Index
Water	1.333
100% PBS pH 8,9	1.3348
50% Vectashield + 50% PBS	1.39
50% PBS pH 8,9 + 50% Glycerol	1.4063
80% Glycerol / 20% Water	1.451
100% Vectashield	1.4523
100% Glycerol	1.46
50% Vectashield + 50% Glycerol	1.4634
Moviol	1.46
Kaisers glycerol jelly	1.47
Oil	1.518
Canada balm	1.5225
¶	
Glass	1.51

Výhody konfokální mikroskopie

- Zabrání zkreslení (rozmazání) obrazu vlivem paprsků přicházejících z roviny nad a pod rovinou ostrosti
- Umožňuje zhotovení 3D obrazů (kromě x a y používá osu z) z více rovin ostrosti
- Použití Nipkowova disku zrychluje snímání až na 60 snímků za sekundu
- Vhodné pro zkoumání topologie organel
- Krátkodobý osvit snižuje blednutí vzorku

