



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA Z BAKTERIÍ A JEJÍ TRANSFEKCE DO BUNĚČNÉ LINIE HEK293

PLASMIDE DNA ISOLATION FROM BACTERIA AND TRANSFECTION TO HEK293 CELL LINE

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Bačovská

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2017

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Studentka:** Kristýna Bačovská **ID:** 173561 **Ročník:** 3 **Akademický rok:** 2016/17

## NÁZEV TÉMATU:

### Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293

#### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s kultivací buněčné linie DH5 $\alpha$  a její úpravou v kompetentní buňky. 2) Nastudujte možnost vpravování plasmidové DNA do takto upravených buněk a následné možnosti izolace plasmidové DNA. 3) Seznamte se s kultivací buněčných linií HEK293 a možnostmi transfekce těchto buněk plasmidovou DNA. 4) Na dané oblasti sestavte odpovídající literární rešerši. 5) Provedte úpravu bakterií, amplifikaci, izolaci a pokusnou transfekci dostupných plasmidů označených různými fluorescenčními sondami. 6) Vhodným způsobem zhodnoťte úspěšnost izolace a transfekce DNA. 7) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

#### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DESALLE, R., GIRIBET, G. and WHEELER, W. Techniques in molecular systematics and evolution. Boston: Birkhäuser, 2002, 407 p. ISBN 08-176-6257-X.

[2] KIM, T. K. and EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010, vol. 397, issue 8, p. 3173-3178.

**Termín zadání:** 6.2.2017

**Termín odevzdání:** 2.6.2017

**Vedoucí práce:** Ing. Ondřej Svoboda

**Konzultant:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*předseda oborové rady*

#### UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

# Abstrakt

Plasmidová DNA je hojně využívána v oblastech molekulární biologie a genového inženýrství. Tato práce pojednává o metodách její izolace a tématech spjatých s tímto procesem. V experimentální části je k izolaci použita metoda fenol-chloroformové extrakce, které předcházela amplifikace plasmidů Channelrhodopsin-2, ASAP1 a K<sub>ir</sub>2.1 v bakteriích buněčné linie DH5α. Celkem bylo provedeno 22 izolací a jejich úspěšnost byla ověřena gelovou elektroforézou a transfekcí do buněčné linie HEK293. Nejúspěšněji dopadla izolace plasmidu ASAP1, souhrnná procentuální úspěšnost pro všechny plasmidy činila 30 %.

# Klíčová slova

Izolace DNA, plasmid, transfekce, HEK293, fenol-chloroformová extrakce

# Abstract

Plasmid DNA is commonly used in fields of molecular biology and genetic engineering. This work deals with methods of DNA isolation and topics related to this procedure. In the experimental part of the work, phenol-chloroform extraction is used. First of all, plasmids Channelrhodopsin-2, ASAP1 and K<sub>ir</sub>2.1 were amplified in bacterial strain DH5α. 22 isolations were accomplished and the yield was validated using gel electrophoresis and transfection to HEK293 cell line. The most successful isolation was the isolation of plasmid ASAP1, the overall percentage success rate was 30 %.

# Keywords

DNA isolation, plasmid, transfection, HEK293, phenol-chloroform extraction

BAČOVSKÁ, K. *Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 48 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Ondřej Svoboda.



# Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma *Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčné linie HEK293* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

# Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce Ing. Ondřeji Svobodovi za odborné vedení a za pomoc a cenné rady při zpracování této práce.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

# Obsah

Seznam obrázků .....	9
Úvod .....	10
1. Literární přehled.....	11
1.1 Escherichia coli.....	11
1.1.1 K-12.....	12
1.1.2 DH5 $\alpha$ .....	12
1.2 Plasmidová DNA.....	13
1.2.1 ASAP1.....	14
1.2.2 ChR2.....	15
1.2.3 K <sub>ir</sub> 2.1 .....	16
1.3 Izolace DNA .....	17
1.3.1 Fenol-chloroformová extrakce .....	17
1.3.2 Silikátové kolonky.....	19
1.3.3 Magnetické nosiče.....	19
1.4 Gelová elektroforéza.....	20
1.5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	21
1.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA .....	21
1.5.2 Fluorescenční stanovení koncentrace DNA .....	22
1.6 Transformace .....	23
1.7 Transfekce .....	24
1.7.1 Metody transfekce .....	24
1.8 Buněčná linie HEK293.....	26
2. Materiály a metody .....	27
2.1 Příprava kompetentních buněk a amplifikace .....	27
2.2 Transformace .....	27
2.3 Izolace.....	28
2.4 Gelová elektroforéza.....	28
2.5 Příprava buněk pro transfekci .....	29
2.6 Transfekce .....	29
3. Dosažené výsledky a diskuze.....	30
3.1 Plasmid ASAP1 .....	30
3.2 Plasmid ChR2 .....	32
3.3 Plasmid K <sub>ir</sub> 2.1 .....	34

3.4	Diskuze .....	35
	Závěr.....	37
	Literatura .....	38
	Seznam zkratk .....	42
	Seznam příloh.....	43

# Seznam obrázků

Obrázek 1: Escherichia coli.....	11
Obrázek 2: Mapa plasmidového vektoru ASAP1 .....	14
Obrázek 3: Mapa plasmidového vektoru ChR2 .....	15
Obrázek 4: Mapa plasmidového vektoru K <sub>ir</sub> 2.1 .....	16
Obrázek 5: Schéma fenol-chloroformové extrakce.....	18
Obrázek 6: Horizontální gelová elektroforéza .....	20
Obrázek 7: Schéma umělé transformace bakterií.....	23
Obrázek 8: Transfekční metody .....	25
Obrázek 9: Buněčná linie HEK293 .....	26
Obrázek 10: Kolonie transformovaných bakterií (Channelrhodopsin-2).....	27
Obrázek 11: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, ASAP (zleva vzorky 3, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 22).....	30
Obrázek 12: Transfekce, ASAP, vzorky 3, 8, 10, 11, 13, 16, 18 – kultivace 24 hodin, vzorky 15, 17, 22 – kultivace 96 hodin .....	31
Obrázek 13: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, ChR2 (zleva vzorky 4, 12, 14, 20, 21).....	32
Obrázek 14: Transfekce, ChR2, vzorky 4, 12, 14, 20 – kultivace 24 hodin, vzorek 21 – kultivace 96 hodin .....	33
Obrázek 15: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, K <sub>ir</sub> 2.1 (zleva vzorky 9, 19).....	34
Obrázek 16: Transfekce, K <sub>ir</sub> 2.1, vzorky 9 a 19 – kultivace 24 hodin .....	34

# Úvod

K prudkému rozvoji molekulární biologie, molekulární genetiky a genového inženýrství dochází zhruba od 70. let 20. století. V laboratořích molekulární biologie se od té doby začíná intenzivně pracovat s uměle vytvořenou DNA, označovanou jako rekombinantní. Rekombinantní DNA vzniká tak, že do speciální molekuly DNA, tzv. vektorového nosiče, je vnesen fragment cizorodé DNA. Nejčastěji se jedná o geny izolované z DNA, např. lidské. [1]

Prvním důležitým krokem pro další laboratorní postupy v molekulární biologii je právě izolace DNA. Poprvé ji provedl v roce 1869 švýcarský lékař Friedrich Miescher během své práce v laboratoři Felixe Hoppe-Saylera. Při experimentech s leukocyty získanými z hnisu si povšiml zvláštní látky, zásadně se lišící od proteinů. Po jejich důkladném prozkoumání je na základě místa jejich objevení (v jádře – *nucleus*) nazval „*nuclein*“. Z tohoto termínu je odvozeno dnešní označení nukleová kyselina (NK). [2]

Rychlá a účinná metoda izolace DNA umožňuje dále efektivně využívat vysoce specifické techniky jako jsou např. polymerázová řetězová reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP) aj. Metod izolace DNA existuje celá řada. Volba konkrétní metody závisí jednak na typu použitého biologického materiálu určeného k izolaci DNA, dále na rychlosti a účinnosti metody a finančních možnostech pracoviště. [3]

K plasmidové DNA je nutno přistupovat specifickým způsobem, jedná se o kruhovou molekulu a nelze ji tedy amplifikovat použitím běžných metod. Z toho důvodu bývá nejprve vpravena do bakteriální linie, kde dojde k jejímu namnožení, a až poté může být izolována. Získaná plasmidová DNA je následně vhodná pro další aplikaci. Jednou z nich může být právě transfekce do buněk jiného organismu za účelem exprese určitého genu. Transfekce (přenos genetické informace) se uplatňuje zejména na poli genového inženýrství a lze jí ovlivnit buněčný fenotyp a mezibuněčnou komunikaci, čehož se využívá např. v genové terapii.

Cílem této práce je seznámit se s metodami izolace a transfekce plasmidové DNA, provést izolaci použitím metody fenol-chloroformové extrakce, následně izolovanou DNA transfekovat do buněčné linie HEK293 a tím ověřit správnost izolace.

V experimentu byly amplifikovány a izolovány tři typy plasmidové DNA. Jednalo se o Channelrhodopsin-2 (ChR2), activated sensor of action potentials (ASAP1) a draselný kanál  $K_{ir}$  2.1. K validaci izolované DNA byla použita gelová elektroforéza a byla provedena její pokusná transfekce do hostitelských buněk.

# 1. Literární přehled

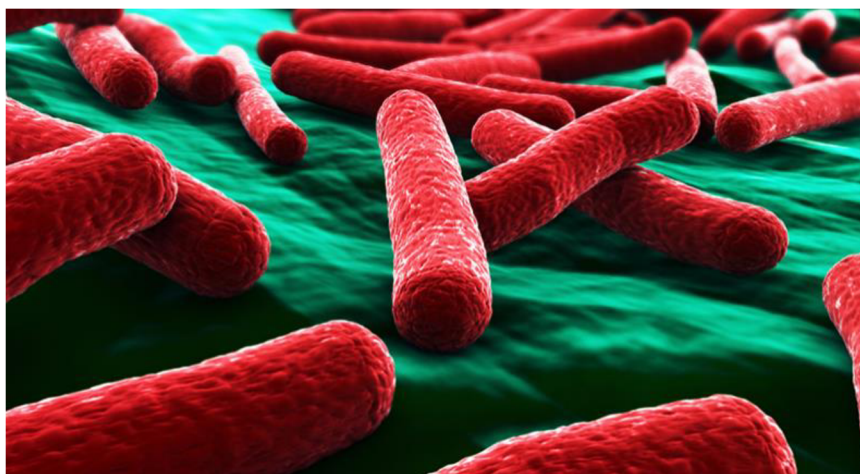
Tato část práce obsahuje nástin jednotlivých témat souvisejících s problematikou izolace plasmidové DNA. Je uveden přehled používaných metod izolace a transfekce. Obsaženy jsou také kapitoly pojednávající o použitém hostitelském organismu, samotné plasmidové DNA a konkrétních plasmidech, způsobech stanovení koncentrace a čistoty DNA a gelové elektroforéze. Důraz je kladen především na metodu fenol-chloroformové extrakce, která je použita v experimentální části.

## 1.1 Escherichia coli

Technologie používané v molekulární biologii jsou založené zejména na práci s rekombinantní DNA, pro jejíž namnožení a následnou izolaci se používají bakteriální buňky. Nejběžnější používanou bakterií je *Escherichia coli* z čeledi *Enterobacteriaceae*. V roce 1885 ji objevil německý pediatr Theodor Escherich, který ji pojmenoval podle místa jejího výskytu (střevo – colon – *E. coli*). [4]

*Escherichia coli* je důležitou součástí biosféry a složkou přirozené střevní mikroflóry živočichů včetně člověka. Tato tyčinkovitá (obr. 1), gramnegativní bakterie obsahuje cirkulární chromosom o velikosti cca  $3 \times 10^6$  párů bází. Je fakultativně anaerobní, dokáže přežít i ve volném prostředí a rozšířit se tak na nového hostitele. Patogenní kmeny *E. coli* způsobují především infekci močových cest a léčí se podáním antibiotik. [5]

*E. coli* vykazuje jedinečnou schopnost množení se a je tedy kultivačně nenáročná. V médiích poskytujících minerální látky, aminokyseliny, vitamíny, prekurzory nukleových kyselin a další potřebné metabolity má *E. coli* v exponenciální fázi růstu za intenzivního třepání při 37 °C generační dobu cca 20 minut. Ve stacionární fázi lze dosáhnout koncentrace cca  $2 \times 10^9$  buněk/ml. [6]



Obrázek 1: Escherichia coli [4]

Existuje řada laboratorně vyvinutých kmenů této bakterie. Pro výběr vhodného kmene je rozhodující účel, ke kterému má být použit, např. k amplifikaci DNA, expresi genů či syntéze DNA, určené pro kolování. *E. coli* je schopná přijmout za určitých podmínek plazmidy, které přenášejí metabolické geny, geny rezistence nebo geny pro produkci toxinů. [7] Využití *E. coli* jako hostitelské buněčné kolonie je dobře známou a oblíbenou platformou.

### 1.1.1 K-12

Téměř všechny buněčné linie *E. coli*, používané v současné době pro experimenty s rekombinantní DNA, byly odvozeny z jediného kmene, a to K-12. Tento kmen byl v roce 1922 izolován na Stanfordské univerzitě z výkalů pacienta trpícího záškrtem. [8] První subkultury a odvozené kmeny vznikly v roce 1944 a od té doby jsou intenzivně využívány v laboratořích a nadále geneticky upravovány. Důležitou skutečností je, že kmen K-12 nezpůsobuje žádné onemocnění a není schopen kolonizovat lidskou střevní mikroflóru. Z toho důvodu je K-12 považován za prototyp bezpečného a nepatogenního kmene *E. coli*. [9]

Transkripční faktory (prvky potřebné pro řízení genové exprese, vázané na DNA) podmiňují schopnost této bakterie přizpůsobovat se změnám prostředí pomocí pozitivní či negativní regulace transkripce. [10] Kmen K-12 hraje významnou roli modelového organismu v molekulární biologii a biotechnologiích. Přítomnost lysogenního bakteriofága lambda (bakteriální vir) v bakterii a velké množství obsažených plazmidů umožňuje široké využití v genovém inženýrství. [3]

### 1.1.2 DH5 $\alpha$

Kmen DH5 $\alpha$  je jedním z nejčastěji laboratorně využívaných kmenů bakterie *E. coli*, sloužícím hlavně k amplifikaci plasmidové DNA. Tento nepatogenní kmen vyvinul americký biolog Douglas Hanahan, který zároveň navrhl metodu pro přípravu kompetentních buněk *E. coli* a zdokonalil protokoly pro její transformaci. [11]

DH5 $\alpha$  je kmen s mnoha přítomnými genovými mutacemi (*recA1*, *endA*, *deoR*), které umožňují vysokou účinnost transformace a podmiňují jeho široké využití pro technologie rekombinantní DNA. [12] Jedna z mutací v genomu tohoto kmene inaktivuje intracelulární endonukleázu, která způsobuje degradaci plasmidové DNA při procesu izolace, a tím pozitivně přispívá k celkovému výtěžku izolované DNA. Plasmidová DNA získaná z tohoto kmene je odolná vůči degradaci během fenol-chloroformové extrakce, což tento kmen činí vhodným kandidátem pro izolaci. Při použití buněk DH5 $\alpha$  se dosahuje výborných výsledků ve smyslu kvality a množství získané plasmidové DNA, vhodné pro další použití, např. sekvenování. [13]

K transformaci bakterií je nezbytné nejdříve uvést buňky do stavu kompetence. Tento proces je popsán v kapitole 2.1.



## 1.2 Plasmidová DNA

Plasmidy jsou mimochromozomové kružnicové elementy DNA, které jsou schopné autonomní replikace. Termín „plasmid“ použil poprvé v roce 1952 Joshua Lederberg, který jím pojmenoval veškerý genetický materiál přítomný mimo chromozomy v cytoplasmě. Přirozeně se plasmidy vyskytují u mikroorganismů, především u bakterií. Jsou dvouřetězcové, mají velikost přibližně od 1 kb do 200 kb a nesou až několik set genů. V jediné bakteriální buňce se mohou nacházet až stovky kopií jednoho plasmidu. Některé plasmidy obsahují geny rezistence vůči antibiotikům (ampicilin, tetracyklin), mutagenům, těžkým kovům, bakteriofágům nebo geny pro produkci restrikčních enzymů. Tyto geny poskytují bakteriím určité výhody ve smyslu odolnosti a přežití a slouží jako selekční markery. [14]

Zmíněných vlastností plasmidů je hojně využíváno pro klonování, přenos a manipulaci s DNA. Plasmidy používané pro tyto účely se nazývají vektory. Vektor je molekula DNA, schopná přijmout cizorodou genetickou informaci, spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce. Plasmidové vektory byly použitím technik rekombinantní DNA odvozeny od přírodních plasmidů, přičemž byly odstraněny nepotřebné a zachovány pouze žádoucí sekvence. Pro jednodušší a efektivnější manipulaci došlo také k redukci jejich celkové délky. Některé plasmidové vektory jsou dlouhé pouze 3 kb, což je podstatně méně než běžné plasmidy *E. coli*. [15]

Rozlišujeme vektory klonovací a expresní. Klonovací plasmidové vektory usnadňují klonování úseků DNA. Obvykle bývají malé a velmi jednoduché. Obsahují následující důležité části:

- Počátek replikace (*ori*) – zajišťuje replikaci plasmidu nezávislou na replikaci bakteriálního chromosomu
- Gen kódující rezistenci na antibiotikum – tzv. selekční marker, díky kterému lze lehce rozlišit, které buňky přijaly vektor
- Klonovací místo (*MCS* – Multiple Cloning Site) – sekvence rozpoznávané restrikčními endonukleázami, které v daném místě štěpí vlákno DNA

Expresní vektory musí mít navíc promotor, řídící transkripci inzertu, terminátor jako místo pro ukončení transkripce a inzertní gen, kódující rekombinantní protein. [16]

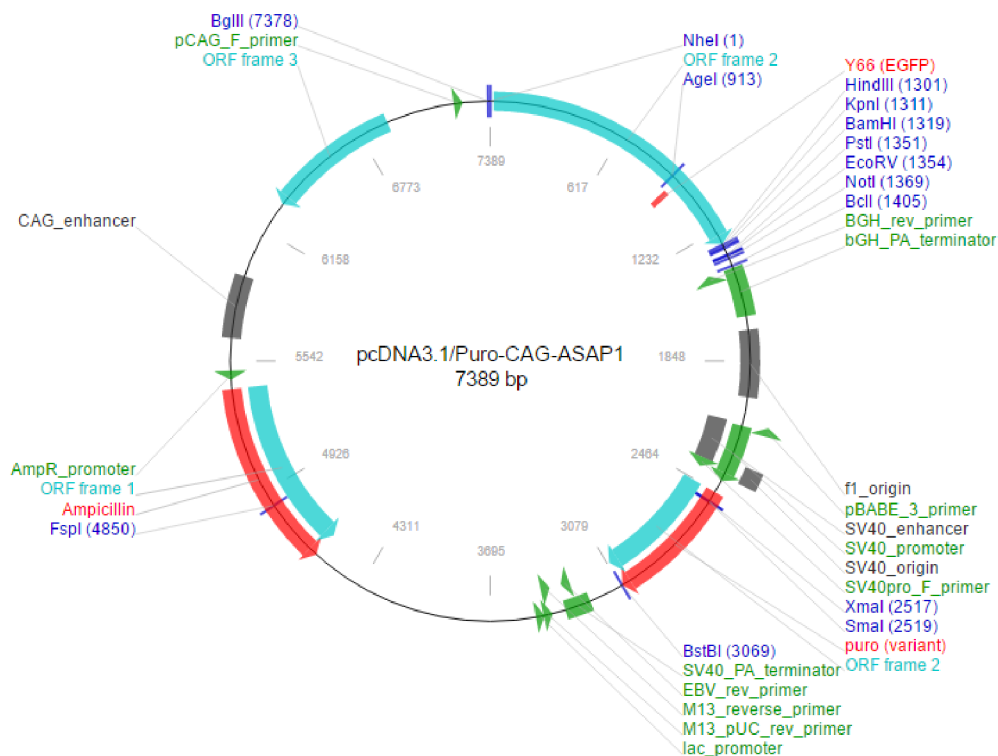
Někdy se můžeme setkat také s pojmem kyvadlové vektory. Tyto vektory mají dva počátky replikace, díky kterým jsou schopny účinně se replikovat v buňkách dvou různých organismů, např. v bakteriích a kvasinkách. Jejich výhodou je snadné klonování genu do *E. coli* a možnost přenesení do hostitele s nízkou účinností přenosu rekombinantní DNA. [17]

Plasmidové vektory slouží pro transfekci nejrůznějších druhů buněk od savčích až po bakteriální. Příklad struktury plasmidového vektoru můžeme vidět na obrázcích 2, 3 a 4.

### 1.2.1 ASAP1

Accelerated Sensor of Action Potentials 1, neboli ASAP1, je uměle vytvořený napěťový senzor akčních potenciálů savčích buněk s vloženým cirkulárně permutovaným zeleným fluorescenčním proteinem (cpGFP). GFP se nachází se na extracelulární smyčce napěťově citlivé oblasti senzoru a reaguje na změny membránového potenciálu změnou fluorescence. Jedná se o derivát zeleného fluorescenčního proteinu, který poprvé izoloval Osamu Shimomura z mořské medúzy *Aequorea victoria* v roce 1962. GFP má schopnost vydávat zelené fluorescenční záření při osvětlení modrým až UV světlem, je možné ho navázat na jiný protein a ten poté zviditelnit v buňce či organismu. Lze tak sledovat např. dělení rakovinných buněk nebo vývoj neuronů. GFP má excitační maximum při vlnové délce 488 nm a jeho emisní maximum leží okolo 510 nm. Vzhledem k širokému potenciálu využití ve výzkumu bylo vyvinuto mnoho různých derivátů tohoto proteinu, jako výše zmíněný cpGFP, EGFP (enhanced GFP), YFP a další. [18] [19]

ASAP1 je v současné době nejlepším geneticky kódovaným napěťovým senzorem. Je založen na napěťově citlivé fosfatáze kura bankivského (*Gallus gallus*) a je schopen detekovat jednotlivé akční potenciály buňky a jejich změny až do frekvence 200 Hz. Projevuje se změnou fluorescence o 29 % na změnu napětí o 100 mV. ASAP1 umožňuje například souvislé sledování membránového potenciálu v neuronových buňkách pomocí epifluorescenční mikroskopie. [18]

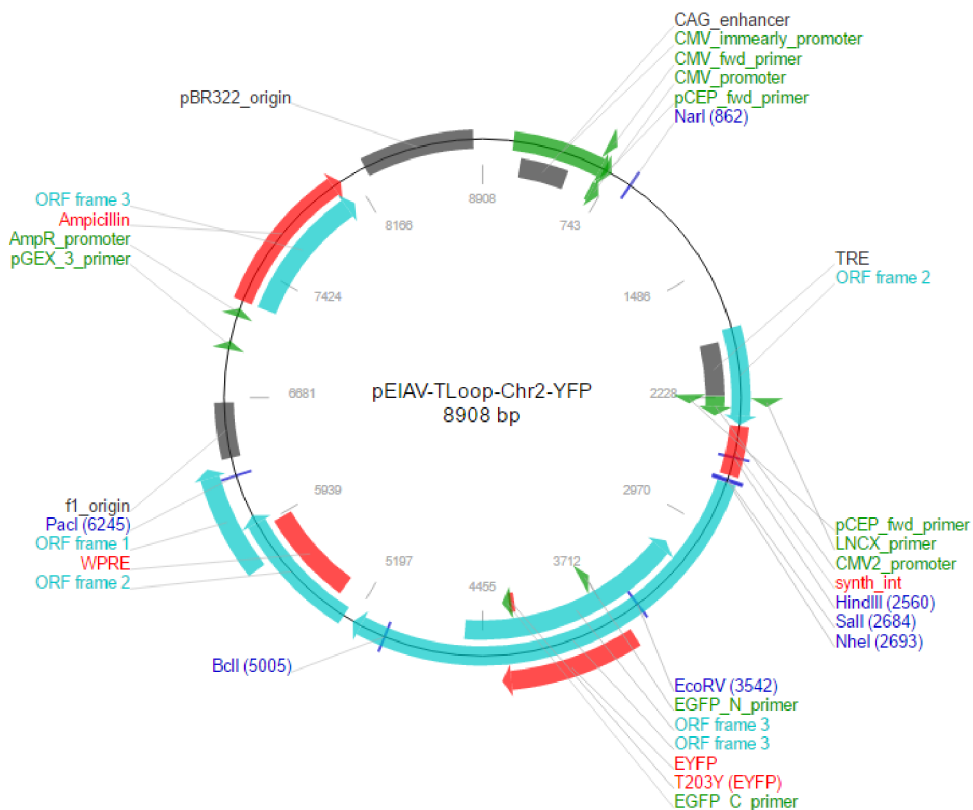


Obrázek 2: Mapa plasmidového vektoru ASAP1

## 1.2.2 ChR2

Channelrhodopsin-2 (ChR2) byl objeven v roce 2003 v zelených řasách rodu *Chlamydomonas*. Jde o světlem řízený iontový kanál, propustný pro kationty ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  a  $Ca^{2+}$  ionty), který patří mezi zástupce mikrobiálních rhodopsinů. Řadí se k receptorům spřaženým s G proteinem (GPCR) a skládá se ze sedmi transmembránových alfa-helixových domén. Jako chromofor využívá all-trans retinal, aldehyd chemicky příbuzný vitamínu A. Při osvětlení modrým světlem (vlnová délka 470–480 nm) je Channelrhodopsin-2 aktivován změnou transformace z all-trans retinalu na 13-cis retinal a otevírají se iontové kanály. Po proběhnutí fotoizomerace kovalentně vázaný retinal znovu relaxuje do all-trans formy, dojde k uzavření iontových kanálů a regeneraci chromoforu. ChR2 je pro svoje dobré kinetické vlastnosti a až desetkrát lepší expresi ve většině hostitelských buňkách v porovnání s ChR1 považován za vhodný prototyp pro použití v optogenetice. [21]

ChR2 může být označen žlutým fluorescenčním proteinem (YFP). Tento derivát proteinu GFP má excitační maximum při vlnové délce 508 nm a emisní maximum při 524 nm. YFP je díky svým vlastnostem vhodným pro fluorescenční mikroskopii užitečným nástrojem buněčné a molekulární biologie. Vylepšenými verzemi YFP jsou Citrine, Venus a Ypet. [22]

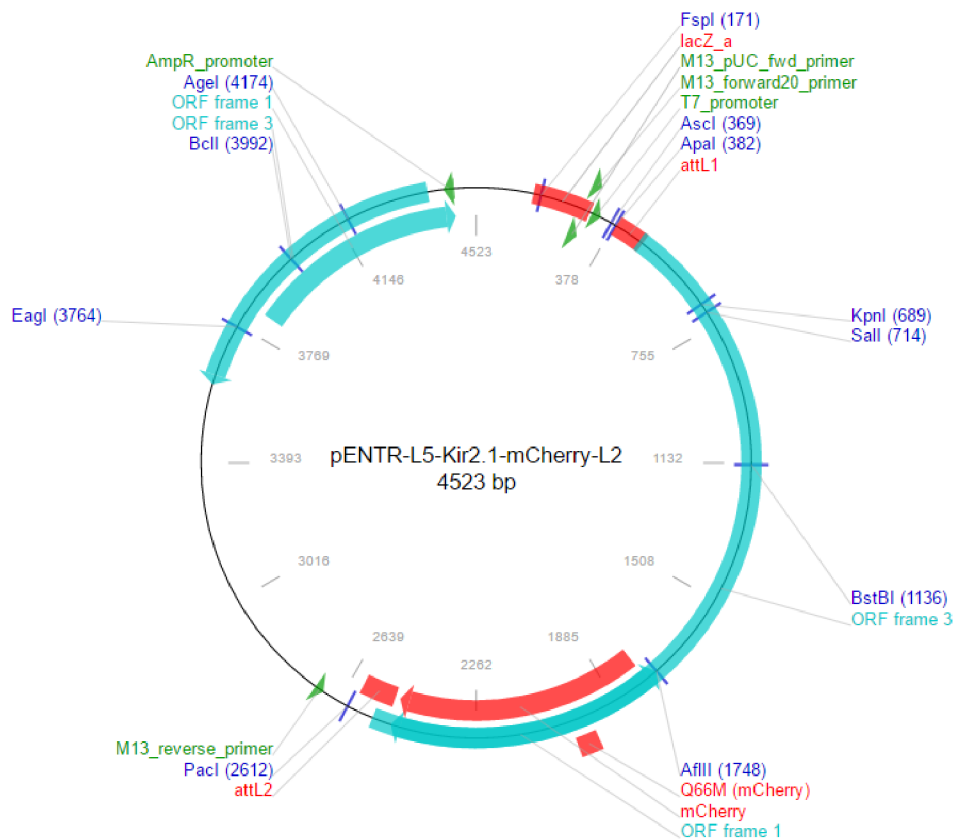


Obrázek 3: Mapa plasmidového vektoru ChR2 [23]

### 1.2.3 Kir 2.1

K<sub>ir</sub> 2.1 je označení pro dovnitř usměrněný iontově selektivní draslíkový kanál. Jedná o protein nacházející se v buněčné membráně. Patří do skupiny kanálů, které se podílí na regulaci mnoha důležitých fyziologických procesů. Ovlivňuje membránový potenciál tím, že usnadňuje průchod kladně nabitých částic do intracelulárního prostoru. Tento kanál hraje podstatnou roli v buňkách srdečního svalstva, kde výrazně působí na klidový membránový potenciál a podílí se na koncové fázi repolarizace membrány. Případné mutace v genu kódujícím kanál K<sub>ir</sub> 2.1 vedou k srdečním a vývojovým vadám. Jsou spojovány např. se syndromem krátkého QT intervalu či Andersen-Tawilovým syndromem. [24] [25]

K označení K<sub>ir</sub> 2.1 se používá červený fluorescenční protein mCherry s maximem excitace/emise při vlnové délce 587 nm a 610 nm. mCherry patří mezi skupinu šesti monomerních fluorescentních proteinů, známých jako mFruits (mBanana, mOrange, mTangerine atd.), jejichž název odkazuje na barvu ovoce podobnou barvě jejich emisního spektra. [22]



Obrázek 4: Mapa plasmidového vektoru K<sub>ir</sub> 2.1 [26]

## 1.3 Izolace DNA

Izolace nukleových kyselin a proteinů je jednou ze základních metod v molekulární biologii. Tyto biomolekuly jsou izolovány z biologických materiálů a jsou určeny pro další využití, jako je analýza, tvorba rekombinantní DNA nebo studium transkripce a translace. V minulosti byla izolace NK a jejich purifikace složitá a velmi časově náročná. V dnešní době existuje mnoho specializovaných a dobře popsanych metod. [27]

Izolace je proces, při kterém jsou získávány NK z buněk. Může se jednat o buňky prokaryotické, ale i kvasinky či tkáňové buňky eukaryot. Izolace DNA se provádí na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi NK a prostředím, ve kterém se nachází. [28]

První izolace DNA byla provedena švýcarským lékařem Friedrichem Miescherem v roce 1869. Miescher vyvinul protokol pro separaci buněčných jader z cytoplasmy a získání DNA z proteinů. Nedosáhl však dostatečného výtěžku materiálu k další analýze, a proto tento postup nadále upravoval a zdokonaloval. [27]

Proces izolace můžeme rozdělit do těchto kroků:

- Lýza buněk – rozpuštění membrány a denaturace proteinů
- Odstranění RNA a dalších složek kromě DNA
- Extrakce DNA

V současnosti existuje velké množství specializovaných metod izolace čisté DNA, RNA či proteinů. Obecně je můžeme rozdělit na protokoly založené na roztoku a na kolonkách. Většina těchto protokolů byla vyvinuta do podoby komerčních izolačních souprav (kitů), které usnadňují proces získání těchto biomolekul. Níže jsou popsány tři nejběžnější metody izolace DNA. Jsou to fenol-chloroformová extrakce, adsorpce na silikát a využití magnetických nosičů.

### 1.3.1 Fenol-chloroformová extrakce

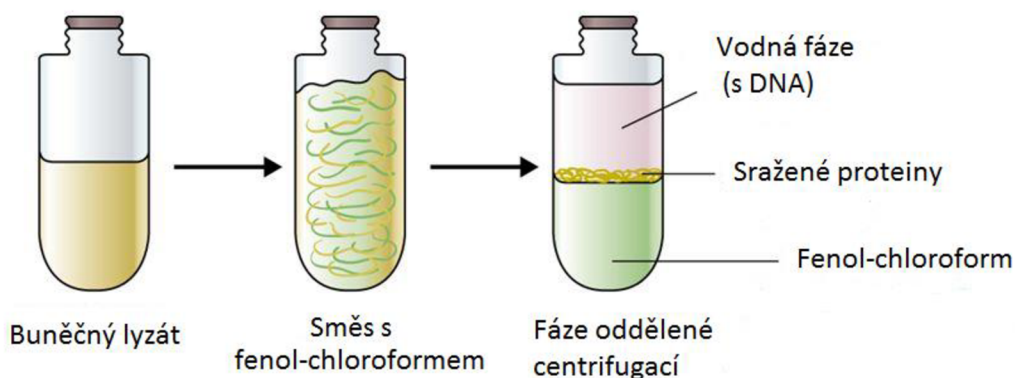
Klasickým způsobem izolace DNA je použití fenol-chloroformové extrakce. Jedná se o poměrně starou metodu, známou již od roku 1956. Vychází z oddělení vodné fáze s rozpuštěnými nukleovými kyselinami a roztoku obsahujícího fenol-chloroform. Denaturované proteiny vytváří prsteneček na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází na základě svých hydrofilních, resp. hydrofobních vlastností.

Prvním krokem při izolaci plasmidové DNA je lýza buněk, ze kterých chceme NK získat. K uvolnění buněčného obsahu se používají detergenty rozrušující buněčnou membránu. Mohou jimi být detergenty iontové povahy (nejčastěji SDS) nebo neionogenní detergenty (obvykle Triton X100). Pokud se jedná o buňky s pevnými buněčnými stěnami, je nutné enzymatické nebo mechanické rozrušení, např. protřepávání na vortexu se skleněnými kuličkami či použití ultrazvuku. [27]

Při izolaci DNA z buněk bakterie *E. coli* se nejčastěji uplatňuje alkalická lýza s použitím SDS. Působením tohoto detergentu dojde k narušení buněčné membrány a uvolnění DNA do roztoku. Vysoké pH (12) způsobí denaturaci chromosomální DNA, která se rozpadne na lineární fragmenty. Malá plasmidová DNA, která je vůči vysokému pH odolná, si zachová kružnicovou formu. Přidáním neutralizačního roztoku (KAc) vznikne precipitát obsahující denaturované proteiny a chromosomální DNA, který se po centrifugaci odstraní. Tím se získá supernatant s volnou plasmidovou DNA. Kromě DNA je zde přítomná také nežádoucí RNA, pro jejíž eliminaci se používá enzym RNáza. Po odstranění všech kontaminantů ze vzorku se DNA vysráží isopropanolem. Centrifugací vzniklý pelet se resuspenduje v přiměřeném objemu pufru. [29]

K buněčnému lyzátu je poté přidána směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu. Roztok je nutné důkladně promísit roztřepáním. Chloroform je organické rozpouštědlo a je tedy nemísitelný s vodným roztokem lyzátu. Jeho přidáním dojde k rozdělení na dvě fáze. Fenol vysráží proteiny, které jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco vysoce nabitě nukleové přecházejí do vodné fáze (viz obr. 5). Isoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, vodná fáze je tak méně zatížena kontaminací fenolem, který má inhibiční vlastnosti, nevhodné pro další práci s DNA. Horní fázi je vodný roztok obsahující DNA, spodní (organická) je fáze fenolu a chloroformu. Mezi vodnou a organickou fází se hromadí sražené proteiny. [27]

Pro dokonalé odstranění proteinů je nutno extrakci opakovat přidáváním fenol-chloroformu a postupným odebíráním a přečišťováním vrchní fáze. Nukleové kyseliny se poté dají vysrážet přidáním etanolu či isopropanolu. Nakonec se shromáždí precipitát nukleových kyselin centrifugací a získaný sediment se rozpustí ve vhodném roztoku (např. TE pufru). [27]



Obrázek 5: Schéma fenol-chloroformové extrakce [30]

### 1.3.2 Silikátové kolonky

Tato metoda využívá adsorpce DNA na silikátový povrch. Je založena na procesu vazby, promytí a uvolnění DNA a je poměrně rychlá a jednoduchá. Nejdříve se k buněčnému lyzátu přidá excitační pufr k uvolnění buněčného obsahu. Poté se do roztoku přidá chaotropní sůl (narušující vodíkové vazby) a suspenze silikátových částic. DNA v přítomnosti chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch, čemuž navíc napomáhá protřepávání směsi.

Tato interakce je založena na vysoké afinitě kladně nabitých silikátových nosičů k negativně nabitým kyslíkovým iontům v molekule DNA. Ostatní složky setrvávají volně v roztoku a jsou lehce odstranitelné. Po jejich usazení či odstředění se odsaje roztok nad sedimentem a ten se znovu propláchne dávkou pufru s chaotropními solemi. Opakovaným odstředěním a odsátím zůstane na částicích adherovaná DNA. Lze ji snadno uvolnit použitím destilované vody nebo vhodného pufru bez chaotropní soli. Po odstředění se na dně nachází silikátové částice a nad nimi čistý roztok DNA, vhodný pro další použití. [27]

### 1.3.3 Magnetické nosiče

V poslední době se pro izolaci nukleových kyselin v odborné veřejnosti ujaly metody využívající magnetické částice. Povrch těchto částic je modifikován takovým způsobem, aby byl schopen navázat vlákna NK. Částice jsou složeny z vlastní fero- nebo ferimagnetické složky, zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem, a složky diamagnetické (nemagnetické), zajišťující interakci s biologickými látkami. Jedná se o magnetické nanočástice s rozměrem menším než 100 nm. Nejčastějšími materiály magnetických nosičů jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa magnetit a maghemit. [31]

Izolace se provádí tak, že se ke vzorku nukleových kyselin přidají magnetické částice a požadované molekuly se na ně naváží. Následně se zkumavka s roztokem umístí do magnetického pole (separátoru), částice jsou přitaženy ke stěně zkumavky a drženy na místě, zatímco supernatant s nečistotami se odebere. V dalším kroku dojde k promytí komplexu magnetických částic a DNA. Nakonec se přidá pufr, do kterého se DNA uvolní a může být použita pro různé aplikace. [27]



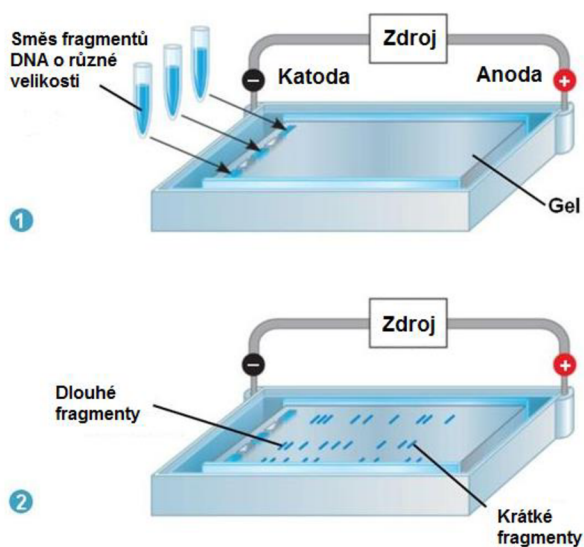
## 1.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších separačních technik v molekulární biologii. Významná je hlavně při izolaci DNA, kde se používá pro ověření úspěšnosti. Její princip spočívá ve schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic závisí na velikosti náboje a samotné molekuly. V nukleových kyselinách jsou nositeli náboje negativně nabitě fosfátové skupiny. Pohyb NK v elektrickém poli je tedy ke kladně nabitě anodě. [17] Schéma elektroforetické aparatury můžeme vidět na obr. 6.

Elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, kterým bývá zpravidla gel. Gely mohou být tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Agaróza vytváří síť dlouhých cukerných polymerů vázaných nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofobními vazbami. Koncentrace agarózového gelu určuje velikost pórů a je tak významným faktorem mobility. Agarózové gely dobře separují molekuly NK o velikosti od 100 bp až do 50 kb. Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu s příměsí bisakrylamidu a používá se pro separaci menších molekul, tzn. 10–1000 bp. [17] [32]

Použitím gelové elektroforézy lze zhodnotit, v jakých konformacích se molekuly DNA nacházejí. Fragmenty DNA o různé velikosti se pohybují agarózovým gelem různou rychlostí. Odlišíme tak kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od otevřených kružnic či lineárních molekul. [17]

Pro identifikaci polohy separovaných molekul je potřeba DNA zviditelnit obarvením. K tomuto účelu se používá např. ethidium bromid, který vytváří s DNA komplex a po osvětlení UV zářením v transluminátoru emituje světlo o vlnové délce 605 nm (oranžová barva). [17]



Obrázek 6: Horizontální gelová elektroforéza [33]



## 1.5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Přesné stanovení koncentrace DNA je předpokladem k úspěšnému provedení řady technik molekulární biologie, zejména k transfekci, klonování a sekvenování DNA, transformaci apod. Většina metod vyžaduje použití čisté DNA, proto je nezbytné po izolaci provést purifikaci. Důležitým krokem v laboratorní praxi je tedy určení čistoty DNA, z níž následně stanovíme vhodnou metodu přečištění NK.

### 1.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentraci izolované DNA měříme nejčastěji pomocí spektrofotometru. Princip spektrofotometrického stanovení je založen na tom, že NK absorbují UV záření. Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi. Absorpční maxima jednotlivých nukleotidů se liší.

Množství pohlceného UV záření je přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku a vyjadřuje se hodnotami absorbance:

$$A = \log \frac{I_0}{I}, \quad (1)$$

kde  $I_0$  je množství vstupujícího světla,  $I$  je množství světla propuštěného.

Pro přímé spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona, který lze zapsat ve tvaru:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l, \quad (2)$$

kde  $c$  je koncentrace DNA,  $\varepsilon$  je molární extinkční koeficient a  $l$  je délka absorpční vrstvy (tloušťka kyvety).

Výpočet koncentrace NK na základě absorbance vzorku při 260 nm závisí na tom, zda je molekula jednovláknová (ss = angl. single-stranded) nebo dvouvláknová (ds = angl. double-stranded).

Pro stanovení koncentrace DNA platí:

$$A_{260} = 1 \text{ při } c(dsDNA) = 50 \mu g/ml \quad (3)$$

$$A_{260} = 1 \text{ při } c(ssDNA) = 33 \mu g/ml \quad (4)$$

Míru kontaminace DNA určíme z poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm, které odpovídají absorpčnímu maximu nukleových kyselin a absorpčnímu maximu bílkovin. Čistá DNA má koeficient čistoty v rozmezí 1,7–2. Pokud je hodnota koeficientu nižší, DNA je pravděpodobně znečištěna proteiny a je potřeba znovu provést extrakci fenolem. V případě vyšší hodnoty se jedná o kontaminaci nízkomolekulárními látkami (fenol, polysacharidy,

EDTA). Koncentrace RNA a nukleotidových kontaminantů nemůže být stanovena, neboť se jejich absorpční maxima překrývají. [34]

### **NanoDrop**

Přístroj NanoDrop je kompaktní spektrofotometr umožňující měření koncentrace a čistoty vzorků NK a proteinů s malými objemy (od 0,5  $\mu$ l). NanoDrop je nenáročný na spotřební materiál (žádné mikrotitrační destičky) a dokáže změřit vzorky i o vyšších koncentracích (rozmezí 2 ng/ $\mu$ l – 15 000 ng/ $\mu$ l dsDNA), není tedy nutné ředění. Využívá povrchového napětí a technologie optických vláken. Je širokospektrální, disponuje rozsahem 190 až 840 nm. [35]

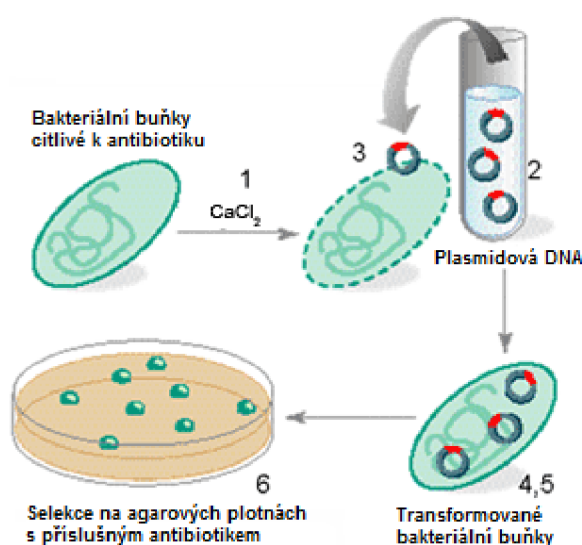
### **1.5.2 Fluorescenční stanovení koncentrace DNA**

Další způsob měření koncentrace nukleových kyselin je založen na jejich obarvení fluorescenčním barvivem. Tato metoda se používá ke stanovení koncentrací zředěných roztoků DNA, které nelze detekovat UV spektrofotometrií. K obarvení se nejčastěji používá Hoechst 33258 nebo ethidium bromid. Barviva se váží na dvoušroubovici DNA a tím dojde ke zvýšení intenzity fluorescence. Ta se měří ve fluorimetru, kde intenzita fluorescence odpovídá množství navázaného fluorescenčního barviva, resp. množství molekul, na které se barvivo váže. [36]

## 1.6 Transformace

Některé bakterie mají schopnost přijmout cizorodou (exogenní) DNA, začlenit ji do svého chromosomu a měnit tak svůj genotyp. Tento proces se nazývá transformace. Transformace byla objevena v roce 1928 Frederickem Griffithem u bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Později trojice amerických vědců (Oswald Avery, Colin MacLeod a Maclyn McCarty) objasnila, že za transformačním principem stojí přenos DNA. Rozlišujeme transformaci přirozenou a umělou. Přirozená transformace se v přírodě vyskytuje u bakterií a dochází při ní k příjmu DNA z volného prostředí. Umělá transformace je prováděna vědci v rámci genového inženýrství. [37]

Transformaci lze provést několika způsoby. Bakteriální buňky musí být však nejprve uvedeny do stavu kompetence, ve kterém jsou schopny přijmout cizorodou (např. plasmidovou) DNA. Velmi často používaným hostitelem plasmidových vektorů jsou buňky kmenů *E. coli*. Stav kompetence je možné u buněk *E. coli* navodit např. působením chloridu vápenatého při nízké teplotě (0 °C), čímž dojde k jejich vyhladovění. Po přidání DNA a vystavení tepelnému šoku (42 °C), který způsobí narušení buněčné membrány, začne transformující DNA přecházet do buněk. Transformované bakterie se poté selektují na agarových plotnách s příslušným antibiotikem. [17] Tento proces je znázorněn na obr. 7.



Obrázek 7: Schéma umělé transformace bakterií [38]

Dalším způsobem přenosu DNA do bakterií je elektroporace, při které jsou buňky v roztoku s přítomnou rekombinantní DNA vystaveny krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí. Tím jsou v buněčné stěně vytvořeny póry, jimiž exogenní DNA prostupuje do buněk. Výhodou této metody je, že ji lze použít nejen u bakterií, ale také při přenosu DNA do eukaryotických buněk (viz. dále). Při aplikaci elektroporace je nutné optimalizovat elektroporační parametry (délka elektrického pulzu a napětí) a její nevýhodou je nízká specifita přenosu. Účinnost transformace je však výrazně vyšší než při užití tepelného šoku. [17]

## 1.7 Transfekce

Transfekce je běžnou technikou molekulární biologie užívanou pro expresi cizorodé DNA v hostitelské buněčné linii. Jedná se o přenos požadovaných genů do eukaryotické buňky. Pro vznik takto geneticky modifikované buňky se nejčastěji používají nukleové kyseliny plasmidů. K hlavním účelům transfekce patří studium funkce přenášených genů pomocí stimulace nebo inhibice jejich exprese. Na základě stability přenášeného genu můžeme transfekci rozdělit na přechodnou a stabilní. [17]

### Stabilní transfekce

U tohoto typu transfekce se cizorodý gen začleňuje do genomu transfekované buňky a zůstává součástí chromozomu i po její replikaci. Stabilní transfekce vzniká pouze u jedné z  $10^5$  až  $10^6$  buněk. Je vhodná pro studium funkce genů, mechanismů jejich regulace a genovou terapii. [39]

### Přechodná transfekce

Při přechodné neboli transientní transfekci se cizorodý gen nespojí s chromozomem a v transfekované buňce je přítomný jen dočasně. Jeho replikace není synchronizována s replikací buňky a během několika dnů se z buňky postupně „vyředí“. Lze však krátkodobě docílit vysoké exprese přenášeného genu. [17] [39]

### 1.7.1 Metody transfekce

Existuje několik různých způsobů transfekce genetické informace, jejichž volba závisí na účelu konkrétního experimentu, vlastnostech hostitelské buněčné linie a požadované účinnosti systému. Optimální metoda by měla zajišťovat vysokou účinnost transfekce, nízkou toxicitu a minimální vznik nežádoucích změn v genomu. Rozlišujeme metody chemické, fyzikální a biologické. Některé níže uvedené způsoby transfekce jsou vykresleny na obrázku 8.

#### Chemické metody

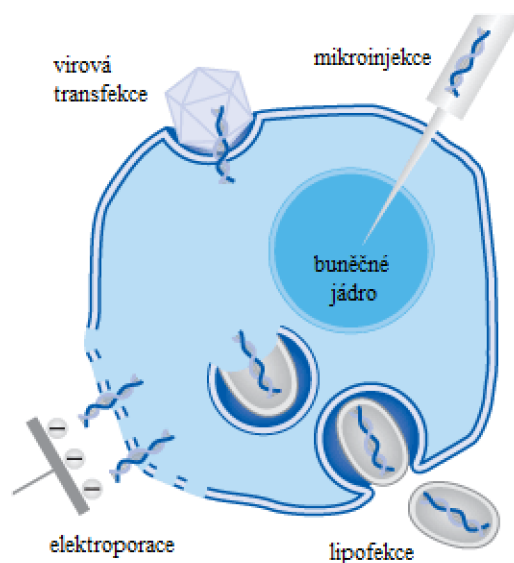
Chemické transfekční metody jsou v novodobém výzkumu těmi nejpoužívanějšími. Přenos DNA do buněk může být zprostředkován např. fosforečnanem vápenatým, polyethyleniminem (PEI) nebo liposomy. Základní princip chemických metod je obdobný. Kladně nabitě transfekční látky vytvoří komplex se záporně nabitými nukleovými kyselinami a jsou přitahovány k záporně nabitě membráně. Cizorodá DNA je tak dopravena do buněk až k buněčnému jádru, kde může dojít k expresi. Účinnost transfekce s použitím chemických metod je poměrně nízká, silně totiž závisí na faktorech jako jsou pH roztoku, typ buněk a stav jejich membrány. [17] [39]

## Fyzikální metody

Mezi fyzikální transfekční metody patří elektroporace, která spočívá v aplikaci krátkého elektrického pulzu o vysokém napětí. DNA poté přechází do cytoplazmy přes napětím vytvořené póry v membráně. Pro transfekci odolnějších buněk (např. rostlinných), které hůře přijímají cizorodou DNA, se používá metoda gene gun (genová puška). Otvory ve stěnách buněk vznikají nastřelováním kovových částic pokrytých DNA. Mechanickým způsobem přenosu DNA do buňky je technika přímé mikroinjekce. Tato metoda je však náročná, vyžaduje přesnou manipulaci a často vede ke smrti buňky. [17] [39]

## Biologické metody

K přenosu DNA do eukaryotických buněk se používá virových vektorů. Podle toho se biologické metody někdy označují jako virové. Vektory vhodnými k transfekci jsou především retroviry a adenoviry. Přenos je zajištěn integrací virového vektoru do hostitelského genomu a jeho následnou expresí v transfekované buňce. Viry jsou limitovány svojí klonovací kapacitou neboli maximálním množstvím bází, které lze vložit do genomu viru. Hlavní nevýhodou je jejich cytotoxicita, přítomnost patogenů a možnost vzniku nežádoucích inzertních mutací. Efektivita přenosu DNA virovými vektory do buněk je však velmi vysoká. Biologické transfekční metody jsou relativně jednoduché na použití a uplatňují se především v genové terapii. [17] [39]

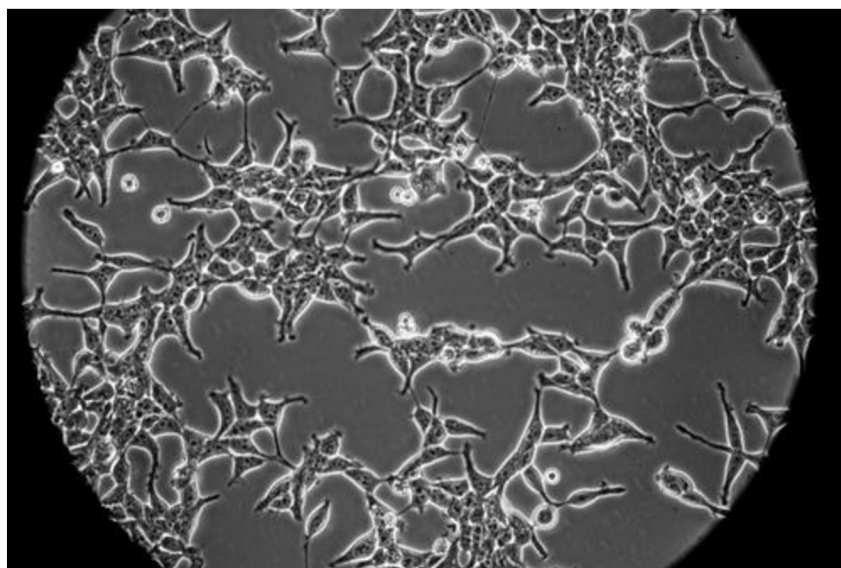


Obrázek 8: Transfekční metody [40]

Ke stanovení úspěšnosti transfekce, měření aktivity a k vizualizaci exprimovaného genu se používají tzv. reportérové systémy. Jedná se o transgeny vkládané do vektorů a umožňující analýzu transfekce. Mohou jimi být např. geny kódující GFP (viz dříve), luciferázu (lux a luc),  $\beta$ -glukuronidáza (GUS) aj. [41] Vyhodnocení může probíhat prostřednictvím Neubauerovy počítací komůrky, průtokového cytometru či odhadem pomocí fluorescenčního mikroskopu.

## 1.8 Buněčná linie HEK293

HEK293 (human embryonic kidney) jsou lidské epiteliální buňky (obr. 9) získané z ledvin zdravého embrya. Poprvé je připravil holandský vědec Alex Van der Eb na Univerzitě v Leidenu na začátku 70. let 20. století. O několik let později provedl Frank Graham jako svůj 293. experiment transformaci HEK linie pomocí adenoviru typu 5. Číslo v názvu buněčné linie odkazuje právě na tuto skutečnost. Relativně jednoduchá transfekce podmiňuje buňky HEK293 k použití pro produkci rekombinantních proteinů. Tato buněčná linie se uplatňuje také ve farmaceutickém a klinickém výzkumu. [42]



Obrázek 9: Buněčná linie HEK293 [43]

Výhodou buněčné linie HEK293 je její snadná kultivace. Buňky HEK293 se množí v kultivačních nádobách umístěných v inkubátoru. Důležitou podmínkou je sterilita inkubátoru, která zamezí kontaminaci kultivovaných buněk jinými mikroorganismy z okolního prostředí, bakteriemi či plísněmi. Optimální teplota pro růst buněk je 37 °C. Relativní vlhkost vzduchu v inkubátoru by měla dosahovat 90 %, aby nedocházelo k odpařování vody z média v kultivační nádobce. Obsah oxidu uhličitého v inkubátoru by se měl udržovat na 5 %. Pěstování buněk probíhá v kultivačním médiu se složením blízkým extracelulární tekutině. Bývá bohaté na látky potřebné k růstu a proliferaci buněk, jako jsou bílkoviny, vitamíny, růstové faktory, glukóza, mastné kyseliny a lipidy, anorganické soli a stopové prvky. Koncentrace těchto látek se s jejich spotřebou snižuje, proto je nutné dvakrát až třikrát týdně médium vyměnit. [44]

## 2. Materiály a metody

V tomto oddílu jsou popsány metody a postupy použité k izolaci plasmidové DNA a její následné transfekci do buněčné linie HEK293.

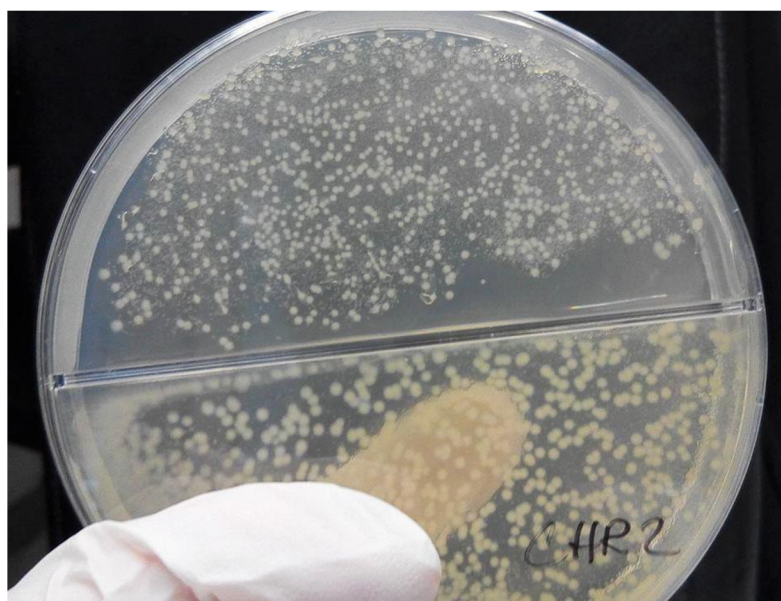
### 2.1 Příprava kompetentních buněk a amplifikace

Aby bylo možné vpravit plasmidy do buněk, je nutné nejprve tyto buňky upravit z nekompetentních na kompetentní (buňky schopné přijmout cizí DNA). Pro amplifikaci plasmidů Chr2, ASAP1(3,5) a Kir 2.1 byly použity bakteriální buňky *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ .

Prvním krokem byla kultivace 1 ml nekompetentních buněk v 250 ml SOB média při 37 °C po dobu 16 hodin. Poté byl centrifugací (10 minut, 5000 rpm) získán pelet, který byl resuspendován v 80 ml CCMB80 pufru a 20 minut chlazen na ledu. Po opětovné centrifugaci byl pelet rozpuštěn v 10 ml CCMB80 pufru. Kompetentní buňky byly po 500  $\mu$ l rozděleny do 20 mikrozkušavek a zmrazeny na -80 °C.

### 2.2 Transformace

Dalším bodem byla transformace plasmidů do bakterií. K tomuto procesu je nezbytné narušení buněčné membrány bakterií. Nejprve bylo smícháno 100  $\mu$ l kompetentních buněk s příslušnou plasmidovou DNA a tato směs byla 15 minut chlazená na ledu. Poté došlo k vystavení teplotnímu šoku (42 °C po dobu jedné minuty). Následovalo doplnění SOB médiem do objemu 1 ml a inkubace 40 minut při 37 °C na třepačce. Připravené buňky byly nanášeny na agarové plotny s antibiotikem (ampicilin) a přes noc kultivovány v sušičce při 37 °C.



Obrázek 10: Kolonie transformovaných bakterií (Channelrhodopsin-2)

## 2.3 Izolace

Z agarových ploten byla setřena kolonie transformovaných bakterií *E. coli* (obr. 10) a kultivována ve 100 ml LB media se 100 µl ampicilinu po dobu 12 hodin. Centrifugací (5 minut, 4000 rpm) došlo k usazení buněčného peletu, který byl pomocí vortexování resuspendován ve 4 ml GET pufru. Následným přidáním alkalického SDS (detergentu) došlo k lýze buněčné membrány. Pro vyrovnání pH bylo použito 6 ml KAc roztoku a směs byla důkladně protřepána. Po 10 minutách inkubace na ledu byla provedena centrifugace (10 minut, 6000 rpm) a došlo k vytvoření vodné fáze s DNA a sraženiny bílkovin a zbytků buněk. Vodný roztok byl zbaven sraženiny přelitím do čisté zkumavky.

Následovalo srážení 16 ml isopropanolu po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Centrifugací (10 minut, 6000 rpm) byl získán pelet a ten byl rozpuštěn v 800 µl TE pufru. Pro eliminaci RNA bylo přidáno 0,5 µl RNázy A (20 mg/ml) a roztok byl inkubován 30 minut při 37 °C. Abychom zamezili rozložení RNázy nespecifickými proteinázami, byl roztok před jejím přidáním zahříván v suché lázni na 65 °C po dobu 20 minut.

Poté byla provedena fenol-chloroformové extrakce, jejíž princip je popsán v kap. 1.3.1. K roztoku bylo napipetováno 300 µl fenol:chloroform:isoamyl alkoholu, 200 µl 1M Tris (base) a 100 µl 3M NaAc. Po důkladném vortexování a propojení všech složek byla směs centrifugována v mikrocentrifuze (3 min, 18000 rpm). Odstředěním se roztok rozdělil na 3 fáze. Horní – vodnou fázi obsahující DNA, prostřední fázi tvořenou proteiny a spodní – fenolovou fázi. Pro zajištění dokonalého odstranění proteinů z roztoku se tento postup opakoval odebráním horní vodné fáze a opětovným přidáním zmíněných roztoků.

Dále bylo nutné provést extrakci fenolu přidáním 500 µl chloroform:isoamyl alkoholu. Tento krok byl podle potřeby 2–4krát opakován. Přechištěný roztok byl poté srážen 1000 µl isopropanolu při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po vysrážení a konečné centrifugaci (10 minut, 18000 rpm) byl vzniklý pelet (izolovaná DNA) rozpuštěn v příslušném objemu TE pufru (20 minut na třepačce) a uchován pro další použití.

## 2.4 Gelová elektroforéza

Úspěšnost izolace DNA byla zkontrolována metodou gelové elektroforézy. Pro přípravu 40 ml agarózového gelu bylo smícháno 40 ml TBE pufru a 0,28 g agarózy. Roztok byl ohříván v mikrovlnné troubě, dokud nebyl čirý. Poté bylo přidáno 20 µl 10krát zředěného fluorescenčního barviva (GelRed) pro vizualizaci DNA. Po ochlazení na teplotu 50–60 °C byl gel rozlit do formy s hřebínkem pro vytvoření jamek. Jakmile gel dostatečně ztuhnul, hřebínek byl vyjmut a gel vložen do elektroforetického systému vyplněného TBE pufrům.

Do jednotlivých jamek v gelu bylo napipetováno vždy 6 µl vzorku izolované DNA smíchaného s 2 µl nanášecího pufru (loading buffer). Do elektroforetického systému bylo



přivedeno napětí 80–90 V. DNA postupně putovalo od katody k anodě. Vyhodnocení pomocí transluminátoru bylo provedeno po 40 minutách elektroforézy.

## **2.5 Příprava buněk pro transfekci**

Samotné transfekci předcházelo pasážování hostitelských buněk, kdy byly adherentní buňky z růstové plochy (kultivační lahve) odstraněny a umístěny v nižší koncentraci ( $5 \times 10^4$  buněk/ml) do Petriho misek ( $9,2 \text{ cm}^2$ ). Následovala kultivace po dobu 24 hodin.

## **2.6 Transfekce**

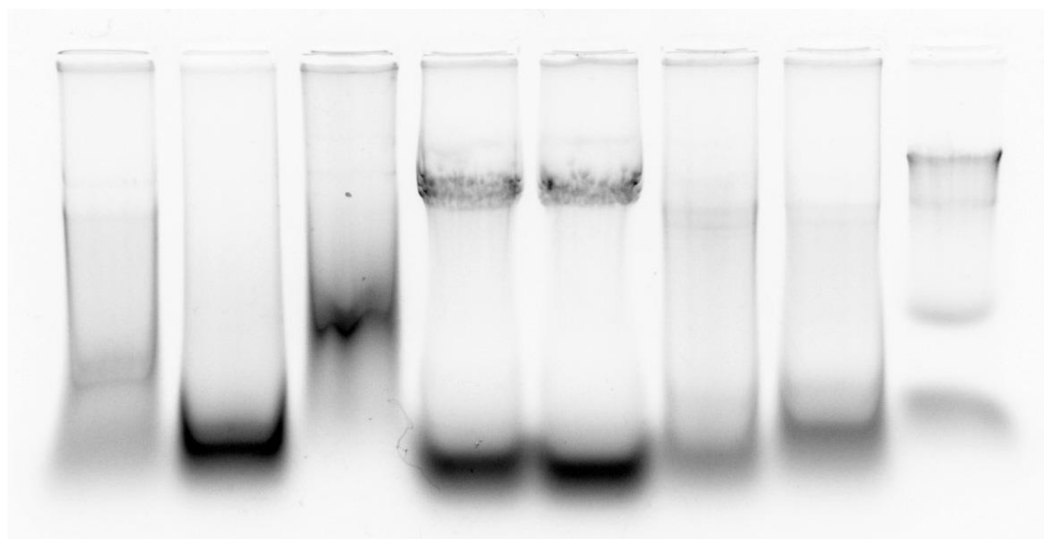
Posledním částí experimentu byla transfekce buněčné linie HEK293 plasmidovou DNA pomocí transfekčního reagentu PEI. Transfekční roztok sestával z 110  $\mu\text{l}$  150mM NaCl (nosné medium), do kterého byl přidán příslušný objem plasmidové DNA a 8–11  $\mu\text{l}$  transfekčního reagentu PEI. Po 10 minutách inkubace při pokojové teplotě byl roztok doplněn 1000  $\mu\text{l}$  kultivačního média (DMEM). Ke kompetentním buňkám připraveným k transfekci na kultivačních miskách byl přidán vzniklý roztok s plasmidovou DNA a dalších 1000  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Misky byly umístěny do inkubátoru ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) na dobu potřebnou k transfekci (24–96 hodin), která závisí na koncentraci plasmidové DNA a také na vlastnostech transfekčního reagentu. Během experimentu bylo 1–2krát vyměněno kultivační medium, již bez transfekčního mixu, neboť ten je při dlouhodobém působení pro buňky toxický.

### 3. Dosažené výsledky a diskuze

Bylo provedeno 22 izolací metodou popsanou v kapitole 2.3. U pěti z nich se nepodařilo získat hodnotitelný pelet (DNA) a celkem se tedy dále pracovalo se 17 vzorky. Úspěšnost izolace byla ověřena gelovou elektroforézou, jejíž výsledky však nebyly zcela průkazné. Hlavním cílem bylo provést transfekci plasmidové DNA do buněčné linie HEK293, která je spolehlivým ukazatelem úspěšnosti izolace plasmidové DNA a jejího začlenění do genomu hostitelských buněk. Souhrnný přehled úspěšnosti izolace a transfekce jednotlivých vzorků poskytuje tabulka v příloze B. Níže jsou zhodnoceny izolace a transfekce jednotlivých druhů plasmidů.

#### 3.1 Plasmid ASAP1

ASAP1 byl nejvícekrát izolovaným plasmidem. Získáno bylo celkově 8 vzorků ASAP1 a 2 vzorky modifikovaného plasmidu (ASAP3 a ASAP5), které byly zkontrolovány gelovou elektroforézou (obr. 11). Separaci molekul NK významně ovlivňuje jejich velikost a konformace. Očekávány byly dva až tři bandy (pruhy) – horní pro lineární formu, spodní pro cirkulární formu a případně prostřední pro relaxovanou formu plasmidové DNA.

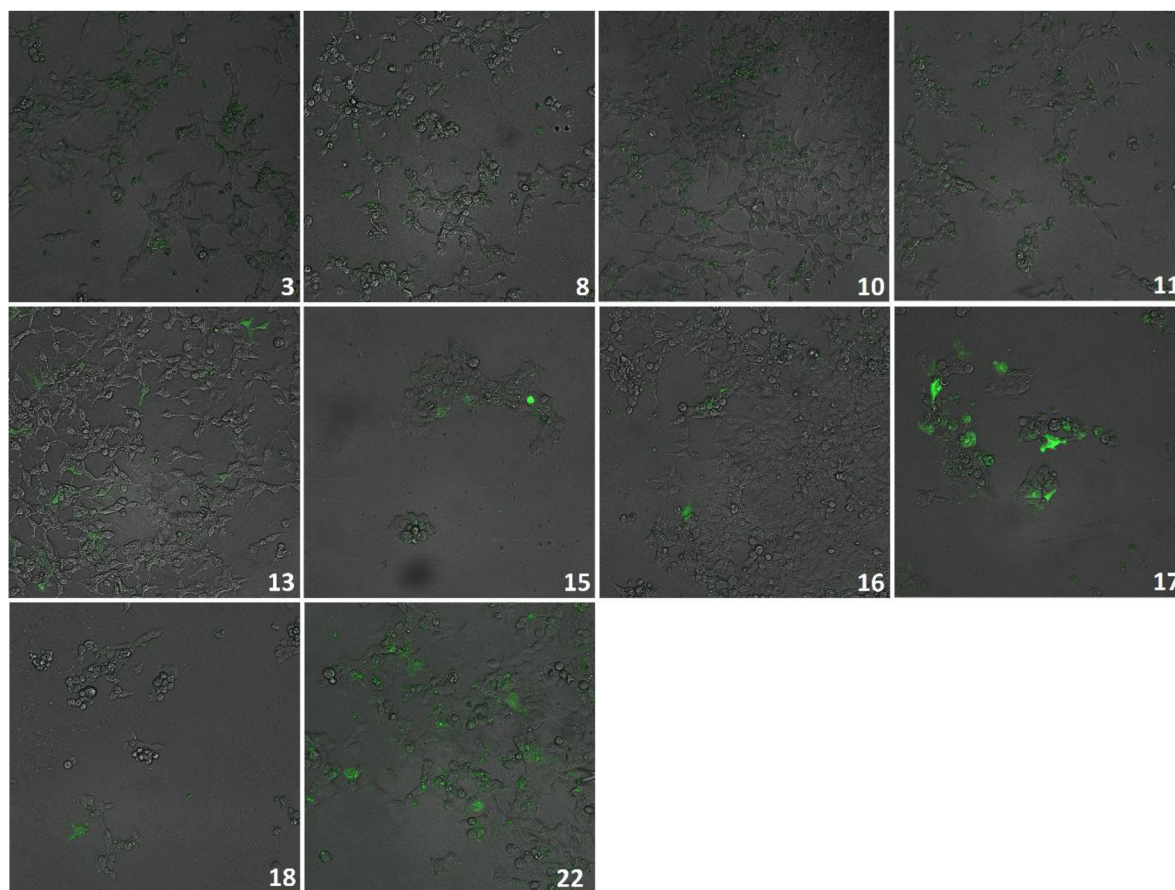


Obrázek 11: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, ASAP (zleva vzorky 3, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 22)

Tento předpoklad se nepotvrdil, neznamená to však nutně neúspěch izolace či nefunkčnost plasmidové DNA. Za náznak bandů se dají považovat pruhy u vzorku 22, který byl izolován komerčním kitem (viz dále). U ostatních se vyskytuje převážně tzv. šmouha (ang. smear), která indikuje fragmentovanou DNA nebo nedostatečně odstraněnou RNA. Pravděpodobné příčiny neprůkaznosti výsledků kontroly gelovou elektroforézou jsou uvedeny v kapitole 3.4.

Pro kompletní ověření úspěšnosti izolace byla provedena transfekce plasmidové DNA do buněk HEK293 (viz kapitola 2.6). Za předpokladu pozitivního vpravení plasmidové DNA do buněk a exprese vkládaného proteinu, byla očekávána fluorescence transfekovaných buněk. U ASAP1 je způsobena přítomností fluorescenční značky GFP (viz kapitola 1.2.1).

Fluorescence buněk byla zkontrolována konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8 X po 24–96 hodinové kultivaci. Jednotlivé vzorky zobrazené použitím kombinací transmisního a fluorescenčního kanálu mikroskopu jsou na obrázku 12.

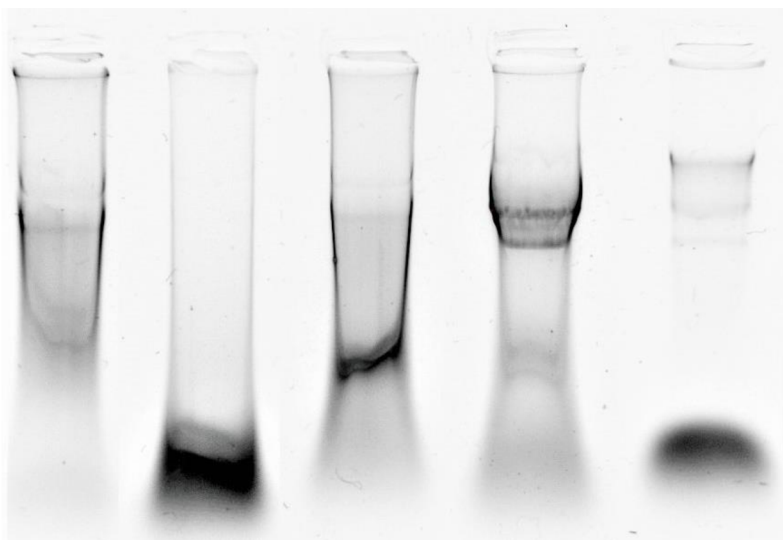


Obrázek 12: Transfekce, ASAP, vzorky 3, 8, 10, 11, 13, 16, 18 – kultivace 24 hodin, vzorky 15, 17, 22 – kultivace 96 hodin

Za úspěšně vyizolované můžeme považovat vzorky 13–22, naopak u vzorků 3–11 se pravděpodobně jedná o nefunkční protein. Dále je patrné, že buňky kultivované po dobu 96 hodin vykazují výrazně větší intenzitu fluorescence než buňky, jejichž kultivace trvala pouze 24 hodin. Delší doba kultivace má však i svoje nevýhody. Pro transfekci je vhodná 40–80% konfluencí buněk (souvislá vrstva – monolayer). Pokud je konfluentní kultura příliš dlouho v původní nádobě, začnou se vytvářet shluky, buňky v jejich centrech začnou odumírat a oddělovat se od kultivačního povrchu. Roste také riziko kontaminace a znehodnocení celého experimentu.

### 3.2 Plasmid ChR2

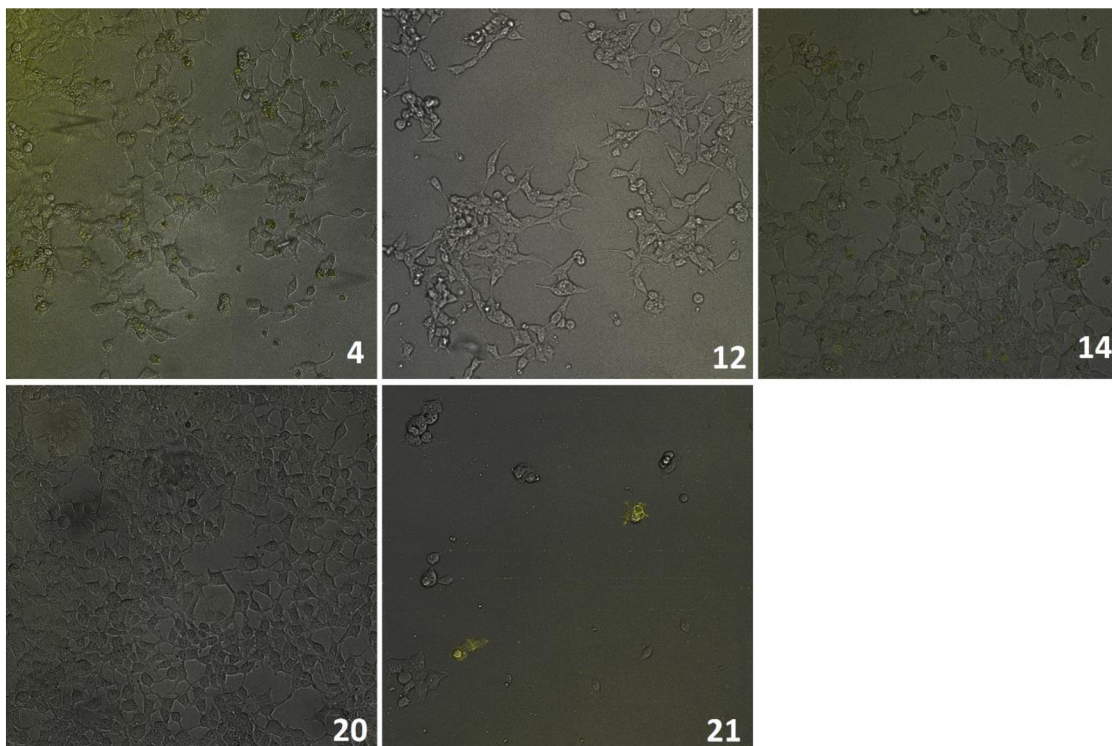
Získáno bylo 5 vzorků izolovaného plasmidu Channelrhodopsin-2. Kontrola gelovou elektroforézou dopadla obdobně jako v předchozím případě. Touto metodou tedy nelze jednoznačně potvrdit či vyvrátit správnost izolace.



Obrázek 13: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, ChR2 (zleva vzorky 4, 12, 14, 20, 21)

Většina vzorků na obrázku 13 vykazuje také přítomnost fragmentované DNA, pouze u vzorku 21 izolovaného kitem se dá hovořit o náznu bandů.

Pro úplnou kontrolu byla izolovaná plasmidová DNA transfekována do buněčné linie HEK293 a byla pozorována fluorescence buněk zprostředkovaná exprimovaným proteinem YFP (viz kapitola 1.2.2). Svítivost jednotlivých vzorků můžeme vidět na obrázku 14.



Obrázek 14: Transfekce, ChR2, vzorky 4, 12, 14, 20 – kultivace 24 hodin, vzorek 21 – kultivace 96 hodin

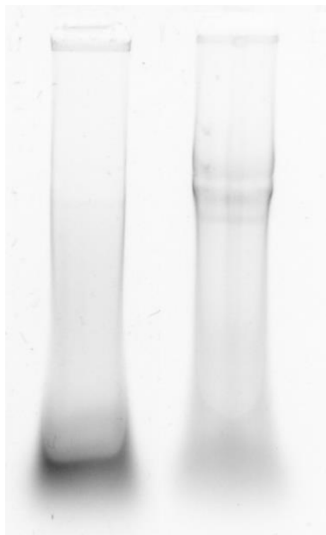
Co se týče tohoto plasmidu, fluorescenci vykazuje pouze vzorek 21, který byl kultivován 96 hodin. Zároveň lze ale vidět, že buňky již nevytváří souvislou vrstvu, nejsou adherované k povrchu („plavou“ v mediu) a mají jiný tvar.

U vzorků 4 a 14 se jedná pravděpodobně o nefunkční protein a v případě vzorků 12 a 20 není patrná žádná fluorescence. Možnými důvody jsou neúspěšná izolace DNA či body uvedené v kapitole 3.4.



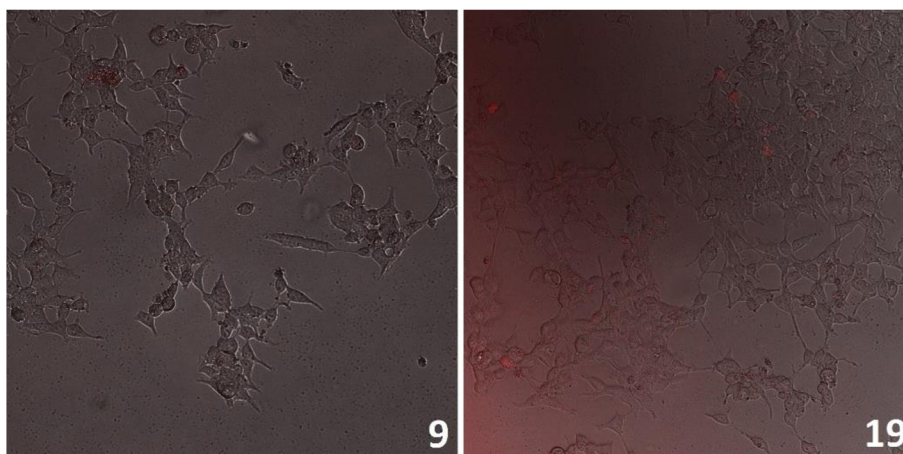
### 3.3 Plasmid K<sub>ir</sub> 2.1

Izolací byly vytěženy dva vzorky DNA plasmidu K<sub>ir</sub> 2.1. Gelová elektroforéza vyšla analogicky jako pro ASAP a ChR2. Odpovídá jí obrázek 15.



Obrázek 15: Gelová elektroforéza plasmidové DNA, 40 minut, 90 V, K<sub>ir</sub> 2.1 (zleva vzorky 9, 19)

Vzorek 9 nemá přítomné žádné pruhy, u vzorku 19 je nepatrně viditelný náznak bandů. Správnost izolace byla ověřena transfekcí (obr. 16).



Obrázek 16: Transfekce, K<sub>ir</sub> 2.1, vzorky 9 a 19 – kultivace 24 hodin

Exprimaci fluorescenčního proteinu mCherry lze pozorovat u vzorku 19, izolaci DNA můžeme pokládat za úspěšnou. Pokud jde o vzorek 9, nejedná se o funkční protein a není přítomná fluorescence.

### 3.4 Diskuze

V průběhu experimentu byly jednotlivé kroky optimalizovány a modifikovány. K dosažení větší výtěžnosti izolované DNA a vyloučení možných chyb a nedostatků při izolaci byly učiněny tyto kroky:

- zopakování transformace buněk DH5 $\alpha$  a amplifikace plasmidové DNA
- kontrola pH fenolu a jeho úprava přidáním Tris base (musí být > 8)
- namíchání nových roztoků potřebných k transformaci a izolaci podle návodů uvedených v příloze A
- prodloužení doby srážení isopropanolem
- výměna RNázy

Výše uvedená opatření byla uskutečněna po několika neúspěšných izolacích a vzhledem k později provedené transfekci byla zřejmě účinná.

Při ověření správnosti izolace gelovou elektroforézou mohlo dojít k chybám způsobeným pravděpodobně lidským faktorem. Možné příčiny nedosažení požadovaného výstupu jsou:

- špatné rozmíchání agarózy při přípravě gelu, následné nehomogenní ztuhnutí gelu (různé hustoty) a rozdílná rychlost pohyblivost vzorků v průběhu elektroforézy
- nesprávná koncentrace TBE pufru či jeho kontaminace
- kontaminace agarózy
- rozdílná koncentrace DNA jednotlivých vzorků v TE pufru a tím způsobená různá intenzita svítivosti DNA
- nedokonalé smíchání vzorku DNA s nanášecím pufrem
- neúspěšná izolace DNA

V některých případech se výsledek gelové elektroforézy shodoval s výsledkem transfekce, v jiných nikoliv. Například vzorek 13 neměl přítomné žádné bandy, pod mikroskopem však fluoreskoval. Z tohoto důvodu se uvedený způsob ověření úspěšnosti izolace nedá považovat za průkazný.

Nízká nebo nulová fluorescence buněk po transfekci byla pravděpodobně způsobena následujícími faktory:

- neúplné přečištění DNA od fenolu a tím způsobená degradace a omezení její funkčnosti
- nízká koncentrace DNA v transfekčním mixu
- nevhodný poměr transfekčního reagentu PEI a plasmidové DNA
- krátká doba kultivace
- degradace DNA v důsledku opakovaného rozmrazování a zamrazování vzorku
- neúspěšná izolace DNA

Pro dodatečnou kontrolu a srovnání byly vzorky 21 (ChR2) a 22 (ASAP1) izolovány pomocí GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu. Oba vzorky byly transfekovány a po 96 hodinové kultivaci jevíly fluorescenci, která potvrdila úspěšnost izolace.

Nutno podotknout, že ačkoliv izolace metodou fenol-chloroformové extrakce se nejeví jako příliš úspěšná, vzorky, které se podařilo vyizolovat, patří do druhé části experimentu, kdy docházelo k úpravám a optimalizaci izolačního protokolu (viz výše).



# Závěr

Teoretická část práce poskytla základní přehled o problematice plasmidové DNA a metodách její izolace. Dále bylo pojednáno o bakterii *E. coli*, konkrétně o kmenu DH5 $\alpha$ , který byl použit jako hostitelský organismus k amplifikaci plasmidů. Pozornost byla věnována mimo jiné také buněčné linii HEK293, její kultivaci a možnostem transfekce plasmidovou DNA.

Cílem experimentální části byla izolace plasmidů ASAP1, ASAP3, ASAP5, K<sub>ir</sub> 2.1 a ChR2. Bylo provedeno 22 izolací, jejichž správnost byla ověřena gelovou elektroforézou a chemickou transfekcí do buněčné linie HEK293.

Z celkového počtu uskutečněných izolací metodou fenol-chloroformové extrakce byl hodnotitelný počet získán v 15 případech, 2 vzorky byly vyizolovány kitem. Na základě kontrolní transientní transfekce za použití transfekčního činidla PEI byla zhodnocena úspěšnost provedených izolací. Nejčastěji a zároveň nejúspěšněji izolovaným plasmidem byl ASAP1, jehož izolace a následná transfekce byla pozitivní v 6 z 9 případů, což činí procentuální úspěšnost 66 %. Jeho modifikované formy ASAP3 a ASAP5 se vyizolovat nepodařilo. K<sub>ir</sub>2.1 byl izolován s 33% úspěšností. Channelrhodopsin-2 se povedlo správně vyizolovat pouze jednou (úspěšnost 16 %). Celková procentuální úspěšnost izolace s využitím fenol-chloroformové extrakce dosahuje 30 %.

Jednotlivé vzorky byly nasnímány pomocí konfokálního mikroskopu a byla zhodnocena jejich fluorescence. Buňky kultivované 96 hodin vykazovaly výrazně větší svítivost než po 24 hodinové kultivaci. Při optimální koncentraci transfekčního reagentu PEI a plasmidové DNA v transfekčním mixu by k maximální expresi vkládané DNA mělo docházet již po 48–72 hodinách kultivace.

V příští práci bych navrhovala zaměřit se na jeden konkrétní plasmid (např. málo úspěšně izolovaný ChR2) a zdokonalit postup jeho amplifikace a izolace.

Pro další použití izolované plasmidové DNA by bylo vhodné stanovit její koncentraci a čistotu, bohužel přístroj umožňující toto měření nebyl v dané době k dispozici. Izolované plasmidy lze využít např. ke studiu aktivity a funkce neuronů (ChR2), monitorování klidového membránového potenciálu (ASAP) či depolarizace buněčné membrány.

# Literatura

- [1] VYMĚTALOVÁ, Veronika. *Biologie pro biomedicínské inženýrství*. Laboratorní cvičení. 2. vyd. Praha: ČVUT, 2015. 109 s. ISBN 978-80-01-05187-0.
- [2] DAHM, Ralf. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* [online]. 2005, vol. 278, no. 2, s. 274–288. ISSN 0012-1606. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- [3] NAVRÁTIL, Milan, UVÍROVÁ, Lenka et al. *Základní praktická cvičení z molekulární biologie* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004. 40 s. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=224&t=0>
- [4] THE BIOCOTE TEAM. *BioCote.com* [online]. [cit. 14.11.2016]. Dostupné z: <http://www.biocote.com/blog/escherichia-coli/>
- [5] BLATTNER, Frederick R., PLUNKETT III, Guy et al. The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science* [online]. 1997, vol. 277, no. 5331, s. 1453-1462. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <http://science.sciencemag.org/content/277/5331/1453.full>
- [6] RUMLOVÁ, Michaela, PAČES, Václav a RUML, Tomáš. *Základní metody genového inženýrství*. 1. vyd. Praha: JPM Tisk, 2003. 270 s. ISBN 80-86313-12-3.
- [7] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. 248 s. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- [8] BACHMAN, Barbara J. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of Escherichia coli K-12. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington, DC: ASM Press, 1996, vol. 2, s. 2460-2488. ISBN 1555810845. Dostupné z: <http://bio.classes.ucsc.edu/bio1051/RESOURCES/bachmann%2066.PDF>
- [9] KUHNERT, Peter. Rapid and Accurate Identification of Escherichia coli K-12 Strains. *Applied and environmental mikrobiology* [online]. 1995, vol. 61, no. 11, s. 4135–4139. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167724/>
- [10] PÉREZ-RUEDA, Ernesto et al. The functional landscape bound to the transcription factors of Escherichia coli K-12. *Computational Biology and Chemistry* [online]. 2015, vol. 58, s. 93–103. ISSN 1476-9271. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.06.002>
- [11] MICROBE WIKI. *DH5-Alpha E.coli* [online]. [cit. 14.11.2016]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha\\_E.coli](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha_E.coli)
- [12] KOSTYLEV, Maxim, OTWELL, Anne E. et al. Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5 $\alpha$ -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End

- Homologies. *PLOS ONE* [online]. 2015, vol. 10, no. 9. ISSN 1932-6203 Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0137466
- [13] TAYLOR, Robin G., WALKER, David C. a MCINNES, Roderick R. E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research* [online]. 1993, vol. 21, no. 7, s. 1677-1678. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309390/>
- [14] CASALI, Nicola a PRESTON, Andrew. *E. coli plasmid vectors: methods and applications*. Totowa, N. J.: Humana Press, 2003. Methods in molecular biology, vol. 235. ISBN 1588291510. Dostupné z: 10.1385/1592594093
- [15] LODISH, Harvey F. et al. *Molecular Cell Biology*. 4. vyd. New York: W. H. Freeman, 2000. ISBN 0-7167-3136-3.
- [16] ADDGENE.ORG. *What is a Plasmid?* [online]. [cit. 4.12.2016]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/plasmid-background/>
- [17] ŠMARDA, Jan et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2010. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [18] ST-PIERRE, François et al. High-Fidelity Optical Reporting of Neuronal Electrical Activity with an Ultrafast Fluorescent Voltage Sensor. *Nature neuroscience* [online]. 2014, s. 884–889. ISSN 1097-6256. Dostupné z: 10.1038/nn.3709
- [19] ROGER Y., Tsien. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1998, vol. 67, s. 509-544. ISSN 1545-4509. Dostupné z: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- [20] ADDGENE.ORG. *pcDNA3.1/Puro-CAG-ASAP1* [online]. [cit. 14.5.2017]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/52519/>
- [21] NAGEL, Georg et al. Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology* [online]. 2005, vol. 15, no. 24, s. 2279-2284. ISSN 0960-9822. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.032>
- [22] DAY, Richard N. a DAVIDSON, Michael W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews* [online]. 2009, vol. 38, no. 10, s. 2887-2921. ISSN 1460-4744. Dostupné z: 10.1039/b901966a.
- [23] ADDGENE.ORG. *pEIAV-TLoop-Chr2-YFP* [online]. [cit. 14.5.2017]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/80160/>
- [24] MINOR, Daniel L. et al. Transmembrane Structure of an Inwardly Rectifying Potassium Channel. *Cell* [online]. 1999, vol. 96, no. 6, s. 879–891. ISSN 0092-8674. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80597-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80597-8)

- [25] WU, Meng et al. A potent and selective small molecule Kir2.1 inhibitor. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* [online]. 2010. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50692/>
- [26] ADDGENE.ORG. *pENTR-L5-Kir2.1-mCherry-L2* [online]. [cit. 14.5.2017]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/32669/>
- [27] TAN, Siun Chee a YIAP, Chin Beow. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 2009, no. 574398, 10 s. ISSN 1110-7251. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398
- [28] VONDREJS, Vladimír a STORCHOVÁ, Zuzana. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997. 59 s. ISBN 80-7184-402-0.
- [29] BUFFALO STATE COLLEGE. *Isolation and Electrophoresis of Plasmid DNA* [online]. [cit. 17.12.2016]. Dostupné z: <http://faculty.buffalostate.edu/wadswogj/courses/BIO211%20Page/lectures/lab%20pdf's/Plasmid06.pdf>
- [30] BRUSSELS-SCIENTIFIC.COM. *Biotechnologie* [online]. [cit. 14.5.2017]. Dostupné z: <http://borzuya-university.org/wp-content/uploads/2017/02/CAPTURE-DE-J1.png>
- [31] PEČOVÁ, Michaela et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy* [online]. 2011, vol. 105, s. 524-530. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_07\\_524-530.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_07_524-530.pdf)
- [32] INOVACE BIOCHEMICKÝCH PROGRAMŮ. *Elektroforéza nukleových kyselin* [online]. [cit. 16.12.2016]. Dostupné z: <http://orion.sci.muni.cz/virtuallab/dokumenty/pdf/Elektroforeza-nukleovych-kyselin.pdf>
- [33] DECODING DNA. *Capillary Electrophoresis* [online]. [cit. 23.4.2017]. Dostupný z: <http://decodingdna.yolasite.com/capillary-electrophoresis.php>
- [34] OVESNÁ, Jaroslava a HODEK, Jan. *Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. 22 s. ISBN 978-80-7427-063-5. Dostupné z: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-063-5.pdf>
- [35] NOVÁK, Josef. Jak je důležité mít NanoDrop. *Chemagazin* [online]. 2011, vol. 5, s. 31. ISSN 1210-7409. Dostupné z: [http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin\\_2010/file/CHEMAGAZIN\\_XXI\\_5\\_c112.pdf](http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_5_c112.pdf)
- [36] GALLAGHER, Sean R. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Neuroscience* [online]. 2011. ISSN 1934-8576. Dostupné z: doi:10.1002/0471142301.nsa01ks56

- [37] GRIFFITHS, Anthony J. F., MILLER, Jeffrey H. et al. *An Introduction to Genetic Analysis*. Bacterial transformation. 7. vyd. New York: W. H. Freeman, 2000, ISBN 0716749394. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21993/>
- [38] MOLECULAR BIOLOGY FOR MASTERS. *Artificial transformation in bacteria* [online]. [cit. 23.4.2017]. Dostupné z: [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Genetic\\_Engineering4A-Transformation-Bacterial\\_Cells.htm](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Genetic_Engineering4A-Transformation-Bacterial_Cells.htm)
- [39] KIM, Tae K. a EBERWINE, James H. Mammalian Cell Transfection: The Present and the Future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, vol. 397, no. 8, s. 3173-3178. ISSN 1618-2650. Dostupné z: <http://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [40] BIONTEX. *Transfection* [online]. [cit. 18.12.2016]. Dostupné z: [http://www.biontex.com/con\\_4\\_6\\_4/cms/front\\_content.php?changelang=1&idcat=52](http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/front_content.php?changelang=1&idcat=52)
- [41] DE RUIJTER, N. C. A. et al. Evaluation and Comparison of the GUS, LUC and GFP Reporter System for Gene Expression Studies in Plants. *Plant Biology* [online]. 2003, vol. 5, no. 2, s. 103–115. ISSN 1438-8677. Dostupné z: [doi:10.1055/s-2003-40722](https://doi.org/10.1055/s-2003-40722)
- [42] THOMAS, Philip a SMART, Trevor G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2005, vol. 51, no. 3, s. 187-200. ISSN 1056-8719. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- [43] JAN BRUDER. *Human Embryonic Kidney 293 cells in culture* [online]. [cit. 18.12.2016]. Dostupné z: <http://www.shutterstock.com/pic-114442948/stock-photo-human-embryonic-kidney-cells-in-culture-these-cells-are-a-standard-cell-line-used-in.html>
- [44] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. Podklady z předmětu Molekulární medicína a biotechnologie, přednáška č. 6. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. [cit. 11.12.2016]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

# Seznam zkratek

DNA	kyselina deoxyribonukleová
RNA	kyselina ribonukleová
NK	nukleová kyselina
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
ChR2	Channelrhodopsin-2
ASAP1	Activated sensor of action potentials
Kir 2.1	Inwardly-Rectifying Potassium Channels
E. coli	Escherichia coli
HEK293	Human Embryonic Kidney Cells – lidské embryonální ledvinové buňky
MCS	multiple cloning site
dsDNA	double-stranded DNA – dvouvláknová DNA
ssDNA	single-stranded DNA – jednovláknová DNA
cpGFP	Circularly Permuted Green Fluorescent Protein – cirkulárně permutovaný zelený fluorescenční protein
EGFP	enhanced GFP – vylepšený zelený fluorescenční protein
YFP	Yellow fluorescent protein – žlutý fluorescenční protein
GPCR	G protein-coupled receptor - receptor spřažený s G proteinem
bp	base pair – pár bází
kb	kilo base pair – kilobáze (1000 bází)
UV	ultraviolet – ultrafialové záření
SDS	sodiumdodecylsulfát
KAc	potassium acetate – octan draselný
SOB medium	Super Optimal Broth medium
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-borát-EDTA
NaAc	sodium acetate – octan sodný
PEI	polyethylenimin
NaCl	chlorid sodný
RNáza	ribonukleáza
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
rpm	revolutions per minute – počet otáček za minutu

# Seznam příloh

Příloha A – Roztoky potřebné k izolaci DNA.....	44
Příloha B – Tabulka úspěšnosti izolace a transfekce .....	48

# Příloha A

## Roztoky potřebné k izolaci DNA

**Tris HCl 1M:**            200 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

Tris base ( $M_r = 121,14$ )            1 M            24,25 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Upravte pomocí HCl na pH 8. Přefiltrujte.

**Tris base 1M:**            200 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

Tris base ( $M_r = 121,14$ )            1 M            24,25 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Přefiltrujte.

**EDTA 0,5M:**            100 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

EDTA ( $M_r = 292,24$ )            0,5 M            14,6 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 100 ml. Upravte pomocí NaOH na pH 8. Přefiltrujte.

**GET:**                    200 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

25 mM    Tris-Cl pH 8,0            1 M            5 ml

50 mM    D-(+)-Glukóza ( $M_r = 180,16$ )            1,8 g

10 mM    EDTA ( $M_r = 292,24$ )    0,5 M            4 ml

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Přefiltrujte.

**Alkalické SDS:**            200 ml                    *Uchovávejte při pokojové teplotě*

0,2 M    NaOH ( $M_r = 40,0$ )            1,6 g

1%        SDS                            2 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Přefiltrujte.

**KAc:**                    200 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

KAc ( $M_r = 98,14$ )                            58,8 g

Kyselina octová (ledová)                    23 ml

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Přefiltrujte.



**TE pufř:**                    500 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

10mM    Tris-HCl pH 8,0                    1 M                    5 ml

1mM      EDTA pH 8                    0,5 M                    1 ml

Doplňte destilovanou vodou na objem 500 ml. Sterilizujte pomocí autoklávu.

**Fenol:chloroform:isoamylalkohol**                    100 ml

*Použití pro extrakci DNA*

1. Připravte chloroform:isoamylalkohol (2x) (CHCl<sub>3</sub>:IAA). Smíchejte 48 ml CHCl<sub>3</sub> a 2 ml isoamylalkoholu (alespoň ACS kvalita nebo lepší). Použijte skleněný válec. Uzavřete do reagenční lahve (Pyrex) s oranžovým uzávěrem. Překryjte TE pufrem. Uchovávejte ve tmě při 4°C.

2. Připravte 1:1 fenol:CHCl<sub>3</sub>:IAA (fenol-CHCl<sub>3</sub>-IAA). Smíchejte rovnoměrné množství (50 g) fenolu a CHCl<sub>3</sub>:isoamylalkoholu. Důkladně promíchejte. Nechte rozdělit fáze při 4°C. Uzavřete do reagenční lahve (Pyrex) s oranžovým uzávěrem. Překryjte TE pufrem. Uchovávejte ve tmě při 4°C.

**Příprava fenol:chloroform:isoamylalkoholu:**

*Použití pro extrakci DNA*

100 g    krystalického fenolu

100 ml    chloroformu

100 ml    H<sub>2</sub>O

10 g      Tris

0,1 g     8-hydroxychinolin [Cend = 0,05 %]

1 ml      EDTA [0,5 M]

Smíchejte, v případě potřeby upravte na pH 8 přidáním Tris

**NaAc 3M:**                    200 ml                    *Uchovávejte při pokojové teplotě*

NaAc (M<sub>r</sub>=136,08)                    81,65 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 200 ml. Přefiltrujte.

**SOB medium:**                    1000 ml                    *Uchovávejte při 4 °C*

2% w/v      tryptone                    20 g

0,5% w/v     Yeast extract                    5 g

10mM	NaCl	0,584 g
2,5mM	KCl	0,186 g

Doplňte destilovanou vodou na objem 1000 ml. Upravte pomocí NaOH na pH 7. Sterilizujte pomocí autoklávu.

**SOC medium:** 500 ml *Uchovávejte při 4 °C*

	SOB medium	500 ml
10 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,876 g
20 mM	D-(+)-Glukóza (M <sub>r</sub> = 180,16)	1,8 g

Přefiltrujte.

**CCMB80 pufr:** 1000 ml *Uchovávejte při 4 °C*

10 mM	KOAc (M <sub>r</sub> = 98,14)	0,981 g
80 mM	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (M <sub>r</sub> = 147,05)	11,764 g
10 mM	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (M <sub>r</sub> = 203,3)	2,033 g
10%	glycerol	100 ml

Upravte pomocí NaOH na pH 6,4

20 mM	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (M <sub>r</sub> = 197,91)	0,958 g
-------	--	---------

Přefiltrujte.

**LB agarové plotny:** 20 kusů *Uchovávejte při 4 °C*

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 1 l odvažte:

5 g NaCl

5 g Tryptonu

2,5 g Yeast Extract

7,5 g Agar

Doplňte destilovanou vodou na objem 500 ml.

Zakružte baňkou, aby došlo ke smíchání – obsah nemusí být kompletně celý v roztoku, ale jakýkoliv prášek usazený na stěnách baňky zkaramelizuje při sterilizaci v autoklávu.

Překryjte hrdlo baňky hliníkovou folií a označte ji páskou pro indikaci sterilizace pro autokláv. Sterilizujte 20 minut, nebo podle specifikací vašeho autoklávu.

Po vyjmutí roztoku z autoklávu nechte zchladnout na 55 °C.

Při nanášení agarů na plotny udržujte pracovní místo sterilní.

Přidejte příslušné množství požadovaného antibiotika do roztoku a zakružte.

Naneste asi 20 ml LB agarů do každé Petriho misky.

Nasaďte víčka na plotny a nechte zchladnout (30-60 minut), poté plotny obraťte a nechte usadit přes noc. Označte dna ploten popiskem (antibiotikum a datum) a uchovejte v plastovém pytli při 4 °C.

# Příloha B

Tabulka 1: Seznam provedených izolací a jejich úspěšnosti  
(+ pro úspěch, – pro neúspěch, × neprováděno)

Pořadí izolace	Plasmid	Pelet získán	Elektroforéza	Transfekce
1.	ASAP1	ne	×	×
2.	ChR2	ne	×	×
3.	ASAP1	ano	—	—
4.	ChR2	ano	—	—
5.	ASAP3	ne	×	×
6.	ASAP5	ne	×	×
7.	K <sub>ir</sub> 2.1	ne	×	×
8.	ASAP1	ano	—	—
9.	K <sub>ir</sub> 2.1	ano	—	—
10.	ASAP3	ano	—	—
11.	ASAP5	ano	—	—
12.	ChR2	ano	—	—
13.	ASAP1	ano	—	+
14.	ChR2	ano	—	—
15.	ASAP1	ano	—	+
16.	ASAP1	ano	—	+
17.	ASAP1	ano	—	+
18.	ASAP1	ano	—	+
19.	K <sub>ir</sub> 2.1	ano	+	+
20.	ChR2	ano	—	—
21.	ChR2*	ano	+	+
22.	ASAP1*	ano	+	+

\* izolace kitem