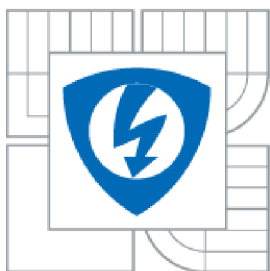




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA Z BAKTERIÍ A JEJÍ TRANSFEKCE DO BUNĚČNÝCH LINIÍ HEK293

PLASMIDE DNA ISOLATION FROM BACTERIA AND TRANSFECTION TO HEK293 CELL
LINE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

KATEŘINA KARMAZÍNOVÁ

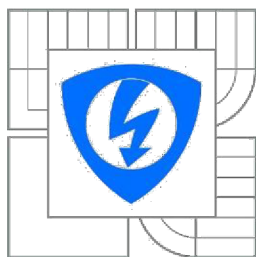
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

ING. ONDŘEJ SVOBODA

SUPERVISOR

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka:

Kateřina Karmazínová

ID: 154637

Ročník:

3

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

**Izolace plasmidové DNA z bakterií a její transfekce do buněčných linií
HEK293**

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s kultivací buněčné linie DH5 α a její úpravou v kompetentní buňky. 2) Nastudujte možnost vpravování plasmidové DNA do takto upravených buněk a následně možnosti izolace amplifikované plasmidové DNA. 3) Seznamte se s kultivací buněčných linií HEK293 a možnostmi transfekce těchto buněk plasmidovou DNA. 3) Na dané oblasti sestavte odpovídající literární rešerši. 4) Proveďte amplifikaci, izolaci a pokusnou transfekcí tří různých druhů plasmidů označených různými fluorescenčními sondami. 5) Vhodným způsobem vyhodnoďte úspěšnost izolace a transfekce DNA. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DESALLE, Rob, Gonzalo GIRIBET a Ward WHEELER. Techniques in molecular systematics and evolution. Boston: Birkhäuser, c2002, ix, 407 p. ISBN 08-176-6257-X.
[2] KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010, vol. 397, issue 8, s. 3173-3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3821-6>

Termín zadání:

22.9.2014

Termín odevzdání: 29.5.2015

Vedoucí práce:

Ing. Ondřej Svoboda

Konzultanti semestrální práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor semestrální 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

Izolace DNA patří mezi základní metody molekulární biologie. Pro izolaci a amplifikaci DNA existují různé metody. V této práci je použita fenol-chloroformová extrakce pro izolaci plasmidů Channelrhodopsin-2, ASAP1 a K_{ir} 2.1. Bylo provedeno 22 izolací plasmidů s celkovou úspěšností 27 %. Správnost izolace byla ověřena gelovou elektroforézou. Úspěšně izolované plasmidy byly následně transfekovány do buněčné linie HEK293 a snímány konfokálním mikroskopem 24, 48 a 72 hodin po transfekci.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace DNA, transfekce, kompetentní buňky, HEK293

ABSTRACT

DNA isolation is one of the basic methods in molecular biology. There are several methods of DNA amplification and isolation. In this paper phenol-chloroform extraction of three plasmid types - Channelrhodopsin-2, ASAP1 and K_{ir} 2.1 is used. Six plasmids were isolated in total. These plasmids are then validated using gel electrophoresis. Successfully isolated plasmids are then transfected to HEK293 cells and images taken on confocal microscope 24, 48 and 72 hours after transfection.

KEYWORDS

DNA isolation , competent cells, HEK293, transfection

KARMAZÍNOVÁ, K. *Izolace plasmidové DNA a její transfekce do buněčné linie HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015, 50s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Ondřej Svoboda.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma *Izolace plasmidové dna z bakterií a její transfekce do buněčných linií 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 práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č.140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

Podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat za pomoc, velkou trpělivost a mnoho cenných rad při vypracovávání mé bakalářské práce Ing. Ondřeji Svobodovi.

V Brně dne

.....

Podpis autora

Obsah

Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	10
Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1. Izolace.....	12
1.1.1. Fenol–chloroformová extrakce.....	13
1.1.2. Adsorpce na silikát.....	13
1.1.3. Magnetické nosiče.....	14
1.2. Gelová elektroforéza.....	14
1.3. Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	15
1.3.1. Spektroskopické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	15
1.3.2. Fluorescenční stanovení koncentrace DNA.....	16
1.4. Escherichia coli.....	17
1.5. Plasmidová DNA.....	19
1.5.1. Channelrhodopsin-2.....	21
1.5.2. ASAP1.....	22
1.5.3. Kir 2.1.....	23
1.6. Transfekce buněk.....	24
1.6.1. Dělení transfekce.....	24
1.6.2. Transfekční metody.....	25
1.7. Buněčná linie HEK293.....	26
2. Experimentální část.....	27
2.1. Materiál a metody.....	27
2.2. Amplifikace a izolace DNA.....	28
2.3. Kontrola DNA gelovou elektroforézou.....	30
2.4. Transfekce.....	31
3. Výsledky a diskuze.....	32
3.1. Ověření gelovou elektroforézou.....	32
3.2. Transfekce.....	34

3.2.1.	Channelrhodopsin-2	35
3.2.2.	K_{ir} 2.1	37
3.2.3.	ASAP1.....	39
Závěr		40
Seznam použité literatury		41
Seznam zkratk		44
Seznam příloh		45

Seznam obrázků

Obrázek 1: Gelová elektroforéza	14
Obrázek 2: Escherichia coli	17
Obrázek 3: Schéma klonovacího vektoru	19
Obrázek 4: Schéma plasmidu Channelrhodopsin 2	21
Obrázek 5: Plasmidový vektor ASAP1	22
Obrázek 6: Schéma plasmidu Kir 2.1	23
Obrázek 7: Diagram transfekcí. Stabilní (A); Transientní (B)	25
Obrázek 8: Buněčná linie HEK293	26
Obrázek 9: Elektroforetická analýza izolovaných plasmidů	32
Obrázek 10: Elektroforetická analýza plasmidů ASAP1	33
Obrázek 11: Gelová elektroforéza plasmidů CHR2 (vlevo) a ASAP1 (vpravo)	34
Obrázek 12: Vzorek č. 1, Channelrhodopsin 2	35
Obrázek 13: Vzorek č. 2, Channelrhodopsin 2	36
Obrázek 14: Vzorek č. 3, Channelrhodopsin 2	37
Obrázek 15: Vzorek č. 4, Kir 2.1.	38
Obrázek 16: Vzorek č. 5, Kir 2.1.	38
Obrázek 17: Vzorek č. 6, Kir 2.1.	39

Seznam tabulek

Tabulka 1: Použité chemikálie.....	27
Tabulka 2: Přístrojové vybavení	28
Tabulka 3: Úspěšnost izolace plasmidů.....	32

Úvod

Pro studium nukleových kyselin (DNA, RNA) je klíčovou úlohou jejich izolace z buňky. Pro účely izolace DNA byla vyvinuta řada technik a metod, kterými lze izolaci provádět. Jednotlivé metody se liší podle toho, o jaký druh nukleové kyseliny se jedná a jaký je cíl použití dané nukleové kyseliny.

Cílem této práce je seznámení se s metodami izolace a transfekce plasmidové DNA a následné využití metody fenol-chloroformové extrakce pro izolaci.

První izolace DNA byla provedena roku 1869 biologem Friedrichem Miescherem [1] alkalickou extrakcí a následnou acidifikací. S následným rozvojem molekulární biologie byly vyvíjeny také techniky izolace DNA. Roku 1956 byla poprvé použita technika fenol-chloroformové extrakce k oddělení nukleové kyseliny z proteinu [2]. Metoda fenol-chloroformové extrakce je stále jednou ze základních technik izolace DNA. Neustále dochází k jejímu vývoji a optimalizaci postupů. Jedná se o relativně levnou a spolehlivou metodu, na jejímž základě jsou vyráběny různé komerční kity.

Na poli klinického výzkumu a genového inženýrství se v současné době se velmi často využívá izolace plasmidové DNA. Plasmidová DNA má, na rozdíl od genomové DNA, schopnost tvořit rekombinantní proteiny, které mohou být začleněny do buněk jiného organismu, kde dochází k jejich replikaci.

Amplifikaci plasmidové DNA není možné vzhledem k jejím vlastnostem provádět běžnými technikami, např. pomocí PCR, LCR nebo 3SR amplifikační reakcí. Proto je využíváno bakteriálních linií, do kterých se plasmidová DNA vpraví, namnoží a následně se izoluje. Po izolaci je získána kruhová molekula plasmidové DNA, která může obsahovat předlohu pro řadu definovaných membránových konstruktů.

Tato práce se zabývá amplifikací a izolací tří typů plasmidové DNA. Konkrétně jsou to proteiny channelrhodopsin-2 (CHR2), activated sensor of action potentials (ASAP1) a draselný kanál K_{ir} 2.1. Získaná DNA je poté podrobena validaci pomocí gelové elektroforézy a otestována transfekcí do buněčných linií HEK293.

Jako modelový organismus, do něhož se následně mohou vkládat izolované plasmidy, slouží velmi často buněčná linie HEK293. Díky jejich jednoduché transfekci a nulové (či velmi nízké) expresi zvolených konstruktů, byly použity jako modelová linie i v této práci.

1. Teoretická část

1.1. Izolace

Izolace DNA z hostitelských organismů je jednou ze základních metod molekulární biologie sloužících pro její analýzu, tvorbu rekombinantní DNA nebo pro využití při studiu transkripce či translace. DNA lze izolovat z prokaryotických buněk i například z kvasinek. Materiálem mohou být virové částice nebo tkáně či orgány eukaryot [3].

Jedná se o proces získání nukleové kyseliny z buňky. Proces izolace DNA je prováděn na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi nukleovou kyselinou a prostředím, ve kterém se nachází [3].

První izolaci DNA provedl švýcarský lékař a fyziolog Friedrich Miescher v roce 1869. Z jader leukocytů, které získával z hnisu nemocničních bandáží, vyizoloval sraženinu obsahující fosfor a dusík. Tuto sraženinu nazval jako „nuclein“ [4].

Proces izolace lze rozdělit do 3 základních kroků [5]:

- Rozrušení buněk nebo virových kapsidů
- Odstranění proteinů a kontaminant
- Vlastní extrakce DNA

Pro narušení buněčné membrány buněk, ze kterých se DNA izoluje, slouží ionogenní detergenty jako SDS či neionogenní detergenty, například Triton X100. V případě lýzy pevných tkání nebo houbových či rostlinných buněk s buněčnou stěnou je nutné užití fyzikálních nebo fyzikálně – chemických postupů, například protřepávání na vortexu se skleněnými kuličkami, rozrušení membrán ultrazvukem a další [6].

Alkalická lýza buněk s použitím SDS je nejčastěji používanou technikou při izolaci DNA ze všech kmenů bakterie *E.coli*. Avšak vliv delšího vystavení buněk denaturačním podmínkám může způsobit, že se uzavřená cirkulární DNA dostane do nevratného denaturačního stadia. Proto je nutné, aby alkalická lýza proběhla pouze po nezbytně dlouhou dobu, nutnou pro rozrušení buněčné membrány [7].

V případě izolace plasmidové DNA je před samotnou extrakcí použito alkalické lýzy pomocí NaOH v přítomnosti detergentu (SDS), dojde k narušení buněčné stěny, DNA se uvolní do roztoku a stává se denaturovanou. Chromozomální DNA je při lýze fragmentována na lineární molekuly, zatímco plasmidová DNA, která má podstatně menší velikost, si zachová kružnicovitou formu. V roztoku je pH okolo 12. To vede k uvolňování vodíkových vazeb mezi řetězci DNA a vznikají jednovláknové molekuly. K neutralizaci se používá octan sodný. Plasmidová DNA renaturuje a vrací se do původní dvouvláknové formy, zatímco lineární molekuly chromozomální DNA nejsou

schopny tak rychle renaturovat, a proto agregují s jinými složkami lyzátu. Tyto sraženiny se odstraní z roztoku centrifugací [8].

Pro zvýšení čistoty získané DNA (především eliminaci molekul RNA) se využívá enzymů proteinázy K nebo RNAazy. Dochází ke štěpení bílkovin, včetně histonů vázaných na strukturu DNA, aniž by molekula DNA byla poškozena [6].

V následujících podkapitolách jsou uvedeny tři nejčastější způsoby izolace DNA. Patří mezi ně fenol-chloroformová extrakce, adsorpce na silikátový gel a využití magnetických nosičů.

1.1.1. Fenol–chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je tradiční separační metoda. Její princip popsal v roce 1956 biochemik Kirby [2], využil deproteinizační účinky fenolu k extrakci nukleové kyseliny z homogenizované savčí tkáně [2]. Během tohoto procesu je buněčný lyzát promíchán se směsí fenolu a chloroformu. Fenol je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od NK. Proteiny jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco NK jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných v následujícím kroku. Centrifugací je oddělena spodní organická fáze, tvořená fenolem. Denaturované proteiny a zbytky buněk tvoří prstenec uprostřed mezi fázemi. Horní vodná fáze pak obsahuje pouze rozpuštěnou DNA. DNA je následně vysrážena etanolem, popřípadě isopropanolem. Precipitát je shromážděn centrifugací a získaný pelet je možné rozpustit ve vodě nebo ve vhodném pufru [5].

Z hlediska výtěžnosti DNA poskytuje tato metoda poměrně dobré výsledky. Oproti komerčně vyráběným kitům je fenol-chloroformová extrakce ekonomicky dostupnější, avšak časově náročnější [6].

1.1.2. Adsorpce na silikát

Tato metoda je založena na procesu vazby, promytí a následného uvolnění DNA. Je využíváno toho, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch. K roztoku, obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. DNA vlivem třepání snadněji ulpívá na silikátových částicích, zatímco ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku, odkud je lze odstředěním odstranit. Poté je odsán roztok nad částicemi a propláchnut novou dávkou pufru obsahující chaotropní soli. Po opětovném odstředění a odsátí roztoku zůstává na částicích adherovaná čistá DNA. Tu lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA [9]. Na základě této

metody jsou vyráběny komerční soupravy, tzv. kity, které slouží pro rutinní extrakce DNA [8].

1.1.3. Magnetické nosiče

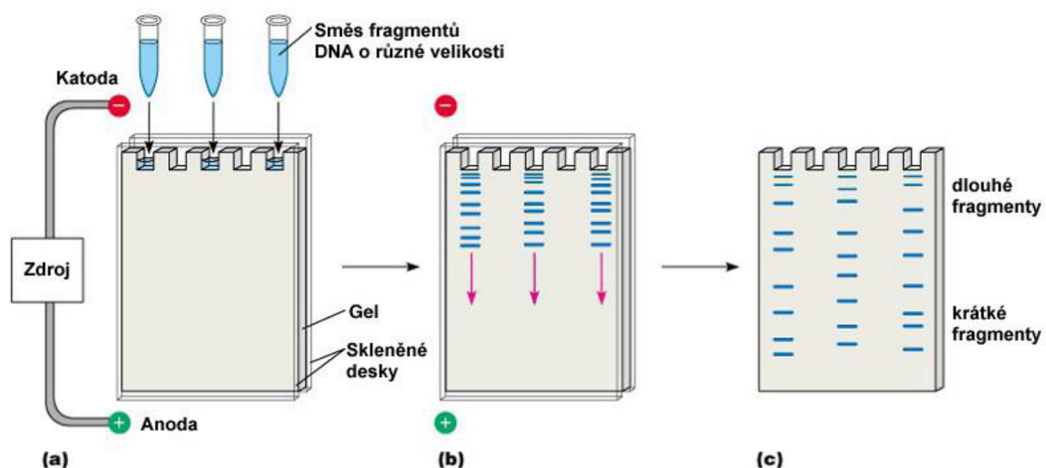
Izolace DNA pomocí magnetických nosičů se v posledních letech stává velmi rozšířenou metodou. Magnetické částice jsou tvořeny magnetickým jádrem zajišťující magnetické vlastnosti částice a nemagnetickou polymerní maticí. Na tuto matici je imobilizována biokompatibilní, biologicky aktivní látka, která slouží pro navázání molekul DNA [10].

Principem této metody je smíchání vzorku obsahující molekuly DNA s upravenými magnetickými nanočásticemi, nejčastěji funkcionalizované karboxylovými skupinami. Po navázání molekul DNA na magnetické částice je možné za pomoci magnetického separátoru oddělit magnetický komplex od zbytku vzorku. Následuje promytí a uvolnění DNA do vhodného pufru [11].

1.2. Gelová elektroforéza

Jedná se o separační analytickou metodu, která spočívá v rozdělení molekul ze směsi podle jejich molekulové hmotnosti účinkem stejnosměrného elektrického proudu [12]. Tato technika je využívána pro ověření provedené izolace.

Molekuly DNA jsou nosiči záporného náboje, proto migrují v elektrickém poli směrem k anodě. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, kterým bývá nejčastěji agarový nebo polyakrylamidový gel. Tento gel je tvořen složitou polymerní sítí a vytváří tak trojrozměrné síto, kterým musí molekuly DNA migrovat ke kladné elektrodě. Koncentrace gelu, tudíž velikost pórů, se volí podle předpokládané velikosti fragmentů DNA, které mají být separovány. Velké fragmenty tak putují pomaleji, malé části naopak rychleji. Průběh elektroforézy je také ovlivněn použitým napětím [13]. Postup elektroforézy je zobrazen na Obrázek 1.



Obrázek 1: Gelová elektroforéza [10]

Elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně vyplněné příslušným pufrům. Tento pufr neutralizuje ionty H^+ a OH^- , které vznikají hydrolyzou vody na elektrodách, tím udržuje optimální pH reakce, kromě toho také vede elektrický proud [6].

Jednotlivé vzorky DNA se nanášejí do připravených jamek v gelu spolu s tzv. vkladacím pufrům, který zajišťuje zatížení DNA pro její pokles do jamky, a zároveň migraci DNA. Současně je přidáno také barvivo, díky kterému je možné zaznamenat fluorescenci separovaných úseků DNA po proběhnutí elektroforézy. Aby bylo možné odhadnout velikost pozorovaných DNA fragmentů, využívá se tzv. velikostního markeru. Marker molekulové hmotnosti obsahuje fragmenty DNA o definované velikosti (např. 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp), nanášejí se do jedné z jamek a slouží k porovnání velikosti separovaných fragmentů DNA [13].

Výsledek elektroforického dělení lze pozorovat na agarovém gelu pomocí transluminátoru. Vizualizace DNA se provádí na základě specifické vazby DNA s barvivem ethidium bromidem, který se přidává do pufru nebo přímo do gelu. Tento komplex při ozáření UV zářením emituje fotony, které jsou následně detekovány a dochází ke zviditelnění DNA [13].

1.3. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Při analýze DNA je stanovení koncentrace a čistoty její nedílnou součástí. Znalost koncentrace DNA je podmínkou pro úspěšné provedení řady molekulárně-biologických metod, ať už se jedná o transformaci DNA, transfekci, enzymové reakce s DNA, mapování apod. Je-li koncentrace znečištění vyšší než stanovená mez, je nutné DNA od nežádoucích kontaminací očistit například ethanolovou precipitací. Koncentraci a čistotu DNA lze měřit spektroskopicky nebo fluorometricky.

1.3.1. Spektroskopické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance na vlnových délkách okolo 260 nm, oproti tomu maximum absorbance proteinů se nachází v oblasti 280 nm. Záření je pohlcováno pyrimidovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, a to má za následek postupnou degradaci DNA [14]. Pro spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona pro monochromatické světlo (Rovnice 1).

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad (1)$$

- c je koncentrace DNA
- ε je molární extinkční (absorpční) koeficient
- l je tloušťka kyvety

Způsoby výpočtu koncentrace nukleových kyselin ve vzorku na základě absorpance vzorku při 260 nm se liší podle konformace molekuly DNA (jednovláknová - ss = angl. single-stranded, dvojitá vláknová – ds = angl. double-stranded).

Při stanovení koncentrace DNA platí následující vztahy:

$$\text{dsDNA: } C = A_{260}/0.02 \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (2)$$

$$\text{ssDNA: } C = A_{260}/0.027 \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (3)$$

Spektrofotometrické stanovení koncentrace je považováno za poměrně přesné a z poměru absorpací při různých vlnových délkách lze určit čistotu DNA [15]. Pro čistou DNA platí tyto hodnoty:

$$A_{280}/A_{260} = 0,550$$

$$A_{230}/A_{260} = 0,455$$

$$A_{260}/A_{280} = 1,80 \text{ až } 1,85$$

$$A_{260}/A_{230} = 2,20$$

Je-li DNA kontaminována proteiny, jsou vypočtené poměry absorpací výrazně nižší a koncentraci DNA nelze přesně stanovit. Stupeň znečištění je také možné vyhodnotit z křivky získané proměřením absorpance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 – 300 nm [15].

Systém Nanodrop

Jedná se o kompaktní spektrofotometrický přístroj, který pracuje se vzorky o objemu 1 μl a nevyužívá kyvety ani kapiláry. Principem je využití optických vláken a povrchového napětí. Vzorek vzlíná mezi dvěma rameny přístroje. Umožňuje měřit ve velmi vysokém rozpětí koncentrace DNA (2 ng/ μl – 3700 ng/ μl).

1.3.2. Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

Stanovení koncentrace DNA fluorescenční metodou se používá u vzorků s nízkou koncentrací nukleové kyseliny a u znečištěných vzorků. Tento způsob měření nukleových kyselin je založen na jejich obarvení fluorescenčním barvivem. Toto barvivo interaguje s bázemi dvouřetězové DNA a po ozáření UV světlem silně fluoreskuje. Nejčastěji jsou používána barviva Hoechst 33258 nebo ethidium bromid. Změřená intenzita fluorescence poté odpovídá množství navázaného fluorescenčního barviva, které koreluje s množstvím molekul na které je barvivo navázáno [15].

1.4. Escherichia coli

Pro řadu molekulárně biologických technik je nutné použití hostitelských buněčných kultur. V této práci byla jako modelový organismus pro amplifikaci plasmidové DNA zvolena bakterie *Escherichia coli*, kmen DH5 α .

Bakterie *Escherichia coli* (Obrázek 2) patří mezi nejprostudovanější modelové organismy.[13] *Escherichia coli* byla objevena roku 1885 německo-rakouským pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem [16]. Tato bakterie patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. *E.coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie. Netvoří spory a k pohybu jí slouží bičík. U člověka a teplokrevných živočichů se přirozeně vyskytuje ve střevní mikroflóře [17]. *E.coli* obsahuje cirkulární chromozom o velikosti cca 3×10^6 párů bází. Jedná se o modelový systém, který je schopen rychlého růstu a množení se na chemickém podkladu. V médiu, které je bohaté na živiny (uhlík, dusík, esenciální látky, aminokyseliny a vitaminy) při 37 °C za intenzivního třepání má v exponenciální fázi růstu generační dobu asi 20 minut. Během stacionární fáze je možné získat při kultivaci až $1-2 \times 10^9$ buněk na mililitr tekutého media [18]. Snadná, krátká kultivace a dobře známé fyziologické a genetické vlastnosti činí z *E. coli* ideálním modelovým systémem, ve kterém je možné vytvářet, množit a zkoumat rekombinantní DNA [18].



Obrázek 2: Escherichia coli [30]

Pro účely tvorby rekombinantní DNA byly připraveny mutantní kmeny *E.coli*, které mají nefunkční geny pro restriční endonukleázy. Takové kmeny neničí rekombinantní DNA, která je v nich naopak vysoce stabilní. Kromě toho mají také inaktivovaný gen *recA*, který zabezpečuje homologní rekombinaci, díky tomu nedochází k porušení integrity klonované DNA [18].

Při výběru vhodného kmene je rozhodující účel, ke kterému má být hostitel určen, hlavně to, jestli má být použit jen k namnožení DNA nebo i k expresi klonovaného genu. V současné době je na trhu široké spektrum kmenů s různými vlastnostmi [18]. Výčet několika kmenu je uveden dále v této práci.

DH5 α

Kmen DH5 α patří mezi nejběžněji používané bakteriální kmeny *E. coli*. Byl odvozen z kmenu DH1 Hanahanem jako kmen obsahující větší množství mutací. Díky těmto mutacím je tento kmen transformován s vysokou účinností. V genomu jsou přítomny mutace, které činí kmen DH5 α vhodným příjemcem rekombinantní DNA. Buňky DH5 α obsahují gen inaktivující vnitrobuněčnou endonukleázu, jež zodpovídá za degradaci plasmidové DNA při její izolaci, a gen eliminující homologní rekombinaci DNA, čímž dochází ke snížené tvorbě delecí i nižšímu podílu multimerních plasmidových molekul. Právě kvůli těmto vlastnostem je kmen DH5 α často používán pro amplifikaci plasmidové DNA [19, 20].

Kmen DH5 α patří mezi hostitelské kmeny, které mají stabilně největší výtěžky kvalitní plasmidové DNA pro její další použití. Plasmidová DNA izolována z toho kmene není náchylná na degradaci při fenol-chloroformové extrakci, proto je kmen DH5 α vhodným typem buněk pro získávání plasmidové DNA [21].

K-12

Většina kmenů využívaných pro tvorbu rekombinantní DNA pochází z kmene *E. coli* K-12. Tento kmen byl poprvé izolován roku 1922 na univerzitě ve Stanfordu. Jedná se o široce využívaný modelový organismus ve farmaceutickém průmyslu, například pro produkci kyseliny L-asparagové, insulinu či somatostatinu, při výzkumu konjugace bakterií nebo metabolismu dusíku v bakteriích.

DNA *E. coli* K-12 má délku asi 4,6 Mbp a kóduje zhruba 4400 proteinů. Tento kmen byl využit např. při studiu metabolismu dusíku u bakterií, při výzkumu konjugace bakterií a také při biosyntéze některých aminokyselin. Obsahuje velké množství plasmidů, což umožňuje široké využití v genovém inženýrství [20].

1.5. Plasmidová DNA

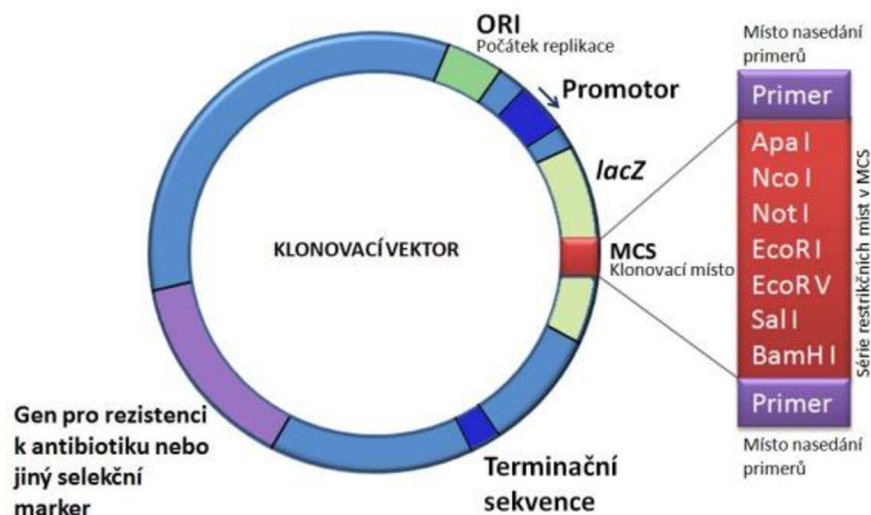
V této kapitole je pojednáno o plasmidové DNA a jednotlivých plasmidech, které byly izolovány v praktické části této práce.

Plasmid je malá kruhová extrachromozomální molekula DNA, která je schopná vlastní replikace. Plasmidy se vyskytují v cytoplasmě prokaryotických organismů – bakterií a archebakterií, a také u některých eukaryot. Plasmidy tvoří až 5 % prokaryotní DNA, vyskytují se v buňce často v několika kopiích [18].

Chemickou stavbou se plasmidová DNA neliší od chromosomální. Je tvořena fosfátovým zbytkem kyseliny fosforečné, deoxyribózy a dusíkaté báze. Velikostí dosahuje plasmidová DNA od tisíce až po stovky tisíc párů bází [18].

Plasmidy nesou především geny rezistence vůči antibiotikům, mutagenům, těžkým kovům, bakteriofágům nebo geny pro produkci restričních enzymů, toxinů, geny virulence a geny umožňující transfer DNA mezi bakteriemi [13].

Ve výzkumu jsou plasmidy využívány zejména pro jejich schopnost nezávislé replikace. Lze je využít jako vektor genetické informace, tedy prostředek pro přenos genetické informace do hostitelské buňky. Nejčastěji jsou to vektory rekombinantní DNA. Cílový organismus se plasmidem transformuje či transfekuje, čímž se daná sekvence rekombinantní DNA přenesou do jádra hostitelské buňky, kde může dojít k expresi genů plasmidu či jejich začlenění do genomu hostitele. Přirozeně se vyskytující plasmidy pocházející z prokaryotických organismů jsou upravovány tak, aby kromě vlastního vloženého genu obsahovaly i další regulační elementy rekombinantní DNA, které mohou například spouštět či zvyšovat expresi daného genu [18].



Obrázek 3: Schéma klonovacího vektoru [14]

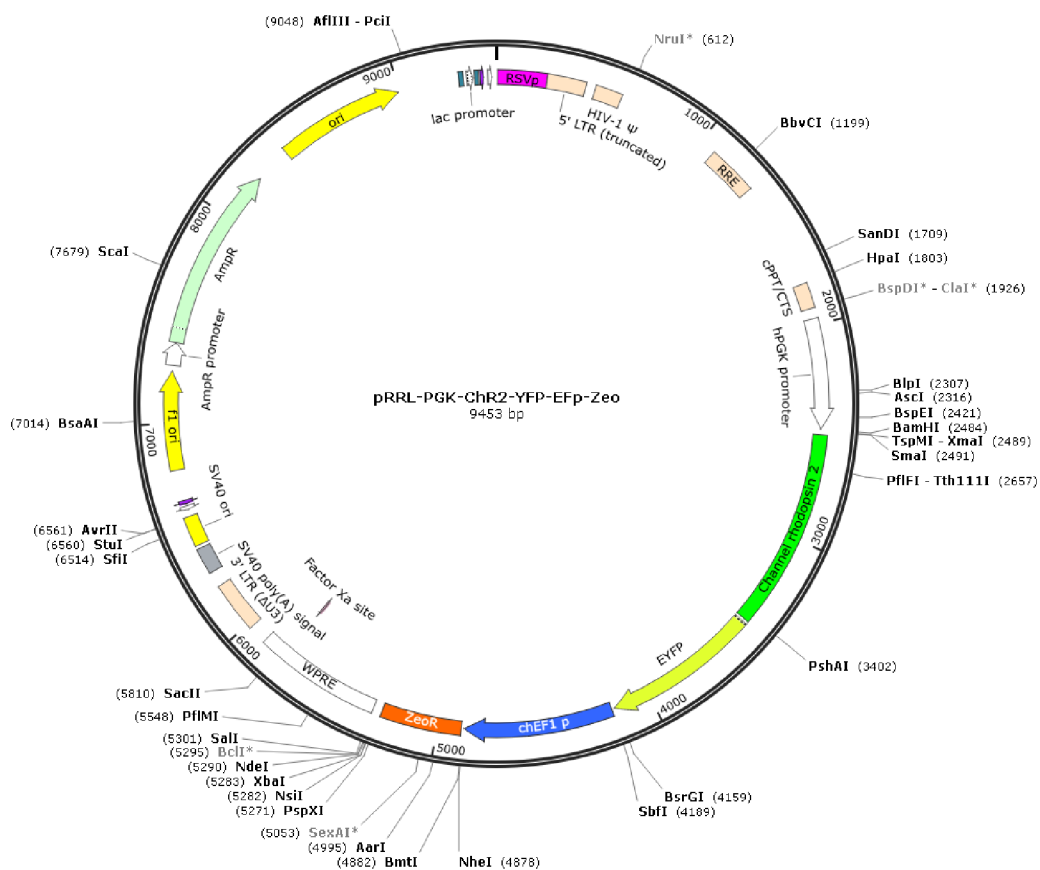
Klonovací vektory DNA (Obrázek 3) sloužící pro transfekci do eukaryotických buněk obsahují tři základní oblasti: počátek replikace (*ori*) zajišťující replikaci plasmidu nezávislou na replikaci bakteriálního chromosomu, gen kódující rezistenci na některé antibiotikum a klonovací místo (MCS - multiple cloning site), které obsahuje několik cílových míst restričních enzymů, které se nevyskytují nikde jinde v sekvenci vektoru. Tato expresní oblast může také obsahovat např. sekvenci pro různé afinitní značky či kotvy usnadňující následnou detekci či purifikaci exprimovaného r-proteinu [15].

Komerčně jsou dostupné plasmidy nesoucí gen Amp pro β -laktamázu, který inaktivuje hydrolytickým účinkem antibiotikum Ampicilin. Zároveň mají jenom jedno klonovací místo, ve kterém je možné plasmid rozštěpit restriční endonukleázou a vložit fragment DNA, který je určen pro klonování. Po vysetí transformovaných buněk na medium porostou pouze ty, které obsahují plasmid s genem rezistence [13].

1.5.1. Channelrhodopsin-2

Jedná se o protein z rodiny rhodopsinů, který je zodpovědný za vnímání světla v rohovce. Je to světlem aktivovaný transmembránový protein ze skupiny receptorů spřažených s G proteinem. Rodopsin je složený z proteinové složky opsinu a karotenové složky retinalu. Retinal je schopný cis-trans izomerie. Cis konfigurace retinalu je pevně vázána na lysinový zbytek opsinového proteinu a představuje klidový stav. Retinal je však schopen prudce reagovat na dopadající fotony světla. Když dojde k absorpci světla cis-retinalem, změní se na all-trans izomer a uvolní se do cytoplasmy. Změnou konformace rodopsinu se aktivuje G protein transducin. Ten aktivuje cGMP fosfodiesterázu, která rozkládá cGMP na otevřený GMP. Výsledkem je, že v přítomnosti channelrhodopsinu-2 v buňce jsme schopni jej s navázanou YFP sondou po ozáření UV při vlnové délce 560 nm detekovat [22].

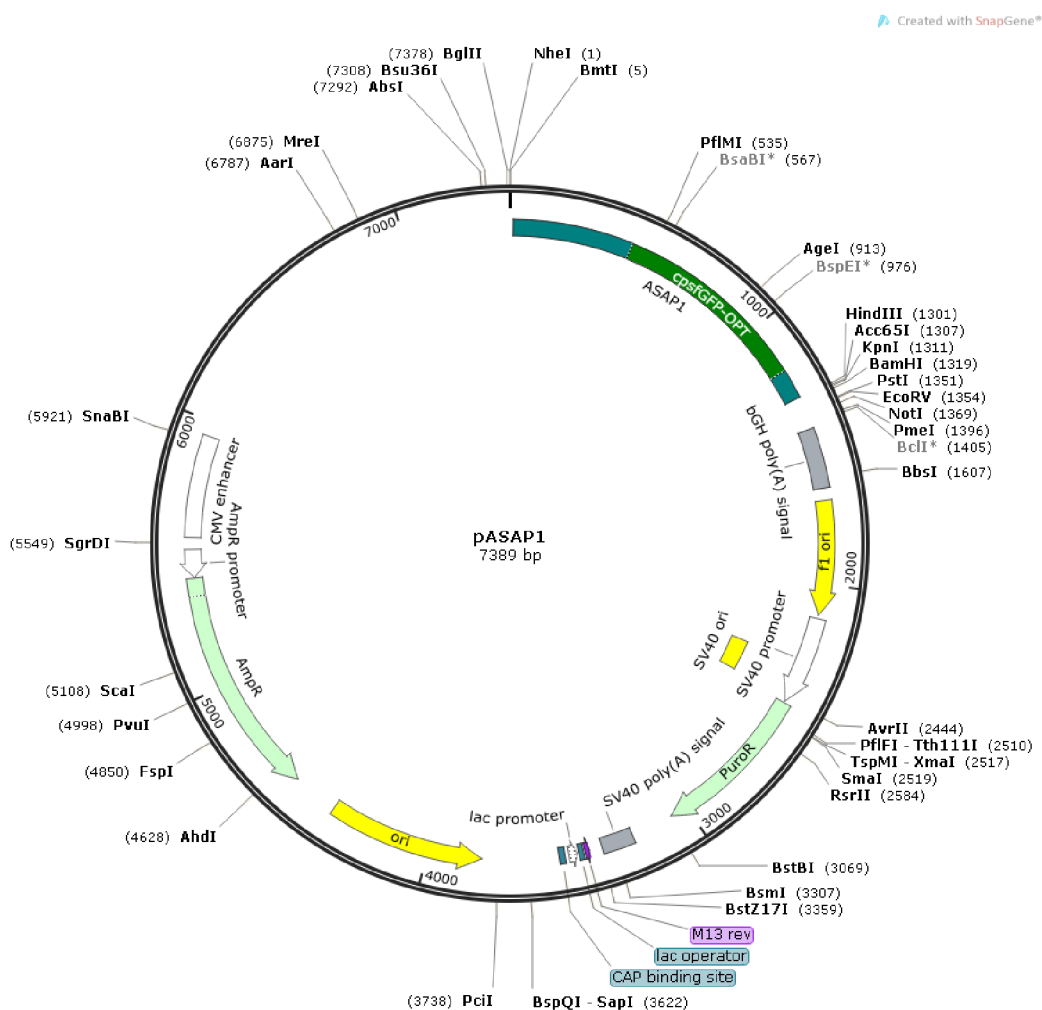
Je to protein, který je snadno exprimován zvláště u excitabilních buněk za použití virologické transfekce či elektroporace. Mapa plasmidového vektoru je zobrazena na Obrázek 4.



Obrázek 4: Schéma plasmidu Channelrhodopsin-2

1.5.2. ASAP1

Tento plasmid celým názvem Accelerated Sensor of Action Potentials (Obrázek 5) je uměle připravený senzor akčních potenciálů u savčích buněk. Plasmid obsahuje zelený fluorescenční protein, který reaguje na membránový potenciál. Plasmid ASAP1 je schopen detekovat jednotlivé akční potenciály buňky a jejich změny až do frekvence 200Hz. Díky kombinaci jasů, dynamického rozsahu a rychlosti detekce umožňuje kontinuální monitorování membránového potenciálu v neuronech pomocí standardního epifluorescenčního mikroskopu [23]. Jeho emisní vlnová délka se nachází okolo 540 nm.



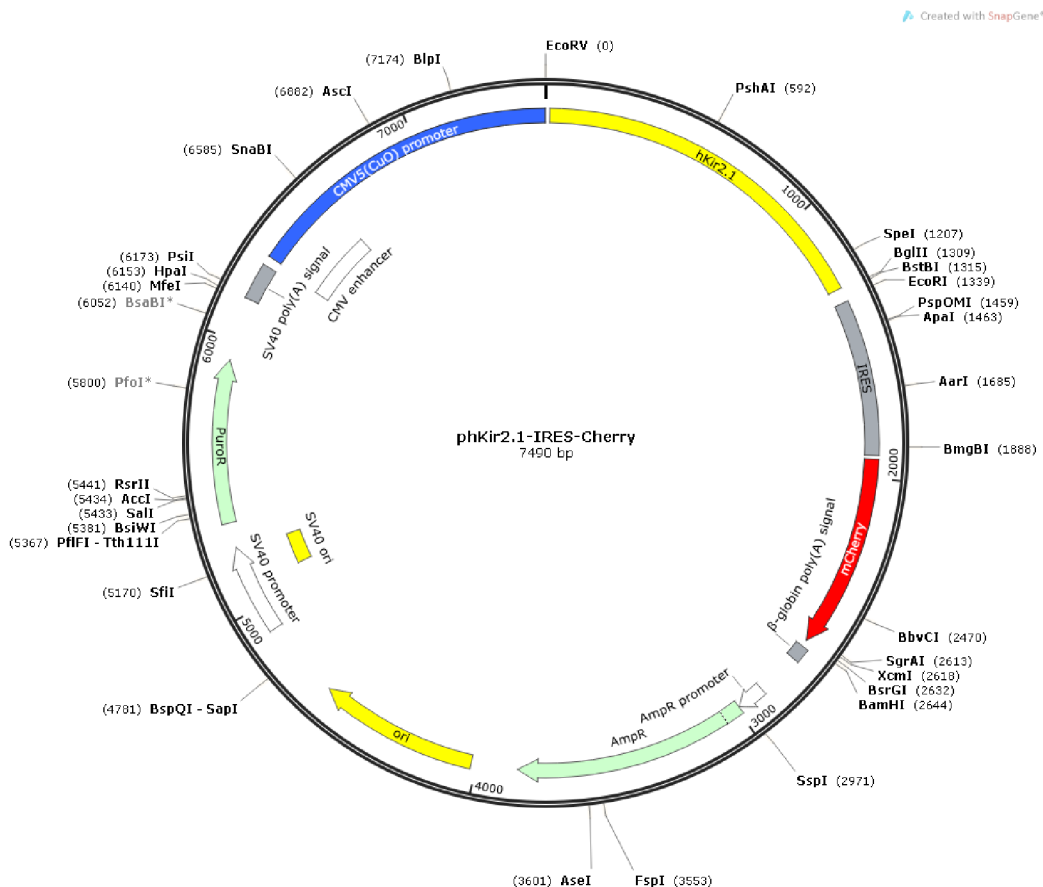
Obrázek 5: Plasmidový vektor ASAP1

1.5.3. K_{ir} 2.1

Zkratka K_{ir} 2.1 značí druh draslíkového kanálu. Jedná se o vnitřně usměrněný iontově selektivní draslíkový kanál nacházející se v membráně buněk. Tento kanál usnadňuje průchod kladně nabitých částic dovnitř buňky a napomáhá stabilizovat klidový membránový potenciál buňky. K_{ir} 2.1 (Obrázek 6) obsahuje dva transmembránové segmenty M1 a M2 regulující fyziologické procesy buňky [24].

Tyto draslíkové kanály se nachází v různých typech buněk, včetně makrofágů, srdečních a ledvinových buňkách. Obsahují je také leukocyty, neurony a endoteliální buňky [24]. Vlivem mutace genu kódujícího K_{ir} 2.1 může docházet k nesprávné srdeční funkci a to syndromu zkráceného QT intervalu, či vzniku Andersen-Tawil syndromu [25].

Aby bylo možné detekovat plasmid K_{ir} 2.1 obsahuje fluorescenční protein mCherry, který má maximum excitační vlnové délky při 587 nm.



Obrázek 6: Schéma plasmidu K_{ir} 2.1

1.6. Transfekce buněk

Transfekce je molekulárně-biologická metoda umožňující začlenění cizorodé nukleové kyseliny do eukaryotické buňky. Nejčastěji jsou pro transfekci využívány nukleové kyseliny plasmidů. Pomocí transfekce tak vznikají geneticky modifikované buňky. Nejčastěji je transfekce využívána pro studium funkce genů a genových produktů pomocí stimulace nebo inhibice exprese určitých genů. Transfekci lze provádět *in vitro* – v laboratorních podmínkách nebo *in vivo* – přenos nukleové kyseliny v živém organismu. Z časového hlediska rozlišujeme také transfekci stabilní a přechodnou [26].

1.6.1. Dělení transfekce

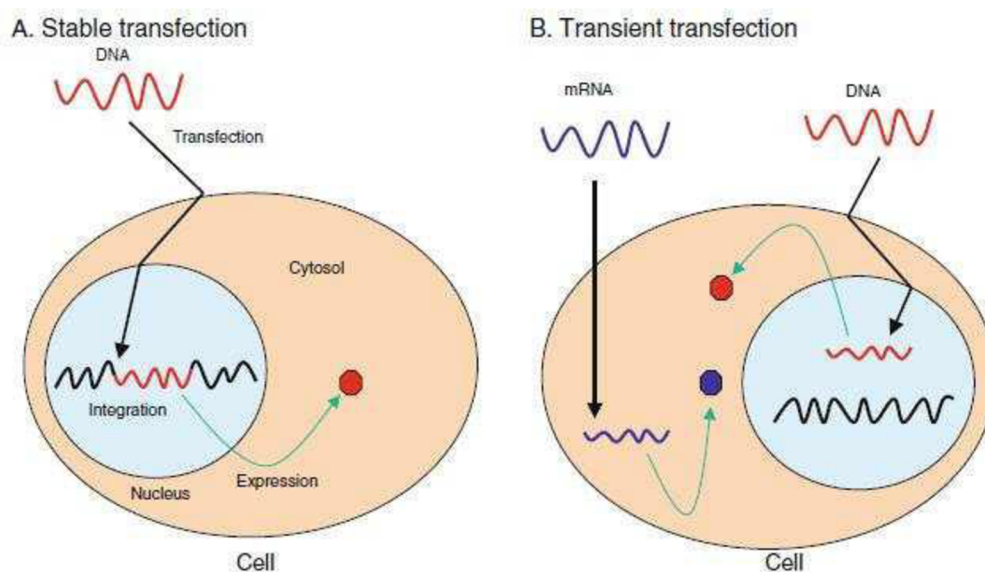
Stabilní transfekce

Při stabilní transfekci dochází k začlenění zájmového genu do genomu hostitelské buňky a jeho následné exprese jakožto sjednoceného genomu. Při této integraci genu dochází k přetrvávající expresi genu i po dělení buněk [26].

Transientní transfekce

Během transientní transfekce nedochází k začlenění cizorodé nukleové kyseliny do hostitelské buňky. K expresi cílové DNA dochází hned po jejím proniknutí do jádra, rychle následuje i syntéza rekombinantního proteinu. Tento protein je tak možné detekovat už po pár hodinách od transfekce. Pro transientní transfekci mohou být využívány transfekční agens jako fosforečnan vápenatý nebo PEI (polyethylenimin) [26].

Srovnání obou transfekcí je ukázáno na Obrázek 7. Během stabilní transfekce (Obrázek 7A) je cizorodá DNA (červeně značená) doručena do jádra průchodem přes buněčnou membránu a jadernou membránu. Začlenění DNA do jaderného genomu (černá). V cytosolu dochází k expresi proteinu, cizí DNA se dostává do jádra, nezačlení se ale do genomu buňky. Cizorodá mRNA (modrá) může být přenesena do cytosolu. Následuje exprese NK a tvorba proteinu (šestiúhelníky).



Obrázek 7: Diagram transfekcí. Stabilní (A); Transientní (B) [24]

1.6.2. Transfekční metody

Transfekci buněk lze provádět různými metodami. Metodu volíme podle typu buněčné linie, účelu transfekce a její účinnosti. Transfekční metody lze rozdělit na biologické, chemické a fyzikální [27].

Virologické metody

Biologické metody transfekce lze také označit jako virální metody. Pro přenos cizorodé DNA do eukaryotické buňky využívají viry. Při množení virů dochází k přenosu jejich genetického materiálu přes plasmatickou membránu buňky a jejich vlastní expresi. Jsou použity tzv. virové vektory, které jsou připravené rekombinací přijmout cizorodou DNA. Pro biologickou transfekci jsou využívány adenoviry a retroviry [27].

Chemické metody

Při chemickém přenosu cizorodé DNA je nutné překonat záporný náboj lipofilní membrány. Principem je, že se nejdříve vytvoří komplex přenášené DNA a transfekční látky, který endocytózou přechází do cytoplazmy buňky. V buňce se působením endozomů a lysozomů začne sraženina rozkládat a přenášená DNA přejde do jádra buňky. Pak se může začít exprimovat. Jako transfekční reagenty je používán například fosforečnan vápenatý, PEI (polyethylenimin) nebo lipidy s kladným nábojem [26].

Fyzikální metody

Kromě chemického či virového přenosu lze DNA vpravit do buňky také pomocí působení fyzikálních sil. Jelikož je díky fyzikálnímu přenosu částečně vyřešený

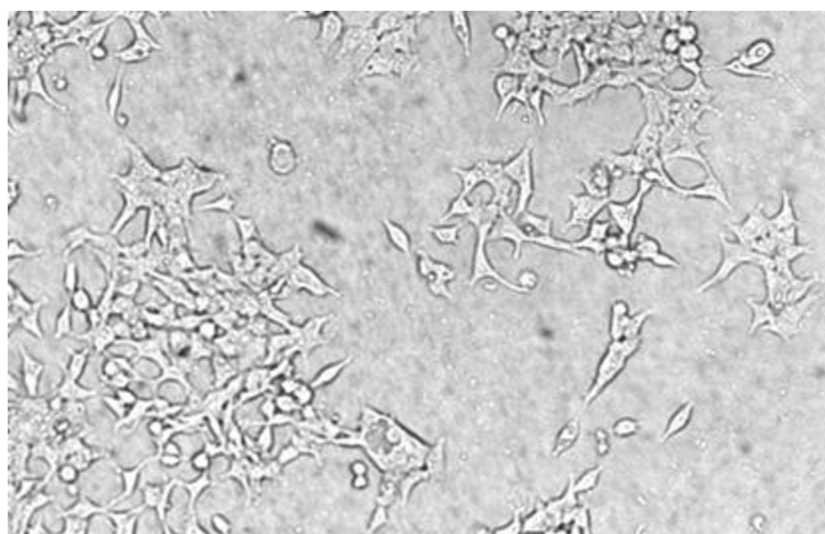
problém průniku DNA přes lipofilní biomembránu, jsou tyto metody poměrně úspěšné. Přenos nukleové kyseliny je možné uskutečnit elektroporací, mikroinjekční metodou, s pomocí zařízení *gene gun*, či díky ultrazvuku nebo s použitím magnetických částic [26].

1.7. Buněčná linie HEK293

Buněčná linie HEK293 jsou lidské embryonální buňky ledvinového epitelu, které byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe Van der Eba v Holandsku a poté upraveny transformací virovou DNA adenoviru 5 Frankem Grahamem roku 1977 [28]. Označení linie číslem 293 poukazuje na 293. transformační pokus, ze kterého známá linie vzešla. Transformace byla provedena precipitací DNA v prostředí chloridu vápenatého [28].

Embryonální ledvinové kultury mohou obsahovat malé množství téměř všech typů buněk lidského těla. Buněčná linie HEK293 a několik dalších lidských buněčných linií, které jsou generované transformací adenovirem lidských embryonálních ledvinových buněk, mají mnoho vlastností nezralých neuronů [29].

Buněčná linie HEK293 (Obrázek 8) jsou velmi snadno kultivovatelné, dobře a rychle se množí a jsou rovněž poměrně jednoduše transfekovatelné. Často bývají používány v pokusech, kdy chování buňky samotné není předmětem zájmu. Takovým využitím HEK293 mohou být například studie účinků léků na sodíkové kanály, testování indukovatelného systému RNA interference, testování izoform selektivní protein kinázy C, či výzkum interakce mezi dvěma proteiny [29].



Obrázek 8: Buněčná linie HEK293, konfokální mikroskop Leica TCS SP8 X, zvětšení objektivu 10×

2. Experimentální část

V této části bakalářské práce jsou uvedeny použité chemikálie, látky a přístrojové vybavení pro provedení práce. Kapitola obsahuje jednotlivé postupy, podle kterých byla provedena izolace plasmidové DNA a její transfekce do buněčné linie HEK293.

2.1. Materiál a metody

Použité materiály a přístroje

Tabulka 1: Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
NaAc (Mr=136,08)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KOAc (Mr = 98,14)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl ₂ .2H ₂ O (Mr = 147,05)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgCl ₂ .6H ₂ O (Mr = 203,3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MnCl ₂ *4H ₂ O (Mr = 197,91)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tryptone	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Yeast extract	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acetic acid – glacial	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAasa - Invitrogen	Life technologies, New York, USA
Isopropylalkohol	Penta s. r. o., Praha, Česká republika
Tris-Cl pH 8.0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA (Mr = 292,24)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris base (Mr = 121,14)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-(+)-Glucose (Mr = 180,16)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
C ₆ H ₅ OH (fenol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CHCl ₃ (chloroform)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
8-hydroxyquinoline [Cend = 0,05 %]	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Chemikálie	Výrobce
C ₅ H ₁₂ O (isoamyl alcohol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gel loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gel Red	Labmark, Praha, Česká republika

Tabulka 2: Přístrojové vybavení

Přístroj	Výrobce (dodavatel)
Centrifuga EBA 20	Hettich
Centrifuga HERMLE	Biotech
Stolní třepačka malá (vortex)	IKA
Stolní třepačka MS3 digital	IKA
Suchá tepelná lázeň CH100	Biosan
Spektroskop Paradigm TH	Beckman Coulter
Fluorescenční inverzní mikroskop IX71	Olympus
Konfokální mikroskop Leica TCS SP8	MIKRO, spol. s. r. o.
CO ₂ inkubátor	N-Biotek
Elektroforetická vana B1A	OWL Separation Systém
Elektroforetický zdroj M7-300V	Major Science

2.2. Amplifikace a izolace DNA

Pro amplifikaci byla použita bakteriální kultura *E.coli*, kmen DH5 α , ve které byly pomnoženy plasmidy Channelrhodopsin-2, ASAP1 a K_{ir} 2.1 určené k izolaci a následné transfekci.

Celý pracovní proces amplifikace a izolace DNA je rozdělen do tří hlavních kroků:

- 1) Příprava kompetentních buněk
- 2) Transformace buněk
- 3) Izolace plasmidové DNA.

Příprava kompetentních buněk

Pro amplifikaci plasmidů je nutné vpravit tyto plasmidy do bakterií, které jsou schopny plasmidovou DNA přijmout (jedná se o kompetentní buňky). Pro amplifikaci byla zvolena bakterie *Escherichia Coli*, kmen DH5 α .

Při přípravě kompetentních buněk bylo 16 hodin kultivováno 250 ml SOB media s 1 ml nekompetentních buněk při teplotě 37 °C. Následnou centrifugací, při 5000 otáčkách po dobu 10 minut, byl získán pelet. Ten byl resuspendován 80 ml pufru CCMB80, a chlazen 20 minut na ledu. Znovu byla provedena centrifugace a získaný pelet byl rozpuštěn 10 ml CCMB80. Poté bylo smícháno 50 µl resuspendovaných buněk s 200 µl SOC media a na tomto vzorku byla provedena kontrola optické hustoty již kompetentních buněk přístrojem Spektroskop – Beckman coulter Paradigm.

Transformace

Pro vpravení molekul DNA do kompetentních bakteriálních buněk, je nutné nejprve destabilizovat cytoplazmatickou membránu a následně je k narušeným bakteriím přidat zvolenou kruhovou DNA. K narušení nejčastěji dochází tepelným šokem [8]. V případě úspěšné transformace dojde poté k expresi plasmidové DNA, kterou je možné izolovat.

Při procesu transformace byly přidány požadované plasmidy k buňkám. Tyto buněčné kultury byly chlazeny při po dobu 10 - 20 minut. Následoval teplotní šok při 42°C, při kterém došlo k destabilizaci cytoplazmatické membrány, a plasmidy se mohly začlenit do buněk. Poté byl přidán 1 ml SOC media a následovala 20 - 60 minutová inkubace na třepače. Takto připravené buňky byly naneseny na agarové plotny s ampicilinem a nechány kultivovat přes noc při 32-37 °C.

Izolace plasmidové DNA

V této práci byly plasmidy Channelrhodopsin-2, ASAP1 a K_{ir} 2.1 izolovány fenol-chloroformovou metodou.

Transformované buňky byly sejmuty z agarových ploten a přes noc kultivovány při 37°C v tekutém LB mediu s přidaným ampicilinem 150 µg/ml média. Následnou centrifugací (4000 otáček, 5 minut) byl získán pelet, který byl vortexováním rozpuštěn v 4ml GET roztoku. Poté byl přidán detergent alkalický SDS (dodecylsulfát sodný). Tím došlo k alkalické lýze buněčné membrány. Pro vyrovnání pH byl roztok protřepán s přidanými 6 ml KAc roztoku. Po 10 minutách inkubace při -18 °C byl roztok 10 minut centrifugován na maximální otáčky. Centrifugací bylo dosaženo oddělení vodného roztoku obsahujícího DNA a vznik sraženin bílkovin a zbytků buněk. Vodný roztok byl pro vysrážení proteinů rozředěn 16 ml isopropanolu. A inkubován 15 - 30 minut při pokojové teplotě. Následnou centrifugací byl získán pelet, který byl resuspendován v 800 µl TE pufru. Pro odstranění molekul RNA bylo přidáno 1,3-10 µl RNasy A. Aby nebyla RNAáza rozložena nespecifickými proteinázami byl roztok předem zahříván 20 minut na 65°C.

K odstranění zbytků RNA, proteinů a jiných nečistot byla použita fenol-chloroformová extrakce. Protože isoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, lze použít směs fenol:chloroform:isoamylalkohol. Tato směs se používá proto, že tak lze po extrakci získat vodnou fázi s malou kontaminací fenolem, který vykazuje nevhodné vlastnosti pro další zpracování DNA, jako jsou jeho inhibiční účinky.

K roztoku bylo přidáno 300 μ l fenol:chloroform:isoamyl alkoholu, 200 μ l 1 M Tris (base) a 100 μ l 3 M NaAc. Tato směs byla důkladně protřepána na vortexu, aby došlo ke spojení všech složek. Po centrifugaci (3 minuty, 15000 otáček) došlo k rozdělení roztoku do 3 fází: vodná fáze obsahující DNA, bílý prstenec s proteiny a spodní fenolová fáze. Aby bylo zajištěno dokonalé odstranění proteinů z roztoku, byl znovu s vodnou fází opakován postup extrakce.

Pro zbavení roztoku zbytků fenolu byla 2-4x opakována extrakce s 500 μ l chloroform-isoamylalkoholem.

Po závěrečném vysrážení 1000 μ l isopropanolu po dobu 30 minut a centrifugací při 18000 otáčkách (10 minut) byl získán požadovaný pelet obsahující kruhovou a lineární formu DNA. Pro uchování byl tento pelet rozpuštěn v TE pufru.

2.3. Kontrola DNA gelovou elektroforézou

Pro základní ověření úspěšné izolace slouží metoda gelové elektroforézy.

Nejprve je nutné připravit agarový gel s jamkami, do kterých je roztok obsahující DNA napipetován. Agarosa je rozmíchána v TAE pufru a je přidáno 2 μ l ethidium bromid zajišťující fluorescenci DNA. Takto připravený roztok je následně přiveden k varu. Po mírném zchlazení je rovnoměrně rozlit do připravené formy s hřebínkem, který utvoří jamky v gelu.

Jakmile je gel dostatečně ztuhlý, je umístěn do elektroforetické vany obsahující tentýž pufr, ze kterého byl připraven agarový gel. Jednotlivé vzorky plasmidové DNA o objemu 2 μ l jsou resuspendovány s 6 μ l vkladacího pufru a napipetovány do připravených jamek. Na svorky elektroforetické vany je přivedeno napětí okolo 80 V, čímž v daném pufru vznikne elektrické pole a DNA začne postupně migrovat směrem k anodě. Po 20ti minutách je agarový gel vizualizován pomocí transluminátoru. Totéž se znovu opakuje po dalších 30ti minutách působení elektrického pole. Následně je možné pozorovat separované jednotlivé fragmenty DNA.

2.4. Transfekce

Izolované plasmidy jsou v posledním kroku práce transfekovány do buněčné linie HEK293, kde by mělo dojít k jejich expresi. Pro způsob transfekce byla zvolena chemická metoda pomocí transfekčního reagentu PEI.

Pro provedení transfekce na konfokálních miskách jsou ve zkumavkách jednotlivé vzorky plasmidové DNA v množství 1,57 μg resuspendovány ve 110 μl 150 mM NaCl. Poté je přidáno 8 μl transfekčního reagentu PEI a roztok je 10 minut inkubován při pokojové teplotě. Do konfokálních misek obsahujících buňky připravené k transfekci jsou jednotlivé vzorky přidány společně s 2 ml kultivačního média. Toto médium je vhodné po 24 hodinách znovu vyměnit.

Množství plasmidové DNA je možné v závislosti na její koncentraci navýšit. V této práci bylo použito 2,5 μl plasmidové DNA CHR2, 6,5 μl plasmidové DNA K_{ir} 2.1 a 5 μl plasmidové DNA ASAP1.

3. Výsledky a diskuze

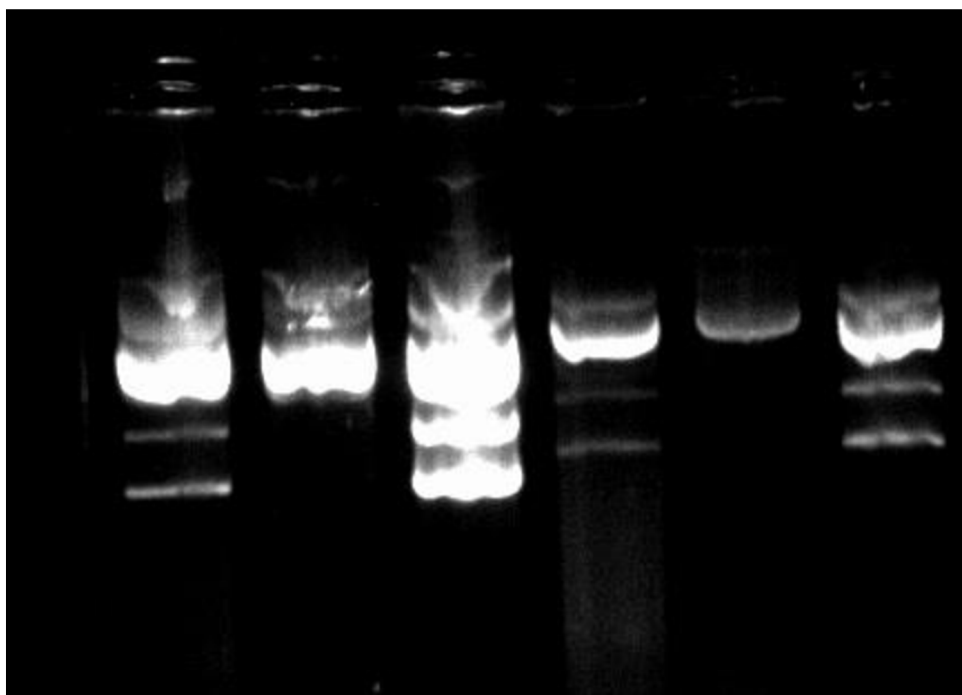
V této části bakalářské práce jsou shrnuty výsledky izolace plasmidové DNA, konkrétně plasmidů Channelrhodopsin-2 (CHR2), ASAP1 a K_{ir} 2.1. Při izolaci byly použity dříve popsané optimalizované protokoly a metody (viz kapitoly 2.2 - 2.4).

V rámci experimentální práce bylo provedeno celkem 22 izolací. Dosažené výsledky jsou uvedeny v Tabulka 3.

Tabulka 3: Úspěšnost izolace plasmidů

	Provedené izolace	Úspěšné izolace	Procentuální úspěšnost
CHR2	5	3 (vzorky č. 1-3)	60%
K_{ir} 2.1	4	3 (vzorky č. 4-6)	75%
ASAP1	13	0	0%
Celkem	22	6	27%

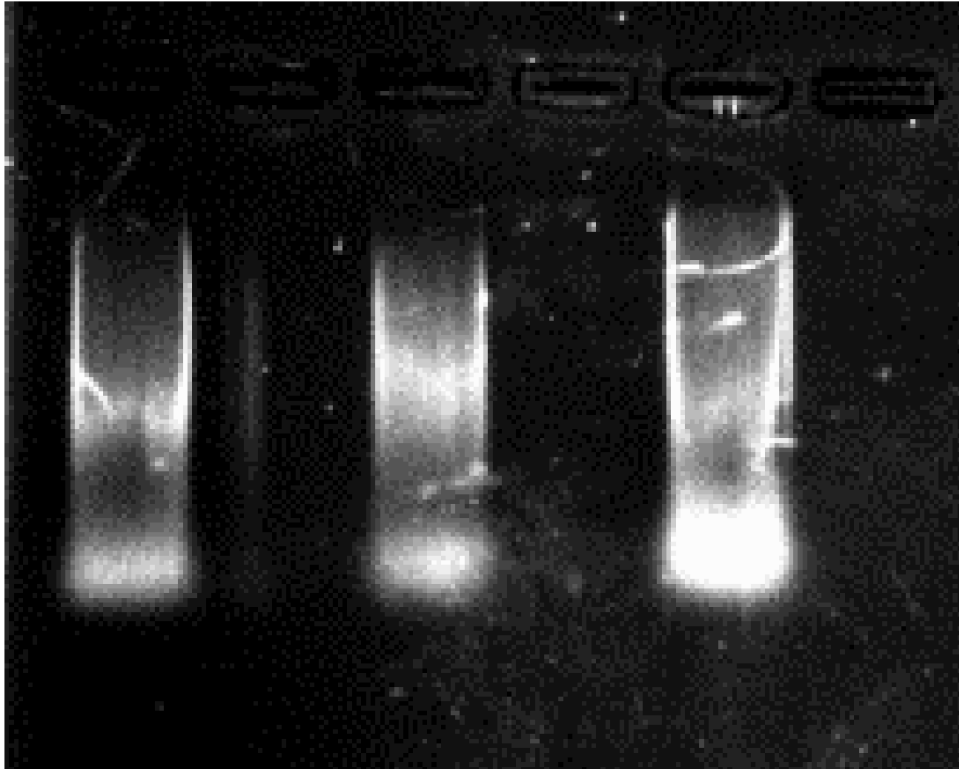
3.1. Ověření gelovou elektroforézou



Obrázek 9: Elektroforetická analýza izolovaných plasmidů

Pro ověření fragmentace získaného peletu byla využita metoda gelové elektroforézy. Výsledky úspěšně izolované DNA jsou uvedeny na Obrázek 9. U každého vzorku byly očekávány dva až tři bandy DNA (horní lineární forma pDNA, prostřední relaxovaná forma a spodní kruhová forma pDNA), ne všechny vzorky je ovšem obsahují. Z toho lze vyvodit, že správně izolované a pravděpodobně funkční vzorky jsou (zleva): 1, 3

(CHR2); 4 a 6 (K_{ir} 2.1). Ostatní vzorky vykazují pouze jeden band, případně různé fragmenty. Tato skutečnost vypovídá o možné chybě v postupu izolace, avšak nevylučuje funkčnost izolované DNA. Rovněž lze pozorovat rozdíly v intenzitě svítivosti jednotlivých vzorků, to je způsobeno různou koncentrací plasmidové DNA v TE pufru. Největší intenzitu dosahovaly vzorky s vysokou koncentrací DNA v TE pufru.

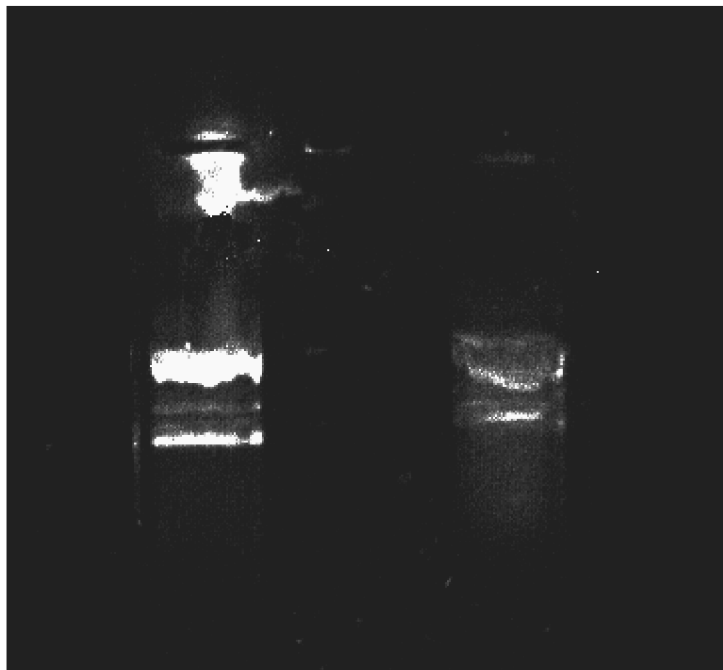


Obrázek 10: Elektroforetická analýza plasmidů ASAP1

Na Obrázek 10 je zobrazena elektroforetická analýza tří plasmidů ASAP1. Můžeme pozorovat pouze fragmentovanou DNA. To svědčí o neúspěšné izolaci tohoto plasmidu. Při jednotlivých experimentech izolace plasmidu ASAP1 byl standardní postup (viz kapitola 2.2.) průběžně optimalizován. Možné příčiny nefunkčnosti izolace mohou být například:

- chybná transformace do bakteriální kultury DH5 α ,
- nedostatečná doba srážení isopropanolem,
- postupná degradace RNAasy (opakovaným zmrazováním a rozmrazováním při používání),
- přílišné působení detergentu SDS, který mohl mít za následek degradaci nukleových kyselin,
- dlouhá doba centrifugace pro získání peletu isopropanolovým srážením.

Ačkoli byly jednotlivé kroky v postupu upravovány, nepodařilo se plasmidovou DNA ASAP1 vyizolovat.



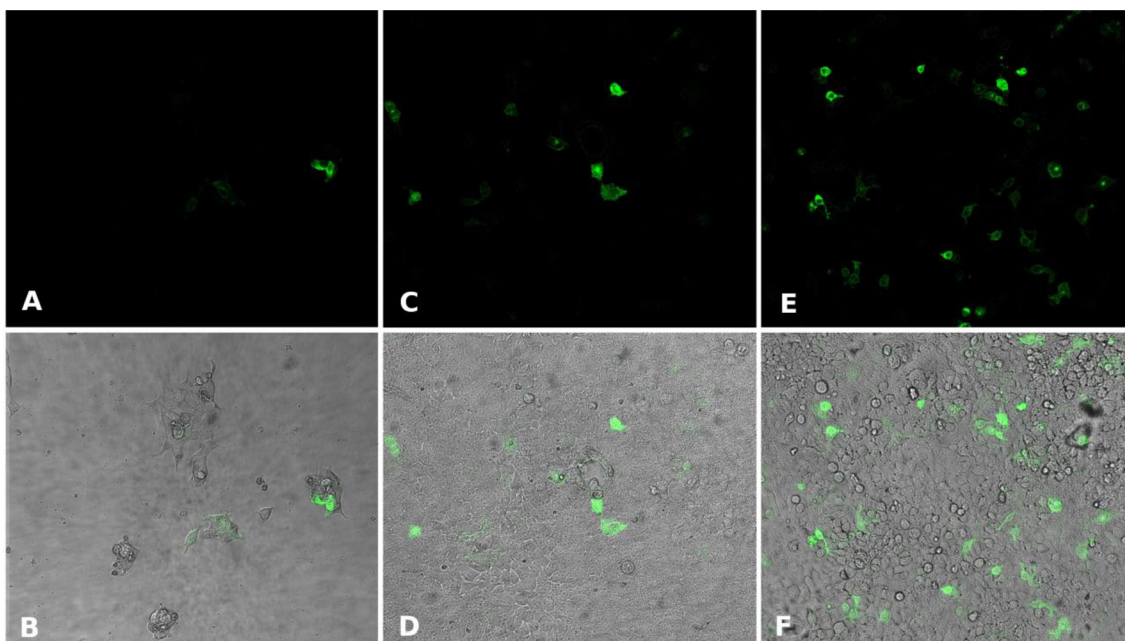
Obrázek 11: Gelová elektroforéza plasmidů CHR2 (vlevo) a ASAP1 (vpravo)

Na Obrázek 11 lze porovnat výsledky plasmidů CHR2 (vlevo) a ASAP1 (vpravo) po 30ti minutách gelové elektroforézy. U vzorku plasmidu CHR2 jsou zřetelně oddělené bandy lineární, relaxované i kruhové pDNA. Vzorek ASAP1 vykazuje pouze rozfragmentované části pDNA.

3.2. Transfekce

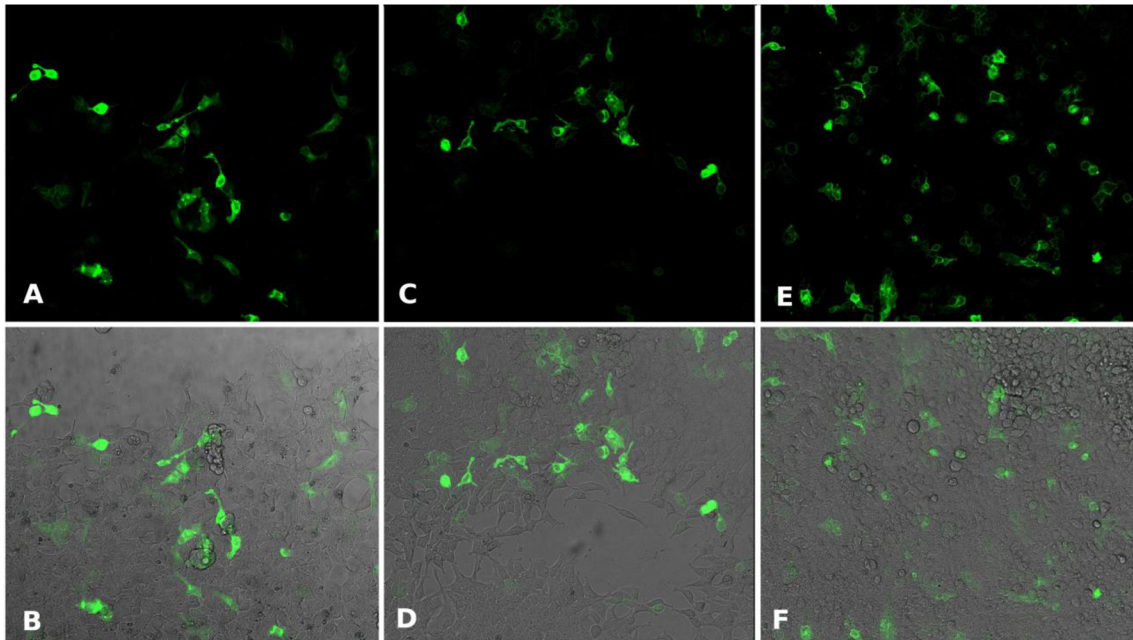
Na základě výsledků elektroforetické analýzy byla provedena transfekce jednotlivých plasmidů do buněčné linie HEK293. Pokud se jedná o funkční membránový konstrukt, je očekávaná fluorescence buněk, ve kterých dochází k expresi vloženého proteinu. Fluorescence plasmidů CHR2 je způsobena navázanou fluorescenční sondou YFP. Fluorescence plasmidů K_{ir} 2.1, je způsobena fluorescenčním proteinem mCherry. Byla použita transientní metoda transfekce (viz 2.4), která poskytla relativně rychle výsledky. První známky fluorescence vykazovaly buňky už 24 hodin od transfekce. Množství transfekovaných buněk se postupně navyšovalo. Ideální fluorescenci bylo možné pozorovat po 72 hodinách od transfekce. Veškeré snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X. Vliv na úspěšnost transfekce mělo množství a charakter plasmidové DNA a stav buněčné linie HEK293. Na následujících obrázcích je patrné, že transfekované buňky byly značně konfluentní.

3.2.1. Channelrhodopsin-2



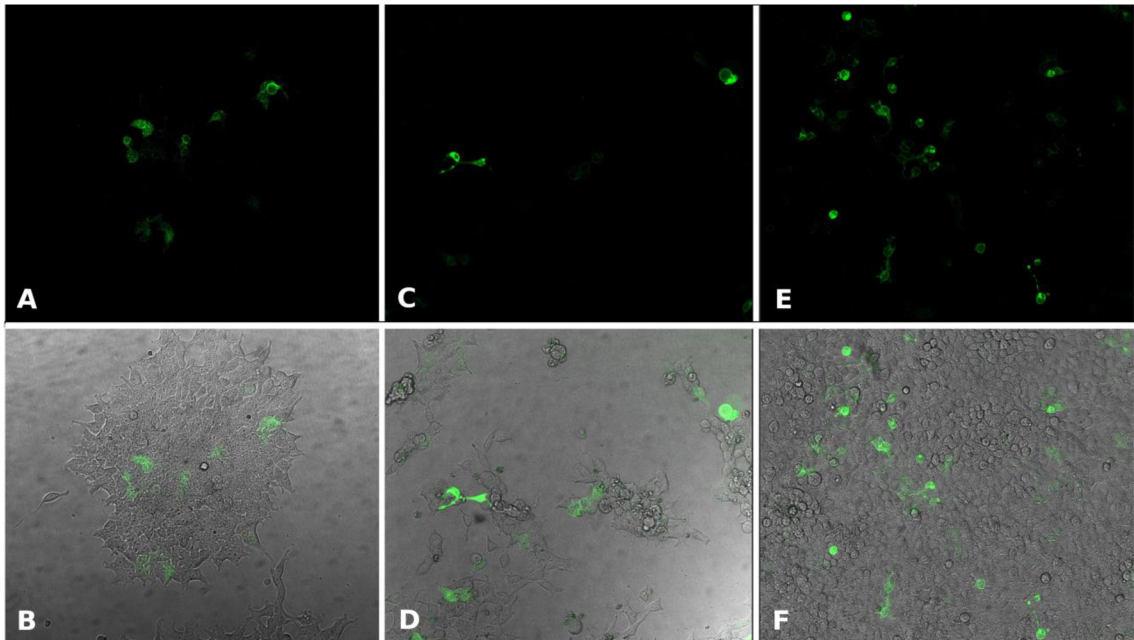
Obrázek 12: Vzorek č. 1, Channelrhodopsin-2 – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Na Obrázek 12 je zobrazen vzorek č. 1 transfekovaného kanálu Channelrhodopsin-2 v buněčné linii. Na obrázcích A, C, E lze vidět samotnou fluorescenci v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po transfekci. Na snímcích pod nimi (B, D, F) je zobrazena kombinace transmisního a fluorescenčního kanálu. Množství transfekovaných buněk postupně narůstalo. Po 24 hodinách (Obrázky 12 A, B) byla transfekční účinnost velmi nízká. Po 72 hodinách (Obrázky 12 E, F) vykazovalo fluorescenci cca 40% buněk.



Obrázek 13: Vzorek č. 2, Channelrhodopsin-2 – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Na Obrázek 13 jsou zaznamenány fluorescence ve stejných časových intervalech pro vzorek č. 2 membránového kanálu Channelrhodopsin-2. Na rozdíl od předchozích vzorků je zde patrná vyšší fluorescence buněk už 24 hodin po transfekci (Obrázek 13 A, B), z čehož lze usuzovat na vyšší koncentraci DNA. Po 72 hodinách (Obrázek 13 E, F) je na snímku vidět poměrně velké množství buněk s exprimovanou DNA.

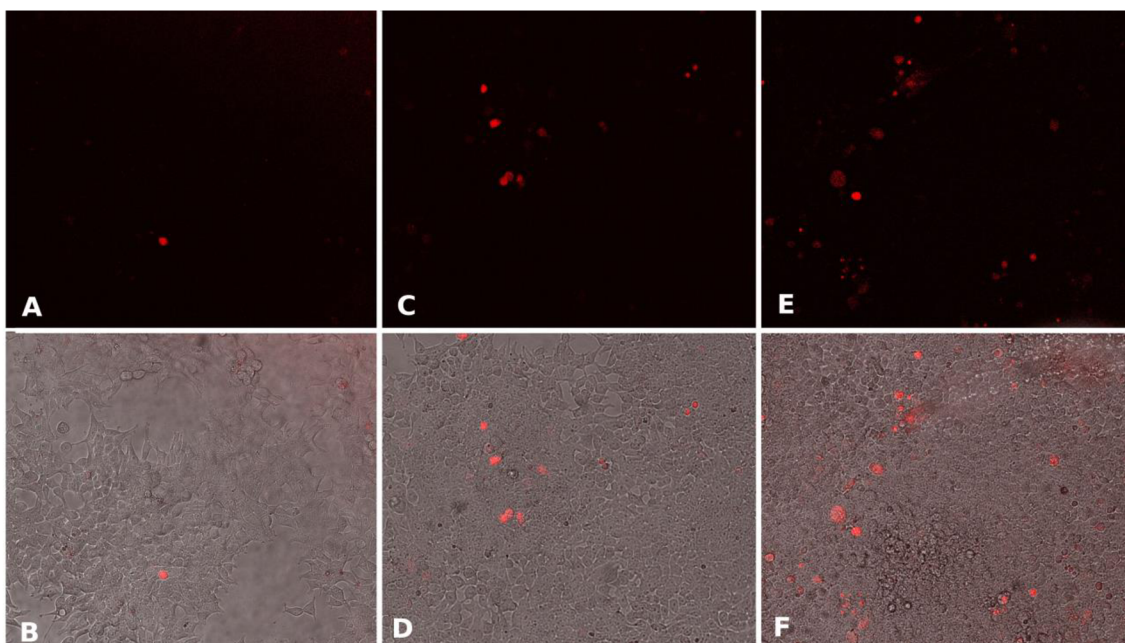


Obrázek 14: Vzorek č. 3, Channelrhodopsin-2 – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Nejnižší fluorescenci z CHR2 se vyznačoval třetí vzorek (Obrázek 14). Transfekce se u něj ve větší míře projevila až po 72 hodinách (Obrázek 14 E, F). Transfekční účinnost byla cca 20%. Příčinou mohla být nižší koncentrace vpravované DNA nebo kvalita dané buněčné linie vzhledem k nízkému počtu buněk v linii (Obrázek 14 D).

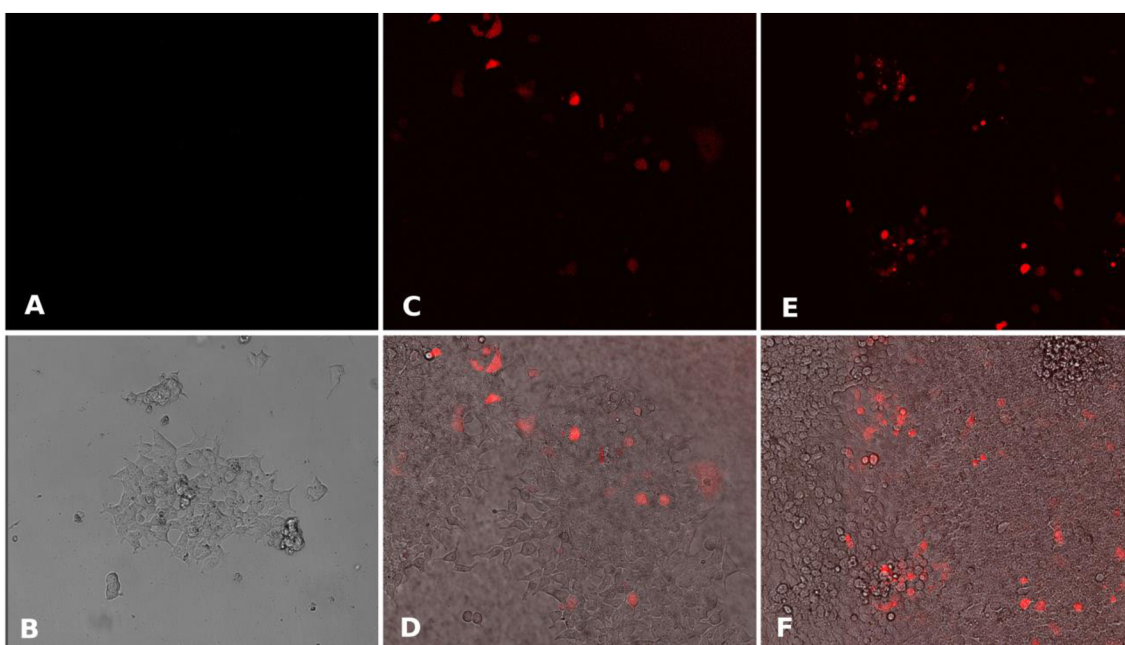
3.2.2. K_{ir} 2.1

Dalším úspěšně izolovaným membránovým konstruktem byl plasmid draslíkového kanálu K_{ir} 2.1, který obsahoval fluorescenční protein mCherry. Excitační maximum proteinu mCherry se nachází na vlnové délce 587 nm. Výťažnost plasmidu K_{ir} 2.1 nebyla tak vysoká jako u kanálu Channelrhodopsin-2. Také fluorescence byla oproti CHR2 nižší. Maximální dosažená fluorescence byla detekována 72 hodin po transfekci u všech vzorků plasmidu K_{ir} 2.1. Největší množství exprimovaného plasmidu byla zaznamenáno u vzorku č. 6 (Obrázek 17) jehož koncentrace DNA byla z izolovaných plasmidů K_{ir} 2.1 nejvyšší. Vliv na transfekci mělo množství i konfluence buněk, do nichž byly plasmidy transfekovány.



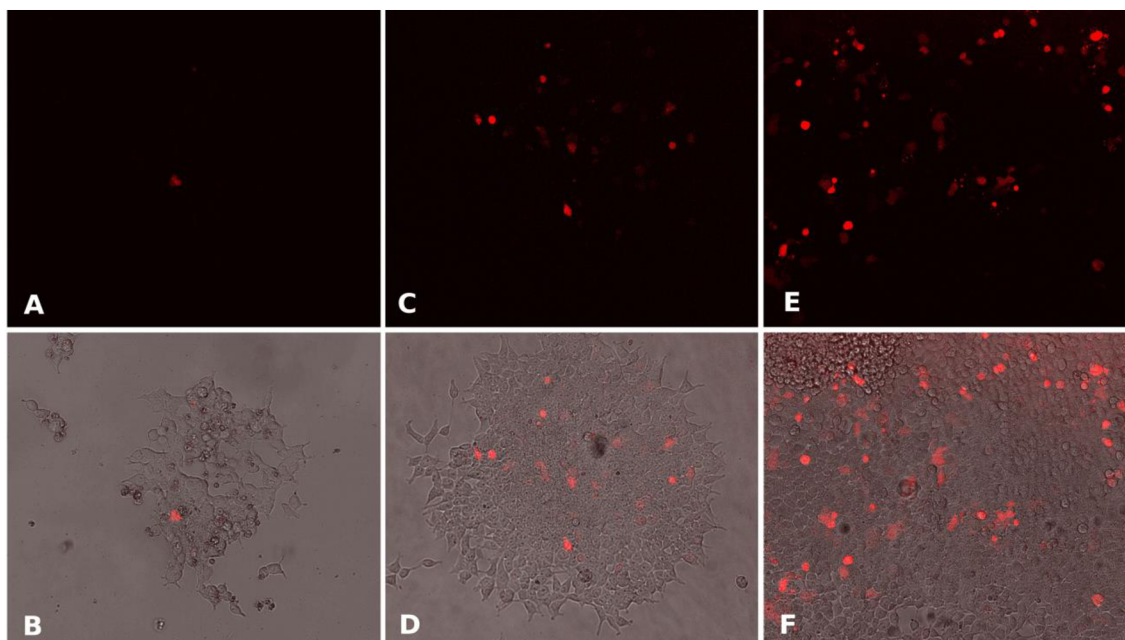
Obrázek 15: Vzorek č. 4, K_{ir} 2.1 – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Na Obrázek 15 A je vidět výraznější fluorescence pouze jedné buňky 24 hodin po transfekci. Po 72 hodinách byla DNA exprimována ve zhruba 20 % buněk.



Obrázek 16: Vzorek č. 5, K_{ir} 2.1 – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Vzorek č. 5 vykazoval fluorescenci až po 48 hodinách od transfekce (Obrázek 16 C), důvodem byla patrně nízká koncentrace plasmidové DNA, což vyplývá i z výsledků elektroforetické analýzy (Obrázek 9) a také malé množství buněk v linii. Nárůst buněčné linie i transfekovaných buněk byl zaznamenán až po 72 hodinách (Obrázek 16 F)



Obrázek 17: Vzorek č. 6, $K_{ir} 2.1$ – A) fluorescence po 24 hodinách; B) transmisní a fluorescenční kanál po 24 hodinách; C) fluorescence po 48 hodinách; D) transmisní a fluorescenční kanál po 48 hodinách; E) fluorescence po 72 hodinách; F) transmisní a fluorescenční kanál po 72 hodinách

Nejvyšší fluorescenci u buněk s exprimovanou DNA plasmidu $K_{ir} 2.1$ bylo možné detekovat u vzorku č. 6. U vzorku č. 6 exprimovalo cca 40 % buněk vloženou DNA.

3.2.3. ASAP1

Přestože z elektroforetické analýzy vyplývá, že se nepodařilo vyizolovat plasmidovou DNA membránového konstruktu ASAP1, byla pro ověření provedena transfekce jeho vzorků do buněčné linie HEK293. Dle očekávání nebyla u buněk zaznamenána žádná fluorescence, tudíž nedošlo k žádné expresi DNA plasmidu ASAP1.

Závěr

Cílem této práce byla izolace plasmidů Channelrhodopsin-2, K_{ir} 2.1 a ASAP1 pro jejich využití jako membránových konstruktů a jejich transfekce do buněčné linie HEK293. Na toto téma byla provedena literární rešerše, ve které byly shrnuty základní metody izolace DNA, přičemž metodě fenol-chloroformové extrakce byla věnována větší pozornost, neboť byla použita v experimentální části práce.

Celkem bylo provedeno 22 izolačních experimentů. Za poměrně úspěšné izolace lze považovat izolaci plasmidů CHR2 a K_{ir} 2.1. Při izolaci těchto plasmidů bylo dosaženo úspěšnosti 66%. Správnost izolace byla nejprve ověřena elektroforetickou analýzou a následně chemickou transfekcí do buněčné linie HEK293. Pro účely ověření funkčnosti plasmidů byla zvolena transientní transfekce izolované DNA pomocí transfekčního reagentu PEI. Fluorescenční snímky jednotlivých vzorků byly snímány na konfokálním mikroskopu v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin od transfekce. Největší svítivost vykazovaly buňky po 72 hodinách, což splňuje teoretické předpoklady. Množství buněk exprimujících DNA se lišilo nejen v závislosti na čase, ale také na koncentraci a kvalitě izolované plasmidové DNA.

Ačkoli byl, z důvodů neúspěšných pokusů, během jednotlivých experimentů protokol izolace v některých krocích optimalizován, nepodařilo se izolovat plasmid ASAP1. Vzhledem k funkčnosti protokolu při izolaci plasmidů CHR2 a K_{ir} 2.1 je pravděpodobné, že důvodem neúspěšné izolace plasmidu ASAP1 bylo opakovaně nesprávné provedení transformace do kompetentních bakterií DH5 α . V další práci by proto bylo vhodné se zaměřit na krok transformace plasmidové DNA ASAP1 do bakteriálních buněk.

Aby bylo možné používat izolovanou pDNA v praxi bylo by vhodné také změřit její koncentraci a čistotu, což se z časových důvodů provedení izolací nepodařilo, neboť se daný přístroj nenachází v prostorách laboratoře UBMI. Kvalitu fenol-chloroformové extrakce by bylo vhodné porovnat například s výsledky izolací pomocí komerčních kitů, či izolací s využitím magnetických nanočástic. Získané plasmidy je možné využít při studiu optické aktivace buněk, indikace depolarizace či kontrole klidového membránového potenciálu buněk.

Seznam použité literatury

- [1] MIESCHER, Friedrich. *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten*. B.m.: F.C.W. Vogel, 1897. ISBN 978-3226030402.
- [2] KIRBY, K S. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids; evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *The Biochemical journal*. 1957, roč. 66, č. 3, s. 495–504. ISSN 0264-6021.
- [3] VONDREJS, Vladimír a Zuzana STORCHOVÁ. *Genové inženýrství*. Praha: Karolinum - Nakladatelství Univerzity Karlovy, 1997. ISBN 382-110-97.
- [4] DAHM, Ralf. *Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research* [online]. 2008. ISBN 0043900704. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-007-0433-0
- [5] GUERRY, Patricia, D. J. LEBLANC a Stanley FALKOW. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*. 1973, roč. 116, č. 2, s. 1064–1066. ISSN 00219193.
- [6] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie* [online]. B.m.: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 9788070805862. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=ec6QAAAACAAJ>
- [7] VINOGRAD, J a J LEBOWITZ. Physical and topological properties of circular DNA. *The Journal of general physiology* [online]. 1966, roč. 49, č. 6, s. 103–125. ISSN 0022-1295. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.49.6.103
- [8] RUMLOVÁ, Michaela, Václav PAČES a Tomáš RUML. *Základní metody genového inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická: JPM Tisko, 2003. ISBN 80-86313-12-3.
- [9] VANDEVENTER, Peter E., Jorge MEJIA, Ali NADIM, Malkiat S. JOHAL a Angelika NIEMZ. DNA adsorption to and elution from silica surfaces: Influence of amino acid buffers. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2013, roč. 117, č. 37, s. 10742–10749. ISSN 15206106. Dostupné z: doi:10.1021/jp405753m
- [10] SAIYED, Z M, C N RAMCHAND a S D TELANG. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* [online]. 2008, roč. 20, č. 20, s. 204153. ISSN 0953-8984. Dostupné z: doi:10.1088/0953-8984/20/20/204153
- [11] CHEN, Xu Wei, Quan Xing MAO, Jia Wei LIU a Jian Hua WANG. Isolation/separation of plasmid DNA using hemoglobin modified magnetic nanocomposites as solid-phase adsorbent. *Talanta* [online]. 2012, roč. 100, s. 107–112. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.07.095

- [12] BÁRTOVÁ, Eva. *Návody k praktickým cvičením z biologie*. 1. vyd. Brno: VFU Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-111-2.
- [13] NAVRÁTIL, Milan, Lenka UVÍROVÁ, Petr NÁDVORNÍK, Marie KUBALÁKOVÁ a Jana KLUKÁČKOVÁ. *Základní praktická cvičení z molekulární biologie* [online]. 2004. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=224&t=0>
- [14] LI, Xiaofei, Yuhua WU, Li ZHANG, Yinglong CAO, Yunjing LI, Jun LI, Li ZHU a Gang WU. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry* [online]. 2014, roč. 451, č. 1, s. 18–24. ISSN 10960309. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.01.016
- [15] SAMBROOK, Joseph, Edward F FRITSCH a Thomas MANIATIS. *Molecular cloning: a laboratory manual* [online]. 1989. ISBN 0-87969-309-6. Dostupné z: doi:Cited By (since 1996) 128440rExport Date 23 May 2012
- [16] ESCHERICH, Theodor. *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*. B.m.: Stuttgart: F. Enke, 1886.
- [17] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
- [18] CASALI, Nicola a Andrew PRESTON. E. coli plasmid vectors: Methods and applications. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2003, roč. 235. Dostupné z: doi:10.1385/1592594093
- [19] BARTOŠ, Milan. *Genové inženýrství ve farmaceutické biotechnologii* [online]. 2014. Dostupné z: <http://www.farmaceuticka-biotechnologie.cz/>
- [20] BLATTNER, F, G PLUNKETT, C BLOCH, N PERNA, V BURLAND, M RILEY, J COLLADO-VIDES, J GLASNER, C RODE, G MAYHEW, J GREGOR, N DAVIS, H KIRKPATRICK, M GOEDEN, D ROSE, B MAU a Y SHAO. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* [online]. 1997, roč. 277, č. 5331, s. 1453–1474. ISSN 0036-8075 (Print). Dostupné z: doi:10.1126/science.277.5331.1453
- [21] TAYLOR, R.G. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*. 1993, roč. 21, č. 7.
- [22] NAGEL, Georg, Tanjef SZELLAS, Wolfram HUHNS, Suneel KATERIYA, Nona ADEISHVILI, Peter BERTHOLD, Doris OLLIG, Peter HEGEMANN a Ernst BAMBERG. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2003, roč. 100, č. 24, s. 13940–13945. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1936192100
- [23] ST-PIERRE, François, Jesse MARSHALL, Ying YANG, Yiyang GONG, Mark SCHNITZER a Michael LIN. High-fidelity optical reporting of neuronal

- electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature neuroscience* [online]. 2014, roč. 17, č. 6, s. 884–9. ISSN 1546-1726. Dostupné z: doi:10.1038/nn.3709
- [24] MINOR, D L, S J MASSELING, Y N JAN a L Y JAN. Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell* [online]. 1999, roč. 96, č. 6, s. 879–891. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80597-8
- [25] STOCKKLAUSNER, Clemens a Nikolaj KLÖCKER. Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, roč. 278, č. 19, s. 17000–17005. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M212243200
- [26] KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, roč. 397, č. 8, s. 3173–3178. ISSN 16182642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3821-6
- [27] HAYCOCK, John W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In: *3D Cell Culture* [online]. 2011, s. 1–15 LA – en. ISBN 978-1-60761-983-3, 978-1-60761-984-0 ST - 3D Cell Culture. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-984-0
- [28] GRAHAM, F L, J SMILEY, W C RUSSELL a R NAIRN. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* [online]. 1977, roč. 36, č. 1, s. 59–74. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- [29] SHAW, Gerry, Silas MORSE, Miguel ARARAT a Frank L. GRAHAM. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 2002, roč. 16, č. 8, s. 869–871. ISSN 15306860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0995fje
- [30] DEVITT, Terry. In the lab, scientists coax E. coli to resist radiation damage. *University of Wisconsin-Madison* [online]. 2014. Dostupné z: <http://www.news.wisc.edu/22641>

Seznam zkratk

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

pDNA – Plasmidová deoxyribonukleová kyselina

RNA – Ribonukleová kyselina

Pb – Páry bází

PCR – Polymerázová řetězová reakce

LCR – Ligázová řetězová reakce

3SR amplifikační reakce - Self-Sustained Sequence Replication

CH2 – Channelrhodopsin-2

ASAP1 – Accelerated Sensor of Action Potentials

K_{ir} 2.1 – Inwardly-Rectifying Potassium Channels

HEK293 – Human Embryonic Kidney

SDS – Dodecylsulfát sodný

UV – Ultrafialové záření

PEI – Polyethylenimin

Seznam příloh

Příloha A – Isolační a transfekční protokoly	46
--	----

Příloha A

Isolační a transfekční protokoly

1. Chemically competent cells

1.1. Materials

- Detergent-free, sterile glassware and plasticware (see procedure)
- Table-top OD600nm spectrophotometer
- SOB

CCMB80 buffer

- 10 mM KOAc pH 7.0 (10 ml of a 1M stock/L)
- 80 mM CaCl₂·2H₂O (11.8 g/L)
- 20 mM MnCl₂·4H₂O (4.0 g/L)
- 10 mM MgCl₂·6H₂O (2.0 g/L)
- 10% glycerol (100 ml/L)
- adjust pH DOWN to 6.4 with 0.1N HCl if necessary
- adjusting pH up will precipitate manganese dioxide from Mn containing solutions.
- sterile filter and store at 4°C
- slight dark precipitate appears not to affect its function

1.2. Procedure

Preparing competent cells

- Inoculate 250 ml of SOB medium with 1 ml vial of seed stock and grow at 37°C to an OD600nm of 0.5
 - This takes approximately 16 hours.
 - Controlling the temperature makes this a more reproducible process, but is not essential.
 - Room temperature will work. You can adjust this temperature somewhat to fit your schedule
 - Aim for lower, not higher OD if you can't hit this mark
- Centrifuge at 5000rpm at 4°C for 10 minutes in a flat bottom centrifuge bottle.

- Flat bottom centrifuge tubes make the fragile cells much easier to resuspend
 - It is often easier to resuspend pellets by mixing *before* adding large amounts of buffer
- Discard supernatant by pouring out slowly and pipeting remains
- Gently resuspend in 80 ml of ice cold CCMB80 buffer
 - sometimes this is less than completely gentle. It still works.
- Incubate on ice 20 minutes
- Centrifuge again at 4°C and discard supernatant as described above.
- Resuspend in 10 ml of ice cold CCMB80 buffer.
- Test OD of a mixture of 200 µl SOC and 50 µl of the resuspended cells.
- Add chilled CCMB80 to yield a final OD of 1.0-1.5 in this test.
- Aliquot to chilled screw top 2 ml vials or 50 µl into chilled microtiter plates
- Store at -80°C indefinitely.
 - Flash freezing does not appear to be necessary
- Test competence (see below)
- Thawing and refreezing partially used cell aliquots dramatically reduces transformation efficiency by about 3x the first time, and about 6x total after several freeze/thaw cycles.

2. Transformation

2.1. Procedure

- Mix 50 to 100 μl of cells with plasmid DNA
- Ice 10 - 20 min
- Heat shock 42 °C 1 min
- Add 1 ml of LB or SOB or SOC media and transfer bacterial suspension into bacteriological tube.
- Shake 20 – 60 min at 37 °C
- Plate 20 to 200 μl of suspension on plates with selective agar.

3. Isolation

- Incubate E.coli at 37 °C with good shaking in 100 ml medium with antibiotics for 12 h or O/N.
- Centrifuge bacteria 5 min 4.000 rpm
- Resuspend the pellet in 4 ml of GET by vigorous vortexing
- Add 8 ml of alkaline-SDS and mix by gentle shaking until solution get clear (no more than 3 min)
- Add 6 ml of KAc solution and shake
- Incubate on ice – 10 min
- Centrifuge 10 min at maximal speed (4 °C)
- Transfer supernatant into a new tube
- Add 16 ml of isopropanol
- Incubate at RT – 15 min
- Centrifuge 10 min at maximal speed (RT)
- Wash the pellet with 1ml 70% ethanol. Air dry for 2-5 minutes on bench.
- Resuspend in 800 µl TE buffer and transfer into 2 ml tube (20 min 65 °C)
- Add 0,5 µl RNaseA [20 mg/ml] and incubate at 37°C for 30 minutes.
- Add 300 µl phenol:chloroform:isoamyl alcohol.
- Add 200 µl 1 M Tris (base)
- Add 100 µl 3 M NaAc
- Vortex until thoroughly mixed. Centrifuge at top speed of microfuge for 3 minutes. Pipette aqueous phase (the top one) into new 2 ml tube.
- Repeat phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction
- Extract phenol with 500 µl chloroform : isoamyl alcohol. Vortex and spin 3 min at max speed. Repeat extraction until the interphase is transparent and without any contaminants (2 – 4 x).
- Precipitate with 1000 µl of isopropanol (30 min at RT)
 - Note: If the volume of DNA is bigger use at least equal volume of IP
- Centrifuge 10 min at maximal speed (RT)
- Remove supernatant
- Wash the pellet with 700 µl of EtOH [70 %]
- Air dry the pellet
- Dissolve in TE (~ 400 - 1000 µl)

4. PEI Transfection – CEITEC Brno:

Polyethyleneimine – Mw = 40,000 (Hypoacetylated – Polyscience # 24765)

PEI : DNA ratio: **4 : 1** or **3 :1** or **5 :1**

Prepare PEI solution: (Sterile filtered, 0,22 µm filter)

Stock solution: **10 mg / ml** in water

Working solution: **1 mg / ml** in water

Cell culture: Replace growth media with fresh medium (including serum):

4.1. Prepare transfection mix:

Resuspend plasmid DNA in 150 mM NaCl

Add PEI [1 mg/ml] (**Ratio 1 : 4**)

Mix and incubate at RT for 10 min

	<u>DNA</u>	<u>150 mM NaCl</u>	<u>PEI [1 mg/ml]</u>	<u>Growth medium</u>
T75	56,3 µg	900 µl	90 µl	10 ml
T25	18,8 µg	300 µl	30 µl	4 ml
6wp	6,8 µg	110 µl	11 µl	2,5 ml
12wp	3 µg	50 µl	5 µl	0,7 ml
24wp	1,3 µg	20 µl	2 µl	0,4 ml
9,2 mm2	1,57 µg	110 µl	8 µl	1,94 ml

CEITEC

The DNA concentration seems to be different if measured in CMRB and CEITEC nanodrop.

The DNA amounts used for transfection in CEITEC should be **2,5 x** more compared to DNA amount used in CMRB. The amount of PEI and NaCl remains the same

For small volumes (minipreps) (screen in 24wp)

Mix 1: Plasmid miniprep	3 µl
150 mM NaCl	25 µl
Mix 2: PEI [1 mg/ml]	3 µl
150 mM NaCl	25 µl

Note: **Several cell densities should be tested.**