Jméno: Datum:

PROTOKOL TRANSFEKCE

A. TRANSFEKCE POMOCÍ PEI, LIPOFECTAMINU a FUGENE

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

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

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

SS plazmidu pmax GFP (amaxa): 1,85 ug/ul

Spočítej kolik ul plazmidu bylo přidáno do reakce:

 B. NUKLEOFEKCE POMOCÍ PŘÍSTROJE NEON

**Postup den předem**: Uvolníme buňky pomocí TRYPSIN/EDTA (viz níže). Buňky spočítáme a opláchneme v PBS. 1x107 buněk resuspendujeme v „Resuspension buffer R“. Před vlastní elektroporací si připravíme misku s růstovým médiem bez antibiotik, do které elektroporované buňky finálně přeneseme. Naplníme elektroporační trubici 3ml „Electrolytic buffer E“. Nastavíme vhodnou kombinaci pro eletroporaci (1150 V/
20 ms/1pulz). Přeneseme 2,5 ul DNA do sterilní zkumavky a přidáme k ní buněčnou suspenzi (1 ml) a jemně zamícháme. Nasajeme suspenzi buněk a DNA do elektroporační jehly. Vložíme elektroporační pipetu do elektroporátoru a necháme proběhnout elektroporaci. Následně buňky „vypustíme“ do předehřátého media bez antibiotik. Kultivace 24 hodin v 37°C/5% CO2 v inkubátoru.

**Postup aktuálně**:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **PEI** | **LIPOFECTAMIN** | **FUGENE** | **NEON** |
|  |  |  |  |

2. Uvolnění buněk pomocí TRYPSIN/EDTA: Do připravené zkumavky přenes 750 ul media z kultury. Zbytek přenes do odpadu. Opláchni misku 2 ml PBS, přidej 250 ul TRYPSIN/
EDTA, inkubuj 3-5´ v 37 °C, přenes uvolněné buňky do zkumavky s mediem. U vybraných variant (po vyzvání) rozděl vzniklý 1 ml suspenze do dvou zkumavek (po 0,5 ml). Z

3. Detekce mrtvých buněk pomocí Live/dead Far Red probe (Molecular probes L10120):

Princip: Jen mrtvé buňky mají porušenou semipermeabilitu cytoplazmatické membrány, a proto se nabarví.

Přidej do 0,5 ml buněčné suspence 0,5 ul próby. Inkubuj 10 minut na ledě.

Minulá skupina: Detekce buněk s porušeným mitochondriálním membránovým potenciálem (apoptóza): Přidej 10 ul roztoku TMRE (Tetramethylrhodamin, SS 10 uM) do 500 ul suspenze buněk. Inkubuj 10 min/37°C/tma. Centrifuguj 200g/4 min, resuspenduj v 200 ul PBS.

4. Spočítej pracovní koncentraci TMRE:

5. Pomocí průtokového cytometru Accuri C6 urči procento GFP pozitivních buněk tvého vzorku.

6. Z výsledků ostatních doplň tabulku a urči pořadí efektivity transfekce:

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

**KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA SP8**

DEMONSTRACE VÝSLEDKŮ IMUNOCYTOCHEMICKÉHO BARVENÍ:

Buňky HEK293 byly vysety na sklíčka pokrytá želatinou. Byla provedena transfekce (PEI)
plazmidem exprimujícím ROR1 fúzovaný ze značkou V5 (M) a plazmidem exprimujícím APP či APLP2 fúzovaným se značkou YFP (R) nebo MYC (R), respektive.

Po 24 hodinách inkubace byla provedena 15 minutová fixace v 4% paraformaldehydu, opláchnutí v PBS, blokováni nespecifických vazeb hodinu v PBTA. Potom byly přidány primární protilátky (1:500) - V5, YFP nebo MYC a jejich kombinace, následovala inkubace v 4°C přes noc.

Druhý den byly buňky opláchnuty v PBS 3 x 10 minut, potom byly přidány na 2 hodiny sekundární protilátky v PBTA (1:1000) – antiR-Alexa 488 (APP,APLP2) a antiM-Alexa 568 (ROR1). Oplach PBS 3x10 minut, Dobarvení jader 15 minut inkubace s DRAQ5, oplach PBS 3x10minut. Montování krycích skel na podložní skla pomocí glycerol-želatiny.

Popiš optimalizaci výstupu:

Závěr: