

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	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. 1×10^7 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 elektroporaci (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 suspenze 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, blokování 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: