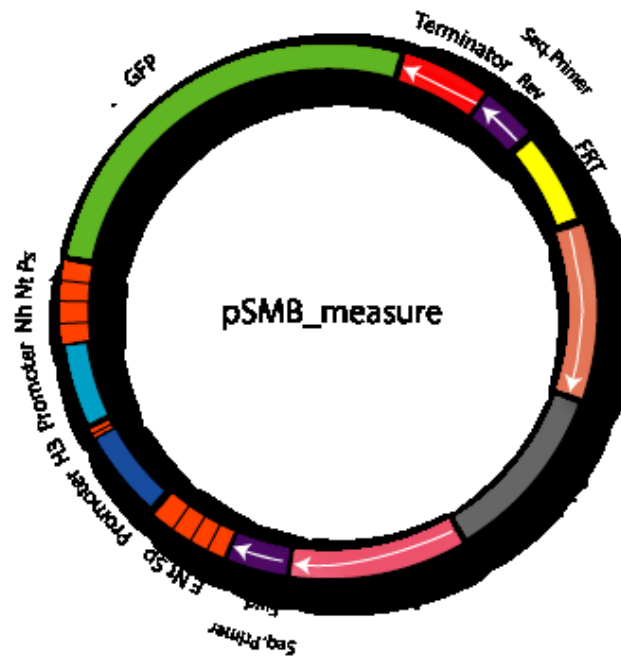
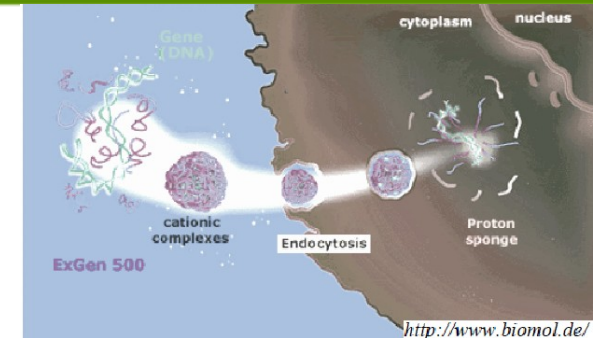


## TRANSFEKCE KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.  
Oddělení fyziologie a imunologie živočichů  
[jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)

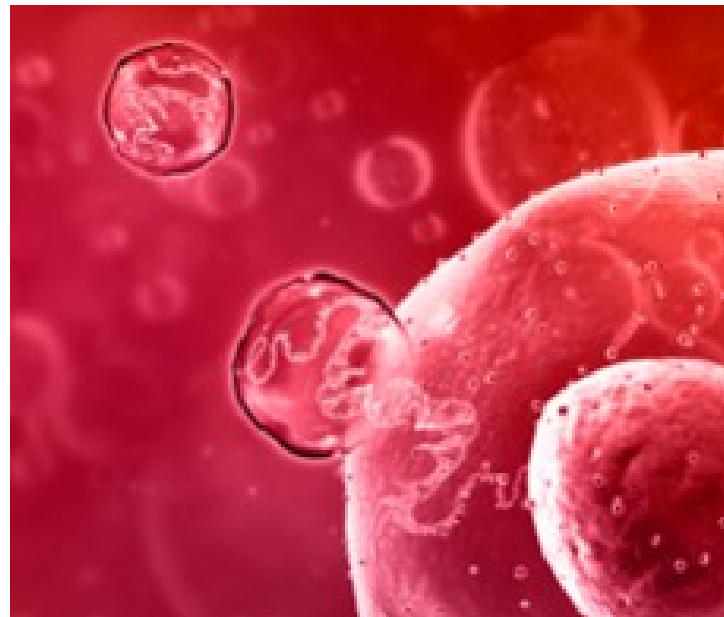
## TRANSFEKCE

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



# TRANSFEKTANTI

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



## DŮLEŽITÉ PARAMETRY

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

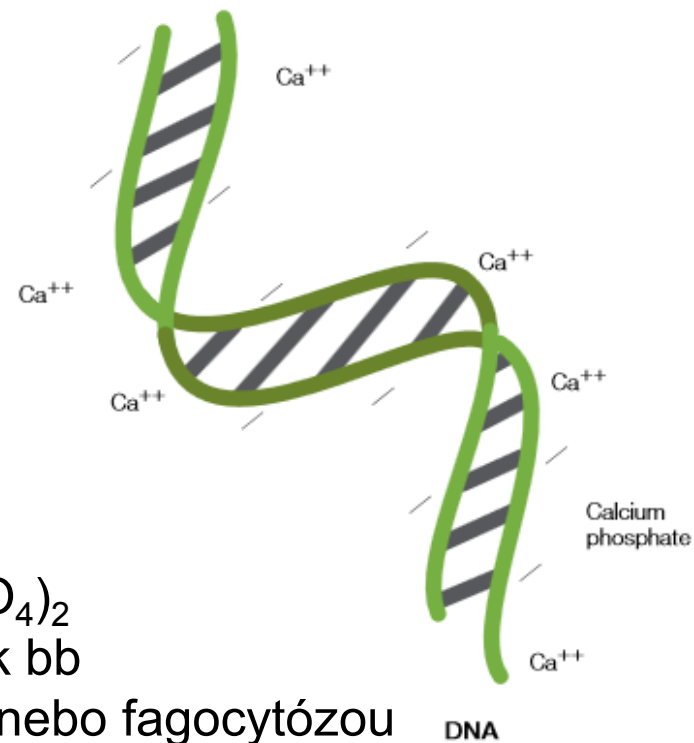
## NEJČASTĚJŠÍ METODY TRANSFEKCE

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

*Krevní buňky je možné transfekovat jen elektroporací*

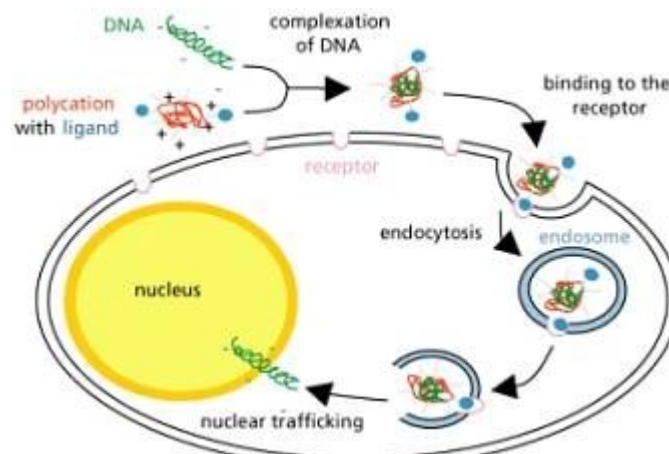
# VÁPENATÉ IONTY

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



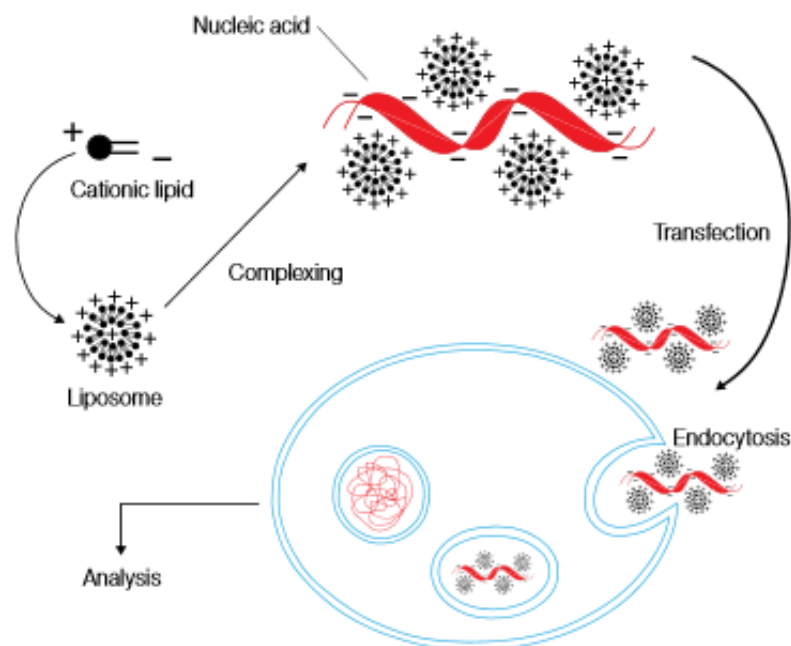
## PEI

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



# LIPOFEKCE

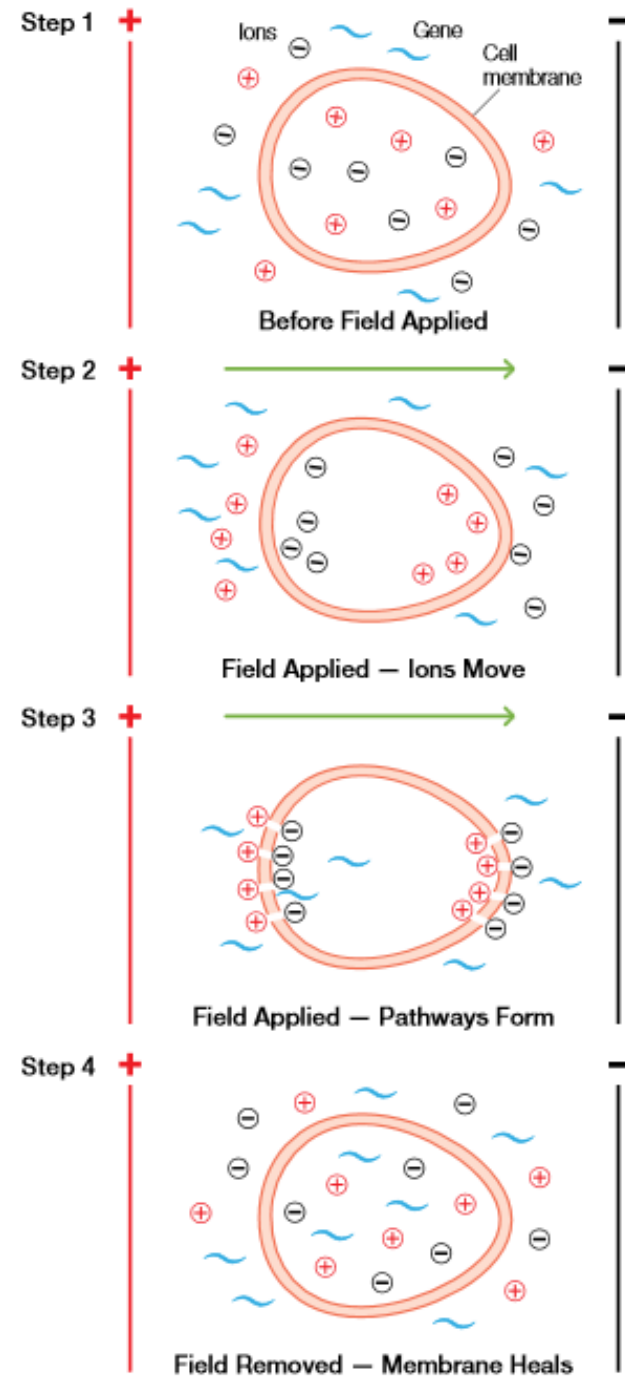
- ▶ Kationické lipidy – liposomy/lipoplexy (Lipofectamin)
- ▶ Jsou to amfifilické molekuly s kladně nabitou polární částí, která je spojena s nepolární hydrofobickou doménou
- ▶ Elektrostatické interakce mezi kladnou částí a negativně nabitou DNA vede k tvorbě komplexů pohlcených endocytózou





## ELEKTROPORACE

- Vystavení buněk elektrickému poli vede ke zvýšení permeabilizace membrány
- Směs buněk a plazmidu v pufru se v kyvetě vloží do elektroporátoru
- Podmínky
  - proud kV/cm
  - délka pulsu  $\mu\text{s}$ -ms



## ELEKTROPORACE - NUKLEOFEKCE

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



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

## MÉNĚ ČASTÉ METODY

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

## PLUSY A MÍNUSY

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

Rozhodující je poměr efektivita : cena

# MOŽNOSTI VYUŽITÍ TRANSFEKCE

## Transfekcí je možné ovlivnit

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

## Transfekcí můžeme vnést do buněk také

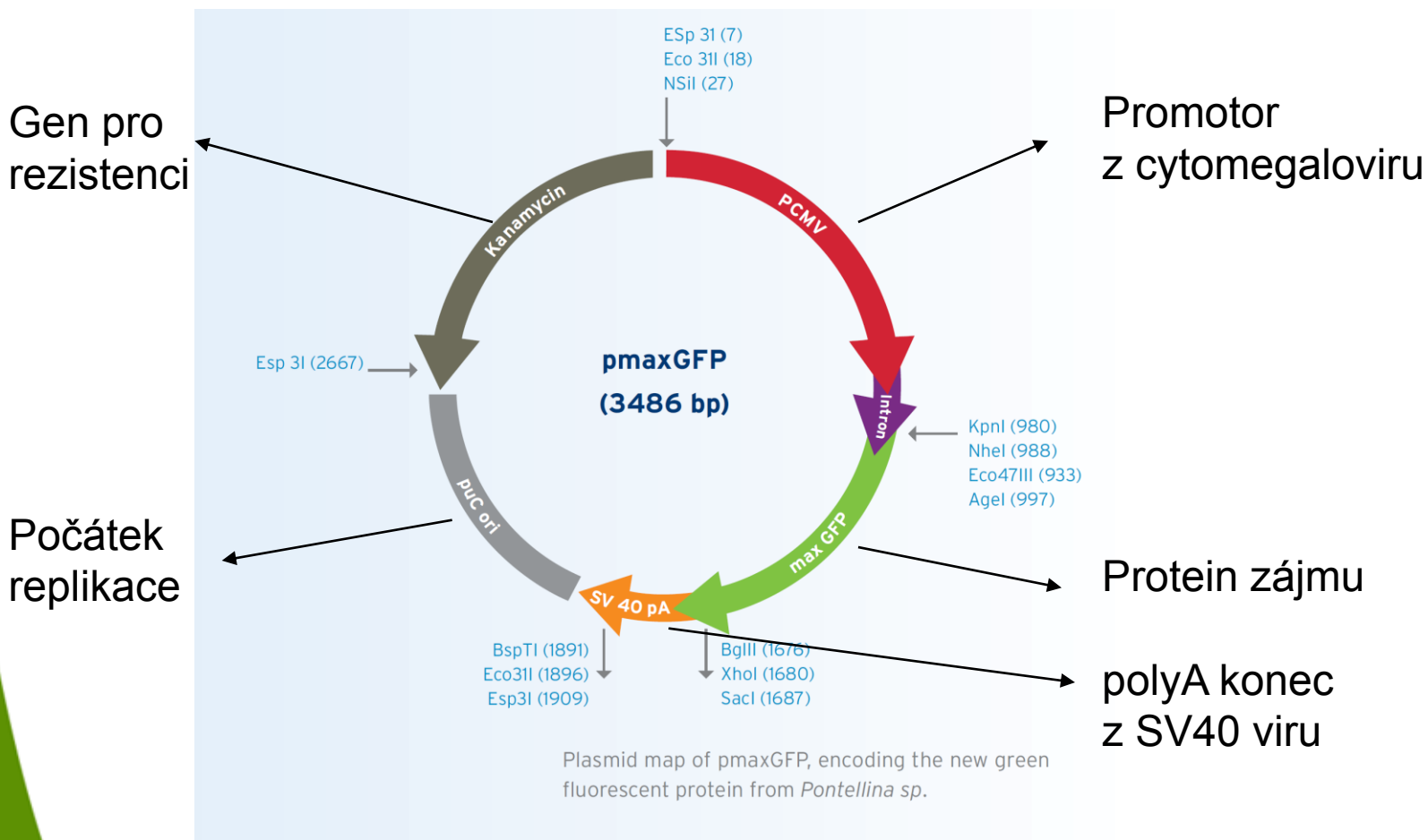
- Reportérový plazmid ( $\beta$ GAL, LUC, CAT...)
- Expresní plazmid (konjugát proteinu a fluorescenčního proteinu – GFP, YFP, mCherry...)
- SiRNA (cílený knock-out genů)

## Experiment

- Transfekce buněk různými transfekčními činidly:
  - PEI
  - Lipofectamin
  - Fugene
  - Nukleofekce Neonem
  - Negativní kontrola
  
- Vektor: konstrukt s GFP (koncentrace)
  
- Hodnocení účinnosti
  - Odhad pomocí fluorescenčního mikroskopu
  - Kvantifikace pomocí průtokového cytometru

# Vektor pMaxGFP (AMAXA)

- GFP izolovaný z planktonového koryše *Pontellina Plumata*

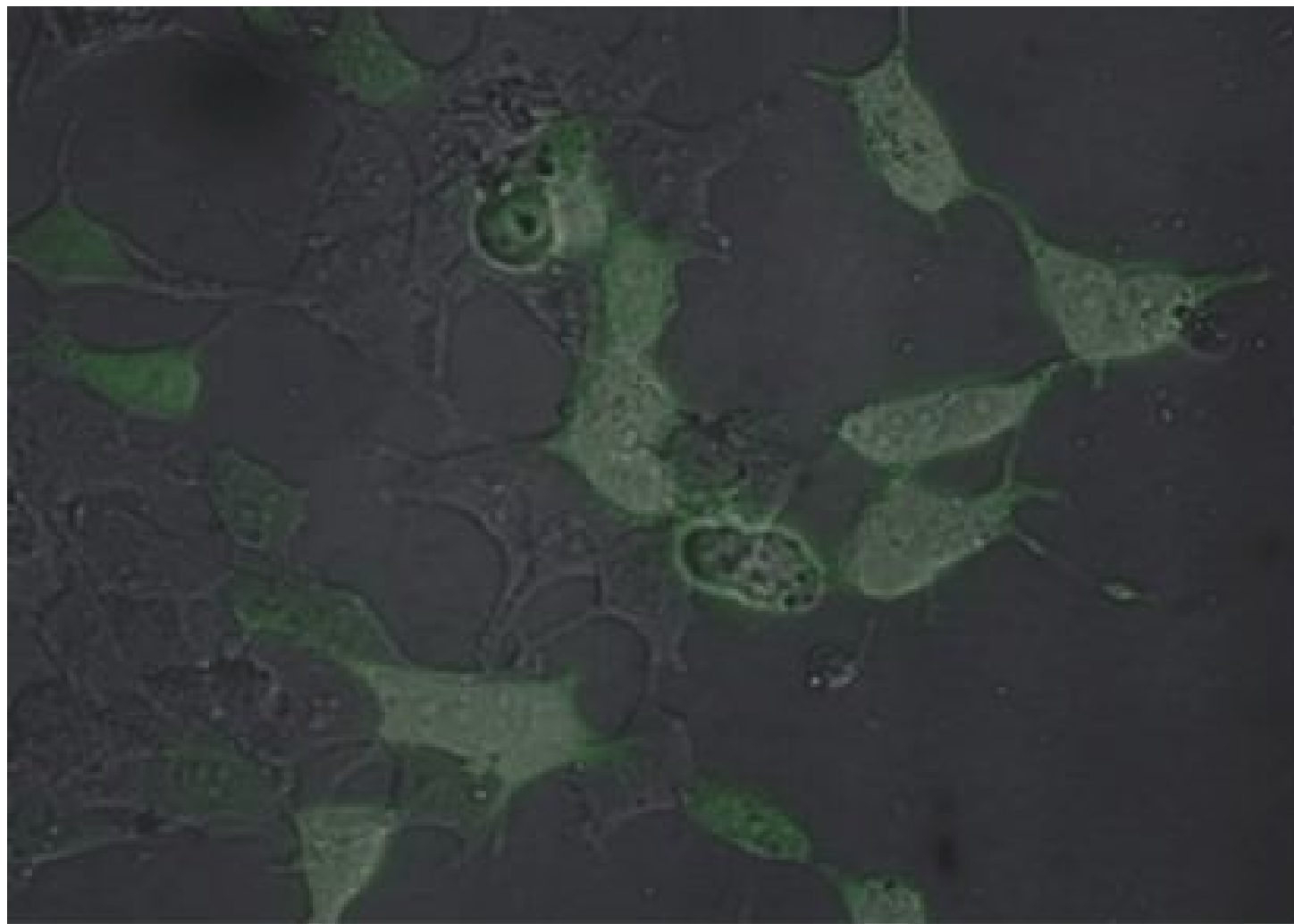


## Postup experimentu

- Transfekce provedena 24 předem
- Odhad účinnosti transfekce pomocí fluorescenčního mikroskopu
- Uvolnění bb z povrchu misek – trypsin/EDTA 5 min/37 C
- Polovina vzorku nabarvena live/dead probe (umírající b.)
- Suspenze buněk hodnocena kvantitativně pomocí průtokového cytometru Accuri, kanál FL1
- Srovnání výsledků

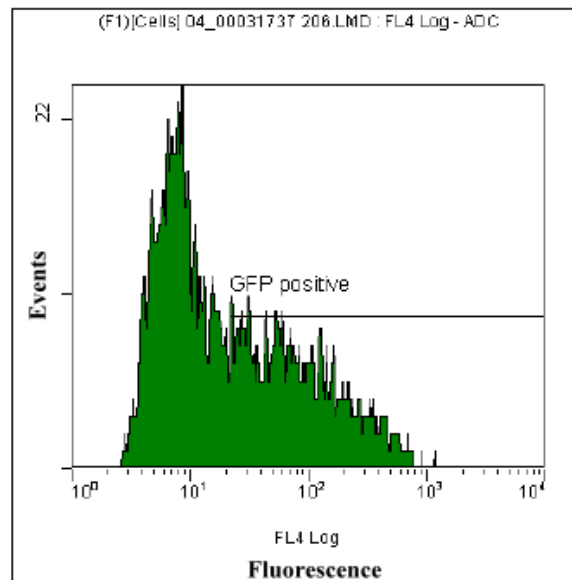


## ODHAD ÚČINNOSTI TRANSFEKCE GFP



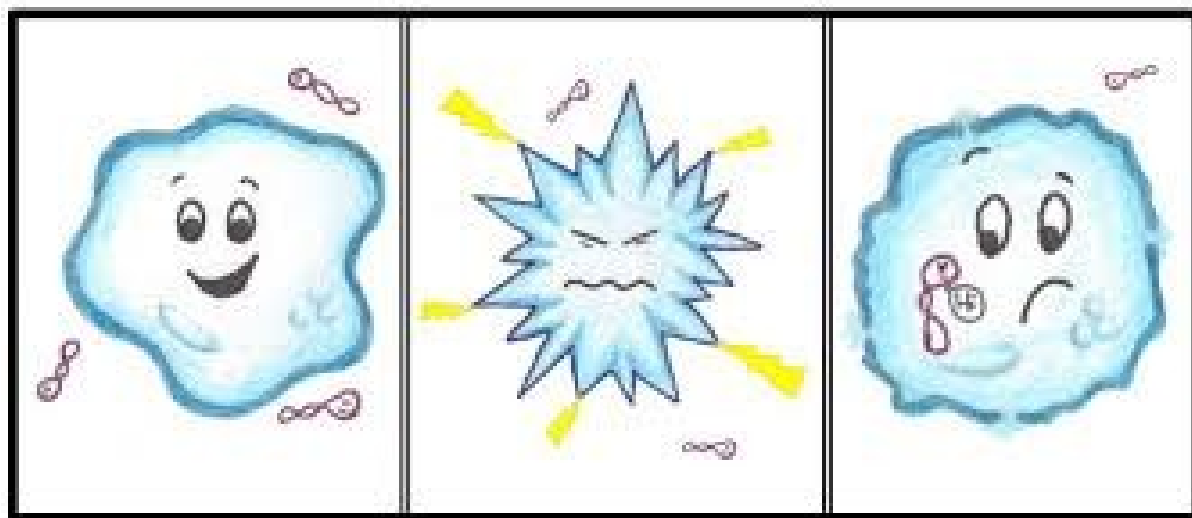
# KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ ÚČINNOSTI

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



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

## SHRNUTÍ



# KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny

## Widefield Versus Point Scanning of Specimens

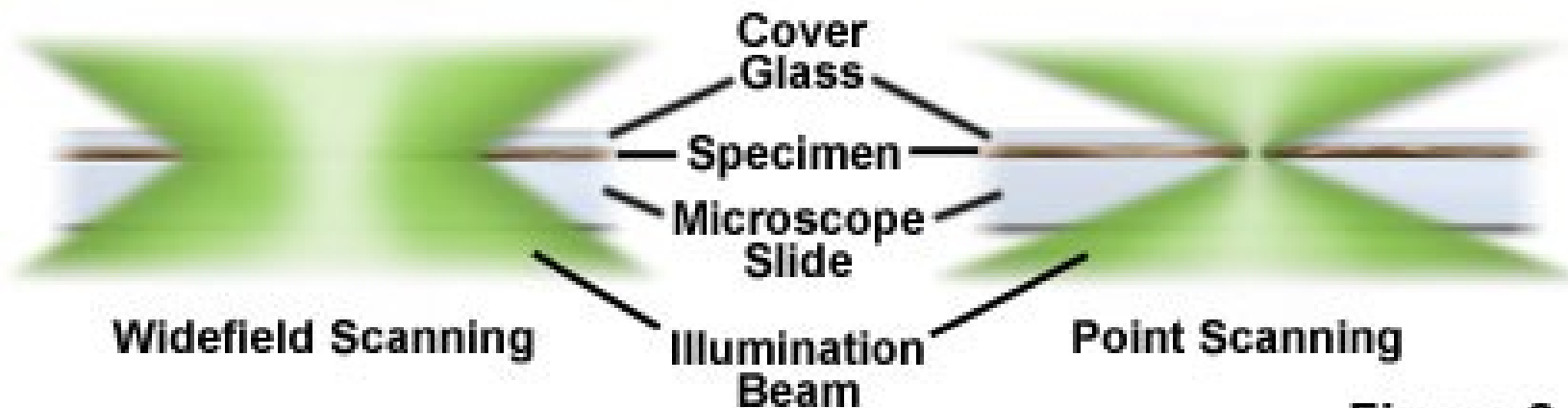
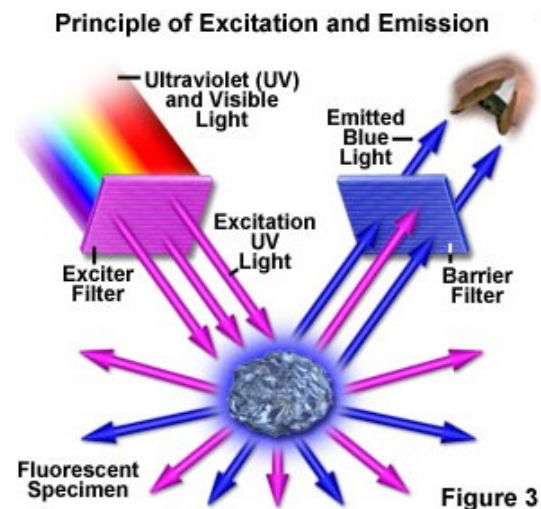
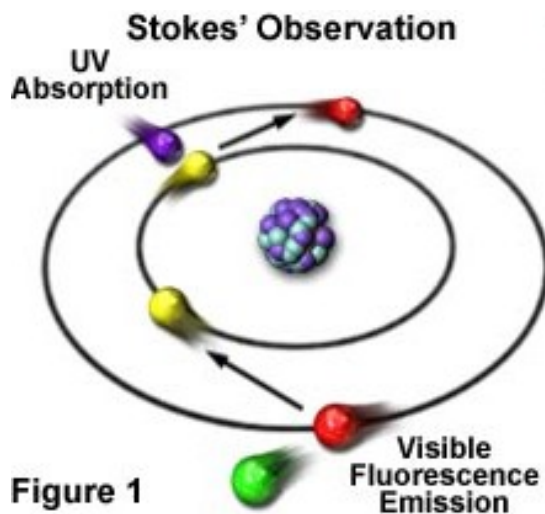


Figure 2

# Princip fluorescence

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



# Skenovací (rastrovací) konfokální mikroskop

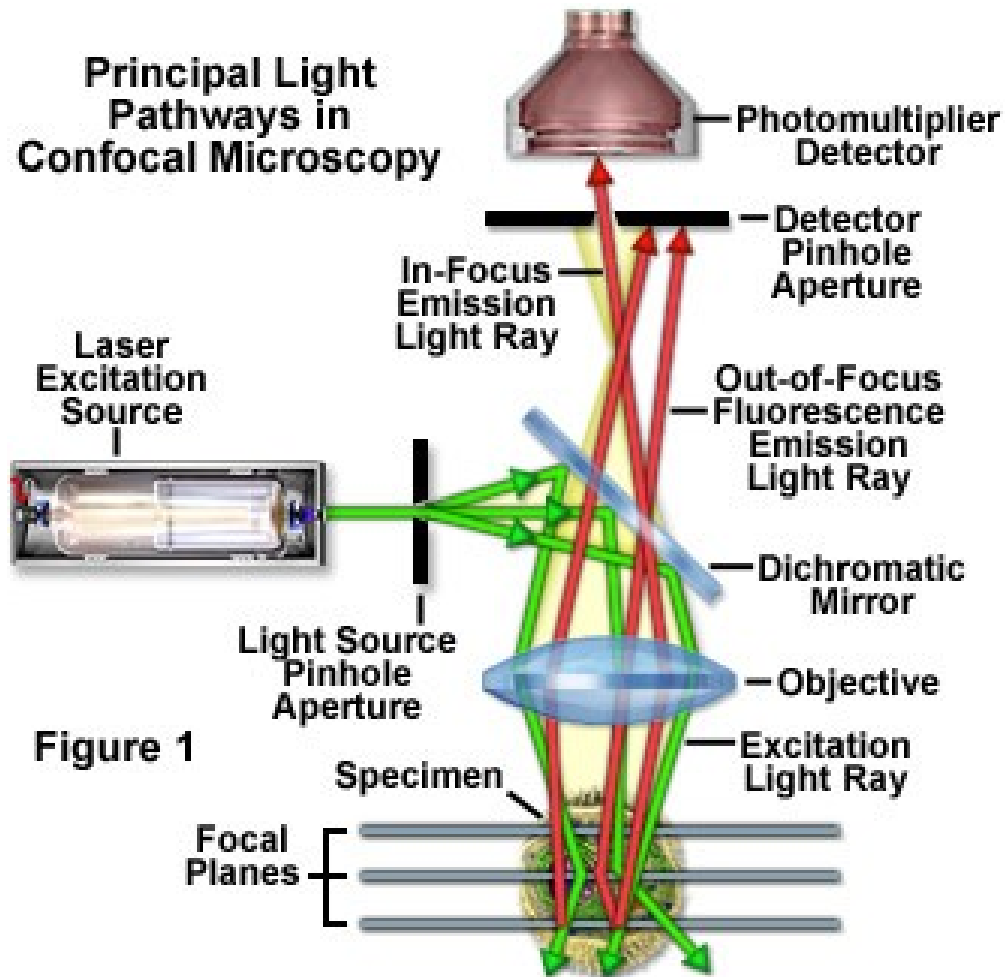
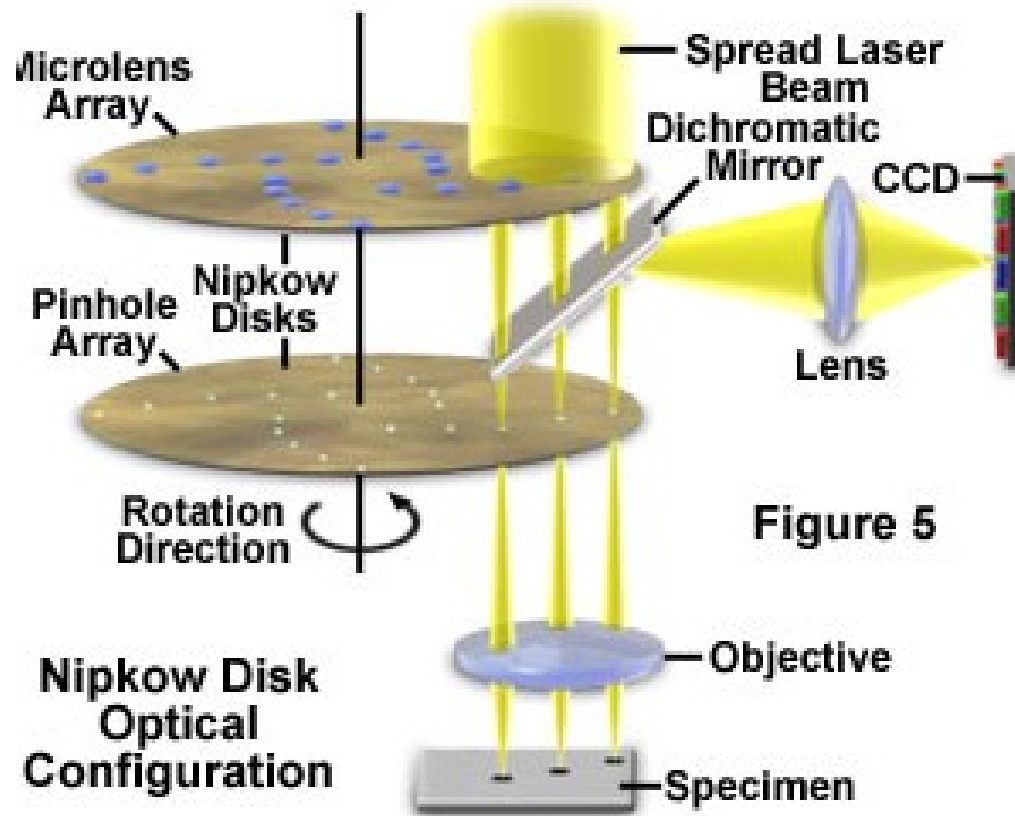
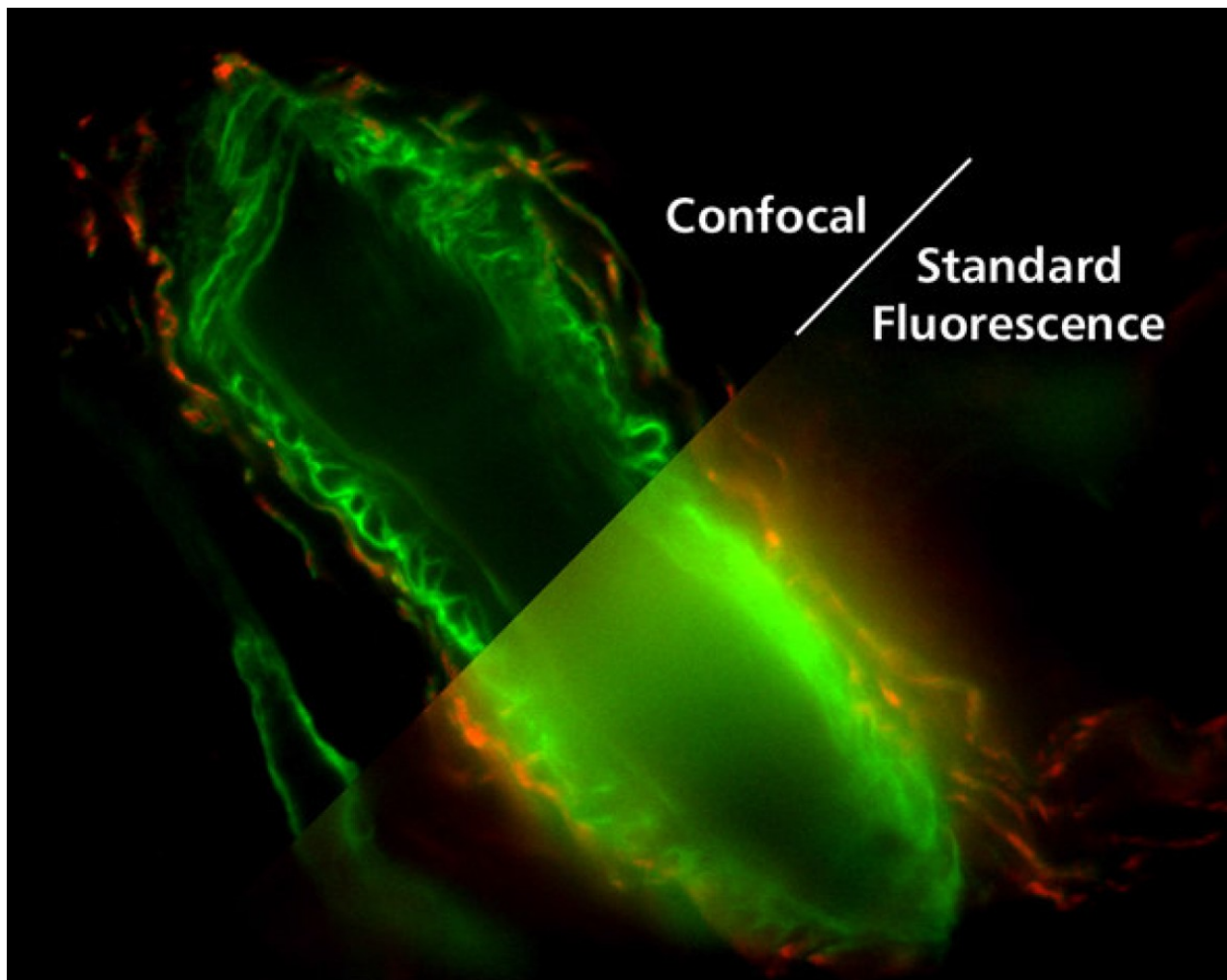


Figure 1

# Rotující (Nipkowův) disk

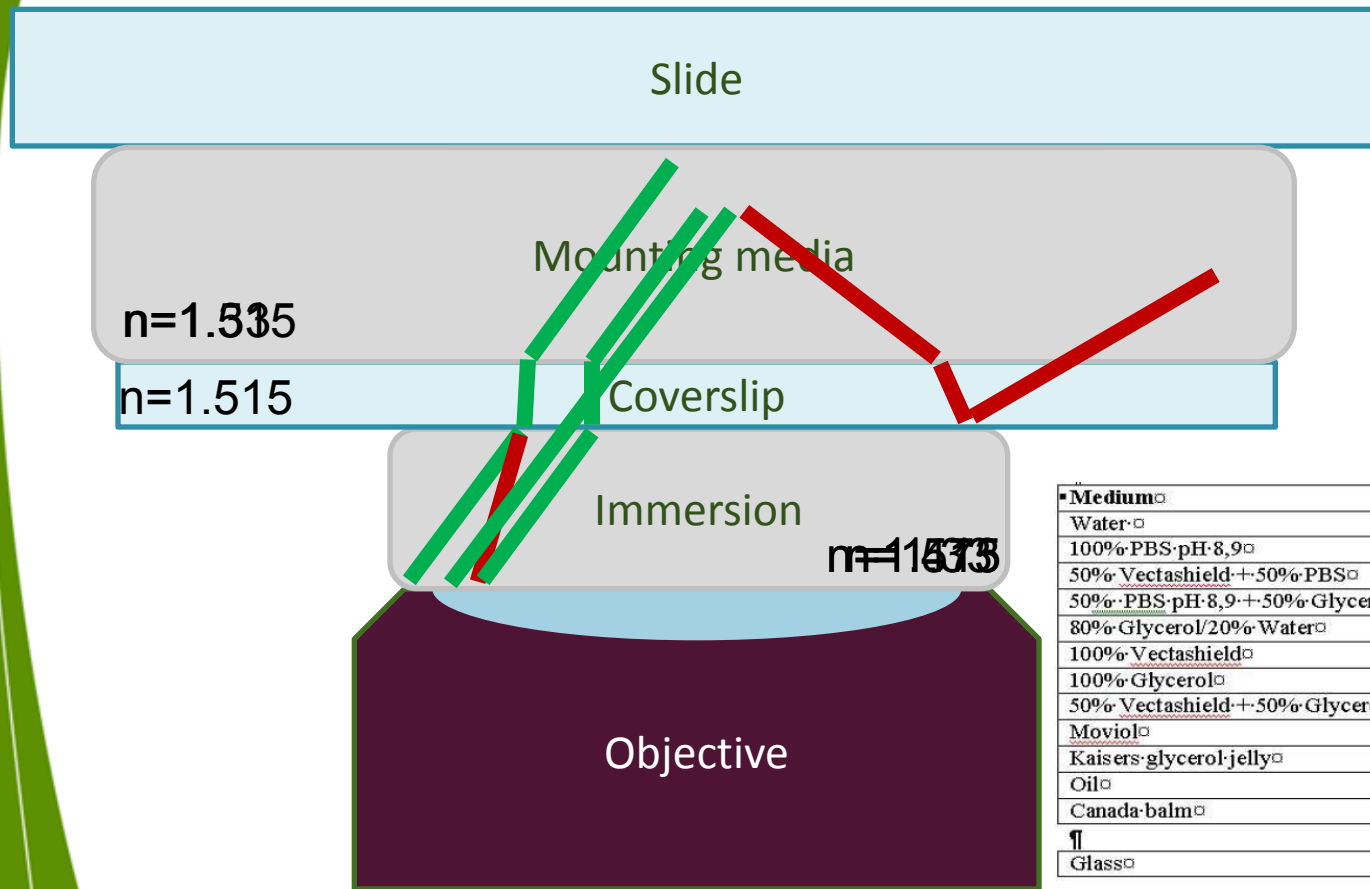


## Rozdíl mezi fluorescenční a konfokální mikroskopií





## Příprava vzorku



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

## Výhody konfokální mikroskopie

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



## odkazy

video on line

[https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s\\_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video](https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video)

ke stažení

[https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s\\_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4](https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4)