

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% CO<sub>2</sub> v inkubátoru.

	PEI pH7,0	LIPOFECTAMIN	FUGENE
<b>Medium</b>	130 ul	130 ul	130 ul
<b>Transfekční činidlo</b>	7,5 ul	7,5 ul	7,5 ul
<b>DNA (pMax GFP)</b>	2,5 ug	2,5 ug	2,5 ug
<b>Poměr transfekční činidlo:DNA</b>	3:1	3:1	3:1

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. 1x10<sup>6</sup> 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 3 ml „Electrolytic buffer E“. Nastavíme vhodnou kombinaci pro elektroporaci (1150 V/ 20 ms/1pulz). Přeneseme 2,5 ug 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% CO<sub>2</sub> v inkubátoru.

**Postup aktuálně:**

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

1. FUGENE	2. NEON	3. PEI	4. LIPOFECTAMIN

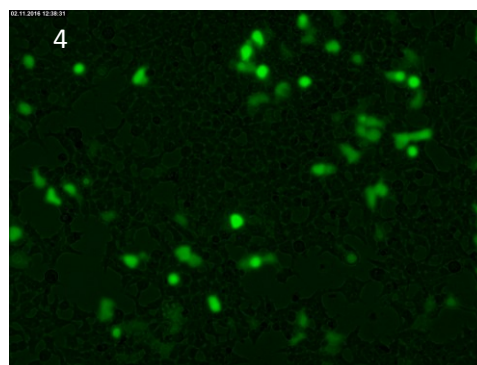
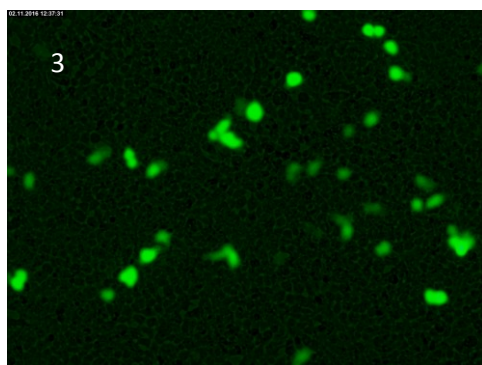
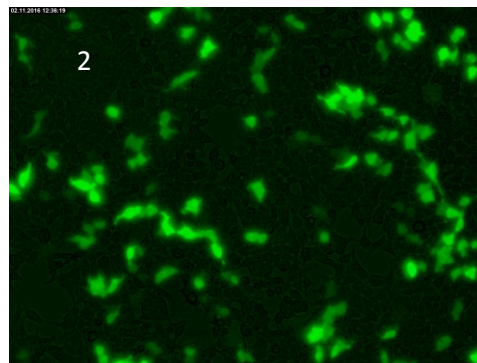
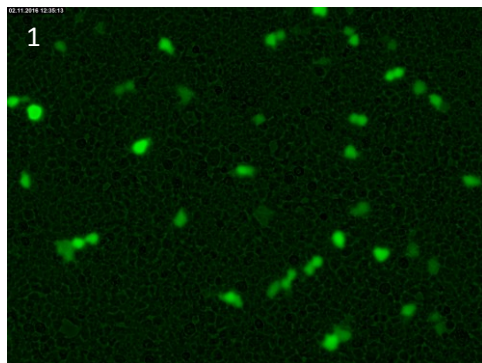
2. Uvolnění buněk pomocí TRYPsin/EDTA: Do připravené zkumavky přenes 750 ul media z kultury. Zbytek přenes do odpadu. Opláchni misku 2 ml PBS, přidej 500 ul TRYPsin/EDTA, inkubuj 3-5' v 37 °C, přenes uvolněné buňky do zkumavky s mediem.

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

4. Ze všech výsledků doplň tabulku a urči pořadí efektivity transfekce:

Transfekční činidlo	Odhad % GFP+ buněk	% GFP+ buněk (accuri)	Pořadí efektivity
PEI			
Lipofectamin			
Fugene			
Neon nukleofekce			

**Výsledky:**



**Závěr:**