

Kultivace buněk

Transfekce

Izolace DNA

Izolace RNA

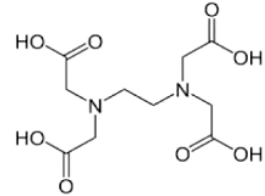
Western blotting

Pasážování adherentních buněk – důležité reagensie



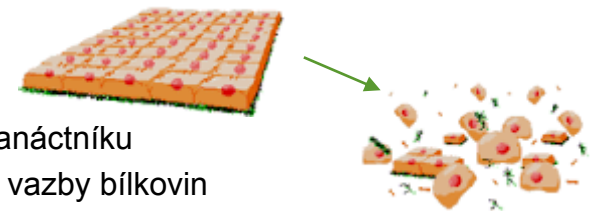
▶ EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

- ▶ polyaminokarboxylová kyselina, $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$
- ▶ chelatační činidlo - vytváří komplexní sloučeniny s ionty kovu
- ▶ využití:
 - ▶ buněčná biologie –rozrušení buněčných spojů vyžadující přítomnost iontů Ca, posílení působení trypsinu
 - ▶ molekulární biologie - součást řady pufrů, například TE pufru pro uchování DNA, ve kterých zajišťuje sekvestraci dvouvalentních iontů, které jsou nezbytné pro funkci DNáz, čímž brání degradaci DNA
 - ▶ medicína – při chelatační terapii, ve které slouží k odstranění těžkých kovů z těla
 - ▶ průmysl – odstraňování tvrdosti vody, bělení, fotografie...



▶ trypsin

- ▶ trávicí enzym, který se vyskytuje v dvanáctníku
- ▶ proteáza, hydroláza - štěpí peptidické vazby bílkovin
- ▶ u adherentních buněk štěpí proteiny, které jsou důležité pro jejich uchycení k podkladu
- ▶ trypsinizace se proto úspěšně a rutinně využívá při pasážování těchto buněk
 - ▶ pozor na dodržení času, aby nedošlo k nežádoucímu natrávení i dalších buněčných struktur!
 - ▶ inaktivace působení trypsinu – některé komponenty séra



Pasážování adherentních buněk

▶ "subculturing"

- ▶ v log fázi, než dosáhnou konfluency, před vstupem do stacionární fáze, kdy pak klesá jejich aktivita a kvalita buněčné kultury

Check confluency of cells



Remove spent medium



Wash with PBS



Incubate with
trypsin/EDTA



Resuspend in serum
containing media



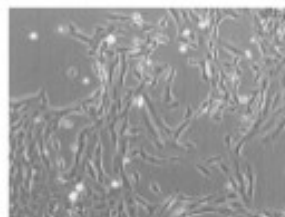
Transfer to culture flask

Why passage cells?

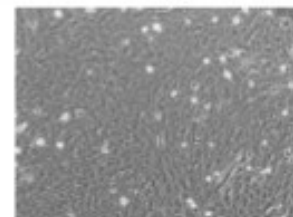
- To maintain cells in culture (i.e. don't overgrow)
- To increase cell number for experiments/storage

How?

- 70-80% confluency
- Wash in PBS to remove dead cells and serum
- Trypsin digests protein-surface interaction to release cells (collagenase also useful)
- EDTA enhances trypsin activity
- Resuspend in serum (inactivates trypsin)
- Transfer dilute cell suspension to new flask (fresh media)
- Most cell lines will adhere in approx. 3-4 hours



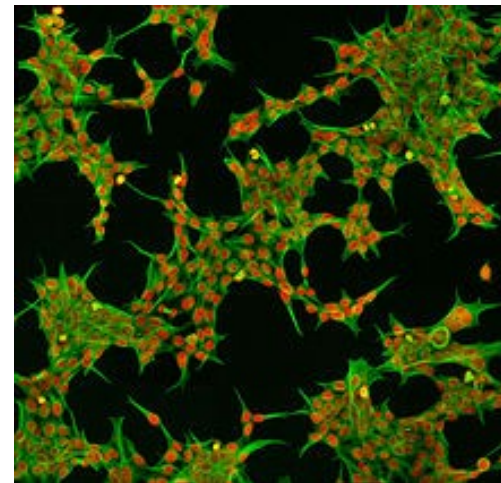
70-80% confluency



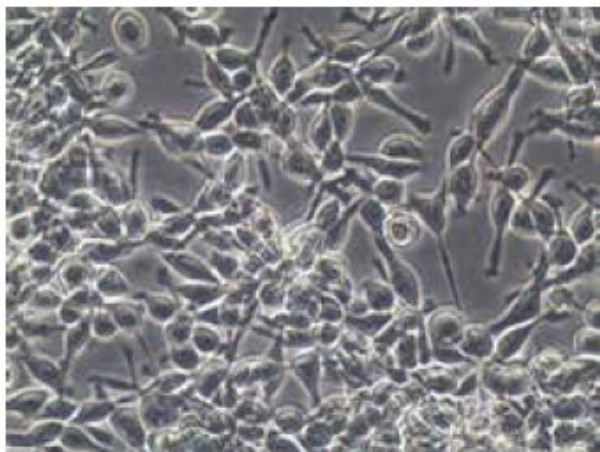
100% confluency

Příklad buněčné linie - HEK293

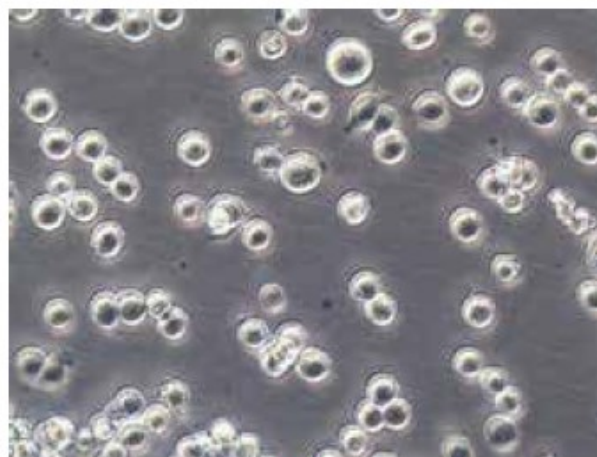
- ▶ linie odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk (1973), transformovaná (adenovirus 5 DNA)
- ▶ široce používaná – rychlý růst, výborně transfekovatelná – využití pro produkci rekombinantních proteinů
- ▶ existuje několik variant této buněčné linie, může růst jako adherentní i suspenzní



(Gibco, 2015; wikipedia.org)



adherentní



suspenzní

STRUČNÝ POSTUP IZOLACE plazmidové DNA

- ▶ Plazmidy (i jinou nízkomolekulární DNA) je možné množit pomocí kompetentních bakterií a následně izolovat pomocí kolonkových kitů (mini-, midi- a maxiprep)
- ▶ Heat shock kompetentních bakterií E. Coli plazmidem zájmu
- ▶ Růst bakterií na selekční půdě (antibiotikum)
- ▶ Izolace rezistentní kolonie a její namnožení v selekčním LB médiu
- ▶ Izolace nízkomolekulární DNA pomocí kolonkového kitu:
 - ▶ Lyzace bakteriálního peletu a RNA
 - ▶ Precipitace proteinů a genomové DNA
 - ▶ Přenos supernatantu na kolonu a vazba plazmidu na pryskyřičných kuliček (promytí)
 - ▶ Eluce plazmidové DNA a její přečištění

IZOLACE DNA POMOCÍ KOLONKOVÉHO KITU

video návod on line

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

Kontrola kvality DNA/RNA - nanodrop

A260... nukleové kyseliny

A280... příměsi

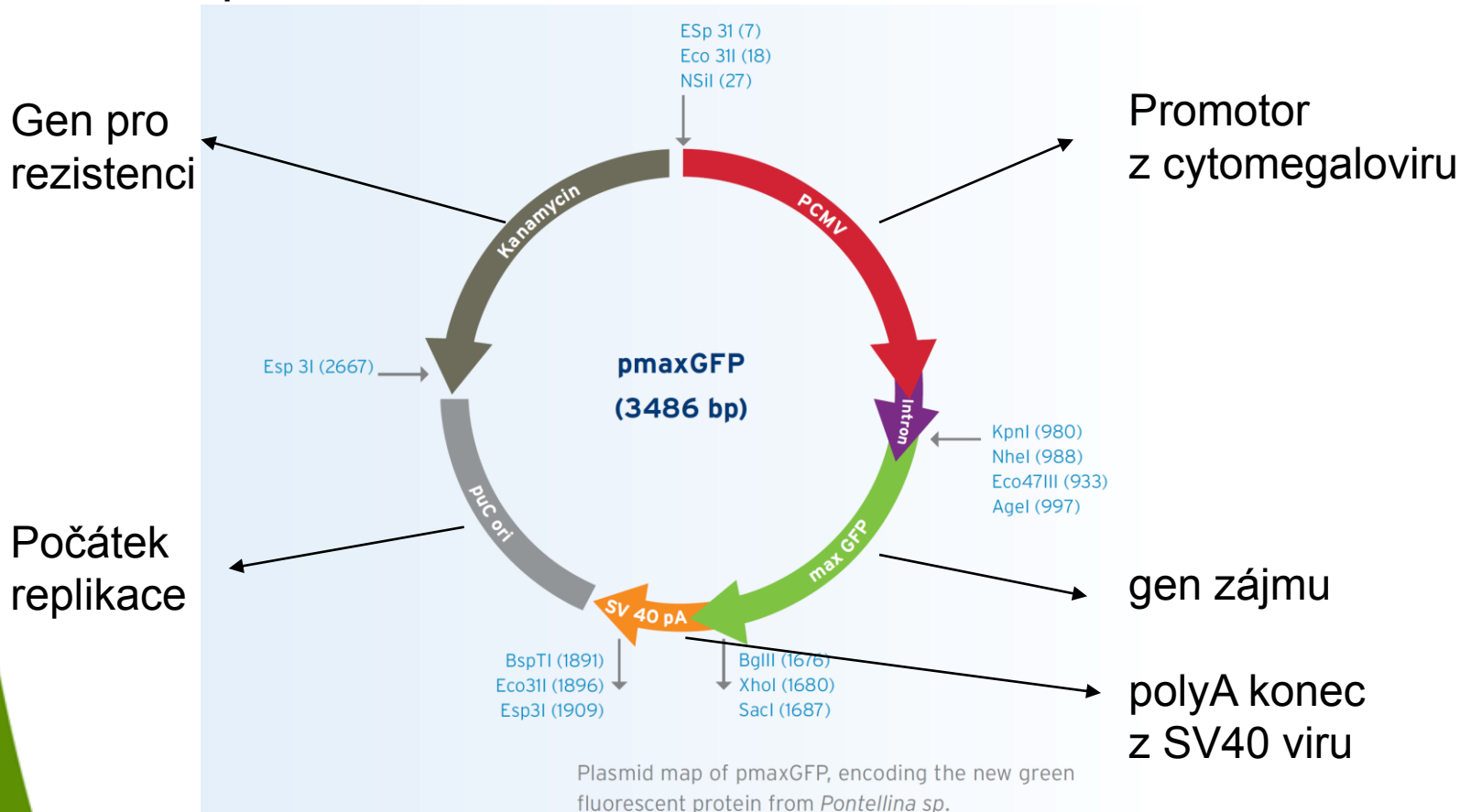
A260 – 1.0 (10x ředit vzorky)

RNA: A260/A280 ~ 2.0

DNA: A260/A280 ~ 1,8

Vektor pMaxGFP (AMAXA)

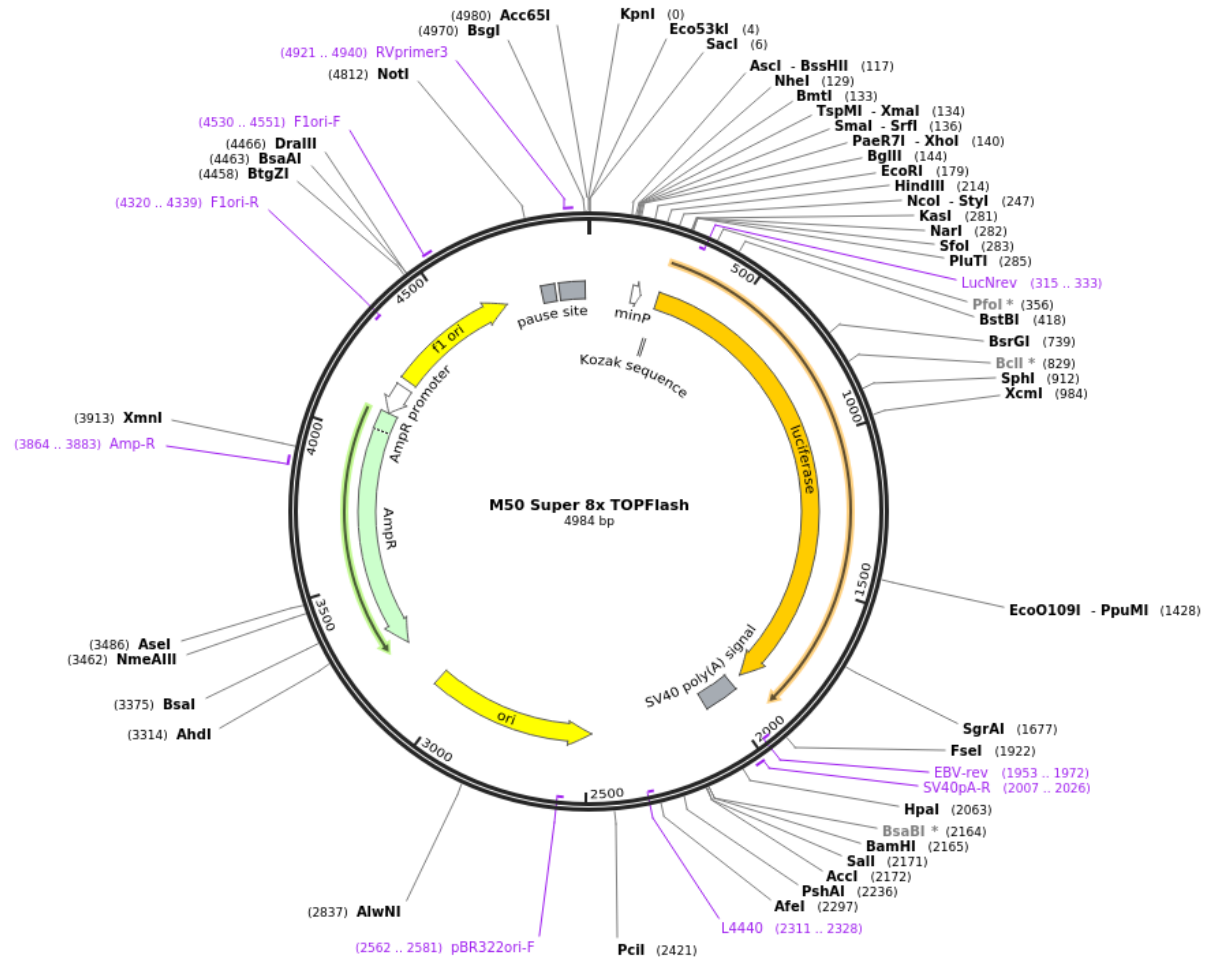
Gen pro GFP izolovaný z planktonového korýše *Pontellina Plumata*, konstitutivně prepisovaný plazmid slouží pro kontrolu účinnosti transfekce



Plazmid 368 - M50 Super 8x TOPFlash

Beta-cateninový reportér. 8xTCF/LEF vazebných míst před promotorem pro FF luciferázu

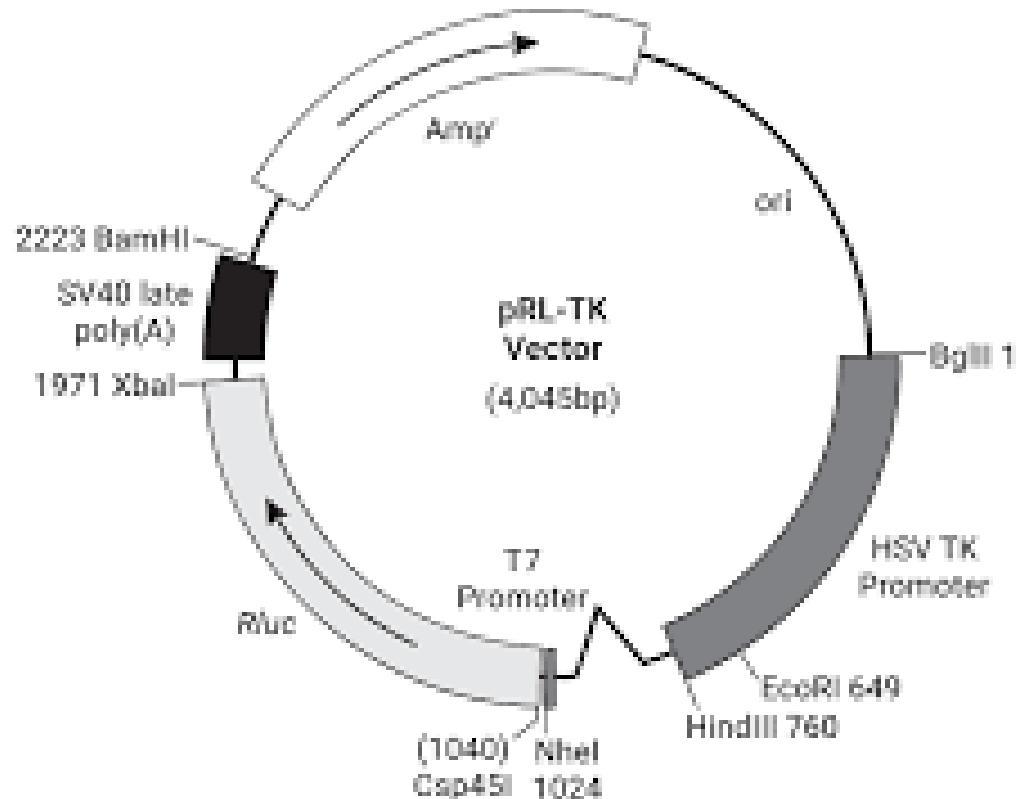
Created with SnapGene®



<https://www.addgene.org/12456/>

Plazmid 345 - pRLtkLuc

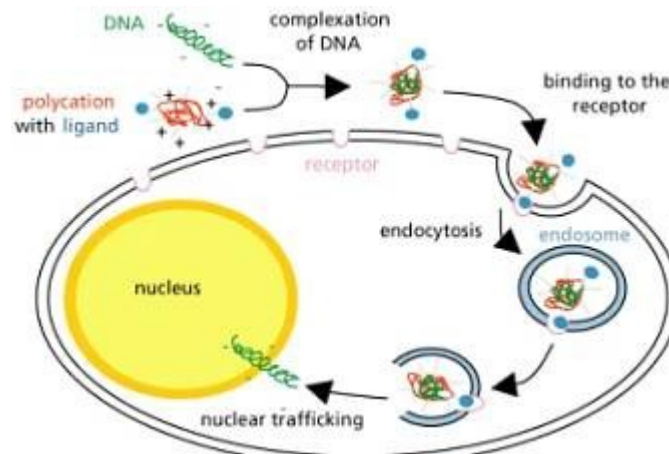
Konstitutivní exprese *Renilla* luciferázy poskytuje vnitřní kontrolu, na kterou se může přepočítat exprese FF luciferázy, protože oba vektory se transfekují se stejnou účinností.



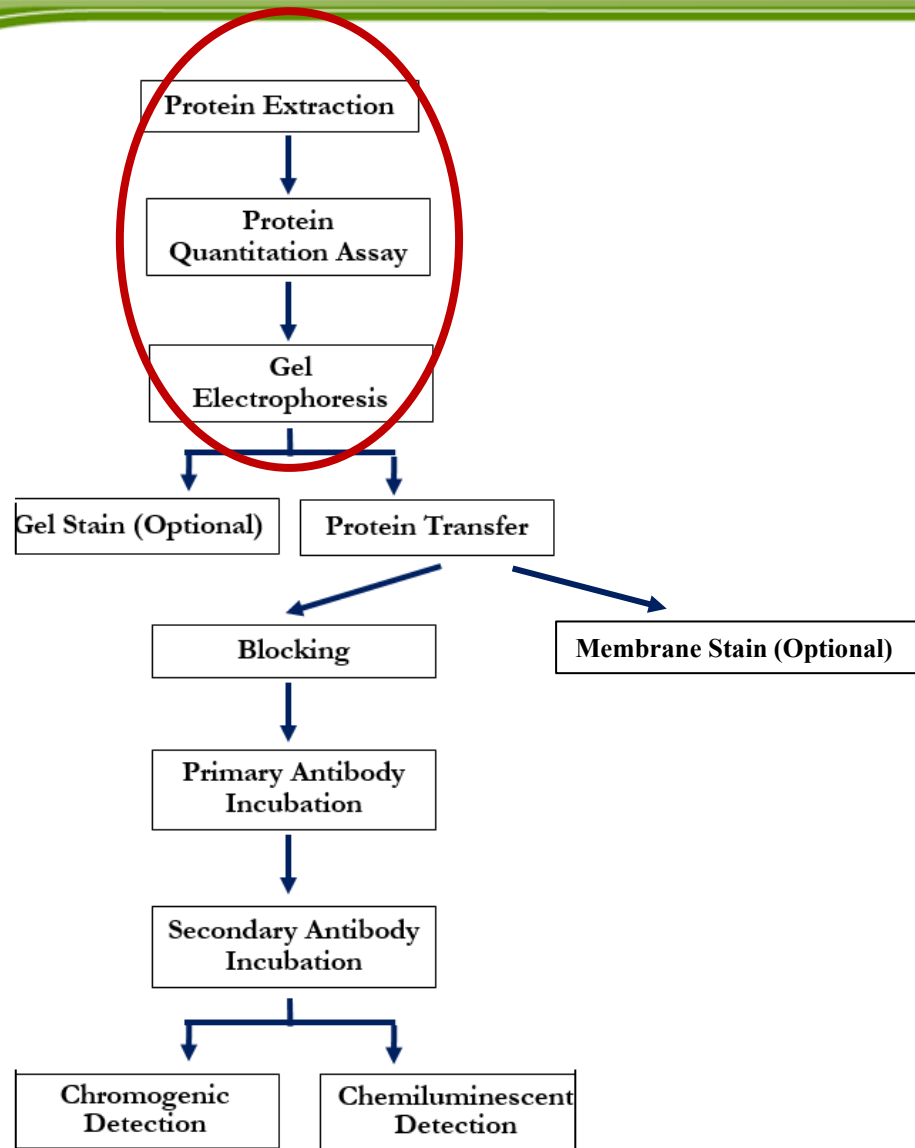
PEI (polyetylenimin)

DNA:PEI = 1:4

- ▶ 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

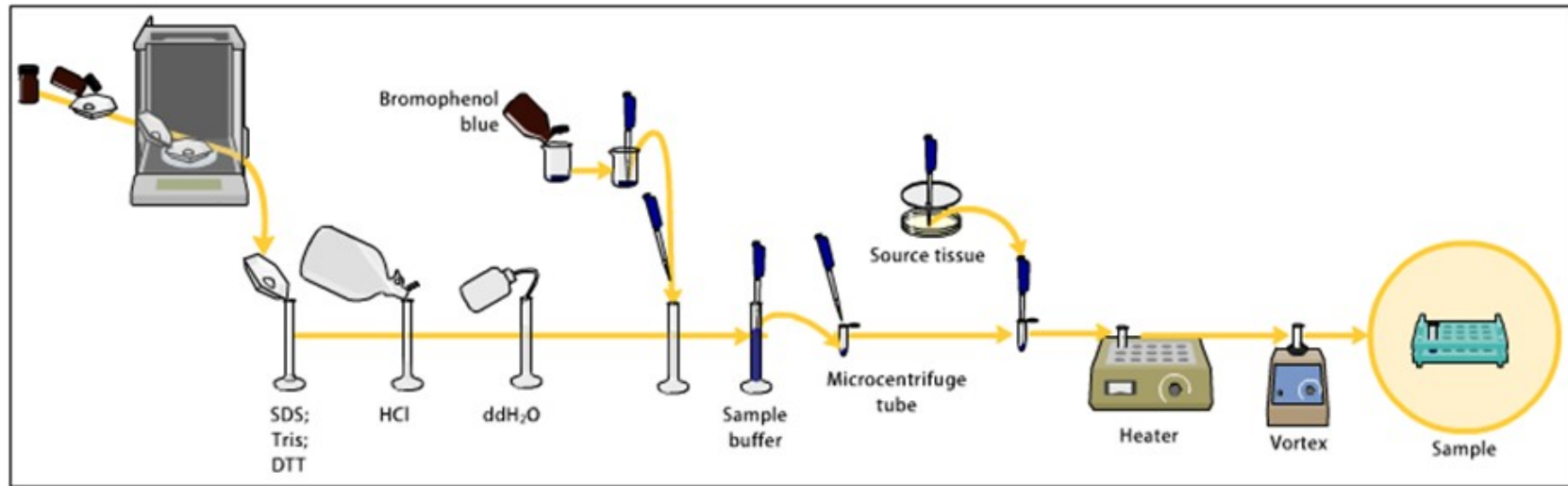


SDS-PAGE - Western blotting – „work flow“

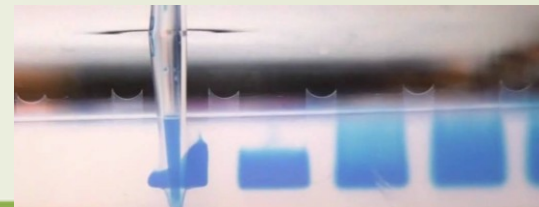


Příprava vzorků

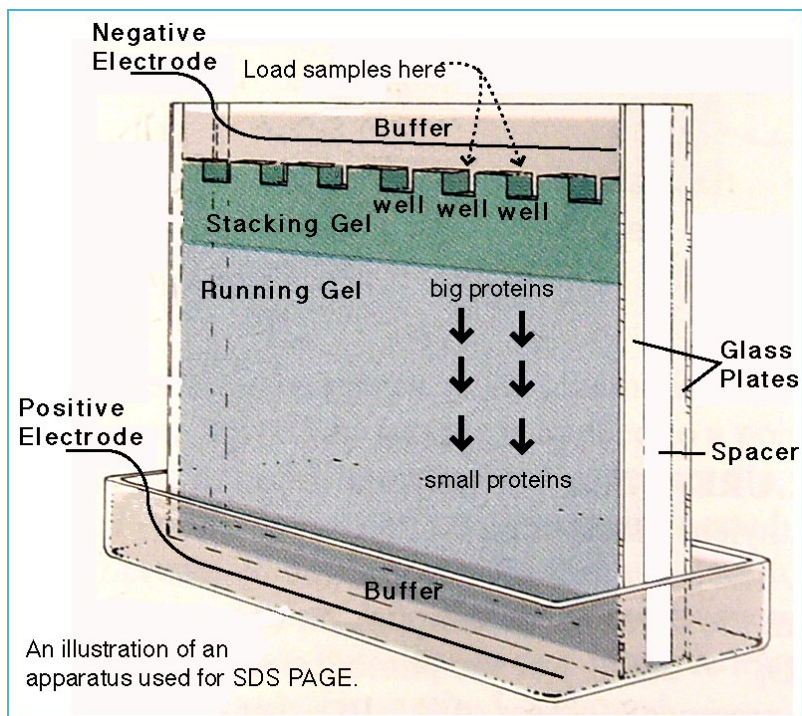
- ♦ izolace buněčných proteinů – lyze buněk, specifické pufrů, centrifugace
- ♦ lyzáty celobuněčné, nebo různé frakce – cytoplazmatická, mitochondriální, jaderná, membránová
- ♦ pro uchování proteinů nutno k lyzátům přidat **inhibitory proteáz a fosfatáz**
- ♦ stanovení **koncentrace proteinů** v jednotlivých vzorcích, naředit vzorky na stejnou koncentraci
- ♦ ke vzorku proteinů se přidává:
 - ♦ **Tris pufr** – zajištění optimálního pH
 - ♦ **SDS, beta-mercaptoetanol, DTT** – denaturace proteinů
 - ♦ **glycerol** – zvýšení hustoty vzorku, lépe se udrží v jamce v gelu
 - ♦ **bromfenolová modř** – vizualizace pohybu proteinů v gelu



Vlastní SDS PAGE (Laemmli)



- ▶ Laemmliho (Tris-glycinový) diskontinuální systém pufrů - dva pufrů o různém pH pro přípravu zaostřovacího a rozdělovacího gelu a jeden pufr tvořící elektrolyt
- ▶ denaturované proteiny jsou laboratorní injekční stříkačkou nebo pipetou vnesené do jamek polyakrylamidového gelu, které jsou vyplněné vhodným pufrům
- ▶ následně je do gelu vpuštěn elektrický proud, díky kterému proteiny záporně nabitě pomocí SDS migrují skrz gel směrem k anodě
- ▶ na základě jejich velikosti se každý protein pohybuje gelem rozdílnou rychlostí
 - ▶ menší proteiny pronikají póry v gelu snadněji než větší, které se střetávají s větším odporem
 - ▶ proteiny se rozdělí podle své molekulové hmotnosti
 - ▶ menší proteiny postoupí dále než větší, které jsou blíže počátku, kam byly proteiny aplikovány



Imunodetekce – blokování membrány

♦ proteiny jako blokovací látky

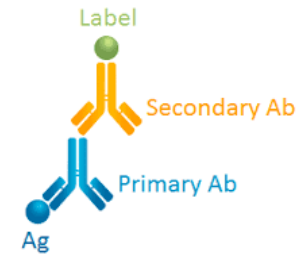
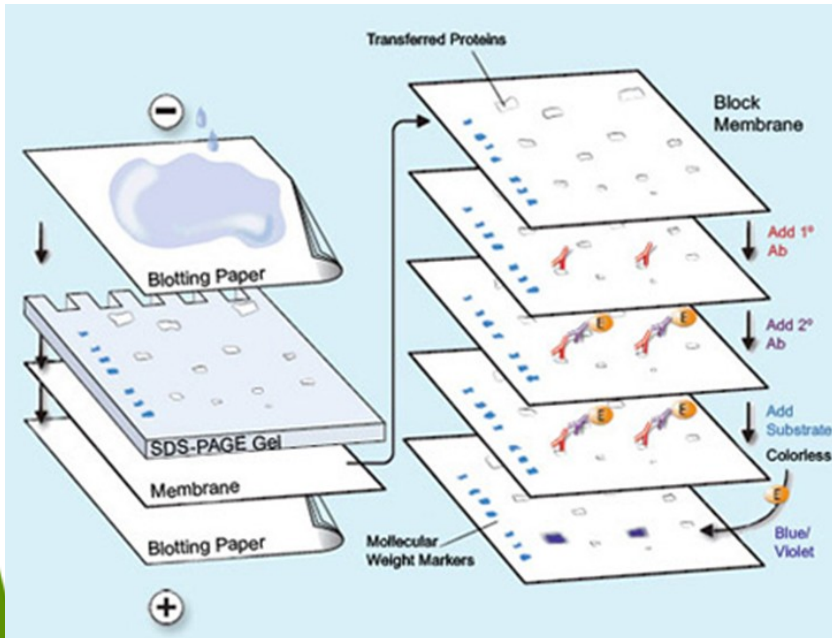
- ♦ inhibují nespecifické interakce mezi proteiny a membránou a mezi proteiny navzájem
- ♦ permanentní blokační agens, fyzikální interakce s membránou
- ♦ mají mít větší afinitu k membráně než následně použité protilátky
- ♦ účinně blokují volná místa na membráně a současně nenarušují vazebné interakce mezi proteiny, které byly již na membránu přeblokovány
- ♦ každý pár Ab:Ag je unikátní a vyžaduje vhodnou volbu blokačního agens, nutno experimentálně určit jeho typ a množství
 - ♦ nedostatek blokovacího agens - vysoké pozadí při následné imunodetekci, protilátka se váže i na membránu, nelze rozlišit specifická versus nespecifická vazba protilátky
 - ♦ nadbytek blokovacího agens – zastínění specifického signálu protilátky při následné imunodetekci, specifický signál zaniká

♦ nejčastěji používané:

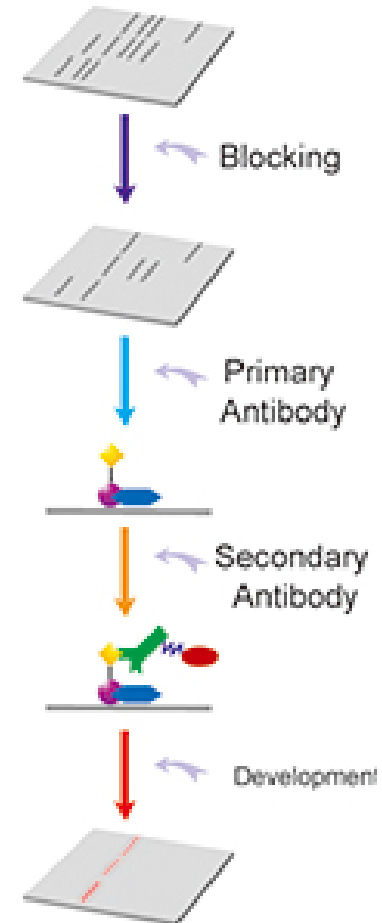
- ♦ **odtučnělé mléko** (5%) + Tween 20 (0,1%), velmi běžné, levné; pozor – nepoužít v případě, že bude následovat imunodetekce s využitím biotinylovaných Ab (mléko obsahuje také biotin, interference!)
- ♦ **BSA** (bovine serum albumine) – 0,3-5%, možno i s Tweenem 20, velmi časté
- ♦ **rybí želatina** - obvykle 2%, pro některé specifické detekce, méně častá, vhodnější než savčí (méně nespecifických reakcí, menší pozadí), pozor – obsahuje biotin, relativně drahá
- ♦ **sérum** – obvykle 10%, použití s azidem sodným, drahé, obsah některých imunoglobulinů – potenciální cross-reaktivita

Vlastní imunodetekce – hlavní fáze

- ▶ detekce a identifikace proteinů přenesených na membránu s využitím specifických protilátek
- ▶ několik základních kroků:
 - ▶ odmytí blokačního agens
 - ▶ přidání **primární protilátky**
 - ▶ odmytí nadbytečné primární protilátky
 - ▶ přidání **sekundární protilátky**
 - ▶ odmytí nadbytečné sekundární protilátky
 - ▶ **detekce signálu** – intenzita úměrná množství detekovaného proteinu (různé možnosti)

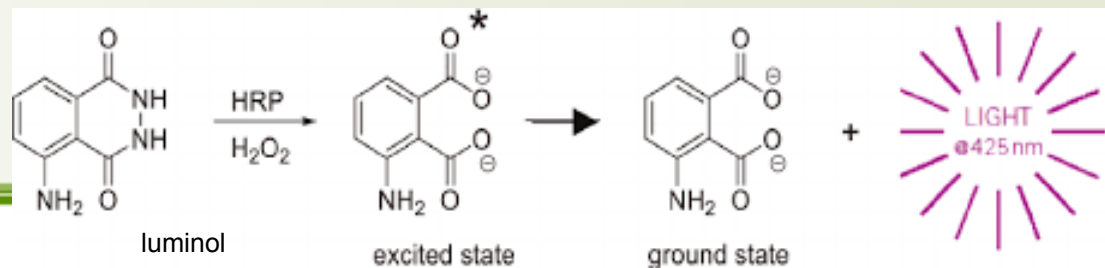


<https://www.cusabio.com>



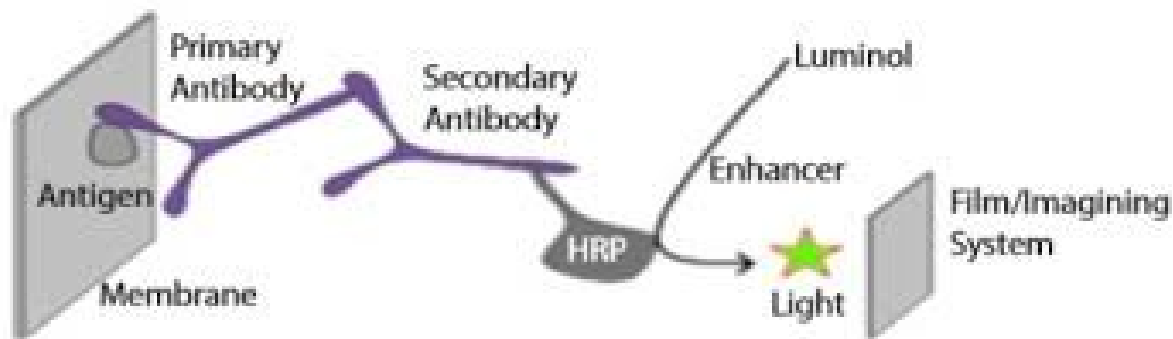
<http://www.merckmillipore.com/>
<http://www.bio-rad.com>

Chemiluminescence

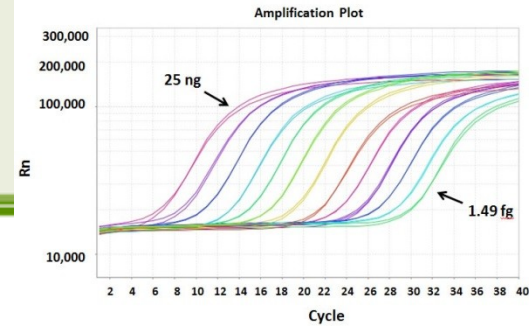


(Geschwender et al., 2013)

- ▶ nejčastější způsob imunodetekce po western blottingu
- ▶ široká škála detekčních kitů založených na chemiluminiscenční reakci
- ▶ princip reakce:
 - ▶ cílový protein – neznačená primární Ab - sekundární Ab je konjugovaná s HRP (peroxidáza) – sem se přidá luminol
 - ▶ HRP katalyzuje oxidaci luminolu - víceokrová reakce, při které je emitováno chemiluminiscenční světlo (428 nm)
 - ▶ jeho množství je úměrné množství HRP (tj. množství sAb, pAb a cílového proteinu)
 - ▶ intenzitu reakce je možné zesílit (až 1000x) přidáním modifikovaných fenolů (p-iodofenol), které stimulují transfer elektronů mezi luminolem a HRP
 - ▶ účinnější detekce signálu, zvýšení citlivosti detekce
 - ▶ enhanced chemiluminescence (ECL) – řada komerčně dostupných kitů



qRT-PCR

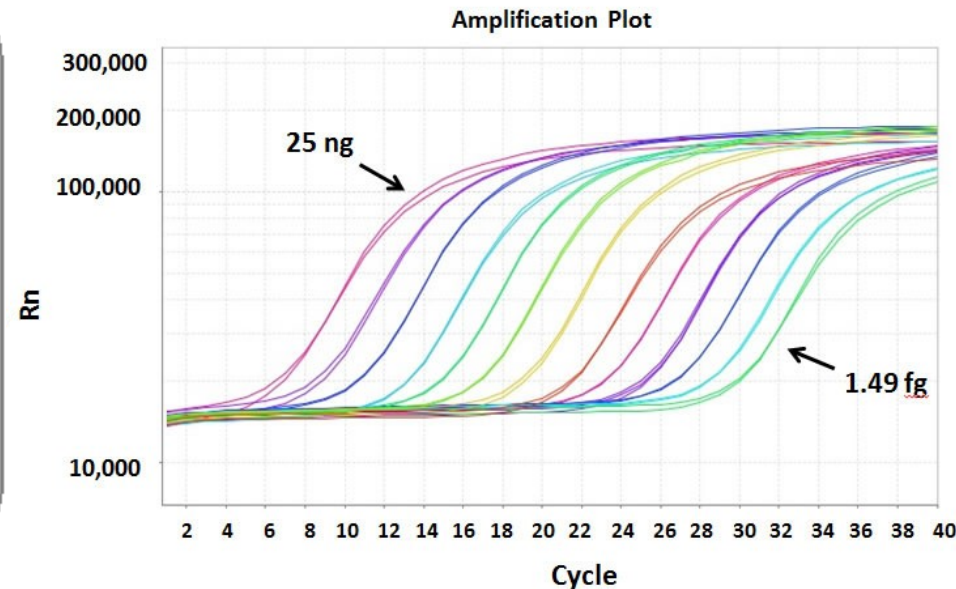
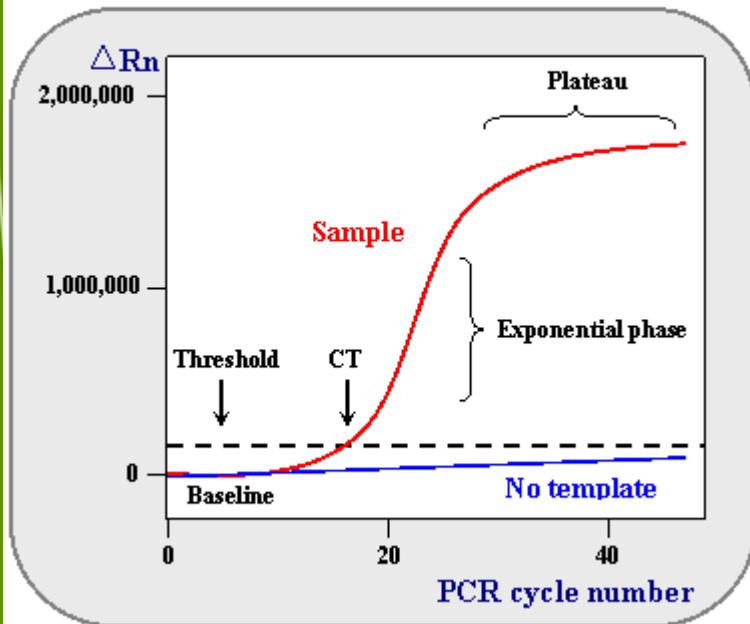


- ▶ dynamická regulace hladiny mRNA – detekce změn je zásadní pro studium změn exprese specifických genů;
- ▶ Kvantifikace exprese proteinů podle množství molekul mRNA využívající reverzní transkripci a PCR
- ▶ Reverzní transkripce převede mRNA na cDNA
 - Primery oligoT, náhodné hexa-nona oligonukleotidy, specifické primery pro konkrétní RNA
- ▶ Kvantifikace je umožněna použitím fluorescenčně značených molekul – nárůst fluorescence po každém cyklu
- ▶ Po každém cyklu je provedena detekce přírůstku = odpadá nutnost kvantifikace pomocí elektroforézy

Hodnocení kvantitativní real time PCR

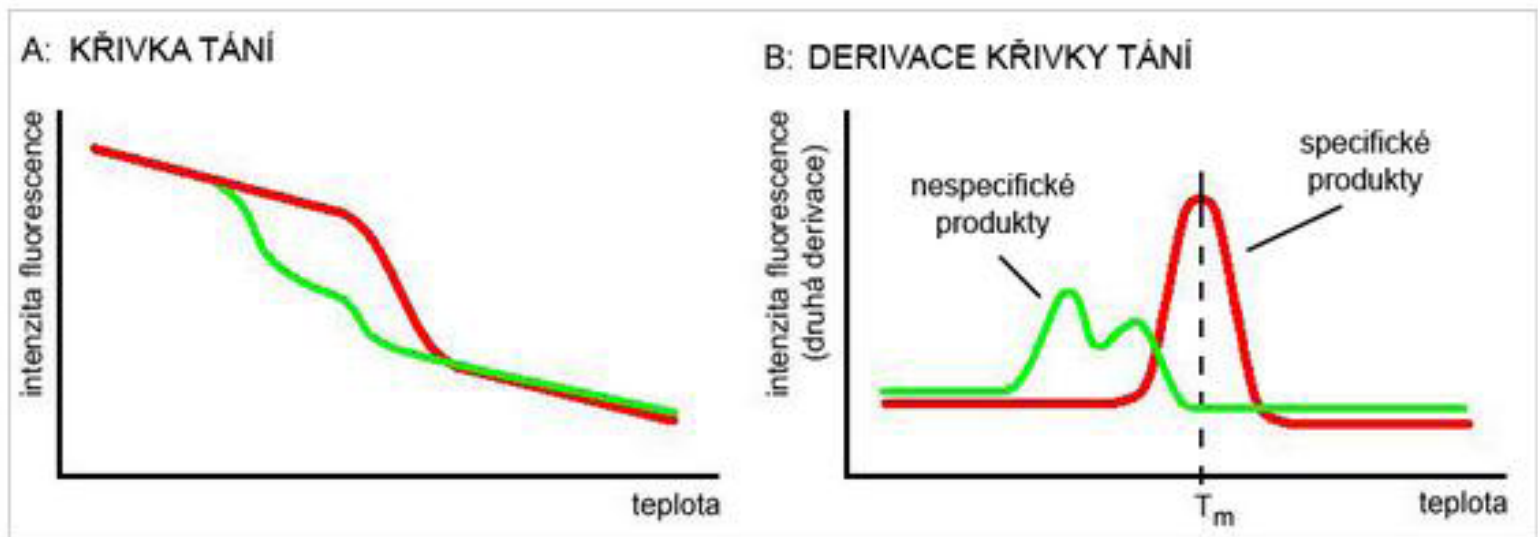
- ▶ Určení Ct (Cp) – manuálně nebo pomocí maxima 2. derivace - bod, kde dochází k strmému stoupání amplifikační křivky vzorku
- ▶ Čím vyšší Ct, tím méně molekul mRNA bylo ve vzorku

Model of real time quantitative PCR plot



Křivka tání (melting curve)

- Na konci reakce proběhne postupné zahřívání celé reakce, po dosažení bodu tání T_m dojde k degradaci DNA (pokles fluorescence)
- Specifitu reakce ilustruje křivka tání (melting curve) – musí mít jen jeden vrchol = jeden produkt



Více info: https://theses.cz/id/go0fw3/Bakalarska_praceEliska_Ruzickova.pdf
<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

Počítání

► Koncentrace bez přepočtu jednotek

SS 40 mM a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Trojčlenka: 20 uM.....100 ul ↑
 ↓ 40 mM.... x ul |
 x/100=0,02/40... 0,0005.100=x

Ředěním I: 40 mM.... 100 ul
 20 mM.... 50 ul
 20 uM.....50 nl = 0,05 ul

Ředěním II: 40 mM/0,02 mM = 2000 x ředěné
 100/2000

Vzorečkem: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ (pozor! Nutné stejné jednotky)
 $40x = 0,02 \cdot 100$ ul

► Koncentrace s přepočtem jednotek

SS: 40 mg/ml a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Nutné znát Mr látky (např 80)

1 M ... 80 mg/ml

0,5 M ... 40 mg/ml

► Ředění buněk

Spočítáme si, že máme $0,35 \times 10^6 / \text{ml} = 0,7 \times 10^6$ b v 2 ml

A) chceme mít $1 \times 10^6 / 1 \text{ml}$

zjistíme, kolik máme buněk celkem ($0,7 \times 10^6$), Centrifugace a pak to doředíme 0,7 ml pufru

B) chceme odebrat 2×10^5 buněk = $0,2 \times 10^6$ buněk

$0,2 / 0,35 = 0,57$ ml vezmeme z původní suspenze