



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ**

**ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## **ZHODNOCENÍ TRANSFEKČNÍCH METOD PRO TRANSFEKCI COS-7 BUNĚK**

EVALUTION OF TRANSFECTION METHODS FOR TRANSFECTION OF COS-7 CELLS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**JAN SLAVÍK**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. MILAN RYCHTÁRIK**

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

**Biomedicínská technika a bioinformatika**

**Student:** Jan Slavík

**ID:** 106110

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2009/2010

## NÁZEV TÉMATU:

**Zhodnocení transfekčních metod pro transfekci COS-7 buněk**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se problematikou kultivování buněk a transfekcí buněčných kultur cizí DNA. Na COS-7 buněčné linii srovnajte úspěšnost transfekce transfekčních reagentů Fugene 6, Fugene HD a kalcium fosfátové metody. Buňky transfekujte dodanou cDNA s markerem. Jako marker použijte CD8 antigen. Vytvořte vlastní protokoly pro použití zadaných transfekčních reagentů s danou buněčnou linií. Výsledky statisticky vyhodnoťte a porovnejte s daty dodanými výrobcem transfekčních reagentů. Úspěšně transfektované buňky budou využity pro patchclampová měření.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Alberts B et. al.: Molecular Biology of the Cell. 4. vyd. Garland, 2002. ISBN: 978-0815332183

[2] Roche Fugene 6 and Fugene HD Transfection Manual

**Termín zadání:** 8.2.2010

**Termín odevzdání:** 31.5.2010

**Vedoucí práce:** Ing. Milan Rychtářík

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

## UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Zhodnocení transfekčních metod pro transfekci COS-7 buněk jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

# Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Milanu Rychtárikovi za pomoc při práci v laboratoři a rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

## **ABSTRAKT**

Cílem této práce je shrnout a v praxi ověřit možnosti transfekce buněk, které nabízí Ústav biomedicínckého inženýrství. Na COS-7 buněčné linii jsou porovnávány tyto transfekční reagenty: fosforečnan vápenatý, Fugene 6 a Fugene HD.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Buněčná kultivace, Transfekce, Fosforečnan vápenatý, Fugene 6, Fugene HD

## **ABSTRACT**

The aim of this work is summarized potentialities of cells transfection in their practise, which offers the Department of biomedical engineering. On COS-7 cell line are compared to those transfection reagents: calcium phosphate, Fugen 6 and Fugen HD.

## **KEYWORDS**

Cell culture, Transfection, Kalcium phosphate, Fugene 6, Fugene HD

**Bibliografická citace mé práce:**

SLAVÍK, J. *Zhodnocení transfekčních metod pro transfekci COS-7 buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 31 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Milan Rychtárik.

# Obsah

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Úvod.....</b>                                                        | <b>3</b>  |
| <b>2. Transfekce.....</b>                                                  | <b>4</b>  |
| 2.1. Transfekce stabilní a nestabilní .....                                | 4         |
| 2.2. Transfekční metody .....                                              | 4         |
| 2.2.1. Biochemické metody .....                                            | 4         |
| 2.2.2. Fyzikální metody .....                                              | 5         |
| 2.2.3. Biologické metody .....                                             | 5         |
| <b>3. Využití transfekčních metod pro studie bioelektrických jevů.....</b> | <b>7</b>  |
| 3.1. Metoda měření terčíkového zámku (patch clamp) .....                   | 8         |
| <b>4. Reportérské geny .....</b>                                           | <b>9</b>  |
| 4.1. Marker CD8 Dynabeads .....                                            | 9         |
| 4.2. Marker GFP .....                                                      | 10        |
| 4.3. Selekční marker pro stabilní transfekci .....                         | 11        |
| <b>5. Buněčné linie .....</b>                                              | <b>12</b> |
| 5.1. Buněčná linie COS-7 .....                                             | 12        |
| 5.2. Buněčná linie HEK-293 .....                                           | 12        |
| <b>6. Práce v laboratoři.....</b>                                          | <b>13</b> |
| 6.1. Úvod do práce v laboratoři .....                                      | 13        |
| 6.2. Vysvětlení vybraných pojmů a funkcí látek .....                       | 15        |
| 6.3 Seznam potřebných přístrojů .....                                      | 16        |
| <b>7. Protokoly .....</b>                                                  | <b>17</b> |
| 7.1. Příprava buněčné kultury .....                                        | 17        |
| 7.2. Pasážování buněk .....                                                | 18        |
| 7.3. Zamražování buněk .....                                               | 19        |
| 7.4. Transfekce fosforečnanem vápenatým .....                              | 20        |
| 7.5. Transfekce Fugene 6 .....                                             | 21        |
| 7.6. Transfekce Fugene HD .....                                            | 22        |
| 7.7. Zjednodušené protokoly pro Fugene .....                               | 23        |
| <b>8. Analýza dat .....</b>                                                | <b>24</b> |
| <b>9. Porovnání transfekčních reagentů.....</b>                            | <b>25</b> |
| 9.1. Doporučení pro COS-7 buněčnou linii.....                              | 26        |
| 9.2. Doporučení pro HEK-293 buněčnou linii .....                           | 26        |
| <b>10. Závěr.....</b>                                                      | <b>27</b> |
| <b>11. Seznam použité literatury .....</b>                                 | <b>28</b> |
| <b>12. Seznam zkratk .....</b>                                             | <b>31</b> |

## Seznam obrázků

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obr 1 - Schématické znázornění transfekce biochemickou metodou .....                                                  | 5  |
| Obr 2 - varianty metody patch-clamp, a – měření z části membrány, b – měření z celé buňky                             | 8  |
| Obr 3 - ukázka buněk s navázanými Dynabeads.....                                                                      | 9  |
| Obr 4 - spektrum GFP, modrá křivka je excitace, zelená křivka je emise .....                                          | 10 |
| Obr 5 - buňky označené GFP markrem, vlevo ve světle, vpravo ve tmě.....                                               | 10 |
| Obr 6 - plazmid pmaxGFP .....                                                                                         | 11 |
| Obr 7 - Znázornění správného způsobu pipetování, vlevo do kultivační lahvičky, vpravo do centrifugační zkumavky ..... | 13 |
| Obr 8 - rozložení věcí v laminárním boxu .....                                                                        | 13 |
| Obr 9 - srovnání dalších transfekčních reagentů .....                                                                 | 25 |
| Obr 10 - Analýza světélkovací exprese u COS-7 buněk transfekovaných Fugene HD.....                                    | 26 |

## Seznam tabulek

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab 1 - hlavní komponenty u průběhu srdečního ventrikulárního akčního potenciálu..... | 7  |
| Tab 2 - poměry látek .....                                                            | 20 |
| Tab 3 - doporučené množství látek v 6-jamkové misce pro Fugene 6.....                 | 21 |
| Tab 4 - doporučené množství látek v 6-jamkové misce pro Fugene HD.....                | 22 |
| Tab 5 - shrnutí vlastností porovnávaných transfekčních reagentů.....                  | 25 |

# 1. Úvod

Ke studiu vlastností genů a jimi kódovaných proteinů se do buněk přenáší cizorodá DNA nesoucí tento gen. Ději přenosu cizorodého genu do buňky se říká transfekce. Jednou z metod uskutečňující transfekci je použití transfekčních reagentů. Transfekční reagenty vytváří s přenášenou DNA komplex, který může přecházet přes membránu buněk. Jednotlivé reagenty se mohou podstatně lišit v úspěšnosti transfekce, toxických účincích a ceně, a to i v závislosti na použité buněčné linii.

Cílem práce je srovnat úspěšnost transfekce kalcium fosfátové metody, Fugene 6 transfekčního reagentu a Fugene HD transfekčního reagentu na buněčné linii COS-7.

Práce nejdříve v kap. 2 podává informace o tom co je transfekce a jaké pro ni existují metody. V kap. 3 je pak stručně rozebrána problematika měření vlastností iontových kanálů, k jejíž řešení tato práce přispívá. Dále v kap. 4 jsou sepsány druhy markerů používaných k odlišení úspěšně transfekovaných buněk. V kap. 5 je popis buněčných linií COS-7 a HEK-293, na kterých se zřejmě transfekce budou provádět. Průpravou pro práci v laboratoři s buněčnými liniemi je pak kap. 6. Praktickou částí je kap. 7, kde jsou protokoly pro postup při buněčné kultivaci a transfekci. V kap. 8 jsou pak uvedeny základní statistické metody pro analýzu dat. A na konec jsou transfekční reagenty mezi sebou porovnávány v kap. 9.

## 2. Transfekce

Transfekcí se rozumí přenos DNA do buňky. Transfekční DNA bývá gen [1], který se v úspěšně transfekované buňce exprimuje. Využití transfekce tedy spočívá hlavně ke studiu funkcí proteinů a ke změně vlastností buněk.

### 2.1. Transfekce stabilní a nestabilní

Podle toho jestli se přenášená DNA začleňuje do chromozomu transferovaného genu, rozlišujeme transfekci stabilní a přechodnou. Při přechodné transfekci se přenášená DNA nezačleňuje do chromozomu buňky, nereplikuje se se stejnou četností jako chromozomy buňky a z neustále se dělících se buněk se nakonec vyřadí. Při stabilní transfekci se přenášená DNA rekombinací začlení do chromozomu buňky a stane se tak součástí jejího genomu. [1] [2]

Ke stabilní transfekci dochází jen u asi  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  úspěšně transferovaných buněk. Buňky, které přenášenou DNA začleňují do svého genomu se označují jako buňky kompetentní. Dosud se ale nepodařilo zjistit co jejich kompetentnost způsobuje nebo jak je od sebe dopředu odlišit. [2]

Ke studiu funkcí proteinů většinou stačí přechodná transfekce. Stabilní se používá především k modifikaci buněčné linie pro jiné možné účely.

### 2.2. Transfekční metody

Rozlišují se tři skupiny metod pro transfekci. Jsou to metody biochemické, fyzikální a biologické. Výběr nevhodnější metody závisí na typu buněčné linie, účelu transfekce a na požadované účinnosti.

#### 2.2.1. Biochemické metody

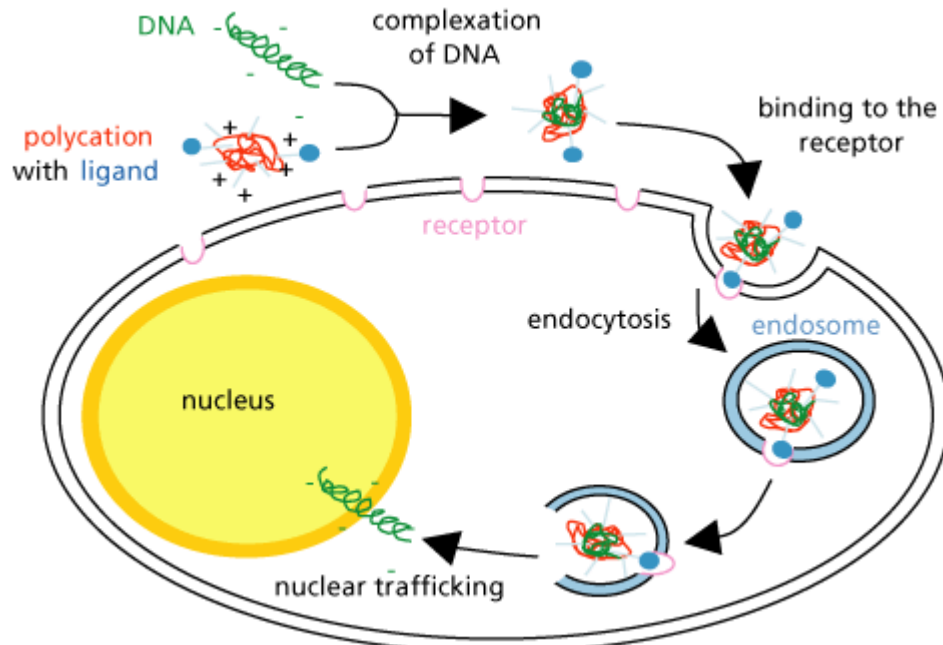
Tato metoda je použita i v této práci, proto je této podkapitole věnována zvýšená pozornost.

Podstatu biochemické metody pro transfekci schématicky znázorňuje obr.1. Principem je, že se nejdříve vytvoří komplex přenášené DNA a transfekční látky, který endocytózou přechází do cytoplazmy buňky. V buňce se působením endozomů a lysozomů začne sraženina rozkládat a přenášená DNA přejde do jádra buňky. Pak se může začít exprimovat. Neúspěšná transfekce u těchto metod znamená, že komplex DNA a transfekční látky zůstane přichycen na membráně buňky. [2] [3]

Na trhu je k dispozici celá řada komerčně dostupných transfekčních reagentů s různou úspěšností, cenou, ale i toxicitou pro různé buněčné linie. V působení se tyto transfekční reagenty mohou lišit, ale základní princip je vždy stejný.

Zvláštní pozornost si zaslouží fosforečnan vápenatý. Jeho transfekční účinky byly objeveny již v roce 1973 a stále je pro transfekci velmi často používán. Jeho hlavními výhodami je nízká cena, jednoduchá práce a velké množství buněčných linií, pro které ho lze použít. Naopak nevýhodou je toxicita a nízká úspěšnost transfekce, která obvykle dosahuje jen několika procent. [2] [3]

Významné je také využití lipidů s kladným nábojem. Elektrostatické síly spojují tyto kladně nabitě lipidy se záporně nabitou DNA do komplexu. Tyto komplexy pak fúzí s plazmatickou membránou, nebo se přes ni přenáší endocytózou. Jak se DNA uvolňuje z komplexu s lipidem zatím není objasněno. Zvláštností této metody je, její možnost ji použít in vivo. Lipidová metoda má ale také jen velmi nízkou úspěšnost transfekce. [2] [3]



Obr 1 - Schématické znázornění transfekce biochemickou metodou [4]

### 2.2.2. Fyzikální metody

Elektropolaci lze použít pro transfekci všech bakteriálních, rostlinných a savčích buněk. Jejím principem je působení krátkého elektrického impulsu o vysokém napětí na plazmatickou membránu buňky, což způsobí tvorbu pórů v membráně. Přes tyto póry může procházet cizorodá DNA. Pro různé buněčné typy se volí různá síla elektrického impulsu. Velikost elektrický impulsu ovlivňuje účinnost transfekce, avšak tento impuls buňky může zahubit a tak je jeho velikost omezena. Kromě velikosti a délky elektrického impulsu účinnost metody dále ovlivňuje především konformace a koncentrace DNA, teplota a složení iontového média. [2] [3]

Dále se používá zařízení označované jako genová puška (z angl. „gene gun“). Jeho principem je vstřelování mikroskopických kovových částíček, pokrytých transfekční DNA, přímo do buňky. Tato metoda je zvláště významná pro různé buněčné typy (hlavně rostlinné) a buněčné organely, které při elektropolaci zůstávají vůči příjmu cizorodé DNA odolné. [2] [3]

Mikroinjekce je metoda, kdy se roztok s DNA vstříkne přímo do jádra buňky pomocí tenké jehly. Tato metoda se používá ke transfekci oocytů a kmenových embryonálních buněk. Jelikož se každá buňka transfekuje zvláště, má tato metoda jen omezené, ale specifické využití. [2] [3]

### 2.2.3. Biologické metody

K přenosu cizorodé DNA do eukaryotických buněk lze použít viry. Jejich životní cyklus zahrnuje přenos jejich vlastního genetického materiálu přes plazmatickou membránu

buňky a následnou expresi jejich vlastních genů. Pro transfekční účely se vytváří speciální virové vektory, připravené rekombinací přijmout cizorodou DNA. Zvláště vhodné jsou retroviry. Použitím retrovirů se dosahuje vysoké transfekční účinnosti. DNA viru se přepíše do RNA a ta se zpětnou transkriptázou přepíše zpět do DNA, která se integruje do chromozomu infikované buňky. Použití retrovirů je tedy vhodné pro stabilní transfekci. Tato metoda má ale i své nevýhody. Hlavními nevýhodami použití retrovirů je odolnost některých typů buněk vůči infekci a riziko, že retrovir v sobě stále nese svůj původní gen, který způsobuje nežádoucí účinky. [2] [3]

### 3. Využití transfekčních metod pro studie bioelektrických jevů

Využití transfekčních metod pro studování vlastností transmembránových bioelektrických jevů se začíná rozvíjet od počátku devadesátých let minulého století spolu s tím, jak se zároveň začaly rozvíjet transfekční metody a metody měření bioelektrických jevů na izolovaných buňkách metodou patch clamp. Metodou patch clamp (česky též metoda měření z terčíkového zámku) nazýváme metodu využívající skleněných elektrod k měření elektrofyziologických vlastností buněčných membrán a jejich komponent. Podrobnější popis této metody je v podkapitole 3.1.

Klasický přístup studií elektrofyziologických vlastností buněčných membrán je založen především na měření na izolovaných buňkách, například kardiomyocytech. Přes jistou nenahraditelnost experimentů na izolovaných buňkách, tento přístup má i několik nesnází. Tou nejvýraznější je, že eukaryotické buňky exprimují celou řadu genů iontových kanálů s velmi podobnými vlastnostmi a podobnou citlivostí na farmaka. Bývá pak obtížné rozlišit vliv jednotlivých genů na dané elektrofyziologické vlastnosti membrán. Excitabilní buňky navíc obsahují ještě větší škálu různých typů iontových kanálů, jejichž popis a studium interakce s různými látkami je důležité ve farmakologickém výzkumu a v mnoha lékařských odvětvích. Studium detailních vlastností konkrétní iontové složky transmembránového proudu (zprostředkované daným typem iontového kanálu) pak vyžaduje použití různých specifických blokátorů, které mohou ovlivňovat i studovaný iontový kanál. Výše uvedené problémy se však dají zmírnit právě využitím transfekčních metod. Typicky pak daná studie probíhá tak, že nejprve je identifikován gen, kódující transmembránový protein našeho zájmu, který se vyizoluje, inkorporuje do vhodného vektoru a transfekuje do eukaryotické buňky s minimem vlastních proudových složek [5][6][7]. Změřené proudové charakteristiky pak odpovídají pouze vlastnostem zkoumaného iontového kanálu, receptoru, nebo přenašečového systému. Za další výhodu lze uvést i to, že pro výsledné studie je možno snížit nebo zcela eliminovat spotřebu laboratorních zvířat.

Současné experimenty konané na Ústavu biomedicínského inženýrství se zaměřují na návrh nové metodiky analýzy dynamických komponent iontových složek transmembránového proudu kardiomyocytů založené na vyhodnocování a měření frekvenčně-admitančních charakteristik. Jelikož je potřeba studovat detailní vlastnosti jednotlivých proudových komponent, využití vlastních transfekovaných buněk se jeví jako velice potřebné. Studium se bude zaměřovat hlavně na hlavní komponenty celkového membránového proudu srdeční buňky, uvedeného v tab. 1 a to za pomoci patch clampové metody

**Tab 1 - hlavní komponenty u průběhu srdečního ventrikulárního akčního potenciálu [8]**

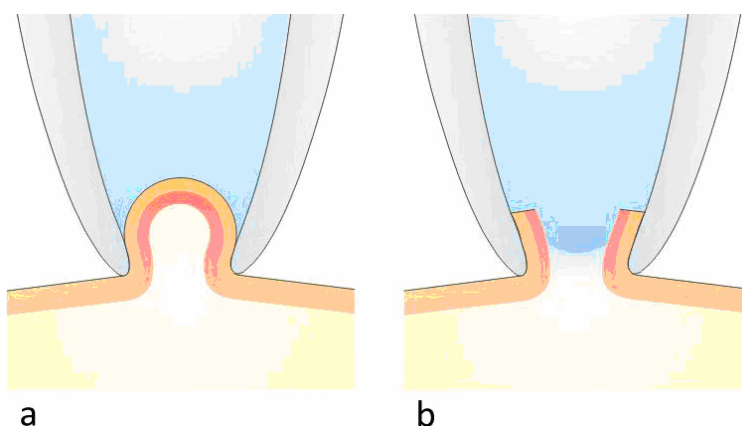
| Iont                          | Proud              | $\alpha$ podjednotka proteinu                | Gen pro $\alpha$ podjednotku | Funkce             |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------------------------|------------------------------|--------------------|
| $\text{Na}^+$                 | $I_{\text{Na}}$    | $\text{Na}_v1,5$                             | SCN5A                        | 0                  |
| $\text{Ca}^{2+}$              | $I_{\text{Ca(L)}}$ | $\text{Ca}_v1,2$                             | CACNA1C                      | 0-2                |
| $\text{K}^+$                  | $I_{\text{to1}}$   | $\text{K}_v4,2/4,3$                          | KCND2/KCND3                  | 1, zářez (notch)   |
| $\text{K}^+$                  | $I_{\text{Ks}}$    | $\text{K}_v7,1$                              | KCNQ1                        | 2,3                |
| $\text{K}^+$                  | $I_{\text{Kr}}$    | $\text{K v 11,1 (hERG)}$                     | KCNH2                        | 3                  |
| $\text{K}^+$                  | $I_{\text{K1}}$    | $\text{K}_{ir}2,1/2,2/2,3$                   | KCNJ2/KCNJ12/KCNJ4           | 3,4                |
| $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ | $I_{\text{NaCa}}$  | $3\text{Na}^+ - 1\text{Ca}^{2+}$ výměna      | NCX1 (SLC81A)                | iontová homeostáza |
| $\text{Na}^+, \text{K}^+$     | $I_{\text{NAK}}$   | $3\text{Na}^+ - 2\text{K}^+ - \text{ATPáza}$ | ATP1A                        | iontová homeostáza |
| $\text{Ca}^{2+}$              | $I_{\text{DPS}}$   | $\text{Ca}^{2+} - \text{transportní ATPáza}$ | ATP1B                        | iontová homeostáza |

### 3.1. Metoda měření terčíkového zámku (patch clamp)

Hlavním problémem při měření el. jevů na buněčné membráně je získání elektrického kontaktu s intracelulárním prostorem buňky bez jejího funkčního poškození. Při měření metodou patch clamp se tak děje za pomoci speciálních skleněných mikroelektrod.

Mikroelektrody jsou tenké skleněné trubičky vytažené pod žhavicí spirálou do ostré špičky a naplněné vhodným vodivým roztokem. Charakteristickým znakem patch clampových elektrod je zvětšení vstupního otvoru elektrody dalším žhavením, což vede k výraznému snížení sériového odporu elektrody. K získání elektrického kontaktu pak obecně nedochází přímým proniknutím elektrody do buňky, ale jejím přisátím k buněčné membráně a jejím protržením. Jednotlivé varianty této metody jsou rozebrány níže. [9]

Měření patch clamp v režimu vnuceného napětí umožňuje snímat proudy procházející buď buněčnou membránou celé buňky (v tom případě je výstupní proudy spojitou funkcí času), nebo jen z útržku membrány přilepené na špičce skleněné elektrody (odtud název patch clamp), viz obr. 2. Za předpokladu, že tento útržek obsahuje pouze jediný iontový kanál, výstupním signálem pak je stochastický (pulsní) signál proudu. Tento kanál prochází skrz nevodivé stavy a (z pravidla) jediným vodivým stavem. Pokud je kanál otevřen, výstupní proud je konstantní. Pravděpodobnost otevření, či zavření kanálu je závislá na přiloženém membránovém napětí. Podmínkou tohoto způsobu měření je dokonalé přisátí mikroelektrody k povrchu buňky (to je kontrolováno dosažením gigaohmového odporu spojení elektroda-buňka – anglicky „gigaseal“). [9]



Obr 2 - varianty metody patch-clamp, a – měření z části membrány, b – měření z celé buňky [10]

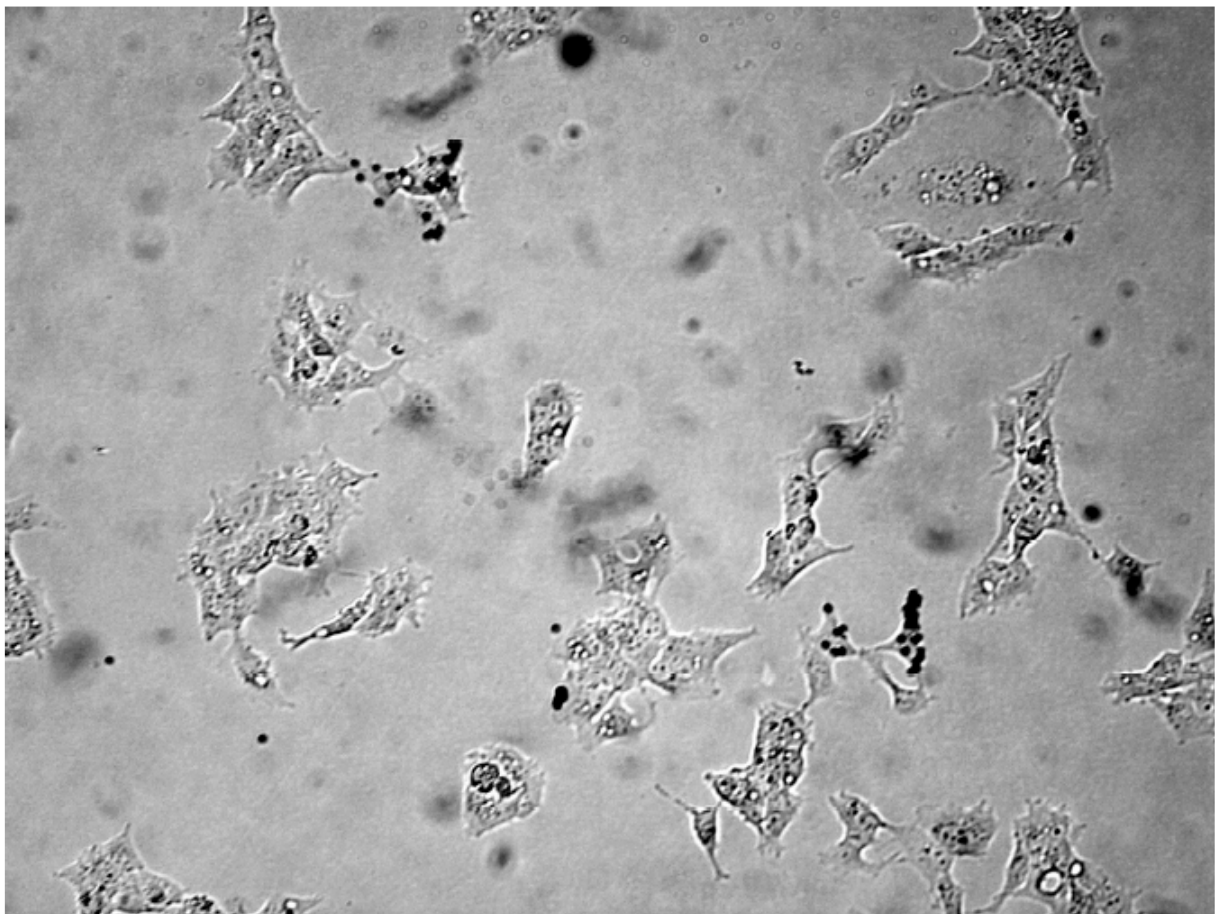
## 4. Reportérské geny

DNA používaná pro transfekci se používají kružnicová, tj. cDNA, bez volných konců. Tyto cDNA zpravidla kromě studovaného genu nesou i další geny, které umožňují rozlišovat mezi buňkami, které se transfekovaly a těmi které ne. Geny kódující proteiny, které toto rozlišení umožňují se nazývají reportérské geny. Reportérským genem nebo-li markerem může být například gen kódující zelený fluorescenční protein, nebo geny kódující antigen, který pak bude reagovat se značenou protilátkou.

### 4.1. Marker CD8 Dynabeads

Jednou z možností je využití specifických vazeb typu protilátka-antigen. Příkladem je CD8 Dynabeads. CD8 je membránový receptor T-lymfocytů na který se vážou imunogeny. Dynabeads jsou superparamagnetické polymerní částice se speciálně upraveným povrchem pro interakce s jinými molekulami. [11] CD8 Dynabeads mají potom povrch upravený pro specifické interakce s CD8 receptory.

Jako reportérský gen se použije DNA kódující CD8 receptor. Po transfekci se k buňkám přidají kuličky Dynabeads, které se začnou na CD8 receptor vázat. Dynabeads jsou patrné pod mikroskopem, což umožňuje odlišení úspěšně transfekovaných buněk. Díky magnetickým vlastnostem Dynabeads lze pak úspěšně transfekované buňky separovat od ostatních. [12]

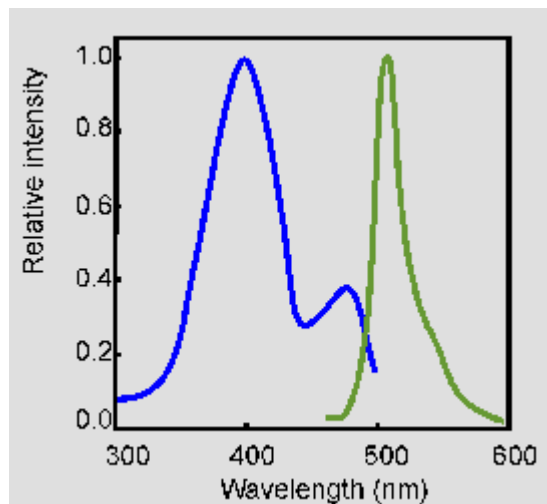


Obr 3 - ukázka buněk s navázanými Dynabeads

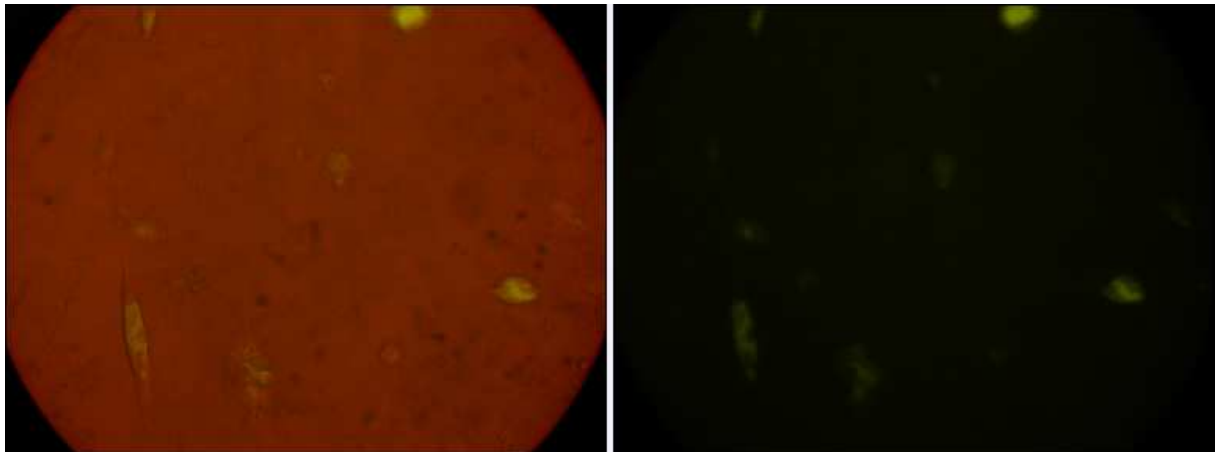
## 4.2. Marker GFP

GFP je zkratka pro zelený fluorescenční protein. DNA sekvence tohoto proteinu se vkládá do vektoru cDNA spolu se studovaným genem a po transfekci této cDNA se vyhodnotí úspěšnost transfekce právě pomocí fluorescence GFP. GFP začne zeleně fluoreskovat až po ozáření modrým světlem. Vyhodnocení svícení GFP se provádí pod fluorescenčním mikroskopem.

Nejvyššího emisního vrcholu 509 nm se dosáhne při vrcholu excitace 395 nm. V molekulární biologii se dále používá jako součást regulačních sekvencí genů, k vyhodnocení míry exprese příslušných genů. Nevýhodou GFP je to, že tento způsob rozlišení buněk nemusí být vhodný pro některé následné manipulace s buňkami. [13]

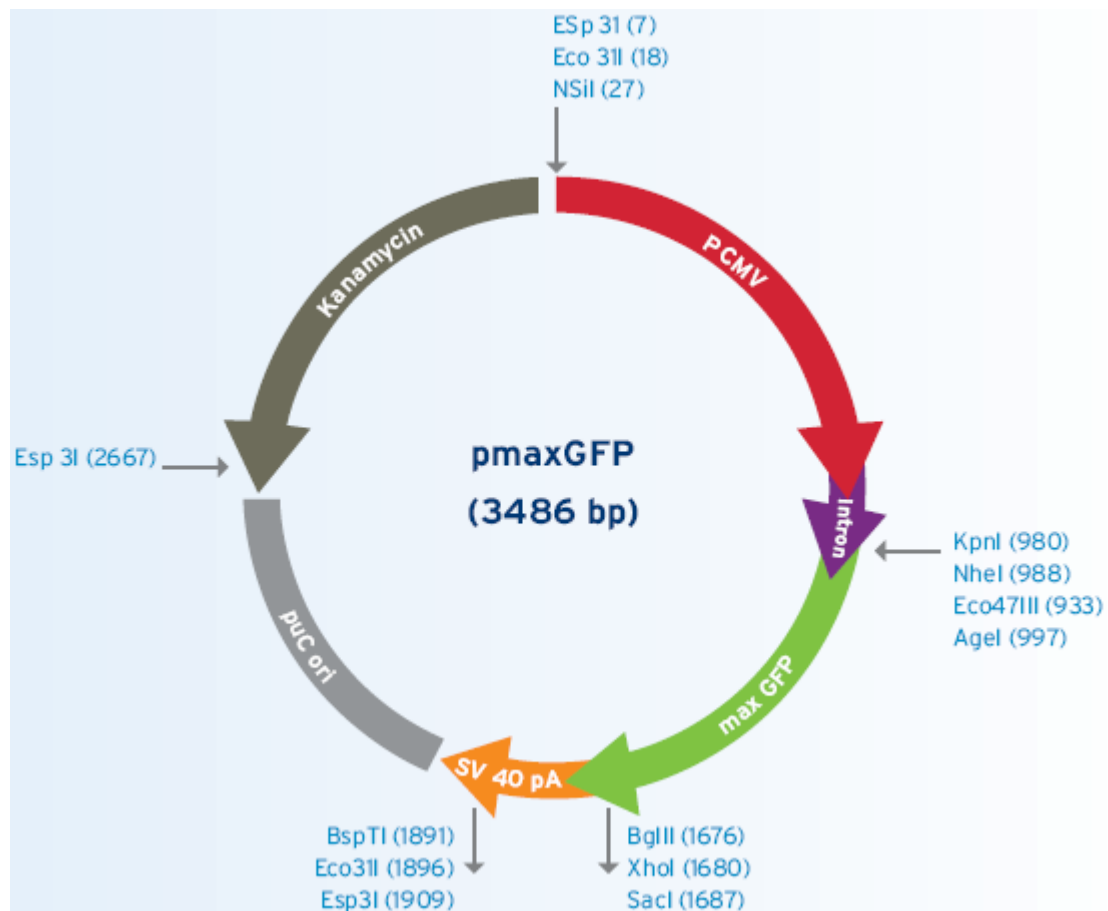


Obr 4 - spektrum GFP, modrá křivka je excitace, zelená křivka je emise [14]



Obr 5 - buňky označené GFP markrem, vlevo ve světle, vpravo ve tmě

Na obr. 6 je ukázka konkrétní mapy plazmidu pro značení úspěšně transfekovaných buněk. Tento plazmid obsahuje hlavně promotor SV40 viru, replikační místo ori, gen rezistence na selekční antibiotika Kanamycin a gen kódující max GFP.



Obr 6 - plazmid pmaxGFP [15]

#### 4.3. Selekční marker pro stabilní transfekci

V případě tvorby nové buněčné linie obsahující novou vlastnost získanou transfekcí DNA, je potřeba rozlišit mezi buňkami, které se transfekovali stabilně a buňkami, které se transfekovali přechodně. K tomu se používá selekční marker, nejčastěji DNA kódující rezistenci na určité antibiotikum. Toto DNA nemusí být součástí původní transfekční směsi, protože kompetentní buňky zařadí do svého genu každou cizorodou DNA přijatou transfekcí. Po přidání antibiotika pak buňky bez rezistence na toto antibiotikum vymírají. Nestabilně transfekované buňky se vyvedí. Celý proces tak zabere 2 až 3 týdny. [2]

## 5. Buněčné linie

Buněčná kultura je systém kultivace prokaryotických, eukaryotických nebo rostlinných buněk *in vitro* za specifických podmínek. Primární buněčné kultury vznikají enzymatickým rozvolnění tkání. Jsou to buňky kultivované přímo z tkání a mají omezenou schopnost se dělit. Často se jedná i o směs více druhů buněk z rozvolněné tkáně. Z nich se pak selektuje jediný typ buněk. Tyto buňky se pak immortalizují působením chemickými či fyzikálními karcinogeny, čímž získají neomezený počet dělení a začnou se neustále množit. Takto upravené buňky se označují jako buněčné linie. [16]

### 5.1. Buněčná linie COS-7

COS-7 buněčná linie pochází z buněk ledviny Kočkodana zeleného (*Cercopithecus aethiops*). Jedná se o adherentní buňky s morfologií fibroblastů (buňky vaziva). Tyto buňky obsahují defektní mutantu genu SV40. Původní gen SV40 je virus přeměňující normální buňky na nádorové. Zmutovaná verze SV40 genu použitá v COS-7 produkuje volný velký T-antigen, ale již postrádá své původní replikační geny. Po transfekci plazmidu obsahující promotor SV40, tento volný velký T-antigen nasedá na sekvenci SV40 promotoru a způsobí replikaci plazmidu. To má za následek zvýšení transkripce přeneseného genu. COS-7 buněčná linie je proto vhodná pro transfekci DNA začleněných do vektorů, které obsahují promotor tohoto viru. Díky tomu COS-7 buněčná linie dosahuje vysoké exprimace proteinů přenesené DNA. Tato linie je proto vhodná pro studium proteinů a virů s SV40. [17] [18]

COS-7 buněčná linie se prodává za cenu od 175 až 300 € i více. Záleží na jestli se má být zmrazena v kryolahvičce (levnější varianta), nebo přijít jako již rostoucí kultura. Obsahu buněk v kryolahvičce je 5000mg/ml. V ceně není zahrnuta cena za dopravu, která může přesáhnout i 40 €. To záleží hlavně na zemi, ze které se dováží. [19] [20]

### 5.2. Buněčná linie HEK-293

Buněčná linie HEK 293 je odvozena u embryonálních buněk ledviny člověka. Jejich původ není ovšem úplně jistý. Nejsou vhodným modelem pro studia chování buněk, ale díky jejich velmi snadné kultivaci a transfekci se staly v biotechnologiích široce používanou buněčnou linií. U kalcium fosfátové metody se úspěšnost transfekce blíží až 100%. Využívají se tedy hlavně ke studiím proteinů. Tato buněčná linie je adherentní. [21]

Cena této buněčné linie je stejná jako u COS-7 buněčné linie. [22]

## 6. Práce v laboratoři

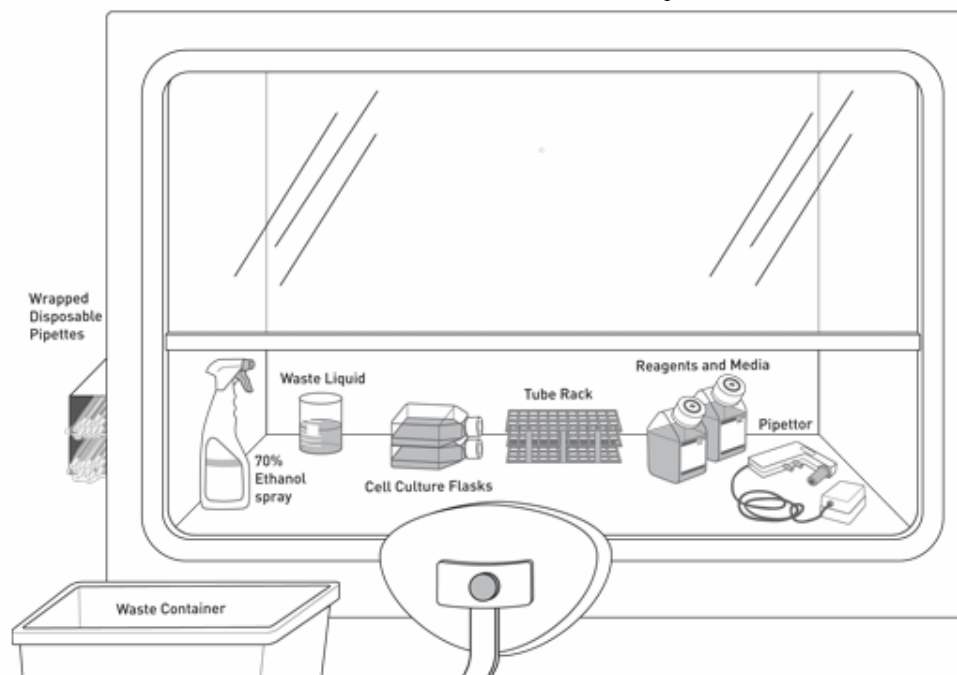
### 6.1. Úvod do práce v laboratoři

Při práci v laboratoři s buněčnými liniemi je velmi důležitá sterilita práce a prostředí. V otevřeném prostoru se s buňkami pracuje výhradně v laminárních boxech. Ty jednak vytváří vzduchovou stěnu přes kterou se nedostanou mikroorganismy a také filtrují vzduch uvnitř boxu. Běžně používané HEPA filtry dokáží odfiltrovat 99,97% částic o velikost 300 nm. [23]. Nebezpečí vniku mikroorganismu do boxu spočívá hlavně při vkládání laboratorních pomůcek a rukou pracovníka do boxu. Všechny vkládané laboratorní pomůcky se před vložením do boxu sterilizují jednorázovým ubrouskem a 70% alkoholem. Pracovníci používají jednorázové laboratorní rukavice, které se také sterilizují pomocí ubrousku a alkoholu. Při pohybu rukama v boxu se nesmí přejíždět nad otevřenými zkumavkami s buňkami a ani nad ničím jiným co přijde do kontaktu s buňkami. To neplatí jen pro různé roztoky, ale i např. pro špičky pipet. Správné znázornění pipetování, při kterém nehrozí kontaminace buněk je znázorněno na obr.7. [24] [25]



Obr 7 - Znázornění správného způsobu pipetování, vlevo do kultivační lahvičky, vpravo do centrifugační zkumavky [26]

Ukázkové rozložení věcí v laminárním boxu zobrazuje obr. 8.



Obr 8 - rozložení věcí v laminárním boxu [27]

I při důsledném těchto pravidel může ke kontaminaci buněk dojít. Odborníci z dlouhodobými zkušenosti tvrdí, že zvláště začátkem podzimu jsou buňky nejnáchylnější k bakteriálním kontaminacím. Aby se riziko kontaminace co nejvíce snížilo, často se k buňkám přidávají antibiotika a antimykotika. Na druhou stranu, tyto látky také mohou infekci skrýt, což ovlivní vlastnosti buněk. Samotná antibiotika jsou navíc také podezřelá, ze snižování účinnosti některých transfekčních reagentů. [24]

Pokud ke kontaminaci dojde, buňky se buďto začnou léčit ještě silnějšími antibiotiky, což je zdlouhavý a dosti nejistý proces, nebo se rovnou zlikvidují, sterilizuje se laboratoř i inkubátor a začne se pracovat s novými buňkami. [24]

Kultivační médium, zajišťuje buňkám všechny potřebné látky k množení. Kultivační média se kupují, nebo si je větší laboratoře dělají samy. Jejich životnost bývá poměrně omezen, obvykle výrobce garantuje jejich nezávadnost na 1 měsíc, proto se častěji kupují jako polotovary ze kterých se připravují. Do kultivačních médií se běžně přidává FBS (fetální bůviné sérum). To značně urychluje proliferaci buněk, ale zároveň díky svému nedefinovanému složení není vhodné pro některé studie. Není tedy, stejně jako antibiotika a antimykotika, vždy součástí kultivačního média. Dále se do kultivačního média přidává L-glutamin. [24]

Lahvičky s buňkami se uchovávají v inkubátorech. Ty zajišťující vhodné podmínky pro množení buněk. Těmi jsou teplota 37°C, atmosféra s 5% CO<sub>2</sub> a relativní vlhkost 90%. [24]

Buňky v kultuře rostou přibližně exponenciálně až do doby, kdy se z důvodu kontaktní inhibice začne buněčná proliferace zpomalovat. Fáze exponenciálního se označuje jako log-fáze a začínající zpomalování proliferace se označuje jako plató. Buňky se pěstují v log-fázi a ještě před dosažení plató se disociují (např. pomocí EDTA), naředí a přenesou do nových kultivačních nádob s čerstvým médiem, kde mohou znovu růst exponenciálně. To jak moc je buněk v kultivační nádobě se určuje jako konfluence. Její hodnota se udává v procentech. Při 100% konfluenci buňky vytvoří souvislou vrstvu vzájemně se dotýkajících buněk a začnou zanikat v důsledku absence signálních drah. Míra konfluence se určuje pouze odhadem, pozorováním buněk v kultivační lahvičce pod mikroskopem. [24] [25]

Je-li potřeba buňky přesně spočítat, nechává se vzorek média obsahující buňky projet průtokovým cytometrem popř. čítačem částic, který spočítá množství buněk ve vzorku. Při zjišťování úspěšnosti transfekce lze u adherentních buněk nechat zkumavku na několika místech nasnímat přes mikroskop a úspěšnost transfekce zjistit jako poměr úspěšně transfekovaných buněk k celkovému počtu buněk.

Při centrifugami je vhodné použít protizávaží, tj. v centrifuze se naproti centrifugační zkumavce s buňkami v kultivačním médiu umístí jiná centrifugační zkumavka se stejným množstvím vody. Tak se sníží zatížení rotoru centrifugy a prodlouží se životnost přístroje. I když je již mnoho moderních centrifug vybaveno integrovaným protizávažím, je jistější tuto zásadu dodržet.

Pro odsávání médií od buněk se používá peristaltická pumpa. Odsáváním se rozumí přepipetování média pipetou se sterilní špičkou do libovolné kádinky a teprve s ní se médium odsaje peristaltickou pumpou do odpadu. Tím se zajistí dostatečná sterilita.

Ke skladování buněk se používají buď hlubokomrazicí boxy, kde se buňky uchovávají při teplotách -80°C nebo se mrazí v párách kapalného dusíku. To je sice dražší a náročnější způsob mražení, ale buňky takto vydrží životaschopné velmi dlouhou dobu. [24]

Odpad vznikající při práci, jako jsou plastové zkumavky nebo špičky pipet se vhazují do speciálních nádob, jejichž obsah se likviduje ve spalovnách. Dělá se to proto, že látky jako jsou třeba antibiotika by se mohli dostat do přírody a vytvořit nové, těmto antibiotikům odolné kmeny bakterií.

## 6.2. Vysvětlení vybraných pojmů a funkcí látek

**DMEM** – nebo-li Dulbecco's Modified Eagle Medium. Toto médium je hlavní složkou kultivačního média. Obsahuje hlavně aminokyseliny, vitamíny a anorganické soli. [28]

**DMSO** – nebo-li Dimethyl sulfoxide. Jedná se o látku pro zajištění přežití buněk při jejich zamrazování. Zabraňuje krystalizaci vody, takže buňky ani při velmi nízkých teplotách nepopraskají. DMSO je pro buňky při běžných teplotách velmi toxické. Proto je nutné při zamrazování buněk je dát co nejdříve mrazit a při rozmrazování zahřáté DMSO s buňkami co nejrychleji rozředit (např. DMEM). [29]

**FBS** – je zkratka pro Fetální Bóviné Sérum. Toto sérum se získá odstraněním koagulačních faktorů z plazmy, která pochází z plodu skotu. Díky vysokému obsahu růstových faktorů a naopak nízkému obsahu protilátek se toto sérum běžně používá jako součást kultivačního média. [30]

**L-glutamin** – je jednou z 21 kódovaných aminokyselin. V kultivačním médiu působí jako hlavní zdroj energie pro buňky. Ovšem jeho přidáním do kultivačního média (DMEM), se životnost tohoto média značně zkrátí. Proto se do médií L-glutamin přidává až dodatečně (ikdyž DMEM již malé množství L-glutaminu již obsahuje). [31]

**OptiMEM** – je médium obsahující snížené množství séra. Používá se při práci s některými transfekčními reagenty. Není-li k dispozici, lze ho nahradit čistým DMEM. [32]

**PBS** – je zkratka pro phosphate buffered saline. Je to stabilizační roztok obsahující chlorid sodný a fosforečnan sodný, někdy dále obsahuje i chlorid draselný a fosforečnan draselný. Používá se k oplachování kultivačních lahvíček obsahujících buňky. [33]

**Pellet** – dá se z angličtiny přeložit jako sraženina. Vzniká po centrifugaci buněk na dně zkumavky. Je to okem viditelná hmota tvořená buňkami. Nemusí být ale vždy patrná, viditelnost závisí na množství buněk.

**Penicilin** – jedná se o antibiotika ničící bakterie z možných kontaminací, které se k buňkám dostaly. Přidává se spolu s streptomycinem do kultivačního média.

**Resuspendace** – v protokolech se uvádí vždy resuspendovat pellet. Tím se myslí několikrát opakované nasátí a znovu napipetování média ve zkumavce pipetou. To má za následek, že buňky, které se srazily do pelletu, se znovu uvolní volně do média.

**Streptomycin** – jedná se o antimykotikum. Antimykotika léčí mykózy vyvolané houbami či kvasinkami, které se k buňkám dostaly. Přidává se spolu s penicilínem do kultivačního média.

**Supernanta** – dá se z angličtiny přeložit jako kal, což je dosti zavádějící význam. V protokolech se uvádí vždy jen odsát supernantu, čímž se myslí, že se po centrifugami zkumavky odsaje horní část roztoku ze zkumavky a nechá se jen spodní část cca. 1 ml, která obsahuje pellet.

**Trypsin-EDTA** – Trypsin slouží k uvolnění adherentních buněk ze stěny kultivační lahvičky. EDTA je polyaminokarboxylová kyselina, která disociuje buňky a zabraňuje jejich shlukování. [34]

### **6.3 Seznam potřebných přístrojů**

Laboratoř E220 na Ústavu biomedicínského inženýrství je vybavena tímto potřebným přístrojovým vybavením:

- centrifuga Hettich EBA 20 – max. rpm. 6000,
- centrifuga Hettich MIKRO 200 – max. rpm. 14000,
- třepačka GFL 3017,
- minitřepačka IKA MS3,
- laminární box BIOAIR Aura Mini,
- hlubokomrazicí box – nastavitelná teplota až do -85°C,
- suchá lázeň Grant LTD,
- vodní lázeň Julabo ED-5,
- sušárna Venticell 55 Standard
- inkubátor CO2cell 170 Standard,
- inkubátor Incucell 22 Comfort.

## 7. Protokoly

Protokoly jsou přesně popsané postupy pro práci a manipulaci s buněčnými liniemi. Následující protokoly jsou psány podrobně tak, aby i začátečník bez předchozích zkušeností s prací na buněčných liniích v laboratoři, byl schopen s buňkami pracovat. Přesto je nutná znalost informací z podkapitol 6.1. a 6.2.

Důležité je připomenout, že kultivační protokoly (7.1. a 7.2.) jsou optimalizovány pro COS-7 buněčnou linii, která je adherentní. Kultivační protokoly lze i bez větších změn použít i pro jiné buněčné linie, ale v případě že by tato buněčná linie nebyla adherentní, je potřeba v některých bodech zcela změnit postup.

Použitou literaturou kapitoly je [35] [36] [37]

### 7.1. Příprava buněčné kultury

1. Příprava 50 ml finálního kultivačního media obsahující DMEM s 10% FBS, 1% L-glutaminu a 1% penicilin-streptomycinu, tj. Do 50 ml centrifugační zkumavky přidat 5 ml FBS, 0,5 ml L-glutaminu, 0,5 ml penicilin-streptomycinu a 44 ml čistého DMEM
2. Pomalu rozmrazit buňky ve vodní lázni, pokud suspenze s mraženými buňkami obsahuje DMSO, je potřeba po jejich rozmražení DMSO co nejrychleji zředit (krok 5). DMSO je totiž pro buňky velmi toxické.
3. Očistit zkumavky alkoholem
4. Pomocí pipety přenést buňky (1 ml) do 15 ml sterilní centrifugační zkumavky a přidat 10 ml čistého DMEM zahřátého na 37 °C
5. Provést centrifugami 900 ot/min po 3 minuty. Po centrifugami by na dně zkumavky měl být (ale nemusí) patrný buněčný pellet.
6. Odsát supernantu (tj. nechat ve zkumavce asi 1 ml roztoku na dně zkumavky), přidat 1 ml čistého DMEM zahřátého na 37 °C a zkumavku jemně protřepat
7. Vzniklou suspenzi pipetou přemístit do kultivační lahvičky, doplnit 4 ml finálního kultivačního média zahřátým na 37 °C a s lahvičkou na ležato provést jemné krouživé pohyby do osmičky.
8. Buňky ještě v lahvičce zkontrolovat pod mikroskopem – buňky s kruhovými tvary jsou živé (platí pro COS-7).
9. Lahvičku označit a uložit ji na 3 dny do inkubátoru.

## 7.2. Pasážování buněk

1. Buňky v lahvičce zkontrolovat pod mikroskopem – živé buňky jsou přichycené na stěnách lahvičky a mají neurčitý tvar rozplásklé chobotnice, mrtvé buňky jsou volné a kruhové (platí pro COS-7).
2. Odsát médium z lahvičky s buňkami za pomoci peristaltické pumpy.
3. Do lahvičky s buňkami přidat 5 ml PBS a pak ho odsát. Po-té přidat PBS ještě jednou a znovu ho odsát. PBS slouží k propláchnutí lahvičky.
4. Přidat do lahvičky s buňkami 5 ml PBS a 5 ml trypsinu-EDTA. Trypsin-EDTA slouží k uvolnění buněk od stěn lahvičky. Nechat tyto látky působit cca. 5 minut. Poklepat na lahvičku z boku dlaní k uvolnění buněk.
5. Buňky v lahvičce zkontrolovat pod mikroskopem – buňky by měly být všechny uvolněné od stěny lahvičky a mohou mezi sebou navzájem vytvářet shluky. Tyto shluky jsou tím menší čím déle působí trypsin-EDTA. V pokračování v další práci je nutno aby buňky byly všechny volné, případně aby shluky byly co nejmenší. Pokud ne, nechat PBS a trypsin-EDTA působit déle nebo ho ještě trochu přidat.
6. Přidat 5 ml finálního kultivačního média zahřátého na 37 °C. FBS, které finální kultivační médium obsahuje, zastaví působení trypsinu-EDTA. Lahvičku tímto médiem, propláchnout.
7. Přepipetovat buňky s finálním kultivačním médiem do 15 ml centrifugační zkumavky.
8. Centrifugovat 900 ot/min po dobu 3 minut.
9. Odsát supernantu, za současného zachování buněčného peletu v 1 ml média.
10. Resuspendovat pelet 15 opakovanými nasátí do špičky pipety a zpětným napipetováním.
11. Založit dvě nové kultivační lahvičky obsahující 5 ml finálního kultivačního média a 0,5 ml buněk z centrifugační zkumavky.
12. Buňky ještě v lahvičce zkontrolovat pod mikroskopem – buňky s kruhovými tvary jsou živé (platí pro COS-7).
13. Lahvičky označit a uložit je na 3 dny do inkubátoru.

### **7.3. Zamražování buněk**

1. Centrifugovat buňky 900 ot/min. po dobu 3 minut
2. Připravit mrazicí roztok: smíchat 1 ml studeného FBS s 0,5 ml sterilního DMSO
3. Po centrifugaci odsát supernantu a resuspendovat buněčný pellet v 3,5 ml studeného DMEM
4. Přidat směs FBS+DMSO do média obsahujícího buňky. Smíchat směs jemným zatřepáním zkumavkou nahoru dolů.
5. Rozdělit buňky do 5 kryolahviček, označit zkumavky buněčným typem, pasážním číslem, jménem a datem
6. Umístit zkumavky do svislé polohy ve stojanu mrazáku na 24 hodin při -80 °C. Pak je přendat ke kapalnému dusíku.
7. Aktualizovat seznam umístění zkumavky ve skladovací kontejneru, buněčný typ, pasážní číslo, atd.

## 7.4. Transfekce fosforečnanem vápenatým

### Postup:

1. Zkontrolovat buňky pod mikroskopem. Míra konfluence buněk by měla následující den, tj. den provedení transfekce, odpovídat 50 až 80%.
2. Napipetovat 10 ml média s buňkami do 100 mm Petriho misky. Inkubovat buňky přes noc.
3. Další den ráno nahradit 8 ml kultivačního média čerstvým kultivačním médiem.
4. Rozmrazit 0,03 ml 250 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,5 ml 2xHEBS.
5. Do mikrozkušavky napipetovat 0,5 ml 2xHEBS a po-té 30 µg DNA.
6. Na mikrozkušavku jemně poklepat k promíchání složek.
7. Velmi pomalu po kapkách přidat 30 µl CaCl<sub>2</sub> do mikrozkušavky obsahující 2xHEBS a DNA.
8. Na mikrozkušavku jemně poklepat k promíchání složek.
9. Nechat mikrozkušavku odstát po 20 minut při pokojové teplotě.
10. Přidat tuto transfekční směs pipetou po kápkách k buňkám.
11. Pro promíchání složek jemně naklánět Petriho misku. Nevířit.
12. Inkubovat buňky 1 den.
13. Vyměnit kultivační médium za čerstvé.
14. Inkubovat buňky 1 až 2 dny.

### Příprava roztoků:

|                           |                                         |                                                                                  |
|---------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| CaCl <sub>2</sub> 250 mM: | 250 mM CaCl <sub>2</sub>                | = 2,775 g ve 100ml H <sub>2</sub> O                                              |
| 2xHEBS:                   | 274 mM NaCl                             | = 1,6g ve 100 ml H <sub>2</sub> O                                                |
|                           | 40 mM Herpes                            | = 1,0 g ve 100 ml H <sub>2</sub> O                                               |
|                           | 12 mM Dextrose                          | = 0,2 g v 100 ml H <sub>2</sub> O                                                |
|                           | 10 mM KCl                               | = 0,074 g ve 100 ml H <sub>2</sub> O                                             |
|                           | 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | = 0,02 g ve 100 ml H <sub>2</sub> O (použít bezvodou formu, protože je bez Rnáz) |

Tyto roztoky uchovávat při -80°C

### Poměry látek:

V tab. 2. jsou doporučené poměry látek.

Tab 2 - poměry látek [27]

| Miska            | Kultivační médium | 2xHEBS | 2,5mM CaCl <sub>2</sub> | DNA    |
|------------------|-------------------|--------|-------------------------|--------|
| 24-jamková miska | 0,5 ml            | 18 µl  | 1,1 µl                  | 1,1 µg |
| 12-jamková miska | 1 ml              | 36 µl  | 2,1 µl                  | 2,1 µg |
| 6-jamková miska  | 2 ml              | 86 µl  | 5,1 µl                  | 5,1 µg |
| 35 mm miska      | 2 ml              | 71 µl  | 4,3 µl                  | 4,3 µg |
| 60 mm miska      | 5 ml              | 186 µl | 11 µl                   | 11 µg  |
| 100 mm miska     | 10 ml             | 500 µl | 30 µl                   | 30 µg  |

## 7.5. Transfekce Fugene 6

### 1. Příprava buněk den před transfekcí

- Zkontrolovat buňky pod mikroskopem. Míra konfluence buněk by měla následující den, tj. den provedení transfekce, odpovídat 50 až 80%.
- Antibiotika snižují úspěšnost transfekce.
- Napipetovat médium s buňkami do 6-jamkové misky. Do každé jamky přidat 2 ml média, které obsahuje 100 000 až 300 000 buněk (50 000 až 150 000 buněk/ml). Jamky označit podle Tab. 3.

### 2. Příprava komplexu

- Připravit šest mikrozkušavek – “ependorfky“ a označit je podle Tab. 3.
- Vyndat Fugene 6 reagent z ledničky nebo mrazicího boxu a nechat ho ohřát na pokojovou teplotu. Mezitím zkontrolovat buňky pod mikroskopem. Ujistit se, že vypadají zdravě a mají 50-80% konfluenci. Po-té vrátit buňky do inkubátoru.
- Zahřát DMEM bez séra (čistý DMEM) na pokojovou teplotu. Napipetovat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství čistého DMEM podle Tab. 3.
- Jemně promíchat Fugene 6 reagent lehkým proklepáním nebo protřepáním na třepače po 1 s. Napipetovat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství Fugene 6 podle Tab. 3. Fugene 6 se pipetuje ze špičky pipety přímo do média.
- Ihned po přidání Fugene 6 do média, mikrozkušavku proklepat nebo protřepat na třepače po 1 s, pro promíchání složek.
- Inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- Přidat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství DNA podle Tab.3.
- Mikrozkušavky proklepat nebo protřepat na třepače po 1 s, pro promíchání složek.
- Inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Delší doba inkubace (až 60 minut) může zvýšit úspěšnost transfekce, to ale závisí na typu buněčné linie.
- Pokud je transfekční komplex v průsvitných zkumavkách, může být patrný jemný zákal.

### 3. Přidání komplexu do buněk

- Vyndat buňky z inkubátoru.
- Po kapkách přidat 100  $\mu$ l transfekčního komplexu do jamek v misce, které obsahují buňky. Jemně zatřást s miskou pro promíchání komplexu.
- Vrátit buňky do inkubátoru

### 4. Inkubace buněk

- Před měřením genové exprese inkubovat buňky 1 až 3 dny. Inkubační doba závisí na typu reportérském genu v plazmidu. Pokud přenášený plazmid obsahuje selekční marker, nepřidávat selekční antibiotika do prvního potransfekčního pasážování.

Tab 3 - doporučené množství látek v 6-jamkové misce pro Fugene 6 [26]

| (A) Buněčná kontrola | (B) Reagentová kontrola | (C) DNA kontrola   |
|----------------------|-------------------------|--------------------|
| Bez reagentu         | 6 $\mu$ l reagentu      | Bez reagentu       |
| Bez DNA              | Bez DNA                 | 1 $\mu$ g DNA      |
| 100 $\mu$ l DMEM     | 94 $\mu$ l DMEM         | 100 $\mu$ l DMEM   |
| (D) 3:1 poměr        | (E) 3:2 poměr           | (F) 6:1 poměr      |
| 3 $\mu$ l reagentu   | 3 $\mu$ l reagentu      | 6 $\mu$ l reagentu |
| 1 $\mu$ g DNA        | 2 $\mu$ g DNA           | 1 $\mu$ g DNA      |
| 97 $\mu$ l DMEM      | 97 $\mu$ l DMEM         | 94 $\mu$ l DMEM    |

## 7.6. Transfekce Fugene HD

### 1. Příprava buněk den před transfekcí

- Zkontrolovat buňky pod mikroskopem. Míra konfluence buněk by měla následující den, tj. den provedení transfekce, odpovídat 50 až 80%.
- Antibiotika snižují úspěšnost transfekce.
- Napipetovat médium s buňkami do 6-jamkové misky. Do každé jamky přidat 2 ml média, které obsahuje 100 000 až 300 000 buněk (50 000 až 150 000 buněk/ml). Jamky označit podle Tab. 4.

### 2. Příprava komplexu

- Připravit šest mikrozkušavek – “eppendorfky“ a označit je podle Tab. 4.
- Vyndat Fugene HD reagent z ledničky nebo mrazícího boxu a nechat ho ohřát na pokojovou teplotu. Mezitím zkontrolovat buňky pod mikroskopem. Ujistit se, že vypadají zdravě a mají 50-80% konfluenci. Po-té vrátit buňky do inkubátoru.
- Zahřát OptiMEM na pokojovou teplotu. Napipetovat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství OptiMEM podle Tab. 4.
- Přidat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství DNA podle Tab.4.
- Mikrozkušavky proklepat nebo protřepat na třepačce po 1 s, pro promíchání složek.
- Jemně promíchat Fugen HD reagent lehkým proklepáním nebo protřepáním na třepačce po 1 s. Napipetovat do jednotlivých mikrozkušavek příslušné množství Fugene HD podle Tab. 4. Fugene HD se pipetuje ze špičky pipety přímo do média.
- Ihned po přidání Fugene HD do média, mikrozkušavku proklepat nebo protřepat na třepačce po 1 s, pro promíchání složek.
- Inkubovat při pokojové teplotě po dobu 0 až 20 minut.

### 3. Přidání komplexu do buněk

- Vyndat buňky z inkubátoru.
- Po kapkách přidat 100  $\mu$ l komplexu do jamek v misce, které obsahují buňky. Jemně zatřást s miskou pro promíchání komplexu.
- Vrátit buňky do inkubátoru

### 4. Inkubace buněk

- Před měřením genové exprese inkubovat buňky 1 až 3 dny. Inkubační doba závisí na typu reportéřském genu v plazmidu. Pokud přenášený plazmid obsahuje selekční marker, nepřidávat selekční antibiotika do prvního potransfekčního pasážování.

Tab 4 - doporučené množství látek v 6-jamkové misce pro Fugene HD

| (A) Buněčná kontrola | (B) Reagentová kontrola | (C) DNA kontrola     |
|----------------------|-------------------------|----------------------|
| Bez reagentu         | 6 $\mu$ l reagentu      | Bez reagentu         |
| Bez DNA              | Bez DNA                 | 1 $\mu$ g DNA        |
| 100 $\mu$ l OptiMEM  | 94 $\mu$ l OptiMEM      | 100 $\mu$ l OptiMEM  |
| <b>(D) 6:2 poměr</b> | <b>(E) 5:2 poměr</b>    | <b>(F) 4:2 poměr</b> |
| 6 $\mu$ l reagentu   | 5 $\mu$ l reagentu      | 4 $\mu$ l reagentu   |
| 2 $\mu$ g DNA        | 2 $\mu$ g DNA           | 2 $\mu$ g DNA        |
| 94 $\mu$ l OptiMEM   | 95 $\mu$ l OptiMEM      | 96 $\mu$ l OptiMEM   |

## **7.7. Zjednodušené protokoly pro Fugene**

### **Fugene 6**

1. Nechat přes noc růst buňky v 6-jamkové misce
2. Připravit transfekční komplex
  - a. 100  $\mu$ l čistého DMEM
  - b. Přidat 3 – 6  $\mu$ l Fugene 6 reagentu
  - c. Jemně protřepat
  - d. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě
  - e. Přidat 1 – 2  $\mu$ g DNA
  - f. Jemně protřepat
  - g. Inkubovat 15 až 60 minut při pokojové teplotě
3. Přidat po kapkách transfekční komplex k buňkám
4. Inkubovat buňky

### **Fugene HD**

1. Nechat přes noc růst buňky v 6-jamkové misce
2. Připravit transfekční komplex
  - a. 100  $\mu$ l OptiMEM
  - b. Přidat 1 – 2  $\mu$ g DNA
  - c. Jemně protřepat
  - d. Přidat 2 – 7  $\mu$ l Fugene HD reagentu
  - e. Jemně protřepat
  - f. Inkubovat 0 až 20 minut při pokojové teplotě
3. Přidat po kapkách transfekční komplex k buňkám
4. Inkubovat buňky

## 8. Analýza dat

### Úspěšnost transfekce

$$UT = \frac{TB}{VB} \quad [38]$$

kde:

UT – úspěšnost transfekce,

TB – počet transfekovaných buněk,

VB – počet všech buněk.

### Výběrová směrodatná odchylka

“Udává, jak se v průměru v daném statistickém souboru odchylojí hodnoty sledované proměnné od aritmetického průměru souboru.“ [38]

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad [38]$$

### Toxické účinky transfekčního reagentu

$$T = \frac{(C - B)}{C} * 100 \quad [39]$$

$$V = 100 - T \quad [39]$$

kde:

B – celkový počet buněk v transfekovaném vzorku v době pasážování,

C – celkový počet buněk v kontrolním vzorku (bez transfekčního reagentu) v době pasážování,

T – toxicita,

V – viabilita.

## 9. Porovnání transfekčních reagentů

Vyhodnocení úspěšnosti transfekce nebylo zpracováno prakticky a opírá se pouze o reference.

Základní vlastnosti porovnávaných transfekčních reagentů shrnuje tab. 4. Jedná se o pouze o obecné shrnutí jejich vlastností platných pro většinu buněčných linií. V závislosti na použité buněčné linii mohou být tyto vlastnosti různé.

**Tab 5 - shrnutí vlastností porovnávaných transfekčních reagentů**

|                             | <b>Kalcium fosfát</b> | <b>Fugene 6</b> | <b>Fugene HD</b> |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| <b>Úspěšnost transfekce</b> | nízká                 | střední         | vysoká           |
| <b>Toxicita</b>             | vysoká                | různá           | různá            |
| <b>Cena</b>                 | zanedbatelná          | 438 € za 1 ml   | 515 € za 1 ml    |

Co se týče ceny Fugene transfekčních reagentů, není na škodu připomenout, že při transfekcích se používají řádově  $\mu\text{l}$  transfekčního reagentu. 1 ml transfekčního reagentu tak vydrží i několik stovek transfekcí.

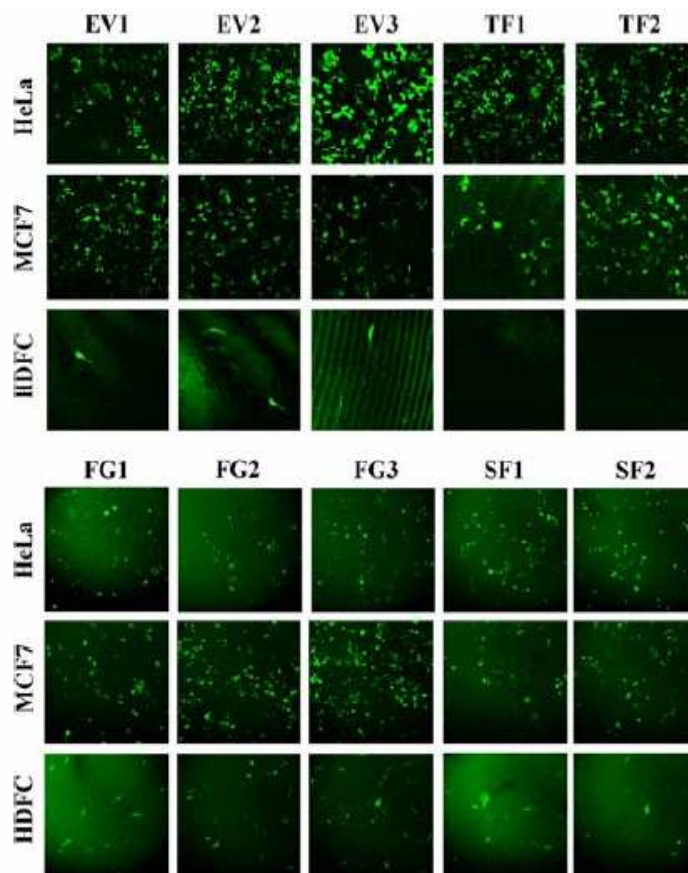
Dále je na obr. 9. znázorněno porovnání dalších transfekčních reagentů na buněčných liniích HeLa, MCF7 a HDFC. Zkratky označují jména transfekčních reagentů a jsou dále uvedeny i použité poměry reagent:DNA. Zkratky jsou:

EV1-3: Eskort V (Sigma, UK) 1:1, 1:2, 1:3,

TF1-2: TransFast (Promega, UK) 1:1, 1:2,

FG1-3: Fugene HD (Roche, UK) 3:2,5:2, 7:2,

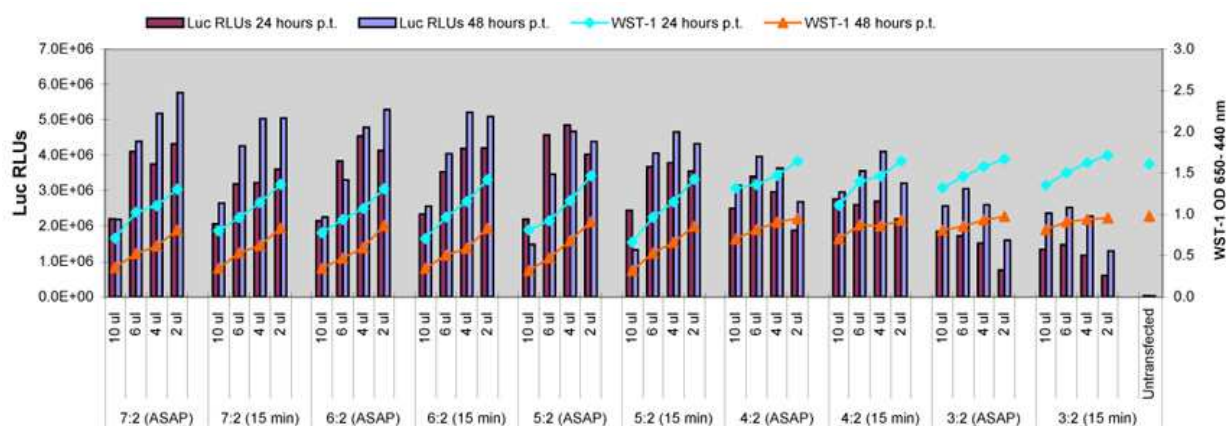
SF1-2: Superfect (Qiagen, UK) 1:2, 1:5.



**Obr 9 - srovnání dalších transfekčních reagentů [40]**

## 9.1. Doporučení pro COS-7 buněčnou linii

Pro COS-7 buněčnou linii je tab. 4. platná. Nejvhodnější se zdá být Fugene HD transfekční reagent. Výrobce k němu poskytuje výsledky, kterých dosáhl přímo na COS-7 buněčné linii viz. obr. 10. V grafu je Luc RLUs úměrná míře úspěšně transfekovaných buněk a WST značí metabolickou aktivitu buněk. Z toho vyplývá, že nejlepší poměr transfekčního reagentu k množství DNA je 5:2. Dalšími zajímavými poměry jsou 6:2, 7:2 a 4:2. V jiných případech je úspěšnost transfekce nedostatečná nebo se na COS-7 buňkách příliš projeví toxické účinky Fugene HD, na které je COS-7 poměrně citlivá na rozdíl od jiných buněčných linií. [35]



Obr 10 - Analýza světélkovací exprese u COS-7 buněk transfekovaných Fugene HD [25]

## 9.2. Doporučení pro HEK-293 buněčnou linii

Pro HEK-293 buněčnou linii je tab. 4. neplatná. Jak již bylo zmíněno, charakteristickou vlastností HEK-293 buněčná linie je, že dosahuje velmi vysoké úspěšnosti transfekce při použití jakéhokoli běžného transfekčního reagentu. Nejvhodnější se proto zdá být použití kalcium fosfátové metody. [21]

## 10. Závěr

Tato práce se z důvodu nedostupnosti jakékoli buněčné linie pro pokusy odchytila od původního zadání, protože samotné transfekce nebyly prováděny prakticky. Nicméně práce obsahuje podrobné postupy jak transfekci provést, zjistit její úspěšnost a optimalizovat tak postup. Jsou zpracovány postupy pro kalcium fosfátovou metodu, Fugene 6 transfekční reagent a Fugene HD transfekční reagent.

Důvod použití COS-7 buněčné linie je, že pokud se transfekuje vektor obsahující SV40 promotor, je v COS-7 buňkách replikován což mnohem zvýší expresi přeneseného genu. V práci se dále objevují informace o HEK-293 buněčné linii, která platí jako záložní buněčná linie za COS-7.

Z teoretických výsledků vyplývá, že pokud je pro přenos cizorodé DNA použit vektor, který obsahuje promotor SV40 viru, je nejvhodnější použít COS-7 buněčnou linii s transfekčním reagentem Fugene HD. Pokud se berou v úvahu kromě jeho účinnosti při transfekci i jeho toxické účinky, je nejlepší poměr 5  $\mu$ l Fugene HD reagentu k 2  $\mu$ g DNA.

Není-li k přenosu cizorodé DNA vektor, který obsahuje promotor SV40 viru k dispozici, je nejvhodnější použít HEK-293 buněčnou linii s využitím kalcium fosfátové metody. Stále je ale možno použít COS-7 buněčnou linii s využitím Fugene HD.

## 11. Seznam použité literatury

- [1] ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie díl první, 4. vyd. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rozsypal, DrSc, 2006. ISBN 80-902562-5-2
- [2] ŠMARDA, Jan a kol. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: MU Brno, 2005. 194 s. ISBN-10: 80-210-3841-1
- [3] PROMEGA – Transfection [online]. 2009 [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.promega.com/paguide/chap12.pdf>>.
- [4] NANO LIFE SCIENCE - Cationic copolymers for non-viral gene delivery [online]. [cit. 2010-17-05]. Dostupný z WWW <<http://www.nano-lifescience.com/research/gene-delivery.html>>.
- [5] Georges Christe, et. al.. A new C-terminal hERG mutation A915fs+47X associated with symptomatic LQT2 and auditory-trigger syncope. Heart Rhythm: Volume 5, Issue 11, 2008, Pages 1577-1586, ISSN 1547-5271
- [6] Naomi J. Logsdon: A Novel Gene: hKCa4, Encodes the Calcium-activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes, The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272, 32723-32726.
- [7] David C. Johns, H. Bradley Nuss, Eduardo Marban. Suppression of Neuronal and Cardiac Transient Outward Currents by Viral Gene Transfer of Dominant-Negative Kv4.2 Constructs. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272, 31598-31603
- [8] WIKIPEDIA – Cardiac action potential [online]. 2004 [cit. 2010-28-05] Dostupný z WWW: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac\\_action\\_potential](http://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac_action_potential)>.
- [9] ŠIMURDA, Jiří.: Bioelektrické jevy. Skripta FEKT VUT v Brně.
- [10] RYCHTÁRIK, Milan.: Metody měření elektrofyziologických vlastností excitabilních membrán. Elektrovue. ISSN 1213-1539
- [11] UGELSTAD, John. 1976. Kinetics and mechanism of emulsion polymerization. Rubber Chem. and Techn. 49, 536 - 609
- [12] INVITROGEN – Dynabeads FlowComp Mouse CD8 [online]. 2008 [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.siercheng.com/UploadFile/2009531221936636.pdf>>.
- [13] TSIEN, Roger. 1998. The Green Fluorescent Protein. Annu. Rev. Biochem. 67:509–442009
- [14] Spectrum of GFP [online]. [cit. 2010-27-05]. Dostupný z WWW: <<http://userpages.umbc.edu/~jili/ench772/gfp-spect.html>>.
- [15] Nucleofector™ technologi in imunology, Novel antibiotics againts mykoplasma, Nucleofection of rat oligodentocytes, maxGFP positive control. AMAXA NEWS #3 2004.

- [16] WIKIPEDIA – Cell culture [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_culture](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture).
- [17] WIKIPEDIA – COS cells [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: [http://en.wikipedia.org/wiki/COS\\_cells](http://en.wikipedia.org/wiki/COS_cells).
- [18] CHEN, Haifeng, CAMPISI, Judith, PADMANABHAN, R. 1996. SV40 Large T Antigen Transactivates the Human cdc2 Promoter by Inducing a CCAAT Box Binding Factor. 13959–13967
- [19] Abcam – COS-7 [online]. 2004 [cit. 2010-20-05] Dostupný z WWW: <http://www.abcam.com/COS7-African-Green-Monkey-SV40-transf-d-kidney-fibroblast-cell-line-Nuclear-Lysate-ab14643.html>.
- [20] CLS – COS-7 [online]. 2004 [cit. 2010-20-05] Dostupný z WWW: [http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index\\_eng.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index_eng.html).
- [21] WIKIPEDIA – HEK cell [online]. 2004 [cit. 2010-20-05] Dostupný z WWW: [http://en.wikipedia.org/wiki/HEK\\_cell](http://en.wikipedia.org/wiki/HEK_cell).
- [22] CLS – 293 (HEK-293) [online]. 2004 [cit. 2010-20-05] Dostupný z WWW: [http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e184/e1032/index\\_eng.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e184/e1032/index_eng.html).
- [23] WIKIPEDIA – HEPA [online]. 2008 [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: [http://cs.wikipedia.org/wiki/HEPA\\_filtr](http://cs.wikipedia.org/wiki/HEPA_filtr).
- [24] VEJRAŽKA, Martin – Buněčné kultury [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>.
- [25] INVITROGEN - Cell Culture Basics [online]. [cit. 2010-28-05]. Dostupný z WWW: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.
- [26] LONZABIO – Basic protocol for primary mammalian endothelial cells [online]. 2004 [cit. 2009-20-10] Dostupný z WWW: [http://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Primary\\_cells/amaxa\\_OP\\_Basic\\_Endothelial\\_VPI-1001.pdf](http://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Primary_cells/amaxa_OP_Basic_Endothelial_VPI-1001.pdf).
- [27] INVITROGEN – Laminar Flow Hood [online]. [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-equipment/laminar-flow-hood.html>.
- [28] INVITROGEN – DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium [online]. [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/Classical\\_Media/dmem.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/Classical_Media/dmem.html).
- [29] WIKIPEDIA – Dimethyl sulfoxide [online]. 2008 [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: [http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl\\_sulfoxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide).

- [30] INVITROGEN – Fetal bovine serum [online]. [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/fbs.html>>.
- [31] WIKIPEDIA – Glutamin [online]. 2008 [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamine>>.
- [32] INVITROGEN – Opti-MEM [online]. [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <[http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/Classical\\_Media/Opti-MEM.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/Classical_Media/Opti-MEM.html)>.
- [33] WIKIPEDIA – Phosphate buffered saline [online]. 2008 [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate\\_buffered\\_saline](http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline)>.
- [34] INVITROGEN – Trypsin [online]. 2008 [cit. 2010-14-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/reagents/Trypsin/Trypsin.html>>.
- [35] ROCHE – Fugene HD [online]. 2008 [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW <<https://www.roche-applied-science.com/sis/transfection/index.jsp?id=TR01010136>>.
- [36] ROCHE – Fugene 6 [online]. 2008 [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW <<https://www.roche-applied-science.com/sis/transfection/index.jsp?id=TR010201>>.
- [37] THE FLEMINGTON LAB – Calcium phosphate transfection method [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.flemingtonlab.com/Protocols/CalciumPhosphateTransf.pdf>>.
- [38] BEDNÁŘOVÁ, Iveta, VEČEREK, Vladimír. Základy statistiky pro studující veterinární medicíny a farmacie: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2007
- [39] MAUSISSE, Rosaline, ed. 2010. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. 10.1186/1472-6750-10-9
- [40] YALVAC, Mehmet, ed. 2009. Comparison and Optimisation of Transfection of Human Dental Follicle Cells, a Novel Source of Stem Cells, with Different Chemical Methods and Electro-poration. 10.1007/s11064-008-9905-4

## 12. Seznam zkratek

|         |                                              |
|---------|----------------------------------------------|
| cDNA    | – kružnicová deoxiribonukleonová kyselina    |
| COS-7   | – původem opičí buňky nesoucí SV40           |
| DNA     | – deoxiribonukleonová kyselina               |
| DMEM    | – Dulbecco's Modified Eagle Medium           |
| DMSO    | – dimethyl sulfoxid                          |
| EDTA    | – polyaminokarboxylová kyselina              |
| FBS     | – fetální bóviné sérum                       |
| GFP     | – zelený fluorescenční protein               |
| HEK-293 | – původem lidské embryonální buňky z ledviny |
| OptiMEM | – Opti-Minimum Essential Medium              |
| PBS     | – pufr fosfátových solí                      |
| SV40    | – opičí virus 40                             |