

## **Laboratoř oboru Biotechnologie:**

### **Úloha:**

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

### Cíl práce

Seznámení z procesem přípravy mléčné směsi pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků a posouzení vlivu vysokotlaké homogenizace na distribuci velikosti tukových kuliček a sedimentační stabilitu suroviny.

## **1. Úvod**

Ve druhé polovině dvacátého století došlo ke skloubení klasické genetiky a chemie nukleových kyselin, což vyústilo v moderní genomiku, která je založena na sekvenování celých genomů velké škály různých organismů. Sekvenování, ve spolupráci s bioinformatikou a jinými technikami, má velký vliv na mnohá odvětví biologických věd s praktickým použitím v medicíně, syntéze léčiv a nebo v ekologii. K dalšímu vývoji v těchto oborech je nutné ještě detailněji poznat chování proteinů v organismech. K prohloubení našich znalostí různých biologických procesů je nutné objevit nové způsoby a nástroje pro jejich detekci, vizualizaci a lokalizaci. Takovýmto nástrojem se v dnešní době stal zelený fluorescenční protein (GFP - *green fluorescent protein*), pocházející původně z medúzy *Aequorea victoria* a příbuzné proteiny z jiných organismů nebo produkty genetického inženýrství.

## **2. Sledování kinetiky proteinu K-ras v savčích buňkách**

### **2.1. Úloha proteinu K-Ras**

Protein K-ras je periferně vázaná membránová GTPasa podílející se na přenosu mitogenních signálů, které vznikají vazbou růstových hormonů na povrchové receptory. Molekula K-Ras obsahuje 189 aminokyselinových zbytků a je posttranslačně farnesylován v C-koncové části na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula. Farnesylový zbytek společně s bazickou oblastí v jeho bezprostředním okolí je zodpovědný za vazbu na cytoplasmatickou membránu. Podstatou příspěvku K-Ras k transdukci mitogenního signálu je jeho schopnost aktivovat kinasu Raf. Tato aktivace spočívá ve vazbě K-Ras v nekovalentním komplexu s GTP na kinasu Raf, což ve výsledku vede k její fosforylaci a aktivaci. Proces aktivace Raf je ukončen hydrolyzou GTP na GDP která je katalyzována přímo proteinem K-Ras, avšak jsou nutné ještě další přídatné faktory (GAF – *GTPase acceleration factors*).

Tento proces je zajímavý z medicínského hlediska, protože mutace v genu pro K-Ras, které souvisí s jeho schopností hydrolyzovat GTP, jsou spojeny v 90 % s onemocněním karcinomu pankreatu a v 80 % s kolorektálním karcinomem. Tyto mutace způsobují (např. velmi časté mutace Gly12→Ala nebo Cys) neschopnost proteinu K-Ras hydrolyzovat GTP, což ve výsledku znamená, že je neustále aktivována kinasa Raf a dochází tak nekontrolovanému dělení.

Mechanismus transportu K-Ras po jeho farnesylyci k cytoplasmatické membráně není do dnešní doby uspokojivě objasněn. Předpokládá se, že se na něm významným způsobem podílí Galektin-1. K-Ras může také být transportován z cytoplasmatické membrány na povrch pozdních endosomů, ve kterých pak pravděpodobně dochází k jeho degradaci. Tento retrográdní transport K-Ras je zajímavý především jeho nestandardním mechanismem. Bylo prokázáno, že se na něm nepodílí kaveolin ani klathrin, což jsou základní adaptorové proteiny zprostředkávající tvorbu váčku na začátku endocytózy. Bylo zjištěno, že se K-Ras internalizovaný z cytoplasmatické membrány nachází na povrchu váčků o průměru 50 – 200 nm. Existují experimentální indicie, naznačující, že K-Ras na těchto membránových váčkách ještě může zprostředkovávat transdukci signálu prostřednictvím kinasu Raf.

## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

## 2.2. Praktické úlohy

Následující úlohy demonstrují základní přístupy genového inženýrství a praktické aspekty metodologie molekulární biologie ve studiu funkce proteinů. Pro studium dynamiky K-Ras *in vivo* je nutné jeho kódující sekvenci spojit s genem kódujícím GFP. Nejprve je nutné izolovat gen *K-ras*, avšak vzhledem k tomu, že většina genů obsahuje nekódující oblasti tzv. introny, je nutné ji získat zpětným přepisem z mRNA (reverzní transkripcí do dvojřetězcové DNA). Poté je gen *K-ras* vložen do vhodného expresního vektoru, což je v našem případě plasmid pEGFP-CI (Clontech), který již obsahuje gen *gfp*. Správnost připraveného vektoru je nutné ověřit sekvencí pro případ nežádoucích mutací. Vektor je potom následně použit pro transfekci tkáňových buněk a chování vzniklého genového produktu GFP-K-Ras lze sledovat jeho přímo v živých buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

### 2.2.1. Reverzní transkripce a PCR

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do DNA. Tato reakce je katalyzována enzymem *reverzní transkriptasou*, která se vyskytuje u mnoha typů retrovirů. V současné době lze reverzní transkripci provádět *in vitro* (ve zkumavce, mimo biologický systém), a je využívána v řadě molekulárně biologických aplikacích, zejména pak v izolacích sestřižených genových variant a průkazu tkáňově specifické transkripce jednotlivých genů. V dnešní době jsou komerčními firmami dodávány různé typy rekombinantních reverzních transkriptas.

Reverzní transkripcí získáme molekulu DNA, která je označována jako cDNA (*z angl. complementary DNA*). Vzhledem k tomu, že produktem je hybrid RNA-DNA, který není vhodný k další práci je nutné gen pomnožit pomocí PCR.

**Izolace RNA.** Pro účely reverzní transkripce je nutné nejdříve izolovat RNA z příslušného biologického vzorku. V současnosti je pro oddělení RNA od DNA používána ionexová chromatografie, při níž dochází k separaci těchto druhů nukleových na základě jejich odlišných nábojových vlastností. Při tomto postupu je získaná RNA o vysoké čistotě.

V buňkách se nachází celkem tři druhy RNA (t-RNA, rRNA a mRNA) a výše popsanými postupy obdržíme jejich směs. Většinou je pro účely reverzní transkripce žádoucí pouze mRNA, která kóduje dané geny. Pro selektivní izolaci mRNA se využívá zejména její polyadenylace (sekvence  $A_n$   $n \sim 10 - 200$ , ozn. polyA) na jejím 3' konci. Nejjednodušší způsob je použití pevného nosiče, na který je kovalentně navázán oligonukleotid polyT, jehož délka se pohybuje v rozmezí 10 – 20 nukleotidů. Přidáním takového nosiče ke směsi různých typů RNA dojde k hybridizaci mRNA k polyT na nosiči pomocí sekvence polyA. Po odmytí nenavázaných RNA jsou hybridizačně navázané molekuly mRNA eluovány pomocí zvýšení teploty nebo iontové síly.

Operace s RNA jsou oproti operacím s DNA náročnější na čistotu práce a kvalitu používaných reagensů. RNA je oproti DNA značně labilní v důsledku snadné degradace RNasami (enzymy specificky štěpící RNA). Tyto enzymy jsou ve značném množství přítomné ve všech biologických systémech. Proto je potřeba dbát na sterilitu používaných chemikálií. Tyto enzymy však díky své vysoké stabilitě odolávají i některým sterilačním krokům a je proto nutné je v příslušných reagensích chemicky inaktivovat pomocí látky DEPC (diethylpyrokarbonát), který je potom odstraněn zahřátím. Samozřejmostí při práci s RNA je používání pipet a dalších pomůcek, které jsou určeny pouze pro tyto účely. Výjimkou není ani vymezení speciálního pracovního stolu nebo laboratoře pro tyto účely

## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

### Pomůcky a reagentie:

- pipeta 1 – 10  $\mu\text{l}$
- 200  $\mu\text{l}$  mikrozkuřavka pro PCR
- stojánek
- termocyklér
- (+) primer
- (-) primer
- AMV reverzní transkriptasa
- deoxynukleotidy
- inhibitor RNAs (RNasin)
- Taq DNA polymerasa
- H<sub>2</sub>O bez nukleas

### Provedení

**(!) Pracujte v ochranných rukavicích! Použitě plastové pomůcky vyhazujte do určených odpadních nádob.**

1. Do sterilní 200  $\mu\text{l}$  mikrozkuřavky napipetujte následující složky:

složka	objem
10 $\mu\text{M}$ (-) primer	2,5 $\mu\text{l}$
1mM zásobní roztok deoxynukleotidů	10 $\mu\text{l}$
Izolovaná RNA	4 $\mu\text{l}$

Směs promíchejte jemným pipetováním tak, aby nedocházelo ke vzniku bublin a uzavřete mikrozkuřavku víčkem.

2. Inkubujte směs 10 minut při 70 °C v termocykléru.

*Pro RNA je charakteristický obsah tzv. vlásenkových sekundárních struktur (vlásenky). Vznik vlásenek je spojen s intramolekulárním párováním krátkých komplementárních úseků RNA. Přítomnost vlásenek je pro účely reverzní transkripce nežádoucí proto se izolovaná RNA zahřívá na teplotu 70 °C, kdy dochází k jejich rozpadu. Po ochlazení dochází také k hybridizaci (-) primeru ke specifickému úseku RNA kódující žádoucí gen.*

3. Vyjměte směs z termocykléru a přidejte do ní následující složky. Směs opět opatrně promíchejte.

složka	objem
H <sub>2</sub> O	6 $\mu\text{l}$
Puřr pro reverzní transkriptasu	2 $\mu\text{l}$
Inhibitor RNAs (RNAsin)	1 $\mu\text{l}$
AMV reverzní transkriptasa	1 $\mu\text{l}$

4. Inkubujte směs 50 minut při 47 °C v termocykléru.

## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

*Tento krok představuje vlastní reverzní transkripci, tj. přepis informace z RNA do DNA. V 2. kroku byla obdržena denaturovaná molekula (y) RNA, ke které byl po ochlazení na laboratorní teplotu následně hybridizován (-) primer. V kroku 3 byly přidány další termolabilní složky. V tomto kroku AMV reverzní transkriptasa kovalentně napojuje na hybridizovaný (-) primer (krátký úsek DNA) nukleotidy, které jsou komplementární ke každé následující bázi v templátové RNA. Výsledkem celého enzymatického procesu je jednořetězcová DNA (cDNA), která je ve formě tzv. heteroduplexu, pod kterým rozumíme nekovalentní komplex hybridizované RNA s komplementární DNA.*

5. Do nové sterilní 200 µl mikrozkušavky pipetujte následující složky a opatrně směs promíchejte jemným pipetováním.

složka	objem
cDNA (směs z předchozího kroku)	6 µl
1 µM (+) primer	10 µl
1 µM (-) primer	10 µl
10 x konc. pufr pro Taq DNA polymerasu	5 µl
1mM zásobní roztok deoxynukleotidů	10 µl
Taq polymerasa	1 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

6. Vložte mikrozkušavku do termocykléru a inkubujte ji při následujícím teplotním režimu.

počet opakování	teplota	čas	
1 x	94 °C	4 min	počáteční denaturace
30 x	55 °C	30 s	hybridizace primeru
	72 °C	1 min	elongace řetězce
	94 °C	20 s	denaturace dsDNA

*Tento krok představuje PCR. Množství obdržené cDNA je nízké a pro její nabohacení se používá právě metoda PCR. V reakční směsi pro PCR jsou již přítomny dva specifické primery (+) a (-), které jsou komplementární k 5' a 3' koncům genu, který chceme amplifikovat. Amplifikace genu je zprostředkována termostabilní Taq polymerasou (DNA dependentní DNA polymerasa). Je důležité si uvědomit, že templátem v tomto případě je již cDNA, která byla získána reverzní transkripcí. Teplotní režim PCR je závislý na délce amplifikované oblasti (genu) a sekvenci primeru. Sekvence primeru značně ovlivňuje výslednou hodnotu hybridizační teploty (tzv. annealing). Např. primery s vysokým obsahem G a C mají vyšší hybridizační teploty. Doba elongace řetězce za katalýzy Taq polymerasy je závislá na délce genu a procesivitě enzymu. Každá termostabilní polymerasa je charakterizována svou procesivitou, která vyjadřuje jak dlouhý úsek DNA je daná polymerasa za daný časový úsek syntetizovat. Pro Taq polymerasu je procesivita ~ 1000 bází za minutu. **Po provedení tohoto kroku byla získána namnožená dvouřetězcová cDNA, kterou lze dále použít v dalších molekulárně biologických aplikacích.***

7. K reakční směsi přidejte 10 µl 6 x konc. vzorkového pufru a pomocí agarosové elektroforesy analyzujte výsledek reakce (tj. izolace genu).

## **Laboratoř oboru Biotechnologie:**

### **Úloha:**

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

*Agarosová elektroforeza nám umožní předběžné ověření úspěšnosti izolace genu na základě stanovení délky amplifikovaného úseku. To zda byl izolován požadovaný gen lze nejlépe zjistit sekvenací amplifikované DNA.*

### **2.2.2. Analýza DNA pomocí elektroforezy v agarosovém gelu**

Elektroforeza v agarosovém gelu se používá k identifikaci, separaci a purifikaci molekul DNA a v některých případech i proteinů. Tyto molekuly jsou v gelu děleny podle jejich náboje (migrace k anodě nebo katodě, přičemž velikost náboje určuje rychlost) a velikosti (gel vlastně působí jako síto). DNA je díky fosfátovým skupinám nabitá záporně a ve stejnosměrném elektrickém poli se při pH 8 bude pohybovat ke kladné elektrodě. Vzhledem k tomu, že jsou fosfátové skupiny spojující jednotlivé nukleosidy distribuovány rovnoměrně, mají molekuly DNA konstantní hodnotu povrchového náboje na jednotku délky a budou se v gelu dělit podle jejich velikosti – delší molekuly se budou proplétat gelovou maticí obtížněji než molekuly menší. Rychlost migrace dvouřetězcové DNA agarosovým gelem je nepřímo úměrná logaritmu jejich délky (počtu párů bází; bp).

Komerční agarosa je lineární polysacharid v podstatě tvořený z asi 800 galaktosových jednotek. Zgelovatěním agarosy vzniká v závislosti na její koncentraci trojrozměrná síť s póry o velikosti 50 až > 200 nm. Velikost pórů samozřejmě určuje použitelný frakcionační rozsah gelu pro lineární molekuly dvouřetězcové DNA, získané např. štěpením DNA restrikčními endonukleasami. Tak v gelu s 0,5 % agarosy lze účinně rozdělit lineární fragmenty velikosti 700 až 25 000 bp, v 1% gelu fragmenty o 250 až 12 000 bp, v 3% gelu fragmenty dlouhé 100 až 3 000 bp a ve speciálních 6% gelech i fragmenty o 10 až 100 bp. Jednotlivé fragmenty putují v gelu ve jako zóny (proužky). Velikost fragmentu lze určit po elektroforese na základě porovnání jeho polohy na gelu s migrací směsi fragmentů známých délek DNA v gelu je třeba nejprve vizualizovat, k čemuž se nejčastěji používá fluorescenčních barviv. Nejběžnějším je ethidiumbromid (EtBr), který viditelně fluoreskuje po ozáření ultrafialovým světlem o vlnové délce okolo 300 nm. Využívá se toho, že po vazbě EtBr mezi dva řetězce dvoušroubovice fluoreskuje komplex DNA/ EtBr 20 – 30× více než samotný EtBr a tímto způsobem lze na gelu „rozsvítit“ proužky obsahující alespoň 0,5 ng DNA. V současné době jsou dostupná fluorescenční barviva dosahující citlivosti až <20 pg (např. SYBR Gold). Na základě intenzity fluorescence proužku lze semikvantitativně vyhodnotit množství DNA porovnáním se standardy obsahující známá množství DNA.

V následujícím textu uvádíme dva postupy pro provedení elektroforezy v agarosovém gelu a její použití pro analýzu produktů provedených PCR reakcí.

#### ***Materiál a chemikálie:***

- elektroforetická aparatura a zdroj stejnosměrného proudu
- UV transiluminátor s dokumentačním zařízením
- latexové ochranné rukavice
- elektroforetický pufr (10× koncentrovaný TBE pufr o složení na 1 litr: 54 g Tris, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA a pH upraveným na hodnotu pH 8, 0)
- destilovaná voda
- agarosa pro molekulární biologii
- ethidiumbromid - EtBr (10 mg/ml ve vodě)
- marker ve vzorkovém pufru (1 µg/5 µl)
- vzorky DNA ve vzorkovém pufru

## **Laboratoř oboru Biotechnologie:**

### **Úloha:**

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

### **Provedení:**

**(!) Pracujte v ochranných rukavicích! Použité plastové pomůcky vyhazujte do určených odpadních nádob.**

1. Podle instrukcí výrobce elektroforetické aparatury připravte podnos pro nalití agarosového gelu tak, aby vznikla těsnící nádoba. *Aparatury jsou vyrobeny nejčastěji z akrylátu a sestávají z elektroforetické vany opatřené na koncích platinovými elektrodami, podnosu pro gel a víka pevně zamčeného po připojení kabelů. Některé podnosy jsou propustné pro UV záření. To umožňuje osvětlit gel na transiluminátoru přímo na podnosu a usnadňuje tak manipulaci s gelem.*
2. Připravte 1× TBE pufr naředěním 10× koncentrovaného zásobního roztoku destilovanou vodou v množství dostatečném pro přípravu gelu a použití jako elektrolyt při elektroforese. *EDTA přítomná v pufru vyvazuje ionty  $Mg^{2+}$  z molekuly DNA, což přispívá k uniformitě náboje.*
3. Podle velikosti očekávaných fragmentů DNA připravte v Erlenmeyerově baňce suspenzi obsahující 1 % hmotn. nebo 2 % hmotn. agarosy v TBE pufru. *Uvažujeme, že 1 ml pufru má hmotnost 1 g a vážená a měřená množství nemusí být „analyticky“ přesná.*
4. Agarovou suspenzi přiveďte do krátkého varu (5-10s) v mikrovlnné troubě. **POZOR:** vroucí agar pění a může překypět. Krátké záhřevy k varu opakujte po zamíchání obsahu baňky krouživým pohybem do rozpuštění agaru. Případně rozpusťte agar zahřátím a povařením na plynovém kahanu. *Výhodné je vsadit do hrdla baňky malou nálevku, která zabrání překypění gelu.*
5. Roztok agaru ponechte ochladit na cca 60 °C (udržíte v holé ruce) a přidejte takové množství EtBr pro vizualizaci, aby výsledná koncentrace byla 0,5 µg/ml. **POZOR:** EtBr je toxický karcinogen.
6. Nalijte gel do utěsněného podnosu a ihned do agaru ponořte hřeben ve vyznačeném místě. Baňku předejte lektorovi k dekontaminaci. *Gel musí být stále dobře tekutý. Případné vzduchové bubliny můžete před zatuhnutím přesunout ke stěně kolmé na hřeben pomocí pipetovací špičky. Hřeben vytvoří v gelu jamky, do kterých se nanáší vzorek.*
7. Ponechte gel ztuhnout při pokojové teplotě. *Ztuhlý gel je lehce matný.*
8. Přelijte gel správně umístěný ve vaně aparatury takovým množstvím elektroforetického pufru, aby byla jeho hladina několik mm nad povrchem gelu (3 – 5 mm) a opatrně vyjměte z gelu hřeben (nesmí dojít k protržení dna jamek). *Správně umístěný gel v aparatuře má hřeben blíže k záporné elektrodě.*
9. Napipetujte do TBE pufru v prostoru kladné elektrody takové množství zásobního roztoku EtBr, aby byla výsledná koncentrace asi 0,5 µg/ml a špičkou obsah prostoru promíchejte. *Kladně nabitě ethidium bude v průběhu elektroforesy putovat proti směru migrace DNA a takto přidaný EtBr bude doplňovat EtBr v gelu. Jinou možností je použít gel a pufr bez EtBr a obarvit gel po elektroforese 30 – 45 min inkubací v TBE s 0,5 µg EtBr / ml nebo vyšší.*

## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

**10.** Do krajních jamek naneste mikropipetou 5  $\mu$ l markeru a do dalších vhodný objem (10 – 20  $\mu$ l) vzorků ve vzorkovém pufru. Pořadí nanášení markeru a vzorků zapište. *Vzorkový pufr obsahuje Ficoll, který má vyšší hustotu než voda a udrží tak roztok DNA v jamce.*

**11.** Uzavřete aparaturu, připojte ji ke zdroji (DNA putuje ke kladné elektrodě) stejnosměrného proudu a nastavte napětí na hodnotu  $U = [1 \text{ až } 5 \text{ V}] \times [\text{vzdálenosti mezi elektrodami v cm}]$ . Zapněte proud a sledujte průběh elektroforesy podle migrace barviv přítomných ve vzorkovém pufru. Elektroforesa trvá podle aplikovaného napětí a požadovaného rozdělení asi 20 – 60 min. *V použitém vzorkovém pufru jsou tři barviva: xylene cyanol, bromfenolová modř a OrangeG, která migrují v 1% gelu stejně rychle jako fragmenty DNA o délce asi 4000 bp, 300 bp a 50 bp, v uvedeném pořadí.*

**12.** Po skončení elektroforesy vypněte zdroj napětí a gel přeneste bezpečně (stále obsahuje EtBr) na plochu transiluminátoru a vizualizujte DNA v UV světle. Pořídte elektronický (pomocí CCD kamery) nebo fotografický záznam gelu a ten vyhodnoťte. **POZOR:** Pokud budete pozorovat gel pod UV pouhým okem používejte speciální ochranný štít s účinným UV filtrem a minimalizujte dobu pozorování. Dioptrické nebo sluneční brýle s UV filtrem nejsou dostatečnou ochranou!

**13.** Použitý gel a elektrodový pufr předejte lektorovi k dekontaminaci.

### 2.2.3. Příprava expresního konstruktů pEGFP-C1-Ras

1. Amplikon (PCR produkt, gen *K-ras*) a vektor pEGFP-C1 štěpte restrikčními enzymy *Bgl* II a *Bam*H I 1 hodinu při 37 °C.
2. Purifikujte fragmenty DNA pomocí komerční soupravy (Qiagen cleanUp) a ověřte úspěšnost operace agarosovou elektroforesou.
3. Proveďte ligaci vektoru a inzertu pomocí T4 DNA ligasy v molárním poměru 1:10 po dobu 1h při pokojové teplotě.
4. Ligační směsí transformujte buňky *E. coli* DH5 $\alpha$  a rozetřete je na pevné médium s kanamycinem.
5. Druhý den pomocí sterilních párátek vypíchněte 24 kolonií do 2 ml kapalného LB média s kanamycinem (50  $\mu$ g/ml) a kultivujte přes noc při 37 °C v orbitálním inkubátoru.
6. Isolujte plasmidovou DNA podle protokolu I.
7. Isolovanou DNA z jednotlivých klonů ověřte restrikčním štěpením enzymy *Bgl* II a *Bam*H I. Pomocí agarosové elektroforesy ověřte přítomnost inzertu v jednotlivých klonech DNA. Správnost inzertu (gen *K-ras*).

## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách  
PROTOKOL

#### 2.2.4. Transfekce buněk HEK293 T

##### *Materiál a chemikálie:*

- buňky HEK 293T na Petriho misce (Ø 10 cm)
- PBS
- kultivační médium DMEM / 10% FBS
- 0,2% trypsin (sterilní)
- Petriho misky (Ø 3 cm) s integrovaným krycím sklíčkem v jejím dně.
- krycí sklíčko (20 x 20 mm)
- CO<sub>2</sub> kultivační box
- laminární box
- transfekční činidlo FuGene (Roche)
- DMEM bez FBS
- plasmidová DNA 1 µg/µl (pEGFP-CI-K-Ras)

##### *Provedení:*

(!) Pracujte v ochranných rukavicích! Použité plastové pomůcky vyhazujte do určených odpadních nádob.

1. Vysterilujte laminární box pomocí UV lampy nejméně po dobu 15 min, po té ho podle instrukcí uveďte do provozu.
2. Z CO<sub>2</sub> kultivačního boxu vyjměte Petriho misku s buňkami HEK 293T v 80 – 90 % konfluenci.
3. Pomocí odsávačky odstraňte kultivační médium a adherované buňky promyjte 10 ml předeřátého PBS. PBS následně odsajte.
4. Na promyté buňky aplikujte 1 ml 0,2% trypsinu a ponechte ho působit po dobu 1 – 2 min při 37 °C. *Buňky HEK293T jsou zástupcem adherentní tkáňové linie, která se na povrch kultivační misky přichycuje prostřednictvím povrchových adhezních proteinových složek (např. cadheriny, adheriny). Kromě toho většina buněčných linií produkuje extracelulární bílkoviny, které jsou základem tzv. extracelulární matrix, která také významně přispívá k adhezenci buněk. Působením trypsinu dochází ke štěpení těchto extracelulárních buněčných adhezních složek, což se ve výsledku projeví uvolněním buněk z povrchu kultivační misky. Pod inverzním světelným mikroskopem pozorujte morfologickou změnu buněk u nichž v průběhu trypsinace dochází k zakulacení a jejich uvolnění z povrchu.*
5. K uvolněním buňkám přidejte 5 ml kultivačního média DMEM/10% FBS. *Tímto způsobem obdržíte buněčnou suspenzi buněk HEK293T o koncentraci přibližně 10<sup>6</sup> buněk na ml*
6. Do Petriho misky o průměru 30 mm s integrovaným krycím sklíčkem napipetujte 2 ml kultivačního média DMEM/10% FBS a 200 µl buněčné suspenze.



## Laboratoř oboru Biotechnologie:

### Úloha:

Sledování pohybu značených proteinů v reálném čase v živých buňkách

7. Petriho misku s buňkami dejte do CO<sub>2</sub> kultivátoru (37 °C) a ponechte minimálně 4 hodiny.
8. Do sterilní 1,5 ml zkumavky napipetujte 96 µl DMEM bez FBS, 3 µl transfekčního činidla Fugene a 1 µl plasmidu pEGFP-CI-K-Ras. Směs jemně promíchejte pipetováním a ponechte 15 min při pokojové teplotě.
9. Celý transfekční mix pipetou rovnoměrně nakapejte k adherovaným buňkám na Petriho misce (Ø 3 cm) a vložte ji zpět do inkubátoru. *V průběhu 4 – 5 hodin dojde ke vstupu plasmidové DNA do buněk. Obvykle se buňky ponechávají v přítomnosti transfekční směsi 12 – 24 hodin.*

### 2.2.5. Sledování dynamiky proteinu GFP-K-Ras v buňkách HEK293 T

#### **Materiál a chemikálie:**

- Transfekované buňky HEK 293T na Petriho misce (Ø 10 cm)
- kultivační médium DMEM / 10% FBS
- inverzní fluorescenční mikroskop vybavený systémem Cell R

#### **Provedení:**

1. Do kultivační cely integrované v mikroskopu vložte Petriho misku s transfekovanými buňkami a nastavte 40 x zvětšující objektiv.
2. V softwaru Cell R nastavte vhodné nastavení filtrů pro fluorescenční mikroskopii GFP.
3. Pomocí mikrometrického šroubu zaostřete na transfekovanou buňku ve fluorescenčním módu
4. Pozorně si prohlédněte více zorných polí preparátu a zvolte vhodně transfekovanou buňku. Za vhodně transfekovanou buňku považujeme takovou buňku, která vykazuje dostatečný fluorescenční signál umožňující jeho detekci na používané kameře. Avšak toto není dostačující podmínka s ohledem na chování nadexprimovaného proteinu. V případě vysoké nadexprese proteinu může docházet k jeho agregaci uvnitř buňky, což je nefyziologické chování. Cílem experimentu je obdržet takovou hladinu exprese proteinu, která řádově odpovídá jeho fyziologii, to ale nemusí být ve všech případech splněno. Volba vhodné buňky pro studium dynamiky proteinu je tedy velmi empirickým procesem, kdy je před vlastní provedením „live imagingu“ provést celou řadu tzv. pilotních experimentů, ze kterých obdržíme hodnotné informace o chování studovaného fúzního proteinu. Ve výsledku je tedy nejlepší takovou buňku jejíž fluorescence se pohybuje na dolní hranici detekčního limitu použitého systému. Hodnota detekčního limitu však není pevně dána a závisí na celé řadě faktorů jako je doba snímání, celkové zvětšení, intenzita použitého excitačního záření, typ emisního filtru a počet snímků za časovou jednotku.
5. V nabídce „live cell experiment“ nastavte následující parametry:
  - magnification: 60 x
  - time exposure picture: camera set default
  - Frequency: 1 s
  - total time 10 s
6. Klikněte na ikonu start.