

# PLASMIDE DNA ISOLATION FROM BACTERIA AND TRANSFECTION TO HEK293 CELL LINE

**Kateřina Karmazínová**

Bachelor Degree Programme (3) FEEC BUT

E-mail: xkarma07@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Ondřej Svoboda

E-mail: xsvobo32@stud.feec.vutbr.cz

**Abstract:** Isolation DNA is a one of the basic methods in molecular biology. There are several methods of DNA amplification and isolation. In this paper phenol-chloroform extraction of three plasmid types is used: Channelrhodopsin-2, ASAP and KIR. Seven plasmids were isolated in total. These plasmids are then validated using gel electrophoresis. Successfully isolated plasmids are then transfected to HEK293 and taken on confocal microscope 24 hours after transfection.

**Keywords:** DNA isolation, competent cells, HEK293, transfection

## 1. ÚVOD

Amplifikaci plasmidové DNA není možné kvůli jejím vlastnostem provádět komerčními způsoby, např. pomocí PCR. Z tohoto důvodu je pro amplifikaci běžně využíváno bakteriálních linií, do kterých se plasmidová DNA vpraví, namnoží a následně se izoluje. Takto získáme kruhovou plasmidovou DNA, která může obsahovat předlohu pro řadu membránových konstruktů. Jako modelový organismus, do něhož se následně mohou vkládat izolované plasmidy, slouží velmi často buněčná linie HEK293. Díky jejich jednoduché transfekci a nulové expresi zvolených konstruktů, byly použity jako modelová linie i v této práci. Hlavními cíly práce jsou tedy: i) pomocí bakteriálního kmenu DH5 $\alpha$  amplifikovat a izolovat plasmidové DNA membránových kanálů Channelrhodopsin-2 (CHR2), KIR a ASAP a ii) ověřit funkčnost získané plasmidové DNA transfekcí do buněčných linií HEK293, které by měly díky expresi zvoleného plasmidu vykazovat fluorescenci.

## 2. IZOLACE DNA

Celý pracovní proces amplifikace a izolace DNA je rozdělen do tří hlavních kroků: 1) příprava kompetentních buněk; 2) transformace buněk a 3) izolace plasmidové DNA.

### 2.1. PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK

Pro amplifikaci plasmidů je nutné vpravit tyto plasmidy do bakterií, které jsou schopny plasmidovou DNA přijmout (jedná se o kompetentní buňky). Vhodným typem bakterií jsou geneticky upravené kmeny *Escherichia Coli*, které jsou stabilní a snadno se kultivují. Kmen DH5 $\alpha$  je vzhledem ke svým četným mutacím zajišťujícím vlastnosti pro hostitelskou expresi rozšířeným kmenem používaným pro transformace.[1] Kompetentní buňky byly připraveny dle protokolu [1].

### 2.2. TRANSFORMACE

Pro vpravení molekul DNA do kompetentních bakteriálních buněk, je nutné nejprve destabilizovat cytoplazmatickou membránu a následně se k narušeným bakteriím přidá zvolená kruhová DNA. Narušení se děje nejčastěji mírným tepelným šokem či pomocí vápenatých iontů [3]. Jestliže transformace proběhne podle předpokladů, jsou následně připraveny buňky s požadovaným plasmidem k izolaci. Transformace probíhala podle protokolu [3].

### 2.3. IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

Pro izolaci DNA lze v praxi použít několik postupů. Nejčastěji využívanými metodami jsou adsorpce na silikátový povrch a fenol-chloroformová extrakce [3], případně lze použít některý z komerčně připravených kitů. V této práci byly plasmidy izolovány fenol-chloroformovou metodou dle [5].

Výsledkem fenol-chloroformové extrakce bylo rozdělení na tři fáze – vodnou horní fázi, interfázi obsahující proteiny a spodní organickou fázi. Ve vodné fázi byla DNA vysrážena isopropanolem a po centrifugaci byla rozpuštěna v TE pufru.

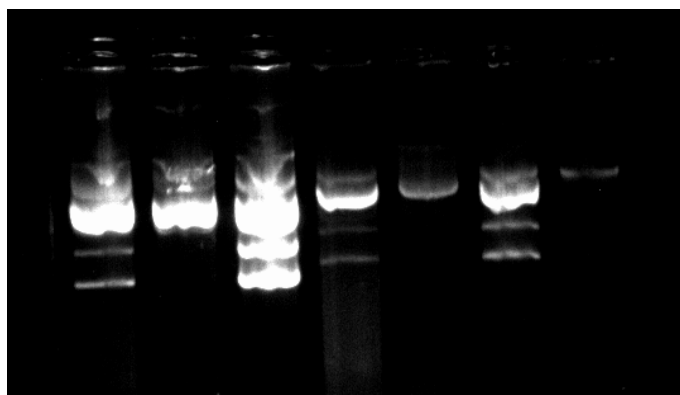
### 3. TRANSFEKCE IZOLOVANÉ DNA DO HEK293

Buněčná linie HEK293 jsou lidské embryonální buňky ledvinového epitelu, které byly poprvé připraveny v 80. letech v laboratoři Alexe Van der Eba [6] v Holandsku a následně upraveny transformací virovou DNA adenoviru 5 [6]. Embryonální ledvinové kultury mohou obsahovat malé množství téměř všech typů buněk lidského těla. Buněčná linie HEK293 a několik dalších lidských buněčných linií, které jsou generované transformací adenovirem lidských embryonálních ledvinových buněk, mají mnoho vlastností nezralých neuronů. Pro svoji snadnou kultivaci a poměrně jednoduchou transfekci jsou velmi rozšířené jako modelový organismus [1].

Transfekce je molekulárně-biologická metoda umožňující zavedení cizorodé nukleové kyseliny, která není běžně exprimována, do eukaryotické buňky. Pomocí transfekce tak vznikají geneticky modifikované buňky.[6] Rozlišujeme dva druhy transfekce – transientní a stabilní. Při stabilní transfekci dochází k začlenění cizorodé DNA do genomu a jeho dlouhodobé expresi. U transientní transfekce není vložený gen začleněn do genomu hostitelské buňky stabilně a k expresi cílové DNA dochází hned po jejím proniknutí do jádra, rychle následuje i syntéza rekombinantního proteinu. Pro transientní i stabilní transfekci existuje řada protokolů i reagentů [6]. Např.: polyethylenimin (PEI), lipofectamin či v současnosti stále populárnější nanočástice (např. MATRA).

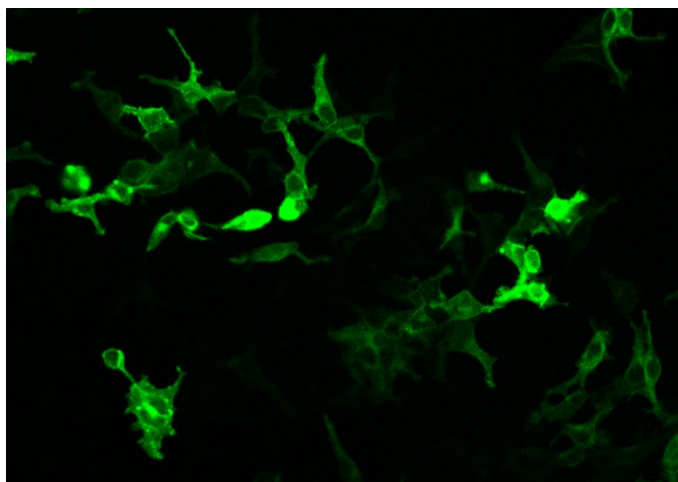
### 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Při experimentu bylo doposud izolováno 7 vzorků – 3 vzorky Channelrhodopsin2, 3 vzorky KIR a 1 vzorek ASAP. Na všech vzorcích byla provedena elektroforetická analýza. Její výsledky jsou uvedeny na Obrázku 1. U každého vzorku byly očekávány dva až tři bandy DNA (horní lineární forma, prostřední relaxovaná forma a spodní kruhová forma DNA), ne všechny vzorky je ovšem obsahují. Z toho lze vyvodit, že správně izolované a pravděpodobně funkční jsou (zleva): 1, 3 (CHR2); 4 a 6 (KIR). Ostatní vzorky vykazují pouze jeden band, případně různé fragmenty a lze tedy očekávat chybu v pracovním postupu. Rovněž lze pozorovat rozdíly v intenzitě jednotlivých vzorků, toto je způsobeno různou koncentrací plasmidové DNA v TE pufru.



Obrázek 1: Elektroforetická analýza izolovaných vzorků (zleva): 1-3 CHR2; 4-6 KIR; 7 ASAP.

Na Obrázku 2 je provedeno ověření funkčnosti izolovaného kanálu Channelrhodopsin2. Je zde patrná intenzivní fluorescence, lze tedy předpokládat, že byla izolace provedena správně a membránový konstrukt je funkční. Fluorescence je způsobena navázanou fluorescenční sondou YFP. Obrázek byl získán pomocí konfokálního mikroskopu 24 hod od transienční transfekce provedené pomocí polyethyleniminu.



**Obrázek 2:** Buněčná linie HEK293 s transfekovaným CHR2.

## 5. ZÁVĚR

Při dosavadních experimentech izolace DNA se podařilo izolovat celkem 7 plasmidů. Z vyhodnocení elektroforetické analýzy (Obrázek 1) vyplývá, že 4 ze 7 izolací byly úspěšné. Channelrhodopsin2 a KIR byly izolovány s úspěšností 66%, ASAP se prozatím izolovat nepodařilo. Úspěšnost izolace byla ověřena elektroforetický a také pokusnou transfekcí do buněk HEK293. V dalším postupu budou izolovány další plasmidy do celkového počtu 3×3 kvalitní plasmidy, následně bude provedeno změření koncentrací jednotlivých vzorků a rovněž pokusná transfekce.

## REFERENCE

- [1] Shaw, G. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. In: *The FASEB Journal*, 2002 DOI: 10.1096/fj.01-0995fje. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/16/8/869.full>
- [2] Top10 chemically competent cells. In: *OpenNetWare*, 2013. Dostupné z: [http://openwetware.org/wiki/TOP10\\_chemically\\_competent\\_cells](http://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells)
- [3] Rumlová, M., Pačes, V., Ruml, T.. Základní metody genového inženýrství, Praha: JPM Tisk, 2003, ISBN 80-86313-12-3
- [4] Bacterial Transformation . In: *Lamitina Lab Protocols*, 2007, Dostupné z: <http://www.med.upenn.edu/lamitinalab/documents/BacterialTransformation.pdf>
- [5] Purify Plasmid DNA. In: *Add Gene*, 2012. Dostupné z: <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/purify-plasmid-dna/>
- [6] Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairu, R. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J. Gen. Virol. 1977, 36
- [7] Kim, K, Eberwine, JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.