

Tópicos en Biofísica Molecular

2do Cuatrimestre de 2011

Docentes: Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

Práctica de laboratorio n° 5: Transfección

OBJETIVOS

Familiarizarse con la transfección transientes de células en cultivo. Transfectar la línea celular HC11 con vectores de fusión para la expresión de distintas proteínas de interés unidas a proteínas fluorescentes. Analizar las células transfectadas mediante Microscopía de Fluorescencia.

INTRODUCCIÓN

La **transfección** se define como la introducción dentro de una célula eucariota de una molécula de DNA que no pertenece a la célula. Como resultado, la célula presenta en general un gen mutado además de su gen normal (en células haploides el gen puede ser reemplazado). Los organismos que han sido permanentemente modificados por la inserción, supresión o reemplazo de un gen se denominan organismos *transgénicos*. Cuando el gen normal continúa presente, solo se observan factores dominantes de la alteración en análisis fenotípicos. Aún así, los animales transgénicos con genes insertados han logrado importantes avances en cuanto a cómo se regulan los genes en mamíferos o cómo ciertos genes alterados (llamados oncogenes) causan el cáncer [1].

Las técnicas de transfección celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales.

Muchas veces puede ser de interés seleccionar las células que han adquirido el plásmido. Para facilitararlo se incluyen en estos plásmidos genes de resistencia a drogas que permiten a las células que los han adquirido sobrevivir en medios selectivos. Así, se pueden diferenciar las **transfecciones temporales o transientes** y las **transfecciones estables** o de larga duración.

Las técnicas de transfección que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: **métodos químicos** o **métodos físicos** [2].

Los **métodos químicos** están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica o a través de las membranas. Entre estos métodos podemos mencionar:

- **Método del fosfato cálcico.** Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados por las células.

Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares.

- **Método del DEAE dextrano.** Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las muy negativamente cargadas moléculas de DNA. El DNA acompañado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.
- **Método de lipofección.** Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA en el citosol. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe un consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método es, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

Los **métodos físicos** están basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Entre ellos están:

- **Microinyección directa.** El DNA se microinyecta directamente al citosol, célula por célula.
- **Electroporación.** Introducción del DNA adherido a micropartículas que se disparan sobre las células.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Transfección

En esta práctica transfectaremos mediante el método de lipofección con lipofectamina (Lipofectamine 2000 de Invitrogen, lípidos especialmente diseñados para transfección de células eucariotas [3]). Trabajaremos la línea celular HC11 (células epiteliales mamarias de ratón) y vectores de fusión para la expresión de:

- Proteína **tubulina** unida a GFP (marcado de microtúbulos)
- Proteína **paxilina** unida a DSRed (marcado de adhesiones focales)

La transfección se realiza sobre células crecidas en cubreobjetos para su visualización en el microscopio. Los cubreobjetos son previamente recubiertos con fibronectina (proteína de la matriz extracelular) para aumentar la adhesión de las células al vidrio y así mejorar su crecimiento.

Para que la transfección sea exitosa, el cultivo debe estar entre un 50% y un 90% de confluencia. Para cada línea celular es necesario estimar la cantidad de células que se

deben plaquear para que al momento de la transfección el cultivo se encuentre en las condiciones mencionadas. El cultivo se realiza en placas de 6, 12 o 24 pocillos (P6, P12 o P24 respectivamente) según el tamaño de cubreobjetos que se va a utilizar.

Protocolo de transfección (placa P6, cubreobjetos de 25 mm)

Reactivos a utilizar:

- Solución de plásmido
- Medio Optimem (Invitrogen)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Medio RPMI solo (sin suero ni antibiótico)
- PBS

1.1 Preparar dos soluciones, en una vial cada una. Por cada pocillo (de la placa de 6 pocillos) hay que poner:

Mix L = 50ul Optimem + 4ul lipofectamina

Mix D = 50ul Optimem + 4-8 ug DNA

Notar que el volumen de solución de DNA a utilizar dependerá de la concentración de la solución. Las cantidades de lipofectamina y DNA dependen de la línea celular y del plásmido que se va a utilizar, estas cantidades fueron optimizadas para esta línea y estas soluciones de DNA.

1.2 Dejar mezclar por 5 minutos.

1.3 Mix L+D = volcar la mezcla de DNA en la de lipofectamina, tirando de a gotitas y agitando suavemente la vial para que se mezcle.

1.4 Esperar 20 minutos.

1.5 Sacar células de la estufa que vaciar el medio de cada pocillo. Lavar dos veces con PBS (la última vez retirar bien el PBS). Colocar 800 ul de medio RPMI sin suero ni antibiótico.

1.6 Con micropipeta tomar los **100ul de Mix L+D** y agregarlo al pocillo de a gotitas distribuidas en el cubreobjetos. Cerrar la placa y moverla en ambas direcciones para que se distribuya bien la mezcla.

1.7 Dejar en la estufa por 5 horas.

1.8 Pasadas las 5 horas, sacar el medio de transfección, lavar con PBS y agregar medio completo.

1.9 Observar al microscopio luego de pasadas 36 horas, para que la proteína se exprese en la célula.

2. Fijación de células

La observación de las células vivas al microscopio es en general utilizada para estudiar procesos dinámicos. Se necesita para la misma un microscopio invertido, y las células son observadas en una cámara que permite la observación en medio de cultivo (en general sin rojofenol). Asimismo, para observar procesos largos es necesario que el microscopio cuente con una cámara ambiental que permita controlar la temperatura y el CO₂. Muchas veces no es necesario observarlas *en vivo*, y se realiza la fijación de las

mismas para su observación. Una vez fijadas las células se pueden marcar además con sondas fluorescentes unidas a anticuerpos.

Para fijar las células, seguir el siguiente protocolo:

2.1 Sacar el medio.

2.2 Lavar con PBS.

2.3 Colocar solución 3.7 % PFA en hielo por 20 min.

2.4 Rehidratar con 10 mM Tris-HCl pH 7 y lavar tres veces con PBS.

Ya fijadas las células, montar los cubreobjetos en un portaobjetos y sellar. En estas condiciones, la muestra puede ser utilizada para su observación durante varios días.

3. Observación de las células al microscopio

Una vez preparadas las muestras, observarlas en el Microscopio de Fluorescencia. Para ello, elegir los cubos adecuados para cada fluoróforo utilizado. Los espectros de las proteínas fluorescentes GFP y DsRed se presentan en la **Figura 1**.

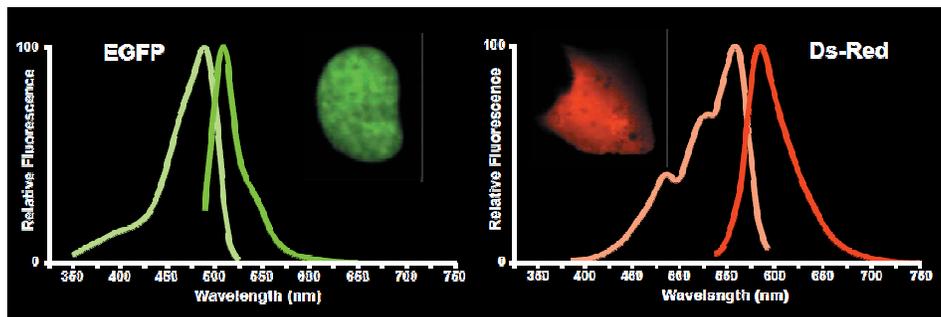


Figura 1. Espectros de excitación y emisión de las proteínas fluorescentes EGFP (izquierda) y DsRed (derecha). Tomado de [4].

Analizar:

3.1 Expresión de las dos proteínas transfectadas. Diferencias en muestras transfectadas con un solo fluoróforo y en muestras cotransfectadas con los dos. Porcentaje de transfección en ambos casos.

3.2 Existencia de sangrado y corrección del mismo en caso de que hubiese.

REFERENCIAS

[1] *Molecular Biology of The Cell*. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Publisher: Garland Publishing Inc.

[2] *Cultek Nota Técnica: Transfección*. 15 de julio de 2006. (http://www.cultek.com/inf/otros/Notas_tecnicas/transfeccion.pdf).

[3] Hoja de datos Lipofectamine 2000, Invitrogen. (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf)

[4] George Patterson, Rich N. Day and David Piston, *Fluorescent protein spectra*, Journal of Cell Science 114 (5).