

OPRAVNÝ LÍSTEK K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Příprava syntetických modifikovaných messenger RNA genů kódující
regulátory buněčného cyklu

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Filip Petroušek

Praha 2020

SEZNAM ZKRATEK (str. 10)

Toll-like receptor – opraveno na: receptor podobný genu Toll

1.5.5. Syntéza mRNA *in vitro* (str.23)

Toll-like receptorů – opraveno na: receptorů podobných genu Toll

3.3.1.1. PREPARATIVNÍ PCR (str. 31)

Nejprve se všechny vzorky zahřály na 98 °C po dobu 40 sekund, aby došlo k oddisociování dvou vláken dsDNA od sebe.

3.3.1.1. PREPARATIVNÍ PCR (str. 31)

Poté se opětovně zopakovalo 30 cyklů, které probíhaly následovně:

- 1.) nejprve se po dobu 20 s nechaly roztoky se vzorky zahřívat na 98 °C
- 2.) následovalo snížení teploty na 60 °C po dobu 20 s
- 3.) poté navýšení teploty na 72 °C po dobu 80 s

3.3.7.1. SDS ELEKTROFRÉZA (str. 43)

Byly připraveny dva gely s tím, že jeden byl ověřovací (neproběhla inkubace s primární protilátkou po přenosu proteinů membránu) a druhý kontrolní (byl dodržen postup inkubace s primární a sekundární protilátkou po přenosu proteinů na membránu).

3.3.7.2. WESTERN BLOT (str.44)

Do Petriho misky se nalil transferový pufr (1-step Transfer Buffer) a gely z elektroforézy se v něm nechaly inkubovat 10 minut. PVDF membrány se nechaly inkubovat 30 sekund v methanolu a po vyndání se inkubovaly 10 minut v transferovém pufru.

3.3.7.1. WESTERN BLOT (str. 44)

Následně byly připraveny papíry (pro přenos proteinů na membránu) o požadovaných rozměrech (60 cm²), které se namočily v transferovém pufru.

Pak se gely vložily mezi papíry pro metodu Western blot a PVDF membránu:

1. Vzaly se 2 spojené papíry (tloušťka vrstvy byla 0,83 mm) a položil se na ně gel
2. Na gel byla položena PVDF membrána
3. Na membránu se položily opět 2 kusy příslušných papírů

Takto připravené gely se vložily do přístroje pro horizontální přenos proteinů na PVDF membránu a tam byly ještě převrstveny transferovým pufrem.

3.3.7.2. WESTERN BLOT (str. 45)

Blokovací roztok byl připraven smícháním 1,5 g BSA a 50 ml TBS. Pak došlo k nalití blokovacího roztoku do Petriho misky a k němu byly přidány obě membrány, aby došlo k zablokování vazebných míst pro nespecifické navázání primární protilátky.

3.3.2. RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ (str. 33)

Byly použity endonukleázy s odlišným štěpícím místem v polynukleotidové sekvenci (obrázek 4 až 8).

4.2. VÝSLEDKY ZE STANOVENÍ KVALITY MRNA (str. 56)

Výsledky jsou uvedeny formou grafů, kde je vynášena závislost relativní fluorescenční jednotky udávající množství nasyntetizované mRNA na velikosti (počtu ribonukleotidů) jednotlivých syntetických mRNA, která byla udána rychlostí migrace mRNA v gelu (obrázek 10 až 17).

4.3. VÝSLEDKY Z WESTERN BLOT ANALÝZY (str. 60)

Pomocí metody Western blot se ověřilo, zda transfekce mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků proběhla úspěšně a také zda došlo k expresi cílových proteinů (obrázek 18 až 22).