

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Iva Vomočilová

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C1

Práce je zaměřena na syntézu lidského proteinu AKR1C1. Kódová sekvence pro tento protein byla objednána v podobě cDNA, která byla vložena do plazmidu pOTB7. Dodané buňky *Escherichia coli*, nesoucí takto upravený plazmid, byly namnoženy a plazmid byl purifikován pomocí alkalické lýzy. S purifikovaným plazmidem byla provedena polymerasová řetězová reakce s dvojicí navržených primerů, které obsahovaly restrikční místo. S ohledem na potřeby pozdějších reakcí byla zvolena rozpoznávací místa pro restrikční endonukleasy NdeI a XhoI. Pro ověření kvality purifikace plazmidu a úspěšnosti PCR byla použita horizontální elektroforéza. Produkt PCR byl purifikován s využitím elektroforézy na ultra-čisté agaróze.

Jako vektor byl zvolen plazmid pET-28b(+). Ten byl namnožen v předem upravených buňkách *E. coli* HB101 a následně purifikován. Purifikovaný plazmid a purifikovaný produkt PCR byly štěpeny pomocí restrikčních endonukleas XhoI a NdeI. Oba naštěpené úseky byly přečištěny a s využitím T4 DNA ligasy byl fragment PCR vložen do otevřeného vektoru pET-28b(+). Takto upravený plazmid byl transformován do kompetentních buněk HB101. Následovalo namnožení těchto buněk a purifikace plazmidu. Úspěšnost ligace byla ověřena nejprve elektroforeticky, poté zpětnou restrikcí s využitím různých kombinací restrikčních endonukleas. Totožnost zaligované sekvence DNA byla ověřena sekvenací.

Po zkontrolování výsledků sekvenace byl plazmid transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL21. Syntéza proteinu se vyvolala přidáním IPTG. Vzniklý protein byl purifikován metodou afinitní chromatografie. Jeho koncentrace se stanovila spektrofotometricky s využitím Bradfordova činidla.