

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Veronika Tobolová

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

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C2

Kódová sekvence AKR1C2 dodaná ve vektoru pOTB7 byla metodou PCR pomnožena a pomocí alkalické lýze přečištěna. Následně zligována s vektorem TOPO 2.1. Kódová sekvence vložená do vektoru TOPO 2.1 byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* a namnožena. Pro kontrolu proběhlé ligace a transformace byla provedena inkubace buněčné kultury s ampicilinem a inkubace kódové sekvence s restričními endonukleasami. Poté byly vzorky sekvence v TOPO 2.1 odeslány na sekvenaci.

V dalším kroku došlo k natrávení kódové sekvence v TOPO 2.1 a otevření zakoupeného vektoru pET-15b. Poté následovalo několik pokusů o ligaci sekvence s expresním vektorem pET-15b. Kontrola těchto kroků byla provedena pomocí transformace rekombinantní sekvence do buněk Hb 101, inkubace na živné půdě s antibiotikem a restrikce.

V závěru byl vektor s kódovou sekvencí vložen do kompetentních buněk BL-21 a provedena exprese. Po rozbití buněk za použití sonikace a natrávení lysozymem jsme mohli pozorovat výsledek pomocí SDS PAGE.