

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Iva Šplíchalová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace transfekcí eukaryontních buněčných linií

Optimalizace transfekce je proces, při kterém hledáme nejlepší podmínky pro transfekci. Tento proces předchází každé rutinní výrobě rekombinantních proteinů v laboratoři. Nejprve se volí expresní systémy, které by nejlépe vyhovovaly konkrétním požadavkům. Při výběru se musí zohlednit rychlost, ekonomičnost a funkčnost vzniklého rekombinantního proteinu, která může být ovlivněna posttranslačními modifikacemi expresních systémů. Pro vnášení cílových genů do expresních systémů se využívá expresních vektorů.

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro transfekci eukaryontních buněčných linií CHO PF a HEK293 za pomoci tří komerčně dostupných kitů. Po optimalizaci následovalo srovnání transfekční účinnosti s doposud používanými transfekčními postupy ve firmě Generi biotech s.r.o. Pro optimalizace byl použit plazmid pMaxGFP. Účinnost transfekce byla hodnocena pomocí Neubauerovy komůrky a kvantifikací GFP v buněčném lyzátu. Pro optimalizace byly použity komerčně dostupné kity Electroporation Solution, TansIT-293 Reagent a TransIT_PRO. Transfekční účinnosti těchto kitů byly následně porovnány s již zavedenými metodami, a to elektroporací v Ex-Cell ACF CHO kultivačním médiu a transfekcí pomocí Effectene.

Nejllepší transfekční účinnosti dosahovala elektroporace v Electroporation Solution, kde, po 48 hodinách byla účinnost vyšší 4 × než je tomu v případě elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu a 12 × vyšší ve srovnání s Effectene. S užitím Trans-293 Reagent je účinnost vyšší 3 × ve srovnání s elektroporací v Ex-Cell ACF CHO médiu. V porovnání s Effectene 9 × vyšší. Tyto dvě nově optimalizované metody budou zavedeny do laboratoře. Transfekce s TransIT_PRO kitem byla 0,3 × nižší než při užití elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu. Ve srovnání s Effectene je pak účinnost vyšší pouze 0,8 ×.