

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MONITOROVÁNÍ ÚSPĚŠNOSTI TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE 293
HEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TOMÁŠ DVOŘÁK

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF

MONITOROVÁNÍ ÚSPĚŠNOSTI TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE 293 HEK

TITLE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. TOMÁŠ DVOŘÁK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. MOJMÍR ŠEVČÍK, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0572/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Tomáš Dvořák	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Monitorování úspěšnosti transfekce buněčné linie 293 HEK

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Tomáš Dvořák
Student(ka)

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce je založena na monitorování úspěšnosti transfekce buněčné linie HEK293. V teoretické části je popsán princip transfekčních metod, buněčné linie, vektory a reportérové geny. V praktické části byly použity buňky HEK293 EBNA1. Byl zkoumán rozdíl mezi plasmidy GFP a EGFP. Dále byly použity různé transfekční reagenty za různých kultivačních podmínek.

ABSTRACT

Diploma thesis is based on monitoring the success of transfection of cell line HEK293. In theoretical part are described principles of transfection methods, cell lines, vectors and reporter genes. HEK293 EBNA1 cells were used for practical part. It was studied the difference between GFP and EGFP plasmids as well as usage of various transfection reagents under different culture conditions.

KLÍČOVÉ SLOVA

transfekce, GFP, HEK293 EBNA1, r-protein, vektory, reportérové geny

KEYWORDS

transfection, GFP, HEK293 EBNA1, r-protein, vectors, reporter genes

DVOŘÁK, T. *Monitorování úspěšnosti transfekce buněčné linie 293 HEK*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 55 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval za trpělivost a strávený čas při vypracovávání mé diplomové práce Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D. Také svým rodičům za psychickou a finanční podporu.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 TRANSFEKCE	9
3.1.1 Rekombinantní proteiny.....	9
3.1.2 Stabilní transfekce	9
3.1.3 Transientní transfekce	10
3.2 VEKTORY	11
3.2.1 Plasmidy	11
3.2.2 Viry	12
3.2.3 Kosmidy	12
3.3 TRANSFEKČNÍ METODY	13
3.3.1 Virový přenos.....	13
3.3.2 Chemický přenos.....	14
3.3.3 Fyzikální přenos	19
3.4 HOSTITELSKÉ BUŇKY	21
3.4.1 Prokaryotní organismy.....	21
3.4.2 Eukaryotní organismy.....	21
3.4.3 HEK293 EBNA1	23
3.5 KULTIVAČNÍ MEDIUM.....	23
3.6 REPORTÉROVÉ SYSTÉMY	24
3.6.1 Luciferáza	24
3.6.2 β -glukuronidáza - GUS.....	24
3.6.3 Green fluorescence protein – GFP.....	25
3.6.4 Chloramfenikol acetyltransferasa – CAT	26
4. PRAKTICKÁ ČÁST.....	27
4.1 MATERIÁL.....	27
4.1.1 Chemikálie.....	27
4.1.2 Přístroje, nástroje a software	28
4.1.3 Buňky a médium.....	28
4.1.4 Transfekční reagenty	28
4.2 METODY.....	29
4.2.1 Manipulace s buňkami.....	29
4.2.2 Manipulace s plasmidy	30
4.2.3 Transfekce.....	33
4.2.4 Fluorescenční mikroskopie.....	36

5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
5.1 POKUS 1	37
5.1.1 Stanovení optimální koncentrace.....	37
5.1.2 Srovnání exprese GFP a EGFP.....	39
5.2 POKUS 2	39
5.2.1 Srovnání účinnosti transfekce pomocí GeneJuice a PEI	40
5.2.2 Srovnání vlivu CO ₂	40
6. ZÁVĚR.....	42
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
8. DALŠÍ ZDROJE	46
9. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	47
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	48
11. PŘÍLOHY	50
11.1 SLOŽENÍ MÉDIA DMEM/F-12	50
11.2 SLOŽENÍ LB MÉDIA	51
11.3 SLOŽENÍ PUFRAČNÍCH ROZTOKŮ	51
11.4 KONCENTRACE A ČISTOTA IZOLOVANÝCH PLASMIDŮ.....	51
11.5 HRUBÁ DATA.....	52
11.5.1 Pokus 1	52
11.5.2 Pokus 2	55

1. ÚVOD

Změna genetické informace byla od počátku světa důležitá pro celou evoluci živočichů. Mutacemi, křížením druhů a schopnosti přizpůsobit se novým podmínkám vznikaly organismy, které měly lepší schopnosti pro přežití. K tvorbě rekombinovaných genů dochází v přírodě zcela běžně. Právě tento proces je zodpovědný za celý vývoj. Také člověk využíval křížení (hybridizaci) po mnoho staletí. Nevědomky tak dlouhodobě experimentoval s DNA. Křížením rostlin nebo živočichů s nejlepšími vlastnostmi získával organismy, které mohl lépe využívat. Vznikaly tak hospodářská zvířata a rostliny, které jsou pro nás dnes samozřejmostí.

Od formulování Mendlových zákonů se začala formulovat molekulární biotechnologie a genetika. Základem genové manipulace je přenos a změna DNA vedoucí k tvorbě rekombinovaných genů. Molekulární biotechnologie je právem označována jako poslední velká revoluce 20. století. Dává možnost tvorby rekombinantních proteinů v různých organismech. Pouze mutacemi totiž nelze vytvořit organismus, který by produkoval protein, který sám nevyrábí. Po skončení druhé světové války se staly rekombinantní proteiny středem zájmu pro farmaceutické společnosti. Prvním produktem tohoto typu byl rekombinantní insulin, jehož výroba pro lékařské účely byla povolena v USA v roce 1982. V dnešní době se biotechnologie využívá pro výrobu mnoha látek. Patří mezi ně například lidský růstový hormon, rekombinantní vakcína proti hepatitidě typu B, interferony a další[1].

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je určení úspěšnosti transientní transfekce buněčné linie 293 HEK/EBNA 1. Úspěšnost byla zjišťována pomocí plasmidů GFP a EGFP. Bylo použito různých transfekčních reagentů, různá koncentrace buněk a různé kultivační podmínky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Transfekce

Základem genové manipulace a biotechnologie jsou změny genetického materiálu k přípravě rekombinantních molekul DNA a případně jejich klonování. Kromě mutací, existují 3 typy rekombinace DNA: transformace, transdukce a konjugace. Transformace je přenos DNA do genomu bakteriálních buněk. Transdukce je přenos DNA pomocí virů. Konjugace se uplatňuje u prokaryot. Je to výsledek sexuálního křížení donoru a akceptoru genetického materiálu. Transfekce je transformací pro eukaryotické organismy. Přenosem DNA vzniká geneticky modifikovaný organismus (GMO). Ten tvoří pomocí genové exprese rekombinantní proteiny (r-proteiny) v hostitelské buňce.

Transfekce je užitečný nástroj pro studium funkčnosti genů, proteinů a jejich regulaci. Přenos může být přirozený nebo umělý. Mezi přirozené procesy patří přenos DNA během bakteriální konjugace, přirozená transformace během života organismu nebo přenos v průběhu virové infekce. Umělým přenosem je myšlen cílený genetický postup, při kterém je volná nebo klonovaná DNA přenesena do buněk živočichů ve vektorech pomocí infekce (virová - biologická metoda) nebo pomocí nevirových metod (chemické a fyzikální metody). Další možností klasifikace transfekce je podle podmínek - *in vivo* a *in vitro*. Transfekce *in vitro* je transfekcí v laboratorních podmínkách. Transfekce *in vivo* (do živého) se využívá především v genové terapii. Transfekce se také rozlišuje na stabilní a přechodnou (transientní). Výběr mezi stabilní a transientní transfekcí je úzce spjat s účelem experimentu[2-6].

3.1.1 Rekombinantní proteiny

Výroba rekombinantních proteinů hraje klíčovou roli v moderní biotechnologii. Využívá se produkce terapeutických proteinů, enzymů a jiných účinných biomolekul. Z přírodních organismů se tyto produkty těžko získávají. Jejich izolace je složitá vzhledem k metabolismu buněk. Požadovaného proteinu nemusí být tolik, je vázán na buněčné struktury nebo jej buněčný systém pokládá za přebytek a rozkládá jej. Proto bývá výroba rekombinantních proteinů často jediný použitelný postup pro výrobu většího množství specifického proteinu.

Technologie rekombinantní DNA vyžaduje 4 aspekty: vektor pro přenos DNA, transfekční metodu (transfekční reagent), buněčnou linii (hostitelský organismus), a kultivační médium. Hlavní výhodou použití r-proteinů jako terapeutik je jejich větší účinnost a méně vedlejších účinků narozdíl od syntetických farmaceutických produktů. Jsou více zaměřeny na skutečnou příčinu nemoci. Nesnaží se jen o zmírnění nebo odstranění symptomů. Prodej r-proteinů dosahuje řádově k desítkám miliard dolarů ročně.[7-11]

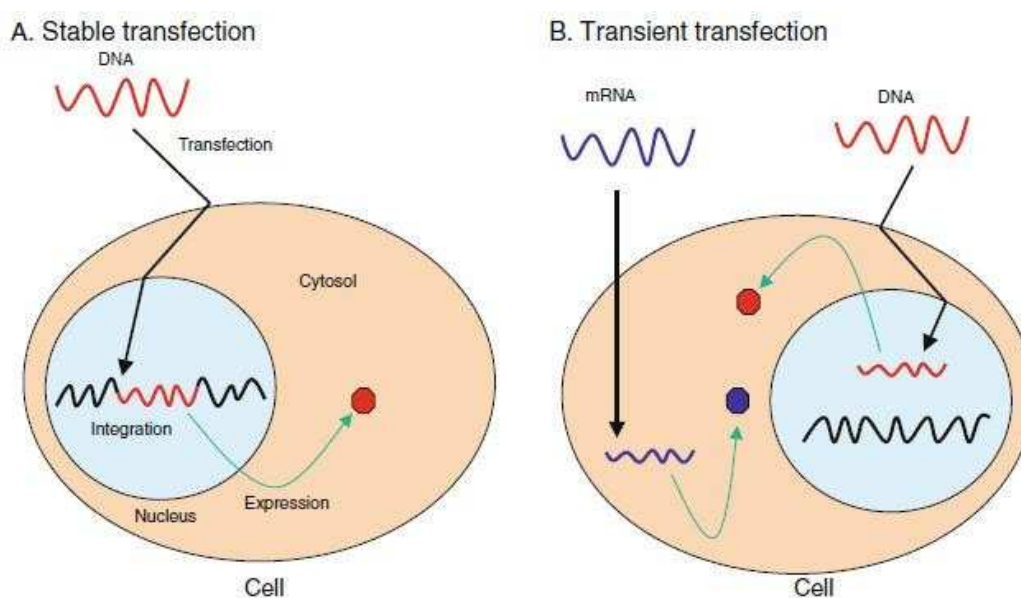
3.1.2 Stabilní transfekce

Základním rozdílem mezi stabilní a přechodnou transfekcí (Obr.1) je to, že u stabilní se gen zájmu začleňuje do genomu hostitelské buňky. To má za následek tvorbu stabilní buněčné linie, která bude při expresi genu prezentovat sjednocený genom. Hlavní výhodou stabilní transfekce je udržení transgenní exprese i po dělení hostitelské buňky. Získá se tak klon, který je transfekován genem zájmu stabilně. Farmaceutické společnosti rutině vyrábí rekombinantní buněčné linie, které konstitutivně produkují r-proteiny po delší dobu kultivace.[12] Ovšem vývoj takového klonu je časově i finančně náročný.[5,13,14]

3.1.3 Transientní transfekce

U transientní transfekce, na rozdíl od stabilní, nedochází k začlenění cizí DNA do genomu hostitelské buňky. K expresi genů dochází jen po určité, limitované dobu. Tato doba je závislá na schopnosti replikace. Genetický materiál se jinak ztrácí v důsledku degradace a během buněčného dělení. Proto je u transientní transfekce degradace plasmidové DNA až 50 % po jednom nebo dvou dnech po transfekci. Transientní transfekcí se rychleji dosahuje produkce r-proteinu než jak je tomu u stabilní transfekce. Což bývá preferovanější při pozorování funkce genů a proteinů. Pozorování se docílí pomocí aktivace nebo inhibice specifické genové exprese.

Produktivita transientní transfekce závisí na faktorech zahrnující poměr transfekovaných buněk, efektivita genové transkripce a translace v hostitelských buňkách a rozsah post-translačního zpracování a úprav, nezbytných pro správnou funkci proteinu[13]. Při přechodné transfekci lze rekombinantní protein detekovat uvnitř buněk již po 1-4 dnech po přenosu DNA. Jeho produkci mimo buňku lze zajistit po 5 dnech. Výťažky r-proteinu se pohybují řádově od miligramů až po gramy.[4,5,12,14]



Obr.1: Diagram transfekcí. Stabilní(a): cizí DNA (červeně značená) je doručena do jádra průchodem přes buněčnou membránu a jadernou membránu. Včlenění se do jaderného genomu (černá). V cytosolu dochází k expresi proteinu. Transientní (b): cizí DNA se dostává do jádra, nezačlení se ale do genomu buňky. Cizí mRNA (modrá) může být přenesena do cytosolu. Následuje exprese NK a tvorba proteinu (šestiúhelníky).[5]

3.2 Vektory

Klonovací vektor je molekula DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA, spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce[15]. Kromě klonovacích vektorů existují také expresní vektory. Při přenosu genu do buňky příjemce (recipienta, hostitele) je třeba zajistit, aby byl úspěšný, tj. aby se gen v buňce udržel (nebyl likvidován), aby se v ní replikoval (tj. rozmnožoval) a exprimoval (tj. byl přepisován a využíván pro výrobu odpovídající bílkoviny)[6]. Právě expresi umožňují expresní vektory. Expresní vektory mají silný promotor, který se nachází proti směru transkripce od klonovacího místa. Promotor je startovací sekvence sloužící k rozpoznání a vazbě RNA-polymerázy během transkripce. Síla promotoru je dána pravděpodobností zahájení transkripce. Geny kódující protein, které mají silnější promotor jsou více exprimovány.

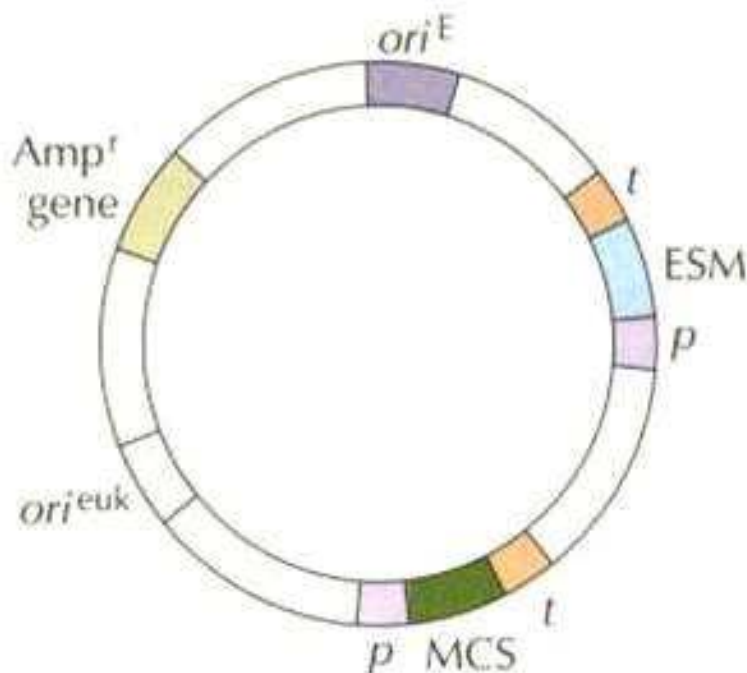
Vektory jsou plasmidy (bakteriální nebo kvasinkové), které se označují jako neživé. Nebo se jedná o viry, které se označují jako živé vektory. Vektory přijaté buňkou nemusí být vždy plně stabilní. Během dělení buněk může dojít ke ztrátě plasmidu. Přítomností rekombinantního plasmidu v buňkách dochází k některým negativním jevům. Může to být snížení růstové rychlosti buněk, zvýšená citlivost buněk nebo i změny jejich morfologie.[2]

3.2.1 Plasmidy

Pro vložení genu zájmu se používají enzymy restriční endonukleázy, které plasmidy naštěpí v určitém místě a tím jej linearizují. Toto místo se nazývá MCS (multiple cloning site) nebo polylinker. Jedná se o jedinečné místo, které rozpoznají restriční endonukleázy, do nichž se začleňuje gen zájmu (DNA inzert). Pro odstranění fosfátových (koncových) skupin DNA inzertu se používá enzym alkalická fosfatáza. Poté je gen zájmu společně s linearizovaným plasmidem spojen pomocí enzymu T4 ligázy. Recirkulizací vzniká rekombinantní (chimerická) DNA. Ta se přenesení do vhodného hostitele, kde se replikuje a vstupuje do jeho potomstva. Častěji se využívají upravené plasmidy od „nativních“ plasmidů. Přírodní plasmidy jsou, na rozdíl od upravených, příliš velké. Úspěšnost transfekce je totiž nepřímo dána velikostí plasmidu.

Eukaryotní plasmidové vektory jsou konstruovány jako kyvadlový vektor, tzv. *shuttle*. To znamená, že mají počátek replikace i selekční markery funkční v prokaryotických i eukaryotických systémech. Byly vyvinuty především kvůli schopnosti post-translačních úprav eukaryot. Toho se využívá pro replikaci v prokaryotách a expresi v eukaryotách. Takový plasmid je složen ze 2 částí (Obr.2). Prokaryotický plasmid a eukaryotická transkripční jednotka s expresní částí. Prokaryotická část obsahuje počátek replikace (ori) a selekční marker (rezistence na ATB). V eukaryotické části je také počátek replikace (ori), pro použití v eukaryotních systémech. Expresní část obsahuje polylinker (MCS) se silným promotorem a oblastí s terminační oblastí (terminátor). Ten dává signál k ukončení transkripce.

Nedílnou součástí jsou selekční markery. Jsou to části genu plasmidu, které mají funkci selekce. Selekční metody jsou založené na genetickém, imunochemickém nebo fyzikálně chemickém principu[6]. Většinou se jedná o geny, které dávají buňkám rezistenci na určité antibiotikum. Nejčastěji se jedná o rezistenci na ampicillin, hygromycin, kanamycin, neomyci, tetracyklin apod. Díky němu lze lehce rozlišit, které buňky přijali vektor. Děje se tak na základě fenotypového projevu. V eukaryotické části se jako selekční marker používá rezistence na rozdílné antibiotikum jak v prokaryotické části.[3,6,8,10,15-17]



Obr.2: Typický eukaryotní expresní vektor. Části eukaryotického expresního vektoru jsou eukaryotická transkripční jednotka s promotorem (*p*), multiple cloning site (*MCS*) pro gen zájmu a DNA segment s terminačním a polyadenylačním signálem (*t*); eukaryotický selekční marker (*ESM*); počátek replikace funkční v eukaryotických buňkách (*ori^{euk}*); počátek replikace funkční v *E.coli* (*ori^E*) a *E.coli* selekční marker – rezistence na ampicilin (*Amp^r*)[16]

3.2.2 Viry

Dalším typem vektorů jsou viry. V některých publikacích jsou zahrnuty mezi vektory, v jiných jsou označeny jako metoda přenosu DNA. Proto jsou popsány v kapitole 3.3.1. Virové vektory se užívají k sledování stabilní i transienční transfekce.

3.2.3 Kosmidy

Kosmidy jsou vektory, odvozené od plasmidu a bakteriofága λ . Uvnitř bakteriálních buněk zaujímá kosmid kružnicovou podobu, ale protože neobsahuje všechny geny bakteriofága λ , nemůže tedy procházet lytickým cyklem[17]. Nicméně může nést delší fragmenty DNA než bakteriofág λ . [16,17]

3.3 Transfekční metody

Transfekční metody lze rozdělit do 3 skupin: biologické(virové), chemické a fyzikální. Těchto metod bylo vytvořeno obrovské množství, ovšem jen některé jsou použitelné pro využití v průmyslovém měřítku. Výběr transfekční metody a vybraný typ hostitelských buněk ovlivňuje úspěšnost transfekce. Záleží na aplikaci, použitých buňkách, časové limitaci, množství požadovaného produktu a bezpečnosti.[3,5,12,14]

3.3.1 Virový přenos

Metoda přenosu založená na virových částicích. Viry přenášejí svou DNA do hostitelské buňky přirozenou cestou během infekce. Musí ovšem dojít k úpravě virů před jejich použitím. Prvním krokem je odstranění patogenních genů. Dále se do viru dodává gen zájmu, aniž by došlo k vystříhnutí genů udržující správný životní cyklus viru.

Jedná se o biologický typ přenosu DNA do buněk. Transfekce pomocí virových částic se nazývá transdukce. Virové vektory jsou považovány za živé na rozdíl od plasmidových vektorů. Virové částice mají vysokou účinnost přenosu do buněk. Jsou vhodné pro genové manipulace s živočišnými buňkami bez plasmidu. Každý druh viru je limitován svojí klonovací kapacitou (Tabulka 1). Klonovací kapacita je maximální možné množství bazí, které lze vložit do genomu viru. Virový přenos se využívá především v genové terapii. Mezi nejčastěji používané viry pro přenos DNA do buněk patří:

- Adenoviry, viry nesoucí dvouřetězovou DNA (dsDNA-double stranded), které napadají všechny typy buněk. Exprese je silná, ale dočasná. Adenoviry se neintegrují do hostitelského genomu, vzniká tak nestabilní genom s transientní expresí. Další nevýhodou je silná imunologická odpověď.
- Adeno-asociované viry mají jednořetězovou DNA (ssDNA-single stranded). Při replikaci jsou závislé na přítomnosti adenovirů. Nemají imunologickou odpověď. Ale negativem je pozdní počátek exprese a problémy pro vyšší objemy.
- Genom retrovirů je ve formě jednořetězové RNA (ssRNA) molekuly. Retroviry nevyvolávají imunologickou odpověď, ale jsou určeny pouze pro dělicí se buňky. Dochází u nich k integraci virového genomu do hostitelského genomu, která je ovšem náhodná.
- Lentivirus je jeden z typu retroviru. Oproti retrovirům je schopen svůj genom začlenit i do nedělících se buněk. Integrují se náhodně do hostitelského genomu. Je u nich možná mutageneze.
- Herpesviry mají dsDNA. Výhodou herpesvirů je dlouhodobá exprese genů. Nevýhodou je jejich toxicita.

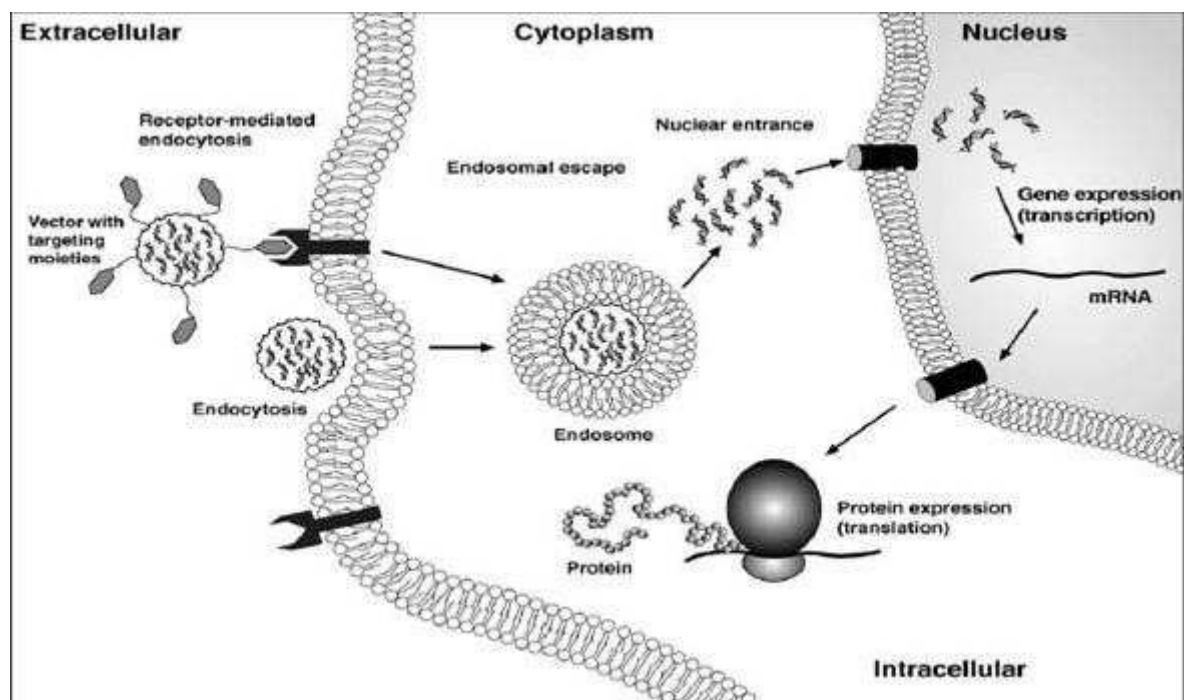
Mezi viry, které napadají prokaryotické buňky patří bakteriofágy. Bakteriofág λ je nejvýznamnějším z bakteriofágů. Má dvouřetězovou DNA. V porovnání s plasmidovými vektory dosahuje jeho klonovací kapacita až 23 kb, což je asi dvakrát více než u plasmidových vektorů[17].[2,6,14,18,19]

Tabulka 1: Přehled klonovací kapacity nejběžněji používaných virů ve srovnání s plasmidem a kosmidem v kilobazích (kb) [14,16]

Typ vektoru	klonování kapacita [kb]
Adenovirus	7,5
Adeno-asociovaný virus	4,5
Retrovirus	8
Lentivirus	8
Herpesvirus	10-40
Plasmid	0,1-10
Bakteriofág λ	10-23
Kosmid	35-45

3.3.2 Chemický přenos

Chemické látky, používané na transfekci, lze rozdělit na anorganické sloučeniny, kationické polymery a kationické lipidy. Problémem přenosu DNA do buněk je jejich záporný náboj biomembrán. DNA tedy nemůže zcela bez problému projít lipofilními membránami, které jsou rovněž nabitě negativně. Jsou proto použity různé metody pro neutralizaci náboje nebo jeho změnu na kladný, aby mohl komplex DNA-transfekční roztok projít přes membránu do buňky (obr.3). Nevirové metody jsou méně efektivní jak virové metody, ale nejsou spjaty s imunologickou odpovědí.[12,20,21]



Obr.3: Schématické zobrazení přenosu DNA do jádra pomocí nevirových metod: komplex s DNA se naváže na receptor zprostředkující endocytózu; dojde k tvorbě endosomu a endocytóze; v cytoplasmě dochází k rozpadu endosomu a přenosu DNA do jádra; v jádře dochází k transkripci: genové expresi; mRNA přechází z jádra do ribosomů kde dochází k translaci: tvorbě proteinu[22]

Anorganické sloučeniny

Z anorganických látek je nejvýznamnějším transfekčním činidlem fosforečnan vápenatý (CaPi).

Použití je následující. Buňky jsou společně s DNA inkubovány v chloridu vápenatém při teplotě 0 °C. Poté je zajištěn teplotní puls, který může být nahrazen přidavkem DMSO (dimethyl sulfoxid) nebo glycerolu. Pro srážení DNA se používá HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) fosfátový pufr. Po jeho přidání (za pokojové teploty a třiceti minutové inkubaci) dojde ke srážení DNA společně s fosforečnanem vápenatým. Tato sraženina tvoří vysokomolekulární komplex, který adhuje na povrch buněk. Komplex pak přechází přes membránu pomocí fagocytózy. Do jádra přechází DNA pomocí lysosomů.

Jedná se o levnou metodu pro stabilní i transientní expresi, protože nevyžaduje drahé reagenty nebo vybavení. Ovšem časová náročnost neumožňuje transfekci velkých objemů pro technické odvětví. Tato metoda byla poprvé použita v roce 1973 pro vnesení DNA adenoviru do savčích buněk Grahamem a Van der Ebem[19]. Za určitých podmínek může CaPi-DNA koprecipitace přenést plasmidovou DNA do 80-90 % buněk HEK293[12]. [3,12,20,23]

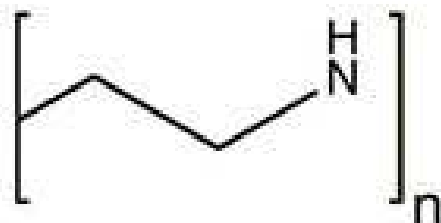
Kationické polymery

Kationické polymery jsou další skupinou látek, které se používají na přenos DNA do buněk. Jedná se o syntetické látky jako polyethylenimin, DEAE-dextran a poly-L-lysin. Komplex tvořený z DNA a polymeru, nesoucí náboj, se nazývá polyplex[24].

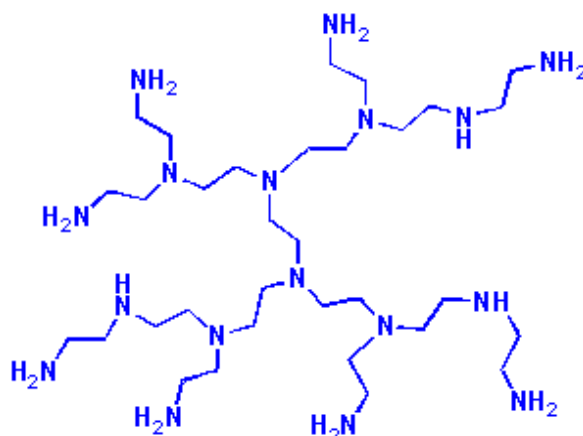
Přenos DNA začíná zformováním nano-částice polyplexu ve vodném pufovaném prostředí z polymeru a DNA. Tvorba komplexu je řízena kineticky. Zprostředkována je pomocí iontové vazby. Tvorba polykationového komplexu je rychlá a téměř irrevizibilní. Komplex se váže nespecifickými nekovalentními vazbami na povrch buňky. Nano-částice polyplexu chrání DNA a zprostředkovává vstup do buněk endocytózou. Uvnitř buňky klesá pH endozomu ze 7 na 5,5. Tím dochází k uvolnění DNA do cytoplasmy. Poté se DNA dostává cytoplasmatickým transportem k jádru. Pro vniknutí do jádra existují dva mechanismy. První je pasivní transport DNA během dělení buněk. Druhý je aktivní transport pomocí jaderných pórů. Účinnost transfekce polyplexem závisí na schopnosti polymeru kondenzovat DNA v mimobuněčném prostředí a disociovat v buněčném prostoru. To je dáno několika faktory, jako je relativní molekulová hmotnost (M_r) polymeru, počet a hustota nábojů nebo složení komplexu. Pro složení komplexu je nejvýznamnější poměr polymer/DNA. Tento faktor se častěji vyjadřuje jako vztah N/P. Je to poměr mezi kladně nabitými atomy dusíku polymeru a záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA, který určuje stabilitu komplexu a účinnost transfekce. V rozmezí hodnot 2-3 je již stabilita zajištěna. Snížením objemu komplexu a jeho vyšším kladným nábojem se zvyšuje úspěšnost transfekce. Nadbytkem polymeru, tedy i vyšším poměrem N/P, je dáno snížení objemu částic (z 1000 nm na 100-200 nm). Proto mají kationické polymery vlastnost zkondenzovat DNA na menší velikost než například kationické lipidy. Vyšším poměrem N/P je silnější zeta (ζ) potenciál, který uděluje komplexu vyšší kladný náboj. Zeta potenciál je rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při pohybu tuhé fáze vůči roztoku. Určuje tak povrchový náboj liposomů. Velký zeta potenciál zabraňuje agregaci a fúzi liposomů, zároveň lépe umožňuje transfekci.[21,22,24,25]

Diethylaminoethyl-dextran (DEAE-dextran) je jednou z nejstarších látek používaných pro transfekci. Komplex DEAE-dextran osciluje se záporně nabitými molekulami DNA, vzniká tak kladně nabitý komplex, který se váže na záporně nabitou lipidovou membránu. Do buněk přechází komplex endocytózou. Nevýhodou je inhibice buněčného růstu a snížení koncentrace séra během transfekce. Nevznikají stabilní transfektanty, proto se používá u přechodné transfekce. Úspěšnost transfekce závisí na typu buněk a může dosáhnout až 80 %. Při transfekci se využívá chlorochinin a DMSO. Chlorochinin zpomaluje degradaci plasmidové DNA[4]. DMSO může přechodně zvýšit absorpci DNA na povrchu buněk.[3,4,20,23]

Polyethylenimin (PEI) se vyskytuje ve dvou formách. V lineární (obr.4), který má velikost 22 kDa, a větvené (obr.5) s velikostí 25 kDa. Stupeň větvení PEI ovlivňuje funkce komplexu. Větvený PEI tvoří menší komplexy s vyšší účinností transfekce, ale i vyšší toxicitou ve srovnání s lineární formou. Struktura primárního aminu u nevětvené formy má za následek horší kondenzaci DNA. PEI, stejně jako všechny kationické polymery nemá hydrofobní domény. Nemůže proto tvořit nebo rozkládat endosomy pouhým kontaktem s endosomální membránou jak kationické lipidy.[13,24-26]

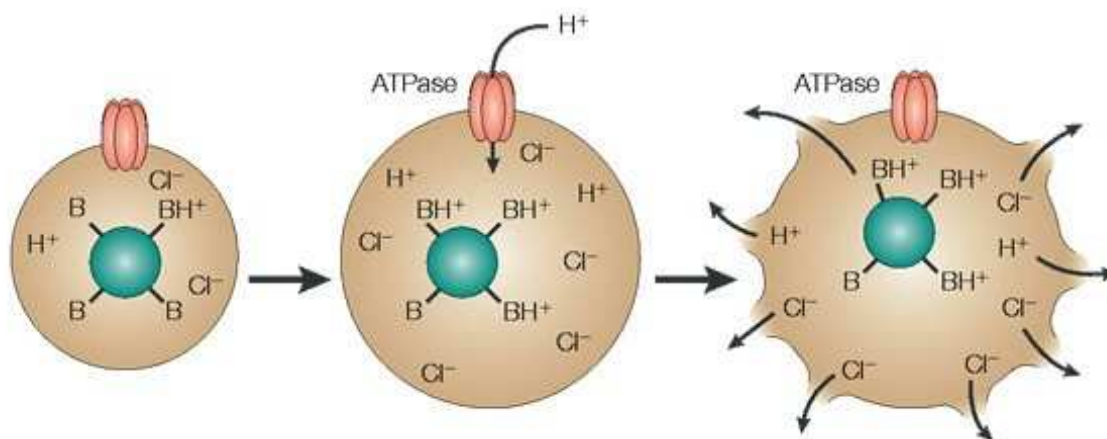


Obr.4: nevětvená forma PEI



Obr.5: větvená forma PEI

Transfekční aktivita PEI je dána schopností tvořit kyselé lysosomy. Tento efekt protonové houby zprostředkuje rozpad lysozomu (Obr. 6). Tyto vlastnosti umožňují vysokou pufrovací kapacitu, která zlepšuje únik komplexu z endosomu. Z tohoto důvodu vyžaduje PEI specifické pH prostředí, což limituje produkční média i podmínky transfekce. Tvorba DNA-PEI komplexu vede ke snížení objemu 10^4 - 10^6 krát jako samotná DNA. PEI je brán jako jeden z nejvhodnějších kationických polymerů pro transfekci. Je to dáno jednoduchou manipulací a především cenou ve srovnání s kationickými lipidy a ostatními transfekčními reagenty. Nicméně PEI má velmi úzkou hranici mezi efektivní dávkou pro narušení endosomu a cytotoxickou dávkou.[13,26-28]



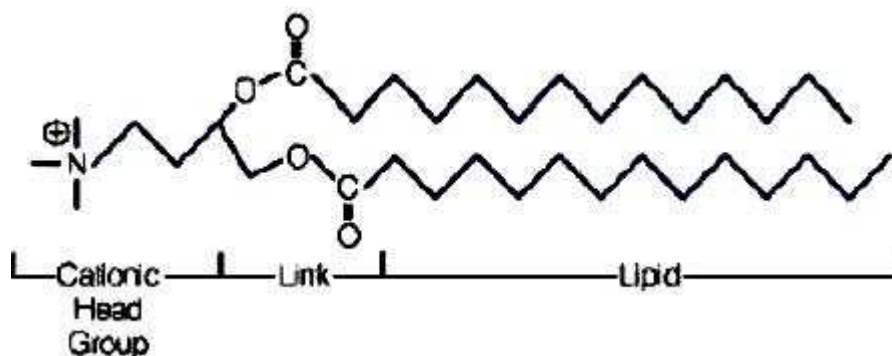
Obr. 6: *Ve fyziologickém prostředí je protonováno pouze 1-6 atomů dusíku. Uvnitř buňky dojde ke snížení pH v endosomu. V důsledku toho začne komplex DNA/PEI vázat protony vodíku. Na tento nedostatek protonů vodíku reaguje enzym ATPáza, který zprostředkuje aktivní přenos vodíkových protonů z vnějšího okolí. Vytváří se nábojový gradient. Tím dochází k soustředění Cl^- anionů v endosomu. Zvyšující se koncentrace Cl^- má za následek zvýšení osmotického tlaku. Vazba vody vyrovnává osmotický tlak. Dochází k nabobtnání endosomu dokud nedojde k jeho lýzi. Rozpadem endosomu se DNA uvolní lehce do prostředí cytoplasmy.*

Jednou z možností modifikace PEI je použití anti-mitotických činidel po transfekci. Ty narušují mikrotubuly v cytoskeletu buňky. Dochází tak k zadržení buněk v G2/M fázi. Další možnost je zkoncentrování buněk centrifugací před transfekcí na 20×10^6 buněk/ml[13]. Pro genové terapie *in vivo* se často používá polyplex DPA (DNA/PEI/Alginát). Alginát, který je ze skupiny polyuronidů, totiž zmírňuje imunitní reakci a zvyšuje účinnost transfekce[26].

Poly-L-lysine (PLL) je polymerem odvozeným od aminokyseliny lysinu. Na rozdíl od PEI nemá ve struktuře sekundární ani terciární aminy, proto u něho nedochází k efektu protonové houby. Díky tomu má samotný PLL bez modifikace nízkou účinnost transfekce. Přidáním histidinu do základní struktury PLL lze navodit efekt protonové houby jako u PEI. Pro buňky je méně toxický než PEI, protože je oproti němu lépe biodegradabilní. Toho se využívá v *in vivo* aplikacích.[24,29,30]

Kationické lipidy

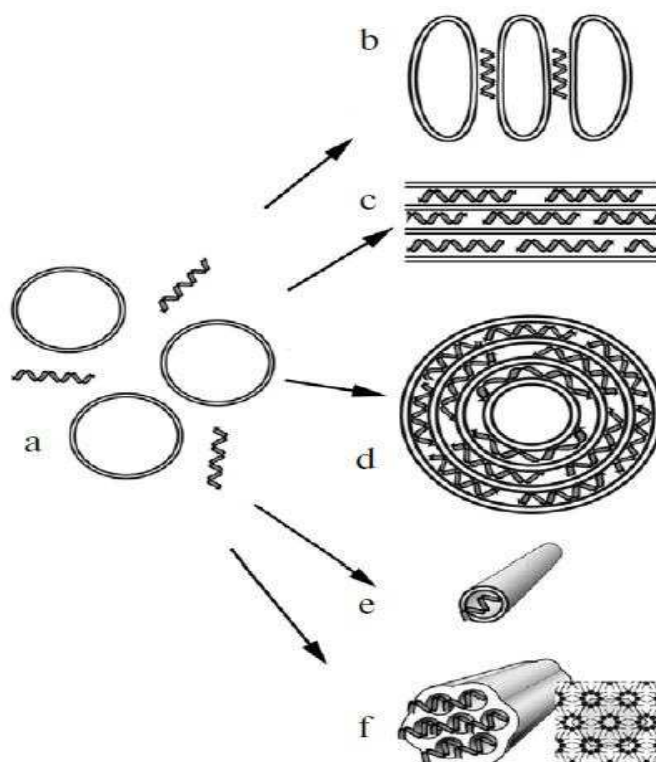
Kationické lipidy jsou synteticky vyrobené sloučeniny, určené pro přenos DNA do buněk. Díky amfifilním vlastnostem jsou schopny tvořit ve vodném prostředí liposom. Amfifilní molekula je tvořena dvěma částmi s různou rozpustností. Jedna část je hydrofóbní – nepolární řetězec, druhá část je hydrofilní polární hlavice[22]. Liposom společně s DNA tvoří kladně nabitý komplex - lipoplexy. Metoda užití lipoplexů se nazývá lipofekce. Pro tvorbu liposomu je zapotřebí přítomnost i neutrálního (pomocného) lipidu. Často to bývá cholesterol. Základní struktura kationického lipidu je vždy stejná (obr.7). Délka celého řetězce je většinou od C8:0 do C18:1. Hlava může být složena z aminů, aminokyselin, peptidů nebo heterocyklů. Spojovací link ovlivňuje chemickou stabilitu a biodegradabilitu. Je spojením mezi kladně nabitou hlavou a hydrofobním zbytkem. Lipidový zbytek ovlivňuje fluiditu membrány. Obsahuje-li nenasycené MK, je fluidita membrán vyšší.[14,20,24,31]



Obr. 7.: *Základní struktura kationického lipidu: hydrofilní hlava nesoucí kladný náboj; spojovací link; hydrofobní zbytek tvořen z dlouhých uhlovodíkových řetězců lipidu.[20]*

Elektrostatické síly umožňují reakci DNA s kladným nábojem hlavy, což je doprovázeno velkými strukturálními změnami. Dochází tak k enkapsulaci DNA. Vznikající polyplex má více strukturálních variant. Nejednoduší je formace propojených liposomů molekulami DNA (obr.8b). Nejběžněji se vyskytující - vícevrstvé útvary (obr. 8c a 8d) vznikají po značné reorganizaci lipidové dvojvrstvy liposomu. DNA vstupuje do liposomu, kryta lipidovou dvouvrstvou z obou stran. Mohou vznikat i dvojvrstvé tuby, které obsahují DNA uvnitř (obr. 8e). Tyto struktury zvané špagety, mohou být součástí z vícevrstvých liposomů nebo z nich vyčnívat. Existuje také struktura inverzní hexagonální fáze. U inverzních liposomů nesměruje polární část molekuly vně struktury ale naopak dovnitř (obr. 8f). Tvorbou lipoplexů je DNA chráněna vůči enzymatické degradaci nukleázami. Díky síťovému kladnému náboji je lipoplex schopen se navázat na buněčnou membránu. Náboj závisí na poměru DNA/lipid. Velká část náboje lipidů je totiž neutralizována záporným nábojem DNA. Lipoplex je schopen, díky struktuře podobné biomembránám, přecházet do buněk endocytózou. Tvar a struktura lipoplexu má vliv na stabilitu DNA, na enkapsulační vlastnosti a na účinnost genové transfekce. Struktura závisí na mnoha faktorech jako je pH, teplota, iontová síla, poměr DNA/lipid a velikost liposomů.

Lipofekce je metodou pro stabilní expresi. Liposomy byly pro přenos DNA použity poprvé v 70 letech. Kationické lipidy jsou efektivní transfekční reagenty, překážkou je jen jejich vysoká cena.[12,14,20,22,31]



Obr.8: Po adsorpci na povrch kationického liposomu(a) může vznikat komplex propojených liposomů molekulami DNA(b). Nebo je vyvolána transformace lipidu, která vede k různým strukturám jako plošné dvojvrstvy(c), vícevrstvé struktury-váčky(d), dvojvrstvé tuby-sphagetti(e) nebo svazek inverzní hexagonální fáze(f).[31]

3.3.3 Fyzikální přenos

Pro přenos DNA do buněk se, kromě chemických činidel nebo virů, využívají i fyzikální síly. Fyzikální přenos je poměrně často založen na transfekci samostatné „nahé“ DNA. Tyto techniky bývají velice jednoduché na manipulaci. Transfekce fyzikálními metodami má poměrně vysokou úspěšnost, protože je částečně vyřešen problém přenosu DNA přes lipofilní biomembránu.

Mezi nevýhody patří limitace nástroji a vybavením. Jejich aplikovatelnost je založena na správné optimalizaci. Některé fyzikální síly mohou totiž způsobit poškození nebo i usmrcení buněk. Většina fyzikálních metod nebylo doposud úspěšně adaptováno na transientní genovou expresi ve velkém, technologicky využitelném měřítku. Patří sem například transfekce pomocí elektrického proudu (elektroporace), ultrazvukem nebo přímo mikroinjekcí.[12,14,18]

Elektroporace

Základem metody je účinek elektrického impulzu s vysokým napětím na buněčnou membránu nebo tkáň. Výsledkem je vyšší permeabilita v důsledku reorganizace lipidové dvojvrstvy a tvorby reverzibilních pórů, kterými mohou prostupovat malé molekuly jako ATP, barvivo, antibiotika, peptidy, oligonukleotidy nebo DNA. Mechanismus elektroporace však není znám dopodrobna. Poprvé byl použit elektrický proud pro transfekci v roce 1982 E. Neumannem.

Po kultivaci buněk a před samotnou elektroporací je třeba buňky zchladit, popřípadě zmrazit, aby pro ně nebyl elektrický impulz velkým šokem. Poté se vloží buňky do kyvety společně s elektroporačním pufrům a přidá se DNA. Kyveta je vystavena elektrickým pulsům o vysokém napětí. Buněčná membrána se chová jako kondenzátor, s výjimkou iontových kanálků. Díky tomu nemůže proud projít skrz membránu. Zároveň dochází ke kolapsu membrány. Tvoří se přechodné kanálky, které mají samovolnou tendenci se uzavírat. Nízká teplota tento proces zpomaluje. Je to dáno vlastnostmi biomembrán při různých teplotách. Při nižší teplotě má biomembrána více rigidní (uspořádanou) strukturu. Zatímco při vyšší teplotě má spíše fluidní charakter. Proto ochlazení buněk přispívá k pomalejšímu uzavírání dočasně vytvořených kanálků pro přestup DNA.

Metoda je vhodná pro přenos do všech typů buněk, vyžaduje ovšem optimalizované elektroporační roztoky a režimy pro každý typ buněk[20]. Elektroporaci lze použít na přechodnou i stabilní transfekci. Rozmezí elektrického napětí pro daný typ buněk udává tabulka 2.[3,4,13,22,32-34]

Tabulka 2: Elektroporační napětí pro některé typy buněk[3]

Typ buněk		Elektrické napětí [kV/cm]
bakteriální	G-	7-15
	G+	až 35
rostlinné, živočišné		1-2

Mikroinjekce

Pomocí kapilární mikroinjekce je možné vložit DNA do cytoplasmu jednotlivých buněk. Metoda tak obchází náročnost přenosu DNA přes membránu. Existuje menší pravděpodobnost, že dojde k mutacím v hostitelské nebo transfekované DNA. K manipulaci je ovšem zapotřebí mikroskop, mikromanipulátor a kapilární jehly. Metoda není vhodná pro transfekci ve větším měřítku. Používá se pro vnesení DNA do embryonálních buněk pro vytvoření transgenních organismů.[14,20,23,33]

Gene gun

Metoda označovaná také jako biolistická transfekce. Mikroskopické částice wolframu nebo zlata jsou obaleny DNA. Částice jsou pak poháněny vysokou rychlostí. Jsou de facto „nastřelovány“ do buněk. Metodu je potřeba optimalizovat. Musí být dosažena rovnováha mezi počtem a velikostí částic nastřelovaných do buněk, poškozením, které způsobí a množstvím DNA, které doručí[33]. Metoda vykazuje vysokou účinnost transfekce jako elektroporace. Nevýhodou oproti elektroporaci je možnost poškození hostitelského organismu. Jedná se o poměrně drahou metodu vzhledem k potřebnému zařízení.[14,33]

Magnetické částice (MATra)

Metoda nazvaná Magnet Assisted Transfection (MATra). Využívá magnetických nanočástic MagTag, na které je uchycena NK a v silně magnetickém poli se dostává do cílových buněk.[20]

Ultrazvuk

Ultrazvuk může být použit pro přenos DNA do buněk. Mechanismus této transfekce není doposud přesně znám.[14]

3.4 Hostitelské buňky

Pro přenos DNA se používají produkční organismy, potřebné k zajištění tvorby r-proteinů. Jsou dvojího typu, eukaryotní a prokaryotní. U buněk prokaryotního typu probíhá transkripce a translace současně. Naopak, vzhledem k přítomnosti jaderné membrány u eukaryotních buněk, nejsou tyto děje simultánní. Existuje mnoho typů buněčných linií, ovšem jen některé splňují 3 požadované kritéria: vysokou účinnost transfekce použitím běžných transfekčních metod, dobrá adaptace na kultivační podmínky a efektivitu nákladů.[10,12,14]

3.4.1 Prokaryotní organismy

Ve srovnání s eukaryotickými, jsou prokaryotické organismy jednodušší. Výhodou bakterií je jednoduchá manipulace, jsou levné a mohou rychle produkovat velké množství r-proteinu. Nevýhodou je špatná rozpustnost proteinu a nedostatečné post-translační modifikace. Ty jsou nezbytné pro správnou biologickou aktivitu komplexních proteinů. To z nich dělá nevhodné hostitelské organismy pro expresi proteinů pro farmaceutické účely, které musí mít zajištěnou správnou strukturu. Bakterie většinou ukládají r-proteiny do inkluzních tělísek.

Nejvíce prostudovaným organismem je *Escherichia coli*. Probíhá u něj jednoduchá a účinná transformace plasmidové DNA. Ovšem nerozpustnost cílových proteinů je limitující zásadním způsobem. Byly proto vyvinuty různé postupy řešící tento problém. Klasickým postupem je modifikace růstových podmínek změnou teploty na nižší. I přesto nepatří mezi tradiční průmyslové organismy. Gramnegativní bakterie rodu *Bacillus* produkují r-proteiny extracelulárně a to ve velkém množství. Jsou schopny snadné adaptace na změny podmínek kultivace. U zbylých gram pozitivních a gram negativních buněk je účinnost přenosu DNA do buněk nízká a je nedostatek vhodných vektorů. Proto je u nich nízká exprese klonovaných genů.[2,13,35]

3.4.2 Eukaryotní organismy

Eukaryotní organismy mají složitější aparát. Především jsou schopny post-translačních úprav, díky nimž mohou produkovat r-proteiny v aktivní podobě. K post-translačním úpravám patří tvorba disulfidických vazeb, glykosilace a modifikace AK uvnitř proteinu. Patří sem kvasinky, hmyzí, rostlinné a živočišné buňky.[14,16]

Kvasinky

Biotechnologicky tradiční mikroorganismus, který je dobrou alternativou k prokaryotním buňkám. Jsou to jednoduchá eukaryota s mikrobiálním charakterem. Rostou poměrně velkou rychlostí s velkým počtem jedinců. *Pichia pastoris* a *Saccharomyces cerevisiae* jsou nejběžnější kmeny pro tvorbu exogenních r-proteinů. Vzhledem k používání *Sachcaromyces cerevisiae* po mnoha staletí, je předpokládána jeho bezpečnost (GRAS: Generally recognized as safe). Do prostředí sekretuje malou škálu proteinů, což je výhodné při purifikaci. Pro kvasinky je zapotřebí vyššího technického zázemí a náročnější manipulace jak u prokaryotních organismů.[2,13,14,16]

Hmyzí buňky

Samotné hmyzí buňky se používají zřídka. Častější je jejich varianta napadená bakulovirem. Hmyzí buňky jsou kultivované *in vitro* a jako vektor je použit bakulovirus. Tento typ buněk se pro výrobu r-proteinů používá již přes 20 let. Díky tomu bylo dosaženo mnoha zlepšení jako je zjednodušení izolace rekombinantního viru nebo kvantifikace metody. Mají schopnost exprese eukaryotních proteinů, úpravou a zpracováním podobný jako savčí buňky. Post-translační modifikace u hmyzích a savčích buněk jsou téměř stejné. Rozdíl je, stejně jako u kvasinek, v tvorbě N-glykosidové vazby. Virion (virová částice) produkuje ochranný matrix polyhedrin. Promotor tohoto proteinu je silný. Nahrazením kódující oblasti polyhedrinu expresní jednotkou má za následek vysokou expresi transgenu. Hlavní limitací expresního systému bakulovirů je časová a finanční náročnost vedoucí k produkci rekombinantního bakuloviru.[13,14,16]

Rostlinné buňky

Výhodou je snadná kultivace, krátká generační doba a asexuální křížení. Post-translačními úpravami se opět shodují se savčími buňkami, ovšem krom glykosilace.[10]

Transgenní rostliny jsou vhodné pro produkci r-proteinů a užití v zemědělství. Mezi modifikace patří: rezistence k herbicidům, škůdcům, větší tolerance ke stresu nebo skladovacím podmínkám. Možnost získání r-proteinu je například rhizosekrecí. Jedná se o sekreci proteinů pomocí kořenů transgenních rostlin do vodného prostředí. Nevýhodou rostlinných buněk je jejich složitější a pevnější buněčná stěna. Proto je náročnější purifikace r-proteinů z jejich buněk.[2]

Živočišné buňky

Mezi nejvýznamnější patří buňky savců. Na rozdíl od nižších eukaryot a prokaryot jsou schopny provést veškeré potřebné post-translační úpravy. Včetně fosforylace, O- a N-glykosilace a modifikace aminokyselin. Využívají se proto na tvorbu terapeutických lidských proteinů. Také na vyhledávání určitých genů a rozpoznávání jejich funkce nebo na přípravu transgenního organismu jako modelů pro studium genetických chorob, příprav hospodářských zvířat s vylepšenými užitkovými vlastnostmi a vytváření cizorodých proteinů (animal farming). Zájem o stabilní, účinné expresní systémy pro produkci humánních proteinů stále stoupá[36]. Hlavní nevýhodou je malý výtěžek proteinu. Maximum se pohybuje okolo 5g/l, což je zlomek v porovnání s kvasinkami nebo bakteriemi.

Živočišné buňky jsou izolovány z tkání a poté kultivovány *in vitro*. Kultivace je nastavena tak, aby co nejvíce připomínala přirozené podmínky buněk. Jedná se o inkubaci při teplotě 37 °C v modifikované atmosféře 5 % CO₂. Manipulace s buňkami vyžaduje sterilní prostředí. Většina buněk roste přisedle, potřebují proto pevný podklad. Mezi takové buňky patří buňky izolované z tkání. Naopak buňky z krevního séra přisedle nerostou. Pro přisedlé buňky je nezbytná neustálá výměna kultivačního média.

Nejčastěji jsou používány buněčné kmeny vycházející z kmenů CHO a HEK293. Obě tyto linie patří mezi přisedlé buňky. CHO (Chinese hamster ovary cells) jsou buňky izolované z vajíček křečka čínského. Byly to první savčí buňky použity pro tvorbu r-proteinu. Tato hlodavčí linie je užívána pro rozšíření nebo selekci buněčných technik a může být adaptována na médium bez séra. Používá se jako hostitelská buňka pro vývoje léků. Pro preklinické testování, pro stabilní rozvoj buněčné linie.

Farmaceutický průmysl často preferuje pro výrobu stabilní buněčné linie CHO před HEK293. Je to dáno dosud dosaženými výsledky z touto buněčnou linií.[2,7,10,12,14,37]

3.4.3 HEK293 EBNA1

Buněčná linie HEK293 EBNA1 je suspenze adaptovaných lidských embryonálních ledvinových buněk, které stabilně tvoří Epstein-Barr virus nukleární antigen 1. Izolovány byly v 70. letech. Číslo 293 značí číslo pokusu pana Grahama. Byly transformovány fragmentem DNA 5 adenovirů. EBNA 1 označuje Epstein-Barr virus. Tento začleněný gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje replikaci exogenní plasmidové DNA. Buňka tak může mít vysoký počet plasmidových kopií v produkční fázi, což vede k vyšším výtěžkům proteinů.

Buňky HEK293 jsou hojně používány na produkci r-proteinů. Mají mnoho výhod jako vysoké výtěžky transfekce s většinou transfekčních metod, lehce rostou v suspenzních kulturách a mohou být adaptovány na média neobsahující sérum. Je to nejpoužívanější buněčná linie na transientní transfekci ve velkém měřítku[12].[7,10,38,39]

3.5 Kultivační médium

Médium hraje velkou roli při růstu a transfekci savčích buněk. Každé kultivační médium musí obsahovat vhodný a snadno utilizovatelný zdroj energie, dále růstové faktory a látky regulující buněčný cyklus[10]. Média obsahující sérum obsahují směs hormonů, živin, růstové faktory a jiné nedefinované složky. Jako séra se používají FBS (fetal bovine serum = fetální hovězí sérum), a HS (horse serum = koňské sérum). V poslední době je tendence používat média bez séra. Je to především kvůli vysoké ceně a biologické bezpečnosti (kontaminace). Také je snaha omezit komponenty odvozené ze zvířat kvůli etickým důvodům. Další výhodou médií bez séra je ulehčení downstream procesů jako je purifikace a izolace produktu. Jako náhražky séra se používají média obohacená proteinovými hydrolyzáty (peptony). Ty jsou zvířecího nebo rostlinného původu. Tyto média podporují vysokou buněčnou hustotu a umožňují dobrou expresi a purifikaci produktů. Byly zkonstruovány jak pro CHO, tak pro HEK293 buněčné linie.

Pro média bez séra je nevhodná transfekční metoda CaPi koprecipitace. Tato metoda je plně závislá na séru. Předpokládá se že sérum tvoří ochranný obal pro komplex DNA/CaPi.[10,12,40]

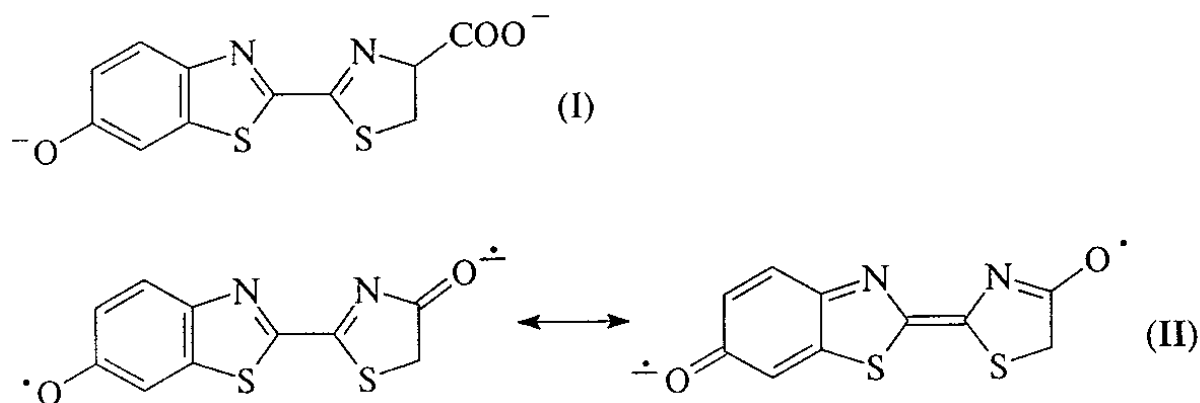
3.6 Reportérové systémy

Reportérové systémy jsou transgeny, vkládané do vektorů, užívané pro vizualizaci a hodnocení exprimovaného proteinu. Jedná se o nedestruktivní způsoby analýzy. V současnosti se používají nejčastěji gen pro luciferázu (lux a luc), β -glukuronidáza (GUS), fluorescenční proteiny (GFP) a gen pro chloramfenikol acetyltransferázu (CAT).

3.6.1 Luciferáza

Luciferáza je enzym světlušek *Photinus pyralis*, který katalyzuje oxidaci proteinu D-luciferinu. K této reakci je zapotřebí Mg^{2+} , ATP a atomární kyslík. Děj je dvoufázový, nejprve heterocyklický D-luciferin (Obr. 9I) reaguje s ATP za vzniku luciferyl adenylátu. Poté dochází k oxidativní dekarboxylaci za vzniku oxyluciferinu (Obr. 9II), který je v singletovém excitovaném stavu. Přechodem do základního energetického stavu dochází k samovolné bioluminiscenční emisi záření o vlnové délce 562 nm. To je detekováno pomocí luminometrů, scintilačních PC nebo CCD kamerou.

Pro zvýšení intenzity signálu se přidává koenzym A do reakční směsi. Metoda je relativně drahá. Během vývoje jiných luciferasových substrátů majících vyšší produkci světla a více sofistikovanějších detekčních přístrojů je možné, že se luciferasa může rozvinout v užitečný reportérový systém pro *in vivo* analýzy[4]. Používá se na *in vivo* aplikace, díky své malé toxicitě.[2,4,33,41,42]



Obr.9: protein luciferin (I) a produkt jeho oxidativní dekarboxylace – oxyluciferin (II)[41]

3.6.2 β -glukuronidáza - GUS

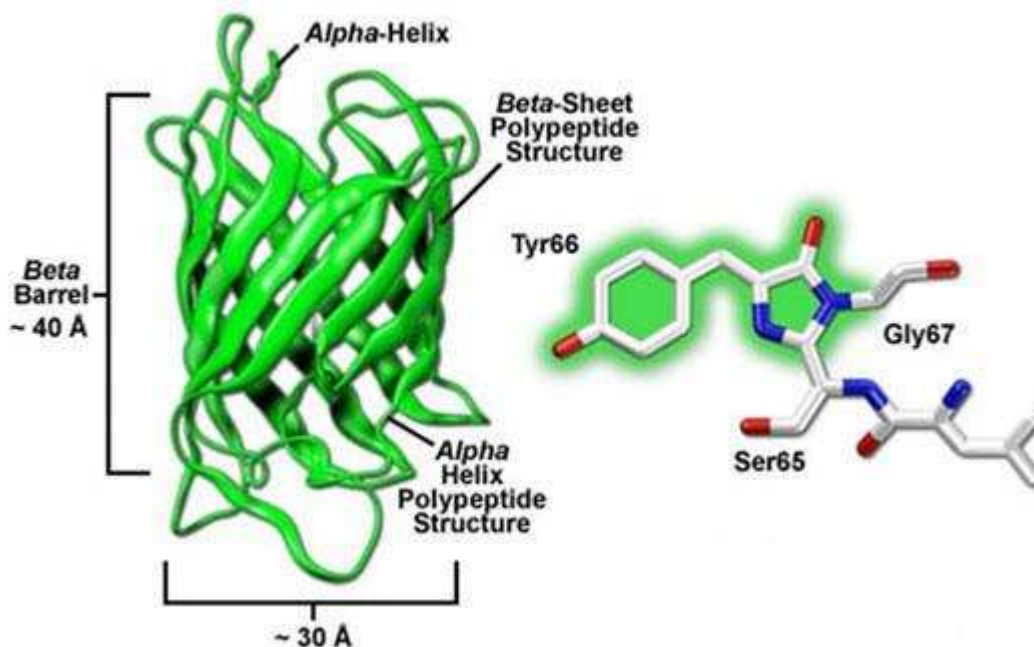
β -glukuronidáza je bakteriálním enzymem, izolovaným z *E. coli*. Může být produkován v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Je jedním z nejrozšířenějších reportéru v *in vivo* a *in vitro* aplikacích. Její stanovení je rychlé a jednoduché. Své uplatnění nachází především u transgenních rostlin. Může být stanovena jak kvalitativním tak i kvantitativním způsobem.

Kvantitativní fluorometrická analýza je založena na reakci se substrátem 4-MUG (4-methylumbeliferyl- β -D-galaktosid). Dochází k hydrolýze na MU (methylumbelliferone), který je ozářen dlouhovlnným UV o délce 365 nm. Poté dává enzym modrou fluorescenci - 570 nm. Kvalitativní analýza je histochemická. Provádí se s chromogenním substrátem X-gluc (5 bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide). Po rozštěpení substrátu dojde k tvorbě nerozpustné modré sraženiny, která zůstává v buňkách. Díky tomu lze lokalizovat buněčnou expresi.[2,4,33]

3.6.3 Green fluorescence protein – GFP

GFP je protein získaný z *Aequorea victoria*. Tento reportér může poskytovat jednoduchou metodu pro hodnocení procenta buněk, které byly transfekovány a může sloužit jako marker pro buňky v populaci, které přijaly transfekovanou DNA[4].

GFP má sudovitý tvar s velikostí 28 kDa. Vnější vrstva má terciární strukturu β skládané listy, které jsou spojeny α helix strukturou. GFP tvoří trojice aminokyselin: serin tyrosin glycin, které tvoří cyklizovanou sekundární strukturu (Obr. 10). Sekvenci serin-tyrosin-glycin má i řada jiných proteinů, nicméně samotná sekvence ještě nezpůsobuje fluorescenci, tu způsobuje teprve až její cyklizace[43]. V žijících medúzách *Aequorea victoria* dochází k fluorescenci GFP pouze za přítomnosti Ca^{2+} iontů, které zapříčiní změnu konformace proteinu. Změnou konformace dochází k excitaci chromoforu do vyšší energetické hladiny. Po navrácení chromoforu na nižší energetickou hladinu dochází k luminiscenci. Z excitačních a emisních píků (Obr. 11) tak lze vyčíst schopnost absorpce modrého světla a emitace zeleného.

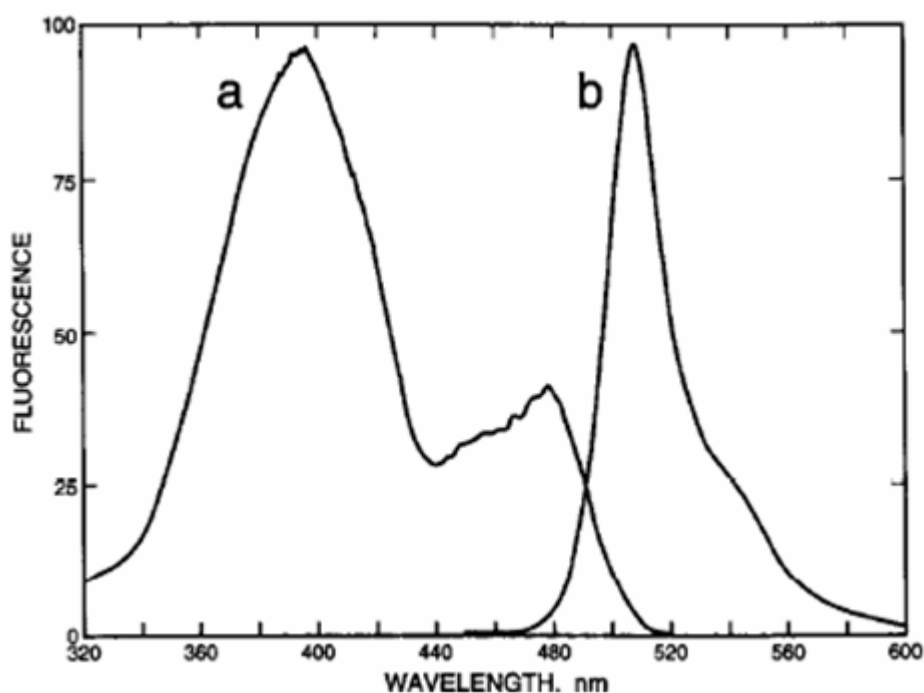


Obr. 10: Na levé straně je zobrazena terciární struktura GFP. Na pravé straně sekundární aminokyselinové složení, které je v cyklické formě zodpovědné za fluorescenci.

Velkou výhodou použití GFP je to, že pro detekci není potřeba substrát ani kofaktor. Detekuje se pomocí flow-cytometru, fluorescenčního mikroskopu nebo fluorimetru.

V roce 2008 byla udělena Nobelova cena za chemii za „objev a rozvoj green fluorescent protein, GFP.“ Cenu získali vědci Osamu Shimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien.

GFP lze využít jako fuzní protein mezi GFP a proteinem zájmu. Schopnost fluorescence na C- i na N-konci řetězce zůstává i po fúzi. Díky tomu je možné sledovat pohyb proteinu a jeho expresi uvnitř buňky v průběhu času. V dnešní době se používají modifikace „divoké“ GFP, které byly vytvořeny pomocí řízených mutací. Genetickou úpravou byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou emisní vlnovou délku. Je tak k dispozici velká škála barevných reportních genů. Modrý EBF, azurový ECF, žlutý YFP a významný červený dsRED protein. DsRED protein bylo problémem zkonstruovat kvůli velké molekulové váze a délce aminokyselinového řetězce. DsRED je významný především při výzkumu orgánů a tkání, protože červené světlo prostupuje hlouběji tkáněmi a tělními tekutinami než světlo zelené.[2,4,33,36,43,44]



Obr. 11: GFP má excitační maximum (a) v 395 nm. Druhé má nižší intenzitu v 470 nm. Tyto vlnové délky odpovídají vlnovým délkám modrého světla. Emisní maximum je ve vlnové délce okolo 509 nm, které odpovídá barvě zelené.[43]

3.6.4 Chloramfenikol acetyltransferasa – CAT

Jedná se o bakteriální enzym, který se často používá jako reportérový gen v savcích buňkách. Tento enzym katalyzuje přenos acetylových skupin z acetyl-CoA na chloramfenikol[4]. Využívá se radioaktivního značení s ^{14}C -chloramfenikolem. Po přidání CAT dojde k acetylaci. Separace acetylovaných a neacetylovaných forem chloramfenikolu je provedena chromatograficky. Lze jej hodnotit kvalitativně i kvantitativně.

CAT byl prvním bakteriálním enzymem získaným z rostlin. Analýza tohoto enzymu je relativně jednoduchá a spolehlivá. Nevýhodou je ovšem časová a finanční náročnost kvůli radioaktivnosti substrátu.[2,4,33]

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

Pro praktickou část byly použity chemikálie vypsané v tabulce 3.

4.1.1 Chemikálie

Tabulka 3.: Použité chemikálie

chemikálie	výrobce	Poznámka
plasmid maxGFP	Amaxa	čistota:1,97
plasmid EGFP-C3	Clontech	čistota:2
plasmid LPL C-6His/pcDNA5	Invitrogen	čistota:2,2
DMEM/F12	Lonza	
FBS	Lonza	fetální hovězí sérum
Trypsin(EDTA)	Lonza	
DMSO (dimethyl sulfoxid)	Sigma-Aldrich	
Fyziologický roztok	Ardeapharma	
GeneJuice	Novagen	
LB médium	Conda	
Resuspendační roztok(P1)	QIAGEN Giga Kit	
Lyzační roztok(P2)		
Neutralizační roztok(P3)		
Ekvilibrační pufr - QBT		
Promývací pufr – QC		
Eluační pufr - QF		
Isopropanol	Lachema	
Etanol	Penta	
PBS (phosphate buffered saline)	GIBCO	
PEI (polyethylenimine)	Polysciences	25 kDa
Trypton N1	Organo Technie	
HCl	Lachner	
Trypanová modř	Sigma-Aldrich	0,4 % w/v
Sterilní destilovaná voda		

4.1.2 Přístroje, nástroje a software

- Laminární sterilní box
- Humidifikovaný CO₂ inkubátor (37 °C, 5 % CO₂)
- Humidifikovaný inkubátor (37 °C, 0 % CO₂)
- Centrifuga
- FLIM, inverzní a fluorescenční mikroskop s Hg výbojkou (Intraco Micro)
- vortex
- Kultivační láhev T-75(75cm²)
- Jednorázové tuby 10-50 ml
- Serologické pipety 5,10,25 ml
- Kryovialky na zamrazování
- Kryogenní box s dusíkem
- Bürknerova komůrka
- Jamkové kultivační desky: 24 jamkové a 12 jamkové
- Zkumavky eppendorf - 1,5ml
- Sterilní filtry
- Sterilní rukavice
- MS office
- ImageJ - program pro zpracování obrazových dat, obsahující statistické zpracování
- Fotoaparát Canon Power Shot G9

4.1.3 Buňky a médium

V experimentální části byly použity buňky HEK293 EBNA1, které jsou blíže popsány v teoretické části v kapitole 3.4.3. Jedná se o buňky se začleněným EBNA1 genem, pocházející z Epstein-Barr viru. Tento gen kóduje jaderný antigen, díky němu může buňka produkovat vyšší počet plasmidů. Proto jsou buňky obsahující tento gen schopné produkovat více r-proteinu. Kultivace těchto buněk je nenáročná. Jako médium se používá DMEM/F12 (složení v kapitole 11.1) s 10 % FBS (fetal bovine serum). Díky FBS jsou buňky přisedlé na dně kultivačních nádob.

4.1.4 Transfekční reagenty

V první i druhé řadě pokusů byl použit transfekční reagent GeneJuice. V druhé řadě pokusů byl použit i kationický polymer PEI. Byla použita jeho lineární forma s velikostí 25 kDa.

GeneJuice je složen z netoxického buněčného proteinu a malého množství polyaminu. Dá se tedy řadit mezi chemické typy přenosu. Používá se pro stabilní i transientní transfekci v eukaryotických systémech. Jeho složení mu umožňuje působení v sérových i bezsérových médiích. Jedná se o suspenzi v 80 % ethanolu.. Uchovává se v teplotním prostředí 4 °C.

4.2 Metody

Manipulace s buňkami

Manipulace s plasmidy

Transfekce

Fluorescenční mikroskopie

4.2.1 Manipulace s buňkami

Rozmražení buněk

Buňky 293 HEK/EBNA1 jsou dlouhodobě skladovány v tekutém dusíku v kryogenním boxu s teplotou -194 °C.

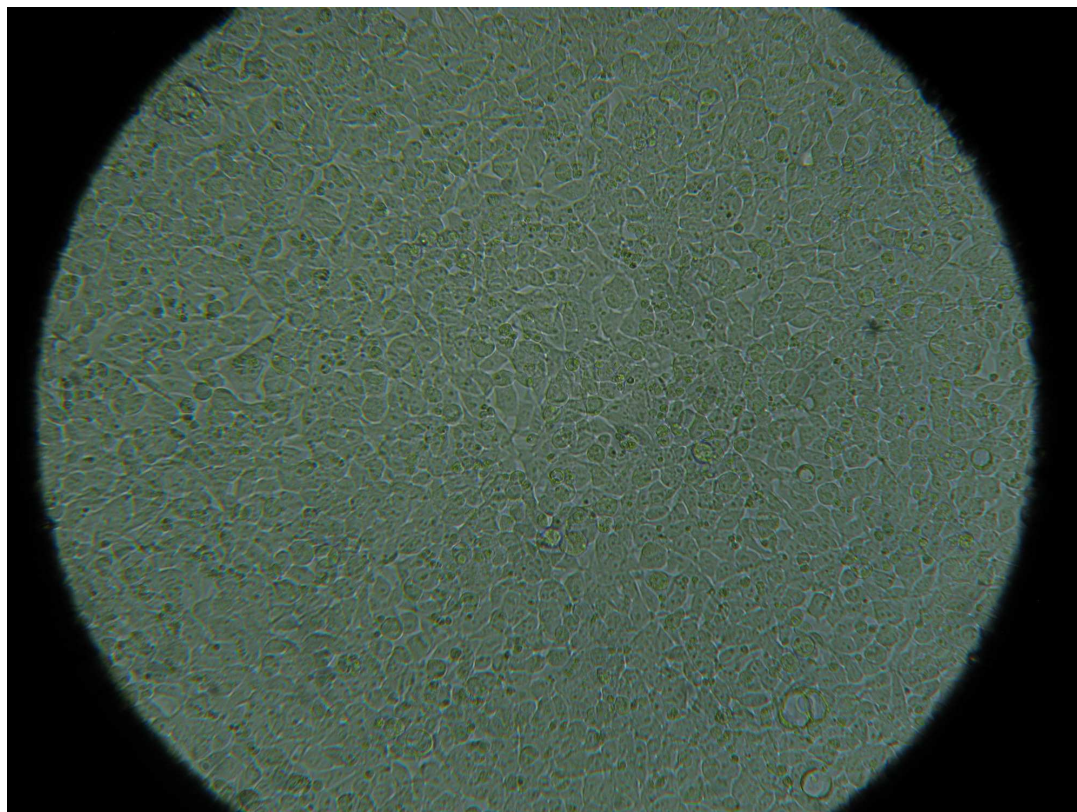
Předem bylo ohřáto 6 ml média, DMEM/F12 s 10 % FBS, v 13 ml tubě. Po vytažení buněk z tekutého dusíku byly zahřáty na 37 °C. Po rozmražení buněk musí být další manipulace rychlá vzhledem k obsahu DMSO v zmrazovacím médiu. DMSO je kryoprotektivní látkou při nízkých teplotách, při vyšších je pro buňky toxický. Buňky jsou pipetovány do média, poté je celý obsah centrifugován (3 minuty, 200 x g a pokojové teplotě (RT)). Po odsátí supernatantu, obsahujícím DMSO byl obsah rozsuspendován s přidanými 3 ml média a přepipetován do T-75. Obsah T-75 byl doplněn médiem s 10 % FBS na 20 ml.

Kultivace a pasáž buněk

Buňky se kultivovaly v humidifikovaném inkubátoru s 5 % CO₂ při 37 °C. Kultivace probíhala dokud buňky nebyly z 80-90 % konfluentní (Obr.12). Po dosažení takovéto konfluence bylo médium odsáno z lahve. Buňky byly promyty 10 ml fyziologického roztoku, aby byly vyplaveny inhibitory trypsinu ze séra. Přídavkem 4 ml EDTA/Trypsin došlo k odpoutání buněk. Po odpoutání, přibližně po 4 minutách, bylo přidáno 4 ml média (DMEM/F12 s 10 % FBS), aby nedošlo k rozbití buněčných stěn trypsinem. Následovalo rozsuspendování shluků. Pro další kultivaci bylo použito 0,25-1 ml trypsinizovaných buněk přidanych do nových T-75 lahví s 20 ml kompletního média. Pro kultivaci nebyly použity žádné antibiotika.

Zamražení buněk

Buňky určené pro zamražení by měly být 80 % konfluentní. Nejprve se trypsinizují stejným postupem jako u pasážování. Po zastavení trypsinizace 4 ml kompletního média se buňky centrifugují. Centrifuguje se při RT (room temperature - pokojová teplota), 7 minut při 1200 x g. Po odsátí supernatantu jsou buňky resuspendovány v 12 ml zamrazovacího média, který je uložen v lázni s ledovou tříští. Médium je složeno z DMEM/F12 s 10 % FBS a 10 % DMSO. DMSO je potřeba filtrovat přes sterilní filtr, jelikož není sterilní. Tato směs se rozpipetuje do 1 ml kryovialek, popíše a zabalené do buničiny a alobalu vloží do mrazáku s teplotou -80 °C. Po 24 hodinách byly kryovialky přemístěny do tekutého dusíku v kryoboxu.



Obr.12: Buňky přibližně 80-90 % konfluentní

4.2.2 Manipulace s plasmidy

Pro experimentální měření byly použity plasmidy pmaxGFP, eGFP a kontrolní plasmid LPL s kódující sekvencí pro lipoprotein lipázu.

Příprava plasmidů

Příprava plasmidů spočívala v jejich izolaci a purifikaci. Byly izolovány 2 plasmidy GFP a EGFP. Postup byl proveden podle příručky QIAGEN Plasmid Purification Handbook za využití QIAGEN Giga Kit.

Prvním krokem bylo rozmrazení plasmidů v *Escherichia coli*. Obsah byl rozsuspendován v 10 ml LB média (složení média – viz 11.2) a inkubován přes noc při teplotě 37 °C na třepačce (300 rpm).

Tato startovací kultura byla inokulována do 2,5 l LB média a nechaná kultivovat se při 37 °C přes noc na třepačce (300 rpm).

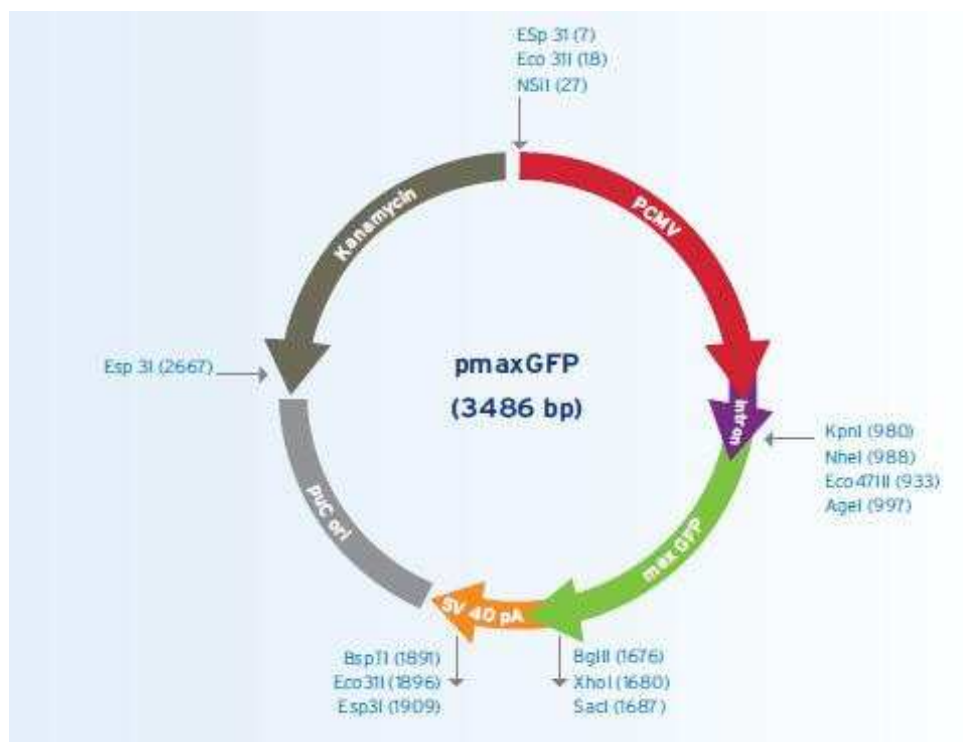
Další den byly buňky centrifugovány při 6000 x g při 4 °C po dobu 15 minut. Bakteriální pelet byl resuspendován v 125 ml pufru P1 (resuspendační), který obsahoval RNázu A. Složení pufrů je obsaženo v kapitole 11.3. Bakterie byly kompletně resuspendovány pomocí vortexu nebo opětovným pipetováním nahoru a dolu, dokud nezbyl žádný shluk buněk. Po přidání 125 ml P2 pufru (lyzační), byl celý obsah pětkrát promíchán jemným obracením tuby a inkubován při pokojové teplotě (RT) 5 minut. Dále bylo přidáno 125 ml chlazeného neutralizačního P3 pufru. Opět byla suspenze pětkrát promíchána obracením tuby a inkubována 20 minut na ledu, aby došlo k lepší precipitaci genomové DNA, proteinů, buněčných zbytků a SDS. Lyzát byl centrifugován při 6000 x g po dobu 30 minut.

Ekvilibrace kolony byla zajištěna 75 ml QBT pufru 15 minut před použitím kolony. Supernatant byl poté dávkován na kolonu. Po odkapání supernatantu, byla zachycená DNA přečištěna 300 ml QC pufru. Poté bylo eluováno 100 ml QF pufru. Následovala precipitace vyeluované plasmidové DNA s použitím 70 ml isopropanolu, obsah byl protřepáván po dobu 2 minut a nakonec zcentrifugován - 5000 x g, 4 °C po dobu 60 minut. Supernatant byl odlit a pelet promyt 10 ml 70 % etanolem. Následovala další centrifugace - 13000 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant DNA byl opatrně dekantován bez narušení peletu a vysušen v proudě vzduchu po dobu 10 minut. Poté byla DNA resuspendována do TE pufru.

Čistota a koncentrace vyizolované plasmidové DNA byla měřena spektrofotometricky. Čistota byla měřena jako podíl absorpance DNA a absorpance RNA, tedy poměr A260 ku A280. Výsledky čistoty a koncentrace ukazuje Tabulka 4. (viz Příloha) Za vhodně čistou je považována DNA o hodnotě $2,0 > A_{260}/A_{280} > 1,8$.

pmaxGFP

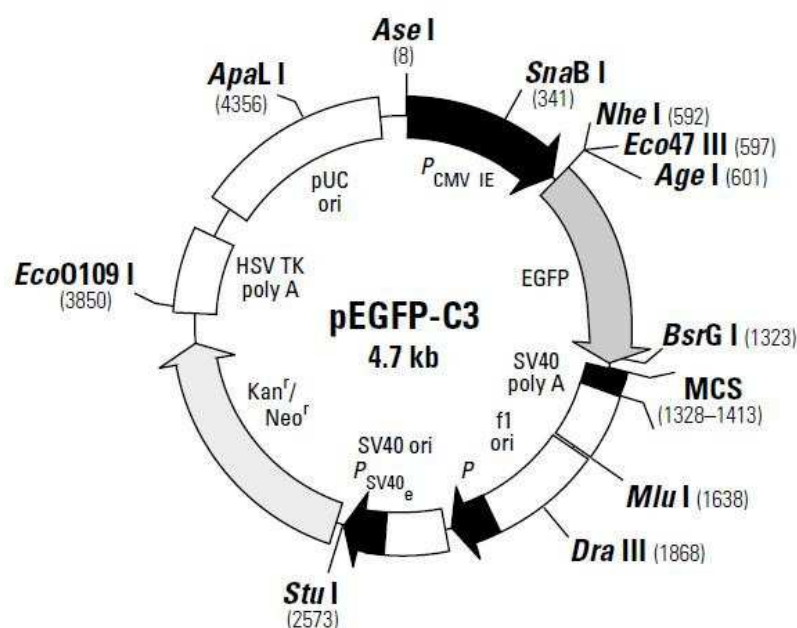
Jeden z proteinů odvozených z GFP. Je získán z *Pontellina species*. Plasmid maxGFP je používán na pozitivní kontrolu při sledování úspěšnosti transfekce. Má lehce vyšší fluorescenci v porovnání s EGFP (enhanced GFP = zlepšená GFP). Detekce se provádí pomocí fluorescenčních mikroskopů a průtokové cytometrie (FCM – flow cytometry). Mapa plasmidu je na Obr. 13.



Obr. 13: Mapa plasmidu *pmaxGFP*

pEGFP-C3

Plasmid EGFP (enhanced = vylepšený) je jednou z variant GFP. Podle výrobce by úspěšnost transfekce, stejně jako mortalita buněk, měla být srovnatelná s plasmidem maxGFP. Plasmid EGFP byl vytvořen pro vyšší fluorescenci v porovnání s „nativním“ GFP. Excitační maximum má při 488 nm a emisní maximum při 507 nm. Plasmid má zaměněné aminokyseliny Phe-64 za Leu a Ser-65 za Thr. Vektor obsahuje počátek replikace použitelný pro expresi v savčích buňkách. Bakteriální část obsahuje rezistenci na kanamycin, použitelný v *E. Coli*. Mapa plasmidu je znázorněna na Obr. 14.



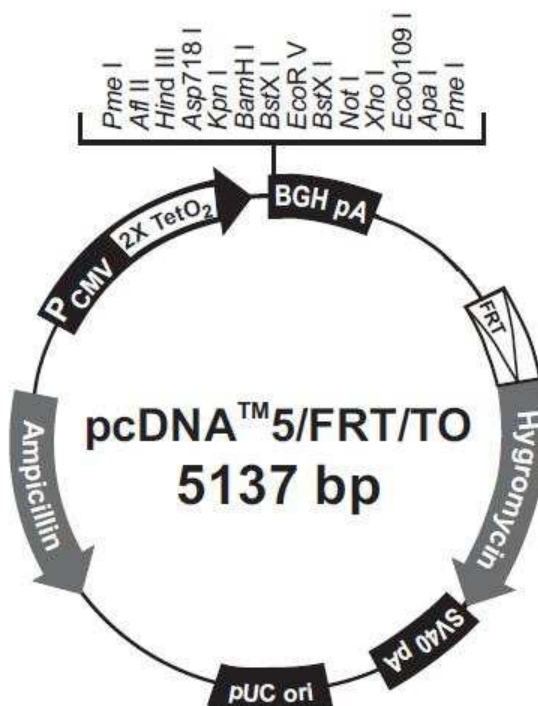
Obr. 14: Mapa plasmidu *pEGFP-C3*

LPL C-6His/pcDNA 5

Jedná se o kontrolní plasmid, který obsahuje kódující sekvenci pro lipoprotein lipázu (LPL). Tato sekvence byla vložena do pcDNA jako inzert. Tento inzert byl vložen mezi sekvence KpnI/XhoI v oblasti multiple cloning site:

KpnI/Kozak/signal sequence hmm38/NheI/LPL/6xHis/GGQ/XhoI

, kde KpnI, NheI, HindIII a XhoI jsou místa rozpoznána restrikcími endonukleázami. Sekvence GGQ kóduje trojici aminokyselin – 2 x glycin a kyselinu glutamovou. Inzert byl vložen do pcDNA5/FRT/TO (Obr.15).



Obr.15: mapa plasmidu pcDNA5/FRT/TO

4.2.3 Transfekce

Po přípravě buněk o vhodné konfluenci a izolaci plasmidů byly buňky transfekovány pomocí transfekčních metod.

V prvním pokuse byl testován rozdíl mezi plasmidy maxGFP a eGFP pomocí transfekčního reagentu GeneJuice. Tento pokus měl také za úkol rozhodnout vhodnou koncentraci plasmidu pro transfekci.

V druhé sadě pokusů byl pozorován rozdíl mezi kultivací v CO₂ a v kultivaci bez přítomnosti CO₂. V každém kultivačním prostředí byly použity dvě transfekční směsi. Jedna směs obsahovala jako transfekční reagent GeneJuice (GJ). Druhá směs obsahovala lineární PEI. Jako reportérový plasmid byl vybrán vhodnější plasmid z první řady pokusů. Také koncentrace plasmidu byla vybrána na základě výsledků z prvního pokusu.

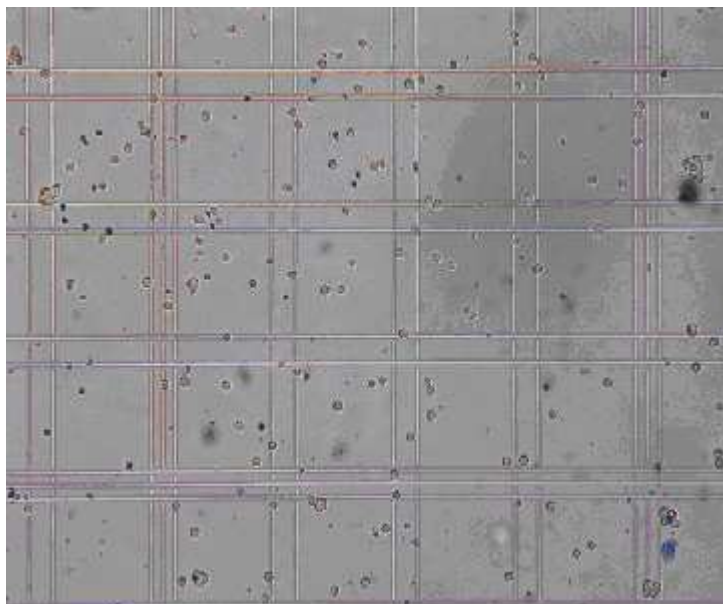
Výpočet buněčné hustoty

Přibližně 24 hodin před samotnou transfekcí byl připraven jamkový set s kompletním médiem (DMEM/F2 a 10 % FBS) a buňkami o požadované koncentraci.

Pro určení koncentrace trypsinizovaných buněk se využívá trypanové modři. 100 µl buněk bylo přidáno k 100 µl trypanové modři a promícháno. Po 5 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla suspenze vložena do Bürknerovy komůrky pod přiložené krycí sklíčko (Obr. 16). Pod mikroskopem byly spočteny živé buňky v 10 čtvercích. Celkový počet buněk byl získán jako součin:

$$n = x \cdot 2 \cdot 2,5$$

,kde n je celkový počet buněk v 1 ml, x je součet buněk v 10 čtvercích. Číslo 2 je vztaženo na ředění a 2,5 zahrnuje relativní objem čtverce.



Obr. 16: Počítání buněk v Bürknerově komůrce (hemocytometr) – žluté (živé) a modré (mrtvé) buňky[45]

Kultivace v jamkových deskách

Kultivace probíhala v jamkových deskách. Ty byly nachystány den před transfekcí (T-1). Před transfekcí bylo médium odsáto a vyměněno za transfekční médium (T0). Den po transfekci bylo potřeba médium opět vyměnit za produkční médium (T1). Média jsou popsána v designu pokusů - tabulky 5 a 6.

V první řadě pokusů byly buňky kultivovány ve dvou 24 jamkových deskách. Jeden pro maxGFP a druhý pro EGFP. Kultivace jamkových setů probíhala v humidifikovaném inkubátoru s 5 % CO₂ při 37 °C.

Druhá sada pokusů vyžadovala kultivaci ve dvou 12 jamkových deskách. Každý jamková deska obsahovala polovinu buněk s PEI a polovinu s GJ. Jedna jamka byla ponechána jako negativní kontrola. Jedna jamková deska byla kultivována v humidifikovaném inkubátoru přístupem 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Druhá byla kultivována v inkubátoru bez přístupu CO₂ o stejné teplotě. Rozdíl v kultivaci byl patrný na první pohled. Po vyjmutí z inkubátoru bylo médium u kultivačních desek bez přístupu CO₂ načervenalé. Naopak u kultivačních desek s přístupem CO₂ se změnila barva média na bledě žlutou. Důvodem je snížení pH média pomocí HCO iontů, které se tvoří v reakci s vodou.

Po transfekci byly buňky kultivovány za stejných podmínek jako před transfekcí a to až do konce zpracování výsledků. Buňky v prvním ani v druhém pokusu nebyly během kultivace protřepávány na třepáčkách.

Transfekce

Pokus 1

Před transfekcí bylo potřeba odsát médium. 100µl média se zvortexuje s transfekčním reagentem a nechá se adaptovat 5-15 minut. Poté se přidá plasmid o požadované koncentraci a poměru k reagentu. Také se nechá adaptovat 5-15 minut. Tato transfekční směs je pak přidána do předem připraveného transfekčního média. Kultivace buněk probíhala stejně jako před transfekcí.

Tabulka 5: Design pokusu 1

kultivace	24 jamková deska
buněčná koncentrace	0,5 x 10 ⁵ buněk/jamka
objem vzorku	1ml/jamka
transfekční reagent (TR)	GeneJuice
kultivační médium	DMEM/F12+10 % FBS
transfekční médium	DMEM/F12 (bez FBS)
produkční médium	DMEM/F12 (bez FBS)
počet opakování	4
DNA:TR	1:3
c DNA [µg/ml]	0,1;0,25;0,5;1

Pokus 2

Při využití GeneJuice byla vždy v tripletech do zkumavek eppendorf napipetována následující transfekční směs. 3 µl GeneJuice do 100 µl DMEM/F12 bez séra. Inkubace 5 minut za RT (pokojové teploty) a trikrát vortex po dobu 3 sekund. 0,1 µg plasmidu GFP a 0,25 µg plasmidu LPL bylo vloženo do směsi GJ. Vzniklá směs DNA-GJ se promíchala pipetou a inkubovala 5-15 minut při RT. Poté byla směs vložena do jamek. Desky se lehce protřepaly, aby došlo k lepší distribuci po celé ploše jamky.

Při použití PEI bylo nejprve nepipetováno 50 µl PBS v tripletech do ependofek, pak bylo do každé přidáno 2,5 µg DNA v poměru 1:10 (GFP:LPL) a nakonec se vzniklá směs DNA-PBS třikrát zamíchala na vortexu po dobu 3 s. Mezitím byla do jiné ependorfky připravena směs 650 µl PBS a 52 µl PEI, která byla taktéž promíchána na vortexu po dobu 3 sekund. Směs PBS-PEI byla po 100 µl přidávána do směsi DNA-PBS. Takto vzniklá směs DNA-PEI byla inkubována při RT 15 min a po této době přepipetována do jamek. Desky byly, stejně jako u prvního pokusu, lehce protřepány kvůli distribuci komplexu DNA-transfekční reagent.

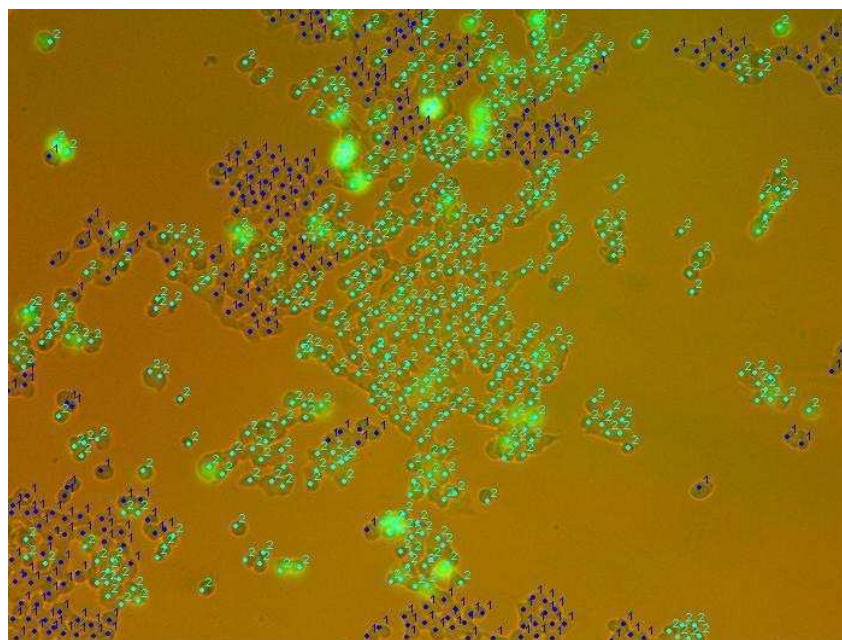
V rozmezí 24 hodin po transfekci byl přidán ke směsi s LPL pepton Trypton N1. Pepton je přidáván post-transfekčně jako výživa buněk pro umožnění produkce daného genu zájmu (genu pro LPL). Připraví se 20 % vodný roztok, který se poté sterilně (přes sterilní kroužky) přidává do každé jamky s plasmidem LPL po 25 µl. Plasmid LPL by měl sloužit jako kontrola úrovně exprese sekretovaného proteinu. Úroveň exprese LPL detekovaná pomocí Western blottu však byla velmi nízká. Výsledky Western blottu nejsou zahrnuty do diplomové práce.

Tabulka 6: Design pokusu 2

kultivace	12 jamková deska
buněčná koncentrace	2×10^6 buněk/jamka
objem vzorku	1ml/jamka
transfekční reagent (TR)	GeneJuice, PEI linear
kultivační médium	DMEM/F12+10 % FBS
transfekční médium	DMEM/F12 (bez FBS)
produkční médium	DMEM/F12 (bez FBS)
počet opakování	3
DNA:TR	1:3
c DNA[$\mu\text{g/ml}$]	1

4.2.4 Fluorescenční mikroskopie

Transfekované buňky byly přibližně po 2 až po 3 dnech pozorovány pomocí FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) mikroskopu s rtuťovou výbojkou. Na pozorování byl použit zelený filtr (označení G), který má rozsah 460-550 nm. Tímto rozsahem pokrývá obě emisní maxima, jak pro GFP i pro EGFP. Pro zaznamenání fotografií byl použitý fotoaparát Canon Power Shot G9. Počítání fluoreskujících (svítících) buněk bylo prováděno v programu Image J (Obr. 17) a následně staticky zpracované v programu Microsoft Office Excel.



Obr. 17: Počítání fluoreskujících buněk pomocí programu Image J: modře značeny nefluoreskující buňky, zeleně – fluoreskující buňky.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Pokus 1

První experiment měl zjistit, který ze dvou reportérových plasmidů má lepší vlastnosti pro použití v následujících experimentech. Na porovnání byly vybrány plasmidy maxGFP a EGFP.

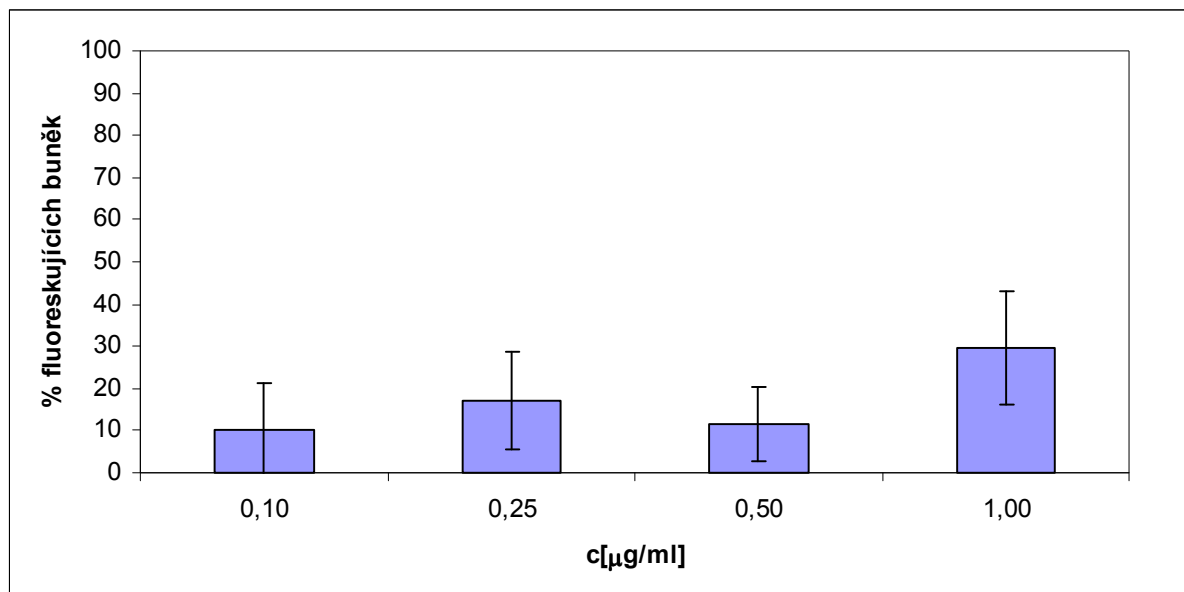
Pro oba plasmidy bylo stanoveno koncentrační rozpětí: 0,1; 0,25; 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. V tomto koncentračním rozpětí byly plasmidy ve čtyřech opakováních transfekovány do buněk. Po 2-3 dnech byly detekovány transfekované buňky. Detekce proběhla pomocí fluorescenčního inverzního mikroskopu (FLIM). Celý pokus byl proveden ve třech opakování.

5.1.1 Stanovení optimální koncentrace

Pro stanovení optimální koncentrace byly z naměřených dat vybrány optimální časové intervaly. Jako optimální časový interval byl vybrán ten, který vykazoval nejvyšší hodnoty transfekovaných buněk, a zároveň byl společný pro všechna měření.

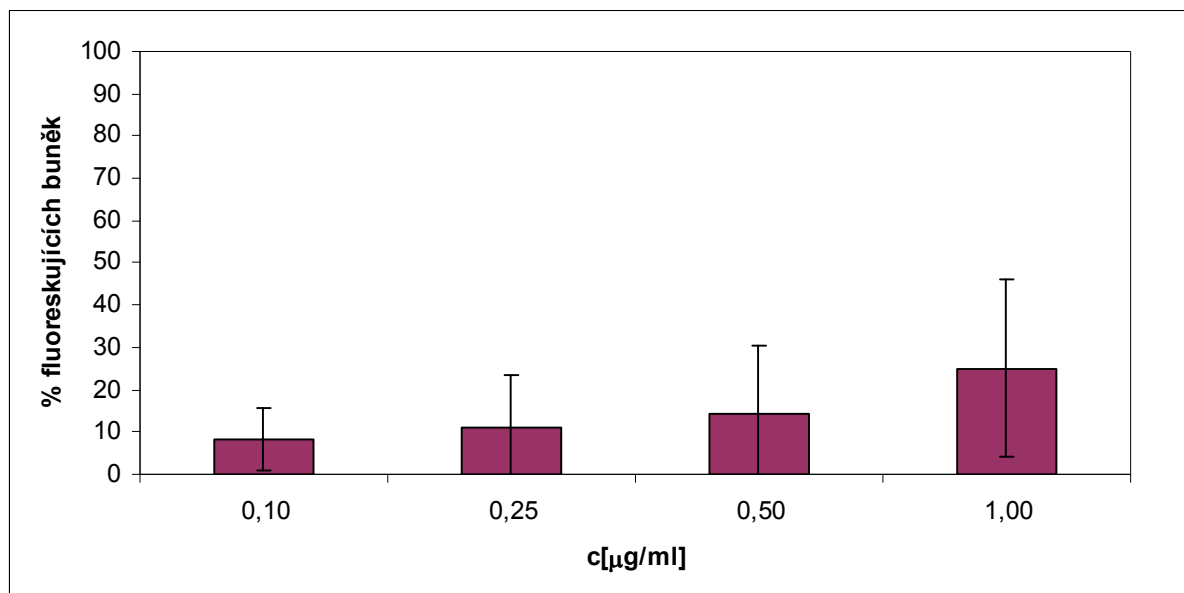
GFP

Graf 1: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu GFP v různých koncentracích v optimálním časovém intervalu (44-55h)



EGFP

Graf 2: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu EGFP v různých koncentracích v optimálním časovém intervalu (44-55h)

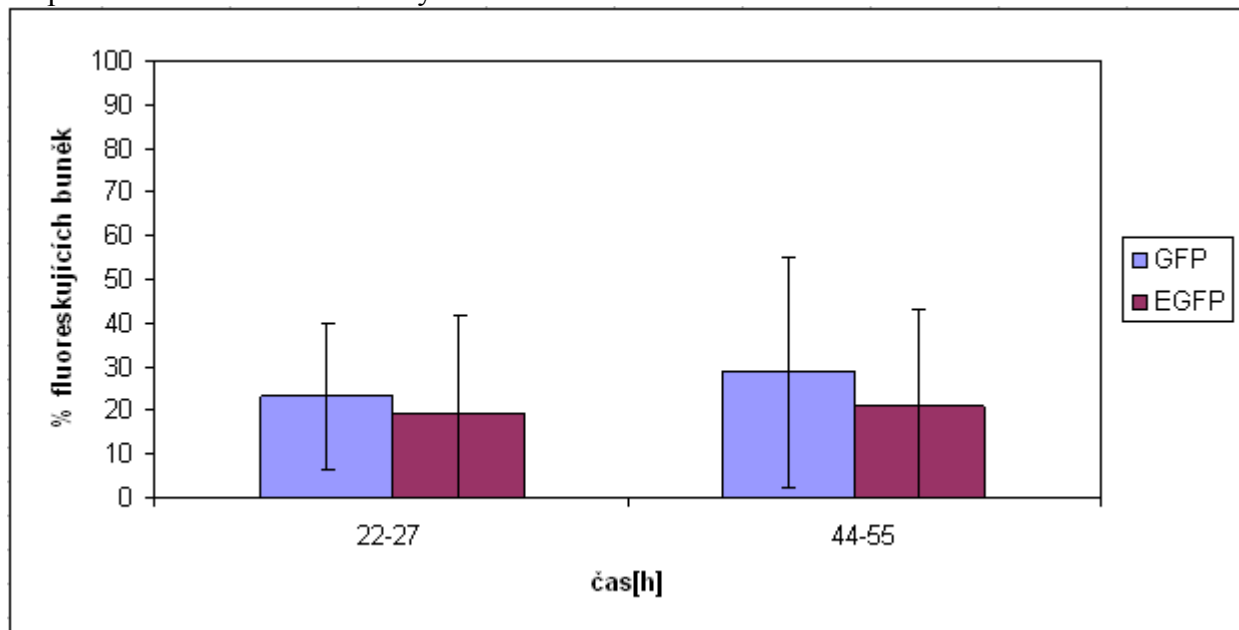


Pro každé měření byla použita jamková deska se 4 jamkami pro GFP a 4 jamkami pro EGFP. Měření bylo provedeno třikrát. Hodnoty v grafech jsou tedy výsledkem průměrů 4 jamek ve 3 opakováních. Jako optimální časový interval bylo stanoveno časové rozmezí 44-55 h po transfekci. Z grafu 1 a grafu 2 byla vybrána optimální koncentrace $c = 1 \mu\text{g/ml}$ pro oba použité plasmidy, která byla zároveň nejvyšší použitou koncentrací. Vysokou expresi plasmidů o této koncentraci si lze vysvětlit jako přímou úměru koncentrace plasmidů na dané expresi a s tím související zvyšování účinnosti transfekce. Tedy čím je koncentrace plasmidu vyšší, tím se zvyšuje i pravděpodobnost exprese tohoto plasmidu.

5.1.2 Srovnání exprese GFP a EGFP

Pro srovnání rozdílů v expresi GFP a EGFP byly vybrány časové intervaly 22-27 h a 44-55 h. Tyto intervaly byly společné pro všechna měření. Jako optimální koncentrace byla vybrána $c = 1 \mu\text{g/ml}$. Výsledné hodnoty jsou opět průměry hodnot 4 jamek po 3 opakováních.

Graf 3: Rozdíl fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu GFP a EGFP v optimální koncentraci v časových intervalech



Zhodnocením grafu 3 lze říci, že při optimální koncentraci má vyšší úspěšnost transfekce maxGFP oproti EGFP. Jak již bylo řečeno, plasmid maxGFP má větší fluorescenci jak EGFP (kapitola 5.2.2). Právě z toho důvodu bylo u něj možné přesněji detekovat transfekované buňky.

5.2 Pokus 2

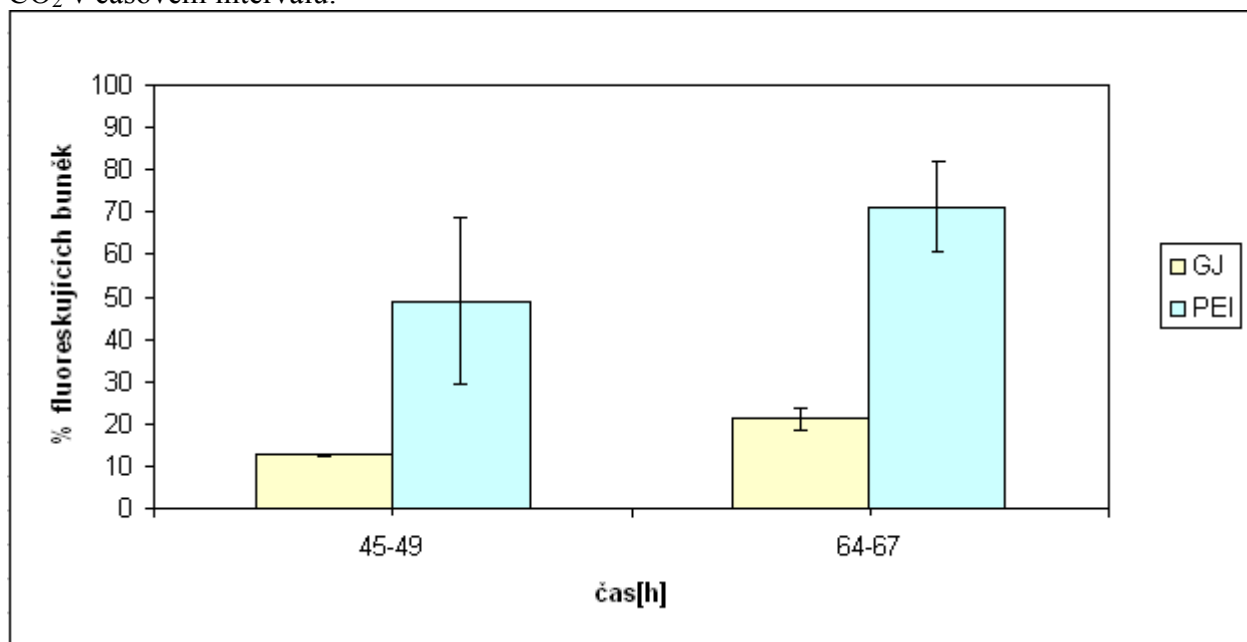
Druhý experiment byl zaměřen na rozdíl kultivací. Paralelně byl také zkoušen rozdíl transfekčních reagentů PEI a GeneJuice. Z výsledků prvních experimentů byla vybrána koncentrace plasmidu $c = 1 \mu\text{g/ml}$ a reportérový plasmid maxGFP. Tento pokus byl prováděn v tripletech ve dvou opakováních.

5.2.1 Srovnání účinnosti transfekce pomocí GeneJuice a PEI

Během porovnání transfekčních směsí GeneJuice a PEI probíhalo zároveň porovnání změny kultivačních podmínek. Časové intervaly měření byly vybrány 45-49 h a 64-69 h.

Byl srovnán rozdíl použitých transfekčních směsí GeneJuice a PEI za stejných kultivačních podmínek jako u pokusu 1 (Graf 4). Tedy za kultivace při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Už na první pohled se lépe osvědčil transfekční reagent PEI.

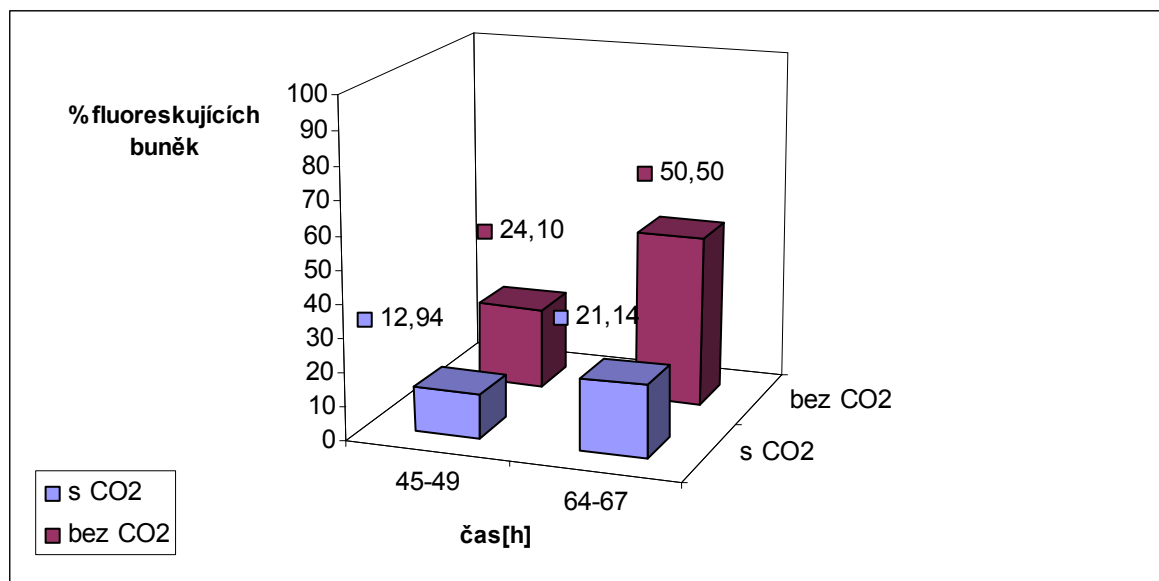
Graf 4: Porovnání fluorescence buněk transfekovaných s využitím GJ a PEI v prostředí 5 % CO₂ v časovém intervalu.



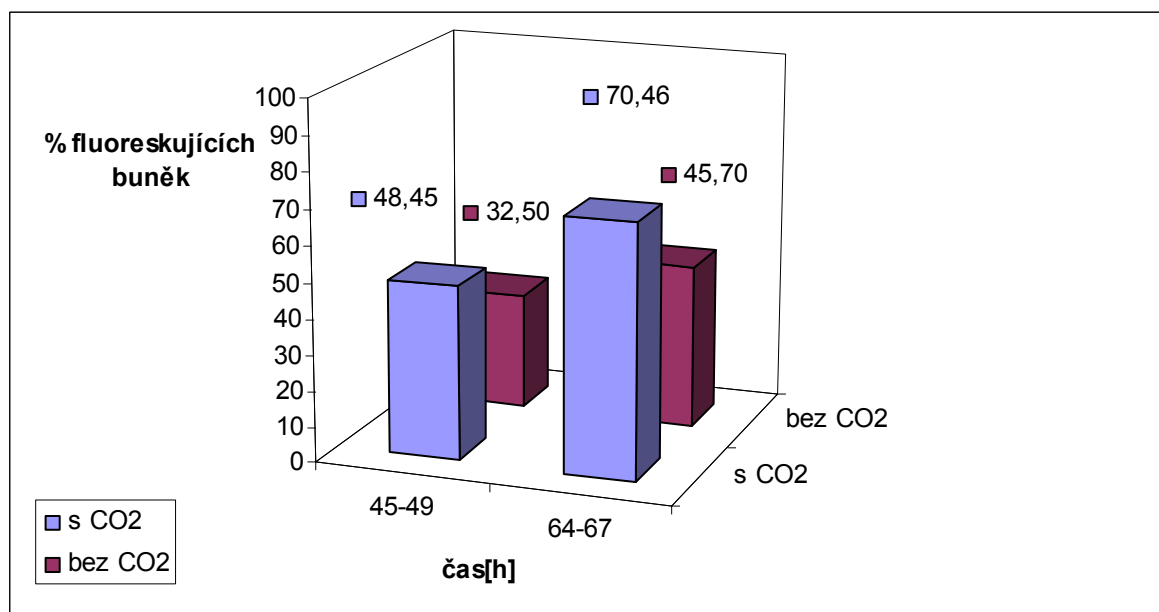
5.2.2 Srovnání vlivu CO₂

Pro porovnání vlivu CO₂ jako kultivační podmínky byly využity pro lepší přehled 3D grafy (Graf 5 a Graf 6). Bez přítomnosti CO₂ byla úspěšnost transfekce u obou transfekčních reagentů téměř stejná. Velký rozdíl ovšem nastal za přítomnosti CO₂. Zde GeneJuice vykazoval mnohem menší hodnoty transfekovaných buněk než PEI. Důvodem by mohlo být snížení pH prostředí. GeneJuice je za nižších hodnot pH téměř stejně účinný jako PEI. Při vyšších hodnotách pH nemá GeneJuice takovou účinnost. Výrobce také upozorňuje na zbytky séra v médiu. Nevymytí desek při změně média mohlo být překážkou pro úspěšnou transfekci GeneJuice.

Graf 5: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí GJ za různých kultivačních podmínek v čase



Graf 6: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí PEI za různých kultivačních podmínek v čase



Grafy hrubých dat, zaznamenávající samostatné opakování, jsou shrnuty v příloze v kapitole 11.5. Pro první pokus se jedná o grafy 7-12.(11.5.1) Pro druhou sadu pokusů to jsou grafy 13 a 14.(11.5.2)

6. ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl zhodnotit účinnost transfekce buněčné linie HEK293 EBNA1 pomocí proteinu GFP.

Teoretická část se zabývá především typy transfekčních metod, vektorů, buněčných linií, kultivačních médií a reportérových systémů. Také popisuje tvorbu rekombinantních proteinů a rozdíl mezi stabilní a přechodnou transfekcí.

Experimentální část je rozdělena na dva bloky. V první části byl zhodnocen rozdíl dvou reportérových GFP plasmidů v různých koncentracích. Jako optimální koncentrace byla stanovena $c = 1 \mu\text{g/ml}$ pro optimální časový interval 44-55 hodin po transfekci. Vyšší exprese, respektive lepší rozlišovací schopnost vykazoval plasmid maxGFP. V druhé části experimentů byl použit plasmid maxGFP s optimální koncentrací. Druhá část je zaměřena na rozdíl transfekčních činidel GeneJuce a lineární PEI (polyethylenimin). V podmínkách nastavených pro první část experimentů, tedy kultivaci při teplotě 37°C a $5\% \text{CO}_2$, byla vyšší účinnost transfekce s použitím lineárního polyethyleniminu. Při změněných podmínkách kultivace; 37°C bez přístupu CO_2 , byly účinnosti obou reagentů téměř srovnatelné.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CVAK, Ladislav; FUSEK, Martin. Moderní biotechnologie a farmaceutický průmysl. *Chemické listy*. 2004, 12, s. 1087 – 1095.
- [2] DOŠKAŘ, J. *Přednášky z molekulární genetiky II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [3] RITTICH, B. *Přednášky z bioinženýrství II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [4] STAŇKOVÁ, Ingrid. *Příprava transgenních buněčných linií a jejich analýza*. Brno, 2009. 53 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [5] KIM, Tae; EBERWINE, James. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010, 2, s. 3173-3178.
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Praha : Akademie věd České republiky, 1999. 192 s.
- [7] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*. 2002, 30(2):e9
- [8] SØRENSEN, Hans; MORTENSEN, Kim. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*. 2005, 115, s. 113-128.
- [9] DÜRRSCHMID, Karin, et al. Monitoring of transcriptome and proteome profiles to investigate the cellular response of E. coli towards recombinant protein expression under defined chemostat conditions. *Journal of Biotechnology*. 2008, 135, s. 34-44.
- [10] ŠMÍD, J. Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1. Brno, 2009. 57s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [11] ALÁN, Jan. *Řešení 3D struktury proteinu na atomární úrovni se zaměřením na lektiny a glykosyltransferasy*. Brno, 2007. 70 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [12] BALDI, Lucia, et al. Recombinant protein production by large-scale transient expression in mammalian cells : state of the art and future. *Biotechnology letters*. 2007, 29, 5, s. 677-684.
- [13] LIU, Chaoting, et al. Transient Transfection Factors for High-Level Recombinant Protein Production in Suspension Cultured Mammalian Cells. *Molecular Biotechnology*. 2008, 39, s. 141-153.
- [14] EL-MOGY, Mohamed A. *Adenovirus-based exogenous gene expression in mammalian cells*. St. Catharines, Ontario, Canada, 2009. 150 s. Dizertační práce. Brock University.

- [15] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. 112 s. ISBN 80-214-3057-5.
- [16] ŠPANOVÁ, A. *Přednášky z molekulární biotechnologie 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [17] SYSLOVÁ, Ivona. *Klonování a exprese glykosyltransferas*. Brno, 2007. 94 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně.
- [18] BOECKLE, Sabine; WAGNER, Ernst. Optimizing Targeted Gene Delivery: Chemical Modification of Viral Vectors and Synthesis of Artificial Virus Vector Systems. *The APPS Journal*. 2006, 4, s. 731-742.
- [19] PYSZKOVÁ, Michaela. *Pokroky v terapii cystické fibrózy a jiných monogeně dědičných chorob*. Brno, 2010. 59 s. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [20] PÁVEK, P. *Přednášky z moderní techniky studia buňky 2009*, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, katedra buněčné biologie a genetiky, 2009
- [21] GUO, Wenjin; LEE, Robert. Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII). *Bioscience Reports*. 2000, 5, s. 419-432.
- [22] ŠKRABALOVÁ, Michaela. *Kationické liposomy pro transfekci buněk*. Brno, 2007. 98 s. Diplomová práce. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [23] NICKOLOFF, Jac; SPIRIO, Lisa; REYNOLDS, Richard. A Comparison of Calcium Phosphate Coprecipitation and Electroporation. *Molecular Biotechnology*. 1998, 2, s. 93-101.
- [24] ILARDUYA, Conchita; SUN, Yan; DÜZGÜNEŞ, Nejat. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* . 2010, 40, s. 159-170.
- [25] CHERNG, Jong-Yuh, et al. The characteristics and transfection efficiency of PEI modified by biodegradable poly(b-amino ester). *Journal of Materials Science*. 2010, 21, s. 543–1551.
- [26] JIANG, Ge, et al. DNA/PEI/Alginate Polyplex as an Efficient In Vivo Gene Delivery System. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2007, 12, s. 684-689.
- [27] MASOTTI, Andrea, et al. Physicochemical and biological study of selected hydrophobic polyethylenimine-based polycationic liposomes and their complexes with DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, 15, s. 1504-1515.
- [28] EDINGER, Daniel; WAGNER, Ernst. Bioresponsive polymers for the delivery of therapeutic nucleic acids. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2011, 1, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>.
- [29] EMMANOUIL, Kalyopy, et al. Novel reducible linear L-lysine-modified copolymers as efficient nonviral vectors. *Journal of Controlled Release*. 2010, 143, 3, s. 326-334 .

- [30] DAI, Jian, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery. *Biomaterial*. 2011, 32, s. 1694-1705.
- [31] TARAHOVSKY, Y.S. Cell Transfection by DNA-Lipid Complexes – Lipoplexes. *BIOCHEMISTRY (Moscow)*. February 2009, 74, 12, s. 1293-1304. ISSN 0006-2979.
- [32] HIRT, Helmut, et al. Use of electroporation in genetic analysis of enterococcal virulence. *Methods in Cell Science*. 1998, 20, s. 79–84.
- [33] BLAŽÍČKOVÁ, Jitka. Rostlinné explantátové kultury a jejich využití pro studium biologie telomer. Brno, 2007. 33 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.
- [34] MÁROVÁ, I. *Přednášky z biochemie I*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008
- [35] SMITH, Harold. The transcriptional response of Escherichia coli to recombinant protein insolubility. *Journal of Structure and Functional Genomic*. 2007, 8, s. 27-35.
- [36] RODA, Aldo. Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: The 2008 Nobel Prize. *Anal Bioanal Chem*. 3-2-2010, 396, s. 1619-1622.
- [37] Galbraith, Douglas; Control of Culture Environment for Improved Polyethylenimine-Mediated Transient Production of Recombinant Monoclonal Antibodies by CHO Cells. *Biotechnol Prog*. 2006 May-Jun;22 (3) :753-62.
- [38] SUN, Xiangming, et al. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. *Biotechnology letters*. 2006, 11, s. 843–848.
- [39] Backliwal, G. et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res* 36, e96 (2008).
- [40] MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimization under serum-free conditions. PH.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.
- [41] DEMENTIEVA, Ekaterina, et al. Fluorescent Properties of Firefly Luciferases and Their Complexes with Luciferin. *Bioscience Reports*. 2000, 1, s. 21-30.
- [42] VIVANI, V.R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Science*. 2002, 11, s. 1833-1850.
- [43] ŠKRHÁK, Tomáš. *Využití laseru 405 nm pro fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze*. Brno, 2008. 35 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta.

[44] NAGY, Attila, et al. Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP) A preliminary study. *Thermochimica Acta*. 2004, 1, s. 161–163.

[45] FRIČOVÁ, Michaela. *Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů*. Brno, 2010. 75 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

8. DALŠÍ ZDROJE

Amaya news #3

http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/amaya-news-03.pdf

Clontech

http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3028-5.pdf

Novagen

<http://iccb.med.harvard.edu/screening/RNAi%20Libraries/Lipid%20Panel/25%20-%20Novagen%20Genejuice.pdf>

Qiagen (plasmid purification handbook)

http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf

Invitrogen

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna5frtto_man.pdf

9. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr.4:http://www.polysciences.com/Catalog/Department/Product/98/productId__1577/categoryId__283/

Obr.5:<http://www.hyperpolymers.com/prodinf.html>

Obr.6:http://www.nature.com/nrd/journal/v4/n7/fig_tab/nrd1775_F4.html

Obr.10:<http://www.ticgroup.com.tw/menu/products/sci/School/GFP/GFP.asp>

Obr.13:http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/amaxa-news-03.pdf

Obr.14:http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3028-5.pdf

Obr.15: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna5firtto_man.pdf

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA	deoxyribonukleová kyselina
HEK	human embryo kidney - lidské ledvinové embryonální
EBNA	Epstein-Barr virus
GFP	green fluorescent protein – zeleně fluoreskující protein
EGFP	enhanced (vylepšený) GFP
GMO	geneticky modifikovaný organismus
r-protein	rekombinantní protein
mRNA	mediátorová DNA
NK	nukleová kyselina
MCS	multiple cloning site
ORI	(origin) replikační počátek
ESM	eukaryotický selekční marker
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
dsDNA	double stranded (dvouřetězcová) DNA
ssDNA	single stranded (jednořetězcová) DNA
ssRNA	single stranded RNA
kb	kilobáze
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
DMSO	dimethyl sulfoxid
DEAE	diethylaminoethyl
Mr	relativní molekulová hmotnost
N/P	dusík/fosfor
ζ	zeta potenciál
PEI	polyethylenimin
kDa	kilodalton
ATP	adenosintrifosfát
DPA	DNA/PEI/Alginát
PLL	Poly-L-Lysin
pH	potential of hydrogen
MaTra	Magnet Assisted Transfection
G ⁻	gramnegativní
G ⁺	grampozitivní
kV	kilovolt
cm	centimetr
AK	aminokyselina
GRAS	generaly recognized as safe
CO ₂	oxid uhličitý

g	gram
l	litr
µg	mikrogram
ml	mililitr
CHO	chinese hamster ovary – vajíčka čínského křečka
FBS	fetal bovine serum – hovězí fetální sérum
HS	horse serum – koňské sérum
GUS	β-glukuronidáza
CAT	chloramfenikol acetyltransferáza
Mg ²⁺	hořečnaté ionty
Ca ²⁺	vápenaté ionty
Cl ⁻	chloridový iont
H ⁺	proton vodíku
nm	nanometr
PC	personal computer
CCD	Charge-Coupled Device
4-MUG	4-metylbumbelliferyl glukuronid
MU	methylumbelliferone
UV	ultraviolet
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide
EBFP	enhanced blue (modrý) fluorescent protein
ECFP	cyan (azurový) fluorescent protein
YFP	yellow (žlutý) fluorescent protein
dsRED	red (červený) fluorescent protein
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
LB	Luria Bertani
PBS	phosphate buffered saline
GJ	GeneJuice
Amp	amplicin
apod.	a podobné
Obr.	obrázek
Leu	leucin
Phe	fenylalanin
Ser	serin
Thr	threonin
lux/luc	luciferáza
acetyl-CoA	acetyl koenzym A
rpm	revolutions per minute
MK	mastná kyselina
G2/M	fáze buněčného cyklu

11. PŘÍLOHY

11.1 Složení média DMEM/F-12

Tabulka 7: Složení média DMEM/F12[25]

komponent	Koncentrace
CaCl ₂ (anhyd.)	116,00 mg/l
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,05 mg/l
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,42 mg/l
KCl	311,83 mg/l
MgCl ₂ •6H ₂ O	61,00 mg/l
MgSO ₄ •7H ₂ O	100,00 mg/l
NaCl	6,99950 mg/l
NaHCO ₃	1,20000 g/l
Na ₂ H ₂ P0 ₄ •7H ₂ O	134,00 mg/l
NaH ₂ P0 ₄ •H ₂ O	62,50 mg/l
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,43 mg/l
Glucose	3,15100 g/l
HEPES	3,57450 g/l
Hypoxanthine	2,04 mg/l
Linoleic Acid	0,04 mg/l
Lipoic Acid	0,10 mg/l
Phenol Red•Na	8,00 mg/l
Putrescine•2HCl	0,08 mg/l
Sodium Pyruvate	110,00 mg/l
Thymidine	0,36 mg/l
L-Alanine	4,46 mg/l
L-Arginine•HCl	147,35 mg/l
L-Asparagine•H ₂ O	7,50 mg/l
L-Aspartic Acid	6,66 mg/l
L-Cysteine•HCl•H ₂ O	17,56 mg/l
L-Cystine	24,00 mg/l
L-Glutamic Acid	7,36 mg/l
L-Glutamine	365,10 mg/l
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00 mg/l
Glycine	18,76 mg/l
L-Histidine•HCl•H ₂ O	31,48 mg/l
L-Isoleucine	54,37 mg/l
L-Leucine	58,96 mg/l
L-Lysine•HCl	91,37 mg/l
L-Methionine	17,24 mg/l
L-Phenylalanine	35,48 mg/l
L-Proline	17,27 mg/l
L-Serine	26,26 mg/l
L-Threonine	53,56 mg/l

11.2 Složení LB média

Tabulka 8: Složení LB média[25]

složka	Koncentrace
trypton	10 g/l
kvasničný extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

11.3 Složení pufrů a roztoků

Tabulka 9: Složení pufrů a roztoků

pufr	složení	Skladování
P1 - resuspendační	50 mM Tris-Cl, pH = 8	2-8 °C po přidání RNázy A
	10 mM EDTA	
	100 µg/ml RNáza A	
P2 - lyzační	200 mM NaOH	15-25 °C
	1 % SDS (w/v)	
P3 - neutralizační	3 mM octan draselný	15-25 °C nebo 2-8 °C
	pH = 5,5	
QBT - ekvilibrační	750 mM NaCl	15-25 °C
	50 mM MOPS, pH = 7	
	15 % isopropanol (v/v)	
	0,15 % Triton X-100 (v/v)	
QC - promývací	1 M NaCl	15-25 °C
	50mM MOPS, pH = 7	
	15 % isopropanol (v/v)	
QF - eluační	1,25 mM NaCl	15-25 °C
	50 mM Tris-Cl, pH = 8,5	
	15 % isopropanol (v/v)	

11.4 Koncentrace a čistota izolovaných plasmidů

Tab. 4: Výsledné koncentrace a čistota plasmidů

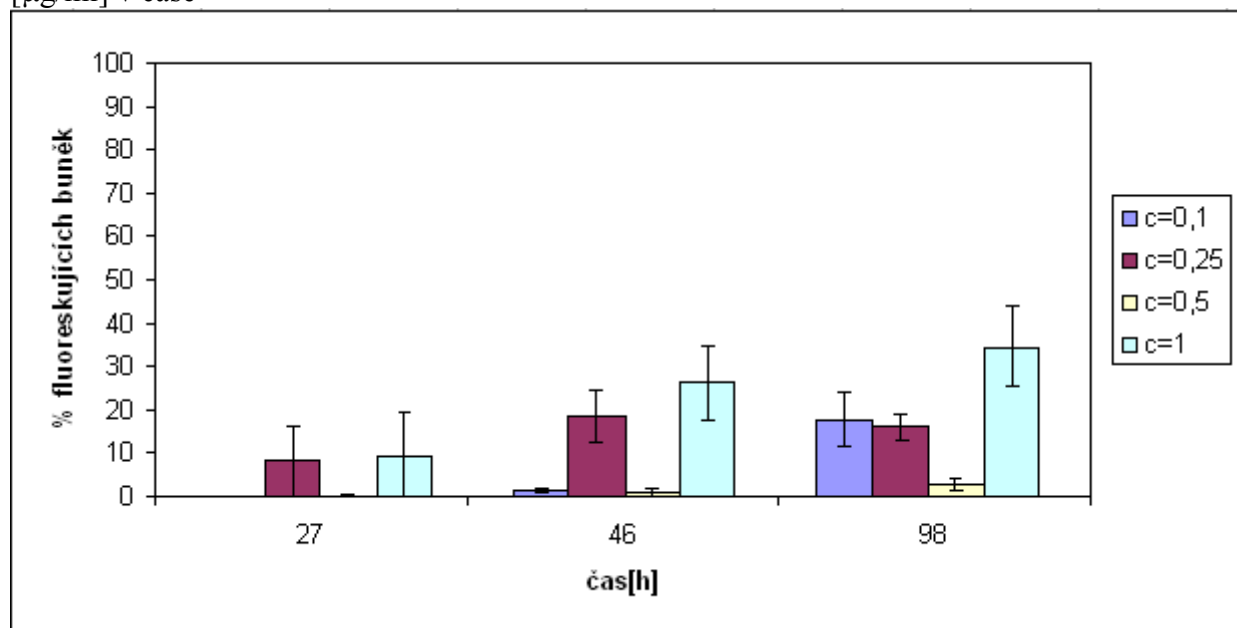
GFP			EGFP		
vzorek	c[µg/ml]	A260/A280	vzorek	c[µg/ml]	A260/A280
1	5013,3	1,95	1	5699,2	2,00
2	4781,7	2,00	2	5993,7	2,00
3	4779,7	1,97	3	6219,9	2,00
$\bar{x}$	4858,2	1,97	$\bar{x}$	4776,7	2,00

11.5 Hrubá data

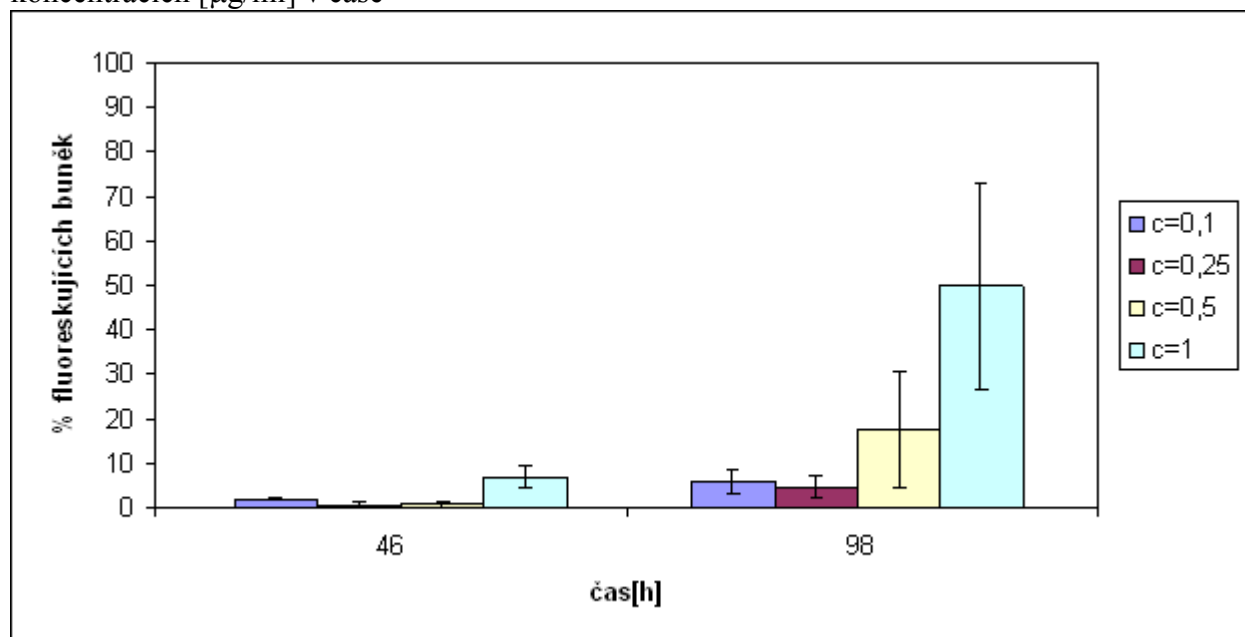
11.5.1 Pokus 1

První opakování

Graf 7: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu GFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase

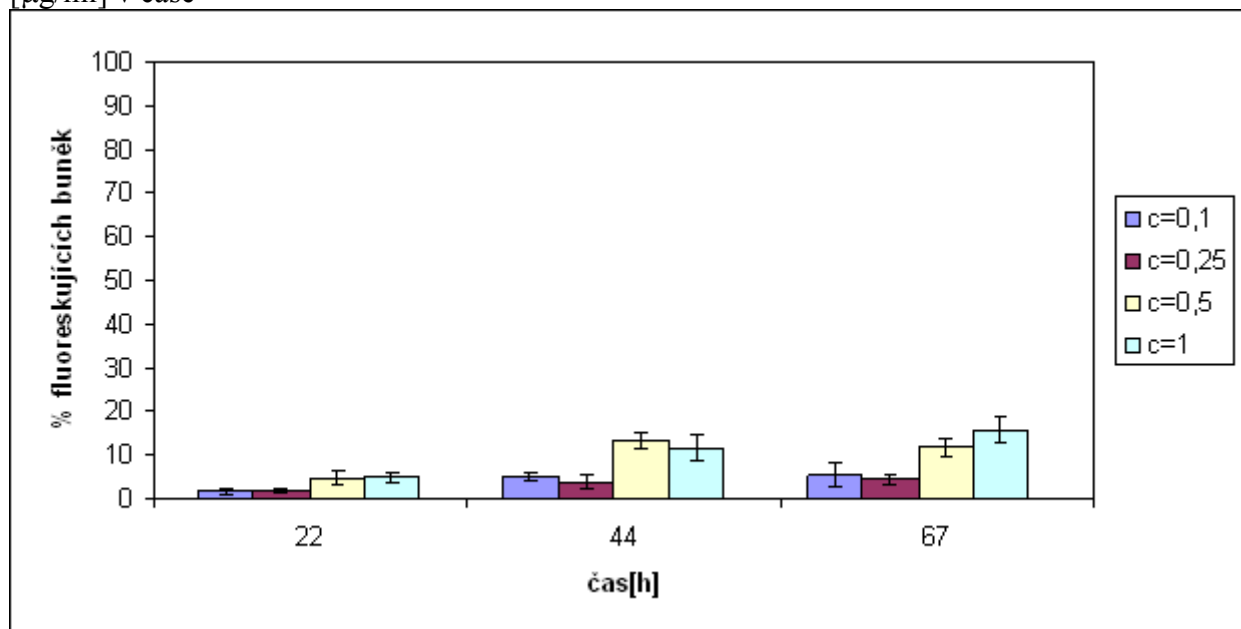


Graf 8.: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu EGFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase

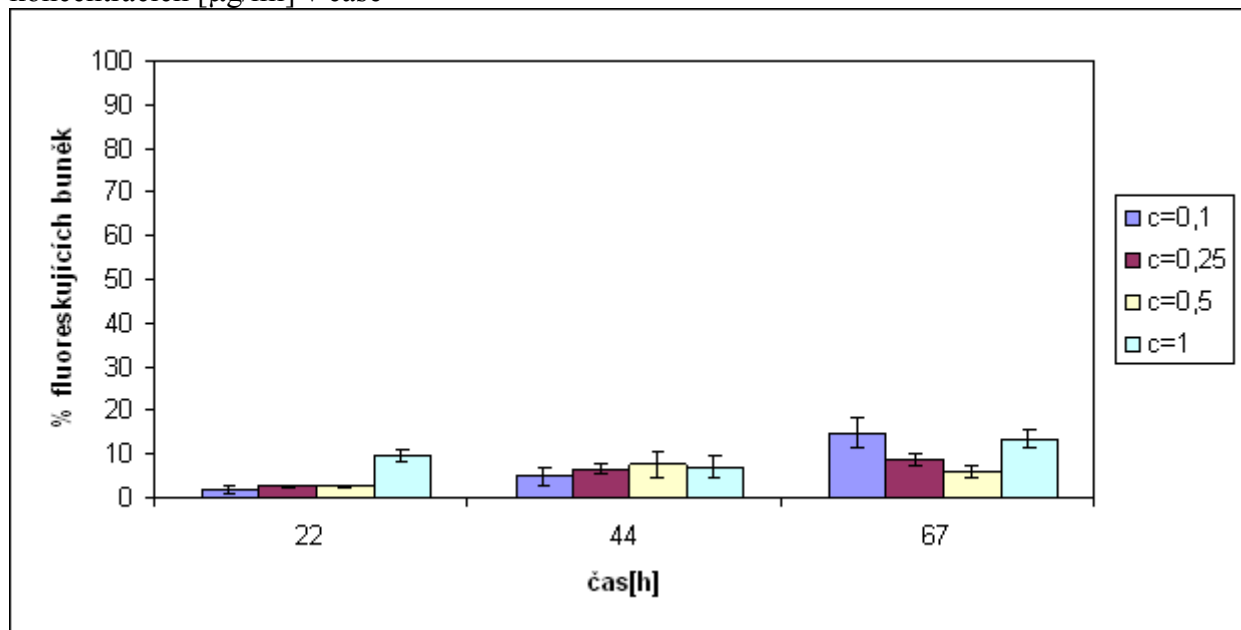


Druhé opakování

Graf 9.: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu GFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase

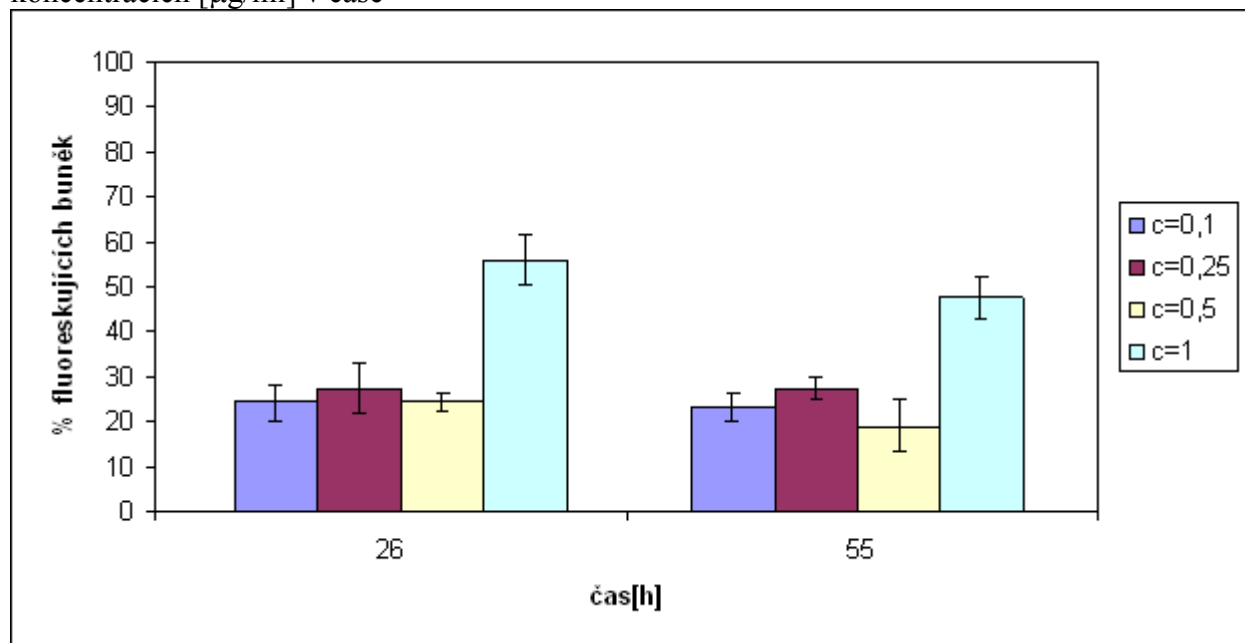


Graf 10.: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu EGFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase

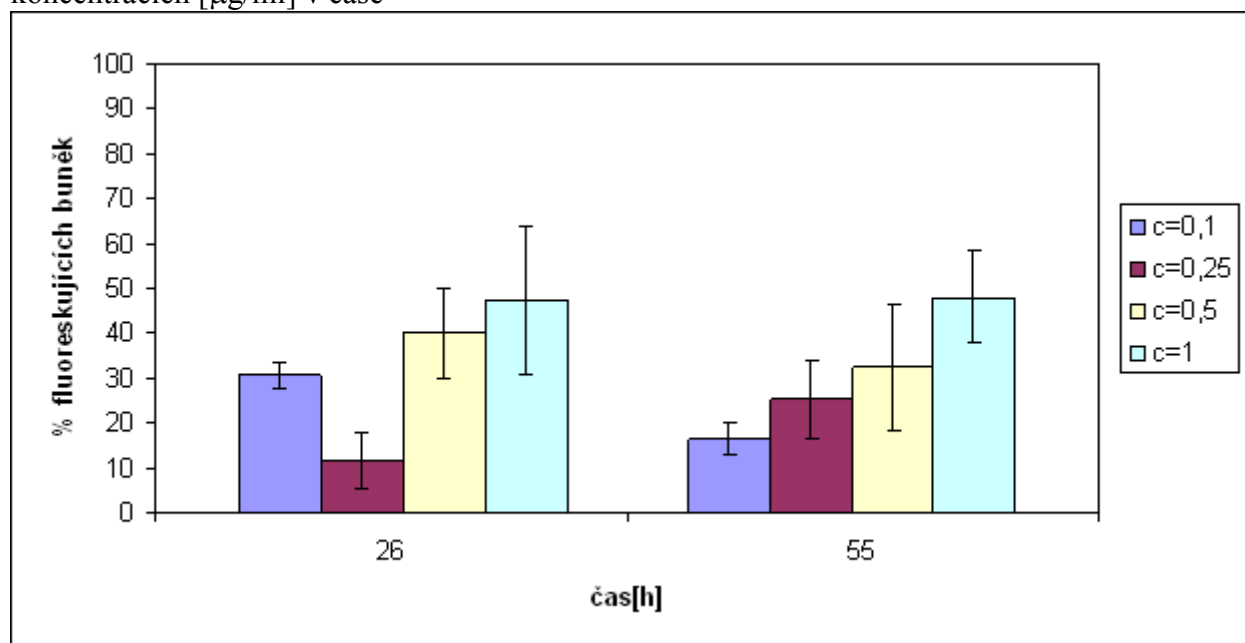


Třetí opakování

Graf 11.: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu GFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase



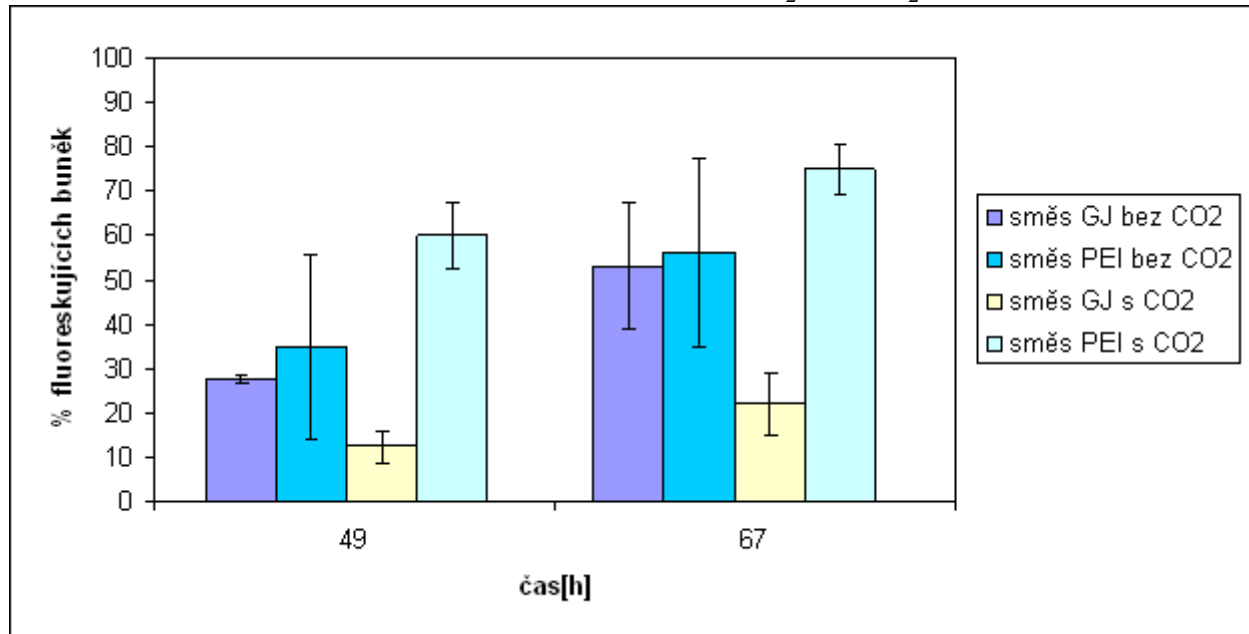
Graf 12.: Fluorescence buněk transfekovaných pomocí plasmidu EGFP v různých koncentracích [$\mu\text{g/ml}$] v čase



11.5.2 Pokus 2

První opakování

Graf 13.: Porovnání fluorescence buněk s GJ/PEI v 5 % CO₂/0 % CO₂ v čase



Druhé opakování

Graf 14.: Porovnání fluorescence buněk s GJ/PEI v 5 % CO₂/0 % CO₂ v čase

