



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ KULTIVAČNÍCH DESEK PRO TKÁŇOVÉ
KULTURY K TESTOVÁNÍ PODMÍNEK EXPRESE
REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V BUNĚČNÉ LINII
HEK293**

APPLICATION OF TISSUE CULTURE TEST PLATES FOR PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN IN
HEK293 CELLS; DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

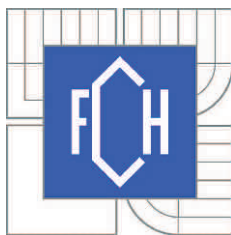
Bc. Marcela Krzyžanková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0972/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Marcela Krzyžanková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Využití kultivačních desek pro tkáňové kultury k testování podmínek exprese rekombinantních proteinů v buněčné linii HEK293

Zadání diplomové práce:

- 1) Stanovení optimálního objemu kultury HEK293
- 2) Stanovení optimální rychlosti třepání (rpm)
- 3) Hodnocení úspěšnosti exprese pomocí SDS-PAGE

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Marcela Krzyžanková
Student(ka)

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Efektivní produkci rekombinantních proteinů (r-protein) předchází testování jejich exprese v malém objemu. Práce byla proto zaměřena na optimalizaci exprese r-proteinů ve 12-jamkových deskách. Optimalizace desek zahrnovala testování vhodné rychlosti třepání, produkčního a transfekčního objemu. Srovnávala jsem stávající testovací nádoby, 50 ml centrifugační tuby, s nově testovanými deskami jako možnou náhradou za nevyhovující tuby. Dalším sledovaným parametrem bylo porovnat nově testované desky s výrobními čtyřhrannými láhvemi s cílem, aby exprese r-proteinu v deskách co nejvíce odpovídala expresi v láhvích. Byl sledován vliv CO₂ na počet živých buněk, jejich viabilitu, relativní četnost buněk pozitivních na GFP v různých kultivačních nádobách (desky, tuby, láhve) a doplňkově také pH netransfekované buněčné kultury HEK 293 v průběhu čtyřdenní kultivace.

Na základě výsledků a jejich statistického zpracování byly stanoveny pro 12-jamkové desky optimální otáčky 230 rpm a jako vhodný produkční a transfekční objem byl určen 2 a 0,5 ml. Po vyhodnocení proměnných a srovnání kultivací v jednotlivých nádobách, bylo možné tuby nahradit deskami. Statisticky byl prokázán významný vliv CO₂ na počet buněk, jejich viabilitu, relativní četnost buněk pozitivních na GFP a pH buněčné kultury HEK 293 v kultivačních nádobách. Nejsilnější exprese r-proteinu bylo dosaženo v prostředí s CO₂.

Výsledky této práce umožňují aplikovat 12-jamkové kultivační desky pro testování exprese r-proteinu v malém objemu v prostředí s CO₂. Na základě zjištěných údajů může exprese r-proteinu probíhající v deskách v prostředí s CO₂ napodobit expresi ve výrobní láhvi bez přítomnosti CO₂.

KLÍČOVÁ SLOVA

12-jamkové desky, CO₂, HEK293, transientní transfekce, rekombinantní protein

ABSTRACT

Efficient production of the recombinant proteins (r-proteins) must be based on previous testing of an expression of a small amount of the r-proteins. This work focuses on optimizing the expression of the r-proteins in 12-well plates. It includes testing of an appropriate speed of shaking, production and transfection volume. It compares all the current testing vessels (it compares a 50-ml centrifugation tube to new tested plates that can substitute the unsuitable tubes). It also compares these new tested plates to production square bottles in order to compare the r-protein expression in the plates to the r-protein expression in the bottles. It monitors effects of carbon dioxide on a number of vital cells, their viability, a relative frequency of positive cells on GFP in various cultivation vessels (plates, tubes, bottles), and pH of HEK 293 cellular cultivation during the 4-day cultivation process as well.

On the basis of the results and statistical processing of the results, we have set the optimal agitation speed of 230 rpm for the 12-well plates. We have also set the appropriate production and transfection volume of 2 and 0.5 ml for the 12-well plates. In order to evaluate variables and compare cultivations in all the vessels, the tubes could be substituted by the plates. There is a statistically significant impact of carbon dioxide on the number of cells, their variability, relative frequency of cells (positive on GFP) and pH of the cellular HEK 293 cultivation in the cultivation vessels. There is the strongest r-protein expression in carbon dioxide conditions.

The results of this work allow to employ the 12-well plates when we aim to test the expression of the r-proteins in a small amount and in carbon dioxide conditions. On the basis of the findings, the expression of the r-proteins in the 12-well plates and carbon dioxide conditions can substitute the expression of the r-proteins in the production bottle and in carbon dioxide free conditions.

KEYWORDS

12-well plates, CO₂, HEK293, transient transfection, recombinant protein

KRZYŽANKOVÁ, M. *Využití kultivačních desek pro tkáňové kultury k testování podmínek exprese rekombinantních proteinů v buněčné linii HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 96 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně citovala. 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:

Děkuji vedoucímu své práce Mojmíru Ševčíkovi za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnosti při konzultacích. Děkuji také Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za její ochotu a čas, který mi věnovala při řešení dané problematiky.

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Savcí hostitelské buněčné linie	10
2.1.1 Buněčná linie HEK 293	11
2.2 Kultivace HEK 293 buněk v bezsérových podmínkách v chemicky definovaných mediích	12
2.3 Produkce r-proteinu	13
2.3.1 Transientní transfekce.....	13
2.3.1.1 PEI.....	13
2.3.1.2 Polyfekce.....	14
2.4 Transientní produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách	15
2.4.1 Výrobní čtyřhranné láhve	15
2.4.2 Testovací nádoby	15
2.5 Transientní produkce r-proteinu v inkubátoru s/bez CO₂	15
2.6 Detekce r-proteinů	16
2.6.1 Ni-NTA Agaróza	17
2.7 Vyhodnocení experimentálních dat	17
2.7.1 R-statistika	17
3. MATERIÁLY A METODY	18
3.1 Seznam materiálu	18
3.2 Buněčná kultura	18
3.3 Příprava plazmidové DNA	19
3.4 Gen-transferová metoda transientní transfekce	19
3.4.1 Polyfekce	19
3.5 Stanovení vhodných podmínek pro transfekci ve 12-jamkové desce	19
3.5.1 Test rychlosti třepání buněčné kultury	19
3.5.2 Test vhodného objemu kultury	20
3.6 Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách	20
3.6.1 12-jamkové kultivační desky	21
3.6.2 50 ml centrifugační tuby	21
3.6.3 Čtyřhranné výrobní láhve	22
3.7 Test produkce r-proteinu v inkubátoru s 5% CO₂ a v inkubátoru bez 5% CO₂ v testovacích a výrobních nádobách	23
3.7.1 12-jamkové desky	23
3.7.2 50 ml centrifugační tuby	23
3.7.3 Čtyřhranné výrobní láhve	23
3.7.4 Měření pH netransfekované buněčné kultury HEK 293.....	24
3.8 Detekce r-proteinu	24
3.8.1 SDS-PAGE s předčištěním r-proteinu na Ni-NTA agaróze	24
3.9 Zpracování experimentálních dat	24
4. VÝSLEDKY	25
4.1 Stanovení optimální rychlosti třepání buněčné kultury v deskách	25
4.1.1 Porovnání rychlost třepání 230 rpm a 270 rpm	26

4.1.2	Detekce r-proteinu	28
4.2	Stanovení optimálního objemu buněčné kultury v deskách	29
4.2.1	Produkční objemy	30
4.2.2	Transfekční objemy	32
4.2.3	Detekce r-proteinu	34
4.3	Vliv inkubace s/bez CO₂ na růst, viabilitu a GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách	36
4.3.1	Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách	37
4.3.2	Viabilita buněk v různých kultivačních nádobách.....	39
4.3.3	GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách.....	41
4.3.4	Vliv CO ₂ na hodnotu pH buněk HEK 293.....	43
4.3.5	Detekce r-proteinu	44
4.4	Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách	45
4.4.1	12-jamkové desky versus 50 ml centrifugační tuby	45
4.4.2	12-jamkové desky versus produkční láhve.....	48
4.4.3	Detekce r-proteinu	50
5.	DISKUZE.....	52
5.1	Stanovení optimální rychlosti třepání buněčné kultury v deskách	52
5.2	Stanovení optimálního objemu buněčné kultury v deskách	52
5.2.1	Produkční objemy	52
5.2.2	Transfekční objemy	53
5.3	Vliv inkubace s/bez CO₂ na růst, viabilitu a GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách	53
5.3.1	Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách	53
5.3.2	Viabilita buněk v různých kultivačních nádobách.....	53
5.3.3	Relativní četnost buněk pozitivních na GFP v různých kultivačních nádobách ..	54
5.3.4	Vliv CO ₂ na hodnotu pH buněk v netransfekované buněčné kultuře	54
5.4	Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách	54
5.4.1	12-jamkové desky versus 50 ml centrifugační tuby	55
5.4.2	12-jamkové desky versus produkční láhve.....	55
6.	ZÁVĚR.....	56
7.	LITERATURA	57
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	59
9.	PŘÍLOH.....	60
10.	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT POMOCÍ MULTI-WAY ANOVY	63
10.1	Multi-way ANOVA pro vliv rychlosti třepání na sledované proměnné.....	63
10.1.1	Počet živých buněk	63
10.1.2	Viabilita buněk.....	64
10.1.3	Relativní četnost buněk pozitivních na GFP	66
10.2	Multi-way ANOVA pro vliv produkčních a transfekčních objemů na sledované proměnné.....	67
10.2.1	Počet živých buněk	67
10.2.2	Viabilita buněk.....	70
10.2.3	Relativní četnost buněk pozitivních na GFP	72

10.3 Multi-way ANOVA pro vliv CO₂ na sledované proměnné v různých kultivačních nádobách	75
10.3.1 Počet živých buněk	75
10.3.2 Viabilita buněk.....	78
10.3.3 Relativní četnost buněk pozitivních na GFP	80
11. NAMĚŘENÁ DATA	83

1. ÚVOD

Prvním rekombinantním proteinem (r-protein) připraveným pomocí bakteriálních buněk *E.coli* byl lidský inzulin. Ten byl poprvé naexprimován v roce 1982 v americké farmaceutické společnosti Eli Lilly & Co. Jde o první r-protein s léčivým účinkem, který nese obchodní název Humulin a byl úspěšně využíván pro léčbu lidského diabetu. V současné době je však 60 až 70% ze všech rekombinantních proteinových léčiv vyráběno v savcích buňkách. V roce 1986 byl jedním z prvních rekombinantních proteinů vyrobených právě v savcích buňkách aktivátor lidského tkáňového plazminogenu aktiváza tPA. Mnoho r-proteinů je vyráběno prostřednictvím imortalizovaných vaječnicku čínského křečka (CHO). Další široce využívanou savčí buněčnou linií jsou lidské embryonální ledvinné buňky (HEK). Rekombinantní proteiny jsou významné především jako léčiva samotná nebo jako jejich složka [1, 2].

Se zvyšujícím se zájmem trhu o širší nabídku rekombinantních proteinů rostou i požadavky na jejich výrobu v laboratoři. Aby bylo docíleno co nejefektivnější výroby různých druhů r-proteinů ve velkém objemu, je potřeba zabezpečit správné podmínky pro otestování jednotlivých r-proteinů v malém objemu. Pro laboratorní výrobu jsou často jako kultivační nádoby používány čtyřhranné skleněné láhve o objemu 1-3 litrů nebo bioreaktory. Pro testování exprese r-proteinu v malém objemu jsou používány například 50 ml centrifugační tuby či kultivační desky nabízející různé kultivační objemy od 100 ul do 5 ml [2].

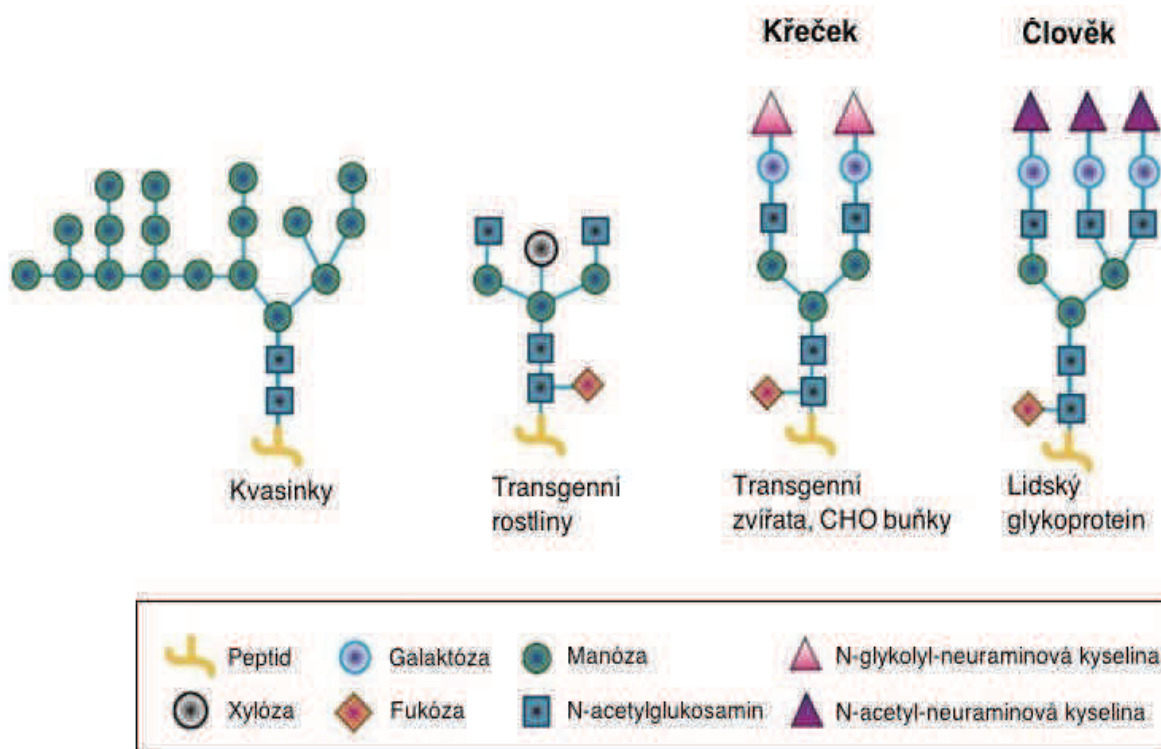
Testování v malém objemu je nezbytnou součástí výrobního procesu. V současné době je v naší laboratoři testování exprese r-proteinů prováděno v 50 ml centrifugačních tubách. Vzhledem k tomu, že množství testovaných variant stále roste, je potřeba najít vhodnější testovací nádoby jako jejich možnou náhradu.

Ve své diplomové práci jsem se věnovala využití 12-jamkových kultivačních desek určených pro tkáňové kultury k testování produkce rekombinantního proteinu (r-protein). Desky s dvanácti jamkami byly testovány, protože nabízí, snadnou manipulaci, menší objem a větší počet variant k testování. Na dvě tuby připadá jeden test exprese r-proteinu v duplikátu, kdežto na jednu 12-jamkovou desku připadá šest testů exprese r-proteinu v duplikátu. Exprese r-proteinu byla dosažena prostřednictvím metody transienční transfekce. Jako hostitelská buněčná linie byla použita linie izolovaná z lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK 293). Aby bylo dosaženo požadovaného cíle, tedy získat produkt ve velkém objemu, zaměřila jsem na optimalizaci rychlosti otáček během třepání těchto desek na třepačce, vhodných objemů pro expresi r-proteinů a porovnání exprese r-proteinu v inkubátoru s CO₂ a bez CO₂. Srovnávala jsem expresi r-proteinu ve 12-jamkových kultivačních deskách s tubami a s výrobními čtyřhrannými láhvemi. Zároveň byl kladen důraz na to, aby výsledná exprese r-proteinu odpovídala expresi r-proteinu ve výrobních čtyřhranných láhvích, a zajistila tak reprodukovatelnost výsledků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Savčí hostitelské buněčné linie

Mezi nejčastěji volené savčí produkční buněčné linie používané pro expresi r-proteinu patří: CHO (chinese hamster ovary) pocházející z vaječníku čínského křečka, HEK 293 (human embryonic kidney) izolována z embryonálních ledvin člověka či NS0 (derived mouse myeloma) odvozena z myšího myelomu. Buněčná linie CHO byla jedna z prvních izolovaných savčích buněčných linií vůbec. V roce 1980 byly buňky CHO jako první stabilně transfekovány neviróvým genem. Tato linie je zkoumána mnohem delší dobu, než například buněčná linie HEK 293 nebo NS0. Což může být hlavním důvodem volby CHO buněk jako hostitelské linie pro produkci r-proteinu v praxi. I přesto však doposud nashromážděná data z experimentů s CHO linií nepotvrzují její širší aplikovatelnost na požadavky výroby r-proteinu. Navíc, protože buněčná linie CHO pochází z hlodavců, neumožňuje zcela správné posttranslační modifikace, jako buněčná linie HEK 293 (Obrázek 1). I když byly buněčné linie CHO geneticky upraveny pro zajištění správné glykosylace r-proteinů, v některých případech dochází během glykosylace r-proteinu k tvorbě kyseliny N-glykolylyl-neuraminové, která se v lidském těle nevyskytuje. Takto upravená glykosylace může vést ke zvýšené imunologické aktivitě r-proteinu a v případě podání člověku jako terapeutikum, je vysoká pravděpodobnost vzniku alergické reakce [3, 4].



Obrázek 1: Posttranslační modifikace v různých expresních systémech. Zdroj: HumanZyme, Inc.

Nutno podotknout, že pokud je vyráběný r-protein určený pouze pro výzkumné účely, nejsou na postranslační úpravy proteinu kladeny tak vysoké nároky. Navíc jsou CHO buňky relativně jednoduše kultivovatelné než buňky HEK 293. Lze je tak využít k produkci r-proteinů, které se nedaří vyrobit v linii HEK 293.

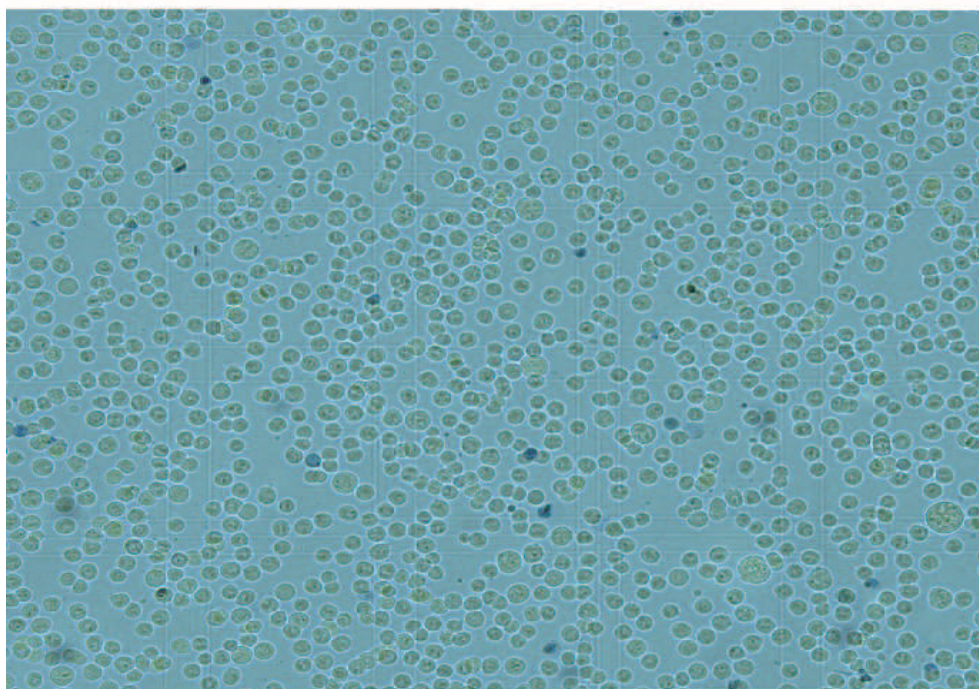
Další poměrně často využívanou buněčnou linií pro produkci r-proteinu je buněčná linie NS0, která je odvozena od myšího myelomu. Tato linie, jak napovídá název, není lidského původu jako linie HEK 293. I tady však nastává problém se správnými posttranslačními modifikacemi. Nicméně, pokud není vyrobený r-protein určen pro terapeutické účely, ale pouze pro výzkumné účely, není potřeba zabezpečit co nejpřesnější posttranslační modifikace. Buněčná linie HEK 293 je oblíbenou savčí linií nejen pro svůj relativně snadný růst, ale také proto, že dokáže správně poskládat řetězce r-proteinu (folding). Výsledný r-protein má tak optimální 3D strukturu. Z důvodu, že většina proteinů nacházejících se v lidském těle je řazena mezi glykoproteiny je nejčastější postranslační modifikace glykosylace a buněčná linie HEK 293 má tuto schopnost. Produkce r-proteinu v buňkách HEK snižuje imunologickou aktivitu a naopak zvyšuje farmaceutickou účinnost a tím atraktivitu finálního produktu. Nezanedbatelné nejsou ani výtěžky vyprodukovaného r-proteinu prostřednictvím HEK 293 linie. Oproti CHO linii jsou více jak dvojnásobně vyšší a pohybují se v mg/L [4, 5].

2.1.1 Buněčná linie HEK 293

Tato linie byla poprvé izolována z embryonálních ledvin v roce 1970 dr. Alexem Van der Eb v nizozemském Leidnu. Většina buněk odvozených z tkání ledvin jsou endoteliální, epiteliální nebo fibroblasty. I přesto probíhají mezi nezávislými výzkumnými pracovníky diskuze, že buňky mohou být neuronového původu. K tomuto se přiklání i samotný dr. Van der Eb. Toto podezření vzniklo z důvodu přítomnosti mRNA a genových produktů v této linii, které se jinak obvykle vyskytují v neuronech.

O sedm let později, v roce 1977 byla buněčná linie HEK 293 upravena pomocí transformace adenovirem 5 skupinou vědců pod vedením Franca Grahame na McMaster universitě v Kanadě. Pomocí rekombinantních technik byl do jejich genomu začleněn gen viru Epstein-Barr (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1), který usnadňuje přenos plazmidu do dceřiných buněk. Vnesený plazmid je tak přenesen do obou dceřiných buněk během buněčného dělení, což zvyšuje expresi proteinu (*Obrázek 2*).

Savčí buňky typu HEK 293 se tak staly vyhledávaným systémem pro produkci r-proteinů, protože mají shodný proteosyntetický aparát a postranslační modifikace jako lidské buňky. To znamená, že kvalita a účinnost proteinu může být ve srovnání s jinými hostiteli, jako jsou bakterie, kvasinky a rostliny lépe exprimována v savčích buňkách [5, 6, 7].



Obrázek 2: Buněčná suspenze HEK 293 obarvena trypanovou modří. Zdroj: BioVendor-Laboratorní medicína a.s.

2.2 Kultivace HEK 293 buněk v bezsérových podmínkách v chemicky definovaných médiích

Potřeba minimalizovat snížení živočišné složky (živočišné sérum) obsažené v médiích pro kultivaci v savčích buněk stále stoupá. Jedním z důvodů je riziko, které spočívá v manipulaci s biologickým materiálem, dále snadnější zpracování konečného produktu a nižší náklady na kultivaci buněk. Touto eliminací živočišného séra tak vzrostl zájem o proteinové hydrolyzáty, jako například pepton, který je nyní nepostradatelný pro většinu chemicky definovaných medií. Vzhledem ke zvýšenému zájmu existuje v současnosti na trhu několik variant, které jsou speciálně vyrobeny pro transienční transfekci s konkrétní buněčnou linií. Takovými médii jsou například CDM4 HEK či FreeStyle 293 medium, které je určeno pro kultivaci buněk 293 HEK (human embryonic kidney)

V případě transienční transfekce s využitím transfekčního reagentu polyethyleniminu (PEI) je možná náhrada živočišného séra za proteinové hydrolyzáty. V některých případech však živočišné sérum nelze nahradit. Příkladem může být transienční transfekce kalcium-fosfátovou metodou, kde je přítomnost séra nezbytná. Role séra v ní zatím není zcela jasná. Předpokládá se, že má nejspíše ochrannou funkci buněčné membrány buněk vstupující do transfekce. I přesto lze sérum nahradit různými růstovými faktory či hormony pro správný růst buněk [3, 8].

2.3 Produkce r-proteinu

Můžeme říci, že zásluhou práce Fredericka Bantinga a Charlese Besova, kteří v roce 1921 extrahovali hormon insulin ze slinivky psa za účelem léčby lidského diabetu, byly položeny základy myšlenky léčby lidí prostřednictvím cizího organismu. V tehdejší době ještě nebyla známa struktura dvoušroubovice DNA, jejíž strukturu jako první na světě identifikovali o 32 let později James Watson a Francis Crick. Tato skutečnost významně přispěla k objevu přenosu cizorodé DNA do prokaryotické buňky (bakterie) a následné expresi r-proteinu obsahující cizorodou DNA. Tento proces je označován jako transformace. Transformace je jedna ze široce využívaných metod pro produkci požadovaného r-proteinu [9].

Jednou z možností, jak vyrobit r-protein, tak aby byl téměř identický s původním lidským proteinem, je metoda transfekce. Tato metoda spočívá v pravení cizorodé DNA do savčích buněk, které jsou schopny správně poskládat protein (posttranslační modifikace proteinu). Savčí buňky patří mezi eukaryoty a oproti prokaryotům mají mnohem složitější stavbu a děje probíhající uvnitř buňky. Proto produkce r-proteinů v savčích buňkách je mnohem náročnější než v bakteriálních buňkách, ale zato je vyrobený r-protein mnohem kvalitnější než r-protein pocházející z bakterií a stává se tak zajímavější pro trh [10, 11].

2.3.1 Transientní transfekce

Podstata transientní transfekce spočívá v přenosu genetického materiálu do eukaryotických buněk jako hostitele pomocí transfekčního činidla. Genetickým materiálem může být například DNA či dvouvláknová RNA. Po vložení DNA do buňky zajistí její proteosyntetický mechanismus expresi proteinů [11]

Rozlišujeme mechanické a nemechanické metody transfekce. Nejznámější mechanická metoda: elektroporace, spočívá v přenosu zájmové DNA do buňky prostřednictvím elektrického impulsu. Často využívané nemechanické metody jako například lipofekce, kalcium-fosfátová precipitace či polyfekce, jsou založené na principu použití transfekčního činidla, které zajistí přenos DNA do hostitelské buňky. Běžně se využívá nízkonákladové transfekční činidlo PEI (polyethylenimin), které sebou nese několik výhod. Ty jsou blíže specifikovány v kapitole 1.1.2.

Hlavní výhodou transientní transfekce je rychlost jakou je protein exprimován do prostředí. Již během 4-10 dnů je úspěšná produkce proteinu ukončena [12].

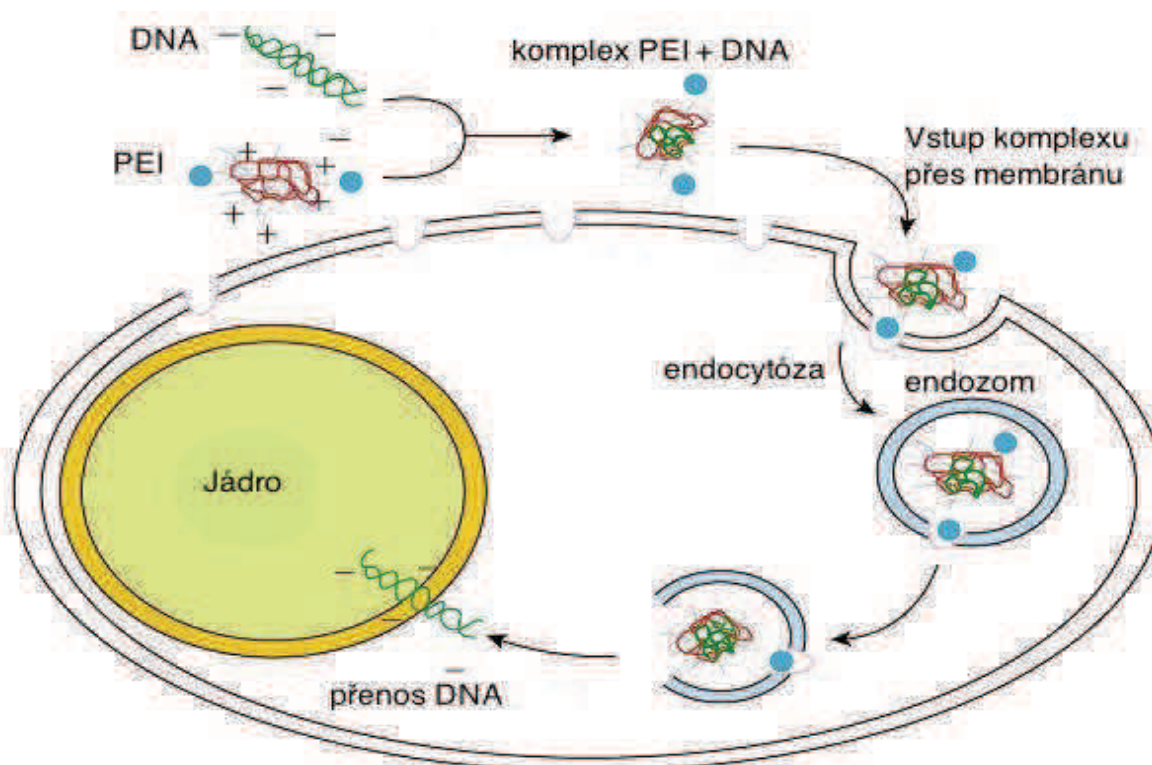
2.3.1.1 PEI

PEI (polyethylenimin) je kationtový polymer, který může dosahovat velikosti od 2 do 800 kDa, přičemž využívané velikosti pro přenos genu jsou od 22-45 kDa. Existuje ve dvou formách, podle toho jak je uspořádán jeho řetěz a to buď lineárně nebo rozvětveně. Rozvětvené PEI má vyšší transfekční účinnost než lineární PEI, avšak na úkor své vysoké toxicity. Proto je 25 kDa lineární PEI častěji používán pro přenos genu do buňky než rozvětvené PEI.

Tento transfekční reagent je vysoce účinný zejména v chemicky definovaných mediích, kde jsou proteinové hydrolyzáty použity jako náhrada za živočišné sérum. Z toho důvodu je PEI vhodným kandidátem pro transientní produkci r-proteinu v mediích bez přítomnosti séra. V sériích vědeckých prací, kde byl PEI úspěšně použit pro transfekci v HEK, NS0 či CHO buňkách se množství vyprodukovaného r-proteinu za využití tohoto činidla pohybuje řádově v mg/L. Nejnovější články dokumentují transfekce s použitím PEI v hmyzích buňkách SF9 v nevirových podmínkách [13].

2.3.1.2 Polyfekce

Transfekční metoda umožňující expresi r-proteinů za využití transfekčního činidla polyethyleniminu (PEI). Princip metody spočívá ve schopnosti transfekčního činidla PEI tvořit kladné komplexy se záporně nabitou DNA. Tento komplex DNA:PEI může vstoupit do buňky přes záporně nabitý povrch membrány, pomocí endocytózy. V prostředí cytosolu, je tento komplex prezentován jako endozom. Princip jakým je DNA bez poškození uvolněna z endozomu není zcela objasněn. Jedna z teorií uvádí, že do endozomu, který je kyslejší než cytosol, vstupují díky vodíkové pumpě poháněnou ATP, protony z cytosolu. Vlivem osmotického tlaku endozom praskne a nukleové kyseliny se tak uvolní do cytosolu. Poté je DNA přenesena do jádra buňky, kde je syntetizována mRNA. V cytosolu následuje tvorba r-proteinu z mRNA (Obrázek 3) [3, 11, 12].



Obrázek 3: Schéma polyfekce. Kationtový polymer PEI tvoří kladně nabitý komplex se záporně nabitou DNA. Vytvořený komplex PEI + DNA vstupující prostřednictvím endocytózy jako endozom dovnitř buňky. Následně uvolnění DNA a její vstup do jádra. Zdroj: www.virtual-lab.or.kr

2.4 Transientní produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách

Různé kultivační nádoby používané pro produkci r-proteinu poskytují různé kultivační podmínky. Ať už svým tvarem dna, objemem či materiálem z jakého jsou nádoby vyrobeny. Hlavním sledovaným parametrem bývá především objem a rychlost třepání, které jsou specifické pro danou nádobu. Mezi oblíbené kultivační nádoby patří skleněné čtyřhranné láhve, které jsou nejčastěji využívány pro velkoobjemové produkce. Ke kultivačním nádobám určeným naopak pro maloobjemové testování produkce řadíme 50 ml centrifugační tuby či kultivační desky, které nabízejí rozsáhlé deskové uspořádání [3, 15].

2.4.1 Výrobní čtyřhranné láhve

V praxi probíhá produkce r-proteinu nejčastěji ve výrobních čtyřhranných láhvích (láhve). Objem používané výrobní láhve je jeden litr, přičemž maximální objem kultivované suspenze je 400 ml. Výrobní láhve jsou ideální nádobou pro produkci r-proteinu. Navíc jsou skleněné, lze je tedy autoklávovat, čímž se snižují náklady na výrobu.

Je samozřejmostí, že produkci r-proteinu ve výrobních láhvích předchází laboratorní testování, které je prováděno v malých objemech [3, 15].

2.4.2 Testovací nádoby

K nejběžnějším testovacím nádobám patří kultivační desky a tuby. Aktuální nabídka plastových nádob pro tkáňové kultury je široká. Od 6-jamkových až po 96-jamkové kultivační desky (podle žádaného objemu kultivace). Mezi oblíbené kultivační nádoby pro testování patří také tuby o objemu 50 ml. Tuby mohou být s vestavěným filtrem, nebo bez filtru.

Ideální podmínky pro testování v malých objemech (desky, tuby) jsou takové, které zabezpečí srovnatelné výsledky v produkci r-proteinu s výrobními objemy (čtyřhranné láhve).

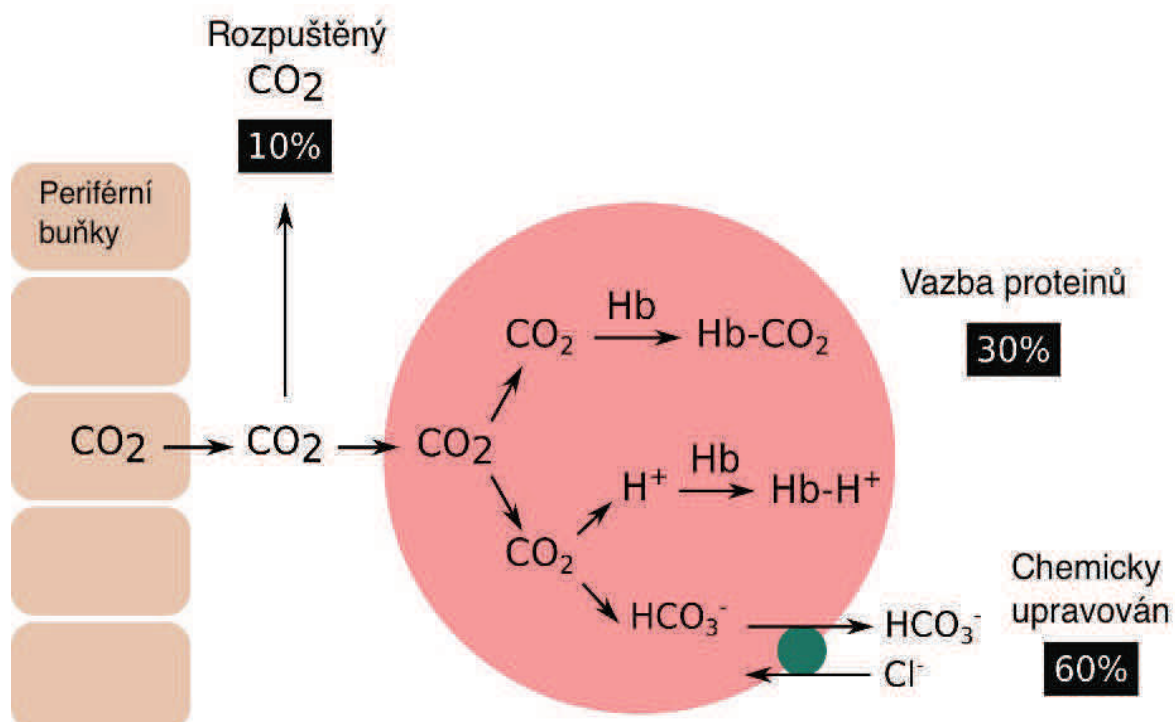
Cílem je dosažení stejných podmínek, jak v testovacích nádobách (desky, tuby), tak i ve čtyřhranných láhvích určených pro následnou výrobu [3, 15].

2.5 Transientní produkce r-proteinu v inkubátoru s/bez CO₂

Na metabolické procesy (syntéza pyrimidinů, purinů a mastných kyselin) a přežití organismu mají hodnoty pH zcela zásadní vliv. Posuny pH významně ovlivňují strukturu a reaktivitu biomolekul, dále mění rozložení iontů na membráně či rozpustnost iontů a jejich sloučenin v tělesných kompartmentech. Udržování správné hodnoty pH je zabezpečováno koncentrací CO₂, který je produktem metabolismu tkání, na H₂CO₃. Majoritní množství CO₂ je v lidské tkáni přeměňováno na H₂CO₃, která disociuje na H⁺ + HCO₃⁻. Důsledkem přeměny je produkce H⁺, tedy kyseliny, která musí být pufrována hemoglobinem a bílkovinami (*Obrázek 4*). Z toho vyplývá, že pro správné pH (7,2-7,4), růst a metabolismus většiny savčích buněčných linií platí, že přítomnost CO₂ je během kultivace buněk nezbytná. Fyziologické

množství CO_2 důležité pro správnou acidobazickou rovnováhu tkáni je 40 mm Hg stupnice (rtuťové stupnice). Tato hodnota odpovídá 5% CO_2 , což je asi 25ml/L CO_2 . Proto jsou inkubátory určené pro kultivaci buněk převážně vybavené monitoringem CO_2 v koncentraci 5%.

Existují media, která svým složením umožňují kultivaci buněk v inkubátoru bez CO_2 . Jednou takovou složkou média může být HEPES, který udržuje hodnoty pH ve správném rozmezí. Potřeba kultivace jednotlivých buněčných linií v inkubátoru s/bez CO_2 je individuální. Některým buněčným liniím vyhovují media obohacena složkami přispívajícími ke správné acidobazické rovnováze a jiným zase naopak vyhovuje kultivace v inkubátoru s CO_2 [16, 17, 18].



Obrázek 4: Rozdělení spotřeby CO_2 v lidském těle. CO_2 metabolizováno tkáněmi na periférii buňky je z 10% rozpuštěno, z 30% je využito k vazbám proteinů a z majoritní části 60% je disociováno a poté chemicky upravováno. Zdroj:www.emaze.com

2.6 Detekce r-proteinů

Společným krokem mnoha detekčních metod r-proteinů bývá především gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Jednotlivé metody se liší buďto ve zpracování vzorku před elektroforézou nebo konečnou detekci r-proteinu z polyakrylamidového gelu.

Mezi rutinní operace vedoucí k detekci r-proteinů patří například Western blot, kde je z polyakrylamidového gelu r-protein přenesen na celulózu membránu, která je inkubována spolu s protilátkou specifickou pro požadovaný r-protein. Další možností je obarvení výsledného gelu barvou (například brilantovou modří) barvicí proteiny. Vzorek před

elektroforézou se nejčastěji zpracovává za denaturačních či nativních podmínek. Jednou z dalších variant, jak lze vzorek supernatantu r-proteinu ošetřit je inkubace s Ni-NTA Agarózou. Ta je blíže specifikována v kapitole 2.6.1. [19]

2.6.1 Ni-NTA Agaróza

Ni-NTA Agaróza je afinitní chromatografická matrice sloužící k čištění rekombinantních proteinů nesoucí histidinovou tag sekvenci (His tag). Princip spočívá ve specifickém navázání histidinových zbytků r-proteinu na imobilizované ionty niklu. Dochází tedy k navázání pouze His tag proteinů. Ostatní zbývající proteiny, které nevykazují afinitu k niklu jsou vymyty. Promytím s navázanými His tag proteiny nastává jejich eluce do pufru za nativních či denaturačních podmínek [19, 20].

2.7 Vyhodnocení experimentálních dat

Z hlediska praktického využití statistických metod v oblasti vyhodnocení experimentálních dat v biologickém a medicínském výzkumu představuje testování statistických hypotéz jednu z nejdůležitějších součástí biostatistiky vůbec. Statistickou analýzou výběrových dat získaných sledováním měřené veličiny v experimentu jsme schopni rozhodnout o platnosti určitého tvrzení. Pozorované výsledky z naměřených dat jsou tak statisticky podložena a získávají tak na věrohodnosti [21].

2.7.1 R-statistika

Matematický software "R" specializovaný pro statistické zpracování dat, byl vyvinut na univerzitě Auckland na Novém Zélandu. Jeho základem jsou knihovny skládající se z balíčků, které obsahují informace z různých vědních oborů (bioinformatika, genetika, geografie, sociologie, ekonomie). Nabízí širokou nabídku statistických aplikací. Umožňuje například testy hypotéz, výpočty analýzy rozptylu (ANOVA), Weibullovo či Studentovo rozdělení a další. Program R-statistika je volně šiřitelný program, který je neustále kontrolován odborným týmem pracovníků (R Core Team). Ti jej neustále vylepšují a řeší případné chyby na straně uživatele, což patří mezi jeho výhody. Na druhou stranu má "R" i své nevýhody, jaká jsou nemožnost zásahu do grafiky či ovládání pomocí příkazového řádku [21].

3. MATERIÁLY A METODY

3.1 Seznam materiálu

Materiál	Výrobce
FreeStyle HEK médium	GIBCO
CDM4HEK293 médium	HyClone Laboratories
L-Glutamin	Appllichem
Polyethylenimin	Polysciences
trypanová modř	SIGMA-ALDRICH
Polyakrylamidový gel	BioRad
Briliantová modř	ROTH
Ni-NTA agaróza	QIAGEN
Ultračistá voda	Ardeapharma
12-jamkové kultivační desky	TPP
50 ml centrifugační tuby	TPP
čtyřhranné kultivační láhve	SCHOTT DURAN
počítací slidy FAST READ 102	Biosigma
Fluorescenční mikroskop	ZEISS
Inkubátor	Kendro Laboratory
Třepačka	Infors HT
Centrifuga	Hettich LAB TECHNOLOGY
pH metr	MELTER TOLEDO

3.2 Buněčná kultura

Buněčná kultura HEK 293 byla kultivována v 1 litrových čtyřhranných láhvích fixovaných na oboustranných lepících páskách v temperovaných orbitálních třepačkách při 37°C. Buněčná kultura byla třepána při 130 otáčkách za minutu (rpm). Pracovní objem buněčné kultury pro 1 litrovou čtyřhrannou láhev byl 400 ml.

Buňky se množily v chemicky definovaném médiu CDM4HEK293 v bezsérových podmínkách. Medium bylo obohaceno 4 mM Glutaminem. Buněčná kultura byla ředěna každý den na denzitu $1,0 \times 10^6$ buněk/ml. Do druhého dny buňky obvykle dosáhly dvojnásobné denzity $2,0 \times 10^6$ buněk/ml. Počet živých buněk a jejich viabilita byla manuálně vyhodnocena

metodou barvení buněk trypanovou modří s použitím počítačích slidů na fluorescenčním mikroskopu.

3.3 Příprava plazmidové DNA

Rekombinantními technikami byly připraveny dvě plazmidové DNA potřebné pro vnesení DNA do buněk HEK 293 během transienční transfekce. Na oddělení Molekulární biologie byly metodou klonování a izolací DNA přichystané dva plazmidy, FetuinB a CTRP4. Tyto plazmidy byly rozpuštěny v ultra čisté vodě pro další zpracování. Jejich koncentrace byla 4905 µg/mL pro FetuinB a 7074 µg/mL pro CTRP4. Čistota obou plazmidů byla stejná a to 1,8. Takto připravené plazmidy byly použity k transfekci buněk.

3.4 Gen-transferová metoda transienční transfekce

3.4.1 Polyfekce

Příprava lineárního 25 kDa PEI spočívala v rozpuštění této soli v ultračisté vodě na finální koncentraci 1 mg/ml. Roztok PEI byl sterilizován filtrací (velikost póru filtru: 0,22 µM).

Množství přidané DNA a PEI na jeden milión buněk bylo 1,25 µg DNA a 2,5 µg PEI. Pro transfekci byl tedy zvolen poměr DNA:PEI: 1:2. Tento poměr byl zachován pro všechny typy kultivačních nádob (12-jamkové desky, 50 ml centrifugační tuby, výrobní láhve).

Pro transfekci bylo použito medium FreeStyle, dále jen transfekční medium. Počet transfekovaných buněk v transfekčním mediu byl $20,0 \times 10^6$ buněk/ml. Doba transfekce byla 4 hodiny. Takto byla připravena transfekční kultura. Po uplynutí transfekční doby (4 hodiny) byly buňky naředěny mediem určeným pro kultivaci buněčné kultury HEK 293E; tj. mediem CDM4HEK293 na $1,7 \times 10^6$ buněk/ml. Takto byla připravena produkční kultura.

3.5 Stanovení vhodných podmínek pro transfekci ve 12-jamkové desce

K optimalizaci exprese r-proteinu ve 12-jamkových deskách byly testovány tři kritéria, a to rychlost třepání, transfekční a produkční objemy buněčné kultury.

3.5.1 Test rychlosti třepání buněčné kultury

Okometricky byly stanoveny maximální otáčky, při kterých se kultura buněk v objemu 1 a 2 ml nevytlívala z jamky ven. Tomu odpovídala rychlost otáček 270 rpm. Při suboptimálních otáčkách menších než 200 rpm se buněčná kultura nedostatečně třepala (buňky ulpívaly na dně jamky). Jako minimální rychlost byly zvoleny otáčky 230 rpm.

Do transfekčních objemů buněčné kultury 0,4; 0,5; 0,6 a 0,7 ml byla provedena polyfekce. S takto transfekovanou buněčnou kulturou byly desky kultivovány v inkubátoru s CO₂ při 37°C dobu čtyř hodin. Po uplynutí transfekční doby, 4 hodiny po transfekci, byly buňky naředěny do produkčních objemů 1 a 2 ml. Část desek s buněčnou kulturou bylo třepáno při 230 rpm a část při 270 rpm.

Produkční kultura byla kultivována čtyři dny. Počet živých buněk a jejich viabilita byla stanovena v časech 4 (počátek inkubace v produkčním objemu), 24 (první den kultivace) a 96 hodin po transfekci (čtvrtý den kultivace). V časech 24 a 96 hodin po transfekci byla stanovena hodnota GFP. Čtvrtý den kultivace byla provedena zkouška exprese proteinu (test na přítomnost r-proteinu v supernatantu; blíže specifikováno v kapitole 3.8).

3.5.2 Test vhodného objemu kultury

Vzhledem k velikosti plochy dna jamky u kultivační desky, byl zvolen takový minimální transfekční objem, který by dno jamky pokryl. Tomu odpovídal objem 0,4 ml. Jako maximální transfekční objem byl stanoven 0,7 ml, který se blížil minimálnímu produkčnímu objemu 1ml. Pro otestování vhodného transfekčního objemu, byly zvoleny tyto čtyři testovací objemy: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml.

Nejvyšší možný objem jamky u kultivační desky je 3 ml. Na základě vhodného třepání buněčné kultury během kultivace, byly vybrány tyto dva produkční objemy, 1 a 2 ml.

Do transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6 a 0,7 ml byla provedena polyfekce. Takto transfekovaná buněčná kultura byla kultivována v inkubátoru s CO₂ při 37°C po dobu čtyř hodin. Rychlost třepání byla 230 rpm. Po uplynutí 4 hodinové transfekce byl transfekční objem 0,5 ml naředěn do produkčních objemů 1 a 2 ml.

Produkční kultura byla kultivována čtyři dny. Počet živých buněk a jejich viabilita byla stanovena v časech 4 (počátek inkubace v produkčním objemu), 24 (první den kultivace) a 96 hodin po transfekci (čtvrtý den kultivace). V časech 24 a 96 hodin po transfekci byla stanovena hodnota GFP. Čtvrtý den kultivace byla provedena zkouška exprese proteinu (test na přítomnost r-proteinu v supernatantu; blíže specifikováno v kapitole 3.8).

3.6 Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách

Byla provedena transienční transfekce buněk HEK293 v různých kultivačních nádobách, za účelem porovnání exprese r-proteinu mezi stávajícími 50 ml centrifugačními tubami (tuby) a nově testovanými 12-jamkovými deskami (desky). Současné testovací podmínky tubách jsou bez přítomnosti CO₂, naproti tomu kultivace buněk v nově testovaných deskách byla provedena v prostředí s CO₂. Expese r-proteinu v malém objemu byla srovnána s expresí r-proteinu ve výrobním objemu čtyřhranné láhve. Dosavadní produkce r-proteinu v láhvi je prováděna bez přítomnosti CO₂.

3.6.1 12-jamkové kultivační desky

V případě 12-jamkových desek byl zvolen transfekční objem 0,5 ml a produkční objem 2 ml. Do transfekčního objemu 0,5 ml byla provedena polyfekce. Takto transfekovaná buněčná kultura byla kultivována v inkubátoru s CO₂ při 37°C po dobu čtyř hodin. Rychlost třepání byla 230 rpm. Po uplynutí 4 hodinové transfekce byl transfekční objem 0,5 ml naředěn do produkčního objemu 2 ml (Obrázek 5).

Produkční kultura byla kultivována čtyři dny. Počet živých buněk a jejich viabilita byla stanovena v časech 4 (počátek inkubace v produkčním objemu), 24 (první den kultivace) a 96 hodin po transfekci (čtvrtý den kultivace). V časech 24 a 96 hodin po transfekci byla stanovena hodnota GFP. Čtvrtý den kultivace byla provedena zkouška exprese proteinu (test na přítomnost r-proteinu v supernatantu; blíže specifikováno v kapitole 3.8).



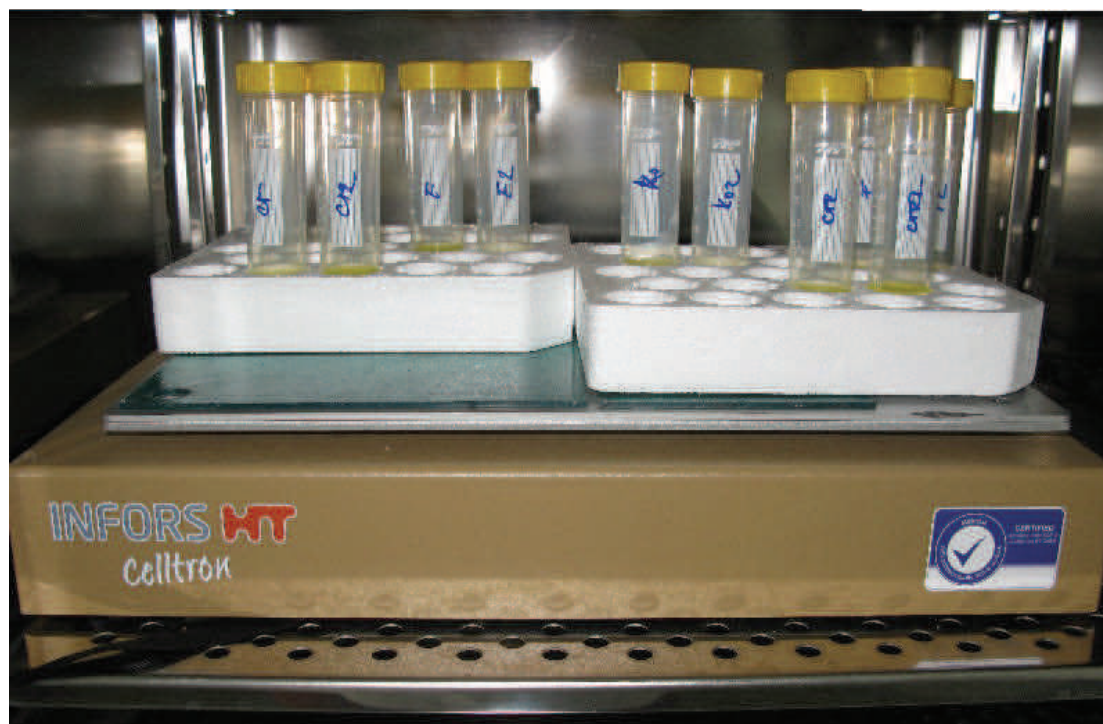
Obrázek 5: Kultivace 12-jamkových desek v inkubátoru. Zdroj: BioVendor-Laboratorní medicína a.s.

3.6.2 50 ml centrifugační tuby

V případě 50 ml centrifugačních tub byl zvolen transfekční objem 1,5 ml a produkční objem 10 ml. Do transfekčního objemu 1,5 ml byla provedena polyfekce. Takto transfekovaná buněčná kultura byla kultivována v inkubátoru bez CO₂ při 37°C po dobu čtyř hodin. Rychlost třepání byla 230 rpm. Po uplynutí 4 hodinové transfekce byl transfekční objem 1,5 ml naředěn do produkčního objemu 10 ml (Obrázek 6).

Produkční kultura byla kultivována čtyři dny. Počet živých buněk a jejich viabilita byla stanovena v časech 4 (počátek inkubace v produkčním objemu), 24 (první den kultivace) a 96

hodin po transfekci (čtvrtý den kultivace). V časech 24 a 96 hodin po transfekci byla stanovena hodnota GFP. Čtvrtý den kultivace byla provedena zkouška exprese proteinu (test na přítomnost r-proteinu v supernatantu; blíže specifikováno v kapitole 3.8).



Obrázek 6: Kultivace 50 ml centrifugačních tub v inkubátoru. Zdroj: BioVendor-Laboratorní medicína a.s.

3.6.3 Čtyřhranné výrobní láhve

V případě čtyřhranné výrobní láhve byl zvolen transfekční objem 35 ml a produkční objem 400 ml. Do transfekčního objemu 35 ml byla provedena polyfekce. Takto transfekovaná buněčná kultura byla kultivována v inkubátoru bez CO₂ při 37°C po dobu čtyř hodin. Rychlost třepání byla 130 rpm. Po uplynutí 4 hodinové transfekce byl transfekční objem 0,5 ml naředěn do produkčního objemu 2 ml (Obrázek 7).

Produkční kultura byla kultivována čtyři dny. Počet živých buněk a jejich viabilita byla stanovena v časech 4 (počátek inkubace v produkčním objemu), 24 (první den kultivace) a 96 hodin po transfekci (čtvrtý den kultivace). V časech 24 a 96 hodin po transfekci byla stanovena hodnota GFP. Čtvrtý den kultivace byla provedena zkouška exprese proteinu (test na přítomnost r-proteinu v supernatantu; blíže specifikováno v kapitole 3.8).



Obrázek 7: Kultivace čtyřhranných láhví v inkubátoru. Zdroj: BioVendor-Laboratorní medicína a.s.

3.7 Test produkce r-proteinu v inkubátoru s 5% CO₂ a v inkubátoru bez 5% CO₂ v testovacích a výrobních nádobách

3.7.1 12-jamkové desky

Uspořádání experimentu bylo provedeno stejně dle odstavce 3.6.1.

Desky s buněčnou kulturou byly umístěny do inkubátoru s nebo bez 5% CO₂

3.7.2 50 ml centrifugační tuby

Uspořádání experimentu bylo provedeno stejně dle odstavce 3.6.2.

Tuby s buněčnou kulturou byly umístěny do inkubátoru s nebo bez 5% CO₂

3.7.3 Čtyřhranné výrobní láhve

Uspořádání experimentu bylo provedeno stejně dle odstavce 3.6.3.

Láhve s buněčnou kulturou byly umístěny do inkubátoru s nebo bez 5% CO₂

3.7.4 Měření pH buněk v netransfekované buněčné kultuře

Buněčná kultura HEK 293 byla zakoncentrována na $20,0 \times 10^6$ buněk/ml a rozsuspendována do objemu 0,5 ml. Buňky nebyly transfekované DNA:PEI. První část desek byla umístěna do inkubátoru s CO₂ a druhá část desek do inkubátoru bez CO₂. Po čtyřech hodinách byla buněčná kultura naředěna na $1,7 \times 10^6$ buněk/ml do objemu 2 ml a opět rozdělena do dvou inkubátoru s CO₂ nebo bez CO₂. Pravidelně byly odebírány vzorky pro měření pH v časech 4; 24 a 96 hodin během kultivace. V objemu 2 ml bylo měřeno pH na pH metru.

3.8 Detekce r-proteinu

3.8.1 SDS-PAGE s předčištěním r-proteinu na Ni-NTA agaróze

V čase 96 hodin po transfekci byl odebrán vzorek 1 ml z kultury a byl zcentrifugován při otáčkách 13 000 rpm. 5 minut. Čirý supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky a k němu bylo přidáno odpovídající množství Ni-NTA agarózy. Připravená směs supernatant-Ni-NTA v mikrozkušavce byla třepána 30 minut. Poté byla směs opět zcentrifugována a omyta $\frac{1}{2}$ x ředěným fosfáto-sodným pufrům PBS. Pro konečnou přípravu vzorku na SDS-PAGE byl použit pelet Ni-NTA agarózy s navázaným r-proteinem.

Byla připravena vertikální elektroforéza s použitím polyakrylamidového gelu o hustotě 12 %. Separace r-proteinů na gelu probíhala 1 hodinu při 200 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel nespecificky barven brilantovou modří na přítomnost proteinů separovaných dle velikosti.

3.9 Zpracování experimentálních dat

Naměřená data byla vyhodnocena prostřednictvím statistického programu "R" a jeho podprogramu R commander. Experimentální data byla znázorněna v histogramu a na základě Gaussovy křivky a testu normality (Shapirův-Wilkův test) byla podle potřeby zlogaritmována, odmocněna či exponována.

Poté byla na takto upravená data aplikována analýza rozptylu ANOVA a sledována statistická významnost u jednotlivých pozorovaných faktorů vzhledem k naměřeným proměnným. Sledované faktory byly transfekční a produkční objemy, otáčky rpm, DNA (CTRP4 a FetuinB), čas kultivace, opakování experimentu, vliv inkubátoru s/bez CO₂ na expresi r-proteinu. Sledované proměnné byly počty živých buněk, jejich viabilita, relativní četnost buněk pozitivních na GFP a pH.

Na základě statistické významnosti analýzy rozptylu u sledovaných parametrů byla vybrána data se statistickou významností $\leq 0,05$ a následně vynesena do krabicového nebo spojnicového grafu.

4. VÝSLEDKY

4.1 Stanovení optimální rychlosti třepání buněčné kultury v deskách

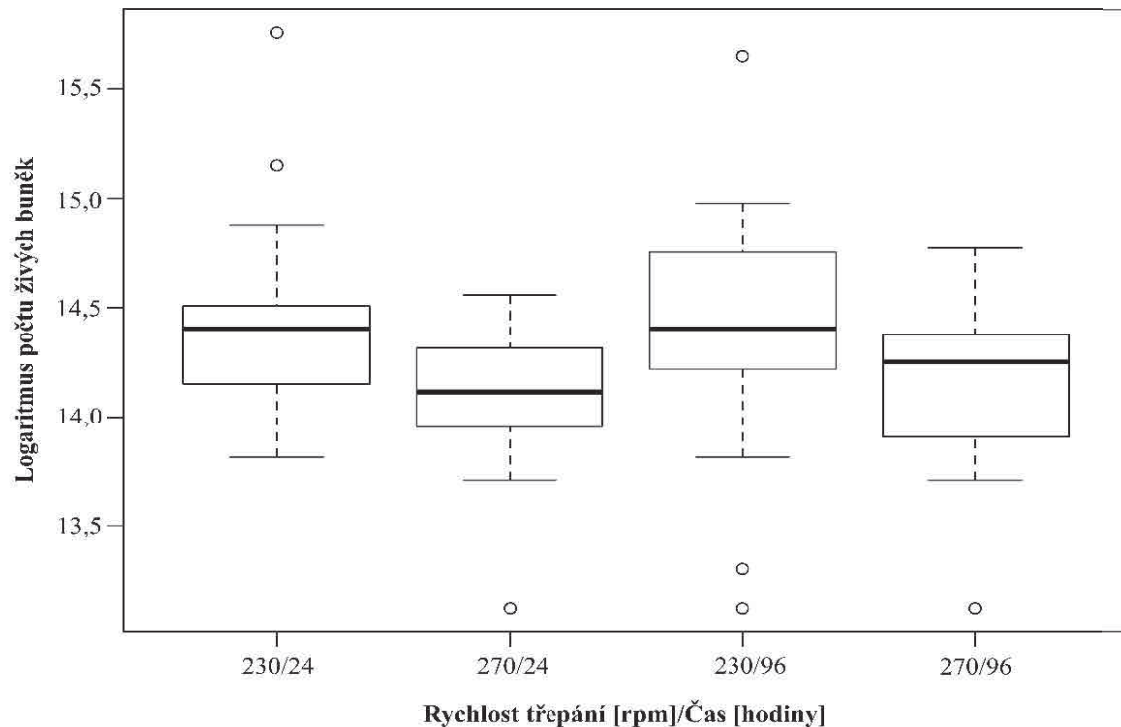
Pro kultivaci buněčné kultury ve 12-jamkových deskách, stejně jako v jiných nádobách je důležitá rychlost třepání, objem, CO₂, pH a další. Byly sledovány proměnné jako počet živých buněk a jejich viabilita při různé rychlosti třepání 230 a 270 rpm. Jako ukazatel úspěšné transfekce byla sledována relativní četnost buněk pozitivních na GFP při stejných rychlostech třepání. Tři sledované parametry byly měřeny u čtyř transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml, kdy společný produkční objem byl 2 ml a u dvou produkčních objemů 1 a 2 ml, kdy společný transfekční objem byl 0,5 ml. Mezi produkčními a transfekčními objemy nebyl rozdíl v počtu buněk, jejich viabilitě ani v množství pozitivních buněk GFP, proto byly data v uvedených grafech zprůměrována. Dále se zpracovává data skládala z transfekovaných buněk dvěma různými DNA, FetuinemB a CTRP4. Jelikož mezi dvěma DNA nebyl taktéž zaznamenán významný rozdíl, a to u všech sledovaných proměnných, byla data zprůměrována. Grafické znázornění rozdílů viability buněk mezi dvěma testovanými DNA je uvedené v příloze (*graf 22*).

4.1.1 Porovnání rychlost třepání 230 rpm a 270 rpm

Hodnoty počtu živých buněk při 230 rpm byly v časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci v průměru: $1,14 \pm 0,1$; $1,60 \pm 0,25$; $2,0 \pm 0,35 \times 10^6$ buněk/mL. Hodnoty počtu živých buněk při 270 rpm byly ve stejných časech v průměru: $0,76 \pm 0,5$; $1,39 \pm 0,2$; $1,64 \pm 0,3 \times 10^6$ buněk/mL. Data byla měřena u všech transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml (graf 1).

Celkové počty živých buněk u sledovaných produkčních objemů 1 a 2 ml v časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci byly v průměru: u testovaných otáček 230 rpm $1,08 \pm 0,1$; $2,38 \pm 0,3$; $1,90 \pm 0,6 \times 10^6$ buněk/mL a u druhých testovaných otáček 270 rpm $0,7 \pm 0,1$; $1,45 \pm 0,1$; $1,33 \pm 0,5 \times 10^6$ (graf 1).

Byl zaznamenán signifikantní vliv rychlosti třepání na počet buněk ($p < 0,001$). Statisticky bylo potvrzeno, že většího počtu živých buněk bylo dosaženo při rychlosti třepání 230 rpm.

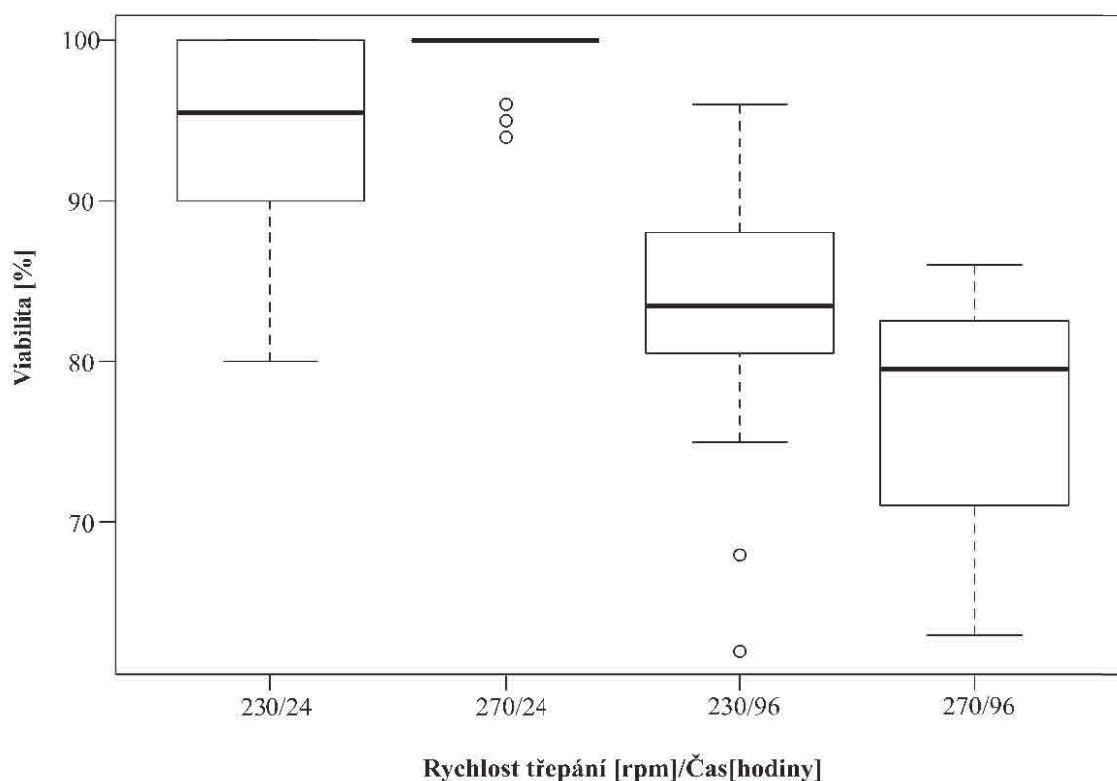


Graf 1: Počet živých buněk při různých rychlostech třepání v čase 24 a 96 hodin po transfekci. Vyšší počet živých buněk byl sledován při rychlosti třepání 230 rpm. Počty živých buněk jsou téměř identické v závislosti na sledovaném čase při stejné rychlosti. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

Hodnoty viability buněk při 230 rpm byly v časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci v průměru: $87\pm 3\%$; $95\pm 5\%$; $87\pm 4\%$ buněk/mL Viability při 270 rpm byly ve stejných časech v průměru: 83 ± 3 ; 99 ± 1 ; $78\pm 3\%$. Data byla měřena u všech transfekčních objemů (graf 2).

Viability buněk u produkčních objemů v časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci byly v průměru: u testovaných otáček 230 rpm 83 ± 3 ; 97 ± 4 ; $76\pm 5\%$ a u testovaných otáček 270 rpm 77 ± 4 ; 98 ± 2 ; $74\pm 3\%$ (graf 2).

Na viabilitu buněk neměla statisticky významný vliv rychlost třepání.

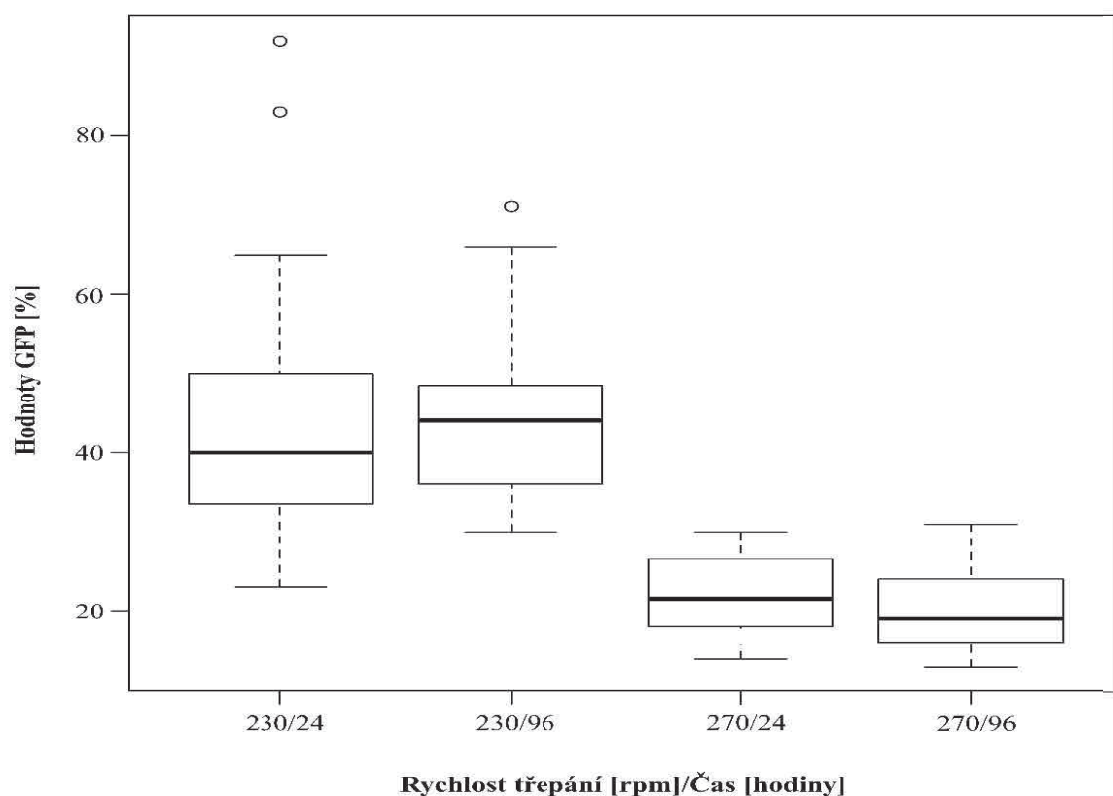


Graf 2: Viabilita buněk při různých rychlostech třepání v čase 24 a 96 hodin po transfekci. Stejná viabilita bylo dosaženo v čase 24 hodin po transfekci, jak u rychlosti třepání 230 rpm, tak u 270 rpm. Naproti tomu po 96 hodinách transfekce byla sledována nižší viabilita u rychlosti třepání 270 rpm než u 230 rpm. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

Relativní četnosti buněk pozitivních na GFP, dosahovaly hodnoty v časech 24 a 96 hodin po transfekci při 230 rpm v průměru 40 ± 7 % a při 270 rpm bylo naměřeno GFP v průměru 21 ± 6 % (graf 3) u všech transfekčních objemů.

U produkčních objemů dosahovaly GFP pozitivní buňky hodnot 24 a 96 hodin po transfekci při 230 rpm v průměru 50 ± 13 % a při 270 rpm v průměru 13 ± 3 % (graf 3).

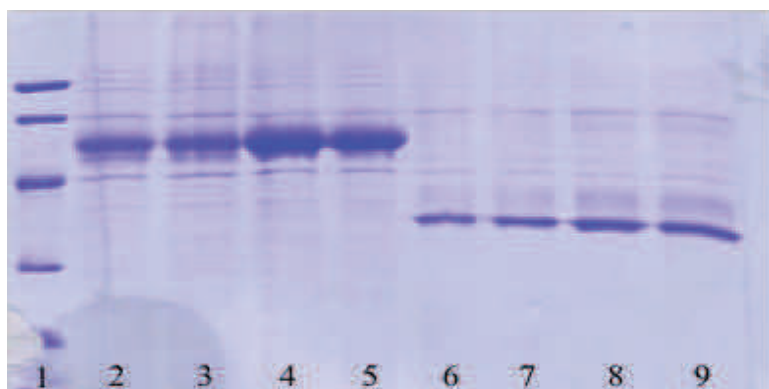
Byl zaznamenán signifikantní vliv rychlosti třepání na hodnoty GFP ($p < 0,001$). Výrazně vyšších hodnot četnosti buněk pozitivních na GFP byl statisticky potvrzen při rychlosti třepání 230 rpm.



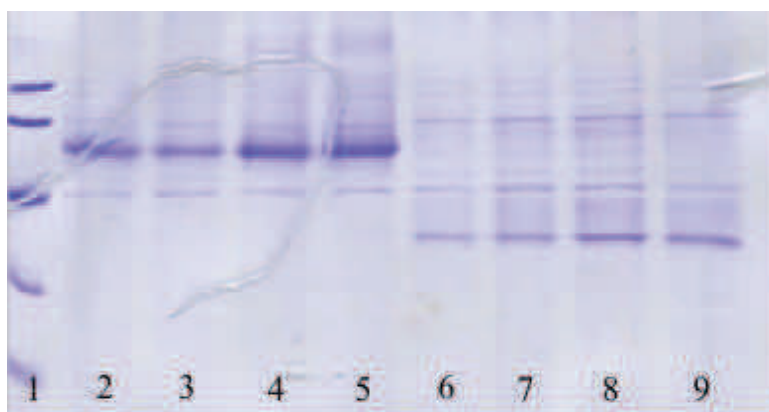
Graf 3: Relativní četnosti buněk pozitivních na GFP při různých rychlostech třepání 24 a 96 hodin po transfekci. GFP pozitivní buňky dosahovaly vyšších hodnot u rychlosti třepání 230 rpm než u 270 rpm. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.1.2 Detekce r-proteinu

Sledovaným výsledkem detekce, byl rozdíl mezi expresí r-proteinů kultivovaných při různých rychlostech třepání buněčné kultury 230 a 270 rpm. Byly detekovány 2 různé r-proteiny FetuinB a CTRP4. Očekávaná velikost Fetuinu B je 45 kDa a CTRP4 36 kDa. V případě buněčné kultury třepané při 230 rpm byly detekované modré bandy na gelu a po srovnání se standardem byly zhodnoceny jako odpovídající své velikosti (Obrázek 8). Viditelně slabší bandy byly detekovány u buněčné kultury třepané při 270 rpm než při 230 rpm (Obrázek 9).



Obrázek 8: Detekce Fetuinu B a CTRP4 na 12% SDS-PAGE při rychlosti třepání buněčné kultury 230 rpm. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 2-5: FetuinB, pozice 5-9 CTRP4. Na gelu jsou viditelné pozitivní bandy jak FetuinuB, tak CTRP4 v odpovídajících velikostech 45 a 36 kDa.



Obrázek 9: Detekce Fetuinu B a CTRP4 na 12% SDS-PAGE při rychlosti třepání buněčné kultury 270 rpm. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 2-5: FetuinB, pozice 5-9 CTRP4. Na gelu jsou velmi slabě viditelné bandy jak FetuinuB, tak CTRP4 v odpovídajících velikostech 45 a 36 kDa.

4.2 Stanovení optimálního objemu buněčné kultury v deskách

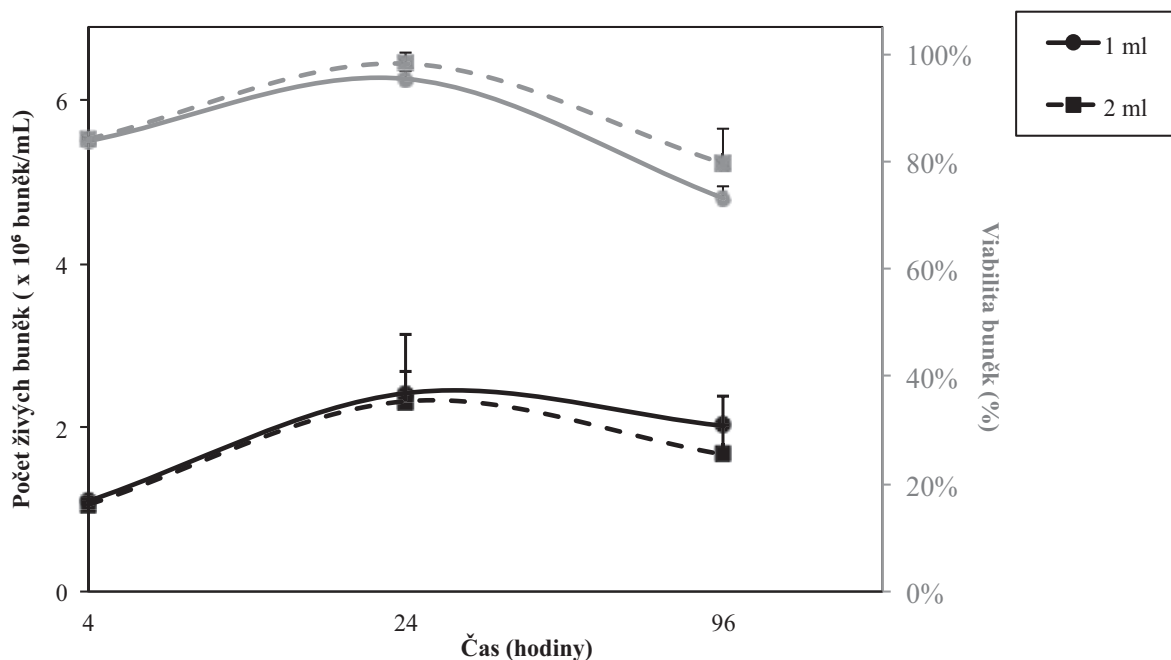
Pro kultivaci buněčné kultury v deskách, stejně jako v jiných nádobách je důležitý správný transfekční a produkční objem. Byly sledovány proměnné jako počet živých buněk, viabilita a GFP pozitivní buňky u čtyř testovaných transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml a dvou produkčních objemů 1 a 2 ml při 230 rpm. Společný produkční objem pro testované transfekční objemy byl 2 ml a jednotný transfekční objem pro tetované produkční objemy byl 0,5 ml. Uvedená data se skládají z buněk transfekovaných dvěma různými DNA, FetuinemB a CTRP4. Jelikož nebyl mezi dvěma DNA nebyl zaznamenán významný rozdíl, a to u všech sledovaných proměnných, byla data zprůměrována. Grafické znázornění rozdílů hodnot GFP mezi dvěma testovanými DNA je uvedené v příloze (graf 23).

4.2.1 Produkční objemy

Během čtyř denní transfekce byl sledován počet živých buněk. V časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci byly počty živých buněk, jak v produkčním objemu 1 ml, tak v produkčním objemu 2 ml identické. V těchto časech 4, 24, 96 hodin dosahovaly počty buněk pro produkční objem 1 ml v průměru $1,1 \pm 0,1$; $2,43 \pm 0,5$; $2,03 \pm 0,6 \times 10^6$ buněk/mL. Ve stejných časech byly počty buněk pro produkční objem 2 ml v průměru: $1,06 \pm 0,1$; $2,33 \pm 0,2$; $1,68 \pm 0,6 \times 10^6$ buněk/mL (graf 4). Na počet buněk neměl statisticky významný vliv produkční objem

Dalším sledovaným parametrem byla viabilita buněk, která byla detekována v průběhu čtyř denní transfekce. V časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci byla viabilita buněk, jak v produkčním objemu 1 ml, tak v produkčním objemu 2 ml identické. V těchto časech 4, 24, 96 hodin byla viabilita pro produkční objem 1 ml v průměru: 83 ± 5 ; 95 ± 4 ; 73 ± 10 %. Ve stejných časech byla viabilita pro produkční objem 2 ml v průměru: 84 ± 3 ; 98 ± 3 ; 80 ± 5 % (graf 4).

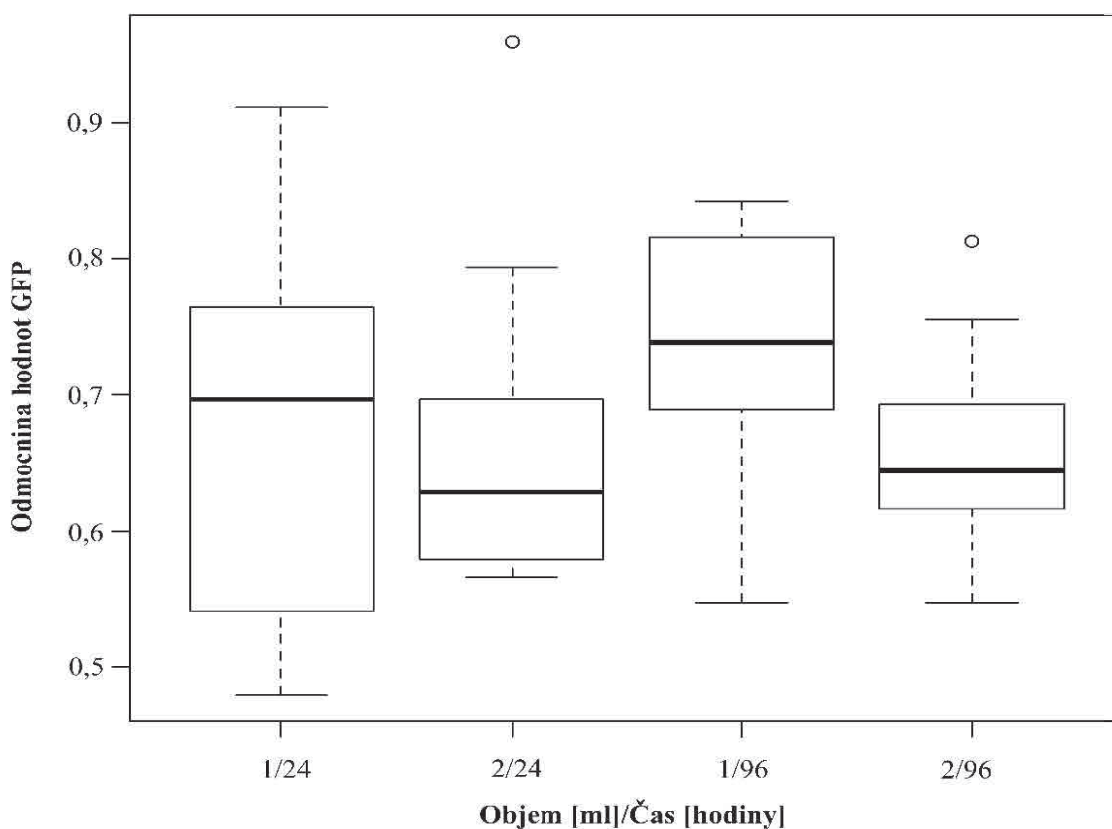
Na viabilitu buněk neměl statisticky významný vliv produkční objem.



Graf 4: Viabilita a počet živých buněk v různých časech po transfekci. U obou transfekčních objemů byly detekována shodná viabilita i počet živých buněk. Průběh šedých křivek znázorňující viability buněk a průběh černých křivek znázorňující počty buněk je stejný pro oba testované produkční objemy (1 a 2ml). V čase 4 hodiny po transfekci dohází ke zvýšení počtu a viability buněk do doby 24 hodin po transfekci. Poté dochází k poklesu křivky z 24 do času 96 hodin po transfekci. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

Třetím sledovaným parametrem byly relativní četnosti buněk pozitivních na GFP ve dvou časech, a to 24 a 96 hodin po transfekci. GFP dosahovalo podobných hodnot v obou produkčních objemech 1 a 2 ml. V případě produkčního objemu 1 ml bylo naměřeno GFP v průměru $47\pm 20\%$ a $55\pm 10\%$ 24 a 96 hodin po transfekci. Přibližných hodnot GFP dosahovalo i u produkčního objemu 2 ml, kdy bylo naměřeno v průměru $48\pm 8\%$ jak pro čas 24 hodin, tak pro čas 96 hodin po transfekci (*graf 5*).

Na relativní četnosti buněk pozitivních na GFP neměl statisticky významný vliv produkční objem

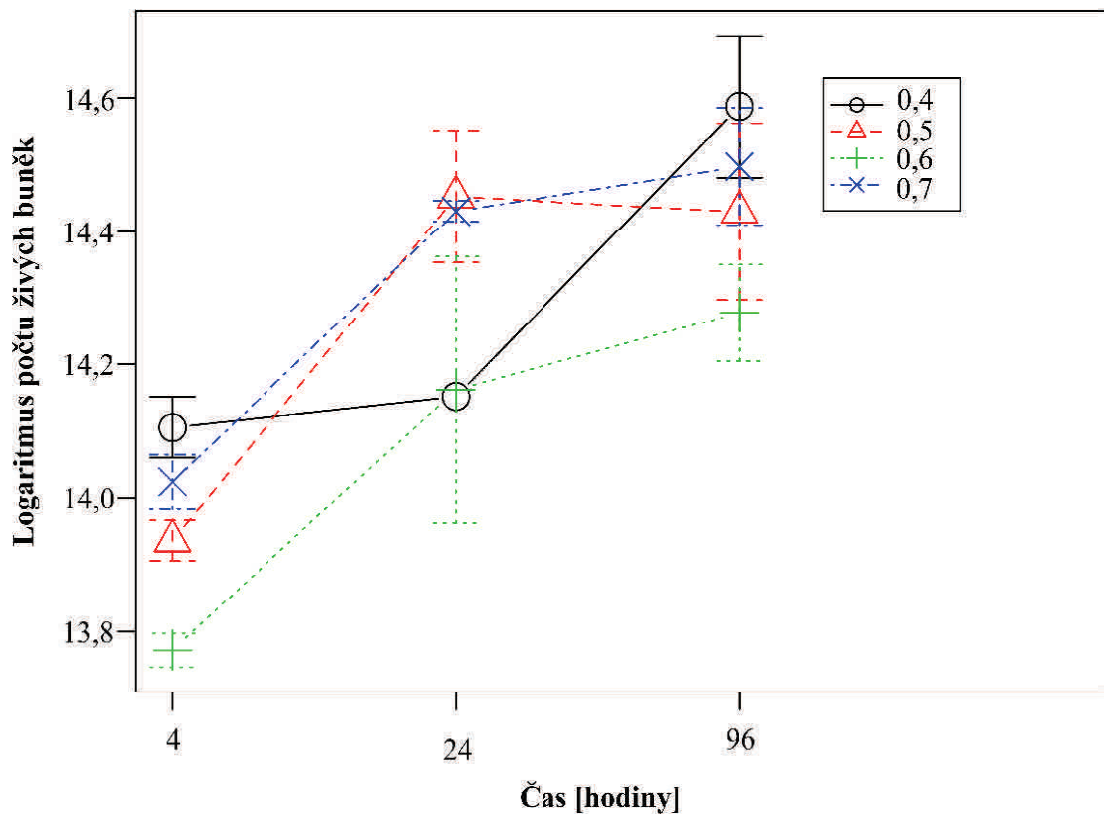


Graf 5: Relativní četnosti buněk pozitivních na GFP v různých časech, 24 a 96 hodin po transfekci. Pro produkční objem 1 ml nabývají data vyšší hodnoty než je tomu u 2 ml, kde GFP dosahovalo různých hodnot. Nejvyšší naměřené množství GFP pozitivních buněk je znázorněno u 1 ml v čase 96 hodin po transfekci. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.2.2 Transfekční objemy

Naměřené hodnoty počtu živých buněk a jejich viability u testovaných transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml byly velmi podobné. Počty živých buněk ve všech čtyřech testovaných transfekčních objemech byly v průměru $1,14 \pm 0,1 \times 10^6$ po 4 hodinách transfekce, $1,60 \pm 0,25 \times 10^6$ buněk/mL 24 hodin po transfekci a $2,00 \pm 0,35 \times 10^6$ 96 hodin po transfekci (graf 6).

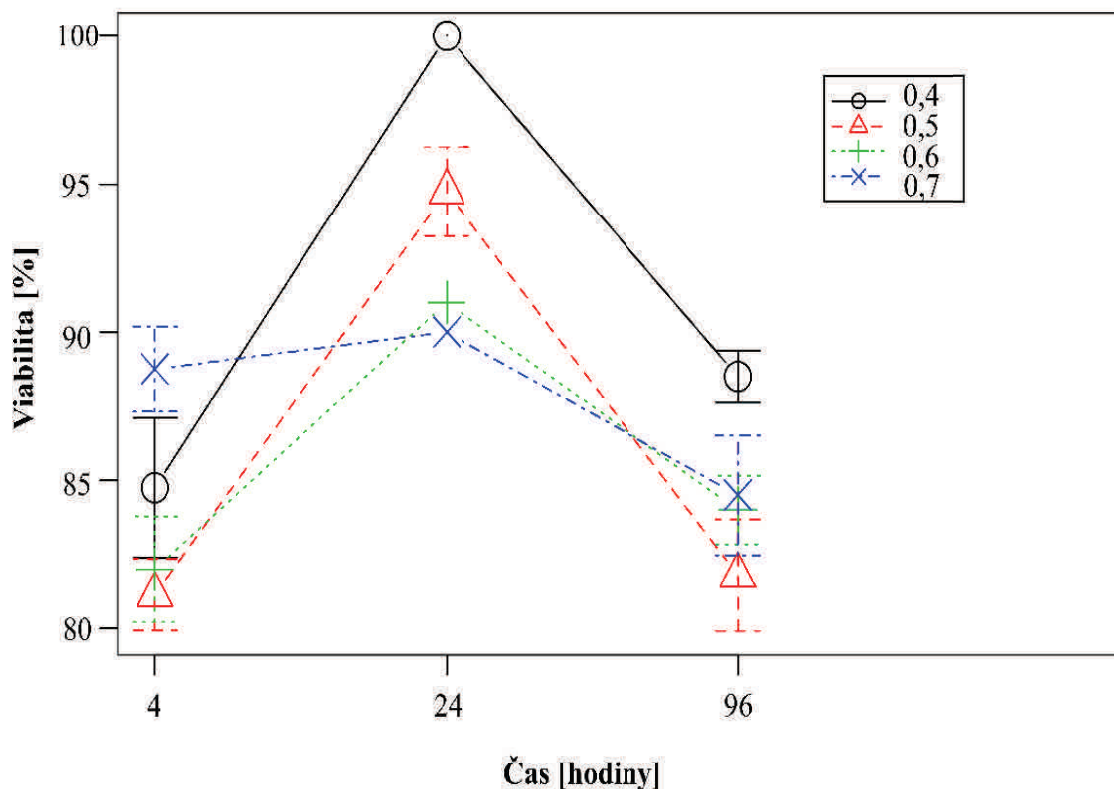
Na počet buněk neměl statisticky významný vliv transfekční objem.



Graf 6: Počet živých buněk v různých transfekčních objemech v čase 4, 24 a 96 hodin po transfekci. Vyšší počet buněk je v grafu znázorněn u transfekčních objemů 0,5 a 0,7 ml oproti transfekčním objemům 0,4 a 0,6 ml. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

Viabilita buněk dosahovala hodnot ve sledovaném časech 4, 24 a 96 hodin po transfekci v průměru 87 ± 3 % ; 95 ± 5 % ; 87 ± 4 % ve všech čtyřech testovaných transfekčních objemech (graf 7).

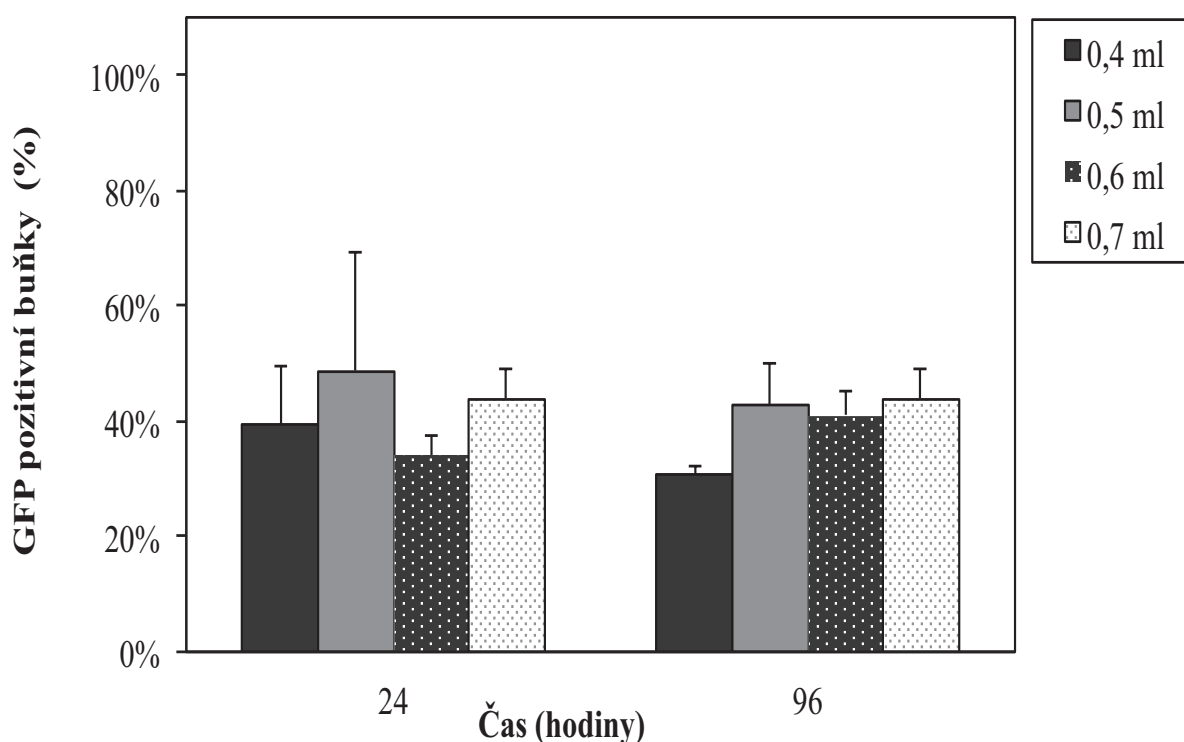
Na viabilitu buněk neměl statisticky významný vliv transfekční objem.



Graf 7: Viabilita buněk v různých transfekčních objemech v čase 4, 24 a 96 hodin po transfekci. Průběh křivek je téměř identický u všech testovaných transfekčních objemů 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 ml. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

GFP pozitivní buňky dosahovaly hodnot ve všech čtyřech testovaných transfekčních objemech v průměru 40 ± 7 % a to v obou měřených časech, 24 a 96 hodin po transfekci (graf 8).

Byl zaznamenán vliv transfekčního objemu na hodnoty GFP ($p < 0,05$). Podle statického zpracování dat bylo podobně vyšších hodnoty GFP pozitivních buněk dosaženo u transfekčního objemu 0,5; 0,6 a 0,7 ml oproti nejnižší hodnotě dosažené v objemu 0,4 ml.

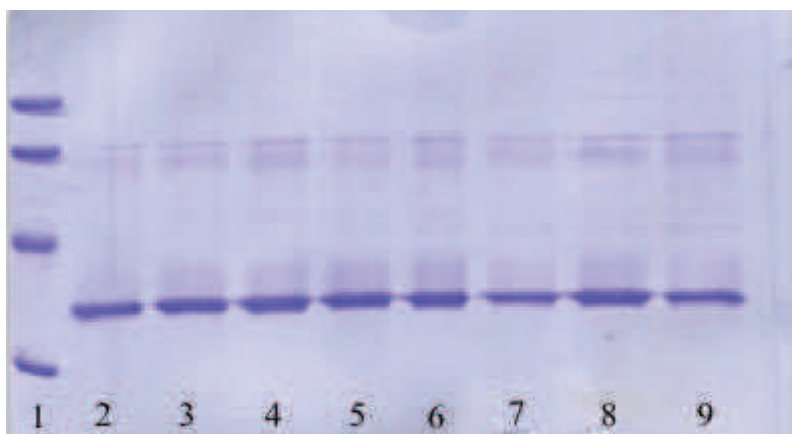


Graf 8: GFP transfekovaných buněk DNA v různých čase 24 a 96 hodin po transfekci. Na grafu je v čase 96 hodin po transfekci zaznamenáno podobných hodnot GFP mezi třemi transfekčními objemy (0,5; 0,6; 0,7), kdy snížené hodnoty GFP bylo naměřeno v objemu 0,4 ml. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

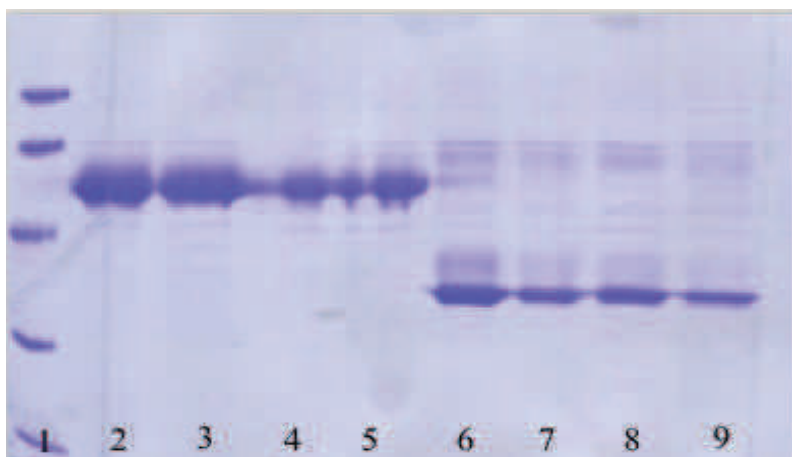
4.2.3 Detekce r-proteinu

Sledovaným výsledkem detekce byl rozdíl mezi expresí r-proteinů kultivovaných v různých produkčních a transfekčních objemech buněčné kultury. Byly detekovány 2 různé r-proteiny FetuinB a CTRP4. Očekávaná velikost Fetuinu B je 45 kDa a CTRP4 36 kDa.

Mezi intenzitou bandů u transfekčních objemů není pozorován viditelný rozdíl (Obrázek 10). Obdobné výsledky z detekce r-proteinů byly zaznamenány u produkčních objemů, kdy v případě 1 ml byly bandy o něco intenzivnější než u produkčního objemu 2 ml (Obrázek 11). Detekované modré bandy na gelu byly srovnány se standartem a poté byly zhodnoceny jako odpovídající své velikosti.



Obrázek 10: Detekce CTRP4 na 12% SDS-PAGE v různých transfekčních objemech. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31), pozice 2-3: 0,4 ml, pozice 4-5: 0,5 ml, pozice 6-7: 0,5 ml, pozice 8-9: 0,7 ml. Na gelu jsou detekovány bandy ve všech transfekčních objemech o stejné intenzitě v odpovídající velikosti proteinu CTRP4 36 kDa



Obrázek 11: Detekce FetuinuB a CTRP4 na 12% SDS-PAGE v různých produkčních objemech. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5), pozice 2-3: FetuinB v 1 ml, pozice 4-5 FetuinB ve 2 ml, pozice 6-7: CTRP4 v 1 ml, pozice 8-9: FetuinB ve 2 ml. Na gelu jsou detekovány bandy ve všech produkčních objemech o podobné intenzitě v odpovídajících velikostech proteinů FetuinuB 45 kDa a CTRP4 36 kDa

4.3 Vliv inkubace s/bez CO₂ na růst, viabilitu a GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách

Po provedené transienční transfekci byla jedná část buněčné kultury umístěna do inkubátoru s CO₂ a druhá část do inkubátoru bez CO₂. Během čtyřdenní kultivace byl sledován vliv inkubace s/bez CO₂ na celkový počet živých buněk, jejich viabilitu a relativní četnost buněk pozitivních na GFP. Transfekce byla provedena do tří různých kultivačních nádob. K testování exprese r-proteinu v malém objemu složily 50 ml centrifugační tuby a 12-jamkové kultivační desky. Pro výrobu r-proteinu ve velkém objemu to byly čtyřhranné láhve o objemu 1 litru.

Vzhledem ke shodným výsledkům třech sledovaných proměnných (počet buněk, viabilita, GFP) u desek a tub (desky a tuby s CO₂, desky a tuby bez CO₂) byly naměřené výsledky těchto dvou testovacích nádob pro grafové znázornění sloučeny, dále jen testovací nádoby. Dalšími statisticky nevýznamnými daty byly minimální rozdíly jak v počtu buněk a viabilitách, tak u hodnot GFP mezi dvěma různými použitými DNA (FetuinB, CTRP4), dále jen DNA, byla data zprůměrována. Grafické znázornění rozdílů viability buněk mezi dvěma testovanými nádobami (desky a tuby s CO₂, desky a tuby bez CO₂) je uvedené v příloze (*graf 24*).

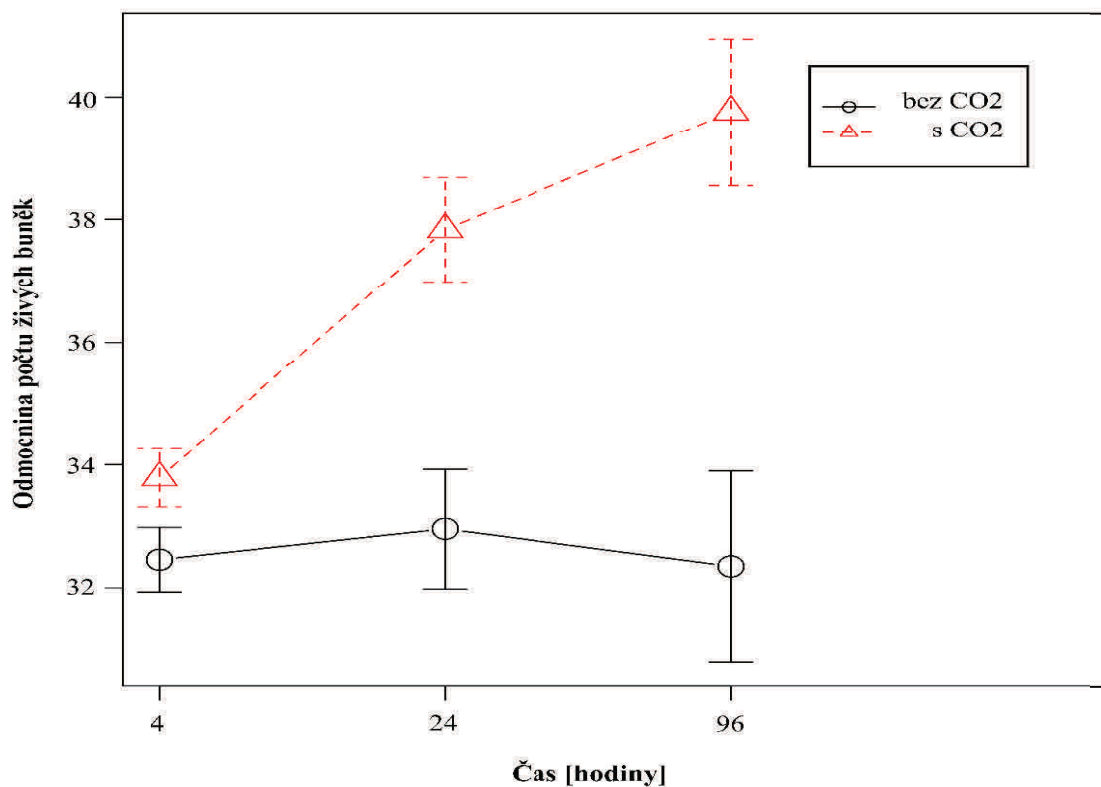
V tomto experimentu byl také sledován vliv inkubace s/bez CO₂ na růst a viabilitu buněk u netransfekovaných buněk, kde sledované proměnné dosahovaly stejných hodnot, jako u transfekovaných buněk DNA. Naměřená data u netransfekovaných buněk nejsou uvedena ve výsledcích, ale grafické znázornění počtů buněk a jejich viabilit je uvedeno v příloze (*graf 25, 26*).

4.3.1 Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách

Jednotlivé počty buněk u testovacích nádob, v případě desek s CO₂, v časech 4; 24; 96 hodin byly 1,44; 2,65; 3,36 x10⁶ buněk/mL. Téměř identické hodnoty byly pozorovány u tub s CO₂: 1,13; 2,03; 2,59 x10⁶ buněk/mL. Ve zkoumaných časech byl počet živých buněk u desek bez CO₂ 1,07; 1,19; 0,87 x10⁶ buněk/mL a u tub bez CO₂: 1,12; 1,40; 1,65 x10⁶ buněk/mL (graf 9).

Podle uvedených dat byl pozorován vyšší počet buněk u nádob umístěných do inkubátoru s CO₂ než nádob umístěných do inkubátoru bez CO₂.

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv inkubace s/bez CO₂ na počet buněk ($p < 0,001$). Statisticky bylo potvrzeno většího počtu živých buněk inkubovaných v přítomnosti CO₂ než bez přítomnosti CO₂.

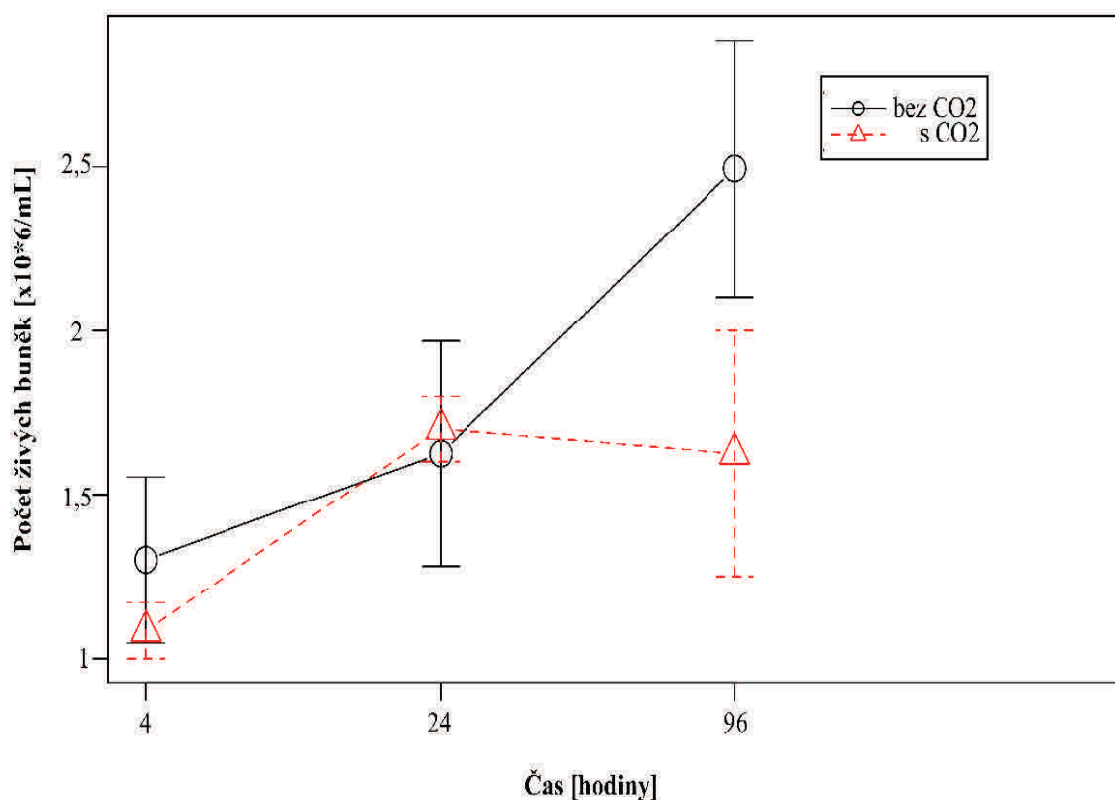


Graf 9: Rozdíl v počtu živých buněk v testovacích nádobách umístěných do inkubátoru s CO₂ nebo bez CO₂ v různých časech. Na grafu bylo zaznamenáno zvýšení počtu buněk kultivovaných v inkubátoru s CO₂ ze 4 hodiny do 96 hodin po transfekci. V případě buněčné kultury kultivované v inkubátoru bez CO₂ bylo v grafu pozorováno snížení počtu živých buněk z 24 hodin do 96 hodin po transfekci. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

Vzhledem k přítomnosti CO₂ v inkubátoru nebyl u výrobních láhvi zaznamenán od začátku kultivace tak velký rozdíl v počtu živých buněk, jak tomu bylo u testovacích. nádob (desky, tuby). Pouze poslední den kultivace, 96 hodin po transfekci, byl evidován rozdíl v počtu buněk mezi kultivací v inkubátoru bez CO₂ či v inkubátoru s CO₂. Počty buněk v láhvích dosahovaly hodnot 1,17; 1,70; 1,63 x10⁶ buněk/mL a to během inkubace s CO₂. V inkubátoru bez CO₂ nabývaly počty buněk hodnot 1,67; 1,05; 2,69 x10⁶ buněk/mL (graf 10).

Podle uvedených dat byl zaznamenán vyšší počet buněk v láhvích inkubovaných v nepřítomnosti CO₂ než s CO₂.

Dle analýzy rozptylu nebyl zaznamenán signifikantní vliv inkubace s/bez CO₂ na počet buněk. Naměřena data byla statisticky nevýznamná.



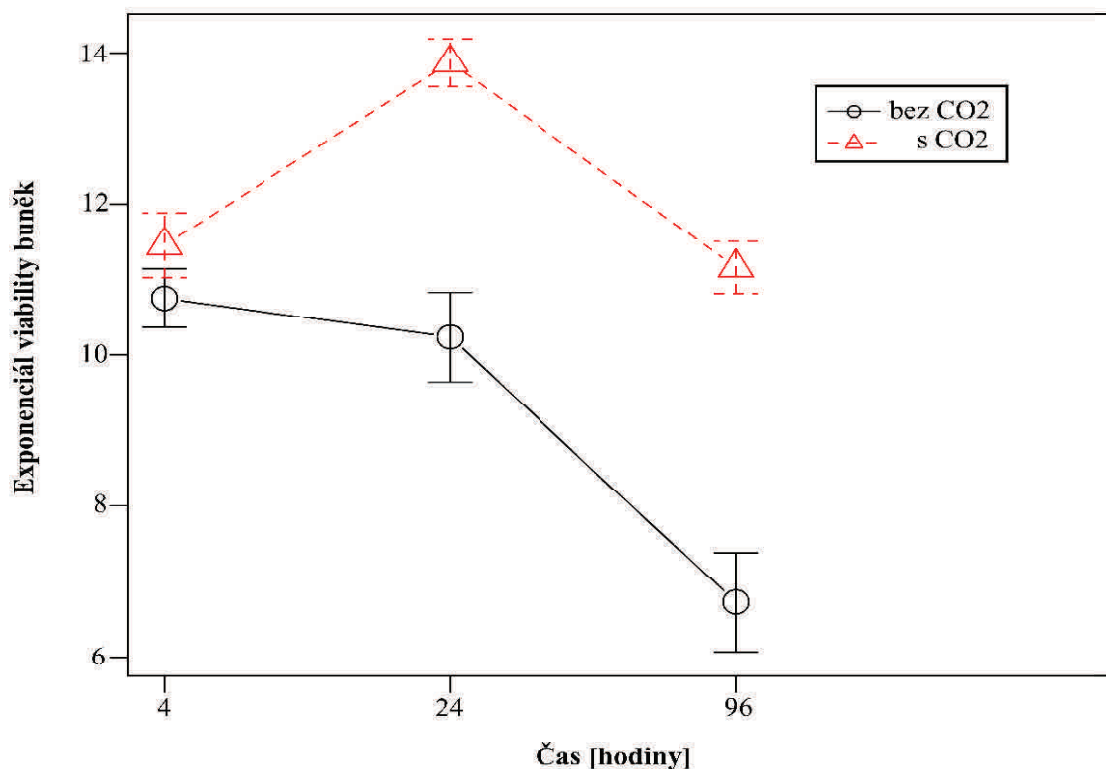
Graf 10: Rozdíl v počtu živých buněk v láhvích kultivovaných v inkubátoru s CO₂ nebo bez CO₂ v různých časech. Na grafu lze vidět zjevný vzestup u obou křivek počtů buněk do 24 hodin po transfekci. Poté se křivky jednotlivých počtů buněk rozcházejí. V případě kultivace v inkubátoru bez CO₂ je počet buněk vyšší než je tomu u kultivace buněk v inkubátoru s CO₂. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.3.2 Viabilita buněk v různých kultivačních nádobách

Dalším sledovaným parametrem byla viabilita buněk. Viabilita měřena v testovacích nádobách v časech 4; 24; a 96 hodin po transfekci odpovídala následujícím hodnotám. Viabilita buněk byla v deskách s CO₂ 91; 96; 89% a v tubách s CO₂ 87; 96; 86%. Rozdílných viabilit, nižších, bylo dosaženo v kultivaci buněk v nepřítomnosti CO₂. V deskách odpovídaly hodnoty viabilit 87; 73; 46% a v tubách 85; 89; 61% (graf 11).

Podle uvedených dat byla zaznamenána vyšší viabilita buněk v testovacích nádobách inkubovaných v přítomnosti CO₂ než bez CO₂.

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv inkubace s/bez CO₂ na viabilitu buněk ($p < 0,001$). Statisticky bylo potvrzeno vyšší viability buněk inkubovaných v přítomnosti CO₂ než bez přítomnosti CO₂.

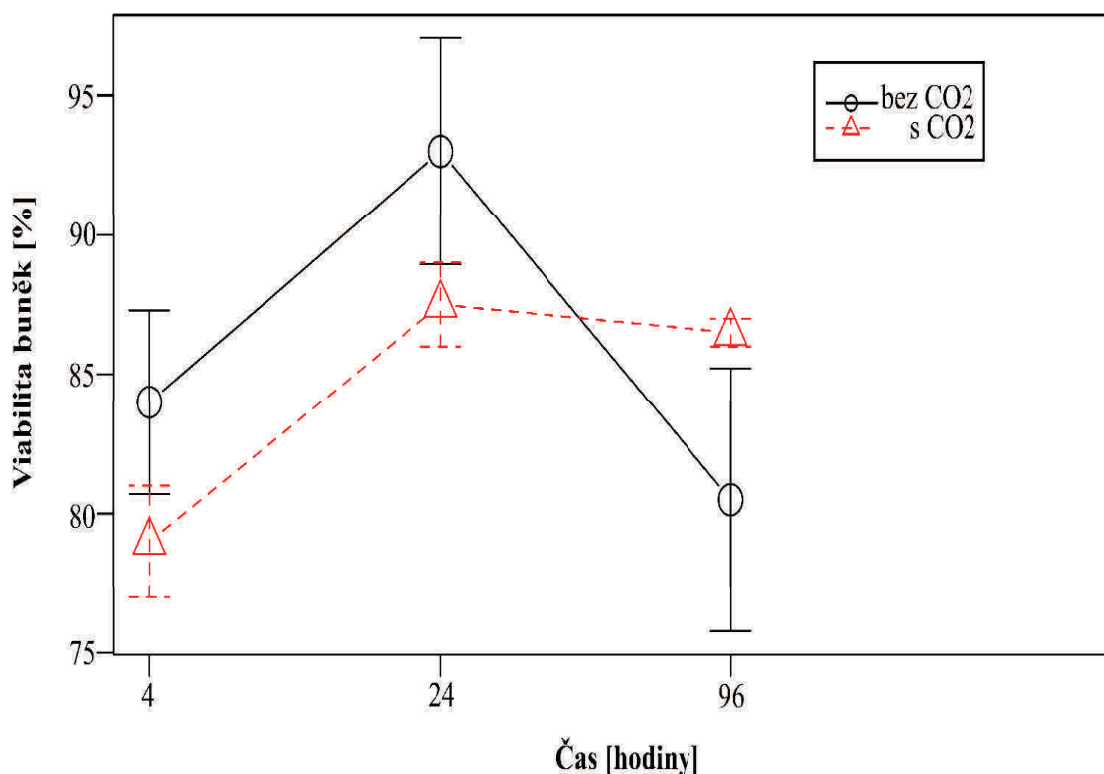


Graf 11: Viabilita buněk v testovacích nádobách umístěných do inkubátoru s CO₂ nebo bez CO₂. V případě buněk umístěných do inkubátoru s CO₂ dosahovala křivka vyšších hodnot viabilit než u buněk umístěných do inkubátoru bez CO₂ po celou dobu kultivace. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

I když byla viabilita buněk v testovacích nádobách vyšší v přítomnosti CO_2 , hodnoty viabilit naměřeny ve výrobních láhvích ukázaly opak. Vyšší viability bylo dosaženo u buněk kultivovaných bez přítomnosti CO_2 než s CO_2 . V časech 4; 24 a 96 hodin po transfekci byly naměřeny hodnoty viabilit buněk v láhvích v prostředí CO_2 79; 87; 87% , kdy u láhvi s buněčnou kulturou umístěných do inkubátoru bez CO_2 bylo dosaženo podobných hodnot viabilit: 84; 93; 80% (graf 12).

Podle uvedených dat byla zaznamenána vyšší viabilita buněk inkubovaných v nepřítomnosti CO_2 než s CO_2 .

Dle analýzy rozptylu nebyl zaznamenán signifikantní vliv inkubace s/bez CO_2 na viabilitu buněk. Naměřena data byla statisticky nevýznamná.



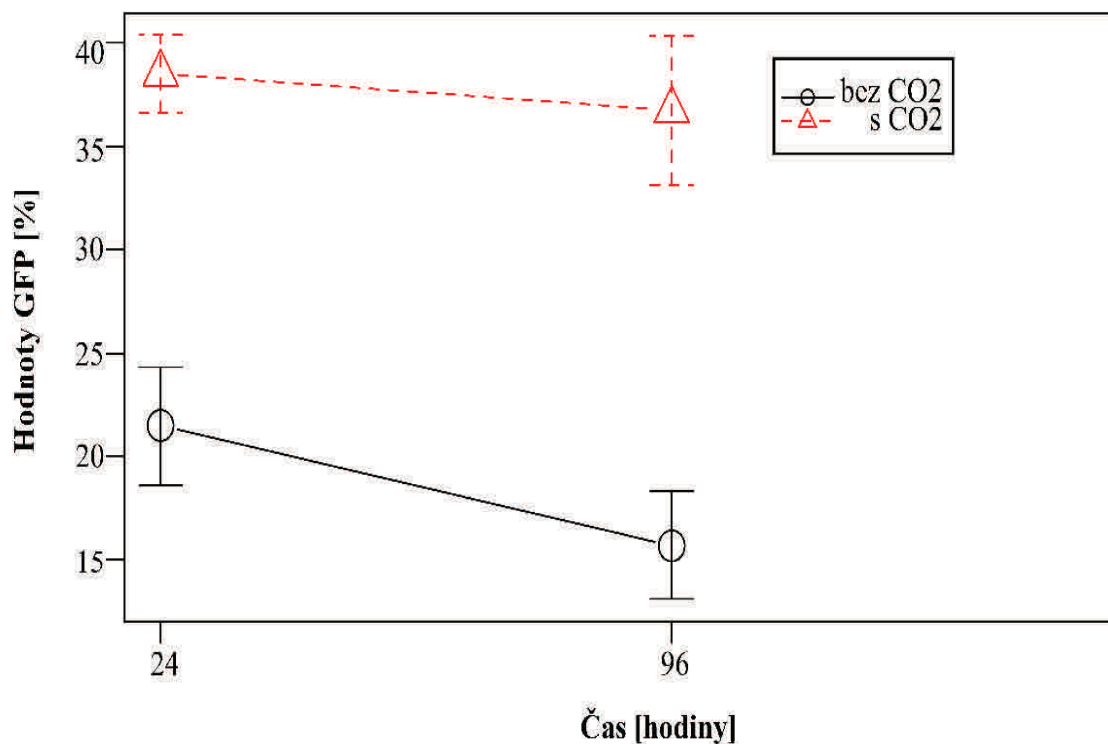
Graf 12: Viabilita buněk v produkčních láhvích umístěných do inkubátoru s CO_2 nebo bez CO_2 . Zvýšení viability buněk ze 4 hodin do 24 hodin po transfekci je pozorováno jak v přítomnosti CO_2 , tak bez CO_2 . V posledním dni kultivace, došlo k většímu poklesu křivky u buněk kultivovaných bez CO_2 , než u buněk kultivovaných s CO_2 . Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.3.3 GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách

Třetím sledovaným parametrem byla relativní četnost buněk pozitivních na GFP. Relativní četnost buněk měřena v testovacích nádobách v časech 24 a 96 hodin po uplynutí transfekce byla následující. Procentuální zastoupení pozitivních buněk na GFP bylo u desek s CO₂ 38 a 37%. Podobných hodnot GFP bylo dosaženo i u tub s CO₂ a to 36 a 35%. Naproti tomu u desek a tub bez CO₂ byly naměřeny nižší hodnoty GFP. Relativní četnost buněk pozitivních na GFP zaznamenaná u desek bez CO₂ byla pouze 13 a 10% a u tub bez CO₂ 30 a 21%.

Podle uvedených výsledků nabývaly vyšších hodnot pozitivních buněk na GFP v přítomnosti CO₂ než bez CO₂ (graf 13).

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenan signifikantní vliv inkubace s/bez CO₂ na relativní četnost buněk pozitivních na GFP ($p < 0,001$). Statisticky bylo potvrzeno vyšších hodnot GFP u buněk inkubovaných v přítomnosti CO₂ než bez přítomnosti CO₂.

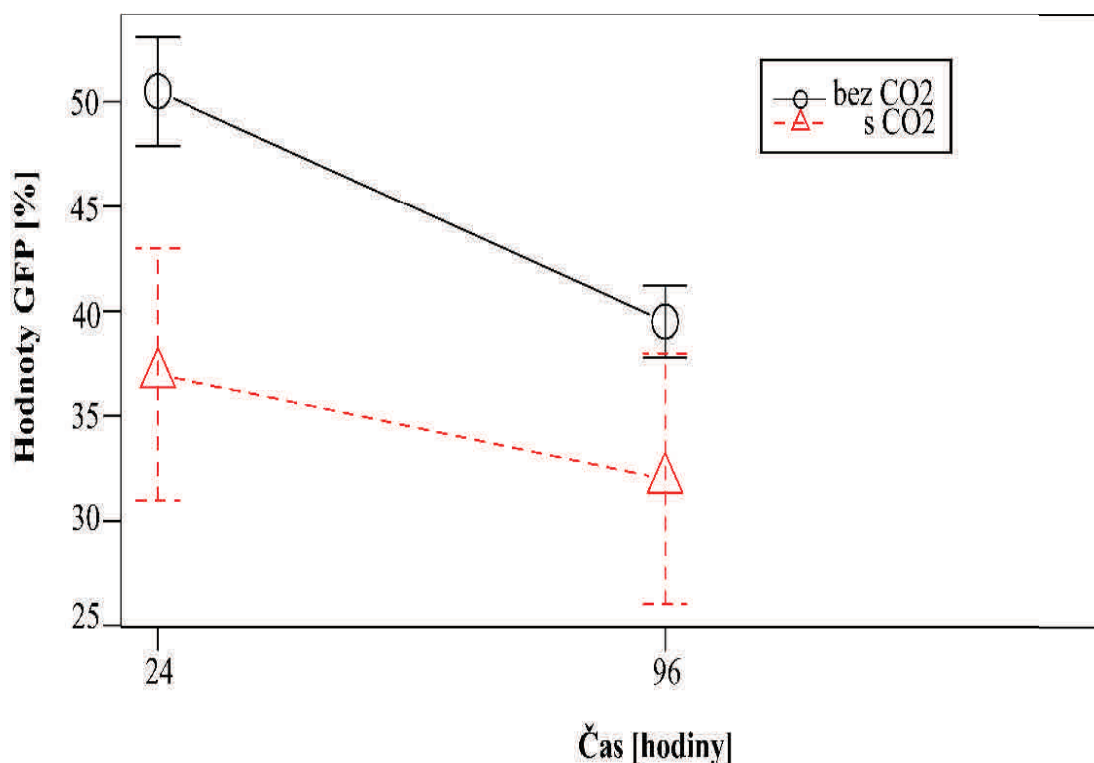


Graf 13: Relativní četnosti buněk pozitivních na GFP v testovaných nádobách 24 a 96 hodin po transfekci. Vyšších hodnot GFP bylo dosaženo u buněčné kultury umístěné do inkubátoru s CO₂ než bez CO₂ po celou dobu kultivace. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

Rozdíl v relativní četnosti buněk pozitivní na GFP mezi buněčnou kulturou vloženou do inkubátoru s CO₂ nebo bez CO₂ je viditelný u všech sledovaných nádob. V případě testovacích nádob je procentuální zastoupení pozitivních buněk na GFP nejvyšší v prostředí CO₂ (graf 13). Naopak je tomu u láhví, kde je GFP vyšší v prostředí bez CO₂ než s CO₂ (graf 14).

Kultivované buňky v produkčních láhvích nabývaly nejvyšších hodnot GFP v inkubátoru bez CO₂ a to 55 a 39%. U láhví kultivovaných v inkubátoru s CO₂ byly GFP hodnoty nižší než v inkubátoru bez CO₂ a to 37 a 32% (graf 14).

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv inkubace s/bez CO₂ na relativní četnost buněk pozitivních na GFP ($p < 0,05$). Statisticky bylo potvrzeno vyšších hodnot GFP u buněk inkubovaných v nepřítomnosti CO₂ než v přítomnosti CO₂.



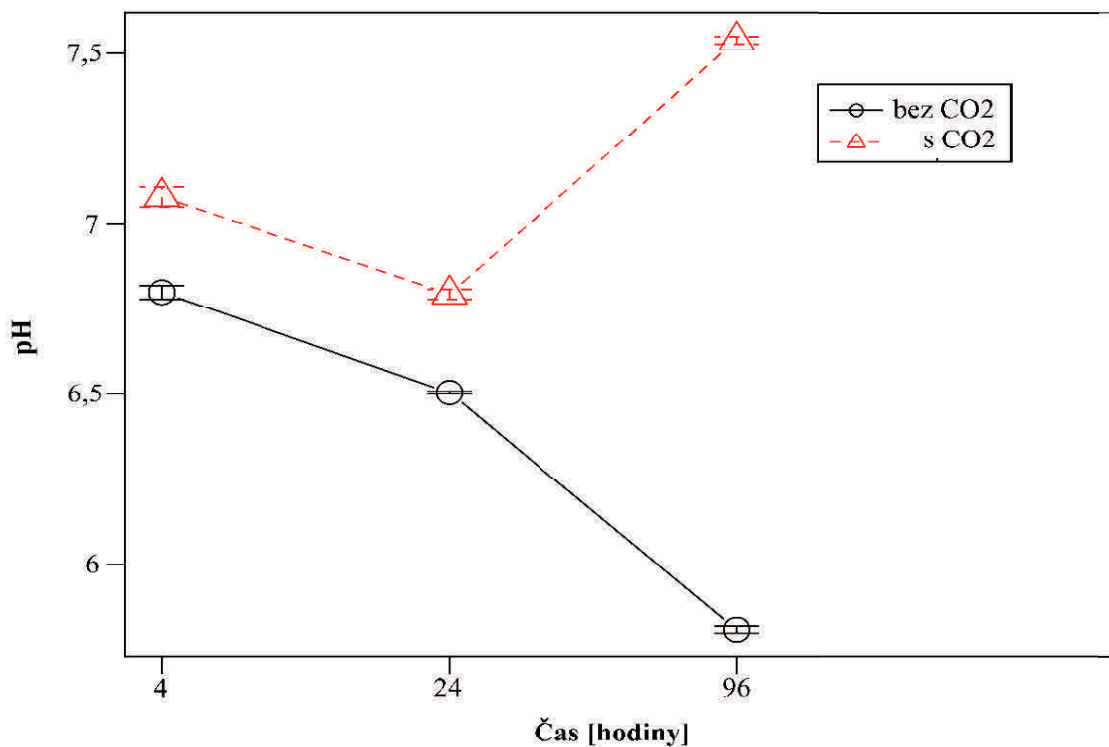
Graf 14: : Relativní četnosti buněk pozitivních na GFP ve výrobních láhvích 24 a 96 hodin po transfekci. Vyšších GFP hodnot bylo dosaženo u buněčné kultury umístěné do inkubátoru bez CO₂ než s CO₂ po celou dobu kultivace. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.3.4 Vliv CO₂ na hodnotu pH buněk v netransfekované buněčné kultuře

Výsledky naměřených pH hodnot v buněčné kultuře HEK 293 umístěné do inkubátoru s nebo bez CO₂ byly rozdílné. V případě kultivace buněk v přítomnosti CO₂ byly hodnoty pH po celou dobu kultivace téměř identické a to ve všech třech odebraných časech 4, 24, a 96 hodin. V těchto časech byly naměřeny tyto hodnoty pH: 7,1; 6,8; 7,5. Nižší hodnoty pH byly naměřeny v buněčné kultuře inkubované bez CO₂ než s CO₂ a to 6,8; 6,5; 5,8 (graf 15).

Podle uvedených výsledků hodnota pH neklesala u buněk kultivovaných v přítomnosti CO₂ po celou dobu kultivace oproti buňkám kultivovaných bez přítomnosti CO₂.

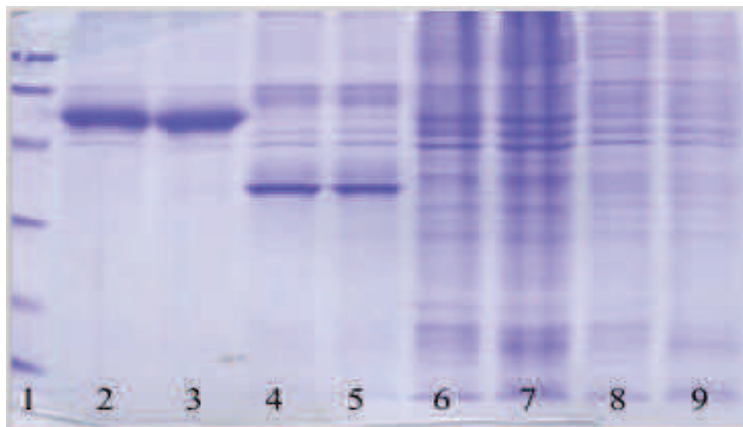
Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv inkubace CO₂ na hodnotu pH ($p < 0,001$). Statisticky byl potvrzen pokles pH hodnoty u buněk inkubovaných v nepřítomnosti CO₂.



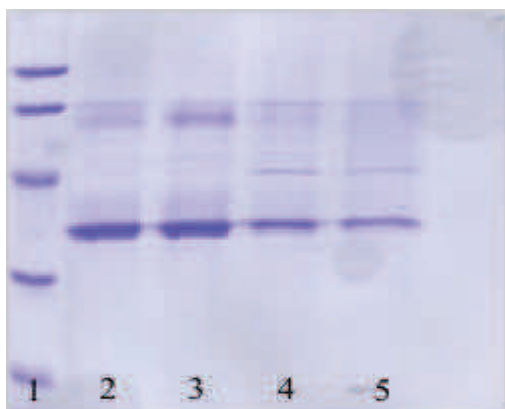
Graf 15: : Hodnota pH buněk HEK 293 v průběhu 4 denní kultivace. Výrazný pokles křivky pH u buněk kultivovaných bez přítomnosti CO₂ po celou dobu kultivace. Naopak výrazný vzestup křivky pH u buněk kultivovaných v přítomnosti pH 4 den kultivace. Data byla zprůměrována ze 2 měření.

4.3.5 Detekce r-proteinu

Sledovaným výsledkem detekce byl rozdíl mezi expresí r-proteinů kultivovaných v inkubátoru s CO₂ a bez CO₂. Byly detekovány 2 různé r-proteiny FetuinB a CTRP4. Očekávaná velikost Fetuinu B je 45 kDa a CTRP4 36 kDa. Detekované modré bandy na gelu byly srovnány se standartem a poté byly zhodnoceny jako odpovídající své velikosti. V případě kultivace buněk v prostředí s CO₂ v testovacích nádobách (desky, tuby) byly zaznamenány intenzivnější bandy než u kultivací bez CO₂ (Obrázek 12). Naproti tomu u buněčné kultury kultivované v láhvi byly detekovány intenzivnější bandy v nepřítomnosti CO₂ než s CO₂ (Obrázek 13).



Obrázek 12: Detekce FetuinuB a CTRP4 na 12% SDS-PAGE kultivovaných v prostředí s a bez CO₂ v testovací nádobě. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5), pozice 2-3: FetuinB s CO₂, pozice 4-5 CTRP4 s CO₂, pozice 6-7: FetuinB bez CO₂, pozice 8-9: CTRP4 bez CO₂. Na gelu jsou detekovány bandy u obou sledovaných proteinů kultivovaných v prostředí CO₂ v odpovídajících velikostech 45 a 36 kDa. Naopak u proteinů kultivovaných v prostředí bez CO₂ nejsou bandy detekovány.



Obrázek 13: Detekce CTRP4 na 12% SDS-PAGE kultivovaných v prostředí s a bez CO₂ ve výrobní láhvi. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5), pozice 2-3: CTRP4 bez CO₂, pozice 4-5 CTRP4 s CO₂. Na gelu jsou detekovány intenzivnější bandy v případě kultivace v prostředí CO₂ oproti kultivaci bez CO₂ v odpovídajících velikostech 36 kDa.

4.4 Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách

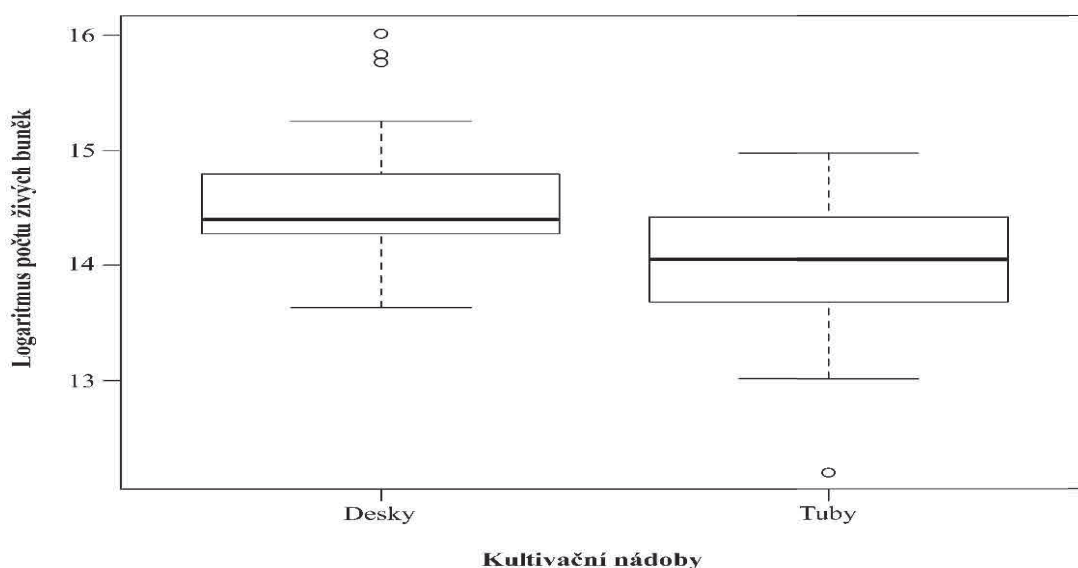
Z důvodu nevyhovujícího testování exprese r-proteinu v 50 ml centrifugačních tubách v naší laboratoři, byly tyto tuby srovnány s nově testovanými 12-jamkovými deskami. Jelikož stávající podmínka pro testování v tubách je inkubace v nepřítomnosti CO₂ a pro desky je v přítomnosti CO₂, byly srovnány proměnné (počty živých buněk, viability buněk a relativní četnost buněk pozitivních na GFP) mezi tubami kultivovanými v inkubátoru bez CO₂ a deskami kultivovanými v přítomnosti CO₂.

Expres r-proteinu v malém objemu by měla odpovídat laboratorní výrobě v láhvích. Z tohoto důvodu byla dalším sledovaným parametrem zvolena adekvátnost proměnných mezi nově testovanými 12-jamkovými deskami v přítomnosti CO₂ a výrobními láhvemi bez přítomnosti CO₂.

4.4.1 12-jamkové desky versus 50 ml centrifugační tuby

Mezi deskami a tubami byl zaznamenán zjevný rozdíl v počtu buněk. Největší rozdíl byl pozorován poslední den kultivace (96 hodin po transfekci), kdy se počet buněk v deskách oproti tubám zdvojnásobil. (graf 16). Naměřené hodnoty počtu živých buněk v deskách a tubách jsou blíže uvedeny v kapitole 3.41.

Podle znázorněného grafu 16 bylo většího počtu buněk dosaženo v deskách než v tubách. Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv kultivační nádoby na počet buněk ($p < 0,001$). Statisticky bylo potvrzeno většího počtu buněk kultivovaných v deskách než v tubách.

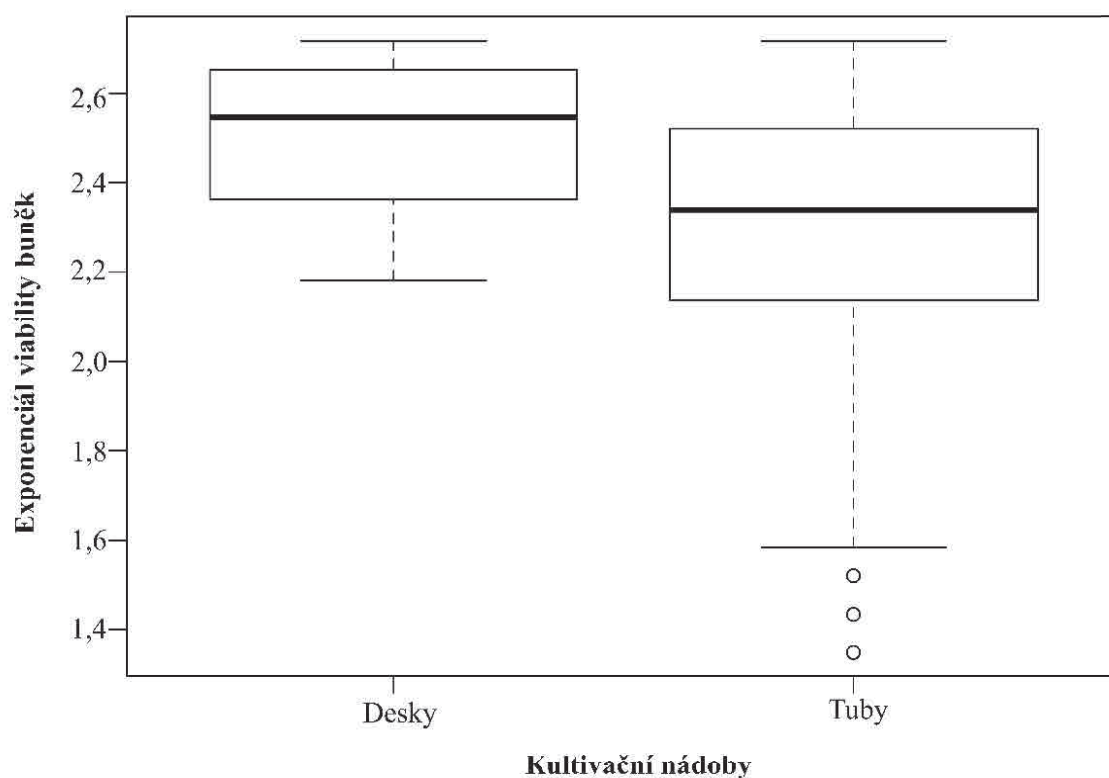


Graf 16: Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách během čtyřdenní kultivace. Vyššího počtu buněk bylo dosaženo u desek oproti tubám. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

U viability buněk byl zaregistrován její významný pokles poslední den kultivace, jako tomu bylo u počtu živých buněk. Viabilita buněk se v tubách snížila v průměru z $90\pm 6\%$ na $70\pm 9\%$. V deskách se viabilita buněk držela vysoko v průměru $95\pm 2\%$ po celou dobu kultivace (graf 17). Naměřené hodnoty viability buněk jsou blíže uvedeny v kapitole 3.4.2.

Podle znázorněného grafu 17 bylo vyšší viability buněk dosaženo v deskách než v tubách.

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv kultivační nádoby na viabilitu buněk ($p < 0,001$). Statisticky byla potvrzena vyšší viabilita buněk kultivovaných v deskách než v tubách.

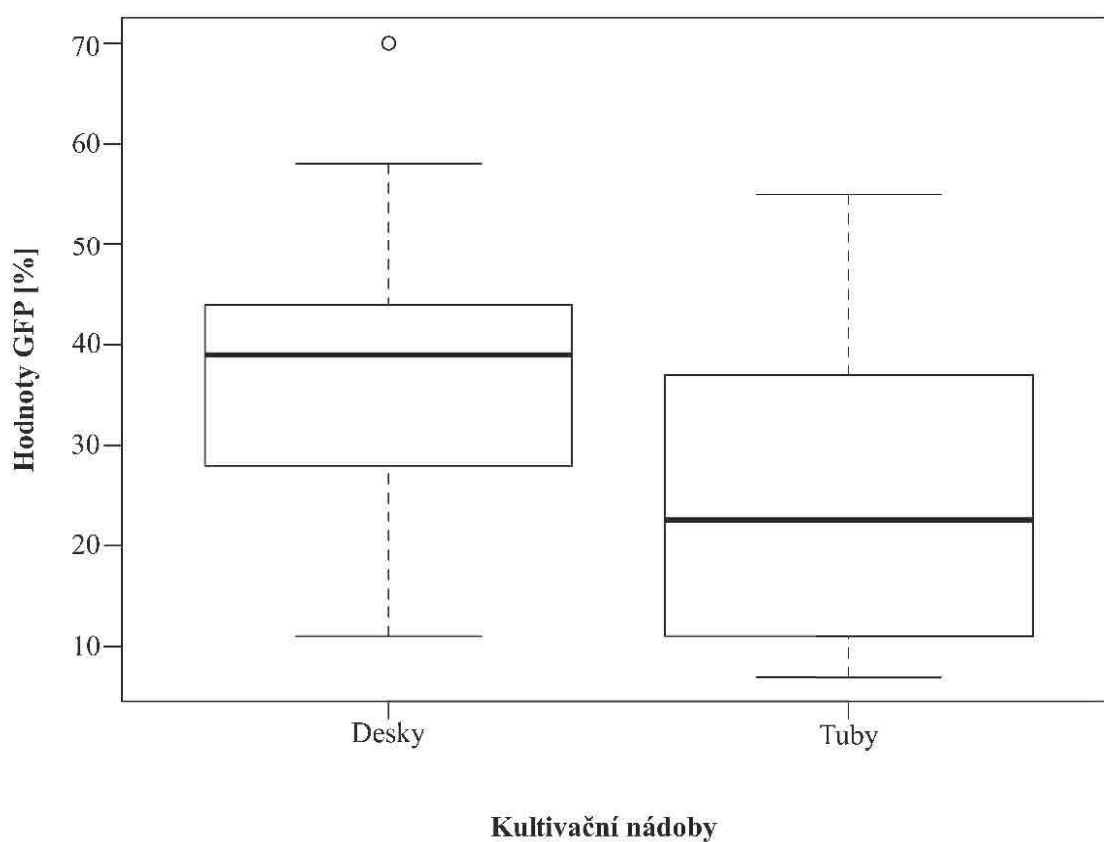


Graf 17: Viabilita v různých kultivačních nádobách během čtyřdenní kultivace. Vyšší viabilita byla dosažena v deskách oproti tubám. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

Relativní četnost buněk pozitivních na GFP dosahovala nejvyšších hodnot u desek jak 24 hodin, tak 96 hodin po transfekci. Hodnoty GFP u buněk kultivovaných v deskách byly v průměru $38 \pm 1\%$, kdy relativní četnost GFP sledována u buněk kultivovaných v tubách dosahovala hodnot $24 \pm 5\%$ v průměru (*graf 18*).

Podle znázorněného grafu 18 bylo dosaženo vyšších hodnot GFP svítících buněk v deskách než v tubách.

Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv kultivační nádoby na četnost buněk pozitivních na GFP ($p < 0,01$). Statisticky bylo potvrzeno dosažení vyšších hodnot GFP svítících buněk kultivovaných v deskách než v tubách.

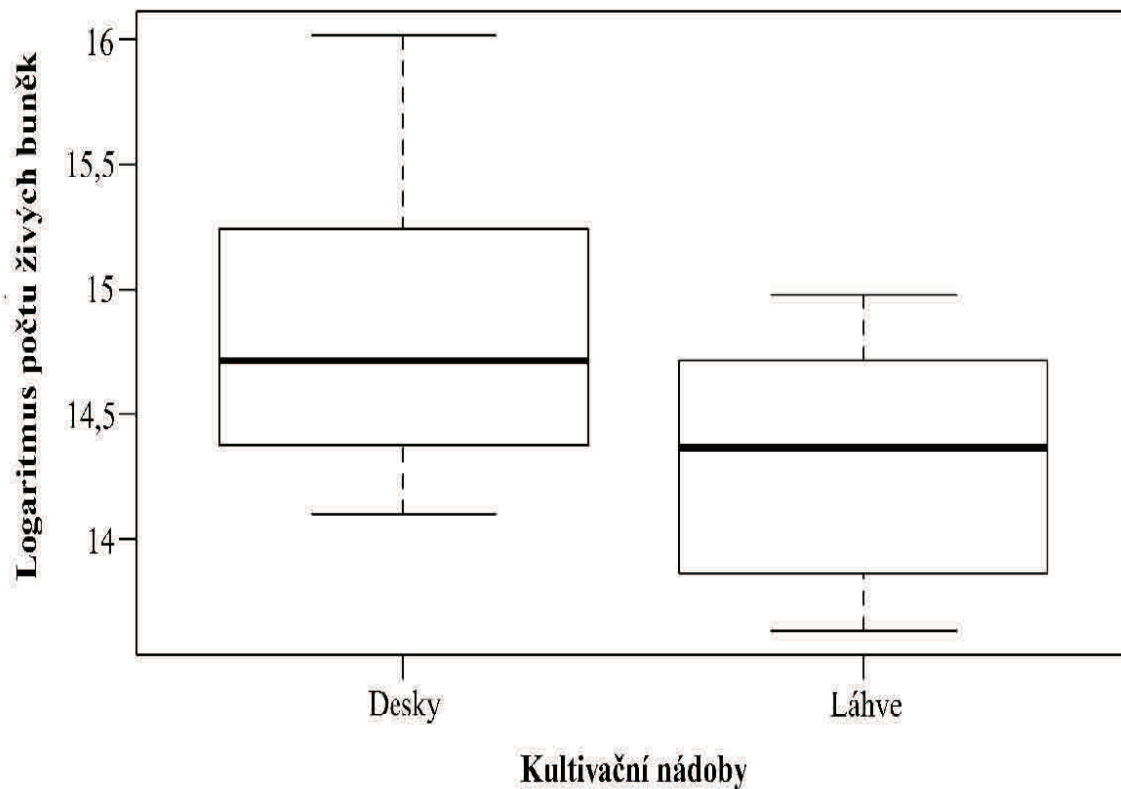


Graf 18: Relativní četnost buněk pozitivních na GFP v různých kultivačních nádobách 24 a 96 hodin po transfekci. Vyšších hodnot GFP bylo dosaženo u buněk kultivovaných v deskách oproti tubám. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

4.4.2 12-jamkové desky versus produkční láhve

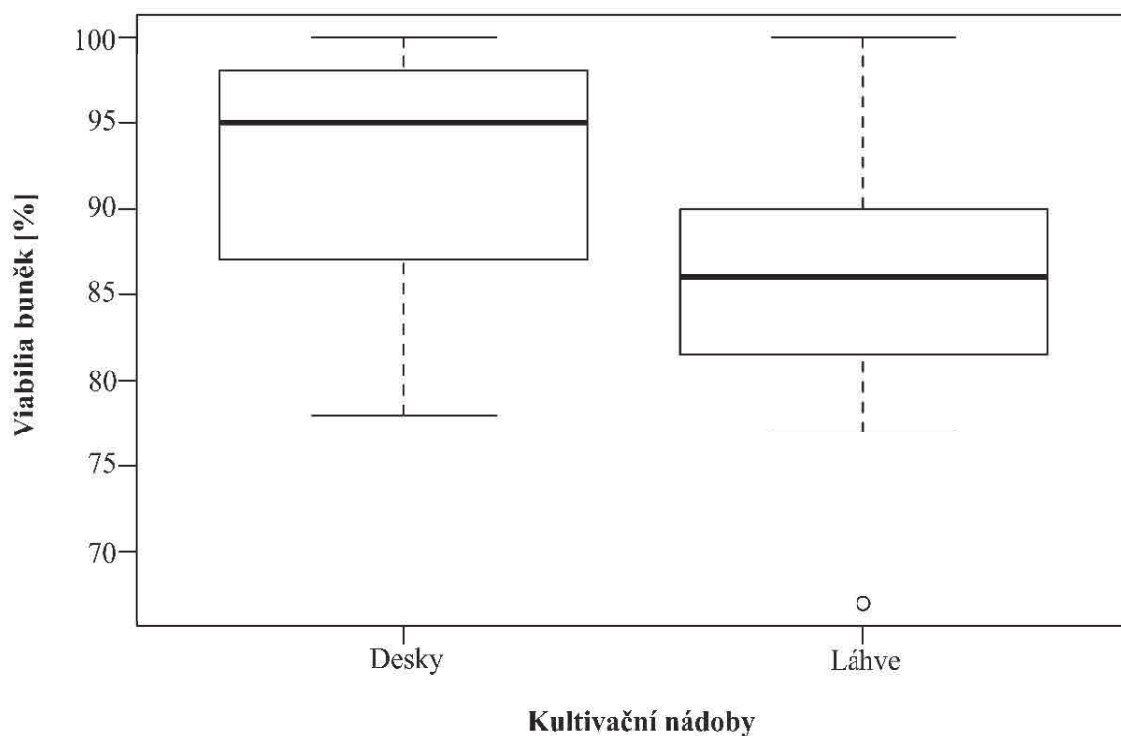
Počet živých buněk byl v průběhu čtyř denní kultivace téměř neměnný a to v obou kultivačních nádobách. Pouze v době 24 hodin po transfekci byl zaznamenán 2,5 krát vyšší počet buněk u desek než u buněk kultivovaných v láhvi (graf 19). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v kapitole 4.3.1.

Podle znázorněného grafu 19, bylo většího počtu buněk dosaženo v deskách než v láhvích. Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv kultivační nádoby na počet buněk ($p < 0,05$). Statisticky bylo potvrzeno dosažení většího počtu buněk kultivovaných v deskách než v láhvích.



Graf 19: Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách během čtyř denní kultivace. Celkově bylo vyššího počtu buněk dosaženo u buněk kultivovaných v deskám oproti láhvím. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

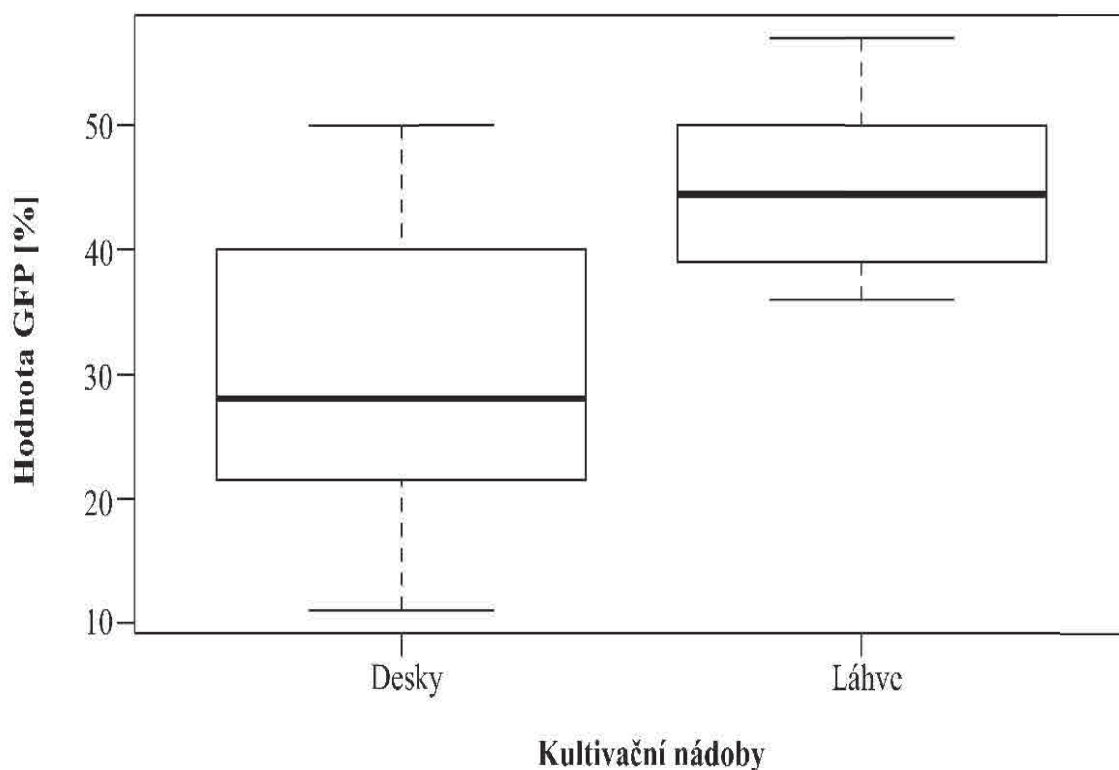
Viability buněk kultivovaných v deskách a láhvích dosahovaly přibližně stejně vysokých hodnot po celou dobu kultivace. V době 96 hodin po transfekci byla viabilita vyšší o 8% u desek než u láhví (*graf 20*). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v kapitole 4.3.2. Podle znázorněného grafu 20 bylo vyšších viabilit buněk dosaženo v deskách než v láhvích. Statisticky nebyl prokázán signifikantní vliv kultivační nádoby na viabilitu buněk.



Graf 20: Viabilita buněk v různých kultivačních nádobách během čtyř denní kultivace. Celkově vyšší viability buněk bylo dosaženo u kultivací v deskách oproti láhvím. Data byla zprůměrována ze 3 měření.

Relativní četnost pozitivních buněk na GFP byla vyšší o 20% u buněk kultivovaných v láhvi než v deskách (*graf 21*). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v kapitole 4.3.3.

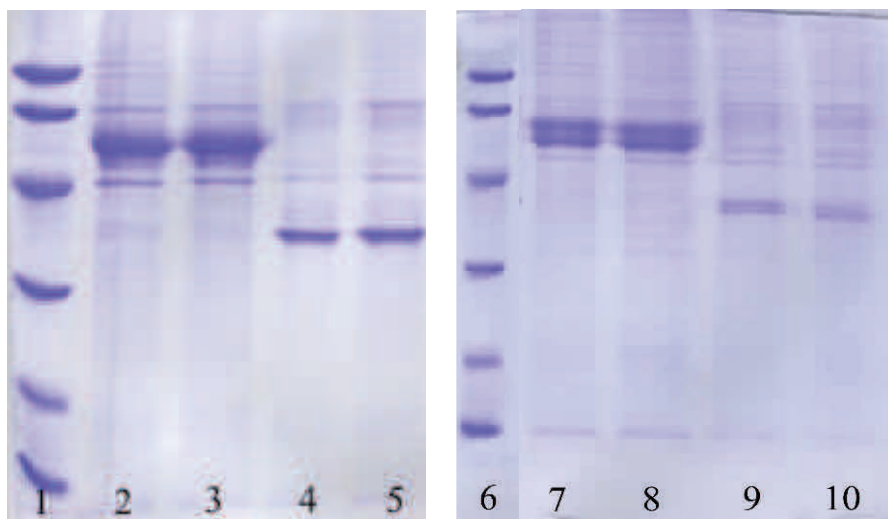
Podle znázorněného grafu 21 bylo dosaženo vyšších hodnot GFP v láhvích než v deskách. Dle analýzy rozptylu byl zaznamenán signifikantní vliv kultivační nádoby na četnost buněk pozitivních na GFP ($p < 0,01$). Statisticky bylo potvrzen vyšší hodnot GFP svítících buněk kultivovaných v láhvích než v deskách.



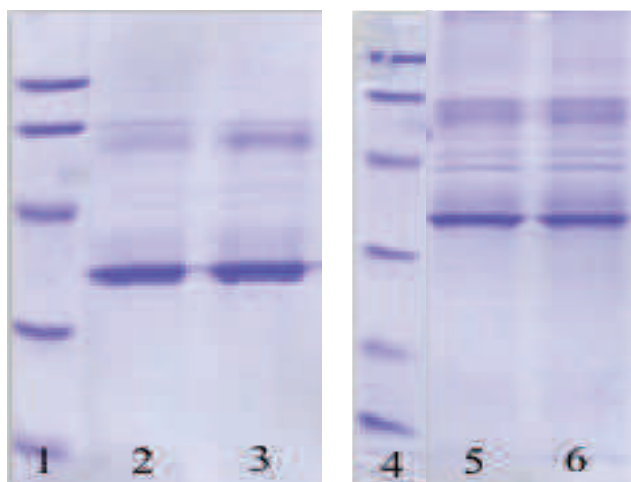
Graf 21: Relativní četnost buněk pozitivních na GFP v různých kultivačních nádobách 24 hodin a 96 hodin po transfekci. Celkově vyšší hodnoty GFP bylo dosaženo u kultivací buněk v láhvi oproti deskám. Data byla zprůměrována ze 3 měření

4.4.3 Detekce r-proteinu

Sledovaným výsledkem detekce byl rozdíl mezi expresí r-proteinů kultivovaných v různých kultivačních nádobách. Byly detekovány 2 různé r-proteiny FetuinB a CTRP4. Očekávaná velikost Fetuinu B je 45 kDa a CTRP4 36 kDa. Rozdíly v intenzitě bandů u testovacích nádob (desky, tuby) byly viditelné. V případě buněčné kultivace v deskách byly bandy intenzivnější než u tub (Obrázek 14). Rozdíly v intenzitě bandů mezi deskami a láhvemi byly minimální. V případě buněčné kultivace v láhvích byly bandy o něco intenzivnější než u láhví (Obrázek 15). Detekované modré bandy na gelu byly srovnány se standartem a poté byly zhodnoceny jako odpovídající své velikosti.



Obrázek 14: Detekce FetuinuB a CTRP4 na 12% SDS-PAGE kultivovaných v deskách a tubách. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 2-3: FetuinB v desce, pozice 4-5 CTRP4 v desce, pozice 6: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 7-8: FetuinB v tubě, pozice 9-10: CTRP4 v tubě. Na gelu jsou detekovány silnější bandy v případě kultivace buněk v deskách než v tubách, jak u FetuinuB tak u CTRP4 v odpovídajících velikostech 45 a 36 kDa.



Obrázek 15: Detekce CTRP4 na 12% SDS-PAGE kultivovaných v deskách a láhvích. Klad vzorků, kdy pozice 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 2-3: CTRP4 v láhvi, pozice 4: 1: standart (velikost v kDa směrem shora dolů: 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4), pozice 5-6: CTRP4 v desce. Na gelu jsou detekovány podobně silné bandy u obou nádob (desky i láhve), jak u FetuinuB tak u CTRP4 v odpovídajících velikostech 45 a 36 kDa.

5. DISKUZE

5.1 Stanovení optimální rychlosti třepání buněčné kultury v deskách

Pro stanovení optimální rychlosti třepání buněčné kultury v deskách, byly porovnávány dvě rychlosti třepání 230 a 270 rpm v různých transfekčních a produkčních objemech. Byly sledovány čtyři měřené proměnné - počet živých buněk, viabilita, relativní četnost buněk pozitivních na GFP, síla exprese r-proteinu na gelu.

Vyšší počet buněk a vyšší hodnoty GFP při 230 rpm než při 270 rpm mohlo být důsledkem efektivnějšího proniknutí komplexu DNA:PEI do buňky, právě díky pomalejším otáčkám. Pozitivní vliv mohlo mít také docílení menšího střížného napětí mezi buňkami při nižší rychlosti třepání. Díky nižšímu střížnému napětí tak mohlo docházet k menšímu mechanickému poškození buněk. Předpokládám, že pravděpodobně došlo k odlišnému poškození buněk i přesto, že moje výsledky ukazují stejně vysokou viabilitu buněk při obou sledovaných rychlostech třepání. Vliv odlišného mechanického stresu na buňky se v mém pokusu projevil patrně jen na míru penetrace komplexu DNA:PEI do buňky (a tedy na statisticky významném rozdílu v hodnotách GFP). Obdobně, Natalie Müller [3] ve svém experimentu s kultivací ve čtyřhranných láhvích zjistila pokles viability buněk doprovázený tvořením pěny na hladině při zvýšení rychlosti třepání buněčné kultury.

5.2 Stanovení optimálního objemu buněčné kultury v deskách

Za účelem stanovení optimálního objemu buněčné kultury v deskách byly porovnány dva produkční objem (1 a 2 ml) a čtyři transfekční objemy (0,4; 0,5; 0,6; a 0,7) a sledovány čtyři proměnné (počet živých buněk, viabilita, relativní četnost buněk pozitivních na GFP, detekce r-proteinu na gelu).

5.2.1 Produkční objemy

Počet buněk, viabilita ani relativní četnost buněk pozitivních na GFP není pravděpodobně ohrožena změnou produkčního objemu. Což může vést k závěru, že pokud nemá produkční objem vliv na expresi r-proteinů, je možné objem v případě potřeby změnit, dle aktuálních kultivačních požadavků, aniž by byla snížena produkce r-proteinu. V případě experimentu Natalie Müller nebyl také pozorován rozdíl v expresi r-proteinu mezi produkčními objemy 1 a 2 ml [3].

Vzhledem k tomu, že pro detekci r-proteinu na polyakrylamidovém gelu je potřeba 1 ml supernatantu, byl vybrán optimální produkční objem 2 ml, který nabízí i případnou rezervu pro opakování detekce r-proteinu.

5.2.2 Transfekční objemy

Vzhledem ke stejně vysokým hodnotám GFP pozitivních buněk dosažených ve třech transfekčních objemech (0,5; 0,6 a 0,7 ml) oproti nižší hodnotě GFP dosažené v objemu 0,4 ml se dá předpokládat, že 0,5 ml se tak může stát hraničním transfekčním objemem (minimálním vhodným transfekčním objemem).

Pro expresi r-proteinu v malém objemu; byl vybrán optimální transfekční objem 0,5 ml, který je dostačující pro kultivaci transientní transfekce v deskách.

5.3 Vliv inkubace s/bez CO₂ na růst, viabilitu a GFP pozitivní buňky v různých kultivačních nádobách

Byl pozorován vliv CO₂ a pH buněčné kultury na kultivaci buněk v testovacích nádobách (desky, tuby) a produkčních nádobách (láhve). Bylo zjištěno, že CO₂ má vliv na všechny sledované parametry (počet živých buněk, viabilita, relativní četnost buněk pozitivní na GFP, detekce r-proteinu na gelu).

5.3.1 Počet živých buněk v různých kultivačních nádobách

Očekávala jsem, že vhodnější podmínky by mohly být při kultivaci buněk v přítomnosti CO₂, které pomáhá udržovat optimální pH buněčné kultury. Toto může být vysvětlením, proč se lépe dařilo množit buňkám v prostředí CO₂ kultivovaných v testovacích nádobách (desky, tuby). Ovšem tato úvaha nevysvětluje dosažení vyššího počtu buněk kultivovaných v láhvích bez přítomnosti CO₂. Je možné, že na počet buněk v prostředí s a bez CO₂ má vliv také tvar a velikost nádoby, výška hladiny suspenze v nádobě a poměr objemu buněčné suspenze a volného prostoru nad ním uvnitř láhve. Jedním z možných vysvětlení může být, že obsah volného prostoru nad hladinou v láhvi si buňky „zadýchají“ a tedy upraví množství CO₂ tak, že dodatečná inkubace buněčné kultury v prostředí CO₂ již nevede ke zlepšení sledovaných parametrů buněčné kultury.

5.3.2 Viabilita buněk v různých kultivačních nádobách

Jako u počtu buněk, i zvýšená viabilita byla předpokládána u kultivací v přítomnosti CO₂ oproti kultivacím bez CO₂. To se potvrdilo u kultivací buněk v testovacích nádobách (desky, tuby), ale kultivace v láhvích tento předpoklad opět nepotvrdily. To opět potvrzuje domněnku, že na samotnou regulaci pH kultury má vliv kromě CO₂ také kultivační nádoba.

5.3.3 Relativní četnost buněk pozitivních na GFP v různých kultivačních nádobách

Zvýšené hodnoty GFP u buněčné kultury inkubované v testovacích nádobách v prostředí CO₂ oproti kultivacím bez CO₂ mohou potvrzovat předpoklad, že vhodnější podmínky kultivace buněk jsou v přítomnosti CO₂, díky schopnosti udržovat optimální pH hodnoty. V rozporu s tím, jsou ale výsledky hodnot GFP naměřených u kultivací buněk v láhvích. Zde byla relativní četnost buněk pozitivních na GFP statisticky významně vyšší u kultivací bez přítomnosti CO₂. To může opět znamenat, že na samotnou regulaci pH má vliv kromě CO₂ také kultivační nádoba.

Výsledky uvedené v práci Natalie Müller jsou obdobné. Ve své práci se také věnovala srovnání inkubací buněk ve čtyřhranné láhvi v přítomnosti CO₂ a bez CO₂. Jejím závěrem bylo, že o něco silnější exprese r-proteinu bylo dosaženo v kultuře inkubované bez přítomnosti CO₂ [3].

5.3.4 Vliv CO₂ na hodnotu pH buněk v netransfekované buněčné kultuře

Předpokládala jsem, že optimálních pH hodnot (blízkých 7,2 – 7,4) bude naměřeno u buněk kultivovaných v přítomnosti CO₂, jelikož byl zjištěn pozitivní vliv inkubace buněk v deskách v prostředí CO₂ na počty buněk, viabilitu a množství GFP pozitivních buněk. Jedním z důvodů, proč byl zaznamenán prudký pokles pH u buněk kultivovaných 4. den bez CO₂, souvisel pravděpodobně se zvýšenou mortalitou v kultuře. Porušení kompartmentace buněk a vylití jejich obsahu do média mohlo vést k narušení osmotické rovnováhy a následnému poklesu pH v médiu. Tento fenomén je potřeba ještě dále otestovat.

5.4 Srovnání produkce r-proteinu v různých kultivačních nádobách

Testování exprese r-proteinu v malém objemu využívající 50 ml centrifugační tuby bylo nevyhovující, a proto bylo nahrazeno 12-jamkovými kultivačními deskami. Jednotlivé proměnné (počty buněk, viabilita, relativní četnost buněk pozitivních na GFP, exprese r-proteinů detekovaná na polyakrylamidovém gelu) byly srovnány mezi stávajícími tubami a nově testovanými deskami. Jelikož bylo dosavadní testování v tubách prováděno bez přítomnosti CO₂, byly při těchto podmínkách tuby srovnávány s deskami kultivovanými v prostředí CO₂.

Podobně tomu bylo i u produkce r-proteinu ve výrobních čtyřhranných láhvích. Kultivace buněk v láhvích probíhá standardně bez přítomnosti CO₂. Naopak u testování exprese r-proteinu v malém objemu je kultivace rutinně prováděna v přítomnosti CO₂. Pro správné provedení experimentu bylo tedy testování v malém objemu v deskách porovnáno s expresí r-proteinu v láhvích vždy ve shodných podmínkách CO₂ - kultivace v testovacích nádobách byly porovnány s kultivacemi v láhvích, samostatně pro prostředí s CO₂ a bez CO₂.

5.4.1 12-jamkové desky versus 50 ml centrifugační tuby

Příčinou rozdílné intenzity exprese r-proteinů detekované na gelu ze vzorků kultivovaných v tubách oproti vzorkům kultivovaným v deskách může být rozdíl v relativní četnosti GFP buněk z kultivací v deskách a tubách. Rozdíl 14% hodnoty GFP naměřené ve vzorcích kultivovaných v deskách oproti kulturám z tub není vysoký. Ale i tak byla intenzita bandů r-proteinu z kultur kultivovaných v tubách slabší než u buněk kultivovaných v deskách.

Vzhledem k naměřeným výsledkům byly 12-jamkové desky vybrány jako náhrada za 50 ml centrifugační tuby. Dalším důvodem volby desek pro testování exprese r-proteinu v malém objemu bylo pro manipulaci výhodnější uspořádání desky, kdy v rámci jedné desky je možné otestovat 6 proteinů v duplikátu. V neposlední řadě je třeba u desek zmínit snadnější manipulaci (jedno společné víčko pro 6 jamek bez nutnosti šroubování, plochý nízký tvar desky minimalizuje riziko převrnutí), nižší spotřebu plazmidu a aditiv nezbytných pro transfekci. Navíc jsou desky také vhodnějšími kultivačními nádobami pro aktuálně

5.4.2 12-jamkové desky versus produkční láhve

Rozdíl v počtu buněk nejspíše neměl zásadní vliv na expresi r-proteinu, jelikož byly detekovány srovnatelné intenzity bandů jak u kultury kultivované v deskách, tak u kultury z láhví. O něco silnější intenzita bandů z kultivací buněk v láhvích odpovídala naměřeným hodnotám GFP, které byly vyšší než u kultivací v deskách. Stejně hodnoty viabilit buněk naměřen jak u kultur inkubovaných v deskách tak u kultur z láhví by mohly znamenat, že parametry kultivací v deskách a láhvích jsou podobné.

Můžeme tedy předpokládat, že exprese r-proteinu v malém objemu ve 12-jamkových deskách může simulovat expresi ve výrobní čtyřhranné láhvi.

6. ZÁVĚR

Savčí buněčné linie patří k úspěšně využívaným liniím pro expresi r-proteinu vůbec. Mezi nejpopulárnější linie patří HEK 293. Spojením transientní transfekce umožňující rychlou expresi r-proteinu se savčí buněčnou linií HEK 293 je možné produkovat rekombinantní proteiny v žádané kvalitě a množství. Výroba r-proteinů prostřednictvím transientní transfekce v savčích expresních systémech se tak stala jednou z oblíbených biotechnologických operací.

Efektivnost exprese takto vyrobených r-proteinu je ovlivněna hned několika parametry. Ty se tak často stávají hledanými cíli v mnoha biotechnologických laboratořích. Laboratorní výrobě r-proteinu ve velkém objemu tradičně předchází jeho testování v objemu malém. Jelikož bylo testování exprese r-proteinu v malém objemu pomocí 50 ml centrifugačních tub nevyhovující, úkolem této práce bylo optimalizovat podmínky pro expresi r-proteinu ve 12-jamkových deskách. Mezi hledané cíle optimalizace patřila rychlost třepání a vhodné produkční a transfekční objemy. Na základě měření byla stanovena optimální rychlost třepání buněčné kultury na 230 rpm. Vhodný produkční objem byl určen na 2 ml s transfekčním objemem 0,5 ml. Aby byla náhrada tub za nově testované desky možná, bylo potřeba výsledná data mezi sebou porovnat a statisticky vyhodnotit. Závěrem měření bylo, že dochází k silnější expresi r-proteinu v deskách oproti tubám.

Oblíbenou nádobou pro produkci r-proteinu v laboratorních podmínkách jsou čtyřhranné láhve. Z tohoto důvodu bylo provedeno srovnání exprese r-proteinu také s těmito lahvemi. Bylo prokázáno, že síla exprese v deskách lépe odpovídá konečné výrobě v láhvích. To znamená, že na základě výsledků exprese r-proteinů v testovaných deskách lze očekávat podobnou expresi ve výrobních láhvích.

Stávající výroba r-proteinů v láhvích probíhá bez přítomnosti CO₂ a testování exprese r-proteinů je prováděno naopak v prostředí CO₂. Proto další sledovaný parametr byl vliv CO₂ na produkci r-proteinu. Na základě získaných dat byl pozorován a také statisticky potvrzen vliv CO₂ na jednotlivé proměnné (počet živých buněk, jejich viabilita a relativní četnost buněk pozitivních na GFP) ve všech kultivačních nádobách (desky, tuby, láhve). V případě kultivace buněk v testovacích nádobách (desky, tuby) bylo dosaženo nejsilnější exprese r-proteinu v prostředí CO₂. Naopak tomu bylo u exprese r-proteinu ve výrobní láhvi. Vzhledem k významnému vlivu CO₂ na kultivaci buněk bylo změřeno pH buněčné kultury při kultivaci v prostředí s a bez CO₂.

Závěrem lze říci, že za uvedených optimalizovaných podmínek (rychlosti třepání, produkční a transfekční objemy), lze nahradit doposud používané 50 ml centrifugační tuby za 12-jamkové desky, avšak pouze v přítomnosti CO₂. Expese r-proteinu v kulturách inkubovaných ve 12-jamkových deskách v prostředí CO₂ je srovnatelná s produkcí ve čtyřhranných lahvích v prostředí bez CO₂ a tuto velkoobjemovou produkci simuluje lépe než kultivace v 50 ml tubách.

7. LITERATURA

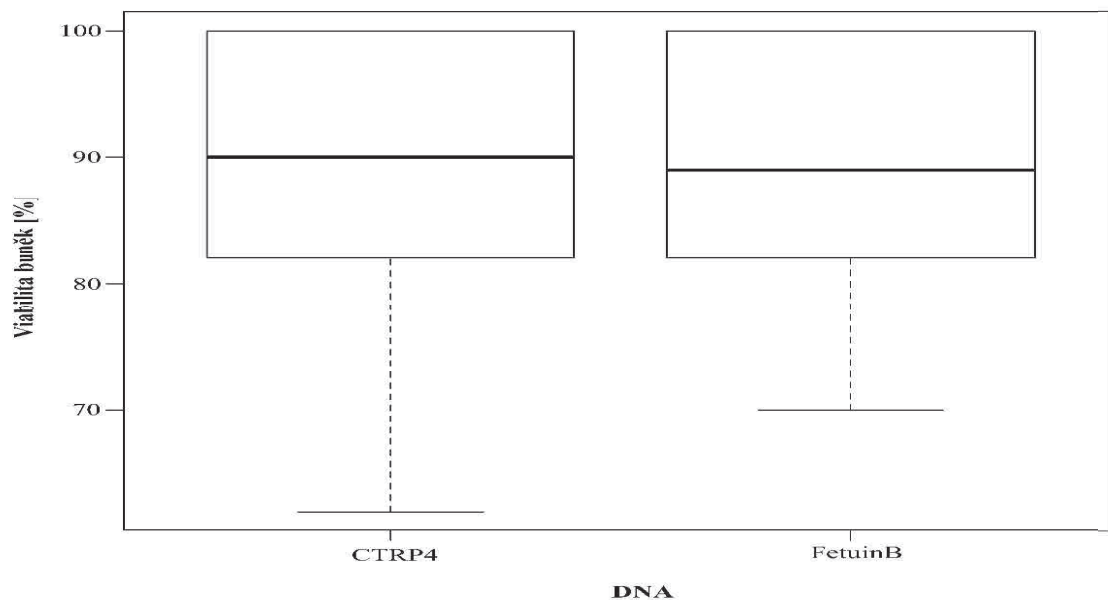
- [1] WHITE JUNOD, Suzanne. Celebrating a Milestone: FDA's Approval of First Genetically-Engineered Product. Food and Drug Law Institute: History Corner. 2007.
- [2] WURM, Florian M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2004, **22**(11), 1393-1398. DOI: 10.1038/nb24026. ISSN 1087-0156.
- [3] MULLER, Natalie. TRANSIENT GENE EXPRESSION FOR RAPID PROTEIN PRODUCTION: STUDIES & OPTIMIZATIONS UNDER SERUM-FREE CONDITIONS. Lausanne, 2005. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne. Vedoucí práce Prof. F. Wurm.
- [4] FUSEK, Martin. Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe. 1. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3727-0.
- [5] SETHURAMAN, Natarajan a Terrance A STADHEIM. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006, **17**(4), 341-346. DOI: 10.1016/j.copbio.2006.06.010. ISSN 09581669
- [6] THOMAS, Philip a Trevor G. SMART. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005, **51**(3), 187-200. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.08.014. ISSN 10568719
- [7] SHAW, G. a Trevor G. SMART. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *The FASEB Journal*. 2005, **51**(3), -. DOI: 10.1096/fj.01-0995fje. ISSN 08926638.
- [8] LEE, ChiChang, et al. Chemically defined medium for cultured mammalian cells. U.S. Patent No 6,900,056, 2005.
- [9] ROSENFELD, Louis. Insulin: discovery and controversy. *Clinical chemistry*, 2002, **48**.12: 2270-2288.
- [10] BALDI, Lucia, David L. HACKER, Myriam ADAM a Florian M. WURM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters* [online]. 2007-3-27, **29**(5), 677-684 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1007/s10529-006-9297-y. ISSN 0141-5492.
- [11] JoVE Science Education Database. *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology*. An Introduction to Transfection. JoVE, Cambridge, MA, doi: 10.3791/5068 (2016)
- [12] WURM, F a A BERNARD. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1999,

- 10(2), 156-159 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)80027-5. ISSN 09581669.
- [13] JÄGER, Michael, Stephanie SCHUBERT, Sofia OCHRIMENKO, Dagmar FISCHER a Ulrich S. SCHUBERT. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chemical Society Reviews* [online]. 2012, **41**(13), 4755- [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1039/c2cs35146c. ISSN 0306-0012
- [14] DUROCHER, Yves; PERRET, Sylvie; KAMEN, Amine. 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-e9.
- [15] MONTEIL, Dominique T., Giulia TONTODONATI, Saroj GHIMIRE, Lucia BALDI, David L. HACKER, Cédric A. BÜRKI a Florian M. WURM. Disposable 600-mL orbitally shaken bioreactor for mammalian cell cultivation in suspension. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2013, **76**, 6-12 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/j.bej.2013.04.008. ISSN 1369703x
- [16] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [17] KIMURA, Roy, et al. Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. In: *Cell Culture Engineering VI*. Springer Netherlands, 1998. p. 213-227.
- [18] VAJRALA, Sucheta Gowthami. Mechanism of CO₂ inhibition in insect cell culture. 2010. PhD Thesis. The University of Iowa.
- [19] RŮČKOVÁ, Mgr Eva; MÜLLER, Petr; VOJTĚŠEK, Bořivoj. Expres a purifikace proteinů. *Klinická onkologie*, 2014, **27.3**.
- [20] Protein Preparation: Ni-NTA Agarose. Qiagen [online]. 2015 [cit. 2016-04-30]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/shop/sample-technologies/protein/protein-preparation/ni-nta-agarose>
- [21] Základy práce v prostředí R: R statistika. Univerzita Palackého v Olomouci: Analýzy dat [online]. 2016 [cit. 2016-04-30]. Dostupné z: <http://ekologie.upol.cz/assets/uploads/ekolos/dokumenty/Analýzadat>

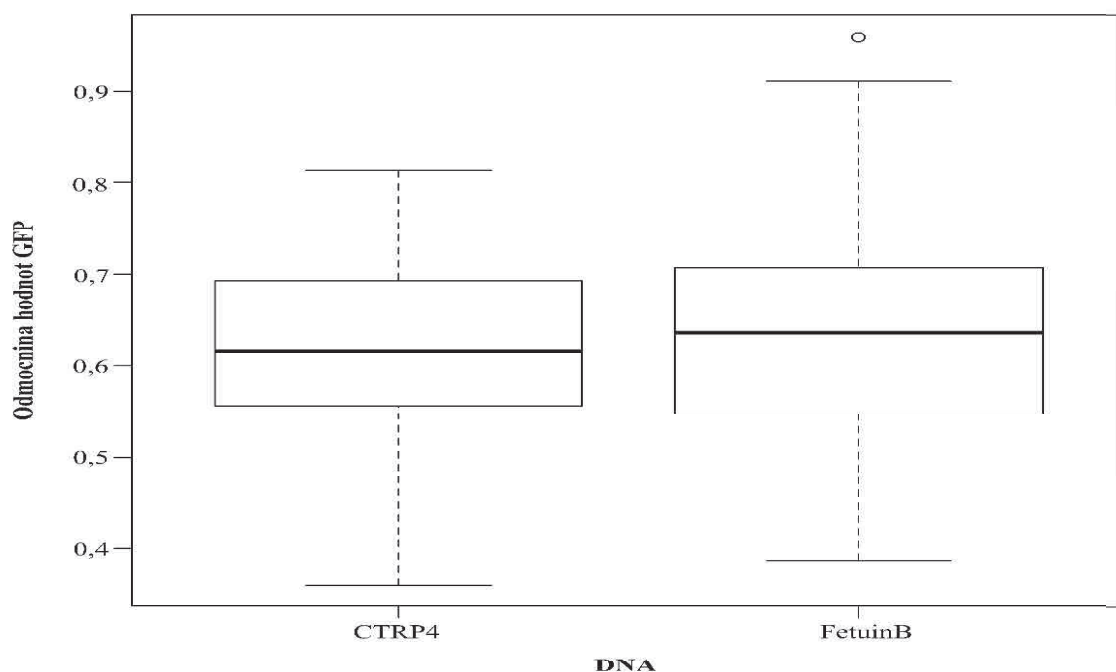
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

desky	12-jamkové kultivační desky
tuby	50 ml centrifugační tuby
láhve	čtyřhranné výrobní láhve o objemu 1 litru
r-protein	rekombinantní protein
HEK 293	lidské embryonální ledvinové buňky (Human embryonic kidney cells)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , gram negativní bakterie
PEI	polyethylenimin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GFP	živočišný rekombinantní protein zeleně fluoreskující (Green fluorescent protein)
CTRP4	lidský rekombinantní protein C1q/TNF-related protein 4, modulátor příjmu potravy a tělesné hmotnosti v hypothalamu
FetuinB	idský rekombinantní protein kódovaný genem FETUB. Negativní protein akutní fáze.
CDM4HEK293	speciální medium zvyšující výtěžek rekombinantních proteinů
FreeStyle	speciální medium podporující růst a transfekci buněk
CO ₂	oxid uhličitý
Hg stupnice	rtuťová stupnice v milimetrových jednotkách
H ₂ CO ₃	kyselina uhličitá
HEPES	4-(2-Hydroxyetyl)piperazin-1-ehansulfonová kyselina
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
His-tag	histidinová aminokyselina
Ni-NTA	Nikl-nitrilotrioctová kyselina
SDS-OAGE	polyakrylamidový gel za přítomnosti dodecylsíranu sodného

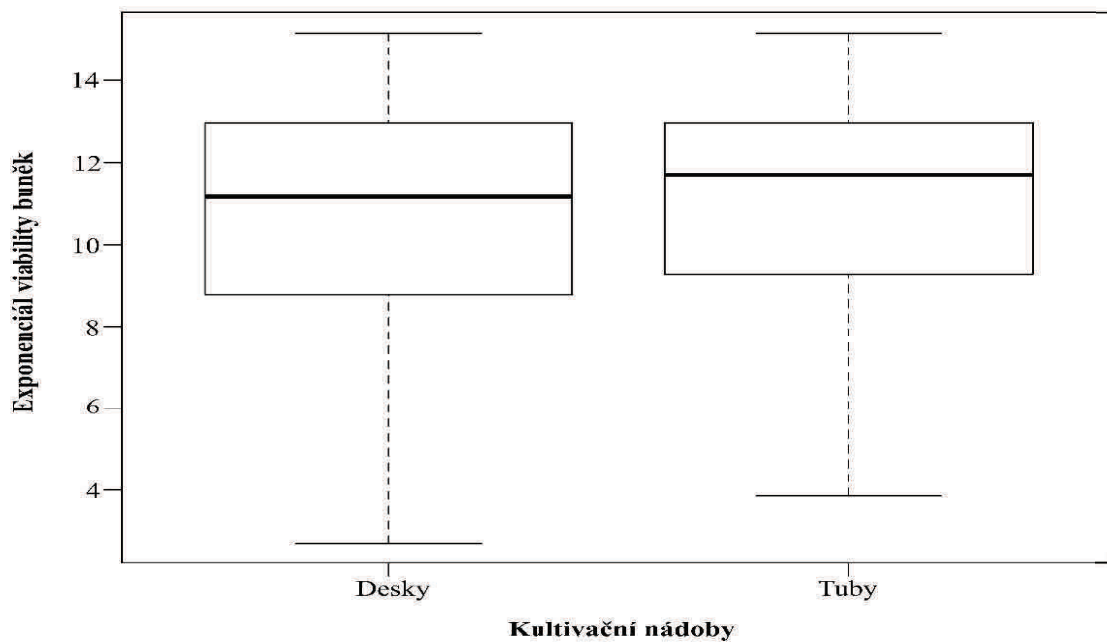
9. PŘÍLOHY



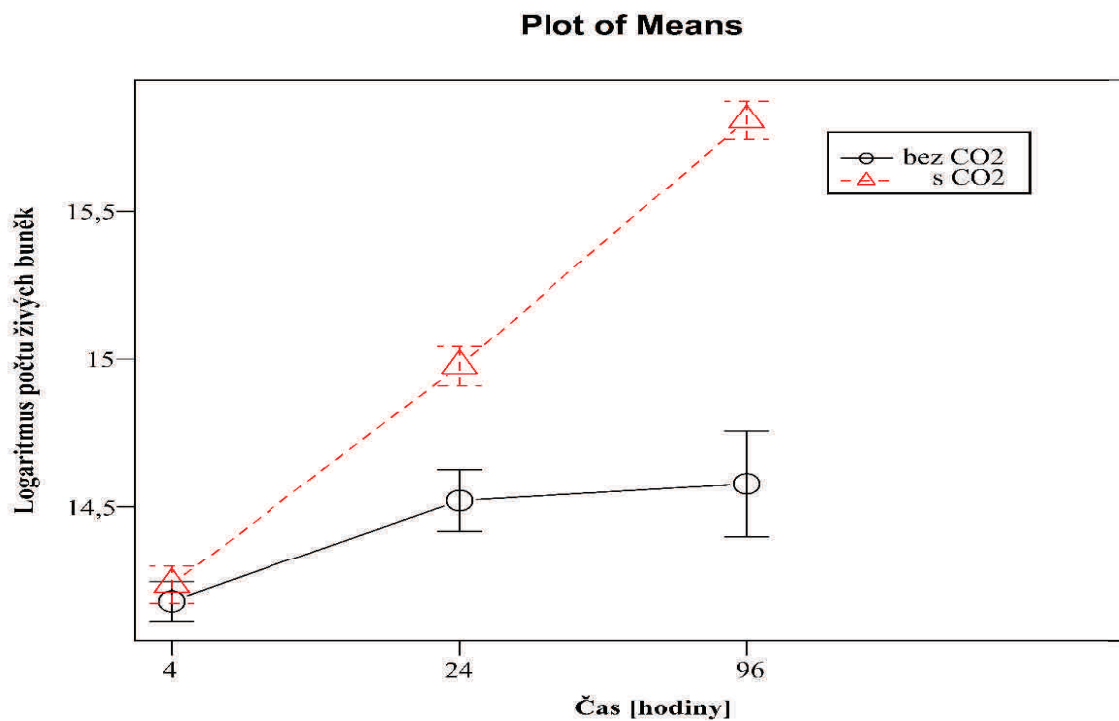
Graf 22: Viabilita buněk v průběhu 4 denní kultivace u dvou různých sledovaných *r*-proteinů. Mezi dvěma *r*-proteiny nebyl zaznamenán rozdíl viability.



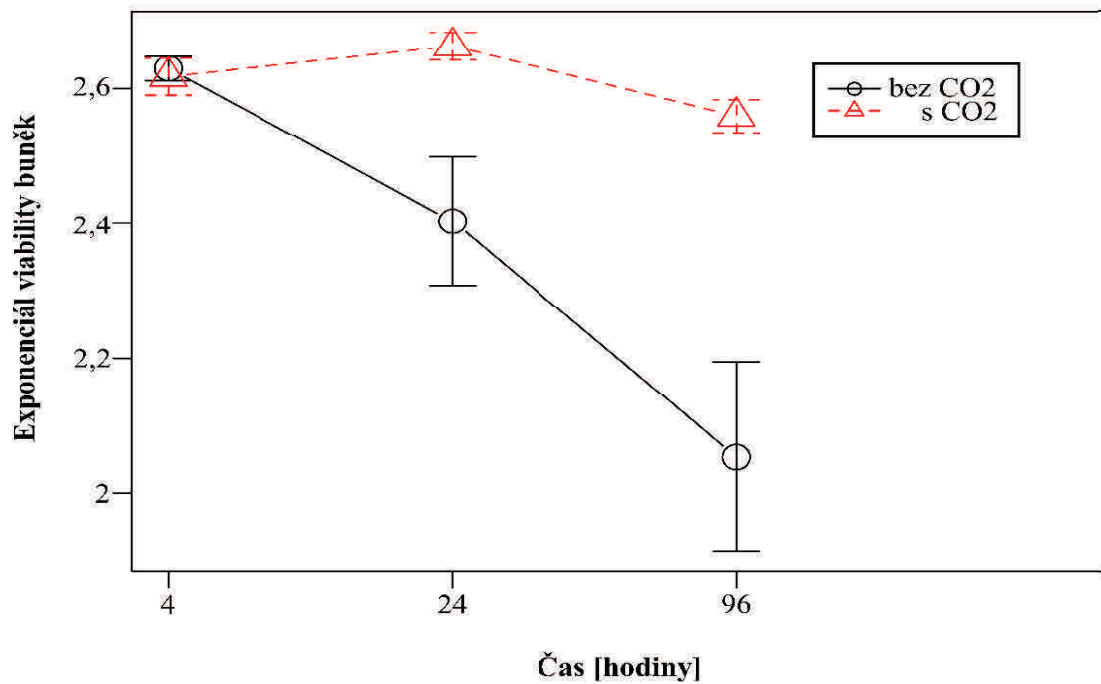
Graf 23: Hodnoty GFP v průběhu 4 denní kultivace u dvou různých sledovaných *r*-proteinů. Mezi dvěma *r*-proteiny nebyl zaznamenán rozdíl hodnot GFP.



Graf 24: Viabilita buněk v průběhu 4 denní kultivace u dvou různých testovacích nádob. Mezi dvěma r-proteiny nebyl zaznamenán rozdíl viabilit



Graf 25: Počet živých buněk v průběhu 4 denní kultivace ve dvou různých prostředí CO₂. Byl zaznamenán stejný trend poklesu křivky počtu buněk v případě kultivace buněk bez CO₂ jako u transfekovaných buněk DNA.



Graf 26: Viabilita buněk v průběhu 4 denní kultivace ve dvou různých prostředí CO₂. Byl zaznamenán stejný trend poklesu křivky viability buněk v případě kultivace buněk bez CO₂ jako u transfekovaných buněk DNA.

10. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT POMOCÍ MULTI-WAY ANOVY

10.1 Multi-way ANOVA pro vliv rychlosti třepání na sledované proměnné

10.1.1 Počet živých buněk

Shapiro-Wilk normality test:

data: pocet_log

W = 0.95337, p-value = 0.001816

Anova Table (Type II tests):

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	0.1303	1	0.7249	0.396854
DNA	0.1040	1	0.5784	0.448977
rpm	1.6850	1	9.3738	0.002919 **
cas:DNA	0.0024	1	0.0133	0.908486
cas:rpm	0.0056	1	0.0309	0.860814
DNA:rpm	0.2127	1	1.1831	0.279689
cas:DNA:rpm	0.1548	1	0.8612	0.355934
Residuals	15.8181	88		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, rpm), mean, na.rm=TRUE)))  
# means  
, , 230
```

```
      CTRP4  FetuinB  
1 14.31820 14.54816  
4 14.41967 14.49544
```

```
, , 270
```

```
      CTRP4  FetuinB  
1 14.12785 13.93050  
4 14.16324 14.20515
```

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, rpm), sd, na.rm=TRUE)))  
+ # std. deviations  
, , 230
```

```
      CTRP4  FetuinB  
1 0.2921776 0.5898252  
4 0.2810541 0.8715932
```

```
, , 270
```

```
      CTRP4  FetuinB
```

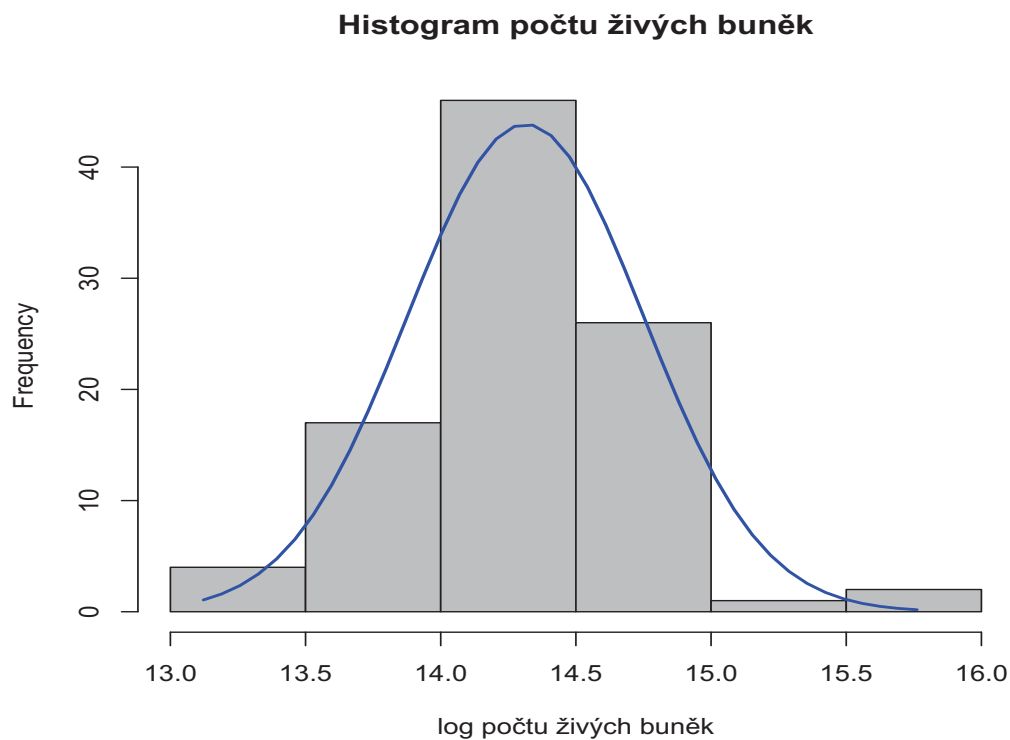
```
1 0.2544686 0.5782284
4 0.4430022 0.3700403
```

```
> xtabs(~ cas + DNA + rpm, data=Dataset) # counts
, , rpm = 230
```

```
  DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    24      8
  4    24      8
```

```
, , rpm = 270
```

```
  DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    12      4
  4    12      4
```



Graf 27: Záznam Gaussovy křivky z počtů živých buněk.

10.1.2 Viabilita buněk

Shapiro-Wilk normality test:

data: viabilita

W = 0.91551, p-value = 1.199e-05

Anova Table (Type II tests):

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	0.51773	1	136.3291	< 2.2e-16 ***
DNA	0.00300	1	0.7908	0.3762892


```

rpm          0.00096  1   0.2536 0.6158228
cas:DNA      0.00398  1   1.0468 0.3090535
cas:rpm      0.06199  1  16.3237 0.0001139 ***
DNA:rpm      0.00026  1   0.0695 0.7926350
cas:DNA:rpm  0.01042  1   2.7440 0.1011789
Residuals    0.33420 88
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(cas, DNA, rpm), mean, na.rm=TRUE)))
# means
, , 230

      CTRP4 FetuinB
1 0.9329167 0.97500
4 0.8379167 0.81625

, , 270

      CTRP4 FetuinB
1 0.9908333   0.99
4 0.7625000   0.80

> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(cas, DNA, rpm), sd, na.rm=TRUE)))
+ # std. deviations
, , 230

      CTRP4 FetuinB
1 0.06389388 0.03023716
4 0.07983566 0.03502550

, , 270

      CTRP4 FetuinB
1 0.02151462 0.02000000
4 0.07300374 0.0678233

> xtabs(~ cas + DNA + rpm, data=Dataset) # counts
, , rpm = 230

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    24      8
  4    24      8

, , rpm = 270

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    12      4
  4    12      4

```

10.1.3 Relativní četnost buněk pozitivních na GFP

Shapiro-Wilk normality test:

data: GFP_sqrt

W = 0.98147, p-value = 0.1932

Anova Table (Type II tests):

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	0.00011	1	0.0094	0.9229
DNA	0.01910	1	1.6014	0.2090
rpm	0.34979	1	29.3326	5.234e-07 ***
cas:DNA	0.00871	1	0.7300	0.3952
cas:rpm	0.00079	1	0.0666	0.7970
DNA:rpm	0.00017	1	0.0138	0.9066
cas:DNA:rpm	0.00174	1	0.1461	0.7032
Residuals	1.04938	88		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(cas, DNA, rpm), mean, na.rm=TRUE)))
```

```
# means
```

```
, , 230
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.6542280 0.6739057
4 0.6448071 0.6945545
```

```
, , 270
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.5269038 0.5192885
4 0.5192473 0.5834422
```

```
> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(cas, DNA, rpm), sd, na.rm=TRUE))) #
```

```
std. deviations
```

```
, , 230
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.08012421 0.1800035
4 0.06638834 0.1005360
```

```
, , 270
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.1237549 0.08437613
4 0.1491145 0.15097563
```

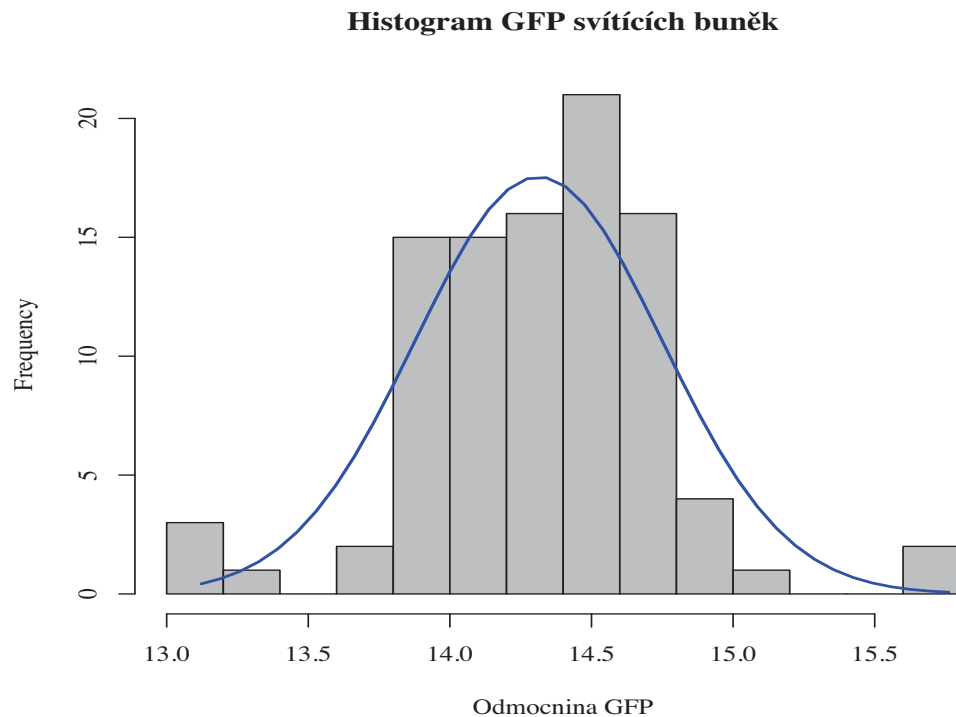
```
> xtabs(~ cas + DNA + rpm, data=Dataset) # counts
```

```
, , rpm = 230
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     24       8
  4     24       8
```

```
, , rpm = 270
```

	DNA	
cas	CTRP4	FetuinB
1	12	4
4	12	4



Graf 28: Záznam Gaussovy křivky z hodnot GFP.

10.2 Multi-way ANOVA pro vliv produkčních a transfekčních objemů na sledované proměnné

10.2.1 Počet živých buněk

Shapiro-Wilk normality test pro produkční objem:

data: pocet_log
 W = 0.95283, p-value = 0.001672

Anova Table (Type II tests) pro produkční objem:

Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	1	0.7166	0.39957
DNA	1	0.1277	0.72173
Prod.ob	1	1.1381	0.28897
cas:DNA	1	0.2108	0.64728
cas:Prod.ob	1	1.1091	0.29515
cas:DNA:Prod.ob	1	3.0586	0.08380
Residuals	88		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, Prod.ob), mean,
na.rm=TRUE))) # means
, , 1
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 14.22243 14.37654
4 14.24830 14.78591
```

```
, , 2
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 14.26122 14.30801
4 14.35138 14.01144
```

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, Prod.ob), sd,
na.rm=TRUE)))
+ # std. deviations
, , 1
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.3318483 0.8679539
4 0.3051361 0.5049196
```

```
, , 2
```

```
      CTRP4  FetuinB
1 0.2881265 0.3673791
4 0.3705987 0.7588252
```

```
> xtabs(~ cas + DNA + Prod.ob, data=Dataset) # counts
, , Prod.ob = 1
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
1     6     6
4     6     6
```

```
, , Prod.ob = 2
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
1    30     6
4    30     6
```

Shapiro-Wilk normality test pro transfekční objem:

```
data: pocet_log
W = 0.95283, p-value = 0.001672
```

Anova Table (Type II tests) pro transfekční objem:

	Sum Sq	Df	F	value	Pr(>F)
cas	0.1303	1	0.6444	0.4243	
DNA	0.1121	1	0.5542	0.4586	
TTF.ob	0.0798	3	0.1316	0.9410	
cas:DNA	0.0464	1	0.2296	0.6331	
cas:TTF.ob	0.4071	3	0.6711	0.5721	

```
DNA:TTF.ob          0
cas:DNA:TTF.ob     0
Residuals          17.3892 86
```

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, TTF.ob), mean,
na.rm=TRUE))) # means
, , 0.4
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 14.13963      NA
4 14.47446      NA
```

```
, , 0.5
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 14.31084 14.34227
4 14.25369 14.39868
```

```
, , 0.6
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 14.19247      NA
4 14.31324      NA
```

```
, , 0.7
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 14.26391      NA
4 14.45643      NA
```

```
> with(Dataset, (tapply(pocet_log, list(cas, DNA, TTF.ob), sd,
na.rm=TRUE)))
+ # std. deviations
, , 0.4
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 0.03025445      NA
4 0.24758199      NA
```

```
, , 0.5
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 0.3205007 0.6364423
4 0.4457534 0.7356643
```

```
, , 0.6
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 0.3527052      NA
4 0.2746907      NA
```

```
, , 0.7
```

```
      CTRP4 FetuinB
1 0.2942396      NA
4 0.1503566      NA
```

```
> xtabs(~ cas + DNA + TTF.ob, data=Dataset) # counts
```

```
, , TTF.ob = 0.4
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0
```

```
, , TTF.ob = 0.5
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    18    12
  4    18    12
```

```
, , TTF.ob = 0.6
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0
```

```
, , TTF.ob = 0.7
```

```
      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0
```

10.2.2 Viabilita buněk

Shapiro-Wilk normality test pro produkční objem:

data: viabilita

W = 0.96235, p-value = 0.00744

Anova Table (Type II tests) pro produkční objem:

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
DNA	0.00047	1	0.0701	0.7918
Prod.ob	0.01034	1	1.5427	0.2174
DNA:Prod.ob	0.00580	1	0.8659	0.3545
Residuals	0.61639	92		

```
> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(DNA, Prod.ob), mean, na.rm=TRUE)))
# means
```

```
          1          2
CTR4P4  0.8375000 0.8776667
FetuinB 0.8566667 0.8575000
```

```
> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(DNA, Prod.ob), sd, na.rm=TRUE))) #
std. deviations
```

```
          1          2
CTR4P4  0.1187147 0.06502585
FetuinB 0.1016530 0.09449627
```

```
> xtabs(~ DNA + Prod.ob, data=Dataset) # counts
```

```
      Prod.ob
DNA     1  2
CTR4P4 12 60
```

FetuinB 12 12

Shapiro-Wilk normality test pro transfekční objem:

data: viabilita

W = 0.96235, p-value = 0.00744

Anova Table (Type II tests) pro transfekční objem:

Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
DNA	1	2.0624	0.15460
TTF.ob	3	3.0546	0.03269 *
DNA:TTF.ob	0		
Residuals	86	0.36288	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(DNA, TTF.ob), mean, na.rm=TRUE))) #  
means
```

```
, , 0.4
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 1.0000000      NA  
4 0.8683333      NA
```

```
, , 0.5
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.9494444 0.9800000  
4 0.7922222 0.8108333
```

```
, , 0.6
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.9316667      NA  
4 0.8200000      NA
```

```
, , 0.7
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.9333333      NA  
4 0.8116667      NA
```

```
> with(Dataset, (tapply(viabilita, list(DNA, TTF.ob), sd, na.rm=TRUE)))  
+ # std. deviations
```

```
, , 0.4
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.0000000      NA  
4 0.03060501     NA
```

```
, , 0.5
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.07157655 0.02730301  
4 0.10591648 0.04581749
```

```
, , 0.6
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.03710346      NA  
4 0.04049691      NA
```

```
, , 0.7
```

```
      CTRP4 FetuinB  
1 0.05163978      NA  
4 0.06431692      NA
```

```
> xtabs(DNA + TTF.ob, data=Dataset) # counts  
, , TTF.ob = 0.4
```

```
      DNA  
cas CTRP4 FetuinB  
1    6      0  
4    6      0
```

```
, , TTF.ob = 0.5
```

```
      DNA  
cas CTRP4 FetuinB  
1   18     12  
4   18     12
```

```
, , TTF.ob = 0.6
```

```
      DNA  
cas CTRP4 FetuinB  
1    6      0  
4    6      0
```

```
, , TTF.ob = 0.7
```

```
      DNA  
cas CTRP4 FetuinB  
1    6      0  
4    6      0
```

10.2.3 Relativní četnost buněk pozitivních na GFP

Shapiro-Wilk normality test pro produkční objem:

```
data: GFP_sqrt  
W = 0.94255, p-value = 0.005
```

Anova Table (Type II tests) pro produkční objem:

```
Sum Sq Df F value Pr(>F)  
DNA          0.00603  1  0.6793 0.4131  
Prod.ob      0.01150  1  1.2966 0.2594  
DNA:Prod.ob  0.00568  1  0.6401 0.4268  
Residuals    0.53218 60
```



```

> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(DNA, Prod.ob), mean, na.rm=TRUE))) #
means
          1          2
CTRP4  0.691773 0.6410665
FetuinB 0.685755 0.6827052

> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(DNA, Prod.ob), sd, na.rm=TRUE))) #
std. deviations
          1          2
CTRP4  0.07709119 0.07004588
FetuinB 0.16384682 0.12610029

> xtabs(~ DNA + Prod.ob, data=Dataset) # counts
      Prod.ob
DNA      1  2
CTRP4   12 60
FetuinB 12 12

```

Shapiro-Wilk normality test pro transfekční objem:

data: viabilita
W = 0.94255, p-value = 0.005

Anova Table (Type II tests) pro transfekční objem:

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
DNA	0.00016	1	0.0109	0.91720
TTF.ob	0.10547	3	2.3862	0.07463
DNA:TTF.ob		0		
Residuals	1.26701	86		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(DNA, TTF.ob), mean, na.rm=TRUE))) #
means
, , 0.4

      CTRP4 FetuinB
1 0.5843227      NA
4 0.5063964      NA

, , 0.5

      CTRP4 FetuinB
1 0.6421358 0.6223666
4 0.6444182 0.6575171

, , 0.6

      CTRP4 FetuinB
1 0.5536630      NA
4 0.6075026      NA

, , 0.7

      CTRP4 FetuinB
1 0.6063266      NA
4 0.5705696      NA

```

```

> with(Dataset, (tapply(GFP_sqrt, list(DNA, TTF.ob), sd, na.rm=TRUE)))
+ # std. deviations
, , 0.4

      CTRP4 FetuinB
1 0.07924843      NA
4 0.07921635      NA

, , 0.5

      CTRP4 FetuinB
1 0.1301378 0.1683928
4 0.1124731 0.1250657

, , 0.6

      CTRP4 FetuinB
1 0.09027038      NA
4 0.07161485      NA

, , 0.7

      CTRP4 FetuinB
1 0.0940302      NA
4 0.1460837      NA

> xtabs(DNA + TTF.ob, data=Dataset) # counts
, , TTF.ob = 0.4

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0

, , TTF.ob = 0.5

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1    18    12
  4    18    12

, , TTF.ob = 0.6

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0

, , TTF.ob = 0.7

      DNA
cas CTRP4 FetuinB
  1     6     0
  4     6     0

```

10.3 Multi-way ANOVA pro vliv CO2 na sledované proměnné v různých kultivačních nádobách

10.3.1 Počet živých buněk

Shapiro-Wilk normality test:

data: pocet

W = 0.85497, p-value = 0.04231

Anova Table (Type II tests):

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	1.6691e+11	1	0.2371	0.6315697
C02	1.5941e+13	1	22.6493	0.0001198 ***
nadoba	2.7730e+12	2	1.9699	0.1656150
opak	1.5246e+11	1	0.2166	0.6466641
cas:C02	5.8594e+11	1	0.8325	0.3724205
cas:nadoba	2.6928e+12	2	1.9130	0.1737009
C02:nadoba	1.4926e+13	2	10.6031	0.0007255 ***
cas:opak	7.5666e+11	1	1.0750	0.3121821
C02:opak	2.3438e+12	1	3.3300	0.0830028 .
nadoba:opak	4.8800e+12	2	3.4667	0.0509778 .
cas:C02:nadoba	2.3437e+12	2	1.6650	0.2143703
cas:C02:opak	1.4850e+12	1	2.1099	0.1618562
cas:nadoba:opak	3.9189e+11	2	0.2784	0.7598838
C02:nadoba:opak	7.5139e+12	2	5.3378	0.0138793 *
cas:C02:nadoba:opak	5.7625e+10	2	0.0409	0.9599704
Residuals	1.4077e+13	20		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(pocet, list(cas, C02, nadoba, opak), mean,
+ na.rm=TRUE))) # means
, , desky, 1
```

```
  bez C02  s C02
1 1860000 2375000
4  720000 2500000
```

```
, , lahve, 1
```

```
  bez C02  s C02
1 2200000 1600000
4 2300000 1250000
```

```
, , tuby, 1
```

```
  bez C02  s C02
1 1875000 2150000
4  900000 3450000
```

```
, , desky, 2
```

```
  bez C02  s C02
1  625000 4900000
4  350000 4175000
```

```
, , lahve, 2
```

```
  bez C02    s C02
1 1050000 1800000
4 2690000 2000000
```

```
, , tuby, 2
```

```
  bez C02    s C02
1  795000  900000
4 1150000 1925000
```

```
> with(Dataset, (tapply(pocet, list(cas, C02, nadoba, opak), sd,
na.rm=TRUE)))
+ # std. deviations
, , desky, 1
```

```
  bez C02      s C02
1 791959.6  35355.34
4 735391.1 1131370.85
```

```
, , lahve, 1
```

```
  bez C02 s C02
1 282842.7  NA
4 1272792.2  NA
```

```
, , tuby, 1
```

```
  bez C02    s C02
1 35355.34 212132.0
4 141421.36 353553.4
```

```
, , desky, 2
```

```
  bez C02      s C02
1 261629.51 2969848.48
4  70710.68  35355.34
```

```
, , lahve, 2
```

```
  bez C02 s C02
1  70710.68  NA
4 268700.58  NA
```

```
, , tuby, 2
```

```
  bez C02    s C02
1 487903.7 141421.4
4 636396.1 318198.1
```

```
> xtabs(~ cas + C02 + nadoba + opak, data=Dataset) # counts
, , nadoba = desky, opak = 1
```

```
  C02
cas bez C02 s C02
  1      2      2
  4      2      2
```

, , nadoba = lahve, opak = 1

C02		
cas	bez C02	s C02
1	2	1
4	2	1

, , nadoba = tuby, opak = 1

C02		
cas	bez C02	s C02
1	2	2
4	2	2

, , nadoba = desky, opak = 2

C02		
cas	bez C02	s C02
1	2	2
4	2	2

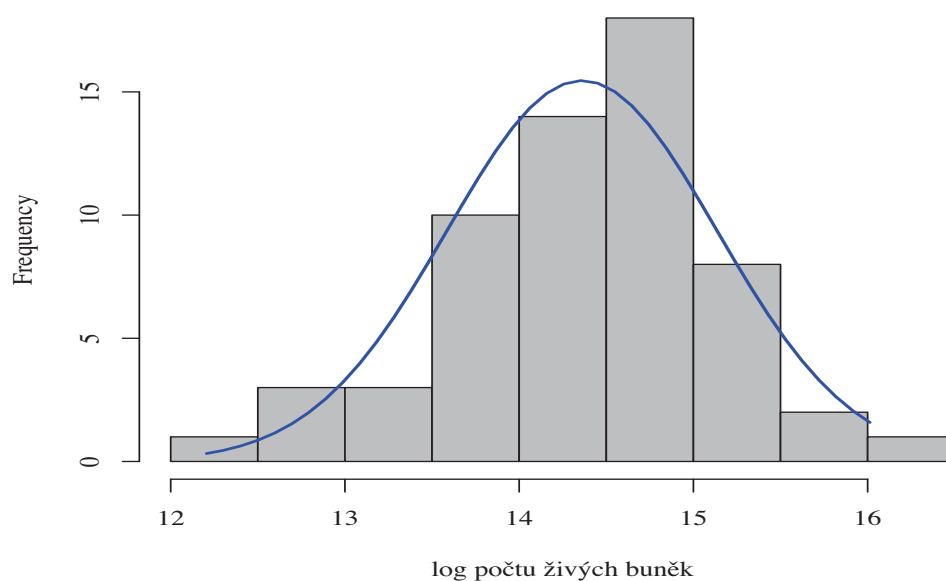
, , nadoba = lahve, opak = 2

C02		
cas	bez C02	s C02
1	2	1
4	2	1

, , nadoba = tuby, opak = 2

C02		
cas	bez C02	s C02
1	2	2
4	2	2

Histogram počtu živých buněk



Graf 29: Záznam Gaussovy křivky z počtů živých buněk.

10.3.2 Viabilita buněk

Shapiro-Wilk normality test:

data: viabilita_exp_2

W = 0.93502, p-value = 0.01567

Anova Table (Type II tests):

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
cas	73.178	1	17.4149	0.0002148	***
C02	133.339	1	31.7320	3.148e-06	***
nadoba	13.600	2	1.6182	0.2140503	
cas:C02	15.968	1	3.8001	0.0600609	.
cas:nadoba	2.826	2	0.3363	0.7169319	
C02:nadoba	60.011	2	7.1407	0.0027283	**
cas:C02:nadoba	0.677	2	0.0806	0.9227801	
Residuals	134.465	32			

```
with(Dataset, (tapply(viabilita_exp_2, list(cas, C02, nadoba), mean,  
na.rm=TRUE)))
```

```
+ # means
```

```
, , desky
```

```
    bez C02    s C02  
1 9.005771 13.82035  
4 5.842558 12.48249
```

```
, , lahve
```

```
    bez C02    s C02  
1 12.89148 11.02089  
4  9.57284 10.75216
```

```
, , tuby
```

```
    bez C02    s C02  
1 11.211213 13.80927  
4  6.761907 12.02677
```

```
> with(Dataset, (tapply(viabilita_exp_2, list(cas, C02, nadoba), sd,  
na.rm=TRUE)))
```

```
+ # std. deviations
```

```
, , desky
```

```
    bez C02    s C02  
1 1.870119 1.668706  
4 1.776389 1.617936
```

```
, , lahve
```

```
    bez C02    s C02  
1 2.620867 0.5606082  
4 1.820999 0.1805621
```

```
, , tuby
```

```
    bez C02    s C02  
1 2.975319 1.6000220  
4 3.206389 0.8788506
```

```
> xtabs(~ cas + C02 + nadoba, data=Dataset) # counts  
, , nadoba = desky
```

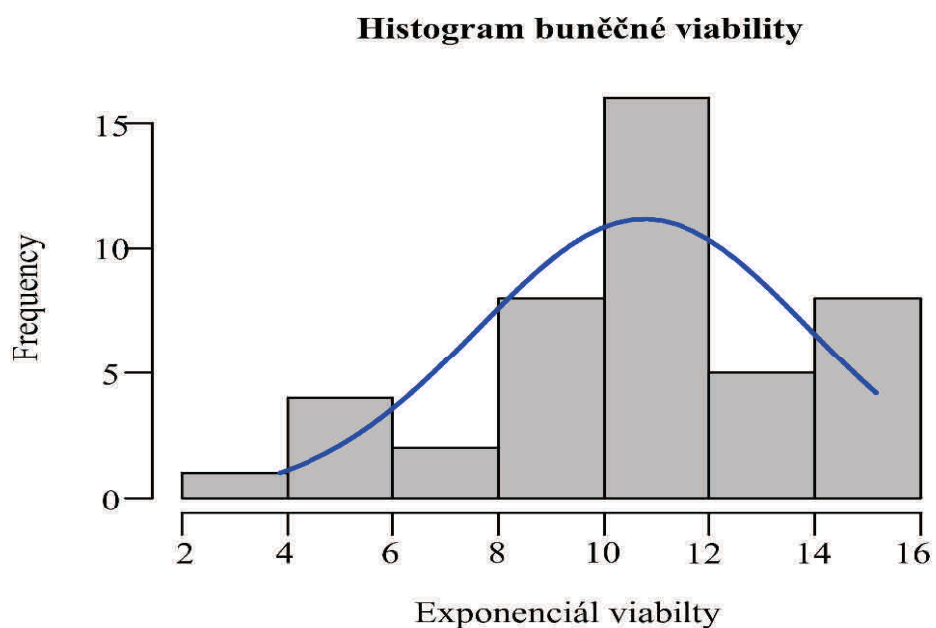
```
      C02  
cas bez C02 s C02  
  1     4     4  
  4     4     4
```

```
, , nadoba = lahve
```

```
      C02  
cas bez C02 s C02  
  1     4     2  
  4     4     2
```

```
, , nadoba = tuby
```

```
      C02  
cas bez C02 s C02  
  1     4     4  
  4     4     4
```



Graf 30: Záznam Gaussovy křivky z viabilit buněk.

10.3.3 Relativní četnost buněk pozitivních na GFP

Shapiro-Wilk normality test:

data: GFP

W = 0.97321, p-value = 0.3908

Anova Table (Type II tests):

Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	1	5.9575	0.02037 *
C02	1	25.4447	1.747e-05 ***
nadoba	2	33.3275	1.501e-08 ***
cas:C02	1	1.1818	0.28510
cas:nadoba	2	0.9856	0.38427
C02:nadoba	2	16.8383	1.009e-05 ***
cas:C02:nadoba	2	0.7416	0.48437
Residuals	32	0.15865	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(GFP, list(cas, C02, nadoba), mean, na.rm=TRUE))) #  
means
```

```
, , deský
```

```
    bez C02  s C02  
1  0.1150 0.3275  
4  0.1125 0.3075
```

```
, , lahve
```

```
    bez C02  s C02  
1   0.505  0.37  
4   0.395  0.32
```

```
, , tuby
```

```
    bez C02  s C02  
1  0.2525 0.3575  
4  0.1375 0.3450
```

```
> with(Dataset, (tapply(GFP, list(cas, C02, nadoba), sd, na.rm=TRUE))) #  
std. deviations
```

```
, , deský
```

```
    bez C02      s C02  
1 0.04509250 0.1195478  
4 0.04856267 0.1071992
```

```
, , lahve
```

```
    bez C02      s C02  
1 0.05196152 0.08485281  
4 0.03415650 0.08485281
```

```
, , tuby
```

```
    bez C02      s C02  
1 0.04112988 0.08098354  
4 0.03862210 0.06557439
```



```
> xtabs(~ cas + C02 + nadoba, data=Dataset) # counts
, , nadoba = desky
```

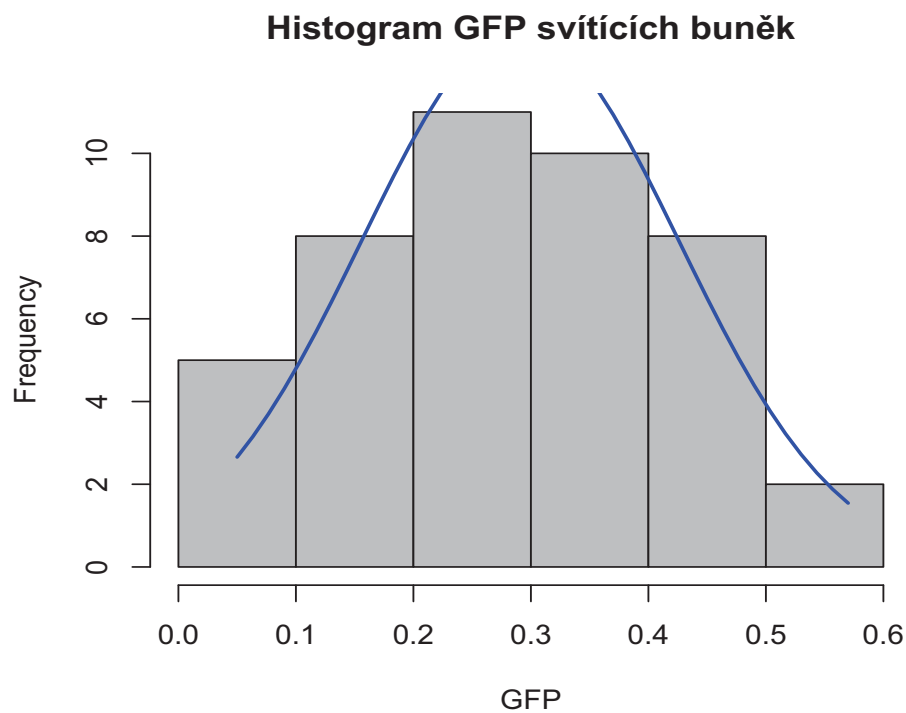
		C02	
cas	bez C02	s C02	
1	4	4	
4	4	4	

```
, , nadoba = lahve
```

		C02	
cas	bez C02	s C02	
1	4	2	
4	4	2	

```
, , nadoba = tuby
```

		C02	
cas	bez C02	s C02	
1	4	4	
4	4	4	



Graf 31: Záznam Gaussovy křivky z hodnot GFP.

10.3.4 pH

Shapiro-Wilk normality test:

data: pH

W = 0.92058, p-value = 0.2908

Anova Table (Type II tests):

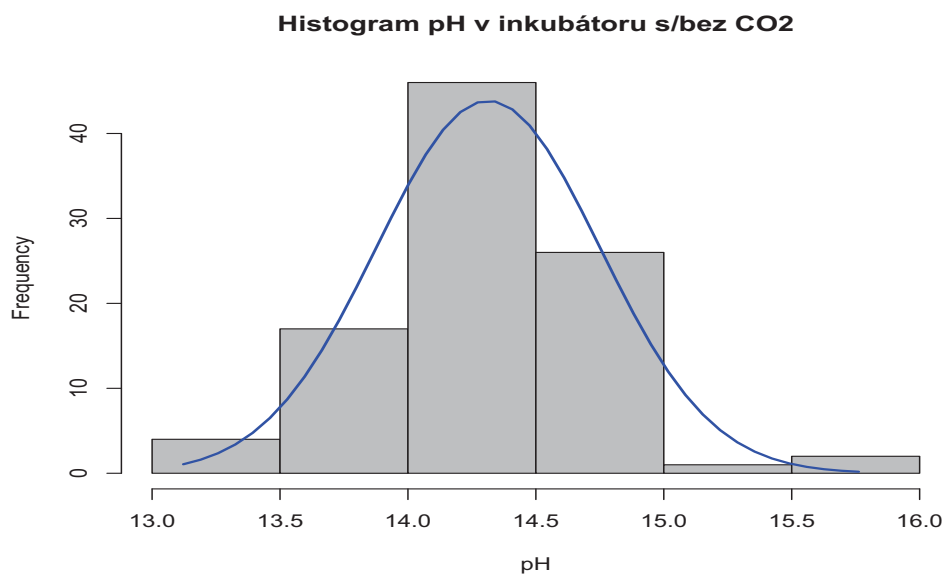
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cas	0.2066	2	177.09	4.623e-06 ***
C02	1.7633	1	3022.86	2.431e-09 ***
cas:C02	1.3921	2	1193.20	1.577e-08 ***
Residuals	0.0035	6		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> with(Dataset, (tapply(pH, list(cas, C02), mean, na.rm=TRUE))) # means
      0      1
0 6.800 7.080
1 6.505 6.795
4 5.810 7.540
```

```
> with(Dataset, (tapply(pH, list(cas, C02), sd, na.rm=TRUE))) # std.
deviations
      0      1
0 0.028284271 0.04242641
1 0.007071068 0.02121320
4 0.014142136 0.01414214
```

```
> xtabs(~ cas + C02, data=Dataset) # counts
      C02
cas 0 1
  0 2 2
  1 2 2
  4 2 2
```



Graf 32: Záznam Gaussovy křivky z hodnot pH.

11. NAMĚŘENÁ DATA

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
318	1	desky	96	230	0,5	1	FetuinB	1	1,70E+06	77%	50%	
318	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,21E+06	76%		
318	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,01E+06	73%		
318	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	2,90E+06	97%	32%	
318	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,10E+06	92%	92%	
318	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	2,50E+06	76%	47%	
318	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	3,20E+06	82%	45%	
318	1	desky	4	230	0,4	2	CTRP4	1	1,33E+06	88%		
318	1	desky	4	230	0,4	2	CTRP4	1	1,20E+06	85%		
318	1	desky	24	230	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	32%	
318	1	desky	24	230	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	46%	
318	1	desky	96	230	0,4	2	CTRP4	1	1,80E+06	90%	30%	
318	1	desky	96	230	0,4	2	CTRP4	1	2,60E+06	87%	32%	
318	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,08E+06	87%		
318	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,00E+06	84%		
318	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	1,90E+06	87%	34%	
318	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	1,50E+06	84%	63%	
318	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	2,60E+06	90%	38%	
318	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	2,30E+06	96%	48%	
318	1	desky	4	230	0,6	2	CTRP4	1	9,17E+05	85%		
318	1	desky	4	230	0,6	2	CTRP4	1	1,00E+06	80%		
318	1	desky	24	230	0,6	2	CTRP4	1	2,00E+06	91%	36%	
318	1	desky	24	230	0,6	2	CTRP4	1	1,00E+06	91%	32%	
318	1	desky	96	230	0,6	2	CTRP4	1	1,40E+06	82%	44%	
318	1	desky	96	230	0,6	2	CTRP4	1	1,80E+06	86%	38%	
318	1	desky	4	230	0,7	2	CTRP4	1	1,25E+06	89%		
318	1	desky	4	230	0,7	2	CTRP4	1	1,10E+06	85%		
318	1	desky	24	230	0,7	2	CTRP4	1	1,80E+06	90%	48%	
318	1	desky	24	230	0,7	2	CTRP4	1	1,90E+06	90%	40%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
318	1	desky	96	230	0,7	2	CTRP4	1	2,30E+06	88%	40%	
318	1	desky	96	230	0,7	2	CTRP4	1	1,70E+06	81%	48%	
324	1	desky	4	270	0,5	1	-	1	6,67E+05	100%		
324	2	desky	4	270	0,5	1	-	1	6,40E+05	98%		
324	1	desky	24	270	0,5	1	-	1	2,40E+06	100%		
324	2	desky	24	270	0,5	1	-	1	1,80E+06	100%		
324	1	desky	96	270	0,5	1	-	1	5,00E+06	85%		
324	2	desky	96	270	0,5	1	-	1	3,50E+06	83%		
324	1	desky	4	270	0,5	2	-	1	7,50E+05	100%		
324	2	desky	4	270	0,5	2	-	1	7,00E+05	97%		
324	1	desky	24	270	0,5	2	-	1	2,90E+06	100%		
324	2	desky	24	270	0,5	2	-	1	2,00E+06	100%		
324	1	desky	96	270	0,5	2	-	1	3,90E+06	85%		
324	2	desky	96	270	0,5	2	-	1	3,60E+06	90%		
324	1	desky	4	270	0,5	1	CTRP4	1	6,67E+05	75%		
324	2	desky	4	270	0,5	1	CTRP4	1	6,00E+05	72%		
324	1	desky	24	270	0,5	1	CTRP4	1	1,00E+06	100%	45%	
324	2	desky	24	270	0,5	1	CTRP4	1	2,10E+06	100%	19%	
324	1	desky	96	270	0,5	1	CTRP4	1	2,40E+06	86%	46%	
324	2	desky	96	270	0,5	1	CTRP4	1	1,40E+06	82%	29%	
324	1	desky	4	270	0,5	2	CTRP4	1	7,50E+05	79%		
324	2	desky	4	270	0,5	2	CTRP4	1	7,10E+05	70%		
324	1	desky	24	270	0,5	2	CTRP4	1	1,50E+06	94%	47%	
324	2	desky	24	270	0,5	2	CTRP4	1	1,20E+06	100%	54%	
324	1	desky	96	270	0,5	2	CTRP4	1	5,00E+05	63%	56%	
324	2	desky	96	270	0,5	2	CTRP4	1	1,00E+06	67%	60%	
324	1	desky	4	270	0,5	1	FetuinB	1	8,33E+05	67%		
324	2	desky	4	270	0,5	1	FetuinB	1	1,23E+06	60%		
324	1	desky	24	270	0,5	1	FetuinB	1	5,00E+05	100%	30%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
324	2	desky	24	270	0,5	1	FetuinB	1	1,10E+06	96%	39%	
324	1	desky	96	270	0,5	1	FetuinB	1	1,60E+06	70%	15%	
324	2	desky	96	270	0,5	1	FetuinB	1	2,20E+06	85%	31%	
324	1	desky	4	270	0,5	2	FetuinB	1	1,08E+06	87%		
324	2	desky	4	270	0,5	2	FetuinB	1	1,24E+06	84%		
324	1	desky	24	270	0,5	2	FetuinB	1	1,60E+06	100%	22%	
324	2	desky	24	270	0,5	2	FetuinB	1	1,80E+06	100%	19%	
324	1	desky	96	270	0,5	2	FetuinB	1	9,00E+05	82%	55%	
324	2	desky	96	270	0,5	2	FetuinB	1	1,50E+06	83%	42%	
324	1	desky	4	270	0,4	2	CTRP4	1	1,04E+06	84%		
324	2	desky	4	270	0,4	2	CTRP4	1	1,20E+05	89%		
324	1	desky	24	270	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	29%	
324	2	desky	24	270	0,4	2	CTRP4	1	1,30E+06	100%	23%	
324	1	desky	96	270	0,4	2	CTRP4	1	1,70E+06	85%	15%	
324	2	desky	96	270	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	82%	18%	
324	1	desky	4	270	0,5	2	CTRP4	1	8,33E+05	86%		
324	2	desky	4	270	0,5	2	CTRP4	1	7,80E+05	90%		
324	1	desky	24	270	0,5	2	CTRP4	1	1,70E+06	100%	15%	
324	2	desky	24	270	0,5	2	CTRP4	1	1,20E+06	100%	17%	
324	1	desky	96	270	0,5	2	CTRP4	1	1,00E+06	71%	14%	
324	2	desky	96	270	0,5	2	CTRP4	1	1,70E+06	74%	20%	
324	1	desky	4	270	0,6	2	CTRP4	1	5,00E+05	81%		
324	2	desky	4	270	0,6	2	CTRP4	1	4,10E+05	76%		
324	1	desky	24	270	0,6	2	CTRP4	1	2,00E+06	95%	14%	
324	2	desky	24	270	0,6	2	CTRP4	1	1,20E+06	100%	38%	
324	1	desky	96	270	0,6	2	CTRP4	1	2,60E+06	81%	22%	
324	2	desky	96	270	0,6	2	CTRP4	1	1,20E+06	75%	38%	
324	1	desky	4	270	0,7	2	CTRP4	1	6,67E+05	81%		
324	2	desky	4	270	0,7	2	CTRP4	1	5,90E+05	80%		

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
324	1	desky	24	270	0,7	2	CTRP4	1	9,00E+05	100%	28%	
324	2	desky	24	270	0,7	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	21%	
324	1	desky	96	270	0,7	2	CTRP4	1	1,80E+06	78%	17%	
324	2	desky	96	270	0,7	2	CTRP4	1	1,70E+06	71%	13%	
330	2	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,08E+06	100%		
330	2	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,18E+06	100%		
330	2	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,20E+06	100%		
330	2	desky	24	230	0,5	2	-	1	2,50E+06	100%		
330	2	desky	96	230	0,5	2	-	1	4,20E+06	98%		
330	2	desky	96	230	0,5	2	-	1	4,30E+06	96%		
330	2	desky	4	230	0,5	1	CTRP4	1	1,04E+06	85%		
330	2	desky	4	230	0,5	1	CTRP4	1	1,15E+06	90%		
330	2	desky	24	230	0,5	1	CTRP4	1	2,20E+06	100%	50%	
330	2	desky	24	230	0,5	1	CTRP4	1	1,70E+06	100%	65%	
330	2	desky	96	230	0,5	1	CTRP4	1	1,30E+06	62%	55%	
330	2	desky	96	230	0,5	1	CTRP4	1	2,10E+06	68%	45%	
330	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,08E+06	86%		
330	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,31E+06	80%		
330	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	2,20E+06	100%	39%	
330	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	1,30E+06	100%	58%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	1,60E+06	84%	66%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	1,00E+06	77%	38%	
330	2	desky	4	230	0,5	1	FetuinB	1	1,04E+06	87%		
330	2	desky	4	230	0,5	1	FetuinB	1	1,33E+06	81%		
330	2	desky	24	230	0,5	1	FetuinB	1	2,20E+06	100%	23%	
330	2	desky	24	230	0,5	1	FetuinB	1	1,80E+06	100%	47%	
330	2	desky	96	230	0,5	1	FetuinB	1	2,80E+06	82%	66%	
330	2	desky	96	230	0,5	1	FetuinB	1	3,20E+06	82%	71%	
330	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	8,33E+05	84%		

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
330	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,02E+06	80%		
330	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,10E+06	100%	50%	
330	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,90E+06	100%	34%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	5,00E+05	83%	50%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	6,00E+05	86%	34%	
330	2	desky	4	230	0,4	2	CTRP4	1	1,33E+06	88%		
330	2	desky	4	230	0,4	2	CTRP4	1	1,50E+06	78%		
330	2	desky	24	230	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	32%	
330	2	desky	24	230	0,4	2	CTRP4	1	1,40E+06	100%	46%	
330	2	desky	96	230	0,4	2	CTRP4	1	1,80E+06	90%	30%	
330	2	desky	96	230	0,4	2	CTRP4	1	2,60E+06	87%	32%	
330	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,08E+06	87%		
330	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,23E+06	81%		
330	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	1,90E+06	100%	34%	
330	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	1,50E+06	100%	63%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	2,60E+06	90%	38%	
330	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	2,30E+06	96%	48%	
330	2	desky	4	230	0,6	2	CTRP4	1	9,17E+05	85%		
330	2	desky	4	230	0,6	2	CTRP4	1	1,00E+06	78%		
330	2	desky	24	230	0,6	2	CTRP4	1	2,00E+06	91%	36%	
330	2	desky	24	230	0,6	2	CTRP4	1	1,00E+06	91%	32%	
330	2	desky	96	230	0,6	2	CTRP4	1	1,40E+06	82%	44%	
330	2	desky	96	230	0,6	2	CTRP4	1	1,80E+06	86%	38%	
330	2	desky	4	230	0,7	2	CTRP4	1	1,25E+06	89%		
330	2	desky	4	230	0,7	2	CTRP4	1	1,34E+06	92%		
330	2	desky	24	230	0,7	2	CTRP4	1	1,80E+06	90%	48%	
330	2	desky	24	230	0,7	2	CTRP4	1	1,90E+06	90%	40%	
330	2	desky	96	230	0,7	2	CTRP4	1	2,30E+06	88%	40%	
330	2	desky	96	230	0,7	2	CTRP4	1	1,70E+06	81%	48%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
391	1	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,83E+06	97%		7,05
391	1	desky	4	230	0,5	2	-	1	2,00E+06	100%		7,11
394	2	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,33E+06	100%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,00E+06	98%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,23E+06	98%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	-	1	1,43E+06	96%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	-	1	4,00E+06	100%		6,78
391	1	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,80E+06	100%		6,81
394	2	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,30E+06	94%		
394	2	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,90E+06	98%		
401	3	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,90E+06	99%		
401	3	desky	24	230	0,5	2	-	1	3,42E+06	99%		
391	1	desky	96	230	0,5	2	-	1	8,70E+06	99%		7,53
391	1	desky	96	230	0,5	2	-	1	8,80E+06	96%		7,55
394	2	desky	96	230	0,5	2	-	1	7,20E+06	90%		
394	2	desky	96	230	0,5	2	-	1	8,20E+06	93%		
401	3	desky	96	230	0,5	2	-	1	7,36E+06	92%		
401	3	desky	96	230	0,5	2	-	1	1,00E+07	93%		
391	1	desky	4	230	0,5	2	-	0	2,00E+06	98%		6,78
391	1	desky	4	230	0,5	2	-	0	2,22E+06	94%		6,82
394	2	desky	4	230	0,5	2	-	0	1,17E+06	93%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	-	0	1,23E+06	97%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	-	0	1,17E+06	99%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	-	0	1,54E+06	97%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	-	0	1,60E+06	95%		6,50
391	1	desky	24	230	0,5	2	-	0	2,20E+06	100%		6,51
394	2	desky	24	230	0,5	2	-	0	1,00E+06	67%		
394	2	desky	24	230	0,5	2	-	0	1,44E+06	88%		
401	3	desky	24	230	0,5	2	-	0	1,48E+06	57%		

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
401	3	desky	24	230	0,5	2	-	0	1,90E+06	67%		
391	1	desky	96	230	0,5	2	-	0	2,20E+06	85%		5,80
391	1	desky	96	230	0,5	2	-	0	2,25E+06	85%		5,82
394	2	desky	96	230	0,5	2	-	0	2,20E+06	68%		
394	2	desky	96	230	0,5	2	-	0	2,80E+06	65%		
401	3	desky	96	230	0,5	2	-	0	5,50E+05	26%		
401	3	desky	96	230	0,5	2	-	0	1,00E+06	29%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,67E+06	98%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,90E+06	96%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,25E+06	88%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,40E+06	90%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,71E+06	98%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	-	1	1,90E+06	95%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	-	1	2,80E+06	97%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	-	1	2,20E+06	100%		
394	2	tuby	24	230	1,5	10	-	1	2,00E+06	91%		
394	2	tuby	24	230	1,5	10	-	1	2,90E+06	98%		
401	3	tuby	24	230	1,5	10	-	1	3,68E+06	99%		
401	3	tuby	24	230	1,5	10	-	1	3,32E+06	100%		
391	1	tuby	96	230	1,5	10	-	1	5,60E+06	98%		
391	1	tuby	96	230	1,5	10	-	1	4,80E+06	98%		
394	2	tuby	96	230	1,5	10	-	1	9,00E+06	94%		
394	2	tuby	96	230	1,5	10	-	1	8,00E+06	94%		
401	3	tuby	96	230	1,5	10	-	1	7,00E+06	88%		
401	3	tuby	96	230	1,5	10	-	1	5,50E+06	92%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,50E+06	96%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,63E+06	100%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,50E+06	98%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,45E+06	99%		

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
401	3	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,05E+06	96%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	-	0	1,22E+06	93%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	-	0	2,70E+06	100%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	-	0	2,20E+06	100%		
394	2	tuby	24	230	1,5	10	-	0	3,30E+06	94%		
394	2	tuby	24	230	1,5	10	-	0	2,00E+06	95%		
401	3	tuby	24	230	1,5	10	-	0	3,50E+06	90%		
401	3	tuby	24	230	1,5	10	-	0	2,44E+06	88%		
391	1	tuby	96	230	1,5	10	-	0	2,50E+06	96%		
391	1	tuby	96	230	1,5	10	-	0	3,20E+06	94%		
394	2	tuby	96	230	1,5	10	-	0	4,90E+06	92%		
394	2	tuby	96	230	1,5	10	-	0	4,80E+06	91%		
401	3	tuby	96	230	1,5	10	-	0	1,36E+06	43%		
401	3	tuby	96	230	1,5	10	-	0	2,20E+06	56%		
391	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,75E+06	96%		
391	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,80E+06	93%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,33E+06	83%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,40E+06	80%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,83E+06	98%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	1	1,75E+06	97%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	2,40E+06	100%	23%	
391	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	2,35E+06	100%	50%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	7,00E+06	90%	31%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	2,80E+06	95%	27%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	2,50E+06	97%	29%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	1	3,64E+06	98%	43%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	1,70E+06	89%	39%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	3,30E+06	87%	41%	
394	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	4,20E+06	98%	21%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
394	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	4,15E+06	95%	22%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	7,50E+06	81%	13%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	1	9,00E+06	78%	11%	
391	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	1,33E+06	91%		
391	1	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	1,40E+06	90%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	7,33E+05	77%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	1,00E+06	80%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	1,48E+06	93%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	CTRP4	0	1,55E+06	90%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	2,42E+06	80%	8%	
391	1	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	1,30E+06	87%	9%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	4,40E+05	81%	11%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	8,10E+05	62%	18%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	5,00E+05	51%	18%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	CTRP4	0	9,60E+05	55%	11%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	1,24E+06	76%	16%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	2,00E+05	48%	5%	
394	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	3,00E+05	43%	14%	
394	2	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	4,00E+05	50%	10%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	9,00E+05	55%	10%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	CTRP4	0	2,25E+06	47%	5%	
391	1	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	6,67E+05	94%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	9,00E+05	90%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	8,50E+05	80%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	9,20E+05	82%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	1,40E+06	93%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	1	1,20E+06	90%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	2,30E+06	100%	28%	
391	1	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	2,00E+06	100%	30%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
394	2	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	1,00E+06	91%	40%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	8,00E+05	94%	45%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	3,65E+06	98%	46%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	1	2,80E+06	99%	49%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	3,70E+06	93%	33%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	3,20E+06	94%	29%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	2,15E+06	88%	32%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	1,70E+06	89%	44%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	4,00E+06	76%	27%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	1	5,25E+06	77%	18%	
391	1	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	1,38E+06	94%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	1,40E+06	90%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	7,50E+05	64%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	8,50E+05	67%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	1,82E+06	94%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	CTRP4	0	1,60E+06	91%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	1,85E+06	100%	30%	
391	1	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	1,90E+06	90%	25%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	4,50E+05	75%	20%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	1,14E+06	82%	26%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	1,36E+06	91%	40%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	CTRP4	0	1,40E+06	90%	39%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	1,00E+06	36%	11%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	8,00E+05	30%	10%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	7,00E+05	78%	18%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	1,60E+06	84%	16%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	1,95E+06	46%	9%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	CTRP4	0	2,95E+06	42%	7%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
391	1	láhve	4	130	35	400	CTRP4	0	8,33E+05	91%		
391	1	láhve	4	130	35	400	CTRP4	0	9,00E+05	88%		
391	1	láhve	24	130	35	400	CTRP4	0	2,40E+06	100%	48%	
391	1	láhve	24	130	35	400	CTRP4	0	2,00E+06	100%	45%	
391	1	láhve	96	130	35	400	CTRP4	0	3,20E+06	89%	44%	
391	1	láhve	96	130	35	400	CTRP4	0	1,40E+06	67%	36%	
394	2	láhve	4	130	35	400	CTRP4	0	1,67E+06	77%		
394	2	láhve	4	130	35	400	CTRP4	0	1,80E+06	80%		
394	2	láhve	24	130	35	400	CTRP4	0	1,10E+06	85%	57%	
394	2	láhve	24	130	35	400	CTRP4	0	1,00E+06	87%	52%	
394	2	láhve	96	130	35	400	CTRP4	0	2,88E+06	83%	40%	
394	2	láhve	96	130	35	400	CTRP4	0	2,50E+06	83%	38%	
394	1	láhve	4	130	35	400	CTRP4	1	1,17E+06	81%		
394	2	láhve	4	130	35	400	CTRP4	1	1,00E+06	77%		
394	1	láhve	24	130	35	400	CTRP4	1	1,60E+06	89%	31%	
394	2	láhve	24	130	35	400	CTRP4	1	1,80E+06	86%	43%	
394	1	láhve	96	130	35	400	CTRP4	1	1,25E+06	86%	26%	
394	2	láhve	96	130	35	400	CTRP4	1	2,00E+06	87%	38%	
391	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	8,33E+05	94%		7,57
391	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,00E+06	90%		7,45
394	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,54E+06	82%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,80E+06	80%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,60E+06	93%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	1	1,33E+06	90%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,80E+06	100%	39%	7,25
391	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,85E+06	100%	37%	7,44
394	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,80E+06	95%	35%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,75E+06	85%	48%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	1,66E+06	98%	45%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
401	3	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	1	2,24E+06	100%	53%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	2,30E+06	88%	42%	7,15
391	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	3,00E+06	94%	41%	7,36
394	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	1,00E+06	93%	39%	
394	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	1,80E+06	96%	41%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	1,06E+06	84%	70%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	1	1,30E+06	81%	58%	
391	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	1,08E+06	91%		7,16
391	1	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	1,12E+06	90%		7,14
394	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	6,00E+05	78%		
394	2	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	7,10E+05	82%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	1,45E+06	94%		
401	3	desky	4	230	0,5	2	FetuinB	0	1,20E+06	88%		
391	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	1,40E+06	88%	6%	6,95
391	1	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	2,20E+06	92%	2%	6,80
394	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	1,20E+06	92%	14%	
394	2	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	5,00E+05	83%	17%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	1,42E+06	58%	25%	
401	3	desky	24	230	0,5	2	FetuinB	0	1,11E+06	53%	20%	
391	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	1,70E+06	71%	9%	6,32
391	1	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	1,50E+06	54%	3%	6,58
394	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	1,00E+04	1%	0%	
394	2	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	1,00E+04	0%	0%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	1,08E+06	55%	18%	
401	3	desky	96	230	0,5	2	FetuinB	0	8,00E+05	53%	33%	
391	1	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	1,50E+06	96%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	1,43E+06	99%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	1,08E+06	68%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	1,21E+06	71%		

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
401	3	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	1,55E+06	90%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	1	2,04E+06	85%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	2,44E+06	100%	25%	
391	1	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	1,80E+06	100%	28%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	1,80E+06	86%	41%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	1,70E+06	89%	47%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	1,18E+06	98%	35%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	1	1,00E+06	99%	50%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	2,40E+06	92%	28%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	2,50E+06	83%	43%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	1,80E+06	86%	26%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	2,15E+06	81%	19%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	1,18E+06	89%	73%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	1	1,00E+06	86%	72%	
391	1	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	1,33E+06	94%		
391	1	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	1,10E+06	91%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	5,33E+05	79%		
394	2	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	6,30E+05	77%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	1,09E+06	86%		
401	3	tuby	4	230	1,5	10	FetuinB	0	1,00E+06	80%		
391	1	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	3,20E+06	94%	8%	
391	1	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	2,90E+06	100%	34%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	5,00E+05	91%	11%	
394	2	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	2,00E+05	80%	16%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	9,00E+05	96%	55%	
401	3	tuby	24	230	1,5	10	FetuinB	0	1,04E+06	84%	52%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	2,60E+06	94%	9%	
391	1	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	2,30E+06	100%	20%	
394	2	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	2,00E+06	91%	28%	

Číslo pokusu	Opakování pokusu	Kultivační nádoba	Čas (hod)	Otáčky (rpm)	Transfekční objem (ml)	Produkční objem (ml)	DNA	CO2	Počet živých buněk	Viabilita	GFP	pH
394	2	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	1,04E+06	80%	35%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	1,60E+06	57%	46%	
401	3	tuby	96	230	1,5	10	FetuinB	0	1,20E+06	57%	44%	