

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Školitel: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Michaela Beranová

Studentka: Petra Grossová

Název diplomové práce: Příprava konjugátů oligonukleotidových sond s funkčními molekulami

Cílem této diplomové práce bylo najít optimální podmínky konjugace oligonukleotidu s fluorescenčním barvivem pomocí click chemie na pevné fázi. Za značící molekulu bylo vybráno tradiční fluorescenční barvivo Cyanine5. Byl sledován vliv použité koncentrace fluorescenčního barviva, pozice značení, pevné fáze a doby reakce. Byly optimalizovány podmínky deprotektce.

Byly provedeny 2 série reakcí s následnou deprotektí a čištěním. Efektivita reakce byla vyhodnocována porovnáním ploch pod křivkou píků konjugovaných a nekonjugovaných molekul v chromatogramech vzorků po analýze metodou HPLC s UV detekcí. Integrace píků byla provedena v programu LabSolutions.

Nejvyšší výtěžnost poskytovaly reakce probíhající na polystyrenové pevné fázi, a to při značení na všech pozicích řetězce. Pro značení na 5'-konci řetězce bylo dosaženo více než 90% výtěžnosti při použití všech námi testovaných pevných fází. Dále bylo zjištěno, že pro click reakci postačuje koncentrace fluorescenčního barviva 100× nižší, než je běžně používaná. Doba reakce může být výrazně kratší, než standardních 24 hodin. Reakce dosahovala již po 10 minutách 94% výtěžnosti (5'-CPG500Å, 1mM Cy5), nicméně maximální výtěžnosti je dosaženo mezi 1-12 hodinami. Pro konkrétnější určení je třeba provést důkladnější kinetickou studii.

Klíčová slova: oligonukleotidové sondy, fluorescenční barvivo, click chemie