

Charakterizace proteinů Paracoccus denitrificans s předpokládanou funkcí monooxygenasy

Ústav Biochemie (A5)

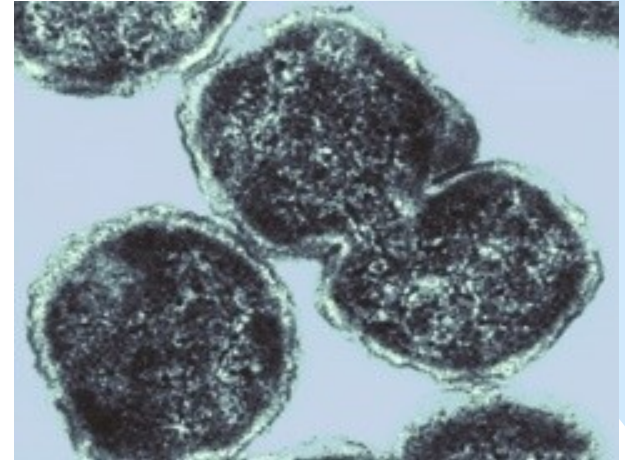
Vedúci: prof. RNDr. Igor Kučera, DrSc.

Konzultant: Mgr. Vojtěch Sedláček, Ph.D.

Martin Olbert

Paracoccus denitrificans

- G⁻ baktérie
- aeróbne aj anaeróbne podmienky
- rozmanité substráty: methanol, vodík, síra...
- denitrifikačné vlastnosti
- hypergravitácia



zdroj:
<http://genome.jgi.doe.gov/parde/>

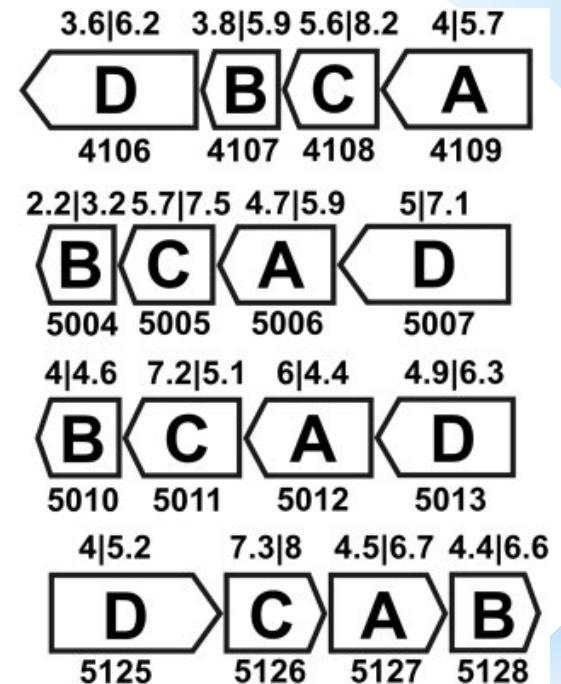
Denitrifikácia

- anaeróbne podmienky (bez O_2 za prít. NO)
- redukcia z dusičnanov na dusík:
 $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$
- 4 reductázy potrebné k reakcii
- využitie v biotech., odstraňovanie NO_2^- z pitnej vody

Oxidačný stres

- ROS
- FerB - cytoplazmatický flavoproteín
- FnrP transk. faktor rozložený ROS
- N₂O reduktáza (prerušená denitrifikácia)

- prestáva využívanie síry bunkou
- aktivácia génov pre monooxygenázy
- vstupujú do boja proti oxidačnému stresu



zdroj:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391915002201>

Ciel' práce

- expresia génov pre tvorbu monooxygenáz
- exprimovanie 4 génov: 4106/5007/5013/5125
- zistenie štruktúry, popis vlastností

Postup práce

- izolácia cDNA *P. Denitrificans*
- izolácia génov reštriktázami
- amplifikácia PCR
- vkladanie do vektora pGEM, transformácia do kmeňa *E.Coli* a kontrola inzercie

- vloženie do vektora pET21, ligácia
- vloženiu vektora pET21 s génom do kompetentných E.Coli a kontrola inzercie
- preklonovanie plasmidu do expresného kmeňa E.Coli BL21
- expresia a izolácia proteínov pomocou afinitnej chromatografie

4106 - pET21 - exprimuje, pokus o purifikáciu

5007 - pET21 - neexprimuje

5013 do pET21 vligovať

5125 do pGEM vligovať

Ďakujem za pozornosť