



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

**Charakterystyka białka PpERL1 z
Physcomitrella patens pod kątem aktywności
cyklaz adenylanowej i guanylanowej.**

Klaudia Hammer

Biotechnologia II rok II st.

Opiekun naukowy: dr Brygida Świeżawska-Boniecka

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

07.05.2021



Cel pracy

Celem pracy była biosynteza białka PpERL1 z *Physcomitrella patens* w prokariotycznym systemie ekspresyjnym, jego oczyszczanie i charakterystyka pod kątem aktywności cyklaz adenylanowej i/lub guanylanowej.

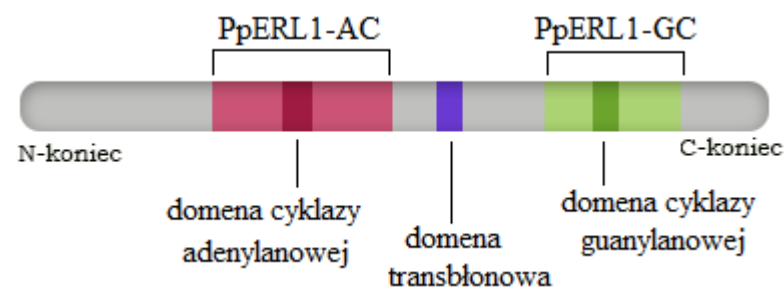
Materiały

- ⊙ **Materiał badawczy: *Physcomitrella patens* (czareczka otwarta)**

Mszak należący do rodziny skrętkowatych (Funariaceae). Posiada niewielki genom, wielkości 500 Mpz. Charakteryzuje się szybkim wzrostem, również w *warunkach in vitro*, dlatego wykorzystywany jest jako organizm modelowy w badaniach laboratoryjnych.

- ⊙ **Badane białko: PpERL1**

W celu zbadania zdolności enzymatycznej do wektora ekspresyjnego wklonowano sekwencje kodujące wybrane fragmenty białka PpERL1.



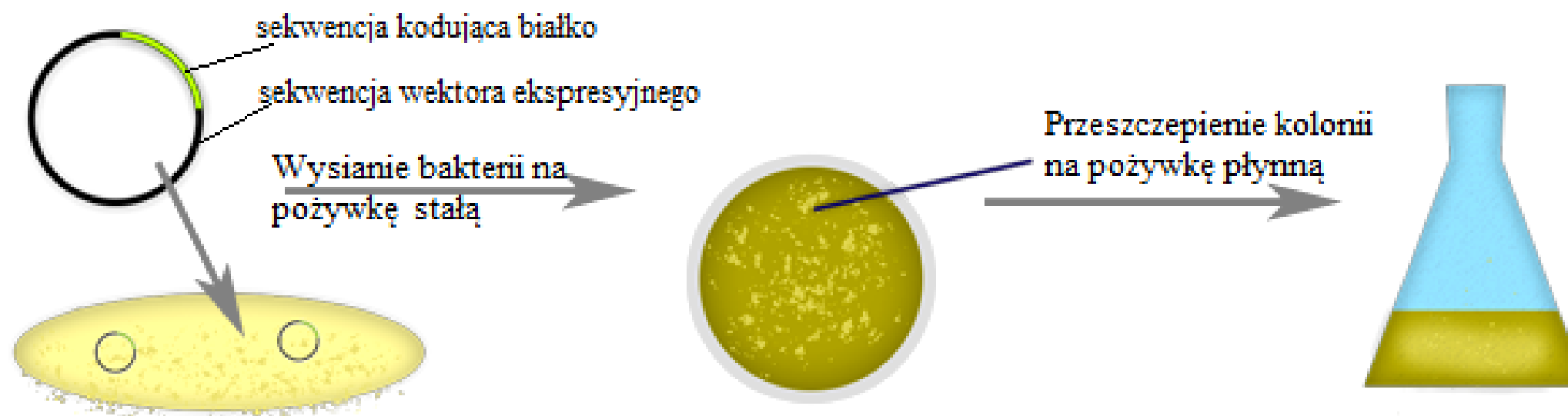
Ryc. 1. Budowa białka PpERL1.

Sekwencja PpERL1-AC koduje białko zawierające potencjalną domenę katalityczną cyklazy adenylanowej.

Sekwencja PpERL1-GC koduje białko zawierające potencjalną domenę katalityczną cyklazy guanylanowej.

Metody

⊙ Biosynteza białek w bakteriach *Escherichia coli*.



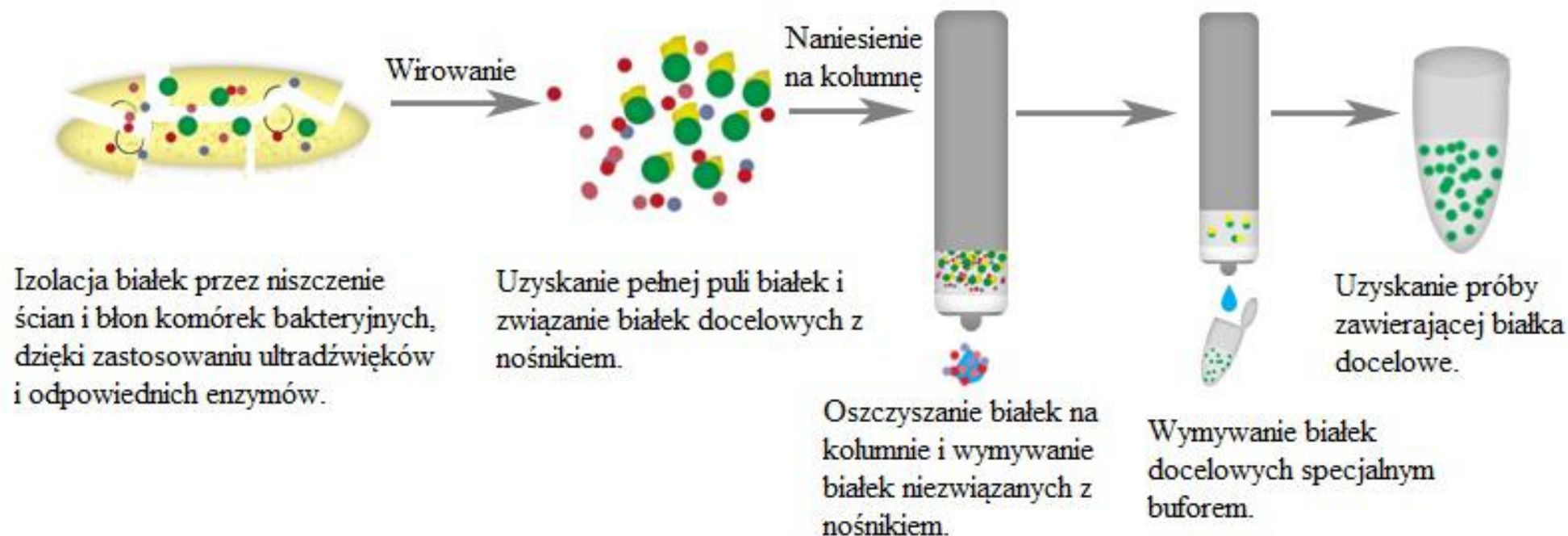
Wklonowanie do *E. coli* wektora wraz sekwencją kodującą białko

Hodowla bakterii na pożywce stałej

Biosynteza białka w hodowli bakteryjnej na pożywce płynnej

Metody

⊙ Oczyszczanie białek.



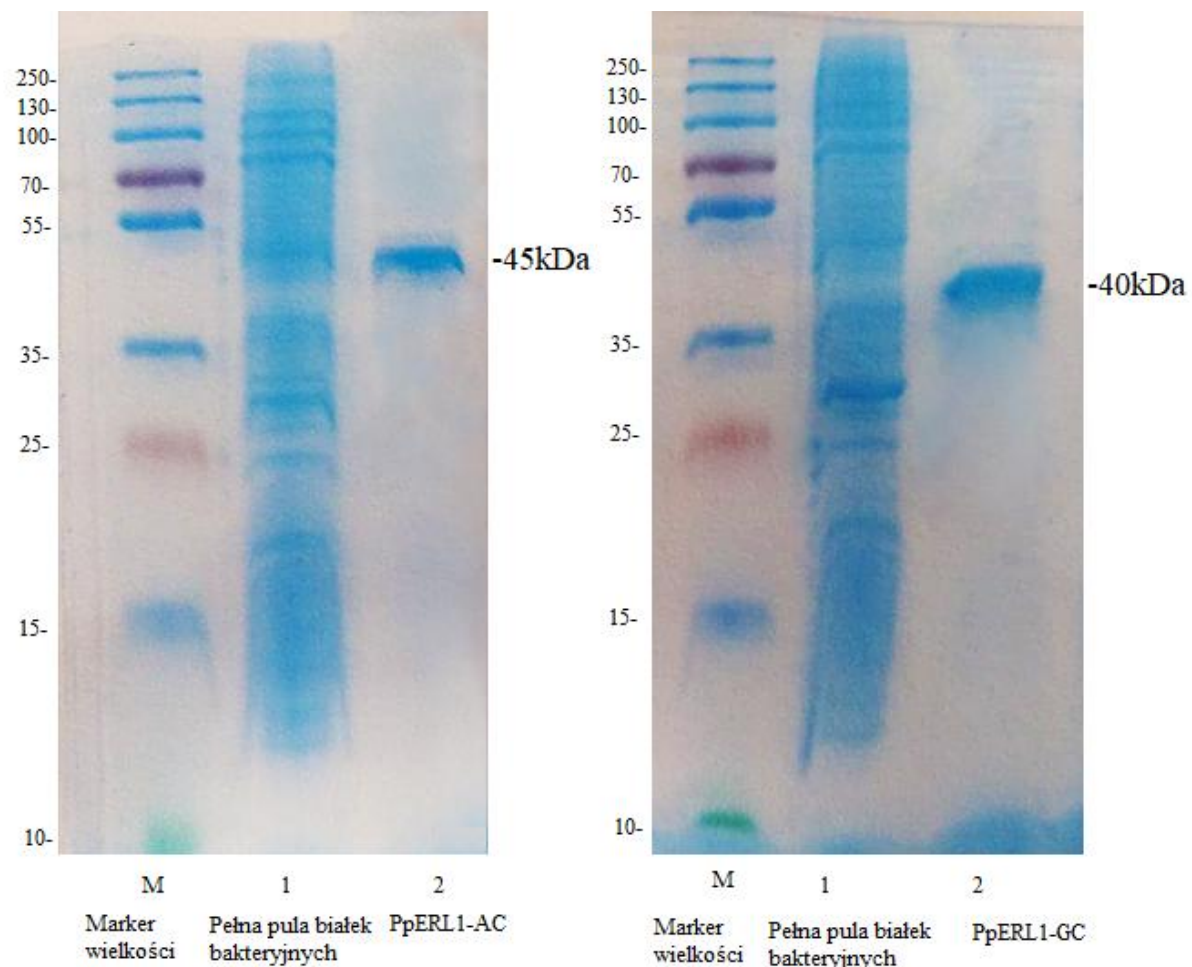
⊙ Badanie aktywności enzymatycznej białek PpERL1-AC i PpERL1-GC – identyfikacja produktów reakcji techniką LC-MS.

5 LC-MS służy do rozdziału substancji w mieszaninie oraz badania ich mas cząsteczkowych.



Wyniki

© W celu zbadania wielkości uzyskanych białek przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS.



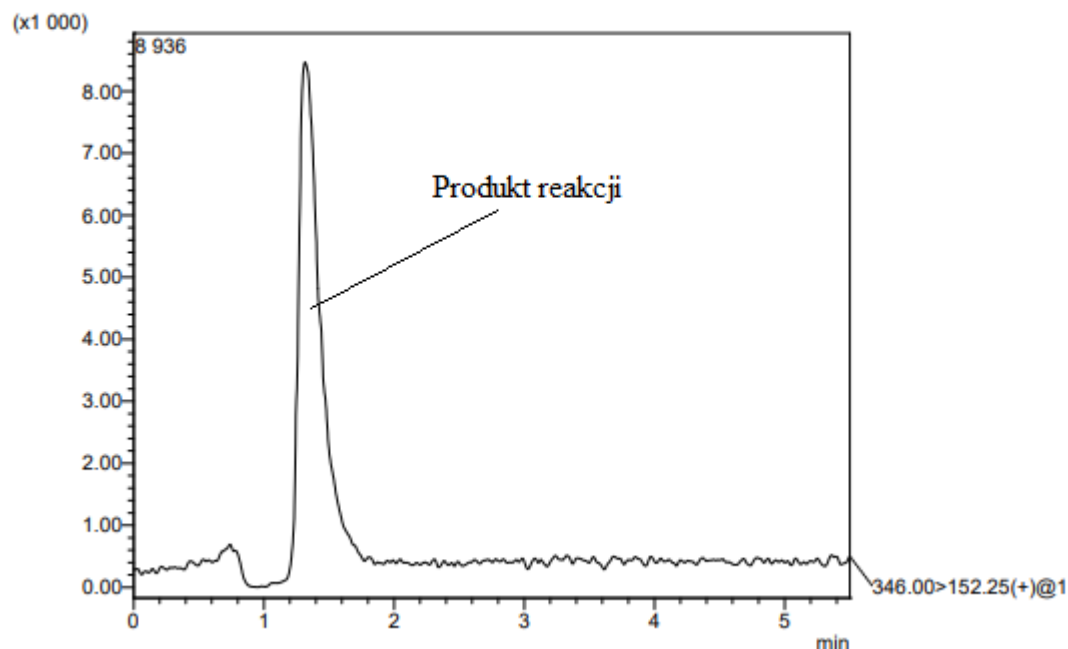
Białka widoczne jako prążki znajdują się na przewidywanych wcześniej wysokościach.



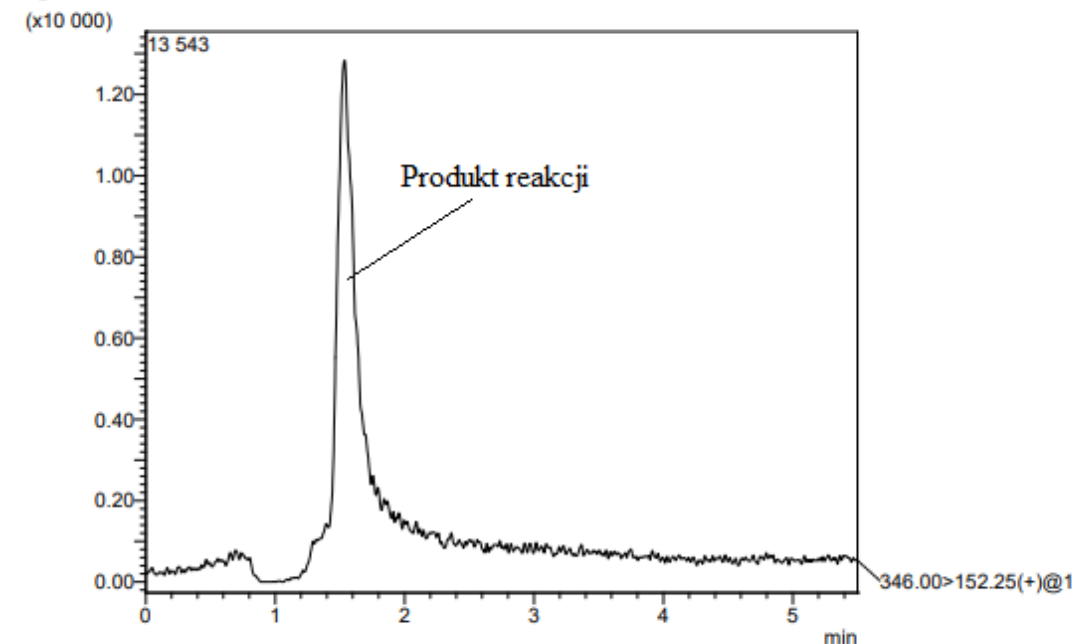
Wyniki

⊙ Analiza aktywności enzymatycznej białek.

PpERL1-AC



PpERL1-GC



⊙ Powstałe piki informują o obecności produktów powstałych w wyniku
7 reakcji.



Wnioski

- 1. Masy białek PpERL1-AC oraz PpERL1-GC są zgodne z przewidywaniami, co potwierdza poprawność procesu klonowania oraz biosyntezy.**
- 2. Badanie aktywności enzymatycznej białek PpERL1-AC i PpERL1-GC potwierdza ich zdolność katalityczną odpowiednio cyklazy adenylanowej i cyklazy guanylanowej.**
- 3. Białko PpERL1 wykazuje aktywność katalityczną zarówno cyklazy adenylanowej, jak i cyklazy guanylanowej.**