

ZÁPIS PRŮBĚHU OBHAJOBY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

JANY DOBRŮŠKOVÉ

Název práce: Příprava rekombinantní AtIPT7 v expresním systému *Saccharomyces cerevisiae* za účelem prenylace enzymu

Studentka Jana Dobrušková prezentovala svou bakalářskou práci. Poté byl přečten posudek vedoucí práce, který neobsahoval dotazy. Dále byl přečten posudek oponentky včetně dotazů a studentka na dotazy odpověděla následovně:

otázka 1: Výrobce expresního vektoru pYES2 uvádí, že je možné ho použít pro transformaci do *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Jaké výhody má použití klonovacího vektoru pDrive?

odpověď: Vektor pDrive poskytuje možnost white/blue screening testu, pro snadnou selekci pozitivních transformantů. Dále je možnost sekvenace plasmidové DNA při použití primerů pro T7 a SP6 promotor, která je účinnější, než sekvenace PCR produktu. U sekvenace amplifikovaného genu zaklonovaného do pDrive navíc není nutné dodávat vlastní primery.

otázka 2: Proč byla k detekci aktivit AtIPT7 použita metoda ELISA? Lze použít i jiné uspořádání? Dle Takei et al. 2001 uvádíte, že při expresi různých AtIPT (včetně AtIPT7) v *E. coli* docházelo ke zvýšení hladiny cytokininů. Měřila jste hladinu cytokininů i ve Vašich vzorcích (pokud k tomu máte možnosti)?

odpověď: Metoda ELISA byla použita proto, že aktivitu enzymů stanovovala dr. Gemrotová (konzultantka mé bc práce) z LRR UP Olomouc a tato metoda je zde běžně používanou metodou stanovení aktivity enzymů. Další možností je použití metody uvedené v práci Takei et al. Z roku 2001, kdy isopentenyltransferasy byly inkubovány se substrátem a donorem isopentenylu DMAPP – produkt reakce byl následně detekován pomocí HPLC a retenčního času. Hladinu cytokininů jsem během mé práce nestanovovala, i když k tomu mám možnost. Vzhledem k předchozím výsledkům, kdy nebyly detekovány rekombinantní proteiny, ani nebyla detekována jejich aktivita, je to navíc bezvýznamné.

otázka 3: Dle Takei et al. 2001 máte v diskuzi zmínku, že AtIPT (kromě 1) ztratily při purifikaci isopentenyltransferasové aktivity. Myslíte, že došlo pouze ke ztrátě aktivity nebo k celkové degradaci enzymu? Může to být stejný problém jako ve Vašem případě?

odpověď: Vzhledem k tomu, že jistá aktivita byla naměřena v extraktech IPT pomocí radioisotopové analýzy, ale již ne u purifikovaných enzymů pomocí metody uvedené v předchozí otázce, je téměř jisté, že došlo pouze ke ztrátě aktivity purifikací.

V našem případě mohlo dojít k degradaci enzymu, taktéž mohlo dojít ke ztrátě aktivity, jako tomu bylo u Takei et al., ale toto není jisté, jelikož v našem případě byla aktivita stanovována v extraktech, kde detekována nebyla. Spíše mohlo dojít ke špatnému sbalení proteinů, které mohlo způsobit jeho neaktivitu. Jak už jsem uvedla dříve, tento problém může vyřešit optimalizace kultivačních podmínek.

Dotazy členů komise:

prof. Brabec: Při jaké vlnové délce absorbuje DNA a proč se při stanovení koncentrace DNA měří absorbance při dvou vlnových délkách?

odpověď: DNA absorbuje při 260 nm, druhá vlnová délka (280 nm) se používá pro odečtení „pozadí“, resp. odečtení absorpance proteinů přítomných ve vzorku.

prof. Brabec: Který typ (tvar) DNA se při elektroforéze pohybuje nejrychleji?

odpověď: Superhelikální.

Další dotazy:

prof. Nauš: Co je to molarita?

odpověď: Je to množství látky v molech v objemu roztoku.

zapsala: M. Špundová