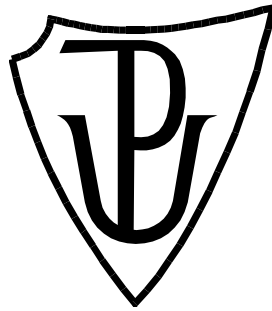


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Izolace protoplastů a vakuol u jednoděložných rostlin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Karolina Šenková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Jiskrová
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 31. 7. 2014

Děkuji své vedoucí Mgr. Evě Jiskrové za věnovaný čas, spolehlivost, trpělivost, odborné vedení, vysvětlení problematiky, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce. Děkuji také všem zaměstnancům a studentům Oddělení molekulární biologie, kteří mi jakkoli pomohli.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolina Šenková
Název práce	Izolace protoplastů a vakuol u jednoděložných rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Eva Jiskrová
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Ječmen (*Hordeum vulgare*) se řadí mezi nejvýznamnější plodiny světového hospodářství díky svému mnohostrannému využití a genetické rozmanitosti umožňující jeho růst v široké škále ekologických regionů.

Protoplasty jsou útvary zbavené buněčné stěny. Mohou být izolovány z mnoha částí rostlin a z buněčných kultur. Slouží ke studiu membránového transportu, regulace metabolismu, exprese genů a mapování proteinů. Vakuoly plní v rostlinách různé funkce, udržují homeostázu, jsou zde skladovány živiny, proteiny a sekundární metabolity; probíhají v nich signalizační a detoxifikační procesy. Jsou využívány pro výzkum metabolitů a látek transportovaných přes membránu.

Tato práce se zabývá nalezením ideálních podmínek pro získání protoplastů a vakuol z ječmene.

V teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se významem ječmene v hospodářství, vlastnostmi protoplastů a vakuol, jejich izolací a dalším využitím. V experimentální části byla optimalizována metoda – zejména osmotické vlastnosti roztoků a poměr enzymů pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene. Čistota odebraných frakcí protoplastů a vakuol byla následně potvrzena pomocí western blotu a imunodetekce s protilátkami V-ATPasou pro tonoplast a Xet5 pro buněčnou stěnu.

Klíčová slova	<i>Hordeum vulgare</i> , protoplasty, vakuoly
Počet stran	56
Počet příloh	1
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Karolina Šenková
Title	Isolation of protoplasts and vacuoles in monocot plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Molecular Biology, Palacký University Olomouc, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Eva Jiskrová
The year of presentation	2014

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare*) belongs to the most important crops of the world economy thanks to its versatile usage and genetic diversity enabling the growth in a wide range of ecological regions.

The protoplasts are structures free of cell wall. They can be isolated from many parts of plant and cell cultures. They serve for the study of membrane transport, regulation of metabolism, gene expression and protein mapping. Vacuoles fulfill various functions in plants. They maintain homeostasis; nutrients, proteins and secondary metabolites are stored there; signaling and detoxification processes take their place there. They are used to research metabolites and substances that are transported across membrane.

This work is concerned with finding the ideal conditions for obtaining protoplasts and vacuoles of barley.

In the theoretical part a review dealing with the significance of barley for economy, properties of protoplasts and vacuoles, their isolation and further use, was written. In the experimental part a method – particularly the osmotic characteristics of solutions and the ratio of enzymes for the isolation of protoplasts and vacuoles from barley were optimized. The purity of fractions of protoplasts and vacuoles was confirmed by western blotting and immunodetection with the antibodies V-ATPase for tonoplast and Xet5 for cell wall.

Keywords	<i>Hordeum vulgare</i> , protoplasts, vacuoles
Number of pages	56
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Jednoděložné rostliny	2
2.1.1	Šlechtění a genetické úpravy	2
2.1.2	Rozšíření geneticky modifikovaných plodin	3
2.2	<i>Hordeum vulgare</i> L.	5
2.2.1	Taxonomické zařazení	5
2.2.2	<i>Hordeum vulgare</i> L.	5
2.2.2.1	Genom ječmene	6
2.2.2.2	Ječmen jako modelový organismus	6
2.3	Rostlinná buňka	7
2.4	Protoplasty	8
2.4.1	Výchozí materiál pro izolaci protoplastů	9
2.4.2	Izolace protoplastů	10
2.4.3	Využití izolovaných protoplastů	11
2.4.3.1	Transformace	11
2.4.3.2	Patch clamp experimenty	12
2.4.3.3	Proteomika	13
2.5	Vakuoly	13
2.5.1	Izolace vakuol	15
2.5.2	Využití izolovaných vakuol	15
2.5.2.1	Transport látek přes tonoplast	16
2.5.2.2	Degradační pochody	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1	Materiál	18
3.1.1	Biologický materiál	18
3.1.2	Chemikálie a pomůcky	18
3.1.3	Roztoky	20
3.1.3.1	Roztoky pro pěstování ječmene	20
3.1.3.2	Roztoky pro základní izolaci protoplastů a vakuol	20
3.1.3.3	Roztoky pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene	21
3.1.3.4	Roztoky pro SDS-PAGE	21
3.1.3.5	Roztoky pro western blot a imunodetekci	22
3.1.4	Přístroje	23
3.2	Metody	23
3.2.1	Příprava rostlinného materiálu	23
3.2.2	Základní postup izolace protoplastů	23
3.2.3	Základní postup izolace vakuol	24
3.2.4	Optimalizace podmínek	24

3.2.4.1	Změna osmotických podmínek prostředí	24
3.2.4.2	Inkubační teplota a doba	25
3.2.4.3	Složení lyzačního pufru	25
3.2.4.4	Složení gradientu	26
3.2.5	Izolace protoplastů z ječmene	26
3.2.6	Izolace vakuol z ječmene	26
3.2.7	Zahuštění a měření celkové koncentrace proteinů	27
3.2.8	SDS-PAGE	27
3.2.9	Western blot a imunodetekce	28
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1	Izolace protoplastů a vakuol z <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
4.2	Složení enzymatického roztoku	30
4.2.1	Koncentrace manitolu	30
4.2.2	Množství CaCl ₂	31
4.2.3	Množství celulasy	32
4.3	Inkubační doba a teplota	33
4.4	Složení lyzačního roztoku a uvolnění vakuol	33
4.5	Potvrzení čistoty izolovaných vakuol pomocí western blotu	38
5	ZÁVĚR	40
6	LITERATURA	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	45
8	PŘÍLOHY	46
8.1	Stručný protokol pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene	46

1 ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare*) patří mezi jednoděložné rostliny a je čtvrtou nejpěstovanější obilovinou na světě. Jeho využití je mnohostranné – v pivovarnictví a destilačním průmyslu, jako složka krmiva zvířat a také tvoří nepostradatelnou součást lidského jídelníčku. Vysoká genetická rozmanitost a všestranná odolnost umožňuje jeho pěstování v rozličných podnebných oblastech od polárních částí světa po subtropickou Afriku.

Protoplasty rostlin představují unikátní systém útvarů bez buněčné stěny. V současnosti je možné izolovat je z rozličných jednoděložných i dvouděložných rostlin a jejich částí, a to z pletiva listu, okvětních lístků, sazenic i buněčných suspenzí. Mechanické procedury jako krájení pletiva a odstraňování epidermis jsou následovány enzymatickým rozložením buněčné stěny. Protoplasty jsou cenným nástrojem pro studium membránového transportu, regulace metabolismu, mapování proteinů a exprese genů. Jejich největší potenciál je v genetickém inženýrství a procesech šlechtění.

Rostlinná buňka obsahuje velkou centrální vakuolu a mnoho menších v různých stádiích vývoje. Vakuola zastává rozličné funkce – udržuje a upravuje turgor a pH, jsou zde skladovány proteiny, živiny a sekundární metabolity; probíhají tu detoxifikační a signalizační procesy. Získat vakuoly v čisté formě je poměrně složité, protože jsou extrémně citlivé na změny podmínek v průběhu izolace. Uvolnění intaktních vakuol lze docílit působením lyzačního roztoku a mechanického tlaku na protoplasty. Významné je studium látek transportovaných přes tonoplast a metabolitů nacházejících se ve vakuole jako jsou aminokyseliny, organické kyseliny, cukry, vitaminy, hormony a flavonoidy.

Cílem této bakalářské práce je v teoretické části zpracovat literární rešerši na téma ječmen v hospodářství; vlastnosti, izolace a využití protoplastů a vakuol. Praktická část je zaměřena na optimalizaci metodiky pro izolaci protoplastů a vakuol u jednoděložných rostlin, zvláště u ječmene a následné ověření čistoty získaných frakcí pomocí metody western blot.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Jednoděložné rostliny

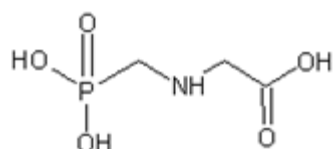
Třída jednoděložných rostlin obsahuje mnoho zemědělsky významných druhů jako kukuřici (*Zea mays* L.), pšenici (*Triticum aestivum* L.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.) a rýži (*Oryza sativa* L.). V globálním měřítku jsou obiloviny pěstovány na 700 milionech hektarů a tvoří přes 40 % energetického příjmu proteinů v lidské stravě. Přispívají tudíž zásadně k zajištění základních živin a tím k růstu populace (Dunwell, 2014).

2.1.1 Šlechtění a genetické úpravy

Lidstvo hraje aktivní roli při šlechtění původních odrůd obilovin už od raných dob zemědělství, což je více než 10 000 let. Možnosti prvních farmářů byly poměrně omezené, vybírali nejlepší rostliny vizuálně podle posouzení jejich vlastností (Wang *et al.*, 1999). Postupný rozvoj šlechtění zrychlil s přibývajícimi vědeckými objevy a poznatky. S objevem mendelovské genetiky vzrostlo pochopení funkce genů podmiňujících fenotypy a selekce se tak stala systematictější (Hartl a Orel, 1992).

Moderní zemědělství s velkými plochami monokultur poskytuje ideální prostředí pro rozvoj a šíření škůdců, plevelů a nemocí. Vznikají tak odolné druhy, které mohou zničit celou úrodu. I přes existující ochranu je roční ztráta kolem jedné třetiny. Zatímco tradiční způsoby šlechtění jsou omezeny možnostmi i časem, techniky genetické modifikace umožňují cílenou a několikanásobnou ochranu obilovin před různými škůdci. Na geneticky modifikované rostliny není třeba aplikovat pesticidy a umožňují tak efektivnější využití půdy (Bruce, 2012). Jiné jsou naopak odolné vůči herbicidům.

Příkladem herbicidu je glyfosát (N-(fosfonomethyl)glycin; Obr. 1), který je světově nejprodávanější agrochemikálií. Od uvedení přípravku Roundup od firmy Monsanto na trh na počátku 70. let změnila tato chemikálie v mnoha úpravách globální zemědělství.



Obr. 1: Strukturní vzorec glyfosátu, účinné látky Roundupu

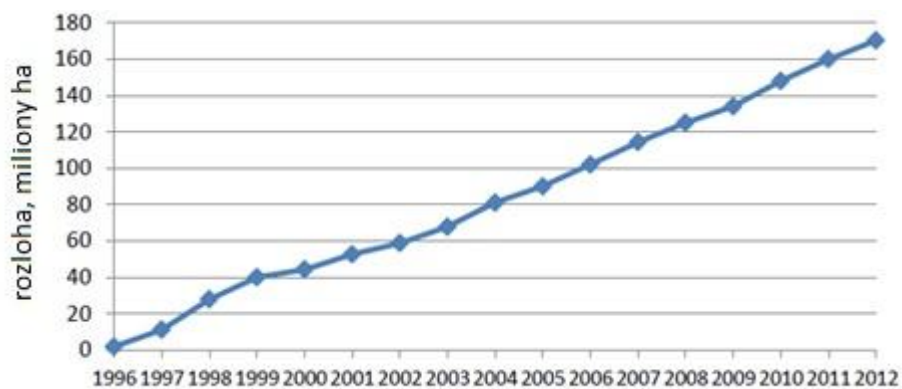
Disponuje mnoha silnými stránkami, zejména systémovostí a schopností ničit vytrvalé druhy plevelů, což zapříčinilo jeho zásadní roli v moderním zemědělství. Glyfosát je mimořádně efektivní herbicid a představuje značnou výzvu pro vývoj nových přípravků určených pro udržitelné pěstování obilovin, vyžadující efektivní a ekologicky šetrnou regulaci plevelu (Baylis, 2000).

Rozšíření sóji odolné vůči glyfosátu v roce 1996 znamenalo počátek nové éry v oblasti regulace plevelu. Od té doby byly transformovány kukuřice, bavlna, řepka a laskavec (Dill, 2005; Norsworthy *et al.*, 2014). V roce 2010 bylo 70 % kukuřice pěstované v USA rezistentní vůči glyfosátu, u sóji se jednalo dokonce o 93 % a u bavlny o 78 %. Nevýhodou ovšem je, že masivní použití postřiků vede na druhou stranu ke vzniku odolných druhů plevelu (Beckie, 2011).

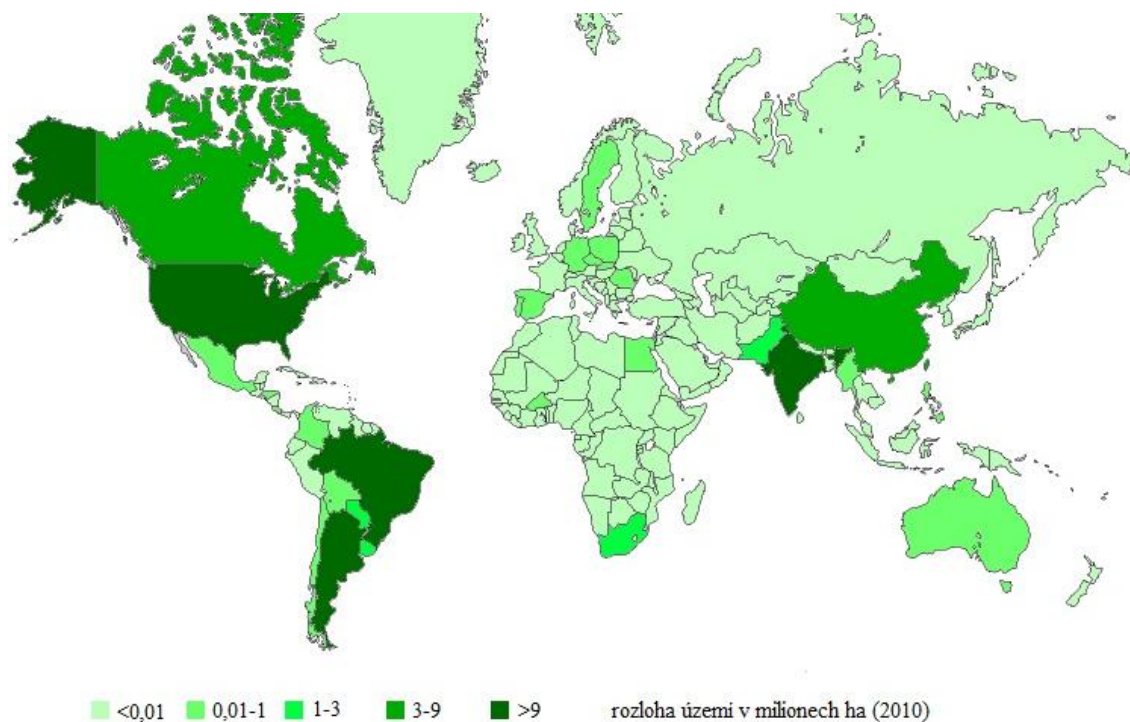
Dalším rizikem je možný přenos genů z transgenních rostlin na divoce rostoucí, což může těmto rostlinám poskytnout v určitých oblastech selektivní výhodu vůči herbicidům nebo hmyzu. Přenos genů z plodin na příbuzné divoce žijící druhy se objevil i v dobách před genetickými manipulacemi a je tudíž třeba vzít jej v úvahu při hodnocení rizik (Chandler a Dunwell, 2008).

2.1.2 Rozšíření geneticky modifikovaných plodin

Pěstování geneticky modifikovaných obilovin přineslo značné ekonomické i ekologické výhody. Rozloha území, na kterém jsou GM plodiny pěstovány, vzrostla 94násobně, z 1,7 milionu hektarů v roce 1996 na 160 milionů hektarů v roce 2011 (Obr. 2). Počet zemí dovolujících pěstovat geneticky modifikované potraviny se zvýšil na 29 (Chen a Lin, 2013). Největší plocha osázená GM rostlinami připadá na Severní a Jižní Ameriku a Asii, jak je patrné z Obr. 3.



Obr. 2: Vývoj velikosti území osazeného GM plodinami
 (http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/topics/LLP/AGD803_3_Final_En.pdf,
 upraveno)



Obr. 3: Mapa oblastí, kde se pěstují GM plodiny
 (<http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e04d.pdf>, upraveno)

2.2 *Hordeum vulgare* L.

2.2.1 Taxonomické zařazení

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	lipnicotvaré (<i>Poales</i>)
Čeleď:	lipnicovité (<i>Poaceae</i>)
Rod:	ječmen (<i>Hordeum</i>)
Druh:	ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)

2.2.2 *Hordeum vulgare* L.

Ječmen je jednou z prvních domestikovaných obilovin. Je základní a dnes celosvětově čtvrtou nejrozšířenější plodinou zemědělství po kukuřici, rýži a pšenici (Schulte *et al.*, 2009). Je využíván v pivovarnictví a destilačním průmyslu jako slad, slouží jako přídatná složka krmiva pro zvířata a je nepostradatelnou součástí lidského jídelníčku.

Vysoká genetická rozmanitost umožňuje existenci kultivarů tolerantních na chlad, zvýšenou slanost, sucho a zásadité půdy, tudíž je možné pěstovat ječmen v rozmanitých ekologických regionech po celém světě od oblastí kolem polárního kruhu po subsaharskou Afriku (Mrízová *et al.*, 2014). Je prokázána existence 317 divokých a 57 kultivovaných linií (Badr *et al.*, 2000).

Ječmen si zachovává dobré výnosy i v tvrdých podmínkách, tudíž zůstává významným zdrojem jídla v chudších zemích. V rozvinutějších společnostech byl klasifikován jako funkční potravina. Zrna ječmene obsahují vysoké dávky rozpustné vlákniny, která výrazně snižuje riziko vzniku závažných onemocnění, zahrnujících diabetes II. typu, kardiovaskulární onemocnění a rakovinu tlustého střeva, které postihují stovky milionů lidí po celém světě (Collins *et al.*, 2010).

2.2.2.1 Genom ječmene

Ječmen je přirozeně diploidní, má nízké chromozomové číslo ($2n=14$), rozsáhlý genom o velikosti 5,1 Gb a je snadno křížitelný (Saisho a Takeda, 2011). Pro srovnání velikost genomu pšenice (17 Gb) je víc než třikrát rozsáhlejší (Bennet a Smith, 1976), *Arabidopsis thaliana* (125 Mb; Kaul *et al.*, 2000) a rýže (389 Mb) mnohonásobně menší (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Sekvence celého genomu ječmene vedla k mnoha novým objevům. Bylo identifikováno 26 159 genů vykazujících vysokou shodu s jinými rostlinnými genomy a 53 220 genů s nízkou homologií. Pro genom ječmene je charakteristický hojný obsah repetitivních sekvencí, přibližně 84 % tvoří mobilní prvky (transpozony) a podobné struktury. Tato data otvírají nové možnosti studia ječmene pomocí genomiky, metabolomiky a proteomiky (Mayer *et al.*, 2012).

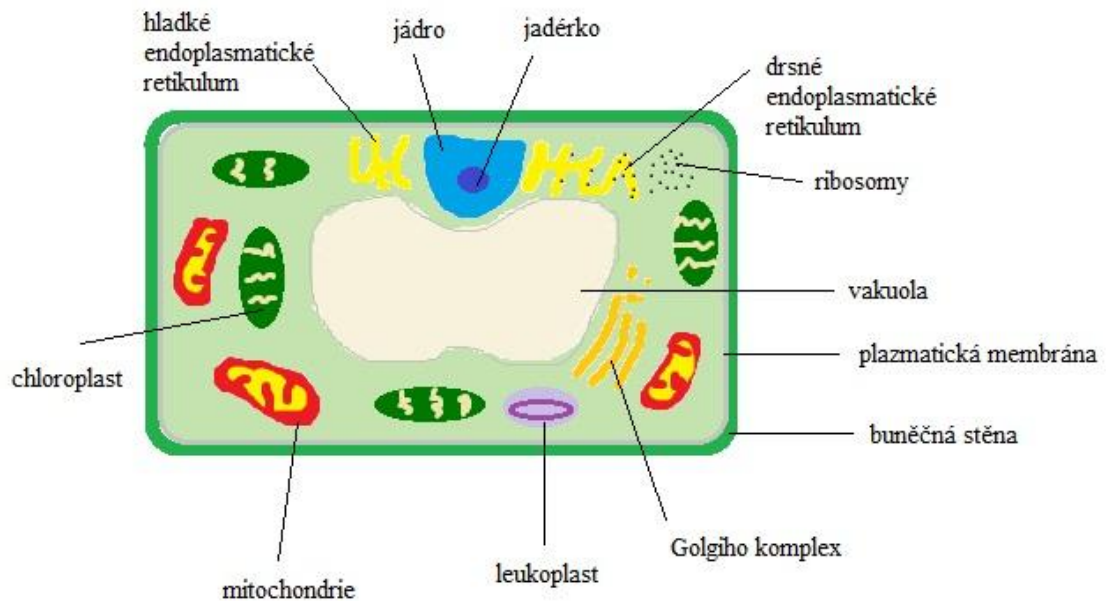
Prioritně se výzkumníci zabývají rezistencí vůči abiotickému stresu, což zahrnuje slanost půdy, teplotu, sucho a příjem živin (Saeed *et al.*, 2012) i biotickému stresu způsobenému jinými živými organismy a patogeny (Dreher a Callis, 2007).

2.2.2.2 Ječmen jako modelový organismus

Ječmen je využíván jako modelový organismus kvůli podobnosti svého genomu s genomy ostatních obilovin. Genetické transformace umožňují rozšíření znalostí v oblasti přímé změny genové exprese následované zkoumáním funkce genu pozorováním fenotypu.

Oblast výzkumu se zaměřuje na nemoci jako rez travní (*Puccinia graminis* L.) a padlí travní (*Blumeria graminis hordei* L.) a přizpůsobivost těchto patogenů (Hensel *et al.*, 2008). Genetické transformace měnící expresi genů zapojených do průběhu nákazy vedou k lepšímu porozumění probíhajících mechanismů, a tak umožňují produkci ječmene schopného odolat napadení patogenem (Kogel a Langen, 2005).

2.3 Rostlinná buňka



Obr. 4: Schéma rostlinné buňky

Rostlinná buňka (Obr. 4) se řadí mezi eukaryotické buňky, vykazuje však i mnoho charakteristických rysů, jimiž se liší od buňky živočišné, jako je přítomnost buněčné stěny, plastidů a vakuol. Zásobními látkami jsou škrob a oleje. Dalšími znaky jsou autotrofní výživa a neukončený růst.

Nejvýznamnějším znakem je přítomnost buněčné stěny. Ta je složená z celulosy, hemicelulosy, pektinu a v mnoha případech ligninu. Jejím hlavním úkolem je chránit buňku.

Pod ní se nachází plazmatická membrána, což je tenký polopropustný obal složený z lipidové dvojvrstvy se zakotvenými proteiny. Plazmatická membrána ohraničuje vnitřek buňky od vnějšího prostředí a kontroluje pohyb látek do a ven z buňky.

Většina genetického materiálu je uložena v jádře. To je obklopeno dvěma membránami, nachází se v něm chromatin a jadérko, obsahující velké množství ribozomální RNA.

Na jádro navazuje endoplasmatické retikulum (ER), což je soustava vzájemně propojených membránových cisteren a kanálků. Často bývá napojeno i na Golgiho aparát. Zvětšuje vnitřní povrch buňky, což je výhodné pro průběh metabolických

procesů. Na povrchu drsného ER jsou přisedlé ribozomy, dochází zde k syntéze, úpravě a rozkladu poškozených bílkovin. Hladké ER odstraňuje toxické látky, probíhá zde část metabolismu lipidů a hemu.

Ribozomy jsou ribonukleoproteiny nacházející se ve vysokých počtech v cytoplazmě a také na ER. Probíhá na nich translace, při níž je z řetězce RNA syntetizován polypeptid. Jsou složeny z větší a menší podjednotky.

Dále je v buňce Golgiho komplex, který tvoří soustava buněčných váčků, sloužících k transportu, přechovávání, úpravě bílkovin a exocytóze.

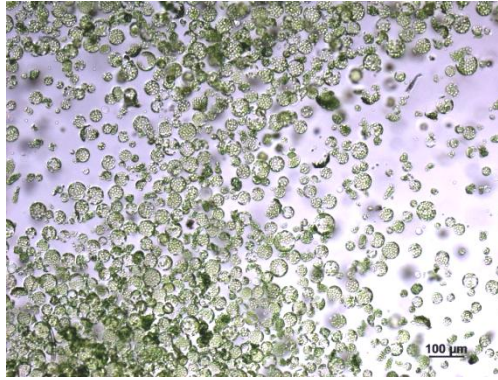
Nepostradatelné plastidy vznikly primární endosymbiózou ze sinic pohlcených heterotrofním eukaryotem. Řadí se mezi ně chloroplasty, obsahující chlorofyl, v nichž probíhá fotosyntéza, amyloplasty obsahující škrob, elaioplasty obsahující tuky a chromoplasty bohaté na barevné pigmenty.

Nedílnou součástí buňky jsou mitochondrie, další endosymbioticky vzniklé organely, v nichž probíhá buněčné dýchání a vzniká tak na energii bohatý ATP, používaný pro průběh mnoha dalších životně důležitých pochodů.

Podstatnou část prostoru buňky zaujímá velká centrální vakuola obklopená membránou zvanou tonoplast. Ta udržuje turgor, kontroluje výměnu molekul, ukládá živiny a zpracovává odpadní látky (Madigan *et al.*, 2000)

2.4 Protoplasty

Rostlinné protoplasty (Obr. 5) představují unikátní systém, umožňující zkoumat mnoho aspektů moderní biotechnologie. Velké pokroky v oblastech genomiky, proteomiky a metabolomiky obnovily zvýšený zájem o tyto křehké útvary bez buněčné stěny. K dispozici jsou spolehlivé postupy pro izolaci protoplastů z široké škály rostlin, a to jednoděložných i dvouděložných (Davey *et al.*, 2005). Vývoj těchto postupů zvýšil všestrannost využití rostlin v biochemickém i genetickém výzkumu. Ty se tak staly nepostradatelnou součástí genetického inženýrství a procesu šlechtění.



Obr. 5: Protoplasty z *A. thaliana* uvolněné po lýzi buněčné stěny

Atraktivitu izolovaných protoplastů reprezentují dva důležité faktory: představují systém jednotlivých buněk, protože každý protoplast je zcela oddělen od ostatních a zadruhé jsou po odstranění buněčné stěny obklopeny pouze cytoplazmatickou membránou. Proto jsou cenným systémem pro řadu různých studií – membránový transport, regulace metabolismu a genová exprese (Krautwig a Lörz, 1995).

Od první úspěšné izolace protoplastů v roce 1960 (Cocking, 1960) došlo k významnému pokroku a mnoha vylepšením izolačních metod. Bylo publikováno mnoho postupů izolace a purifikace protoplastů pro optimalizaci výtěžku u různých rostlinných druhů. Tyto postupy jsou často komplikované, zahrnují mnoho kroků a jsou časově náročné. Navíc jsou využitelné u jednoho nebo jen několika málo rostlinných druhů. Tato omezení mohou být překonána pozměněním existujících podmínek a různou kombinací a množstvím enzymů (Rao a Prakash, 1995).

2.4.1 Výchozí materiál pro izolaci protoplastů

Fyziologický stav pletiva ovlivňuje schopnost uvolňovat životaschopné protoplasty. Sezónním změnám, majícím vliv na reprodukovatelnost izolace, lze předejít pěstováním rostlin *in vitro* ve stálých podmínkách nebo použitím suspenzních kultur.

V současné době mohou být protoplasty izolovány z pletiva listu, okvětních lístků, sazenic a diferenciovaných nebo embryogenních buněčných suspenzí. Poslední jmenované jsou preferovaným zdrojem materiálu pro jednoděložné rostliny, jako jsou obiloviny a banánovník (Assani *et al.*, 2002). Výhodou použití semenáčků je, že protoplasty mohou být izolovány z hypokotylu, děložních lístků, kořenů

i kořenového vlášení a to již po několika dnech od vyklíčení rostlinky (Davey *et al.*, 2005).

První protokol, zabývající se izolací protoplastů (Cocking, 1960) pracoval s kořeny rajčete. Power a Cocking (1970) se dále zabývali také listy tabáku (*Nicotiana tabaccum* L.) o stáří 50-70 dní. Kringstad *et al.* (1980) se zaměřili na izolaci z tučnolistých rostlin (*Crassulacean*). Neobvyklou techniku pro izolaci protoplastů z *Arabidopsis thaliana*, využívající dva druhy lepicí pásky (pro oporu při manipulaci a odstranění spodní epidermis) vypracovali Wu *et al.* (2009). Postupně byly vyvinuty a aplikovány metody pro izolace protoplastů z mnoha jednoděložných i dvouděložných rostlin: huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.), paprika setá (*Capsicum annuum* L.), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.), kukuřice setá (*Zea mays* L.), banánovník (rod *Musa*) a další (Robert *et al.*, 2007; Bloom-Zandstra *et al.*, 1995; Assani *et al.*, 2002; Sheen, 2002; Rao a Prakash, 1995).

2.4.2 Izolace protoplastů

Mechanické procedury, zahrnující krájení materiálu na kousky a odstranění povrchové vrstvy pomocí mořského písku nebo karborunda, jsou samostatně používány jen v případě, že není vyžadováno velké množství protoplastů.

Pokud je třeba mnoho protoplastů, což je běžnější, je základní metodou enzymatické rozložení buněčné stěny pomocí celulasy, pektinasy nebo macerozymu. Dvoukroková metoda zahrnuje uvolnění mezofylových buněk pomocí pektinasy a následnou aplikaci celulasy, vedoucí k formaci izolovaných protoplastů (Takebe *et al.*, 1968). Procedura byla zjednodušena použitím směsi enzymů pektinasy a celulasy, přidaných přímo ke zpracovávanému materiálu (Power a Cocking, 1970). Při odstranění buněčné stěny pomocí enzymů je třeba omezit dobu jejich působení, aby nedošlo k poškození protoplastů.

Doba působení enzymatického roztoku se pohybuje kolem 2-4 hodin při laboratorní teplotě, nebo naopak delší dobu 16 h při teplotě 16°C (Bloom-Zandstra *et al.*, 1995). Poměr enzymů macerozymu/pektinasy ku celulase se různí od 1:1 přes 1:5 a 1:10 až po 1:170 (Pandey *et al.*, 2002), v závislosti na použitém materiálu a rostlině.

Uvolněné protoplasty jsou obvykle filtrovány a centrifugovány, což působí na plasmatickou membránu stresově. Qian *et al.* (1993) dokázali, že takovéto zacházení může způsobit změnu v proteinovém složení plasmatické membrány, a dokonce ovlivnit

míru aktivity ATPasy nebo výdeje K^+ iontů. Pro minimalizaci následků je výhodné neměnit osmolaritu roztoků v průběhu izolace a předejít tak osmotickému šoku a možnému poškození plasmatické membrány. V některých protokolech jsou centrifugační kroky zcela vynechány.

Uvolňování protoplastů ovlivňuje mnoho faktorů, zahrnujících tloušťku buněčné stěny, teplotu, dobu inkubace s enzymy, pH optimum enzymatického roztoku, rychlost míchání, a povahu osmotika (Sinha *et al.*, 2003).

Celý proces nezbytný pro získání protoplastů může být pro buňky stresující, což je způsobeno hromaděním aktivních forem kyslíku a degradačních produktů, které způsobují lýzi buňky (Cutler *et al.*, 1989). Reaktivní kyslíkové částice (ROS) hrají významnou roli v raných i pozdějších fázích reakce rostliny na patogenezí, působí jako signální molekuly a přímo jako antipatogeny (Allan a Fuhr, 1997). O aktivních formách kyslíku je známo, že se účastní síťování buněčné stěny a hydroxylové radikály se podílejí na rozvolňování buněčné stěny. Na druhou stranu je třeba podotknout, že pokud nejsou vůbec přítomny antioxidační geny a mechanismus indukce aktivních forem kyslíku není funkční, protoplasty mohou trpět oxidativním stresem a peroxidací membránových lipidů (Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2002).

2.4.3 Využití izolovaných protoplastů

Kontrolovaná lýze protoplastů umožňuje izolaci určitých buněčných frakcí, zahrnujících membrány a organely jako jsou vakuoly s cílem studia biochemických a fyziologických vlastností, transportu iontů a akumulace látek.

Izolované protoplasty vyšších rostlin syntetizují za správných podmínek novou buněčnou stěnu a probíhá u nich mitotické dělení. Dceřiné buňky se vyvíjí ve tkáň, z nichž mohou být rostliny regenerovány pomocí embryogeneze nebo organogeneze. Protoplasty jsou nejčastěji kultivovány v tekutém mediu, což je nejjednodušší. Také mohou být udržovány na speciálních médiích překrytých nylonovou síťovinou nebo filtračním papírem (Power *et al.*, 2004).

2.4.3.1 Transformace

Připravené protoplasty je možné použít jako výchozí materiál pro transformace. K dispozici jsou mnohé metody pro zavedení exogenní DNA do rostlinné buňky.

Jsou to metody spojené s *Agrobacterium tumefaciens*, bombardování mikroprojektily nebo přímá transformace. Každá z nich přináší určité nevýhody, což vede k vývoji stále nových, alternativních možností jako jsou infiltrace, elektroporace, mikroinjekce a transformace zprostředkované karbidem křemíku nebo liposomy.

Počáteční studie byly zaměřeny na transformaci protoplastů u lilkovitých (*Solanaceae*) s intaktními Ti plasmidy, a to od doby, kdy bylo možné transformované buňky lépe regenerovat pomocí předpokládaných růstových regulátorů. Následná zkoumání potvrdila efektivitu chemických látek jako PEG (polyethylenglykolu), elektroporace (elektrických pulsů o vysokém napětí), nebo kombinace těchto metod k proniknutí DNA do protoplastů (Rakoczy-Trojanowska, 2002).

Následně byly vyvinuty metody zahrnující techniky transformace pro kukuřici (Kirienko *et al.*, 2012), pšenici (Tamás-Nyitrai *et al.*, 2012), rýži (Duan *et al.*, 2012; Wakasa *et al.*, 2012) a ječmen (Harwood, 2012).

2.4.3.2 Patch clamp experimenty

Patch-clamp je laboratorní technika elektrofyziologie umožňující studium iontových kanálů v buňce. Jako elektrodu využívá skleněnou mikropipetu s ústím o průměru kolem 1 μm , což je velikost zabírající několik iontových kanálů. Vnitřek pipety je naplněn odpovídajícím roztokem, který umožňuje studovat změny ve velikosti elektrického proudu, který generuje tok iontů procházející kanálem za různých podmínek. Mikropipeta je přitlačena proti plazmatické membráně a pomocí sání se vytvoří spojení izolující měřený proud (Hamill *et al.*, 1981).

Buněčná stěna představuje hlavní překážku pro patch-clamp experimenty. Proto je třeba odstranit ji a získat přístup k plazmatické membráně. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby: enzymaticky a mechanicky, jak je uvedeno v kapitole 3.4.2 (Trebacz a Schönknecht, 2000).

Většina studií využívajících tuto techniku u vyšších rostlin je zaměřena na procesy transportu iontů v ochranných buňkách epidermis a jen zřídka v buňkách kořene nebo mezofylových (Bloom-Zandstra *et al.*, 1995). Ochranné buňky hrají důležitou fyziologickou roli v regulaci plyných toků přes rostlinnou epidermis. Tyto buňky se staly modelovým systémem pro studium signálních drah, přenášejících fyziologické reakce na podněty z prostředí (MacRobbie, 2000). Pandey *et al.* (2002) vypracovali

protokoly pro izolaci protoplastů z ochranných buněk epidermis *A. thaliana* ve velkém i malém měřítku určených pro fyziologické studie.

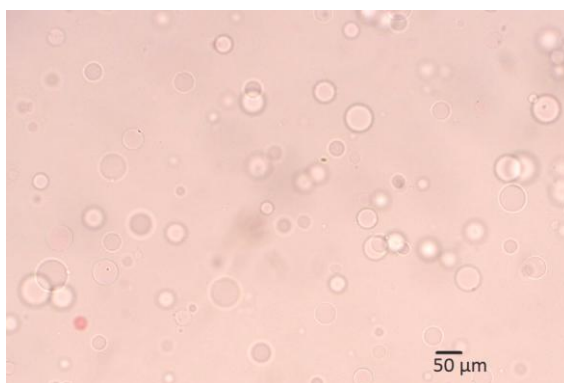
2.4.3.3 Proteomika

Odvětví proteomiky je dnes široce využíváno v rostlinné biologii, zejména při studiích modelových organismů a významných plodin (Jorrín *et al.*, 2007). Proteomika, to je systematické studium a charakterizace proteinů v buněčném pletivu nebo celém organismu, zahrnující mapování výskytu a složení bílkovin, proteinové interakce, lokalizaci, dynamické události v regulační proteinové síti, signální mechanismy, metabolismus a transkripci (de Hoog a Mann, 2004).

Hynek *et al.* (2009) zkoumali obohacení hydrofobních membránových proteinů, které mohou hrát významnou roli v procesu klíčení, z frakce plasmatické membrány ječmene pomocí dvoufázového dělení a chromatografii na reverzní fázi. Míra obohacení byla potvrzena pomocí western blotu a imunodetekcí s H^+ -ATPasou. Po proběhnutí SDS-PAGE identifikovali celkem 61 proteinů (19 už bylo objeveno dříve) pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem (ESI-MS/MS).

2.5 Vakuoly

Rostlinné vakuoly (Obr. 6) se liší velikostí, funkcemi a svým rozdílným obsahem v odlišných pletivech a typech buněk. Většina rostlinných buněk obsahuje velkou centrální vakuolu, která zabírá více než 90% celkového objemu buňky. Dále může obsahovat menší vakuoly v různých stádiích vývoje (Marty, 1999).



Obr. 6: Vakuoly izolované z *A. thaliana*

Vakuola je největší součástí plně vyvinuté rostlinné buňky a probíhá v ní většina hydrolytických procesů včetně proteolýzy (Ramos *et al.*, 2011). Vakuoly plní u rostlin rozličné, biologicky významné funkce – udržují a upravují turgor a pH, probíhají zde detoxifikační procesy nebo jsou zde skladovány proteiny, živiny a sekundární metabolity (Trentmann a Haferkamp, 2013). Plní nezastupitelnou roli při udržení homeostázy a umožňují růst buňky. Složení vakuoly a regulace jejího objemu závisí na aktivitě přenašečů a kanálů umístěných v membráně, nazývané tonoplast, obklopující vakuolu (Reisen *et al.*, 2005).

Některé plně vyvinuté buňky obsahují nejméně dva typy velkých vakuol s rozdílnými funkcemi. Je pozoruhodné, že jednotlivé vakuoly mohou zastávat mnohé funkce, částečně podporované membránovým transportním systémem. Rozličné přenašeče se podílí na skladování dusíku, schopnosti snášet různé koncentrace solí a těžkých kovů, signalizaci a ochraně buňky. Dále umožňují rostlině reagovat na měnící se prostředí, skladovat živiny a energii na horší časy a udržovat optimální podmínky v cytosolu (Martinoia *et al.*, 2007).

Díky světelné mikroskopii bylo zjištěno, že protoplasty ječmene obsahují dva odlišné typy vakuol – skladovací a lyzozomální. Fluorescenční mikroskopie s použitím pH sensitive fluorescentní próby a substrátu pro cysteinové proteasy prokázala, že oba typy jsou kyselé, lytické (Swanson *et al.*, 1998).

Na rozdíl od jiných organel, jako jsou mitochondrie a chloroplasty, které je poměrně snadné získat v čisté formě, jsou rostlinné vakuoly extrémně citlivé a jejich izolace klasickými metodami pomocí homogenizace rostlinného materiálu může vést k jejich poškození (Robert *et al.*, 2007).

Vakuoly jsou zapojeny do programované buněčné smrti, což je aktivní proces selektivního odstranění určitých buněk při působení biotického nebo abiotického stresu. Jsou popsány dva mechanismy. Zaprvé je to narušení tonoplastu způsobující uvolnění obsahu vakuoly do cytoplasmy, které je účinné proti vnitrobuněčným parazitům, a zadruhé spojení tonoplastu s cytoplazmatickou membránou následované uvolněním obsahu vakuoly do buněčné stěny, které je účinné proti mimobuněčným parazitům (Hara-Nishimura a Hatsugai, 2011).

2.5.1 Izolace vakuol

K získání intaktních vakuol je nutné docílit lýze protoplastů, a to působením lyzačního roztoku a mechanicky vystavením tlaku opakovaným pipetováním nebo protlačováním přes jehlu stříkačky (Bethke *et al.*, 1996).

Poměrně rozšířenou metodou, jak uvolnit a získat vakuoly z částečně lyzovaných protoplastů, je centrifugace v několikapatrovém diskontinuálním hustotním gradientu. Kringstad *et al.* (1980) použili 5%, 10% a 15% (w/v) Ficoll v 0,5 mol·l⁻¹ manitolu a 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8; Martinoia *et al.* (1986) 5%, 20% a 30% (v/v) Percoll v 0,5 mol·l⁻¹ sorbitolu, 1 mmol·l⁻¹ CaCl₂ a 5 mmol·l⁻¹ MES, pH 6.

Přehledný a funkční protokol pro *A. thaliana* vypracovali Robert *et al.* (2007).

2.5.2 Využití izolovaných vakuol

Složení vakuoly a regulace jejího objemu jsou závislé na koordinaci aktivit transportérů a kanálů, nacházejících se v tonoplastu. Reisen *et al.* (2005) provedli 3D rekonstrukci, a tím umožnili nový pohled na architekturu membrány a její pozorování během dynamicky probíhajících procesů.

Tohge *et al.* (2011) se pokusili zodpovědět otázku: Jak je metabolismus regulován? Pro tento účel použili vysoce přečištěné vakuoly ječmene a srovnali jejich metabolom s tím, který je obsažen v protoplastech, ze kterých byly získány tyto vakuoly. Pomocí kombinace GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) a FT/MS (Fourier transform/mass spectrometry) detekovali ve vakuole 59 primárních metabolitů se známou strukturou a dalších 200 sekundárních, u kterých je struktura předpovězena. Tyto metabolity tvoří aminokyseliny, organické kyseliny, cukry, cukerné alkoholy, meziproducty šikimátové dráhy, vitaminy, fenypropanoidy a flavonoidy.

Granstedt a Huffaker (1982) identifikovali vakuolu jako hlavní zásobní oblast nitrátu (NO_3^-).

2.5.2.1 Transport látek přes tonoplast

Kaiser a Heber (1984) zjistili, že transport sacharosy do vakuoly probíhá přes přenašeče, což dokázali mírou saturace substrátu při použití metabolického inhibitoru a kompetitivního substrátu. Endler *et al.* (2006) identifikovali vakuolární transportér sacharosy v *A. thaliana* pomocí proteomického přístupu.

Transportem aniontů přes tonoplast, především jeho prostupností a příjmem chloridů se zabývali Martinoia *et al.* (1986). Kobae *et al.* (2004) navrhli, že zinkový transportér AtMTP1 je lokalizován ve vakuolární membráně a podílí se na zbavování se přebytků Zn z cytoplasmy do vakuol a tím zachovává jeho homeostázu.

Dietz *et al.* (1990) se zabývali transportem aminokyselin do vakuoly, pomocí C14 značených AMK, a zjistili, že neutrální AMK jako valin a leucin efektivně snižují příjem alaninu. Výsledky vedly k předpokladu, že existuje jednosměrný translokátor specifický pro neutrální a bazické AMK, který je pod kontrolou metabolických efektorů. Martinoia *et al.* (1991) se dále zabývali transportem argininu a aspartátu. Rentsch a Martinoia (1991) srovnávali příjem citrátu s aktivitou příjmu malátu, a prokázali jeho závislost na přítomnosti ATP.

Rostlinný hormon auxin (IAA, kyselina indol-3-octová) hraje klíčovou roli ve vývoji rostliny. Jeho distribuce je kontrolována kombinací biosyntetických, metabolických a transportních mechanismů. Ranocha *et al.* (2013) identifikovali IAA a s ním spojené metabolity ve vakuolách *A. thaliana* a potvrdili jejich významnou roli v homeostáze auxinu. Dále lokalizovali WAT1, což je auxinový transportér, poskytující nový pohled na složitost transportu auxinu v rostlinách.

Kompletní přehled vakuolových přenašečů a význam jejich nepostradatelné role v metabolismu rostlin zpracovali Martinoia *et al.* (2007), transportéry v jejich fyziologickém kontextu shrnuli Martinoia *et al.* (2012).

2.5.2.2 Degradční pochody

Pro rostliny je hlavní cestou jak detoxifikovat organická xenobiotika konjugace glutathionu. Tyto útvary (glutathion S-konjugáty) vznikají v cytosolu, jsou transportovány přes tonoplast a ukládány ve vakuole (Wolf *et al.*, 1996).

Předpokládá se, že degradace proteinů pomocí proteasomu vede k produkci peptidů o velikosti 3-30 AMK. Ramos *et al.* (2011) se zajímali, zda jsou tyto peptidy dále přenášeny do vakuoly, kde probíhá jejich finální degradace. Výsledky vedly k názoru, že tonoplast obsahuje nejméně jeden ABC-transportér (ATP-binding cassette), vyžadující přítomnost ATP, který efektivně přenáší peptidy s dlouhým řetězcem z cytosolu do vakuoly ke konečnému rozkladu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana (ekotyp Col-O)

Hordeum vulgare (cv. Golden Promise)

3.1.2 Chemikálie a pomůcky

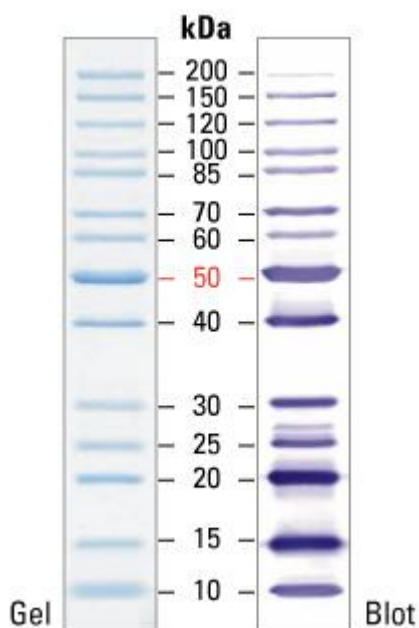
K přípravě roztoků byly použity následující chemikálie: albumin standard (Thermo Scientific, USA), akrylamid (Sigma-Aldrich, USA), amidočern 10 B (Merck, Německo), β -merkptoethanol (Sigma, USA), butanol (Penta, ČR), celulosa »Onozuka R-10« z *Trichoderma viride* (Serva, Německo), Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, ČR), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (Penta, ČR), dithiotreitol (Sigma, USA), D-mannit (Penta, ČR), dodecylsírán sodný (Penta, ČR), dusičnan amonný (Lachema, ČR), dusičnan draselný (Penta, ČR), dusičnan vápenatý tetrahydrát (Penta, ČR), ethanol (Lach-ner, ČR), fenylmethansulfonylchlorid (Sigma, USA), Ficoll PM 400 (Sigma, USA), glycin (Lach-ner, ČR), hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát (Lach-ner, ČR), hydroxid draselný (Lach-ner, ČR), hydroxid sodný (Penta, ČR), chlorid manganatý tetrahydrát (Sigma-Aldrich, USA), chlorid sodný (Lach-ner, ČR), chlorid vápenatý monohydrát (Penta, ČR), chloroform (Lach-ner, ČR), kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová (Duchefa, Nizozemí), kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (Roth, Německo), kyselina boritá (Neolab, Německo), kyselina ethylendiamintetraoctová (Penta, ČR), kyselina molybdenová monohydrát (Lachema, ČR), kyselina octová (Lach-ner, ČR), macerozym R-10 z *Rhizopus sp.* (Serva, Německo), methanol (Lach-ner, ČR), N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA); Neutral Red (Sigma, USA), persírán amonný (Fluka – Sigma-Aldrich, USA), síran hořečnatý heptahydrát (Penta, ČR), síran měďnatý pentahydrát (Lachema, ČR), síran zinečnatý heptahydrát (Neolab, Německo), síran železnatý heptahydrát (Neolab, Německo), sorbitol (Duchefa,

Nizozemí), sušené mléko Laktino odtučněné (PML Protein.Mléko.Laktóza, ČR), tetramethyldiamin (Sigma-Aldrich, USA), Tris (Duchefa, Nizozemí), Tween 20 (Neolab, Německo).

Pro stanovení velikosti fragmentů při SDS elektroforéze byl jako standard použit PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA). Velikosti fragmentů, obsažených v tomto standardu jsou popsány na Obr. 7.

Primární protilátky pro imunodetekci byly ředěny v poměrech V-ATPasa 1:2000 (vacuolar H⁺-ATPase), Xet5 1:500 (Xyloglucan xyloglucosyl transferase), (Agrisera, Švédsko) a sekundární protilátka AntiRabbit IgG HRP 1:5000 (Sigma, USA).

V experimentální části byly dále použity Centrifugal Filter Units for concentration and purification of biological solutions – Amicon Ultra 10K (Merck Millipore, Německo), Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo) a další pomůcky Oddělení molekulární biologie, CRH.



Obr. 7: Molekulový standard PageRuler Unstained Protein Ladder

3.1.3 Roztoky

3.1.3.1 Roztoky pro pěstování ječmene

Hoaglandův roztok 1 – 136 g KH_2PO_4 , pH 6 (KOH) / 1 l dH_2O

Hoaglandův roztok 2 – 493 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / 1 l dH_2O

Hoaglandův roztok 3 – 2,86 g H_3BO_3 ; 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,09 g $\text{H}_3\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 1 l dH_2O

Hoaglandův roztok 4 – 56,1 g KOH; 11,45 g $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 7,8 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5 (H_2SO_4) / 1 l dH_2O

Hoaglandův roztok 5 – 202 g KNO_3 ; 472 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 80 g NH_4NO_3 / 1 l dH_2O

Hoaglandův roztok – 0,5 ml Hoaglandova roztoku 1; po 1 ml Hoaglandova roztoku 2, 3, 4 a 5 ml Hoaglandova roztoku 5 přidáno za stálého míchání do 800 ml destilované vody, následně doplněno do 1 l

3.1.3.2 Roztoky pro základní izolaci protoplastů a vakuol

0,2 mol·l⁻¹ fosforečnan sodný; pH 7,5 – 16 ml 0,2 mol·l⁻¹ NaH_2PO_4 a 84 ml 0,2 mol·l⁻¹ Na_2HPO_4

0,2 mol·l⁻¹ fosforečnan sodný; pH 8 – 5,3 ml 0,2 mol·l⁻¹ NaH_2PO_4 a 94,7 ml 0,2 mol·l⁻¹ Na_2HPO_4

Promývací pufr 1 – 60 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 30 ml 50 mmol·l⁻¹ MES, pH 5,6; 60 ml dH_2O

Enzymatický roztok 1 – 0,3 g celulasa; 0,3 g macerozym; 0,09 g CaCl_2 ; 30 ml promývací pufr 1; 10,5 μl β -merkapt ethanol; při 37°C do rozpuštění složek

Lyzační pufr 1 – 3 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 5 ml 30% Ficoll; 300 μl EDTA, pH 8; 375 μl 0,2 mol·l⁻¹ fosforečnan sodný, pH 8; 75 μl roztoku neutrální červeně; 6,25 ml ddH_2O ; udržovat při 37°C

Vakuolový pufr 1 – 4,5 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 250 µl 0,2 mol·l⁻¹ fosforečnan sodný, pH 7,5; 40 µl EDTA; 5,21 ml ddH₂O; uchovávat na ledu

4% Ficoll – 4,5 ml vakuolového pufru 1 a 3 ml lyzačního pufru 1

3.1.3.3 Roztoky pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene

0,1% roztok neutrální červeně – 0,01 g neutrální červeně; 20 µl 1% kyseliny octové; 5 µl chloroformu, doplněno na 10 ml dH₂O

Promývací pufr 2 – 60 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 20 ml 50 mmol·l⁻¹ MES, pH 5,6; 20 ml dH₂O

Enzymatický roztok 2 – 0,6 g celulasa; 0,3 g macerozym; 0,27 g CaCl₂; 30 ml promývací pufr; při 37°C do rozpuštění složek

Lyzační pufr 2 – 2,1 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5; 3,84 ml ddH₂O

16% Ficoll – 4 ml 30% Ficoll; 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5

12,5% Ficoll – 2,5 ml 30% Ficoll; 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5

7% Ficoll – 1,4 ml 30% Ficoll; 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5; 940 µl ddH₂O

1,5% Ficoll – 300 µl 30% Ficoll; 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol; 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5; 2040 µl ddH₂O

3.1.3.4 Roztoky pro SDS-PAGE

Roztok akrylamidu-bisakrylamidu – 30% akrylamid; 0,8% bisakrylamid

Elektrodový pufr – 0,025 mol·l⁻¹ Tris; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

Pufř pro dělicí gel – 2,25 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 9,2

Pufř pro zaostřovací gel – 0,75 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8

10% dělicí (running) gel – 3,33 ml roztoku akrylamidu-bisakrylamidu; 1,67 ml pufřu pro dělicí gel; 4,84 ml ddH₂O; 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml 10% (w/v) APS

4% zaostřovací (stacking) gel – 1 ml roztoku akrylamidu-bisakrylamidu; 1,25 ml pufřu pro dělicí gel; 5,13 ml ddH₂O; 0,075 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml 10% (w/v) APS

4x SDS nanášecí pufř – 0,2 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) glycerol; 0,4% (w/v) bromfenolová modř; 8% (w/v) SDS; 2,8% (v/v) β-merkapt ethanol

3.1.3.5 Roztoky pro western blot a imunodetekci

Transferový pufř – 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 20% (v/v) methanol; 80% (v/v) dH₂O

Blotovací pufř – 12,5% (v/v) transferový pufř; 20% (v/v) methanol; 67,5% (v/v) dH₂O

Barvicí roztok pro gel – 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 50% (v/v) methanol; 10% kyselina octová; 40% (v/v) dH₂O

Barvicí roztok pro membránu – 0,5% (w/v) amidočern; 50% (v/v) methanol; 7% (v/v) kyselina octová, 43% (v/v) dH₂O

Odbarvovací roztok – 40% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) dH₂O

TBS promývací pufř – 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 500 mmol·l⁻¹ NaCl; pH 7,5

TBST promývací pufř – 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 500 mmol·l⁻¹ NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,5

Blokovací pufř – 5% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBST pufřu

Pufř s primární/sekundární protilátkou – 1% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBST pufřu (ředění primární protilátky V-ATPasa 1:2000, Xet5 1:500 a sekundární protilátky AntiRabbit IgG HRP 1:5000)

3.1.4 Přístroje

Analytické váhy model 5034/120 (Auxilab, Španělsko)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5427 R (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Multifuge X3 (Thermo Scientific, USA)

Digitální fotoaparát (Panasonic, Japonsko)

Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)

Dokumentační systém ChemiDoc MP (BIO-RAD, USA)

Easypet (Eppendorf, Německo)

Inkubátor (28°C), (Lovibond, Německo)

Inkubátor (37°C), (Medline Scientific limited, Německo)

Magnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG (IKA, Německo)

Mikroskop Olympus CX21FS3 (Olympus, Japonsko)

pH metr (Eutech Instruments, Singapur)

Třepačka (Kühner, Švýcarsko)

Ultracentrifuga Micro CS150NX, rotor S52ST-0360 (Hitachi, Japonsko)

UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, USA)

Vortex (Labnet, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Semena ječmene byla promývána po dobu jedné minuty v 70% ethanolu a následně třikrát propláchnuta sterilní vodou. Po dobu dvou dnů byla ponechána klíčit ve tmě ve fytotronu (22°C, 60% vlhkost, 16h den / 8h noc) a poté další dva dny na světle.

Vyklíčená semena byla pěstována hydroponicky v Hoaglandově roztoku ve fytotronu (22°C, 60% vlhkost, 16h den / 8h noc) po dobu 21 dní.

3.2.2 Základní postup izolace protoplastů

Izolace protoplastů probíhala podle postupu publikovaného Robert *et al.* (2007). 2 g listů z růžice 35 dní staré rostliny *Arabidopsis thaliana* nebo 3 g listů ječmene

starého 21 dní byly nakrájeny pomocí žiletky na tenké proužky a umístěny spolu s 30 ml enzymatického roztoku 1 do odsávací baňky. Po 10 minutách aplikace vakua byla baňka překryta parafilmem a přesunuta do tmy na třepačku na 4 hodiny při 70 rpm. Poté byl roztok promyt přes sítko (Collector Tissue Sieve Thermo EC) do kádinky a opatrně přelit do 50 ml konické zkumavky. Centrifugace probíhala 5 min. při 55 g, zrychlení a zpomalení 3. Supernatant byl odpipetován pomocí serologické pipety s širokým ústím a pelet opatrně promyt v 30 ml promývacího pufru. Protoplasty byly opět centrifugovány a znovu promyty. Získané protoplasty byly zkontrolovány pomocí světelného mikroskopu.

3.2.3 Základní postup izolace vakuol

Promyté protoplasty byly centrifugovány 5 min. při 55 g, zrychlení a zpomalení 3 a supernatant byl odpipetován. K peletu bylo přidáno 10,5 ml předehřátého lyzačního pufru 1 a směs byla resuspendována pomocí opakovaného pipetování. Po 2 minutách bylo pozorováno pomocí světelného mikroskopu prasknutí protoplastů a uvolnění vakuol. 2,5 ml lyzovaného roztoku bylo přesunuto do centrifugační kyvety (4 kyvety pro jeden vzorek) a postupně převrstveno 1,5 ml roztoku 4% Ficollu a 0,5 ml ledově vychlazeného vakuolového pufru 1, čímž byl vytvořen centrifugační gradient. Ultracentrifugace probíhala při 71 000 g, 10°C, 50 min., zrychlení a zpomalení 1.

3.2.4 Optimalizace podmínek

3.2.4.1 Změna osmotických podmínek prostředí

Původní koncentrace manitolu $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v promývacím pufru byla změněna při zachování ostatních podmínek na $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo $0,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vliv změny koncentrace manitolu na protoplasty byl pozorován pomocí světelného mikroskopu každou hodinu.

Množství CaCl_2 v původním enzymatickém roztoku bylo zvýšeno z 0,3% (w/v) na 0,9% (w/v) a pomocí světelného mikroskopu bylo každou hodinu porovnáno, které protoplasty si zachovaly lepší vlastnosti.

Poté bylo zdvojnásobeno množství celulasy a opět byl pomocí světelného mikroskopu každou hodinu kontrolován počet a vzhled protoplastů.

3.2.4.2 Inkubační teplota a doba

Mimo původní inkubační teplotu 22°C byly vyzkoušeny také teploty 28°C a 37°C. Vzhled protoplastů byl pozorován po 3 h a po promytí.

Byla porovnána doba inkubace 3 h nebo 4 h na 28°C při 70 rpm s inkubací přes noc (14 h) a následným 30 min. třepáním při 70 rpm.

3.2.4.3 Složení lyzačního pufru

Složení lyzačního pufru z původního návodu, obsahující 0,2 mol·l⁻¹ manitol bylo porovnáno s lyzačním pufrem modifikovaným tak, aby poměr koncentrace manitolu v promývacím (0,6 mol·l⁻¹) a lyzačním (0,3 mol·l⁻¹) pufru byl 2.

Pro lepší lýzi bylo vyzkoušeno umístit protoplasty před přidáním lyzačního pufru na 20 min. na led a použití jehly místo pipetování pro uvolnění vakuol.

Byla vyzkoušena i jiná složení lyzačního pufru:

- 1) 0,3 mol·l⁻¹ sorbitol; 2 mmol·l⁻¹ EDTA-Tris, pH 7,5 a 2,5 mmol·l⁻¹ DTT
- 2) 0,2 mol·l⁻¹ manitol; 20 mmol·l⁻¹ EDTA-Tris, pH 7,5; 2 mmol·l⁻¹ DTT a 10 mmol·l⁻¹ HEPES
- 3) 0,2 mol·l⁻¹ manitol; 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 0,1% roztok neutrální červeně.

Třetí varianta byla postupně modifikována na všechny dostupné kombinace manitolu (0,05 mol·l⁻¹; 0,1 mol·l⁻¹; 0,2 mol·l⁻¹; 0,3 mol·l⁻¹; 0,35 mol·l⁻¹; 0,4 mol·l⁻¹; 0,45 mol·l⁻¹ a 0,5 mol·l⁻¹) a Tris-HCl, pH 7,5 (5 mmol·l⁻¹; 15 mmol·l⁻¹; 25 mmol·l⁻¹ a 40 mmol·l⁻¹) pro zjištění nejlepších podmínek pro lýzi protoplastů.

3.2.4.4 Složení gradientu

Gradient tvořený podle původního návodu (Robert *et al.*, 2007) vrstvením lyzovaného roztoku, 4% Ficollu a ledově vychlazeného vakuolového pufru 1 byl porovnán s gradientem vzniklým vrstvením 16%; 12,5%; 7% a 1,5% Ficollu v $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitolu a $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a lyzovaného roztoku (Saunders, 1979).

V roztocích gradientu s Ficollem byla upravena koncentrace manitolu na $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a Tris-HCl, pH 7,5 na $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.2.5 Izolace protoplastů z ječmene

Byly naváženy 3 g rostlinného materiálu - listů ječmene z 21 dní staré rostliny. Listy byly nakrájeny pomocí žiletky příčně na tenké proužky a umístěny do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml spolu s 30 ml enzymatického roztoku 2. Směs byla ponechána ve tmě na třepačce 4 h při 70 rpm. Roztok byl promyt přes sítko do kádinky a opatrně po stěně přelit do 50 ml konické zkumavky. Následovala centrifugace 5 min. při 55 g, zrychlení a zpomalení 3. Supernatant byl odpipetován a pelet resuspendován ve 20 ml promývacího pufru 2 pomocí postupného naklánění zkumavky. Po centrifugaci byl tento promývací krok opakován, aby došlo k co nejlepšímu odstranění enzymů. Byl odebrán vzorek protoplastů a uchován při -20°C . Izolované protoplasty byly zkontrolovány pomocí světelného mikroskopu.

3.2.6 Izolace vakuol z ječmene

Promyté protoplasty byly znovu centrifugovány, supernatant byl odpipetován, k peletu bylo přidáno 6 ml lyzačního pufru 2 a po opatrném promísení $60 \mu\text{l}$ roztoku neutrální červeně. Pelet byl resuspendován nakláněním zkumavky. Průběh lyzačního procesu byl pozorován pod světelným mikroskopem. Gradient byl tvořen do čtyř centrifugačních kyvet postupným vrstvením 1 ml roztoků 16% Ficoll; 12,5% Ficoll; 7% Ficoll; 1,5% Ficoll a lyzovaného roztoku protoplastů. Ultracentrifugace proběhla 2 h při 90 000 g, 4°C , zrychlení a zpomalení 2. Vakuoly byly sesbírány z vrstvy mezi 7% a 1,5% Ficollem. Následovala vizuální kontrola vakuol pod světelným mikroskopem. Roztok obsahující vakuoly byl skladován v mikrozkuhavce při -20°C .

3.2.7 Zahuštění a měření celkové koncentrace proteinů

K zahuštění proteinů, obsažených ve vzorcích protoplastů a vakuol byl využit kit Centrifugal Filter Units for concentration and purification of biological substances obsahující kolonky Amicon Ultra 10K.

Vzorky protoplastů z několika izolací byly spojeny a postupně zahuštěny ze 7,5 ml na 0,5 ml; u vzorků obsahujících vakuoly došlo ke zmenšení objemu z 2,5 ml na 0,5 ml.

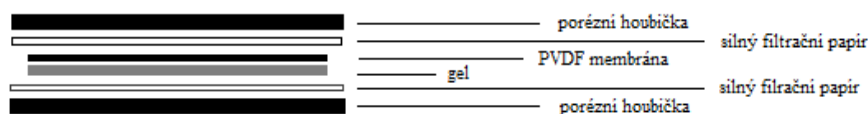
Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky metodou podle Bradfordové, která je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue R250 na molekulu proteinu (Bradford, 1976). Vzrůst absorbance při 595 nm je přímo úměrný koncentraci proteinu. Byly připraveny standardní roztoky o známé koncentraci BSA $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro sestavení kalibrační křivky. Pro blank bylo do mikrozkušavky pipetováno 800 μl ddH₂O a 200 μl činidla Bradfordové. Vzorek se skládal ze 795 μl ddH₂O, 5 μl proteinu o neznámé koncentraci a 200 μl činidla Bradfordové. Po vortexování následovala 5 min. inkubace při laboratorní teplotě. Absorbance byla změřena při vlnové délce 595 nm.

3.2.8 SDS-PAGE

Po sestavení aparatury byl připraven dělicí gel, který byl nanesen mezi skla a převrstven butanolem. Po půl hodině polymerace byl butanol slit do odpadu a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Následovalo nanesení vrstvy zaostřovacího gelu, do kterého byl opatrně vsunut plastový hřebínek. Po zatuhnutí gelu byl hřebínek vyndán a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Komůrka pro elektroforézu byla naplněna elektrodoým pufrem, do kterého byla vsunuta skla s připravenými gely. Vzorky byly naředěny podle koncentrace tak, aby jamka obsahovala 5 μg proteinu a celkový objem byl 27 μl . K naředěným vzorkům byl přidán SDS nanášecí pufr v poměru 3:1 a směs byla denaturována pod dobu 5 min. při 95°C. Poté byly vzorky umístěny na led.

Proteiny byly separovány při 100 V 20 min. a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V po dobu 1-2 hodin.

3.2.9 Western blot a imunodetekce



Obr. 8: Schéma uspořádání Western blotu

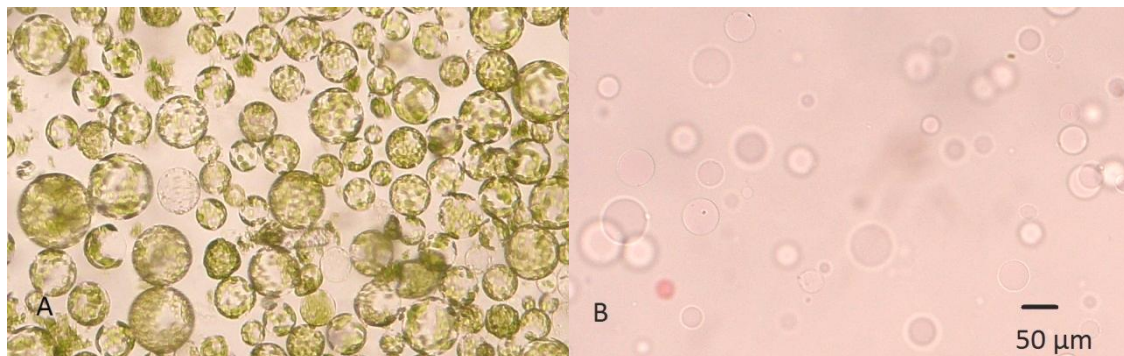
Do předem připraveného a vychlazeného blotovacího pufru byly namočený dvě porézní houbičky a dva kusy silného filtračního papíru. PVDF membrána upravená na velikost gelu byla aktivována ponořením do 100% methanolu na 30 s a ekvilibrována v blotovacím pufru. Poté bylo vytvořeno sendvičové uspořádání podle Obr. 8 a případné bubliny a nerovnosti byly vyrovnány pomocí 50 ml kónické zkumavky. Sendvič spolu s chladicím bločkem byl vložen do blotovací komůrky a zalit po okraj blotovacím pufrem. Aparatura byla umístěna na led a proces probíhal 1 h při 100 V.

PVDF membrána byla několik sekund barvena roztokem amidočerni, propláchnuta destilovanou vodou a odbarvována 20 min. při 60 rpm. Poté byla blokována za stálého třepání po dobu 1 h v roztoku 5% mléka v TBST pufru. Následovalo promytí membrány 5 minut v TBST pufru a 2 x 5 minut v TBS pufru za stálého třepání. Poté byla membrána inkubována v 10 ml 1% mléka v TBST pufru s primární protilátkou (ředění primární protilátky V-ATPasa 1:2000, Xet5 1:500) a opět promyta 5 minut v TBST pufru a 2 x 5 minut v TBS pufru. Následně byla membrána inkubována v 10 ml 1% mléka v TBST pufru obsahujícím sekundární protilátku (AntiRabbit IgG HRP 1:5000). Na závěr byla membrána promyta v TBST a TBS pufru.

Vyvolání bylo provedeno chemiluminiscenčně. PVDF membrána byla inkubována 5 minut v roztoku vzniklém smísením substrátu pro křenovou peroxidasu s příslušným pufrem v poměru 1:1. Samotná detekce proběhla pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Izolace protoplastů a vakuol z *Arabidopsis thaliana*

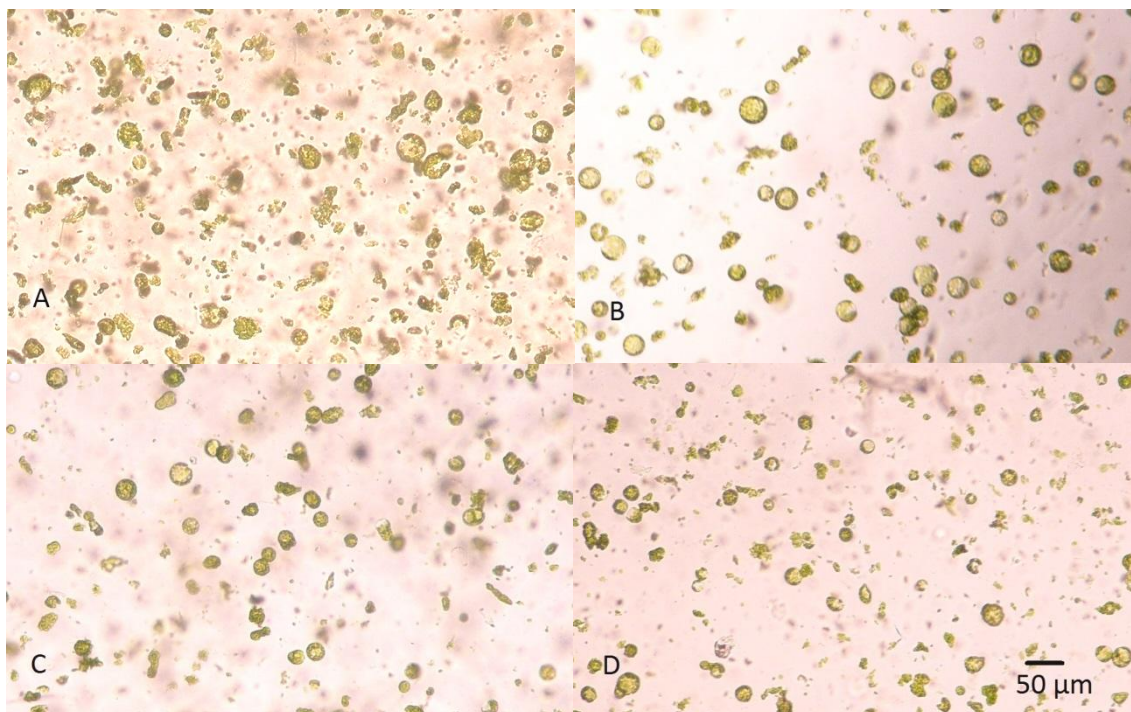


Obr. 9: A – protoplasty a B – vakuoly izolované z *A. thaliana* pomocí postupu publikovaného Robert *et al.* (2007).

Robert *et al.* (2007) vypracovali přehledný a spolehlivě fungující protokol pro izolaci protoplastů a vakuol z *A. thaliana* (Obr. 9). Při aplikaci tohoto postupu (kapitola 3.2.2) na ječmen byl vzhled protoplastů neuspokojivý, okraje byly svráštělé a k uvolnění vakuol vůbec nedošlo (kapitola 3.2.3). Pravděpodobně to bylo způsobeno tím, že ječmen nepatří mezi dvouděložné, ale jednoděložné rostliny a jeho protoplasty tak vyžadují jiné osmotické podmínky. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k postupné optimalizaci složení enzymatického roztoku, teploty, skladby lyzačního roztoku a gradientu s cílem nalézt vhodné podmínky pro ječmen.

4.2 Složení enzymatického roztoku

4.2.1 Koncentrace manitolu

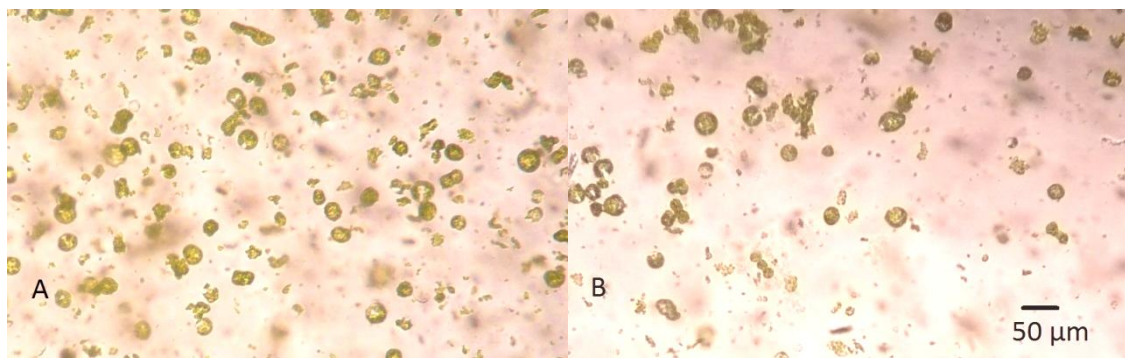


Obr. 10: Protoplasty izolované z ječmene, koncentrace manitolu v enzymatickém roztoku A – 0,4 mol·l⁻¹, B – 0,6 mol·l⁻¹, C – 0,7 mol·l⁻¹, D – 0,8 mol·l⁻¹

Manitol je do roztoku přidáván jako osmotický stabilizátor, pomáhající udržet ideální podmínky pro protoplasty (Rao a Prakash, 1995). Jeho původní koncentrace v enzymatickém roztoku podle Robert *et al.* (2007) je 0,4 mol·l⁻¹, na základě informací z jiných článků byly vyzkoušeny koncentrace 0,6 mol·l⁻¹; 0,7 mol·l⁻¹ a 0,8 mol·l⁻¹ (Saunders, 1979; Kringstad *et al.*, 1980; Mettler a Leonard, 1979).

Na Obr. 10 B lze vidět, že pro protoplasty je nejvhodnější 0,6 mol·l⁻¹ koncentrace manitolu, jsou hezky kulaté a dochází zde v nejmenší míře k jejich lýzi. I protoplasty při 0,7 mol·l⁻¹ koncentraci manitolu na Obr. 10 C mají pěkný tvar, ale ve větší míře lyzují.

4.2.2 Množství CaCl₂



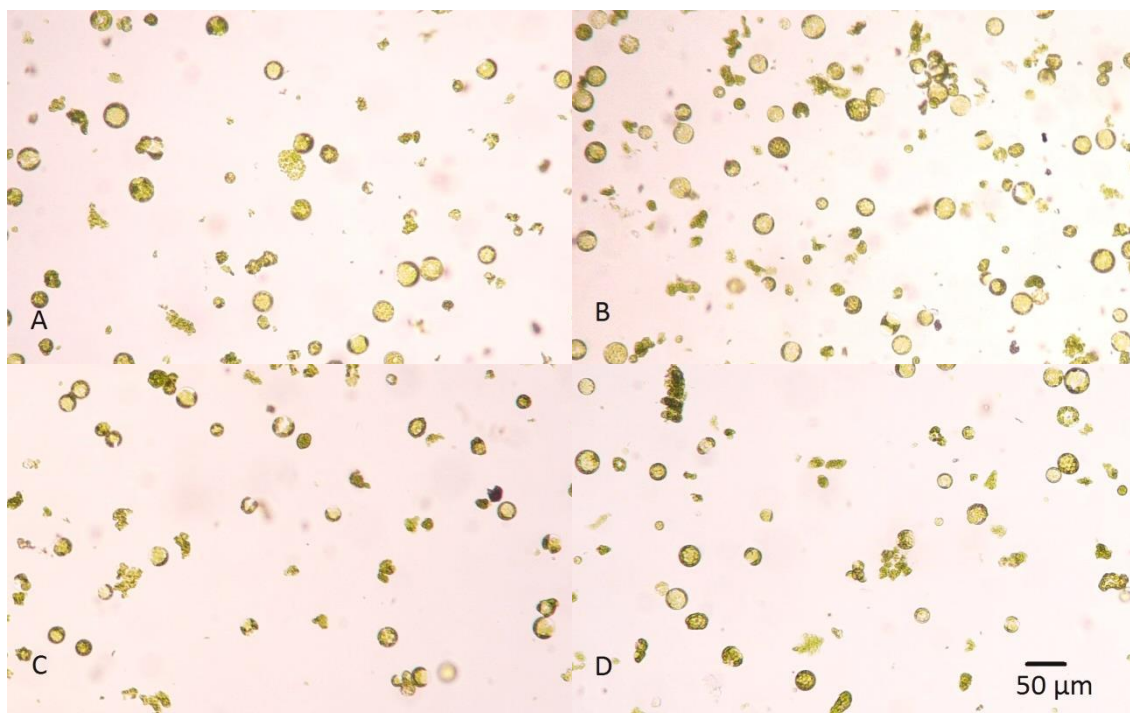
Obr. 11: Protoplasty izolované z ječmene, obsah CaCl₂ v enzymatickém roztoku A – 0,03% (w/v), B – 0,09% (w/v)

CaCl₂ zastává v roztoku funkci ochranného prostředku a navíc upravuje pH. Koncentrace CaCl₂ v enzymatických roztocích se pohybuje od 0,5 mmol·l⁻¹ (Pandey *et al.*, 2002), přes 1 mmol·l⁻¹ (Sheen, 2002), 2 mmol·l⁻¹ (Bloom-Zandstra *et al.*, 1995), 10 mmol·l⁻¹ (Wu *et al.*, 2009) až po 27 mmol·l⁻¹ (Robert *et al.*, 2009).

Z Obr. 11 je patrné, že u ječmene způsobil původní 0,03% (w/v) obsah CaCl₂ (0,027 mol·l⁻¹) uvolnění většího množství hezkých protoplastů, na rozdíl od 0,09% (w/v) obsahu (0,081 mol·l⁻¹).

V některých protokolech je nahrazen MgCl₂ (Kringstad *et al.*, 1980) nebo je přítomna jejich kombinace (Bloom-Zandstra *et al.*, 1995), tato alternativa však nebyla využita.

4.2.3 Množství celulasy



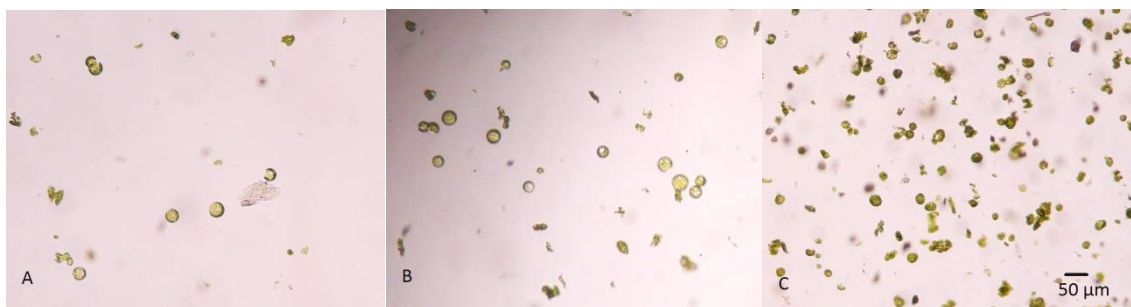
Obr. 12: Protoplasty izolované z ječmene, enzymatický roztok obsahoval A – $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol, 1% (w/v) celulasa; B – $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol, 2% (w/v) celulasa; C – $0,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol, 1% (w/v) celulasa; D – $0,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol, 2% (w/v) celulasa

V literatuře je možné dohledat různá množství, druhy a poměr enzymů. Cocking (1960) použil pouze 5% celulasu. Power a Cocking (1970) už zkombinovali 4% celulasu a 0,4% macerozym (poměr 10:1), Kringstad *et al.* (1970) 2% celulasu a 1% pektinasy (poměr 2:1), Bloom-Zandstra *et al.* (1995) 1% celulasu a 0,2% macerozym (poměr 5:1), Pandey *et al.* (2002) dokonce 1,3% celulasu a 0,0075% pektolyasu (poměr 170:1). Naproti tomu Robert *et al.* (2009) 1% celulasa a 1% macerozym (poměr 1:1).

Z důvodu dostupnosti enzymů a jejich častého využití v různých protokolech bylo rozhodnuto zůstat u použití kombinace celulasy a macerozymu. Na základě literatury byla jako první varianta zvolena dvojnásobná koncentrace celulasy oproti macerozymu. Ta se osvědčila a už nebyla dále modifikována.

Na Obr. 12 je možné vidět, že kombinace $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitolu a 2% (w/v) celulasy poskytla větší množství uvolněných protoplastů, než přítomnost pouze 1% (w/v) celulasy a jejich vzhled byl lepší, než při použití $0,7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitolu.

4.3 Inkubační doba a teplota



Obr. 13: Protoplasty izolované z ječmene, doba inkubace 4 hodiny, teplota inkubace A – 22°C, B – 28°C, C – 37°C

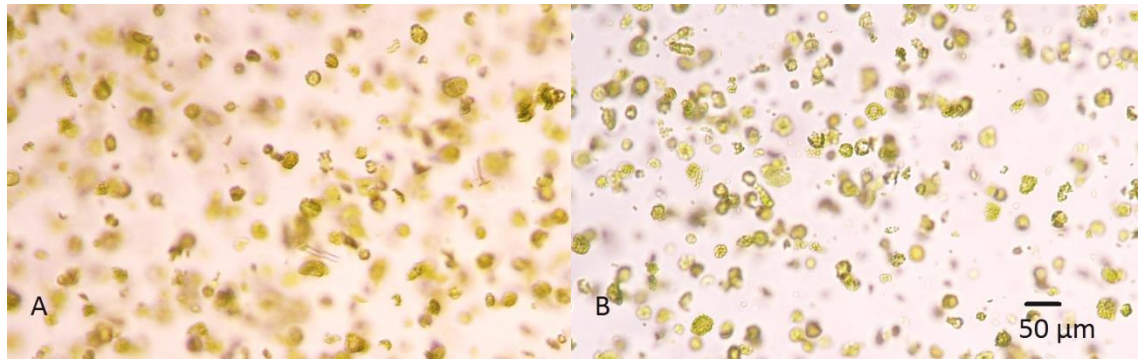
U většiny dostupných protokolů probíhá izolace při laboratorní teplotě. Výjimkou je postup publikovaný Rao a Prakash (1995), ve kterém je časový úsek 16 h při 12°C.

Jak lze vidět na Obr. 13, laboratorní teplota (22°C) nebyla pro uvolnění protoplastů dostatečně účinná. Naopak při teplotě 37°C se sice uvolnilo velké množství protoplastů, byly však svraštelé a lyzovaly. Jako nejideálnější se tudíž jeví teplota 28°C, při které bylo přítomno nejvíce celistvých protoplastů a nejméně jejich zlomků.

Co se týče inkubační doby, 4 hodiny jsou nejlepším kompromisem mezi počtem uvolněných protoplastů a zachováním jejich dobré kondice. Při inkubaci s enzymatickým roztokem přes noc, který byl vyzkoušen kvůli celkové menší časové náročnosti, došlo k masivnější lýzi protoplastů a výskytu zlomkových částí. Kvůli horší zkušenosti s inkubací přes noc byla dána přednost pouze několikahodinové variantě ve tmě (Rentsch a Martinoia, 1991).

4.4 Složení lyzačního roztoku a uvolnění vakuol

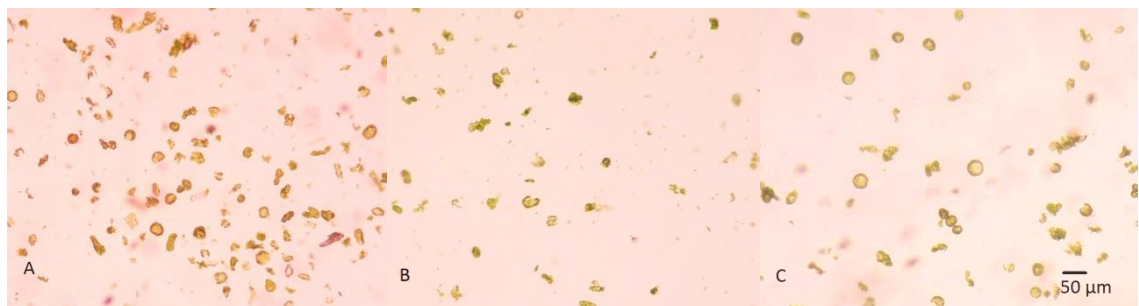
Bylo spočítáno, že poměr koncentrací manitolu v promývacím a lyzačním pufru podle Robert *et al.* (2009) byl 1:2 (kapitola 3.2.4.3). Podle tohoto poměru byla změněna koncentrace manitolu v lyzačním pufru na 0,3 mol·l⁻¹. Jak je vidět na Obr. 14, ani jedna z těchto variant nevedla k lýzi protoplastů a uvolnění vakuol.



Obr. 14: Protoplasty izolované z ječmene, poměr koncentrace manitolu v promývacím a lyzačním roztoku 2:1 A – koncentrace manitolu v promývacím roztoku $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v lyzačním $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, B – koncentrace manitolu v promývacím roztoku $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v lyzačním $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Bednarek a Reikhel (1991) využili kombinaci osmotického a termálního šoku, Bethke *et al.* (1996) vsadili na použití stříkačky s jehlou, Saunders (1979) na opakované pipetování roztoku. Byly vyzkoušeny způsoby, jak uvolnit vakuoly inspirované těmito protokoly – opakované protlačení přes jehlu o rozměrech $0,45 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$, pipetování lyzovaného roztoku umístěného nejdříve na 5 minut na led, protlačení přes loadovací špičku, lýze pomocí ledově zchlazené vody, ohřátí lyzačního roztoku na 37°C . Ani jedna z těchto variant však nepřinesla požadovaný výsledek, jak je patrné z Obr. 15.

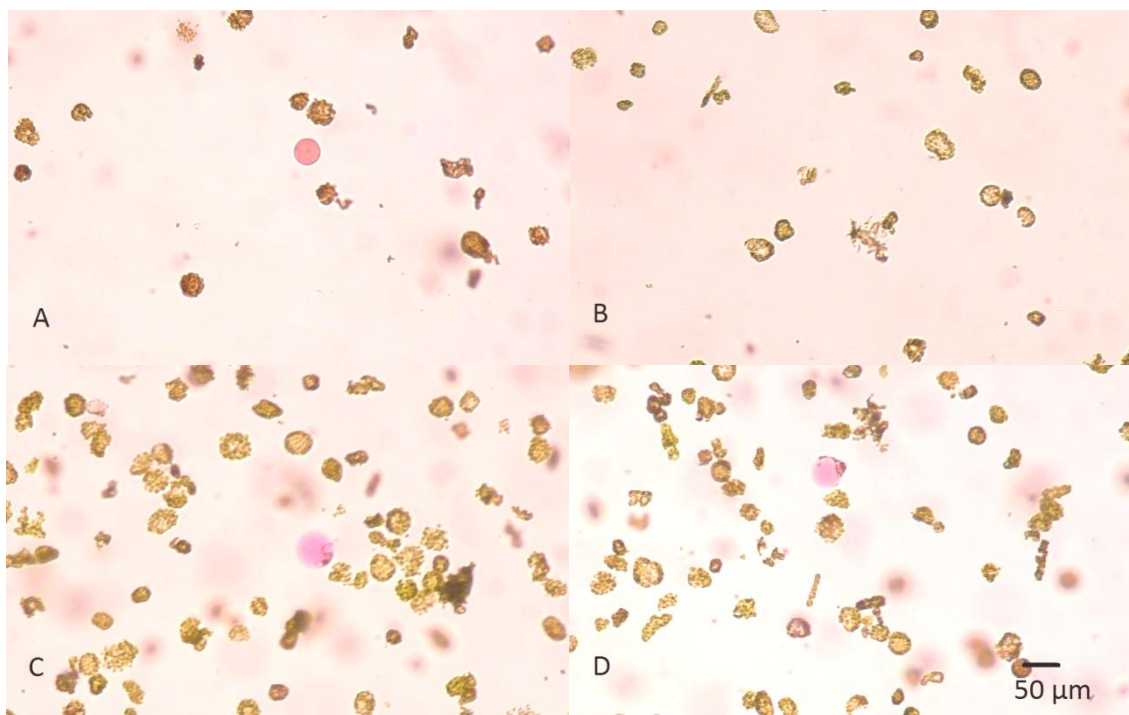
Posléze byl vyzkoušen lyzační roztok podle Mettler a Leonard (1979), který obsahoval $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sorbitol, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA-Tris (pH 7,5) a $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT a následovaly různé způsoby uvolnění vakuol, opět ale bez úspěchu.



Obr. 15: Lýze protoplastů izolovaných z ječmene pomocí A – jehly o rozměrech $0,45 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$, B – lyzačního roztoku ohřátého na 37°C , C – ledově zchlazené vody

Tab. 1: Modifikovaná složení lyzačního roztoku a vzhled protoplastů

koncentrace manitolu [mol·l⁻¹]	koncentrace Tris-HCl [mmol·l⁻¹]	vzhled protoplastů
0,05	5	celé, kulaté, vakuola
	15	celé, části, vlnité okraje
	25	deformované, vlnité okraje
	40	deformované, části
0,1	5	vlnité okraje, části
	15	celé, zbytky
	25	vlnité okraje, části
	40	části, zbytky
0,2	5	kulaté, zvlněné, části
	15	rovnoměrně kulaté, vlnité
	25	kulaté, občas vlnité
	40	převážně kulaté
0,3	5	kulaté, bez lýze
	15	scvrklé, části
	25	zvlněné části
	40	scvrklé části
0,35	5	úplně i částečně uvolněné vakuoly
	15	pár částečně uvolněných vakuol
	25	vakuoly viditelné v protoplastech
	40	několik vakuol v protoplastech
0,4	5	vlnité okraje, vakuola
	15	deformované protoplasty
	25	vlnité okraje, deformované
	40	rozlišně deformované části
0,45	5	pár částečně uvolněných vakuol
	15	několik vakuol v protoplastech
	25	mírně uvolněné vakuoly
	40	kulaté, části
0,5	5	vlnité okraje, části
	15	deformované, shluky
	25	vlnité, části
	40	občas vakuola v protoplastu

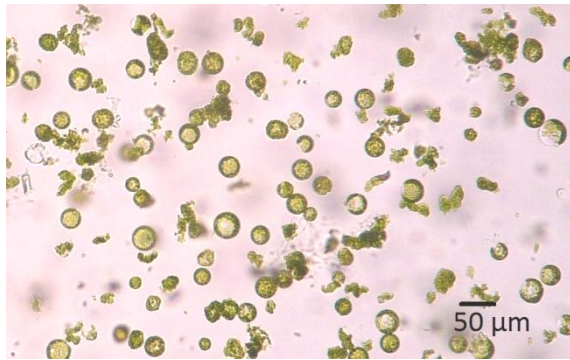


Obr. 16: Lýze protoplastů izolovaných z ječmene, A – $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5), B – $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5), C – $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5), D – $0,45 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5)

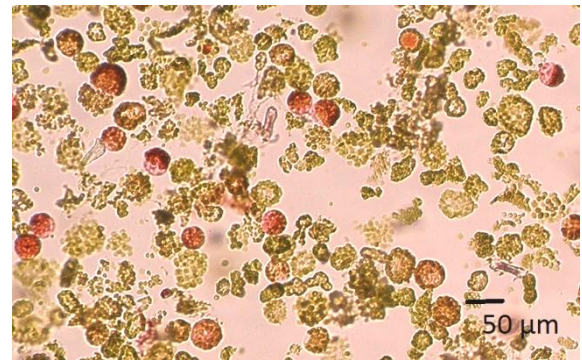
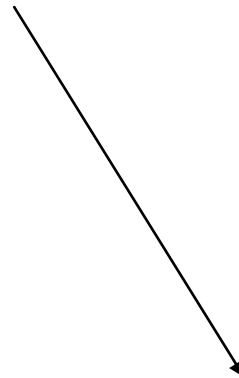
Další variantou bylo zkusit postup, který publikoval Saunders (1979). K lýzi protoplastů zde sloužil roztok obsahující $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5). Následovala dvouhodinová ultracentrifugace při $90\,000 \text{ g}$, 4°C v hustotním gradientu, který tvořil 1,5%; 7%; 12,5% a 16% (w/v) Ficoll v $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5) a $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitolu. Tento postup byl již účinný, došlo k částečnému uvolnění vakuol. Vzhledem k jejich nízkému počtu bylo přistoupeno k modifikaci složení lyzačního roztoku (shrnuto v Tab. 1) s cílem získat lepší osmotické podmínky. Jako nejvhodnější byla shledána kombinace $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitolu a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,5), při níž došlo k uvolnění největšího počtu vakuol (výběr na Obr. 16).

Nakonec byla pozměněna koncentrace manitolu v roztocích tvořících hustotní gradient na $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, aby byla stejná, jako v promývacím pufru a koncentrace Tris-HCl (pH 7,5) po vzoru lyzačního pufru na $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

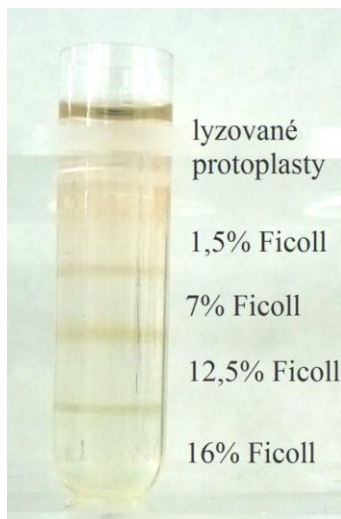
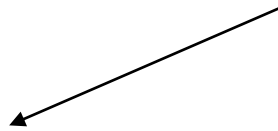
Na Obr. 17 je ve zkratce zachycen průběh izolace s optimalizovanými podmínkami.



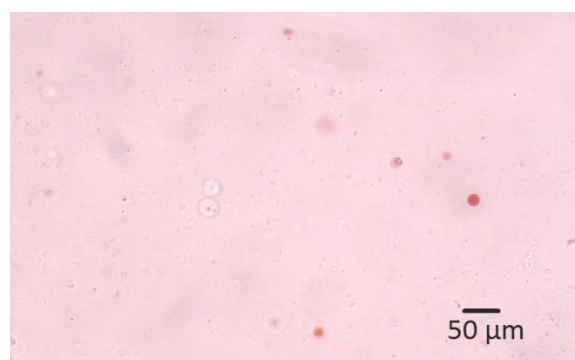
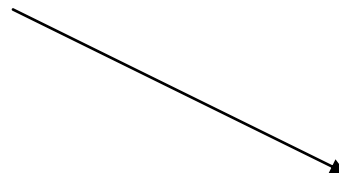
protoplasty izolované z ječmene
po druhém promytí



lýze protoplastů



hustotní gradient
pro ultracentrifugaci



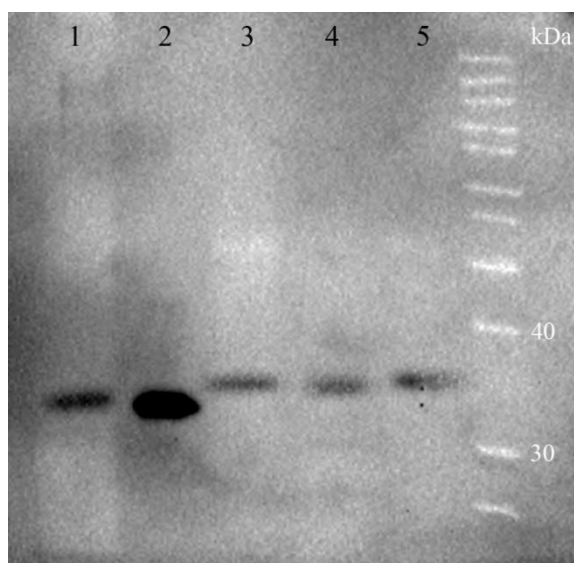
vakuoly sesbírané z vrstvy mezi 7% a 1,5% Ficollem

Obr. 17: Zjednodušené schéma izolace protoplastů a vakuol z ječmene (kapitoly 3.2.5 a 3.2.6)

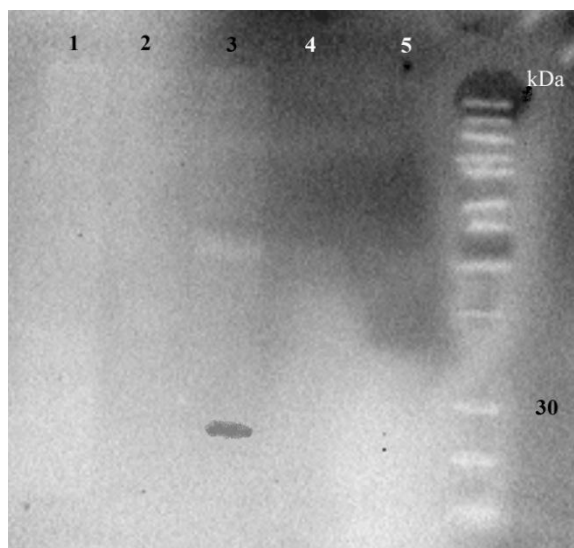
4.5 Potvrzení čistoty izolovaných vakuol pomocí western blotu

Frakce protoplastů a vakuol izolovaných z *A. thaliana* a ječmene byly zahuštěny a poté byla změřena celková koncentrace proteinů (kapitola 3.2.7). V závislosti na koncentraci frakce vakuol izolovaných z ječmene (184,4 μg) se odvíjela množství ostatních vzorků tak, aby obsah v jamce odpovídal přibližně 5 μg (koncentrace frakce protoplastů ječmene 528,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; frakce protoplastů *A. thaliana* 163,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; frakce vakuol *A. thaliana* 130 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a proteinového extraktu z listů ječmene 3,15 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzorky z *A. thaliana* a proteinový extrakt z listů ječmene sloužily jako kontrola.

Následně proběhla SDS-PAGE (kapitola 3.2.8), western blot a imunodetekce (kapitola 3.2.9). Přítomnost bandů o velikosti přes 30 kDa při použití V-ATPasy jako primární protilátky dokazuje přítomnost vakuolárních proteinů u všech vzorků, což je v souladu s předpokládaným výsledkem (Obr. 18). Na Obr. 19 je patrný band pouze u proteinového extraktu z listů ječmene při použití primární protilátky Xet5 dokazující přítomnost proteinů buněčné stěny. U ostatních se nevyskytuje, což prokazuje, že nejsou kontaminovány zbytky buněčné stěny.



Obr. 18: Western blot a imunodetekce, primární protilátka V-ATPasa, sekundární protilátka AntiRabbit IgG HRP; 1 – zahuštěné protoplasty z *A. thaliana*, 2 – zahuštěné vakuoly z *A. thaliana*, 3 – zahuštěný proteinový extrakt z listů ječmene, 4 – zahuštěné protoplasty z ječmene, 5 – zahuštěné vakuoly z ječmene; molekulový standard PageRuler Unstained Protein Ladder



Obr. 19: Western blot a imunodetekce, primární protilátka Xet5, sekundární protilátka AntiRabbit IgG HRP; 1 – zahuštěné protoplasty z *A. thaliana*, 2 – zahuštěné vakuoly z *A. thaliana*, 3 – zahuštěný proteinový extrakt z listů ječmene, 4 – zahuštěné protoplasty z ječmene, 5 – zahuštěné vakuoly z ječmene; molekulový standard PageRuler Unstained Protein Ladder

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla vypracována literární rešerše zabývající se významem ječmene v hospodářství, vlastnostmi protoplastů a vakuol, jejich izolací a dalším využitím ve výzkumu.

V experimentální části byla úspěšně provedena optimalizace podmínek pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene. Byly nalezeny vhodné osmotické podmínky použitých roztoků, a to koncentrace manitolu ($0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), obsah CaCl_2 (0,03% w/v) a celulasy (2% w/v). Dále byla optimalizována inkubační teplota (28°C) a doba (4 h). Složení lyzačního pufru bylo uzpůsobeno potřebám ječmene ($0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ manitol a $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl; pH 7,5). Celý postup byl shrnut do přehledného protokolu.

Čistota izolovaných protoplastů a vakuol byla potvrzena western blotem a imunodetekcí s primárními protilátkami V-ATPasou pro tonoplast a Xet5 pro buněčnou stěnu.

6 LITERATURA

- Allan A.C., Fuhr R. (1997): Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in Tobacco epidermal cells. *The Plant Cell*, **9**, 1559-1572.
- Assani A., Haicour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Cote F.X., Ducreux G., Ambroise A., Grapin A. (2002): Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science*, **162**, 355-362.
- Badr A., Muller K., Schafer-Pregl R., El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H.H., Pozzi C., Rohde W., Salamini F. (2000): On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 499-510.
- Baylis A.D. (2000): Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, **56**, 299-308.
- Beckie H.J. (2011): Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. *Pest Management Science*, **67**, 1037-1048.
- Bednarek S.Y., Raikhel N.V. (1991): The barley lectin carboxyl-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinant in plants. *The Plant Cell*, **3**, 1195-1206.
- Bennet M.D., Smith J.B. (1976): Nuclear-DNA amount in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **274**, 227-274.
- Bethke P.C., Hillmer S., Jones R.L. (1996): Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone. *Plant Physiology*, **110**, 521-529.
- Bloom-Zandstra M., Koot H.T.M., van Hattum J., Vogelzang S.A. (1995): Isolation of protoplasts for patch-clamp experiments: an improved method requiring minimal amount of adult leaf or root tissue from monocotyledonous or dicotyledonous plants. *Protoplasma*, **185**, 1-6.
- Bradford M.M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bruce T.J.A. (2012): GM as a route for delivery of sustainable crop protection. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 537-541.
- Cocking E.C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, **187**, 962-963.
- Collins H.M., Burton R.A., Topping D.L., Liao M.L., Bacic A., Fincher G.B. (2010): Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: Potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry*, **87**, 272-282.
- Cutler A.J., Saleem M., Coffey M.A., Loewen M.K. (1989): Role of oxidative stress in cereal protoplast recalcitrance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **18**, 113-127.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, **23**, 131-171.
- de Hoog C.L., Mann M. (2004): Proteomics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **5**, 267-293.
- Dietz K.J., Jäger R., Kaiser G., Martinoia E. (1990): Amino acid transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, **92**, 123-129.
- Dill G.M. (2005): Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, **61**, 219-224.
- Dreher K., Callis J. (2007): Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, **99**, 787-822.
- Duan Y., Zhai C., Hao L., et al. (2012): An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, **31**, 1611-1624.
- Dunwell J.M. (2014): Transgenic cereals: Current status and future prospects. *Journal of Cereal Science*, **59**, 419-434.
- Endler A., Meyer S., Schelbert S. et al. (2006): Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology*, **141**, 196-207.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations Home Page: <http://www.fao.org/home/en/> (14. 7. 2014)
- Granstedt R.C., Huffaker R.C. (1982): Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. *Plant Physiology*, **70**, 410-413.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, **391**, 85-100.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N. (2011): The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death and Differentiation*, **18**, 1298-1304.
- Hartl D.L., Orel V. (1992): What did Gregor Mendel think he discovered? *Genetics*, **131**, 245-253.
- Harwood W.A. (2012): Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 1791-1798.
- Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J, Kumlehn J. (2008): Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interaction. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 71-82.
- Hynek R., Svensson B., Jensen O.N., Barkholt V., Finnie C. (2009): The plasma membrane proteome of germinating barley embryos. *Proteomics*, **9**, 3787-3794.
- Chandler S., Dunwell J.M. (2008): Gene flow, risk assessment and the environmental release of transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **27**, 25-49.
- Chen H., Lin Y. (2013): Promise and issues of genetically modified crops. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 255-260.
- International Rice Genome Sequencing Project. (2005): The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, **436**, 793-800.
- Jorrín J.V., Moldonado A.M., Castillejo M.A. (2007): Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics*, **7**, 2947-2962.
- Kaiser G., Heber U. (1984): Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta*, **161**, 562-568.
- Kaul S., Koo H.L., Jenkins J., et al. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Kirienko D.R., Luo A., Sylvester A.W. (2012): Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experiment study. *Plant Physiology*, **159**, 1309-1318.
- Kobae Y., Uemura T., Sato M.H., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T., Maeshima M. (2004): Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiology*, **45**, 1749-1758.
- Kogel K.H., Langen G. (2005): Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiology*, **7**, 1555-1564.
- Krautwig B., Lörz H. (1995): Cereal protoplasts. *Plant Science*, **111**, 1-10.
- Kringstad R., Kenyon W.H., Black Jr. C.C. (1980): The rapid isolation of vacuoles from leaves of *Crassulacean* acid metabolism plants. *Plant Physiology*, **66**, 379-382.
- MacRobbie E.A.C. (2000): ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺ (Rb⁺) release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 12361-12368.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2000): Eukaryotic Microorganisms. In: *Brock Biology of Microorganisms*. Ninth edition, (Corey P.F., ed.), Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA, 720-739.
- Martinoia E., Schramm M.J., Kaiser G., Kaiser W.M., Heber U. (1986): Transport of anions in isolated barley vacuoles. *Plant Physiology*, **80**, 895-901.
- Martinoia E., Thume M., Vogt E., Rentsch D., Dietz K.J. (1991): Transport of arginine and aspartic acid into isolated barley mesophyll vacuoles. *Plant Physiology*, **97**, 644-650.
- Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. Ekkehard (2007): Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 83-102.
- Martinoia E., Meyer S. De Angeli A., Nagy R. (2012): Vacuolar transporters in their physiological context. *Annual Reviews of Plant Biology*, **63**, 183-213.
- Marty F. (1999): Plant Vacuoles. *The Plant Cell*, **11**, 587-599.

- Mayer K.F., Waugh R., Landgridge P., Close T.J., Wise R.P., Graner A., *et al.* (2012): A physical genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, **491**, 711-716.
- Mettler I.J., Leonard R.T. (1979): Isolation and partial characterization of vacuoles from tobacco protoplasts. *Plant Physiology*, **64**, 1114-1120.
- Mrázová K., Holasková E., Tufan Öz M., Jiskrová E., Frébort I., Galuszka P. (2014): Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances*, **32**, 137-157.
- Norsworthy J.K., Griffith G., Griffin T., Bagavathiannan M., Gbur E.E. (2014): In-field movement of glyphosate-resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) and its impact on cotton lint yield: Evidence supporting a zero-threshold strategy. *Weed Science*, **62**, 237-249.
- Pandey S., Wang X.Q., Coursol S.A., Assmann S.M. (2002): Preparation and application of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. *New Phytologist*, **153**, 517-526.
- Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (2002): Stress could be responsible for recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 549-559.
- Power J.B., Cocking E.C. (1970): Isolation of leaf protoplasts: Macromolecule uptake and growth substance response. *Journal of Experimental Botany*, **21**, 64-70.
- Power J.B., Davey M.R., Anthony P., Lowe K.C. (2004): Protoplast culture and regeneration. In: *Encyclopedia of Plant and Crop Science* (Goodman R.M., ed.), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1065-1068.
- Qian Y.C., Nguyen T., Murphy T.M (1993): Effect of washing on the plasma membrane and on stress reactions of cultured rose cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **35**, 2245-252.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002): Alternative methods of plant transformation – A short review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **7**, 849-858.
- Ramos M.S., Abele R., Nagy R., Grotmeyer M.S., Tampé R., Rentsch D., Martinoia E. (2011): Characterization of a transport activity for long-chain peptides in barley mesophyll vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2403-2410.
- Ranocha P., Dima O., Nagy R., *et al.* (2013): Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications*, **4**:2625, www.nature.com/naturecommunications, DOI: 10.1038/ncomms3625
- Rao K.S., Prakash A.H. (1995): A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*, **20**, 645-655.
- Reisen D., Marty F., Leborgne-Castel N. (2005): New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biology*, **5**:13, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/5/13>
- Rentsch D., Martinoia E. (1991): Citrate transport into barley mesophyll vacuoles comparison with malate-uptake activity. *Planta*, **184**, 532-537.
- Robert S., Zouhar J., Carter C., Raikhel N. (2007): Isolation of intact vacuoles from *Arabidopsis* rosette leaf-derived protoplasts. *Nature Protocols*, **2**, 259-262.
- Saeed M., Dahab A.H.A., Guo W.Z., Zhang T.Z. (2012): A cascade of recently discovered molecular mechanism involved in abiotic stress tolerance of plants. *OMICS*, **16**, 188-199.
- Saisho D., Takeda K. (2011): Barley: emergence as a new research material of crop science. *Plant Cell Physiology*, **52**, 724-727.
- Saunders J.A. (1979): Investigations of vacuoles isolated from Tobacco. *Plant Physiology*, **64**, 74-78.
- Sheen J. (2002): A transient expression assay using maize mesophyll protoplasts. <http://molbio.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocols.html> (17.9.2013)
- Schulte D., Close T.J., Graner A., Landgridge P., Matsumoto T., Muehlbauer G. *et al.* (2009): The international barley sequencing consortium – At the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant Physiology*, **149**, 142-147.
- Sinha A., Wetten A.C., Caligari P.D.S. (2003): Optimisation of protoplast production in white lupin. *Biologia Plantarum*, **47**, 21-25.
- Swanson S.J., Bethke P.C., Jones R.L. (1998): Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: Characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *The Plant Cell*, **10**, 685-698.

- Takebe I., Otsuki Y., Aoki S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant and Cell Physiology*, **9**, 115-124.
- Tamás-Nyitrai C., Jones H.D., Tamás L. (2012): Biolistic- and *Agrobacterium*-mediated transformation protocols for wheat. *Methods in Molecular Biology*, **877**, 357-384.
- Thermo Scientific Home Page: <http://www.thermoscientificbio.com/protein-electrophoresis/pageruler-unstained-protein-ladder/> (1. 6. 2014)
- Tohge T., Ramos M.S., Nunes-Nesi A., Mutwil M., Giavalisco P., Steinhauser D., Schellenberg M., Willmitzer L., Persson S., Martinoia E., Fernie A.R. (2011): Toward the storage metabolome: profiling the barley vacuole. *Plant Physiology*, **157**, 1469-1482.
- Trebacz K., Schönknecht G. (2000): Simple method to isolate vacuoles and protoplasts for patch-clamp experiments. *Protoplasma*, **213**, 39-45.
- Trentmann O., Haferkamp I. (2013): Current progress in tonoplast proteomics reveals insight into the function of the large central vacuole. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 1-10.
- Wakasa Y., Ozawa K., Takaiwa F. (2012): *Agrobacterium*-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. *Plant Cell Reports*, **31**, 2075-2084.
- Wang R.L., Stec A., Hey J., Lukens L., Doebley J. (1999): The limits of selection during maize domestication. *Nature*, **398**, 236-239.
- Wolf A.E., Dietz K.J., Schröder P. (1996): Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters*, **384**, 31-34.
- Wu F.H., Shen S.C., Lee L.Y., Lee S.H., Chan M.T., Lin C.S. (2009): Tape-*Arabidopsis* sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*, **5**:16, <http://www.plantmethods.com/content/5/1/16>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	aminokyselina
APS	persíran amonný
BSA	albumin, hovězí sérový
dH ₂ O	destilovaná voda
ddH ₂ O	destilovaná deionizovaná voda
DTT	dithiotreitol
ER	endoplazmatické retikulum
FT/MS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
GM	geneticky modifikovaný
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IAA	indol-3-octová kyselina
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
PEG	polyethylenglykol
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
SDS	dodecylsíran sodný
TEMED	tetramethylendiamin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření

8 PŘÍLOHY

8.1 Stručný protokol pro izolaci protoplastů a vakuol z ječmene

30% Ficoll

- 3 g / 10 ml

1 mol·l⁻¹ manitol

- rozpustit 72,87 g manitolu ve 400 ml dH₂O

50 mmol·l⁻¹ MES; pH 5,6

- rozpustit 2,14 g MES ve 180 ml dH₂O
- upravit pH na 5,6 pomocí 1 mol·l⁻¹ KOH
- doplnit na celkový objem 200 ml

50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; pH 7,5

- rozpustit 3,03 g Tris ve 40 ml dH₂O
- upravit pH pomocí HCl na 7,5
- doplnit na celkový objem 50 ml

Promývací pufr (0,6 mol·l⁻¹ manitol)

- 60 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 20 ml 50 mmol·l⁻¹ MES
- 20 ml dH₂O

Enzymatický roztok

- 0,6 g celulasa
- 0,3 g macerozym
- 0,27 g CaCl₂
- 30 ml promývací pufr
- při 37°C do rozpuštění enzymů

- navážit 3 g listů ječmene
- nasekat příčně na proužky pomocí žiletky
- zalít 30 ml enzymatického roztoku
- třepat při **70 rpm, 28°C, 4 h** ve tmě

Lyzační pufr (0,35 mol·l⁻¹ manitol + 5 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; pH 7,5)

- 2,1 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5)
- 60 µl roztok neutrální červeně
- 3840 µl dH₂O

Gradient:

16% Ficoll

- 4 ml 30% Ficoll
- 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5)

12,5% Ficoll

- 2,5 ml 30% Ficoll
- 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 60 µl 50 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5)

7% Ficoll

- 1,4 ml 30% Ficoll
- 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5)
- 940 µl dH₂O

1,5% Ficoll

- 300 µl 30% Ficoll
- 3,6 ml 1 mol·l⁻¹ manitol
- 60 µl 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5)
- 2040 µl dH₂O

- promýt roztok s protoplasty přes sítko do kádinky, propláchnout troškou promývacího pufu
- opatrně, pomalu, po stěně přelít do 50 ml kónické zkumavky, vymýt kádinku troškou promývacího pufu
- centrifugace – **55 g, laboratorní teplota, 5 min., zrychlení/zpomalení 3**
- odpipetovat supernatant
- opatrně resuspendovat ve 20 ml promývacího pufu
- zcentrifugovat a znovu opakovat promývací krok
- (po 2. promytí vhodné odebrat vzorek protoplastů do mikrozkuavky)
- odpipetovat supernatant
- přidat 5 ml lyzačního pufu, promísit otáčením kónické zkumavky
- **gradient** do 4 centrifugačních kyvet: po 1 ml roztoků
16% Ficoll – 12,5% Ficoll – 7% Ficoll – 1,5% Ficoll – roztok lyzovaných protoplastů
- ultracentrifugace (výkyvný rotor): 90 000 g, 4°C, 2 h, zrychlení/zpomalení 2
- vakuoly sbírat z vrstvy mezi 1,5% a 7% Ficollem