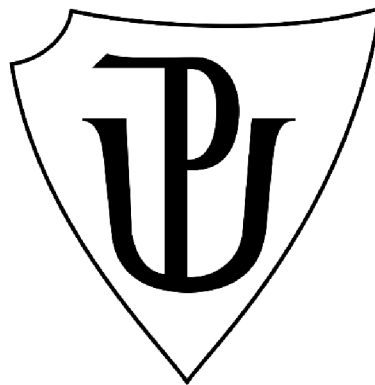


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Klonování genu *TGW6* (*THOUSAND GRAIN WEIGHT 6*) z Ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Kateřina Smolková**
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.**
Rok: 2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Márii Majeské Čudejkové, Ph.D. za odborné vedení práce, za její čas a cenné rady, trpělivost a ochotu při zpracování bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Smolková
Název práce	Klonování genu <i>TGW6</i> (<i>THOUSAND GRAIN WEIGHT 6</i>) z Ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednou z nejvýznamnějších polnohospodářských plodin. Zvyšování produkce takto významných plodin je důležitou úlohou v molekulárním šlechtitelství. Minulá zjištění naznačují, že by gen *THOUSAND GRAIN WEIGHT 6* (*TGW6*) mohl mít přínosný vliv na zlepšení výnosových charakteristik u rýže případně i dalších plodin. Cílem experimentální části této práce bylo amplifikovat DNA fragment obsahující gen *TGW6* a cca 3000 nukleotidů nacházejících se před tímto genem, kde by se měl nacházet nativní promotor tohoto genu, a vložit ho do vektoru obsahujícího gen pro GFP protein. Pomocí metody tzv. „seamless“ klonování byl nakonec úspěšně připraven gen *TGW6* s nativním promotorem fúzovaný s *GFP* jako reportérovou značkou. Tento konstrukt může být dále použitý pro klonování do vektoru pro transformaci ječmene, pomocí kterého by bylo možné lokalizovat expresi proteinu *TGW6* a přispět tak k porozumění jeho úlohy při vývinu zrn ječmene.

Klíčová slova	<i>Hordeum vulgare</i> L., „seamless“ klonování, <i>TGW6</i> gen
Počet stran	39
Počet příloh	6
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Smolková
Title	Cloning of the <i>TGW6</i> (<i>THOUSAND GRAIN WEIGHT 6</i>) gene from barley (<i>Hordeum vulgare</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Mária Majesk udejkov, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important agricultural crops. Increasing the production of such important crops is an important task in molecular breeding. Past findings suggest that the *THOUSAND GRAIN WEIGHT 6* (*TGW6*) gene could have a beneficial effect on improving the yield characteristics in rice and possibly other crops. The aim of the experimental part of this work was to amplify a DNA fragment containing the *TGW6* gene and approximately 3,000 nucleotides upstream of this gene, where the native promoter of this gene should be located, and insert it into the plasmid containing gene encoding GFP protein. The *TGW6* gene with a native promoter fused to *GFP* as a reporter tag was prepared using the method called seamless cloning. This construct can be further used for cloning into a barely transformation vector, which can allow us to localize *TGW6* protein and contribute to the understanding of the role of the protein during the development of barley grains.

Keywords	<i>Hordeum vulgare</i> L., seamless cloning, <i>TGW6</i> gene
Number of pages	39
Number of appendices	6
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	2
2.1.1 Hospodářský význam	2
2.1.2 Vývoj a složení zrna	3
2.2 Výnosové charakteristiky zrna.....	5
2.3 Hormonální regulace vývoje zrna.....	6
2.3.1 Konjugáty IAA	8
2.4 Charakteristika genu <i>TGW6</i> (<i>THOUSAND GRAIN WEIGHT 6</i>)	9
2.5 Klonování DNA.....	10
2.6 Plazmidové vektory	11
2.7 „Seamless“ klonování	12
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
3.1 Materiál	13
3.1.1 Biologický materiál	13
3.1.2 Chemikálie.....	13
3.1.3 Sekvence použitých primerů (Tab. 1)	14
3.1.4 Roztoky a média	15
3.1.5 Kity a návody	16
3.1.6 Přístroje a pomůcky	16
3.2 Metody	17
3.2.1 Izolace plasmidové DNA (pDNA) alkalickou lyzí	17
3.2.2 Izolace pDNA podle QIAprep® Spin Miniprep Kitu	17
3.2.3 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)	18
3.2.3.1 PCR s Phusion polymerasou.....	18
3.2.3.2 PCR s GoTaq DNA polymerasou.....	19

3.2.4	Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu	20
3.2.5	DNA extrakce a purifikace z agarosového gelu	20
3.2.6	Purifikace produktu PCR reakce pomocí PCR Clean-up Kitu	20
3.2.7	Klonování amplifikovaného fragmentu do vektoru pMini	21
3.2.8	Transformace chemicky kompetentních buněk <i>E. coli</i>	21
3.2.9	Transformace elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	22
3.2.10	Očkování vybraných kolonií do LB média s ampicilinem	22
3.2.11	Klonování podle NEBuilder Hifi DNA Assembly Kitu	22
3.2.12	Restrikční štěpení	23
3.2.13	Sekvence klonované DNA	23
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1	Strategie 1: Amplifikace fragmentu <i>promotor</i> - <i>TGW6</i> a klonování pomocí NEB PCR Cloning kitu	24
4.2	Strategie 2: Amplifikace fragmentu <i>promotor</i> - <i>TGW6</i> a klonování pomocí NEBuilder Hifi DNA Assembly Kitu	27
5	ZÁVĚR	33
6	LITERATURA	34
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	38
8	SEZNAM PŘÍLOH	39

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Připravit literární rešerši na téma související s experimentální částí.

Praktická část

- Zvládnutí samostatné laboratorní praxe a technik molekulární biologie.
- Příprava plazmidového vektoru obsahující gen *TGW6* fúzovaný s fluorescenčním proteinem GFP

1 ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednou z nejvýznamnějších polnohospodářských plodin. Má svůj podíl na celosvětové zásobě potravin a je nezbytnou součástí pivovarského průmyslu. Rychlý růst světové populace a snižování orné půdy na celém světě naznačuje potřebu zvýšit výnos obilnin, tedy i ječmene. Studium genů, které se nějakým způsobem podílí na hodnotě výnosu, je tedy zásadní pro zvyšování produkce obilnin. *THOUSAND GRAIN WEIGHT 6 (TGW6)* je gen, který pozitivně ovlivňuje růst a výnos u několika kultivarů rýže. *TGW6* kóduje hydrolázu štěpící kyselinu indol-3-octovou (IAA)-glukosu na IAA a glukosu. IAA-glukosa je inaktivní forma auxinu, která se díky hydrolýze změní na aktivní formu. Minulá zjištění naznačují, že by gen *TGW6* mohl mít přínosný vliv na zlepšení výnosových charakteristik u rýže případně i dalších plodin.

V této bakalářské práci byl klonován DNA fragment obsahující gen *TGW6* a cca 3000 nukleotidů nacházejících se před tímto genem, kde by se měl nacházet nativní promotor tohoto genu. Na konec genu *TGW6* byla přidána sekvence pro *GFP*, a to metodou zvanou „seamless“ klonování. K dispozici byl plazmid obsahující sekvenci *GFP*, do kterého byl vložen požadovaný DNA fragment tak, aby mezi sekvenci genů *TGW6* a *GFP* nebyli přidány žádné jiné nukleotidy, které nepatří ani jednomu z genů. Inzert bylo potřeba vložit do vektoru tak, aby *TGW6* gen přímo navazoval na *GFP* gen. Za použití této metody by fúzovaný gen kódoval *TGW6* protein s reportérovou značkou. Vytvořený gen by mohl být použit v dalších experimentech pro transformaci ječmene za účelem lokalizace proteinu *TGW6*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)

Druh *Hordeum vulgare* L. se taxonomicky řadí do: říše rostliny (*Plantae*), oddělení krytosemenné (*Magnoliopsida*), třída jednoděložné (*Lilianeae*), čeleď lipnicovité (*Poaceae*), kmen (*Triticeae*), rod ječmen (*Hordeum*; ITIS).

Mezi první domestikované obilniny se řadí právě ječmen, který se před více než 10 000 lety vyvinul z jeho dávného divokého předka *Hordeum spontaneum*. Tento proces probíhal na Blízkém východě, kde se uvádějí první počátky zemědělství. Konkrétním místem domestikace byla severní Afrika a oblast tzv. Úrodného půlměsíce, která zahrnuje současný Izrael, Libanon a západní Sýrii až po jihovýchodní Turecko, podél řeky Tigris a Eufrat, Irák až po západní stranu Íránu. Přejít z divokého typu na domestikovaný zahrnuje především změnu tří hlavních morfologických znaků, které usnadňují sklizeň plodiny. Mezi tyto atributy patří velikost zrna, pevnost hlavní osy klasu (rachis) a snadnost jakou se zrno uvolňuje ze svých listových struktur. (Salamini et al., 2002). Vzhledem k tomu, že je ječmen všestranná obilnina s krátkým obdobím růstu, přizpůsobuje se široké škále prostředí a geografických lokalit, jako jsou například suché země severní Afriky a vysoká nadmořská výška hor Tibetu (Aldughpassi et al., 2016).

2.1.1 Hospodářský význam

Ječmen se řadí mezi jednu z nejdůležitějších hospodářských plodin pěstovaných po celém světě. Mezi pět největších producentů ječmene patří Ruská federace, Francie, Německo, Ukrajina a Kanada. V současnosti se přibližně 65 % produkce ječmene využívá jako krmivo pro zvířata, více než 30 % je využíváno jako surovina pro výrobu sladu a vaření piva, a pouze 2-3 % pro lidskou spotřebu (Aldughpassi et al., 2016). Ve východní a střední Evropě a Africe je ječmen stále široce využíván pro lidskou stravu. Zrna ječmene jsou například základem tibetské kuchyně, a hojně se také využívají jako celozrnná jídla na Blízkém východě v polévkách, guláši, ovesných kaších, ječném chlebu, ale i v sušenkách (Clifton & Keogh, 2016). Výrazným faktorem určujícím způsob využití ječmene je obsah β -glukanů v buněčných stěnách endospermu. Při výrobě sladu se dbá na to, aby obsah β -glukanů byl co nejnižší. Na druhou stranu v potravinářství je žádán ječmen s vysokým obsahem β -glukanů. Bylo totiž prokázáno, že β -glukany snižují hladinu LDL („low-density lipoprotein“; lipoprotein s nízkou hustotou) cholesterolu

v krvi, a také kontrolují hladinu glukosy v krvi. Pravidelná konzumace stravy bohaté na ječmen může sloužit jako prevence kardiovaskulárních onemocnění (Kumar et al., 2020).

Vzhledem k rychlému růstu světové populace a neustálým snižováním orné půdy na celém světě, zůstává zvyšování výnosu ječmene v současném kontextu změny klimatu velkou výzvou pro šlechtitelské programy (Fischer et al., 2010).

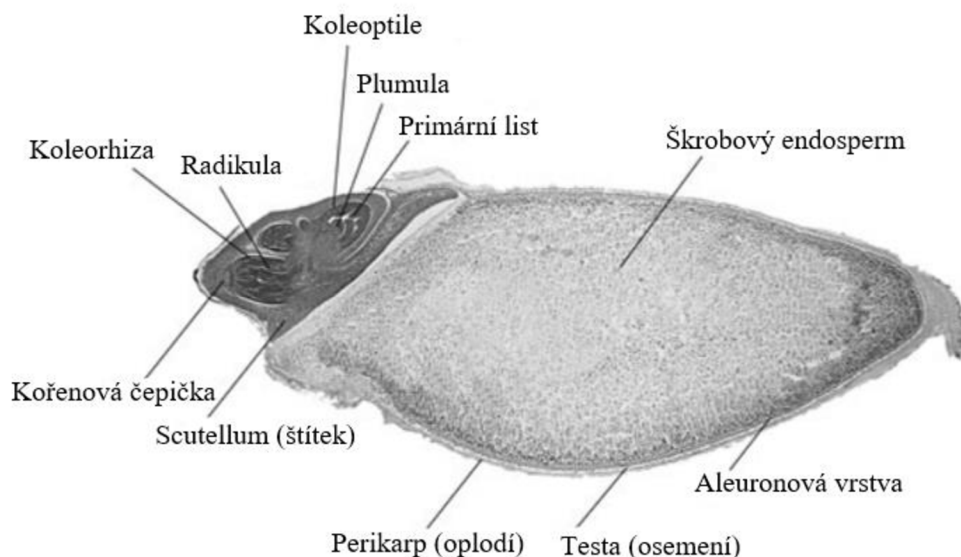
2.1.2 Vývoj a složení zrna

Porozumění vývoje zrna a jeho struktury je velice důležité k nalezení dalších přístupů za účelem zlepšení výnosu a složení zrna. Ječné zrno je plod, ve kterém je oplodí a obal semene (testa) srostlé a tvoří obilku (Sreenivasulu et al., 2010).

Během generativní fáze vývoje rostlin se generuje soubor plodolistů (gynoeceum) a soubor tyčinek (androceum), které jsou zdrojem vaječné buňky, respektive pylových zrn. Vývoj semen u krytosemenných vyšších rostlin začíná dvojitým oplodněním, které vede k vývoji embrya a endospermu, a podílí se na něm samčí a samičí gametofyt. Samičí gametofyt, který je tvořen osmi jádry a sedmi buňkami, se označuje jako zárodečný vak. Samčím gametofytem jsou pylová zrna tvořící se v prašných pouzdrech tyčinek. Samčí gametofyt je přenášen na bliznu pestíku a čnělkou prochází k vaječným buňkám (oosféře) do zárodečného vaku. Samčí gametofyt tvoří dvě spermatické buňky, kde se první spojí s oosférou a dá vznik diploidní zygote ($2n$), ze které se poté vyvíjí embryo. Druhá spermatická buňka se fúzuje s diploidním centrálním jádrem zárodečného vaku za vzniku triploidního endospermu ($3n$; Pavlová a Fischer, 2011). U jednoděložných rostlin, jako je ječmen, tvoří endosperm hlavní část zralého semene (Sundaresan, 2005). Obal semene pochází z mateřské pletivové tkáně, zatímco triploidní endosperm i diploidní embryo jsou dceřiné tkáně. V obou případech je počet buněk, určený během buněčného dělení ve vyvíjejícím se syncytiálním endospermu, určujícím faktorem konečné velikosti semene. Velikost semene je totiž primárně spojena s počátečním růstem endospermu a nikoli s pozdějším růstem embrya (Jameson & Song, 2016). Endosperm se diferencuje na vnější aleuronové/subaleuronové vrstvy a vnitřní škrobový endosperm a je chráněn testou. Embryonální tkáně se nacházejí v bazální části zrna a zahrnují scutellum, dvouděložný kotyledon a embryo (Wobus et al., 2005).

Zralé zrno ječmene se skládá s obalových slupek a obilky, která je charakteristická fúzí perikarpu s o semením (testou). Obilka se skládá z embrya, velkého endospermu a z mateřských tkání (Obr. 1). Endosperm slouží jako tkáň s hlavní nutriční hodnotou,

neboť zabírá 80 % obsahu obilného zrna. Zralý endosperm obsahuje pět typů buněk, jimiž jsou aleuron, sub-aleuron, škrobový endosperm, oblast okolí embrya a buňky pro přenos endospermu. Embryo se skládá ze dvou hlavních částí: embryonální osy a štítku (scutellum), který přiléhá k endospermu. Štítek je zodpovědný za transport živin do vyvíjející se embryonální osy a později během klíčení zrna poskytuje cestu pro transport sacharidů z endospermu do klíčícího embrya (Li et al., 2013, Aoki et al., 2006). Zralé embryo se dále skládá z plumuly, radikuly, která je kryta koleorhizou, kořenové čepičky a primárního listu (neboli dělohy), který je kryt koleoptilí (Obr. 1). Plumula tvoří embryonální základ pro nadzemní část rostliny. Radikula je naopak základem pro vznik kořene (Pavlová a Fischer, 2011).



Obr. 1 Podélný řez obilky ječmene s označením různých obilných tkání. Upraveno z (Li et al., 2013).

Zrna ječmene syntetizují škrob jako hlavní zásobní sloučeninu. Škrob nahromaděný v endospermu slouží jako primární zdroj sacharidů pro lidskou a zvířecí stravu. Škrob se dočasně také akumuluje v aleuronových buňkách, kde je degradován během období plnění zrn, a je poté nahrazen zásobními proteiny a lipidy (Radchuk et al., 2009). Ječné zrnko je tedy z velké části tvořeno sacharidy. Škrob, který se skládá z amylosy a amylopektinu tvoří téměř 60 % hmotnosti zrna. Hlavní složkou buněčných stěn buněk endospermu jsou β -glukany (75 %) a arabinoxylany (25 %). Bílkovinnou složku zrna tvoří hlavně prolaminy (hordein), albuminy, globuliny a gluteiny. Zásobní proteiny tvoří matrix kolem škrobových granulí v endospermu a poskytují zdroj dusíku pro rostoucí embryo při klíčení (Fox, 2010).

2.2 Výnosové charakteristiky zrna

Globální poptávka po potravinách, která je způsobena nárůstem populace, se neustále zvyšuje, a tak je zvýšení výnosu obilnin jedním z hlavních témat šlechtitelství. Drobnozrné obilniny jako jsou rýže, pšenice, ječmen, žito a oves tvoří přibližně 50 % světové zásoby potravin (Sharma et al., 2018; Ray et al., 2013). Hlavním cílem moderního šlechtění rostlin je vytvořit rostlinný materiál, který odolá různým environmentálním výzvám a zároveň poskytuje vysoký výnos (Sharma et al., 2018).

Výnos zrna je jednou z klíčových charakteristik pro šlechtitele, ale pochopení jeho genetické podstaty je obtížné kvůli jeho kvantitativní povaze a složité dědičnosti, která interaguje s prostředím. Výnos zrna je dán počtem sklizených zrn na jednotku plochy půdy a individuální hmotností zrna, která pozitivně souvisí s velikostí zrna. Počet zrn a potenciaální hmotnost jednotlivých zrn jsou ustanoveny v časovém úseku kolem období kvetení a hmotnost zralého zrna pozitivně koreluje s potenciálem zjištěným dříve (Fischer, 2008; Gambín & Borrás, 2010). Mezi další charakteristiky určující výnos zrna patří hmotnost tisíce zrn („Thousand Grain Weight“ - TGW), počet zrn na klas, plocha zrna, délka a šířka zrna a délka klasu (Sharma et al., 2018). Výnos plodin je komplexní znak ovlivněný mnoha abiotickými a biotickými faktory, a také různými vývojovými znaky rostlin (Thirulogachandar et al., 2021). Výtěžnost zrna je dána řadou dalších faktorů souvisejících s celkovým vývojem rostlin. Patří mezi ně schopnost rostliny přijímat vodu a živiny prostřednictvím kořenů, vývoj listů a fotosyntetických tkání pro fixaci uhlíku a skladování, a také procesy přemísťování uhlíku a živin během plnění obilnin (Li et al., 2013).

Jak už bylo zmíněno, výnos zrna patří mezi kvantitativní, tj. měřitelné znaky, a je podmíněn více než jedním genem. Jednou z nejpůvodnějších metod k studiu a analýze kvantitativních polygenních znaků je v současnosti metoda mapování lokusů s kvantitativním znakem (Quantitative Trait Loci, QTL). Lokus s kvantitativním znakem – QTL označuje specifickou oblast na chromozomech, která obsahuje geny kontrolující sledované znaky. QTL analýza je v podstatě statistická metoda, která se snaží propojit fenotypová data s genotypovými a identifikovat tak úseky DNA (molekulární markery), které jsou úzce spojené se specifickým fenotypovým znakem (Miles and Wayne, 2008). V roce 2018 Sharma a kolegové publikovali výsledky QTL analýzy 25 různých exotických kultivarů ječmene a jejich kříženců (celkem 1420 linií) v různých ekologických i pěstitelských podmínkách, přičemž sledovali devět znaků souvisejících s výnosem zrna. Cílem této studie bylo identifikovat nové alely pocházející z různorodého genetického pozadí, které by mohli v budoucnosti přispět jako nové cíle šlechtění při zlepšování výnosu zrna u ječmene. Autorům se podařilo identifikovat celkem 96 QTL regionů, přičemž mnohé z nich byly identifikované, jako geny známe, které se podílejí na kontrole kvetení, nebo morfologie klasu a podobně. 14 QTL bylo asociováno s nejméně třemi znaky současně, a některé z nich byly identifikovány jako orthology známých genů u rýže, podílejících se na determinaci velikosti zrna a výnosu. Jedním z těchto orthologních genů je gen *TGW6* na sedmém chromozomu ječmene, a tento gen byl vybrán jako cíl klonování v této bakalářské práci.

2.3 Hormonální regulace vývoje zrna

Konečný tvar a velikost obilky ječmene závisí na časové a prostorové regulaci buněčného dělení a buněčné expanze. Morfologie zralé obilky je z velké části určena růstovými charakteristikami raného oplodí (Pielot et al., 2015). Tvar mateřského oplodí totiž ovlivňuje hmotnost a výnos obilných zrn tím, že omezuje zvětšení zrna a následně i objem zrna (Ugarte et al., 2007). Poznání růstových charakteristik oplodí je velice důležité pro pochopení tvorby výnosu zrna, protože délka zrna je nejlépe korelovaným znakem s konečnou hmotností zrna. Hlavní procesy definující konečnou hmotnost zrna nastávají během první třetiny období plnění zrn, kdy oplodí prochází značným zvětšováním (Lizana et al., 2010).

Vývoj zrna je regulován nejenom na molekulární úrovni, ale i za pomoci fytohormonů. Mezi tyto hormony patří hlavně auxiny, cytokininy (CK), ale také i gibereliny (GA). Je známo, že auxin reguluje různé aspekty vývoje semen, včetně vývoje embrya,

endospermu a obalu semene, po oplodnění. V rostlinách se akumulace a distribuce auxinu během vývoje semen mění. Ačkoli hraje auxin důležitou roli při regulaci vývoje zrna, o jeho regulačních mechanismech je zatím známo málo (Cao et al., 2020). CK se také podílejí na mnoha zásadních aspektech růstu, vývoje a fyziologických procesů, jako je buněčné dělení a diferenciací, zpoždění senescence, vývoj semen a plodů, a reakce na biotické a abiotické stresy. Jejich regulace je komplexní, založená na rovnováze mezi biosyntézou, aktivací, inaktivací a degradací, která je řízena enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12; Jameson and Song, 2016). Prodlužování buněk může být také stimulováno GA, které jsou často detekovány v mladých zrnech (Yamaguchi, 2008). Auxin působí synergicky s GA a auxinové signály pocházející ze semene upregulují biosyntézu GA a signalizaci ve vajíčkách, čímž stimulují růst zrn (Seymour et al., 2013).

Růst obilky do délky je zprostředkován spíše dorzálními a laterálními oblastmi. Naopak růst do tloušťky souvisí s ventrálními oblastmi zrna. Hodnoty auxinu se zvyšují s nejvyššími hladinami v bazálním oplodí již šest dní po oplodnění. V této době se také upreguluje transport a signalizace auxinu. Biosyntéza GA je transkripčně upregulována až později a hladiny bioaktivních giberelinů se zvyšují až mezi 7 a 13 dnem po oplození a jsou vyšší ve ventrálních oblastech (Pielot et al., 2015). Prodlužování buněk zahrnuje více kroků, jako je relaxace buněčné stěny pro přizpůsobení příjmu vody, vnímání mechanických podnětů svého mikroprostředí a prodloužení buněčné stěny tlakem turgoru, dehydratace a biosyntéza buněčné stěny. Expanze rostlinných buněk je přísně regulována a auxin je zde jedním z nejdůležitějších signálů. Auxin aktivuje H^+ -ATPasy, které okyselují apoplast a aktivují proteiny buněčné stěny, jako jsou expansiny a xyloglukan, endotransglykosylasy/hydrolasy zprostředkovávající uvolňování buněčné stěny. H^+ -ATPasy také indukují hyperpolarizaci plazmatických membrán, které indukují K^+ dovnitř usměřující kanály nezbytné pro příjem vody (Fuchs et al., 2006). Výsledné vychytávání K^+ usnadňuje přítok vody a podporuje expanzi buněk (Ringli, 2010). Auxin tedy indukuje genovou expresi H^+ -ATPasy plazmatické membrány, K^+ kanálů, expansinů a enzymů remodelujících buněčnou stěnu a podporuje export nového materiálu buněčné stěny. Auxinem zprostředkované turgorem řízené zvětšení buněk může být stimulováno štěpením sacharosy, čímž se získají hexosy a zvyšuje se osmotická koncentrace ve vakuolách a je usnadněn příjem vody (Kutschera & Niklas,

2013). Expanze rostlinných buněk a tvarování orgánů jsou odvozeny od měnícího se vztahu vody a materiálu buněčné stěny (Burton & Fincher, 2014).

Auxin se může ve tkáni akumulovat dvěma způsoby, a to lokální biosyntézou nebo transportem ze vzdáleného zdroje. Nejzastoupenější formou auxinu v rostlinách je kyselina indol-3-octová (Indol-3-Acetic Acid, IAA). Tento auxin je syntetizován v řadě mladých tkání dvěma různými cestami, cestou závislou na tryptofanu a cestou nezávislou na tryptofanu (Mano & Nemoto, 2012). Enzymy biosyntézy auxinu jsou exprimovány pouze během pozdějších fází vývoje zrna, což naznačuje, že během raných fází růstu semen není auxin syntetizován v oplodí, ale je zde importován (Pielot et al., 2015).

2.3.1 Konjugáty IAA

IAA existuje ve dvou formách: hormonálně aktivní – volná kyselina, nebo hormonálně neaktivní ve formě konjugátů. Předpokládá se, že konjugáty auxinu hrají důležitou roli jako zásobní formy pro aktivní rostlinný hormon IAA. Ve volné formě tvoří IAA pouze 25 % z celkového množství IAA v závislosti na tkáni a studovaném rostlinném druhu. Rozlišujeme tři hlavní skupiny konjugátů IAA: nízkomolekulární esterové konjugáty s cukry, amidové konjugáty s aminokyselinami, nebo vysokomolekulární konjugáty s peptidy a proteiny (Ludwig-Müller, 2011). Předpokládá se, že tyto konjugáty se podílejí na transportu, ochraně proti oxidaci, skladování a homeostáze IAA. Homeostatická kontrola koncentrace IAA v rostlinách je velmi důležitá při určování mnoha růstových a vývojových reakcí (Kowalczyk et al., 2003). Kromě amidových konjugátů (IAA-Leu, IAA-Phe a další) byl také esterový konjugát IAA-glukóza identifikován u několika dvouděložných rostlin (včetně *Arabidopsis thaliana*) a jednoděložné kukuřice (*Zea mays* L.) (Tam et al., 2000; Jakubowska & Kowalczyk, 2004). IAA-glukosa se nachází zejména v rostlinách a rostlinných proteinech s IAA glukosyltransferasovou aktivitou (Woodward & Bartel, 2005). Identifikované geny *iaglu* u kukuřice (Szerszen et al., 1994) a *UGT84B1A* u *Arabidopsis thaliana* (Jackson et al., 2001) kódují glukosyltransferasy, které konjugují IAA s glukosou. Paradoxně jsou hladiny volné IAA ve skutečnosti zvýšené u linií s nadměrnou expresí *UGT84B1* (Jackson et al., 2002). Kukuřičný gen *iaglu* kóduje UDP-glukosyltransferasu (UGT), která tvoří 1-O-indolacetylglukosový ester (IAGlc), glukosylovaný konjugát IAA (Jackson et al., 2001). Podobně byly esterově vázané konjugáty studovány například i v rýži. Yu a kolegové v roce 2019 zjistili, že protein IAAGLU katalyzuje reakci volného IAA s glukosou za tvorby IAA-glukosy, která by mohla potenciálně regulovat IAA homeostázu v rýži a kukuřici.

Vzhledem k potenciálnímu zapojení konjugátů IAA do hormonální homeostázy a skladování musí existovat řada enzymů hydrolyzujících konjugáty s odlišnou specifitou. Pouze zlomek konjugátů IAA, jako je IAA–Ala, IAA–Leu, IAA–Phe a další, je hydrolyzován zpět na volnou IAA prostřednictvím auxinových aminokyselinových konjugátových hydrolas. Zatímco u konjugátů aminokyselin s IAA–Asp a IAA–Glu se předpokládá, že mohou být spíše prekurzory pro degradační dráhu (Ludwig-Müller, 2011). Hydrolýza druhé skupiny hlavních auxinových konjugátů s cukry je méně dobře známa. UDP glukosyltransferasy konjugují IAA s glukosou. Následuje další přeměna IAA-glukosy na IAA-myo-inositol. Enzym pro přenos IAA z IAA–glukosy na myo-inositol může také katalyzovat reverzní reakci, tj. hydrolýzu na volnou IAA (Kowalczyk et al., 2003). Ishimaru a kolegové v roce 2013 identifikovali v rýži gen *TGW6* kódující protein s hydrolasovou aktivitou pro IAA-glukosu. Tato reakce negativně ovlivňovala velikost zrna a počet buněk v endospermu.

2.4 Charakteristika genu *TGW6* (*THOUSAND GRAIN WEIGHT 6*)

Odhalení genu *TGW6* předcházela identifikace lokusu *tgw6* pomocí QTL analýzy u rýže a její funkční fyziologická charakterizace (Ishimaru 2003). Analýza QTL asociovaných s *TGW* za použití linií, které byly získány zpětným křížením kultivarů rýže cvs Nipponbare/Kasalath/Nipponbare, odhalila lokus odpovědný za zlepšení *TGW* parametru. Lokus byl lokalizován na chromozomu 6 a ukázalo se, že alela kultivaru Kasalath, má zřejmě zásadní vliv na vyšší výnos. Charakterizace fyziologické funkce této alely ukázala, že pozitivně ovlivňuje akumulaci sacharidů a syntézu škrobu v listových pochvách, které představují hlavní pletivo akumulující sacharidy před metáním (Ishimaru 2003).

V následujících letech stejná pracovní skupina identifikovala *TGW6* (*OsTGW6*, *Oryza sativa* L.) gen obsahující jediný exon a porovnála sekvence alel Kasalath a Nipponbare (Ishimaru et al., 2013). Ukázalo se, že Kasalath alela obsahuje šest nukleotidových substitucí a jednonukleotidovou delecí na pozici 313 v porovnání s Nipponbare alelou. Zmíněná delece způsobuje posun čtecího rámce, což vede k předčasnému výskytu stop kodonu a následně tak i k produkci nefunkčního proteinu. *TGW6* kóduje originální protein, který vykazuje hydrolasovou aktivitu a štěpí IAA-glukosu. Takovým způsobem reguluje přísun aktivní formy auxinu a kontroluje tak, v prvních hodinách po oplození, přechod ze syncytiální do buněčné (celulární) fáze, čím negativně ovlivňuje počet buněk endospermu a velikost zrna. Nefunkční protein (produkt

Kasalath alely) má tedy žádoucí, pozitivní efekt na velikost zrna u rýže. Avšak, ukázalo se, že *TGW6* má pleiotropní efekt a účinkuje i v listových pochvách, orgánech poskytujících zásobní látky (uhlovodíky) vyvíjecímu se zrnu. Tento účinek je však nepřímý (například reguluje transkripci genů zapojených do syntézy škrobu), a má negativní vliv na translokaci zásobních látek ze zdroje do zrna. Kasalath alela teda kromě toho, že má pozitivní vliv na velikost zrna, zvyšuje i kapacitu zdrojových orgánů dodávat zásobní látky a umocňuje tak svou roli při zvyšování výnosu zrna u rýže (Ishimaru et al. 2013).

Homologní gen k *OsTGW6*, prokazatelně asociován s hmotností zrna, byl identifikován i v pšenici (*Triticum aestivum* L.) – *TaTGW6*. Protože nízká exprese *TaTGW6* v nezralých i zralých zrnech koreluje s nízkým obsahem IAA, a naopak vyšší hmotností zrna, je možno se domnívat, že podobný mechanismus regulace pomocí *TGW6* jako u rýže, se může vyskytovat i u pšenice (Hu et al., 2016). Avšak, funkce *TGW6* zejména jako IAA-glukosa hydrolasy v nezralých zrnech pšenice i rýže byla nedávno zpochybněna. Kabir & Nonhebel (2021) uvádějí, že ani *TaTGW6* ani *OsTGW6* nejsou exprimovány ve vyvíjejících se zrnech. Místo toho jsou oba geny a jejich blízké homology exprimovány výhradně v průběhu vývinu květenství. Tento důkaz v kombinaci s jejich pozorováním, že vyvíjející se zrna pšenice mají nedetekovatelné hladiny esteru IAA ve srovnání s volnou IAA a neexprimují IAA-glukosa syntasu, naznačuje, že role *TGW6* jako hydrolasy štěpící IAA-glukosu ve vyvíjejících se zrnech by měla být přehodnocena, nebo alespoň podrobena dalšímu výzkumu.

2.5 Klonování DNA

Klonování DNA je proces tvorby klonů, tj. identických molekul DNA. Tento proces zahrnuje přípravu rekombinantní DNA, kdy je požadovaný fragment DNA vložen do klonovacího vektoru za vzniku rekombinantního vektoru (tj. rekombinantní DNA), který je schopný autonomní replikace v hostitelském organismu (Carter & Shieh, 2015). Vývoj klonovacích technik začal s objevem bakteriálních enzymů označovaných jako „restrikční endonukleasy“, které štěpí DNA molekuly na specifických místech. Tradiční metody molekulárního klonování využívají těchto enzymů ke štěpení větších fragmentů DNA na menší fragmenty, které jsou pak spojeny s klonovacími vektory pomocí enzymu zvaného DNA ligasa. Restrikční endonukleasy generují buď „lepivé konce“, ve kterých má fragment DNA jednovláknový převis (několik specifických nukleotidů buď na 3' nebo 5' konci), nebo „tupé konce“, kde se žádný převis nenachází. Jakékoliv dva tupé

konce mohou být spojeny DNA ligasou, ale u lepivých konců mohou být spojeny jenom komplementární převisy, což znamená, že fragment a vektor musí být štěpeny stejnou restriční endonukleasou (Bertero et al., 2017).

2.6 Plazmidové vektory

Nejčastěji používanými klonovacími vektory jsou plazmidové vektory. Plazmidy jsou malé kruhové mimochromozomové molekuly DNA schopné nezávislé replikace vyskytující se u mikroorganismů, zejména bakterií. Plazmidové vektory jsou vhodné pro nejběžnější pokusy s klonováním a mohou pojmut až 20 kb (kilo báz) cizí DNA. Plazmid musí obsahovat několik důležitých prvků, aby mohl sloužit jako vhodný vektor, a to replikační počátek, dominantní selekční marker a mnohočetné klonovací místo (Tolmachov, 2009). Replikační počátek („Origin of replication“ - ORI) je důležitý pro start replikace DNA a umožňuje tak amplifikaci (klonování) plazmidu. Existují různé typy ORI, které mohou ovlivnit počet kopií plazmidu na bakteriální buňku (Ekundayo & Bleichert, 2019). Další důležitou komponentou plazmidu je selekční marker, který umožňuje selekci bakterií obsahujících rekombinantní plazmidy. Jako selekční marker slouží obvykle gen rezistence k antibiotiku. Mnohočetné klonovací místo („Multiple cloning site“ - MCS), je oblast navržená tak, aby obsahovala různá unikátní restriční místa pro usnadnění vkládání fragmentu cizí DNA (inzertu) do vektoru. Unikátní restriční místo je místo štěpení, které je nachází v sekvenci plazmidu pouze jednou a leží v takové oblasti vektoru, která nezasahuje klíčové komponenty jako ORI nebo selekční marker (Simpson, 2010). Některé plazmidy obsahují i jiné specifické sekvence, například promotor a terminátor. Promotor iniciuje a terminátor ukončuje expresi inzertu a takovým plazmidům říkáme expresní plazmidy (Bertero et al., 2017, Rosano & Ceccarelli, 2014).

Nejčastěji používaným hostitelským organismem rekombinantních plazmidových vektorů je snadno rostoucí, nepatogenní laboratorní bakteriální kmen *Escherichia coli*. Jedna transformovaná buňka *E. coli* nesoucí požadovanou rekombinantní DNA může být snadno exponenciálním způsobem namnožena tak, aby generovala identické kopie této DNA. Jako takové může být molekulární klonování viděno i jako *in vivo* polymerasová řetězová reakce (PCR). Molekulární klonování však umožňuje větší flexibilitu, vyšší přesnost a nižší náklady než PCR (Berteto et al, 2017).

2.7 „Seamless“ klonování

Klonování pomocí restričních endonukleas vyžaduje přítomnost specifických restričních míst na koncích fúzovaných fragmentů DNA (plazmidu i inzertu). Tuto přítomnost je ale potřeba zabezpečit vložením takové sekvence DNA na začátek a konec inzertu, a to buď pomocí linkerů, a nebo PCR reakce, kde je restriční místo součástí sekvence primeru. V takovém případě výsledný rekombinantní plazmid obsahuje kromě sekvence plazmidu a inzertu navíc sekvenci restričního místa. V případě expresních plazmidů, které se používají nejen pro amplifikaci DNA fragmentu, ale také pro expresi odpovídajícího rekombinantního proteinu, mohou takové extra sekvence představovat problém, protože mohou narušit aktivitu a funkci rekombinantního proteinu. Pro klonování rekombinantních proteinů je proto vhodnější použít jinou metodu klonování a to například tzv. „seamless“ klonování (Hou et al., 2021).

„Seamless“ klonování umožňuje přesné spojení dvou a více fragmentů DNA najednou tak, že se mezi spojované fragmenty DNA nepřidávají žádné nové nežádoucí nukleotidy (Lu, 2005). Tento způsob klonování se používá pro studium promotorů, exonů, funkční studie proteinů, proteinové inženýrství, produkce proteinů a manipulace s genomem (Lu, 2005). Tento typ klonování vyžaduje pečlivý návrh četných primerů pro zajištění úspěšné amplifikace DNA fragmentů a linearizovaných vektorů. Při této metodě jsou primery pro amplifikaci dvou fragmentů navrženy tak, aby měli na svých koncích převisy více než 13 bází, které jsou k sobě navzájem homologní a překrývají se. Amplifikované fragmenty tedy tyto převisy mají také. Díky tomu se při spojení těchto dvou fragmentů při klonování mezi ně nedostanou žádné jiné báze (Zhang et al., 2010).

Existují však i další metody klonování bez přidání extra sekvencí DNA, a to například Gibsonovo klonování (Li et al. 2018), „Golden gate“ klonování (Engler and Marillonnet, 2014), OEPR („Overlap Extension PCR and Recombination *in vivo*“) klonování (Liu et al., 2017) a jiné.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Jako DNA templát pro amplifikaci vybraného úseku DNA byla použita genomická DNA ječmene (*H. vulgare*) odrůdy Golden Promise. Při klonování byly použity chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP10 a NEB 10-beta, nebo elektrokompetentní buňky *E. coli* TOP10.

3.1.2 Chemikálie

- 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 100 bp plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 5x Green GoTaq[®] reakční pufr (Promega, USA)
- 5x Phusion GC (High-Fidelity) pufr (NEB, Velká Británie)
- 5x Phusion HF (High-Fidelity) pufr (NEB, Velká Británie)
- 6x DNA Purple Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, Velká Británie)
- Agar (Himedia, Indie)
- Agarosa (Amresco, USA)
- Amplicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- Bam HI-HF restriční endonukleasa (NEB, Velká Británie)
- dNTPs 10mM (BioRad, USA)
- DMSO (Duchefa, Nizozemsko)
- EDTA (Penta, Česká republika)
- Ethanol (Lach-ner, Česká republika)
- Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- GoTaq DNA Polymerasa (Promega, USA)

Hydroxid sodný (Penta, Česká republika)
Chlorid draselný (Lach-ner, Česká republika)
Chlorid hořečnatý (Finnzymes, Finsko)
Chlorid sodný (Penta, Česká republika)
Isopropanol (MACH, Česká republika)
KpnI-HF restriční endonukleasa (NEB, Velká Británie)
Kvasinkový extrakt (HiMedia, Indie)
Kyselina octová (Lach-ner, Česká republika)
Nuclease-free voda (Qiagen, Německo)
Octan draselný (Penta, Česká republika)
Phusion DNA Polymerasa (NEB, Velká Británie)
Proteinasa K (Macherey-Nagel, Německo)
RNasa (Top-Bio, USA)
SalI-HF restriční endonukleasa (NEB, Velká Británie)
SDS (Penta, Česká republika)
Tris (Duchefa, Nizozemsko)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
Trypton (Duchefa, Nizozemsko)

3.1.3 Sekvence použitých primerů (Tab. 1)

Primery byly navrženy pomocí programu Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>). Primery pro klonování pomocí NEBuilder Hifi DNA Assembly Reaction Kitu byly navrženy programem NEBuilder[®] Assembly tool (<https://nebuilder.neb.com/#!/>).

Tab. 1 Sekvence použitých primerů.

Primery	Sekvence primeru (5'-3')
tgw6_full_fw	CGGGATAGTGGTCGATGAGT
tgw6_full_rev	CTTGCGTATAACGACGGACA
promTWG6_fw	gcttatcgataaccgtcgacgcTCCATGCATTACTCTGTTTTAC
promTGW6_rev	tcctcgcccttgcaccatCTTGCGTATAACGACGGAC
promTGW6_fw2	ctaaaggaacaaaagctggGCTGATATTCCTATTGATTTCGATAAAC
promTGW6_rev2	tcctcgcccttgcaccatCTTGCGTATAACGACGGAC
pGFP_Amp_fwd	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
pGFP_Amp_rev	CGTCGACGGTATCGATAAGC
pGFP_Amp_fw2	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
pGFP_Amp_rev2	CCAGCTTTTGTTCCTTTAGTG
GFP_fw	ATGGTGAGCAAGGGCG
GFP_rev	CTTGTACAGCTCGTC
TGW6-Hr7-Fw1	GAACAAACACAACAACATCACC
TGW6-Hr7-Rev1	CAACAGAAAACCTCCACTTAACAGAC

3.1.4 Roztoky a média

1% agarosový gel: 1 g agarosy, 100 ml 1xTAE pufru

Extrakční pufr: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v), autoklávováno a přidáno 100 µg/ml proteinasy K

LB (Luria-Bertani) médium (1 l): 10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasničný extrakt, pH = 7,0, autoklávováno

LB agar (1 l): 10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasinkový extrakt, 15 g agar, pH = 7,0, autoklávováno

P1 roztok (250 ml): 1,51 g Tris-HCl, 0,93 g EDTA-NA₂.2H₂O, pH = 8,0, po autoklávování a ochlazení přidáno 200 µl RNasy (Top-Bio) do 50 ml roztoku

P2 roztok (250 ml): 2 g NaOH, 2,5 g SDS, autoklávováno

P3 roztok (250 ml): 73,6 g CH₃COOK, pH = 5,5, autoklávováno

SOC médium (1 l): 20 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mmol.l⁻¹ KCl, pH = 7,0, po autoklávování přidáno 5 ml 2 mol.l⁻¹ MgCl₂, 20 ml 1 mol.l⁻¹ glukosy

50x TAE pufr (1 L): 242 g Tris-acetát, 57,1 ml CH₃COOH, 100 ml 0,5 mol.l⁻¹ EDTA (pH = 8,0)

3.1.5 Kity a návody

NEB PCR Cloning Kit (NEB, Velká Británie)

NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction Kit (NEB, Velká Británie)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Německo)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)

3.1.6 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 5034/120 (Nahita-Auxilab, Španělsko)

Centrifuga 5427R (Eppendorf, Česká republika)

Digestoř (MERCİ, Česká republika)

Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)

Elektromagnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG® (IKA, Německo)

Elektroporátor ECM399 (BTX, USA)

Flowbox (MERCİ, Česká republika)

Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Inkubátor (Mettler, Německo)

Inkubátor Cool-Hotter Dry (Major Science, USA)

MEGA 6.0 (MegaSoftware, USA)

Mikrocentrifuga Eppendorf Microcentrifuge 5417R (Eppendorf, Německo)

Nanodrop Lite (Thermo Scientific, USA)

NEBuilder® Assembly tool (<https://nebuilder.neb.com/#/>)

PC se softwarem Image Lab™ (BIO-RAD, USA)

Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>)

SnapGene software (Insightful Science; snapgene.com)

Termoblok (BIOER, Čína)

Termocykler gradient T (Biometra, Německo)

Termocyklér Veriti 96 Well Fast (Applied Biosystems, USA)

Třepačka inkubovaná Unimax 1010 (Heidolph, Německo)

UV transiluminátor (Vilber Lourmat, Francie)

Vortex (Labnet, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.2 Metody

S bakteriemi bylo zacházeno výhradně ve sterilních podmínkách ve flowboxu.

3.2.1 Izolace plasmidové DNA (pDNA) alkalickou lyzí

Všechny centrifugační kroky byly provedeny při 13000 rpm. Nejprve byly 2 ml bakteriální kultury centrifugovány po dobu 1 min při laboratorní teplotě, aby proběhla separace buněk od média. Supernatant byl odstraněn a byl resuspendován v 300 μ l P1 roztoku. Poté bylo k roztoku přidáno 300 μ l lyzačního P2 roztoku a zkumavka byla 6x převracena a byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo k roztoku přidáno 300 μ l P3 roztoku, který sráží jadernou DNA a proteiny. Zkumavka byla 6x převracena a byla inkubována 5 min na ledě. Po inkubaci byla zkumavka centrifugována 10 min při 4 °C. Vzniklý supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a bylo k němu přidáno 500 μ l isopropanolu, který sráží pDNA. Roztok byl promíchán převrácením zkumavky. Zkumavka byla centrifugována 30 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 μ l 70 % ethanolu, který byl těsně před přidáním vytáhnut z ledničky, aby měl teplotu -20 °C. Dále proběhla centrifugace po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl ethanol odstraněn. Zkumavka byla ještě krátce centrifugována na pikocentrifuze a ethanol usazený na dně zkumavky byl opatrně za pomoci pipety odstraněn. Zkumavka byla otevřená ponechána v digestoři, aby byl zbytek ethanolu odpařen po dobu cca 15 min. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 100 μ l sterilní H₂O. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Nanodropu.

3.2.2 Izolace pDNA podle QIAprep® Spin Miniprep Kitu

Všechny centrifugační kroky byly provedeny při laboratorní teplotě (21 °C) a 13000 rpm. 2 ml bakteriální kultury bylo centrifugováno 3 min. Supernatant byl odstraněn a pelet bakteriálních buněk byl resuspendován v 250 μ l P1 pufru a byl přepipetován do

mikrocentrifugační zkumavky. K roztoku bylo napipetováno ještě 250 μl P2 pufru a roztok byl promíchán převrácením zkumavky 4-6 krát dokud roztok nebyl průhledný. Dále bylo do zkumavky přidáno 350 μl N3 pufru a roztok byl promíchán převrácením zkumavky 4-6krát. Zkumavka byla centrifugována po dobu 10 min. 800 μl supernatantu bylo napipetováno na QIAprep 2.0 kolonku a kolonka byla centrifugována 45 s. Kolonka byla poté promyta napipetováním 500 μl pufru PB a byla centrifugována po dobu 45 s. Dále byla kolonka promyta 750 μl PE pufru a byla centrifugována 45 s. Dále byla kolonka centrifugována 1 min, aby se odstranil zbývající pufr. Kolonka byla vložena do 1,5 ml mikrozukavky. Pro vymytí DNA bylo na kolonku napipetováno 50 μl EB pufru a byla takhle inkubována po 1 min při laboratorní teplotě a dále byla kolonka centrifugována 1 min. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Nanodropu.

3.2.3 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Při použití primerů tgw6_full a promTGW6 byla jako DNA templát použita genomická DNA (gDNA) ječmene odrůdy Golden Promise (GP). Při použití primerů pGFP_Amp byla jako DNA templát použita plazmidová DNA (pDNA) a to plazmid pGFP_Amp.

3.2.3.1 PCR s Phusion polymerasou

Phusion polymerasa, vykazuje 3' \rightarrow 5' exonukleasovou aktivitu, která zabezpečuje opravy v průběhu amplifikace a zvyšuje přesnost a generuje tak amplikony s tupými konci. Tato polymerasa je také navíc vhodná i pro amplifikaci delších fragmentů. Finální koncentrace polymerasy, MgCl₂, DMSO nebo DNA v PCR reakci se v průběhu optimalizace reakce měnila (Tab. 2) podobně jako čas denaturace a elongace (Tab. 3).

Tab. 2 Reakční mix pro jednu PCR reakci s Phusion DNA polymerasou.

Složka	Finální koncentrace
5X Phusion GC/HF reakční pufr	1 x
25mM MgCl ₂	1,5 – 3,5 mM
10 mM dNTPs	2 mmol·l ⁻¹
10 μM fw primer	0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
10 μM rev primer	0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Phusion DNA polymerasa	1/0,6 U
DMSO	3 – 5 %
H ₂ O	
DNA templát	75 ng·ml ⁻¹ (gDNA)/0,01 – 1 ng· μl^{-1} (pDNA)

Tab. 3 Program termocykléru pro PCR s Phusion DNA polymerasou

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	98	40 – 60	1
2. Denaturace	98	15 – 20	30
3. „Annealing“	56 – 69	30	
4. Elongace	72	150 – 90	
5. Závěrečná elongace	72	420/300	1

3.2.3.2 PCR s GoTaq DNA polymerasou

Tato polymerasa byla použita pro kontrolní PCR, pro potvrzení přítomnosti inzertu ve vektoru nebo „Colony“ PCR. Pro kontrolu, zda byl inzert (PCR produkt amplifikován pomocí primeru *tgw6_full*) vložen do vektoru *pMini* byla provedena „Colony“ PCR s primery *TGW6-Hr7* (Tab. 4). Teplota pro nasedání primerů byla 60 °C (Tab. 5). Tato metoda byla použita i pro ověření, zda se vektor nachází v narostlých koloniích při klonování podle NEBuilder Hifi DNA Assembly Cloning Kitu. Zde bylo vybráno několik narostlých kolonií, ve kterých by se měl nacházet klonovaný konstrukt (*promTGW6::pGFPamp*). Tyto kolonie byly ověřeny na přítomnost genu *GFP* pomocí PCR reakce s *GFP* primery (Tab. 4). Teplota pro nasedání primerů byla 62 °C (Tab. 5).

Tab. 4 Reakční mix pro jednu PCR reakci s GoTaq DNA polymerasou

Složka	Finální koncentrace
5X Green GoTaq [®] reakční pufr	1 x
10 mM dNTPs	0,2 mmol·l ⁻¹
10 μM fw primer	0,4 μmol·l ⁻¹
10 μM rev primer	0,4 μmol·l ⁻¹
25mM MgCl ₂	1,5 mmol·l ⁻¹
GoTaq [®] DNA polymerasa (5U·μl ⁻¹)	0,6 U
H ₂ O	

Tab. 5 Program termocykléru pro PCR s GoTaq DNA polymerasou. Před lomítkem jsou podmínky pro *TGW6-Hr7* primery, za lomítkem jsou podmínky pro *GFP* primery.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	95	120	1
2. Denaturace	95	30	30
3. „Annealing“	60/62	30	
4. Elongace	72	60/45	
5. Závěrečná elongace	72	300	1

3.2.4 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu

PCR produkty a fragmenty DNA získané restrikčním štěpením byly separovány pomocí agarosové elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Pro vizualizaci DNA byl použit ethidium bromid (0,0005%) a do gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek na nanášení vzorků. Po ztuhnutí byl gel bez hřebínku vložen do horizontální elektroforetické komůrky, a zalit 1x TAE pufrém, tak že byl zcela ponořen. Nanášecí pufr 6x Purple Loading Dye byl přidán ke vzorku DNA v poměru 1:5. Vzorky pak byly pipetovány do vytvořených jamek v gelu. Do jedné jamky byly také napipetovány 3 μ l 1 kb plus DNA Ladder nebo 100 bp plus DNA Ladder, které se používají pro stanovení velikosti separovaných fragmentů DNA. Po napipetování všech vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Zdroj napětí byl nastaven na 110 V a separace probíhala cca 40 min.

3.2.5 DNA extrakce a purifikace z agarosového gelu

Extrakce DNA z gelu byla provedena podle kitu NucleoSpin[®]Gel and PCR Clean-up. Čistým skalpelem byl fragment DNA z gelu vyříznut pod UV lampou a zvážen na analytických vahách. Ke každým 100 mg agarosového gelu bylo přidáno 200 μ l pufru NTI. Zkumavka s tímto roztokem byla inkubována při 50 °C po dobu 5-10 min až do té doby, kdy byl gel rozpuštěný. Do nové mikrozukavky (2 ml) byla vložena kolonka, na kterou bylo napipetováno 700 μ l vzorku a takto byla centrifugována při 11000 rpm po dobu 30 s. Tekutina byla ze zkumavky odstraněna a kolonka byla vrácena zpět do zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 700 μ l NT3 pufru a zkumavka byla centrifugována při 11000 rpm po dobu 30 s. Tento krok byl 2x opakován. Dále byla centrifugována (11000 rpm, 1 min) pouze mikrozukavka s kolonkou, aby byl NT3 pufr úplně odstraněn. Pak byla tato kolonka vložena do čisté 1,5 ml a přímo na ní bylo napipetováno 15 μ l NE pufru, který byl předeřhřátý na 70 °C. Po 5 min byla a mikrozukavka s kolonkou centrifugována při 11000 rpm. Roztok na dně zkumavky obsahoval přečištěnou DNA a její koncentrace byla změřena pomocí Nanodropu.

3.2.6 Purifikace produktu PCR reakce pomocí PCR Clean-up Kitu

K purifikaci byl použit PCR Clean-up Kit. Bylo smícháno 90 μ l PCR produktu s 180 μ l NTI pufru. Na čistou kolonku z kitu, která byla vložena do mikrozukavky (2 ml), bylo napipetováno 700 μ l vzorku. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována při 11000 rpm po dobu 30 s, a proteklý roztok byl odstraněn. Dále byla kolonka dvakrát promyta

NT3 pufrem a to tak, že na ni bylo napipetováno 700 μl NT3 pufru a byla centrifugována při 11000 rpm po dobu 30 s. Zkumavka s prázdnou kolonkou byla centrifugována ještě jednou při 11000 rpm po dobu 1 min, aby došlo k úplnému odstranění NT3 pufru. Poté byla kolonka vložena do nové mikrozukavky (1,5 ml) a bylo na ní napipetováno 20 μl pufru NE inkubovaného při 70 °C a byla inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté byla mikrozukavka s kolonkou centrifugována při 11000 rpm po dobu 1 min. Rostok na dně zkumavky obsahoval přečištěnou DNA a její koncentrace byla změřena pomocí Nanodropu.

3.2.7 Klonování amplifikovaného fragmentu do vektoru pMini

Fragment genu *TGW6* s jeho promotorem, který byl amplifikován pomocí *tgw6_full* primerů byl klonován do vektoru *pMini* za pomoci NEB PCR Cloning Kitu. Ligační směs (Tab. 4) byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě, anebo přes noc při 4 °C v lednici, a poté ještě 2 min na ledě. Ligační směs byla ihned použita k transformaci bakteriálních buněk.

Tab. 4: Složení ligační směsi pro klonování inzertu do vektoru pMini.

Složka	Ligační [μl]	směs	Pozitivní kontrola [μl]
Linearizovaný pMiniT 2.0 vektor (25 ng· μl^{-1})	1		1
Inzert	4		-
Amplikon – klonovací kontrola (1 kb; 15 ng· μl^{-1})	-		2
H ₂ O	-		2
Klonovací mix 1	4		4
Klonovací mix 2	1		1
Celkový objem	10		10

3.2.8 Transformace chemicky kompetentních buněk *E. coli*

Se všemi bakteriálními buňkami bylo zacházeno za sterilních podmínek ve flowboxu. pDNA, anebo ligační směs byla transformována pomocí tepelného šoku do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 nebo NEB 10-beta. Nejprve byly tyto buňky rozmrazeny na ledu, protože jsou za normálních podmínek uchovávány při teplotě -80 °C. 5 μl ligační směsi nebo pozitivní kontroly bylo přidáno k 50 μl rozmražených buněk. Směs byla inkubována na ledu po dobu 20 min. Následně byl proveden teplotní šok 45 s při 42 °C (ve vodní lázni) a ihned po skončení byly zkumavky přeneseny na led a zde byly inkubovány 5 min a poté ještě 2 min při pokojové teplotě. Následně bylo

k transformovaným buňkám přidáno 975 μl NEB 10-beta SOC média a byly inkubovány na třepačce při 250 rpm a 37 °C po dobu 60 min.

Po skončení inkubace byly zkumavky centrifugovány 3 min při pokojové teplotě a 3000 rpm. Ze zkumavek bylo odebráno 300 μl supernatantu. Ve zbytku supernatantu byly transformované buňky resuspendovány. Poté byly buňky (50 a 150 μl) rozetřeny pomocí sterilní hokejky na petriho misky s LB agarem, které obsahovaly ampicilin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vektor totiž obsahuje gen, který propůjčuje rezistenci k ampicilinu, takže po očkování na LB agar s tímto antibiotikem vyrostou pouze kolonie obsahující tento vektor. Petriho misky byly utěsněny parafilmem a byly kultivovány dnem vzhůru přes noc při 37 °C.

3.2.9 Transformace elektrokompetentních buněk *E. coli*

Se všemi bakteriálními buňkami bylo zacházeno za sterilních podmínek ve flowboxu. Ligační směs byla transformována pomocí tepelného šoku do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10. 2,5 μl ligační směsi nebo pozitivní kontroly byly přidány k 50 μl rozmražených buněk. Směs buněk a DNA byla přepipetována do vychlazených kyvet pro elektroporaci (na ledu) a pak byl aplikován elektrický šok pomocí elektroporátoru, který byl nastaven na 15 kV. Po elektroporaci bylo ke vzorkům okamžitě přidáno 950 μl SOC média. Roztok z kyvet byl přelit do nových mikrozkušavek (1,5 ml). Následující postup byl již stejný jako při transformaci s chemicky kompetentními buňkami.

3.2.10 Očkování vybraných kolonií do LB média s ampicilinem

Vybrané kolonie byly ve flowboxu za pomoci sterilních pipetových špiček přeočkovány do 2 ml tekutého LB média obsahujícího ampicilin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Následovala inkubace přes noc na třepačce při 180 rpm a 37 °C.

3.2.11 Klonování podle NEBuilder Hifi DNA Assembly Kitu

Pro klonování inzertu promTGW6 do vektoru pGFP_Amp byl použit NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit, který slouží ke sloučení dvou fragmentů dohromady, aniž by k nim byly přidány nežádoucí sekvence aminokyselin. Fúzované byly dva PCR produkty, a teda inzert i plazmid byly amplifikovány pomocí PCR za použití Phusion polymerasy (3.2.3.1) a promTGW6 nebo pGFP_Amp primerů, respektive. Reakční směs (Tab. 7) byla připravena na ledu a poté byla inkubována v termocykléru při 50 °C po dobu 60 min. Po uplynutí doby inkubace byla ligační směs ihned použita k transformaci bakteriálních buněk.

Tab. 7 Složení reakční směsi pro NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit

Složka	Klonovací směs [μ]	NEBuilder pozitivní kontrola [μ]
Poměr vektor:inzert	1:2	-
Celkový objem fragmentů	3	10
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10	10
H ₂ O	7	0
Celkový objem	20	20

3.2.12 Restrikční štěpení

Pro kontrolu, zda byla fúze plazmidu pGFPamp a inzertu promTGW6 úspěšná, bylo provedeno restrikční štěpení s restrikčními enzymy BamHI-HF (HF – High Fidelity), SalI-HF a Kpn-HF. Štěpena byla plazmidová DNA extrahovaná ze dvou namnožených kolonií, které narostly na miskách po transformaci *E. coli*. Štěpení probíhalo při 37 °C přes noc. Složení restrikční směsi je uvedeno v Tab. 8.

Tab. 8 Složení restrikční směsi.

Složka	Objem pro 1RX [μ]
Restrikční enzym	2,5
10X CutSmart pufr	0,5
H ₂ O	19
DNA	3
Celkový objem	25

3.2.13 Sekvencace klonované DNA

Plazmidová DNA extrahovaná ze dvou namnožených kolonií, které narostly na miskách po transformaci *E. coli* ligační směsí (3.2.11). Jako sekvenční primery byly použity primery: promTGW6_fw2, promTGW6_rev2, TGW6-Hr7-Fw1 a GFP_rev. Výsledky byly zpracovány pomocí programu SnapGene software (Insightful Science; snapgene.com).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

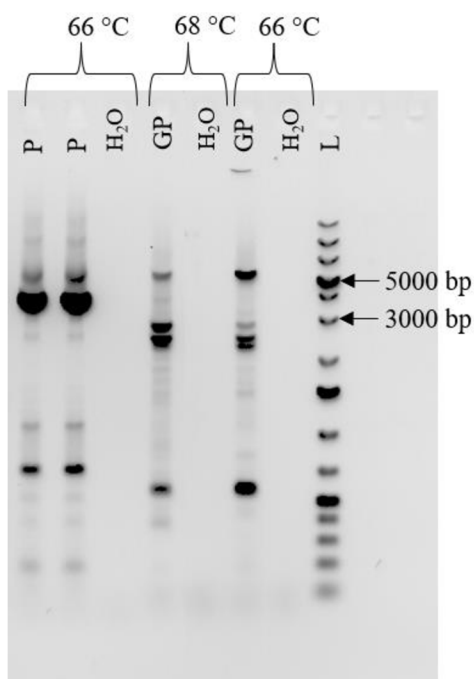
Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo amplifikovat inzert – DNA fragment obsahující gen *TGW6* a cca 3000 nukleotidů nacházejících se před tímto genem, kde by se měl nacházet nativní promotor tohoto genu, a vložit ho do vektoru obsahujícího *GFP* gen. Inzert jsme chtěli do vektoru vložit tak, aby přímo navazoval na gen *TGW6*, a finální gen by tak kódoval *TGW6* protein s reportérovou značkou, který by v dalších experimentech mohl být použitý pro transformaci ječmene za účelem lokalizace proteinu *TGW6*. Jak již bylo zmíněno, *TGW6* byl určen jako kandidátní gen spojen s vyšším výnosem zrna a mohl by být slibným kandidátem pro molekulární šlechtění za účelem zvýšení výnosu (Sharma et al. 2018). Lokalizace tohoto proteinu v ječmeni, může navíc přispět k porozumění úlohy *TGW6* v průběhu vývinu zrn ječmene, což může být zvláště přínosné, protože role *TGW6* jako IAA-glukosa hydrolasy v nezralých zrnech pšenice i rýže byla zpochybněna (Kabir & Nonhebel 2021), a navíc v případě rýže jsou výsledky i konfliktní (Kabir & Nonhebel 2021 versus Ishimaru et al. 2013).

Pro toto klonování byla zvolena metoda „seamless“ klonování za použití kitu NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit, a byly zvoleny dvě různé strategie. První strategie je nepřímá, to znamená, že amplikon pro „seamless“ klonování by nebyl amplifikován přímo z gDNA, ale z jiného plazmidu, který by ho obsahoval. To znamená, že je potřeba nejdříve připravit tento vektor, a to pomocí NEB PCR cloning kitu. Druhá strategie je přímá, to znamená, že amplikon pro „seamless“ klonování je amplifikován přímo z gDNA. Při druhé strategii byla jako DNA templát použita genomická DNA z ječmene odrůdy Golden Promise. Optimalizace amplifikace a klonování podle obou strategií probíhali současně.

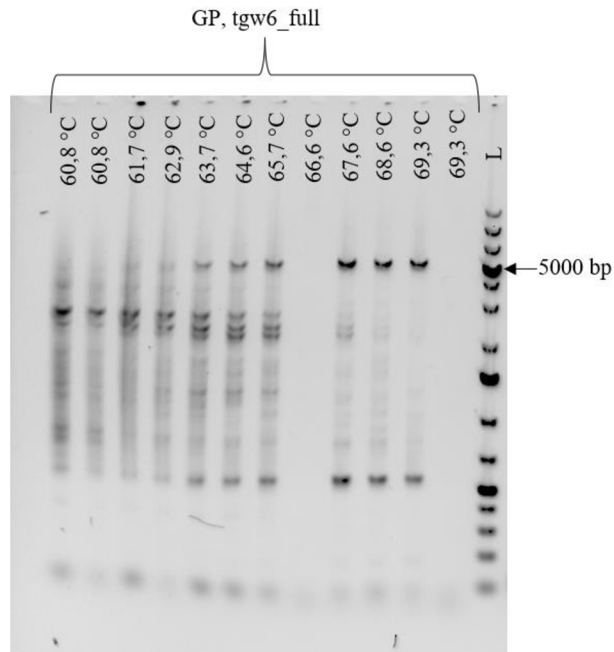
4.1 Strategie 1: Amplifikace fragmentu *promotor - TGW6* a klonování pomocí NEB PCR Cloning kitu

Při této strategii byly pro amplifikaci fragmentu *promotor - TGW6* navrženy primery *tgw6_full* (Tab. 1), pomocí kterých bychom měli amplifikovat produkt velikosti cca 5000 bp. Tento fragment DNA, zahrnuje v sobě sekvenci inzertu určeného pro přímé klonování pomocí primerů *promTGW6*. Při první PCR reakci s primery *tgw6_full* byly zvoleny podmínky reakce doporučené výrobcem Phusion polymerasy a teplota „annealingu“ 66 °C a 68 °C (3.2.3.1). PCR produkt byl vizualizován pomocí agarosové elektroforézy (3.2.4). Při těchto podmínkách došlo k amplifikaci požadovaného fragmentu, ale na

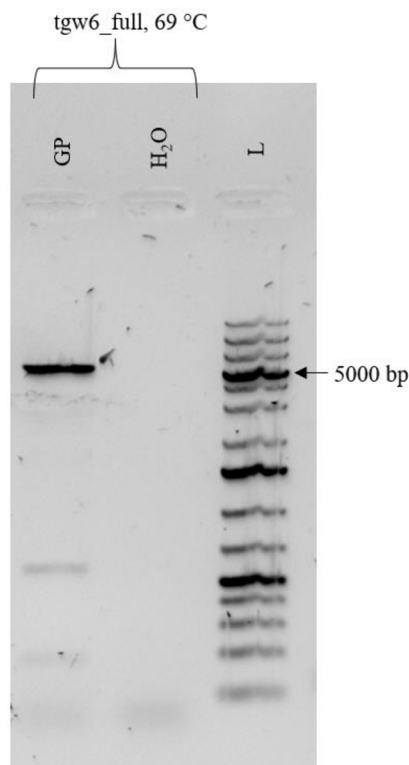
elektroforetogramu se vyskytovaly i DNA fragmenty jiných velikostí (Obr. 2). Pro další optimalizaci teploty „annealingu“ byl proveden teplotní gradient od 60,8 do 69,3 °C (3.2.3.1). Nejlepší výsledek byl viděn při teplotě 69,3 °C, kde se vyskytoval požadovaný fragment a pak pouze jeden další kratší fragment (Obr. 3). Dále byl vyzkoušen další teplotní gradient a zároveň vliv přidavku DMSO, přičemž lepší výsledek byl pozorován při PCR bez přítomnosti DMSO (Obr. P1). Dále byla optimalizována koncentrace hořčíku (MgCl_2 od 2 do 3,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v reakci, ale ukázalo se, že hořčík nemá vliv na kvalitu amplifikace cílového fragmentu (Obr. P2). Z provedených optimalizací bylo zjištěno, že nejlepší výsledek amplifikování požadovaného fragmentu byl pozorován při teplotě „annealingu“ 69 °C a bez přítomnosti DMSO a při běžné, doporučené koncentraci MgCl_2 (1,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), i když výsledkem nebyl jen jediný produkt (Obr. 4).



Obr. 2 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery pGFP_Amp a tgw6_full. P – plazmid pGFPAmp - primery pGFP_Amp - $T_m = 66$ °C; vzorky GP ($T_m = 68, 66$ °C) – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise - primery tgw6_full. H_2O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



Obr. 3 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery tgw6_full – vliv teploty nasedání primerů – teplotní gradient (hodnoty teplot jsou uvedeny v obrázku). U všech vzorků byla jako DNA templát použita gDNA ječmene odrůdy Golden Promise – GP, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



Obr. 4 Elektroforetogram optimalizované PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pomocí tgw6_full primerů ($T_m = 69\text{ °C}$), GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

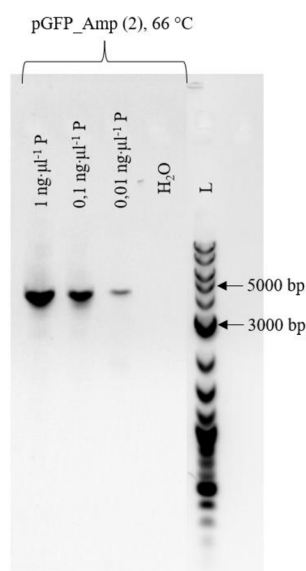
Kvůli přítomnosti nespecifického fragmentu, byl požadovaný fragment z agarosového gelu vyříznut a přečištěn pomocí NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-Up Kitu (3.2.5). Přečištěný fragment byl klonován do pMini vektoru za použití NEB PCR Cloning Kitu (3.2.7). Tento kit umožňuje jednoduché a rychlé klonování jakéhokoliv PCR amplikonu, který může být amplifikovaný širokou škálou polymeras. Hotová ligační směs (Tab. 4) byla použita pro transformaci chemicky kompetentních bakteriálních NEB 10-beta *E. coli* buněk pomocí teplotního šoku (3.2.8). Selektce transformovaných buněk byla provedena na LB agarových miskách s ampicilinem. Bylo vybráno několik narostlých kolonií, které byly prověřeny na přítomnost inzertu pomocí „colony“ PCR s GoTaq polymerasou (3.2.3.2). Zde se ovšem u žádné z kolonií klonovaný inzert nevyskytoval. Celý proces klonování byl opakován a byla vyzkoušena i transformace elektrokompetentních *E. coli* buněk (3.2.9), ale všechny pokusy byly neúspěšné.

Po opakovaném neúspěšném klonování jsme překontrolovali sekvence primerů a zjistili, že primery nebyly navrženy ideálně, co zřejmě způsobilo, že toto klonování nebylo úspěšné.

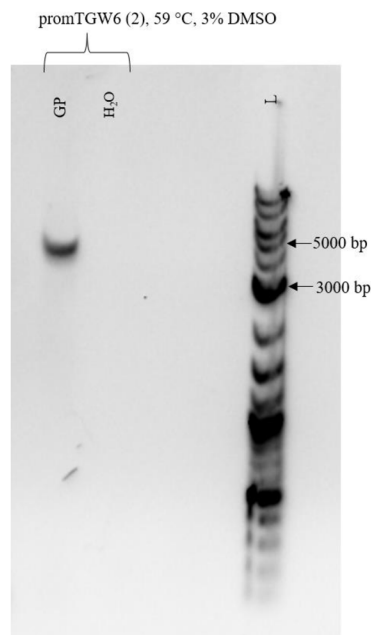
4.2 Strategie 2: Amplifikace fragmentu *promotor - TGW6* a klonování pomocí NEBuilder Hifi DNA Assembly Kitu

NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit umožňuje rychlé a efektivní „seamless“ klonování, kde dochází k fúzi dvou a více fragmentů DNA. V případě, že plánujeme fúzi dvou fragmentů, jeden z fragmentů musí na svých koncích obsahovat jednovláknové převisy 15 až 30 bp dlouhé, které jsou homologní se sekvencí konců druhého fragmentu, to vyžaduje pečlivé navržení primerů pro amplifikaci žádaných fragmentů. V tomto případě jde o dva fragmenty, a to plazmid pGFP_{Amp}, který obsahuje sekvenci pro GFP protein, který chceme vložit přesně za sekvenci genu *TGW6*, respektive inzert promotor-*TGW6*, přičemž musíme odstranit z této sekvence stop kodon. Primery byly navrženy pomocí programu NEBuilder Assembly Tool, a to tak, že primery pro amplifikaci inzertu obsahovali zmiňované převisy sekvence homologní s konci plazmidu, kde jeden konec začínal genem pro GFP. Navržené primery jsme použili k amplifikaci cílových fragmentů pomocí Phusion polymerasy (3.2.3.1). Amplifikace plazmidu pomocí primerů pGFP_{Amp} při výchozí teplotě „annealingu“ (66 °C) byla nespecifická, to znamená, že požadovaný fragment byl sice amplifikovaný, ale byly zde přítomny i jiné fragmenty (Obr. 2). Reakci jsme se pokoušeli optimalizovat, například zvýšením koncentrace hořčiku, ale výsledek nebyl ideální (Obr. P3). V případě amplifikace inzertu byly

výsledky ještě horší. I když jsme optimalizovali různé parametry reakce – jako teplotu (Obr. P4), koncentraci hořčíku, přísadek DMSO (Obr. P5), i jiné polymerasy (data neuvědena), inzert se nám nepodařilo amplifikovat a nedošlo ani k amplifikaci nějakých nespecifických fragmentů. První sada primerů tedy nebyla použitelná, a proto jsme navrhli druhou sadu primerů – pGFP_Amp(2) a promTGW6(2), a to tak, že jsme museli odstranit z plazmidu mnohočetné klonovací místo pro získání optimálnějších primerů. S novými primery jsme nejdříve vyzkoušeli teplotní gradient (data neuvědena), a opět se nám nepodařilo amplifikovat inzert. Proto jsme optimalizovali dále a tentokrát i jiné parametry reakce, jako koncentrace polymerasy, koncentrace primerů, přísadek DMSO, koncentrace templátu (v případě pDNA; Obr. 5) a navíc jsme změнили i délku některých kroků reakce. Koncentrace primerů neměla vliv na výsledek (data neuvědena), zato současná změna dalších parametrů vedla konečně k úspěšné a unikátní amplifikaci obou fragmentů. Nejlepší výsledky pro amplifikaci inzertu byly nakonec dosaženy při snížené koncentraci polymerasy (0,6 U/50 μ l), zkrácené době elongace (90 s), teplotě „annealingu“ 59 °C a přísadku 3% DMSO (Obr. 6). Nejlepší výsledky pro amplifikaci plazmidu byly dosaženy při snížené koncentraci polymerasy (0,6 U/50 μ l), zkrácené době elongace (90 s), teplotě „annealingu“ 66 °C a koncentraci templátové DNA 0,05 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Tyto podmínky byly použity při amplifikaci fragmentů pro klonování.



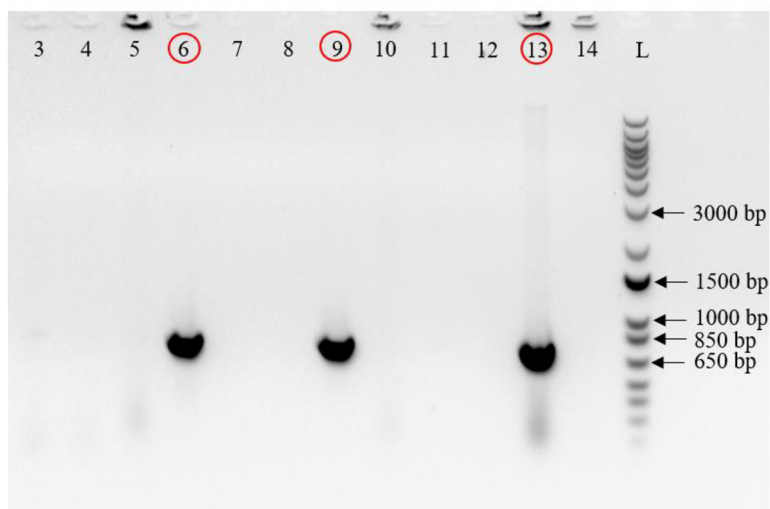
Obr. 5 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pomocí pGFP_Amp(2) primerů ($T_m = 66\text{ }^\circ\text{C}$), různé koncentrace P – pDNA pGFPamp, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



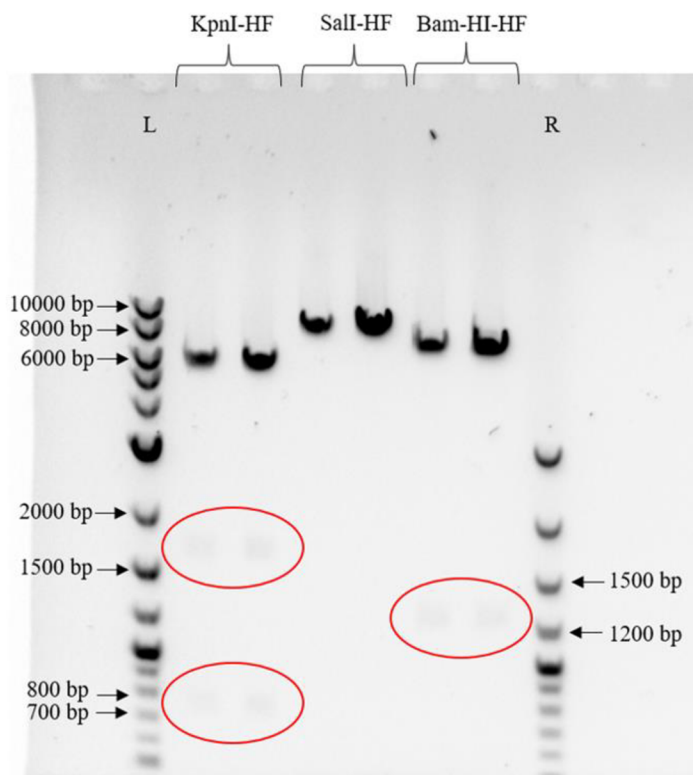
Obr. 6 Elektroforetogram optimalizované PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pomocí promTGW6(2) primerů ($T_m = 59\text{ }^\circ\text{C}$), s 3%DMSO. DNA templát - GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

PCR produkty obou fragmentů byly přečištěny (3.2.6) a ligovány pomocí NEBuilder Hifi DNA Assembly kitu (3.2.11).

Po ukončení ligace byla směs transformována pomocí teplotního šoku do chemicky kompetentních NEB 10-alfa *E. coli* buněk (3.2.8). Transformované buňky byly selektovány na LB agarových miskách s ampicilinem. Z narostlých kolonií bylo vybráno 14 kolonií, které byly testované na přítomnost inzertu i plazmidu. Přítomnost plazmidu byla ověřena pomocí PCR za použití primerů pro GFP (3.2.3.2). U třech kolonií se prokázala přítomnost *GFP* na agarosovém gelu (Obr. 7), kde byla očekávána velikost fragmentu cca 800 bp. Tyto tři kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s ampicilinem (3.2.10). Z narostlých kultur byla izolována pDNA (3.2.2), která byla dále použita pro ověření přítomnosti celého konstruktu *pGFP_{Amp}::promTGW6* pomocí restrikčního štěpení (3.2.12). Byly použity tři enzymy: Bam HI-HF (očekávané velikosti fragmentů po restrikci: 6486 bp, 1261 bp, 249 bp), SalI-HF (očekávané velikosti fragmentů po restrikci: 7540 bp, 456 bp) a KpnI-HF (očekávané velikosti fragmentů po restrikci: 5538 bp, 1703 bp, 755 bp), které ale přesně nepotvrdily přítomnost konstruktů. Velikost fragmentů separovaných na agarosovém gelu úplně neodpovídala požadovaným fragmentům (Obr. 8).



Obr. 7 Elektroforetogram vybraných kolonií pro "Colony" PCR – ověření přítomnosti plasmidu v narostlých koloniích (3-14), za použití primerů pro GFP. L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder. Zakroužkované vzorky byly použity pro přeočkování do tekutého LB média.

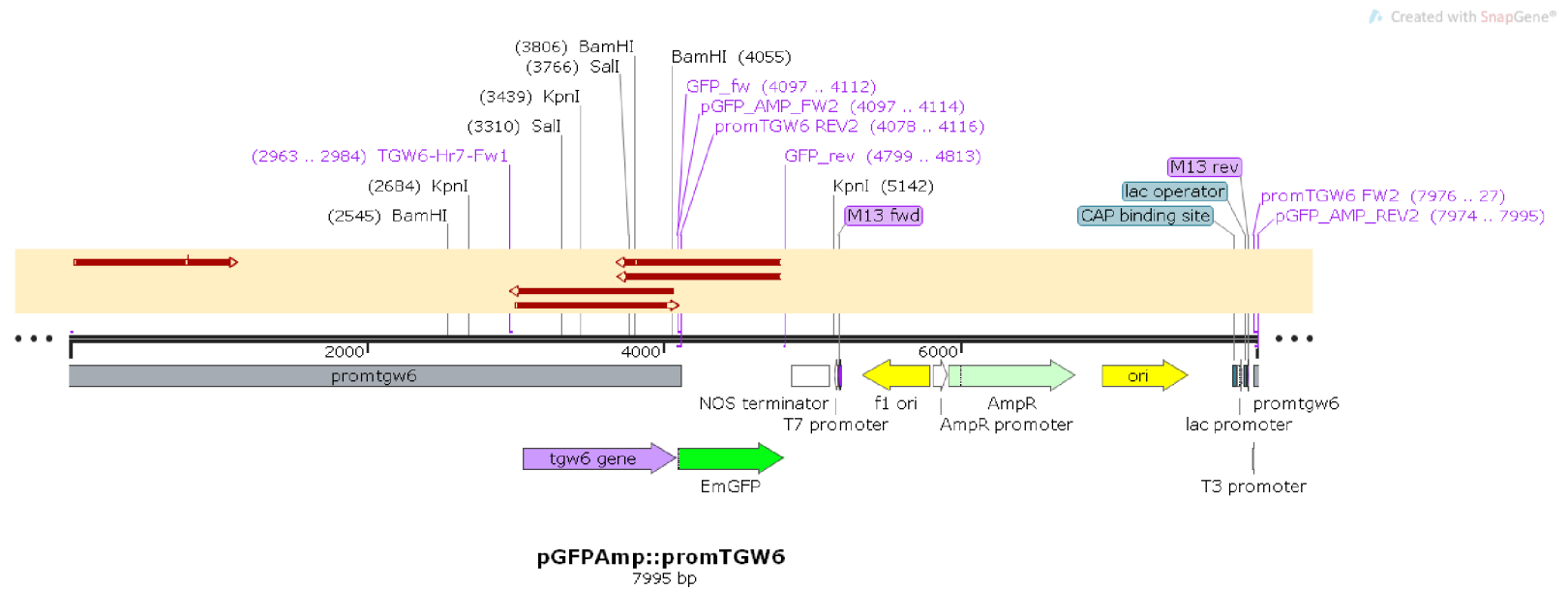


Obr. 8 Elektroforetogram restrikčního štěpení pro ověření přítomnosti celého konstruktu *pGFPamp::promTGW6*. DNA templát - izolované plasmidové DNA z narostlých kultur. Byly použity tři enzymy: Bam HI-HF, SalI-HF a KpnI-HF. Červenými ovály jsou vyznačeny špatně viditelné separované fragmenty DNA. L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder, R – 100 bp plus GeneRuler DNA Ladder.

Štěpení enzymem KpnI odpovídá očekávání, ale při štěpení enzymem BamHI jsme nedetekovali nejkratší fragment, co může být způsobeno elektroforézou, ale navíc velikost nejdelšího fragmentu není možno přesně určit – jestli je to 6486 bp (očekávaná velikost) nebo 6765 bp (velikost v případě straty jednoho restrikčního místa). Zdá se, že štěpení enzymem SalI ani neproběhlo (Obr. 8) a to ani po opakování celé reakce (data neuvedena).

Kvůli nejednoznačným výsledkům restrikce byl výsledný plazmid ještě sekvencován (3.2.13). Byly použity různé primery (GFP_rev, promTGW6_rev2, promTGW6_fw2 a TGW6-Hr7-Fw1), pomocí kterých bychom měli být schopni zjistit, jestli je v plazmidu přítomný i inzert. Získané sekvence byly zpracovány pomocí programu SnapGene, to znamená, že nekvalitní konce sekvencí byly odstraněny a výsledné sekvence byly zarovnány (namapovány) na sekvenci výsledného plazmidu (Obr. 9). Všechny sekvence byly zarovnány na sekvenci plazmidu, co znamená, že výsledný plazmid (Obr. P6) obsahuje oba fragmenty, které jsme chtěli spojit, a to v takovém pořadí a orientaci, jak jsme předpokládali. Prokázali jsme přítomnost začátku inzertu, tj. počáteční sekvenci v promotorové oblasti, přítomnost sekvence genu *TGW6*, a taky připojení genu *GFP* přímo za *TGW6* gen (Obr. 9). V sekvencovaných oblastech byla také zkontrolována přítomnost restrikčních míst, pro pochopení nejednoznačných výsledků restrikce. V případě enzymu SalI, bylo restrikční místo prokázáno, co může znamenat, že enzym byl nejspíš nefunkční. V případě enzymu BamHI, byla osekvencované dvě restrikční místa, která souhlasí, a jejich štěpením vzniká nejkratší fragment DNA, což může znamenat, že restrikce byla správná, ale poslední fragment byl už nedetekovatelný kvůli migraci etidium bromidu v gelu opačným směrem.

Cíl experimentální části práce byl zdárně splněn a byl připraven jsme gen *TGW6* s nativním promotorem fúzovaný s GFP jako reportérovou značkou. Tento konstrukt může být dále použitý pro klonování do vektoru pro transformaci ječmene.



Obr. 9 Mapa finálního plazmidu se zarovnáním osekvenčovaných sekvencí a znázorněním využitých restričních míst a primerů pro amplifikaci plazmidu i inzertu, a primerů použitých pro „colony“ PCR a sekvencování. Hnědé šipky znázorňují zarovnané sekvence.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce bylo shrnuta obecná charakterizace ječmene, jeho hospodářský význam, vývoj a složení zrna, výnosové charakteristiky hormonální regulace vývoje zrna, konjugáty IAA, charakteristika genu *TGW6*, klonování DNA, plazmidové vektory a „seamless“ klonování.

V praktické části této bakalářské práce byla provedena optimalizace metody PCR s Phusion polymerasou a s GoTaq polymerasou. Při optimalizaci reakcí byly optimalizovány: koncentrace $MgCl_2$, přídavek DMSO, teplotní gradient, délka elongačního cyklu, koncentrace DNA templátu i koncentrace polymerasy. Díky optimalizaci byly zvoleny finální podmínky pro amplifikaci požadovaného DNA fragmentu, obsahujícího gen *TGW6* s jeho nativním promotorem (inzerť), i vektoru. Inzerť s vektorem byl spojen za pomoci komerčního kitu. Nakonec, bylo provedeno ověření správnosti klonování pomocí sekvenční analýzy, která potvrdila, že gen *TGW6* byl úspěšně klonován přesně do místa před *GFP* gen v plazmidu, a to bez přidání nadbytečných nukleotidových sekvencí.

Cíl experimentální části této práce se tedy podařilo splnit a výsledný konstrukt může být dále použitý pro klonování do vektoru pro transformaci ječmene.

6 LITERATURA

- Aldughpassi, A., Wolever, T. M. S., & Abdel-Aal, E. S. M. (2016). Barley. In *Encyclopedia of Food and Health* (s. 328–331). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00055-6>
- Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X.-D., Offler, C. E., Patrick, J. W., & Furbank, R. T. (2006). Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiology*, 141(4), 1255–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082719>
- Bertero, A., Brown, S., & Vallier, L. (2017). Methods of Cloning. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (s. 19–39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3>
- Burton, R. A., & Fincher, G. B. (2014). Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00456>
- Cao, J., Li, G., Qu, D., Li, X., & Wang, Y. (2020). Into the Seed: Auxin Controls Seed Development and Grain Yield. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1662. <https://doi.org/10.3390/ijms21051662>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Chapter 10—Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. In M. Carter & J. Shieh (Ed.), *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (Second Edition) (s. 219–237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00010-1>
- Clifton, P., & Keogh, J. (2016). Starch. In *Encyclopedia of Food and Health* (s. 146–151). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00661-9>
- Ekundayo, B., & Bleichert, F. (2019). Origins of DNA replication. *PLoS Genetics*, 15(9), e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008320>
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden Gate Cloning. In S. Valla & R. Lale (Ed.), *DNA Cloning and Assembly Methods* (s. 119–131). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- Fischer, R. A. (2008). The importance of grain or kernel number in wheat: A reply to Sinclair and Jamieson. *Field Crops Research*, 105(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.04.002>
- Fischer, R. A. (Tony), & Edmeades, G. O. (2010). Breeding and Cereal Yield Progress. *Crop Science*, 50(S1), S-85-S-98. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.10.0564>
- Fox, G. P. (2010). Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality. In G. Zhang & C. Li (Ed.), *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality* (s. 63–98). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01279-2_3
- Fuchs, I., Philippar, K., & Hedrich, R. (2006). Ion Channels Meet Auxin Action. *Plant Biology*, 8(3), 353–359. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924121>
- Gambin, B. I., & Borrás, L. (2010). Resource distribution and the trade-off between seed number and seed weight: A comparison across crop species. *Annals of Applied Biology*, 156(1), 91–102. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00367.x>
- Hou, X.-W., Tong, H.-Y., & He, Z.-H. (2021). Alternative Seamless Cloning Strategies in Fusing Gene Fragments Based on Overlap-PCR. *Molecular Biotechnology*, 63(3), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00298-0>
- Hu, M.-J., Zhang, H.-P., Cao, J.-J., Zhu, X.-F., Wang, S.-X., Jiang, H., Wu, Z. Y., Lu, J., Chang, C., Sun, G.-L., & Ma, C.-X. (2016). Characterization of an IAA-glucose hydrolase gene

- TaTGW6 associated with grain weight in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 36(3), 25. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0449-z>
- Ishimaru, K. (2003). Identification of a Locus Increasing Rice Yield and Physiological Analysis of Its Function. *Plant Physiology*, 133(3), 1083–1090. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027607>
- Ishimaru, K., Hirotsu, N., Madoka, Y., Murakami, N., Hara, N., Onodera, H., Kashiwagi, T., Ujiie, K., Shimizu, B., Onishi, A., et al. (2013). Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene TGW6 enhances rice grain weight and increases yield. *Nature Genetics*, 45(6), 707–711. <https://doi.org/10.1038/ng.2612>
- ITIS – Integrated Taxonomic Information System: <https://www.itis.gov/>
- Jackson, R. G., Lim, E.-K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., & Bowles, D. J. (2001). Identification and Biochemical Characterization of an Arabidopsis Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4350–4356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006185200>
- Jackson, R. G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., & Bowles, D. J. (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: Phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 32(4), 573–583. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01445.x>
- Jakubowska, A., & Kowalczyk, S. (2004). The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl-beta-D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 791–801. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh086>
- Jakubowska, A., & Kowalczyk, S. (2005). A specific enzyme hydrolyzing 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl-β-d-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*, 162(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.015>
- Jameson, P. E., & Song, J. (2016). Cytokinin: A key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 593–606. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv461>
- Kabir, M. R., & Nonhebel, H. M. (2021). Reinvestigation of THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 grain weight genes in wheat and rice indicates a role in pollen development rather than regulation of auxin content in grains. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(7), 2051–2062. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03804-3>
- Kowalczyk, S., Jakubowska, A., Zielińska, E., & Bandurski, R. S. (2003). Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myo-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 119(2), 165–174. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00158.x>
- Kumar, D., Narwal, S., Virani, S., Verma, R. P. S., Gyawali, S., & Singh, G. P. (2020). 12 - Barley grain beta glucan enrichment: Status and opportunities. In O. P. Gupta, V. Pandey, S. Narwal, P. Sharma, S. Ram, & G. P. Singh (Ed.), *Wheat and Barley Grain Biofortification* (s. 295–308). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818444-8.00012-2>
- Kutschera, U., & Niklas, K. J. (2013). Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: A synthesis. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 207, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.004>
- Li, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2018). A Modified Gibson Assembly Method for Cloning Large DNA Fragments with High GC Contents. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1671, 203–209. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7295-1_13

- Li, M., Lopato, S., Kovalchuk, N., & Langridge, P. (2013). Functional Genomics of Seed Development in Cereals. *In Cereal Genomics II* (s. 215–245). https://doi.org/10.1007/978-94-007-6401-9_9
- Liu, C.-J., Jiang, H., Wu, L., Zhu, L.-Y., Meng, E., & Zhang, D.-Y. (2017). OEPR Cloning: An Efficient and Seamless Cloning Strategy for Large- and Multi-Fragments. *Scientific Reports*, 7, 44648. <https://doi.org/10.1038/srep44648>
- Lizana, X. C., Riegel, R., Gomez, L. D., Herrera, J., Isla, A., McQueen-Mason, S. J., & Calderini, D. F. (2010). Expansins expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(4), 1147–1157. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp380>
- Lu, Q. (2005). Seamless cloning and gene fusion. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.008>
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Miles, C. & Wayne, M. (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1):208
- PAVLOVÁ, Libuše a Lukáš FISCHER. Růst a vývoj rostlin. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1913-2.
- Pielot, R., Kohl, S., Manz, B., Rutten, T., Weier, D., Tarkowská, D., Rolčík, J., Strnad, M., Volke, F., Weber, H., & Weschke, W. (2015). Hormone-mediated growth dynamics of the barley pericarp as revealed by magnetic resonance imaging and transcript profiling. *Journal of Experimental Botany*, 66(21), 6927–6943. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv397>
- Radchuk, V. V., Borisjuk, L., Sreenivasulu, N., Merx, K., Mock, H.-P., Rolletschek, H., Wobus, U., & Weschke, W. (2009). Spatiotemporal Profiling of Starch Biosynthesis and Degradation in the Developing Barley Grain. *Plant Physiology*, 150(1), 190–204. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133520>
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLOS ONE*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- Ringli, C. (2010). Monitoring the Outside: Cell Wall-Sensing Mechanisms. *Plant Physiology*, 153(4), 1445–1452. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154518>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 429–441. <https://doi.org/10.1038/nrg817>
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit Development and Ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- Sharma, R., Draicchio, F., Bull, H., Herzig, P., Maurer, A., Pillen, K., Thomas, W. T. B., & Flavell, A. J. (2018). Genome-wide association of yield traits in a nested association mapping

- population of barley reveals new gene diversity for future breeding. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 3811–3822. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery178>
- Simpson, M. G. (2010). Chapter 14—Plant Molecular Systematics. In M. G. Simpson (Ed.), *Plant Systematics* (Second Edition) (s. 585–601). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50014-2>
- Sreenivasulu, N., Borisjuk, L., Junker, B. H., Mock, H.-P., Rolletschek, H., Seiffert, U., Weschke, W., & Wobus, U. (2010). Chapter 2 - Barley Grain Development: Toward an Integrative View. In K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Roč. 281, s. 49–89). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81002-0](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81002-0)
- Sundaresan, V. (2005). Control of seed size in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 17887–17888. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509021102>
- Szerszen, J. B., Szczyglowski, K., & Bandurski, R. S. (1994). Iaglu, a Gene from Zea mays Involved in Conjugation of Growth Hormone Indole-3-Acetic Acid. *Science*, 265(5179), 1699–1701. <https://doi.org/10.1126/science.8085154>
- Tam, Y. Y., Epstein, E., & Normanly, J. (2000). Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose1. *Plant Physiology*, 123(2), 589–596. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.589>
- Thirulogachandar, V., Koppolu, R., & Schnurbusch, T. (2021). Strategies of grain number determination differentiate barley row types. *Journal of Experimental Botany*, 72(22), 7754–7768. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab395>
- Tolmachov, O. (2009). Designing plasmid vectors. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 542, 117–129. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_6
- Ugarte, C., Calderini, D., & Slafer, G. (2007). Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat, barley and triticale. *Field Crops Research*, 100, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.07.010>
- Wobus, U., W., Sreenivasulu, N., Borisjuk, L., Rolletschek, H., Panitz, R., Gubatz, S., & Weschke, W. (2005). Molecular physiology and genomics of developing barley grains. *Recent Res.Devel.Plant Sci.*, 2, 1–29.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yu, X.-L., Wang, H.-Y., Leung, D. W. M., He, Z.-D., Zhang, J.-J., Peng, X.-X., & Liu, E.-E. (2019). Overexpression of OsIAAGLU reveals a role for IAA-glucose conjugation in modulating rice plant architecture. *Plant Cell Reports*, 38(6), 731–739. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02402-4>
- Zhang, A., Zhang, L., Zhang, L., Chen, H., Lan, X., Zhang, C., & Zhang, C. (2010). An efficient and rapid method for gene cloning from eukaryotic genomic DNA using overlap-PCR: With an example of cattle Ghrelin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(3), 1490–1493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.099>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CK	cytokinin
Cvs	kultivar
GA	giberelin
IAA	kyselina indol-3-octová
IAGlc	1-O-indolacetylglukosový ester
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MCS	mnohočetné klonovací místo
ORI	replikační počátek
PCR	polymerasová řetězová reakce
QTL	lokus s kvantitativním znakem
TGW	hmotnost tisíce zrn
UGT	UDP-glukosyltransferasa

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery tgw6_full - teplotní gradient

Příloha 2: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery tgw6_full - vliv různé koncentrace MgCl₂

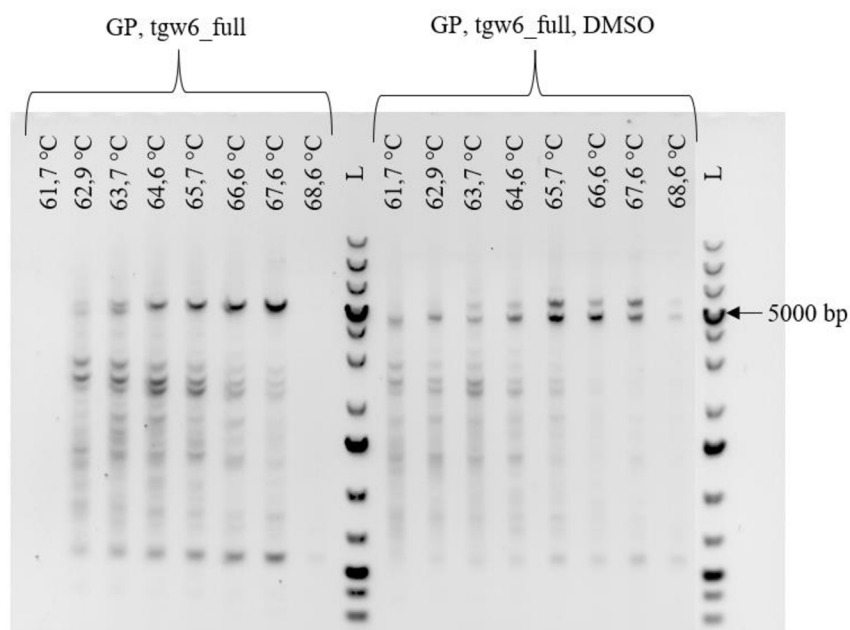
Příloha 3: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery pGFP_Amp - vliv různé koncentrace MgCl₂

Příloha 4: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – teplotní gradient

Příloha 5: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – teplotní gradient, vliv DMSO

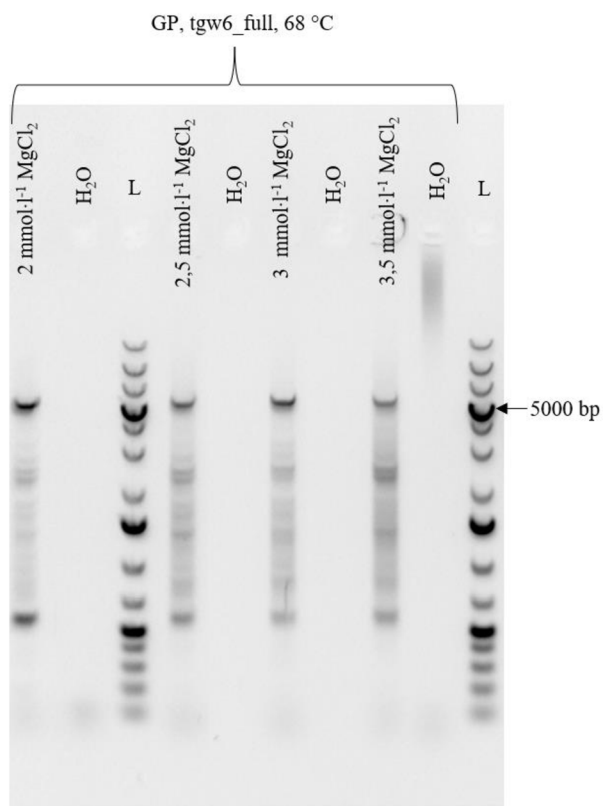
Příloha 6: Mapa finálního plazmidu *pGFP_{Amp}::promTGW6*.

Příloha 1: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery `tgw6_full` - teplotní gradient



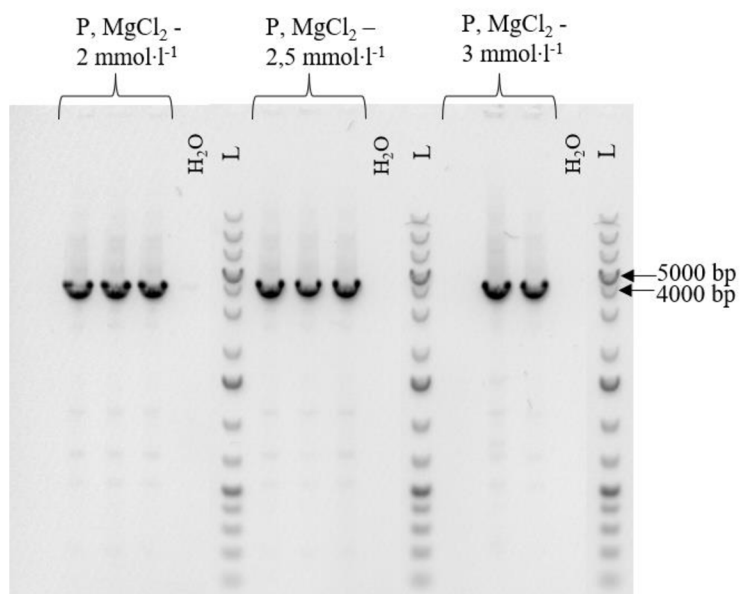
Obr. P1 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery `tgw6_full`– vliv teploty nasedání primerů – teplotní gradient (hodnoty teplot jsou uvedeny v obrázku). Vliv přítomnosti 3% DMSO. DNA templát – GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

Příloha 2: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery *tgw6_full* - vliv různé koncentrace $MgCl_2$



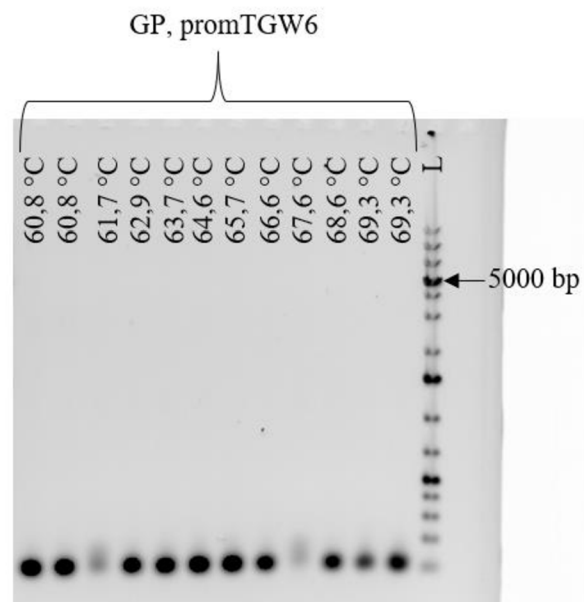
Obr. P2 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery *tgw6_full* ($T_m = 68$ °C) – vliv různé koncentrace $MgCl_2$ (2-3,5 $mmol \cdot l^{-1}$). DNA templát – GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

Příloha 3: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery pGFP_Amp - vliv různé koncentrace MgCl₂



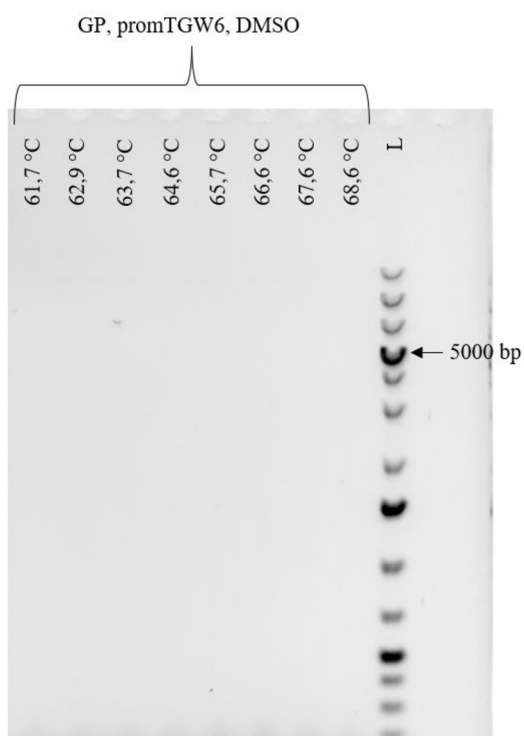
Obr. P3 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery pGFP_Amp ($T_m = 66\text{ }^\circ\text{C}$) – vliv různé koncentrace MgCl₂ (2-3 mmol·l⁻¹). DNA templát – P – pDNA pGFP_Amp, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

Příloha 4: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – teplotní gradient



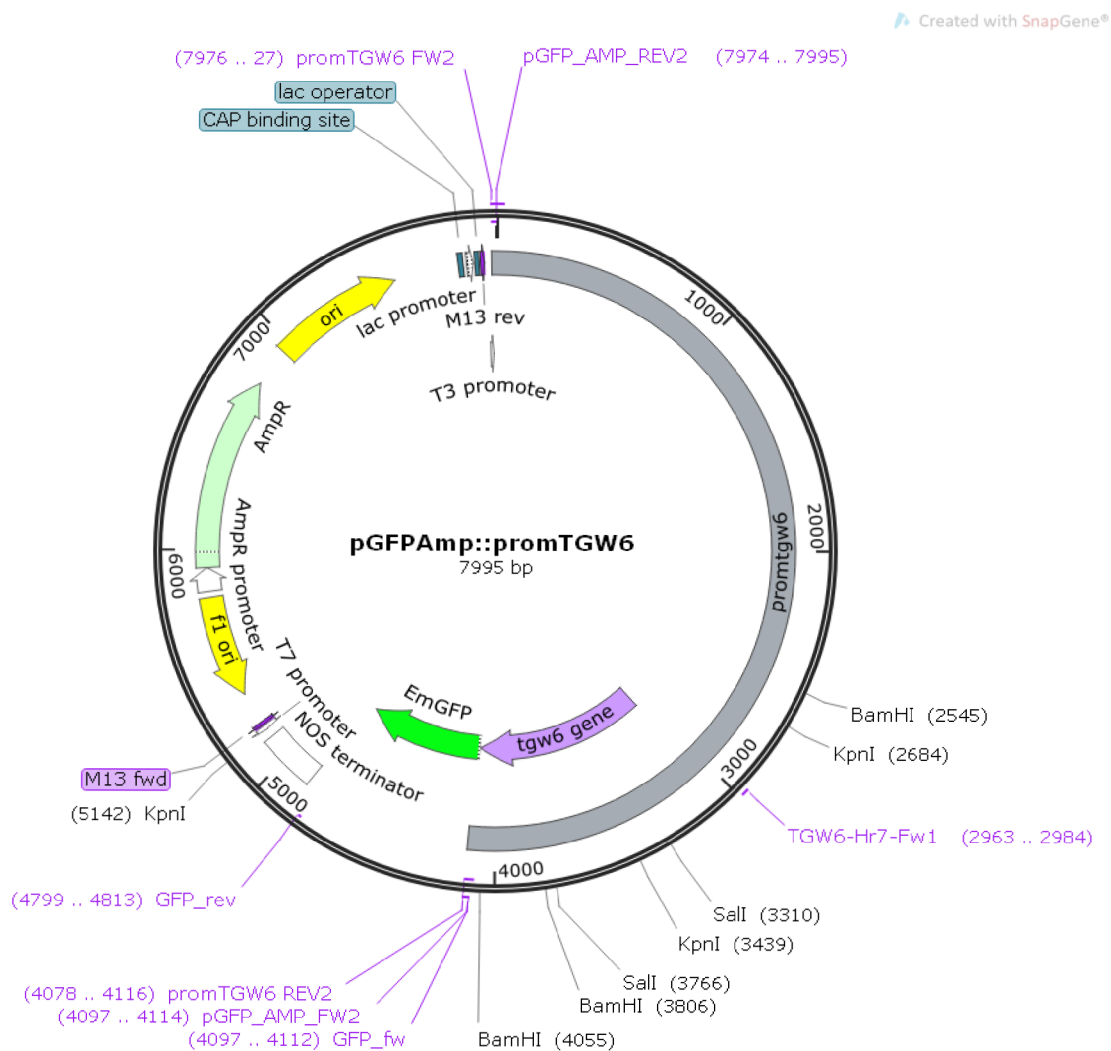
Obr. P4 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – vliv teploty nasedání primerů – teplotní gradient (hodnoty teplot jsou uvedeny v obrázku). DNA templát – GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

Příloha 5: Optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – teplotní gradient, vliv DMSO



Obr. P5 Elektroforetogram optimalizace PCR reakce s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou pro primery promTGW6 – vliv teploty nasedání primerů – teplotní gradient (hodnoty teplot jsou uvedeny v obrázku). Vliv přítomnosti 3% DMSO. DNA templát – GP – gDNA ječmene odrůdy Golden Promise, H₂O – negativní kontrola, L – 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

Příloha 6: Mapa finálního plazmidu *pGFPAmp::promTGW6*.



Obr. P6 Mapa finálního plazmidu *pGFPAmp::promTGW6*. Jsou zde zaznamenána restrikční místa, která byla použita pro restrikční analýzu a primery pro amplifikaci plazmidu i inzertu, a primery použité pro „colony“ PCR a sekvencování. Schématický obrázek byl vytvořen v programu SnapGene.