

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta



Reportérové markery GFP a GUS v transgenozí rostlin

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.

Autor:

Lenka Hrabáková

České Budějovice

2011

Bakalářská práce v nezkrácené podobě:

Hrabáková L., 2011: Reporterové markery GFP a GUS v transgenozí rostlin [GFP and GUS reporters in plant transgenesis. Bc. Thesis in Czech.]- 60 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The main goal of this bachelor thesis was the confrontation of two oftently used reporter genes *gfp* and *gus*, their structure, utility and methods of screening their activity. The experimental part of this bachelor thesis was based on transformation of tobacco with *Agrobacterium tumefaciens* strains.

Tato bakalářská práce byla financována z projektu MŠMT 1M06030 „Funkční genomika a proteomika ve šlechtění rostlin“ (2006-2011), jejímž řešitelem je RNDr. Slavomír Rakouský, CSc. (ZSF JU, České Budějovice).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

26. dubna 2011

Lenka Hrabáková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli, RNDr. Slavomíru Rakouskému, CSc. za jeho podporu, cenné rady a trpělivost při řešení této práce. Mé další poděkování patří kolegům z laboratoře, jmenovitě ing. Marii Příbylové a ing. Františku Bezunkovi za jejich obrovskou trpělivost při zaučování v laboratoři, za příjemné pracovní prostředí a za pomoc při pokusech a následné analýze vzorků. A v neposlední řadě děkuji svým rodičům za to, že mne vždy ve všem podporovali.

Obsah

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Literární přehled..... | 2 |
| 2.1 Přímé metody transformace | 2 |
| 2.1.1 Transgenoze protoplastů | 2 |
| 2.1.2 Transgenoze mikroprojektily | 2 |
| 2.1.3 Transgenoze chloroplastů | 3 |
| 2.2 Nepřímé metody transformace rostlin - transformace bakteriemi rodu <i>Agrobacterium</i> | 3 |
| 2.2.1 Čeleď <i>Rhizobiaceae</i> | 3 |
| 2.2.2 Ti plazmid <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 5 |
| 2.2.3 Přenos a integrace T-DNA..... | 6 |
| 2.2.4 Vektory pro transformaci bakteriemi <i>Agrobacterium</i> | 7 |
| 2.2.5 Reportérové a selektovatelné transgeny | 8 |
| 2.2.5.1 Selektovatelné geny | 8 |
| 2.2.5.2 Reportérové geny | 10 |
| 2.3 Gen pro β -glukuronidázu – GUS | 11 |
| 2.3.1 Struktura enzymu β -glukuronidázy | 13 |
| 2.3.2 Metody detekce β -glukuronidázy | 13 |
| 2.3.2.1 Metody detekce in vitro | 14 |
| 2.3.2.1.1 Kolorimetrická metoda..... | 14 |
| 2.3.2.1.2 Fluorimetrické stanovení | 14 |
| 2.3.2.1.3 Spektrofotometrické stanovení..... | 14 |
| 2.3.2.2 Metody detekce in situ | 15 |
| 2.3.2.2.1 Histochemické stanovení (indigogenní metoda) | 15 |
| 2.3.2.2.2 Metoda azokopulační..... | 16 |
| 2.4 Gen pro zeleně fluoreskující protein – GFP..... | 17 |
| 2.4.1 Struktura GFP | 18 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.2 Fluorescenční centrum GFP..... | 20 |
| 2.4.3 Mechanismus aktivace fluoroforu | 21 |
| 2.4.4 Mutace GFP | 21 |
| 2.4.5 Přehled některých mutací GFP | 22 |
| 2.4.6 Metody zobrazování | 25 |
| 2.4.6.1 Vizuální zobrazování, tzv. „visual screening“ | 25 |
| 2.4.6.2 Video zobrazování, „video imaging“ | 26 |
| 2.4.6.3 „Fluorescence - Activated Cell Sorting“ – FACS..... | 26 |
| 2.4.6.4 „High-throughput microscopy “ – HTM..... | 26 |
| 3 Materiál a metodika | 27 |
| 3.1 Materiál | 27 |
| 3.2 Příprava kultivačních médií | 28 |
| 3.2.1 Použitá kultivační média..... | 29 |
| 3.3 Sterilizace a výsev semen tabáku..... | 30 |
| 3.4 Postup transformace listových segmentů tabáku | 30 |
| 4 Výsledky | 32 |
| 4.1 Transformace bakteriemi <i>A. tumefaciens</i> a následné pěstování transgenických rostlin | 32 |
| 4.2 Vizuální detekce GFP | 33 |
| 5 Diskuze | 35 |
| 5.1 Studované signální geny GUS a GFP | 35 |
| 5.1.1 Použití reportérových genů..... | 39 |
| 6 Závěr..... | 42 |
| 7 Seznam použité literatury | 43 |
| 8 Přílohy | 49 |
| 8.1 Mapa fúzního genu SPI2:GFP | 49 |
| 8.2 Aminokyselinová sekvence fúzního genu SPI-2:GFP | 50 |

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 8.3 Mapa konstruktů pWell09:gmSPI2..... | 51 |
| 8.4 Schéma plazmidového vektoru pBIN m-gfp5-ER..... | 51 |
| 9 Seznam použitých zkratk..... | 52 |
| 9.1 Slovní zkratky..... | 52 |
| 9.2 Zkratky v textu použitých chemických látek..... | 52 |
| 9.3 Mezinárodní zkratky aminokyselin..... | 53 |

1 Úvod

Díky oborům jako genetika a molekulární genetika, které patří do nejnovější etapy biologie, a jejich neustálému vývoji, společně s technikami rostlinných explantátů jsme schopni vytvořit geneticky modifikované organismy (GMO). GMO jsou takové organismy, kterým byl záměrně pozměněn genetický materiál (jeho DNA) takovým způsobem jakým nelze dosáhnout přirozenou rekombinací.

Transgenozí se získávají rostliny, které se dají využít nejen v zemědělství, ale také ve farmakologii a v okrasném zahradnictví. Co se týče zemědělství, vnáší se do genomů rostlin geny pro získání rezistence vůči herbicidům, hmyzím škůdcům a virovým patogenům. U okrasných rostlin se většinou jedná o změnu barvy květů. Ve farmakologii a zdravotnictví spočívá využití transgenoze při produkci farmakologicky významných látek - antigenů, albuminu, kofaktorů, a tzv. jedlých vakcín.

V současné době je největší množství pěstovaných GMO rostlin v zemědělství v USA, Argentině, Brazílii, Kanadě, Indii a Číně. Hlavními pěstovanými geneticky modifikovanými rostlinami jsou sója, kukuřice, bavlník a řepka olejná. V České Republice je dle zákona povoleno pěstování pouze geneticky modifikovaná kukuřice, tzv. Bt-kukuřice MON810, a brambor Amflora se zvýšeným obsahem amylopektinu ve škrobu. Prozatím byla nejvyšší výměra, na které byla tato Bt-kukuřice pěstována, v roce 2008 a to 8380 ha, v následujícím roce její plocha pěstování klesla přibližně o 2000 ha.

V rámci této bakalářské práce jsem aplikovala jednu z nepřímých metod transformace, a to transformaci pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a poté jsem se zabývala následným studiem exprese markerových genů nesených vektory, konkrétně se jednalo o signální geny *gfp* a *gus*.

2 Literární přehled

2.1 Přímé metody transformace

Pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* nebylo možné transformovat všechny rostlinné objekty, zejména pak jednoděložné rostliny, proto docházelo k současnému vývoji přímých metod. Mezi přímé metody transformace rostlin patří například transformace protoplastů, transformace mikroprojektily a transformace chloroplastů izolovanou deoxyribonukleovou kyselinou, DNA (Ondřej & Drobník, 2002).

2.1.1 Transgenoze protoplastů

Pro transformace protoplastů byla využívána přímá aplikace cizorodé DNA, z rostlinných buněk byla před tím odstraněna buněčná stěna, která do značné míry omezuje průnik cizorodé DNA do buněk. Při této metodě je možné aplikovat cizorodou DNA na velké množství rostlinných buněk, řádově 10^6 - 10^7 , a navodit značné selekční tlaky, čím se zvýší pravděpodobnost získání transgenních buněčných klonů. Kvůli potížím, ke kterým docházelo při regeneraci rostlin z protoplastů, se v současné době dává přednost transgenozí celých pletiv (Ondřej & Drobník, 2002). Protoplasty (buňky) zbavené buněčné stěny nejsou pro většinu vyšších rostlin přirozeným stavem, proto je složitější zajistit vhodné podmínky pro jejich kultivaci a zároveň dochází i ke snížení účinnosti následné regenerace rostlin z kalusu (Rakouský, 2011).

2.1.2 Transgenoze mikroprojektily

Principem této metody je nastřelování mikroskopických částic pokrytých nukleovou kyselinou do rostlinných pletiv. Pro mikrobombardování se užívají zlaté nebo wolframové kuličky o velikosti kolem $2\mu\text{m}$, které se smíchají s roztokem plazmidové DNA. Voda z roztoku se odpaří a plazmidová DNA zůstává na povrchu mikroprojektílů. Při klasické metodě se bombarduje pletivo, které se následně

kultivuje na médiích vhodných pro kalogenezi a pro selekci transgenních pletiv (Ondřej & Drobník, 2002).

2.1.3 Transgenoze chloroplastů

Transformace chloroplastů se poprvé podařila v roce 1985. Tato metoda je málo účinná a transgenoze se podařila jen u mála objektů – tabáku, brambor, řepky.

2.2 Nepřímé metody transformace rostlin - transformace bakteriemi rodu *Agrobacterium*

K přenosu DNA do rostlinných buněk jsou po řadu let úspěšně využívány vektory, zejména bakterie, které jsou schopné přenést část své genetické informace do rostlinné buňky a tím zajistit stálou nebo dočasnou neboli transientní expresi genu. Mezi nejběžnější přenašeče patří bakterie z čeledi *Rhizobiaceae*.

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou schopné přenést specifický úsek své DNA označovaný jako „transferred“ DNA, T-DNA, do širokého spektra organismů, od hub, kvasinek, vřeckovýtrusých a stopkovýtrusých, přes nahosemenné rostliny až po jednoděložné a dvouděložné krytosemenné rostliny (Gelvin, 2003).

Jako vektory by bylo možné použít i DNA viry. Pokud by nesly námi zaklonovaný gen, přenášely by ho společně se svým genomem při napadání rostlin. Zároveň by pomocí virů bylo možné klonovat i jednoděložné rostliny, tím by se vyplnila mezera mezi transformacemi pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*, které mají problémy s klonováním jednoděložných rostlin (Watson *et al.*, 1992). Tato cesta se však ukázala jako velmi komplikovaná a proto přestala být rozvíjena.

2.2.1 Čeleď *Rhizobiaceae*

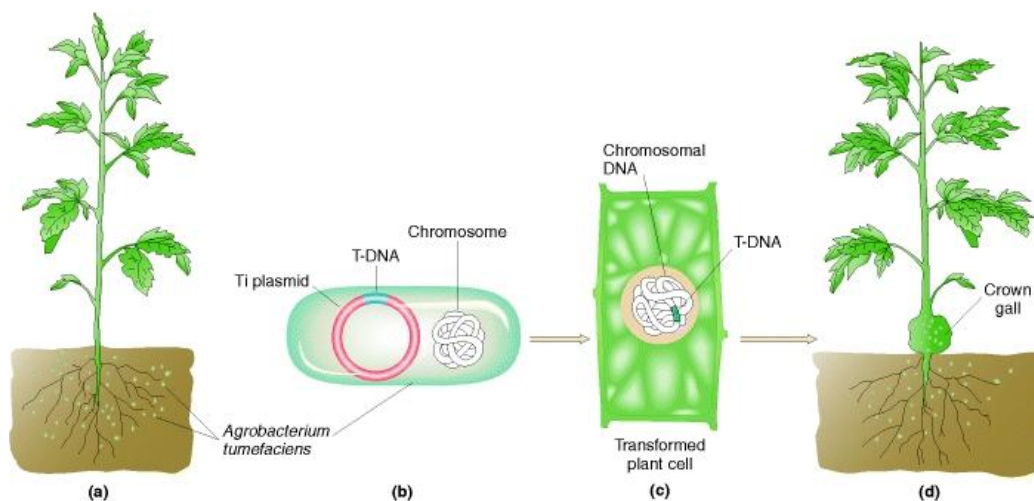
Bakterie, které způsobují morfologické změny na rostlinách, se řadí do čeledi *Rhizobiaceae*, kam patří rody *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* (Ondřej & Drobník, 2002).

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou gramnegativní půdní bakterie, které jsou schopné vytvořit morfologické změny, které vedou k tvorbě nádorů v pletivech dvouděložných rostlin (viz obr. 1).

Ovšem ne všechny z těchto druhů jsou schopné vnést své geny do genomu hostitele, například rod *Pseudomonas* a *Corynebacterium fascians*. To znamená, že změny, které způsobují tyto bakterie na rostlinách, trvají jen tak dlouho, dokud jsou rostlinná pletiva napadena danou bakterií. V těchto případech nedochází k přenosu genetické informace z vektoru, napadající bakterie, do hostitelské rostlinné buňky (Ondřej, 1992).

Bakterie, které patří do rodů *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* se přeměňují v tzv. bakteroidy a jsou trvalými složkami pletiv kořenových hlízek leguminózních rostlin¹. Pouze bakterie rodu *Agrobacterium* jsou schopné vnášet specifické geny, které jsou lokalizovány na Ti plazmidu, do rostlinných buněk, které následně rostou jako nediferenciované nádory. Do rodu *Agrobacterium* patří 4 rody: *A. vitis*, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* (Ondřej & Drobník, 2002).

Vzhledem k tomu, že rod *A. tumefaciens* je možné celkem jednoduše, pouze změnou typu plazmidu, změnit na rod *A. rhizogenes*, je klasické členění na rody nesmyslné. Proto je lepší rod *Agrobacterium* rozdělit do biovarů², kdy rody *A. tumefaciens* a *A. rubi* se řadí do biovaru I, *A. rhizogenes* do biovaru II a *A. vitis* tvoří biovar III (Gelvin, 2003).



Obr. 1: Proces tvorby rostlinných nádorů způsobených bakterií rodu *Agrobacterium* (Griffiths *et al.*, 2000).

¹ leguminózní rostliny – rostliny vytvářející nodulující symbiózy s fixátory vzdušného kyslíku, například rostliny z čeledi *Fabaceae*.

² biovar – různé varianty rodu prokaryotických organismů, které se odlišují fyziologicky a/nebo biochemicky od ostatních druhů daného rodu.

2.2.2 Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*

Ti plazmidy (Ti – tumor inducing plasmid) jsou funkční jednotky v buňkách bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které jsou schopné indukovat tvorbu rostlinných nádorů a Ri plazmid (Ri plazmid – root induction plasmid) *A. rhizogenes* indukující tvorbu vlasatých kořenek u rostlin (Gartland *et al.*, 1995).

Plazmid Ti/Ri má velikost v rozmezí 150-200 kb, to je asi 3% genomu agrobakteria. Pro indukci rostlinných nádorů je nutné, aby Ti plazmid měl dva úseky (Ondřej & Drobník, 2002):

- úsek virulence, který obsahuje geny nutné pro přenos T-DNA (transferred DNA) a její integraci do rostlinného genomu.
- úsek T-DNA, která vstupuje do rostlinných buněk, ale sama neobsahuje žádné geny pro vlastní integraci

T-DNA má velikost 15-45 bp, skládá se z 25 bp dlouhých hraničních sekvencí, mezi kterými jsou dva druhy genů:

- geny pro syntézu opinů³ – látek, které slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro bakterie, které indukovaly tvorbu nádorů. Jsou syntetizovány transformovanými rostlinnými buňkami (Lewin, 1994).
- geny pro nové cesty biosyntézy fytohormonů, auxinů a cytokininů, které pokud působí v maximální mezi tolerance, způsobují dediferenciaci rostlinných buněk (tzv. crown galls u Ti plazmidu či tzv. hairy root disease u Ri plazmidu) (Gartland *et al.*, 1995).

Ti plazmidy se dělí na dvě skupiny, oktopinové a nopalínové, podle toho jestli je T-DNA složena z jednoho úseku, typ oktopiový, nebo ze dvou úseků, nopalínový typ. Nopalínový typ má T - DNA rozdělenou na dva úseky, pravý (T_R) a levý (T_L), mezi kterými neobsahuje žádné geny, projevující se v rostlinách. Protože T-DNA plazmidů Ti a Ri obsahuje jen hraniční sekvence 25 bp, ale žádné geny pro svoji integraci do rostlinného genomu, je důležitý úsek virulence (oblast *vir*). Geny úseku virulence zajišťují přenos T-DNA do rostlinných buněk a její následnou integraci do rostlinného genomu. Oblast *vir* má délku 35 bp a je víceméně shodná u různých typů plazmidů Ti a Ri, na mapách plazmidů se vyskytuje v různé vzdálenosti vlevo

³ Opiny – estery bazických aminokyselin, s jinými skupinami nízkomolekulárních látek (cukrů, ketoskupinou), jsou produkovány napadenými rostlinnými buňkami a jsou využívány jen bakteriemi, které indukovali nákazu

od T-DNA. Na integraci T-DNA do rostlinného genomu se podílí šest operonů této oblasti – *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* a *virG*. Ti plazmid obsahuje ještě další úseky, které jsou potřebné pro funkci plazmidu v bakteriálních buňkách a pro interakci mezi rostlinnými a bakteriálními buňkami. (Ondřej & Drobník, 2002).

Oktopinové typy obsahují geny *vir A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *H* (označovaný jako *pinF*). Nopalinové kmeny *A. tumefaciens* se liší od oktopinových jen dvěma změnami v oblasti genů *vir* – postrádají geny *virF*, *virH*, ale obsahují navíc gen *tzs* (Gartland *et al.*, 1995). Gen *tzs* je odpovědný za sekreci trans-zeatinu z bakterie a zároveň kóduje novou cestu biosyntézy cytokininu. Není známá jeho přesná funkce ve *vir* oblasti Ti plazmidu, nejspíše hraje určitou roli při iniciaci infekce, zřejmě pro vyšší účinnost transformace rostlinných buněk (Akiyoshi *et al.*, 1985).

Na přenosu a integraci T-DNA do rostlinných buněk se podílejí geny z virulentní oblasti a z bakteriálního chromozomu.

2.2.3 Přenos a integrace T-DNA

Bakterie *A. tumefaciens* jsou schopné rozpoznat poraněné rostlinné buňky díky některým fenolickým látkám typu acetosyringonu, které jsou jimi uvolňovány. Mezi ně patří například acetovanitol, kyselina galová, nebo vanilin. Tyto látky jsou vytvářeny většinou dvouděložných rostlin, ale jsou produkovány jen málo buňkami jednoděložných rostlin (Ondřej & Drobník, 2002).

Fenolické látky jsou rozpoznány proteinovými receptory na povrchu buněčné stěny bakterie *Agrobacterium*. Následuje chemotaxe bakterií směrem k poraněným rostlinným buňkám. Proteiny bakteriálního chromozomu kódované geny *chvA*, *chvB*, *pscA* zajišťují připojení bakterií na buněčnou stěnu rostlinné buňky. Následně dochází k přenosu signálů přes buněčnou stěnu a aktivuje se transkripce genů oblasti *virB*, *virC*, *virD* a *virE*. Uvolňují se jednovláknové T-DNA, které je možné přenést do rostlinné buňky (Ondřej & Drobník, 2002).

Zlomy pro vznik jednovláknových T-DNA jsou způsobeny endonukleázou, která je kódována geny *virD1*, *virD2*, tím dochází k sestřihu T-DNA (Ondřej & Drobník, 2002).

Důležitým okamžikem je vznik přenosového komplexu, který chrání T-DNA při přenosu z bakteriálních buněk, přes buněčné stěny až do jádra rostlinné buňky. Aktivně se přenáší komplex a T-DNA je s ním pouze pasivně přenášena.

Tento komplex je tvořen polypeptidy, které jsou kódovány geny *virD1*, *virD2*, *virE2* a pravděpodobně některými geny *virB*. Protein, který je produkován ve velkém množství transkripcí genu *virE2*, se váže na T-DNA po celé její délce (Lewin, 1994).

Protein, vznikající z genu *virD2*, se váže na 5'-konec T-DNA a působí jako lokalizátor do jádra, to znamená, že směřuje T-DNA z cytoplazmy do jádra rostlinné buňky, ale přes jadernou blánu již prochází jen protein nebo T-DNA, které jsou na něj navázány, samotný protein genu *virD2* do jádra nevstupuje (Ondřej & Drobník, 2002).

Následně je T-DNA integrována do genomu, často do míst, kde je vysoký výskyt páru bazí AT (Ondřej & Drobník, 2002).

Indukce oblasti *vir* a následný přenos T-DNA z bakterie je ovlivňován teplotou, při které transformace probíhá, horní hranice je udávána mezi 25 °C a 27 °C. Naopak některé kmeny bakterií *Agrobacterium*, tvoří nejstabilnější pilus v mnohem nižších teplotách, mezi 18 °C a 20 °C (Gelvin, 2003).

Zvýšit úspěšnost transformace lze například sonikací, kdy dochází k rozrušení povrchových bariér, a tímto tento proces usnadňuje hlubší proniknutí *A. tumefaciens* do pletiv a umožňuje stálou transformaci. Intenzita a doba sonikace musí být přizpůsobena každému druhu zvlášť, v závislosti na tkáni, typu pokusu, fyziologickému stavu rostliny, případnému působení stresových faktorů na rostlinu (Beranová *et al.*, 2008).

2.2.4 Vektory pro transformaci bakteriemi *Agrobacterium*

Aby bylo možné použít bakterii rodu *Agrobacterium* jako vektor pro cílený přenos genů do rostlinných buněk, je nutné, upravit její T-DNA. Při takovéto úpravě se ponechávají hraniční sekvence a vnitřní geny se odstraňují. Mezi zachované hraniční sekvence se pomocí restričních štěpení a ligací vnáší nové požadované geny. Rozlišujeme dva typy vektorů – kointegrativní a binární vektory.

- Kointegrativní vektory jsou takové, kde je při jejich vytváření používán malý plazmid, který nese klonovaný úsek T-DNA. Do této T-DNA je restričním štěpením a ligací vnesen požadovaný gen. Plazmid je konjugací vložen do buněk bakterií *Agrobacterium*, kde dojde k homologní rekombinaci mezi úseky Ti plazmidu a malého intermediárního plazmidu (Zambryski *et al.*, 1983).

- Binární vektory – takové kmeny *A. tumefaciens*, které mají genetickou informaci Ti plazmidu rozdělenou mezi dva plazmidy. Na prvním je pouze oblast virulence, bez T-DNA. Většinou se používá Ti plazmid zbavený T-DNA. Druhý plazmid obsahuje pouze T-DNA a selektovatelný gen pro rezistenci k antibiotiku. Je již dostatečně malý a obsahuje vhodná restriční místa, která umožňují jednodušší genovou manipulaci pro úpravu agrobakterií a ke včleňování klonovaných genů do rostlin (Ondřej & Drobník, 2002).

V současné době je dostupné velké množství binárních vektorů. Všechny mají mezi hraničními sekvencemi gen pro selekci transformovaných buněk (Mlynářová & Nap, 1997).

2.2.5 Reportérové a selektovatelné transgeny

Reportérové a selektovatelné geny se používají velmi hojně, využívají se jak při selekci transgenních rostlin, tak i k detekci zda transformace úspěšně proběhla.

2.2.5.1 Selektovatelné geny

Jsou takové, které kódují rezistenci k určité látce a tím umožňují, aby po proběhlé transformaci, byly selektovány transformované buňky a pletiva. Látky, které jsou specifické pro danou rezistenci, se přidávají do kultivačního média, nebo se aplikují postřikem na regenerované rostliny. K selekci se používají některá antibiotika - kanamycin, hygromycin, streptomycin; některé herbicidy – Biaphalos, chlorsulfuron, sulfonamid (Guerineau, 1995).

Selektovatelné geny fungující na bázi rezistence pletiv k herbicidům mají výhodu oproti selekčním antibiotikům. Rostliny rezistentní vůči herbicidům není nutné pěstovat ve sterilním agarovém médiu, protože postřik daným herbicidem zabije všechny rostliny, které v půdě vyrostou a nemají rezistenci k danému herbicidu, tzn. rostliny, které nebyly transformovány (Nakamura *et al.*, 2010).

Rozlišujeme dva typy selekcí, *in vitro*, pozitivní a negativní. Negativní selekce spočívá v tom, že na agarovém médiu, které obsahuje selekční látku, rostou pouze transgenní rostliny, ostatní rostliny odumírají. Pozitivní selekce poskytuje

transformovaným rostlinám metabolickou výhodu a nedochází k odumírání netransformovaných rostlin (Příbylová, 2008).

Přestože některé rostliny jsou transformovány jednoduše, jako například tabák, je počet transformovaných buněk velmi malý. Bylo odhadnuto, že pouze jedna buňka z tisíce až z miliónu ovlivněných buněk, přijme cizí DNA. Proto bylo nutné vytvořit selekční metody pro podchycení těchto vzácných buněk (Mlynářová & Nap, 1997).

Selektovatelné transgeny jsou tedy důležitou součástí postupů při regeneraci rostlin po transformaci. Příklady některých vybraných selektovatelných genů jsou, spolu s názvem kódovaného enzymu a jejich selektivní látkou, uvedeny v Tab. I.

Tab. 1: Příklady vybraných selektovatelných genů.

| Gen | Kódovaný enzym | Selektivní látka |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>npt II</i> | neomycinofosfottransferáza | kanamycin |
| <i>hpt/ aphIV</i> | hygromycinofosfottransferáza | hygromycin |
| <i>Spt</i> | streptomycinofosfottransferáza | streptomycin |
| <i>aadA</i> | aminoglykosid-3-adenyltransferáza | streptomycin, spectinomycin |
| <i>Bar</i> | phosfinothricin-N-acetyltransferáza | glufosinát, Bialaphos, phosphinothricin |
| <i>Als</i> | acetolaktátsyntéza | chlorosulfan |

2.2.5.2 Reportérové geny

Jsou do rostlin vnášeny společně s geny pro selekci, používají se k detekci transformovaných buněk a rostlin, ale také ke studiu DNA sekvencí, které jsou potřebné k regulaci exprese genu u rostlin - promotorů, enhancerů a silencerů (Mlynářová & Nap, 1997).

Jsou hojně používané, protože jejich produkty mohou být kvantifikovány pomocí jednoduchých biochemických rozborů/testů. Tyto geny se s výhodou také používají k detekci transformace během přenosu genů a jejich exprese je u transgenních rostlin velmi snadno zjistitelná. Mezi nejčastěji používané patří gen pro β -glukuronidázu (GUS), gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP), gen pro luciferázu (LUC), chloramfenikolacetyltransferázový gen (Guerineau, 1995).

Mohou se zároveň využít i k měření stupně jejich exprese s různými promotory (síly promotorů), s různou strukturou, v různých genotypech rostlin, v různých pletivech rostlin i v různých podmínkách (Ondřej *et al.*, 1999).

Přehled nejčastěji používaných reportérových genů je uveden v tabulce (Tab. II), spolu s názvem kódovaného enzymu a substrátů.

Tab. II: Přehled nejčastěji používaných reportérových genů.

| Gen | Kódovaný enzym | Substrát |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>uidA/gus</i> | β - glukuronidáza | β - glukuronidy |
| <i>Luc</i> | luciferáza (světluška) | luciferin, ATP, kyslík |
| <i>Gfp</i> | zeleně fluoreskující protein (Green fluorescent protein) | Potřebný kyslík |

2.3 Gen pro β -glukuronidázu – GUS

Systém reportérového genu pro enzym β -glukuronidázu byl vytvořen R. A. Jeffersonem v roce 1987. Od té doby patří gen pro β -glukuronidázu mezi nejpoužívanější reportérové systémy k dokázání exprese transgenů (Jefferson *et al.*, 1987). Tento gen se běžně vyskytuje u prokaryot a eukaryot s výjimkou rostlin. β -glukuronidáza (GUS) je kódována genem *gus* (dříve *uidA*) a byl izolován z bakterie *Escherichia coli* kmene K12. β -glukuronidáza má mnoho vlastností, díky kterým je *gus* velmi atraktivním reportérovým genem. GUS řadíme mezi hydrolytické enzymy a navíc je termostabilní. Tento enzym štěpí β -glykosidické vazby mezi kyselinou D-glukuronovou a necukernou složkou (Jefferson *et al.*, 1986).

β -glukuronidáza je aktivní v širokém rozsahu pH. β -glukuronidáza má široké optimální spektrum pH (5–7,5); poloviční aktivita nastává, jestliže je pH rovno 4,3; hodnota pH 8,5 je považována za tzv. neutrální optimum. Zároveň je GUS odolná vůči inaktivaci teplotou do 50 °C (Jefferson *et al.*, 1986).

β -glukuronidáza umožňuje analyzovat expresi na úrovni pletiv, v buňkách, i v rámci buněčných organel.

GUS se také využívá pro sledování lokalizace proteinu v jádře, přestože by byl vhodnější zelený fluorescenční protein (GFP), má v tomto případě má GUS některé výhody. Její velká molekulová hmotnost zabraňuje pasivní difúzi do jádra. V případě, že je gen pro GUS fúzován s genem pro GFP, a výsledný protein je z nějaké příčiny nefluorescentní, GUS si zachovává svou enzymatickou aktivitu a je detekována histochemicky. V tomto případě má GUS ve srovnání s GFP jednu nevýhodu. Touto nevýhodou je, že je možné detekovat pouze „silnou jadernou lokalizaci“ (expresi v jádře) (Blažíčková, 2010).

GUS se používá jako reportérový gen, kdy je možné díky jednoduché histochemické metodě stanovit, zda dochází k expresi genů ve vazbě, které jsme použili při transformaci. Na rozdíl od GUS v případě GFP nedochází při stanovení exprese k odumírání rostlinných buněk (Příbylová, 2008).

Pro transformaci rostlin se jako regulační sekvence pro gen *gus* používá promotor CaMV 35S viru žilkové mozaiky kvěťáku, který je schopný se exprimovat

ve všech rostlinných orgánech (Pret'ová *et al.*, 2001). Promotor CaMV 35S je přednostně aktivní v S fázi buněčného cyklu (Jefferson *et al.*, 1987).

Rostliny, které jsou transformovány genem pro GUS, jsou většinou normální, zdravé a schopné rozmnožování. Protein GUS je velmi stabilní, a i po dlouhé době skladování rostlinného extraktu je protein aktivní ve vysokém stupni.

Za normálních podmínek se enzym GUS nevyskytuje v rostlinných pletivech (respektive u většiny vyšších rostlin nebyla detekována jeho aktivita), nebo se vyskytuje jen velmi vzácně. Citlivost testovacích metod založených na detekci GUS umožňuje ověření proběhlé transformace (Ogras & Gözükmizi, 1999).

Kvůli problémům s expresí β -glukuronidázy i v buňkách bakterie *Agrobacterium*, byl do sekvence *gus*, vložen intron. Tento vložený intron byl odvozen z intronů rostlin. V transformovaných rostlinných buňkách je při úpravách m-RNA intron vystřižen a vzniká tak aktivní enzym β -glukuronidáza. Zároveň by měl intron zvyšovat enzymatickou aktivitu enzymu. Díky tomuto intronu pak již není detekována aktivita v buňkách bakterií *Agrobacterium*, z toho důvodu, že prokaryotické buňky (bakterie), nemají mechanismus vystřížení intronů eukaryotických buněk (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Mezi výhody GUS patří (Falciatore A., 2002):

- aktivní endogenní enzym GUS chybí v mnoha organismech, v nižších i vyšších rostlinách, ve většině bakterií, řasách, houbách a mnoha druzích hmyzu, je ve velké míře nebo zcela nepřítomen.
- β -glukuronidáza katalyzuje hydrolýzu mnoha substrátů, které jsou komerčně dodávány, a je možné aktivitu měřit fluorometricky, histochemicky a spektrofotometricky.
- β -glukuronidáza je velmi stabilní enzym, je odolný vůči detergentům, a je aktivní v širokém rozmezí pH a je rezistentní vůči tepelné inaktivaci.
- Enzym GUS toleruje fúze na N-konci, které většinou nemívají vliv na změnu jeho aktivity, GUS prochází přes membrány a díky modifikacím na amino- konci, může být GUS lokalizována v chloroplastech, mitochondriích, nebo endoplazmatickém retikulu.

- Bylo vytvořeno mnoho vektorů s GUS genem, které jsou komerčně dodávány.

2.3.1 Struktura enzymu β -glukuronidázy

Bakteriální enzym β -glukuronidáza je kódována lokusem *gus* (*uidA*) bakterie *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Enzym je tetramer s podjednotkami o molekulové hmotnosti přibližně 68 000. Nejvyšší aktivitu projevuje v přítomnosti SH-redukujících látek, jako je například β -merkaptoetanol, dithiothreitol. Naopak dvoumocné ionty některých kovů, Cu či Zn, působí inhibičně. Nejvyšší aktivitu má prokaryontní GUS při pH 7,0. Poločas života při 55 °C je 2 hodiny (Vitha, 1995).

2.3.2 Metody detekce β -glukuronidázy

Aktivitu enzymu GUS je možné detekovat *in vitro* a zároveň i *in situ*. *In vitro* je možné zjišťovat obsah GUS kvantitativně, ale bez její známé lokalizace. Naopak metody používané *in situ* umožňují enzym lokalizovat, ale bez kvantitativního výsledku. K detekci β -glukuronidázy se využívá substrát β -D- glukuronid, který je katalyticky hydrolyzován GUS a touto reakcí se uvolňuje primární produkt. Tento produkt je následně detekován přímo nebo po určité přeměně následující v dalších reakcích (Vitha, 1995).

In vitro lze β -glukuronidázu lze velmi snadno detekovat třemi způsoby a to – fluorometricky, histochemicky a spektrofotometricky (Jefferson *et al.*, 1987). Fluorometrické metody se využívá ke stanovení množství GUS (Ogras & Gözükmizi, 1999). Histochemické analýzy se používají k odhalení lokalizace genové aktivity v buňce a pletiv transformovaných rostlin (Jefferson *et al.*, 1987). Spektrofotometrické metody, se běžně využívají v laboratořích a slouží k pozorování záření, které je vydáváno rozpadem nestabilního produktu, který vzniká hydrolyzou.

Metod, které se využívají v případě lokalizace *in situ* je několik, například metoda indigogenní či azokopulační. Při používání metod *in situ*, by měl být nejprve objekt fixován ve formaldehydu nebo glycerinaldehydu a měly by být vytvořeny řezy. Ale fixace se často vynechává a i vytvoření řezů není nezbytně nutné (Vitha, 1995).

2.3.2.1 Metody detekce in vitro

2.3.2.1.1 Kolorimetrická metoda

Při této metodě se využívá jako substrát p-nitrofenyl β -D-glukuronid. Štěpením substrátu vzniká p-nitrofenol, jehož přítomnost je měřena kolorimetrem (Vitha, 1995).

2.3.2.1.2 Fluorimetrické stanovení

Tato kvantitativní metoda je nejvíce citlivá a univerzální, umožňuje zjistit i slabou úroveň exprese genu GUS. Fluorimetrická metoda je 100-1000krát citlivější než kolorimetrické testování. Nejčastěji je používán substrát 4-methylumbelliferyl β -D-glukuronid (4-MUG). Tento substrát se hydrolyzuje na 4-methylumbelliferon (4-MU) a D-glukuronovou kyselinu. Míra akumulace 4-MU je lineárně závislá na koncentraci GUS proteinu a proto může být využit k testování aktivity enzymu GUS. K zastavení reakce se přidává Na_2CO_3 , který zároveň umožňuje dosáhnout maximální fluorescence 4-MU. Po ozáření dlouhovlnným zářením UV, o vlnové délce 365 nm, vyzařuje 4-MU modré světlo o vlnové délce 455 nm (Falciatore, 2002).

Mezi další substráty používané při této metodě patří například resorufin β -D-glukuronid a fluorescein mono- β -D-glukuronid (Vitha, 1995).

2.3.2.1.3 Spektrofotometrické stanovení

Tato metoda je přímá a nevyžaduje žádné zvláštní vybavení laboratoře. Její omezení je však dáno nedostatečnou citlivostí metod založených na absorpci světla a problémech spojených se světelnou absorpcí rostlinných pigmentů, které jsou obsaženy v rostlinných pletivech. Citlivost této metody se dá zvýšit délkou její inkubační doby (Falciatore, 2002). Hydrolýzou příslušného substrátu vzniká nestabilní produkt, který se rozpadá a přitom se produkuje světelné záření (Vitha, 1995).

2.3.2.2 Metody detekce in situ

Jak již bylo zmíněno dříve, tyto metody jsou využívány k tomu, aby byla zjištěna lokalizace aktivity enzymu, ale není možné s jejich pomocí získat kvantitativní výsledek.

Metoda *in situ* by měla být vybírána podle toho, v jaké fázi je lokalizace GUS aktivity, která má tři fáze (Vitha, 2005):

- 1) zpracování studovaného objektu,
- 2) vlastní inkubace
- 3) postinkubační procedury.

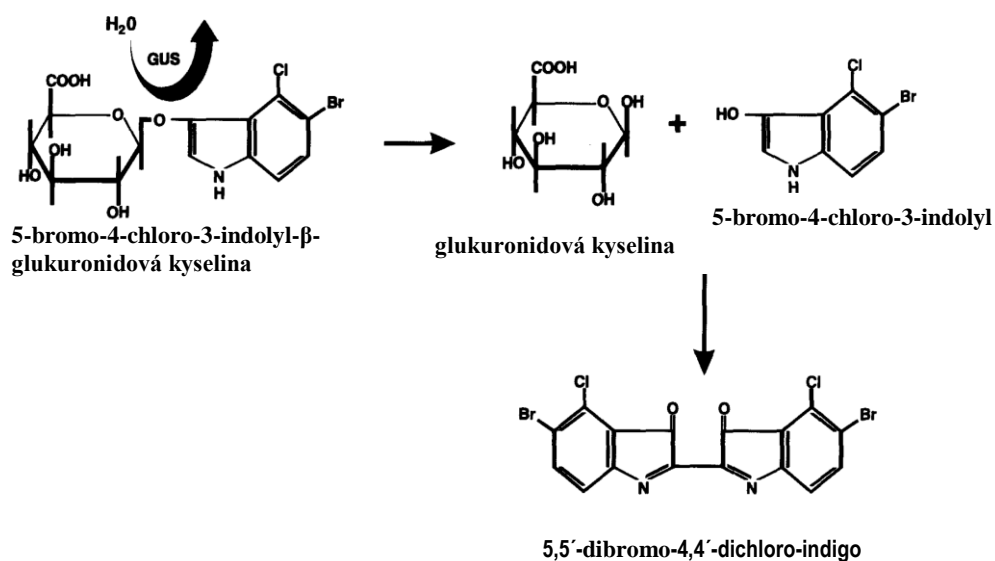
Při inkubaci je nutné rozlišit, zda jde o vlastní enzymatickou reakci nebo navazující vizualizační reakci. Takto získáme barevný produkt, jehož lokalizace by měla odpovídat místům v pletivu, kde je přítomný enzym. Postinkubační metody by měly dát za vznik trvalým preparátům, které umožní opakované srovnávání, nebo alespoň vytvoření dokumentace ve formě mikrofotografie, digitálního záznamu (Vitha, 1995).

2.3.2.2.1 Histochemické stanovení (indigogenní metoda)

Při histochemickém stanovení se používá jako substrát 5-bromo-4chloro-3-indolyglukuronid (X-gluc), které dávají vzniku modrému zabarvení (Jefferson *et al.*, 1987). Reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je substrát hydrolyzován na bezbarvý primární produkt, který difunduje z místa svého vzniku dále do okolí. Tento primární produkt je dále oxidován a dimerizován na modrý nerozpustný produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo (viz obr. 2). Aby bylo docíleno rychlejšího vzniku konečného produktu, přidávají se do barvicího pufru kyanoželezitan a kyanoželeznatan draselný. Zároveň tyto látky omezují difúzi primárního produktu a tím získáme přesnější lokalizaci proteinu, ale jejich nevýhodou je, že také inhibují aktivitu β -glukuronidázy (Gartland *et al.*, 1995).

Proto musí být u každého testovaného vzorku stanovena optimální koncentrace kyanoželezitanu a kyanoželeznatanu draselného v závislosti na intenzitě zbarvení a přesnosti lokalizace (Blažíčková, 2010).

Objekty se mohou barvit živé nebo mírně fixované. Fixace ovšem snižuje aktivitu β -glukuronidázy, proto je často vynechávána. Barvicí pufr obsahuje Na-fosfátový pufr, kyanoželezitan draselný, kyanoželeznatan draselný, X-gluc a detergent. Pro lepší proniknutí barvicího roztoku do pletiv lze použít vakuovou pumpu a desikátor. Barvení probíhá při 37 °C (Vitha S., 1995). Aby bylo možné pozorovat modré zbarvení, musí být odstraněn chlorofyl a další pigmenty. K tomuto kroku se používá 70 % etanol a k projasnění je využívána infiltrace glycerolu (Blažíčková, 2010).



Obr. 2: Hydrolýza glukuronidu X-gluc (převzato od Blažíčková, 2010).

2.3.2.2.2 Metoda azokopulační

Je běžně používaná metoda při lokalizaci intrinsní GUS v živočišných tkáních. Mezi nejpoužívanější substráty patří 6-bromo-2-naftol β -D-glukuronid, α -naftyl β -D-glukuronid, naftol ASBI β -D-glukuronid. Hydrolýzou je uvolňována naftolická složka substrátu, která poté reaguje s diazoniovou solí (tzv. azokopulační reakce) a tím vzniká barevná nerozpustná látka. Tuto metodu ještě můžeme rozdělit na simultánní a postkopulační, podle toho, zda byla diazoniová sůl přítomna v inkubačním médiu společně se substrátem, nebo byla přidána až poté, co proběhla enzymatická hydrolýza substrátu (Vitha, 1995).

2.4 Gen pro zeleně fluoreskující protein – GFP

Zeleně fluoreskující protein, zkráceně GFP z anglického Green fluorescent protein, byl poprvé popsán v roce 1962, se postupem času stal jedním z nejdůležitějších reportérových genů. Byl izolován, společně s bioluminiscenčním proteinem aequorinem, z medúzy *Aequorea victoria*, která se vyskytuje v oblasti východního pobřeží Pacifického oceánu, od Beringova moře po Kalifornii.

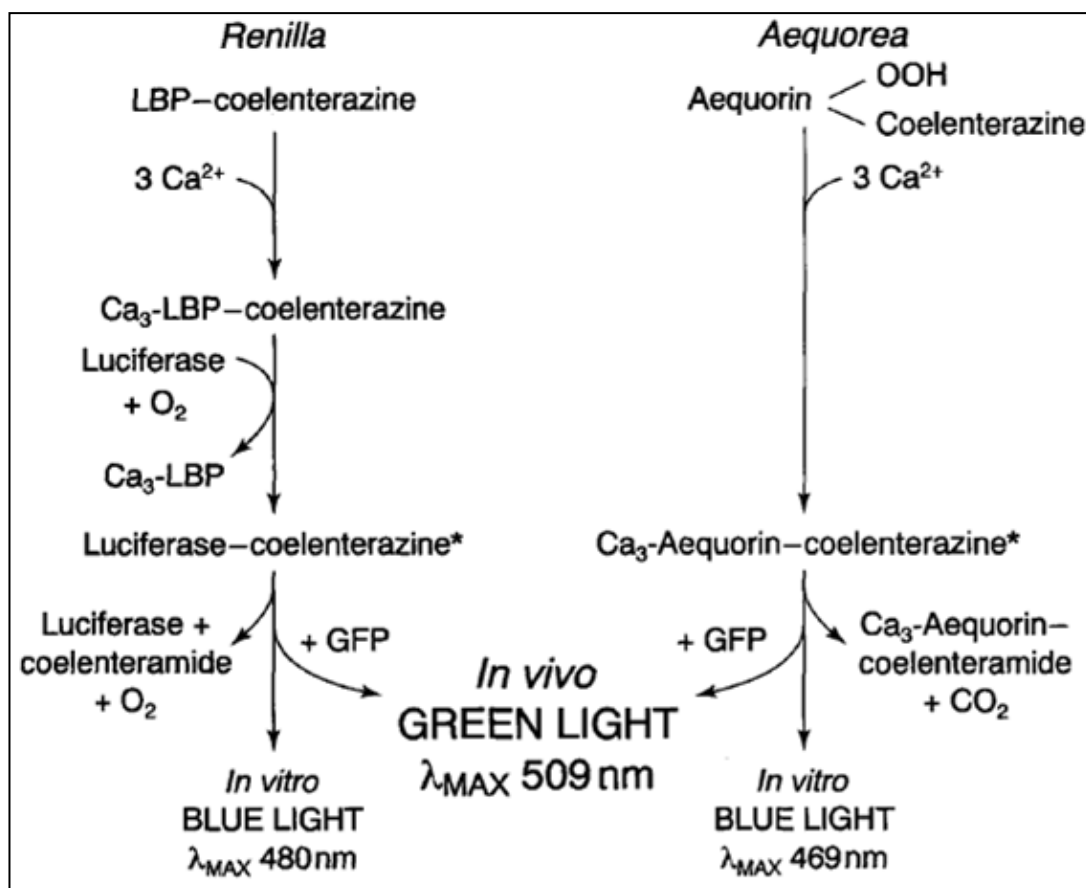
Protein aequorin, který se vyskytuje v medúze, emituje modré světlo, $\lambda = 440\text{--}480\text{ nm}$, pokud je přítomný vápenatý kation, Ca^{2+} (viz obr. 3). Modré světlo je poté pomocí GFP přeměňováno na zelené. Fluorescenci si tento fluoreskující protein zachovává i při fúzi s jiným proteinem, který může být navázán na C- nebo N- konec. Tato vlastnost se dá využít pro sledování lokalizace proteinu v buňce.

Zeleně fluoreskující protein byl také izolován z mořské sasanky *Renilla*.

Bioluminiscence mořské sasanky *Renilla* je zprostředkována proteinem luciferin-binding (LBP), pouze po navázání Ca^{2+} na tento protein (viz obr. 3), dochází k oxidaci coelenterazinu a získaná energie je přenášena na GFP. Tento typ GFP má pouze jedno excitační maximum v modré oblasti světla při 498 nm a emisní maximum je stejné jako u GFP izolovaného z medúzy *Aequorea* (Prasher, 1995).

V roce 2008 byli tři vědci, Osamu Shimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien, oceněni Nobelovou cenou v oblasti chemii za objev a následný vývoj GFP metod.

GFP protein byl již vnesen do mnoha typů organismů – bakterií, kvasinek, hlístic, hmyzu, ryb, savců a rostlin.



Obr. 3: Porovnání bioluminiscentní cesty z mořské sasanky *Renilla* a medúzy *Aequorea*, (Prasher, 1995).

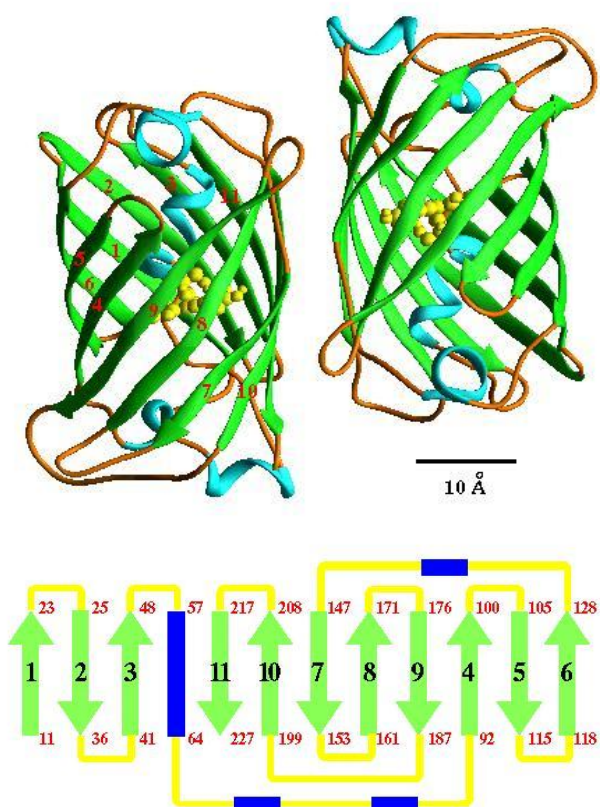
2.4.1 Struktura GFP

Aminokyselinová sekvence původního GFP:

MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGDATYGLTLNFICTTG
 KLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKD
 DGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIM
 GDKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS
 ALSKDPNEKRDMILLEFVTAARITHGMDELYK (dle Kůta, 2007)

Molekulární struktura proteinu je sudovitého tvaru, tzv. beta can, je složen z 11 β -listů, které tvoří stěny, prostředkem tohoto „sudu“ z β -listů, prochází α -helix. Tyto dva „sudy“ tvoří dimerickou strukturu proteinu. Na horním a spodním konci „sudu“ se nachází malé šroubovicovité segmenty (viz Obr. 4). Zeleně fluoreskující protein je

tvořen 238 aminokyselinami. Tzv. „wild“ typ GFP, je složen ze dvou monomerů, jeho molekulová hmotnost je rovna 27 kDa, průměr tzv. beta-barelu je 27 Å, jeho délka je rovna 40 Å. Tento původní typ GFP emituje v UV oblasti světla mezi 360-400 nm, a v oblasti modrého světla, $\lambda = 440-480$ nm. Hlavní excitační maximum se nachází v oblasti UV, při 395 nm, a vedlejší excitační maximum se nachází v modré oblasti světla při 475 nm s extinkčními koeficienty $30\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $7\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Emisní maximum je při 509 nm, tedy v zelené oblasti spektra světla, vedlejší emisní vrchol je při 540 nm (Yang *et al.*, 1996).



Obr. 4: Trojrozměrné zobrazení proteinu GFP – „beta can“ s fluoroforem uprostřed. Topologický diagram GFP (zeleně jsou zobrazeny β -listy, modře α -helixy, žlutě spojovací smyčky) (Yang *et al.*, 1996).

Pro fluorescenci není potřeba dodávat žádné kofaktory, substráty, ani žádné další sloučeniny.

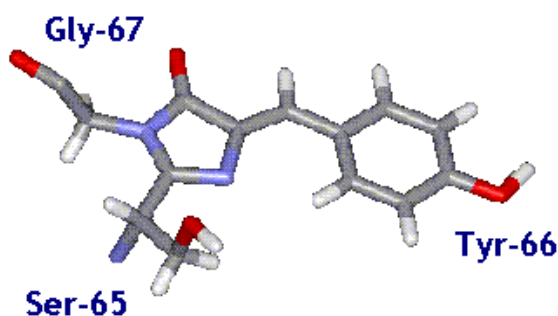
Zeleně fluoreskující protein, je aktivní a odolný vůči denaturaci ve velmi širokém rozmezí hodnot pH 5-11, a v teplotách do 60 °C. Protein je velmi odolný

vůči denaturizaci způsobenou denaturizačními činiteli, jako jsou například 6M guanidin HCl, 8M močovinou či 1% dodecylsíránem sodným (Hraška *et al.*, 2006).

V neutrálních roztocích ztrácí GFP svoji fluorescenci při 78 °C, GFP z medúzy *Aequorea*, a 70 °C, u GFP pocházejícího z korálnatce *Renilla*. Denaturace GFP proběhne také po působení 6M guanidin HCl po dobu dvou minut a 92 °C, acidifikaci pod pH 2, alkalizaci nad pH 13. Po denaturaci GFP zcela ztrácí svoji fluorescenci, ale je možné protein opět renaturovat. Pro takovouto renaturaci je nutné přidání thiolu (Prasher, 1995).

2.4.2 Fluorescenční centrum GFP

Fluorescence GFP proteinu je patrná po ozáření UV světlem. Základem fluoroforu je sekvence Ser-Tyr-Gly (viz Obr. 5), která je posttranslační modifikací upravena do struktury 4-(p-hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on (Hraška, 2003).



Obr. 5: Model struktury tripeptidu Ser65-Tyr66-Gly67 fluorescenčního centra GFP (anonym, 2011)

Jsou známy dvě formy fluoroforu, jedna s parciálním negativním nábojem na benzylovém kyslíku tyrosinu, a druhá s nábojem na karbonylovém kyslíku imidazolového kruhu. Fluorofor je velmi dobře chráněn jedenácti β -listy, které ho obklopují. V jeho okolí můžeme najít polárně i nepolárně nabitě boční řetězce aminokyselin a další různě nabitě částice (anonym, 2011).

2.4.3 Mechanismus aktivace fluoroforu

Mechanismus aktivace fluoroforu běžného proteinu je shodný s neenzymatickou deaminací Ans-Gly, která je však následována oxidací tyrosinu na dehydrotyrosin. Tato reakce je iniciována rychlou cyklizací mezi Ser⁶⁵ a Gly⁶⁷, což vede k vytvoření imidazolin-5-onového meziprojektu. Proces následuje mnohem pomalejší oxidace bočního řetězce Tyr⁶⁶ kyslíkem. Výzkum mutací fluoroforu odhalil, že Gly⁶⁷ je naprosto nezbytný pro tvorbu fluoroforu a není možné ho nahradit jinou aminokyselinou. Molekula kyslíku, která je pro reakci vyžadována, hraje roli při vytváření dvojité vazby mezi uhlíky na tyrosinu, aby došlo k vytvoření aromatického systému. Pro tento autokatalytický proces, nejsou známy žádné kofaktory a enzymy. Reakce je termosensitivní, při teplotách nad 30 °C klesá schopnost vytvářet fluorofor. Ale na rozdíl od vytváření fluoroforu, který je ovlivňován teplotou, je jednou již vytvořený GFP termostabilní (Yang *et al.*, 1996).

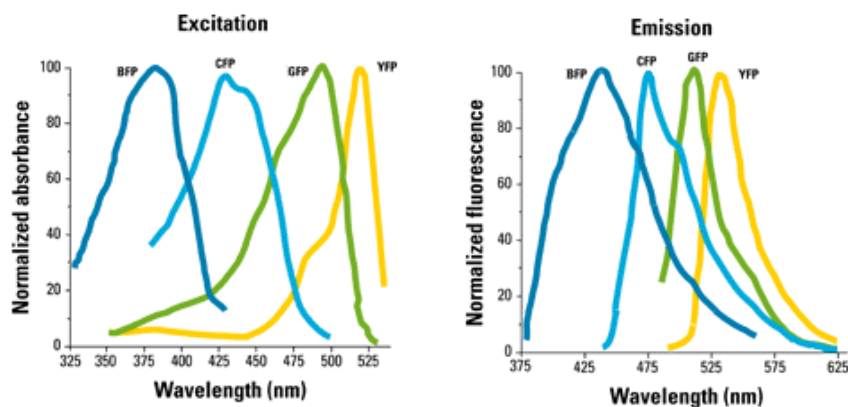
2.4.4 Mutace GFP

V blízkosti fluoroforu se vyskytují polární zbytky aminokyselin, které z velké části vytváří síť, pomocí vodíkových můstků na boku Tyr⁶⁶. Atomy postranních řetězců na Thr²⁰³, Glu²²², Ile¹⁶⁷ pomocí slabých vazebných van der Waalových sil interagují s Tyr⁶⁶. Pokud by došlo k mutaci v těchto oblastech, nebo pokud dojde ke změně náboje, mělo by to přímý vliv na fluorofor a na jeho okolí (anonym, 2011).

Změny zbytků aminokyselin, které se nacházejí v blízkosti fluoroforu, mají vliv na absorpci a/nebo emisní spektra GFP. Díky možnosti změny okolí fluoroforu a jejich následné změny fluorescence, mohou tyto mutanty GFP přinést další využití GFP, například genových markerů, markerů vývojových linií buněk (Yang *et al.*, 1996).

Některé mutace jsou způsobeny zkomolením či zkrácením N - a C – konců. Jestliže dojde ke ztrátě či změně více než 7 aminokyselin na C – konci nebo Met na N – konci, mutace povede k úplné ztrátě fluorescence (anonym, 2011). Některé mutanty byly tvořeny tak, aby byl excitační vrchol posunut do oblasti červeného spektra, do hodnoty 490 nm, ale emisní vrchol zůstal na stejné úrovni, 509 nm. Tyto typy mutací jsou lépe využitelné pro pozorování s pomocí standardních optických

soustav a filtrů. Zároveň tyto mutanti umožňují efektivnější využití aplikací konfokálního mikroskopu. Následně byly vytvářeny další mutanty, které mají posunutý excitační vrchol do jiných oblastí viditelného spektra (viz Obr. 6), například BFP (Blue fluorescent protein), CFP (Cyan fluorescent protein), YFP (Yellow fluorescent protein) (anonym, 2011).



Obr. 3: Srovnání excitačních a emisních vrcholů některých mutantů - BFP, CFP, YFP – s GFP (anonym, 2011).

2.4.5 Přehled některých mutací GFP

- Mutace Tyr⁶⁶ fluoroforu na Phe způsobuje zvýšenou excitaci, ale dochází i ke ztrátě intenzity fluorescence.
- Mutace Ser⁶⁵ na Thr zvyšuje intenzitu fluorescence.
- Mutace Tyr⁶⁶ na His způsobí posunutí excitačního maxima do UV oblasti, na vlnovou délku 383 nm, s emisním maximem v modré oblasti, $\lambda = 448$ nm.
- Mutace Tyr⁶⁶ na Trp způsobuje posunutí emisního signálu do modré oblasti, zároveň dochází k poklesu intenzity fluorescence v porovnání s fluorescencí „wild type“ GFP.
- Záměna Ser⁶⁵ na Thr, Ala, Cys nebo Leu způsobí ztrátu excitačního vrcholu o vlnové délce 395 nm, a dochází k excitaci v modré oblasti viditelného světla.
- Při kombinaci s Ser⁶⁵ mutantů vedou záměny na dalších místech v blízkosti fluoroforu, jako například Val⁶⁸ na Leu či Ser⁷² na Ala, ke zvýšení intenzity zelené fluorescence při excitaci ve vlnové délce 498 nm.

- Záměna Ser²⁰² za Phe a zároveň záměna Thr²⁰³ za Ile, způsobují ztrátu excitace při 475 nm, ale excitace při 395 nm zůstává zachována.
- Nahrazení Ile¹⁶⁷ na Thr způsobuje změnu citlivosti fluoroforu na excitační signál.
- Záměna Glu²²² na Gly je spojena s eliminací excitace při 395 nm.
- Mutace Val¹⁶³ na Arg zvyšuje teplotní toleranci GFP a zvyšuje význam změny Ser⁶⁵ na Thr.
- Mutace His¹⁴⁸ ovlivňuje závislost excitačních vrcholů (395 nm a 475 nm) na hodnotách pH. Atom dusíku v His je vzdálen 3,3 Å od hydroxylového kyslíku Tyr⁶⁶ fluoroforu.
- U některých mutací, do kterých patří například Phe¹⁰⁰ na Ser, Met¹⁵⁴ na Thr a Val¹⁶⁴ na Ala; není znám přesný projev mutace. Pozice 154 až 164 se vykytují na povrchu proteinu. Tyto mutace by mohly sloužit ke zvýšení rozpustnosti nebo snížení soudržnosti proteinu. Mutace Phe – Ser by mohla snižovat stabilitu jádra proteinu. Vzhledem k tomu, že není známo, jak tyto mutace působí, nelze říci, zda budou mít nějaký další přínos k vylepšení charakteristik GFP.

(upraveno, Hraška, 2003, anonym, 2011)

Zároveň se mutace GFP mohou rozdělit do sedmi kategorií, skupiny jedna až čtyři jsou odvozeny od polypeptidů s Tyr na pozici 66, a třídy 5, 6 a 7 mají tento Tyr na pozici 66 zaměněn za Trp, His, Phe:

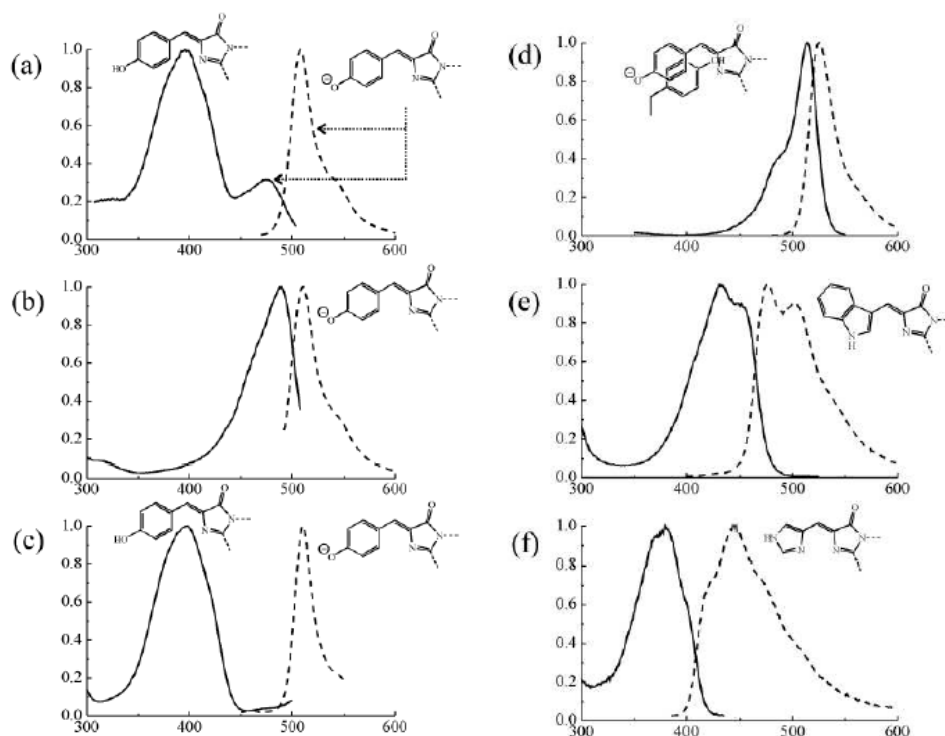
- 1) původní typ, tzv. „wild type“ směs neutrálního fenolu a záporného fenolátu,
- 2) fenolátový anion – například mutace Emerald,
- 3) neutrální fenol – záměna Tyr²⁰³ za Ile, tato změna způsobuje to, že dojde k eliminaci excitačního vrcholu při 475 nm, emisní vrchol je při 511 nm, například mutace H9,
- 4) fenolátový anion s π -elektronový konjugací mezi nahrazeným tyrosinovým zbytkem a chromoforem (YFPs) – mutanti mají posunutý emisní vrchol do žluté oblasti spektra, například mutace Topaz,
- 5) indol (CFPs) – díky záměně Tyr⁶⁶ za Trp, vzniká v chromoforu indol, díky velikosti indolového chromoforu vznikají na indolu další mutace, například mutace W7,

- 6) imidazol (BFPs) – změna Tyr⁶⁶ za His vytvoří imidazol v chromoforu a výsledkem této záměny je posunutí excitačního a emisního maxima do modré oblasti spektra, například mutace BFP,
- 7) fenyl – v této skupině mutantů je nahrazen Tyr⁶⁶ za Phe, to má za následek nejnižší známou hodnotu excitace při 360 nm a emisní maximum při 442 nm.

Celkový přehled mutací na chromoforu a jejich emisních a excitačních maxim jsou uvedeny na obr. 7 a 8 (Tsien & Prasher, 1998).

| Mutation ^a | Common name | λ_{exc} (ϵ) ^b | λ_{em} (QY) ^c | Rel. fl. ^d @ 37°C | References ^e |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Class 1, wild-type | | | | | |
| None or Q80R | Wild type | 395–397 (25–30) 470–475 (9.5–14) | 504 (0.79) | 6 | 43, 45 |
| F99S, M153T, V163A | Cycle 3 | 397 (30) 475 (6.5–8.5) | 506 (0.79) | 100 | 43, 45 |
| Class 2, phenolate anion | | | | | |
| S65T | EGFP | 489 (52–58) | 509–511 (0.64) | 12 | 43–45 |
| F64L, S65T | | 488 (55–57) | 507–509 (0.60) | 20 | 43–45 |
| F64L, S65T, V163A | Emerald | 488 (42) | 511 (0.58) | 54 | 44 |
| S65T, S72A, N149K, M153T, I167T | | 487 (57.5) | 509 (0.68) | 100 | 44 |
| Class 3, neutral phenol | | | | | |
| S202F, T203I | H9 | 399 (20) | 511 (0.60) | 13 | 44 |
| T203I, S72A, Y145F | H9–40 | 399 (29) | 511 (0.64) | 100 | 44 |
| Class 4, phenolate anion with stacked π-electron system (yellow fluorescent proteins) | | | | | |
| S65G, S72A, T203F | 10C Q69K | 512 (65.5) | 522 (0.70) | 6 | 44 |
| S65G, S72A, T203H | | 508 (48.5) | 518 (0.78) | 12 | 44 |
| S65G, V68L, Q69K, S72A, T203Y | 10C | 516 (62) | 529 (0.71) | 50 | 44 |
| S65G, V68L, S72A, T203Y | | 514 (83.4) | 527 (0.61) | 58 | 44 |
| S65G, S72A, K79R, T203Y | Topaz | 514 (94.5) | 527 (0.60) | 100 | 44 |
| Class 5, indole in chromophore (cyan fluorescent proteins) | | | | | |
| Y66W | W7 | 436 | 485 | — | 21 |
| Y66W, N146I, M153T, V163A | | 434 (23.9) 452 | 476 (0.42) 505 | 61 | 44 |
| F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A | W1B or ECFP | 434 (32.5) 452 | 476 (0.4) 505 | 80 | 44 |
| S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A | W1C | 435 (21.2) | 495 (0.39) | 100 | 44 |
| Class 6, imidazole in chromophore (blue fluorescent proteins) | | | | | |
| Y66H | BFP | 384 (21) | 448 (0.24) | 18 | 44 |
| Y66H, Y145F | P4–3 | 382 (22.3) | 446 (0.3) | 52 | 44 |
| F64L, Y66H, Y145F | EBFP | 380–383 (26.3–31) | 440–447 (0.17–0.26) | 100 | 43, 44 |
| Class 7, phenyl in chromophore | | | | | |
| Y66F | | 360 | 442 | — | 22 |

Obr. 7: Spektrální charakteristiky hlavních tříd GFP (dle Tsien & Prasher, 1998).



Obr. 8: Fluorescenční excitační (plné čáry) a emisní (přerušované čáry) spektra typických zástupců ze 6ti hlavních skupin mutantů chromoforu GFP společně se strukturou jejich chromoforů (pokud je uvedena pouze jedna struktura chromoforu, excitační i emisní spektrum vychází pouze z jedné konformace). Vysvětlivky: a) standardní GFP, b) Emerald, c) H9-40, d) Topaz, e) W1B, f) P4-3 (převzato z & Prasher, 1998).

2.4.6 Metody zobrazování

2.4.6.1 Vizuální zobrazování, tzv. „visual screening“

Pro toto zobrazování postačuje levnější přístrojové vybavení. Základem vizuálního zobrazování je zdroj excitačního světla obvykle o vlnové délce 395 nm, nebo světlo z xenonové lampy o vlnové délce 480 nm a interferenční filtr či monochromátor. Pozorování je následně prováděno ještě přes další filtr tzv. „long-pass filter“. Pokud by byl využíván jako zdroj excitace UV záření, je nutné, aby byl použit další filtr, který blokuje toto ultrafialové záření, kvůli zdravotnímu riziku, které toto světlo způsobuje. Při excitaci modrou částí spektra se využívají žluté nebo oranžové ochranné filtry (Tsien & Prasher, 1998).

Pozorování lze provést i za použití fluorescenčního mikroskopu, se slabým objektivem (obvykle 4x), který je opatřený filtrem pro oddělení excitačního a emitovaného světla (Tsien & Prasher, 1998).

2.4.6.2 Video zobrazování, „video imaging“

Tato metoda, která využívá shromažďování a počítačové zobrazování spektrálních charakteristik, byla nazvána Youvanem *et. al.* (1995) jako Digital Imaging Spectroscopy. Metoda je shodná s běžně využívaným zobrazováním fyziologických jevů uvnitř buněk s rozdílem, že lze pozorovat spíše makroskopické než mikroskopické objekty. Digitální zobrazování je mnohem citlivější než pozorování lidským okem, ale je potřebná určitá koordinace pohybů obsluhy při pozorování obrazovky počítače (Tsien & Prasher, 1998).

2.4.6.3 „Fluorescence - Activated Cell Sorting“ – FACS

Tato metoda je velmi výkonná a rychlá, především při stanovení dvou neobvyklých a rozdílných emisních spekter jako kritérií přerozdělování. První pokusy se standardním typem GFP, tzv. „wild- type“ GFP, nebyly úspěšné, protože signál z jednotlivých kolonií bakterií byl velmi slabý a přerozdělované bakterie nevykazovaly fenotyp, na který by mohly být tříděny (Tsien & Prasher, 1998). Později byly pokusy úspěšné, protože vědci objevili nejjasnější signál při excitaci při 488 nm (Cormack *et al.*, 1998).

FACS je optimální metoda pro GFP screening, její výhodou je vysoká účinnost (více jak 10^3 buněk s^{-1}), zároveň není omezena jen na pozorování bakterií (Tsien & Prasher, 1998).

2.4.6.4 „High-throughput microscopy“ – HTM

Tato metoda je podobná metodě předcházející – metodě FACS, ale navíc umožňuje kvantifikovat buněčnou morfologii a zahrnout prostorové rozložení a koncentraci fluorescenčně označených molekul v buňce. V mnoha případech GFP proteiny a GFP fúzní proteiny mají vyšší efektivitu, pokud jsou exprimovány v savcích buňkách než v bakteriálních buňkách (Tsien & Prasher, 1998).

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

Jako výchozí rostlinný materiál pro transformační pokusy byly používány rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*) vypěstované sterilně ze semen. V daném případě se jednalo o cv. Petit Havana, mutantu SR1WT rezistentního k antibiotiku streptomycinu (Maliga *et al.*, 1973), které byly pěstovány na MS médiu v kultivační místnosti (16 hodin fotoperioda, 22-25 °C). Obdobným způsobem byly odvozeny a pěstovány transgenní rostliny tabáku SR1WT s vneseným transgenem *gfp* (Hraška, 2007), které sloužily jako pozitivní kontrola při mikroskopickém studiu mnou získaných transgenních tabáků. Pro jejich selekci a udržování bylo používáno MS médium s 500 mg.l⁻¹ kanamycinu.

Jako transformační bakterie byly použity kmeny *A. tumefaciens* EHA 105 a GV 2260.

Kmen GV 2260 nese konstrukt SPI-2:GFP (Navrátil, 2008). Tento konstrukt je složený z genů *nptII*, *SPI-2* a *gfp*. Gen *nptII* kóduje neomycinofotransferázu, a umožňuje selekci transformantů na základě jejich rezistence k antibiotiku kanamycinu. Gen *SPI-2* (inhibitor proteáz serinového typu) a reportérový gen GFP jsou fúzovány a řízeny jediným promotorem CaMV 35S (viz obr. 11 v příloze 8.1).

Kmen EHA 105 nesoucí konstrukt pWell 09, který je složený z genů *gus*, *nptII* a *SPI-2*, byl poskytnut Mendelovou Univerzitou v Brně. Gen *gus*, kódující β-glukuronidázu, slouží jako reportérový gen pro snadné zjištění úspěšnosti transformace. Gen *nptII*, který kóduje neomycinofotransferázu, umožňuje selekci transformovaných buněk (Nirmala *et al.*, 2001). (viz obr. 12 v příloze 8.3). Možnostmi aplikace zjištěných poznatků o inhibitoru SPI-2 se zabývá navazující projekt 1M06030 „Funkční genomika a proteomika ve šlechtění rostlin“ (2006-2011), v rámci kterého jsem realizovala i tuto bakalářskou práci.

Kmeny vektorových bakterií byly dlouhodobě uchovávány při velmi nízké teplotě (- 80 °C) v glycerinu. Před jejich dalším používáním k transformaci byly po zotavení (dvoudenním předpěstování v tekutém LK médiu s 200 mg.l⁻¹ kanamycinu) přeočkovány na agarové médium LK s 200 mg.l⁻¹ kanamycinu.

Takto připravené kultury byly uchovávány po dobu max. 3 měsíců v lednici při teplotě 4–7 °C.

3. 2 Příprava kultivačních médií

Pro transformaci listových řízků pomocí *A. tumefaciens* byla používána níže uvedená kultivační média. Médium LK pro předpěstování bakterií a varianty MS média (Murashige & Skoog, 1962) pro kultivaci výchozího rostlinného materiálu a regeneraci rostlin.

Médium pro rostliny bylo připravováno v 1000 ml kádince s redestilovanou vodou, do které byly rozmíchány všechny složky daného média kromě agaru, růstových látek a antibiotik. K jeho přípravě bylo využito komerční práškové médium MS s vitamíny od firmy Duchefa (Holandsko). Poté byla redestilovaná voda doplněna do požadovaného objemu, bylo změřeno pH, které bylo upraveno pomocí 1 M KOH na hodnotu 5,7. Rozmíchané médium bylo přelito do Erlenmayerovy baňky, kde byl nasypán připravený agar. Baňka byla uzavřena pomocí dvojité vrstvy hliníkové folie. Poté bylo médium klávnováno při 121 °C po dobu 30 minut. Mezitím se samosterilizovala antibiotika přibližně po dobu 1,5 hodiny. Následně bylo médium zchlazeno asi na teplotu 50 °C. V této fázi přípravy média byly ve sterilním prostředí flow boxu přidány termolabilní látky, antibiotika, médium bylo pečlivě promícháno a rozlito do připravených Petriho misek. Misky byly označeny a uskladněny v lednici.

Médium pro kultivaci *Agrobacterium tumefaciens* bylo připravováno v 1000 ml kádince s redestilovanou vodou, kde byly rozpuštěny všechny složky média. Objem média byl doplněn redestilovanou vodou do daného objemu a upravena jeho kyselost (pH 6,5-6,7). Posléze bylo médium odměřováno po 10 ml pomocí odměrného válce a naléváno do 100 ml Erlenmayerových baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Po zchlazení byla média uskladněna v lednici.

3. 2. 1 Použitá kultivační média

| MS médium: | dávka | |
|---------------|---------------------------|--------|
| MS s vitamíny | 4 400 mg.l ⁻¹ | |
| inositol | 100 mg.l ⁻¹ | pH 5,7 |
| sacharóza | 30 000 mg.l ⁻¹ | |
| Agar | 8 000 mg.l ⁻¹ | |

| MS médium I.: | dávka | |
|---------------|------------------------|--------|
| NAA | 0,1 mg.l ⁻¹ | pH 5,7 |
| BAP | 1 mg.l ⁻¹ | |

| MS médium II.: | dávka | |
|----------------|------------------------|--------|
| NAA | 0,1 mg.l ⁻¹ | |
| BAP | 1 mg.l ⁻¹ | pH 5,7 |
| kanamycin | 300 mg.l ⁻¹ | |
| Timentin | 200 mg.l ⁻¹ | |

| LK médium pro kultivaci <i>A. tumefaciens</i> : | dávka | |
|-------------------------------------------------|---------------------------|------------|
| sacharóza | 10 000 mg.l ⁻¹ | |
| kasein hydrolyzát | 800 mg.l ⁻¹ | |
| kvasnicový extrakt | 4 000 mg.l ⁻¹ | pH 6,5–6,7 |
| KH ₂ PO ₄ | 2 000 mg.l ⁻¹ | |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 300 mg.l ⁻¹ | |

3. 3 Sterilizace a výsev semen tabáku

Před transformací bylo nutné ze semen vypěstovat rostlinky tabáku vhodné k transformaci. Před vysetím semen na agarové médium, byla semena povrchově sterilizována etanolem a následně zředěným roztokem sterilizačního přípravku Savo (Bochemie, ČR).

Potřebné množství semen bylo přeneseno do sterilních mikrokumavek Eppendorf o objemu 1,5 ml. Do mikrokumavky bylo přidáno 100 µl 70 % etanolu, který byl cca. po jedné minutě odstraněn. Následně bylo do mikrokumavky napipetováno 150 µl sterilizačního roztoku (SAVO: voda v poměru 1:9 a kapka Jaru), semena se sterilizačním roztokem byla promíchána a ponechána v roztoku po dobu 40 minut za občasného promíchání. Po této době byl sterilizační roztok odstraněn slitím a semena byla několikrát promyta sterilní destilovanou vodou, dokud nebylo odstraněno všechno smáčedlo - Jar.

Poté byl asepticky přidán řídký agar, 0,125 % Difco BactoAgar (Difco Laboratories, USA), zkrácenou špičkou byla semínka rozprostřena na Petriho misky se základním kultivačním médiem MS s 3 % sacharózou. Misky s vysetými semínky byly kultivovány v kultivační místnosti asi po dobu 4 týdnů. Poté byly vzešlé rostlinky přesázeny do skleniček s MS médiem téhož složení.

3. 4 Postup transformace listových segmentů tabáku

Pro transformaci byla použita modifikovaná metoda listových disků (Horsch *et al.*, 1985).

Jeden a půl dne před transformací byly bakterie zaočkovány sterilní kličkou ve flow boxu (Telstar AH 100, Španělsko) do připravených 100 ml Erlenmayerových baněk s 10 ml tekutého média LK (Langley & Kado, 1972), které obsahovalo 50 mg.l⁻¹ kanamycinu (SERVA, Německo). Bakterie byly kultivovány v horizontální třepačce s vodní lázní při 25–28 °C a 120 kmitů za minutu.

Pro transformaci, která byla prováděna ve sterilním prostředí flow boxu a vysterilizovanými nástroji, byly vybrány nejlepší listy, bez znatelného zežloutnutí či nekróz. Většinou se jednalo o plně rozvinutý druhý či třetí list od vrcholu rostliny.

Listy byly zbaveny střední žilky a rozřezány na segmenty o velikosti přibližně 1,5 x 0,5 cm. Segmenty byly přeneseny do Petriho misky, ve které bylo připraveno 18 ml sterilního roztoku 10 mM MgSO₄. Do misky byly přidávány segmenty až do chvíle, kdy byl povrch v misce pokryt segmenty asi ze 2/3 až 3/4. Následně bylo přidáno 1,5 ml bakteriální suspenze, obsah v Petriho misce byl promíchán, aby se bakteriální suspenze dostala ke všem částem segmentů v misce. Petriho miska byla zakryta a kultivována 2 hodiny v laboratorních podmínkách. Po stanovené době byla odsáta bakteriální suspenze, segmenty byly osušeny sterilním filtračním papírem a přeneseny na 9 cm Petriho misky s 25 ml agarového média MS s 0,1 mg.l⁻¹ NAA a 1,0 mg.l⁻¹ BAP, bez antibiotik (MS médium I) spodní stranou listu vzhůru. Misky byly zalepeny Nescofilmem (Bando Chemical Ind. Ltd., Japonsko) nebo polyetylenovou folií. Misky byly kultivovány přikryté 2 vrstvami filtračního papíru, v kultivační místnosti, po dobu dvou dnů. Po kultivaci v šeru byly nejlepší segmenty přeneseny na agarové médium MS, které mělo stejné složení jako předchozí, jen bylo navíc přidáno 300 mg.l⁻¹ kanamycinu (SERVA, Německo), pro selekci transformovaných rostlinných buněk, a 200 mg.l⁻¹ Timentinu (SmithKline Beecham Plc., Velká Británie), pro eliminaci vektorových bakterií, (MS médium II). Při přenášení byly segmenty otočeny, takže svrchní strana listu byla nahoru. Následná kultivace probíhala při plném světle v kultivační místnosti.

4 Výsledky

4.1 Transformace bakteriemi *A. tumefaciens* a následné pěstování transgenních rostlin

Celkem bylo provedeno 7 pokusů o transformace tabáku, *Nicotiana tabacum*, odrůdy SR1WT Petit Havana dvěma kmeny bakterií *A. tumefaciens*. Z toho byly čtyři pokusy provedeny kmenem EHA 105 nesoucím konstrukt pWell 09, který obsahuje gen pro SPI-2, *gus* a *nptII*, a tři pokusy kmenem BV 2260, který obsahuje konstrukt SPI-2:GFP. Transformací konstruktem SPI-2:GFP bylo získáno celkem 19 prokazatelně transformovaných rostlin, transformace druhým typem konstruktu nebyla úspěšná. Shrnutí provedených pokusů je zobrazeno v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3: Přehled provedených transformačních pokusů.

| Pokus | Kmen | Konstrukt | Počet získaných transformovaných rostlin |
|-------|-----------------------|-----------|------------------------------------------|
| | <i>A. tumefaciens</i> | | |
| 1. | BV 2260 | SPI-2:GFP | 6 |
| 2. | BV 2260 | SPI-2:GFP | 9 |
| 3. | BV 2260 | SPI-2:GFP | 7 |
| 4. | EHA 105 | pWell 09 | 0 |
| 5. | EHA 105 | pWell 09 | 0 |
| 6. | EHA 105 | pWell 09 | 0 |
| 7. | EHA 105 | pWell 09 | 0 |

Během pokusů byla využívána tzv. disková metoda transformace. K transformaci byly používány rostliny, které byly vypěstovány *in vitro* ze semen, která byla nejprve povrchově vysterilizována. Následná regenerace byla prováděna na základním médiu MS s přidavkem antibiotik – 200 mg.l⁻¹ Timentinu a 300 mg.l⁻¹ kanamycinu, a růstových látek 0,1 mg.l⁻¹ NAA a 1 mg.l⁻¹ BAP, přesně podle postupu, který je uvedený v kapitole Materiál a metodika.

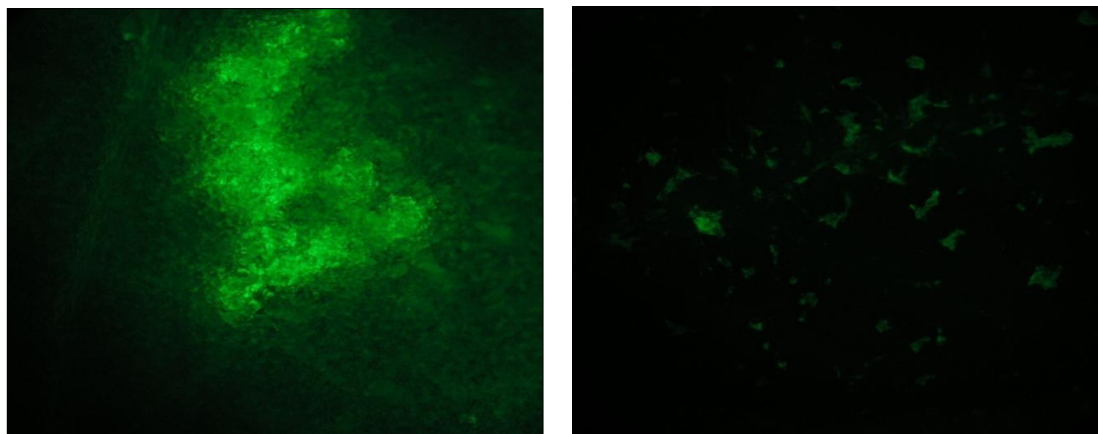
Přibližně po dvou týdnech kultivace začaly listové explantáty tvořit kalusy, které následně, díky přítomným růstovým hormonům (BAP, NAA) v médiu, začaly tvořit výhony. Vzhledem k tomu, že médium, na kterém byly explantáty kultivovány, obsahovalo antibiotikum kanamycin, docházelo k postupné selekci transformovaných buněk a pletiv. Netransformované buňky odumíraly, z toho důvodu, že neobsahovaly gen *nptII*, který by zajišťoval jejich rezistenci vůči antibiotiku. Přibližně po 7-8 týdnech byly z původních transformovaných explantátů odděleny výhony, které byly přeneseny na zakořeňovací médium MS s antibiotiky a růstovými hormony (500 mg.l⁻¹ kanamycinu, 300 mg.l⁻¹ Augmentinu a 0,1 mg NAA).

Po zakořenění byly regenerované rostliny pěstovány v podmínkách *in vitro* na základním MS médiu s kanamycinem, bez růstových látek, pouze s přidáním polovičního množství Augmentinu, tzn. 150 mg.l⁻¹. Při další kultivaci byl Augmentin již úplně vynechán. Tímto postupem postupného snižování obsahu antibiotik došlo ke spolehlivé eliminaci vektorových bakterií a zároveň byla umožněna regenerace a vývoj výhonů.

Po vizuální detekci regenerantů, bylo 19 rostlin (generace T₀) převedeno z podmínek *in vitro* do normálního půdního substrátu. Rostliny byly pěstovány ve skleníku se stálou teplotou pohybující se kolem 22 °C. Během růstu ve skleníku rostliny vegetačně prospívaly, neproběhlo žádné napadení škůdci ani chorobami. Pouze dvě rostliny nebyly schopné se adaptovat na změněné podmínky, a postupně uvadly a odumřely. Zbytek rostlin dosáhl reprodukčního stádia. Před rozvinutím květů byla květenství izolována, aby se předešlo nechtěnému cizosprašení. Semena z těchto rostlin byla, jako T₁ generace, v laboratoři využita pro další testování.

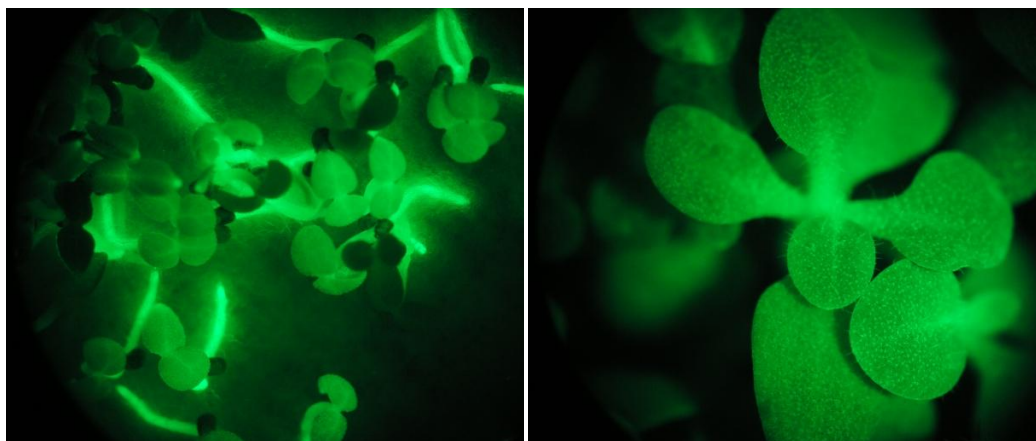
4.2 Vizuální detekce GFP

Z listových segmentů bylo regenerováno 22 hypotetických transformantů. Z těchto rostlin byly odebrány vzorky pletiv, listů, které byly pozorovány pod binokulárním mikroskopem (Leika MZ12) a nástavcem pro vizualizace GFP (viz Obr. 9). Kvůli nízké úrovni fluorescence GFP bylo používáno poměrně velké zvětšení (objektiv 1,6×, zoom 8-10×, okulár 10×). Při pozorování byla pořízena fotodokumentace.



Obr. 9: Fluorescenční signál GFP listů z primárních regenerantů listu tabáku SR1WT Petit Havana, které byly transformovány vektorem nesoucím gen pro fúzní protein SPI2:GFP, byl zjištěn jen velmi ojediněle, pouze v izolovaných oblastech malého rozsahu některých jedinců (vlevo rostlina č. 18, vpravo č. 3).

Pro srovnání fluorescence byla souběžně vyseta semena GFP⁺ tabáku (pozitivní kontroly) a následně byla pozorována jejich fluorescence (viz Obr. 10).



Obr. 10: Fluorescence semenáčků tabáku GFP⁺ pěstovaných na médiu MS s 500 mg.l⁻¹ kanamycinu. Tmavé semenáčky patrné v levé části obrázku jsou netransgenní jedinci, kteří vyštěpili za přítomnosti selektivního antibiotika a nebyli dále životaschopní. Vpravo detail fluoreskujících semenáčků.

5 Diskuze

Oba popisované reportérové geny, *gus* a *gfp*, jsou hojně využívány v mnoha laboratořích a mají široké spektrum použití, jsou využívány jak pro rostliny, tak i pro zvířata.

Bylo zjištěno, že transformací pomocí bakterií *A. tumefaciens*, se může včlenit několik kopií T-DNA do jednoho lokusu genomu rostliny, jako přímé či obrácené repetice. Tyto nadbytečné lokusy bývají spojené s umlčováním exprese. Stabilně exprimované lokusy obvykle obsahují jednoduše uspořádané inzerty T-DNA ohraničené alespoň na jedné straně rostlinnou DNA (Iglesias *et al.*, 1997). Proto bývají obvykle vyhledáváni transformanti s jednou začleněnou kopií T-DNA, u kterých je nejvíce pravděpodobné, že budou transgen stabilně exprimovat po několik generací (Blažíčková, 2010). V další literatuře je udáváno, že při transformacích tabáku, které proběhly pomocí *A. tumefaciens*, existují dva typy insertů T-DNA. Typ „vysoce exprimující“, označovaný jako High-expressing (H), které obsahují pouze jednu kopii v lokusu, což má za následek vysokou expresi *gus*. Druhý typ „málo exprimující“, označovaný jako Low-expressing (L), kdy se do lokusu začlení i další převrácená opakování T-DNA. Tento stav je následovaný nízkou expresí genu *gus* (Hobbs *et al.*, 1993).

5.1 Studované signální geny GUS a GFP

V T₀ generaci rostlin tabáků, která byla získána po transformaci listových disků vektorem SPI-2:GFP, byla mikroskopicky detekována fluorescence GFP jen velmi ojediněle. Byla pozorována pouze v některých listech a zároveň jen v některých částech listu. Mohlo se i jednat o artefakty. Nebo tento stav mohl být způsoben i závislostí úrovní fluorescence na cílovém genotypu a na použitém promotoru (Hraška *et al.*, 2006). V našem případě však pro transformace obou variant (se samotným *gfp* a fúzním SPI-2: GFP genem) byl použit stejný typ tabáku Petit Havana SR1WT a konstrukt s konstitutivním promotorem 35S CaMV. Proto není toto vysvětlení na místě.

V rámci dalšího výzkumu v laboratoři byla semena rostlin T₀ generace vyseta, v následné generaci T₁ již nebyla objevena žádná fluorescence, ale fúzní gen v rostlinách byl detekován pomocí PCR. Navíc bylo tzv. inverzní PCR a následnou sekvencí produktu prokázáno, že dochází k syntéze odpovídající mRNA (messenger RNA) se zachovanou shodou sekvencí. Žádnému ze zainteresovaných pracovišť se však obvyklými metodami (ELISA, Western blot) dlouhou dobu nedařilo prokázat přítomnost genového produktu, proteinu SPI-2 nebo SPI-2:GFP. Interpretace výsledků proto byla velmi nesnadná.

Výzkum účinků samostatného SPI-2 byl prováděn v laboratořích Entomologického ústavu, v.v.i. AV ČR Biologického centra v Českých Budějovicích a v Ústavu experimentální botaniky, v.v.i. Akademie věd České Republiky, Praha. Na něj navazující projekt IBS5007316 byl věnován studiu nových inhibitorů proteáz, které by byly využitelné proti patogenům lidí a zvířat a v ochraně rostlin, byl realizován v letech 2003–2005.

Díky tomuto výzkumu byl objeven proteázový inhibitor GmSPI-2, který se vyskytuje v hedvábí zavíječe voskového, *Galleria mellonella*. Následným zkoumáním bylo zjištěno, že tento inhibitor proteáz serinového typu je velmi aktivní hlavně proti bakteriálnímu enzymu subtilisinu, a houbové proteináze K, navíc zůstává aktivní i při glykolyzaci a prodloužení karboxylového konce (Kludkiewicz *et al.*, 2005).

V důsledku neúspěšnosti transformace pomocí kmene GV 2260, se začaly hledat příčiny, které by tento stav mohly zavinit. Jako nejvíce pravděpodobné je, že tato situace je způsobena tím, že během konstrukce vektoru byla z technických důvodů odstraněna zaváděcí sekvence pro gen *gfp* do endoplazmatického retikula (ER). Úkolem této zaváděcí sekvence je zesilování fluorescenčního signálu, z tohoto důvodu by například špatné oddělení zaváděcí sekvence či porušení správného čtecího rámce mělo prokazatelný vliv na intenzitu signálu, popřípadě přítomnost signálu při vizuální detekci. Oproti intenzitě emitovaného záření u GFP⁺ tabáku, byla intenzita světelného signálu, pokud byl vůbec pozorován, u materiálu transformovaného vektorem nesoucím fúzní gen SPI-2:GFP, minimální. Takovými výjimkami byly pouze tři genotypy (č. 7, č. 12 a č. 18) z celkových 19 analyzovaných rostlin T₀ generace. Naproti tomu v následné T₁ generaci veškerých transformátů nebyl mezi několika tisíci semenáčky pozorovanými pod stereomikroskopem s GFP nástavcem nalezen ani jediný jedinec, který by

se tímto způsobem jevil jako pozitivní. V úvahu proto přichází několik vysvětlení. Jednou z možností je, že výsledné množství proteinu je tak nízké, že ani tak citlivými metodami jako jsou ELISA, Western blot a fluorescence, není detekovatelné. V úvahu také přichází možnost chybné konformace fúzního proteinu, v jejímž důsledku by mohla být snížena intenzita emitovaného signálu. Možné příčiny nezdaru jsou předmětem dalšího výzkumu. V naší laboratoři v současné době dochází k vývoji nového fúzního konstruktů. Bylo zjištěno, že se tento nový konstrukt se exprimuje v bakteriích *E. coli*. V rámci následujícího testování konstruktů bylo shledáno, že se vytváří odpovídající mRNA. Příslušná cDNA (copy DNA) byla obousměrně osekvenována a byla potvrzena shoda se sekvencí navrženého fúzního genu.

Při transformaci kmenem EHA 105, který nese konstrukt pWell 09, se nepodařilo získat žádnou transformovanou rostlinu. Po transformaci bakteriemi docházelo k neustálému přerůstání bakterií, které znemožnily potřebnou regeneraci rostlinných explantátů, a následně došlo k úplnému zahubení transformovaných rostlinných explantátů. Tento stav by mohl být způsobený vyselektovanou rezistencí vektorových bakterií. Rezistence mohla vzniknout například dlouhodobě nesprávným skladováním vektoru. Na základě tohoto zjištění jsme požádali spolupracující pracoviště Mendelovy univerzity v Brně o poskytnutí nového vektoru. V rámci řešení problému byl například i důkladně vyčištěn autokláv, ve kterém se sterilizovaly skleničky pro pěstování rostlin *in vitro* a změněn postup jejich klávování, z obavy, že by se mohly uvolňovat těžké kovy, které by se ukládaly v rostlinách, a které by měli vliv na úspěšnost transformace (Ondřej & Drobník, 2002). Opakované pokusy s novým vektorem však problém nevyřešily. Příčinu je proto třeba hledat jinde. V úvahu přichází i možnost záměny bakteriálních klonů na pracovišti poskytovatele.

Fluorescence GFP je ovlivněna mnoha faktory jako je například typ rostliny, stáří a typ pletiva, genotyp, či promotory reportérových genů.

Vyšší úroveň fluorescence byla zjištěna na místech, kde došlo k řezu u vodivých pletiv. Tento jev by mohl být zapříčiněn tím, že vodivá pletiva jsou náchylnější k infekci agrobaktériem a vyšší denzitou těchto buněk (Maximová *et al.*, 1998).

Fluorescence bývá snadněji detekována v nově se objevujících mladých výhonech, ale její intenzita klesá a je hůře pozorovatelná ve starších pletivech

a orgánech. Ke ztrátě fluorescence nebo k jejímu postupnému uhasínání dochází ve starých pletivech, konkrétně v listech (Kamaté *et al.*, 2000). Ve většině případů již fluorescence klesne až na hodnotu, kdy je prakticky neviditelná, nebo s občasným výskytem malých fluoreskujících oblastí v některých typech buněk (Eady *et al.*, 2000) nebo orgánů (Kim *et al.*, 2004). Naopak vysoký stupeň fluorescence byl pozorován u zralých květenství a reprodukčních orgánech (Zhou *et al.*, 2005), klíčících rostlin a sazenicích (Kamaté *et al.*, 2000).

Intenzita fluorescence je závislá na tom, z jaké části rostliny nebo pozice na rostlině pochází studovaný vzorek, konkrétně list (Halfhill *et al.*, 2003b). Ke studiu exprese reportérového genu GUS byla provedena série pokusů, kde vyšlo najevo, že při použití diskové metody při transformaci agrobaktériem záleží na tom jaký list z rostliny je použitý. Zároveň je vyšší úspěšnost transformace u mladých listů, a to až pětinasobná v porovnání mezi 1. a 19. listem rostliny. Listy, které se vyznačují rychlým růstem, obvykle mají i velmi rychlou proteosyntézu, a zároveň i větší expresi GUS (Preťová *et al.*, 2001). V mé práci se pro transformace používá první až třetí rozvinutý list, které jsou zelené bez známek jakéhokoli žloutnutí nebo jiných viditelných poškození.

. Jedno z vysvětlení, proč klesá fluorescence ve starších listech, souvisí se vzrůstajícím obsahem chlorofylu, který ji negativně ovlivňuje (Ponappa *et al.*, 1999).

V rámci výzkumů bylo zjištěno, že fluorescence kolísá i v rámci jednoho listu (Hraška *et al.*, 2008a). Intenzita fluorescence je závislá i na tom, jakou stranu listu měříme, zda svrchní či spodní, a může se velmi významně lišit (Hraška *et al.*, 2008a). Velmi výrazný je rozdíl mezi fluorescencí, kterou je možné pozorovat na bázi rostliny a starších listech, v porovnání s fluorescencí vydávanou horní částí rostliny a mladými listy. Tento jev byl popsán u několika druhů rostlin jako je brukev řepka (*Brassica napus*) (Halfhill *et al.*, 2003a), rostliny tabáku (Preťová *et al.*, 2001) na tolice (*Medicago*) a rýže (Zhou *et al.*, 2005). Naopak u rostliny huseníčku (*Arabidopsis*) (Zhou *et al.*, 2005) a tabáku SR1WT odrůdy Petit Havana (Hraška *et al.*, 2008a), bylo zjištěno, že kolísání intenzity fluorescence, v rámci její možné detekce, se liší druh od druhu, genotyp od genotypu. Hypotéza rozdílných úrovní exprese reportérových genů v pletivech různého stáří, nebyla potvrzena dalším testováním u tabáku, kdy bylo odhaleno přibližně stejné množství obsaženého proteinu v různých částech rostliny (Harper & Stewart, 2000).

Dalším regulátorem projevu reportérových genů je jejich promotor. Nejčastěji jsou při transformaci agrobaktériem používány promotory CaMV 35S a Act 1 (Benfey *et al.*, 1990). V podrobných výzkumech bylo zjištěno, že jejich exprese různá v různých druzích pletiv (Sunilkumar *et al.*, 2002). O promotoru CaMV 35S je známo, že má vyšší aktivitu ve vodivých pletivech, a proto je v těchto pletivech pozorována vyšší úroveň fluorescence. Tím je vysvětlen pokles a ztráta fluorescence GFP ve stárnoucích a odumírajících pletivech jako jsou plody či semena, kde dochází k úbytku obsahu vody (Hraška *et al.*, 2008b).

5.1.1 Použití reportérových genů

V současné době se reportérové geny využívají v oborech výzkumu, jako jsou molekulární biologie a genetika, jejich další využití by mohlo být v ekologickém monitoringu bezpečnosti geneticky modifikovaných rostlin.

V souvislosti se vzrůstající tendencí využívání GFP v laboratořích, se mnozí vědci přikláněli k názoru, že zeleně fluoreskující protein je toxický pro rostliny. Tato teorie byla podpořena neoficiálním tvrzením, že transgenní linie buněk, které měly nejjasnější emisi světelného signálu, bylo obtížné převést do rostlin. Další výzkumy však dokázaly, že GFP není toxický pro rostliny, ale při jeho excitaci vznikají volné radikály. Z tohoto důvodu se následně vznikající mutanty vyznačovaly tím, že byly cílené do jiných organel než do jádra, například do endoplasmatického retikula (ER). Změna cílového místa GFP úplně oddělila GFP od nukleosomu rostliny a zároveň došlo ke zvýšení exprese genu *gfp* (Stewart, 2001). V rámci výzkumu vlivu možného toxického vlivu GFP byl proveden pokus s potkany. Bylo zjištěno, že ani samotné GFP, ani krmení transgenními rostlinami obsahující gen *gfp*, nemá nepříznivý dopad na jejich životaschopnost a reprodukci. Tím bylo prokázáno, že GFP není pro obratlovce toxické (Richards *et al.*, 2003).

Využití těchto genů by se dalo rozdělit podle cílového objektu studia na několik úrovní - vnitrobuněčné, buněčné, pletiva rostlin, popřípadě celé rostliny, a transformace.

V rámci vnitrobuněčné aplikace bylo GFP jako první použito ke sledování lokalizace proteinu v buňce, tzv. „protein tagging“. Tím bylo umožněno přímo nahlédnout do procesů, které probíhají v buňce, pomocí fluorescenčního mikroskopu. V současné době není problém standardními klonovacími postupy vytvořit fúzi mezi

cílovým genem, který klonujeme, a genem pro *gfp*. Tato fúze je následně metodami genového inženýrství vnášena do vybraného organismu, kde se jeho exprese projevuje jako stálá či transientní (dočasná). Fúzní produkt se nejčastěji pozoruje běžným fluorescenčním mikroskopem. Vzhledem k tomu, že není nutná jakákoliv fixace či permeabilizace buněk, má tato metoda detekce výhodu oproti jiným technikám (Misteli & Spector, 1997).

GFP umožňuje sledování dynamických procesů v živé buňce, pozorování organel, mitotického aparátu, cytoskeletálních elementů, pohyb bílkovin v reálném čase (Misteli & Spector, 1997).

Navíc je možné využít GFP pro pozorování změn tvarů buněčných organel a sledovat jejich pohyb během rozličných fyziologických procesů (Shiina *et al.*, 2000).

Přestože nejčastější je aplikace na úrovni buňky, zdá se, že mnohem zajímavější bude sledování GFP na úrovni pletiv a celé rostliny. Jediným úskalím se zdá být to, že se musí použít modifikované GFP, kvůli tomu, že je potřeba vysoká úroveň fluorescence. Tímto způsobem je možné sledovat např. patogenní nákazy u rostlin. Například u virů je tato metoda založena na nahrazení části plášťového proteinu za GFP a následném monitorování infekce rostliny, pohybů viru, a díky fúzi protein-pohybový protein lze zjistit i to, jak se virus rozšiřuje do okolí a mezi buňkami hostitele (Leffel *et al.*, 1997).

Mezi další využití signálních genů patří studium promotorů, které mají vliv na expresi genů. Výhoda použití reportérových genů je taková, že okamžitě poukazují na hodnotu exprese v dané buňce, či tkáni. V tomto případě opět není nutná fixace buněk a to umožňuje opakovat pozorování a opakování měření hodnot opakovaně i po změnění podmínek (Misteli & Spector, 1997). Konstitutivní promotory jako je například CaMV 35S nebo Act1 jsou nejpoužívanější pro transformace (Batraw & Hall, 1990). V rámci dalších výzkumů bylo zjištěno v kterých částech rostliny, má nejvyšší expresi který promotor, například u listů rostlin mají nejvyšší expresi promotory D35S, 35S a UBQ3. Při kvantifikování exprese GUS bylo zjištěno, že u rostlin má v kořenových systémech nejvyšší expresi promotor UBQ3 (Wally *et al.*, 2007). U promotoru CaMV 35S bylo prokázáno, že je aktivní hlavně ve vodivých pletivech, proto by v těchto oblastech měla být očekávána vyšší exprese reportérových genů (Hraška *et al.*, 2008b). V rámci dalších výzkumů bylo prokázáno, že pro studium dočasné exprese zajišťovanou

specifickými promotory tapeta jako jsou například A9 u *Arabidopsis thaliana* či TA29 u *Nicotiana tabacum*, je vhodnější reportérový gen *gfp* v porovnání s genem *gus* (Kavita & Burma, 2008).

Jako další možné využití se jeví to, že by v některých případech bylo možné částečně nebo zcela nahradit selekci vyvolávanou antibiotiky, herbicidy či dalšími látkami, detekcí GFP a následným výběrem transformantů. Zároveň by mělo velký vliv, pokud by organogeneze nebo při regeneraci explantátů po transformaci, které nejsou úspěšné při použití antibiotik a herbicidů. Tato optická selekce byla zatím použita u cukrové třtiny, která byla transformována bakteriemi *A. tumefaciens* (Elliott *et al.*, 1998).

6 Závěr

Byla provedena transformace listových segmentů tabáku, *Nicotina tabacum*, cv. Petit Havana SR1WT v podmínkách *in vitro*. K této transformaci byly použity dva rozdílné kmeny bakterií *A. tumefaciens*, kmen GV 2260 a kmen EHA 105.

Kmen GV 2260 nesoucí konstrukt SPI2-GFP, u pravé hraniční sekvence (RB) se nachází promotor genu pro nopalinsyntázu (NOS), který řídí projev genu pro *nptII*, tedy neomycinofosfotransferázu II. Exprese fúze genů SPI-2 a *gfp* je řízena promotorem CaMV 35S.

Z celkového počtu 22 regenerovaných hypotetických transformantů bylo ze 3 pokusů s kmenem GV2260 získáno celkem 19 prokazatelně transformovaných rostlin (PCR), u kterých byla studována fluorescence GFP v jejich pletivech pomocí binokulárního mikroskopu se speciálním nástavcem. Pouze u genotypů č. 3, 12 a 18, byla výjimečně pozorována minimální fluorescence. Tato generace T₀ byla pro potřeby laboratoře převedena do skleníku a dovedena až do reprodukčního stádia. V generaci T₁ již nebyla zjištěna žádná fluorescence.

Tento stav byl nejspíše způsoben problémy s vektorovým konstruktem, který, jak se ukázalo i v mé práci, nebyl plně funkční. Dané zjištění společně s dalšími výsledky školící laboratoře poukazuje na možnou nefunkčnost fúzního konstruktů. Možné příčiny jsou předmětem dalšího studia.

Ve druhé sérii pokusů s kmenem EHA 105 nesoucím konstrukt pWell 09, obsahující geny *nptII*, *gus* a SPI-2, se nepodařilo získat žádnou transgenní rostlinu vzhledem k tomu, že bakterie neustále přerůstaly explantáty. Protože opakované pokusy s nově obdrženým kmenem poskytovaly tytéž výsledky, nabízí se jako možné vysvětlení záměna kmene nebo chyba ve vedení kultury na partnerském pracovišti.

7 Seznam použité literatury

- Akiyoshi, D.E.; Regier, D. A.; Jenl, G.; Gordon, M. P. (1985):** Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucleic Acids Res.*, 13, 2773–2778.
- Anonym (2011):** The fluophore center of GFP. [Online] 3 2011.
<http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/gfp.htm>.
- Battraw, M. J.; Hall, T. C. (1990):** Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase. *Plant Mol Biol.*, 15, 527–538.
- Beranová, M.; Rakouský, S.; Vávrová, Z.; Skalický T. (2008):** Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 94, 253–259.
- Benfey, P. N.; Ren, L.; Chua, N-H. (1990):** Tissue specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.*, 9, 1677–1684.
- Blažičková, J. (2010):** Optimalizace systému pro studium proteinových komplexů. Diplomová práce, PřF MU. Brno, 52 s.
- Cormack, B. P.; Valdivia, R. H; Falkow S. (1998):** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.*, 173, 33–38.
- Eady, C. C.; Weld, R. J.; Lister, C. E.(2000):** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.*, 19, 376–381.
- Elliott, A. R.; Campbell, J. A.; Brettell, R. I. S; Grof Ch. P. L. (1998):** *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Aust J Plant Physiol.*, 25, 739–743.
- Falciatore, A.; Formiggini, F.; Bowler Ch. (2002):** Reporter genes *in vivo* imaging. In: Bowler Ch.; Gilmartin P.M. (eds.): *Molecular plant biology*. New York : Oxford University Press.
- Gartland, K. M. A.; Phillips, J. P.; Vitha, S.; Beneš K. (1995):** Fluorometric GUS analysis for transformed plant material. *Methods Mol Biol.*, 44, 195–199.

- Gelvin, S. B. (2003):** *Agrobacterium* - mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 67, 16–37.
- Griffiths, A. J. F.; Miller, J. H.; Suzuki D. T.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M. (2000):** *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th edition. W. H. Freeman, New York.
- Guerineau, F. (1995):** Tools for expressing foreign genes in plants. *Methods Mol Biol.*, 49, 1–32.
- Halfhill, M. D.; Millwood, R. J.; Rufty, T. W.; Weissinger, A. K.; Stewart C. N. Jr. (2003b):** Spatial and temporal patterns of green fluorescent protein (GFP) in transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. *Plant Cell Rep.*, 22, 338–343.
- Halfhill, M. D.; Millwood, R. J.; Stewart C. N. Jr. (2003a):** Green fluorescent protein quantification in whole plants. *Methods Mol. Biol.*, 286, 215–226.
- Harper, B. K.; Stewart, C. N. Jr. (2000):** Patterns of green fluorescent protein expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2000, 18, 141a–141i.
- Haseloff, J.; Siemering, K. R.; Prasher D. C.; Hodge, S. (1997):** Removal of a cryptic intron and subcellular localisation of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 2122–2127
- Hobbs, S. L. A.; Warkentin, T. D.; DeLong, C. M. O. (1993):** Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.*, 21, 17–26.
- Horsch, R. B.; Fry, J. E.; Hoffmann, N. L.; Eicholtz, D.; Rogers, S. G.; Fraley R. T. (1985):** A simple and general method for transforming genes into plants. *Science.*, 227, 1229–1231.
- Hraška, M. (2007):** nepublikováno.
- Hraška, M. (2003):** Tvorba a detekce GFP transformantů rostlin. Diplomová práce JU ZF, České Budějovice, 67 s.
- Hraška, M.; Heřmanová, V.; Rakouský, S.; Čurn, V. (2008a):** Sample topography and position within plant body influence the detection of the intensity of green fluorescent protein fluorescence in the leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.*, 27, 67–77.
- Hraška, M.; Rakouský S.; Čurn, V. (2006):** Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 86, 303–318.

- Hraška, M.; Rakouský, S.; Čurn, V. (2008b):** Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 94, 239–251.
- Iglesias, V. A.; Moscone, E. A.; Papp, I.; Neuhuberya, F.; Michalowski, S. (1997):** Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably. *Plant Cell.*, 9, 1251–1264.
- Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; Hirsh D. (1986):** β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene - fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 8447–8451.
- Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W. (1987):** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 3901-3907.
- Kamaté, K.; Rodriguez-Llorente, I. D.; Scholte, M.; Durand, P.; Ratet, P.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A.; Trinh, T. H. (2000):** Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.*, 19, 647–653.
- Kavita, P.; Burma, P. K. (2008):** A comparative analysis of green fluorescent protein and beta-glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. *J. Biosci.*, 33, 337–343.
- Kim, C. K.; Chung, J. D.; Park, S. H.; Burrell, A. M.; Kamo, K. K.; Byrne, D. H. (2004):** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using green fluorescent protein (GFP) gene. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 78, 107–111.
- Kludkiewicz, B.; Kodrík, D.; Grzelak, K.; Nirmala, X.; Sehnal F. (2005):** Structurally unique recombinant Kazal-type proteinase inhibitor retains activity when terminally extended and glycosylated. *Protein Expr. Purif.*, 43, 94–102.
- Kůta, V. (2007):** Možnosti využití signálního genu pro zeleně fluoreskující protein k identifikaci a selekci transformantů lnu. Bakalářská práce PpF JU. České Budějovice, 54 s.
- Langley, R. A; Kado, C. I. (1972):** Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoguanidine and relationship of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mutat. Res.*, 14, 277–286.
- Leffel, S. M.; Mabon, S. A.; Stewart, C. N. Jr. (1997):** Applications of green fluorescent protein in plants. *BioTechniques.*, 23, 912–918.

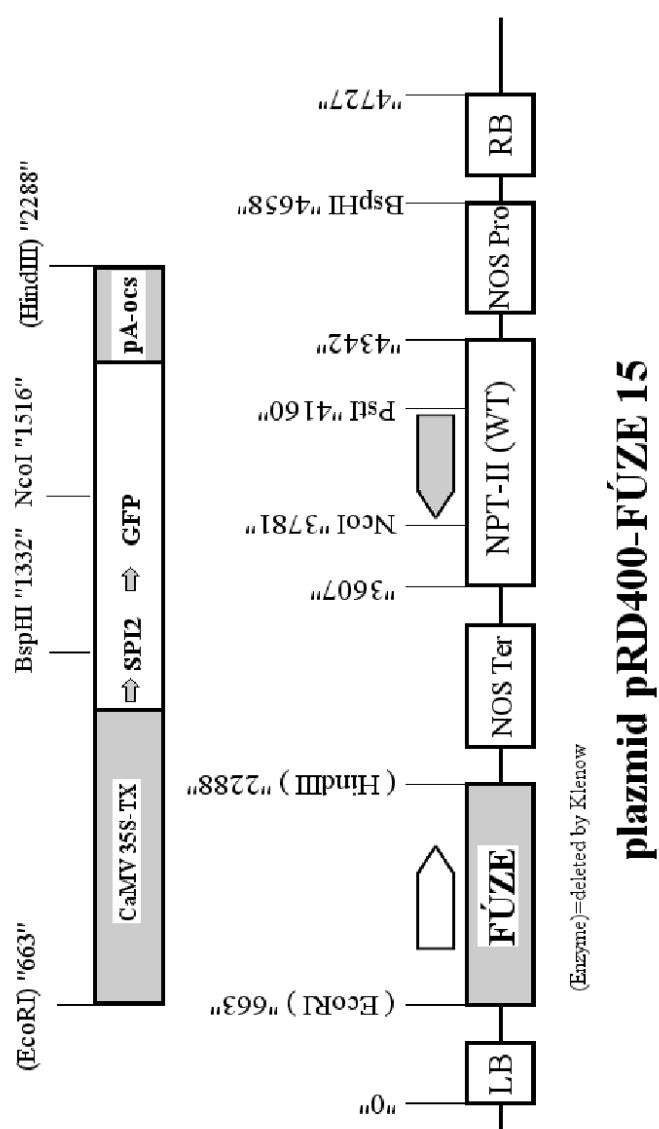
- Lewin, B. (1994):** Genes V. Oxford university press, New York.
- Maliga, P.; Sz-Breznovits, A.; Márton, L. (1973):** Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature.*, 244, 29–30.
- Maximová, S. N.; Dandekar, A. M.; Gultinan, M. J. (1998):** Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are ratelimiting. *Plant Mol. Biol.*, 37, 549–559.
- Misteli, T.; Spector, D. L. (1997):** Applications of green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnol.*, 10, 961–963.
- Mlynárová, L'; Nap J. P. (1997):** Gene transfer and expression in plants. VEDA, Bratislava.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15, 473–497.
- Nakamura, S.; Shoji, M.; Tanaka, Y.; Ohnishi M. (2010):** Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1315–1319.
- Navrátil, O. (2008):** nepublikováno.
- Nirmala, X.; Kodrík, D.; Žurovec, M.; Sehnal, F. (2001):** Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 268, 2064–2073.
- Ogras, T. T.; Gözükmirmizi, N. (1999):** Expression and inheritance of GUS gene in transgenic tobacco plants. *Tr. J. Bot.*, 23, 297–302.
- Ondřej, M.; Drobník J. (2002):** Transgenozé rostlin: Academia, Praha.
- Ondřej, M.; Drobník, J.; Gartland, K. M. A.; Gartland, J. S. (1999):** Genové inženýrství rostlin. VŠCHT, Praha.
- Ondřej, M. (1992):** Genové inženýrství kulturních rostlin: Academia, Praha.
- Ponappa, T.; Brzozowski, A. E.; Finer, J. J. (1999):** Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Rep.*, 19, 6–12.
- Prasher, D. C. (1995):** Using GFP to see the light. *Technical Focus.*, 11, 320–323.

- Pret'ová, A.; Obert, B.; Wetzstein, H.Y. (2001):** Leaf developmental stage and tissue location affect the detection of β -glucuronidase in transgenic tobacco plants. *Biotechnol. Lett.*, 23, 555–558.
- Příbylová, M. (2008):** Porovnání účinnosti přímé a nepřímé metody genetické transformace u bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Diplomová práce, ZF JU, 68 s.
- Rakouský, S. (2011):** Ústní sdělení.
- Richards, H. A.; Han, C. T.; Hopkins, R. G.; Failla, M. L.; Ward, W. W.; Stewart, C. N. Jr. (2003):** Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J. Nutr.*, 133, 1909–1912.
- Shiina, T.; Hayashi, K.; Ishii, N.; Morikawa, K.; Toyoshima, Y. (2000):** Chloroplast tubules visualized in transplastomic plants expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol.*, 41, 367–371.
- Skalický, T. (2009):** Vliv vybraných exogenních a endogenních faktorů na účinnost transformačního procesu. Bakalářská práce, PřF JČU, 72 s.
- Stewart, C. N. Jr. (2001):** The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 20, 376–382.
- Sunilkumar, G.; Mohr, L.; Lopata-Finch, E.; Emani, C.; Kathore, K. S. (2002):** Developmental and tissue-specific expression of a CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol. Biol.*, 50, 463–474.
- Tsien, R.; Prasher D. (1998):** *Molecular Biology and Mutation of Green Fluorescent Protein. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols.* Wiley-Liss Inc., Chichester, pp. 97-118.
- Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L.; Rocha-Sosa, M. (1990):** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 220, 245–250.
- Vitha, S. (1995):** Některé problémy studia exprese reportérového genu pro β -glukuronidázu (GUS) v transgenních rostlinách. Dizertační práce, BF JU, České Budějovice, 23 s.
- Vodrážka, Z. (2007):** *Biochemie.* Academia, Praha.

- Wally, O.; Jayaraj, J.; Punja Z. K. (2007):** Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep.*, 27, 279–287.
- Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. (1992):** Recombinant DNA. W.H. Freeman, New York.
- Yang, F.; Moss, L. G.; Phillips, N. G. Jr. (1996):** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1246–1251.
- Zambryski, P.; Joos, H.; Geetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu M.; Schell, J. (1983):** Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plants cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.*, 2, 2143-2150.
- Zhou, X.; Carranco, R.; Vitha, S.; Hall, T. C. (2005):** The dark side of green fluorescent protein. *New Phytol.*, 168, 313–322.

8 Přílohy

8.1 Mapa fúzního genu SPI2:GFP

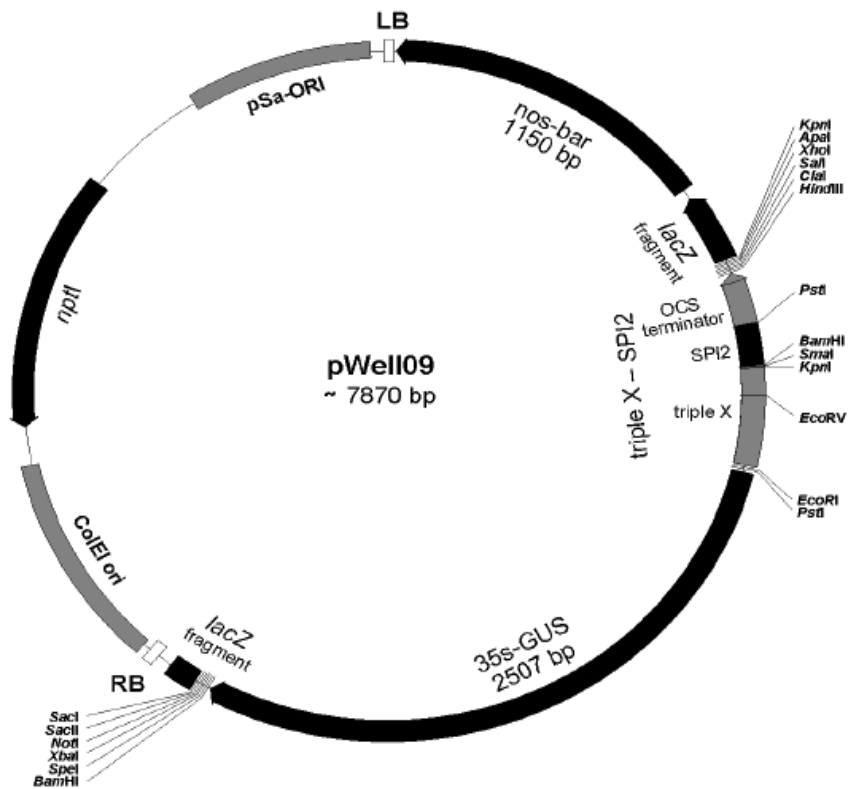


Obr. 11: Mapa fúzního genu SPI-2:GFP (dle Skalický, 2009).

8.2 Aminokyselinová sekvence fúzního genu SPI-2:GFP

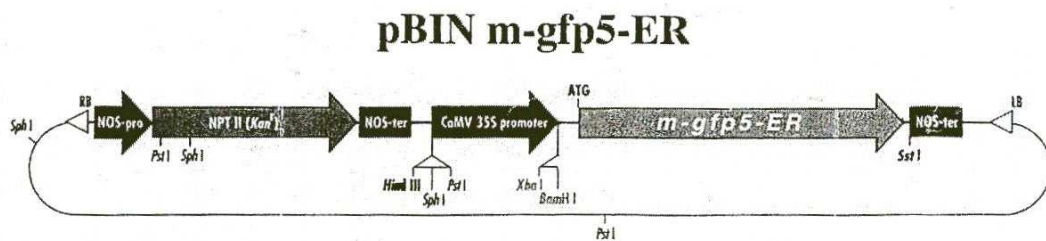
| | | | |
|------------|------------|-------------|------------|
| ATGGTTTGCA | CAGCTGAGTG | GGACCCTGTT | TGTGGTAAAG |
| ATGGAAAGAC | TTACAGCAAT | CTTTGCTGGT | TGAACGAGGC |
| TGGTGTTGGA | TTGGATCATG | AAGGTGAATG | TCAATTCAGT |
| AAAGGAGAAG | AACTTTTCAC | TGGAGTTGTC | CCAATTCTTG |
| TTGAATTAGA | TGGTGATGTT | AATGGGCACA | AATTTTCTGT |
| CAGTGGAGAG | GGTGAAGGTG | ATGCAACATA | CGGAAAACTT |
| ACCCTTAAAT | TTATTTGCAC | TACTGGAAAA | CTACCTGTTC |
| CATGGCCAAC | ACTTGTCACT | ACTTTCTCTT | ATGGTGTTCA |
| ATGCTTTTCA | AGATACCCAG | ATCATATGAA | GCGGCACGAC |
| TTCTTCAAGA | GCGCCATGCC | TGAGGGATAC | GTGCAGGAGA |
| GGACCATCTT | CTTCAAGGAC | GACGGGAACT | ACAAGACACG |
| TGCTGAAGTC | AAGTTTGAGG | GAGACACCCT | CGTCAACAGG |
| ATCGAGCTTA | AGGGAATCGA | TTTCAAGGAG | GACGGAAACA |
| TCCTCGGCCA | CAAGTTGGAA | TACAAC TACA | ACTCCCACAA |
| CGTATACATC | ATGGCCGACA | AGCAAAAGAA | CGGCATCAAA |
| GCCAACTTCA | AGACCCGCCA | CAACATCGAA | GACGGCGGCG |
| TGCAACTCGC | TGATCATTAT | CAACAAAATA | CTCCAATTGG |
| CGATGGCCCT | GTCCTTTTAC | CAGACAACCA | TTACCTGTCC |
| ACACAATCTG | CCCTTTCGAA | AGATCCCAAC | |

8.3 Mapa konstruktů pWell09:gmSPI2



Obr. 12: Mapa kmenu pWell 09.

8.4 Schéma plazmidového vektoru pBIN m-gfp5-ER



Obr. 13: Mapa vektorového plazmidu pBIN m-gfp5-ER (Haseloff *et al.*, 1997)

9 Seznam použitých zkratek

9.1 Slovní zkratky

| | |
|-------|-------------------------------------------------------------|
| GFP | zeleně fluoreskující protein (Green fluorescent protein) |
| GUS | gen pro β -glukuronidázu |
| LK | médium dle Langley, Kado (1972) |
| MS | médium dle Murashige, Skoog (1962) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| T-DNA | transferová DNA |
| mRNA | messenger RNA |
| cDNA | copy DNA |
| BFP | modře fluoreskující protein (Blue fluorescent protein) |
| CFP | azurově fluoreskující protein (Cyan fluorescent protein) |
| YFP | žlutě fluoreskující protein (Yellow fluorescent protein) |
| kb | kilobáze |

9.2 Zkratky v textu použitých chemických látek

| | |
|---------------------------------|--------------------------------------------|
| BAP | 6 - benzylaminopurin |
| NAA | kyselina 1-naftyloctová |
| A | adenin |
| T | thymin |
| 4-MU | 4-methylumbelliferon |
| 4-MUG | 4-methylumbelliferyl β -D-glukuronid |
| Na ₂ CO ₃ | uhličitan sodný |

9.3 Mezinárodní zkratky aminokyselin

| Aminokyselina | Jednopísmenná zkratka | Třípísmenná zkratka |
|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Alanin | A | Ala |
| Arginin | R | Arg |
| Asparagin | N | Asn |
| Kyselina asparagová | D | Asp |
| Cystein | C | Cys |
| Glutamin | Q | Gln |
| Kyselina glutamová | E | Glu |
| Glycin | G | Gly |
| Histidin | H | His |
| Isoleucin | I | Ile |
| Leucin | L | Leu |
| Lysin | K | Lys |
| Methionin | M | Met |
| Fenylalanin | F | Phe |
| Prolin | P | Pro |
| Serin | S | Ser |
| Treonin | T | Thr |
| Tryptofan | W | Trp |
| Tyrosin | Y | Tyr |
| Valin | V | Val |

(převzato z Vodrážka, 2007)