

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava knock-outovaných linií *Arabidopsis thaliana* pro genovou rodinu CKX a jejich fenotypové změny během senescence**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Kateřina Závodná</b>
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	26. dubna 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 16. dubna 2010

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce Doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. (Katedra biochemie, Oddělení molekulární biologie, Univerzita Palackého v Olomouci) za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Mé upřímné poděkování patří Mgr. Márii Šmehilové (Katedra biochemie, Oddělení molekulární biologie, Univerzita Palackého v Olomouci) za velkou pomoc, předané zkušenosti v laboratoři a především za trpělivost a obětovaný čas. Ráda bych také poděkovala všem členům Katedry biochemie, Oddělení molekulární biologie, Univerzity Palackého v Olomouci za dobré podmínky pro realizaci mé diplomové práce. Poděkování patří Dr. Isabelu Bartrina y Manns (Frei University, Berlin) za poskytnutí semen knock-outovaných linií *Arabidopsis thaliana*. V neposlední řadě velké poděkování náleží mé rodině za obrovskou podporu po celou dobu mého studia.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Závodná
Název práce	Příprava knock-outovaných linií <i>Arabidopsis thaliana</i> pro genovou rodinu <i>CKX</i> a jejich fenotypové změny během senescence
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Teoretická část diplomové práce je věnovaná metabolismu rostlinných hormonů cytokininů a jejich signální dráze. Dále popisuje proces senescence. Velká část práce je věnovaná metodám transgenoze rostlin. Zabývá se různými způsoby transformace, od použití <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, přes přímé metody jako je biolistická metoda, až po dnes velice významnou metodu transformace pomocí „zinc-finger“ nukleas.</p> <p>Praktická část popisuje metodu křížení rostlin za účelem přípravy double knock-outované homozygotní linie <i>Arabidopsis thaliana</i> pro geny <i>AtCKX2</i> a <i>AtCKX5</i>. U těchto dvou genů byla zjištěna zvýšená exprese během listové senescence. Z přibližně 200 zkřížených linií rostlin byly úspěšně selektovány 4 homozygotní double knock-outované linie, které byly potvrzeny metodou PCR, Northern blot a PCR v reálné čase.</p>
Klíčová slova	<i>AtCKX</i> , senescence, transgenoze rostlin, „crossing“ křížení rostlin, double knock-outovaná linie <i>Arabidopsis</i>
Počet stran	75
Počet příloh	0
Jazyk	český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Bc. Kateřina Závodná
Title	Multiple <i>CKX</i> knockout lines of <i>Arabidopsis thaliana</i> and their response to senescence
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstrakt	<p>In the theoretic part of master thesis, metabolism of plant hormones cytokinins and their signaling pathway is described. As well, mechanism and consequences of leaf senescence are discussed. The final part deal with different techniques for plant transformation, including <i>Agrobacterium</i>-mediated gene transfer, direct gene transfer method, where particle bombardement is the most exploited, and current approaches using zinc-finger nucleases.</p> <p>In the experimental part of master thesis, the crossing of plants and preparation of homozygote double knockout line of <i>Arabidopsis thaliana</i> for <i>AtCKX2</i> and <i>AtCKX5</i> genes is described. These two genes show extremely increased expression pattern during senescence. Four double knockout lines were successfully established and selected from approximately 200 crossing events and confirmed using methods of basic PCR, real-time PCR and Northern blot.</p>
Keywords	<i>AtCKX</i> , senescence, plant transgenesis, crossing of plants, double knockout line of <i>Arabidopsis</i>
Number of pages	75
Number of appendices	0
Language	Czech

## **OBSAH**

<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>-8-</b>
<b>I. ČÁST TEORETICKÁ .....</b>	<b>-9-</b>
1. ARABIDOPSIS THALIANA .....	-10-
2. CYTOKININY .....	-10-
3. METABOLISMUS CYTOKININŮ .....	-11-
3.1. BIOSYNTÉZA CYTOKININŮ .....	-11-
3.2. DEGRADACE CYTOKININŮ–CYTOKININ OXIDASA/DEHYDROGENASA ..	-12-
3.2.1. CKX u Arabidopsis .....	-14-
3.2.2. Expres CKX v průběhu listové senescence .....	-14-
4. SIGNÁLNÍ DRÁHA CYTOKININŮ .....	-15-
5. SENESCENCE .....	-15-
6. METODY TRANSGENOZE ROSTLIN .....	-16-
6.1.1. Agrobacterium tumefaciens .....	-16-
6.1.1.1. Praktická aplikace transformace rostlin za použití Agrobacterium .....	-18-
6.1.2. Namáčení květů („floral dip“) .....	-19-
6.2. PŘÍMÉ METODY GENOVÉ TRANSFORMACE .....	-19-
6.2.1. Biolistická metoda („partical bombardement“) .....	-20-
6.2.2. Transformace zprostředkované vysokým osmotickým tlakem .....	-21-
6.2.3. Elektroporace .....	-21-
6.2.4. Vlákna křemíku křemíku-WHISKERS™ .....	-21-
6.2.5. Umlčování genů .....	-22-
6.2.5.1. Transkripční umlčování genů (TGS „transcriptional gene silencing“) .....	-22-
6.2.5.2. Post-transkripční umlčování genů (PTGS „post-transcriptional gene silencing“) .....	-22-
6.2.5.2.1. miRNA .....	-22-
6.2.5.2.2. siRNA .....	-23-
6.2.6. Molekulární sestřih genomu pomocí „zinc finger“ nukleas (ZFNs) .....	-23-
6.2.6.1. Homologní rekombinace .....	-23-
6.2.6.2. Nehomologní spojení konců (NHEJ „non-homology end joining“) .....	-24-
6.2.6.3. „Zinc finger“ proteiny (ZFPs) .....	-25-

6.2.6.4. Nukleasy zinkového prstu (ZFN)	-25-
6.2.6.5. Mechanismus zlomů dvouvláknové DNA pomocí ZFN	-25-
6.2.6.6. Bakteriální hybridní systém pro selektování požadovaných ZFP	-26-
6.2.6.7. Aplikace transformace rostlin pomocí ZFN	-27-
<b>II. ČÁST EXPERIMENTÁLNÍ</b>	<b>-28-</b>
<b>7. MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ</b>	<b>-29-</b>
7.1. CHEMIKÁLIE	-29-
7.2. PŘÍSTROJE	-30-
7.3. ROZTOKY	-31-
<b>8. METODY</b>	<b>-33-</b>
8.1.1. Rostlinný materiál	-33-
8.1.2. Podmínky pěstování	-33-
8.1.3. Sterilizace semen	-33-
8.1.4. Metodika křížení rostlin-„crossing“	-33-
8.1.4.1. Příprava rostlin AtCKX-KO5 pro opylování	-34-
8.1.4.2. Opylování pestíků rostlin AtCKX-KO5 pylem z rostliny AtCKX-KO2	-34-
8.1.5. 3. Mendlův zákon	-35-
8.2. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU PCR	-36-
8.2.1. Izolace genomové DNA (gDNA)	-36-
8.2.2. Umístění insercí u jednotlivých homozygotních linií	-36-
8.2.3. Navrhování primerů	-37-
8.2.4. PCR	-37-
8.2.5. Agarosová elektroforéza	-38-
8.3. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU NORTHERN BLOT	-38-
8.3.1. Příprava značené próby	-38-
8.3.2. Příprava in vitro transkriptu pro AtCKX2	-40-
8.3.3. Izolace celkové RNA	-40-
8.3.4. Izolace mRNA	-40-
8.3.5. Metody stanovení koncentrace vzorků RNA	-41-
8.3.5.1. Stanovení koncentrace RNA spektrofotometricky	-41-
8.3.5.2. Stanovení koncentrace RNA fluorimetricky	-42-
8.3.6. Příprava vzorku	-42-
8.3.7. Agarosová formaldehydová elektroforéza vzorků RNA	-42-
8.3.8. Northern blot	-42-

8.3.8.1. Fixace RNA na membránu pomocí „crosslinkeru“ .....	-44-
8.3.9. Hybridizace .....	-44-
8.3.9.1. Prehybridizace .....	-44-
8.3.9.2. Hybridizace .....	-44-
8.3.10. Detekce .....	-44-
8.4. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU „REAL-TIME“ PCR .....	-46-
8.4.1. Přepis mRNA do cDNA .....	-46-
8.4.2. „Real-Time“ PCR .....	-46-
9. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	-47-
9.1.1. Statistika klíčivosti semen 2. generace rostlin .....	-48-
9.1.2. Vyšetí a způsob značení rostlin 2.generace .....	-48-
9.2. SELEKCE ROSTLIN METODOU PCR .....	-49-
9.2.1. Agarosová elektroforéza po PCR .....	-52-
9.2.2. 1. série testování .....	-52-
9.2.3. 2. série testování .....	-53-
9.2.4. 3.série testování .....	-56-
9.2.5. Finální potvrzení vyselektovaných linií double knock-outovaných rostlin AtCKX-KO2/KO5 .....	-58-
9.3. APLIKACE METODY NORTHERN BLOT .....	-61-
9.4. APLIKACE METODY „REAL-TIME“ PCR .....	-63-
9.5. POZOROVÁNÍ FENOTYPU VYSELEKTOVANÉ HOMOZYGOTNÍ LINIE DOUBLE KNOCK-OUTŮ ATCKX-KO2/KO5 .....	-65-
10. ZÁVĚR .....	-66-
11. LITERATURA .....	-68-
12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	-74-

## **CÍLE PRÁCE**

- Zpracování literární rešerže
  - rostlinné hormony cytokininy
  - exprese CKX během listové senescence
  - metody transgenozie rostlin
- U genů *AtCKX2* a *AtCKX5* byla prokázána silná exprese v průběhu listové senescence. Cílem práce je příprava rostliny *Arabidopsis thaliana*, která bude mít oba tyto geny vyřazeny z provozu.
- Sledování jejího fenotypu



**I.ČÁST**  
**TEORETICKÁ**

## **1. ARABIDOPSIS THALIANA**

*Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) je malá kvetoucí rostlina, široce využívaná jako modelový organismus v rostlinné biologii. Patří do čeledi *Brassicaceae* (brukvovité). Dosahuje velikosti 20-25 cm. Listy formují růžici jako základ rostliny, několik listů se také nachází na kvetoucím prýtu. Listy v růžici jsou 1,5-5 cm dlouhé a 2-10 mm široké, listy na prýtu jsou menší. Listy jsou pokryty malými jednobuněčnými trichomy. Drobné květy jsou oboupohlavné a pravidelné, mají průměr 3 mm a jsou uspořádány v chocholičnatém květenství. Uzavřený kalich tvoří 2+2 lístky o délce 1,5-2 mm. Bílá koruna je složená ze 4 volných plátků o délce 2-4 mm. V květu se nachází tyčinky v počtu 2+4. Svrchní semeník vznikl srůstem dvou plodolistů. Na velice krátké čnělce se nachází široká, dvoulaločná blizna. Plodem jsou šešule 5-20 mm dlouhé, široké 0,5-0,75 mm. Lysé šešule jsou tupě čtyřhranné a většinou lehce prohnuté. Vyrůstají vzpřímeně nebo šikmo na slabých stopkách o délce 5-11 mm. Chlopně plodů jsou člunkovité, s vyniklým středním nervem, obsahující 20-30 semen. Hnědá, lesklá semena jsou uložena v jedné řadě. Jejich velikost je asi 0,5 mm. Kořen má jednoduchou strukturu s jedním kořenem hlavním, který později vytváří kořeny postranní (Randuška et al, 1986).

## **2. CYTOKININY**

Cytokininy jsou řazeny do třídy rostlinných hormonů. Chemicky se jedná o N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu s isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem (Mok & Mok, 2001). Regulují buněčné dělení a velké množství vývojových dějů, jako je větvení prýtu a kořene, vývoj listů, klíčení semen a vývoj chloroplastů (Mok 1994; Schmülling et al., 2003). Cytokininy potlačují apikální dominanci a stimulují tak větvení stonku, regulují listovou senescenci (Gan & Amasino, 1995). Dále regulují mnoho důležitých aspektů vývoje nadzemních a podzemních orgánů rostlin. Zprostředkovávají odpovědi na různé vnější faktory, jako jsou světelné podmínky nebo dostupnost vody a živin v kořeni. Cytokininy

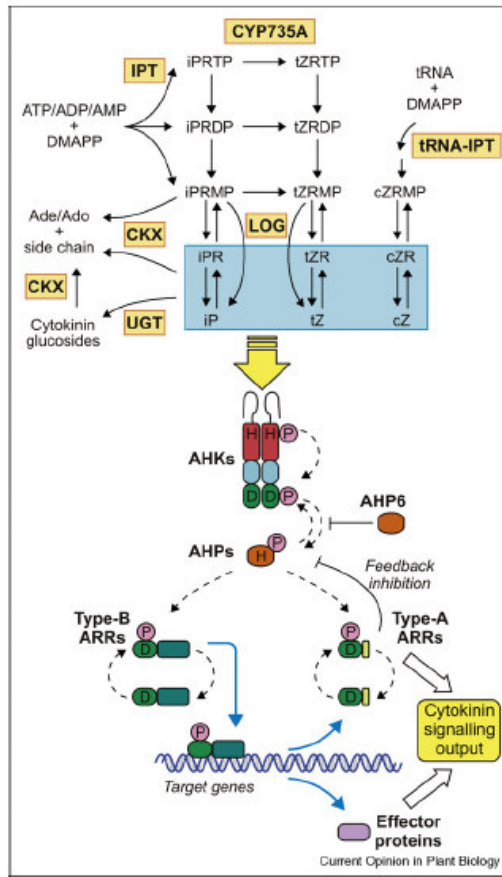
mají také roli v odpovědi na biotický a abiotický stres (Werner & Schmülling, 2009).

### **3. METABOLISMUS CYTOKININŮ**

#### **3.1. BIOSYNTÉZA CYTOKININŮ**

Biosyntéza cytokininů je katalyzována isopentenyltransferasami (IPT), které existují jako adenosinfosfát-IPT a tRNA-IPT, závisující na svých substrátech (Werner & Schmülling, 2009). IPTs jsou v *Arabidopsis* kódovány malou multigenovou rodinou (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001). Rozdílná subcelulární lokalizace IPT enzymů indikuje to, že biosyntéza může probíhat v cytosolu, chloroplastech a mitochondriích. Reakce zahrnuje přenos isopentenylové skupiny z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na adenosinfosfáty (AMP, ADP, ATP), výsledkem je isopentenyadenosin-5'-mono, di- nebo tri-fosfát (iPMP, iPDP, iPTP). Hydroxylace těchto iP-typů pomocí cytochromu P450 monooxygenas (CYP735A a CYP735A2) vede k formování *trans*-zeatinu (tZ) (Takei et al., 2004). Vzájemná přeměna mezi volnými cytokininy, nukleosidy a nukleotidy představuje důležité aspekty metabolismu cytokininů, vliv na aktivitu, stabilitu a mobilitu cytokininů v rostlinách (Mok & Mok, 2001; Werner et al., 2006). Formování *cis*-zeatinu (cZ) v *Arabidopsis* zcela závisí na aktivitě dvou tRNA-IPT. Tento výsledek konečně objasnil biosyntetickou cestu cZ a ukazuje, že ATP/ADP-IPT jsou zcela odpovědné za syntézu iP a tZ (Miyawaki et al., 2006).

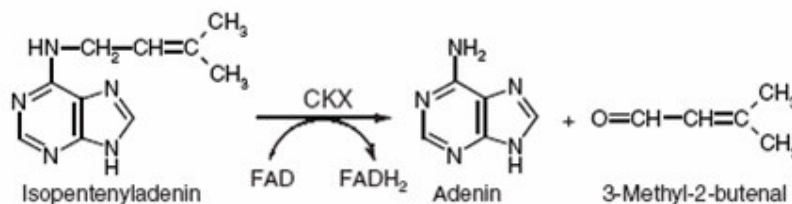
Bylo prokázáno, že IPT3 může být modifikována farnesyací. Farnesylace řídí začlenění IPT3 proteinu do jádra nebo cytosolu, zatímco nefarnesylované proteiny jsou lokalizovány v plastidech (Galichet et al., 2008). Důležitý poznatek přineslo objevení enzymů ovlivňujících uvolnění aktivních cytokininů z jejich nukleotidových prekursorů. Genové rodiny kódující tyto enzymy - cytokinin nukleosid 5'-monofosfátfosforibohydrolasy, tzv. LONELY GUY (LOG), Obr.1, byly popsány např. u rýže a *Arabidopsis* (Kurakawa et al., 2007, Kuroha et al., 2009).



Obr.1: Schématický model metabolismu cytokininů a hlavní kroky cytokininové signální dráhy (Werner & Schmülling, 2009).

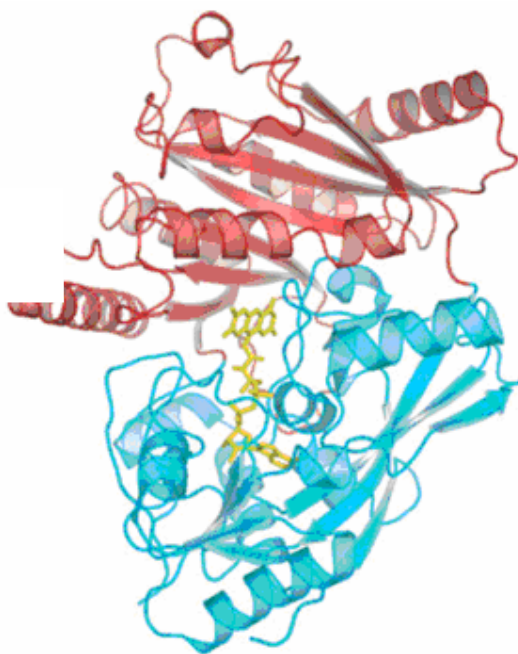
### 3.2. DEGRADACE CYTOKININŮ - CYTOKININ OXIDASA/DEHYDROGENASA

Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKX, EC 1.5.99.12) katalyzuje ireverzibilní degradaci cytokininů isopentenyladeninu, zeatinu a jejich ribosidů štěpením postranního řetězce na adenin a příslušný aldehyd (Schmülling et al., 2003).



Obr.2: Reakce degradace cytokininů katalyzovaná CKX (Schmülling et al., 2003).

CKX je flavoprotein obsahující kovalentně vázaný FAD jako kofaktor (Galuszka et al., 2001).



Obr.3: Krystalová struktura AtCKX7. FAD-vázající doména (modrá), substrát-vázající doména (červená), FAD molekula (žlutá) (Bae et al., 2008).

První zpráva o aktivitě CKX byla publikována Pačesem v roce 1971. Popsal přeměnu značeného isopentenyladeninu na adenin v extraktu buněčné kultury tabáku (Pačes et al., 1971). Stejná aktivita byla popsána v zrnech kukuřice a byl navržen název enzymu, cytokinin oxidasa (Whitty & Hall, 1974). CKX byla po dlouhou dobu označována jako oxidasa, ale současné studie potvrzují, že enzym pracuje mnohem efektivněji s jinými elektronovými akceptory, než je kyslík, a proto byl překlasifikován na dehydrogenasu (Galuszka et al., 2001).

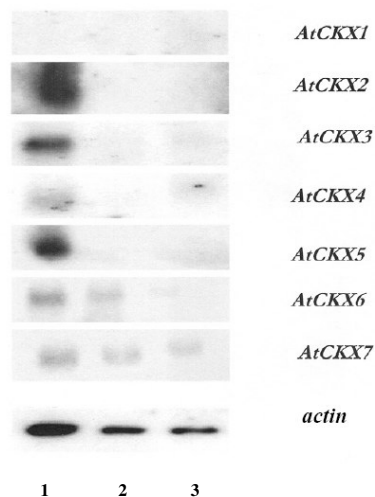
Geny kódující CKX byly izolovány z mnoha rostlinných druhů, např. kukuřice (Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999; Massonneau 2004), *Arabidopsis* (Bilyeu et al., 2001; Werner et al., 2001) a orchidejí (Yang et al., 2003).

### 3.2.1. CKX U ARABIDOPSIS

Analýzou celého genomu a cDNA bylo u *Arabidopsis* odhaleno 7 genů pro CKX (*AtCKX1-AtCKX7*) (Schmülling et al., 2003). Srovnání aminokyselinových sekvencí ukázalo, že jednotlivé CKX proteiny mají společné oblasti s vysokou homologií (FAD-vázající domény), ale mimo tyto oblasti se liší (Popelková et al., 2004). To může značit funkční různorodost v biochemických vlastnostech jako je pH optimum, substrátová specifita (Galuszka et. al., 2007). Systematickým vyhodnocením všech cytokinin degradujících enzymů-CKX v *Arabidopsis* byly odhaleny jejich odlišné biochemické vlastnosti. Především CKX2, CKX4 a CKX6 vykazují nejvyšší aktivitu s volným iP a tZ, zatímco ostatní nečekaně preferují jako substrát glukosidy nebo nukleotidy (Galuszka et al., 2007).

### 3.2.2. EXPRESSE CKX V PRŮBĚHU LISTOVÉ SENESCENCE

Metodou Northern blot byly analyzovány listy *Arabidopsis thaliana*, které byly senescenční (1), zelené listy staré 60 dní (2) a zelené listy staré 40 dní (3). Zvýšená exprese během listové senescence byla detekována pro geny *AtCKX2* a *AtCKX5* (Šromová 2006).



Obr.4: Northern blot vzorků RNA izolovaných z listů *Arabidopsis thaliana*: 1. senescenční listy, 2. zelené listy 60 dní staré, 3. zelené listy 40 dní staré (Šromová 2006).

#### **4. SIGNÁLNÍ DRÁHA CYTOKININŮ**

U *Arabidopsis* jsou známy tři cytokininové receptory AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL, které mají strukturní vlastnosti histidinkinas. Histidinové proteinkiny iniciují cytokininovou transdukční signální dráhu pomocí fosfátového přenosu na histidin fosfotransferové proteiny (AHP). AHP proteiny jsou translokovány do jádra a přenáší fosfátovou skupinu na regulátory odpovědi (ARR). Specifická kombinace *Arabidopsisových* histidinkinas (AHK), AHP a ARR determinuje specifitu cytokininové odpovědi během růstu a vývoje rostlin (Kim et al., 2006). Pokud dojde k navázání ligandu na cytokininový receptor, dojde k autofosforylaci receptoru. Signál je přenášen přes AHP až na B-tyt ARR. B-tyt ARR má funkci transkripčního faktoru (Obr.1). Následkem toho dochází k transkripci cílových genů, kde jednu skupinu tvoří A-tyt ARR. A-tyt ARR proteinů se zapojuje do negativní zpětné regulace cytokininové signální dráhy. Fylogenetické analýzy odhalily, že cytokininové receptory a A-tyt ARR ukazují, že cytokininová signální dráha a její negativní regulace vznikly současně při přechodu rostlin na souš a vyskytují se tedy již na úrovni nižších cévnatých rostlin (Pils & Heyl, 2009).

#### **5. SENESCENCE**

Listová senescence je přirozeně pozorována u podzimních listů víceletých rostlin, ale také u monokarpických rostlin (Noodén 1988). Senescence je konečnou fází vývoje listu, jedná se o recyklační proces, při kterém jsou živiny uložené ve stárnoucím listu remobilizovány do jiných částí rostliny, jako jsou mladé listy, vyvíjející se semena nebo zásobní tkáně (Gan & Amasino, 1996). Během senescence listové buňky prodělávají výrazné metabolické a strukturní změny. První viditelnou změnou je žloutnutí listů v důsledku degradace chlorofylu způsobenou rozpadem chloroplastů, doprovázenou hydrolýzou lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Senescence není jednoduchý degenerativní proces, ale jedná se o

geneticky programovaný aktivní proces (Kim et al., 2006). Zahájení listové senescence je regulováno jak endogenními tak enviromentálními signály. Rostlinné hormony jsou považovány za hlavní vnitřní faktory kontrolující tento vývojový proces. Kde kyselina abscisová a ethylen jsou promotory senescence, zatímco cytokininy jsou typickými inhibitory (Smart, 1994). Během senescence dochází k poklesu hladiny cytokoninů (Balibrea Lara et al., 2004).

## **6. METODY TRANSGENOZE ROSTLIN**

Transformace rostlin je široce adaptovanou metodou využívanou k porozumění, jak rostliny pracují a zlepšení zemědělsky výhodných znaků. Transformace rostlin závisí na vnášení transgenů do vlastního genomu rostliny. Byly vyvinuty různé metody a mnoho rostlinných druhů tak bylo úspěšně transformováno. Některé transformační metody jsou založeny na využití *Agrobacterium tumefaciens*, patogenu vnášející geny do genomu dvouděložných rostlin. V případě transgenozie jednoděložných rostlin byly vyvinuty jiné metody, označované jako přímé metody genové transformace. Jednou z těchto metod je metoda biolistická (Slater et al, 2003).

### **6.1.1. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS**

*Agrobacterium tumefaciens* je půdní, gramnegativní tyčinkovitá bakterie, způsobující nádory na rostlinných tkáních. *Agrobacterium* obsahuje tumor indukující, tzv. Ti-plasmid, který obsahuje T-DNA. Ti-plasmid se inkorporuje z bakterie do genomu hostitelské rostliny. T-DNA obsahuje geny kódující proteiny podílející se na syntéze hormonů (auxinů, cytokininů) a rostlinných metabolitů (opinů a agropinů).

Pokud dojde k poškození nebo poranění rostliny, *Agrobacterium* může infikovat rostlinu v místě poranění tak, že je přitahováno do místa poškození cestou chemotaxe na základě uvolňovaných chemikálií z poškozených rostlinných buněk (sacharidy



a fenolické látky-acetosyringon). Produkce auxinů a cytokininů způsobí, že rostlinné buňky proliferují a formují nádory.

Ti-plasmid obecně obsahuje jeden nebo více T-DNA oblastí, *vir* region, počátek replikace, region umožňující konjugativní přenos a geny pro katabolismus opinů (Slater et al, 2003).

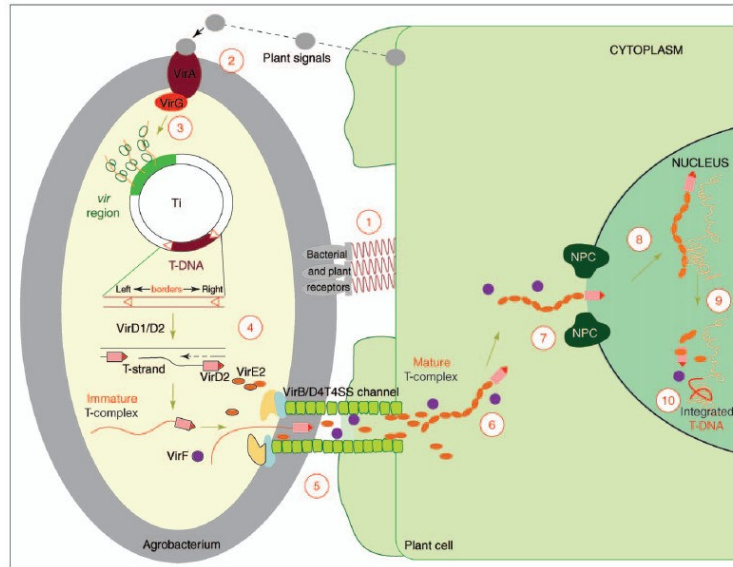
### **T-DNA**

T-DNA oblast je charakteristická přítomností levé a pravé ohraničující sekvence, jedná se o 24 bp dlouhé repetice.

### ***vir* region**

Geny odpovědné za přenos T-DNA do hostitelské rostliny jsou také umístěny na Ti-plasmidu. Jedná se o cca 40 kb oblast vně T-DNA, známou jako *vir* region. Je zde nejméně devět operonů kódujících přibližně 12 genů.

VirA je specifická membránová fenolická sensor kinasa. Po rozpoznání acetosyringonu dochází k její autofosforylaci a následné fosforylaci a aktivaci VirG. VirG je transkripční faktor odpovědný za expresi všech *vir* genů. VirD1/VirD2 komplex rozpozná levou a pravou ohraničující sekvenci T-DNA. VirD2 se kovalentně váže na 5' - konec jednovláknové T-DNA a dochází k uvolnění ssT-DNA z Ti-plasmidu. T-DNA/VirD2 komplex a další Vir proteiny prochází rostlinnou plasmatickou membránou. VirE2 slouží k ochraně T-DNA před nukleasami, usnadňuje jadernou lokalizaci a vytváří správnou konformaci T-DNA/VirD2, aby prošel přes komplex jaderných pórů (NPC „nuclear-pore complex“). VirD2 obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS „nuclear localisation signal“), který usnadňuje interakce s rostlinnými proteiny, které jsou součástí skupiny proteinů, tzv. importinů, ty zajišťují přenos přes NPC (Obr.5). VirE2 obsahuje dva NLS, ale jaderná lokalizace je zprostředkována jinými rostlinnými proteiny, tzv. VIP1, které usnadňují importinům rozpoznání jaderných lokalizačních signálů na VirE2 (Slater et al, 2003).



Obr.5: Genetická transformace zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens*. Rozpoznání a připojení *Agrobacterium* k hostitelské buňce (1), aktivace VirA/VirG systému specifickými rostlinnými signály (2) a následná aktivace *vir* regionu (3). Rozpoznání T-DNA sekvenec VirD1/VirD2 komplexem (4), přenos VirD2/DNA komplexu společně s dalšími Vir proteiny do cytoplasmy rostlinné buňky (5), kde je T-DNA stabilizována VirE2 (6) a inportována do jádra hostitelské buňky (7). Uvnitř jádra je T-DNA oddělena od všech průvodních proteinů (8,9) a integrována do genomu hostitelské rostliny (10) (www.egohabitat.com).

#### 6.1.1.1. Praktická aplikace transformace rostlin za použití *Agrobacterium*

Hlavním účelem transgenozy je produkce celé transgenické rostliny. Užívaný explantát musí být schopen regenerace v celou rostlinu a měl by obsahovat vysoký poměr buněk kompetentních pro transformaci. Vektory užívané pro transformaci *Agrobacteriem* jsou odvozeny od přirozeného Ti-plasmidu, ale jsou pozměněny tak, že nemají jeho původní vlastnosti, je zachována pouze levá a pravá ohraničující sekvence zabezpečující přenos T-DNA. Vektory dále obsahují v místě T-DNA selekční markery pro identifikaci transformovaných rostlin (Slater et al, 2003).

Základní body transformačního protokolu:

- Zvolit vhodný explantát  
Vhodná rostlinná tkáň je oddělena od původní rostliny a je sterilizována.
- Kokultivace s *Agrobacterium*  
Explantát je vložen do kultury s *Agrobacterium* a následně je inkubován na pevném MS-médiu s *Agrobacterium*.
- Destrukce *Agrobacterium* za použití vhodného antibiotika  
Explantáty jsou odebrány z média a promyty v roztoku s antibiotiky zabíjející *Agrobacterium*.
- Selektce transformovaných rostlinných buněk  
Explantát je přenesen do čistého pevného média obsahující selekční markery, které zabrání růstu netransformovaných rostlinných buněk.
- Regenerace celé rostliny  
Médium obsahuje poměr auxinů a cytokininů pro regeneraci úplné rostliny.

Dvouděložné rostliny jsou přirozeně transformovány pomocí *Agrobacterium*. U jednoděložných rostlin je transformace mnohem složitější. Lze ji provádět za použití modifikovaného vektoru nebo tzv. supervirulentního druhu *Agrobacterium* (Slater et al, 2003).

#### 6.1.2. NAMÁČENÍ KVĚTŮ („FLORAL DIP“)

Namáčení květů je velice jednoduchá metoda, kdy jsou mladé květy ponořovány do kultury s *Agrobacterium* za vzniku transgenních semen. Tato metoda byla kromě *Arabidopsis* jako cílové rostliny úspěšně aplikována také u vojtěšky a petúnie (Davis et al, 2009).

#### 6.2. PŘÍMÉ METODY GENOVÉ TRANSFORMACE

Přímé metody genové transformace jsou všechny založeny na vnášení velkého množství „holé“ DNA, zatímco je rostlinná buňka propustná, např. při elektroporaci protoplastů (Slater et al, 2003).

### 6.2.1. BIOLISTICKÁ METODA („PARTICULAR BOMBARDMENT“)

Biolistická metoda je nejdůležitější a nejefektivnější přímou metodou genové transformace. Tato technika spočívá v navázání DNA na wolframové nebo zlaté částice a vpravení do rostlinné tkáně. Částice jsou poháněny vysokou rychlostí do rostlinného materiálu, kde je DNA uvolňována uvnitř buňky a může být integrována do genomu.

Biolistická metoda byla poprvé použita v roce 1987 za využití wolframových částic. Tato technologie byla klíčem k úspěšné transformaci většiny obilovin. První komerční geneticky modifikovanou plodinou získanou touto metodou, byla kukuřice obsahující gen pro *Bt*-toxin. Vývoj této technologie vedl k produkci velkého množství systémů vnášející částice do rostlinných pletiv. V současné době je nejvíce využíváno transformace řízené vysokým tlakem hélia (PDS-1000/He).

Snaha optimalizovat systém byla soustředěna na tři aspekty:

- typ částice a příprava
- urychlení částice
- výběr cílového materiálu

Bylo dosaženo rovnováhy mezi množstvím a velikostí částic „střílených“ do cílových buněk, jejich poškozením a vneseným množstvím DNA. Příliš málo DNA může vést k nízké frekvenci transformace, naopak mnoho DNA může způsobit vysoké množství kopií a přeskupování transgenních konstruktů. Nová příprava částic pro biolistickou transformaci, která využívá aminosiloxany k pokrytí částic DNA, vedla k vyššímu efektu transformace a ke snížení koncentrace DNA.

Rostlinná pletiva využívaná pro bombardování částicemi jsou obvykle dvojího typu:

- primární explantát, který je bombardován a následně z něj lze získat embryonální kalus
- proliferující embryogenní kultura, která je bombardována a poté dochází k proliferaci a následné regeneraci

Bombardování částicemi je nejčastěji využíváno pro transformaci jaderného genomu, ale také ho lze použít pro začlenění DNA do plastidů (Slater et al, 2003).

#### 6.2.2. TRANSFORMACE ZPROSTŘEDKOVANÉ VYSOKÝM OSMOTICKÝM TLAKEM

Rostlinné protoplasty mohou být transformovány „holou“ DNA za ošetření polyethylenglykolem (PEG) za přítomnost dvojmocných kationů (obvykle  $\text{Ca}^{2+}$ ). PEG a dvojmocné kationy destabilizují plasmatickou membránu protoplastů a umožňují propustnost DNA. Jakmile uvnitř protoplastu DNA vstoupí do jádra, integruje se do genomu. Limitujícím faktorem úspěchu této techniky je problematická práce a regenerace protoplastů. Používaná DNA je také velice citlivá na degradaci a přeskupení (Slater et al, 2003).

#### 6.2.3. ELEKTROPORACE

Elektroporace buněk může být využita k vnášení DNA do rostlinných buněk a protoplastů. Užívanými vektory jsou jednoduché plasmidy. Materiál je inkubován v roztoku pufru obsahující DNA a vystaven vysokonapětovému elektrickému impulsu. DNA migruje do genomu přes póry v plasmatické membráně vzniklé vysokým napětím. Elektroporace byla úspěšně využita pro transformaci obilovin (rýže, pšenice, kukuřice) (Sorokin et al, 2000). Rostlinný materiál používaný pro elektroporaci požaduje specifické zacházení, jako je pre- a postelektroporační inkubace ve vysoceosmotickém pufru. Úspěšnost elektroporace je také závislá na stavu rostlinného materiálu (Slater et al, 2003).

#### 6.2.4. VLÁKNA KARBIDU KŘEMÍKU-WHISKERS™

Rostlinný materiál je ponořen do pufru obsahující DNA a vlákna karbidu křemíku. Vlákna mající průměr 0,3-0,6  $\mu\text{m}$  a jsou 10-100  $\mu\text{m}$  dlouhá, pronikají přes buněčnou stěnu a plasmatickou membránu a pomáhají DNA dostat se dovnitř buňky (Asad et al, 2008).

#### 6.2.5. UMLČOVÁNÍ GENŮ

Umlčování genů popisuje epigenetický proces genové regulace. Geny jsou regulovány na úrovni transkripce a post-transkripce. Na základě toho rozlišujeme dva způsoby umlčování genů, a to tzv. TGS a PTGS (Slater et al, 2003).

##### 6.2.5.1. Transkripční umlčování genů (TGS „transcriptional gene silencing“)

Transkripční umlčování genů je výsledkem methylace histonů a promotorových oblastí genů, jejímž výsledkem je potlačení transkripce (van Leeuwen & van Steensel, 2005).

##### 6.2.5.2. Post-transkripční umlčování genů (PTGS „post-transcriptional gene silencing“)

Za regulaci genů na post-transkripční úrovni jsou především zodpovědné dva typy malých molekul RNA, *mikro RNA* (miRNA „micro RNA“) a *malá interferující RNA* (siRNA „small interfering RNA“). Tyto malé RNA regulují genovou expresi inkorporací do aktivního multiproteinového komplexu (RISC), kde reagují s komplementárními místy specifických mRNA kódující především regulační proteiny. Následkem je degradace cílové mRNA a umlčení exprese daného genu (Corn et al, 2008).

###### 6.2.5.2.1. miRNA

Mikro RNA je třída malých (19-23 nukleotidů) molekul vyskytujících se u rostlin, virů a savců. miRNA nekódují proteiny. miRNA je nejdříve transkribována v jádře jako prekurzor (pri-miRNA), než je enzymaticky přeměněna na přibližně 70 nukleotidů dlouhou vlásenkovou strukturu (pre-miRNA), která je přenášena do buněčné cytoplazmy. Další enzymatické zpracování vytváří asi 22 nukleotidů dlouhou zralou miRNA. Tato zralá miRNA reguluje genovou expresi inkorporací do aktivního komplexu RISC. Mikro RNA se přirozeně vyskytuje ve všech buňkách (Corn et al, 2008).

#### 6.2.5.2.2. siRNA

siRNA o velikosti přibližně 21 nukleotidů vzniká štěpením dvouvláknové RNA (dsRNA) endonukleasou. Po vazbě siRNA na multiproteinový komplex RISC, nastává specifické navázání aktivovaného komplexu RISC na homologní mRNA, komplementární s siRNA. To aktivuje štěpení cílové mRNA a následnou degradaci. siRNA se přirozeně nevyskytuje ve všech buňkách, ale jedná se o chemicky syntetizovanou molekulu (Chicas & Macino, 2001).

#### 6.2.6. MOLEKULÁRNÍ SESTRŮH GENOMU POMOCÍ „ZINC FINGER“ NUKLEAS (ZFNs)

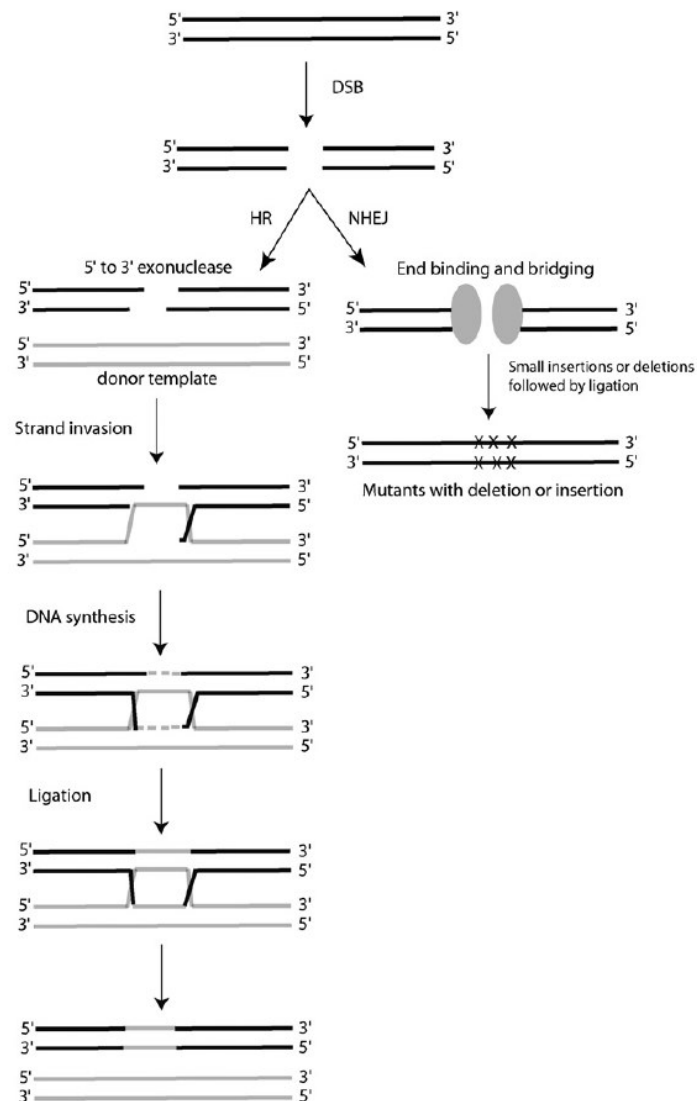
Nukleasy zinkového prstu jsou proteiny, které byly vytvořeny k štípání specifických sekvencí DNA a staly se tak vhodným nástrojem pro genové cílení, tzn. procesu přemísťování genů uvnitř genomu pomocí homologní rekombinace. ZFNs kombinují nespecifické štěpící domény FokI endonukleasy (označované jako „N“, viz Obr.8) se „zinc finger“ proteiny (ZFPs). Jsou schopny vytvořit místně specifické dvouvláknové zlomy (DSB „double-strand break“) v genomu. Vývoj genového cílení zprostředkovaného ZFN poskytuje schopnost místně specificky permanentně modifikovat rostlinné a živočišné genomy cestou přímé homologní opravy cílených genomických dvouvláknových zlomů (Durai et al, 2005).

##### 6.2.6.1. Homologní rekombinace

Buňky využívají universální proces homologní rekombinace k zprostředkování místně specifických rekombinací k udržení jejich genomické integrity, především během opravy DSB. Oprava poškozeného chromozomu DSB homologní rekombinací v buňkách je nejpřesnější formou opravy. Pracuje cestou kopírovacího a slepovacího mechanismu, obvykle užitím homologního úseku DNA jako templátu z nepoškozené sesterské chromatidy (Obr.6). Genové cílení využívá extrachromozomálního fragmentu donorové DNA (většinou se jedná o linearizovaný plasmid), který vyvolá vlastní buněčnou opravu vedoucí ke genové konversi (Durai et al, 2005).

### 6.2.6.2. Nehomologní spojení konců (NHEJ „non-homology end joining“)

Během nehomolgního spojení konců jsou přerušené konce DNA spojeny specifickými proteinovými faktory. Konce jsou následně spojeny protein-proteinovými interakcemi mezi proteinovými faktory. Sekvence jsou pak srovnány a zaligovány (Obr.6). NHEJ je mutagenní proces, protože většinou dochází ke vzniku malých delecí nebo insercí v místě spojení (Wu et al, 2007).

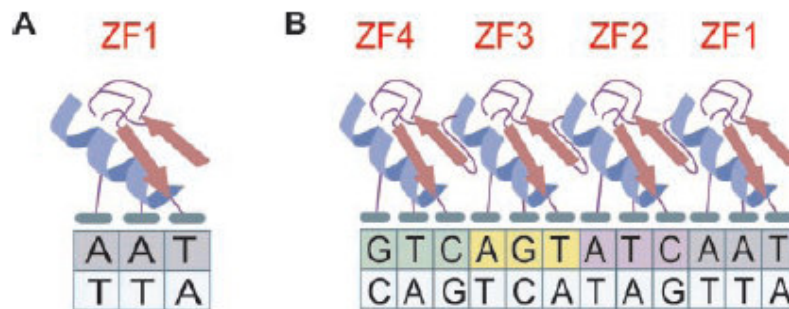


Obr.6: Schéma dvou hlavních možných mechanismů opravy DSB, homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojení konců (NHEJ) u savčích buněk (Wu et al, 2007).



### 6.2.6.3. „Zinc finger“ proteiny (ZFPs)

Každý motiv zinkového prstu je složen z přibližně 30 aminokyselin, vytváří  $\beta\beta\alpha$  strukturu (Obr. 7A), která je stabilizována iontem zinku konzervovaným  $\text{Cys}_2\text{His}_2$  rezidui. Motiv zinkového prstu váže DNA vkládáním  $\alpha$ -helixu do velkého zářezu dvoušroubovice DNA. Každý zinkový prst váže specifický triplet na DNA. Vázání delších DNA sekvencí je dosaženo spojením několika motivů zinkového prstu do tandemu a vytvoření ZFPs (Obr. 7b) (Durai et al, 2005).



Obr.7: Struktura individuálního motivu zinkového prstu (A), čtyři motivy zinkového prstu vytvářející tandem ZFPs (B) (Durai et al, 2005).

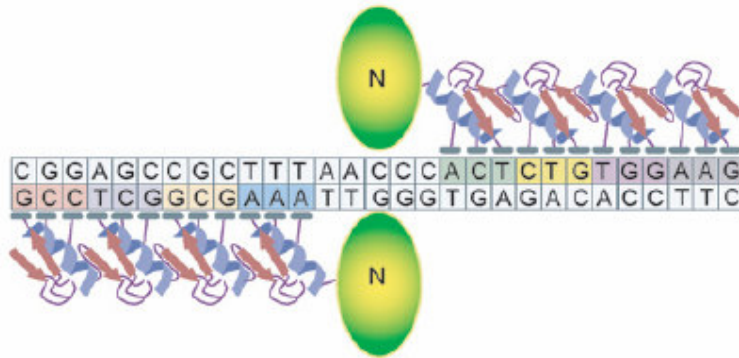
### 6.2.6.4. Nukleasy zinkového prstu (ZFN)

Nukleasy zinkového prstu obsahují doménovou strukturu FokI. FokI je bakteriální restriční endonukleasa rozpoznávající nepalindromickou sekvenci pěti deoxyribonukleotidů 5'-GGATG-3' a 5'-CATCC-3'. Uvnitř ZFN jsou přítomny dvě oddělené proteinové domény. Jedna pro rozpoznání specifické sekvence DNA a druhá pro endonukleasovou aktivitu (FokI). První doména rozpozná místo na DNA, naváže se na něj a allosterickou interakcí přeneše signál na endonukleasovou doménu za vzniku zlomu (Durai et al, 2005).

### 6.2.6.5. Mechanismus zlomů dvouvláknové DNA pomocí ZFN

Studie mechanismu dvouvláknových zlomů pomocí ZFN ukázala, že je potřeba dimerizace nukleasové domény, aby mohl být DNA substrát naštípán. Původně bylo využíváno tři motivů zinkového prstu spojené s FokI štěpící doménou (N), které tvořily dimer, a tak mohly vznikat dvouvláknové zlomy. Tyto dimerizované tři motivy byly

schopny rozpoznat 18 bp dlouhé sekvence (Durai et al, 2005). Pro zvýšení specifity bylo využito čtyř motivů zinkových prstů, tyto dimerizované ZFP byly schopny již rozpoznat 24 bp dlouhé sekvence. Vazebná místa pro ZFP nemusí být identická (Obr.8) (Wu et al, 2007).

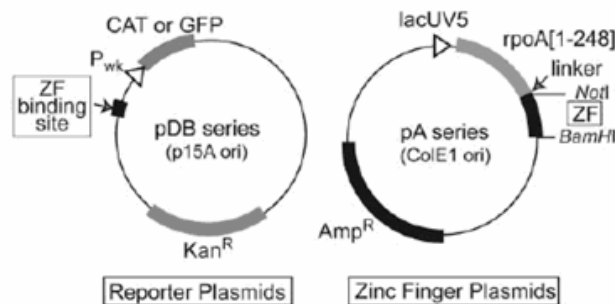


Obr.8: Struktura čtyř motivů zinkového prstu vytvářející tandem ZFPs spojený s FokI štěpící doménou (N) tvořící dimer (Wu et al, 2007).

#### 6.2.6.6. Bakteriální hybridní systém pro selektování požadovaných

##### ZFP

Bakteriální hybridní systém pro selekci ZFP používá dva rozdílné reportérové geny, chloramfenikolacetyltransferasu (CAT) a zelený fluorescenční protein (GFP). Systém využívá dvou plasmidů (Obr.9).



Obr.9: Plasmidy hybridního genetického selekčního systému

Na prvním (Zinc Finger Plasmid) je umístěná kódující sekvence požadovaných ZFP motivů spojená s fragmentem  $\alpha$ -podjednotky RNA polymerasy (RpoA) pomocí 22 aminokyselin (linker). Na druhém plasmidu (Reporter Plasmid) je specifické vazebné místo pro ZFP

(rozpoznávací motiv) uvnitř promotoru v místě počátku transkripce pro CAT nebo GFP. Navázání ZFP domény spojené s RpoA na „Zinc Finger Plasmidu“ do tohoto vazebného místa na „Reporter Plasmidu“ vede k transkripci reportérového genu a tedy ke zvýšení rezistence na chloramfenikol nebo zvýšení zelené fluorescence (Durai et al, 2005).

#### 6.2.6.7. Aplikace transformace rostlin pomocí ZFN

Pro rostliny nebyla dlouho dostupná účinná a běžně užívaná metoda pro cílové modifikace genomu. Transformace rostlin byla vždy velice metodicky a časově náročná s ne vždy požadujícím výsledkem. Až v roce 2005 byla úspěšně provedena přímá transformace pomocí ZFN v rostlinách, konkrétně v *Arabidopsis thaliana*. Později byla tato metoda úspěšně aplikována také u tabáku zvýšením frekvencí lokalizovaných HR (Wu et al, 2007).

Současné studie popisují úspěšné transformace pomocí ZFN také u kukuřice. Kdy jsou do specifického místa v lokusu přesně doručeny geny pro rezistenci na herbicidy. Konkrétně byl insercí přerušen lokus pro gen *IPK1*, který kóduje inositol-1,3,4,5,6-pentakis-2-kinasu, enzym katalyzující finální krok v biosyntéze fytátu v zrnech kukuřice. Redukce fytátu je zemědělsky velmi důležitá. Fytát představuje antinutriční složku krmných zrn a navíc přispívá k enviromentálnímu znečištění. Výsledkem inserce *IPK1* genu bylo jak získání rezistence proti herbicidům, tak úprava inositolfosfátového profilu ve vyvíjejících se zrnech. Genetické změny pomocí transformace ZFN jsou přenášeny rostlinou do další generace (Shukla et al, 2009).

Jiná současná studie popisuje použití ZFN pro transformaci tabáku v místě cílových endogenních rostlinných genů, konkrétně acetolaktátsynthasy. Je prokázáno, že specifická mutace v tomto genu způsobuje rezistenci na herbicidy imidazolinon a sulfurylureu. Tato studie potvrdila, že je konečně možné efektivně měnit cílové sekvence v endogenních rostlinných genech metodou ZFN (Townsend et al, 2009).

**II.ČÁST**  
**EXPERIMENTÁLNÍ**

## **7. MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ**

### 7.1. CHEMIKÁLIE

- **Aldrich** chlornan vápenatý
- **Ambion** TriReagent; MicroPoly(A)Purist
- **Amresco** agarosa
- **Bio Rad** dNTP Mix (10 mM každý dNTP)
- **Bioline** IMMOLASE™ DNA polymerasa
- **Ducheve** Tris; MS
- **Fermentas** ReverAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit
- **Fluka** Blotting-Nylon 66 Membranes, typ B, pozitivní;  
bromfenolová modř; formaldehyd; β-  
merkptoethanol; MES
- **Invitrogen** pCR-BluntII-TOPO 3,5 kb; Ribogreen; ROX
- **Lachema** kyselina chlorovodíková, hydroxid draselný
- **Lach Ner** citrát sodný
- **MACH** isopropanol
- **Merck** hydrohenfosforečnan sodný
- **NeoLab** chloroform; octan sodný; Tween 20
- **Penta** EDTA; ethanol; formamid; glycerol; hydroxid  
sodný; chlorid sodný; methanol; sacharosa; SDS
- **Qiagen** pDrive Cloning Vector 3,85 kb
- **Roche** Diagnostics DIG Luminiscent Detection Kit  
(blokovací látka; CSPD); DIG RNA Labeling Kit  
SP6/T7 (reagencie pro přípravu próby); Lumi-Film  
Chemiluminescent Detection Film 20,3 x 25,4 cm
- **Roth** kyselina maleinová
- **Sigma** N-lauroylsarkosin; Triton X-100
- **Sigma-Aldrich** fixační roztok Kodak GBX replenisher; DEPC; MS  
s přídavkem vitamínů; vyvíjecí roztok Kodak GBX  
developer; myoinositol; xylénová violeť
- **TopBio** LA DNA polymerasa
- **Whatman** chromatografický papír 3 mm

## 7.2. PŘÍSTROJE

- autokláv Labo Autoclave MLS 3020, Sanyo
- centrifuga Mikro 200R, Hettich
- centrifuga (mini) Combi-spin, Biosan, FVL-2400N
- centrifuga MR23i Jouan UP3280 1073288
- crosslinker, Herolab
- digitální fotoaparát Olympus C-5060, Olympus
- flow box Polaris 72, Steril
- fluorimetr Turner, Bio Systems
- hybridizační pec, Thermo Fisher Scientific
- inkubátor Termostat CL 135
- klimakomora
- mikrovlnná trouba EMM 2005, Elektrolux
- mrazák Ultra low, Sanyo
- pH metr Eutech Instrument
- sestava pro agarosovou elektroforézu Agagel Mini, Biometra
- stereomikroskop Intraco Micro
- termocykler (Real time PCR), Applied Biosystems
- termocykler T-gradient a T-personal, Biometra
- termoblok Termoblock Digital Dry Bath Incubator, Boekel
- transiluminátor UV, Vilber Lourmat

a další přístrojové vybavení Katedry biochemie Oddělení molekulární biologie

### 7.3. ROZTOKY

#### **pěstování *Arabidopsis thaliana* v rostlinné kultuře**

- MS médium: 0,46% MS; 1,5% sacharosa; 0,025% MES; 0,005% myoinositol; (pH 5,7); 0,8% agar, autoklávováno

#### **izolace gDNA**

- extrakční pufr v TE: 0,15 M Tris/HCl (pH 7,0); 1 M NaCl; 15 mM EDTA; 1,5% CTAB; autoklávováno; 1,5%  $\beta$ -merkaptoethanol
- TE pufr: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

#### **voda inhibující RNA endonukleasy („RNase-free“ voda)**

- 0,025-0,1% DEPC voda: destilovanou vodu s přidaným DEPC je nutné pořádně promíchat a inkubovat cca 15-20 hod (přes noc) na 37°C, poté autoklávovat 30 min na 120°C.

#### **elektroforetické roztoky**

- TAE pufr: 45 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)

(všechny další roztoky byly připraveny v „RNase-free“ vodě a autoklávovány)

- 0,40 M formaldehydový agarosový gel: 1,2% agarosa, 1x MOPS; 0,40 M formaldehyd; „RNase free“ voda; neautoklávovat
- MOPS pufr-zásobní roztok 10x: 0,2 M MOPS (pH 7,0); 20 mM octan sodný a 10 mM EDTA (pH 8.0); 0,05-0,1% DEPC; inkubováno přes noc na 37°C, autoklávováno, zkontrolováno pH
- 10x nanášecí pufr pro formaldehydový gel („loading buffer“): 50% glycerol v „RNase free“ vodě; 10 mM EDTA (pH 8,0); 0,25% bromfenolová modř; 0,25% xylenová violeť

#### **roztoky pro Northern Blot**

- Alkalizační roztok: 50 mM NaOH v „RNase free“ vodě
- SSC-zásobní roztok 20x: 3 M NaCl a 0,3 M citrát sodný; (pH 7,0); 0,05- 0,1% DEPC; inkubováno přes noc na 37°C, autoklávováno, zkontrolováno pH

- Alkalický transferový pufr: 2,5 mM NaOH; 3 M NaCl; 0,05-0,1% DEPC; inkubováno přes noc na 37°C, autoklávováno

### hybridizační roztoky

- Pufr s vysokým obsahem SDS: 50% formamid; 5x SSC; 0,1% N-laurosylsarkosin; 7% SDS; 2% blokovací roztok; 50 mM Na<sup>+</sup>-fosfátový pufr (pH 7,0); „RNase free“ voda

### promývací a detekční roztoky

- Pufr s nízkou stringencí („Low Stringency“ pufr): 2x SSC; 0,1% SDS
- Pufr s vysokou stringencí („High Stringency“ pufr): 0,1x SSC; 0,1% SDS
- Pufr kyseliny maleinové: 0,1 M kyselina maleinová; 0,15 M NaCl; (pH 7,5); 0,05-0,1% DEPC; inkubováno na 37°C, autoklávováno, zkontrolováno pH
- Promývací pufr: 0,3% Tween 20 v pufru kyseliny maleinové; neautoklávovat
- Blokovací roztok-zásobní roztok 10%: v pufru kyseliny maleinové byla rozpuštěna blokovací látka a roztok byl autoklávován
- Protilátka Anti-digoxigenin-AP v 1% blokovacím roztoku
- Detekční pufr: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl; (pH 9,5); 0,05-0,1% DEPC; inkubováno na 37°C, autoklávováno, zkontrolováno pH
- CSPD 1:100 v detekčním pufru
- Vyvíjecí roztok: 103 ml Kodak GBX developer a 473 ml vody
- Fixační roztok: 103 ml Kodak GBX replenisher a 473 ml vody

### roztoky pro „Real-time“ PCR

V naší laboratoři je připravována směs pro „Real-time“ PCR obsahující IMMOLASE™ DNA polymerasu, která je zde 4x ředěna oproti komerční směsi, kde je IMMOLASE™ DNA polymerasa již ve směsi se všemi komponenty (dNTP, pufr, MgCl<sub>2</sub>, ROX).

Na jednu PCR reakci se přidává tato směs:

- IMMOMIX: 2,5 µl IMMOLASE™ DNA polymerasy; 0,5 µl 6,25 µM ROX; 2,0 µl „RNase free“ vody



## **8. METODY**

### **8.1.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL**

Rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia, 1. homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* s knock-outovaným genem *CKX2* pomocí vloženého Ti-plasmidu (SALK\_068485.17.10.x), 2. homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* s knock-outovaným genem *CKX5* pomocí vloženého Ti-plasmidu (SALK\_064309.55.75.x) (dar Dr. Isabela Bartrina y Manns, Frei University Berlin), linie *Arabidopsis thaliana* s double knock-outovanými geny *CKX2/CKX5* získaná křížením 1. a 2. homozygotní linie.

### **8.1.2. PODMÍNKY PĚSTOVÁNÍ**

Sterilizovaná semena rostlin *Arabidopsis thaliana* byla vysazena na Petriho misky s MS médiem a byla inkubována v klimakomoře po dobu 14 dní za definovaných podmínek (22°C; 16 hodin světlo, 8 hodin tma; osvětlení 1000-1500 lux; vlhkost 40%), pak byla přesazena do substrátu ve fytotronu resp. skleníku za definovaných podmínek (25°C; 16 hodin světlo, 8 hodin tma; substrát Potgrond H) .

### **8.1.3. STERILIZACE SEMEN**

K semenům *Arabidopsis thaliana* byl přidán 70% ethanol a semena byla vortexována po dobu 5 min. Ethanol byl odpipetován a odsán. Byl přidán nasycený roztok chlornanu vápenatého ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ) a 0,1% Triton X-100, semena byla vortexována 8-9 min, roztok byl odpipetován. Nakonec byla semena 5x promyta sterilní vodou v laminárním boxu.

### **8.1.4. METODIKA KŘÍŽENÍ ROSTLIN - „CROSSING“**

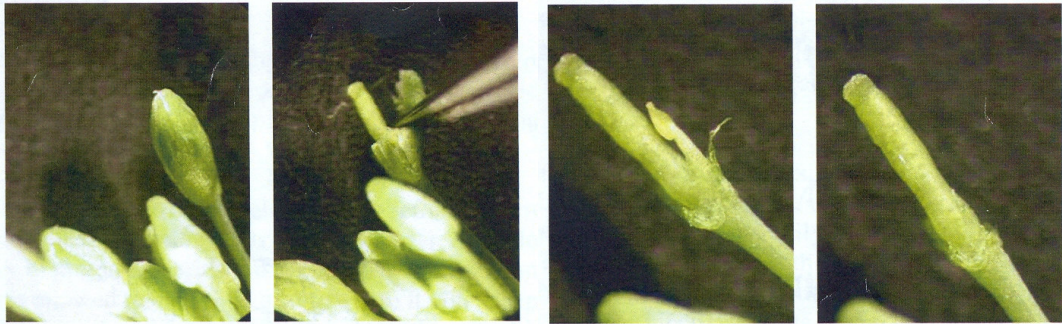
Nejprve byly vysazeny rostliny *Arabidopsis thaliana* ze dvou homozygotních linií:

1. linie měla knock-outován gen *CKX2* (*CKX-KO2*;  $\Delta 2$ ) a 2. linie gen *CKX5* (*CKX-KO5*;  $\Delta 5$ ). Tyto homozygotní linie rostlin byly kříženy.

#### 8.1.4.1. PŘÍPRAVA ROSTLIN ATCKX-KO5 PRO OPYLOVÁNÍ:

Pod stereomikroskopem byly z mladých, ještě nerozvinutých květů opatrně pomocí pinzety postupně otrhány všechny kališní, korunní lístky a tyčinky tak, že nakonec zůstal samotný pestík. Pestík nesměl být nijak poškozen a musel zůstat čistý, bez jakýchkoli zbytků tyčinek nebo lístků, jinak docházelo k jeho uhnívání a odumírání.

Takto otrhaný pestík byl označen (ovázán barevnou nitkou) a nechal se dozrát do 2.-3. dne, pak mohl být opylován.

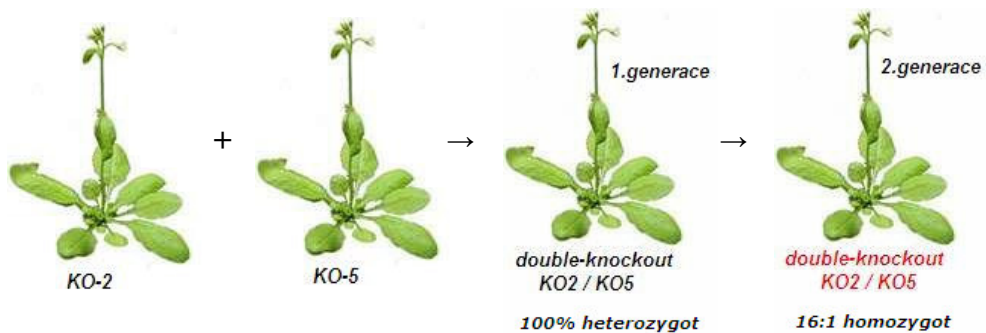


Obr.10: Způsob přípravy pestíků rostlin *A. thaliana* KO5 pro opylování (Kristensen et al, 2005).

#### 8.1.4.2. OPYLOVÁNÍ PESTÍKŮ ROSTLIN ATCKX-KO5 PYLEM Z ROSTLINY ATCKX-KO2:

Po dozrání připravených otrhaných pestíků byly pod stereomikroskopem pomocí pinzety otrhány zralé tyčinky z rostlin *AtCKX-KO2* a pyl byl přenesen na zralý pestík *AtCKX-KO5*.

Crossing byl prováděn 8 dní dle průběžného dozrávání květů. Bylo třeba dávat pozor, aby nedocházelo k samosprašení vlastním pylem.



Obr.11: Schéma křížení dvou homozygotních linií za vzniku 1. generace double knock-outované rostliny *AtCKX-KO2/KO5* a následného vývoje 2. generace (obrázek rostliny *A. thaliana* použit ze zdroje *w3int.oru.se*).

Za 2-3 týdny byly do mikroskopavek sesbírány zralé šešule se semeny 1. generace rostlin *Arabidopsis thaliana* s potenciální **heterozygotní linií** double knock-outa *AtCKX-KO2/KO5*.

Náhodně bylo vybráno 10 zkušavek se semeny a tato semena byla sterilizována a vysazena na MS médium, asi po 14 dnech byla přesazena do skleníku do substrátu.

Po samosprašení 1. generace rostlin byly za 2-3 týdny získány opět zralé šešule se semeny 2. generace rostlin, tentokrát již s hledanou potenciální **homozygotní linií** double knock-outa *AtCKX-KO2/KO5*. Z původních náhodně vybraných 10 linií rostlin 1. generace bylo sterilizováno a vyseto na MS médium asi 20 semen od každé linie, které byly po 14 dnech přesazeny do fytotronu do substrátu.

### 8.1.5. 3. MENDELŮV ZÁKON

Na základě 3. Mendlova zákona o nezávislé kombinovatelnosti alel lze vyjádřit poměr hledané homozygotní linie double knock-outa *CKX-KO2/KO5*.

	CKX2 CKX5	CKX2 ckx5	ckx2 CKX5	ckx2 ckx5
CKX2 CKX5	CKX2 CKX5	CKX2 CKX5	CKX2 CKX5	CKX2 CKX5
CKX2 ckx5	CKX2 CKX5	CKX2 ckx5	CKX2 CKX5	CKX2 ckx5
ckx2 CKX5	CKX2 CKX5	CKX2 CKX5	ckx2 CKX5	ckx2 CKX5
ckx2 ckx5	CKX2 CKX5	CKX2 ckx5	ckx2 CKX5	ckx2 ckx5

homozygot

**16:1**

Obr.12: Kombinační čtverec vyjadřující poměr možných fenotypů a zároveň poměr hledaných homozygotů.

## **8.2. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU PCR**

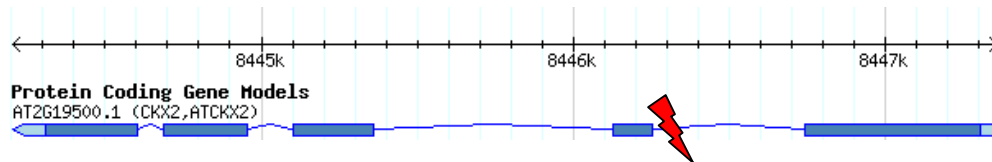
### **8.2.1. IZOLACE GENOMOVÉ DNA (gDNA)**

K 3-5 mg listu rostlinného materiálu bylo přidáno 200 µl extrakčního pufru v TE. Listová tkáň byla homogenizována o stěny mikrozkuřavky otáčením tyčinky. S takto vyizolovanou gDNA byla přímo nastavena PCR reakce.

### **8.2.2. UMÍSTĚNÍ INSERCÍ U JEDNOTLIVÝCH HOMOZYGOTNÍCH LINIÍ**

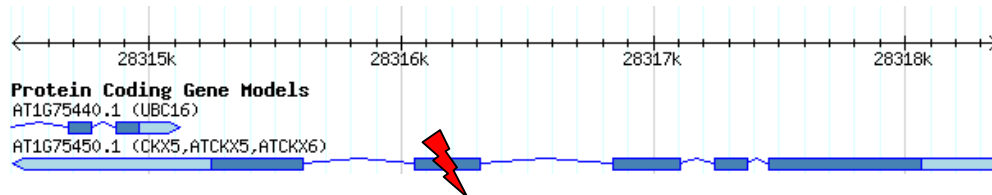
#### 1. homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* s knock-outovaným genem *CKX2* (SALK\_068485.17.10.x)

**chromosom:** 2  
**typ inserce:** T-DNA inserce  
**místo inserce:** intron



#### 2. homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* s knock-outovaným genem *CKX5* (SALK\_064309.55.75.x)

**chromosom:** 1  
**typ inserce:** T-DNA inserce  
**místo inserce:** exon



(www.arabidopsis.org)

### 8.2.3. NAVRHOVÁNÍ PRIMERŮ

Primery byly navrhovány v programu BioEdit. Byly zvoleny tak, aby byla prokázána T-DNA inserce a selektována homozygotní linie *AtCKX-KO2/KO5*.

<i>XR2_rev</i>	5´-TGG GAA AAC CCT GGC GTT ACC CAA CTT AAT-3´
<i>319_fw_1S</i>	5´-AAC ATG ACG TGT ATC ACT GA-3´
<i>AtCKX2_ex2_rev</i>	5´-GTT TAG GTG CAT GGT CCA AAA-3´
<i>AtCKX5_full_rev</i>	5´-TCC TCT TGG TTT TGT CCT GTG-3´
<i>AtCKX5_fw</i>	5´-GCA CGA ATC TCT CTC GAA CCA GCT C-3´
<i>AtCKX5_rev</i>	5´-CGC TGA CGA AGA AGA CGA CGA CG-3´
<i>AtCKX5_ex4_fw</i>	5´-AAG TTG AGA TTC TGA TGA AGA AAT-3´
<i>AtCKX5_ex5_rev</i>	5´-TGA GCT CCT CTC GTC CCA T-3´
<i>AtCKX5_int4_fw</i>	5´-ATG CAT GCA AAG TTA CAC TTG TGG G-3´
<i>AtCKX5_int4_rev</i>	5´-CTG ACA ATA ACA TCA AAT TAC GAC-3´
<i>ARA_act_fw (aktin)</i>	5´-GCC ATC CAA GCT GTT CTC TC-3´
<i>ARA_act_rev (aktin)</i>	5´-GGT GGT GCA ACG ACC TTA AT-3´

### 8.2.4. PCR

PCR bylo vždy nastaveno tak, aby byla finální koncentrace 20 µl. Byly používány dva typy DNA-polymeras (*LA* a *Taq-polymerasa*):

<b>2 µl</b>	PCR pufru	<b>2 µl</b>	LA pufru
<b>0,5 µl</b>	dNTP	<b>0,5 µl</b>	dNTP
<b>1 µl</b>	primer fw	<b>1 µl</b>	primer fw
<b>1 µl</b>	primer rev	<b>1 µl</b>	primer rev
<b>1 µl</b>	templátové gDNA	<b>1 µl</b>	templátové gDNA
<b>2 µl</b>	Taq-polymerasy	<b>0,3 µl</b>	LA-polymerasy
<b>12,5 µl</b>	ultra čisté vody	<b>14,2 µl</b>	ultra čisté vody

#### Nastavení PCR reakce v termocycleru:

1.	2 min	95°C	
2.	30 s	95°C	← 44 cyklů
3.	30 s	56°C	
4.	doba annealingu	72°C	
5.	10 min	72°C	
6.	10 min	10°C	

Podmínky PCR: 56°C, 45 cyklů, doba annealingu 1:30-2:45 min dle použité polymerasy

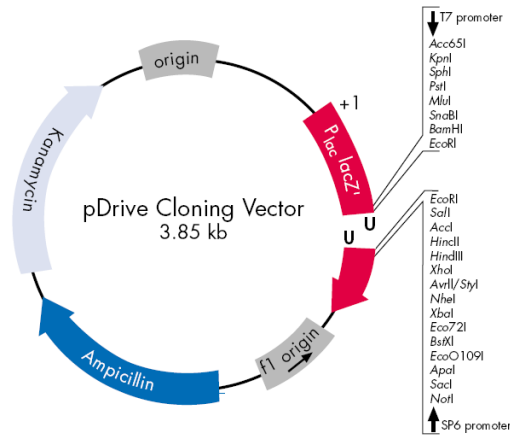
#### **8.2.5. AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA**

Všechny vzorky byly po PCR analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Vždy byla použita 1% agarosa v TAE pufru, byl nanášen DNA marker 1 kb. Elektroforéza byla spuštěna 20-30 min při 120 V. Detekce DNA byla prováděna vizualizací signálu ethidia bromidu pod UV světlem na transiluminátoru.

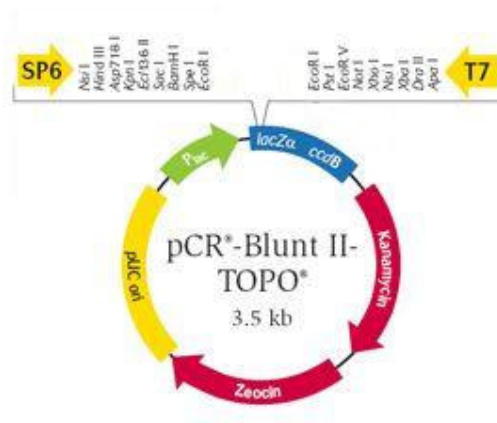
### **8.3. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU NORTHERN BLOT**

#### **8.3.1. PŘÍPRAVA ZNAČENÉ PRÓBY**

V rámci bakalářské práce byl do klonovacího vektoru pDrive (Obr.13a) vložen fragment genů pro *aktin* o velikosti 606 bp (respektive *GAPDH* 407 bp; *CKX5* 893 bp). Restrikční analýzou bylo zjištěno, že gen je ve vektoru vložen jako „antisense“. Pro vytvoření RNA próby komplementární k mRNA daných genů byl proto jako promotor použit T7. Pomocí restrikční endonukleasy *XhoI* byl plasmid linearizován. Pro *CKX2* byla připravena próba vložením celého genu pro *CKX2* o velikosti 1502 bp do klonovacího vektoru pCR-BluntII-TOPO (Obr.13b). Zde sloužil jako promotor SP6. Pomocí restrikční endonukleasy *XhoI* byl plasmid linearizován.



Obr.13a: Klonovací vektor pDrive (QIAGEN, PCR Cloning Handbook).



Obr.13b: Klonovací vektor pCR-BluntII-TOPO (www.invitrogen.com).

4  $\mu\text{l}$  linearizovaného plasmidu s vloženým genem byly smíchány s 9  $\mu\text{l}$  „RNase free“ vody (celkový objem musí být 13  $\mu\text{l}$ ). Pak byly přidány 2  $\mu\text{l}$  10x „NTP labelig mixture“ obsahující směs nukleotidů (10 mM ATP; 10 mM CTP; 10 mM GTP; 3,5 mM DIG-11-UTP; pH 7,5), 2  $\mu\text{l}$  10x transkripčního pufu, 1  $\mu\text{l}$  „Protector RNase Inhibitor“ a 2  $\mu\text{l}$  RNA polymerasy T7 (respektive SP6 při přípravě próby pro CKX2). Směs byla jemně promíchána, krátce stočena na pikofuze a inkubována 2 hod při 37°C. Byly přidány 2  $\mu\text{l}$  DNaseI a inkubovalo se 15 min při 37°C. Reakce byla nakonec zastavena přidáním 2  $\mu\text{l}$  0,2 M EDTA (pH 8,0).

### **8.3.2. PŘÍPRAVA IN VITRO TRANSKRIPTU PRO *AtCKX2***

*In vitro* transkript *AtCKX2* byl připraven vložením celého genu pro *CKX2* o velikosti 1502 bp do klonovacího vektoru pCR-BluntII-TOPO. Jako promotor sloužil T7. Pomocí restriční endonukleasy *BamHI* byl plasmid linearizován. Další postup byl totožný s přípravou značené próby s tím rozdílem, že byla použita směs nukleotidů bez značeného DIG-11-UTP.

### **8.3.3. IZOLACE CELKOVÉ RNA**

Ve třecí misce bylo pomocí tekutého dusíku na prach rozetřeno 2,5 g zelených a senescenčních listů *Arabidopsis thaliana*. V digestoři bylo přidáno 15 ml roztoku TriReagent, směs byla vortexována 5 min při laboratorní teplotě a následně centrifugována (12000 g, 10 min, 2°C). Supernatant byl přenesen do čisté „RNase free“ zkumavky a byly k němu v digestoři přidány 3 ml chloroformu, směs byla 15 s rychle převrácena a následně centrifugována (12000 g, 15 min, 2°C). Do čisté zkumavky byla odebrána vrchní vodná fáze, ke které bylo přidáno 7,5 ml isopropanolu, roztok byl promíchán, inkubován 10 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován (12000 g, 10 min, 2°C). Supernatant byl odlit a pelet byl promýván 75% ethanolem, centrifugován (7500 g, 5 min, 2°C). Ethanol byl odpipetován, pelet se nechal na vzduchu vyschnout a nakonec byl rozsuspendován v 700 µl „RNase free“ vody.

### **8.3.4. IZOLACE mRNA**

K celkové RNA přidán 0,1 násobek jejího objemu 5 M octanu amonného (= 70 µl), 1 µl glykogenu, přidán 2,5 násobek objemu 100% ethanolu (= 1925 µl). Směs byla pořádně zvortexována a precipitována při -20°C přes noc (respektive rychle zamrzena v ethanolu na suchém ledu, popřípadě 30 min při -70°C). Po ukončení precipitace následovala centrifugace (12000 g, 20-30 min, 4°C). Supernatant byl opatrně odebrán pipetou. Byl přidán 1 ml 70% ethanolu, jemně zvortexováno, centrifugováno (12000 g, 10 min, 4°C) a opět opatrně odebrán supernatant. Pelet byl rozsuspendován ve 250 µl „RNase free“ vody a pořádně zvortexován. Bylo přidáno 250 µl „2x Binding Solution“ a pořádně promícháno.



### ***Navázání na Oligo(dT) celulosu***

Roztok RNA byl přenesen do kolonek s Oligo(dT) celulosou a pořádně pipetou rozsuspendován. Směs byla inkubována 5 min při 75°C a následně 60 min na třepačce při laboratorní teplotě za občasného promíchání, aby nedocházelo k usazování. Centrifugována (4000 g, 3 min, laboratorní teplota), supernatant byl uchován na ledu.

### ***Promývání Oligo(dT) celulosy***

K peletu bylo přidáno 500 µl „Wash Solution I“, pořádně zvortexováno a přeneseno do speciální kolonky, centrifugováno (4000 g, 3 min, laboratorní teplota). Supernatant byl odlit a bylo znovu přidáno 500 µl „Wash Solution I“ ke kolonce, vortexováno a centrifugováno, supernatant odlit. Vše bylo opakováno s „Wash Solution II“.

Kolonka byla přenesena do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 100 µl na 75°C předehřátého „The RNA Storage Solution“, rychle zvortexováno a rychle centrifugováno (5000 g, 2 min, laboratorní teplota), tento krok byl 1x zopakován. Kolonky byly odstraněny a dále bylo pracováno pouze s roztokem, který protekl.

Bylo přidáno 20 µl 5 M octanu amonného, 1 µl glykogenu, 2,5 násobek objemu 100% ethanolu. Směs byla pořádně zvortexována a precipitována při -20°C přes noc (respektive rychle zamrazena v ethanolu na suchém ledu, popřípadě 30 min při -70°C). Po ukončení precipitace následovala centrifugace (12000 g, 20-30 min, 4°C). Supernatant byl opatrně odebrán pipetou. Byl přidán 1 ml 70% ethanolu, jemně zvortexováno, centrifugováno (12000 g, 10 min, 4°C) a opět opatrně odebrán supernatant. Pelet byl rozsuspendován v 9 µl „The RNA Storage Solution“. Spektrofotometricky byla změřena koncentrace mRNA. Vzorek vyizolované mRNA byl zamražen na -70°C.

## ***8.3.5. METODY STANOVENÍ KONCENTRACE VZORKŮ RNA***

### ***8.3.5.1. STANOVENÍ KONCENTRACE RNA SPEKTROFOTOMETRICKY***

Vzorek RNA byl změřen v křemenné kyvetě s objemem 5 µl při vlnové délce 260 a 280 nm. Délka kyvetového prostoru, ve kterém byl napipetován vzorek a kterým procházel paprsek, byla 1 mm. Byla stanovena přibližná koncentrace RNA podle úměry, pokud je hodnota

absorbance při vlnové délce 260 nm rovna 1, pak je koncentrace RNA ve vzorku 40 µg/ml.

#### 8.3.5.2. STANOVENÍ KONCENTRACE RNA FLUORIMETRICKY

Pomocí barviva Ribogreen byla zhotovena kalibrační křivka pro různé koncentrace RNA z myšího brzlíku (1000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml a 10 ng/ml). Barvivo bylo naředěno ve vodě v poměru 1:200. 100 µl vhodně zředěného roztoku RNA bylo smícháno se 100 µl naředěného barviva a byla změřena fluorescence. Vzorky z rostlinného materiálu byly stejným způsobem proměřeny na fluorimetru a hodnoty koncentrací byly odečteny z kalibrační křivky pro RNA z myšího brzlíku.

#### **8.3.6. PŘÍPRAVA VZORKU**

Byly smíchány 4 µl vodného roztoku RNA z rostlinného materiálu, 2 µl 10x MOPS, 2 µl 37% formaldehydu a 10 µl formamidu. Zahřívány 1 hodinu při 55°C nebo 10 minut při 70 (85)°C. Byly přidány 2 µl nanášecího pufru pro formaldehydový gel. Vzorky byly nanášeny na elektroforetický gel.

#### **8.3.7. AGAROSOVÁ FORMALDEHYDOVÁ ELEKTROFORÉZA VZORKŮ RNA**

Byl připraven 1,2% agarosový 0,40 M formaldehydový gel. Jako elektroforetický pufr byl použit 1x MOPS, ke kterému byl přidán 37% formaldehyd tak, aby jeho finální koncentrace byla 0,2 M. Před nanesením vzorků na gel byla cca na 5-10 minut spuštěna elektroforéza na 5 V/ cm (asi 40 V); po nanesení vzorků do jamek na 3-4 V/ cm (asi 25 V). Elektroforéza běžela 3-4 hodiny v horizontálním uspořádání, během této doby byl jedenkrát vyměněn čerstvý 1x MOPS s 0,2 M formaldehydem.

#### **8.3.8. NORTHERN BLOT**

Před vlastním přenosem RNA fragmentů z gelu na nylonovou membránu, byl gel na třepačce promýván a inkubován při laboratorní teplotě:

- 5 min v „RNase free“ vodě
- 20- 30 min ve 200 ml 50 mM NaOH

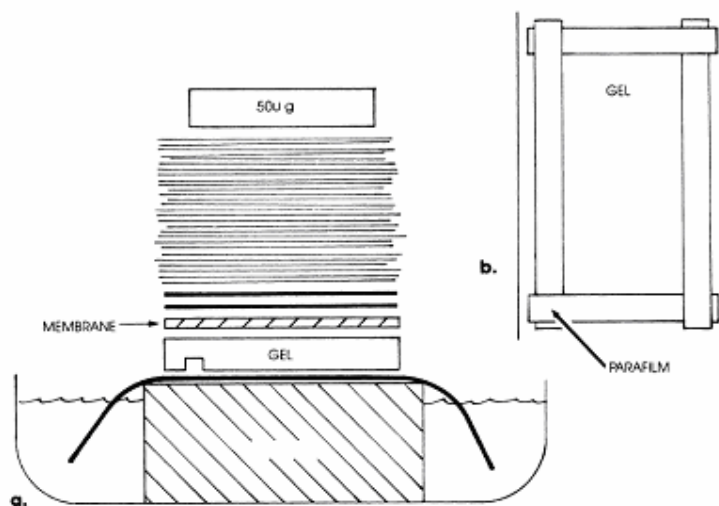
### **alkalický kapilární přenos**

Po alkalizaci v 50 mM NaOH je gel ihned vložen do aparatury pro kapilární přenos. Používanou membránou pro alkalický přenos je nylonová pozitivně nabitá membrána. Jako přenosový pufr slouží 2,5 mM NaOH + 3 M NaCl.

Nylonová membrána je před přenosem promývána při laboratorní teplotě:

- 2 min v „RNase free“ vodě
- 5 min v 5-10x SSC

Byla sestavena aparatura pro kapilární přenos podle Obr.14. Na filtrační papír, jehož konce přesahovaly do roztoku transferového pufru (2,5 mM NaOH s 3 M NaCl) byly položeny po obvodu proužky parafilmu (viz Obr.14b), na které byl vložen agarosový gel tak, aby jamky směřovaly dolů. Parafilm je nutné použít proto, aby nedošlo k případnému kontaktu filtračního papíru nasávajícího transferový pufr a sloupcem papírových ubrousků. Byly odstraněny vzduchové bubliny. Na gel byla přiložena předem promytá membrána a opět byly odsáty vzduchové bubliny. Na membránu byla položena asi 6 mm vrstva papíru (Whatman 3 mm) předem promytého v 5-10x SSC a byl přiložen sloupec suchých papírových ubrousků do výšky cca 8 cm, které byly zatíženy závažím (300-500 g). Přenos probíhal přes noc (asi 15-20 hodin), přičemž fragmenty RNA byly přenášeny z gelu na membránu vztlakovou silou roztoku transferového pufru.



Obr.14: Schéma aparatury pro kapilární přenos (Farrel, 2005).

#### 8.3.8.1. FIXACE RNA NA MEMBRÁNU POMOCÍ „CROSSLINKERU“

Aby nedošlo k nežádoucímu vymytí RNA z membrány, byla nutná fixace vzorků na membránu. Membrána byla položena na filtrační papír tak, aby strana, která byla při přenosu v kontaktu s gelem, byla směrem vzhůru k působícímu UV záření (100 s, 500 J). Dále byla membrána použita k hybridizaci.

### **8.3.9. HYBRIDIZACE**

#### 8.3.9.1. PREHYBRIDIZACE

Membrána byla vložena do uzavíratelné plastové zkumavky Falcon a byla zalita 20-50 ml hybridizačního roztoku, vložena do hybridizační pece na 68°C a byla zde inkubována po dobu 30 minut až 2 hodin.

#### 8.3.9.2. HYBRIDIZACE

Do mikrozkušavky bylo napipetováno potřebné množství značené próby a přidáno 50 µl „RNase free“ vody, směs byla zahřáta 5-10 minut na 100°C, aby došlo k rozvolnění vazeb a následně rychle ochlazena na ledu.

20-50 ml hybridizačního roztoku z prehybridizace bylo vylito. Próba byla přidána k 2-5 ml předehřátého hybridizačního roztoku (68°C) a přidána k membráně. Membrána byla hybridizována přes noc (cca 15-20 hodin) v hybridizační peci při teplotě 68°C.

Hybridizační roztok s próbou byl vylit, a pak bylo dvakrát přidáno 20-50 ml „Low Stringency“ pufru, ve kterém byla membrána promývána a inkubována při laboratorní teplotě a následně třikrát v hybridizační peci při 68°C v 20-50 ml „High Stringency“ pufru pokaždé po dobu 15 minut.

### **8.3.10. DETEKCE**

Na hybridizovanou sondu, která je značená digoxigeninem, se imunologicky váže protilátka proti digoxigeninu (Anti-digoxigenin-AP) s navázanou alkalickou fosfatase. Přítomnost próby je pak detekována přidáním luminiscenčního substrátu CSPD, který reaguje s alkalickou fosfatase za vzniku luminiscence, který je možno určit přiložením fotografického filmu na membránu a vyvoláním fotografie v temné místnosti.

Membrána byla inkubována při laboratorní teplotě za stálého třepání v těchto roztocích:

- 3 minuty v promývacím pufru
- 60-180 minut v blokovacím roztoku
- 30 minut v roztoku s protilátkou

Protilátka Anti-digoxigenin-AP byla 5 minut centrifugována při 10 000 rpm. Do 1% blokovacího roztoku bylo napipetováno potřebné množství protilátky v poměru 1:10 000. Tzn. na jednu membránu o velikosti 6,5 x 7,5 cm je potřeba 10 ml 1% blokovacího roztoku a 1 µl protilátky.

- 3x 15 minut v promývacím pufru
- 2 minuty v detekčním pufru

Byl nachystán CSPD substrát, který byl rozpuštěn v detekčním pufru v poměru 1:100. Na jednu membránu o velikosti 6,5 x 7,5 cm je potřeba minimálně 750 µl tohoto roztoku. Substrát je nutné chránit před světlem.

Pro lepší manipulaci byla použita skleněná podložka, na kterou byla natažena potravinová folie. Membrána byla položena na potravinovou folii tak, aby strana, která byla při přenosu v kontaktu s gelem byla směrem vzhůru. Byla zakapána připraveným substrátem. Membrána byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě, a pak byla překryta vrstvou potravinové folie. Folie byla ostříhána tak, aby přesně kopírovala obvod membrány a byla zalepena, aby nedocházelo k vyschnutí membrány. Membrána na skleněné podložce byla vložena na 10-20 minut do inkubátoru na 37°C.

V temné komoře byla membrána v expoziční kazetě překryta fotografickým filmem a po příslušné době (1 min až 15 hodin) byl film v temné komoře vyvolán v následujících roztocích:

- 2 minuty proplachován ve vyvíjecím roztoku
- opláchnut v destilované vodě
- 1 minutu ve fixačním roztoku

#### **8.4. TESTOVÁNÍ ROSTLIN METODOU „Real-Time“ PCR**

Primery byly navrhovány v programu BioEdit.

*AtCKX2\_TM\_fw* 5'-CGT TAT TAC TGG GAA AGG TGA AAT G-3'  
*AtCKX2\_TM\_rev* 5'-ACC TCC TAA CAC TCC ATA GAA CAA-3'  
*AtCKX2\_TM sonda* 5'-TGA CAT GCT CGC GAC AGC TAA ACC C-3'  
*AtCKX5\_TM\_fw* 5'-AGC TCC GGT CCA AGA ATT TAT G-3'  
*AtCKX5\_TM\_rev* 5'- TGA ACA AAG ACA AAT GGG ACG A-3'  
*AtCKX5\_TM sonda* 5'- TTC CAC ACC CAT GGC TCA ACC TCT TC-3'

##### **8.4.1. PŘEPIS mRNA DO cDNA**

Roztok mRNA (1-4  $\mu$ l) byl doplněn „RNase free“ vodou tak, aby byl finální objem 12  $\mu$ l. Byl přidán 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>18</sub> primeru. Směs byla inkubována 5 min při 70°C a následně zchlazena na ledu, byla krátce centrifugována. Byly přidány 4  $\mu$ l 5x reakčního pufru a 2  $\mu$ l 10mM dNTP, směs byla lehce zvortexována a krátce centrifugována. Inkubace 5 min na 37°C. Byl přidán 1  $\mu$ l reversní traskriptasy ReverAid™ H Minus M-MuLV RT. Směs byla inkubována 90 min při 42°C, reakce byla zastavena zahřátím směsi na 70°C po dobu 10 min a následným uložením na led. Se získanou cDNA byla nastavena „Real-Time“ PCR reakce.

##### **8.4.2. „Real-Time“ PCR**

PCR bylo vždy nastaveno tak, aby byla finální koncentrace 10  $\mu$ l.

<b>5 <math>\mu</math>l</b>	imomix
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	TaqMan sondy
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	primer fw
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	primer rev
<b>2 <math>\mu</math>l</b>	templátové cDNA

## **9. VÝSLEDKY A DISKUSE**

Do substrátu ve skleníku byly vysazeny rostliny *Arabidopsis thaliana* ze dvou homozygotních linií s knock-outovaným genem pro *AtCKX2* (*CKX-KO2; Δ2*), resp. *AtCKX5* (*CKX-KO5; Δ5*). Z každé linie bylo vypěstováno 8 rostlin. Tyto homozygotní linie rostlin byly mezi sebou kříženy. Křížení bylo prováděno po dobu 8 dnů.

Pod stereomikroskopem byly z mladých, ještě nerozvinutých květů *CKX-KO5* linie opatrně pomocí pinzety postupně otrhány všechny kališní, korunní lístky a tyčinky tak, že nakonec zůstal samotný pestík. Takto otrhaný pestík byl označen (ovázán barevnou nitkou) a nechal se dozrát do 2.-3. dne, pak mohl být opylován.

Po dozrání připravených otrhaných pestíků byly pod stereomikroskopem pomocí pinzety otrhány zralé tyčinky z rostlin *CKX-KO2* a pyl byl přenesen na zralý pestík *CKX-KO5*.

Každý den bylo průměrně připraveno 4-7 květů na každé rostlině *CKX-KO5* pro opylování. Průměrně docházelo k odumírání 1-2 pestíků na každé rostlině. Ve finále bylo získáno cca 192 oplozených šišulí pylem *CKX-KO2*. Zralé šišule byly uzavřeny do mikrozkušavek. Každá šišule obsahovala průměrně 15-20 semen. Semena byla uložena po dobu 14 dní v chladničce, aby prošla obdobím vernalizace.

Ze získaných cca 192 mikrozkušavek se semeny 1. generace double knock-outované linie rostlin *Arabidopsis thaliana* bylo náhodně vybráno 10 mikrozkušavek a tato semena byla sterilizována, vysazena na MS médium a následně přesazena do substrátu ve skleníku.

Po samosprášení 1. generace rostlin byly za 2-3 týdny získány zralé šišule se semeny 2. generace rostlin. Z původních náhodně vybraných 10 linií rostlin 1. generace bylo sterilizováno a vyseto na MS médium asi 20 semen od každé linie, které byly po 14 dnech přesazeny do fytotronu do substrátu. Tyto rostliny byly označeny jako 2. generace a byly následně testovány za účelem systematické selekce homozygotní double knock-outované linie *AtCKX-KO2/KO5*.

### **9.1.1. STATISTIKA KLÍČIVOSTI SEMEN 2. GENERACE ROSTLIN**

U semen 2. generace rostlin, která byla sterilizována a vysazena na MS médiu, byla po 14 dnech stanovena úspěšnost klíčení. Bylo zjištěno, že klíčivost semen byla velmi dobrá (95,1%), viz. Tabulka č.1.

Tabulka č.1: Statistika klíčivosti semen 2. generace rostlin double knock-outované linie AtCKX-KO2/KO5

<b>č. linie</b>	<b>počet vysazených semen na MS médiu</b>	<b>počet nevyklíčených semen</b>	<b>klíčivost semen v %</b>
<b>1</b>	21	2	90,5
<b>2</b>	23	2	91,3
<b>3</b>	20	0	100
<b>4</b>	19	0	100
<b>5</b>	22	1	95,5
<b>6</b>	23	1	95,7
<b>7</b>	23	1	95,7
<b>8</b>	20	0	100
<b>9</b>	21	1	95,2
<b>10</b>	15	2	86,7
		<b>celková klíčivost v %</b>	<b><u>95,1</u></b>

### **9.1.2. VYSETÍ A ZPŮSOB ZNAČENÍ ROSTLIN 2.GENERACE**

Vyklíčené rostliny 2. generace byly vysazeny do substrátu ve fytotronu. Obr.15 ukazuje vysazení a způsob značení jednotlivých rostlin. Z každé z 10 linií bylo vysazeno přibližně 20 rostlin. V několika případech však nebyl dostatek sazenic z důvodů nevyklíčení semen na MS médiu (viz Tabulka č.1), případné kontaminace plísní nebo docházelo k odumření rostliny, proto jsou některá pole prázdná.



J	♣	♣ ♣	♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
I	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
H	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
G	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
F	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
E	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
D	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
C	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
B	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
A	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣
	1 •	2 •	3 •	4 •	5 •	6 •	7 •	8 •	9 •	10 •	

Obr.15: Způsob vysetí a značení jednotlivých linií 2.generace rostlin připravených pro selekci homozygota.

## 9.2. SELEKCE ROSTLIN METODOU PCR

### SELEKCE TRANSGENNÍ LINIE ROSTLIN

- potvrzení, zda obsahuje v genu *AtCKX2* a *AtCKX5* T-DNA inserci


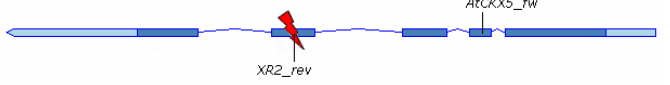
### SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN


- potvrzení, zda se jedná o homozygota pro gen *AtCKX-KO2*
- potvrzení, zda se jedná o homozygota pro gen *AtCKX-KO5*

### SELEKCE TRANSGENNÍ LINIE CKX2 A CKX5

Potvrzení, že testovaná linie rostlin obsahuje v genu T-DNA inserci.

Tabulka č.2: Kombinace primerů navržená pro selekci transgenní linie CKX2 a CKX5

<b>kombinace primerů</b>	<b>místo nasedání primerů</b>	<b>přibližná velikost</b>
<i>XR2_rev</i> <i>319_fw_1S</i>	<b>CKX2</b> 	1200 bp
<i>XR2_rev</i> <i>AtCKX5_fw</i>	<b>CKX5</b> 	1500 bp

<i>XR2_rev</i> <i>AtCKX5_full_rev</i>	<b>CKX5</b> 	1600 bp
--	---	---------

### SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE KO2 A KO5

Homozygotní linie neobsahují wild-typové alely genů, protože jsou přerušeny T-DNA insercí. Na základě toho nemůže vznikat PCR produkt vzhledem k velikosti T-DNA insertu.

Tabulka č.3: Kombinace primerů navržená pro selekci homozygotní linie KO2 a KO5

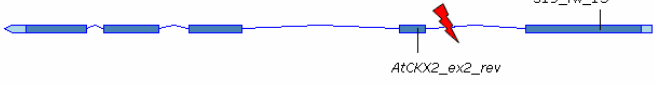
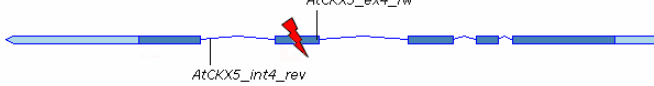
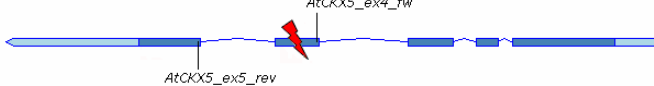

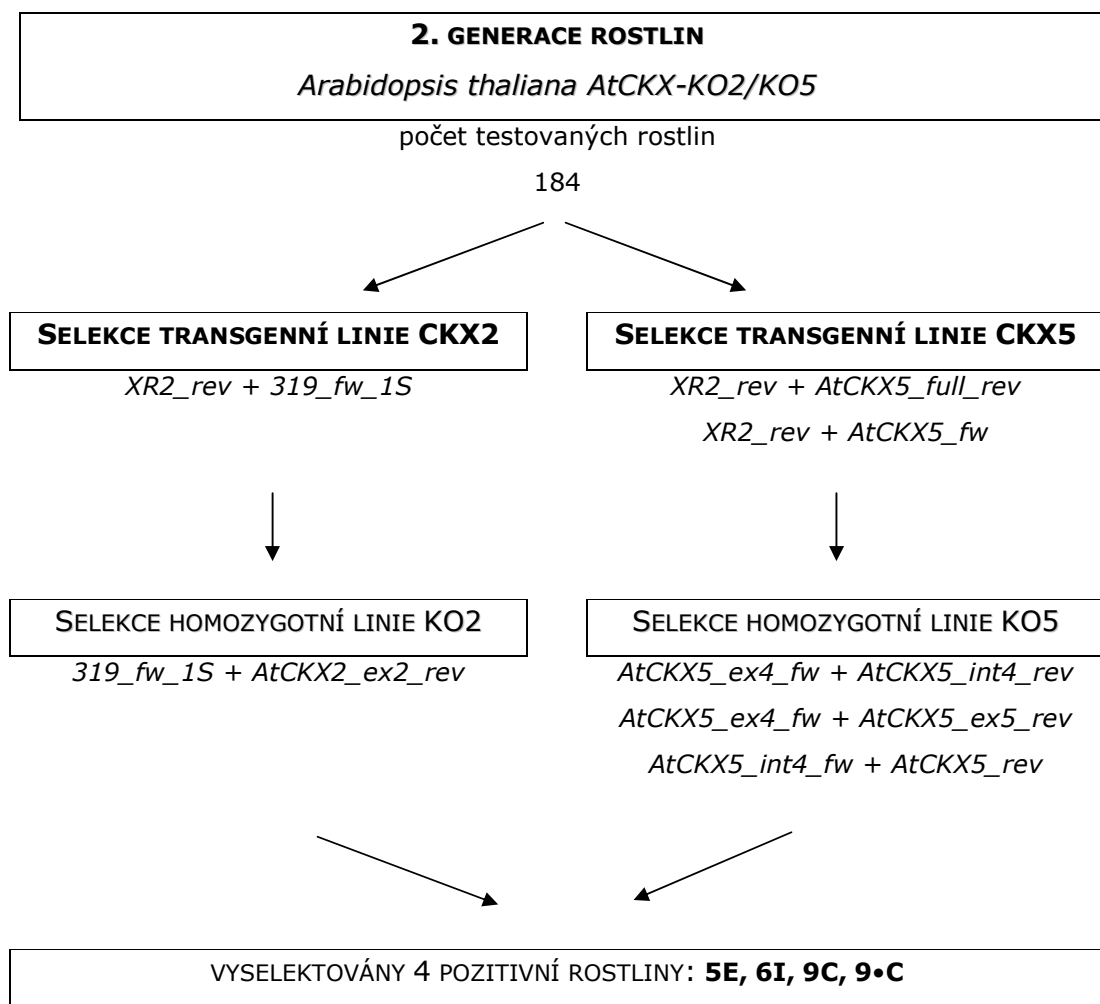
<b><u>kombinace primerů</u></b>	<b><u>místo nasedání primerů</u></b>	<b><u>přibližná velikost</u></b>
<i>319_fw_1S</i> <i>AtCKX2_ex2_rev</i>	<b>CKX2</b> 	857 bp
<i>AtCKX5_ex4_fw</i> <i>AtCKX5_int4_rev</i>	<b>CKX5</b> 	705 bp
<i>AtCKX5_ex4_fw</i> <i>AtCKX5-ex5_rev</i>	<b>CKX5</b> 	724 bp
<i>AtCKX5_int4_fw</i> <i>AtCKX5_rev</i>	<b>CKX5</b> 	714 bp

SCHÉMA SYSTEMATICKÉ SELEKCE HOMOZYGOTNÍ DOUBLE KNOCK-OUTOVANÉ LINIE  
AtCKX-KO2/KO5



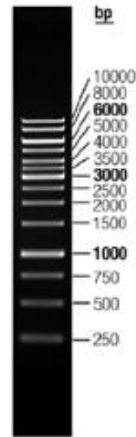
TESTOVÁNÍ 2.GENERACE ROSTLIN *Arabidopsis thaliana AtCKX-KO2/KO5*

2. generace rostlin s potencionálními homozygoty byla vzhledem k velkému množství rostlin testována ve 3 sériích.

- celkový počet testovaných rostlin 2. generace: **184**
- v 1. sérii testováno: **34** rostlin
- v 2. sérii testováno: **94** rostlin
- v 3. sérii testováno: **56** rostlin

### 9.2.1. AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA PO PCR

Všechny vzorky byly po PCR analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Vždy byla použita 1% agarosa v TAE pufru, byl nanášen DNA marker 1 kb.



Obr.16: DNA marker 1 kb (Fermentas).

### 9.2.2. 1. SÉRIE TESTOVÁNÍ

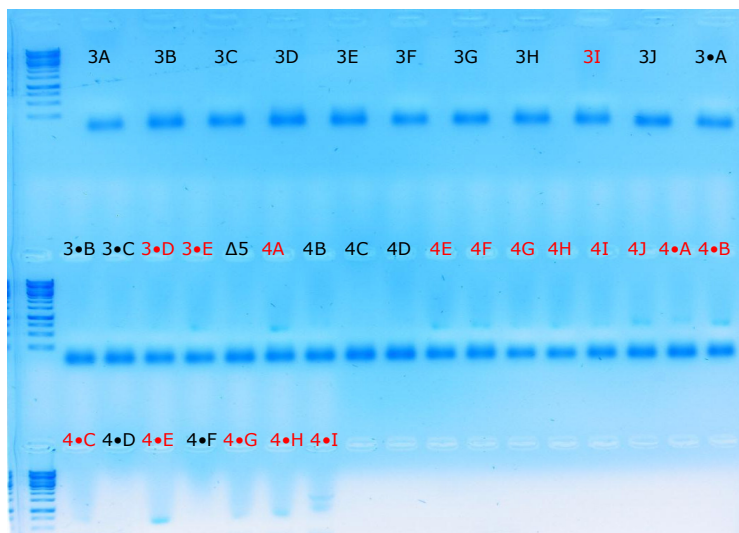
- vzorky: 34 rostlin (3A-J, 3•A-E; 4A-J, 4•A-I) viz Obr.15

SELEKCE TRANSGENNÍ LINIE ROSTLIN

primery:

□ ***XR2\_rev + AtCKX5\_fw***

(*Taq-Pol*, 45 cyklů, 56°C, 2:30)



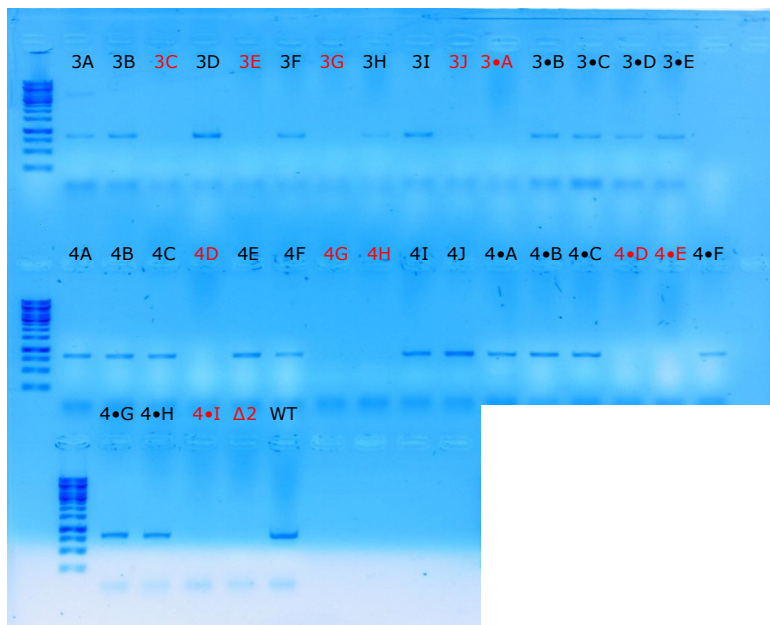
Obr.17: Elektroforéza po PCR při selekci transgenní linie CKX5. Kombinace primerů *XR2\_rev + AtCKX5\_fw* (1500 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. U tohoto PCR nastal problém s metodou izolace gDNA a docházelo k rušení reakce, i přesto byly červeně označené vzorky posuzovány jako pozitivní, protože vykazovaly alespoň slabé signály.

SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN KO2

kontrolní vzorky: WT, CKX-KO2 (dále jen  $\Delta 2$ )

primery:  $\square$  **AtCKX2\_ex2\_rev + 319\_fw\_1S**  
(Taq-Pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)



Obr18: Elektroforéza po PCR při selekci homozygotní linie rostlin KO2. Kombinace primerů *AtCKX2\_ex2\_rev* + *319\_fw\_1S* (857 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. Červeně označené vzorky jsou pozitivní na testování homozygota KO2, protože neobsahují wild-typový *AtCKX2* gen, to znamená, že nevzniká PCR produkt (viz Tabulka č.3). Tyto rostliny byly selektovány a dále testovány.

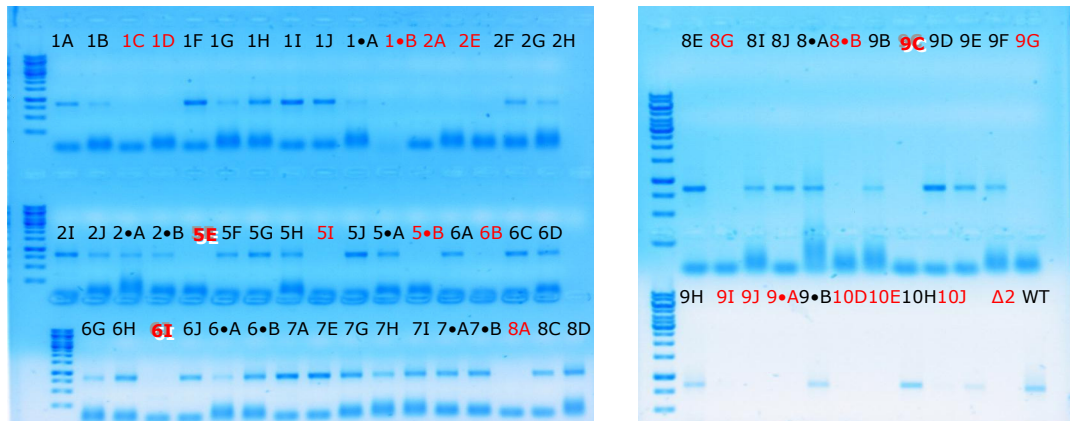
### 9.2.3. 2. SÉRIE TESTOVÁNÍ

- vzorky: 94 rostlin (1A-J; 1•A-B; 2A-J; 2•A-B; 5A-J; 5•A-B; 6A-J; 6•A-B; 7A-J; 7•A-B; 8A-J; 8•A-B; 9A-J; 9•A-B; 10A-J) viz Obr.15

## SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN KO2

kontrolní vzorky: WT,  $\Delta 2$

primery: □ **AtCKX2\_ex2\_rev + 319\_fw\_1S**  
(Taq-Pol, 45 cyklů, 56°C, 2:45)



Obr.19: Elektroforéza po PCR při selekci homozygotní linie rostlin KO2. Kombinace primerů *AtCKX2\_ex2\_rev* + *319\_fw\_1S* (857 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. Červeně označené vzorky jsou pozitivní na testování homozygota KO2, protože neobsahují wild-typový *AtCKX2* gen, a tedy nevzniká PCR produkt (viz Tabulka č.3). Tyto rostliny byly selektovány a dále testovány. Výrazně označené vzorky rostlin jsou finálně potvrzené homozygotní linie double knock-outovaných *AtCKX*-KO2/KO5, zde jsou takto značeny pouze pro větší přehlednost a snazší orientaci.

Rostliny potvrzené při selekci na homozygotní linii KO2 z 1. a 2. série testování byly selektovány a následně společně testovány na homozygotní linii KO5 a zda obsahují T-DNA inserci v genu pro *AtCKX5*.

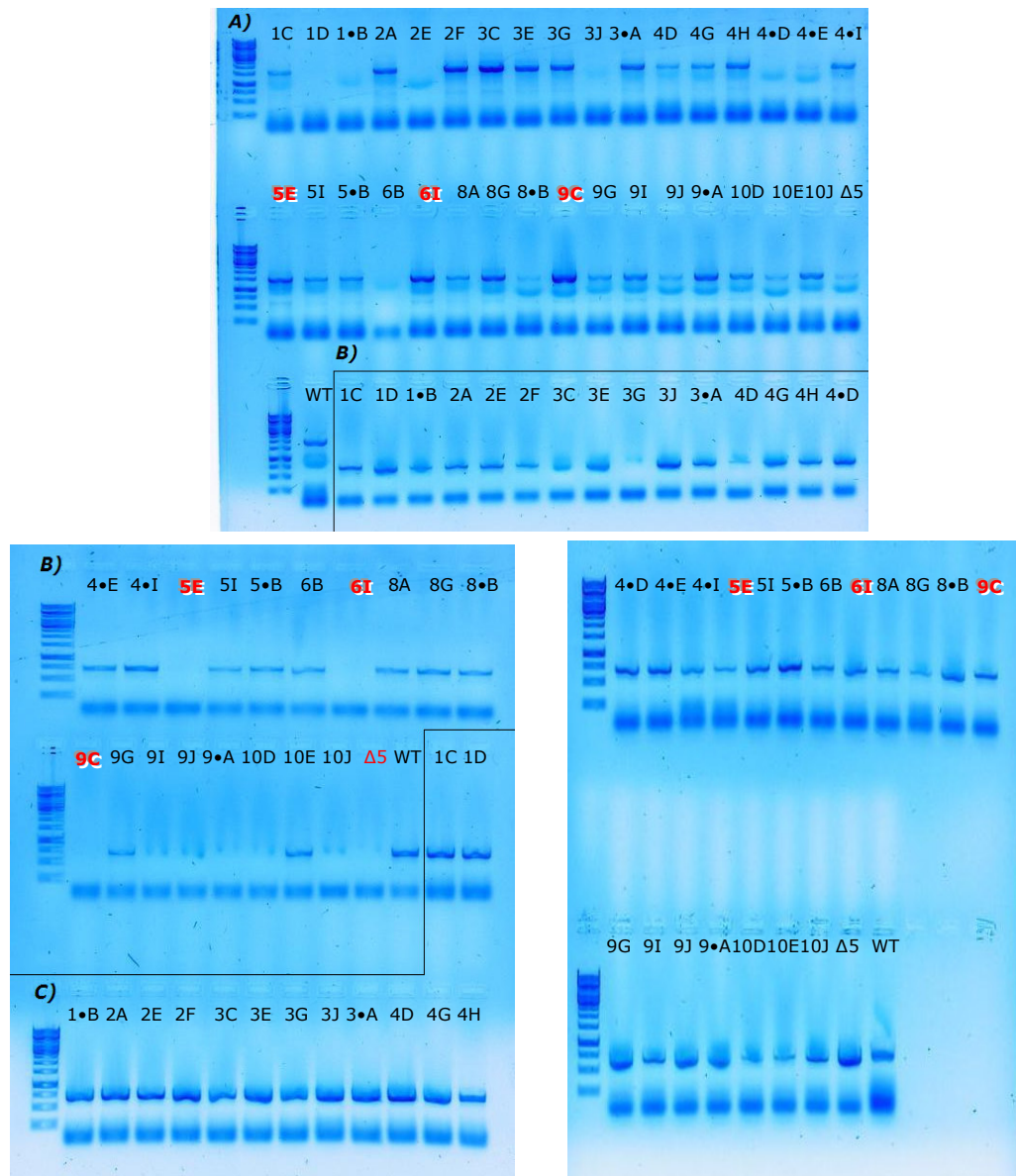
- vzorky: 33 rostlin, u kterých bylo v předchozích experimentech potvrzeno testování na homozygota *AtCKX*-KO2 (1C, 1D, 1•B, 2A, 2E, 2F, 3C, 3E, 3G, 3J, 3•A, 4D, 4G, 4H, 4•D, 4•E, 4•I, 5E, 5I, 5•B, 6B, 6I, 8A, 8G, 8•B, 9C, 9G, 9I, 9J, 9•A, 10D, 10E, 10J)

SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN KO5 A SELEKCE TRANSGENNÍ LINIE ROSTLIN

kontrolní vzorky: WT, CKX-KO5 (dále jen  $\Delta 5$ )

primery:

- ***XR2\_rev + AtCKX5\_fw***  
(LA-pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)
- ***AtCKX5\_ex4\_fw + AtCKX5\_ex5\_rev***  
(Taq-pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)
- ***AtCKX5\_rev + AtCKX5\_int4\_fw***  
(Taq-pol, 45 cyklů, 62°C, 1:30)



Obr.20: Elektroforéza po PCR při selekci homozygotní linie rostlin KO5 a selekci transgenní linie CKX5. A) kombinace primerů *XR2\_rev + AtCKX5\_fw*

(1500 bp), B) *AtCKX5\_ex4\_fw* + *AtCKX5\_ex5\_rev* (724 bp), C) *AtCKX5\_rev* + *AtCKX5\_int4\_fw* (714 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. Červeně označené vzorky jsou pozitivní na testování homozygota KO5, protože neobsahují wild-typový *AtCKX5* gen, a tedy nevzniká PCR produkt (viz Tabulka č.3). Tyto rostliny jsou stejně tak pozitivní na testování transgenityv genu *AtCKX5* (viz Tabulka č.2). U C) kombinace primerů je signál i v pozitivních vzorcích, tato kombinace primerů slouží jako kontrola, protože tyto primery jsou navrženy mimo místo inserce, a tedy vzniká PCR produkt ve všech vzorcích.

#### **9.2.4. 3.SÉRIE TESTOVÁNÍ**

- vzorky: 56 rostlin (1•C-I; 2•C-J; 5•C-J; 6•C-J; 7•C-J; 8•C-J; 9•C-J; 10•A; 7F; 7J; 8F; 9A; 10I) viz Obr.15

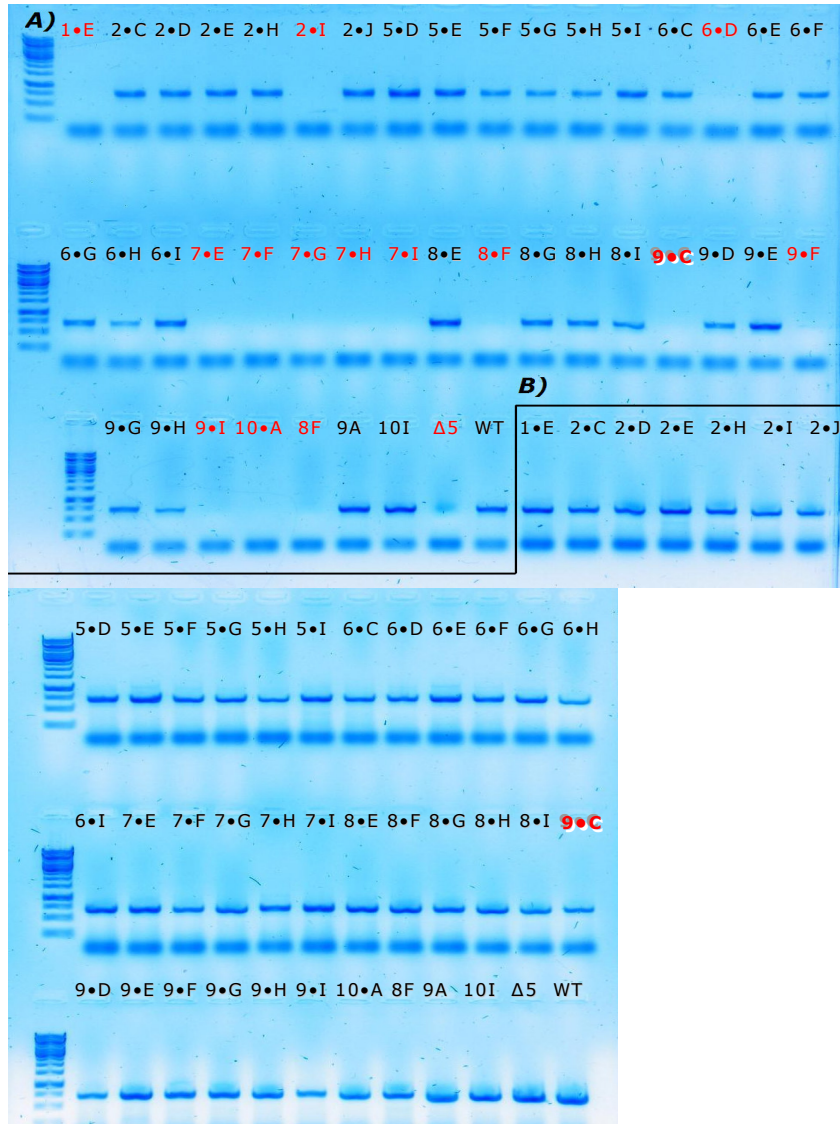
Ve 3. sérii testování byla nejdřív zvolena kombinace primerů pro selekci homozygota *AtCKX*-KO5, protože tyto primery velice dobře fungovaly v předchozím testování.

SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN KO5

kontrolní vzorky: WT,  $\Delta 5$

- primery:
- ***AtCKX5\_ex4\_fw* + *AtCKX5\_ex5\_rev***  
(*Taq-pol*, 45 cyklů, 56°C, 1:30)
  - ***AtCKX5\_rev* + *AtCKX5\_int4\_fw***  
(*Taq-pol*, 45 cyklů, 56°C, 1:30)





Obr.21: Elektroforéza po PCR při selekci homozygotní linie rostlin KO5. A) kombinace primerů *AtCKX5\_ex4\_fw* + *AtCKX5\_ex5\_rev* (724 bp), B) *AtCKX5\_rev* + *AtCKX5\_int4\_fw* (714 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. Červeně označené vzorky jsou pozitivní na testování homozygota KO5, protože neobsahují wild-typový *AtCKX5* gen, a tedy nevzniká PCR produkt (viz Tabulka č.3). U B) kombinace primerů je signál i v pozitivních vzorcích, tato kombinace primerů slouží jako kontrola.

### 9.2.5. FINÁLNÍ POTVRZENÍ VYSELEKTOVANÝCH LINIÍ DOUBLE KNOCK-OUTOVANÝCH ROSTLIN ATCKX-KO2/KO5

Z důvodů nedostatku rostlinného materiálu 2. generace byla semena 17 rostlin potvrzených ve všech sériích testování na homozygota AtCKX-KO5 vyseta na MS médium a po 14 dnech přesazena do skleníku do substrátu. Na Petriho misce se semeny vzorku 6•D byla detekována kontaminace plísní, všechna semena byla zasažena, a proto nebyla vysazena do substrátu a zahrnuta do testování.

Z každé ze 16 rostlin bylo vysazeno přibližně 10 sazenic. Tyto rostliny byly označeny jako **3.generace** *Arabidopsis thaliana* double knock-out CKX-KO2/KO5 a byly opětovně testovány metodou PCR, aby mohla být finálně selektována homozygotní linie double knock-outované rostliny *Arabidopsis thaliana*.

J	♣	♣ ♣	♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
I	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣
H	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
G	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
F	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣
E	♣ ♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
D	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
C	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣
B	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
A	♣ ♣	♣ ♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣ ♣
	1 •	2 •	3 •	4 •	5 •	6 •	7 •	8 •	9 •	10 •	

Obr.22: Červeně označené vzorky 17 rostlin 2. generace, které byly potvrzeny na homozygota AtCKX-KO5.

#### TESTOVÁNÍ 3.GENERACE ROSTLIN *Arabidopsis thaliana*

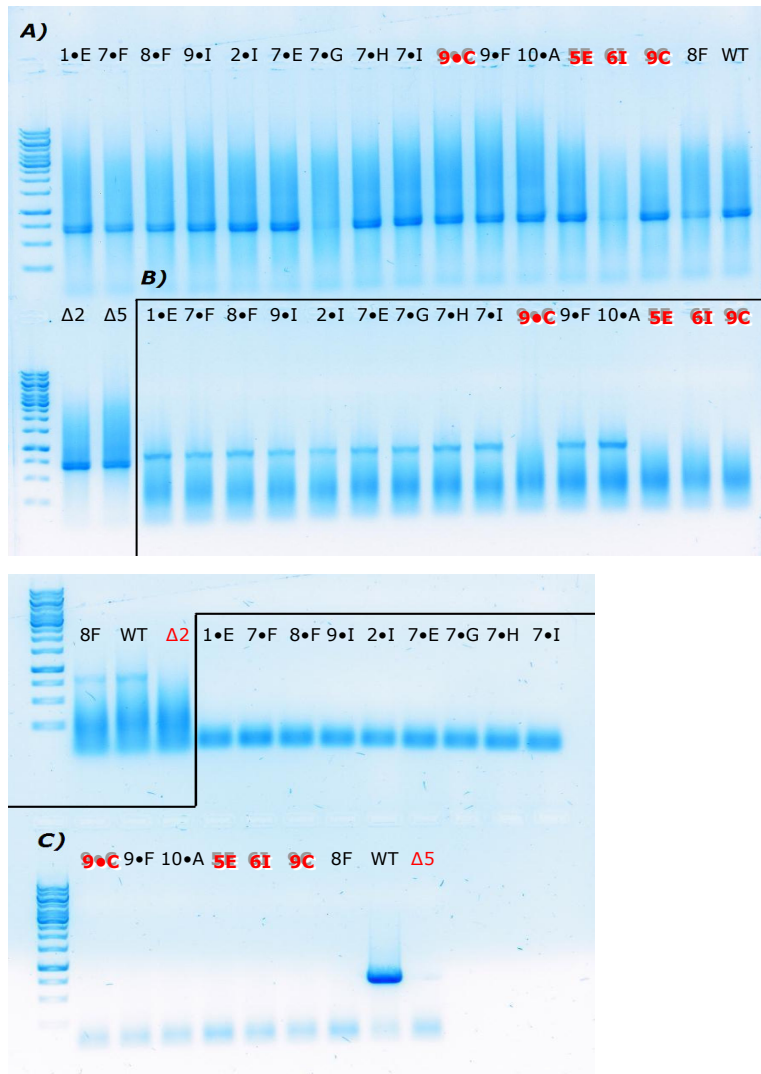
##### SELEKCE HOMOZYGOTNÍ LINIE ROSTLIN KO2 A KO5

kontrolní vzorky: WT, Δ2, Δ5

primery: □ **aktin**

(Taq-pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)

- **AtCKX2\_ex2\_rev + 319\_fw\_1S**  
(Taq-pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)
- **AtCKX5\_ex4\_fw + AtCKX5\_int4\_rev**  
(Taq-pol, 45 cyklů, 56°C, 1:30)



Obr.23: Elektroforéza po PCR při selekci homozygotní linie rostlin KO2 a KO5. A) kombinace primerů pro *aktin* (650 bp), B) *AtCKX2\_ex2\_rev + 319\_fw\_1S* (857 bp), C) *AtCKX5\_ex4\_fw + AtCKX5\_int4\_rev* (705 bp).

Bandy o velikosti menší než 250 bp jsou zbytky primerů. Červeně označené vzorky rostlin jsou homozygotní linie double-knockoutované rostliny *Arabidopsis thaliana*. A) kombinace primerů pro aktin sloužila jako kontrola, protože aktin je provozní gen a tedy by měl být detekován signál

ve všech vzorcích. B) kombinace primerů potvrzuje, které vzorky rostlin odpovídají homozygotní linii AtCKX-KO2, neobsahují wild-typový *AtCKX2* gen, a tedy nevzniká PCR produkt. C) kombinace primerů jsou navrženy pro detekci homozygotní linie AtCKX-KO5, neobsahují wild-typový *AtCKX5* gen, a tedy ve všech vzorcích nevzniká PCR produkt (viz Tabulka č.3).

#### KONTROLNÍ PCR POTVRZUJÍCÍ PŘÍTOMNOST OBOU T-DNA INSERCÍ

kontrolní vzorky: WT, Δ2, Δ5

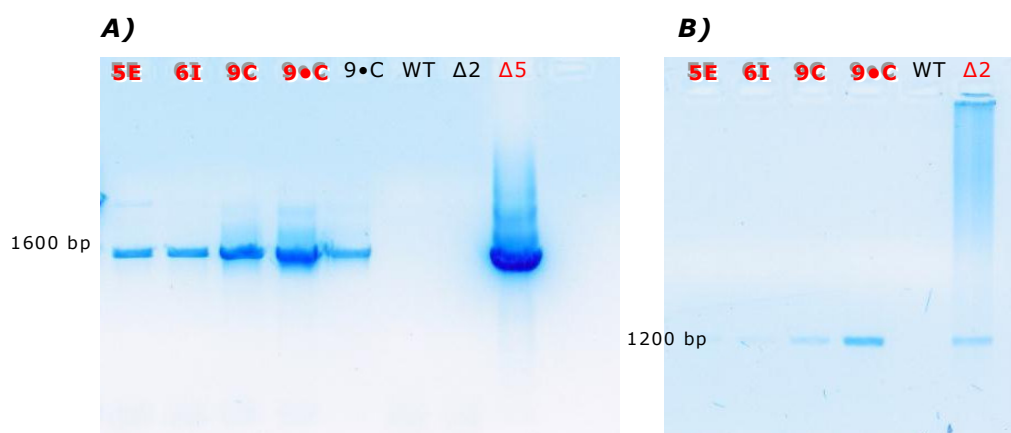
primery:

- ***XR2\_rev + AtCKX5\_full\_rev***

(*Taq pol*; 45 cyklů; 56°C; 2:45)

- ***XR2\_rev + 319\_fw\_1S***

(*Taq pol*; 45 cyklů; 56°C; 2:45)



Obr.24: Výřez z elektroforetických gelů po PCR na potvrzení transgenity všech 4 vzorků selektovaných testováním na homozygota KO2 a KO5.

A) kombinace primerů *XR2\_rev + AtCKX5\_full\_rev* (1600 bp), B) *XR2\_rev + 319\_fw\_1S* (1200 bp).

Bylo potvrzeno, že vzorky rostlin 5E, 6I, 9C a 9•C jsou transgenní, tzn. obsahují T-DNA inserci jak v genu *AtCKX2* tak *AtCKX5*.

#### CELKOVÁ ÚSPĚŠNOST SELEKCE HOMOZYGOTŮ

Z původních 184 testovaných rostlin 2. generace, byly 4 rostliny potvrzeny jako homozygotní linie double knock-outa *AtCKX-KO2/KO5 Arabidopsis thaliana*.

J	♣	♣ ♣	♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
I	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
H	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
G	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
F	♣ ♣	♣ ♣	♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
E	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
D	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
C	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
B	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣
A	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣	♣ ♣
	1 •	2 •	3 •	4 •	5 •	6 •	7 •	8 •	9 •	10 •	

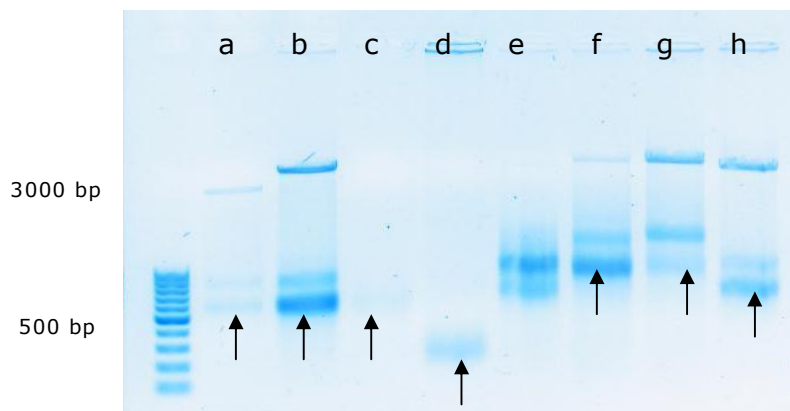
Obr.25: Celková úspěšnost selekce homozygotů. Z původních 184 rostlin byly 4 potvrzeny jako AtCKX-KO2/KO5.

### 9.3. APLIKACE METODY NORTHERN BLOT

Inserce T-DNA v genu *AtCKX2* je vložena v intronu, což má za následek, že může docházet k sestřihu a gen může být funkční. Pro ověření byla připravena RNA próba pro *AtCKX2* a použita metoda Northern blot pro vzorky, u kterých byla potvrzena homozygotní linie double knock-outa AtCKX-KO2/KO5.

#### PŘÍPRAVA ZNAČENÉ PRÓBY

- a: kontrolní RNA z kitu
- b: připravená próba pro aktin (606 bp)
- c: kontrolní próba pro aktin připravená v r. 2007
- d: próba GAPDH (407 bp)
- e: kontrolní próba GAPDH připravená v r. 2007
- f: *in vitro* transkript AtCKX2 (1502 bp)
- g: próba AtCKX2 (1502 bp)
- h: próba AtCKX5 (893 bp)



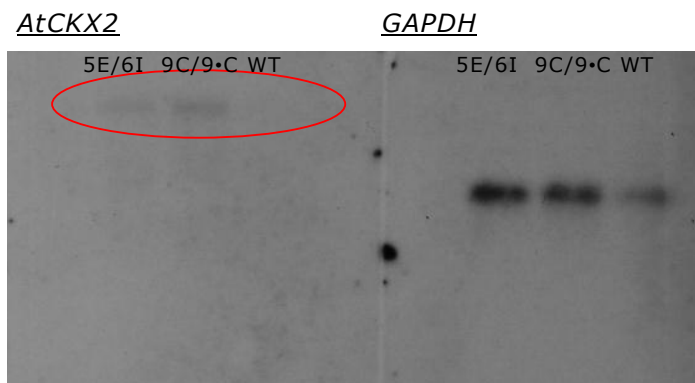
Obr.26: Kontrolní elektroforéza po přípravě značených RNA prób.

Šipky ukazují velikost odpovídající připraveným próbám. Dvojband, který vzniká u většiny vzorků je zřejmě dán tím, že nedošlo k úplné linearizaci během restrikce. Bandy větší než 3000 bp odpovídají zbytku plasmidového klonovacího vektoru. Vzorek e) představuje kontrolní próbu GAPDH připravenou v r. 2007, nevznikl zde band o správné velikosti, což je pravděpodobně dáno degradací próby. Velikosti jednotlivých bandů nemusí zcela odpovídat velikosti markeru, protože byl použit DNA marker 100 bp na vzorky RNA.

### TESTOVÁNÍ ROSTLIN 3.GENERACE METODOU NORTHERN BLOT

Expres *AtCKX2* se silně zvedá během listové senescence, proto je potřeba, aby byla RNA izolována ze senescenčních listů. Pro nedostatek rostlinného materiálu (pro izolaci mRNA je potřeba minimálně 1 g listů) byly posbírány dohromady zelené a senescenční listy z linií 5E+6I a listy z linií 9C+9•C. Jako kontrolní a srovnávací vzorek sloužily listy WT. Byla izolována mRNA. U vzorku WT se nepodařilo vyizolovat dostatečné množství kvalitní mRNA, pro detekci signálu málo abundantního genu *AtCKX2*. V senescenčních listech často bývá RNA částečně degradovaná díky vyšší přítomnosti nukleas. Byly použity značené próby pro *AtCKX2* a jako kontrolní próba pro abundantní gen *GAPDH*.

Pokud velikost transkriptu double knock-outů odpovídá velikosti transkriptu WT, dochází k sestřihu a gen *AtCKX2* je funkční.



Obr.27: Northern blot pro potvrzení velikosti transkriptu.

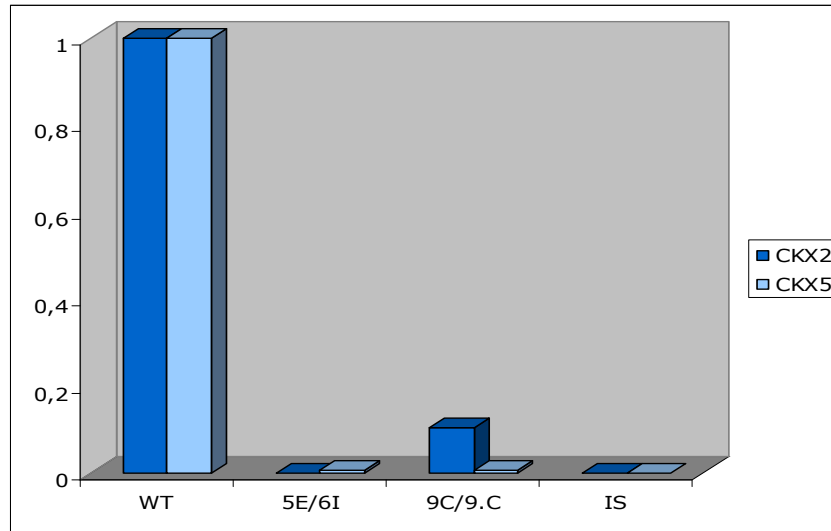
Z databáze TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) bylo zjištěno, že velikost transkriptu *GAPDH* (1745 bp) a *AtCKX2* (1667 bp) je přibližně stejná, a tedy detekovaný signál *AtCKX2* by měl přibližně odpovídat úrovni bandů *GAPDH*. Northern blot ukázal, že *AtCKX2* vytváří obrovský nespecifický transkript, který zřejmě obsahuje i neseříhané introny.

#### **9.4. APLIKACE METODY „REAL-TIME“ PCR**

Jako další metodou pro ověření, zda dochází k expresi genu *AtCKX2*, byla použita metoda „Real-Time“ PCR. Byla přepsána mRNA do cDNA a natavena PCR reakce. Jako kontrolní vzorky sloužily WT a double knock-out KO2/KO5 IS (připravený Dr. Isabela Bartrina y Manns nezávisle na naší laboratoři). „Real-Time“ PCR bylo pro každý vzorek nastaveno ve třech opakujících se sériích pro možné statistické vyhodnocení.

vzorky: cDNA 5E+6I a 9C+9•C  
získané při izolaci mRNA pro Northern blot

primery: □ ***AtCKX2\_TM\_fw + AtCKX2\_TM\_rev***  
□ ***AtCKX5\_TM\_fw + AtCKX2\_TM\_rev***



Obr.28: Graf genové exprese CKX2 a CKX5 u selektovaných homozygotních double knock-outovaných linií AtCKX-KO2/KO5 vzorků 5E/6I a 9C/9.C.

Tabulka č.4: Hodnoty a jejich směrodatné odchylky exprese CKX2 a CKX5 u selektovaných homozygotních double knock-outovaných linií.

	CKX2	CKX5
WT	1	1
5E/6I	bez exprese	0,0063±0,003215
9C/9.C	0,1050±0,055462	0,0060±0,002000
IS	bez exprese	bez exprese

Jako kontrolní vzorky byly použity WT, kdy byla exprese CKX2 i CKX5 vztažena k hodnotě 1 a double knock-out KO2/KO5 IS (připravený Dr. Isabela Bartrina y Manns, Frei University Berlin), u kterého nedocházelo k expresi CKX2 ani CKX5. U vzorku 5E/6I nedocházelo k expresi v případě CKX2 a exprese CKX5 byla 167x snížena vůči WT. U vzorku 9C/9.C byla exprese CKX2 snížena 9,5x a CKX5 167x vůči WT. Expresce tedy buď neprobíhala vůbec nebo byla výrazně snižena. Detekovaný signál CKX5 v případě obou vzorků a CKX2 ve vzorku 9C/9.C s největší pravděpodobností svědčí o nespecifické amplifikaci.



### **9.5. POZOROVÁNÍ FENOTYPU VYSELEKTOVANÉ HOMOZYGOTNÍ LINIE DOUBLE KNOCK-OUTŮ ATCKX-KO2/KO5**

Byl sledován fenotyp vyselektované homozygotní linie double knock-outů AtCKX-KO2/KO5. Kořeny byly tvořeny kořenem hlavním s kořeny postranními a délkou se nelišily od WT. Velikost listů i počet odpovídal WT. Květy drobné, v květu se nacházely tyčinky v počtu 2+4 stejně jako u WT. Plody byly čárkovité šešule dlouhé nejčastěji 12-16 mm, hnědá, lesklá semena uložená v jedné řadě. Jejich velikost byla asi 0,5 mm, odpovídající WT. U homozygotní linie double knock-outů AtCKX-KO2/KO5 nebyla pozorována oddálená senescence, jak bylo očekáváno.

## **10. ZÁVĚR**

Na základě poznatků, že u genů *AtCKX2* a *AtCKX5* byla prokázána silná exprese v průběhu listové senescence, bylo rozhodnuto, že bude připravena double knock-outovaná linie *Arabidopsis thaliana*, která bude mít právě tyto dva geny vyřazený z provozu. Byla získána transgenní linie rostlin, u které se předpokládalo výrazné oddálení senescence.

Byly získány homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* s knock-outovaným genem *AtCKX2* (SALK\_068485.17.10.x) a knock-outovaným genem *AtCKX5* (SALK\_064309.55.75.x) pomocí vloženého Ti-plasmidu. Tyto dvě linie byly navzájem zkříženy. Po samosprášení 1. generace rostlin byla získána 2. generace, která byla postupně testována a byla selektována homozygotní linie double knock-outa *AtCKX-KO2/KO5*.

Z původních 184 testovaných rostlin 2. generace byly získány 4 rostliny pozitivní jak při testování na transgenitu, to znamená, že obsahují T-DNA inserci v genu *AtCKX2* a *AtCKX5*, tak při prokázání homozygotů, kdy bylo potvrzeno, že obsahují přerušovaný gen pro *AtCKX2* a *AtCKX5*. Tyto rostliny byly potvrzeny jako homozygotní linie double knock-out *AtCKX-KO2/KO5*.

Jelikož je inserce u původní získané linie s knock-outovaným genem *CKX2* (SALK\_068485.17.10.x) vložena v intronu, bylo možné, že dochází k sestřihu intronů, což by znamenalo, že gen *AtCKX2* je stále funkční a dochází k normální expresi *CKX2*. Proto byl proveden Northern blot jako kontrolní metoda, aby bylo prokázáno nebo vyvráceno, zda transkript, který vzniká, má stejnou velikost jako WT.

Byla připravena značená RNA próba pro *AtCKX2*, vyizolována mRNA ze zelených i senescenčních listů potvrzených homozygotů knock-out *AtCKX-KO2/KO5* a WT jako kontroly.

Na základě metody Northern blot sice nemohla být srovnána velikost transkriptu získaných homozygotů s WT z důvodu nedostatečného vyizolování kvalitní mRNA z wild-typových senescenčních listů. Bylo ale zjištěno, že velikost transkriptu *GAPDH* a *AtCKX2* je přibližně stejná, a tedy detekovaný signál *AtCKX2* by měl přibližně odpovídat úrovni bandů *GAPDH*. Northern blot ukázal, že *AtCKX2* vytváří velký

nespecifický transkript, který zřejmě obsahuje i nesetřihané introny. Gen *AtCKX2* tedy s největší pravděpodobností není funkční.

Jako další metodou pro ověření, zda dochází k expresi genu *AtCKX2*, byla použita metoda „Real-Time“ PCR. Byla přepsána mRNA do cDNA a natavena PCR reakce.

Metoda „Real-Time“ PCR ukázala, že u vzorku 5E/6I exprese CKX2 neprobíhá a u vzorku 9C/9•C byla exprese CKX2 snížena 9,5x vůči WT.

Byl sledován fenotyp vyselektované homozygotní linie double knock-outů *AtCKX-KO2/KO5*. Fenotyp se nijak významně v žádném aspektu nelišil od WT linie rostlin *Arabidopsis thaliana*. U homozygotní linie double knock-outů *AtCKX-KO2/KO5* nebyla pozorována oddálená senescence, jak bylo očekáváno.

Na vyselektovaných homozygotních liniích double knock-outů *AtCKX-KO2/KO5* bude dále sledována exprese dalších členů rodiny *AtCKX* genů, což se v rámci mé diplomové práce z časových důvodů nestihlo. Bude studováno, zda dochází ke zvyšování exprese některého z nich během listové senescence a tedy, jestli dochází k jejich redundanci za knock-outované geny *AtCKX2* a *AtCKX5*.

## **12. LITERATURA**

Asad S., Mukhtar Z., Nazir F., Hashmi J.A., Mansoor S., Zafar Y., Arshad M. (2008) Silicon carbide whisker-mediated embryogenic callus transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and regeneration of salt tolerant plants. *Mol Biotechnol.* **40(2)**, 161-169.

Bae E., Bingman C.A., Bitto E., Aceti D.J., Phillips G.N. Jr. (2008) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins* **70(1)**, 303-306.

Balibrea Lara M.E., Gonzalez Garcia M.C., Fatima T., Ehness R., Lee T.L., Proels R., Tanner W., Roitsch T. (2004) Extracellular Invertase is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *Plant Cell* **16**, 1276-1287.

Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378-386.

Corn R.M., Wark A.W., Lee H.J. (2008) Multiplexed Detection Methods for profiling MicroRNA Expression in Biological Symplex. *Angew. Chem. Int.* **47**, 644 - 652.

Davis A. M., Hall A., Millar A. J., Darrah Ch., Davis S. J. (2009) Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods.* **5**, 1-7.

Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M. H., Chandrasegaran S. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research.* **33**, 5978-5990.

Farrel R.E., Jr. (2005) RNA Methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization, pp. 268, Elsevier, Academic Press, USA.

Galichet A., Hoyerová K., Kamínek M., Gruissem W. (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**, 1155-1164.

Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem* **268**, 450-461.

Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I. Schmülling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Regul* **26**, 255-267.

Gan S., Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Gan S., Amasino R.M. (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray and spray to clone and play. *Bioessays* **18**, 557-565.

Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* **17**, 615-626.

Chicas A., Macino G. (2001) Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO reports* **2(11)**, 992-996.

Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.

Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.Ch., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* **103**, 814-819.

Kristensen Ch., Morant M., Olsen C.E., Ekstrøm C.T., Galbraith D.W., Møller B.L., Bak S. (2005) Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *PNAS*. **102**, 1779-1784.

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Koyzuka J. (2007) Direkt kontrol of shoot meristem aktiviti by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.

Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direkt Activation Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21(10)**, 3152-3169.

Massonneau A., Houba-Hérin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopečný D., Majira A., Rogowsky P., Laloue M. (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany* **55(408)**, pp. 2549-2557.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 16598-16603.

Mok D.W., Mok M.C (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.

Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328-333.

Noodén L.D. (1988) The phenomena of senescence and aging. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1-50.

Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971) Conversion of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol* **48**, 775-778.

Pils B., Heyl A. (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiol* **151**(2), 782-91.

Popelková H., Galuszka P., Frébortová J., Bilyeu K.D., Frébort I. (2004) Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modelling of the flavoprotein catabolizing plant hormones cytokinins. In *Pandalai SG(ed), Recent Research Developments in Proteins, Vol.2. Kerala India: Transworld Research Network*, pp. 63-81.

Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986) Barevný atlas rostlin, pp. 38, Vydavatelstvo Obzor, Bratislava, SK.

Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Worden S.E., Mitchell J.C., Arnold N.L., Gopalan S., Meng X., Choi V.M., Rock J.M., Wu Y.Y., Katibah G.E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M.A., Blakeslee B., Greenwalt S.A., Butler H.J., Hinkley S.J., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D. (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 437-441.

Schmülling T., Werner T., Fiedler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res* **116**, 241-252.

Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. (2003) Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants, pp. 55-76, Oxford University Press Inc., New York, NY, USA.

Smart C.M. (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419-448.

Sorokin A. P., Ke X. Y., Chen D. F., Elliott M. C. (2000) Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Science* **156**, 227-233.

Šromová L. (2006) The Role of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase in Leaf Senescence, Fac. Sci., Palacký University, Olomouc, Czech Republic.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-2410.

Takei K., Yamaha T., Sakakibara H. (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 a CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.

Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K., Voytas D.F. (2009) High-frequency modification of plant genes using engineering zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 442-445.

van Leeuwen F., van Steensel B. (2005) Histone modifications: from genome-wide maps to functional insights. *Genome Biology* **6**, 113.1-113.6.

Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487-10492.

Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmülling T. (2006) New Insight into the Biology of Cytokinin Degradation. *Plant Biology* **8(3)**, 371-381.

Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 1-12.



Whitty C.D., Hall R.H. (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* **52**, 787-799.

Wu J., Kandavelou K., Chandrasegaran S. (2007) Custom-designed zinc finger nucleases: What is next?. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 2933-2944.

Yang S.H., Yu H., Goh C.J. (2003) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Mol. Biol.* **51**, 237-248.

[www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)

[www.egohabitat.com](http://www.egohabitat.com)

[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

[w3int.oru.se](http://w3int.oru.se)

## **11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

AHK	histidinkinasa <i>Arabidopsis</i>
AHP	histidinfosfotransferový protein
ARR	regulátory odpovědí uplatňující se v signální dráze cytokininů
Anti-Digoxigenin-AP	protilátka proti digoxigeninu s alkalickou fosfatase
<i>BamHI</i>	restrikční enzym z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
bp	počet bází
CAT	chloramfenikolacetyltransferasa
CSPD	disodná sůl 3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5' chloro) ricyklo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]dekan}-4-yl)fenyl fosfát
cDNA	komplementární DNA
<i>CKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu
<i>CKX-KO2</i>	knock-outovaný gen <i>CKX2</i>
<i>CKX-KO5</i>	knock-outovaný gen <i>CKX5</i>
<i>CKX-KO2/KO5</i>	double knock-outované geny <i>CKX2</i> a <i>CKX5</i>
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
DEPC	diethylpyrokarbonát
dNTP	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DSB	dvouvláknové zlomy
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
gDNA	genomová DNA
GFP	zelený fluorescenční protein
HR	homologní rekombinace
MES	2-morfolinoethanosulfonová kyselina
MOPS	3-[N-morpholino]propansulfonová kyselina
MS	Murashige a Skoog (MS) médium
NHEJ	nehomologní spojování konců
NLS	jaderný lokalizační signál
NPC	komplex jaderných pórů
PCR	polymerásová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol

PTGS	post-transkripční umlčování genů
ROX	referenční barvivo pro „Real-Time“ PCR
SDS	dodecylsírán sodný
SSC	roztok chloridu a citronanu sodného
TAE	pufr obsahující Tris-octan-EDTA
Taq-Pol	polymerasa z <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	transferová DNA z <i>Agrobacterium</i> přenášená do genomu hostitelské rostlinné buňky
TE	pufr obsahující Tris-EDTA
TGS	transkripční umlčování genů
WT	wild-type
<i>XhoI</i>	restrikční enzym z <i>Xanthomonas holcicola</i>
ZFN	nukleasy zinkového prstu
ZFP	proteiny zinkového prstu