

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

Transformace ptDNA Chlamydomonas reinhardtii

Bc. Jana Husáková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jindřich Bříza, CSc.

PřF JU a ÚMBR, BC AV ČR, v. v. i.

Školitel specialista: Mgr. Pavla Přikrylová

České Budějovice 2011

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HUSÁKOVÁ J. (2011): Transformace ptDNA *Chlamydomonas reinhardtii* [Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* ptDNA, Mgr. Thesis, in Czech.] – 65 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

The aim of this master thesis was to test and compare two available methods of genetic transformation (biolistics, electroporation) of the plastid genome of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. For biolistic transformation a wide range of experimental parameters which generally influence ptDNA transformation efficiency was optimized: physiological condition of acceptor cells, type and size of microparticles, pressure of propulsion gas (helium), length of projectile trajectory, transformation of cells directly on selective medium (containing spectinomycin 150 µg/ml) or on nonselective medium (without spectinomycin) and form of transforming DNA. In contrast to nuclear transformation ptDNA transformation of the experimental object *C. reinhardtii* by means of electroporation hadn't been described. Hence a wide range of values of different physical parameters which can significantly influence the transformation efficiency was tested.

ANOTACE

Cílem této magisterské práce bylo vyzkoušet a porovnat dvě dostupné metody genetické transformace (biolistika, elektroporace) u plastidového genomu zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Při biolistické transformaci byla optimalizována celá škála experimentálních parametrů, které obecně transformační účinnost ptDNA ovlivňují: fyziologický stav akceptorových buněk, typ a velikost použitých mikročastic, tlak hnacího plynu (hélia), délka dráhy letu mikročastic, transformace buněk přímo na selekčním médiu (obsahující spektinomycin 150 µg/ml) či na médiu neselekčním (bez spektinomycinu) a forma vnášené DNA. Na rozdíl od jaderné transformace nebyla dosud transformace ptDNA pokusného organismu *Ch. reinhardtii* prostřednictvím elektroporace popsána. Právě proto zde bylo testováno široké spektrum hodnot různých fyzikálních veličin, které mohou podstatným způsobem účinnost transformace ovlivnit.

Key words: biolistics, electroporation, *Chlamydomonas reinhardtii*, ptDNA, transformation

Tato práce byla financována granty **IAA500960903** a **GAJU 134/2010/P**.

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

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

V Českých Budějovicích, 28. 4. 2011

.....

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych ráda poděkovala především svému školiteli Doc. RNDr. Jindřichu Břízovi, CSc. za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu této práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavle Přikrylové, zejména za celkový vhled do problematiky a pomoc při prvotních experimentech. Rovněž děkuji RNDr. Haně Niedermeierové, Vlastě Tetourové a Bc. Janě Jehlíkové za pomoc a velmi přátelskou atmosféru, kterou mi na pracovišti vytvořily. Děkuji RNDr. Kateřině Bišové, PhD. za mnohé rady a obdivuhodnou vstřícnost, kterou projevila vždy, když jsem ji kontaktovala. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi byli a stále jsou nepostradatelnou oporou.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. STUDOVANÝ OBJEKT <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	3
2.1.1. <i>Chloroplastový genom (ptDNA) Chlamydomonas reinhardtii</i>	4
2.1.2. <i>Jaderný genom Ch. reinhardtii</i>	6
2.1.3. <i>Mitochondriální genom Ch. reinhardtii</i>	6
2.2. VÝHODY CHLOROPLASTOVÉ TRANSFORMACE <i>CH. REINHARDTII</i>	7
2.2.1. <i>Homologní rekombinace</i>	8
2.3. METODY TRANSFORMACE ŘAS SE ZAMĚŘENÍM NA <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	9
2.3.1. <i>Genové dělo (biolistika)</i>	9
2.3.1.1. Princip metody	9
2.3.1.2. Aplikace u řas.....	11
2.3.2. <i>Elektroporace</i>	12
2.3.2.1. Princip metody	12
2.3.2.2. Aplikace u řas.....	13
2.3.3. <i>Metoda skleněných kuliček</i>	14
2.3.3.1. Princip metody	14
2.3.3.2. Aplikace u řas.....	14
2.3.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.3.4.1. Princip metody	15
2.3.4.2. Aplikace u řas.....	15
2.3.5. <i>Shrnutí transformačních metod řas</i>	16
3. MATERIÁL A METODY	17
3.1. MATERIÁL.....	17
3.1.1. <i>Pokusné řasy</i>	17
3.1.2. <i>Transformační plazmid</i>	17
3.2. METODY.....	17
3.2.1. <i>Příprava plazmidové DNA pro transformaci</i>	17
3.2.1.1. Kultivace bakterií nesoucích plazmid.....	17
3.2.1.2. Izolace plazmidové DNA	18
3.2.1.3. Linearizace plazmidové DNA	18
3.2.1.4. Elektroforéza plazmidů.....	19
3.2.2. <i>Kultivace Ch. reinhardtii</i>	20
3.2.2.1. Složení kultivačních médií.....	20
3.2.2.2. Stanovení růstové křivky <i>Ch. reinhardtii</i> v tekutém médiu TAP	22
3.2.2.3. Stanovení citlivosti řas ke spektinomycinu.....	22
3.2.3. <i>Biolistická transformace</i>	22
3.2.3.1. Příprava řasové kultury.....	22
3.2.3.2. Sterilizace spotřebního materiálu.....	23
3.2.3.3. Příprava mikroprojektilů.....	23
3.2.3.4. Vlastní transformace	24
3.2.3.5. Souhrn testovaných podmínek.....	25
3.2.4. <i>Elektroporace</i>	26
3.2.4.1. Kultivace řas	26
3.2.4.2. Vlastní elektroporace	26
3.2.4.3. Souhrn testovaných podmínek.....	26
3.2.5. <i>Kultivace potencionálně transformovaných řas</i>	27
3.2.6. <i>Detekce přítomnosti transgenu aadA</i>	27
3.2.6.1. „Tkáňová“ PCR.....	27

3.2.6.1.1.	Použité primery	27
3.2.6.1.2.	Příprava vzorků pro „tkáňovou“ PCR	29
3.2.6.1.3.	Vlastní „tkáňová“ PCR	29
3.2.6.1.4.	Elektroforéza v agarózovém gelu	30
3.2.6.2.	Southernova hybridizace	31
3.2.6.2.1.	Příprava řasové kultury	31
3.2.6.2.2.	Izolace DNA	31
3.2.6.2.3.	Čištění izolované DNA	33
3.2.6.2.4.	Štěpení <i>Bam</i> H I	33
3.2.6.2.5.	Elektroforéza restrikčních fragmentů	33
3.2.6.2.6.	Kapilární přenos DNA na membránu	34
3.2.6.2.7.	Značení DNA sondy	35
3.2.6.2.8.	Hybridizace	35
4.	VÝSLEDKY	36
4.1.	IZOLACE A LINEARIZACE PLAZMIDOVÉ DNA PRO TRANSFORMACI	36
4.2.	KULTIVACE <i>CH. REINHARDTII</i>	37
4.2.1.	Růstové křivky <i>Ch. reinhardtii</i>	37
4.2.2.	Výběr selekční koncentrace spektinomycinu	38
4.3.	BIOLISTICKÁ TRANSFORMACE	40
4.4.	ELEKTROPORACE	45
4.5.	DETEKCE PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU <i>AADA</i>	46
4.5.1.	PCR	46
4.5.2.	Southernova hybridizace	47
4.5.2.1.	Příprava řasových kultur a izolace DNA	47
4.5.2.2.	Vlastní hybridizace	48
5.	DISKUZE	50
5.1.	BIOLISTIKA	50
5.2.	ELEKTROPORACE	53
5.3.	PCR A SOUTHERNOVA HYBRIDIZACE	53
5.4.	VOLBA PLAZMIDU	55
6.	ZÁVĚR	57
7.	POUŽITÁ LITERATURA	58

1. Úvod

Od roku **1953**, kdy pánové **J. D. Watson** a **F. H. C. Crick** v časopise *Nature* zveřejnili strukturní model dvoušroubovice DNA, v níž je zapsán nám známý život, uplynulo již téměř 60 let. Dalo by se s určitou nadsázkou říct, že právě tehdy se začala psát historie nové biotechnologické disciplíny – genového inženýrství. S přibývajícimi objevy přišla na řadu i otázka, zdali by nebylo možné do genetického kódu zasáhnout a změnit jej tak, aby daný organismus získal nové pozoruhodné vlastnosti. Za stěžejní díla lze považovat práce **Cohena *et al.* (1973)** a **Morrowa *et al.* (1974)**, jimž se jako prvním podařilo vložit cizorodou DNA do bakteriální buňky. Pro potvrzení významnosti soudobých genetických manipulací lze zmínit běžně známé příklady produkce inzulínu a somatotropinu transgenními bakteriemi či kvasinkami (**Goeddel *et al.*, 1979a; Goeddel *et al.* 1979b, Tokunaga *et al.*, 1985; Lars *et al.*, 1987**), ale i případ tzv. zlaté rýže, která byla genovými inženýry upravena tak, aby obsahovala více betakaroténu (**Ye *et al.*, 2000**). Konzumace této plodiny by pak mohla elegantně vyřešit hrozbu slepoty při deficienci vitamínu A, zejména u obyvatel rozvojových zemí (**Ondřej & Drobník, 2002**). V současnosti není takřka problém pozměnit genetickou informaci bakterií a neustále se objevují i nové pokusy o genetické transformace hospodářsky významných rostlin či dokonce živočichů. Nicméně do popředí se dostávají také velice důležité organismy spojující to nejlepší ze světa mikroorganismů a rostlin, a to jsou řasy (**Potvin & Zhang, 2010**).

Již nejstarší lidské civilizace využívaly řasy jako nepostradatelnou součást svého jídelníčku, ale až po druhé světové válce nabyla velkoplošná kultivace těchto organismů na skutečném významu. Mnohé státy byly nuceny hledat kvalitní alternativní zdroje potravy pro své rychle rostoucí populace, a právě řasy připadly zejména v přímořských oblastech jako dobré řešení (např. nori v Japonsku, Číně a Koreji nebo mořský salát ve Velké Británii, Irsku a Skandinávii). Řasy brzy pronikly do širokého spektra dalších odvětví, např. dobře známý agar, polysacharid získávaný z buněčných stěn červených řas, zejména rodu *Gelidium*, je využíván jako standardní médium pro růst mikroorganismů laboratořemi po celém světě (**Hallmann, 2007**). Řasy se dále rovněž uplatňují i v odpadním průmyslu při odstraňování dusíku a fosforu z odpadních vod, a dokonce se objevují i úvahy o využívání řas pro produkci metanu či vodíku jako alternativního paliva budoucnosti (**Melis & Happe, 2001; Pulz & Gross, 2004**). Avšak do povědomí široké veřejnosti se dnes řasy dostávají zejména díky svému vysokému obsahu vitamínů a tato jejich vlastnost je pak využívána při produkci nejrůznějších potravinových doplňků a kosmetických výrobků.

Výše popsaná atraktivnost řas může však nabývat ještě dalších rozměrů, uvážíme-li tyto prastaré organismy jako vynikající model pro genové inženýrství. Rychlý růst, krátký životní cyklus a

celkem jednoduchá laboratorní kultivace činí řasy velice dobrým experimentálním objektem pro transgenozu, o čemž svědčí i fakt, že se v posledních pár letech podařilo úspěšně geneticky transformovat již na 25 druhů řas (**Hallmann, 2007**). Genetické úpravy řas by mohly usnadnit kultivaci již stávajících kultur využívaných v potravinářském, chemickém a farmaceutickém průmyslu – např. zvýšením výnosů tzv. bioreaktorů (vodních kultur) díky ještě menším nárokům geneticky modifikovaných řas na složení médií, osvětlení a teplotu. Rovněž v odpadním průmyslu by se mohly uplatnit např. transgenní řasy se zvýšenou schopností vázat na sebe těžké kovy (**Siripornadulsil et al., 2002**). Další cestu, jak ulevit dnes tolik zatěžovanému životnímu prostředí, bychom mohli nalézt v práci **Melise a Happeho (2001)**, kteří prokázali, že již zmiňované využití řas jako obnovitelného zdroje energie se jeví u *Chlamydomonas reinhardtii* za využití metod genového inženýrství jako velice slibné. V souladu s těmito a mnoha dalšími nápady jde i idea tzv. genového farmaření, kdy by transformované řasy produkovaly ve velkém množství, a tudíž i za nižší ceny, nové či již dobře známé a široce ceněné látky pro zemědělství nebo medicínské účely (**Franklin & Mayfield 2004**). Do této skupiny by jistě spadala tvorba tzv. jedlých vakcín (**Banicki, 2004; Sayre et al., 2001**), vývoj nových léčiv (**Skulberg, 2000**), antibiotik (**Piccardi et al., 2000**) a insekticidů (**Borovsky, 2003**). Toto vskutku širokospektrální využívání řas nasvědčuje, že jsou tyto organismy právem označovány za zelené zlato současného a pravděpodobně i budoucího biotechnologického průmyslu.

Cílem mé diplomové práce bylo dostupnými metodami (genové dělo, elektroporace) vyzkoušet a porovnat transformaci chloroplastového genomu řasy *Chlamydomonas reinhardtii* jako nového modelového organismu pro experimentální činnost na oddělení Molekulární genetiky Ústavu molekulární biologie rostlin BC AV ČR, v. v. i., v Č. Budějovicích.

2. Literární přehled

2.1. Studovaný objekt *Chlamydomonas reinhardtii*

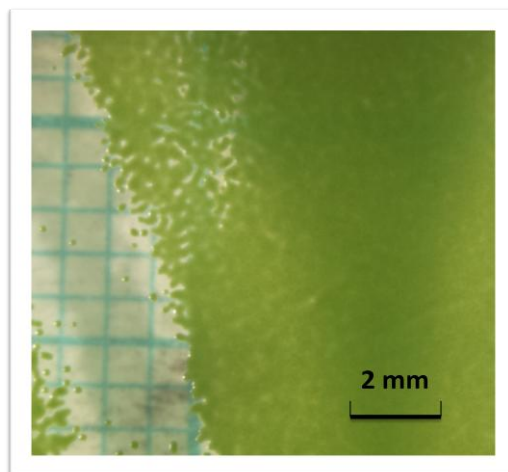
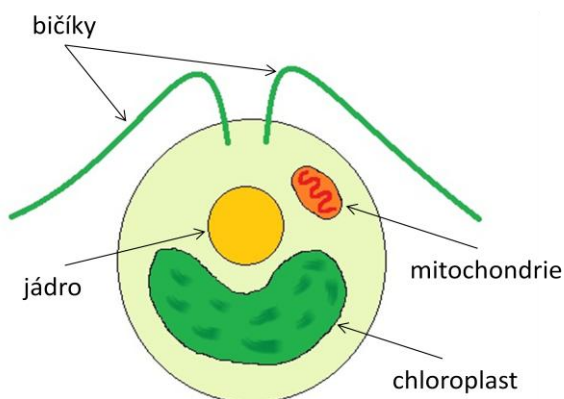
Rod *Chlamydomonas* (česky pláštěnky) patří do řádu *Volvocales* čítá přibližně na 600 druhů zelených řas vyskytujících se po celém světě ve vodě, půdě, a dokonce i sněhu (*Ch. nivalis*). *Chlamydomonas reinhardtii* byla poprvé popsána roku 1888 Dangeardem a pojmenována po ukrajinském botanikovi Ludwigovi Reinhardtovi, který v roce 1876 publikoval popis oplození u tehdy ještě neznámého druhu *Chlamydomonas*. Základní studie Ebersolda a Levina v 50. a 60. letech minulého století vedly ke konstrukci první jaderné mapy *Ch. reinhardtii* a k následnému širokému uplatnění mutantů této řasy v mnoha rozličných experimentálních pracích buněčné biologie, rostlinné fyziologie a dalších vědeckých disciplín (Harris, 2009) – např. i pro detekci genotoxického potenciálu (Podstavková *et al.*, 1992).

Ch. reinhardtii je jednobuněčná pohyblivá řasa (velikosti 10 μm) se 2 bičíky (obr. 1), jejíž tělo je pokryto bílkovinnou buněčnou stěnou zvanou *chlamys*. *Chlamydomonas* může během svého životního cyklu procházet jak pohlavním, tak i nepohlavním rozmnožováním. *Ch. reinhardtii* je řazena mezi heterothalické (existence plus a mínus gamet), izogamní (plus a mínus gamety se vzhledově neliší) řasy. Při pohlavním rozmnožování dochází ke splynutí plus („samičí“) a mínus („samčí“) pohlavní buňky. Vzniká tak zygota se čtyřmi bičíky a silnou buněčnou stěnou, odolnou vůči nepříznivým podmínkám okolního prostředí. Za vyhovujícího stavu prochází zygota meiózou a do prostředí jsou uvolněny čtyři dceřiné buňky. Naproti tomu při nepohlavním rozmnožování se parentální buňka rozdělí na 2 - 8 zoospor, které jsou rovnou uvolněny do okolí (Harris, 2009).

Ch. reinhardtii je přirozeně půdní organismus – v laboratorních podmínkách však může růst i v tekutém či na agarovém médiu s jednoduchými minerálními solemi. Výhodou *Ch. reinhardtii* oproti jiným druhům *Chlamydomonas* je její schopnost růstu ve tmě za přístupu k organickému zdroji uhlíku (Harris, 2009).

Vyjma jaderného genomu *Ch. reinhardtii* obsahuje ještě genom chloroplastový a mitochondriální (obr. 1).

Chlamydomonas reinhardtii



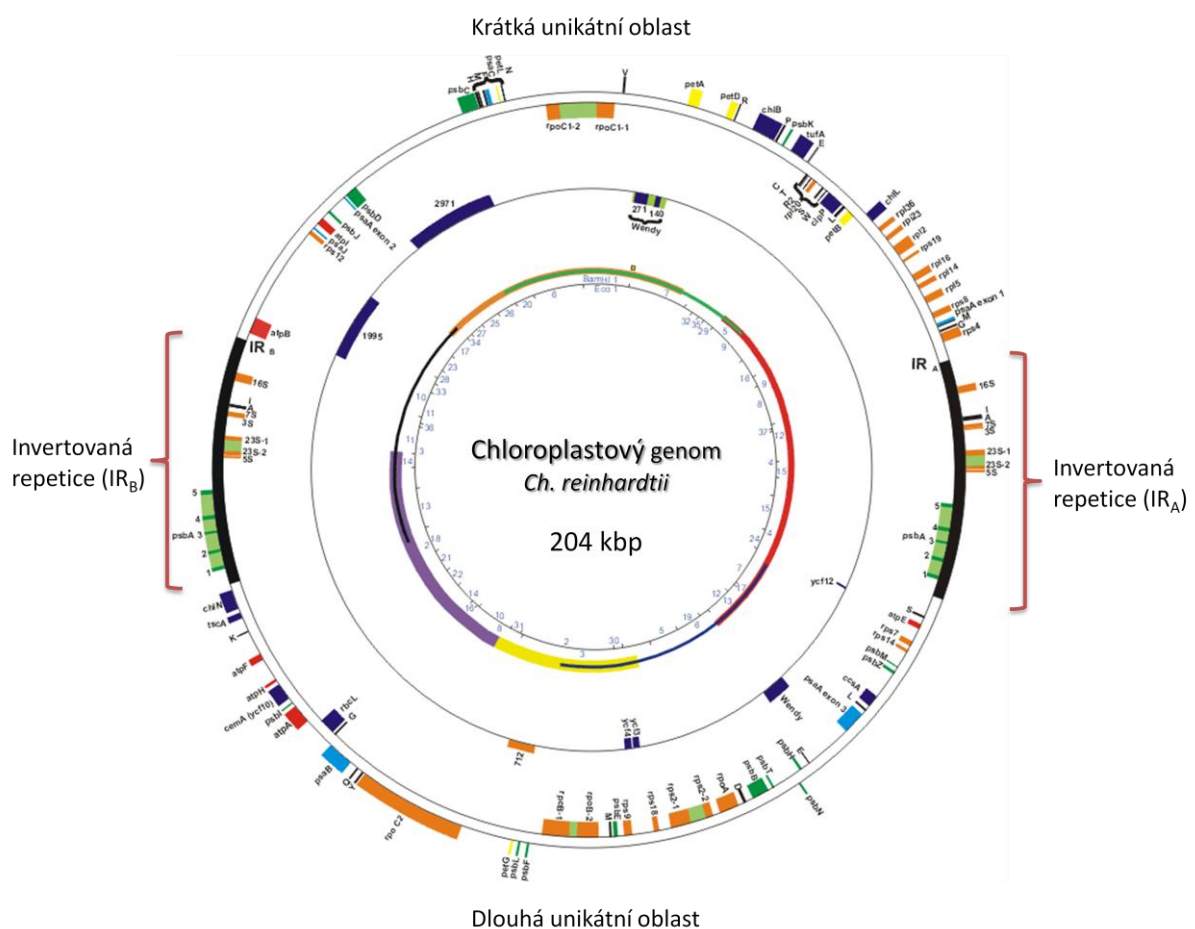
Obr. 1: Vlevo: schématický obrázek *Chlamydomonas reinhardtii* a jejích buněčných organel, které lze geneticky transformovat, vpravo: fotografie kultury *Ch. reinhardtii* na pevném médiu.

2.1.1. Chloroplastový genom (ptDNA) *Chlamydomonas reinhardtii*

Chloroplast je zelená buněčná organela nacházející se u rostlin a eukaryotických řas. Podle endosymbiotické teorie vznikl chloroplast pravděpodobně z předka dnešních sinic, který byl v průběhu evoluce pohlcen eukaryotickou buňkou (Rochaix *et al.*, 1998). *Ch. reinhardtii* má jeden velký chloroplast a chloroplastový genom je zde větší (203 828 bp), než je běžná velikost typického rostlinného chloroplastového genomu, jež činí 120 až 160 kbp (Harris, 2009). Odhadem představuje chloroplastová DNA v haploidní vegetativní buňce přibližně 14 % z celkového buněčného obsahu DNA (tj. kolem $1,72 \cdot 10^{-8}$ μg /buňku), zatímco v gametách je toto množství asi poloviční (Gillham, 1978; Whiteway & Lee, 1977). Stejně jako je tomu u většiny vyšších rostlin, má i ptDNA *Chlamydomonas* dvě unikátní oblasti oddělené invertovanými repeticemi (IR) – viz obr. 2. Chloroplastový genom existuje díky těmto dvěma poměrně velkým invertovaným repeticím ve dvou isomerických formách, a to v poměru 50:50 (Aldrich *et al.*, 1985; Palmer *et al.*, 1985). Invertované repetice mají délku 22 211 bp a obsahují kopii genu *psbA*, 5 genů pro rRNA a 2 geny pro tRNA (Maul *et al.*, 2002). Unikátní oblasti jsou téměř shodné velikosti – 81 307 a 78 088 bp (Stern, 2009). Protože hlavní funkcí chloroplastu je fotosyntéza, není zdaleka překvapivé, že většina ze 109 chloroplastových genů kóduje proteiny účastnící se tohoto procesu (NCBI, 2011). Zajímavým faktem je, že více jak 20 % plastidového genomu zaujímá repetitivní DNA, a to zejména ve formě tzv. krátkých rozptýlených

repetic, které tvoří hlavní součást mezigenových oblastí a mají pravděpodobně strukturní a evoluční význam (Maul *et al.*, 2002).

Chloroplast *Ch. reinhardtii* se začal široce využívat jako modelový systém pro studium fotosyntetických procesů (Maul *et al.*, 2002), díky čemuž se záhy chloroplastová transformace této řasy stala velice oblíbenou. Tomuto faktu napomohla i skutečnost, že celý chloroplastový genom byl sekvenován (Maul *et al.*, 2002). Základní strategie a techniky chloroplastové transformace se v podstatě od prvního úspěšného pokusu (Boynton *et al.*, 1988) téměř nezměnily, nicméně byly stále zdokonalovány (Ramesh *et al.*, 2004; Purton, 2007).



Obr. 2: Chloroplastový genom *Chlamydomonas reinhardtii*.

Zdroj: <http://www.chlamy.org/chloro/default.html>

2.1.2. Jaderný genom *Ch. reinhardtii*

Jaderný genom zaujímá velikost přibližně 121 Mbp a je rozdělen do 17 chromozomů. Genů kódujících proteiny je podle předběžné analýzy zhruba 15 000. Většina z těchto genů obsahuje introny, které jsou delší, než je běžné u jednobuněčných řas. Geny spolu se svými regulačními sekvencemi zaujímají zhruba 30 % jaderného genomu a zbývající DNA připadá na introny a mezigenové oblasti. Zhruba 350 jaderných genů řídí chloroplastové funkce (většina z nich byla původně součástí chloroplastové DNA a během evoluce se přemístila do jádra) a u více jak poloviny těchto genů není konkrétní význam zatím znám (Merchant *et al.*, 2007).

2.1.3. Mitochondriální genom *Ch. reinhardtii*

Mitochondrie se vyvinuly ze symbiotického organismu příbuzného eubakteriím (Rochaix *et al.*, 1998). Velká část mitochondriální genetické výbavy postupně vymizela, nebo se přesunula do jaderného genomu. Vzdálené mitochondriální genomy se proto často liší ve velikosti, počtu genů a jejich organizaci. Velikost mitochondriálního genomu nicméně nemusí zdaleka odrážet množství obsažených genů (Gillham, 1994). Takovým případem je právě *Ch. reinhardtii*, jejíž mitochondriální genom o velikosti 15,8 kbp obsahuje pouze 25 genů, z toho 8 pro proteiny (NCBI, 2011). Genom je lineární, s velmi krátkými intergenovými sekvencemi a bez intronů (Stern, 2009) a je složen z více kopií, které jsou organizovány do 20 - 30 tzv. nukleoidů. Tyto nukleoidy mohou měnit tvar i velikost během buněčného cyklu (Nishimura *et al.*, 1997; Hiramatsu *et al.*, 2006). Celý mitochondriální genom *Ch. reinhardtii* byl sekvenován (Boynton & Gillham, 1996) a po *Saccharomyces cerevisiae* se tato řasa stala druhým organismem, jehož mitochondrie se podařilo úspěšně transformovat, a to biolistickou metodou (Boynton & Gillham, 1996). Z počátku však transformace měly velice nízkou účinnost (Yamasaki *et al.*, 2005). Po optimalizaci metody bylo nejlepších výsledku dosaženo za použití linearizovaného plazmidu: 100 - 250 transformovaných kolonií/1 µg DNA (Remacle *et al.*, 2006).

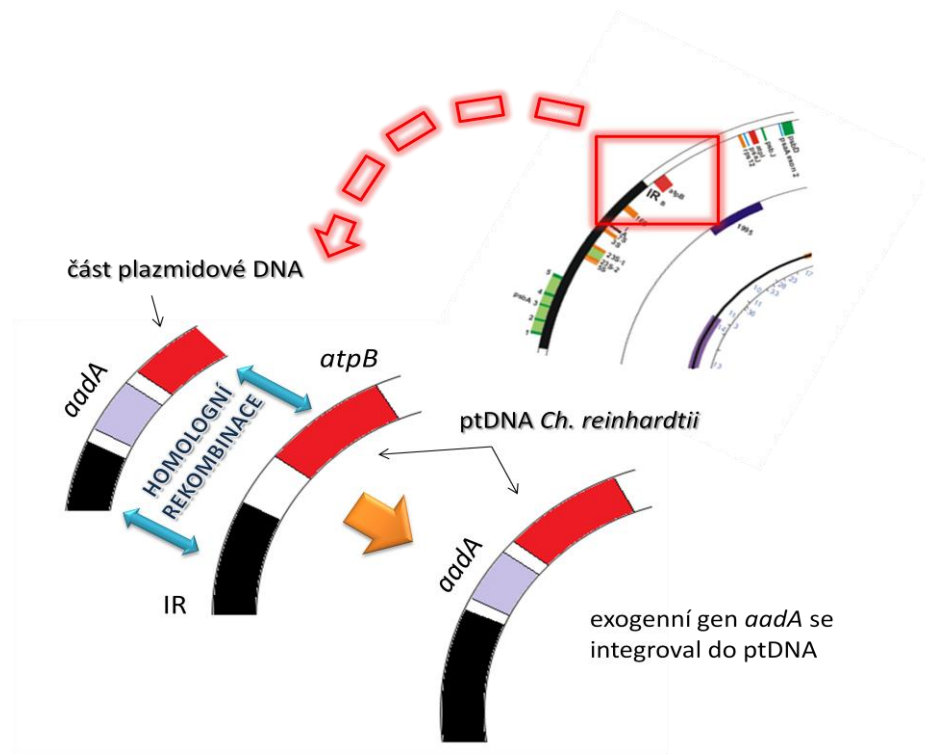
2.2. Výhody chloroplastové transformace *Ch. reinhardtii*

Geneticky transformovat lze u *Ch. reinhardtii* jak jadernou, tak chloroplastovou i mitochondriální DNA. Mitochondriální transformace je však u *Chlamydomonas* stále poměrně novým jevem, a tak jsou v současnosti významné zejména první dvě dobře zavedené transformační strategie. Hlavní důvody, proč je mnohými laboratořemi upřednostňována právě chloroplastová transformace, lze v krátkosti shrnout do následujících bodů:

1. U chloroplastu lze díky možnosti **homologní rekombinace (kap. 2.2.1)** cílit vložení transformační DNA **do předem známého místa**. Naopak u jaderné transformace je homologní rekombinace velice vzácným jevem. Cíleným vložem genu tak lze zcela eliminovat tzv. poziční efekt, který mnohdy snižuje expresi transgenů při jaderné transformaci do náhodného místa (**Paszkowski, 1994**).
2. Expres cizorodých proteinů v jádře zůstává stále nízká. Příčinami mohou kromě již zmiňovaného pozičního efektu být i tzv. umlčování genu (gene silencing), přítomnost kompaktní chromatinové struktury a nekonvenční epigenetický účinek. V chloroplastech naopak k předchozím jevům nedochází (**Heifetz, 2000**), a proto je zde **expres transgenů poměrně vysoká**. Navíc podle výsledků studie na rostlinách (**Faye & Daniell, 2006**) lze u chloroplastu předpokládat limitaci proteolytických drah, díky čemuž jsou cizí proteiny **chráněny před degradací**, a tudíž je i jejich výnos podstatně vyšší.
3. *Ch. reinhardtii* má **jeden velký chloroplast**, což podstatně ulehčuje transformační proceduru a umožňuje tak poměrně záhy získat uniformní transformovanou kulturu. Protože buňka obvykle obsahuje kolem 80 molekul chloroplastové DNA (**Stern, 2009; Scott & Mayfield, 2004**), ne všechny kopie jsou transformovány během prvotního zásahu do genomu (buňka je heteroplasmická). Řasy s transformovanými kopiemi ptDNA se proto opakovaně přenášejí na selekční médium, čímž se netransformované kopie eliminují (**Harris, 2009**). Podstatně rychleji lze homoplasmických buněk (veškeré kopie ptDNA nesou transgen) dosáhnout kultivací řasové kultury před transformační procedurou s 5-fluorodeoxyuridinem, který redukuje v buňce počet kopií ptDNA (**Wurtz et al., 1979; Boynton & Gillham, 1993**). Transformované homoplasmické řasy pak mohou díky mnoha kopiím transgenů produkovat požadovaný protein v podstatně větším množství.

2.2.1. Homologní rekombinace

Homologní rekombinace je proces, při kterém dochází ke genetické výměně mezi 2 páry homologních (podobných) sekvencí. Homologní rekombinací při plastidové transformaci se pak rozumí výměna mezi homologními úseky v plastidovém genomu, jenž má být transformován, a v transformačním vektoru, tj. nejčastěji plazmidu, který nese požadovaný exogenní gen – např. gen *aadA* způsobující rezistenci k antibiotikům spektinomycinu (spec) a streptomycinu (**obr. 3**). Transformační vektory jsou konstruovány tak, že transformační gen je z obou stran obklopen sekvencemi (tzv. flanking sekvence) z ptDNA konkrétního cílového druhu, jenž má být následně daným vektorem transformován. **Svab a Maliga (1993)** sice ve své práci striktně neurčili minimální velikost těchto sekvencí, ale s úspěchem se jim podařila transformace již se 400 b homologními úseky. Přímý důkaz existence homologní rekombinace v chloroplastovém genomu byl objeven u tabáku po fúzi protoplastů následovanou fúzí chloroplastů (**Paszkowski, 1994**).



Obr. 3: Schéma integrace exogenního genu *aadA* do chloroplastového genomu (ptDNA) *Ch. reinhardtii* prostřednictvím homologní rekombinace.

2.3. Metody transformace řas se zaměřením na *Chlamydomonas reinhardtii*

Transgenní jednobuněčné řasy nacházejí své uplatnění jak v základním výzkumu, tak i při komerčních praktických aplikacích. K selekci vznikajících transformantů slouží zejména dva hlavní selekční systémy: první systém je založen na transformaci mutovaných řas, u kterých se transgenozí obnoví původní schopnost fotosyntézy (Boynton *et al.*, 1988), naopak u druhého modernějšího systému transformované buňky získávají resistenci vůči selekčnímu antibiotiku či herbicidu (Boynton & Gillham, 1993; El-Sheekh, 2000). Ke vnášení cizorodých genů do genetického materiálu řas se stejně jako u vyšších rostlin využívá zejména biolistické a elektroporační metody, nicméně velmi oblíbenou je zde i tzv. metoda skleněných kuliček (Kindle, 1990), a s podivem se dokonce objevují i studie, kdy se daří realizovat jadernou transformaci řasy *Ch. reinhardtii* pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2004; Kumar & Rajam, 2007).

2.3.1. Genové dělo (biolistika)

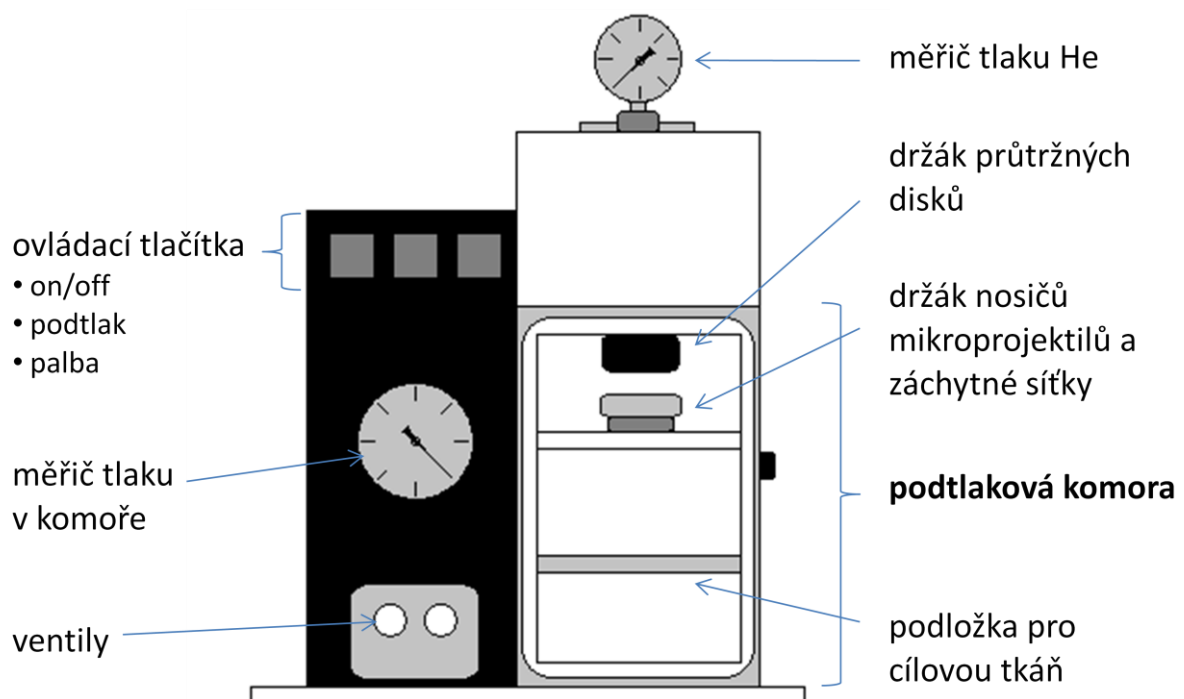
2.3.1.1. Princip metody

Biolistická transformace nebo také jinak uváděná transformace genovým dělem je jedna z nejoblíbenějších a nejvyužívanějších metod genetické transformace vůbec. Tato metoda využívá mikročastic těžkých kovů (zlata či wolframu), na jejichž povrchu je navázána transformační DNA. Lze jí geneticky modifikovat jak jadernou tak i mimojadernou (chloroplastovou, mitochondriální) DNA v téměř jakémkoliv buněčném typu, s výjimkou buněk s extrémně pevnou buněčnou stěnou (Potvin & Zhang, 2010). Ač je transformační účinnost biolistiky obvykle nízká (řada potenciálně transformovaných buněk je příliš poničena a nepřežívá), zůstává i nadále tato metoda nejúčinnějším nástrojem pro transformaci chloroplastů (Lumbreras & Purton, 1998), kdy mikročastice s DNA musejí úspěšně překonat jak buněčnou, tak i dvojitou chloroplastovou membránu.

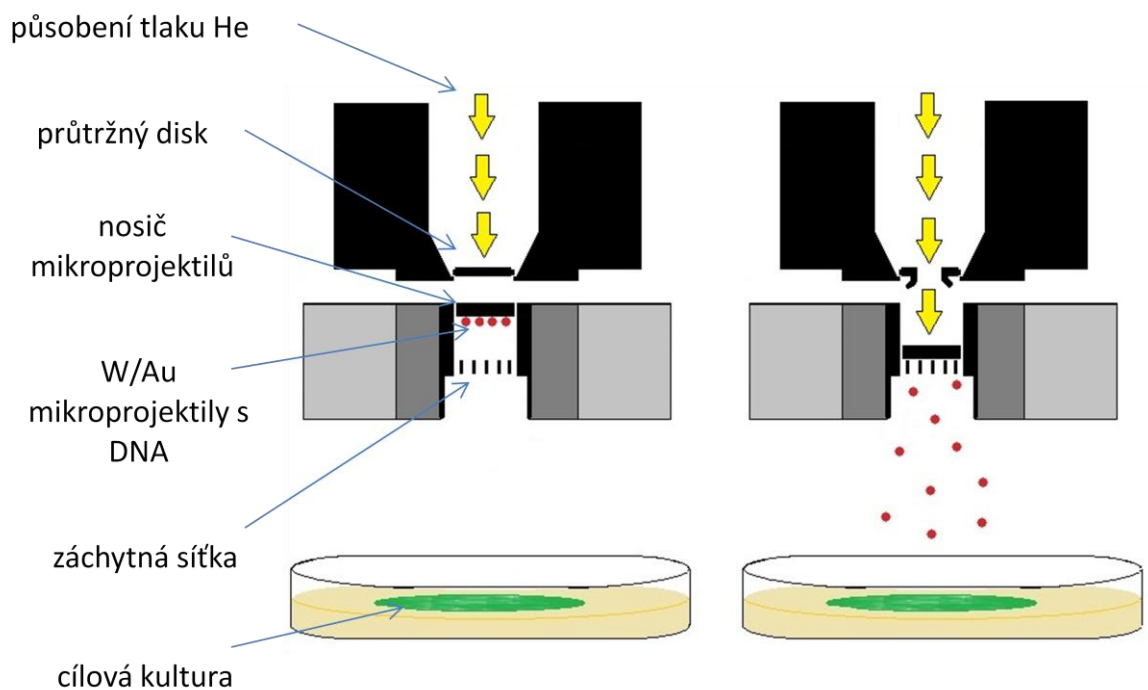
Asi nejčastěji používaným biolistickým přístrojem je PDS - 1000/He firmy Biorad (obr. 4). Díky tlaku hélia je toto zařízení schopné vystřelovat mikročastice inertních kovů přibližně rychlostí 500 m/s. Transformovaný objekt je přitom umístěn v podtlakové komoře, jež redukuje odpor vzduchu vůči letícím mikročasticím (Sanford *et al.*, 1993) – viz obr. 5. Při biolistice je zpravidla nejdůležitějším parametrem použitý materiál (zlato vs. wolfram) a velikost mikročastic (0,4 - 1,7 μm), dále pak i rychlost, jakou jsou mikročastice vystřelovány (ovlivněna tlakem He a velikostí redukce tlaku v komoře), a vzdálenost (3 - 12 cm), kterou musí mikročastice urazit k transformovanému

objektu. Volba mikročástic je do značné míry ovlivňována jejich cenou, která hovoří pro wolfram. Proti wolframu hovoří to, že jeho mikročástice bývají často nepravidelného tvaru, což může hrát do značné míry roli při degradaci transformační DNA (Russel *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993). Čím silnější buněčnou stěnu transformovaný organismus má, tím silnější tlak helia je nutné obvykle zvolit. Následnou úpravou délky dráhy mikročástic pak dosahujeme určitého kompromisu, abychom zasáhli co největší množství pokusných objektů a zároveň zajistili jejich přežití.

Před samotnou procedurou jsou řasy v exponenciální fázi růstu nanášeny na pevný podklad – různé filtry, agarové médium (Boynton *et al.*, 1988; Doetsch *et al.*, 2001; El-Sheekh, 2000). Množství řas se obvykle pohybuje např. u *Ch. reinhardtii* mezi 6 - 200 miliony buněk/1 střelu (Coll, 2006). Bombardovat lze řasy jak na médiu selekčním s obsahem antibiotika, herbicidu apod. (Ishikura *et al.*, 1999), tak na médiu neselekčním (Takahashi *et al.*, 1991), odkud se zpravidla po několika hodinách až dnech řasy spolu s filtrem přenášejí na selekční médium. Na transformaci obvykle nemá vliv, zda je exogenní DNA ve formě kruhového plazmidu či linearizovaná (Debuchy *et al.*, 1989; Mayfield & Kindle, 1990; Jarvis & Brown 1991).



Obr. 4: Náčrt biolistickeho přístroje PDS - 1000/He firmy Biorad.



Obr. 5: Schéma biolistickej transformace.

2.3.1.2. Aplikace u řas

Již na konci 80. let minulého století se **Boyntonovi et al. (1988)** podařilo jako vůbec prvním úspěšně biolisticou transformovat chloroplastovou DNA *Chlamydomonas reinhardtii*. Na stejném modelovém organismu byla s kladným výsledkem biolistika použita i při transformaci jaderné (**Kindl et al., 1989**). Následovala řada dalších zdařilých prací na řasách, za zmínku jistě stojí jaderná transformace *Volvox carterii* (**Schiedlmeier et al., 1994**), chloroplastová transformace *Chlorella kessleri* (**El-Sheekh, 1999**) a *Euglena gracilis* (**Doetsch et al., 2001**) a mitochondriální transformace *Ch. reinhardtii* (**Randolph-Anderson, 1993; Boynton & Gillham, 1996; Remacle et al., 2006; Bonnefoy et al., 2007**). Výhodou této metody je, že jí lze transformovat i řasy se značně pevnou buněčnou stěnou – např. rozsivky (**Apt et al., 1996**).

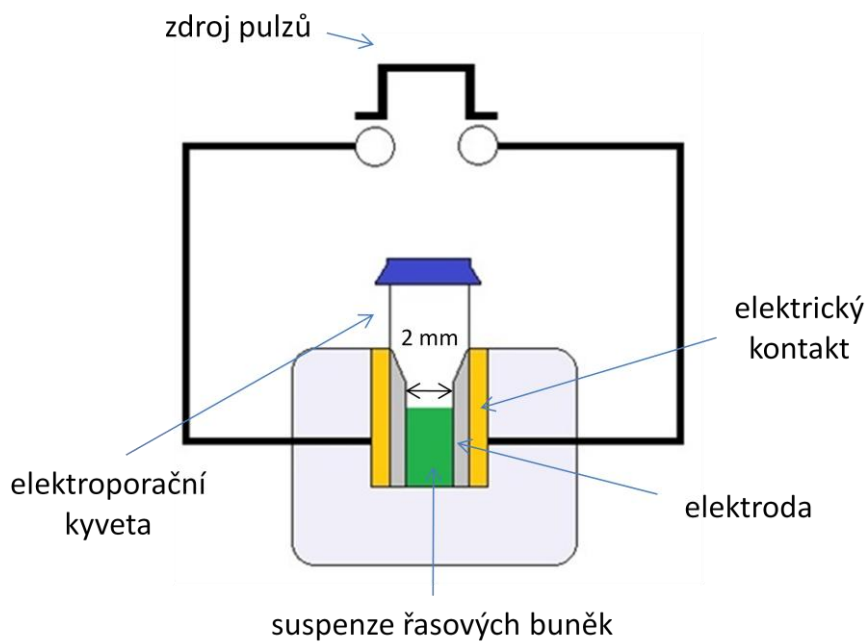
2.3.2. Elektroporace

2.3.2.1. Princip metody

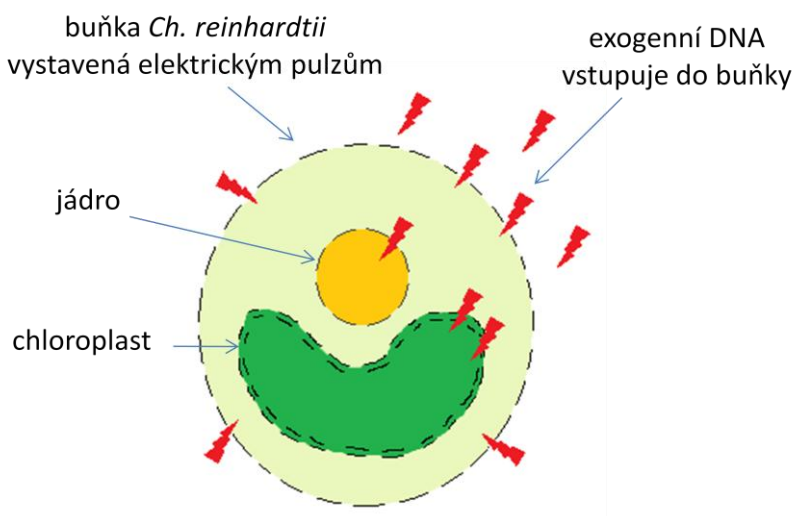
Při elektroporaci vytvářejí speciálně navržené elektrody na buněčné membráně napětí, které převyšuje její dielektrickou sílu. Krátký elektrický puls vysokého napětí ve fosfolipidické dvojvrstvě membrány dočasně vytvoří póry, jimiž mohou molekuly exogenní DNA pronikat dovnitř buňky a následně se integrovat do genomu (**Fromm et al., 1985; Van Wert & Saunders, 1992**).

Účinnost metody ovlivňuje síla elektrického pole, délka pulzu, složení média, teplota, vlastnosti membrány transformované buňky (**Brown et al., 1991**) a také koncentrace transformační DNA (**Shimogawara et al., 1998; Wang et al., 2007a**). Síla elektrického pole (V/cm) je důležitá pro formaci pórů v buněčné stěně a organelových membránách a zároveň hraje i hlavní roli pro přežívání transformovaných buněk. Délka pulzu (ms) je daná odporem média (Ω), který je výsledkem jeho iontového složení a objemu, a lze ji obvykle měnit nastavením kapacity kondenzátoru v přístroji. Koncentrace přítomných dvojmocných iontů v médiu dále působí na strukturu exogenní DNA a membránovou stabilitu transformovaných buněk (**Coll, 2006**).

U řas lze celou elektroporační proceduru rozdělit zhruba do tří etap: inkubace buněk těsně před elektrickým pulzem, aplikace elektrického pulzu (**obr. 6**) a následná fáze zahájení regenerace. První etapa je důležitá pro to, aby exogenní DNA měla možnost se dostat do kontaktu s buněčnou stěnou řasy. Mnohdy je tento krok usnadněn použitím řasy s redukovanou buněčnou stěnou (**Brown et al., 1991**), ovšem pak je pro ochranu transformovaných buněk velice vhodné nanášet řasy na pevné selekční médium v suspenzi s kukuřičným škrobem (**Shimogawara et al., 1998**). Během aplikace pulzu exogenní DNA proniká dočasnými póry dovnitř do buňky a následně do organel (**obr. 7**). Poslední krok slouží k uzavření pórů a řasy začínají postupně regenerovat. Všechny tři fáze jsou obvykle realizovány při teplotě kolem 4 °C, která nepřímo zvyšuje přežívání řas a poskytuje exogenní DNA dostatek času ke vstupu do buňky (**Chu et al., 1987**). U *Ch. reinhardtii* je nejvyššího množství přežívajících transformovaných buněk obvykle dosahováno při intenzitě elektrického pole v rozpětí 1000 - 2000 V/cm a délce elektrického pulzu 2 - 26 ms (**Brown et al., 1991**). Používané kyvety mají zpravidla tloušťku 2 - 4 mm a objem 100 - 800 μ l. Koncentrace buněk je pak 0,2 - 400 milionů buněk/ml média (**Coll, 2006**). Někdy se k transformační DNA přidává i její nosič (např. lososí sperma), který pravděpodobně zvyšuje transformační účinnost tím, že chrání exogenní DNA saturací přítomných nukleáz a zároveň blokuje nescifická DNA-vazebná místa (**Shimogawara et al., 1998**). K udržení osmolarity v médiu se obvykle používá 0,04 - 0,4 M sacharóza, sorbitol či mannitol (**Coll, 2006**).



Obr. 6: Schéma elektroporace.



Obr. 7: Nákres, jak exogenní DNA proniká dovnitř do buňky a organel póry formovanými během aplikace elektrických pulzů.

2.3.2.2. Aplikace u řas

Elektroporace se běžně využívá při jaderné transformaci např. u *Ch. reinhardtii* (Brown *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1995; Kovar *et al.*, 2002; Ladygin, 2003 & 2004), *Chlorella vulgaris* (Chow & Tung, 1999) a *Dunaliella salina* (Geng *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007b). Během velmi obsáhlé studie

elektroporace při jaderné transformaci mutantů *C. reinhardtii* bez buněčné stěny, kdy byly sledovány hlavní parametry jako síla elektrického pole (1 900 - 2 400 V/cm), kapacita (3, 10 a 35 μ F), koncentrace linearizované transformační DNA (0,5 - 50 μ g/ml) a přítomnost jejího nosiče (0 - 800 μ g/ml), osmolarita tekutého média (0 - 80 mM sacharóza) a teplota během procedury (0 - 30 °C), se po optimalizaci všech těchto parametrů podařilo dosáhnout skutečně fascinující transformační účinnosti 200 tisíc transformovaných kolonií/1 μ g DNA (**Shimogawara et al., 1998**).

2.3.3. Metoda skleněných kuliček

2.3.3.1. Princip metody

Řasy s redukovanou buněčnou stěnou lze úspěšně transformovat tzv. *metodou skleněných kuliček*. Velkou výhodou oproti předešlým metodám je, že zde nejsou požadovány žádné drahé specializované přístroje. Řasy jsou odebrány v logaritmické fázi růstu a obvykle po 30 - 100 milionech buněk/400 μ l tekutého isotonického média krátce (10 - 15 s) třepány spolu s kuličkami (\varnothing 0,4 - 0,5 mm) za přidání 25 - 50 μ g transformační DNA (**Coll, 2006**). Díky třepání s kuličkami je dosaženo přechodné průchodnosti membrány a exogenní DNA tak může vstoupit rovnou do buněčného jádra či dalších organel. K směsi řas a kuliček se někdy přidává i fúzní činidlo polyetylen glykol, díky němuž může být transformační účinnost zvýšena 5 - 12 x (**Kindle, 1990**). Při použití polyetylen glykolu mohou být také kuličky nahrazeny vlákny z karbidu křemíku (**Dunahay, 1993; Jarvis & Brown, 1991; Lohuis & Miller, 1998**). Cílovým objektem této transformační metody jsou výhradně mutované řasy s absencí buněčné stěny nebo např. u *Ch. reinhardtii* lze buněčnou stěnu odstranit pomocí autolytického enzymu (**Kindle, 1990; Nelson et al., 1994**). Řasy tento enzym za normálních okolností vylučují, aby umožnily fúzi gamet během pohlavního cyklu rozmnožování (**Harris, 2009**). Obdobně je enzymatického rozkladu buněčné stěny pro aplikaci kuliček zapotřebí také u rodu *Chlorella* (**Hawkins & Nakamura, 1999**), kdy pro transformaci dokonce není nezbytná ani samotná přítomnost kuliček (**Jarvis & Brown, 1991; Kim et al., 2002**).

2.3.3.2. Aplikace u řas

Tzv. *metoda skleněných kuliček* byla jedním z prvních způsobů úspěšné transformace jaderné genetické informace *Ch. reinhardtii*, kdy se navzdory poměrně vysoké mortalitě podařilo dosáhnout i významné transformační účinnosti až 1000 transformovaných kolonií/1 μ g DNA (**Kindle, 1990**). Snad také právě proto se brzy stala tato jednoduchá a dobře reprodukovatelná technika velmi

oblíbenou a široce rozšířenou metodou pro jadernou transformaci řas. V zápětí byly však skleněné kuličky vyzkoušeny i pro transformaci chloroplastu *Ch. reinhardtii* a dosažená transformační účinnost byla rovněž uspokojivá, a to 50 transformovaných kolonií/1 μ g DNA (Kindle *et al.*, 1991). Celková úspěšnost transformace skleněnými kuličkami byla podpořena i prací Fenga *et al.* (2009), kterým se podařilo prokázat, že u *Dunaliella salina* je díky této metodě možné získat daleko více transformovaných buněk než při biolisticce. O kladném výsledku ovšem významně rozhoduje použití řas s redukcí buněčné stěny. Právě tento předpoklad z důvodu obrovské komplexnosti a rozmanitosti ve stavbě buněčných stěn značně komplikuje schopnost geneticky transformovat řadu druhů řas.

2.3.4. *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.4.1. Princip metody

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní patogenní půdní bakterie, která indukuje proliferaci buněk a vznik nádorů u širokého spektra rostlin (Ondřej & Drobník, 2002). *Agrobacterium* v podstatě přetváří rostlinná pletiva pro svou potřebu. Kromě běžného bakteriálního chromozomu obsahuje i tzv. Ti (tumor indukující) plasmid, který zodpovídá za její virulentnost. Část Ti plazmidu tzv. T-DNA (transferovaná DNA) vstupuje při napadení rostliny do buňky a následně se integruje do jejího jaderného chromozomu (Zaenen *et al.*, 1974). T-DNA jednak obsahuje geny nové cesty biosyntézy rostlinných hormonů, které způsobují diferenciaci rostlinných buněk, a jednak geny pro syntézu nádorově specifických látek, tzv. opinů, které slouží bakterii jako zdroj uhlíku a dusíku (Ondřej & Drobník, 2002). Metodami genového inženýrství bylo *Agrobacterium* upraveno tak, aby si plně zachovalo schopnost přenosu genů do napadené rostliny, ale přitom plnilo funkci trojského koně a přenášelo geny, které mu do dědičné informace podsunul člověk.

2.3.4.2. Aplikace u řas

Transformace pomocí Ti plazmidu *Agrobacterium tumefaciens* je u řas teprve ve svých počátcích a je zapotřebí tuto techniku ověřit nezávislými vědeckými skupinami. Kumar *et al.* (2004) prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* úspěšně transformoval jadernou DNA *Ch. reinhardtii* geny *uidA* (β -glukuronidáza), *gfp* (zelený fluorescenční protein) a *hpt* (hygromycin fosfotransferáza) a dosáhl uspokojivé transformační účinnosti až 350 transformovaných kolonií na milion pokusných buněk. Další průkopnické práce Kumara a Rajama (2007) a Kathiresana *et al.* (2009) jsou příslibem,

že po potřebné optimalizaci bude pravděpodobně možné použít *Agrobacterium* i pro transformaci dalších druhů řas.

2.3.5. Shrnutí transformačních metod řas

Všem transformačním metodám je společné, že řasy se obvykle pro experiment odebírají v exponenciální či pozdně exponenciální fázi růstu (Mayfield & Kindle, 1990; Doetsch *et al.*, 2001). Velkou výhodou v metodě skleněných kuliček je, že prakticky nevyžaduje žádná nákladná specializovaná zařízení, nicméně potřeba transformovat řasy s redukovanou buněčnou stěnou bývá u mnoha druhů řas poměrně komplikovanou záležitostí (Coll, 2006). Pro jadernou transformaci se běžně využívá jak elektroporace, tak skleněných kuliček a nově se objevují i studie s *Agrobacterium tumefaciens*. Naproti tomu při transformaci chloroplastové se obvykle upřednostňuje metoda biolistická. Všechny metody disponují značným množstvím proměnných, které mohou hrát v transformaci podstatnou roli, např. přítomnost nosiče exogenní DNA u biolistiky nemá vliv (Kindle *et al.*, 1989), naopak při elektroporaci či transformaci pomocí skleněných kuliček je transformační účinnost vyšší (Shimogawara *et al.*, 1998). Souhrnně je ovšem pro dosažení co nejvyšší úspěšnosti všech jmenovaných transformačních metod vždy nejpodstatnější kompromis mezi zásahem co největšího množství buněk a jejich schopností tento zásah přežít. **Tab. 1** přináší celkový pohled na současnou aplikovatelnost metod pro transformaci různých organel řas a jejich hlavní omezení.

Tab. 1: Uplatnění metod jaderné, chloroplastové a mitochondriální transformace řas a jejich hlavní omezení

		biolistika	elektroporace	skleněné kuličky	<i>A. tumefaciens</i>
transformace	jaderná	✓	✓	✓	✓
	chloroplastová	✓	x	✓	x
	mitochondriální	✓	x	x	x
omezení	nutnost redukce buněčné stěny	x	x	✓	x
	nákladné vybavení	✓	✓	x	x

3. Materiál a Metody

3.1. Materiál

3.1.1. Pokusné řasy

Standardní kmen řasy *Chlamydomonas reinhardtii* 137C+ (komerční označení: CCAP 11/32C) byl získán z CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), Scottish Marine Institute, Oban, Argyll, UK.

3.1.2. Transformační plazmid

Pokusné řasy byly geneticky transformovány komerčně dostupným plazmidem P-740, který navrhli Fargo *et al.* (1998) pro standardní chloroplastovou transformaci *Ch. reinhardtii*, z Chlamydomonas center (www.chlamy.org). Tento plazmidový konstrukt na bázi pUC18 obsahuje gen *aadA* (adenosyl-3'-adenyltransferáza) z *E. coli* ohraničený *atpB* 5'a *rbcl* 3'UTR sekvencemi z *C. reinhardtii*. Integrace genu *aadA* do chloroplastového genomu je zajištěna homologní rekombinací se sekvencemi ležícími na konci invertované repetice B (IR_B) a začátkem krátké unikátní sekvence. Úspěšně transformované řasy následně získávají díky produkci enzymu adenosyl-3'-adenyltransferáza rezistenci k antibiotikům spektinomycinu a streptomycinu (Svab *et al.*, 1990).

3.2. Metody

3.2.1. Příprava plazmidové DNA pro transformaci

3.2.1.1. Kultivace bakterií nesoucích plazmid

Zásobní kulturu bakterie *E. coli* nesoucí transformační plazmid P-740 (uchovávanou v -70 °C) jsem napěstovala na pevném LB médiu (tab. 2) s ampicilinem (100 µg/ml) v termostatu

při 37 °C za 24 hod. Poté jsem bakterie přeočkovala na nové LB médium s ampicilinem pomocí tzv. křížového roztěru a opět nechala kultivovat za stejných podmínek. Inokulací jedné narostlé kolonie do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem (100 µg/ml) jsem připravila startovací bakteriální kulturu třepanou při 140 rpm, 37 °C, 5 hod. Ze startovací kultury jsem vždy použila 100 µl inokulum na 50 ml tekutého LB média s ampicilinem a nechala třepat 12 hod. (160 rpm, 37 °C). Z takto narostlých bakteriálních kultur jsem poté izolovala plazmidovou DNA, která posloužila k následným transformačním experimentům.

Tab. 2: Složení LB (Luria - Bertani) média (1 l)

1 % pepton	10 g
0,5 % kvasničný extrakt	5 g
1 % NaCl	10 g
pH upraveno na hodnotu 7 pomocí 1 N NaOH	

Pozn. Sterilizace probíhala v autoklávu (121 °C, 20 min.).

Pro pevná média byl agar přidán před sterilizací na výslednou koncentraci 1,5 %.

Ampicilin (zásobní roztok 100 mg/ml) byl přidán po sterilizaci do média zchlazeného na zhruba 60 °C ve flowboxu na výslednou koncentraci 100 µg/ml.

3.2.1.2. Izolace plazmidové DNA

Transformační plazmidovou DNA jsem izolovala pomocí soupravy Qiagen® Plasmid Midi (Qiagen) nebo Nucleobond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) vždy podle příložených návodu. Koncentraci takto získané DNA jsem zjišťovala pomocí spektrofotometru Quant II (Pharmacia Biotech). DNA jsem zředila sterilní destilovanou vodou (SDW) na pracovní roztoky o koncentraci 1 µg/µl a ty byly uchovávány do dalšího použití při - 20 °C.

3.2.1.3. Linearizace plazmidové DNA

Pro jeden z dílčích transformačních experimentů jsem plazmidovou DNA linearizovala pomocí restriční endonukleázy *Xmn* I, která v sekvenci GAANN/NNTTC jednou štěpí všechny plazmidy nesoucí rezistenci k ampicilinu. K 20 µl pracovního roztoku DNA (1 µg/µl) jsem přidala:

5 µl *Xmn* I (50 U) 20 µl příslušného pufru 2 µl BSA (10 mg/ml) 153 µl SDW (celkový objem 200 µl)

Směs jsem mírně poklepala prstem, stočila (4 s) a uložila na 3 hod. do termostatu (37 °C).

Linearizovanou DNA jsem přečistila podle následujícího návodu:

- přidat 200 µl chloroformu a 20 µl 3 M octanu sodného
- vortexovat (max., 1 min.), stočit (13 500 rpm, 4 min.)
- opatrně odsát vodnou fázi do nové mikrozkuhavky a k ní přidat 2/10 objemu 10 M octanu amonného a trojnásobek objemu 100 % etanolu (HPLC, Merck)
- ponechat po dobu \geq 45 min. při - 70 °C
- stočit (13 500 rpm, 7 min.), odsát supernatant (DNA zůstává přichycena ke zkuhavce)
- promýt 70 % etanolem (HPLC), následně odsát etanol a nechat vysušit
- rozpustit ve 20 µl SDW a uložit do - 20 °C

3.2.1.4. Elektroforéza plazmidů

Úspěšnost izolace a případné linearizace plazmidu jsem kontrolovala pomocí elektroforézy v 0,8 % agarózovém gelu (agaróza pro DNA elektroforézu, Serva) v TAE pufru (**tab. 3**). Jako velikostní standard jsem při izolaci plazmidu použila 1 µl superspiralizované DNA (Invitrogen) a při jeho linearizaci 5 µl lineární DNA (New England Biolabs - NEB). Plazmidovou DNA jsem nanášela ve 3 různých objemech (3, 1 nebo 0,5 µl), přidala 2 µl vkladacího pufru (NEB) a doplnila SDW na 12 µl. Elektroforéza probíhala při napětí 40 V po dobu 5 hodin. DNA v gelu byla následně barvena přidáním ethidium bromidu do TAE pufru (0,5 g/l) za jemného míchání po dobu 30 min. Gel jsem vyfotografovala na UV transluminátoru pomocí zobrazovacího systému ImageStore 5 000 (UVP).

Tab. 3: Složení zásobního roztoku TAE

100 x TAE pufr (200 ml)	
Tris	97 g
EDTA	15 g
Ledová kyselina octová	16 ml (přidat po rozpuštění zahřátím předchozích dvou složek a pomocí dalších cca 4 ml doladit pH na hodnotu 8)

3.2.2. Kultivace *Ch. reinhardtii*

3.2.2.1. Složení kultivačních médií

Pokusné řasy určené k experimentálním účelům jsem pěstovala v tekutém či na pevném (2 % agar, Duchefa Biochemie) médiu TAP (**tab. 4**). Zásobní kultura řas byla uchovávána na pevném (2 % agar) médiu HS (**tab. 5**). Ke kultivaci řas v tekutém médiu sloužily Erlenmayerovy baňky provzdušňované na třepačce či probublávané plastové válce – viz **kap. 3.2.2.2**. Pro pevné médium jsem použila sterilní plastové Petriho misky (Ø 90 mm, 20 ml média). Veškerá připravená média byla sterilizována v autoklávu (121 °C, 20 min.) a u selekčních médií bylo po zchladnutí sterilně přidáno antibiotikum (spektinomycin).

Tab. 4: Složení média TAP (TrisAcetate-Phosphate)

TAP (1 l) – Gorman a Levine (1965)	
5x Beijerinckovy soli	10 ml
Fosfátový roztok	8,33 ml
Tris-acetát	10 ml
Hutnerovy mikroprvky	1 ml

Složení zásobních roztoků	
5x Beijerinckovy soli (1 l) – sterilizace filtrací	
NH ₄ Cl	40 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5 g
MgSO ₄ · 2 H ₂ O	10 g
Fosfátový roztok (1 l) – sterilizace filtrací	
K ₂ HPO ₄ (bezvodý)	14,34 g
KH ₂ PO ₄ (bezvodý)	7,26 g
Tris-acetát (1 l) – sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.)	
Tris (base)	242 g
Ledová kyselina octová	100 ml
Hutnerovy mikroprvky (Hutner's Trace Elements)	
Komerční dodavatel: www.chlamy.org (Hutner <i>et al.</i> , 1950)	

Tab. 5: Složení média HS (High Salt)

HS (1 l) – Sueoka (1960) – upraveno podle Bišové (ústní sdělení, MBÚ, Třeboň)

Roztok č. 1	10 ml
Roztok č. 2	10 ml
Roztok č. 3	0,5 ml
Roztok č. 4	1 ml
2 M Tris (base)	10 ml

pH upraveno na hodnotu 6,7 - 7,2 pomocí koncentrované HCl, sterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 min.), poté sterilně přidáno 5 ml roztoku č. 5

Složení zásobních roztoků:

Roztok č. 1 (1 l) – sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.)

NH ₄ Cl	50g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2g

Roztok č. 2 (1 l) – sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.)

MgSO ₄ .7H ₂ O	20g
Chelatonát železito-sodný	1,84g

Roztok č. 3 (1 l) – sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.)

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5g
---	----

Roztok č. 4 (1 l) – sterilizace filtrací

H ₃ BO ₃	3,086g
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,180g
CoSO ₄ .7H ₂ O	1,404g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,244g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,430g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,840g

Roztok č. 5 (1 l) – sterilizace filtrací

KH ₂ PO ₄	72g
K ₂ HPO ₄	134g

2 M Tris (base) (1 l) – sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.)

Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	242g
---	------

3.2.2.2. Stanovení růstové křivky *Ch. reinhardtii* v tekutém médiu TAP

Stanovení růstové křivky *Ch. reinhardtii* bylo důležité pro získání představy o vhodné době kultivace řasy v našich laboratorních podmínkách pro následné transformační experimenty. Vyzkoušela jsem dvě varianty dostupných kultivačních nádob:

- 1) Erlenmayerovy baňky (objem 250 ml, 100 ml média)
- 2) probublávané plastové válce (objem 1 l, 300 ml média).

Startovací inokulum řas bylo vždy velikosti očka bakteriologické kličky (\varnothing 4 mm). Řasy jsem kultivovala v tekutém médiu TAP za kontinuálního osvětlení (1 700 lx) a třepání (120 rpm., pouze pro variantu Erlen. baňky) při teplotě 23 °C, ve čtyřech opakováních pro Erlen. baňky a dvou opakováních pro válce. Vždy po 24 hod. kultivace jsem sterilně odebírala 200 μ l narostlé kultury řas, pod mikroskopem (zvětšeno 160 x) zkontrolovala vitalitu buněk a pro následný výpočet jsem buňky inhibovala přidáním 2 μ l Lugolova roztoku. Buňky jsem spočítala pomocí hemocytometru, a to vždy ve dvou odběrech z každého opakování obou variant. Získané množství buněk jsem přepočítala na průměrný počet buněk v 1 ml média a vytvořila růstové křivky pomocí programu Findgraph (Uniphiz Lab Software).

3.2.2.3. Stanovení citlivosti řas ke spektinomycinu

Citlivost řasy *Ch. reinhardtii* k selekčnímu antibiotiku spektinomycinu byla stanovena na pevných médiích TAP a HS umístěných v termostatickém boxu (Sanyo) při osvětlení 8 000 lx, fotoperiodě 16 : 8 (16 hod. světlo : 8 hod. tma) a 22 °C. Zvolila jsem celkem 8 koncentrací antibiotika: 0 (pozitivní kontrola), 10, 25, 50, 100, 150, 200 a 300 μ g/ml média a pro každou variantu čtyři opakování. Kontrolu nárůstu jsem provedla po 1 měsíci kultivace a na základě výsledků stanovila nejvhodnější typ média (TAP vs. HS) a koncentraci spektinomycinu pro selekci transformovaných kolonií.

3.2.3. Biolistická transformace

3.2.3.1. Příprava řasové kultury

Řasy ze zásobní kultury na pevném médiu jsem standardně kultivovala v tekutém médiu TAP v Erlen. baňkách provzdušňovaných na třepačce nebo v probublávaných válcích (**kap. 3.2.2.2**) 60, resp. 96 hod. Po této době kultura dosáhla nárůstu 2 - 3.10⁶, resp. 5 - 7.10⁶ b/ml média. Přesnou

koncentraci buněk jsem zjistila pomocí hemocytometru a pod mikroskopem zkontrolovala jejich vitalitu. Poté jsem řasy zahustila na $6 \cdot 10^7$, resp. $3 \cdot 10^8$ b/ml média centrifugací při 5 000 rpm, 4 min., 4 °C. Z takto připravené kultury jsem sterilně nanášela večer či dvě hodiny před transformací 300 µl suspenze na Petriho misku – při použití neselekčního TAP média (bez spektinomycinu) na membránový filtr (0,22 µm, Ø 47 mm, Durapore™ membrane filters, Millipore) položený na povrch média, při použití selekčního média (koncentrace spektinomycinu 150 µg/ml) přímo na agarové médium. Pomocí pipety jsem vytvořila vrstvu řas kruhového tvaru (cca Ø 4 cm) a nechala podle potřeby 30 - 45 min. zasychat ve flowboxu. Řasy nanášené večer před transformací na selekční médium byly pro zpomalení metabolických procesů uchovávány přes noc ve tmě při 10 °C.

3.2.3.2. Sterilizace spotřebního materiálu

Pro biolistickou transformaci je nutné vždy předem sterilizovat veškeré pomůcky:

- sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min.): kovový držák pro průtržné disky, kovové záchytné sítě a držáky pro nosiče mikroprojektilů, nosiče mikroprojektilů
- sterilizace 70 % etanolem: vnitřní plastové rozebíratelné součásti přístroje (ponořením na alespoň 30 min.) a vakuová komora (důkladným otřením buničitou vatou)
- sterilizace 70 % isopropanolem: průtržné disky (několik vteřin)

3.2.3.3. Příprava mikroprojektilů

Pro biolistickou transformační metodu jsem používala celkem tři typy mikroprojektilů: **wolframové** velikosti 1,1 µm, **zlaté** velikosti **1,0 µm** a **zlaté** velikosti **0,6 µm**. Příprava mikroprojektilů probíhala vždy sterilně podle následujícího návodu:

- protože zlaté částice mohou vázat značné množství vody, je nutné je předem ponechat přes noc (12 hod.) při 180 °C
- na analytických vahách do 1,5 ml mikrozkuřavky odvážit 9 mg částic zlata nebo wolframu (předpokládané množství pro 12 střel, bereme v úvahu i ztráty během přípravy)
- přidat 1 ml 100 % etanolu (HPLC) a intenzivně vortexovat 3 - 5min.
- nechat stát 15 min., stočit (5 s) a opatrně odstranit supernatant
- přidat 1 ml SDW a vortexovat 1 min., nechat 1 min. sedimentovat, opět stočit (5 s) a opatrně odstranit supernatant
- předchozí promývací krok s SDW opakovat ještě 2 x
- k mikroprojektilům přidat 100 µl sterilního 50 % glycerolu

Takto připravené mikroprojektily wolframu, resp. zlata mohou být bez problému skladovány při - 20 °C, resp. 4 °C po dobu až dvou týdnů.

Před samotnou biolistickou procedurou bylo nezbytné sterilně navázat plazmidovou DNA na připravené wolframové či zlaté mikroprojektily podle návodu (pro kontrolní vzorky je postup stejný bez přidání DNA):

- mikroprojektily v 50 % glycerolu vortexovat po dobu 5 min.
- stále za vortexování přidat: 10 µl DNA (koncentrace 1µg/µl)
100 µl 2,5 M CaCl₂
40 µl 0,1 M spermidinu (vždy čerstvě připraven)
- pokračovat ve vortexování 2 - 3 min.
- nechat sedimentovat 1 min., stočit (2 s) a odstranit supernatant
- přidat 280 µl 70 % etanolu (HPLC), poklepat prstem, stočit (2 s) a odstranit supernatant
- přidat 280 µl 100 % etanolu (HPLC), poklepat prstem, stočit (2 s) a odstranit supernatant
- přidat 72 µl 100 % etanolu (HPLC), resuspendovat poklepáním prstem, jemně vortexovat (2 - 3 s)

Mikrozkumavky obsahující mikroprojektily s navázanou DNA jsem umístila na led a dále jsem rovnoměrně nanášela vždy po 6 µl této směsi na jeden vysterilizovaný nosič. Z jedné mikrozkumavky jsem tedy pokaždé odebrala množství částic pro celkem 12 střel. Na jednu střelu tudíž po ztrátách během přípravy mikroparticulí a následnému navazování DNA připadlo přibližně 0,5 mg mikročástic wolframu, resp. zlata a 0,8 µg transformační DNA.

3.2.3.4. Vlastní transformace

Biolistická transformace řasy *Ch. reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1993) probíhala ve flowboxu pomocí přístroje PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (BioRad). Jako nosné médium mikroprojektilů s DNA je zde využíváno hélium.

Následující postup byl pro každý dílčí transformační experiment identický. Nejprve jsem umístila sterilní průtržný disk (vždy konkrétní typ pro požadovaný přetlak: 900, 1 100, 1 350 či 1 550 psi [1 psi = 1 pound-force per sq. inch = 6 895 Pa]) do kovového nosiče a našroubovala jej do podtlakové komory. Dále jsem zkompletovala příslušný držák, do něhož jsem umístila zachytnou síťku a nosič s mikroprojektily. V posledním kroku jsem instalovala plastový nosič spolu s Petriho miskou s nanesenými řasami do požadované vzdálenosti od držáku mikroprojektilů v podtlakové komoře (tj. 3, 6, 9 nebo 12 cm). Po uzavření komory v ní byl vývěvou snížen tlak vzduchu o 28 palců Hg (28 palců Hg = 948,2 kPa). Tlakem He (konkrétní hodnota odpovídala typu průtržného disku) pak

byly mikročástice s DNA (pro kontrolní vzorky bez DNA) vystřeleny do řasové kultury. Po výstřelu jsem podtlakovou komoru nechala opět zavzdušnit a celý postup opakovala s novou miskou. Misky s transformovanými řasami uzavřené parafilmem jsem uložila do termostatického boxu (tma nebo 400 lx, resp. 1700 lx, fotoperioda 16 : 8, 22 °C). Řasy transformované přímo na selekčním médiu (spektinomycin 150 µg/ml) jsem po týdnu přenesla do intenzivnějšího osvětlení (5 000 lx, resp. 8 000 lx, fotoperioda 16 : 8, 22 °C). Řasy transformované na neselekčním médiu jsem přenesla spolu s filtrem po 36 hod. na selekční médium a do intenzivnějšího osvětlení opět po uplynutí jednoho týdne. Obvykle po 1 měsíci probíhající selekce již byly na miskách patrné kolonie *Ch. reinhardtii* vykazující rezistenci ke spektinomycinu.

3.2.3.5. Souhrn testovaných podmínek

Souhrnem jsem při biolistické transformaci *Ch. reinhardtii* testovala následující podmínky:

- tlak He pro vystřelení mikroprojektilů s navázanou DNA:

900 psi	1 100 psi	1 350 psi	1 550 psi
----------------	------------------	------------------	------------------
- vzdálenost, jež mikroprojektily urazí k transformovaným řasám:

3 cm	6 cm	9 cm	12 cm
-------------	-------------	-------------	--------------
- typ mikroprojektilů:

wolfram (1,1 µm)	zlato (1,0 µm)	zlato (0,6 µm)
-------------------------	-----------------------	-----------------------
- typ média TAP pro transformaci:

selekční (spektinomycin 150 µg/ml)	neselekční (spektinomycin 0 µg/ml)
---	---
- typ P-740 plazmidu pro transformaci:

kruhový	linearizovaný (<i>Xmn</i> I)
----------------	--------------------------------------
- kultivační podmínky před transformací:
 - doba kultivace řas 60 nebo 96 hod.
 - hustota nanášených řas 6. 10⁷ nebo 3. 10⁸ b/ml média
 - nanesení řas pro transformaci na média večer či 2 hod. před transformací
- kultivační podmínky po transformaci:
 - přenos po 1 týdnu ve tmě či 1 týdnu na mírnějším osvětlení (400 lx, resp. 1 700 lx) do osvětlení intenzivnějšího (5 000 lx, resp. 8 000 lx)

3.2.4. Elektroporace

3.2.4.1. Kultivace řas

Řasy ze zásobní kultury na pevném médiu jsem standardně kultivovala v tekutém médiu TAP (**kap. 3.2.2.2**) 48, 72 a 84 hod. Po těchto dobách kultury dosáhly nárůstu zhruba 1.10^6 , 3.10^6 a 6.10^6 b/ml média. Přesnou koncentraci buněk jsem zjistila pomocí hemocytometru a pod mikroskopem zkontrolovala jejich vitalitu. Poté jsem řasy zahustila na 1.10^8 b/ml média centrifugací 5 000 rpm, 4 min., 4 °C a resuspendovala v příslušném objemu tekutého TAP média s 60 mM sorbitolem (**Wykoff, 1998**). Takto získaná kultura řas byla do přípravy elektroporačních kyvet uchovávána na ledu.

3.2.4.2. Vlastní elektroporace

Postupovala jsem podle upraveného elektroporačního protokolu jaderné transformace *Ch. reinhardtii* dle Bišové (ústní sdělení, MBÚ, Třeboň) a dle **Wykoffa (1998)**. Požadovaný počet sterilních elektroporačních kyvet (Electroporation cuvette plus™ – model No. 620 – 2 mm, BTX®, A Division of Genetronics, Inc.) jsem předem umístila na led. K připravené kultuře řas na ledu (kromě kontrolního vzorku) jsem přidala transformační DNA (1 nebo 2 µg DNA/vzorek = kyvetu, koncentrace zásobního roztoku DNA o 1 µg/µl) a jemně pomocí mikropipety promíchala. Do každé kyvety jsem přenesla 250 µl suspenze a dále ponechala na ledu po dobu 10 min. Pro samotnou elektroporaci jsem používala přístroj ECM 630 (Eletro Cell Manipulator, BTX®, A Division of Genetronics, Inc.) zapůjčený z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni. Po elektrickém pulzu byly řasy ponechány v klidu při pokojové teplotě po dobu 20 min. Poté jsem elektroporovanou řasovou kulturu přenesla do 10 ml TAP s 60 mM sorbitolem (ve 100 ml Erlen. baňce) a dala jemně třepat při mírném osvětlení (1 700 lx) přes noc. Následující den jsem řasy stočila (3 000 rpm, 2 min., 4 °C), pelet resuspendovala v 0,6 ml TAP a po 200 µl rovnoměrně nanasla na 3 Petriho misky se selekčním médiem TAP (spektinomycin 150 µg/ml). Misky jsem umístila do termostatického boxu (5 000 lx, fotoperioda 16 : 8, 22 °C). Již po třech týdnech selekce byly viditelné kolonie *Ch. reinhardtii* nesoucí rezistenci ke spektinomycinu.

3.2.4.3. Souhrn testovaných podmínek

- optimalizace kultivačních podmínek před transformací – doba kultivace:
 - 1. 10^6 b/ml (48 hod. kultivace)
 - 3. 10^6 b/ml (72 hod. kultivace)
 - 6. 10^6 b/ml (84 hod. kultivace)

- koncentrace transformační DNA:
 - 1 µg DNA/vzorek (kyvetu)
 - 2 µg DNA/vzorek
- nastavení parametrů přístroje (**tab. 6**)

Tab. 6: Parametry nastavení elektroporátoru pro zvolené pokusné varianty

Varianta	Napětí U [kV]:	Odpor R [Ω]:	Kapacita c [µF]:	Délka pulzu [ms]:
1	0,4	200	150	12
2	0,24	25	1200	30
3	0,4	200	25	2

Pozn. Každá varianta byla provedena ve 2 - 3 opakováních.

Varianta 1 byla nastavena podle Bišové (ústní sdělení, MBÚ, Třeboň), varianta 2 podle **Hayashia (2001)** a varianta 3 podle **Chowa & Tunga (1999)**.

3.2.5. Kultivace potencionálně transformovaných řas

Zpravidla již po 3 - 4 týdnech probíhající selekce *Ch. reinhardtii* na médiu TAP se spektinomycinem (150 µg/ml) byly na miskách patrné kolonie vykazující rezistenci k tomuto antibiotiku. Tyto kolonie jsem sterilně pomocí párátko odebrala a rozetřela na nová média TAP se spektinomycinem. Narostlé potencionálně transformované řasy jsem průběžně přepasážovávala na nová média a odebírala vzorky pro molekulární ověřování genetické transformace.

3.2.6. Detekce přítomnosti transgenu *aadA*

3.2.6.1. „Tkáňová“ PCR

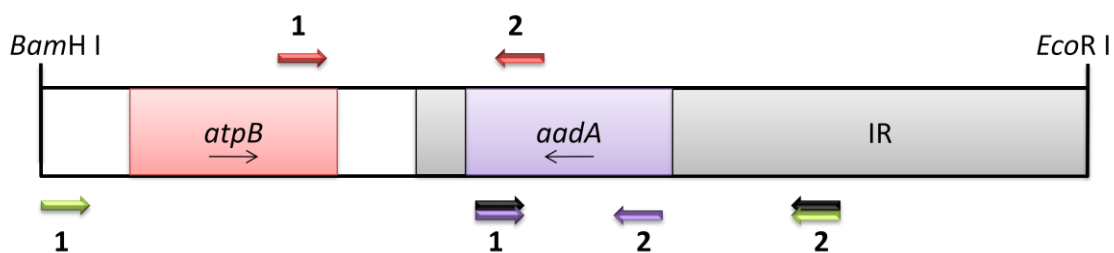
3.2.6.1.1. Použité primery

Pro ověření metodiky PCR u *Chlamydomonas* (amplifikace fragmentu chloroplastového genu *rbcl*), detekci genu *aadA* a potvrzení místa inzerce v chloroplastovém genomu (ptDNA) jsem

používala primery navržené školitelem a primery dle **Goldschmidt-Clermonta (1991)** – viz **tab. 7** a **obr. 8**.

Tab. 7: Sekvence použitých primerů a předpokládané velikosti amplifikovaných fragmentů

PCR reakce	Primer 1	Primer 2	Velikost fragmentu [bp]
<i>rbcl</i>	5'-AAG CTG AAC GAA TTA CGT CG -3'	5'-TTG TAG GTA AAC TAG AAG GTG -3'	353
<i>aadA</i>	5'-TTA TTT GCC AAC TAC CTT AGT GAT C-3'	5'-GAA GCG GTT ATC GCC GAA G-3'	787
Inzerce do ptDNA	z obou stran 5'-ACG ATT ACG TCA ATT ACG TCG-3'	5'-CTC CTA AGT TTA CTT GCC CAA T -3'	≈ 5 600
	zleva 5'-AGA AGC TAT TAG TAA AGC TGC-3'	5'-GCT AGA CAG GCT TAT CTT GG -3'	≈ 1 350
	zprava 5'-TTA TTT GCC AAC TAC CTT AGT GAT C-3'	5'-CTC CTA AGT TTA CTT GCC CAA T -3'	≈ 1 500



Obr. 8: Umístění primerů pro důkaz inzerce genu *aadA* do chloroplastového genomu.

Šipky odpovídají umístění použitých primerů (čísla 1 a 2 jsou analogická Primeru 1 a Primeru 2 v **tab. 7**) a jsou vždy v páru barevně odlišeny: *aadA* (fialově), inzerce do chloroplastového genomu – z obou stran (zeleně), zleva (červěně), zprava (černě).

3.2.6.1.2. Příprava vzorků pro „tkáňovou“ PCR

K ověření inzerce genu *aadA* do chloroplastového genomu potencionálně transformovaných řas jsem použila v naší laboratoři dobře zavedenou metodu pro rostliny – tzv. „tkáňovou“ PCR, ve které jako templát slouží přímo rostlinné buňky. Prostřednictvím primerů pro gen *rbcl* jsem potvrdila aplikovatelnost této metody i pro *Ch. reinhardtii*. Postupovala jsem následovně:

- do 1,5 ml mikrozkušavek umístěných na ledu napipetovat po 40 µl 0,25 M NaOH
- z každé napěstované potenciálně transgenní kultury *Ch. reinhardtii* (potomci 1 transformované buňky) odebrat tkáň velikosti očka bakteriologické kličky a přidat k NaOH
- povařit ve vodní lázni (100 °C, 30 s) a zchladit na ledu
- do každého vzorku připipetovat 40 µl 0,25 M HCl a 20 µl 0,5 M Tris (pH 8; s obsahem 0,25 % neiontového detergentu Nonidet P-40), promíchat
- povařit (2 min.) a opět zchladit na ledu

Takto připravené vzorky lze ihned použít pro PCR nebo uchovat do dalšího použití (- 20 °C).

3.2.6.1.3. Vlastní „tkáňová“ PCR

Vzorky uchovávané při - 20 °C jsem povařila (2 min.) ve vodní lázni a následně zchladila na ledu. Dále jsem pracovala podle návodu:

- připravit reakční směs o objemu 20 µl, resp. 50 µl na vzorek do 0,5 ml mikrozkušavek umístěných na ledu – složení a objem reakční směsi se liší podle očekávané délky amplifikovaných fragmentů (**tab. 8**)
- malé množství buněčné hmoty (odebrat 1 µl pipetou) přidat k reakční směsi
- poklepat prstem a krátce stočit (3 s)

Tab. 8: Složení reakčních směsí pro „tkáňovou“ PCR

„krátké“ fragmenty (např. *rbcl*, *aadA*) – 20 µl/vzorek

10 % (v/v) PCR pufr (100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0,5 % Nonidet P-40)

10 % (v/v) dNTPs (koncentrace každého nukleotidu 2,5 mM)

1 % (v/v) 20 µM primer 1

1 % (v/v) 20 µM primer 2

1,2 % (v/v) Taq DNA polymeráza (Takara; 1,5 U)

76,8 % (v/v) SDW

„dlouhé“ fragmenty (např. inserce do ptDNA z obou stran) – 50 µl/vzorek

10 % (v/v) PCR pufr

8 % (v/v) dNTPs } souprava Takara Ex Taq Hot Start (Takara)

0,5 % (v/v) DNA polymeráza Ex Taq HS

1 % (v/v) 20 µM primer 1

1 % (v/v) 20 µM primer 2

10 % (v/v) PCR enhancer (Epicentre)

69,5 % (v/v) SDW

PCR probíhala na přístrojích T3 Thermocycler (Biometra®) a XP Cycler (Bioer) v 35 reakčních cyklech – doba elongace se lišila podle očekávané délky amplifikovaných fragmentů (**tab. 9**).

Tab. 9: Průběh reakčních cyklů „tkáňové“ PCR

„krátké“ fragmenty (např. *rbcL*, *aadA*)

Denaturace	94 °C, 45 s
Nasednutí primerů (annealing)	55 °C, 30 s
Elongace	72 °C, 2 min.
Po skončení všech cyklů	4 °C

„dlouhé“ fragmenty (např. inserce do ptDNA z obou stran)

Denaturace	94 °C, 25 s
Nasednutí primerů (annealing)	55 °C, 30 s
Elongace	72 °C, 5 min.
Po skončení všech cyklů	4 °C

3.2.6.1.4. Elektroforéza v agarózovém gelu

Amplifikované fragmenty DNA jsem pomocí elektroforézy rozdělila v 0,8 % agarózovém gelu v TBE pufru (**tab. 10**) s přidavkem 1 µg ethidium bromidu na 10 ml gelu. Na gel jsem nanášela 20 µl vzorku s 3,5 µl vkladacího pufru. Jako velikostní standard jsem použila 5 µl 100 bp (NEB), resp. 2 log

(pro delší fragmenty) ladderu (NEB). Elektroforéza probíhala po dobu 60 min. při napětí 100 V. Gel jsem vyfotografovala na UV transluminátoru pomocí zobrazovacího systému ImageStore 5000.

Tab. 10: Složení TBE pufru (1 l)

Tris base	54 g
Kyselina boritá	27,5 g
0,2 M EDTA (pH 8,0)	50 ml

3.2.6.2. Southernova hybridizace

3.2.6.2.1. Příprava řasové kultury

Potenciálně transformované řasy jsem pěstovala ve 300 ml tekutého média TAP se spektinomycinem (100 µg/ml) v probublávaném válci či Erlen. baňkách po dobu minimálně 4 dnů. Narostlou kulturu jsem poté stočila (5 000 rpm, 4 min., 4 °C) a pelet jsem zvažila. Pro následnou izolaci DNA bylo nutné získat alespoň 0,5 g řasové biomasy. Pokud jsem požadované hmotnosti nedosáhla při použití média se spektinomycinem, pokusila jsem se řasy opakovaně napěstovat v médiu bez spektinomycinu. Takto získanou řasovou biomasu jsem uložila do - 70 °C.

3.2.6.2.2. Izolace DNA

DNA z potenciálně transgenních řas a netransgenní kontroly jsem izolovala upravenou metodou autorů **Tai a Tanksley (1991)** podle následujícího postupu:

- v tekutém dusíku rozdrtit 0,5 - 1,5 g řasové hmoty a drť přenést vychlazenou špachtlí do centrifugační kyvety
- ihned přidat 15 ml čerstvě namíchaného extrakčního pufru (**tab. 11**), protřepat a umístit do zpracování všech vzorků na led
- inkubovat ve vodní lázni (65 °C, 15 min.) a průběžně protřepávat
- přidat 4,65 ml 5 M octanu draselného, promíchat a inkubovat 20 min. na ledu
- stočit (4 000 rpm, 10 min., 4 °C) a supernatant přefiltrovat přes filtr Miracloth (velikost pórů 22 - 25 µm) do nové kyvety se 14 ml isopropanolu a jemným otáčením promíchat (objeví se světlá sraženina s DNA)

- nechat odstát 10 min. při pokojové teplotě, poté stočit (4 000 rpm, 10 min., 4 °C) a supernatant odstranit
- pelet 1x opláchnout 5 ml 70 % etanolu a nechat osušit na filtračním papíru
- osušený pelet přenést pomocí pipety do mikrozkuřavky a rozpustit v 840 µl T5E pufru (**tab. 11**)
- po úplném rozpuštění přidat 360 µl 10 M octanu amonného a inkubovat 10 min. na ledu
- stočit (13 500 rpm, 5 min.) a supernatant rozdělit zhruba po 650 µl do 2 nových mikrozkuřavek
- přidat 500 µl isopropanolu a nechat 5 min. srážet při pokojové teplotě
- stočit (13 500 rpm, 30 s) a opatrně odstranit supernatant
- pelet DNA promýt 1 ml 70 % etanolu (HPLC)
- opatrně odstranit supernatant (zbytky etanolu odsát pipetou) a pelet nechat oschnout
- rozpustit v 50 - 200 µl (podle množství peletu) SDW
- přidat 5 µl RNázy (0,1 µg/µl) na 100 µl vzorku a inkubovat 30 min. při 37 °C

Koncentraci DNA ve vzorcích jsem zjišťovala pomocí spektrofotometru Gene Quant II (Pharmacia Biotech) a elektroforetickým porovnáním koncentrační řady standardu λ DNA (NEB) s koncentrační řadou každého vzorku. Vzorky byly do dalšího použití uchovávány při - 20 °C.

Tab. 11: Složení extrakčního a T5E pufru

Extrakční pufr (100 ml)	
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10 ml
5 M NaCl	10 ml
10 % SDS	12,5 ml
2 N NaOH	416 µl
SDW	57 ml
Na-bisulfid	0,38 g
Na-diethyldithiokarbamát	0,38 g
T5E pufr (100 ml)	
1 M Tris (pH 8,0)	5 ml
0,2 M EDTA	2 ml

3.2.6.2.3. Čištění izolované DNA

Z každého vzorku jsem pro čištění odebrala objem odpovídající 25 µg izolované DNA a doplnila SDW na 200 µl. Dále jsem postupovala podle návodu:

- přidat 100 µl fenolu a 100 µl chloroformu
- vortexovat (2 min.), poté stočit (13 500 rpm., 4 min.)
- opatrně odsát svrchní vodnou fázi a přenést do nové mikrozkušavky
- přidat 2/10 objemu 10 M octanu amonného a trojnásobek objemu 100 % etanolu (HPLC)
- ponechat po dobu ≥ 45 min při -70 °C
- stočit (13 500 rpm, 7 min.) a odstranit supernatant
- pelet promýt 1 ml 70 % etanolu (HPLC)
- opatrně odstranit supernatant (zbytky etanolu odsát pipetou) a pelet nechat oschnout
- rozpustit ve 100 µl SDW

3.2.6.2.4. Štěpení *BamH* I

Izolovanou a přečištěnou DNA jsem štěpila pomocí restriční endonukleázy *BamH* I. Ke každému 100 µl vzorku DNA jsem přidala 100 µl restriční směsi složené z:

20 µl 10x pufr K (Takara) 2 µl BSA (10 mg/ml) 4 µl *BamH* I (60 U) 74 µl SDW

Směs jsem krátce vortexovala, stočila (4 s) a uložila do termostatu (30 °C). Po 2 hod. byly do každého vzorku přidány 4 µl *BamH* I (60 U), po dalších 2 hod. ještě 6 µl *BamH* I (90 U). Vzorky byly ponechány přes noc při 30 °C. Kontrolu účinnosti štěpení enzymem *BamH* I jsem provedla elektroforeticky na 0,7 % gelu v TBE pufru. Na gel jsem nanášela vždy 5 µl vzorku DNA po štěpení s 3 µl vkladacího pufru (doplněno SDW na celkový objem 13 µl).

3.2.6.2.5. Elektroforéza restričních fragmentů

Ke 200 µl vzorku DNA po restričním štěpení jsem přidala 40 µl octanu amonného (2/10 objemu) a 600 µl 100 % etanolu (HPLC, trojnásobek objemu). Vzorky jsem protřepala a následně inkubovala 45 min. při -70 °C. Další postup byl následující:

- stočit (13 500 rpm, 7 min.), odstranit supernatant a pelet promýt 1 ml 70 % etanolu (HPLC)
- opatrně odstranit supernatant (zbytky etanolu odsát pipetou) a pelet nechat oschnout
- rozpustit ve 30 µl SDW

Ke každému vzorku jsem poté přidala 5 µl vkladacího pufru a jako velikostní standard jsem použila 1 kb DNA ladder (Gibco BRL). Elektroforéza probíhala v 1 % agarózovém gelu v TBE pufru při 90 V přes noc. Následně byl gel obarven ethidium bromidem (1 mg/l TBE pufru), poté vyfocen na UV transluminátoru a nepotřebné části gelu byly odříznuty.

Před samotným přenosem DNA na membránu byl gel chemicky ošetřen ve třech krocích:

- inkubace v roztoku 0,25 M HCl (max. 15 min., mírné třepání) ⇒ naštěpení DNA na kratší fragmenty a její kyselá depurinace
- opláchnutí gelu destilovanou vodou a přenesení do roztoku 0,4 M NaOH a 1,5 M NaCl (30 min., mírné třepání) ⇒ alkalická denaturace DNA
- opláchnutí gelu destilovanou vodou a přenesení do neutralizačního roztoku 0,5 M Tris-HCl a 1,5 M NaCl (≥ 30 min., mírné třepání)

3.2.6.2.6. Kapilární přenos DNA na membránu

Pro umožnění kapilárního přenosu DNA na membránu jsem postupovala následovně:

- do plastové vany nalít 10 x SSC roztok (zředěn ze zásobního roztoku 20 x SSC – viz **tab. 12**)
- přes vanu položit skleněnou desku a na ni umístit 2 vrstvy papíru 3MM Whatman tak, aby byly jeho konce ponořeny do 10 x SSC roztoku
- na papír položit gel
- na gel umístit nylonovou membránu (Nytran Supercharge Nylon Transfer Membrane, Schleicher & Schuell BioScience, Inc.) a na ni opět 2 vrstvy papíru 3MM Whatman namočeného v 10 x SSC (vše o velikosti gelu) – vytlačit případné bubliny
- nakonec položit asi 15 cm silnou vrstvu buničité vaty a zatížit

Kapilární přenos DNA na membránu probíhal přes noc a následující den jsem zkontrolovala přenos z gelu na UV transluminátoru (v gelu nebyly patrné žádné zbytky DNA). Membránu jsem opláchla v 2 x SSC a nechala 10 min. sušit (80 °C) mezi dvěma vrstvami papíru 3MM Whatman. Následně jsem membránu ozářila (120 mJ/cm²) v crosslinkeru UVC 500 (Hoefer) a poté opět vložila do 80 °C (30 min.).

Tab. 12: Složení zásobního roztoku 20 x SSC (1 l)

3 M NaCl	75 g
0,3 M citrát sodný	88,2 g
pH 7	

3.2.6.2.7. Značení DNA sondy

Jako sonda sloužil 787 bp dlouhý fragment genu *aadA*, připravený pomocí PCR s primery pro tento gen (**tab. 3**). Značení sondy bylo provedeno pomocí soupravy Rediprime™ II (Amersham Pharmacia Biotech), která je založena na využití náhodných primerů, a za použití ³²P značeného dCTP ([α-³²P]dCTP od firmy Izotop Ltd.).

3.2.6.2.8. Hybridizace

Hybridizace probíhala podle postupu uvedeného v práci **Churche a Gilberta (1984)**. Před samotnou hybridizací byla membrána inkubována po dobu minimálně 30 min. při 65 °C v 50 ml hybridizačního roztoku (**tab. 13**). Poté byla přidána značená denaturovaná sonda a hybridizace pokračovala při 65 °C přes noc. Následující den byla membrána 3x omyta (30 min., 65 °C) předeštěným fosfátovým pufrům (**tab. 13**). Membrána zatavená v mikrotenové fólii byla následně exponována ve speciální kazetě (Storage Fosfor Screen) po dobu 5 hod. Detekce radioaktivního signálu byla realizována v systému Typhoon (Amersham Pharmacia Biotech).

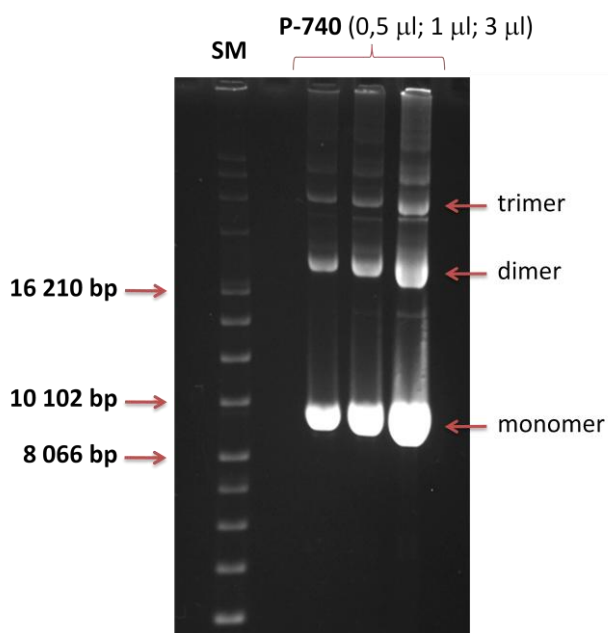
Tab. 13: Složení hybridizačního roztoku a fosfátového pufru

Hybridizační roztok (50 ml)	
1 M NaPO ₄ (pH 7,2)	20 ml
EDTA	100μl
BSA	0,5 g
SDA	3,5 g
Fosfátový pufr (500 ml)	
10 % SDS	50 ml
1 M NaPO ₄ (pH 7,2)	50 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1 ml

4. Výsledky

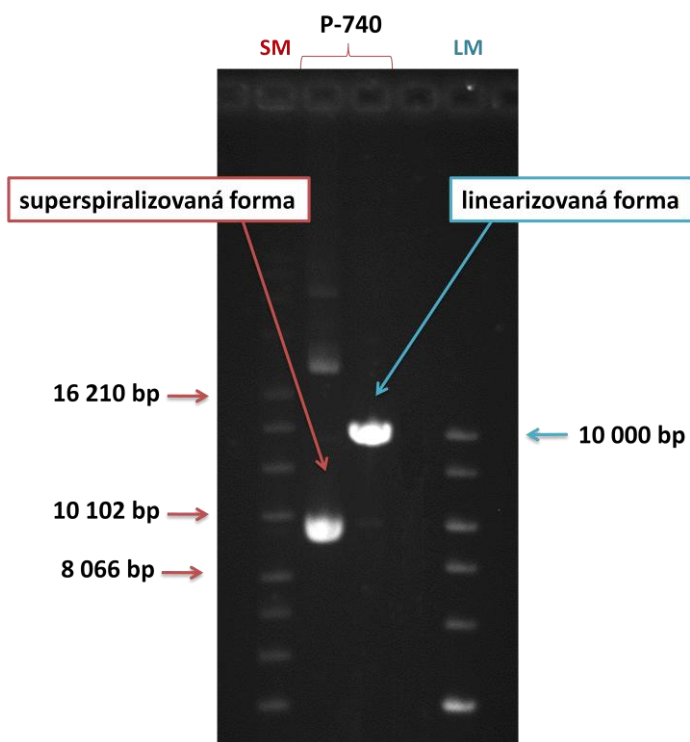
4.1. Izolace a linearizace plazmidové DNA pro transformaci

Důležitým prvotním krokem mé magisterské práce byla úspěšná izolace plazmidové DNA pro následné transformační pokusy (komerčně dostupným plazmidem P-740) z bakterií *E. coli*. Pro další experiment jsem tuto DNA také linearizovala pomocí restriční endonukleázy *Xmn* I. Úspěšnost obou procedur jsem ověřila elektroforeticky (**obr. 9 a 10**).



Obr. 9: Elektroforetogram izolované DNA transformačního plazmidu P-740. Na gel naneseny 3 objemy plazmidové DNA (0,5; 1 a 3 µl). V dráze jsou patrné monomerní, dimerní, trimerní a případně různé topoizomerní formy plazmidu. SM = velikostní standard superspiralizované DNA.

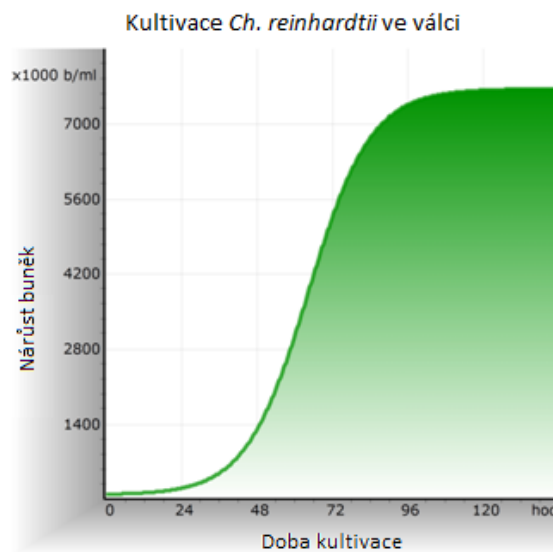
Obr. 10: Elektroforetogram cirkulární a linearizované formy transformačního plazmidu P-740. SM = velikostní standard superspiralizované DNA, LM = velikostní standard lineární DNA.



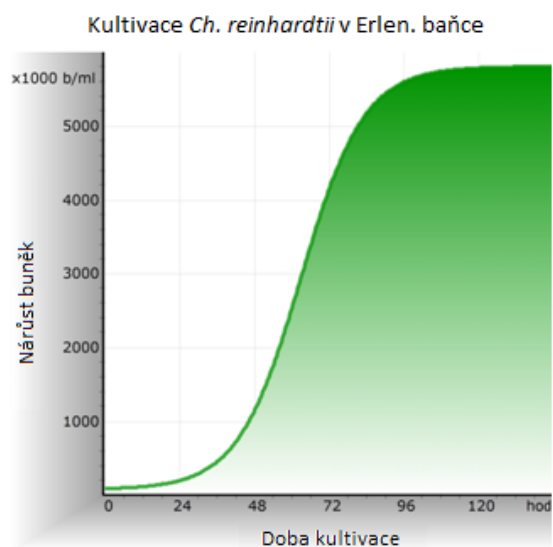
4.2. Kultivace *Ch. reinhardtii*

4.2.1. Růstové křivky *Ch. reinhardtii*

Růstové křivky experimentální řasy *Ch. reinhardtii* pro dva dostupné typy kultivačních nádob (probublávaný válec, Erlen. baňka provzdušňovaná třepáním) jsem stanovila na základě sledování nárůstu buněk ve 24 hod. intervalech během šesti dnů kultivace (**obr. 11 a 12**). Z obrázků je patrné, že dynamika nárůstu řas byla pro obě kultivační nádoby stejná (max. nárůst za cca 96 hod. kultivace), ale dosažená max. hustota řas byla v probublávaném válci zhruba o 1/3 vyšší.



Obr. 11: Růstová křivka *Ch. reinhardtii* při kultivaci v probublávaném válci (300 ml média TAP/válec, průměrné hodnoty pro 2 opakování).



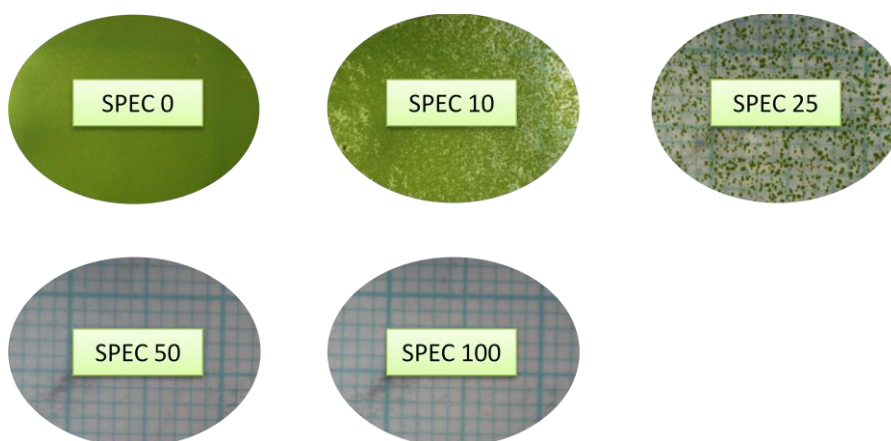
Obr. 12: Růstová křivka *Ch. reinhardtii* při kultivaci v Erlen. baňce (100 ml média TAP/baňku, průměrné hodnoty pro 4 opakování).

4.2.2. Výběr selekční koncentrace spektinomycinu

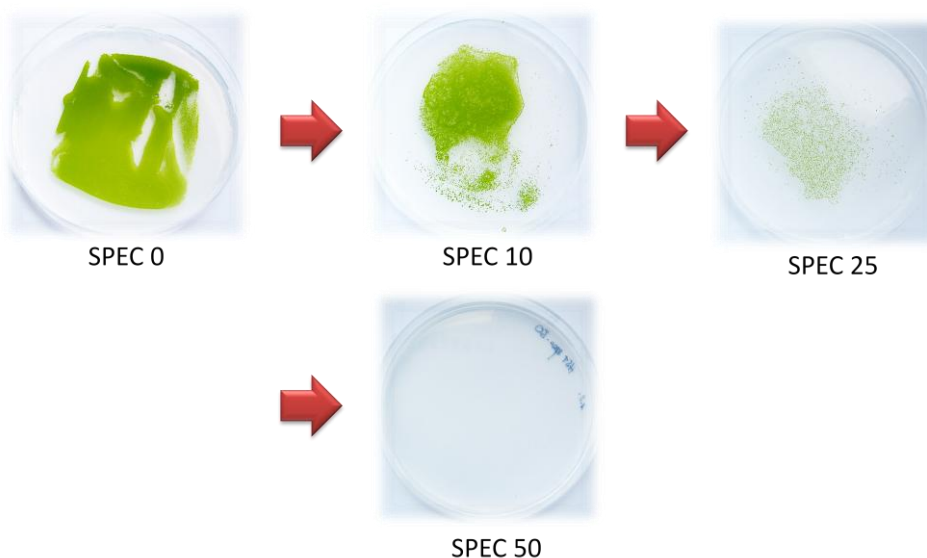
Stanovení spektinomycinové koncentrace pro následnou selekci potenciálně transformovaných kolonií *Ch. reinhardtii* bylo důležitým počátkem mých experimentů.

Koncentrační řada spektinomycinu u média HS:

Jako optimální koncentraci spektinomycinu pro následnou selekci transformovaných buněk jsem u kultivačního média HS určila **50 $\mu\text{g/ml}$** , kdy již žádné řasy výchozího kmene nepřežily (**obr. 13 a 14**).



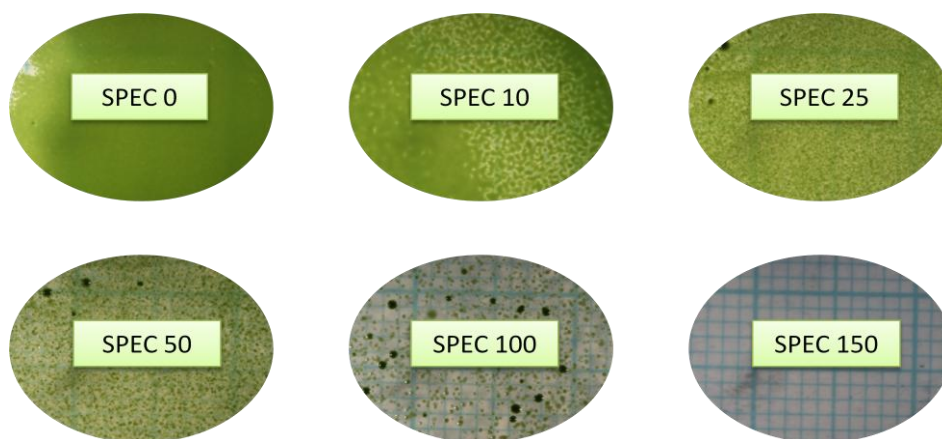
Obr. 13: Detailní zobrazení nárůstu *Ch. reinhardtii* na spektinomycinové (spec) koncentrační řadě u média HS (koncentrace antibiotika je uváděna v $\mu\text{g/ml}$) po 3 týdnech trvání pokusu. Obrázky nárůstu řas u spektinomycinových koncentrací 150, 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$ nejsou zobrazeny, neboť tyto koncentrace stejně jako koncentrace 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ již žádné řasy nepřežily.



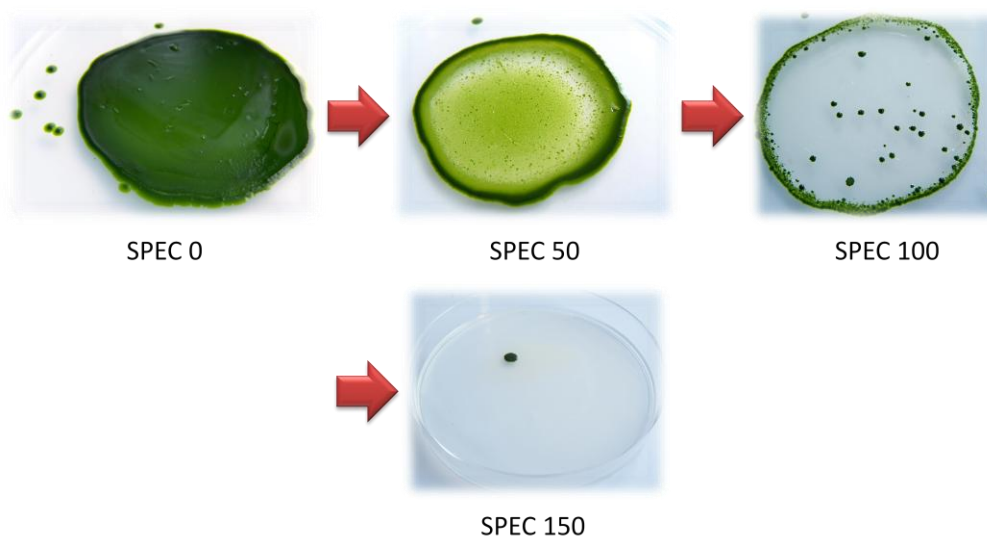
Obr. 14: Typické nárůsty řas pro vybrané spektinomycinové (spec) koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) u média HS po 1 měsíci trvání pokusu.

Koncentrační řada spektinomycinu u média TAP:

Optimální koncentraci spektinomycinu pro následnou selekci transformovaných buněk na médiu TAP jsem stanovila na **150 $\mu\text{g/ml}$** , kdy přeživaly kolonie *Ch. reinhardtii* v počtu max. jednotek (**obr. 15 a 16**). Vzhledem k faktu, že médium TAP je bohatší na živiny a v porovnání s médiem HS na něm řasy více prosperují, zvolila jsem jej nakonec jako jediné kultivační médium pro následující transformační pokusy.



Obr. 15: Detailní zobrazení nárůstu *Ch. reinhardtii* na spektinomycinové (spec) koncentrační řadě u média TAP (koncentrace antibiotika je uváděna v $\mu\text{g/ml}$) po 3 týdnech trvání pokusu. Obrázky nárůstu řas u spektinomycinových koncentrací 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$ nejsou zobrazeny, neboť tyto koncentrace již žádné řasy nepřeživaly.



Obr. 16: Typické nárůsty řas pro vybrané spektinomycinové (spec) koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) u média TAP po 1 měsíci trvání pokusu.

4.3. Biolistická transformace

V počátečních experimentech jsem porovnávala účinnost biolistické transformace na selekčním a neselekčním médiu TAP při použití dvou typů mikročástic (W 1,1 a Au 1,0 μm), 4 různých hodnot tlaku He (900, 1 100, 1 350 a 1 550 psi), jímž jsou mikročástice poháněny, a 4 různých vzdáleností (3, 6, 9 a 12 cm), které mikročástice urazí k cílovému objektu (**tab. 14**). Protože jsem z těchto pokusů při ověřování pomocí PCR získala jen velmi malé množství kolonií *Ch. reinhardtii* pozitivních na přítomnost *aadA*, ovšem s jasnou převahou ve prospěch transformace realizované na neselekčním médiu (**tab. 15**), rozhodla jsem se pokusy s neselekčním médiem ještě rozšířit o další typ mikročástic, a to o zlaté částice velikosti 0,6 μm . Avšak z výsledků (**tab. 16**) bylo zřejmé, že ani tato obměna četnost získaných pozitivních kolonií na *aadA* výrazně neovlivnila.

Experimentální řasy jsem do této doby kultivovala po dobu 96 hod., která podle zjištěných růstových křivek odpovídala přechodu z pozdní logaritmické fáze růstu do fáze stacionární (**obr. 11 a 12**). Řasy jsem přitom nanášela v množství $0,9 \cdot 10^8$ buněk na misku večer před samotným transformačním pokusem. Vzhledem k velmi malé úspěšnosti předchozích experimentů jsem se domnívala, že by právě tyto skutečnosti mohly být klíčové pro získání většího množství transformovaných kolonií. V dalším kroku jsem se proto rozhodla řasy kultivovat pouze po dobu 60 hod. (logaritmická fáze růstu) a nanášet je v nižší hustotě 2 hod. před samotnou realizací biolistické transformace. Současně jsem na základě výsledků v **tab. 14 a 16** v následujících pokusech použila pouze variantu W 1,1 μm , 1 100 psi, 9 cm, pomocí které jsem v již uskutečněných biolistických experimentech získala celou $\frac{1}{4}$ z celkového počtu kolonií *Ch. reinhardtii* pozitivních při PCR na přítomnost transgenu *aadA*. V neposlední řadě bylo mým dalším záměrem zjistit, do jaké míry by mohla ovlivnit úspěšnost transformace linearizace transformačního plazmidu a kultivace řas po biolisticce po dobu 1 týdne za tmy či mírného osvětlení (400 lx). Linearizace plazmidu by mohla teoreticky usnadnit proces homologní rekombinace. Cílem druhé obměny bylo ponechat řasám co největší prostor pro regeneraci po ničivém zásahu mikročasticemi za tmy či za mírného osvětlení, kdy metabolismus není tak aktivní jako za osvětlení plného. Transformaci jsem provedla v obou případech na médiu selekčním i neselekčním. Nicméně ani v těchto experimentech se mi nepodařilo dosáhnout výrazného zvýšení transformační účinnosti (**tab. 17**).

Z biolistické transformace *Ch. reinhardtii* (souhrnem jsem použila 320 střel) se mi celkem podařilo získat **194 nezávislých kolonií vykazujících rezistenci ke spektinomycinu (obr. 17 a 18)** a z toho **25 kolonií** bylo při ověřování prostřednictvím PCR **pozitivní na přítomnost transgenu *aadA* (kap. 4.5.1.)**.

Tab. 14: Výsledky biolistickej transformace (W 1,1 a Au 1,0 μm) *Ch. reinhardtii* na selekčním a neselekčním médiu TAP

Mikročástice	Tlak [psi]	Vzdálenost [cm]	Selekční médium		Neselekční médium	
			Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií	Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií
W 1,1 μm	1550	3	6	0	-	-
		6	6	0	3	0
		9	6	0	2	0
		12	4	0	4	0
	1350	3	0	0	-	-
		6	6	0	6	0
		9	0	0	12	3
		12	0	0	1	1
	1100	3	1	0	-	-
		6	0	0	3	1
		9	2	1	6	5
		12	1	0	4	0
900	3	0	0	-	-	
	6	2	0	1	1	
	9	0	0	4	3	
	12	0	0	3	0	
Au 1,0 μm	1550	3	4	0	-	-
		6	0	0	4	1
		9	1	0	3	2
		12	2	0	1	0
	1350	3	0	0	-	-
		6	0	0	2	0
		9	4	0	2	1
		12	4	0	1	0
	1100	3	0	0	-	-
		6	5	0	3	1
		9	3	0	2	1
		12	0	0	3	0
900	3	0	0	-	-	
	6	1	0	2	0	
	9	1	0	0	0	
	12	2	0	0	0	

V tabulce je uveden souhrnný počet získaných kolonií ze čtyř opakování pro každou pokusnou variantu. Vzdálenost = vzdálenost, kterou mikročástice urazí k cílovému objektu, - = test nebyl realizován. Z kontrolního testování přežívání *Ch. reinhardtii* na médiu TAP po biolistickej zásahu bylo zjištěno, že vzdálenost 3 cm je pro řasy příliš devastující, proto byla tato vzdálenost z následujících experimentů vynechána.

Tab. 15: Souhrnný výsledek z tab. 14 při biolistické transformaci řas *Ch. reinhardtii* na selekčním a neselekčním médiu TAP (bez ohledu na typ mikročástic, hodnotu tlaku i letovou vzdálenost mikročástic)

	Selekční médium	Neselekční médium
Počet střel	96	96
Počet rezistentních kolonií	50	72
Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií	1	20

Varianta vzdálenosti 3 cm není zahrnuta.

Tab. 16: Výsledky biolistické transformace (Au 0,6 μ m) *Ch. reinhardtii* na neselekčním médiu TAP

Mikročástice	Tlak [psi]	Vzdálenost [cm]	Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií
Au 0,6 μ m	1550	6	0	0
		9	0	0
		12	3	1
	1350	6	2	0
		9	4	0
		12	0	0
	1100	6	1	0
		9	2	2
		12	3	0
	900	6	3	0
		9	3	0
		12	0	0
Celkem kolonií ze 48 střel:			21	3

V tabulce je uveden souhrnný počet získaných kolonií ze čtyř opakování pro každou pokusnou variantu. Vzdálenost = vzdálenost, kterou mikročástice urazí k cílovému objektu. Varianta vzdálenosti 3 cm nebyla realizována.

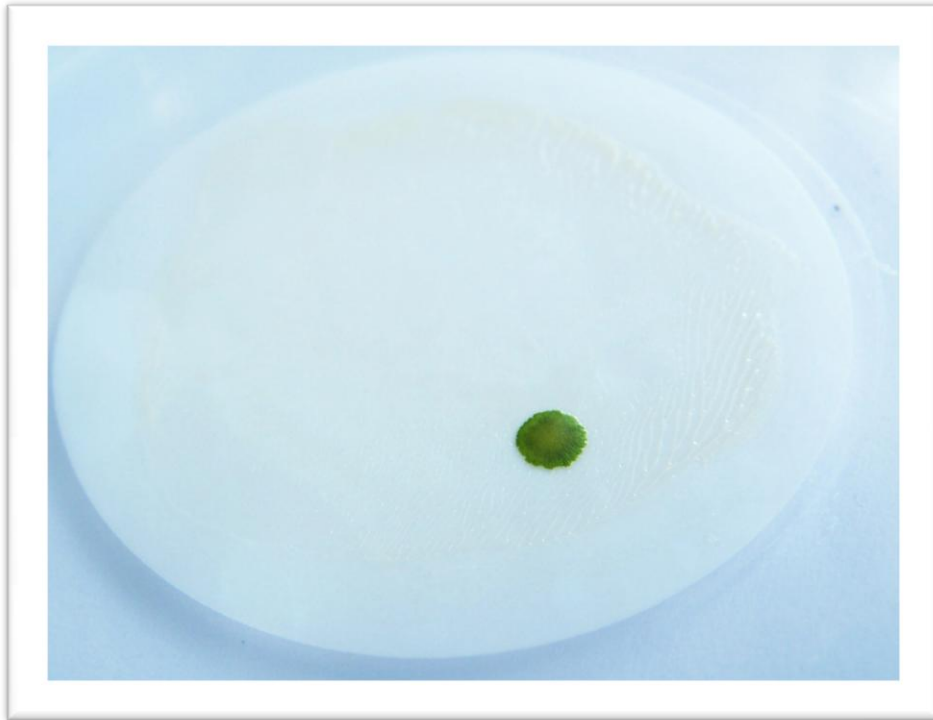
Tab. 17: Souhrn výsledků z biolistickej transformace *Ch. reinhardtii* (W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm) cirkulárním a linearizovaným plazmidem P-740

Plazmid	1 týdenní kultivace	Selekční médium		Neselekční médium	
		Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií	Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií
Cirkulární	400 lx	11	0	11	0
	tma	6	0	0	0
Linearizovaný	400 lx	4	0	8	1

V tabulce je uveden souhrnný počet získaných kolonií z 9 opakování pro každou pokusnou variantu cirkulárního plazmidu a 6 opakování pro pokusnou variantu plazmidu linearizovaného.



Obr. 17: 1 kolonie *Ch. reinhardtii* rezistentní ke spektinomycinu po biolistickej transformaci přímo na selekčním médiu (TAP + spektinomycin 150 μg/ml).



Obr. 18: 1 kolonie *Ch. reinhardtii* rezistentní ke spektinomycinu po biolistické transformaci na neselektivním médiu (TAP) a následně vyselektovaná na médiu selektivním (TAP + spektinomycin 150 $\mu\text{g/ml}$).

4.4. Elektroporace

V elektroporačních experimentech jsem porovnávala použité množství transformační DNA, dobu kultivace řasy před vlastní transformací a parametry nastavitelné na přístroji (napětí, odpor a kapacita). Ze všech elektroporačních variant jsem celkem získala **6 kolonií *Ch. reinhardtii* rezistentních ke spektinomycinu**, žádná však po ověření PCR nevykazovala přítomnost genu *aadA* (tab. 18).

Tab. 18: Shrnutí výsledků elektroporace *Ch. reinhardtii*

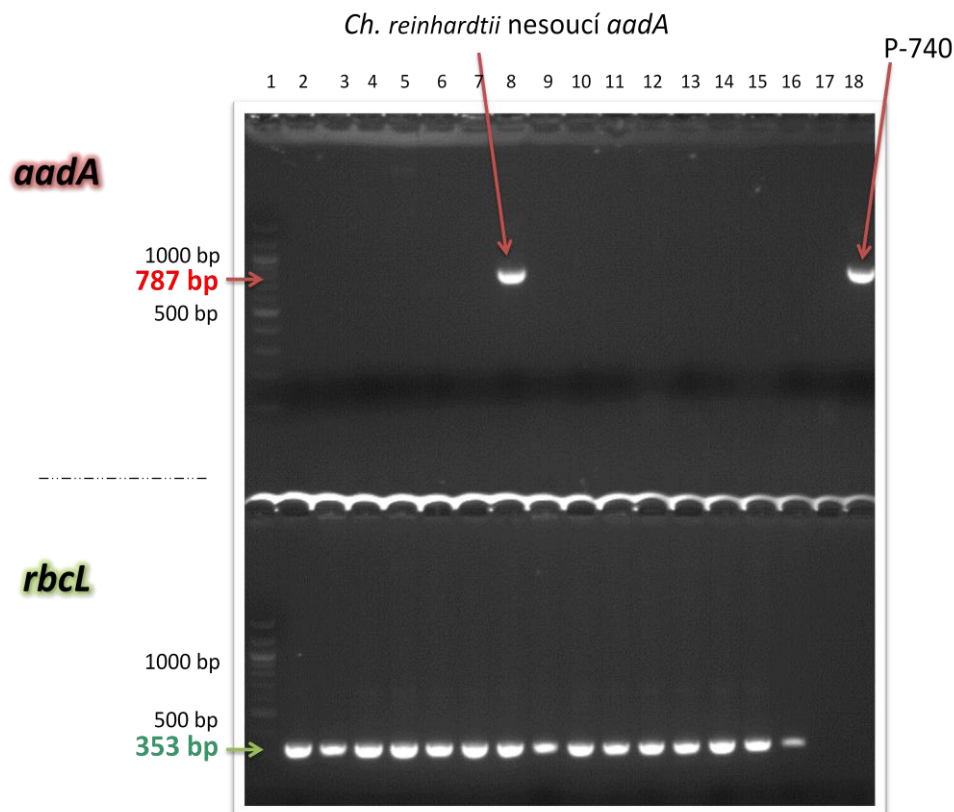
Koncentrace DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Kultivace [buňky/ml]	U [kV]	R [Ω]	c [μF]	t [ms]	Počet rezistentních kolonií	Počet <i>aadA</i> pozitivních kolonií	
1	1.10 ⁶	0,4	200	150	12	0	0	
		0,24	25	1 200	30	0	0	
		0,4	200	25	2	0	0	
	3.10 ⁶	0,4	200	150	12	0	0	
		0,24	25	1 200	30	0	0	
		0,4	200	25	2	2	0	
	6.10 ⁶	0,4	200	150	12	0	0	
		0,24	25	1 200	30	2	0	
		0,4	200	25	2	0	0	
	2	3.10 ⁶	0,4	200	150	12	0	0
			0,24	25	1 200	30	1	0
			0,4	200	25	2	0	0
6.10 ⁶		0,4	200	150	12	0	0	
		0,24	25	1 200	30	1	0	
		0,4	200	25	2	0	0	

V tabulce je uveden souhrnný počet získaných kolonií z 2 nebo 3 opakování pro každou pokusnou variantu.

4.5. Detekce přítomnosti transgenu *aadA*

4.5.1. PCR

Veškeré kolonie *Ch. reinhardtii* vykazující rezistenci ke spektinomycinu po transformačních procedurách byly testovány pomocí PCR na přítomnost transgenu *aadA* (tab. 7, obr. 8. a 19). Jako kontrola průběhu reakce sloužila amplifikace části chloroplastového genu *rbcl*.



Obr. 19: Příklad elektroforetogramu z testování kolonií *Ch. reinhardtii* rezistentních ke spektinomycinu získaných po biolistické transformaci pomocí PCR na přítomnost genu *aadA* a ověření vzorků (gen *rbcl*). Očekávané velikosti vznikajících fragmentů byly pro gen *aadA* 787 bp, pro gen *rbcl* 353 bp. Dráha 1 = velikostní standard 100 bp DNA, 2 – 16 = potenciálně transgenní linie, 17 = reakční směs bez DNA (negativní kontrola), 18 = plazmid P-740 (pozitivní kontrola).

Z celkem 194 nezávislých kolonií *Ch. reinhardtii* rezistentních ke spektinomycinu po biolistické transformaci jsem zjistila pomocí PCR přítomnost transgenu *aadA* u 25 linií, zatímco z elektroporačních pokusů se mi nepodařilo získat žádnou kolonii pozitivní na *aadA*. Při ověřování místa inserce transgenu *aadA* do ptDNA (tab. 7, obr. 8) pomocí PCR u všech 25 potenciálně

transgenních linií vznikalo více fragmentů, z nichž žádný neodpovídal předpokládaným velikostem, nebo byly pro změnu reakce bez signálu. Po určité době nezdařilých pokusů jsem tedy byla nucena od PCR upustit a svou pozornost jsem zaměřila na přípravu Southernovy hybridizace.

4.5.2. Southernova hybridizace

4.5.2.1. Příprava řasových kultur a izolace DNA

Předpokladem úspěšné Southernovy hybridizace byla izolace dostatečného množství DNA z potenciálně transgenních řas, k čemuž jsem potřebovala získat minimálně 0,5 g řasové hmoty od každé linie. Tento požadavek se ukázal být velice problematický při kultivaci potenciálně transformovaných řas v médiu TAP se spektinomycinem (100 µg/ml). Z 25 linií se takto podařilo nakultivovat v dostatečném množství pouze 3, zbytek narostl nepatrně nebo vůbec. Potřebnou hmotu se mi podařila následně získat u dalších 16 linií při opakované kultivaci v médiu TAP bez spektinomycinu (spec). Zbylých 6 linií před (během pasážování) či v průběhu kultivace zcela zaniklo. Přehled všech potenciálně transgenních linií, množství získané buněčné hmoty a izolované DNA poskytuje **tab. 19**.

Tab. 19: Přehled potenciálně transgenních linií

Označení	Linie	m [g]	DNA [µg]	Životnost
T 1	W 1,1 µm; 1 100 psi; 9 cm ¹	0,50 ^{spec}	50	✓
T 2	W 1,1 µm; 1 100 psi; 6 cm	0,50 ^{spec}	50	✓
T 3	W 1,1 µm; 1 350 psi; 9 cm	0,90 ^{spec}	120	✓
T 4	W 1,1 µm; 1 350 psi; 9 cm	0,65	100	✓
T 5	Au 0,6 µm; 1 550 psi; 12 cm	-	-	✗ ³
T 6	W 1,1 µm; 1 350 psi; 12 cm	0,66	80	✗ ⁴
T 7	Au 1,0 µm; 1 350 psi; 9 cm	0,88	160	✓
T 8	Au 1,0 µm; 1 550 psi; 9 cm	-	-	✗ ³
T 9	Au 1,0 µm; 1 550 psi; 6 cm	0,56	40	✓
T 10	Au 1,0 µm; 1 550 psi; 9 cm	1,06	88	✓
T 11	W 1,1 µm; 1 350 psi; 9 cm	1,20	200	✗ ⁴

Označení	Linie	m [g]	DNA [μg]	Životnost
T 12	Au 1,0 μm; 1 100 psi; 6 cm	0,79	40	x ⁴
T 13	Au 1,0 μm; 1 100 psi; 9 cm	1,07	100	x ⁴
T 14	Au 0,6 μm; 1 100 psi; 9 cm	0,81	80	x ⁴
T 15	Au 0,6 μm; 1 100 psi; 9 cm	-	-	x ³
T 16	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm	0,76	50	✓
T 17	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm	-	-	x ³
T 18	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm	-	-	x ³
T 19	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm	0,50	15	x ⁴
T 20	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm	1,10	200	✓
T 21	W 1,1 μm; 900 psi; 9 cm	0,88	80	x ⁴
T 22	W 1,1 μm; 900 psi; 9 cm	-	-	x ³
T 23	W 1,1 μm; 900 psi; 9 cm	0,60	80	x ⁴
T 24	W 1,1 μm; 900 psi; 6 cm	0,89	80	✓
T 25	W 1,1 μm; 1100 psi; 9 cm ²	1,00	70	✓

¹ transformována přímo na selekčním médiu, zbylé linie na médiu neselekčním,

² transformována linearizovaným plazmidem, zbylé linie plazmidem cirkulárním

^{spec} TAP určené ke kultivaci obsahovalo spektinomycin (100 μg/ml)

✓ = linie přežívá na pevném selekčním médiu,

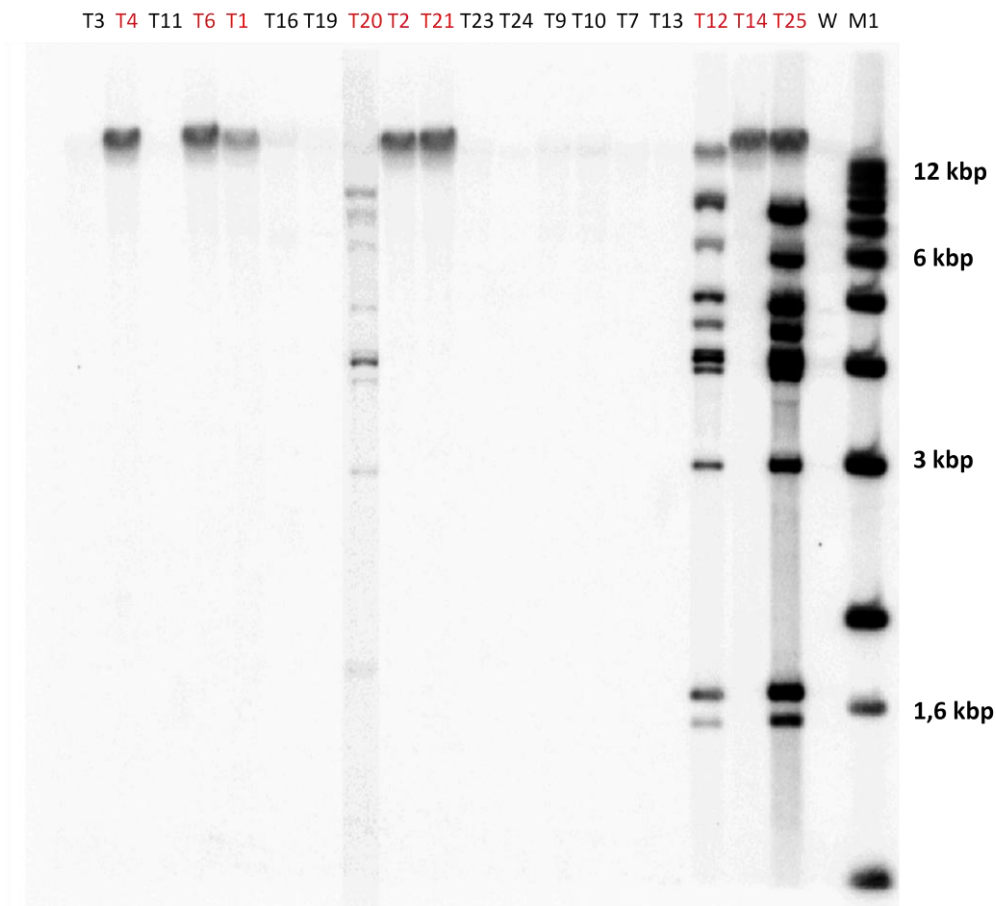
x³ = linie zanikla před či v průběhu kultivace pro S. hybridizaci

x⁴ = linie zanikla v období po realizaci S. hybridizace

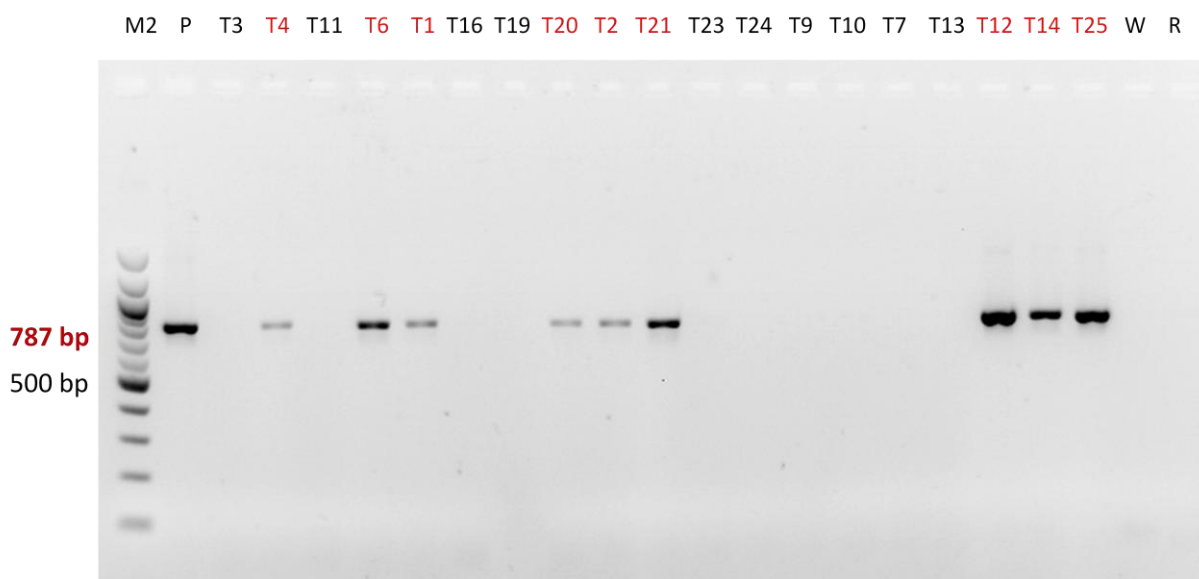
m = hmotnost nakultivované buněčné hmoty potenciálně transgenních linií během min. 4 dnů ve 300 ml TAP,
DNA = množství izolované DNA

4.5.2.2. Vlastní hybridizace

Výsledek Southernovy hybridizace doplněný o následnou PCR pro přítomnost *aadA* ve vzorcích DNA izolované z potenciálně transgenních linií *Ch. reinhardtii* pro hybridizaci ukazuje **obr. 20 a 21**. U 10 linií došlo v průběhu kultivace ke ztrátě transgenu *aadA*. Naopak u 9 linií se přítomnost transgenu při hybridizaci i PCR potvrdila (označeny červeně), avšak žádný ze vzniklých fragmentů u hybridizace neodpovídal předpokládané velikosti části sekvence ptDNA po integraci transgenu *aadA* do chloroplastového genomu *Ch. reinhardtii* na základě homologní rekombinace (9,7 nebo 8,9 kbp). U 6 potenciálně transgenních linií vznikl fragment podstatně větší (> 12 kbp) a u třech linií došlo k vícenásobné inzerci transgenu s neuvěřitelně podobným vzorem.



Obr. 20 : Southernova hybridizace potenciálně transgenních řas *Ch. reinhardtii* se sondou odvozenou od genu *aadA*. Dráhy T3 - T25 = potenciálně transgenní linie (**tab. 20**), W = netransformovaná standardní kultura *Ch. reinhardtii*, M1 = velikostní standard 1 kb DNA (Gibco BRL).



Obr. 21: Elektroforetogram z PCR amplifikující 787 bp fragment transgenu *aadA*. Dráha M2 = vel. standard 100 bp DNA, P = plazmid P-740, T3 - T25 = potenciálně transgenní linie (**tab. 20**), W = netransformovaná standardní kultura *Ch. reinhardtii*, R = reakční směs bez DNA.

5. Diskuze

V mé magisterské práci jsem se pokusila provést transformaci chloroplastového genomu (ptDNA) zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* pomocí dvou dostupných metod genetické transformace, a to biolistiky (genového děla) a elektroporace. Biolistická transformační metoda je všeobecně považována za nejúčinnější nástroj pro transformaci chloroplastového genomu, a to i přes skutečnost, že tato metoda dosahuje pouze nízké transformační účinnosti (**Lumbreras & Purton, 1998**). Úspěšná transformace ptDNA prostřednictvím elektroporace u studovaného objektu *Ch. reinhardtii* dosud nebyla na rozdíl od jaderné transformace, jež má významně vysokou transformační účinnost (**Shimogawara et al., 1998**), popsána. K myšlence pokusit se použít elektroporaci k transformaci ptDNA tohoto organismu nás přivedl fakt, že polyetylen glykolem zprostředkovaná transformace rostlinných protoplastů je úspěšně používána jak pro jadernou, tak i plastidovou transformaci (např. **Nugent et al., 2006**). Od další alternativní metody plastidové transformace *Ch. reinhardtii*, velmi oblíbené transformace pomocí skleněných kuliček, jsem musela upustit hned v počátcích mé práce, neboť tato metoda vyžaduje u cílového objektu redukci buněčné stěny (**Harris, 2009**). V předběžných experimentech (nejsou součástí práce) se mi v našich laboratorních podmínkách nikdy nepodařilo izolovat tzv. autolysin, enzym, který řasy vylučují při pohlavním cyklu rozmnožování a který se běžně využívá k redukci buněčné stěny pro následné transformační experimenty (**Kindle, 1990; Kindle et al., 1991**). U obou dostupných metod jsem se snažila vyzkoušet co nejširší spektrum parametrů, které mohou významným způsobem ovlivňovat transformační účinnost.

5.1. Biolistika

Při biolistické transformaci jsem se zabývala fyziologickým stavem akceptorových buněk, jenž byl ovlivňován délkou kultivace řas před samotnou transformací (60 nebo 96 hod.), dobou výsevu pokusných řas na pevné médium pro transformaci (večer či 2 hodiny před transformací) a množstvím řas určených k transformaci ($6 \cdot 10^7$ nebo $3 \cdot 10^8$ b/ml média). Dále jsem studovala vliv typu a velikosti použitých mikročástic (W 1,1 μm ; Au 1,0 μm a Au 0,6 μm), hodnoty tlaku hnacího plynu (hélium: 900, 1 100, 1 350, 1 550 psi) a délky dráhy letu mikročástic k cílovému objektu (3, 6, 9 a 12 cm) na transformační účinnost. Také jsem zkoumala, který typ média (HS či TAP) je pro transformaci vhodný a zdali je rozhodující transformovat buňky přímo na selekčním médiu (obsahujícím selekční antibiotikum spektinomycin 150 $\mu\text{g/ml}$) či na médiu neselekčním (bez spektinomycinu). Ač se řada autorů (**Debuchy et al., 1989; Mayfield & Kindle, 1990; Jarvis & Brown, 1991**) shoduje, že linearizace

nemá na transformační účinnost při biolisticke vliv, rozhodla jsem se toto tvrzení ověřit a své pokusy jsem ještě doplnila o transformaci s linearizovanou formou transformačního plazmidu P-740.

Pokusné akceptorové buňky musí být vzhledem k velice náročným požadavkům na schopnost přežít během celého procesu transformace ve velice dobrém fyziologickém stavu. Nejlepších výsledků transformace je zpravidla dosaženo při použití řasové kultury v logaritmické fázi růstu (**El-Sheekh, 2000**), nicméně transformované kolonie lze získat i u kultury ve fázi pozdně logaritmické (**Yang et al., 2006; Muto et al., 2009**). Výsledky mých experimentů nemohou toto tvrzení vyvrátit ani potvrdit, neboť jsem při transformování kultury ve fázi jak logaritmické, tak pozdně logaritmické dosahovala jen velice nízké transformační účinnosti. Podle **Harrisové** (nepublikováno) je dále důležité nanášet řasy na pokusná média vždy několik hodin před transformací (ideálně 2 hod.), neboť hlavním problémem bývá, když řasová kultura na misce nedostatečně zaschne a zbylá tekutina na povrchu média pak absorbuje podstatnou část hybné síly mikročásteček. Tuto podmínku jsem vždy splnila. To zdali jsem kulturu nánášela večer či 2 hod. před vlastní transformací však nehrálo z hlediska transformační účinnosti žádnou roli. O typu používaného média k transformacím (HS vs. TAP) jsem rozhodla již v počátečních experimentech při stanovení vhodné koncentrace spektinomycinu pro selekci potenciálně transformovaných kolonií *Ch. reimhardtii*, kdy řasa na médiu TAP přežívala vyšší koncentraci spektinomycinu (150 µg/ml u TAP vs. 50 µg/ml u HS). Proto jsem při snaze poskytnout řasám co nejlepší podmínky ke kultivaci i následné regeneraci po transformačním zásahu zvolila výživnější médium TAP. Nicméně volba média dle faktu, že někteří autoři při svých experimentech používají médium TAP (např. **Takahashi et al., 1991; El-Sheekh, 2000; Manuell et al., 2007**) a jiní pro změnu volí médium HS (např. **Klein et al., 1992; Anthonisen et al., 2001**), nebude stěžejním faktorem v úspěšnosti transformace. Se stejnou rozmanitostí jsem se setkala i při studiu literárních zdrojů z hlediska transformace řasy přímo na médium selekčním (s antibiotikem) či neselekčním (bez antibiotika). Např. **Ishikura et al. (1999)** a **El-Sheekh (2000)** zvolili médium selekční, **Newman et al. (1990)** a **Yang et al. (2006)** transformovali na médium neselekčním. Výsledky mých experimentů hovoří jasně pro transformaci na médium neselekčním (v poměru 1 : 24 získaným potenciálně transformovaným koloniím), což je dle mého názoru i v souladu s představou, že řasy do určité míry poškozené biolisticke zásahem mají bez selekčního tlaku na médiu bez antibiotika větší prostor pro regeneraci, neboť transgen (nesoucí rezistenci k danému antibiotiku) nemusí být bezprostředně po transformační proceduře již plně funkční. Velikost mikročásteček, síla tlaku a letová vzdálenost rozhodují o tom, zdali tyto mikročástečky dosáhnou dostatečné rychlosti k průniku do cílové buňky přes buněčnou stěnu a následně do organel (**Chernobrovkina et al., 2007**) – u chloroplastu dokonce musí překonat dvojitou membránu. V mých pokusech jsem zjistila, že největší váhu z výše zmíněných třech proměnných má letová vzdálenost, kterou mikročástečky musí urazit k cílovému objektu, neboť aplikace vzdálenosti 3 cm v kombinaci

s různými hodnotami tlaku i velikostí mikročástic se ukázala být pro řasu *Ch. reinhardtii* naprosto fatální. Poškození kultury na miskách během biolistického zásahu z 3 cm bylo patrné pouhým okem již po několika dnech, kdy uprostřed misky zůstalo jako pozůstatek dopadu mikročástic pouze jedno velké obnažené místo agarového média bez jediné živoucí kolonie. Na základě této skutečnosti jsem proto vzdálenost 3 cm u dalších pokusů naprosto vyloučila. Celou jednu pětinu potenciálně transformovaných kolonií *Ch. reinhardtii* jsem získala při biolistické transformaci v kombinaci mikročástic wolframu (1,1 μm), tlaku 1 100 psi a vzdálenosti 9 cm. Nicméně jsem si dobře vědoma, že při tak nízké celkové transformační účinnosti, jíž jsem dosáhla, a pouze čtyřech opakování od každé varianty, jsou jakékoliv závěry mých pokusů z hlediska volby parametrů biolistické transformace v kombinaci typu a velikosti částic, hodnoty tlaku a letové vzdálenosti pouze indikativní. Z biolistické transformace linearizovaným plazmidem P-740 pomocí restriční endonukleázy *Xmn* I jsem pouze u jedné z 12 získaných potenciálně transformovaných kolonií rezistentních ke spektinomycinu potvrdila přítomnost transgenu *aadA*, transformační účinnost jsem tedy nijak nezvýšila a mohu jen potvrdit, že linearizace vnášené DNA u biolistiky nehraje významnou roli (**Debuchy et al., 1989; Mayfield & Kindle, 1990; Jarvis & Brown, 1991**).

Ač jsem vyzkoušela poměrně velké množství parametrů, které by mohly významně ovlivňovat biolistickou transformaci pokusného organismu, dosáhla jsem jen velmi nepatrné transformační účinnosti (z celkem 320 střel bylo při PCR pouze 25 kolonií pozitivních na přítomnost transgenu *aadA*). Častým problémem biolistické transformace bývá vysoká variabilita v počtu získaných transformovaných buněk během několika opakování experimentu, což mohu sama jen potvrdit. Tento jev je dán skutečností, že prakticky nelze pro každý transformační úkon připravit naprosto totožnou směs mikročástic a transformační DNA (**Sanford et al., 1993**). Pokud není experimentátor dostatečně zručný, DNA se mu nemusí dokonce podařit navázat na mikročástice vůbec. Cílová kultura na jedné pokusné misce je pak pokaždé ostřelována mikročásticemi s různými kvalitativními parametry, a proto mohou být výsledky do značné míry rozporuplné. Ze stejného důvodu bohužel nemohu nikterak prokázat, že jsem se při svých experimentech nedopustila zásadních chyb při přípravě mikročástic a navazování DNA, díky čemuž jsem následně získala tak malé množství transformovaných buněk. Důvodem mého neúspěchu při transformaci by rovněž mohl být i výběr řasového kmenu a vhodného transformačního plazmidu. Vzhledem k faktu, že jsme se v naší laboratoři setkali s řasou *Ch. reinhardtii* vůbec poprvé, zvolili jsme pro plánované pokusy standardní kmen (137C+), který se běžně používá pro základní genetické transformace (např. **Ishikura et al., 1999; Shimogawara et al., 1998; El-Sheekh, 2000; Manuell et al., 2007**). Kmen jsme v našich podmínkách aklimatizovali celkem rychle a bez problémů, a proto se nedomnívám, že zde je zdroj mého nezdaru. Podstatně záladnější se zdá ovšem být situace se zvoleným plazmidem, který jsme získali komerční cestou. Cílové místo pro vložení transgenu do chloroplastového genomu na základě

homologní rekombinace je zde pro naše účely pravděpodobně zvoleno trochu nešťastně (**kap. 5.4**) a nejasné jsou i výsledky z ověřování potenciálně transformovaných kolonií na základě PCR a Southernovy hybridizace (**kap. 5.3.**).

5.2. Elektroporace

Elektroporační pokusy byly od začátku mé práce považovány pouze za pokus o uplatnění této metody, která se běžně využívá při jaderné transformaci, v transformaci chloroplastového genomu pokusného organismu *Ch. reinhardtii*. Při těchto experimentech jsem testovala různé hodnoty nastavení přístroje (napětí, odporu, kapacity – viz **tab. 6**), fyziologický stav buněk (z hlediska doby kultivace pokusné kultury) a množství vnášené DNA (1 či 2 µg DNA/vzorek), vždy jsem přitom však vycházela z dostupné literatury týkající se úspěšné jaderné transformace řas (**Hayashi, 2001, Chow & Tung, 1999**). Vzhledem k charakteru celého elektroporačního pokusu jsem neočekávala výraznou úspěšnost svých zásahů, což bylo nakonec výsledky potvrzeno. Celkem pokusy přinesly pouze 6 kolonií *Ch. reinhardtii* rezistentních ke spektinomycinu, u kterých pomocí PCR nebyla přítomnost transgenu *aadA* prokázána. Řasy zřejmě nebyly při elektroporaci vůbec zasaženy nebo naopak byl zásah příliš devastující, čemuž do určité míry nasvědčuje i poměrně malý počet spontánně vzniklých mutantů řasy rezistentních ke spektinomycinu.

5.3. PCR a Southernova hybridizace

Již od počátku ověřování potenciálně transgenních kolonií *Ch. reinhardtii* vzniklých po transformačních zásazích jsem se potýkala s problémy PCR u delších fragmentů (pro ověření místa inserce transgenu v chloroplastovém genomu na základě homologní rekombinace). Prakticky jediná PCR, která dávala jednoznačnou odpověď, se týkala ověření samotné přítomnosti transgenu *aadA* u těchto kolonií (amplifikace 787 bp fragmentu). U ostatních PCR nikdy nevznikly fragmenty předem očekávané velikosti a nejproblematičtější se ukázala být sekvence invertovaných repetit, kde nevznikaly žádné fragmenty, a to ani v homologní oblasti samotného transformačního plazmidu P-740. Nepatrnou zmínku o problémech některých laboratoří s aplikací PCR u chloroplastového genomu *Ch. reinhardtii* jsem našla v práci **Harris (2009)** citující **Sagera a Ishidu (1963)**, kteří tvrdí, že PCR u ptDNA může být u tohoto organismu zkomplikována vysokým obsahem bází guaninu a cytosinu. My jsme dále sledovali jedno podstatné úskalí, kdy se v chloroplastovém genomu opakovala 15bázová část cílové sekvence jednoho z primerů 13 x. Po pozitivní PCR na *aadA* jsme tedy měli pouze jistotu, že se transgen *aadA* při transformaci vložil někde do genomu (jaderného, chloroplastového, mitochondriálního). Transgen mohl být jak funkční a exprimovat se (kolonie by na

základě funkčního produktu vykazovaly rezistenci ke spektinomycinu), tak i nefunkční (v případě, že by se integroval do řasy, která získala rezistenci vůči spektinomycinu prostřednictvím spontánní mutace – **Harris et al., 1989**). Ač měly být součástí vnášeného úseku DNA s transgenem regulační sekvence schopné plné funkce pouze v chloroplastu, nemůžeme zcela vyloučit integraci transgenů i do genomu jaderného či mitochondriálního s plnou či částečnou funkčností – viz dále. Srozumitelnější informace jsme se pokusili získat na základě Southernovy hybridizace.

Při Southernově hybridizaci dalo pozitivní signál pro transgen *aadA* pouze 9 potenciálně potenciálně transgenních linií z celkem 25 již dříve ověřených linií při PCR (izolace DNA byla provedena pouze u 19 linií, zbylé zanikly během pasážování). Tento výsledek potvrdila i následná PCR amplifikující 787 bp fragment genu *aadA*. U 10 potenciálně transgenních linií tedy došlo ke ztrátě genu *aadA*. Vysvětlením by mohlo být, že tyto linie byly zřejmě spontánními mutanty, jež získaly díky této mutaci rezistenci k selekčnímu antibiotiku, a postupně během pasážování o integrovaný, ale nepotřebný gen *aadA* přišly. Gen mohl být integrován kdekoliv v jaderném, chloroplastovém či dokonce mitochondriálním genomu. U 4 linií pozitivních na *aadA* avšak zaniklých během pasáží se mohu domnívat, že gen se zde pravděpodobně integroval do jaderného genomu v blízkosti silného promotoru – mohl být tedy po určitou dobu exprimován, což řasám umožňovalo přežít pod selekčním tlakem. Náhodně však docházelo k umlčování tohoto genu, které je zcela běžným jevem při jaderné transgenózi, zejména při vícenásobných inzercích (**Harris, 2009**). Řasy tak postupně ztrácely schopnost rezistence ke spektinomycinu a hynuly. Příklad, že by se jednalo o chloroplastové transformanty s funkčním genem, můžeme vyloučit, neboť pod selekčním tlakem antibiotika by nemohlo dojít k jeho eliminaci prostřednictvím chloroplastových reparačních systémů. Teoreticky by se zde mohlo jednat i o spontánní mutanty, u nichž se transgen mohl integrovat na různá místa ve všech třech genomech, ale byl nefunkční (i přesto však dával signál v PCR) a při reverzní mutaci se řasy staly opět citlivými k antibiotiku a následně uhynuly. U žádné z 9 kolonií pozitivních na přítomnost *aadA* však opět (jako u PCR) nevznikly fragmenty předpokládané velikosti po integraci transgenů do cílového místa v ptDNA na základě homologní rekombinace. U 8 linií jsou patrné podstatně větší fragmenty. Zde je však nutné podotknout, že kontrola štěpení DNA pomocí *BamH I* nepoukázala na žádný problém, a proto by se mohlo jednat o integraci na základě jednostranné homologní rekombinace (**Kindle et al., 1991**) spíše než o nedokonalé štěpení příslušnou restriktázou. Pak by byl do genomu kromě požadovaného fragmentu s genem *aadA* vložen celý plazmid a sondou označený proužek by byl značně větší, než se očekávalo. U třech potenciálně transgenních linií je nápadně si podobná vícenásobná inserce transgenů, ale opět se pouze dva fragmenty jen hrubě blíží požadované velikosti (9,7 nebo 8,9 kbp). Vzhledem k určitému opakujícímu se vzoru se můžeme domnívat, že by inserce mohla být chloroplastová na základě mnohonásobné homologní rekombinace. Ale vzhledem k faktu, že jsou známé i práce (**Sodeinde & Kindle, 1993; Gumpel et al.,**

1994), které přicházejí s myšlenkou homologní rekombinace v jaderném genomu *Ch. reinhardtii* a jiných druhů řas (Minoda *et al.*, 2004), mohlo by se jednat i o transformaci jadernou – opět u spontánních mutantů či v případě inserce některého z fragmentů s *aadA* do blízkosti silného promotoru. Nebo by se mohlo jednat o kombinaci vložení transgenu do různých částí všech genomů na základě určité podobnosti místních sekvencí, které by umožnily homologní rekombinaci. Problémy s kultivací řas pod selekčním tlakem antibiotika napovídají, že u mnohých linií by připadala v úvahu právě méně účinná spontánní mutace (Harris *et al.*, 1989). Je známo, že inhibiční látky se více projevují v tekutém médiu než na pevném (Harris, 2009). Řasy s méně účinnou spontánní mutací tak mohly na pevném médiu s antibiotikem přežít, zatím co při přenosu do tekutého média byl růst inhibován, či byly řasy dokonce usmrceny. Gen *aadA* by byl v tomto případě opět pouze nefunkčním artefaktem po transformačním zásahu kdekoli a v kterémkoli z genomů. Jsem si naprosto vědoma, že mé závěry jsou čistě spekulativní, nicméně po zdlouhavé a bohužel celkem neúspěšné snaze optimalizovat obě metody genetické transformace *Ch. reinhardtii* s cílem získat větší množství transformovaných kolonií jsem nemohla z důvodu časové tísně postoupit k dalším ověřovacím metodám, které by případně mohly objasnit celou situaci se vzniklými potenciálně transgenními koloniemi (funkčnost genu *aadA* by mohla být zjištěna pomocí nothernové hybridizace, či jeho případný produkt pomocí hybridizace westernové).

5.4. Volba plazmidu

Můj nezdár při transformačních experimentech a následné problémy při ověřování transformovaných linií *Ch. reinhardtii* mne vedly k závěru, že pravděpodobnou příčinou může být špatná volba transformačního plazmidu, který jsme získali z Chlamydomonas center (www.chlamy.org). Homologní rekombinace je zde směřována do konce invertované repetice B (IR_B), jež neobsahuje kódující sekvence. To může být do značné míry problém, vezmu-li v potaz, že se jednotlivé kmeny mohou v těchto repeticích lišit. Homologní rekombinace pak při použití kmenu s neúplně kompatibilní sekvencí v místě integrace nemusí patřičně fungovat (Newman *et al.*, 1990). Do chloroplastového genomu pak mohou být vkládány různě velké fragmenty transformačního plazmidu na základě jednostranné homologní rekombinace či k integraci nemusí docházet vůbec. Bylo by proto na místě vyzkoušet pro daný kmen řasy různé typy transformačních plazmidů. Nicméně další typ plazmidu z jiného zdroje, než od kterého byl zakoupen náš pokusný plazmid, se nám nepodařilo získat. Daná společnost bohužel neposkytuje celkovou restriční mapu nabízeného transformačního plazmidu, ale pouze odkaz na publikaci (Fargo *et al.*, 1998), v níž byl plazmid vytvořen a následně úspěšně použit pro transformaci *Ch. reinhardtii* (nutno podotknout, že jiného kmenu než je standardní kmen 137C+, ale oba kmeny by se v podstatě od sebe neměly výrazně lišit).

Zarážejícím faktem navíc bylo, když doc. Bříza (školitel) později zjistil, že tento plazmid obsahuje dvě štěpná místa pro *Bam*H I namísto jednoho, deklarovaného v dané publikaci. Bez podrobné sekvence plazmidu v podstatě nemáme jistotu, jak je ve skutečnosti konstruován a zdali by potažmo nemohlo být něco při jeho použití v transformačních experimentech na závadu.

Na úplný závěr diskuze bych ráda podotkla, že pokud bych měla opět tu možnost vyzkoušet proces genetické transformace u organismu, snímž se setkávám vůbec poprvé, soustředila bych se stejně intenzivně jak na optimalizaci transformačních metod, tak i na různé typy využívaných transformačních plazmidů, popř. na různé úspěšně geneticky transformovatelné kmeny daného organismu podle dostupných informačních zdrojů.

6. Závěr

Ve své magisterské práci jsem se pokusila zavést transformaci chloroplastového genomu (ptDNA) zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* jako nového modelu pro experimentální činnost na oddělení Molekulární genetiky Ústavu molekulární biologie rostlin BC AV ČR, v. v. i., v Č. Budějovicích. Vyzkoušela jsem dvě dostupné metody genetické transformace (biolistiku a elektroporaci). Elektroporace se běžně využívá při jaderné transformaci studovaného organismu, ale úspěšná transformace jeho chloroplastového genomu pomocí této metody zatím nebyla publikována. Protože zde šlo o pokus aplikovat elektroporaci na jiný typ transformace, než je obvyklé, není příliš překvapivé, že mé pokusy skončily nezdarem. U žádné z 6 po elektroporaci získaných kolonií *Ch. reinhardtii* rezistentních vůči selekčnímu antibiotiku spektinomycinu se mi nepodařilo potvrdit přítomnost transgenu *aadA*. Naproti tomu biolistická metoda je, a to nejen u řas, považována za nejúčinnější prostředek genetické transformace chloroplastového genomu. Proto bylo těžiště mých experimentů výrazně posunuto ve prospěch biolistiky. Z celkového počtu 320 střel jsem získala 194 nezávislých kolonií vykazujících rezistenci ke spektinomycinu, z toho však pouze 25 kolonií bylo při PCR pozitivní na *aadA*. Jednoznačně prokázat, že se u těchto potenciálně transgenních linií skutečně jedná o transformaci chloroplastového genomu, se mi však nepodařilo ani pomocí Southernovy hybridizace.

7. Použitá literatura

Aldrich J., Cherney B., Merlin E., Williams C., and Mets L. (1985): Recombination within the inverted repeat sequences of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genome produces two orientation isomers, *Current Genetics*, 9: 233-238 – v Harris E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.

Anthonisen I. L., Salvador M. L., and Klein U. (2001): Specific sequence elements in the 59 untranslated regions of *rbcl* and *atpB* gene mRNAs stabilize transcripts in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, *RNA*, 7: 1024–1033.

Apt K. E. and Kroth-Pancic P. G., and Grossman A. R. (1996): Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Molecular & General Genetics*, 252 (5): 572-579.

Banicki J. J. (2004): An alga a day keeps the doctor away: engineered algae as a new means to vaccinate fish, *Twine Line*, 26: 1-2.

Bonnefoy N., Remacle C., and Fox T. D. (2007): Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria, *Methods in Cell Biology*, 80: 525-548.

Borovsky D. (2003): Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control, *Journal of Experimental Biology*, 206 (21): 3869-3875.

Brown L. E., Sprecher S. L., and Keller L. R. (1991): Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation, *Molecular and Cellular Biology*, 11 (4): 2328-2332.

Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R., Randolph-Anderson B. L., Robertson D., Klein T. M., Shark K. B., and Sanford J. C. (1988): Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles, *Science*, 240: 1534-1538 – v Harris E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.

Boynton J. E. and Gillham N. W. (1993): Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*, *Methods in Enzymology*, 217: 510-536.

Boynton J. E. and Gillham N. W. (1996): Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*, *Methods in Enzymology*, 264: 279-296.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., and Helling R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 70: 1293-1297.

Coll J. M. (2006): Review: methodologies for transferring DNA into eucaryotic microalgae, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4 (4): 316-330.

Debuchy R., Purtn S., and Rochaix J. D. (1989): The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus, *The EMBO Journal*, 8 (10): 2803-2809.

- Doetsch N. A., Favreau M. R., Kuscuglu N., Thompson M. D., and Hallick R. B. (2001):** Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon, *Current Genetics*, 39 (1): 49-60.
- Dunahay T. G. (1993):** Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers, *BioTechniques*, 15 (3): 452-460.
- El-Sheekh M. M. (1999):** Stable transformation of the intact cells of *Chlorella kessleri* with high velocity microprojectiles, *Biologia Plantarum*, 42 (2): 209-216.
- El-Sheekh M. M. (2000):** Stable chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* using microprojectile bombardment, *Folia Microbiologica*, 45 (6): 496-504.
- Fargo D. C., Zhang M., Gillham N. W., and Boynton J. E. (1998):** Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*, *Molecular & General Genetic*, 257 (3): 271-282.
- Faye L. and Daniell H. (2006):** Novel pathways for glycoprotein import into chloroplasts, *Plant Biotechnology Journal*, 4 (3): 275-279.
- Feng S., Xue L., Liu H., and Lu P. (2009):** Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method, *Molecular Biology Reports*, 36 (6):1433-1439.
- Franklin S. E. and Mayfield S. P. (2004):** Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*, *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2): 159-165.
- Fromm M., Taylor L. P., and Walbot V. (1985):** Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 82 (17): 5824-5828.
- Geng D., Wang Y., Wang P., Li W., and Sun Y. (2003):** Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta), *Journal of Applied Phycology*, 15 (6), 451-456.
- Gilham N. W. (1978):** Organelle heredity, Raven Press, New Your, 602 pp – v Harris E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.
- Gilham N. W. (1994):** Organelle Genes and Genomes, Oxford University Press, New York, 424 pp – v Stern D. B. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp.
- Goeddel D. V., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D. G., Ross M. J., Miozzari G., Crea R., and Seeburg P. H. (1979b):** Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone, *Nature*, 281 (5732): 544-548.
- Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., and Riggs A. D. (1979a):** Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76 (1): 106-110.
- Goldschmidt-Clermont M. (1991):** Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*, *Nucleic Acids Research*, 19 (15): 4083-4089.

- Gorman D. S. and Levine R. P. (1965):** Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 54: 1665-1669. [online]. [cit. 22. 1. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.chlamy.org/TAP.html>>.
- Gumpel N. J., Rochaix J. D., and Purton S. (1994):** Studies on homologous recombination in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Current Genetics*, 26(5-6): 438-442.
- Hallmann A. (2007):** Algal transgenics and biotechnology, *Transgenic Plant Journal*, 1 (1): 81-98.
- Harris E. H., Burkhart B. D., Gillham N. W., and Boynton J. E. (1989):** Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome, *Genetics*, 123 (2): 281-292.
- Harris E. H. (2009):** The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.
- Hawkins R. L. and Nakamura M. (1999):** Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*, *Current Microbiology*, 38 (6): 335-341.
- Hayashi M., Hirono M., and Kamiya R. (2001):** Recovery of flagellar dynein function in a *Chlamydomonas* actin/dynein-deficient mutant upon introduction of muscle actin by electroporation, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 49 (3): 146-153.
- Heifetz P. B. (2000):** Genetic engineering of the chloroplast, *Biochimie*, 82 (6-7): 655-666.
- Hiramatsu T., Nakamura S., Misumi O., and Kuroiwa T. (2006):** Morphological changes in mitochondrial and chloroplast nucleoids during *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cell cycle, *Journal of Phycology*, 42: 1048-1058 – v Stern D. B. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp.
- Hutner S. H., Provasoli L., Schatz A., and Haskins C. P. (1950):** Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms, *Proceedings of the American Philosophical Society*, 94 (2): 152-170. [online]. [cit. 22. 1. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.chlamy.org/trace.html>>.
- Chernobrovkina M. A., Sidorov E. A., Baranov I. A., Kharchenko P. N., and Dolgov S. V. (2007):** The effect of the parameters of biolistic transformation of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) on the level of transient expression of GFP reporter gene, *Biology bulletin*, 34 (6), 558-563.
- Chow K. C. and Tung W. L. (1999):** Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*, *Plant Cell Reports*, 18 (9): 778-780.
- Chu G., Hayakawa H., and Berg P. (1987):** Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA, *Nucleic Acids Research*, 15 (3): 1311-1317.
- Church G. M. and Gilbert W. (1984):** Genomic sequencing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81 (7): 1991-1995.
- Ishikura K., Takaoka Y., Kato K., Sekine M., Yoshida K., and Shinmyo A. (1999):** Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 (3): 307-314.

- Jarvis E. E. and Brown L. M. (1991):** Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea*, *Current Genetics*, 19 (4): 317- 321.
- Kathiresan S., Chandrashekar A., Ravishankar A., Sarada R. (2009):** *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae volvocales), *Journal of Phycology*, 45 (3):642-649.
- Kim D. H., Kim Y. T., Cho J. J., Bae J. H., Hur S. B., Hwang I., and Choi T. J. (2002):** Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*, *Marine Biotechnology*, 4 (1): 63-73.
- Kindle K. L., Schnell R. A., Fernandez E., and Lefebvre P. A. (1989):** Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase, *Journal of Cell Biology*, 109 (6): 2589-2601.
- Kindle K. L. (1990):** High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87 (3): 1228-1232.
- Kindle K. L., Richards K. L., and Stern D. B. (1991):** Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88 (5): 1721-1725.
- Klein U., De Camp J. D., and Bogorad L. (1992):** Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 (8): 3453-3457.
- Kovar J. L., Zhang J., Funke R. P., Weeks D. P. (2002):** Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation, *The Plant Journal*, 29 (1): 109–17.
- Kumar S. V., Misquitta R. W., Reddy V. S., Rao B. J., and Rajam M. V. (2004):** Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Science*, 166, 731-738.
- Kumar S. V. and Rajam M. V. (2007):** Induction of *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Current Science*, 92 (12): 1727-1729.
- Ladygin V. G. (2003):** The transformation of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation, *Microbiologia*, 72 (5): 585-591.
- Ladygin V. G. (2004):** Efficient transformation of mutant cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation, *Process Biochemistry*, 39 (11): 1685-1691.
- Lars T., Mogens T. H., and Anders R. S. (1987):** Secretion of human insulin by a transformed yeast cell, *FEBS Letters*, 212 (2): 307-312.
- Lohuis M. R. and Miller D. J. (1998):** Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs, *The Plant Journal*, 13: 427-435.
- Lumbreras V. and Purton S. (1998):** Recent advances in *Chlamydomonas* transgenics, *Protist*, 149 (1): 23-27.

- Manuell A. L., Beligni M. V., Elder J. H., Siefker D. T., Tran M., Weber A., McDonald T. L., and Mayfield S. P. (2007):** Robust expression of bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast, *Plant Biotechnology Journal*, 5 (3): 1-11.
- Maul J. E., Lilly J. W., Cui L., dePamphilis C. W., Miller W., Harris E. H., and Stern D. B. (2002):** The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats, *The Plant Cell*, 14 (11): 2659-2679.
- Mayfield S. P. and Kindle K. L. (1990):** Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 2087-2091 – v Harris E. H. (2009): *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.
- Melis A. and Happe T. (2001):** Hydrogen production: green algae as a source of energy, *Plant Physiology*, 127 (3): 740-748.
- Merchant S. S. et al. [117 authors] (2007):** The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, *Science*, 318 (5848): 245-250. [online]. [cit. 28. 1. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://sandwalk.blogspot.com/2007/10/genome-of-chlamydomonas-reinhardtii.html>>.
- Minoda A., Sakagami R., Yagisawa F., Kuroiwa T., and Tanaka K. (2004):** Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Plant & Cell Physiology*, 45 (6): 667-671.
- Morrow J. F., Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Goodman H. M., and Helling R. B. (1974):** Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 71 (5): 1743-1747.
- Muto M., Henry R. E., and Mayfield S. P. (2009):** Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in *Chlamydomonas* chloroplast, *BMC Biotechnology*, 9: 26.
- NCBI (2011):** Genomes [online]. [cit. 2. 3. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2759&type=4&name=Eukaryotae%20Organelles>>.
- Nelson J. A., Savereide P. B., and Lefebvre P. A. (1994):** The *CRY1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (6): 4011-4019.
- Newman S. M., Boynton J. E., Gillham N. W., Randolph-Anderson B. L., Johnson A. M., and Harris E. H. (1990):** Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events, *Genetics*, 126 (4): 875-888.
- Nishimura Y., Higashiyama T., Suzuki L., Misumi O., and Kuroiwa T. (1998):** The biparental transmission of the mitochondrial genome in *Chlamydomonas reinhardtii* visualized in living cells, *European Journal of Cell Biology*, 77 (2): 124-133 – v Stern D. B. (2009): *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second edition), Vol.2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp.
- Nugent G. D., Coyneb S., Nguyena T. T., Kavanagh T. A., and Dix P. J. (2006):** Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts, *Plant Science*, 170(1): 135-142.

Ondřej M. a Drobník J. (2002): Transgenozé rostlin, Academia, Praha, 316 pp.

Palmer J. D., Boynton J. E., Gillham N. W., and Harris E. H. (1985): Evolution and recombination of the large inverted repeat in *Chlamydomonas* chloroplast DNA. In: The Molecular biology of the photosynthetic apparatus (Steinback K. E., Bonitz S., Arntzen C. J., and Bogorad L., Eds.), 269-278 pp, Cold Spring Harbor, NY – v Harris, E. H. (2009) The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.

Paszkowski J. (1994): Homologous recombination and gene silencing in plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Piccardi R., Frosini A., Tredici M. R., and Margheri M. C. (2000): Bioactivity in freeliving and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*, *Journal of Applied Phycology*, 12 (3-5): 543-547.

Podstavková S., Miadoková E., and Vlcek D. (1992): New DNA repair-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mutation Research*, 293 (1): 65-69.

Potvin G. and Zhang Z. (2010): Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review, *Biotechnology Advances*, 28 (6): 910-918.

Pulz O. and Gross W. (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (6): 635-648.

Purton S. (2007): Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 616: 34-45.

Ramesh V. M., Bingham S. E., and Weber A. N. (2004): A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Methods in Molecular Biology*, 274: 301-307 – v Harris, E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.

Randolph-Anderson B. L., Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Johnson A. M., Dorthu M. P., and Matagne R. F. (1993): Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation, *Molecular & General Genetics*, 236 (2-3): 235-244.

Remacle C., Cardol P., Coosemans N., Gaisne M., and Bonnefoy N. (2006): High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103 (12): 4771-4776.

Rochaix J. D., Goldschmidt-Clermont M., and Merchant S. (1998): The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*: advances in photosynthesis, Vol. 7, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Russel J. A., Roy M. K., and Sanford J. C. (1992): Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation, *Plant Physiology*, 98 (3): 1050-1056.

Sager R. and Ishida M. R. (1963): Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 50: 725-730 – v Stern D. B. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp., rovněž v Harris E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.

Sanford J. C., Smith F. D., and Russell J. A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications, *Methods in Enzymology*, 217: 483-509.

Sayre R. T., Wagner R. E., Sirporanadulsil S., and Farias C. (2001): Transgenic algae for delivering antigens to an animal, *Int. Patent Number WO/ 2001/98335 A2*. [online]. [cit. 20. 3. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2001098335&IA=US2001019643&DISPLAY=STATUS>>.

Scott E. F. and Mayfield S. P. (2004): Prospect for molecular farming in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (2): 159-165.

Shimogawara K., Fujiwara S., Grossman A., and Usuda H. (1998): High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation, *Genetics*, 148 (4): 1821-1828.

Schiedlmeier B., Schmitt R., Müller W., Kirk M. M., Gruber H., Mages W., and Kirk D. L. (1994): Nuclear transformation of *Volvox carteri*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91 (11): 5080-5084.

Siripornadulsil S., Traina S., Verma D. P., and Sayre R. T. (2002): Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae, *The Plant Cell*, 14 (11): 2837-2847.

Skulberg O. M. (2000): Microalgae as a source of bioactive molecules: experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*, 12 (3-5): 341-34.

Sodeinde O. A. and Kindle K. L. (1993): Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 46(1): 83-91.

Stern D. B. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol.2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp.

Sueoka, N. (1960): Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 46(1): 83-91. [online]. [cit. 4. 1. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.chlamy.org/Sueoka.html>>.

Svab Z., Harper E. C., Jones J. D., and Maliga P. (1990): Aminoglycoside-3'-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*, *Plant Molecular Biology*, 14 (2): 197-205.

Svab Z. and Maliga P. (1993): High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90 (3): 913-917 – v **Paszowski J. (1994):** Homologous recombination and gene silencing in plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M., Soen S. Y., Franzén L. G., and Rochaix J. D. (1991): Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I, *The EMBO Journal*, 10 (8): 2033-2040.

Tang D. K. H., Qiao S. Y., and Wu M. (1995): Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 36 (5): 1025-1035.

- Tai T. H. and Tansley S. T. (1991):** A rapid and inexpensive method for isolation of DNA from dehydrated plant tissue, *Plant Molecular Biology Reporter*, 8 (4): 297-303.
- Tokunaga T., Iwai S., Gomi H., Kodama K., Ohtsuka E., Ikehara M., Chisaka O., and Matsubara K. (1985):** Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast, *Gene*, 39 (1): 117-120.
- Van Wert S. L. and Saunders J. A. (1992):** Electrofusion and electroporation of plants, *Plant Physiology*, 99 (2): 365-367.
- Wang C., Wang Y., Su Q., and Gao X. (2007a):** Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12 (2): 180-183.
- Wang T. Y., Xue X., Hou W., Yang B., Chai Y., Ji X., and Wang Y. (2007b):** Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (3): 651-657.
- Watson J. D. and Crick F. H. C. (1953):** A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171: 737-738.
- Whiteway M. S. and Lee R. W. (1977):** Chloroplast DNA content increases with nuclear polyploidy in *Chlamydomonas*, *Molecular & General Genetics*, 157: 11-15 – v Stern D. B. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 2, Academic Press, Kidlington, GB, 1071 pp.
- Wurtz E. A., Sears B. B., Rabett D. K., Shepherd H. S., Gillham N. W., and Boynton J. E. (1979):** A specific increase in chloroplast gene stations following growth of *Chlamydomonas* in 5-fluorodeoxyuridine, *Molecular & General Genetics*, 170: 235-242 – v Harris E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second edition), Vol. 1, Academic Press, Kidlington, GB, 444 pp.
- Wykoff D. (1998):** Electroporation protocol, bionet.chlamydomonas archives. [online]. [cit. 3. 9. 2010]. Dostupné z WWW: <<http://www.bio.net/hypermail/chlamydomonas/1998-June/000995.html>>.
- Yamasaki T., Kurokama S., Watanabe K. I., Ikuta K., and Ohama T. (2005):** Shared molecular characteristics of successfully transformed mitochondrial genomes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Molecular Biology*, 58 (4): 515-527.
- Yang Z., Li Y., Chen F., Li D., Zhang Z., Liu Y., Zheng D., Wang Y., and Shen G. (2006):** Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast, *Chinese Science Bulletin*, 51 (14): 1703-1709.
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., and Potrykus I. (2000):** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm, *Science*, 287 (5451): 303-305.
- Zaenen I., Larebeke N., Teuchy H., van Montagu M., and Schell J. (1974):** Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains, *Journal of Molecular Biology*, 86 (1): 109-127.