

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

a

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.
Laboratoř virologie



**Použití rostlinných virů pro navození cílených epigenetických
změn u *Solanum tuberosum* a *Nicotiana benthamiana***

Diplomová práce

Autor práce: Jakub Dušek

Vedoucí práce: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.
Školitel konzultant: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Použití rostlinných virů pro navození cílených epigenetických změn u *Solanum tuberosum* a *Nicotiana benthamiana*" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2016

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. za možnost pracovat na tomto zajímavém tématu, Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu kdykoli pomoci. Dále bych rád poděkoval Renatě Hadámkové, Doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc. a RNDr. Oldřichu Navrátilovi, za to, že mě naučili samostatné práci v laboratoři a pomohli mi vždy, když jsem potřeboval. Nakonec chci poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Použití rostlinných virů pro navození cílených epigenetických změn u *Solanum tuberosum* a *Nicotiana benthamiana*

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá navozením cílených epigenetických změn pomocí upraveného X viru bramboru (PVX, **P**otato **v**irus **X**). Z rostlin *Solanum tuberosum* a *Nicotiana benthamiana* byl pomocí PCR a speciálně navržených primerů izolován gen nesoucí sekvenci PDS. Primery byly navrženy tak, aby byly univerzální pro obě rostliny a Tm teplota byla v rozmezí 5 °C. Na hraničních úsecích PCR produktů byla přidána restriční místa (XhoI a ClaI) navržena tak, aby po vložení do PVX byla sekvence PDS v AS orientaci. Virový vektor pGR106 byl později vnesen do rostlin za pomoci *Agrobacterium tumefaciens*. Tím došlo k degradaci cílového transkriptu, vedoucího k umlčení (silence) genu. Jedná se tedy PTGS (**p**ost**t**ranscriptional **g**ene **s**ilencing). Fenotypovým projevem je částečné vyblednutí zeleného rostlinného pletiva.

Část rostlin se inokulovala v podmínkách *in vitro*, a proto musela být vypracována nová metodika, umožňující účinnou inokulaci rostlin sterilním virovým inokulem.

Klíčová slova: PVX, PDS, Post – transkripční genový silencing, DNA

Introducing targeted epigenetic changes in *Solanum tuberosum* and *Nicotiana benthamiana* by plant viruses

Summary

In this thesis we have focused on the induction of targeted epigenetic changes using modified Potato Virus X vector (PVX, **P**otato **v**irus **X**). The gene coding sequence phytoene desaturase (PDS) was isolated from *Solanum tuberosum* and *Nicotiana benthamiana* plants using PCR. Primers were specifically designed as universal for both plant species and their T_m temperatures was in the range of 5 °C. The primers also added flanking restriction sites XhoI and ClaI to simplify cloning of PDS PCR products into full length PVX viral vector in AS orientation. The PVX viral vector pGR106 was later introduced into the plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Infection led to the degradation of the target transcript and to efficient gene silencing (PTGS **p**ostranscriptional **g**ene **s**ilencing). The process has been manifested by complete or partial fading of a green plant tissue phenotype..

Some of the plants were also inoculated in *in vitro* conditions, for which a novel technique has been implemented.

Keywords: PVX, PDS, Posttranscriptional gene silencing, DNA

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Literární rešerše	10
1.1 Rostlinné viry	10
1.2 Obrana rostlin proti virům	12
1.3 PVX – X virus bramboru	12
1.4 Expresní vektory založené na rostlinných vírech	13
1.4.1 Transientní exprese	13
1.4.2 Permanentní exprese.....	14
1.5 Silencing genu	14
1.5.1 Supresory umlčování genů	15
1.6 Metylace DNA	15
4. Materiál a metody	18
1.7 Metody	18
1.7.1 Rostlinný materiál	18
1.7.2 Virové vektory	18
1.7.3 Přístroje	19
1.7.4 Chemikálie.....	20
1.7.5 Ostatní vybavení	21
1.7.6 Roztoky, pufrы, soupravy a enzymy	21
1.7.7 Primery.....	23
1.8 Metody	23
1.8.1 Elektroforéza v agarosovém gelu	23
1.8.2 Izolace DNA	24
1.8.3 Izolace RNA	25
1.8.4 Reversní transkripce	25
1.8.5 PCR	26
1.8.6 Přечиštění DNA z agarosového gelu	26
1.8.7 Ligace	27
1.8.8 Transformace kompetentních buněk bakterie <i>E. coli</i>	27
1.8.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií.....	28
1.8.10 Restrikce.....	29
1.8.11 Transformace kompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i>	29
1.8.12 Pěstování rostlin	30

1.8.13	Inokulace.....	30
1.8.13.1	Inokulace injekční stříkačkou	30
1.8.13.2	Mechanická inokulace.....	30
1.8.14	Purifikace viru PVX.....	31
1.8.15	PT – ELISA (Plate – trapped ELISA).....	32
5.	Výsledky	34
1.9	Návrh primerů pro amplifikaci genu phytoden desaturázy	34
1.10	Izolace genů pro phytoden desaturázu z <i>N. benthamiana</i> a <i>S. tuberosum</i> ...	35
1.11	Klonování do pUC57	36
1.12	Klonování genu PDS do virového vektoru PVX.....	37
1.13	Inokulace rostlin <i>N. benthamiana</i>	39
1.14	Výsevy semínek na sterilní půdu	42
1.14.1	Příprava media	42
1.14.2	Sterilizace semen	42
1.15	Filtrace virového materiálu	45
1.16	Inokulace <i>Solanum tuberosum</i> v <i>in vitro</i> podmínkách	47
1.16.1	Pěstování brambor <i>in vitro</i>	47
1.16.2	ELISA.....	48
1.17	Izolace viru	49
6.	Diskuse	50
1.18	Rostliny <i>Nicotiana benthamiana</i>.....	50
1.19	Rostliny <i>Solanum tuberosum</i>	51
1.20	Sterilní virové inokulum.....	52
7.	Závěr	53
8.	Seznam literatury.....	54
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	57
10.	Seznam příloh	58
1.21	Obrázky.....	58
1.22	Tabulky	58
1.23	Grafy.....	58

1. Úvod

Rostlinné viry, nebo také fytoviry, jsou obligátní vnitrobuněční parazité rostlin. Každý fytovirus má svůj vlastní okruh hostitelských rostlin. Často to bývají kulturní plodiny, ve kterých mohou způsobovat značné škody. V napadených rostlinách často dochází k rozvoji pro daný virus typických příznaků např. listové skvrnitosti, zakrslosti, barevným změnám a mnoha dalším.

Na viry ale můžeme pohlížet z více stránek, nejenom jako na fytopatogena, ale i jako na přínos pro biotechnologie (používají se k expresi hodnotných proteinů nebo vakcín), vědu a výzkum. Vhodnou rostlinou pro práci s viry je *Nicotiana benthamiana*, kterou lze snadno infikovat mnoha různými rostlinnými viry. Velice snadno se inokuluje, rychle roste a je poměrně nenáročná. Navíc práce s rostlinami a jejich viry je finančně přijatelnější (oproti jiným metodám) díky nízkým výrobním nákladům.

Epigenetické změny jsou takové změny v genové expresi, ke kterým dochází v průběhu života jedince vlivem vnějších podmínek. Tyto změny ale nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA, ale o změny toho, která DNA je aktivně transkribována a která nikoliv. Některé takové vyvolané změny se mohou dědičně přenášet na potomstvo, ale tento proces bývá kdy reversibilní (potenciálně vratný).

Do rostlin můžeme uměle dodat (například pomocí virového vektoru např. PVX) jednořetězcovou antisense RNA. V rostlině vznikne dvouvláknová RNA (dsRNA), podle které není ribozom schopný syntetizovat bílkovinu, zato je však velmi účinným spouštěčem zhášení genové exprese (genového silencingu).

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce je studium mechanismů vedoucích k vyvolání cílené methylace jaderné DNA pomocí post-transkripčního genového silencingu (PTGS). Modelovými organismy budou vegetativně rozmnožované plodiny bramboru (*Solanum tuberosum*), generativně rozmnožované rostliny tabáku (*Nicotiana benthamiana*) a X virus bramboru (PVX).

- 1) Konstrukce rekombinantního rostlinného viru PVX určeného pro silencing markerového genu PDS
- 2) Infekce rostlin virovým vektorem, vyvolání PTGS
- 3) Fenotypová analýza rostlin další generace

Předpokládáme, že po inokulaci rostlin *Nicotiana benthamiana* pomocí rekombinantního rostlinného viru PVX, určeného pro silencing genu PDS, nastane změna ve fenotypu F1 generace rostlin.

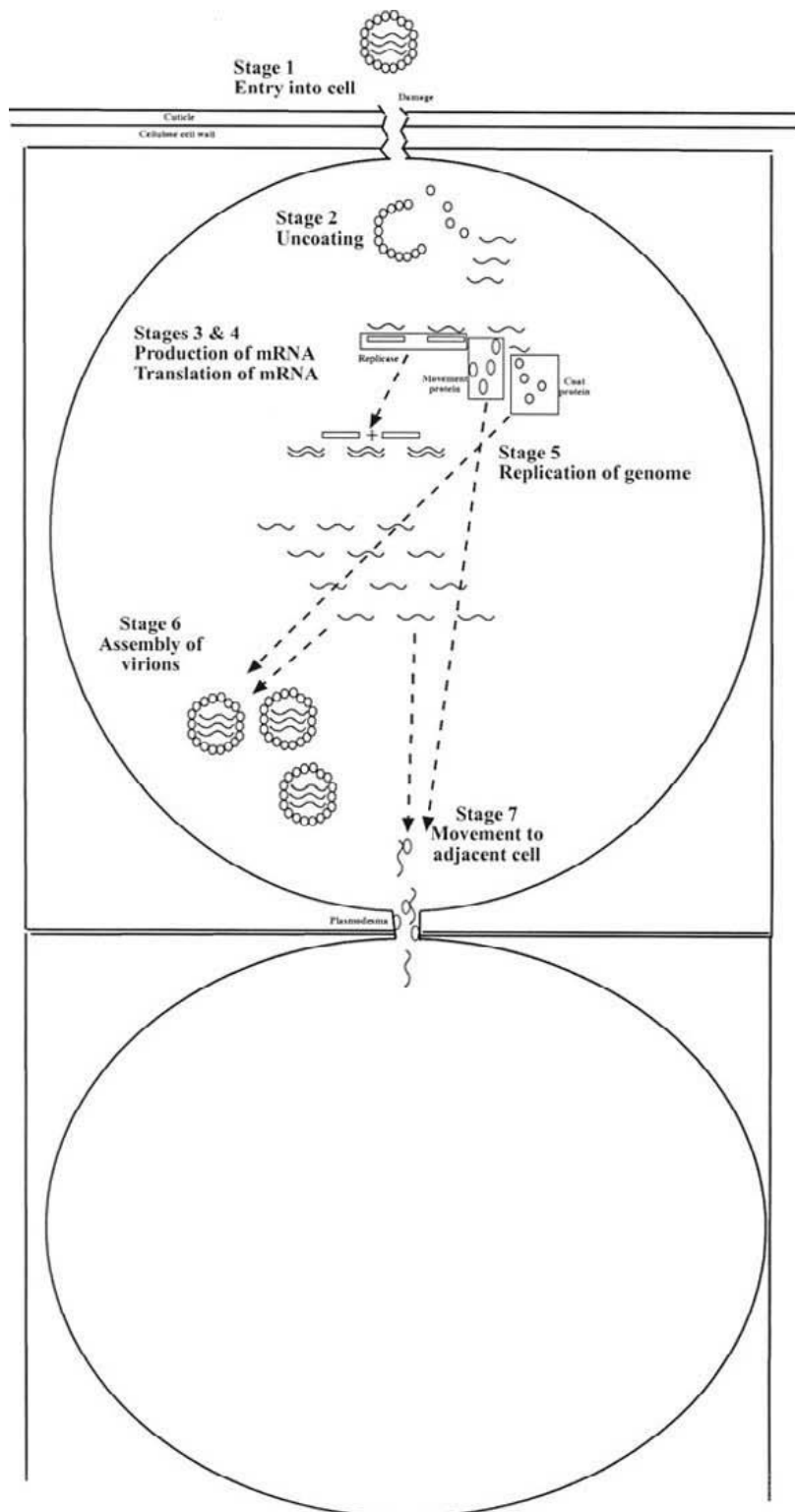
3. Literární řešerše

1.1 Rostlinné viry

Mezi rostlinné viry se počítají takové viry, které dokáží infikovat rostlinné buňky a replikovat se v nich. Na rozdíl od živočišných buněk, jsou buňky rostlinné chráněny buněčnou stěnou. Rostlinné viry však nedisponují žádným mechanismem, který by jim umožnil aktivně proniknout přes buněčnou stěnu do rostlinné buňky. Viry tak mohou do buňky proniknout jen poškozenými místy. K těmto poškozením dochází buď mechanicky, nebo působením jiného organismu (tzv. vektoru). Nejčastějším vektorem je hmyz – mšice, molice, křísi, některé rostlinné viry jsou ale přenášeny i houbami. Virus se do buňky dostává pomocí ústního ústrojí hmyzu. Další možností je přenos pomocí pylu nebo roubování infekčního materiálu na zdravé pletivo (Rozsypal et al., 2002).

Rostlinné buňky jsou navzájem propojeny pomocí plasmodesmat, která spojují cytoplasmu jednotlivých buněk. Virus se tedy může šířit mezi jednotlivými buňkami prostým pohybem v cytoplasmě a postupně tak dochází k sekundární infekci dalších buněk v pletivu (Rozsypal et al., 2002). Tento způsob přenosu z buňky do buňky se nazývá cell-to-cell movement. K tomuto způsobu pohybu je většina rostlinných virů vybavena jedním nebo více pohybovými proteiny (Hull, 2009). Některé rostlinné viry, jako například X virus bramboru, potřebují pro pohyb z buňky i virový obalový protein (CP) (Rozsypal et al., 2002). Obalový protein viru X má zcela nezastupitelný význam ve všech fázích interakce virus – rostlina (Baratova et al., 2004). Na větší vzdálenosti se viry šíří vodivými pletivy. Ovlivňující faktory rychlosti šíření viru jsou např. druh viru, druh rostliny a vnější podmínky (Rozsypal et al., 2002).

Pokud je infikovaná rostlinná buňka k viru vnímavá, dojde během několika hodin ke změně jejího metabolismu a započne replikační cyklus viru. Infekce první buňky je odlišný proces od infekce ostatních buněk. Tento proces začíná v místě inokulace první buňky a po namnožení se viry šíří rostlinou. V místě vstupu viru do rostliny se mohou vyvíjet lokální příznaky. Virus se může šířit po celé rostlině a dochází k systémové infekci. (Rozsypal et al., 2002)



Obrázek 1 : Zobrazení virového infekčního cyklu (Hull, 2009)

1 – Vstup do buňky, 2 – Dekapsidace, 3 & 4 – Produkce a translace mRNA, 5 - Replikace DNA, 6 - Komplementace virionů, 7 – Přesun do přilehlých buněk

Většina názvů rostlinných virů, je odvozena od hlavního symptomu a převládajícího hostitele (popřípadě hostitele, u kterého byl virus poprvé popsán). Některé viry mohou infikovat celou rostlinu bez zjevných příznaků. Stávají se tak zdrojem dalšího šíření viru. Zdrojem virových infekcí často bývají planě rostoucí rostliny nebo i bezpříznakové okrasné rostliny šířené nadnárodními distribučními sítěmi. (Hull, 2009).

1.2 Obrana rostlin proti virům

Rostliny se vůči virové infekci brání mnoha různými mechanismy a adaptacemi. Vzhledem ke svému stacionárnímu způsobu života se rostlina vůči infekci brání většinou pasivně (anatomické a morfologické vlastnosti rostliny). Mezi pasivní ochranu patří např. přítomnost kutikuly, voskem pokrytá buněčná stěna, či jinými úpravami pokožky, které zabraňují vniknutí patogena do organismu. (Zhao et al. 2005).

Pokud dojde k překonání pasivních obranných mechanismů, je rostlina dále vybavena specifickými a nespecifickými ochrannými mechanismy. Během specifické obranné reakce interaguje rostlinný receptor s efektorovým virovým proteinem a výsledkem této specifické obranné reakce nejčastěji bývá hypersensitivní obranné reakce. Nevýhodou tohoto mechanismu je, že receptory jsou zaměřeny pouze na určitý protein konkrétního viru, takové geny rezistence proti virům jsou často založeny monogenně. K jejich překonání často stačí i bodová mutace virového genomu, ta však může na druhou stranu přinést omezenou fitness viru. Viry překonávající rezistenci jsou výsledkem přirozené evoluce a nedá se jim zabránit (Rozsypal et al, 2002).

1.3 PVX – X virus bramboru

X virus bramboru obvykle způsobuje jen mírné nebo latentní příznaky infekce na bramborách. Na tabáku se projevuje skvrnitostí a deformacemi vrchních listů. Na rostlinách *Chenopodium amaranticolor* dochází k hypersensitivní reakci a vzniku nekrotických lezí. Symptomy jsou často dosti variabilní – projevují se podle kultivaru rostliny, kmenu viru, zdravotního stavu rostliny a synergickému účinku s dalšími infekcemi. Uvádí se, že ve smíšené infekci s PVY nebo jiným potyvirem se mohou ztráty zvýšit o 50%. X virus napadá především rostliny z čeledi *Solanaceae* (lilkovité), ale i *Asteraceae* (hvězdnicovité), *Amaranthaceae* (laskavcovité), *Fabaceae* (bobovité) a další. (Loebenstein and Gaba, 2012).

Virus je nepřenositelný vektorem, pyllem ani semeny. Přenos je možný mechanickou inokulací nebo kontaktem infikované a zdravé rostliny (Stols et al. 1970).

Virion se skládá z neobalené kapsidy, která je vláknitá s helikální symetrií. Částice je dlouhá 470 až 580 nm a široká 13 nm. Přibližně 94 % hmotnosti částice tvoří proteiny, 6 % RNA. Genom tvoří lineární jednovláknová pozitivní ssRNA (6435 nukleotidů) (Loebenstein and Gaba, 2012).

PVX může být detekován v listech nebo hlízách pomocí ELISA testu, RT-PCR, nebo může být určen elektronovým mikroskopem (Loebenstein et Gaba 2012).

PVX, slouží v rostlinné virologii jako modelový virus. X virus brambor v posledních letech výrazně přispěl k pochopení principů hostitelské rezistence a mechanismů genového umlčování (gene silencing) (Ryu et Hong, 2008).

Expresní vektor pGR106, který je odvozený od PVX (Baulcombe et al., 1995) kombinuje výhody transfekce zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens* a virové infekce (Wagner et al., 2004) Ve srovnání s mnoha dalšími systémy rostlinných virových vektorů, je genom PVX schopný pojmout velké inserce sekvencí heterologních proteinů. (Chapman et al., 1992).

1.4 Expresní vektory založené na rostlinných virech

1.4.1 Transientní exprese

Rostlinné viry mohou být použity jako univerzální expresní vektory, které se využívají pro produkci rekombinantních proteinů v rostlinách (Yusibov et al., 2006). U transientní (dočasné) exprese, která je založená na rostlinných virech, nedochází k začlenění genetické informace do genomu rostliny. Díky tomu mohou být vektory purifikací z rostliny zpětně izolovány. Inokulace hostitelské rostliny by měla být co nejjednodušší (mechanická inokulace), provedena pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, s vloženým virovým vektorem – ten zajišťuje systémovou distribuci v rostlině. Navíc by rostlina měla být k viru vnímavá, nebo tolerantní – tím dosáhneme vysoké koncentrace virů a tím i vysokého výtěžku (Kaproeski et Yusibov, 2001).

Nevýhodou tohoto postupu je nestabilita virového vektoru. Může dojít ke ztrátě vloženého konstruktů nebo jeho části (Chapman et al., 1992).

1.4.2 Permanentní exprese

U permanentní exprese dochází k trvalému začlenění genetické informace do genomu rostliny. Tento gen se stabilně dědí z generace na generaci (Gelba, 2007). Transformace *Agrobacterium tumefaciens* je nejčastější metodou – ty obsahují Ti plazmid, do kterého je možné vložit konstrukt. Po inokulaci rostliny transformovanými buňkami je T - DNA do genomu hostitele vložena (Baulcombe et al., 1995).

1.5 Silencing genu

Rostliny jsou vybaveny adaptivním obranným mechanismem proti virové infekci. Tento mechanismus se nazývá gene silencing (umlčování genové exprese) (Jung et Kempken 2010). Spouštěcím signálem pro aktivaci tohoto obranného mechanismu je přítomnost dvouvláknové RNA v cytoplasmě. Genový silencing může být na úrovni transkripční (transcriptional gene silencing, TGS) nebo na post – transkripční (posttranscriptional gene silencing, PTGS) PTGS se také může označovat jako RNA silencing, pokud je vyvolán virem, bývá rovněž označován jako VIGS (virus induced gene silencing) (Vaucheret and Fagard 2001).

Během replikace rostlinného viru se nutně v cytoplasmě buněk vyskytují RNA obou polarit sense a antisense, a jejich komplex. Přítomnost dvouvláknové RNA v cytoplasmě je silným spouštěčem VIGS. Nejprve je pomocí enzymu DICER RNA rozštěpena na krátké 20-25 bazí dlouhé fragmenty a ty jsou poté vloženy do komplexu RISC (RNA-induced silencing komplex). Následně je degradována buď virová RNA nebo i jiné molekuly RNA například mRNA, které mají baze komplementární s krátkými fragmenty v komplexu RISC (Weinhold et al. 2013). Mechanismus vzniku a funkce PTGS byl nejprve popsán u rostlin a poté byl objeven rovněž u všech dalších eukaryotických organismů. V roce 2006 byla za odhalení mechanismů RNA interference udělena Nobelova cena. Při TGS je exprese genu přímo blokována, a to již na úrovni transkripce epigenetickými modifikacemi chromatimu – nejčastěji methylací cytosinových bází v sekvenci DNA a modifikacemi histonů chromatinu (An et al. 2005). Komplexy RISC se zřejmě mohou podílet na RNA řízené metylaci DNA (RdDM), nicméně mechanismus přechodu PTGS na TGS není ještě zcela popsán. (Weinhold et al. 2013)

Dvouvláknová RNA (dsRNA) je poté štěpena na malé úseky RNA. Ty pak řídí v součinnosti s řadou dalších proteinů buď štěpení částečně či plně komplementární mRNA,

nebo blokují její translaci v procesu PTGS. Také se mohou podílet na RNA řízené metylaci DNA (RdDM). Umlčují geny na transkripční úrovni doprovázené remodelací chromatinu (Zho et al., 2005)

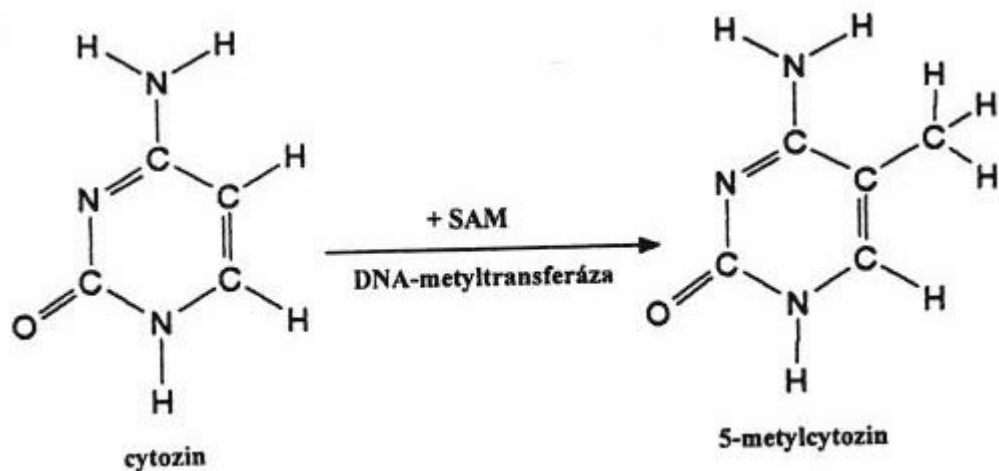
1.5.1 Supresory umlčování genů

Některé rostlinné viry mohou kódovat proteiny, které inhibují silencing genu. Tyto proteiny zasahují do jednoho či více kroků dráhy PTGS. Dokud se virus v infikované rostlinné buňce nezačne replikovat, tyto proteiny nemohou být produkovány. Supresorová aktivita může být prokázána dlouhodobou akumulací viru v buňce ve vysoké koncentraci (Lu et al. 2003).

1.6 Metylace DNA

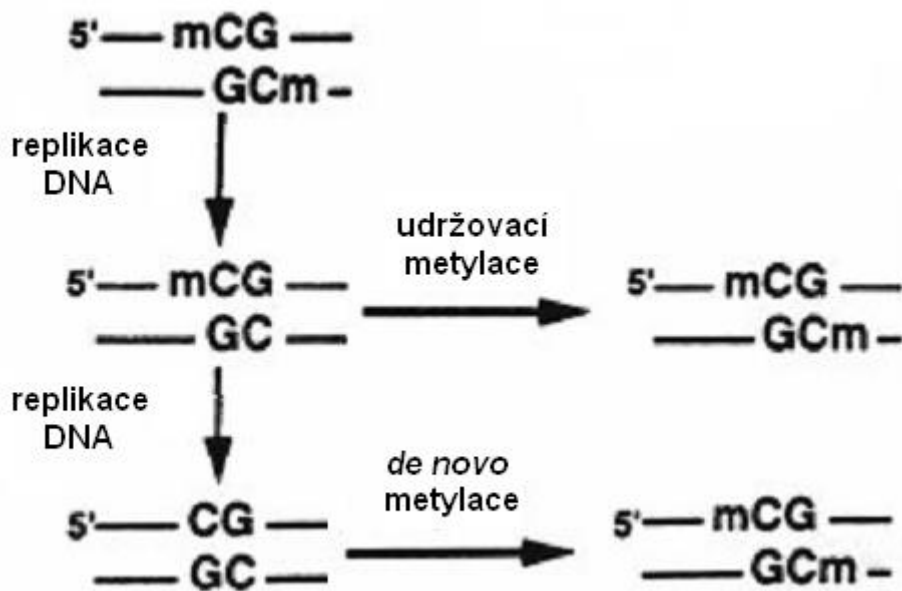
Methylace DNA je spolu s post-translačními úpravami histonů základním mechanismem epigenetické regulace genové exprese. Jedná se o kovalentní adici metylové skupiny na specifickou sekvenci DNA. Kromě čtyř běžných dusíkatých bází, což je adenin (A), thymin (T), guanin (G) a cytosin (C), může DNA obsahovat i báze modifikované. Nejčastější modifikovanou bází je 5-metylcytosin (Kouzarides, 2007) Methylace cytosinu na pozici C5 je prastarou epigenetickou modifikací, kterou můžeme nalézt ve všech říších eukaryot a také u bakterií. (Feng and Jacobsen 2011) Mezi další modifikace patří například N4-metylcytozin a N6-metyladenin, které jsou popsány především u prokaryot. (Kouzarides, 2007). Vyskot (1999) uvádí, že v jaderných genomech savčích druhů je metylováno asi jen 8% cytosinových bází, u rostlin může tato hodnota dosáhnout až 30%. Vysoký stupeň methylace u rostlin však koreluje s vysokým počtem repetitivních (opakovaný) sekvencí. Ty mohou tvořit až 90% genomu. Oblasti s vysokým zastoupením metylovaných cytosinů jsou transkripčně neaktivní. Jako donor metylové skupiny slouží S-adenosyl-Lmethionin (SAM). Reakci katalyzuje enzym DNA-metyltransferáza (Vyskot, 1999).

Některé druhy eukaryot (například *Schizosaccharomyces pombe* a *Drosophila*) metylaci cytosinů téměř nemají. To dokazuje, že methylace DNA není nepostradatelným regulačním epigenetickým mechanismem (Vyskot, 1999).



Obrázek 2: Vznik 5–metylcytosinu, (Vyskot, 1999)

Máme dva druhy metylace. Prvním je *de novo* metylace. Jedná se o metylaci dosud nemodifikované DNA. *De novo* mohou být metylovány cytoziny v symetrických i nesymetrických sekvenčních motivech. Druhým typem je udržovací metylace. Tímto procesem se udržují metylační vzorce mezi buněčnými generacemi. Tento proces je velmi rychlý, metylace dceřiného vlákna je dokončena jen několik minut po replikaci DNA. (Vyskot, 1999)



Obrázek 3: Schéma *de novo* a udržovací metylace DNA, Vyskot (1999)

K nejznámějším inhibitorům metylace DNA patří 5-azacytidin a 5-azadeoxycytidin, analogy cytidinu. Inhibují jak udržovací, tak *de novo* metylaci. Vytvářejí kovalentní spojení mezi DNA a metylázou, čímž brání další aktivitě enzymu (.Juttermann et Jaenisch, 2004).

4. Materiál a metody

1.7 Metody

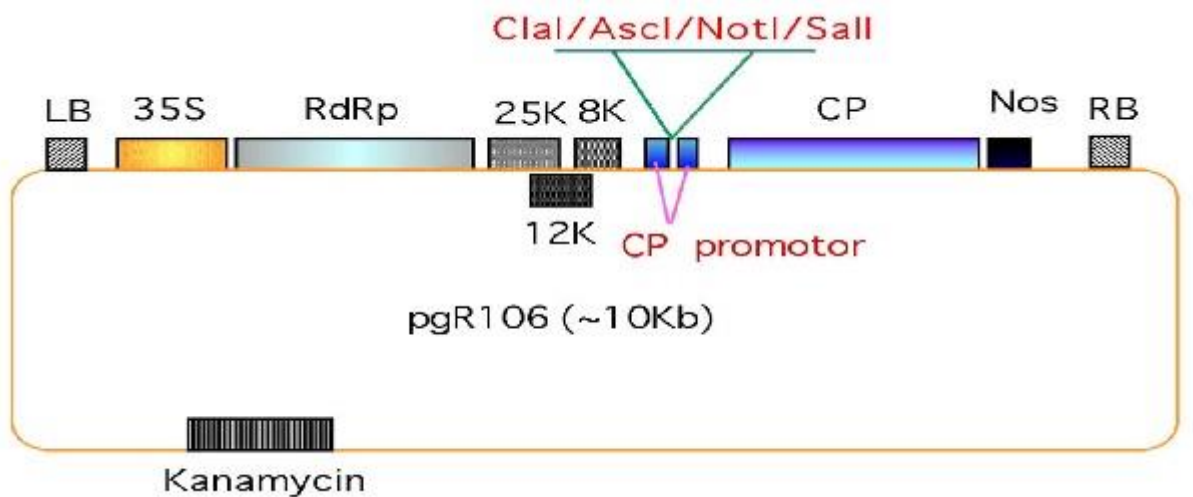
1.7.1 Rostlinný materiál

Rostliny *Nicotiana benthamiana* – ÚEB AV ČR, v. v. i.

Rostliny *Nicotiana tabacum*, cv. Samsun NN - ÚEB AV ČR, v. v. i.

Solanum tuberosum, cv. Kamyk - Šlechtitelská stanice Selekt Pacov

1.7.2 Virové vektory



Obrázek 4 : Schématické znázornění vektoru pGR106

Převzato z: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/davidbaulcombe/methods/vigs>

LB (left border) a RB (right border) znázorňuje místa nezbytná pro přijetí vektoru buňkami

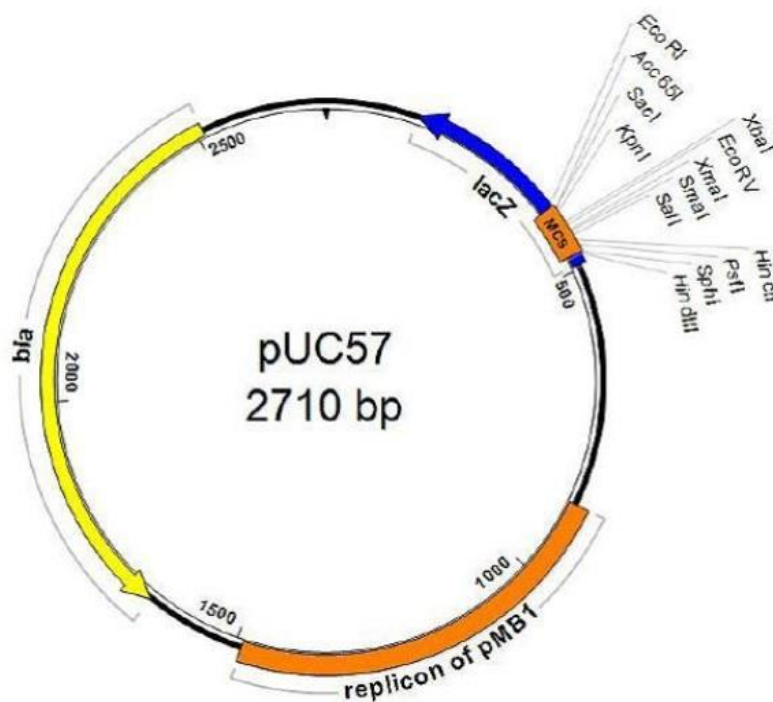
Agrobacterium tumefaciens. Úsek Kanamycin poukazuje na rezistenci *A. tumefaciens* ke

kanamycinu. RdRp (RNA dependentní RNA polymeráza) je TGB (triple gene block) – blok

čítající tři proteiny. CP je kapsidový protein PVX. Před ním se nachází silný zdvojený

promotor. Mezi CP a promotory se nachází restriční místa pro možné vložení heterologního

genu 35S – promotor z Viru mozaiky kvěťáku (Baulcombe, 1995)



Obrázek 5: Vektor pUC57 obsahuje gen bla, ten umožňuje rezistenci k ampicilinu. Místo lacZ slouží k modro/bílé selekci.

Převzato z: <http://www.centic-biotec.com/pUC57/en>, upraveno

1.7.3 Přístroje

Centrifuga Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Německo
Centrifuga Multifuge 3SR	Heraeus, Německo
Dokumentační systém Gel Doc EQ	BIO-RAD, USA
Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD, USA
Inkubátor Heraeus Function Line	Heraeus, Německo
Laminární box HERAsafe KS 12	Heraeus, Německo
Magnetická míchačka MM2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR termocykler C1000 Thermal Cycler	BIO-RAD, USA
pH metr HI 1131 Hanna	Instruments, USA
Spektrofotometr HELIOS γ	Thermo Fisher Scientific, USA
Termální blok TB1 ThermoBlock	Biometra, Německo
Ultracentrifuga Beckman L7-55 Beckman	Coulter, USA
Univerzální třepaný inkubátor NB-205	N-BIOTEK, Korea

Váhy Kern EW220-3NM
Výrobník ledu
Zdroj napětí pro elektroforézu Power Pac 300

Kern, Německo
Brema Ice Makers, Itálie
BIO-RAD, USA

1.7.4 Chemikálie

Agarosa	Promega, USA
Azid sodný	Sigma, USA
Bakto-agar	BD, USA
Diethanolamin	Fluka, Švýcarsko
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner, ČR
EDTA	Lachema, ČR
Hydrogenuhlíčan sodný	Lach-Ner, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema, ČR
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kanamycin	Serva, Německo
Karbenicilin	Duchefa, Holandsko
Kvasničný extrakt	Amresco, USA
Kyselina boritá	Lachema, ČR
Kyselina chlorvodíková	Lachema, ČR
Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, USA
Merkaptoethanol	Fluka, Švýcarsko
Murashige & Skoog medium	Duchefa, Holandsko
Ovalbumin	Fluka, Švýcarsko
PEG 6000	Fluka, Švýcarsko
Pepton	Amresco, USA
Polyvinylpyrolidon	Sigma-Aldrich, USA
Sacharosa	Lach-Ner, ČR
SYBR Safe Dna Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, USA
Tris	Duchefa, Holandsko

Triton X-100	Serva, Německo
Tween 20	Fluka, Švýcarsko
Uhličitan sodný	Lachema, ČR

1.7.5 Ostatní vybavení

Magenty	Magenta LLC, USA
Millex filtrační stříkačková jednotka, jednorázová,	Sigma-Aldrich, USA

1.7.6 Roztoky, pufrы, soupravy a enzymy

Promývací roztok = PBS+T

Do 1 l destilované vody

- 8 g NaCl
- 2,9 g Na₂HPO₄ · H₂O
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g KCl
- 0,2 g NaN₃
- 0,5 ml Tween 20

Potahovací pufr = PP (pH 9,6)

Do 250 ml destilované vody

- 0,39 g Na₂CO₃
- 0,73 g NaHCO₃
- 0,05 g NaN₃

Konjugační pufr = KP

Do 250 ml PBS+T

- 5 g PVP
- 0,5 g OVO (0,2 % ovalbumin v PBS+T)

Substrátový pufr = SP

24,25 ml diethanolaminu přidat do 200 ml destilované vody, poté upravit pH na 9,8 pomocí HCl. Po úpravě pH doplnit redestilovanou vodou na objem 250 ml.

Přenosový pufr

- 9 g Na₂HPO₄ do 500 ml destilované vody
- 1,7 g KH₂PO₄ do 250 ml destilované vody

Pak je roztok KH₂PO₄ přidáván do roztoku Na₂HPO₄ do té doby, než je pH 7,3.

Elektroforéza v agarosovém gelu

TBE pufr: 89 mM Tris-HCl, 89 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA, pH 8,0

Reverzní transkripce:

5x M-MLV RT Reaction Buffer	Promega, USA
dNTP mix (10 mM)	Fermentas, USA
RNasin (40 U/μl)	Promega, USA
M-MLV RT RNase H Minus, Point Mutant (200 U/μl)	Promega, USA

PCR:

5x Colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega, USA
dNTP mix (10 mM)	Fermentas, USA
GoTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega, USA

Přečištění PCR směsi a DNA z agarosového gelu:

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Německo
--	----------------

DNA ligace:

LB medium: 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 171 mM NaCl

LB agar: 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1,6 % (w/v) bacto-agar,
171 mM NaCl

Izolace plazmidů z bakterií:

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Německo
---------------------------	-----------------

Restrikční štěpení:

BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs, Anglie
----------------	-----------------------------

ClaI (10 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
ClaI (10 000 U/μl)	Fermentas, USA
EcoRI (10 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
PstI (20 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
SalI (20 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
XbaI (20 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
XhoI (20 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
SalIHF (20 000 U/μl)	New England Biolabs, Anglie
10x NEBuffer 4	New England Biolabs, Anglie
10x SuRE/Cut Buffer H	Sigma-Aldrich, USA
10x Thermo Scientific Tango Buffer	Fermentas, USA

1.7.7 Primery

PDS - S	AAACTCGAGCCAGCAATGCTTGGAG
PDS - AS	AAAATCGATACTGGAGTGGCAAACAC
PDS - 5NTR - S	AATATCGATTCCAATGGTTTAGTTGGGCG
PDS - 5NTR - AS	AATCTCGAGTAACGGCCAAACCACCACAAA
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT
HP – pGR106 – 5'	GCAAACCTAGATGCAGAAACC
HP – pGR106 – 3'	CATACAATCAAACCAGAAAATAC

1.8 Metody

1.8.1 Elektroforéza v agarosovém gelu

Touto separační metodou docílíme rozdělení různě dlouhých molekul DNA na základě jejich elektroforetické mobility na agarosovém nosiči. Molekuly DNA jsou v neutrálním nebo zásaditém prostředí ve formě polyanionů (zbytky kyseliny fosforečné). Se zvyšujícím se počtem nukleotidů tedy úměrně roste i náboj molekul. Tvar necirkulárních dvojvláknových molekul DNA se dá považovat za lineární a mobilita lineárních molekul DNA je za

konstantního napětí přímo úměrná velikosti nábojů (počtu nukleotidů) molekul DNA. V případě cirkulárních molekul DNA (plazmidy) závisí mobilita i na tvaru.

- 1) 1 g agarosy byl za tepla rozpuštěn ve 100 ml TBE pufru. Tím byl připraven 1 % agarosový gel
- 2) Do roztoku byl za stálého míchání pipetován 1 μ l SYBR Safe
- 3) Roztok byl nalit do připravené aparatury a po zatuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické vany s TBE pufrem
- 4) Do jednotlivých jamek byly pipetovány vzorky a vhodný marker
- 5) Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V (1 V/cm²) po dobu 30 min (v případě potřeby mohl být čas prodloužen)
- 6) Gel byl vizualizován v UV oblasti

1.8.2 Izolace DNA

Extrakce

100 mg pletiva bylo rozetřeno v třecí misce a zároveň bylo přidáno 0,5 ml DNA Azolu. Homogenát byl přepipetován do mikrozkuřavky a poté ponechán 5 minut při pokojové teplotě. Tím bylo umožněno oddělení nukleoproteinového komplexu.

Separace

Ke vzorku bylo přidáno 1 ml chloroformu a obsah byl promíchán. Poté byl ponechán 10 minut při pokojové teplotě. Nakonec byl vzorek centrifugován 15 min při 12 000 g.

Precipitace

Nyní byla odebrána tekutina nad usazeninou. Vzorek byl smíchán s 95 % etanolem (na 1 U supernatantu 0,75 U etanolu). Vzorek byl opatrně promíchán a ponechán 5 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován 4 min při 5 000 g. Tímto krokem bylo docíleno vysrážení a usazení DNA.

Promývání

Supernatant z předešlého kroku byl odsán a peleta byla dvakrát promyta v 0,5 ml 75 % etanolu. Centrifugace byla prováděna 4 minuty při 5 000 g.

Rozpuštění DNA

Etanol byl odsán a mikrozkuřavka byla po 3 minuty nechána otevřena, aby se všechny zbytky etanolu odpařily. Sediment byl rozpuštěn ve 100 μ l EB pufru. Nakonec byl vzorek promíchán, aby došlo k rozpuštění pelety.

1.8.3 Izolace RNA

Extrakce

100 mg pletiva bylo rozetřeno v třecí misce a zároveň bylo přidáno 1 ml RNA Azolu. Homogenát byl přepipetován do mikrozkušavky.

Precipitace

K vzorku bylo přidáno 0,4 ml redestilované vody. Vzorek byl poté promíchán a 10 minut ponechán při pokojové teplotě. Následovala centrifugace, trvající 15 min, při 12 000 g. Touto centrifugací jsme oddělili složky. V peletě se nachází DNA, proteiny a polysacharidy. RNA se nachází v supernatantu. Supernatant (1 ml) by přenesen do nové mikrozkušavky, ke kterému bylo přidáno 0,4 ml etanolu. Vzorek byl opatrně promíchán a poté ponechán při pokojové teplotě 10 min. Následovala centrifugace – 8 minut při 12 000 g. RNA se nyní nachází v peletě na dně mikrozkušavky.

Promývání

Supernatant z předešlého kroku byl odsán a peleta byla dvakrát promyta v 0,5 ml 75 % etanolu. Centrifugace byla prováděna 4 minuty při 5 000 g.

Rozpuštění RNA

Etanol byl odsán a peleta byla rozpuštěna v 50 μ l redestilované vody. Nakonec byl vzorek promíchán, aby došlo k rozpuštění pelety.

1.8.4 Reversní transkripce

Při reverzní transkripci (RT) dochází při použití vhodných primerů k přepisu jednovláknové molekuly RNA na molekulu DNA enzymem reverzní transkriptasa. Vzniká tak hybridní molekula RNA : DNA. U metody RT byla použita reverzní transkriptasa M - MLV RT, s kterou je doporučeno pracovat při 42° C.

Nejprve bylo smícháno 9 μ l RNA s 2 μ l primeru. Mikrozkušavka byla umístěna do termálního bloku vyhřátého na teplotu 70° C po dobu 5 minut. Ihned potom byly na 5 minut umístěny do ledu.

RT směs M-MLV RT

- 5 μ l 5x M-MLV RT Reaction Buffer
- 1,25 μ l 10 mM dNTP mix
- 0,25 μ l RNasin (40 U/ μ l)
- 1 μ l M-MLV RT (200 U/ μ l)

- 6,5 µl redestilované vody

K předešlým vzorkům byla přidána RT směs M-MLV RT. Mikrozkuřavky byly umístěny do termálního bloku vyhřátého na teplotu 42° C a byly zde ponechány po dobu jedné hodiny. Po 60 minutách byla teplota zvýšena na 70° C a mikrozkuřavky byly v termálním bloku při této teplotě ponechány 15 min (inaktivace reverzní transkriptasy).

1.8.5 PCR

PCR směs

- 5 µl 10x GoTaq Reaction Buffer
- 2 µl 10 mM dNTP mix
- 0,4 µl GoTaq DNA Polymerase (5 U/µl)
- 2,5 µl 5 % DMSO
- 35,1 µl redestilované vody

- 1) Do mikrozkuřavek byly pipetovány 2 µl přímého primeru a 2 µl zpětného primeru o koncentracích 20 µM. Primery byly vybrány podle úseku, který měl být amplifikován.
- 2) Do každé mikrozkuřavky byl přidán 1 µl templátu
- 3) Mikrozkuřavky byly umístěny do PCR termocykleru a byl nastaven následující program: inkubace při 94° C po dobu 90 sekund (denaturace DNA), následoval cyklus: 94° C po dobu 30 sekund, 56° C po dobu 30 sekund (hybridizace primerů), 72° C po dobu 45 sekund (tento časový úsek závisí na délce amplifikovaného fragmentu-přibližně 1 min na 1 kb fragment). Tento cyklus se opakoval 35x. Poslední krok byla inkubace při 72° C po dobu 10 min (rezerva pro GoTaq polymerasu)

1.8.6 Přečištění DNA z agarosového gelu

- 1) Vyříznutý proužek gelu byl vložen do předem zvažené mikrozkuřavky (hmotnost gelu nesmí být větší jak 100 mg)
- 2)) Do mikrozkuřavky bylo pipetováno 300 µl vazebného pufru
- 3) Mikrozkuřavka byla dána do termálního bloku vyhřátého na teplotu 50° C a byla zde ponechána po dobu 10 min, vzorek byl za tuto dobu třikrát promíchán

- 4) Do mikrozkušavky bylo pipetováno 150 μl isopropanolu a obsah mikrozkušavky byl znovu promíchán
- 5) Obsah mikrozkušavky byl převeden na kolonu a ta byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 6) Sběrná nádoba byla vylita, na kolonu bylo pipetováno 500 μl promývacího pufru a kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 7) Obsah sběrné nádoby byl vylit, na kolonu bylo pipetováno 200 μl promývacího pufru a byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 8) Kolona byla umístěna do mikrozkušavky
- 9) Na kolonu bylo pipetováno 50 μl elučního pufru a byla ponechána 1 minutu při pokojové teplotě
- 10) Nakonec byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min

1.8.7 Ligace

Do mikrozkušavky bylo pipetováno 1 μl roztoku DNA PCR produktu, 1 μl roztoku vektoru, 1 μl ligačního pufru, 1 μl roztoku PEG 6000, 1 μl T4 DNA ligasy a 5 μl vody. Mikrozkušavka byla umístěna do lednice (+ 4° C) a byla tam ponechána přes noc.

1.8.8 Transformace kompetentních buněk bakterie *E. coli*

- 1) 3 μl ligační směsi (do každé reakce by mělo jít přibližně 100 ng) byl pipetován do mikrozkušavky obsahující 100 μl suspenze buněk *E. coli*, kmene DH5 - Alfa
- 2) Mikrozkušavka byla ponechána na ledu 45 min
- 3) Poté byla mikrozkušavka umístěna do termálního bloku vyhřátého na teplotu 42° C po dobu 2 min
- 4) Mikrozkušavka byla umístěna na led a ponechána zde 2 min
- 5) Do mikrozkušavky bylo pipetováno 900 μl LB media
- 6) Mikrozkušavka byla inkubována za stálého třepání při teplotě 37° C po dobu 1 h
- 7) Byla připravena Petriho miska s LB agarem, která obsahuje antibiotikum karbenicilin o účinné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$
- 8) Po 1 h třepání byla mikrozkušavka centrifugována 1 min při 7 000 ot/min a bylo odstraněno 850 μl supernatantu

- 9) Sediment byl resuspendován ve zbylém supernatantu. Obsah mikrozkušavky byl pipetován na Petriho misku a byl rozetřen očkovací hokejkou
- 10) Petriho miska byla inkubována přes noc při teplotě 37° C

1.8.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Principem soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit je alkalická lyze bakteriálních buněk. Následuje adsorpce DNA na speciální silikátová vlákna v přítomnosti roztoku o vysoké iontové síle. Bakteriální buňky jsou lyzovány lyzačním pufrem P2, který obsahuje roztok NaOH a SDS (NaOH denaturuje chromosómalní DNA, plazmidovou DNA a proteiny, SDS solubilizuje fosfolipidy a proteiny buněčných membrán), a RNasu A (odstranění molekul RNA). Pufř N3 neutralizuje zásadité pH a má vysokou iontovou sílu. Vysoká koncentrace solí způsobuje denaturaci proteinů, chromosómalní DNA a precipitaci SDS, zatímco plazmidová DNA renaturuje a zůstává v roztoku.

- 1) Do zkumavky obsahující 5 ml LB media bylo pipetováno 10 μ l roztoku karbenicilinu (50 mg/ml)
- 2) Zkumavka s LB mediem byla naočkována bakteriální kulturou a zkumavky byly přes noc třepány při teplotě 37°C
- 3) Bakteriální suspenze ze zkumavek byla pipetována do mikrozkušavky a byla centrifugována po dobu 5 min při 12 000 ot/min
- 4) Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 250 μ l pufru P1
- 5) Sediment byl resuspendován v pufru P1
- 6) Do mikrozkušavky bylo pipetováno 250 μ l lyzačního pufru P2 a obsah mikrozkušavky byl promíchán
- 7) Do mikrozkušavky bylo pipetováno 350 μ l neutralizačního pufru N3, obsah mikrozkušavky byl promíchán a mikrozkušavka byla centrifugována po dobu 2 min při 13 000 ot/min
- 8) Supernatant byl pipetován na kolonu a ta byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 9) Obsah sběrné nádoby byl vylit, na kolonu bylo pipetováno 500 μ l promývacího pufru PB a kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 10) Obsah sběrné nádoby byl vylit, na kolonu bylo pipetováno 750 μ l promývacího pufru PE a kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min
- 11) Kolona byla umístěna do mikrozkušavky, na kolonu bylo pipetováno 50 μ l elučního pufru EB a mikrozkušavka s kolonou byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min

1.8.10 Restrikce

- 1) Do mikrozkuřavky byly pipetovány řádané restrikční enzymy, 2 μ l vhodného restrikčního pufru, 0,3 roztoku BSA. Do reakce jsem používal 300 ng až 1 μ g plazmidové DNA (objem dopočítáme spolu s 3 až 5 U restrikčního enzymu. Dodáme tolik redestilované vody, aby výsledný objem byl 20 μ l.
- 2) Mikrozkuřavka byla inkubována 2 h při teplotě 37°C
- 3) Poté byla teplota zvýřena na 80 ° C po dobu 15 min. Tím dořlo k deaktivaci restrikčních enzymů. Ne všechny restrikční enzymy však lze tepleně deaktivovat.
- 4) Byla provedena elektroforéza v 1 % agarosovém gelu

1.8.11 Transformace kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Cílem transformace je vřavit řádaný konstrukt do ředem řipravených kompetentních bakteriálních buněk *Agrobacterium tumefaciens*. To vyřaduje vytvořeni dočasné prostupné buněčné stěny.

- 1) Do mikrozkuřavky obsahující 100 μ l suspenze buněk *A. tumefaciens* byly pipetovány 2 μ l roztoku plazmidu pGR106 s vloženou DNA, směř byla promířána
- 2) Mikrozkuřavka byla ponořena do tekutého dusíku a ponechána zde 5 min
- 3) Mikrozkuřavka byla přemířtřena do termálního bloku vyhřátého na teplotu 37° C
- 4) Po roztátí obsahu byla mikrozkuřavka ponořena na 5 min do tekutého dusíku a poté byla umístřena do termálního bloku vyhřátého na teplotu 37° C
- 5) Po roztátí suspenze byla mikrozkuřavka umístřena na led a byla zde ponechána 15 min
- 6) Do mikrozkuřavky byl pipetován 0,5 ml LB media a mikrozkuřavka byla inkubována za stálého třepání při teplotě 28° C po dobu 1 h
- 7) Mikrozkuřavka byla umístřena do centrifugy a byla centrifugována při 4 000 ot/min po dobu 1 min
- 8) Supernatant byl odstraněn a sediment byl důkladně rozpuřtřen v 100 μ l LB media
- 9) Obsah mikrozkuřavky byl pipetován na Petriho misku s LB agarem (obsahující antibiotikum kanamycin o účinné koncentraci 50 μ g/ml) a byl rozetřen očkovací hokejkou
- 10)) Petriho miska byla inkubována 2 dny při teplotě 28°C

1.8.12 Pěstování rostlin

Všechny rostliny byly předpěstovány v kultivační místnosti s udržovanou teplotou 20 – 25 °C. V místnosti bylo umělé osvětlení a byla udržována denní 16-ti hodinová světelná perioda. Díky těmto podmínkám mohly být rostlina pěstovány po celý rok.

Dvou - třítýdenní sazenice *N. benthamiana* a *N. tabacum* byly jednotlivě rozsazovány do směsi zahradního substrátu s perlitem v poměru 3 : 1. První 2 dny po přesazení byly přiklopeny minipařeništěm. Po dalších 2 – 3 týdnech byly rostliny připravené na inokulaci.

1.8.13 Inokulace

1.8.13.1 Inokulace injekční stříkačkou

Inokulum (transformované *Agrobacterium tumefaciens* namnožené v LB médiu po 2 dnech) bylo naočkováno na spodní stranu 3 - 4 listů rostlin *Nicotiana benthamiana*. Tlak z injekční stříkačky umožňuje průnik bakterie do rostlinných buněk. Pro větší efektivnost byla horní strana listů pokropena vodou – tím došlo k otevření průduchů na spodní straně listů. Poté byly rostliny dopěstovány v Sanyo boxu.

Z rostlin (které projevily příznaky infekce PVX) byly po 14 dnech odebrány části listů. Ty sloužily k mechanické inokulaci rostlin *Nicotiana tabacum*, které mají větší listovou plochu a lépe se z nich virus purifikuje.

1.8.13.2 Mechanická inokulace

Infikované listy nebo samostatný virový purifikát byl smíchán (listy rozetřeny) v desetinásobném množství přenosového pufru (0,05 M Na – K – fos. pH 7,3). Tento extrakt byl nanášen skleněnou tyčinkou na svrchní stranu listů, která byla před tím poprášena karborundovým práškem. Poté byl tyčinkou rozetřen po celém povrchu listu.

Tímto postupem bylo zajištěno poškození buněk na povrchu listu. Usnadnily se tím podmínky pro průnik patogena do hostitelské rostliny. Inokulované rostliny byly dopěstovány v Laminárním boxu.

1.8.14 Purifikace viru PVX

Účelem purifikace je koncentrovat virové částice obsažené v listech inokulovaných rostlin. Výtěžek purifikátu se měří na základě absorbance v rozmezí 220 - 320 nm.

- 1) Rostlinný materiál se smíchá s 0,1 M fosfátovým pufrům pH 8,0 (do 1 l redestilované vody se přidá 30,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 2,18 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) v poměru 1 : 2. Dále je přidáno 0,2 % merkaptoethanolu a 10 % etanolu (% vychází z objemu fosfátového pufru).
- 2) Celá směs je homogenizována 3 minuty v mixéru.
- 3) Homogenát je filtrován přes nylonovou síťku
- 4) Směs je centrifugována 20 min při 4° C a 7 800 g
- 5) Supernatant je znovu přefiltrován přes silon a objem je změřen. Přefiltrovaný supernatant je doplněn Tritonem X - 100, tak aby vznikl 2% roztok
- 6) Směs je míchána 1 hod v ledové lázni
- 7) Vzorek byl centrifugován 20 min při 4° C a 5 500 g
- 8) Supernatant je slit a je k němu přidán PEG 6 000 a NaCl v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 4 % PEG 6 000 a 2 % NaCl
- 9) Směs je 1 hod míchána v ledové lázni
- 10) Směs je nechána přes noc v lednici (4° C)
- 11) Následujícího den je obsah centrifugován 30 min při 4° C a 7 800 g
- 12) Sediment je rozpuštěn v 0,05 M fosfátovém pufru pH 8,0 (do 1 l redestilované vody se přidá 15,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1,09 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), na 50 g původního rostlinného materiálu připadá 10 ml fosfátového pufru. Dále je přidán Triton X - 100, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 1 %.
- 13) Vzorek je centrifugován 10 min při 4°C a 7 800 g
- 14) Supernatant je navrstven na sacharosový polštář (30% sacharóza v 0,05 M fosfátovém pufru pH 8,0), poté centrifugován 2,5 h při 4°C a 27 000 ot/min
- 15) Nažloutlý gelový sediment usazený na stěně skleněné kyvety byl rozpuštěn v 1 ml 0,02 fosfátovém pufru pH 7,2 (do 1 l redestilované vody se přidá 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 16) Resuspendovaný sediment je ponechán do rána v lednici ve 4° C
- 17) Následujícího dne byla směs centrifugována 5 min při 2 000 g a 4° C
- 18) Nakonec bylo změřeno absorpční spektrum purifikátu v rozmezí 220 – 320 nm proti slepému vzorku 0,05 M fosfátového pufru (pH 8,0). Na základě použitého molárního

extinkčního koeficientu pro PVX při 260 nm ($\epsilon_{\text{PVX}, 260} = 2,97$) byl spočítán výtěžek purifikátu a z poměru absorbancí 260/280 byla určena kvalita výsledného purifikátu

1.8.15 PT – ELISA (Plate – trapped ELISA)

Enzymová imunosorpční analýza (z anglického **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**) je v praxi běžně používaná metoda sloužící ke kvantitativnímu stanovení protilátek nebo antigenů. Je založena na vzniku komplexů antigen – protilátka, jenž jsou poutány na pevnou fázi (imunosorbent). Volné antigeny a protilátky, které nezreagují, jsou odstraněny vymytím. Po přidání chromogenního substrátu je za přítomnosti enzymu (tento enzym musí být protilátkou chemicky konjugován) možné pozorovat barevnou změnu. Díky této reakci je možné provést spektrofotometrické stanovení koncentrace produktu. ELISA je vysoce citlivá a mimořádně efektivní metoda. (Káš, 2006)

Byla využita PT ELISA (**Plate Trapped ELISA**), která je založena na reakci virových antigenů s komerční primární (králičí) protilátkou IgG proti PVX. Sekundární protilátka (anti/králičí) byla značena enzymem (alkalická fosfatáza, AP). Přidáním vhodného substrátu (p-nitrofenylfosfát v případě AP) dojde k enzymově katalyzované reakci. Vzniká barevný produkt, kterým je žlutý p-nitrofenol. Množství antigenu je úměrné intenzitě vzniklého zbarvení, které je stanoveno spektrofotometricky.

- 1) Odebraný rostlinný materiál byl rozetřen v třecí misce společně s PP v poměru 1 : 10 (rostlinný materiál : PP)
- 2) Jednotlivé vzorky byly pipetovány po 100 μl do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky.
- 3) Vzorky byly ponechány v lednici (4° C) přes noc, aby mohla proběhnout inkubace
- 4) Následující den byly destičky 4x promyty PBS+T (200 μl na jamku)
- 5) Poté byla nanášena primární protilátka (králičí) třídy IgG proti PVX v množství 100 μl na jamku. IgG byla ředěna konjugačním pufrům na výslednou koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$.
- 6) Mikrotitrační destička byla inkubována 2 hod při 37° C
- 7) Po inkubaci následovalo opětovné čtyřnásobné promytí PBS+T (200 μl na jamku)
- 8) Do každé jamky bylo přidáno 100 μl sekundární protilátky SIGMA 104 (ředěné 1 : 30 000 KP)
- 9) Vzorky byly inkubovány 2,5 hod při 37° C
- 10) Jamky byly 4x promyty PBS+T (200 μl na jamku)

11) Do jamek bylo pipetováno 100 μ l p-nitrofenylfosfátu ředěného SP (1 mg/1ml)

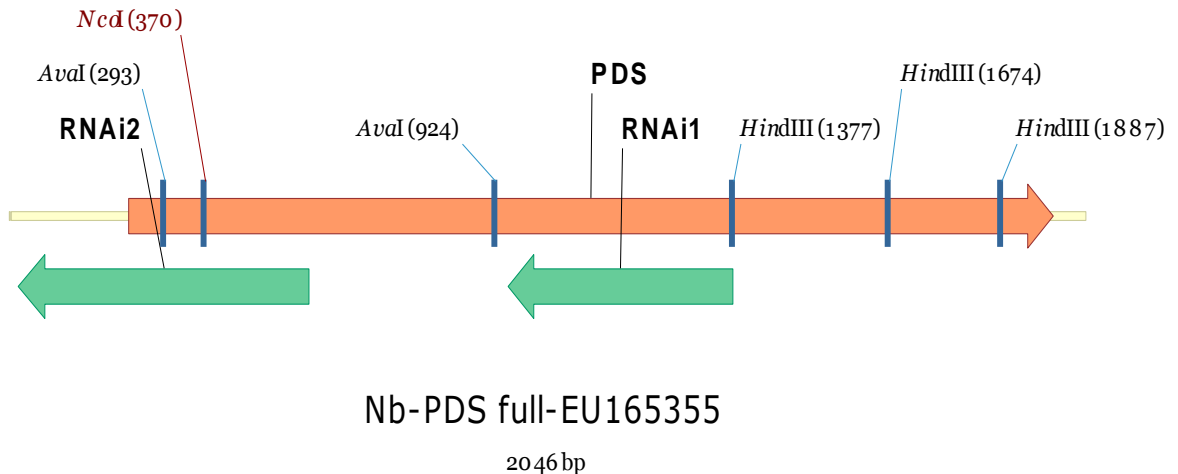
Nakonec proběhla inkubace při 37° C po 60 min, poté se změřila absorbance uvolněného p-nitrofenolu (v případě nízké absorbance byly destičky ponechány v lednici při 4° C přes noc a hodnoty absorbancí se změřily následujícího dne)

5. Výsledky

1.9 Návrh primerů pro amplifikaci genu phytoden desaturázy

Primery byly navrženy tak, aby byly použitelné jak pro *S. tuberosum* tak i pro *N. benthamiana*. Proto byly navrženy na základě konzervovaných úseků DNA (úseky do velké míry stejné u různých organismů) obou rostlin. Byl použit alignment sekvencí PDS *N. benthamiana* a *S. tuberosum*. (Nb-PDS full-EU165355, NW_006238964-St genomic LOC102583491). K vytvoření alignmentu nukleotidových sekvencí i k vlastnímu návrhu primerů byl použit program Vector NTI.

Tm teplota všech navržených primerů byla v rozmezí 55 °C – 57 °C. Na hraničních úsecích PCR produktů byla přidána restriční místa (XhoI a ClaI) navržena tak, aby po vložení do PVX byla sekvence PDS v AS orientaci.



Obrázek 6: Oblasti RNA interference, Vytvořeno v programu Vector NTI

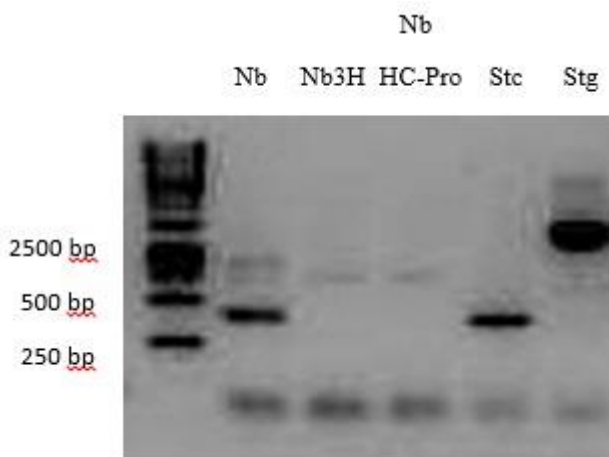
Tabulka 1: Primery navržené pro izolaci genu nesoucí sekvenci PDS

Primery konstruktů	Nukleotidové sekvence
PDS - přímý	AAACTCGAGCCAGCAATGCTTGGAG
PDS - zpětný	AAAATCGATACTGGAGTGGCAAACAC
PDS - 5NTR - přímý	AATATCGATTCCAATGGTTTAGTTGGGCG
PDS - 5NTR - zpětný	AATCTCGAGTAACGGCCAAACCACCACAAA

1.10 Izolace genů pro phytoden desaturázu z *N. benthamiana* a *S. tuberosum*

- 1) Byla připravena PCR směs
- 2) Do mikrokumavek byly pipetovány 2 μ l přímého primeru PDS - S a 2 μ l zpětného primeru PDS - AS o koncentracích 20 μ M..
- 3) Do každé mikrokumavky byl přidán 1 μ l templátu
- 4) Mikrokumavky byly umístěny do PCR termocykleru a byl nastaven následující program: inkubace při 94° C po dobu 90 sekund (denaturace DNA), následoval cyklus: 94° C po dobu 30 sekund, 57° C po dobu 30 sekund (hybridizace primerů), 72° C po dobu 45 sekund (tento časový úsek závisí na délce amplifikovaného fragmentu-přibližně 1 min na 1 kb fragment). Tento cyklus se opakoval 35x. Poslední krok byla inkubace při 72° C po dobu 10 min (rezerva pro GoTaq polymerasu)

Zdrojem genomové DNA byly i transgenní linie *N. benthamiana* HC-Pro a *N. benthamiana* 3H. Díky tomu jsme měli více pokusných vzorků. Rozdíl mezi jednotlivými vzorky však nebyl očekáván.



Obrázek 7: Elektroforeogram - Templát pro PCR byla gDNA (Nb3H, NbHC-Pro, Stg) nebo cDNA (Nb,Stc)

Tabulka 2: Úspěšnost PCR v závislosti na typu DNA a druhu rostliny (ano – úspěšné, ne - neúspěšné)

Primer	Typ DNA	<i>N. benthamiana</i>	<i>S. tuberosum</i>
PDS - přímý/zpětný	cDNA	ano	ano
	gDNA	ano	ano
PDS - 5NTR - přímý/zpětný	cDNA	ano	ano
	gDNA	ne	ano

1.11 Klonování do pUC57

Vzhledem k tomu, že k amplifikaci PCR produktů byla použita Taq polymeráza, bylo možné PCR produkty rovnou bez dalších enzymatických krků vložit do T/A plazmidu pUC57 (InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo). Plazmid umožňuje modrobílou selekci na LB plotnách s barvivem X-gal.

Zaligované plazmidy byly transformovány do *E. coli* kmene Top10 a plazmidová DNA poté byla z bakterií izolována.

Plazmidy byly štěpeny restričními enzymy EcoRI (10 000 U/ml) a PstI (20 000 U/ml) v pufru 10x SuRE/Cut Buffer H. Byla provedena elektroforéza v 1 % agarosovém gelu a správně naštěpené plazmidy byly sekvenovány.

Tabulka 3: Klonování do T/A plazmidu pUC57

Vložený PCR fragment	Délka	Primer	Poznámka	Shoda se sekvenovanou databází
PDS, <i>S. tuberosum</i> , cDNA – Stc1	750 bp	M13F	po odstranění vektoru zbývá 708 bp	99 %
PDS, <i>S. tuberosum</i> , cDNA – Stc2	850 bp	M13F	po odstranění vektoru zbývá 450 bp	98 %
PDS, <i>N. benthamiana</i> , cDNA - Nb	1080 bp	M13F	po odstranění vektoru zbývá 400 bp	99 %
PDS, <i>S. tuberosum</i> , gDNA- Stg1	800 bp	M13R	Sestaven kontig, po odstranění vektoru zbývá 888 bp	89 %
PDS, <i>S. tuberosum</i> , gDNA- Stg1	900 bp	M13F		

Alternativní sestřih (alternativní splicing) je úkaz, při němž kvůli různým variantám splicingu (sestřihu) z jednoho genu vzniká více bílkovinových produktů. Po přepisu DNA v jádře projde primární transkript RNA úpravami. Díky tomu se dlouhé nekódující úseky (introny) vystřihují a ostatní úseky (exony) se mohou spojit různými způsoby.

1.12 Klonování genu PDS do virového vektoru PVX

Byla provedena restrikce plazmidu pUC57 s vloženou DNA (štěpena enzymy ClaI a XhoI) v pufru 10x Tango Buffer. Restrikce neproběhla úplně, proto byla opakována se stejnými vzorky, ke kterým bylo navíc přidáno navíc 1 μ l restrikčního enzymu ClaI a 0,5 μ l restrikčního enzymu XhoI. Poté byla provedena elektroforéza v 1 % agarosovém gelu.

Vektor pGR106 prošel stejnou restrikcí. Jenom byl nahrazen restrikční enzym XhoI restrikčním enzymem SalIHF a purf 10x Tango Buffer pufrem 10x Cut Smart Buffer. Vektorová DNA byla po skončené restrikci ještě defosforylována přidavkem 10 U alkalické fosfatázy SAP. Po 30 minutách byla fosfatáza deaktivována.

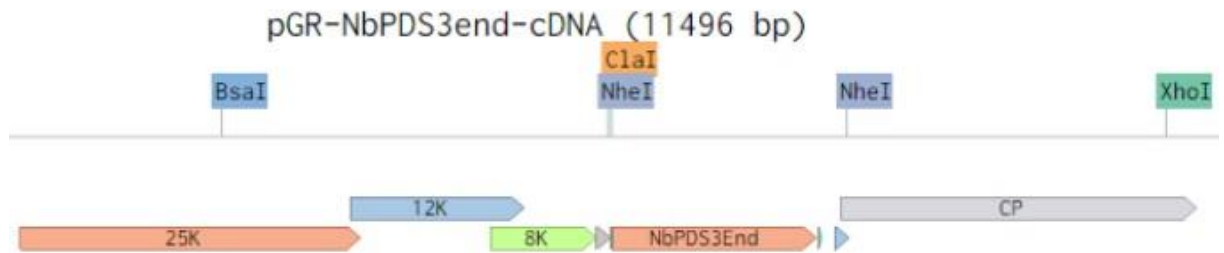
DNA fragmenty byly rozděleny elektroforézou a poté byly vyizolovány z agarosy a přečištěny. Poté byla provedena ligace DNA insertu do vektoru pGR106.

Vzorek byl poté transformován do kompetentních buněk bakterie *E. coli* a vhodné plazmidy byly z buněk izolovány. Nakonec byly plazmidy štěpeny restrikčními enzymy XbaI a EcoRI, a fragmenty rozděleny elektroforézou v agarovém gelu. Vhodně naštěpené vzorky byly sekvenovány.

U některých sekvenovaných vzorků buďto chyběla zaklonovaná DNA, nebo chyběl PVX CP. Později bylo zjištěno, že s restrikčním enzymem SalIHF nedochází k úplnému rozštěpení plazmidové DNA. Proto byla jeho koncentrace ve vzorku zvýšena a restrikce poté proběhla úplně. Ověřené plazmidy byly použity pro transformaci kompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens* GV3103.

Tabulka 4: Klonování do pGR106

DNA	Primer	Poznámka
PDS, <i>N. benthamiana</i> , cDNA,	Hp-pGR106 - 5'	411 bp insert, bez mutace
PDS, <i>S. tuberosum</i> , cDNA – Stc kol. A	Hp-pGR106 - 5'	411 Bp insert <i>S. tuberosum</i> PDS, bohužel je zaklonovaný až do místa restrikce XhoI – PVX CP vypadl
PDS, <i>S. tuberosum</i> , cDNA – Stc kol. B	Hp-pGR106 - 5'	Prázdný pGR106 včetně PVX CP
PDS, <i>S. tuberosum</i> , cDNA - StcB	Hp-pGR106 - 5'	415 bp insert



Obrázek 8: Vektor pGR106 s vloženou PDS, vytvořeno pomocí databáze na benchling.com

1.13 Inokulace rostlin *N. benthamiana*

Virový vektor pGR106 s genem PDS byl připraven a mohl být aplikován na rostliny *N. benthamiana*. Inokulum (transformované *Agrobacterium tumefaciens* namnožené v LB médiu po 2 dnech) bylo naočkováno na spodní stranu 3 listů 14 dní starých rostlin pomocí injekční stříkačky.

Jako negativní kontrola sloužil virový vektor pGR106 bez genu PDS. Tvorba inokula a samostatná inokulace proběhla stejně jako u virového vektoru pGR106 s genem PDS. Po 14 dnech se projeví první příznaky na rostlinách. První místa bez chlorofylu se objevila na nejsvrchnější části rostliny.

Po dalších 10 dnech (cca 8 týdnů staré rostliny) se PVX šířil rostlinou a bíle zbarvená listová plocha se rozšiřovala. Zcela zelené zůstávaly jenom nejstarší části rostliny. Pokud však rostliny *N. benthamiana* byly pěstovány ve skleníku, příznaky začaly po cca 1 měsíci mizet, nebo se už dále rostlinnou nešířily. Rostliny *N. benthamiana* pěstované v Sanyo boxu měly trvalou ztrátu chlorofylu.

Ztráta chlorofylu je dobře viditelný fenotypový projev, bohužel ale také oslabuje rostlinu. Rostliny měly málo květů. Květy rostlin byly deformované a většina z nich byla sterilní. Nakonec se několik tobolek se semeny vytvořilo.



Obrázek 9: Fenotypový projev silencingu 14 dní po inokulaci (vlastní foto)



Obrázek 10: Fenotypový projev silencingu 14 dní po inokulaci (vlastní foto)



Obrázek 11: Fenotypový projev silencingu 24 dní po inokulaci (vlastní foto)



Obrázek 12: Fenotypový projev silencingu 24 dní po inokulaci (vlastní foto)



Obrázek 13: Negativní kontrola - virový vektor pGR106 bez genu PDS (vlastní foto)

1.14 Výsevy semínek na sterilní půdu

1.14.1 Příprava media

Skližená semena byla umístěna do mikrozkušavky společně s kusem buničiny. Buničina byla k semenům přidána proto, aby odsála přebytečnou vlhkost. Mikrozkušavky byly uchovávány v lednici (+4 °C).

Kultivační medium

Do 1 l destilované vody

- 2,15 g Murashige & Skoog medium
- 1 ml Vitamin mix
- 20 g sacharózy

Poté bylo pH upraveno na 5,8 a nakonec bylo přidáno 2,8 agaru. Sterilní medium bylo rozlito do sterilních Petriho misek.

1.14.2 Sterilizace semen

- 1) Semena *N. benthamiana*, umístěná v Petriho miskách, byla dána do mikrovlnky na 2 x 6 min.

- 2) Semena byla přenesena do Flowboxu, kde byla ponořena do SAVA a ponechána zde max. 5 min. Poté byla propláchnuta vodou a ponechána na vzduchu 5 min aby oschla.
- 3) Suchá semena byla nabírána špičkou a byla přenášena na Petriho misky s kultivačním médiem. Na každé misce bylo 5 semen.
- 4) Petriho misky se semeny byly přeneseny do Sanyo boxu

Po 14 dnech byla semena již dost naklíčená a mohla se spočítat ta, která již nevyklíčí.

Tabulka 5: Klíčivost semen

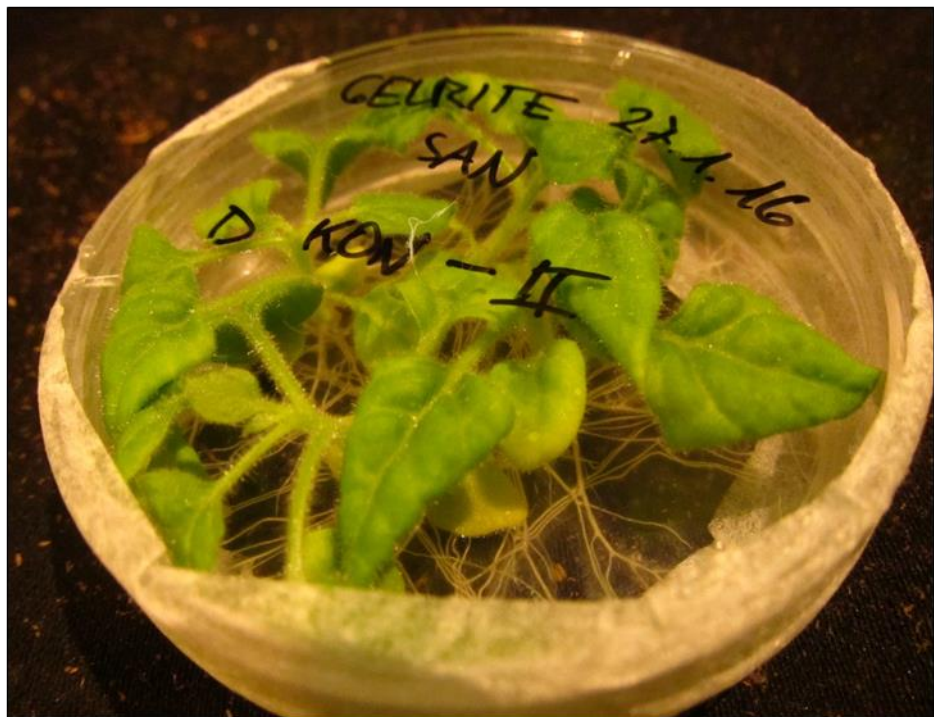
	Nevyklíčená semena	Celkový počet semen	Klíčivost
Rostliny pěstované ve skleníku	3	80	96,25%
Rostliny pěstované v Sanyo boxu	5	70	92,86%
Kontrola	0	15	100%

Rostliny byly ponechány v Petriho miskách 3 týdny. Poté byly jednotlivé rostliny už natolik velké, že se nevešly do misek. Musely být proto přesazeny do zahradního substrátu, který byl smíchán s pískem v poměru 3:1. Rostliny byly prvních 5 dní přikryty minipařeništěm a zpočátku 3x denně zvlhčovány – byla to snaha co nejvíce snížit stres, který byl vyvolaný přenesením z podmínek *in vitro* do podmínek *ex vitro*.

Po celou dobu byly rostliny *N. benthamiana* pozorovány, jestli se neprojeví fenotypové projevy silencingu. Za celé 3 týdny pozorování se na žádné rostlině neprojeví fenotypové změny.



Obrázek 14: *N. benthamiana* vypěstovaná ze semen rostlin napadených virovým vektorem PVX s genem PDS po 14 dnech (vlatní foto)



Obrázek 15: *N. benthamiana* vypěstovaná ze semen rostlin napadených virovým vektorem PVX s genem PDS po 21 dnech (vlatní foto)

1.15 Filtrace virového materiálu

Smyslem tohoto experimentu bylo získání sterilního virového inokula pro *in vitro* inokulaci *S. tuberosum*. Pokus byl prováděn s purifikátem PVX a TMV. TMV byl použit jako kontrolní virus. Pokud je rostlina *Nicotiana tabacum* NN napadena TMV, reaguje hypersenzitivní reakcí (nekrotické léze na listech). To nám umožní kvantifikaci infekce v případě mechanické inokulace. Kvantifikace PVX lze provést na *Chenopodium amaranticolor*, ale technicky je mnohem náročnější.

Pokud je *Nicotiana tabacum* napaden TMV, dělá nekrotické léze na listech. To nám umožní kvantifikaci infekce v případě mechanické inokulace.

Sterilní virové inokulum

- 1) Do mikrozkušavek bylo pipetou přeneseno karborundum, poté byly mikrozkušavky sterilizovány
- 2) Purifikovaný virus TMV byl naředěn přenosovým pufrem a to v poměru 1 : 500 (10 μ l TMV : 5 ml 0,05 M Na – K – fos.)
- 3) Do mikrozkušavek s karborundem bylo přeneseno 250 μ l směsi s virem. Polovina vzorků prošla přes Millex filtr s membránou z acetátu celulózy s otvory o průměru 0,45 μ m. Vše probíhalo ve sterilním prostředí Flowboxu.

Stejný postup byl proveden i s PVX.

Listy *N. tabacum* byly rozděleny na poloviny. Na první polovinu bylo aplikováno mechanickou inokulací 20 μ l nefiltrovaného viru s přenosovým pufrem, na druhou polovinu 20 μ l filtrovaného viru s přenosovým pufrem. Rostliny byly pěstovány další týden v Sanyo boxu při umělém osvětlení. Poté byly spočítány jednotlivé léze na infikovaných listech.

Z výsledků počítání nekrotických lezí na listech tabáku je zřejmé, že po průchodu filtrem došlo ke snížení infekivity purifikovaného viru ($p=0.0093$) v průměru o 40 %, zároveň je zřejmé, že tento typ testu je zatížen poměrně velikou chybou. Filtraci lze tak bez obav použít pro sterilizaci virového purifikátu pro účely infekce rostlin *in vitro*.



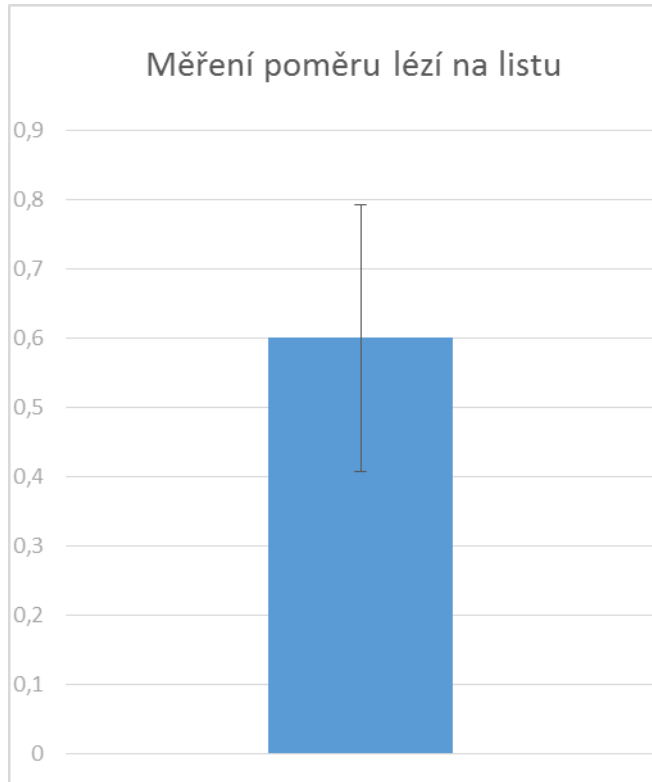
Obrázek 16: Nekrotické léze na listech *Nicotiana tabacum* NN napadených TMV (vlastní foto)



Obrázek 17: Nekrotické léze na listech *Nicotiana tabacum* NN napadených TMV (vlastní foto)

,

Graf 1



Graf znázorňuje průměrnou hodnotu a její směrodatnou odchylku vypočítanou relativní cestou tzn. Počet filtrovaných/nefiltrovaných.

1.16 Inokulace *Solanamu tuberosum* v *in vitro* podmínkách

1.16.1 Pěstování brambor *in vitro*

Rostlinný materiál je možné kromě přirozených podmínek pěstovat také v umělých podmínkách. Mezi tyto podmínky patří i kultivace za specifických podmínek v uzavřených nádobách. Tento postup umožňuje pěstování celistvých rostlin, ale i jejich oddělených částí. Odtud pochází i názvy těchto kultur – kultury *in vitro* (ve skle – nádoby, ve kterých jsou rostliny pěstovány, jsou nejčastěji skleněné).

Díky vysoké regenerační schopnosti, kterou rostliny disponují, je možné kultivovat rostlinný materiál. Somatické rostlinné buňky disponují schopností, která obnovuje buněčné dělení. Díky této vlastnosti se mohou rostliny vegetativně množit, nebo nahrazovat poškozené orgány. Je založena na tzv. totipotenci rostlinné buňky – většina živých rostlinných buněk (i buňky plně diferenciované) obsahuje kompletní genetickou informaci, kterou je schopna potenciálně realizovat.

Kultivační médium

Do 1 l destilované vody

- 4,4 g Murashige & Skoog medium
- 20 g sacharózy
- 8 g agaru

Do jedné sterilizované magenty se aplikuje 60 ml sterilního média. Rostliny se množily vegetativně - řízkováním. V jedné magentě se nacházely 2 rostliny.

Dva týdny staré rostliny *S. tuberosum* (pěstované v podmínkách *in vitro* v magentách) byly mechanicky inokulovány PVX. Inokulum bylo připraveno postupem – Sterilní virové inokulum str xxx. Na list bylo aplikováno 5 µl inokula a to bylo rozetřeno pouze špičkou pipety, nebo pomocí skleněné tyčinky. Jako kontrola mechanického poškození bylo aplikováno samostatné karborundum s redestilovanou vodou.

1.16.2 ELISA

Po 14 dnech byla provedena ELISA.

Tabulka 6: Naměřená absorbance při 405 nm po 30 min

<i>Solanum tuberosum</i> – inokulace PVX		A (405 nm)
Neinfikovaná rostlina		0,111
Rostlina inokulovaná špičkou pipety	Inokulovaný list	0,137
	Systémový list	0,162
Rostlina inokulovaná skleněnou tyčinkou	Inokulovaný list	0,178
	Systémový list	0,154

Tabulka 7: Naměřená absorbance při 405 nm po 24 hod v lednici (4 °C)

<i>Solanum tuberosum</i> – inokulace PVX		A (405 nm)
Neinfikovaná rostlina		0,385
Rostlina inokulovaná špičkou pipety	Inokulovaný list	0,623
	Systémový list	0,818
Rostlina inokulovaná skleněnou tyčinkou	Inokulovaný list	1,061
	Systémový list	0,731

1.17 Izolace viru

Rostliny *N. benthamiana* byly inokulovány 1 ml injekční stříkačkou bez jehly virovým vektorem PVX s genem GBSS a wild type PVX. Přibližně po 14 dnech byly odebrané napadené části listů. Z nich byl připraven extrakt použitý pro mechanickou inokulaci rostlin *Nicotiana tabacum*, které jsou vhodnější pro izolaci větších množství viru, ale je v nich obtížné vyvolat virovou infekci agroinfiltrací.

Purifikace probíhala podle metodiky popsané na str. 31

Wild type PVX = 8,1 mg/ml $A_{260/280} = 1,2$

PVX/GBSS = 2,59 mg/ml $A_{260/280} = 1,2$

6. Diskuse

1.18 Rostliny *Nicotiana benthamiana*

V první generaci rostlin *Nicotiana benthamiana* došlo k dobře viditelným fenotypovým změnám – vybělení rostlinného pletiva. Rostliny nebyly zcela bílé, listy vykazovaly mozaikový fenotyp s bílými i zelenými částmi. Setkali jsme se ovšem s neočekávaným jevem, který se ukázal jako velmi významný a negativně ovlivnil naše další experimenty. Přestože rostliny s bílým fenotypem nasazovaly na květy s normální frekvencí, nedocházelo u nich k tvorbě semen. Všechny květy byly deformované a většina z nich byla sterilní. To negativně ovlivnilo další experimenty, které byly závislé na vypěstování a sledování druhé generace rostlin. V pokusu se nakonec podařilo vypěstovat několik tobolek se semeny, ovšem tyto byly odebrány z té části rostliny, která vykazovala normální zelený fenotyp. V druhé generaci nebyly žádné fenotypové změny pozorovány, což mohlo být ovlivněno jak zdrojem semen (zelené části prýtu) tak i jejich malým počtem.

Guo et al. (2003) publikovali, že úspěšně provedli PTGS (post – transkripční genový silencing) genu PDS na *Arabidopsis thaliana*. Konstrukty pX7-PDSi(At) byly úspěšně dokončeny a mohly se inokulovat na rostliny. Pěstovali na živném médiu 35 linií *A. thaliana*. 33/35 mělo bílý fenotyp. Z 33 rostlin pouze 2 měly semena. Semena z těchto 2 rostlin měla nízkou fertilitu a bylo jich produkováno málo. Jiný nezávislý vzorek pX7-PDSi(At) byl inokulován do 81 rostlin. Všechny rostliny dokončily vegetační cyklus s fenotypovými změnami. Byla sklizena semena z 12 jedinců. Následující generace ale také neprojevovala známky PTGS.



Obrázek 18: Fenotypový projev silencingu na *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2003)



Obrázek 19: Fenotypový projev silencingu na *Nicotiana benthamiana* (vlastní foto)

Dalo by se předpokládat, že pokud by se vypěstovalo velké množství rostlin druhé generace, tak by nějaká z nich mohla být metylována. Bohužel na tolik rostlin nemáme prostory ani dostatek fertálních semen.

Pro další práci bude zapotřebí najít jiný vhodný vizuální marker, který nebude rostlinu tolik oslabovat, a ta by se mohla bez obtíží generativně rozmnožovat.

1.19 Rostliny *Solanum tuberosum*

Oproti rostlinám *N. benthamiana* mají rostliny *Solanum tuberosum* delší vegetační cyklus a navíc jsou prostorově náročnější. *N. benthamiana*, které je možné pravidelně vysévat (v naší laboratoři jsou k dispozici nové rostliny zhruba každé 2 týdny), brambory byly pro pokus připraveny pouze jednou v průběhu vegetační sezóny. Přestože byl pokus naplánován s dostatečným předstihem a časovou rezervou, nakonec se shodou okolností nepodařilo včas získat virový vektor s vloženým fragmentem genu PDS, byl tedy použit náhradní virový vektor nesoucí fragment genu GBSS. V současné době je virový vektor pGR106 s genem PDS připraven pro použití do *Solanum tuberosum*.

1.20 Sterilní virové inokulum

Cílem tohoto experimentu bylo získání sterilního virového inokula pro *in vitro* inokulaci *S. tuberosum*. Pokud byl prováděn s TMV a rostlinami *Nicotiana tabacum* NN. Tyto rostliny totiž reagují na napadení TMV hypersenzitivní reakcí - tvorbou nekrotických lézí na listech. V případě mechanické inokulace nám to umožní jednoduchou kvantifikaci.

Membránové filtry zadrží viry pomocí adsorpce a velikostním omezením – průměr pórů filtru je menší než virové částice. Adsorpci může zabránit ošetření viru laurethsulfátem sodným (snižuje povrchové napětí) nebo purifikace viru v destilované vodě. Obalové proteiny některých virů mohou také zabránit adsorpci. Virus by měl přejít přes membránu v případě, že průměr pórů membrány je dvakrát větší než průměr viru. I když se dodržují předešlá doporučení pro zabránění projití viru přes membránu, stále filtrace nemusí být úspěšná (Ver et al.).

Givan et al. (1965) provedli filtraci Rubiviru (průměr okolo 100 μm). Membrána filtru měla průměr pórů 100 μm . Přesto virus přes filtr prošel.

Virion TMV je přibližně dlouhý 300 nm a v šířce má 18 nm, (Hull, 2009). Pro přípravu čistého virového inokula jsme použili filtr s membránou z acetátu celulózy s otvory o průměru 450 nm.

Spočítáním nekrotických lézí na listech na listech tabáku je zřejmé, že po průchodu filtrem došlo ke snížení infekivity purifikovaného viru ($p=0.0093$) v průměru o 40 %. Filtraci lze tak bez obav použít pro sterilizaci virového purifikátu pro účely infekce rostlin *in vitro*.

7. Závěr

- Konstrukce rekombinantního rostlinného viru PVX pro silencing genu PDS u *Nicotiana benthamiana* se zdařila.
- Rostliny byly infikovány a po 14 dnech se projeví první fenotypové změny, tudíž se PTGS na rostlinách *N. benthamiana* zdařil.
- Bohužel rostliny měly málo semen a odebraná semena byla z částí rostlin se zeleným fenotypem. V druhé generaci rostlin se bílé zbarvení neprojevilo, což mohlo být způsobeno malým počtem semen nebo odebráním semen ze zelených částí rostliny.
- Rostliny *Solanum tuberosum* mají delší vegetační cyklus a navíc jsou prostorově náročnější než rostliny *Nicotiana benthamiana*. Přestože byl pokus naplánován s dostatečným předstihem a časovou rezervou, nakonec se shodou okolností nepodařilo včas získat virový vektor s vloženým fragmentem genu PDS. V současné době je virový vektor pGR106 s genem PDS připraven pro použití do *S. tuberosum*

Hypotéza byla vyvrácena – pomocí rekombinantního rostlinného viru PVX, určeného pro silencing genu PDS, nenastaly žádné fenotypové změny v F1 generaci u rostlin *Nicotiana benthamiana*.

Je možné, že tyto změny nemohly být pozorovány z důvodu nedostatečného množství vypěstovaných F1 rostlin. Tento pokus by šel provést, ale byl by prostorově náročný.

Další možností by bylo najít jiný vhodný vizuální marker, který by rostliny tolik neoslabil, a ty by se mohly bez komplikací generativně rozmnožovat

8. Seznam literatury

- Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Rodionova, N. P. 2004. N- Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *European Journal of Biochemistry*. 271. 3136-3145
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., Santa Cruz, S. 1995. *Plant. J.* 7. 1045-1053.
- Givan, K. F., Rozee, K. R., Rhodes, A. J. Rhodes. 1965. Incidence of rubella antibodies in female subjects. *Can. Med. Assoc.* 92.126-128.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins
- Guo, H. – S., Fei, J. - F., Xie, Q., Chua. N. – H. 2003: A chemical – regulated inducible RNAi systém in plants. *The Plant Journal*. 34: 383 - 392
- Hull, R. 2009. *Comparative plant virology*. Academic Press, Norwich. p. 393.
- Chapman, S. N., Hills, G., Watts, J., Baulcombe, D. C. 1992. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X. Effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*. 191. 223-230.
- in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18. 134141
- Juttermann, Li. E., Jaenish R. 1994. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91. 11797-11801.
- Kaprowski, H., Yusibov, V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*. 19. 2734 – 2741.
- Káš J., Kodíček M., Valentová O. 2006. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha. p. 258.
- Kouzardies, T. 2007. *Chromatin Modifications and Their Function*. – *Cell*: 693-705.
- Lobenstrin, G., Gaba, V. 2012. *Viruses of Potato*. *Advances in Virus Research*. 84: 209-246.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I., Baulcombe .2003. Virus - induced gene silencing in plants. *Methods* 30: 296-303.

- Matzke, A. J. M. et Matzke, M. A., 1995. Trans-Inactivation of Homologous Sequences in *Nicotiana tabacum*. In: Meyr P. [ed]. Gene Silencing in Higher Plants and Related Phenomena in Other Eukaryotes - Springer-Verlag, 1 -14.
- Muller, A. E. 2010. Gene Silencing in Plants: Transgenes as Targets and Effectors. In: Kempken, F., Jung, CH. [ed.]. Genetic modification of plants: agriculture, horticulture and forestry. Springer. 79-94.
- Rozsypal, S. Doškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V. 2002. Úvod do molekulární biologie. Brno. p. 1199.
- Ryu, K. H., Hong, J. S. 2008. Potexvirus. Encyclopedia of Virology. 4. 310-313.
- Stols, A. L. H., Hill-Van Der Meulen, G.W. Toen, M. K. I. 1970. Virology. 40. 168-170.
- Vaucheret, H., Fagard, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. Trends in Genetics. 1: 29-35.
- Ver, B. A., Melnick, J. L., Wallis, C. 1968. Efficient Filtration and Sizing of Viruses with Membrane Filters . Journal of Virology. Jan. 21 – 25.
- Vyskot, B. 1999. Přehled vývojové biologie a genetiky. Ústav molekulární genetiky AV ČR. Praha. p. 241.
- Wagner, B., Fuchs, H., Adhami, F., Ma, Y., Schneiner, O., Breiteneder, H. 2004. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. Methods. 32 (3). 227-234.
- Weinhold, A., Kellenbach, M., Baldwin, I. 2013. Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants. Plant Biology. 1 – 18.
- Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R. M., Fisher, R. 2006. The potential of plant virus vectors for valine production. Drugs in R&D. 7. 203-217.
- Zhao, M. M., An, D. R., Huang, G. H., He, Z. H., Chen, J. Y. 2005. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 37. 248 – 253.

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Pár bází
BSA	Hovězí (bovinní) sérový albumin
CP	Kapsidový protein
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzymová imunosorpční analýza
IgG	imunoglobuliny typu G
kb	Kilobáze
LB medium	Luria-Bertani medium
M - MLV	Moloney - Murine Leukemia Virus
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
PBS	fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDS	Fytoen desaturáza
PEG	Polyethylenglykol
pGR106	Rostlinný virový vektor pGR106
pUC57	Plazmidový vektor v <i>E. coli</i>
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVX	X virus bramboru (<i>Potato virus X</i>)
RNA	Ribonukleová kyselina
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
Taq polymerasa	Polymerasa z <i>Thermus aquaticus</i>
TMV	Virus mozaiky tabáku
ÚEB AV ČR, v. v. i.	Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, veřejná výzkumná instituce
UV oblast	Oblast ultrafialového záření

10. Seznam příloh

1.21 Obrázky

Obrázek 1 : Zobrazení virového infekčního cyklu	11
Obrázek 2: Vznik 5–methylcytosinu	16
Obrázek 3: Schéma <i>De novo</i> a udržovací metylace DNA	16
Obrázek 4 : Schématické znázornění vektoru pGR106	18
Obrázek 5: Vektor pUC57	19
Obrázek 6: Oblasti RNA interference, Vytvořeno v programu Vector NTI.....	34
Obrázek 7: Elektroforeogram - Templát pro PCR.....	35
Obrázek 8: Vektor pGR106 s vloženou PDS.....	39
Obrázek 9: Fenotypový projev silencingu 14 dní po inokulaci	40
Obrázek 10: Fenotypový projev silencingu 14 dní po inokulaci	40
Obrázek 11: Fenotypový projev silencingu 24 dní po inokulaci	41
Obrázek 12: Fenotypový projev silencingu 24 dní po inokulaci	41
Obrázek 13: Negativní kontrola - virový vektor pGR106 bez genu PDS	42
Obrázek 14: <i>N. benthamiana</i> vypěstovaná ze semen rostlin napadených virovým vektorem PVX s genem PDS po 14 dnech	44
Obrázek 15: <i>N. benthamiana</i> vypěstovaná ze semen rostlin napadených virovým vektorem PVX s genem PDS po 21 dnech	44
Obrázek 16: Nekrotické léze na listech <i>Nicotiana tabacum</i> NN napadených TMV	46
Obrázek 17: Nekrotické léze na listech <i>Nicotiana tabacum</i> NN napadených TMV	46
Obrázek 18: Fenotypový projev silencingu na <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
Obrázek 19: Fenotypový projev silencingu na <i>Nicotiana benthamiana</i>	51

1.22 Tabulky

Tabulka 1: Primery navržené pro izolaci genu nesoucí sekvenci PDS.....	34
Tabulka 2: Úspěšnost PCR v závislosti na typu DNA a druhu rostliny (ano – úspěšné,.....	36
Tabulka 3: Klonování do T/A plazmidu pUC57.....	37
Tabulka 4: Klonování do pGR106.....	38
Tabulka 5: Klíčivost semen	43
Tabulka 6: Naměřená absorbance při 405 nm po 30 min	48
Tabulka 7: Naměřená absorbance při 405 nm po 24 hod v lednici (4 °C)	49

1.23 Grafy

Graf 1	47
--------------	----