



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Molekulární detekce genů potenciálně zapojených  
do reakce na stres suchem u máku**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ  
LABORANT**

**Autor:** Miroslava Šefčíková

**Vedoucí práce:** Ing. Irena Hoštičková

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Molekulární detekce genů potenciálně zapojených do reakce na stres suchem u máku* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Miroslava Šefčíková

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce paní Ing. Ireně Hoštičkové za cenné rady, pomoc a bezmeznou trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry genetiky a speciální produkce rostlinné, kteří mi umožnili využívat prostory laboratoří. Poděkování také patří mé rodině za podporu po celou dobu mého studia.

# **Molekulární detekce genů potenciálně zapojených do reakce na stres suchem u máku**

## **Abstrakt**

Sucho patří mezi jeden z hlavních abiotických faktorů, které ovlivňují výnos i kvalitu zemědělských plodin. Rostliny se však těmto negativním vlivům prostředí brání mechanismy vytvořenými v průběhu evoluce. Jedním z těchto mechanismů je odpověď rostlin na molekulární úrovni, čímž je exprese genů. Mezi tyto geny potenciálně reagující na sucho patří také geny MLP43 a SDD1. Pro molekulární detekci těchto genů bylo potřeba izolovat DNA z rostlin máku setého (*Papaver somniferum* L.) odrůdy Orel a Onyx. Dále byly navrženy sady primerů pro geny MLP43 a SDD1, které byly optimalizovány. Vybrané sady primerů byly použity pro analýzu metodou real-time PCR. Rovněž byla optimalizována metoda PCR.

## **Klíčová slova**

PCR; genová exprese; real-time PCR; MLP43; SDD1; mák setý; stres suchem; izolace DNA

# **Molecular detection of genes involved in drought stress reaction in opium poppy**

## **Abstract**

Drought belongs among one of the main abiotic factors that influence the yield and quality of agricultural crops. However, plants fight these negative environmental impacts by mechanisms developed during evolution. One of these mechanisms is the plants' response on molecular level, which is gene expression. These genes potentially reacting to drought include the following genes: MLP43 and SDD1. For the purposes of molecular detection of these genes, the DNA from opium poppy plants (*Papaver somniferum* L.) Orel and Onyx type, was necessary to be isolated. Further, primer sets for the genes of MLP43 and SDD1 were designed. The chosen primer sets were used for analysis purposes using the real-time PCR method. The PCR method was also optimized.

## **Key words**

PCR; gene expression; real-time PCR; MLP43; SDD1; Opium poppy; drought stress; DNA isolation

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Literární rešerše.....	8
2.1	Stres rostlin .....	8
2.2	Stres suchem .....	8
2.3	Projevy stresu suchem na rostlinách.....	9
2.4	Molekulární odpověď rostlin na stres suchem.....	9
2.5	Major latex protein.....	12
2.6	Stomatal density and distribution 1 (SDD1).....	12
2.7	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	13
3	Cíl práce a hypotézy.....	16
4	Materiál a metody .....	17
4.1	Návrh primerů pro gen MLP43 a SDD1 .....	17
4.2	Real-time PCR navržených primerů.....	18
4.3	Elektroforéza po real-time PCR.....	19
4.4	Rostlinný materiál.....	19
4.5	Izolace DNA .....	19
4.6	Měření koncentrace získané DNA.....	20
5	Výsledky .....	21
5.1	Kontrola navržených primerů .....	21
5.2	Výběr vhodné teploty pro annealing a sady primerů pro další použití.....	22
5.3	Real-time PCR .....	23
5.4	Izolace DNA (kontrola kvality izolované DNA).....	28
6	Diskuze.....	31
7	Závěr .....	33
8	Seznam použité literatury.....	34
8.1	Seznam tabulek .....	38
8.2	Seznam obrázků.....	39
8.3	Seznam zkratk .....	40

## 1 Úvod

Lidská činnost ovlivňuje globální klima, čímž vznikají změny. Důsledkem těchto změn jsou menší sněhové a dešťové srážky na území České republiky. Tím dochází k abiotickému stresu působícímu na zemědělské plodiny, mezi které patří mák setý. Stres ovlivňuje výnos a kvalitu zemědělských plodin. Rostliny se však brání působení stresu pomocí mechanismů, které byly vytvořeny během evolučního vývoje. Jedním z těchto mechanismů je i molekulární odpověď rostlin na stres suchem. Klíčovým reaktantem v molekulární odpovědi je kyselina abscisová, která indukuje množství různých genů.

Mezi tyto geny je také řazen gen MLP43, který patří do skupiny major latex proteinů. Skupina těchto genů byla nejdříve objevena u máku setého. Později tyto geny byly prokázány u dalších rostlin. Bylo také objeveno mnoho dalších zástupců MLP genů.

Naopak gen SDD1 patří mezi geny projevující se nezávisle na ostatních drahách. Tento gen se podílí na vlastnostech, jako je rozložení a hustota průduchů. Důležitou roli hraje také při udržování vodní rovnováhy u rostliny.

Pro studium exprese těchto genů se v současnosti využívá analýza cDNA pomocí metody real-time PCR. Pro analýzu je důležité navrhnout a optimalizovat primery pro tyto geny a také optimalizovat metodu real-time PCR. Po úspěšném splnění těchto kroků mohou být primery použity při dalším výzkumu reakce máku na stres suchem.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 *Stres rostlin*

Na rostliny působí faktory vnějšího prostředí, které se nazývají stresory. Působení stresorů na rostliny lze definovat jako stres. Rostliny se mohou přizpůsobit stresu na několika úrovních. Stres způsobuje u rostlin nedědičné genotypické změny. Na druhou stranu může také způsobit mutace, které se dále přenáší na potomstvo, protože změna je trvalá (Miedzińska, 2010).

Rostliny jsou vystaveny abiotickým stresům, které vedou k morfologickým, fyziologickým, biochemickým a molekulárním změnám. Mezi tyto neživé faktory patří například sucho, slanost, chemická toxicita, extrémní teploty, nedostatek esenciálních minerálních prvků v půdě, vysoké nebo nízké pH, vysoká nebo nízká ozáření a oxidativní stres (Pavlová, 2005; Lisar et al., 2012). Abiotický stres má dopad na růst a produktivitu rostlin (Lisar et al., 2012).

Odolností nebo rezistencí je označována schopnost rostliny přežít nepříznivé podmínky. Rezistence je tvořena tolerancí a avoidancí. Avoidancí je myšlena schopnost předcházet stresu a vyhýbat se mu. Pokud se nepříznivé podmínky pravidelně opakují, některé druhy rostlin se jim přizpůsobí geneticky fixovanými vlastnostmi. Tyto vlastnosti se projeví i bez působení stresoru. Takto získaná odolnost je označována jako evoluční avoidance nebo evoluční rezistence (Pavlová, 2005).

### 2.2 *Stres suchem*

Stres suchem neboli vodní stres se projevuje, pokud rostlina není dostatečně zásobena vodou. Když obsah vody je nižší než při maximálním nasycení, jedná se o vodní deficit na úrovni buňky nebo rostliny (Pavlová, 2005).

Příčin pro nedostatečné zásobení vodou může být několik. Při nízkých vodních srážkách nebo jejich naprosté absenci je nedostatek vody v půdě. Další příčinou je zasolení půdy, což značí vysoký obsah rozpuštěných látek v půdním roztoku. Pokud je vodní potenciál půdního roztoku nižší než hodnota vodního potenciálu buněk kořene, nedochází k příjmu vody, i když jí je dostatek. Vodní deficit může být způsoben i vysokou transpirací, při níž nedochází k nahrazování vody jejím příjmem pomocí kořenů z půdy. Vodní deficit také vyvolávají teploty pod bodem mrazu, které způsobují tvorbu ledu v mezibuněčných prostorech nebo vakuolách. To způsobuje dehydrataci



cytosolu, protože chemický potenciál vody v cytosolu je vyšší než chemický potenciál vody v pevném skupenství (Pavlová, 2005).

### ***2.3 Projevy stresu suchem na rostlinách***

Sucho postihuje rostliny na několika úrovních jejich organizace. Během sucha je u rostlin redukován vodní potenciál v buňkách a turgor, což zvyšuje koncentraci rozpuštěných látek v cytosolu a extracelulární matrix. Takto postižená buňka ztrácí schopnost růstu a dělení (Lisar et al., 2012).

Sucho neovlivňuje u rostlin pouze turgor a celkový obsah vody, ale také průduchovou regulaci výměny plynů, redukuje dýchání a asimilaci uhlíku (Procházka, 1998; Lisar et al., 2012). Negativní efekty v oblasti minerální výživy a metabolismu vedou ke zmenšení listů a přizpůsobení rozdělení orgánů. Dochází také ke změně elasticity u buněk rostliny, narušení homeostaze a iontové distribuce. Účinkům stresu se také podřídí syntéza nových proteinů a mRNA (Lisar et al., 2012).

Sucho způsobuje kvantitativní a kvalitativní změny proteinů rostliny. Většinou jsou postiženy proteiny kvůli potlačení syntézy, často u rostlin  $C_3$  více než u rostlin  $C_4$ . Stres suchem pozmění genovou expresi a následkem toho i syntézu nových proteinů a mRNA. Hlavními proteiny syntetizovanými při stresu suchem jsou LEA (late embryogenesis abundant proteins), stresový protein vysušení, proteiny zodpovědné za kyselinu abscisovou (ABA), dehydriny, chladové regulační proteiny, proteasy, enzymy pro zvýšení syntézy osmoticky aktivních látek a detoxifikační enzymy (Procházka, 1998; Lisar et al., 2012).

Při stresu suchem se vytváří dehydriny, které jsou totožné s proteiny vznikajícími při nestresovém procesu, kdy zasychá embryo v dozrávajících semenech. Dehydriny mají označení LEA D-11 a jedná se o skupinu více proteinů. Interagují s řadou enzymů v cytosolu a cytoskeletem. Koncentrace kyseliny abscisové (ABA) ovlivňuje tvorbu dehydrinů (Procházka, 1998).

### ***2.4 Molekulární odpověď rostlin na stres suchem***

Abiotické stresy, například chlad nebo sucho, mají více efektů na růst rostliny a výnos plodin. Následkem těchto vlivů se rostliny snaží odpovědět adaptací na tyto stresory. Abiotické stresy indukují různé biochemické a fyziologické odpovědi u rostlin. Mohou jimi být různé molekuly, například sacharidy, cukerné alkoholy a prolin.

Případně kyselina abscisová, která je produkována při stresu a hraje důležitou roli v odpovědi a toleranci abiotickému stresu (Chen et al., 2006).

V reakci na stres bylo popsáno mnoho genů na transkripční úrovni. Produkty těchto genů mají funkci při toleranci stresu a odpovědi na stres. Geny indukující stres zlepšují stresovou toleranci rostlin při genovém přenosu. Produkty genů nechrání pouze buňky proti stresu, ale také regulují expresi genů. Kyselina abscisová indukuje většinu genů podílejících se na odpovědi vůči stresu. Dehydratace způsobuje produkci kyseliny abscisové, která indukuje různé geny. Existují ABA-nezávislé i ABA-závislé kaskády podílející se na expresi genů (Chen et al., 2006).

Během stresu suchem jsou produkovány geny, které kódují proteiny, jejichž funkcí není pouze chránit buňky proti stresu, ale také genová exprese a signál transdukce v odpovědi na stres (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Produkty těchto genů se dělí do dvou skupin. V první skupině jsou proteiny, jejichž pravděpodobná funkce je tolerance stresu, jako jsou chaperony, LEA (late embryogenesis abundant proteins), osmotin, nemrznoucí proteiny, mRNA-vazebné proteiny, enzymy biosyntézy osmolytů, proteiny vodního kanálu, cukerné a prolinové transportní proteiny, detoxifikační enzymy a různé proteasy. Druhá skupina zahrnuje proteiny zúčastňující se regulace signálů transdukce a genové exprese, jako jsou kinasy, transkripční faktory a enzymy fosfolipidového metabolismu. Toto vše vytváří komplex odpovídající na abiotický stres (Chen et al., 2006).

Mnoho genů produkových při stresu jsou regulovány ABA-nezávislými procesy. Analýzou expresí genů produkových při stresu byla odhalena existence ABA-nezávislých i ABA-závislých transkripčních regulačních systémů. Při dehydrataci probíhají čtyři nezávislé regulační systémy, jejichž funkcí je aktivace genů produkových při stresu. Dva z nich jsou ABA-závislé a dva jsou ABA-nezávislé (Chen et al., 2006).

#### **2.4.1 ABA-nezávislá exprese genů při reakci na stres suchem a chladem**

Při reakci na stres suchem a chladem se účastní dva ABA-nezávislé systémy. Jedním z ABA-nezávislých systémů je cis-působící element, který je pojmenovaný jako element reagující na dehydrataci (DRE, dehydration responsive element) a C-repeat (CRT). Tento element je základní pro regulaci mnoha genů produkových při stresu suchem, nízkou teplotou a vysokou koncentrací látek v půdě. Ve všech DRE/CRT-vázajících proteinech je obsažen DNA-vázající motiv. Patří sem také dvě nezávislé

skupiny DREB proteinů, DREB1/CBF a DREB2, které mají funkci jako trans-působící faktory ve dvou oddělených signálech transdukční cesty při dehydrataci a nízké teplotě. Bylo identifikováno mnoho genů s různými funkcemi jako DREB/CBF cílové geny, které podporují nadměrnou expresi mnoha genů funkčních při stresu suchem (Chen et al., 2006).

V ABA-nezávislých systémech je několik genů produkovaných při stresu suchem, které nejsou zodpovědné za reakci na chlad nebo vazbu na ABA. Tyto geny mají specifické funkce při reakci na sucho. (Chen et al., 2006).

#### **2.4.2 ABA-závislá exprese genů při reakci na stres suchem**

Při reakci na sucho a vysokou koncentraci látek rozpuštěných v půdě je syntetizována ABA. Nahromaděná ABA v průběhu stresu suchem reguluje mnoho genů produkovaných při stresu. Mnoho genů zapojených do biosyntézy ABA jsou důsledkem sucha a vysoké koncentrace látek v půdě, ale nikoli stresem chladem (Chen et al., 2006).

#### **2.4.3 Přenos signálu při reakci na stres suchem**

Přenos signálu od prvotního zaznamenání dehydratace nebo osmotických změn po expresi různorodých genů není příliš prostudována. Většinou se využívalo znalostí systémů z kvasinek a zvířat, které se převáděly na rostliny (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Podobně jako cyanobakterie i rostliny obsahují mnoho genů, které kódují sensor-histidin kinasy a odpověď-regulační homology, které mají podobné osmosensitivní mechanismy u vyšších rostlin. ATHK1 (histidinová kinasa) slouží jako osmosensor u *Arabidopsis* (Huseníček). Ostatní mechanismy jsou spíše mechanického typu, jako jsou mechanické sensory cytoskeletu a sensory superoxidů produkovaných při stresu. Při uzavřených průduších se zvyšuje úroveň cytoplasmického  $\text{Ca}^{2+}$ , který působí jako druhý posel v reakci na osmotický stres. Signalizací pomocí vápníku se účastní fosfolipidy (Chen et al., 2006).

Důležitou roli při reakci na stres suchem má kyselina abscisová. Neovlivňuje pouze uzavření průduchů, ale také produkci mnoha genů. Několik mutací v ABA signalizaci může ovlivnit proteinovou fosfatasu, farnesyl transferasu a několik faktorů zahrnutých v mRNA procesech a proteinové degradaci (Chen et al., 2006).

## **2.5 Major latex protein**

Kyselina abscisová se podílí na rostlinném vývoji a odpovědi na abiotický stres. Její produkce se zvyšuje při stresu suchem a při uzavření průduchů. Protože kyselina abscisová má velmi důležitou úlohu v odpovědi na stres suchem, věnovalo se velké úsilí v identifikaci komponentů zahrnutých v její dráze (Wang et al., 2015).

Jedním z těchto produktů je Major latex protein (MLP), který byl nejdříve nalezen u máku setého (*Papaver somniferum*), (Nessler, 1990). Jedná se o nízkomolekulární polypeptidy (Nessler a Burnett, 1992). Orthology MLP se nazývají MLP-like proteiny (MLP). Byly objeveny i u dalších rostlin (Wang et al., 2015).

Původně byl jako materiál k analýze používán latex, který se získal po naříznutí stěn buněk. Latex podléhá osmotickému tlaku, proto pokrývá místa s poškozením stěn buněk. Po vystavení na vzduchu se z bílého latexu stane hnědá lepkavá hmota nazývaná opium (Nessler, 1990; Nessler a Burnett 1992).

Fyziologické a biochemické analýzy značí, že major latex protein-like 43 (MLP43) souvisí s ABA a její odpovědí na stres suchem kvůli úpravě primárních metabolitů a genovou expresí (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2018).

MLP jsou spojovány také s hormony rostlin, biosyntézou alkaloidů, oxidativním stresem, stresem při nadměrné koncentraci solí v půdě, vývojem rostlin, transportem organických tekutin a obranou proti infekcím patogenů (Zhang et al., 2018). MLP byly nalezeny již ve více rostlinách, například broskve, sojové boby, jahoda, meloun, tabák a *Arabidopsis* (Sun et al., 2010).

Zvyšující se počet studií popisující funkci MLP u rostlin ukazuje, že hrají důležitou roli v odpovědi na biotický a abiotický stres (Zhang et al., 2018).

## **2.6 Stomatal density and distribution 1 (SDD1)**

Stomatal density and distribution 1 (SDD1, hustota a rozložení průduchů) kóduje subtilisin-like serinovou proteasu (Berger a Altmann, 2000; Yoo et al., 2010) a vyskytuje se v prekurzorových buňkách průduchů (von Groll et al., 2002). Tento gen ovlivňuje hustotu průduchů, optimální transpiraci a vodní rovnováhu. Vývoj průduchů je regulován mnoha geny, které kontrolují adekvátní rozložení a množství průduchů na rostlině. Genetické analýzy SDD1 ukazují, že tento gen reaguje nezávisle na ostatních drahách regulující průduchy. Mechanismus regulace průduchů pomocí SDD1 není dosud zcela objasněn (Morales-Navarro, 2018).

SDD1 se nachází v kořenech, stoncích a speciálně v listech. Bylo dokázáno, že se tento gen projevuje v drahách citlivých na sucho (Liu et al., 2015).

Nejvíce je tento gen objasněn u *Arabidopsis thaliana*, ale orthology tohoto genu byly prokázány i u jiných druhů rostlin (Morales-Navarro, 2018).

## **2.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

### **2.7.1 Tradiční PCR**

Při PCR dochází k enzymatické amplifikaci úseku DNA. Tento fragment bývá ohraničen dvěma oligonukleotidovými primery. Cílová sekvence bývá syntetizována DNA-polymerázou. Primery jsou navrženy tak, aby docházelo k biosyntéze dvou nových řetězců DNA. Tyto řetězce jsou komplementární. Při cyklu dochází k tepelné denaturaci dvoušroubovice, poté k hybridizaci primerů a enzymové syntéze. Cykly se opakují a vzniklé produkty se tak zmnoží exponenciálně (Nussbaum et al., 2004). K syntéze jsou využity termostabilní polymerázy pocházející z termofilních mikroorganismů, aby odolaly vysokým teplotám (Šmarda et al., 2005).

Návrh obou primerů ovlivní přesnost a úspěšnost PCR. Při návrhu primerů by bylo dobré dodržet několik podmínek (Šmarda et al., 2005):

- Délka přibližně 18 – 25 nukleotidů
- Obsah GC 40 – 60 %
- Rovnoměrná distribuce oblastí s páry GC a AT
- Teplota  $T_m$  primeru 50 °C a více
- Teplota obou primerů by měla být přibližně stejná.
- Primery by měly být specifické.
- Primery by neměly tvořit dimery (vázat se sami na sebe).
- Primery by neměly tvořit vlásenky (hairpin).

Cílem PCR je tvorba produktů, což jsou úseky DNA. Tyto amplikony mají předem známou délku. Přítomnost těchto produktů je prokazována při elektroforetické separaci podle velikosti v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Případně se koncentrace DNA měří na spektrofotometru (Šmarda et al., 2005).

### **2.7.2 Real-time PCR (qPCR)**

Při této metodě dochází ke kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce (Šmarda et al., 2005).

U real-time PCR se přidává fluorescenčním barvivem značený reportér, který se váže v produktech. Reportér po nasvícení produkuje fluorescenční signál, který je detekován. V průběhu reakce je signál slabý a nelze jej rozeznat od signálu pozadí (šum). Poté s přibývajícím produktem se zvyšuje signál exponenciálně (Kubista et al., 2006). Při využití real-time PCR není nutné detekovat produkty pomocí elektroforézy (Šmarda et al., 2005).

### **2.7.3 Metoda $\Delta\Delta C_t$**

Tato metoda je vhodná pro PCR, kdy produkt přibývá exponenciálně s 100% účinností. Je tím myšleno, že dochází ke zdvojnásobení počtu ampliconů mezi jednotlivými cykly (Livak a Schmittgen, 2001).

### **2.7.4 Analýza křivky tání**

U metody real-time PCR je použité fluorescenční barvivo SYBR Green. Toto barvivo je zabudováno do vznikajících ampliconů, které jsou detekovány nespecificky. Specifita produktu PCR je zjišťována při analýze křivek tání (Maršálková, 2014).

Při této analýze dochází k zahřívání řetězců dsDNA. Při zvyšující se teplotě se komplementární vlákna DNA oddělují (tání DNA) a fluorescenční barvivo SYBR Green se uvolňuje z DNA. Naměřená fluorescence se snižuje. Tímto způsobem lze stanovit teplotu tání ampliconu. Analýzou křivky tání se určí, jestli vzorky nejsou kontaminovány jinou DNA, nebo nevznikají dimery primerů, případně jejich nesprávné vazby či jiné fragmenty (Maršálková, 2014). Dimery primerů mají většinou menší délku než cílové amplicony a jejich teplota tání je menší než produktů, proto je lze rozpoznat (Kubista et al., 2006).

### **2.7.5 Srovnání tradiční PCR a real-time PCR**

Při použití tradiční PCR je nutné výsledné amplicony separovat elektroforézou podle jejich velikosti (Šmarda et al., 2005). Zatímco metoda real-time PCR žádný další krok nepotřebuje (Schmittgen et al., 2000, Klein, 2002).

Real-time PCR měří fluorescenci při každém cyklu a zaznamenává tak kinetiku celé reakce v reálném čase (Valasek a Repa, 2005). U metody tradiční PCR se produkty hodnotí až po proběhnutí reakce (Schmittgen et al., 2000, Šmarda et al., 2005).

### **2.7.6 Výhody PCR**

Výhodou PCR je velmi velká citlivost, kdy stačí pouze jediná buňka. Pro reakci je potřeba velmi malého množství DNA. Odpadá tak potřeba předem připravit velké

množství tkáňových vzorků (Nussbaum et al., 2004). Real-time PCR je natolik citlivá, aby detekovala méně než 5 kopií cílové sekvence (Valasek a Repa, 2005).

Další výhodou je rychlost a menší náklady v porovnání s jinými metodami k analýze nukleových kyselin (Nussbaum et al., 2004).

Mezi další výhody PCR patří, že ji lze využít pro amplifikaci RNA. Musí být však přidán další enzym reverzní transkriptáza, který převede RNA templát na komplementární DNA (Valasek a Repa, 2005).

Metoda real-time PCR je výhodná také v tom, že odpadá další krok elektroforézy. Bez tohoto kroku se zabrání možnosti produkt kontaminovat. Toto je výhodné pro použití real-time PCR v diagnostice (Klein, 2002).

### **2.7.7 Nevýhody PCR**

Vysoká citlivost této metody je současně i nevýhodou, protože dochází snadno ke kontaminaci vzorku. Kontaminace může být způsobena i jedinou molekulou (Šmarda et al., 2005).

Při průběhu reakce jsou do nově vznikajících amplikonů zařazeny chybné (nekomplementární) nukleotidy. Tuto chybu provádí DNA-polymeráza. Vyváženost jednotlivých složek reakce ovlivňuje frekvenci těchto chyb (Šmarda et al., 2005).

Použité vzorky musí splnit určitý standard na čistotu. Při nedodržení této podmínky by byla snížena účinnost PCR. Mezi látky působící jako inhibitory PCR patří hem, heparin, IgG a lipidy (Kubista et al., 2006).

Největší nevýhoda real-time PCR se nevztahuje k technologii, ale k lidskému faktoru. Nevhodné vyhodnocení dat analýzy a neodůvodněné závěry, či nesprávný vývoj testu ovlivňuje získaný celkový výstup PCR (Valasek a Repa, 2005).

### **3 Cíl práce a hypotézy**

Cíle bakalářské práce:

- 1) Návrh primerů pro geny máku potenciálně zapojené do reakce na stres suchem
- 2) Optimalizace techniky RT-PCR pro detekci těchto genů u máku



## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Návrh primerů pro gen MLP43 a SDD1**

#### **4.1.1 Návrh primerů**

Pro každý gen byly navrženy dvě sady primerů s ohledem na to, že budou použity pro metody Real-time PCR. Sekvence pro vytvoření primerů byly získány sekvenováním na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné ZF JČU (Mandal, nepublikovaná data).

Nejdříve byl vytvořen FASTA formát sekvencí genů MLP43 a SDD1. Poté byly tyto sekvence zadány do programu, který vytvoří požadované primery (Primer3). V tomto programu byly zadány podmínky pro vytvoření primerů. Byla zadána délka primeru mezi 18 a 24 bazemi. Teplota  $T_m$  pro primery byla určena mezi 55 – 75 °C. Maximální rozdíl teplot  $T_m$  obou primerů byl určen na 2 °C. Poměr GC u primerů byl zadán 45 – 75 %. Délka výsledného amplikonu byla zvolena na 70 bází až 150 bází. Následně byly navrhované primery zkontrolovány pomocí programu Vector NTI, který rozpoznal, jestli se primery nevázaly navzájem na sebe nebo nevytvářely vlásenky. Po další selekci navržených primerů byla zkontrolována jejich specifita pomocí databáze NCBI (Benson et al., 2018).

#### **4.1.2 Příprava primerů pro další použití**

Na zkumavce od výrobce bylo uvedeno množství vody, kterou je potřeba přidat k získání koncentrace 100 pmol/μl. Primery byly inkubovány při 37 °C na 10 minut. Poté byly zvortexovány a do nové zkumavky bylo přidáno 20 μl primeru a 180 μl vody pro získání pracovního roztoku o koncentraci 10 pmol/μl. Původní zkumavky byly uloženy do mrazícího boxu.

#### **4.1.3 Stanovení optimální teploty annealingu navržených primerů**

Při přípravě vzorků pro PCR bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.6.1. Rozdíl byl pouze v množství použitých reagentů. Každá sada primerů byla určena pro pět různých teplot. Všechny sady primerů byly vyzkoušeny u obou odrůd máku. Celkem bylo zpracováno 40 vzorků. Bylo napipetováno 50 μl Master mix (PPP Master Mix společnosti Top-Bio s.r.o.), 30 μl vody, 5 μl od každého primeru.

Pro stanovení optimální teploty annealingu bylo vybráno těchto pět teplot: 52,2 °C, 54,0 °C, 56,9 °C, 58,5 °C a 60,1 °C.

Po provedení PCR byla provedena agarosová elektroforéza. Postup byl proveden stejně jako v kapitole 4.6.2. Pouze bylo upraveno množství agarosového gelu s ohledem na větší množství vzorků. Elektroforéza byla spuštěna při napětí 150 V po dobu 60 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl gen přesunut kvůli focení.

## 4.2 Real-time PCR navržených primerů

Měření proběhlo na přístroji QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific Inc.) s použitím reagensí sady SYBR Green Reagents.

Na konci měření amplifikace probíhá zvyšování teploty, dokud se nedosáhne teploty, kdy se dvouvláknové produkty rozpadnou. Tento jev se nazývá tání a jeho analýzou se získá křivka tání. Správná křivka tání by měla vypadat jako jediný ostrý vrchol (Valasek a Repa, 2005). Pokud jsou píky rozmístěny u více teplot, znamená to, že byly amplifikovány fragmenty o různé délce (Ririe et al., 1997). Při navrhování primerů je dobré stanovit teplotu tání, ale nelze se jí v praxi řídit. Měla by být ještě stanovena experimentálně. Nevhodně zvolená teplota annealingu primerů ovlivní účinnost real-time PCR. Tvorba primer dimerů může způsobit falešně pozitivní fluorescenci (Bustin et al., 2009).

Celkem proběhlo 40 cyklů, jejichž podmínky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Nastavení programu real-time PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1. Počáteční denaturace	50 °C	2 minuty	1
2. Denaturace	95 °C	10 minut	40
3. Annealing	95 °C	15 sekund	
4. Elongace	60 °C	1 minuta	
5. Analýza křivky tání	zvyšování teploty z 60 °C na 95 °C		

U jedné odrůdy bylo měřeno 8 vzorků. Každá sada primerů byla tvořena třemi vzorky a také dvěma negativními kontrolami. Pro toto množství vzorků bylo pipetováno 50 µl Master mixu (PowerUp™ SYBR® Green Master Mix od společnosti Thermo Fisher Inc.), 10 µl forward primeru, 10 µl reverse primeru, 20 µl vody. Dále byl přidán 1 µl templátové DNA.

### **4.3 Elektroforéza po real-time PCR**

Po kvantifikaci DNA pomocí metody real-time PCR byla DNA separována na 2,5% agarosovém gelu. Bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.6.2. Bylo změněno pouze množství navážené agarosy na 2,5 g. Nejdříve byl napipetován ladder. Poté do jamky 1 – 3 byl přidán vzorek odrůdy Onyx. Do jamky 4 – 6 byly přesunuty vzorky odrůdy Orel a v jamkách 7 – 8 byly negativní kontroly. Po elektroforéze byl gel opět vyfocen.

### **4.4 Rostlinný materiál**

Rostlinný materiál byl získán z odrůd máku setého (*Papaver somniferum* L.) Onyx a Orel. Rostliny byly pěstovány v boxech pro kultivaci rostlin při teplotě 21 °C, vlhkosti 80 % a fotoperiodě, při níž bylo 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Materiál pro vzorky byl odebrán z části listu. Z každé odrůdy byl použit jeden vzorek. Odebraný vzorek byl pro další zpracování připraven jako směsný vzorek ze dvou rostlin.

### **4.5 Izolace DNA**

Izolace DNA vybraných vzorků máku byla provedena na komerčním kitu NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG).

Homogenizované vzorky byly přeneseny do zkumavky, kam bylo přidáno 400 µl pufru PL1. Vzorek byl zvortexován a následně byl 10 minut inkubován při 65 °C. Poté byl lyzát přemístěn do kolonky s filtrem (kolonka s fialovým proužkem). Vzorky byly centrifugovány 2 minuty na 11 000 x g. Supernatant bez peletu byl přemístěn do nové zkumavky typu Eppendorf a bylo přidáno 450 µl pufru PC. Pak směs byla opět promíchána na vortexu. Na novou sběrnou zkumavku byla přidána nová kolonka (se zeleným proužkem), kam byl přesunut vzorek. Následně byla kolonka se vzorkem centrifugována 1 minutu při 11 000 x g. Poté byl obsah sběrné zkumavky odstraněn. Pak bylo do kolonky přidáno 700 µl pufru PW2 a směs byla znovu centrifugována 1 minutu při 11 000 x g. Obsah sběrné zkumavky byl opět odstraněn. Do kolonky bylo napipetováno 200 µl pufru PW2 a směs byla centrifugována na 2 minuty při 11 000 x g. Po opětovném vylití sběrné zkumavky byla kolonka ještě jednou na 1 minutu centrifugována na 11 000 x g, aby byla vysušena. Následně byla kolonka přesunuta do nové zkumavky. Bylo přidáno 50 µl pufru PE, který byl vytemperován na 65 °C. Po přidání pufru byla kolonka se směsí vytemperována na

5 minut při 65 °C. Poté byla směs centrifugována po dobu jedné minuty na 11 000 x g. Následně bylo opět přidáno 50 µl pufru PE a eluční krok byl opakován.

Vzorky izolované DNA byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### **4.6 Měření koncentrace získané DNA**

Měření koncentrace nukleové kyseliny bylo provedeno na spektrofotometru BioSpec-Nano společnosti Shimadzu. Pro změření byl použit 1 µl vzorku. Jako blank byl využit PE pufr z kitu NucleoSpin® Plant II.

##### **4.6.1 Kontrola přítomnosti izolované DNA pomocí PCR**

Do zkumavky bylo napipetováno 15 µl Master mix (PPP Master Mix společnosti Top-Bio s.r.o.), 9 µl vody, 1,5 µl forward primer PSOM17 a 1,5 µl reverse primer PSOM17 (Mičianová et al., 2017). Všechny příměsi před přidáním byly promíchány na vortexu. Do mikrozkušavek pro PCR byl přidán 1 µl vzorku. Pak byl do mikrozkušavek napipetován jednou vzorek Onyx a jednou vzorek Orel. Zkumavka pro negativní kontrolu byla bez templátové DNA. Poté se do každé mikrozkušavky přidalo 9 µl připravené směsi. Následně byly zkumavky krátce promíchány na vortexu a poté byly vloženy do thermocykleru.

##### **4.6.2 Elektroforéza na agarosovém gelu**

Byla provedena elektroforéza pro zjištění, zda izolovaná DNA není degradovaná. Jednalo se o elektroforézu v 1,5% agarosovém gelu v pufru TBE.

Bylo naváženo 1,5 g agarosy, k níž bylo přidáno 100 ml TBE pufru. Vzniklá směs byla zahřívána, dokud prášek nebyl zcela rozpuštěn. Během zahřívání bylo potřeba směs občas zamíchat. Po dokonalém rozpuštění byla směs zchlazena na 60 °C. Poté bylo do směsi přidáno fluorescenční barvivo ethidium bromid (EtBr). Směs byla promíchána. Následně byla přelita do formičky s hřebenem, kde byla ponechána 10 minut ztuhnout. Po ztuhnutí byl odstraněn hřeben a vzniklý gel byl přemístěn do vany pro elektroforézu s TBE pufrem. Na začátek a konec gelu byl napipetován 100 bp DNA ladder, který sloužil jako velikostní standard. Do jamky bylo vpraveno 9 µl vzorku amplifikovaného pomocí PCR. Elektroforéza byla spuštěna při napětí 120 V po dobu 60 minut. Následně byl gel přesunut do komory s kamerou a UV světlem kvůli pořízení elektroforeogramu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Kontrola navržených primerů

Nejdříve byly navrženy primery v programech na PC. Pro detekci genu MLP43 byly navrženy dvě sady primerů. První sada byla MLP43-F1 + MLP43-R1 s výsledným amplikonem o velikosti 101 bází. Druhá sada byla MLP43-F2 + MLP43-R2 s amplikonem o velikosti 136 bází. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Sekvence a názvy primerů pro gen MLP43

Název	Sekvence primeru	Teplota tání [°C]	Počet bází	Poměr GC [%]	Délka amplikonu
<b>MLP43-F1</b>	5'-TGCCAAGTTGTTCTGAGAGA-3'	52,9	20	50	101
<b>MLP43-R1</b>	5'-CTTCTCTTTCGCCTTGACGC-3'	54,2	20	55	
<b>MLP43-F2</b>	5'-GCGTCAAGGCGAAAGAGAAG-3'	54,2	20	55	136
<b>MLP43-R2</b>	5'-TCCTTCTGTGTTGGAGTGGT-3'	49	20	50	

Pro detekci genu SDD1 byly navrženy také dvě sady primerů. První sada byla SDD1-F1 + SDD1-R1 s výsledným amplikonem 199 bází. Druhá sada byla SDD1-F2 + SDD1-R2 s amplikonem 106 bází. Názvy primerů a jejich sekvence jsou opět uvedeny v tabulce (Tab. 5.2).

Tab. 5.2 Sekvence a názvy primerů pro gen SDD1

Název	Sekvence primeru	Teplota tání [°C]	Počet bází	Poměr GC [%]	Délka amplikonu
<b>SDD1-F1</b>	5'-GCGGATGATGGAAGCGAATT-3'	56,3	20	50	199
<b>SDD1-R1</b>	5'-GGTAGAACATGGGCGTCAAC-3'	51,8	20	55	
<b>SDD1-F2</b>	5'-GGAAATAACGGCCCCATCAC-3'	55,5	20	55	106
<b>SDD1-R2</b>	5'-CCAGACGTAAAGTAGCGGGA-3'	52,1	20	55	

Poté byly potřebné údaje odeslány výrobci. Výsledné vytvořené primery byly odeslány do laboratoře. Nejprve bylo potřeba lyofilizované primery připravit pro další použití. Podle doporučení výrobce bylo k lyofilizátu přidáno uvedené množství vody tak, aby zásobní roztok měl koncentraci 100 pmol/μl. Tento roztok byl dále uchováván v mrazicím boxu. Ze zásobního roztoku bylo odebráno 20 μl, které byly v nové zkumavce naředěny 180 μl vody. Takto získaný 10 pmol/μl pracovní roztok byl skladován v lednici a byl připraven pro použití při PCR. Poté bylo potřeba vyzkoušet,

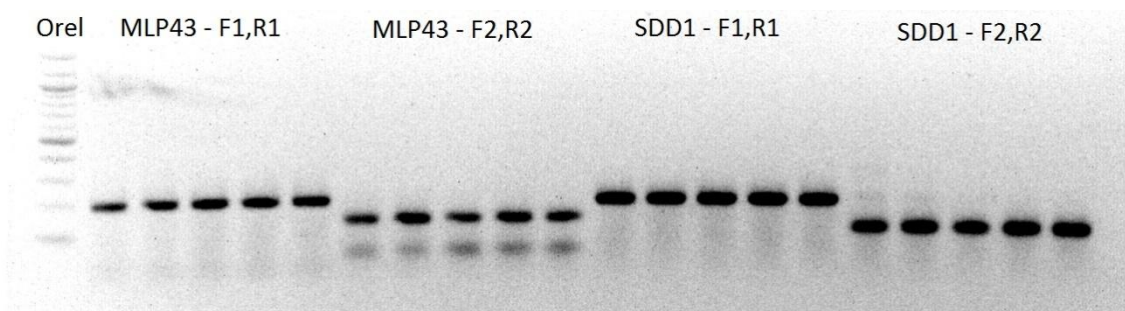
jestli dané primery jsou funkční. Funkčnost primerů byla ověřena při výběru vhodné teploty pro annealing.

## 5.2 Výběr vhodné teploty pro annealing a sady primerů pro další použití

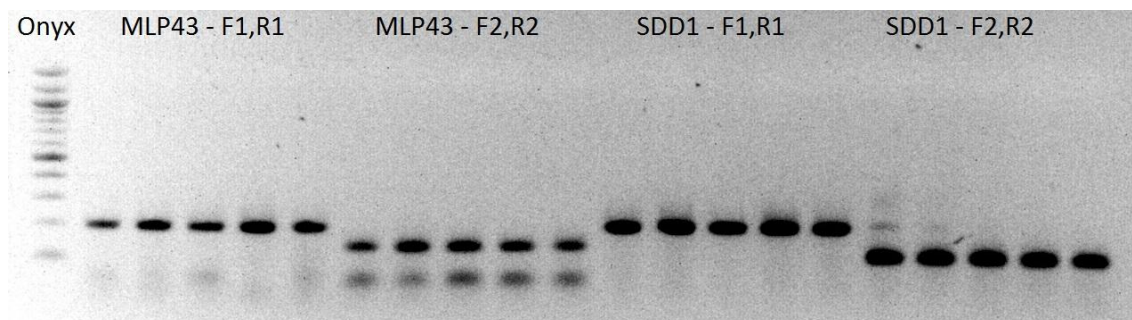
Před použitím daných primerů pro metodu real-time PCR bylo zapotřebí stanovit optimální teplotu annealingu, která je vhodná pro použité primery.

Pro tento experiment bylo použito všech sad primerů. Celkem byly využity 4 sady primerů pro pět různých teplot u dvou odrůd. V součtu se jednalo o 40 vzorků. Teploty navržené pro annealing byly tyto: 52,2 °C, 54,0 °C, 56,9 °C, 58,5 °C a 60,1 °C. Po amplifikaci pomocí metody PCR byly vzorky nanášeny na 1,5% agarosový gel pro elektroforézu. Jedné sadě primerů odpovídalo 5 jamek.

Na výsledných elektroforeogramech (Obr. 5.1, Obr. 5.2) lze vidět zleva ladder, poté pětici jamek zaujímá stejná sada primerů. Ke každé jamce přísluší teplota uvedená v postupu výše. U další sady primerů se teploty v jamkách opakují. Elektroforeogramy jsou rozděleny podle odrůdy.



Obr. 5.1 Elektroforeogram po gradientové PCR u odrůdy Orel



Obr. 5.2 Elektroforeogram po gradientové PCR u odrůdy Onyx

Podle elektroforeogramu (Obr. 5.1) po elektroforetické separaci DNA odrůdy Orel lze vyhodnotit, že primery MLP43 – F1,R1 jsou při nižších teplotách nevhodné pro použití, protože vznikají nespecifické fragmenty. Naopak pro použití při teplotě 60 °C jsou vhodné. Primery MLP43 – F2,R2 nejsou vůbec vhodné pro použití, protože

nespecifické fragmenty vznikaly při všech teplotách. Tyto primery byly vyloučeny. Primery SDD1 – F1,R1 se ukázaly jako vhodné při všech teplotách. Mohly se využít zároveň s primery MLP43 – F1,R1 pro amplifikaci. Primery SDD1 – F2,R2 také nebyly použity.

Na elektroforeogramu (Obr. 5.2) pro stanovení optimální teploty annealingu u odrůdy Onyx byla sada primerů MLP43 – F1,R1 opět bez nespecifit, proto byla vybrána pro další použití. Primery MLP43 – F2,R2 byly vyřazeny kvůli fragmentům, které se vytvořily při všech teplotách. Sada primerů SDD1 – F1,R1 byla vhodná k dalšímu použití. U poslední sady primerů SDD1 – F2,R2 se při nejnižší teplotě 52,5 °C vytvořily nespecifické fragmenty. U ostatních teplot byly primery v pořádku, ale nebyly vybrány pro další využití.

Pro metodu real-time PCR byly zvoleny sady primerů MLP43 – F1,R1 a SDD1 – F1,R1. Optimální teplota pro annealing těchto sad primerů byla 60,1 °C. Dalším důvodem pro výběr těchto primerů byla i vhodná délka amplikonů.

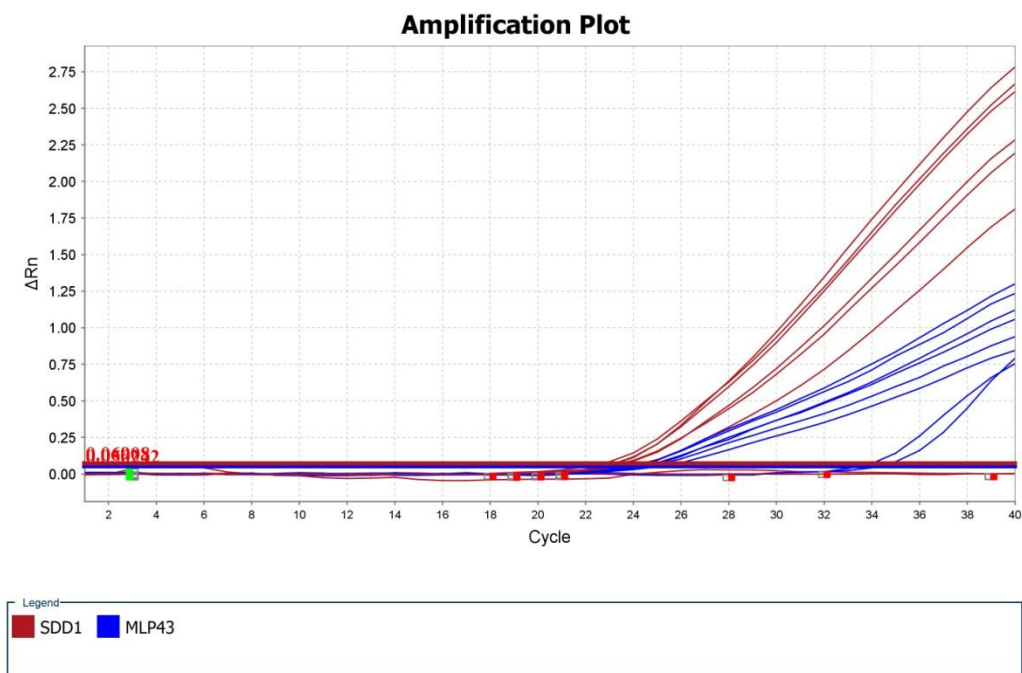
### **5.3 Real-time PCR**

Pro analýzu real-time PCR byla použita izolovaná DNA z rostlin máku setého odrůdy Orel a Onyx. Poté byly navrženy primery pro detekci genů MLP43 a SDD1. Po ověření funkčnosti a výběru optimální teploty pro annealing byly vybrány vhodné sady primerů. Pro každý gen bylo analyzováno 8 vzorků, z nichž dva sloužily jako negativní kontroly, tedy bez DNA přidané do reakce. Zbylé vzorky byly rozděleny mezi dvě odrůdy po třech technických opakováních.

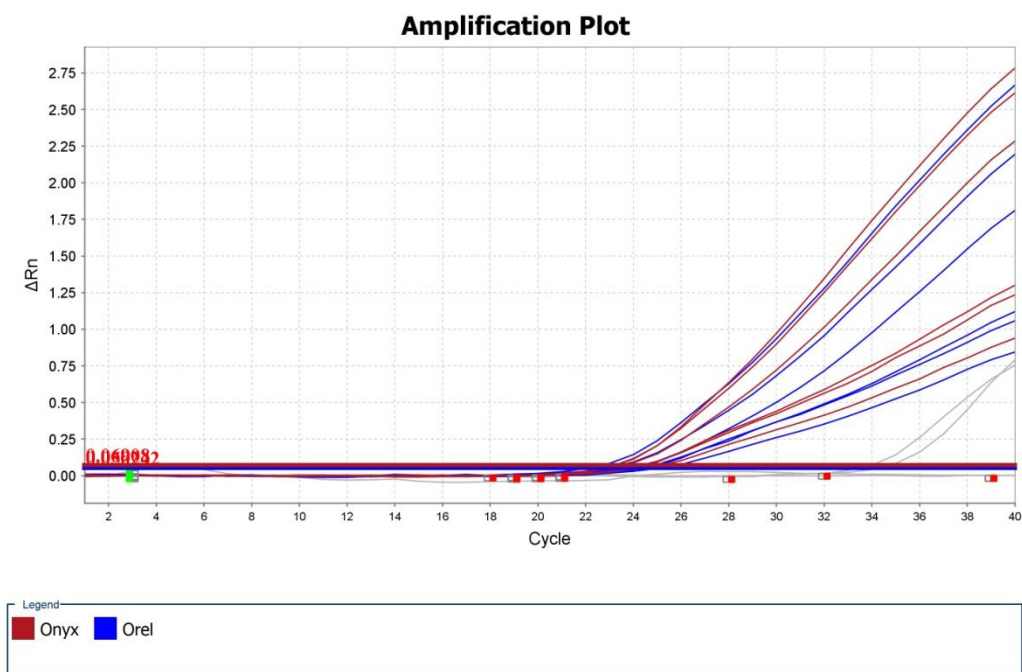
Při real-time PCR byla měřena intenzita fluorescence, která stoupala s přibývajícím produktem. Záznamem měření byly amplifikační křivky. Nejdříve byla zaznamenána fluorescence na pozadí neboli šum. Jakmile fluorescence vystoupala nad určitou hladinu (threshold), její hodnota odpovídala koncentraci DNA produktu.

Na grafu (Obr. 5.3) byla znázorněna data získaná z analýzy real-time PCR. Na grafu je znázorněna závislost hodnoty  $\Delta R_n$  (signál fluorescence) na počtu cyklů. Různé barevné označení odlišuje křivky pro gen SDD1 a gen MLP43. V tomto grafu jsou zahrnuty křivky pro obě odrůdy. Podle nižšího sklonu křivek pro MLP43 lze usoudit, že dané primery nejsou příliš specifické a nedochází k úplnému zdvojnásobení amplikonů mezi jednotlivými cykly.

Nízký sklon křivek ukazuje také na menší koncentraci templátové DNA (Ririe et al., 1997).



Obr. 5.3 Amplifikační křivka pro geny SDD1 a MLP43, zahrnuje obě odrůdy



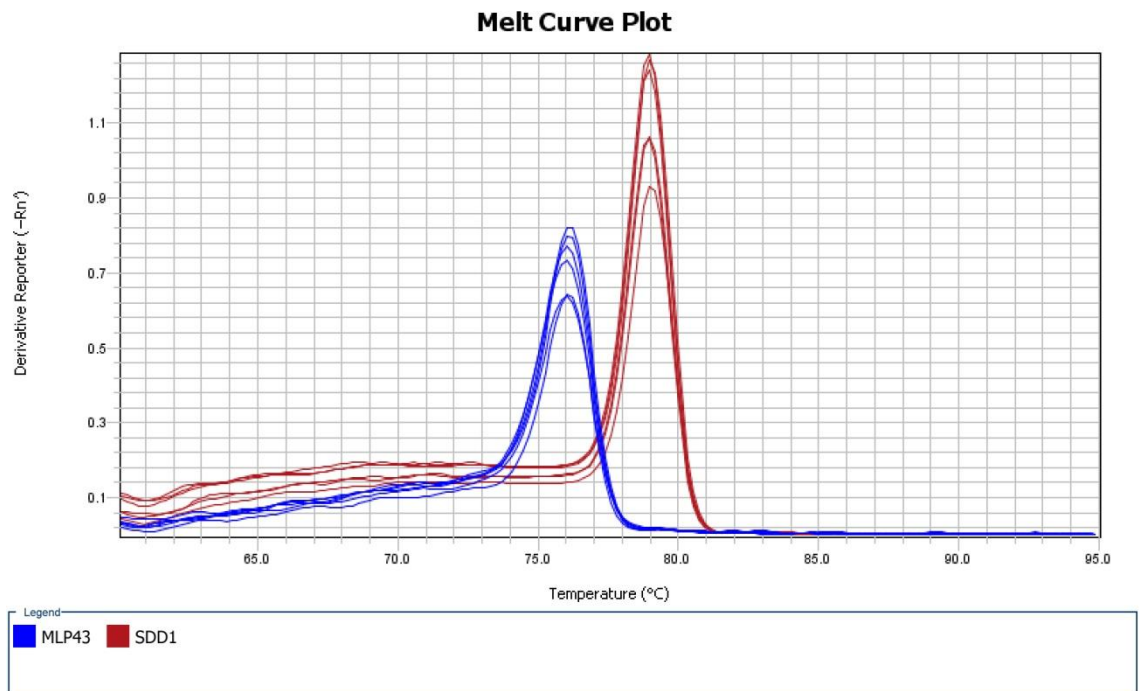
Obr. 5.4 Amplifikační křivka pro odrůdy Orel a Onyx, obsahuje oba geny

Na grafu (Obr. 5.4) jsou amplifikační křivky barevně odlišené podle odrůdy. Odrůda Onyx je značena červeně a odrůda Orel je označena modře. Při srovnání s grafem (Obr. 5.3) lze odlišit křivky pro jednotlivé geny. Křivky označené šedou barvou odpovídají negativní kontrole, která byla kontaminována DNA. Druhá negativní

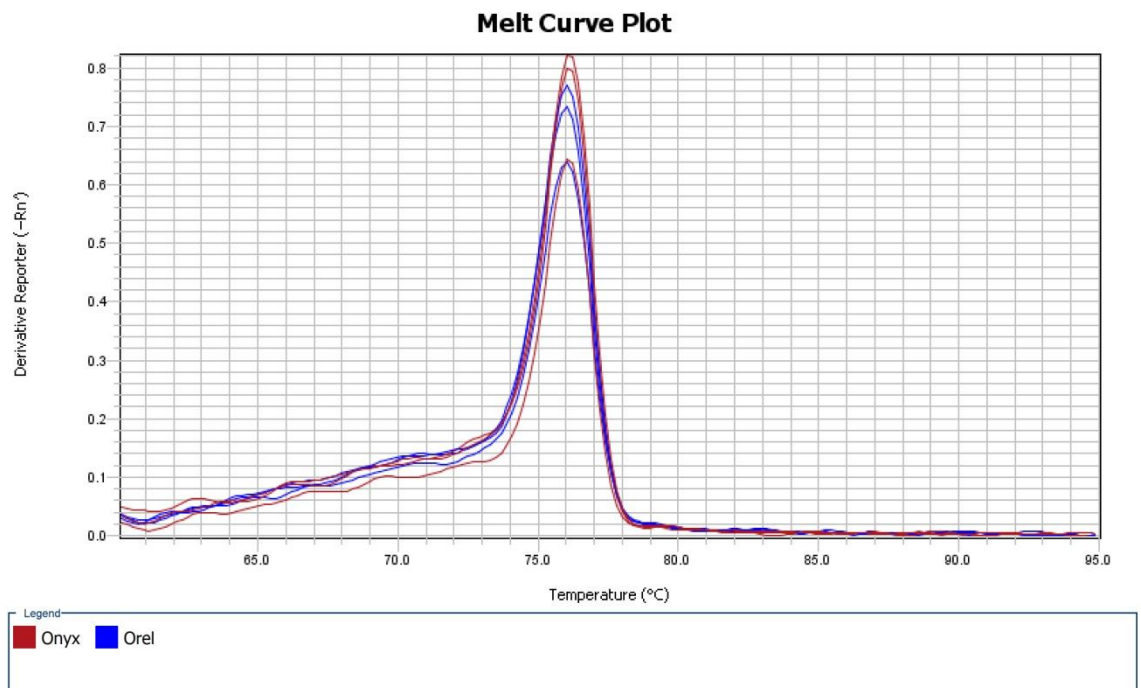


kontrola vyšla negativně a nebyla v ní fluorescence zaznamenána. Treshold, který tvoří prahovou hodnotu pozadí, je označen na obrázku červeným číslem.

Na dalším grafu (Obr. 5.5) jsou křivky tání. Tyto křivky jsou vypočítány derivací hodnoty  $R_n$  závislou na teplotě. Křivky jsou barevně odlišeny podle genu, pro které byly určeny primery. Graf (Obr. 5.5) ukazuje křivky pro odrůdu Orel i Onyx.



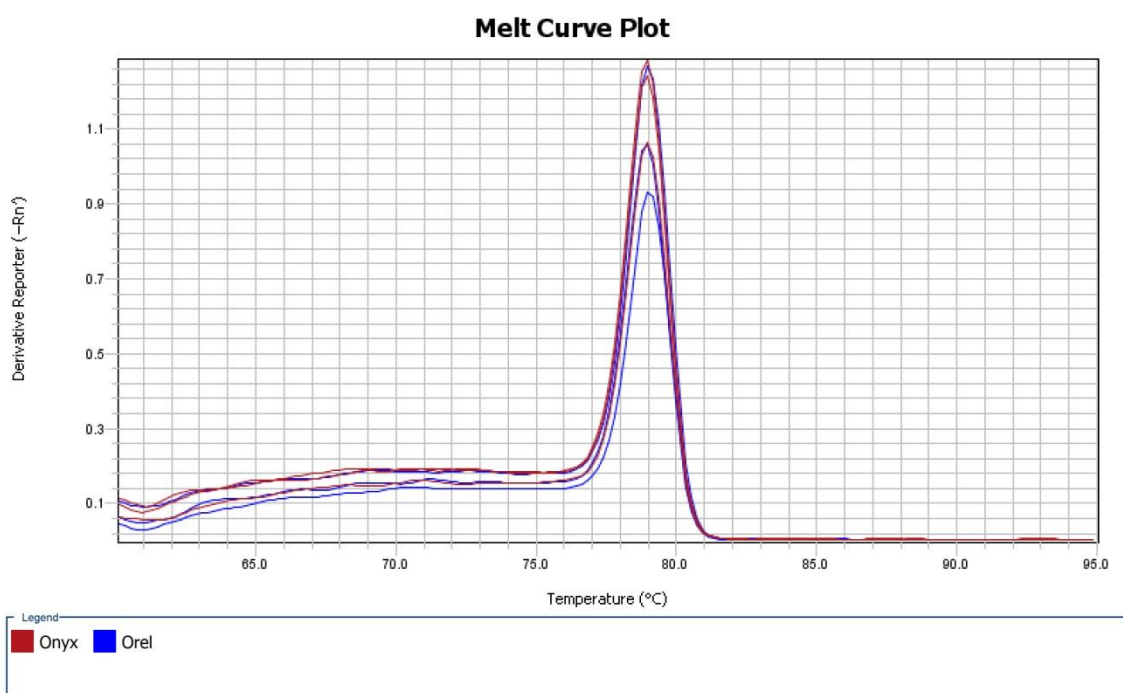
Obr. 5.5 Křivka tání pro geny SDD1 a MLP43 u obou odrůd



Obr. 5.6 Křivka tání pro gen MLP43 u odrůdy Onyx a Orel

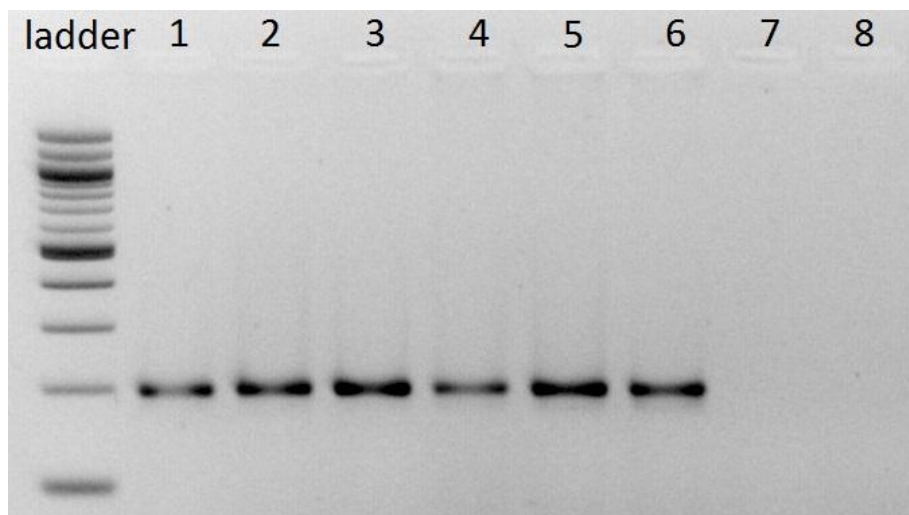
Graf (Obr. 5.6) znázorňuje křivky tání u genu MLP43 pro odrůdu Orel a Onyx, které jsou barevně rozlišeny. Jednotlivé píky se nachází v zákrytu a mají ostrý vrchol. Teplota tání pro produkty u genu MLP45 je 76 °C. Tento graf ukazuje, že se mimo hlavní teplotu neobjevují další píky, které by značily fragmenty s odlišnou teplotou tání. Podle průběhu křivky tání nedochází k tvorbě primer dimerů.

Na grafu (Obr. 5.7) jsou křivky tání pro gen SDD1 u vzorků odrůdy Orel a Onyx. Píky se nachází v zákrytu s ostrým vrcholem. Teplota tání pro produkty u genu SDD1 je 79 °C. Nevyskytují se žádné vedlejší píky, které by značily přítomnost dalších fragmentů s odlišnou teplotou tání.



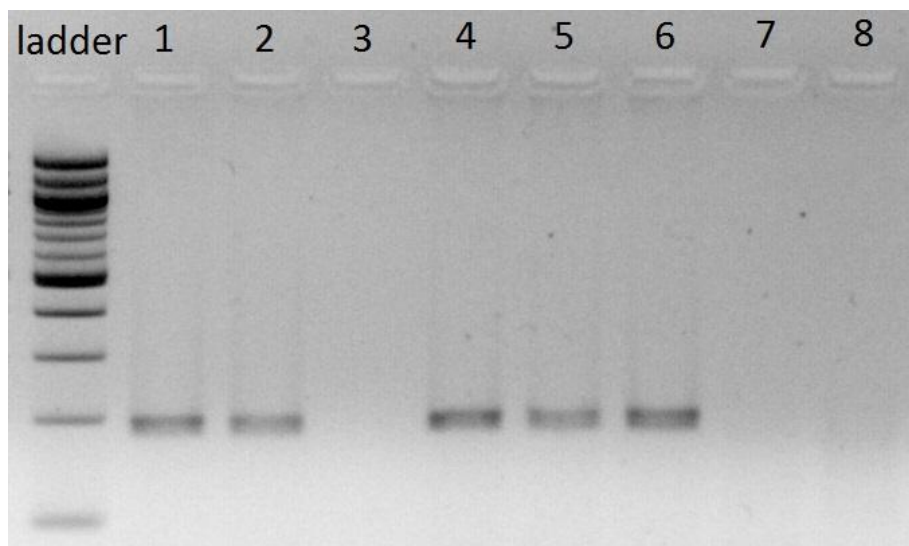
Obr. 5.7 Křivka tání pro gen SDD1 u odrůdy Orel a Onyx

Po kvantifikaci DNA metodou real-time PCR byly vzorky pro kontrolu separovány elektroforézou na 2,5% agarosovém gelu. Na elektroforeogramu (Obr. 5.8) pro gen SDD1 lze vidět v jamkách 1 – 3 vzorky odrůdy Onyx a v jamkách 4 – 6 vzorky odrůdy Orel. Jamky 7 a 8 obsahují negativní kontrolu, kde nebyla templátová DNA, proto se nemohly vytvořit žádné amplikony. Při srovnání vzorků s ladderem lze zjistit, že výsledná délka amplikonů byla přibližně 200 bazí, což odpovídá očekávané délce amplikonu určeného při navrhování primerů.

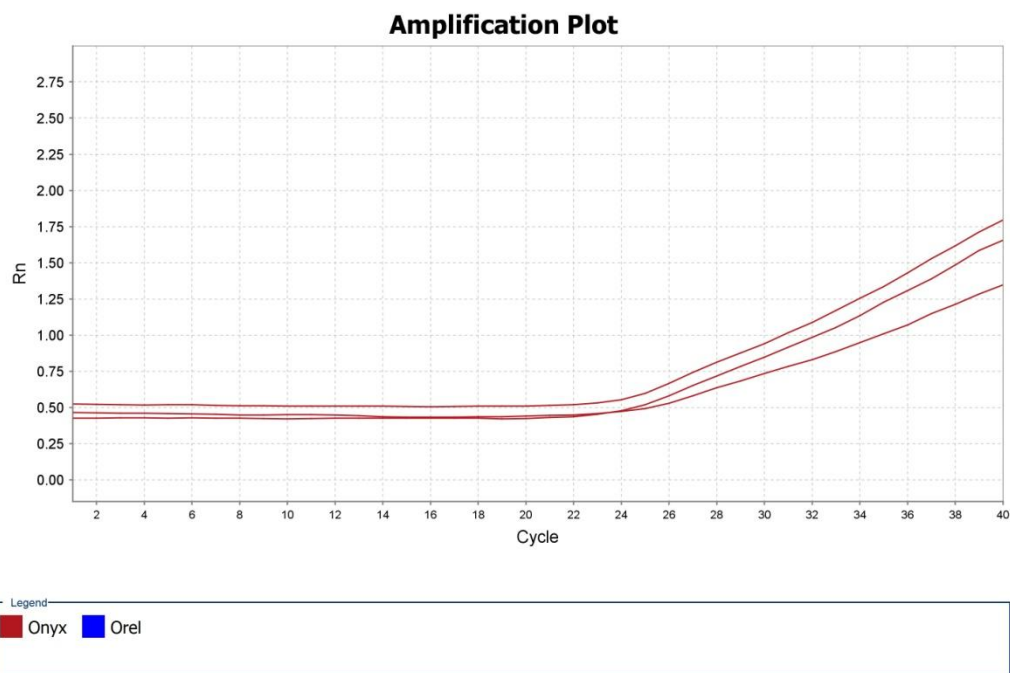


Obr. 5.8 Elektroforeogram produktů po real-time PCR u genu SDD1

Elektroforeogram (Obr. 5.9) zobrazuje vzorky obsahující primery pro detekci genu MLP43. V jamce 1 – 3 byly napipetovány vzorky odrůdy Onyx a do jamek 4 – 6 byly přidány vzorky odrůdy Orel. Poslední dvě jamky 7 a 8 byly negativní kontroly. Jamka číslo 3 je prázdná, což svědčí o chybě při pipetování. Tuto chybu potvrzuje i graf (Obr. 5.10), na kterém lze vidět amplifikační křivky tří vzorků odrůdy Onyx pro gen MLP43. Každá amplifikační křivka odpovídá jednomu vzorku.



Obr. 5.9 Elektroforeogram produktů po real-time PCR u genu MLP43



Obr. 5.10 Amplifikační křivka pro gen MLP43 u vzorků odrůdy Onyx

Kontaminované negativní kontroly pro gen ML43, které měly své amplifikační křivky viditelné na grafu (Obr. 5.4), naopak na gelu po elektroforéze vidět nelze. To značí, že kontaminace byla velmi malá. Také to poukazuje na to, že metoda fluorescenční detekce u real-time PCR je mnohem citlivější než elektroforetická separace a následné vyhodnocení fluorescence na gelu.

Po vyhodnocení grafů amplifikačních křivek a elektroforeogramů lze soudit, že sada primerů SDD1 – F1,R1 je vhodná pro použití pro detekci genu SDD1. Sada primerů MLP43 – F1,R1 pro gen MLP43 není vhodná pro použití pro metodu real-time PCR. Tuto sadu je nutné ještě optimalizovat.

#### **5.4 Izolace DNA (kontrola kvality izolované DNA)**

Nejprve se pomocí měření koncentrace DNA zjistilo, jestli se vůbec podařila vyizolovat rostlinná DNA. Pomocí spektrofotometru byla změřena koncentrace DNA ve vzorku z odrůdy Onyx. Koncentrace byla 61,37 ng/μl. Následně se změřila koncentrace DNA z odrůdy Orel, která byla 185,63 ng/μl (Obr. 5.11).

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

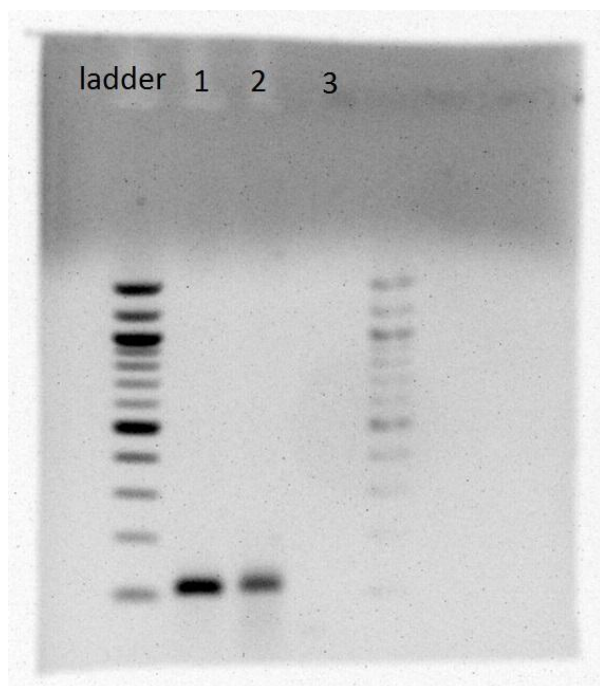
Analyte:dsDNA

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230
1	mak onyx	19.03.05 12:47:06			61,37	2,22	2,28
2	mak orel	19.03.05 12:48:15			185,63	2,08	1,29

Obr. 5.11 Naměřená koncentrace DNA ve vzorcích

Podle naměřené hodnoty absorbance je odvozena čistota izolované DNA. U měření koncentrace DNA je za čistý vzorek považován s hodnotou 1,8, ale většinou se jako dostačující uvádí hodnota 2,0. Toto číslo je vypočítáno jako poměr absorbancí při vlnové délce 260 nm a 230 nm. Dále se pracuje s poměrem absorbancí u vlnových délek 260 nm a 280 nm. Pokud je hodnota u poměru 260/230 menší než 2, může to znamenat kontaminaci fenolem, guanidinem, glykogenem nebo sacharidy. Problém může být také v záměně blanku nebo jeho kontaminaci. Při nízké hodnotě u poměru 260/280 je kontaminace způsobena fenolem nebo je koncentrace DNA příliš nízká (Matlock, 2015). Podle obrázku (Obr. 5.11) bylo vyhodnoceno, že izolovaná DNA z odrůdy Onyx byla čistá. Nízká hodnota u poměru absorbancí 260/230 značila, že vzorek byl pravděpodobně kontaminován.

Vyizolovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR a poté elektroforeticky separována na agarosovém gelu. Elektroforetické dělení proběhlo při napětí 120 V po dobu 60 minut. Na výsledném elektroforeogramu (Obr. 5.12) lze vidět zleva: ladder, poté vzorek Onyx, vzorek Orel, negativní kontrola a nakonec opět ladder.



Obr. 5.12 Elektroforeogram vzorků izolované DNA

Na elektroforeogramu (Obr. 5.12) v první jamce byl napipetován 100 bp DNA ladder, který slouží jako velikostní standard. V jamkách 1 – 2 byly vzorky s izolovanou DNA. Jamka číslo 1 obsahovala DNA odrůdy Onyx a jamka číslo 2 obsahovala vzorek DNA s odrůdou Orel. V jamce číslo 3 byla negativní kontrola, která neobsahovala žádnou templátovou DNA. I když koncentrace DNA u odrůdy Onyx byla nízká, amplifikace proběhla v pořádku. Z výsledků elektroforézy lze usoudit, že izolace DNA byla provedena úspěšně.

## 6 Diskuze

V latexu máku setého jsou nízkomolekulární polypeptidy, které se nazývají major latex proteiny. Nejdříve byly popsány geny gMLP15 a cMLP40, které byly zakódovány v cDNA. Z 98,9 % byly nukleotidové sekvence těchto genů podobné, proto lze předvídat přítomnost dalších produktů s identickými aminokyselinami. Následně byl popsán gen gMLP22 (Nessler et al., 1990, Nessler a Burnett, 1992). Postupně byly tyto proteiny nalezeny i v dalších rostlinách jako je broskev, sojové boby, jahoda, meloun, tabák a *Arabidopsis*. Biologická funkce MLP v rostlinách je neznámá (Sun et al., 2008), ale je prokázána souvislost s odpovědí na biotický a abiotický stres. Analýza genové exprese MLP může posloužit k pochopení rolí těchto proteinů v metabolismu rostlin (Zhang et al., 2018).

Ve studii zahrnující funkci MLP43 jako regulátor při ABA odpovědi na stres suchem u *Arabidopsis thaliana*, bylo prokázáno, že rostliny s nadměrnou expresí genu MLP43 jsou tolerantní vůči suchu (Wang et al., 2015).

Cílem této práce je optimalizovat metodu real-time PCR pro analýzu exprese genů MLP43 a SDD1 u máku setého a navrhnout vhodné primery pro tyto geny.

Pro gen MLP43 byly navrženy dva páry primerů. Po gradientové PCR byla vybrána vhodná teplota pro annealing, která byla 60 °C. Ze dvou navržených párů primerů byl určen optimální pár, u kterého nedocházelo ke tvorbě nespecifických fragmentů. Tato sada primerů byla použita pro amplifikaci MLP43 cDNA metodou real-time PCR. Z amplifikačních křivek bylo zjištěno, že real-time PCR nebyla účinná na 100 %. Menší sklon křivek dokazoval, že nedochází k dvojnásobné tvorbě amplikonů. Také to mohlo být způsobeno nižší koncentrací templátové DNA. U primerů pro gen MLP43 by bylo vhodné metodu více optimalizovat nebo pozměnit primery.

Gen SDD1 byl poprvé popsán u *Arabidopsis thaliana*. Tento gen kóduje serinovou proteasu a má velký vliv při vývoji průduchů (Berger a Altman, 2000). Nadměrná exprese genu SDD1 vedla u *Arabidopsis thaliana* k nižší hustotě průduchů (Liu et al., 2014). Real-time PCR analýza potvrdila, že SDD1 byl izolován v rostlině *Isatis tinctoria*. Nejvíce byl exprimován v listech, ale transkript byl nalezen také v kořenech a výhoncích. Současně bylo zjištěno, že je zapojen v drahách reagujících na stres suchem (Xiao et al., 2010).

Pro tuto práci byly navrženy dvě sady primerů pro expresi genu SDD1 u máku setého. Metodou gradientové PCR byla zjištěna teplota pro annealing těchto primerů a to konkrétně 60 °C. Zároveň byl vybrán optimální pár primerů, který byl použit pro analýzu metodou real-time PCR. Z analýzy amplifikačních křivek a křivek tání vyplynulo, že primery jsou vhodné pro další využití při výzkumu exprese SDD1 u máku.

Exprese genu SDD1 byla studována např. i u kukuřice seté (*Zea mays* L.), (Liu et al., 2014), či v kořenech tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Exprese genu SDD1 byla v těchto pracích také analyzována metodou real-time PCR (Wendlandt et al., 2015).

Výstupy této bakalářské práce se mohou použít pro další práci v rámci výzkumu exprese genů u rostlin máku setého při reakci na suchu. Na tuto práci může navazovat diplomová práce zabývající se analýzou exprese genů MLP43 a SDD1 u reakce na stres suchem. Navržená sada primerů pro gen SDD1 by mohla být přímo použita, zatímco pár primerů pro gen MLP43 bude potřeba ještě optimalizovat. Metoda real-time PCR byla při práci na této bakalářské práci již optimalizována pro další použití při analýze exprese genů MLP43 a SDD1. V navazující diplomové práci budou sledovány exprese genů v listech máku v průběhu vystavení stresu suchem. Zároveň by bylo vhodné porovnat, jak se exprese těchto genů liší vůči sobě navzájem. Případně, jestli nejsou metabolické dráhy těchto genů propojené.



## 7 Závěr

Tato práce se věnovala molekulární detekci genů potenciálně zapojených na stres suchem u máku. Studium exprese genů indukovaných při stresu suchem může do budoucna pomoci při šlechtitelské práci, aby jejím výsledkem byly rostliny odolné k suchu.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu real-time PCR, která byla použita pro analýzu genů MLP43 a SDD1. Pro tyto geny byly navrženy čtyři sady primerů. Po další kontrole těchto primerů byla vybrána jedna sada primerů pro každý gen. Jednalo se o primery MLP43 – F1,R1 a SDD1 – F1,R1. Z výsledků real-time PCR vyplynulo, že sada primerů SDD1 – F1,R1 navržených pro gen SDD1 je optimálních pro další využití v rámci výzkumu reakce máku na stres suchem. Navržené primery pro gen MLP43 by bylo vhodné dále optimalizovat. Například změnou času nebo teploty pro annealing. Vhodnější by však bylo pozměnit primery, aby více vyhovovaly pro další použití real-time PCR.

Z rostlin máku setého (*Papaver somniferum* L.) odrůdy Onyx a Orel byla izolována DNA. U vyizolované DNA byla zjištěna koncentrace a čistota. Poté použitelnost DNA byla zkontrolována pomocí reverse a forward primerů PSOM17 metodou tradiční PCR a následnou elektroforetickou separací.

Podařilo se tedy navrhnout primery pro gen SDD1, které mohou být využity při další diplomové práci. Primery pro gen MLP43 se nepodařilo navrhnout. Bude potřeba je pro další použití upravit nebo navrhnout jiné.

## 8 Seznam použité literatury

- [1]. BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., OSTELL, J., PRUITT, K. D., SAYERS, E.W., 2018. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41–D47.
- [2]. BERGER, D., ALTMANN, T., 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development.* 14.9: 1119-1131, doi: 10.1101/gad.14.9.1119
- [3]. BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J., WITTEWER, C. T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry.* 55.4: 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- [4]. CHEN, T. H. H., UEMURA, M., FUJIKAWA, S., (eds.). 2006. *Cold hardiness in plants: molecular genetics, cell biology and physiology*. CABI, United Kingdom. 288 s. ISBN 9780851990590.
- [5]. KLEIN, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine.* 8.6: 257-260, doi: 10.1016/S1471-4914(02)02355-9
- [6]. KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, m., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine.* 27.2-3: 95-125, doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007
- [7]. LISAR, S. Y. S., MOTAFAKKERAZAD, R., HOSSAIN, M. M., RAHMAN, I. M. M., 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: RAHMAN, I. M. M., HASEGAWA, H., *Water Stress*. InTech, Chorvatsko, s. 1 – 14. ISBN 978-953-307-963-9
- [8]. LIU, Y., QIN, L., HAN, L., XIANG, Y., ZHAO, D., 2015. Overexpression of maize SDD1 (*ZmSDD1*) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).* 122.1: 147-159, doi: 10.1007/s11240-015-0757-8

- [9]. LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*. **25**(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- [10]. MARŠÁLKOVÁ, K., 2014. *Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií*. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [11]. MATLOCK, B., 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity: Technical Note 52646. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- [12]. MIČIANOVÁ, V., ONDREIČKOVÁ, K., MUCHOVÁ, D., KLČOVÁ, L., HUDCOVICOVÁ, M., HAVRLETOVÁ, M., MIHÁLIK, D., KRAIC, J., 2017. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia*. **72**(6), 587-594, doi: 10.1515/biolog-2017-0076
- [13]. MIEDZIŃSKA, L., 2010. *Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- [14]. MORALES-NAVARRO, S., PERÉZ-DIAZ, R., ORTEGA, A., DE MARCOS, A., MENA, M., FENOLL, C., GONZÁLEZ-VILLANUEVA, E., RUIZ-LARA, S., 2018. Overexpression of a SDD1-like gene from wild tomato decreases stomatal density and enhances dehydration avoidance in *Arabidopsis* and cultivated tomato. *Frontiers in plant science*. **9**. doi: 10.3389/fpls.2018.00940
- [15]. NESSLER, C. L., BURNETT, R. J., 1992 Organization of the major latex protein gene family in opium poppy. *Plant molecular biology*. **20**.4: 749-752, doi: 10.1007/BF00046460
- [16]. NESSLER, C. L., KURZ, W. G. W., PELCHER, L. E., 1990. Isolation and analysis of the major latex protein genes of opium poppy. *Plant molecular biology*. **15**.6: 951-953, doi: 10.1007/BF00039436
- [17]. NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., 2004. *Klinická genetika: Thompson & Thompson: 6. vyd.* Triton. 492 s. ISBN 978-80-7254-475.
- [18]. PAVLOVÁ, L., 2005. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 253 s. ISBN 80-246-0985-1.

- [19]. PROCHÁZKA, S., 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, vyd. 1., 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- [20]. RIRIE, K. M., RASMUSSEN, R. P., WITTEWER, C. T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*. 245.2: 154-160. doi: 10.1006/abio.1996.9916
- [21]. SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology*. 3.3: 217-223. doi: 10.1016/S1369-5266(00)80068-0
- [22]. SCHMITTGEN, T. D., ZAKRAJSEK, B. A., MILLS, A. G., GORN, V., SINGER, M. J., REED, M. W., 2000. Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical biochemistry*. 285.2: 194-204. doi: 10.1006/abio.2000.4753
- [23]. SUN, H., KIM, M., PULLA, R. K., KIM, Y., YANG, D., 2010. Isolation and expression analysis of a novel major latex-like protein (MLP151) gene from *Panax ginseng*. *Molecular biology reports*. 37.5: 2215-2222. doi: 10.1007/s11033-009-9707-z
- [24]. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮZIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno. 194 s. ISBN 80-210-3841-1
- [25]. VALASEK, M. A., REPA, J. J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 29.3: 151-159. doi: 10.1152/advan.00019.2005
- [26]. VON GROLL, U., BERGER, D., ALTMANN, T., 2002. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. *The Plant Cell*. 14.7: 1527-1539. doi 10.1105/tpc.001016
- [27]. WANG, Y., YANG, L., CHEN, X., YE, T., ZHONG, B., LIU, R., WU, Y., CHAN, Z., 2015. Major latex protein-like protein 43 (MLP43) functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*. 67.1: 421-434. doi: 10.1093/jxb/erv477

- [28]. WENDLANDT, T., MOCHE, M., BECHER, D., STÖHR, CH., 2015. A SDD1-like subtilase is exuded by tobacco roots. *Functional plant biology*. 43.2: 141-150. doi: 10.1071/FP15211
- [29]. XIAO, Y., YU, X., CHEN, J., DI, P., CHEN, W., ZHANG, L., 2010. IiSDD1, a gene responsive to autopolyploidy and environmental factors in *Isatis indigotica*. *Molecular biology reports*. 37.2: 987. doi: 10.1007/s11033-009-9776-z
- [30]. YOO, C. Y., PENCE, H. E., JIN, J. B., GOSNEY, M. J., HASEGAWA, P. M., MICKELBART, M. V., 2010 The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. *The Plant Cell*. 22.12: 4128-4141. doi: 10.1105/tpc.110.078691
- [31]. ZHANG, N., LI, R., SHEN, W., JIAO, S., ZHANG, J., XU, W., 2018. Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of major latex protein (MLP) family genes in *Vitis vinifera*. *Molecular genetics and genomics*. 293: 1061-1075. doi: 10.1007/s00438-018-1440-7

## **8.1 Seznam tabulek**

Tab. 4.1 Nastavení programu real-time PCR .....	18
Tab. 5.1 Sekvence a názvy primerů pro gen MLP43 .....	21
Tab. 5.2 Sekvence a názvy primerů pro gen SDD1 .....	21

## 8.2 Seznam obrázků

Obr. 5.1 Elektroforeogram po gradientové PCR u odrůdy Orel .....	22
Obr. 5.2 Elektroforeogram po gradientové PCR u odrůdy Onyx.....	22
Obr. 5.3 Amplifikační křivka pro geny SDD1 a MLP43, zahrnuje obě odrůdy .....	24
Obr. 5.4 Amplifikační křivka pro odrůdy Orel a Onyx, obsahuje oba geny .....	24
Obr. 5.5 Křivka tání pro geny SDD1 a MLP43 u obou odrůd .....	25
Obr. 5.6 Křivka tání pro gen MLP43 u odrůdy Onyx a Orel .....	25
Obr. 5.7 Křivka tání pro gen SDD1 u odrůdy Orel a Onyx .....	26
Obr. 5.8 Elektroforeogram produktů po real-time PCR u genu SDD1 .....	27
Obr. 5.9 Elektroforeogram produktů po real-time PCR u genu MLP43.....	27
Obr. 5.10 Amplifikační křivka pro gen MLP43 u vzorků odrůdy Onyx .....	28
Obr. 5.11 Naměřená koncentrace DNA ve vzorcích.....	29
Obr. 5.12 Elektroforeogram vzorků izolované DNA .....	30

### 8.3 Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
AT	adenin-thymin
ATHK1	histidinová kinasa
bp	párů bází
Ca	vápník
CBF	C-repeat-vázající faktor
cDNA	complementary deoxyribonukleová kyselina
cMLP40	Major latex protein 40
CRT	C-repeat
Ct	cycle treshold, hranice cyklů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRE	dehydration responsive element
DREB	DRE-vázající protein
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FASTA	formát
GC	guanin-cytosin
gMLP15	Major latex protein 15
gMLP22	Major latex protein 22
IgG	imunoglobulin G
JČU	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
LEA	late embryogenesis abundant proteins
MLP	Major latex protein
MLP43	Major latex protein-like 43
mRNA	messengerová RNA
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
ng	nanogram
nm	nanometr
Obr.	Obrázek
PC	pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	pufr



pH	koncentrace oxoniových iontů
PL1	lyzační pufr
pmol	pikomol
PSOM17	primer
PW2	pufr
qPCR	real-time polymerázová řetězová reakce
Rn	signál fluorescence
RNA	ribonukleová kyselina
SDD1	Stomatal density a distribution 1
Tab.	Tabulka
TBE	Tris-borát-EDTA pufr
T <sub>m</sub>	teplota tání primerů
UV	ultrafialové světlo
V	Volt
x g	násobek přetížení
ZF	Zemědělská fakulta
μl	mikrolitr