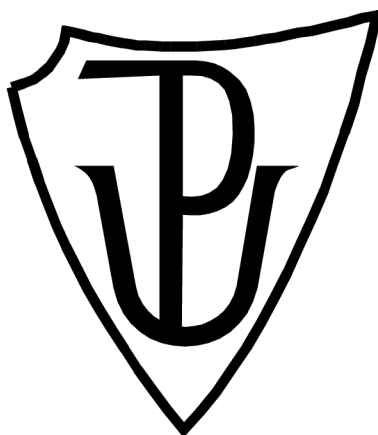


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Příprava a charakterizace mutantů *Arabidopsis thaliana* se
zvýšenou expresí LHCB8 proteinu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Karolína Remešová
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Iva Ilíková, PhD.
Rok: : 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Ivě Ilíkové, Ph.D., za její čas a za odborné vedení. Děkuji také Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D., doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D. a prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D., za rady při zpracování experimentální části. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům podporu a trpělivost. Řešení této bakalářské práce bylo umožněno spoluúčastí na projektu Grantové agentury ČR 21-05497S s názvem „Role proteinu LHCB8 v organizaci a funkci světlosběrného komplexu fotosystému II“.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Remešová
Název práce	Příprava a charakterizace mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> se zvýšenou expresí LHCB8 proteinu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná
Vedoucí práce	Mgr. Iva Ilíková, PhD.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

LHCB8 protein, dříve nazýván LHCB4.3 protein, tvoří v dnešní době jednu z částí superkomplexu fotosystému II, která je stále málo prozkoumaná a jeho funkce není ještě zcela prozkoumaná, avšak předpokládá se, že má roli při fotoprotekci, protože je u většiny rostlin exprimován jen při působení vysokých intenzit světla. V rámci struktury superkomplexu fotosystému II u nahosemenných rostlin má významnou roli v jeho struktuře, protože jak bylo zjištěno většina nahosemenných rostlin má unikátní stavbu superkomplexu fotosystému II, a postrádá například minoritní anténu LHCB6 jak bylo pozorováno u smrku. Proto je cílem této práce vytvoření mutantu *Arabidopsis thaliana* se zvýšenou expresí LHCB8 proteinu a jeho následná charakterizace za normálních i stresových podmínek, aby tento protein mohl být lépe prozkoumán a také jeho vliv na fotosystém II. Jednou z hlavních metod v této práci bylo Gateway klonování, které bylo využito k vytvoření konstruktů pro transformaci *A. thaliana*.

Klíčová slova	LHCB8 protein, Gateway klonování, transformace <i>A. thaliana</i> , fotosystém II
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Karolína Remešová

Title Preparation and characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant lines with overexpression of light-harvesting protein LHCB8

Type of thesis Bachelor

Department Centrum of Region Hana

Supervisor Mgr. Iva Ilíková, PhD

The year of presentation 20024

Abstract

The LHCB8 protein, formerly known as the LHCB4.3 protein, currently constitutes one part of the photosystem II supercomplex, which remains poorly understood, and its function is not yet fully elucidated. However, it is presumed to play a role in photoprotection, as it is expressed in most plants mainly under high light intensities. Within the structure of the photosystem II supercomplex in angiosperms, it plays a significant role, as most angiosperms have a unique photosystem II supercomplex structure, lacking, for example, the minor antenna LHCB6 observed in conifers. Therefore, this study aims to create a mutant of *Arabidopsis thaliana* with increased expression of the LHCB8 protein and subsequently characterize it under normal and stress conditions to better understand this protein and its impact on photosystem II. One of the main methods used in this study was Gateway cloning, which was utilized to create a construct for the transformation of *A. thaliana*.

Keywords LHCB8 protein, Gateway cloning, transformation of *A. thaliana*, photosystem II

Number of pages 59

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Fotosyntéza	2
2.1.1 Oxygenní fotosyntéza	2
2.2 Fotosystém II	4
2.3 LHC rodina proteinů	5
2.2.1 LHCB proteiny	6
2.3.2 LHCB4 protein	8
2.4 LHCB8 protein	9
2.5 Gateway klonování	10
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	12
3.1 Materiály	12
3.1.2 Chemikálie	12
3.1.3 Přístrojové a ostatní vybavení	13
3.1.4 Kity a návody	13
3.1.5 software	14
3.2 Metody	15
3.2.1 Pěstování rostlinného materiálu	15
3.2.2 PCR s Q5 polymerázou	15
3.2.3 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu	17
3.2.4 Purifikace vzorku s DNA	17
3.2.5 Gateway klonování – BP reakce	18
3.2.6 Gateway klonování – LR reakce	18
3.2.7 Transformace <i>E. coli</i>	18
3.2.8 Izolace DNA z <i>E. coli</i>	19
3.2.9 Sangerovo sekvenování	20
3.2.10 Colony PCR	22
3.2.11 Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.2.12 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.2.13 Selektce transformovaných semen	26
3.2.14 Izolace DNA z rostlin <i>A. thaliana</i>	26
3.2.15 ddPCR	28
3.2.16 PEA meter (Plant efficiency analyzer)	30
3.2.17 Měření obsahu chlorofylu	31
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	32
4.1 Příprava rostlin <i>A. thaliana</i> s overexpresí proteinu LHCB8	32
4.1.1. Příprava donorového vektoru pDONRP4-P1R s promotorem CaMV5s	32
4.1.2 Příprava konstruktů pro transformaci <i>A. thaliana</i>	37
4.1.3 Transformace rostlin <i>A. thaliana</i>	44
4.2 Selektce homozygotních linií <i>A. thaliana</i> se zvýšenou expresí LHCB8	45
4.2.1 Selektce transformovaných semen	45
4.2.2 Určení počtu kopií T-DNA u T1 generace linie <i>Atlhcb8</i> a výběr heterozygotů	47
4.2.3 Určení homozygotů v T2 generaci	49
4.3 Charakterizace fenotypu	50
4.4 Charakterizace overexpresních linií za normálních a stresových podmínek	51

4.5 Porovnání genotypů při působení vysoké intenzity záření	53
5 ZÁVĚR	56
6. LITERATURA	57
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59

Cíle práce:

Teoretická část:

1. Vypracování přehledu problematiky o funkci světlosběrné antény LHCB8 ve fotosyntéze se zaměřením na její možnou roli za stresových podmínek

Praktická část:

1. Příprava mutantní linie *Arabidopsis thaliana* se zvýšenou expresí proteinu LHCB8
2. . Základní fyziologická charakterizace těchto linií za optimálních a stresových pěstebních podmínek
3. Analýza naměřených dat a diskuse výsledků

1 ÚVOD

Fotosyntéza je biochemický proces, bez kterého by život na Zemi nemohl existovat, tak jak ho známe. Je to velmi složitý proces, na kterém se podílí mnoho částí, které na sebe navazují a tím utváří proces, který stojí za většinou života na Zemi. Jednou z těchto částí je fotosystém II.

Fotosystém II je klíčovou složkou fotosyntézy a je umístěn, v thylakoidních membránách. Je to supekomples, který je složen z jádra a z světlosběrného komplexu, který obklopuje jádro. Tento světlosběrný komplex je složen ze světlosběrných proteinů, které jsou schopné vázat chlorofyl a díky tomu jsou získávat energii ze slunečního záření.

Mezi tyto proteiny patří také LHCB8 protein, který byl původně nazvaný LHCB4.3, protože byl předpoklad o jeho podobnosti s ostatními izoformami LHCB4 proteinu. Toto bylo však postupně od jeho objevení vyvráceno, a proto byl tento protein přejmenován. Jeho funkce není ještě zcela objasněna, ale spojuje se s fotoinhibicí, protože v krytosemenných rostlinách exprimován více při působení vysoce intenzivního záření, zatímco v klidovém stavu je jeho množství zanedbatelné. Toto však neplatí pro většinu nahosemenných rostlin, protože bylo objeveno že u smrku ztepilého a u dalších nahosemenných rostlin je tento protein exprimován běžně (Grebe et al., 2019) a nejen při působení vysoké intenzity světla jako je tomu u krytosemenných rostlin.

Motivací k této práci je lépe prozkoumat protein LHCB8 a jeho funkci v rámci fotosystému II jak u krytosemenných, tak nahosemenných rostlin. Řešení této bakalářské práce bylo umožněno díky grantu s názvem „Role proteinu LHCB8 v organizaci a funkci světlosběrného komplexu fotosystému II“, který nyní zkoumá protein LHCB8 a tato práce by měla přispět k objasnění jeho funkce vytvořením homozygotních linií *A. thaliana* s overexpresí LHCB8 proteinu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza (FS) je biochemický proces, při kterém dochází k absorpci energie slunečního záření a jeho následnou přeměnu na energii chemické vazby. Opačným procesem fotosyntézy je respirace. Tento základní fyziologický proces je charakteristický pro širokou škálu organismů, včetně některých bakterií, sinic, nezelených a zelených řas a vyšších rostlin.

Fotosyntéza se skládá ze dvou hlavních fází. První fáze, nazývaná světelná nebo primární, je klíčová pro absorpci světelné energie fotosyntetickými pigmenty. Tato energie je pak využita k syntéze ATP a redukovaných forem přenašečů elektronů, jako jsou ferredoxin a NADPH. Součástí této fáze je také uvolňování kyslíku, který je důležitý pro životní prostředí.

Produkty primární fáze, včetně ATP a redukovaných forem, jsou následně využity v druhé fázi fotosyntézy, známé jako sekundární, syntetická nebo temná fáze. V této fázi dochází k fixaci oxidu uhličitého (CO_2) do organických molekul prostřednictvím Calvinova cyklu, což umožňuje tvorbu organických sloučenin.

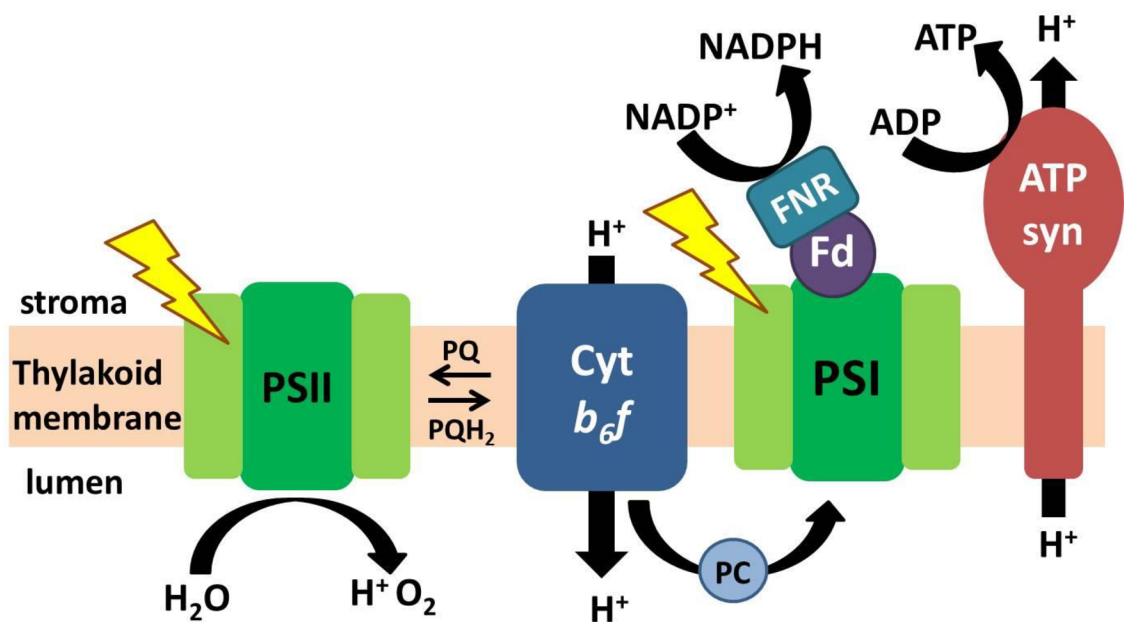
Je obecně přijímáno, že tento proces se vyvinul před více než 3,5 miliardami let. První fotosyntetizující organismy byly pravděpodobně anoxygenní bakterie, které využívaly světlo k produkci energie. Anoxygenní fotosyntéza, která probíhá u některých bakterií a archeobakterií, umožňuje výrobu potravy (cukrů) pomocí světla bez přítomnosti kyslíku. Postupně se vyvinula oxygenní fotosyntéza, která je efektivnější a produkuje více energie. To umožnilo vývoj vyšších organismů, které mohly efektivněji využívat energii ze slunečního světla.

2.1.1 Oxygenní fotosyntéza

Oxygenní fotosyntéza je proces, který se vyskytuje u většiny rostlin, hub a některých bakterií. Tento proces umožňuje těmto organismům vyrábět cukry za pomoci světla, přičemž kyslík se uvolňuje jako produkt a uhlík se dodává ve formě oxidu uhličitého. Tento typ fotosyntézy se vyvinul u předků moderních cyanobakterií a je hlavním producentem kyslíku a organické hmoty na Zemi. Probíhá ve dvou fázích – syntéza a oxidace. Syntéza využívá světelnou energii k rozkladu vody na kyslík a redukci oxidu

uhelnatého na uhlohydráty, jako je glukóza, přičemž vznikají ATP a NADPH. Oxidace zahrnuje reakce k oxidaci NADPH na NADP^+ a tvorbu ATP. Tímto procesem rostliny produkují energii za světla a uvolňují kyslík nezbytný pro život živočichů.

Oxygenní fotosyntéza zahrnuje reakce, které se vyskytují hlavně, ale ne výhradně, v chloroplastech. Tyto organely jsou ohraničeny dvojitou membránou a obsahují thylakoidní membrány, které tvoří síť zploštělých disků nazývaných thylakoidy. Tyto membrány obsahují proteinové komplexy zapojené do světelné fáze fotosyntézy. Thylakoidní membrány oxidují vodu, redukují NADP a syntetizují ATP, což je umožněno multijednotkovými komplexy fotosystém I, fotosystém II, F ATPasa a cytochrom b6f, které utváří elektronový a protonový transportní řetězec (Johnson, 2016). Uspořádání těchto jednotlivých komplexů a jejich podíl na reakcích probíhajících v thylakoidní membráně je zaznačeno na Obr.1.



Obrázek 1. Schéma jednotlivých superkomplexů podílejících se na fotosyntéze v rámci thylakoidové membrány. Znázornění autoprotolýzy vody pomocí fotosystému II. Znázorněn elektronový a protonový řetězec. Převzato z <https://newunderthesunblog.wordpress.com/the-basics/the-light-reactions/photosystem-ii/>

2.2 Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je klíčovou součástí fotosyntetického mechanismu nacházející se v thylakoidní membráně chloroplastů. Jeho složitá struktura zahrnuje několik klíčových prvků.

Jádro PSII se převážně skládá z proteinů D1 a D2, které tvoří reakční centrum, kde probíhají fotochemické reakce. Tyto proteiny jsou podporovány dalšími podjednotkami, jako jsou CP47 a CP43, spolu s kofaktory, včetně chlorofylu a karotenoidů, které zachycují a přenášejí světelnou energii do reakčního centra. V jádře je zasazen komplex kyslíkového vývoje, který je zodpovědný za katalýzu štěpení molekul vody na kyslík, protony a elektrony, proces nezbytný pro udržení aerobního života na Zemi. Přesná uspořádání a interakce těchto složek uvnitř jádra PSII umožňují efektivní přenos energie a přenos elektronů, což vede k produkci molekulárního kyslíku a usnadňuje tok elektronů skrze fotosyntetický řetězec. Okolo reakčního centra se nacházejí anténové komplexy, které obsahují molekuly chlorofylu a karotenoidů. Tyto anténové pigmenty zachytávají fotony světelné energie a směřují je do reakčního centra, což zvyšuje účinnost absorpce světla.

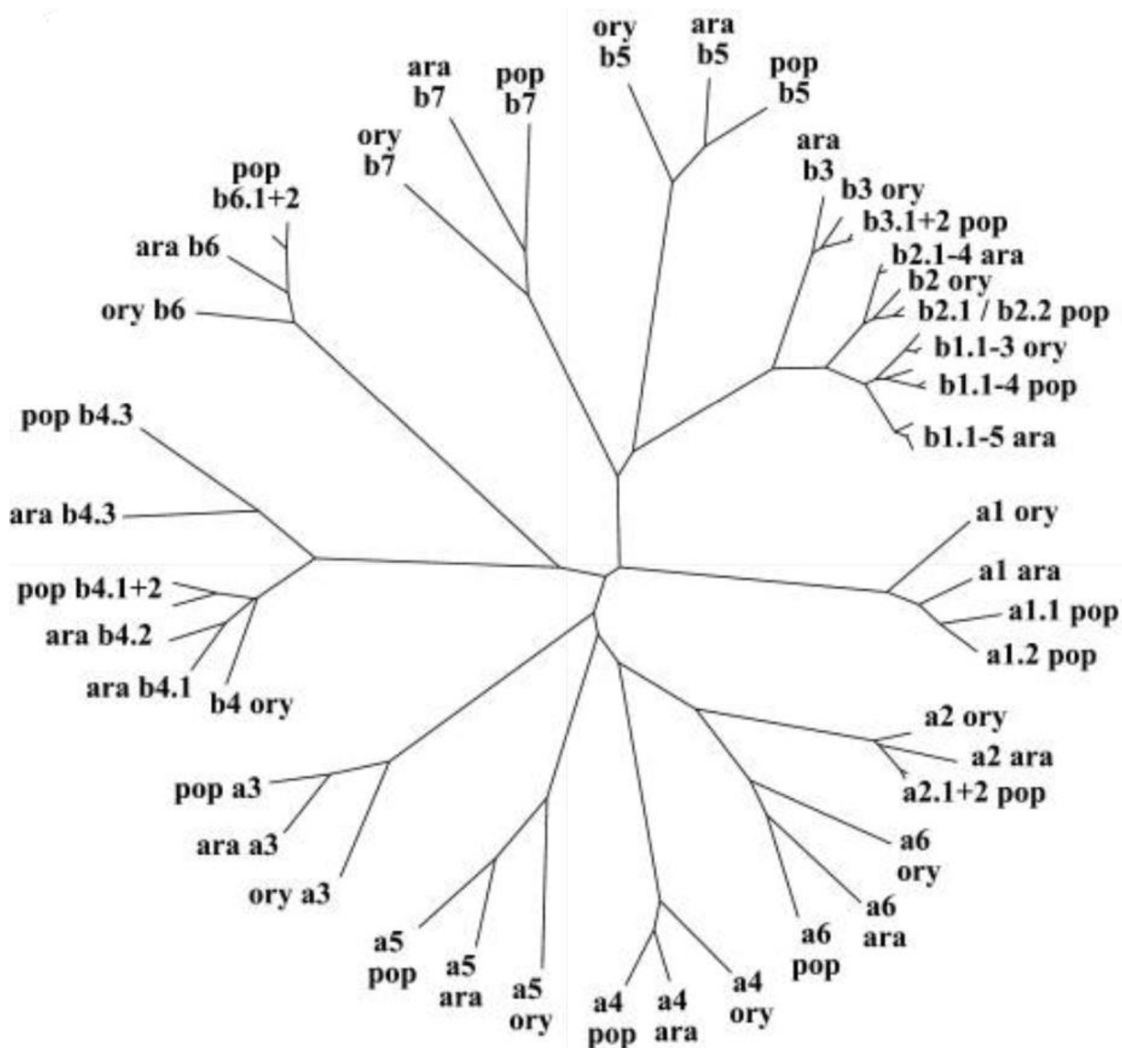
2.3 LHC rodina proteinů

Fotosyntetické organismy se spoléhají na různé způsoby sběru světla, proto se během evoluce fotosyntetických organismů vyvinulo mnoho druhů světlosběrných komplexů, které mají různou strukturu. LHC (light-harvesting complex) rodina proteinů patří do super-rodiny LHC proteinů, kde se mimo jiné také nachází LIL (light-harvesting PsbS (photosystem II sub-unit S) a FCII (ferrochelatase) rodiny (Lan et. al. 2023). LHC proteiny se nacházejí u téměř všech fotosyntetických eukaryotních organismů a je dokázána jejich funkce při sběru světelné energie pro primární fotochemické reakce fotosyntézy a také při fotoprotekci fotosyntetického aparátu.

LHC proteiny jsou typicky tvořeny třemi transmembránovými helixy, které je ukotvují v thylakoidní membráně chloroplastů (Büchel, 2015, Rochaix a Bassi, 2019). Transmembránové helixy jsou uspořádané v konfiguraci, které jim umožňuje navázat pigmentové molekuly, jako jsou chlorofyly a karotenoidy. Vazebné domény LHC proteinů pro příslušné pigmenty obsahují specifické aminokyselinové zbytky, které interagují s kovovými ionty chlorofylových molekul a zajišťují jejich správnou orientaci a stabilitu v rámci proteinového komplexu.

Primární funkcí těchto proteinů je zachycování světelné energie v rámci anténových komplexů a přenos této energie do reakčních center PSI a PSII. Kromě role při získávání světelné energie se také LHC proteiny účastní fotoprotekčních mechanismů.

Nejvýznamnější skupiny proteinů patřící do této rodiny jsou LHCA a LHCB proteiny. Proteiny patřící do těchto dvou skupinky jsou zaznačeny v kladogramu, který je znázorněn na Obr. 2, kdy tento kladogram byl vytvořen a znázorňuje sekvenční podobnosti mezi jednotlivými proteiny vyskytující se v *Arabidopsis thaliana*, topolu a rýži.



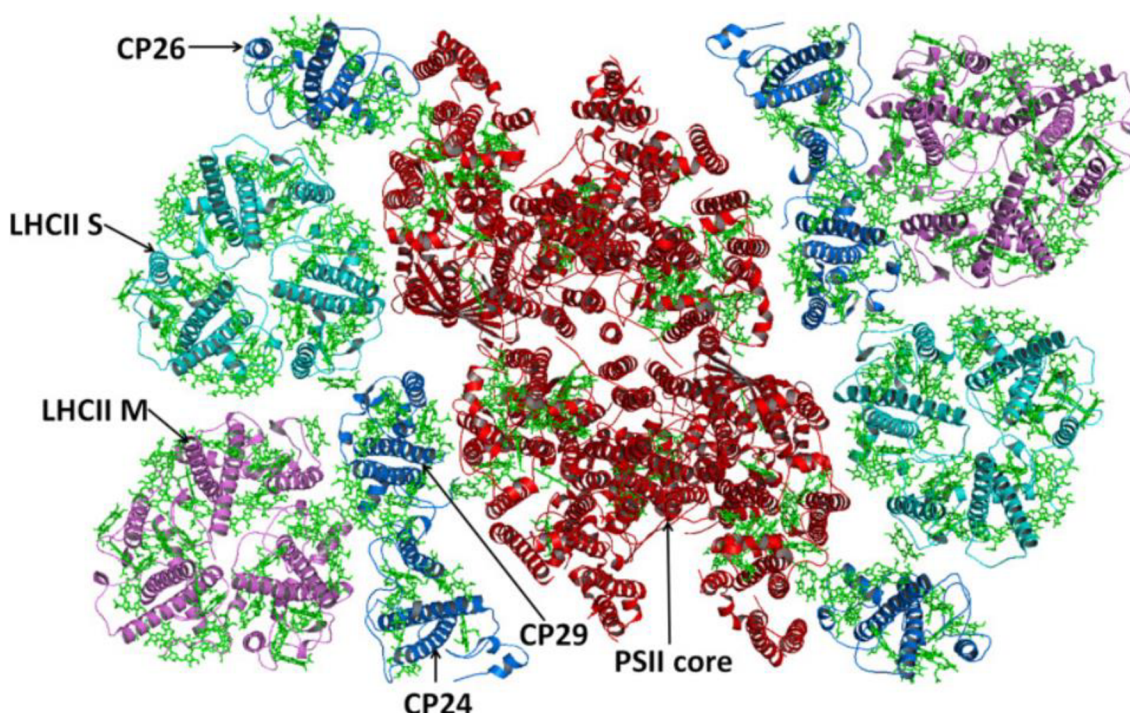
Obrázek 2 Rodina proteinů LHC v *Arabidopsis thaliana* (ara), topolu (pop) a rýži (ory) a jejich vzájemná podobnost v rámci sekvence zaznačena v kladogramu. Jednotlivé proteiny LHCA označeny a1 – a6 a jednotlivé proteiny LHCB označeny b1-b7. Převzato z Klimmek et. al. (2006) a upraveno.

2.2.1 LHCB proteiny

LHCB (light-harvesting chlorophyll a/b binding) proteiny jsou apoproteiny, tvořící světlosběrný komplex u PSII. Tyto proteiny se podílejí na procesech získávání energie ze světla a jejím přenosu u mnoho fotosyntetizujících organismů, včetně rostlin, řas a sinic. V rostlinách jsou proteiny LHCB základní součástí anténových komplexů PSII, kde absorbují světelné záření, díky tomu získají excitační energii a poté tuto energii převádějí do reakčního centra PSII. Tvoří anténové komplexy, které absorbují světelné záření a díky tomu získají excitační energii, kdy poté tuto energii převádějí na jaderný komplex PSII. LHCB proteiny jsou důležité pro růst a vývoj rostliny a také při odpovědi vyšších rostlin na abiotický stres.

V rámci PSII superkomplexu tyto proteiny tvoří vnější světlosběrné antény. Přesněji homo/heterotrimery LHCB1, LHCB2 a LHCB3 tvoří hlavní světlosběrný komplex (LHCII) superkomplexu PSII-LHCII, zatímco monomery LHCB4, LHCB5 a LHCB6 tvoří minoritní (vedlejší) antény superkomplexu PSII-LHCII – CP29, CP26 a CP24 (Jansson, 1994). Největší vyčištěný superkomplex PSII (C2S2M2), jeho struktura je zaznačena na Obr 3., se skládá z dimeru jádra PSII, na něž jsou navázány dvě kopie CP29, CP26 a CP24. Na jádro je silně navázaný LHCII trimer označován jako S trimer. Tento trimer se skládá z LHCB1 a LHCB2 proteinů. Pomocí CP29 je s jádrem spojený další trimer LHCII označován jako M trimer, který se skládá z LHCB1 a LHCB3 proteinu (Xu et. al., 2017).

Rozdíly v přítomnosti a množství jednotlivých LHCB proteinů mezi různými fotosyntetizujícími organismy odrážejí evoluční adaptace na rozmanité podmínky prostředí a selektivní tlaky. Studium těchto rozdílů může poskytnout vhled do molekulárních mechanismů, které jsou základem adaptace v rámci rostlinné říše.



Obrázek 3. Struktura PSII-LHCII superkomplexu se zaznačením pozice LHCII antén, CP29, CP26 a CP24. Dimerní jádro PSII je zobrazeno červeně, vedlejší antény modře, trimery S a M fialově a tyrkosově, chlorofyly jsou zobrazeny zeleně. Převzato z Xu et. al. (2017)

2.3.2 LHCB4 protein

LHCB4 protein tvoří minoritní anténu označenou jako LHCB4 nebo CP29, která v rámci PSII-LHCII superkomplexu spojuje LHCII M-trimer a jádro PSII (zobrazeno na Obr.3). V PSII hraje protein LHCB4 klíčovou roli při optimalizaci procesů sběru světla a přenosu energie. Podílí se na rozšíření absorpčního spektra PSII, což umožňuje efektivní zachycení světelné energie napříč širokým spektrem vlnových délek.

Dále je LHCB4 nezbytný pro mechanismy fotoprotekce uvnitř PSII. Přispívá k regulaci nadbytku excitované energie, což předchází poškození způsobené reaktivními formami kyslíku za podmínek vysokého osvětlení. Prostřednictvím rozptylování nadbytkové energie jako tepla pomocí nefotochemického zhášení LHCB4 pomáhá chránit PSII před fotoinhibicí a oxidačním stresem (Chen et. al., 2018, de Bianchi et. al., 2011)

Původně byly popsány tři isomery tohoto proteinu, a to LHCB4.1, LHCB4.2 a LHCB4.3 v *Arabidopsis thaliana* (Jansson, 1999) kódovány geny *LHCB4.1* (*AT5G01530*), *LHCB4.2* (*AT3G08940*) a *LHCB4.3* (*AT2G40100*) (de Bianchi et. al., 2011). Jednotlivé isoformy proteinu LHCB4 jsou zastoupeny u rostlinných druhů různě, některé mohou u různých rostlinných druhů zcela scházet. V rámci *A. thaliana* bylo zastoupení isoform LHCB4.1 a LHCB4.2 popsáno jako vzájemně rovné při normálních podmínkách a předpokladem je, že jejich funkce je navzájem natolik podobná, že jsou funkčně zaměnitelné (Ilíková et. al., 2021)

Protein LHCB4.3 byl od svého první popsání přejmenován na LHCB8 protein, vzhledem k jeho strukturní odlišnosti od dalších isoform proteinu LHCB4.

2.4 LHCB8 protein

Lhcb8 protein byl dříve označován jako LHCB4.3 protein (Jansson, 1994), což naznačovalo jeho úzkou spojitost s proteinem LHCB4 a s jeho isoformami LHCB4.1 a LHCB4.2. S dalším zkoumáním tohoto proteinu však byly objeveny jeho odlišnosti od ostatních proteinů LHCB4, a proto byl pro tento protein navržen název LHCB8, který by odrážel jeho jedinečnost (Klimmek et. al., 2006).

Při studiu proteinu LHCB8 bylo prokázáno, že tento protein postrádá velkou část C-terminální domény (Albanese et. al., 2019). Původně byl tento protein považován za specifický protein pro krytosemenné rostliny, protože byla jeho přítomnost prokázána jen u rostlinných druhů patřící do řádu Eurosidy I a II (Klimek et. al., 2006), avšak při analýze dalších rostlinných druhů byla prokázána přítomnost tohoto proteinu u řádu hvězdíkotvaré z oddělení krytosemenné, ale také u oddělení nahosemenné, s výjimkou zástupců řádu cykasotvaré (Grebe et. al., 2019).

Za normálních podmínek je LHCB8 protein u krytosemenných rostlin přítomen v minimálním množství, jeho množství se ovšem zvyšuje při stresových podmínkách, přesněji při působení vysoké intenzity záření (Klimmek et. al., 2006). Dále byla popsána možný vliv LHCB8 proteinu na odpověď rostliny na osmotický stres a stres ze sucha (Zhao et. al., 2020). namísto LHCB4

Při analýze PSII u smrku bylo objeveno, že tento se v jeho struktuře nachází LHCB8 namísto LHCB4, a také že postrádá tento superkomplex minoritní antény LHCB6 a LHCB3, což se stalo předmětem dalšího zkoumání LHCB8 proteinu.

2.5 Gateway klonování

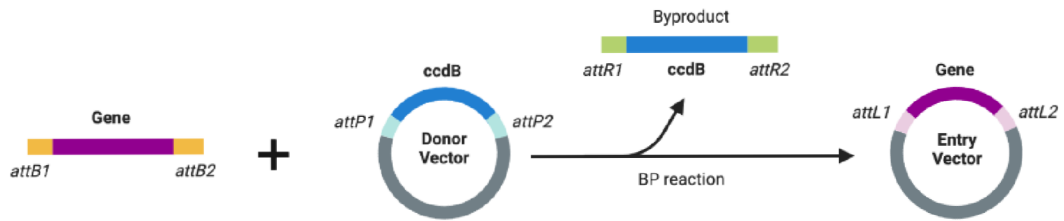
Gateway klonování, výrazně zjednodušila proces přenosu DNA fragmentů mezi vektory ve srovnání s tradičními metodami založenými na restričních enzýmech. Sestává ze dvou hlavních reakcí: BP (nebo BP klonasa) reakce a LR (nebo LR klonasa) reakce, přičemž každá má v klonovacím procesu své specifické účely (Reece-Hoyes a Walhout, 2018a).

BP reakce slouží jako počáteční krok v procesu klonování Gateway a má za cíl přenést DNA fragment zájmu z dárcovského vektoru do vstupního vektoru. Tato reakce je klíčová pro vytvoření vstupního klonu obsahujícího DNA fragment ohraničený specifickými rekombinačními místy známými jako attL místa. K rekombinaci dochází mezi attB místa v dárcovském vektoru a attP místa v vstupním vektoru, katalyzované enzymem BP klonasa. Tato enzymatická výměna umožňuje přesnou integraci DNA fragmentu do vstupního vektoru, čímž se zajistí vytvoření standardizovaného vstupního klonu připraveného k další manipulaci. (Obr. 4.1)

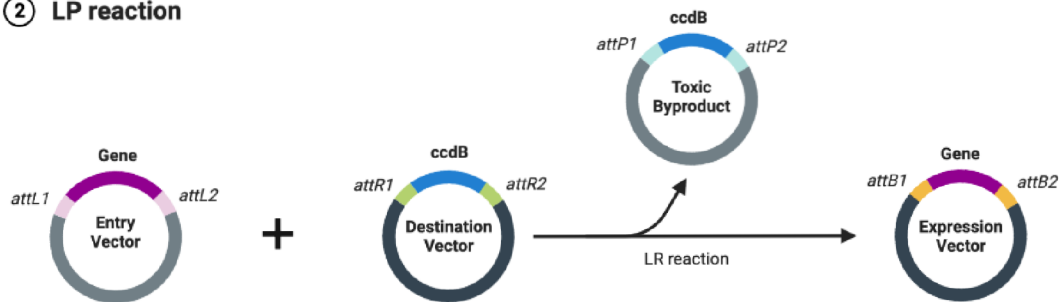
Následující LR reakce dokončuje přenos DNA fragmentu do destinačního vektoru, generuje rekombinantní plazmid vhodný pro následné aplikace. V LR reakci je vstupní klon obsahující DNA fragment ohraničený attL místy smíchán s destinačním vektorem obsahujícím attR místa. Enzym LR klonasa usnadňuje rekombinaci mezi attL místy ve vstupním klonu a attR místy v cílovém vektoru. Tato enzymatická rekombinace vede k přenosu DNA fragmentu z vstupního klonu do destinačního vektoru, čímž vytváří rekombinantní plazmid. LR reakce zajistí přesnou integraci DNA fragmentu do destinačního vektoru (Obr. 4.2).

Gateway klonování je široce využíváno v různých oblastech molekulární biologie díky své efektivitě, všestrannosti a škálovatelnosti. Výzkumníci využívají tuto techniku pro analýzu exprese genů, studium exprese proteinů, analýzu promotorů a generaci fúzních proteinů. Jeho schopnost zjednodušit konstrukci expresních vektorů a rekombinantních DNA molekul ho činí zvláště cenným pro experimenty ve vysokém průtoku a analýzy více genů. S pomocí Gateway klonování mohou výzkumníci manipulovat s DNA fragmenty s přesností a snadností, což výrazně posiluje jejich poznání genetických procesů a biologických systémů.

① BP reaction



② LP reaction



Obrázek 4. Schéma Gateway klonování

1- BP reakce – zakomponování amplifikovaného fragmentu do donorového vektoru za vzniku vstupního vektoru

2 – LR reakce - kombinace vstupního vektoru a destinačního vektoru za vzniku toxického meziproduktu a expresního vektoru

Převzato z <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Biologický materiál

- Rostliny:
 - *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), divoký typ (wild type, WT, ekotyp Col-0)
 - Mutant *A. thaliana kolhcb8*, dodaný školitelem
- Bakterie:
 - *Escherichia coli* (*E.coli*) NEB 5alpha
 - *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) GV3101
- Genetický materiál:
 - pDONRP4-P1 – dodáno školitelem
 - pH7m246W-FAST – dodaný školitelem (podle Shimada et. al. 2010)
 - *pDONR207::AtLHCB* – dodaný školitelem
 - promotor CaMV35s

3.1.2 Chemikálie

- Agarosa (Sigma-Aldrich)
- BigDye (Thermo Fisher Scientific) • Primery (Eurofins Scientific)
- CutSmart pufr (New England Biolabs)
- ddNTPs (Sigma-Aldrich)
- ddPCR supermix (Bio-Rad)
- DMSO (Duchefa)
- DNA Ladder 100-5000 bp (Thermo Fisher Scientific)
- DNA Loading Dye, Blue (6X) (Thermo Fisher Scientific)
- dNTPs (New England Biolabs)
- Ethanol (Merck)
- Ethanol (Merck)
- Ethidium bromid (NeoLab)
- Gentamycin (Merck)
- LB médium
- MfeI restriční enzym (New England Biolabs)
- Olej pro generování droplet (Bio-Rad)
- Primery (Eurofins Scientific)
- Primery (Eurofins Scientific) – jednotlivé primery i jejich sekvence uvedeny u metod
- Proby (Thermo Fisher Scientific)
- Pufr EB (Qiagen)
- Pufr PE (Qiagen)
- Pufr PB (Qiagen)
- Pufr pro izolaci rostlinné DNA (PL1, PC, PW1, PW2, PE) (Macherey-Nagel)
- Q5 DNA polymeráza (New England Biolabs)
- Q5 reakční pufr (New England Biolabs)

- Rifampicin (Merck)
- RNasa A (Macherey-Nagel)
- Sacharosa (Lachner)
- Sekvenační pufr (5X) (Thermo Fisher Scientific)
- Silwet L-77 (ClonTech)
- Spectinomycin (Merck)
- TAE pufr (10X) (Thermo Fisher Scientific)
- TE pufr (Thermo Fisher Scientific)
- YEB medium (Thermo Fisher Scientific)

3.1.3 Přístrojové a ostatní vybavení

- Centrifuga (Labnet International)
- Digitální předvážky (Scaltec instruments GmbH)
- Fluorescenční mikroskop (Olympus)
- Homogenizátor (Qiagen)
- Chlorofylmetr SPAD 502 Plus DL (Konica Minolta)
- Inkubátor (Novus Ferro)
- Kapilární sekvenátor (Thermo Fisher Scientific)
- Lyofilizátor (LabGene)
- NanoDrop® ND 1000 spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- PCR cycler (Bio-Rad)
- Plate Sealer (Bio-Rad)
- QX200 ddPCR systém (Bio-Rad)
- Spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Systém pro horizontální elektroforézu (Thermo Fisher Scientific)
- Termoblok (Thermo Fisher Scientific)
- Třepačka (Eppendorf)
- UV transiluminátor (Syngene International Limited)
- Vodní lázeň (Grant Instruments)

3.1.4 Kity a návody

- PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Floral dip protokol (upraveno podle Clough a Bent (1998))
- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel)
- Qiaquick PCR purification kit (New England Biolabs)
- Manuál pro Digital Droplet PCR (Bio-Rad)
- Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge
- Phire Plant Direct PCR Kit od Thermo Scientifici

3.1.5 software

- Microsoft Excel
- Microsoft PowerPoint (Dotmatics)
- SnapGene
- Software QuantaSoft™ (Bio-Rad)

3.2 Metody

3.2.1 Pěstování rostlinného materiálu

Rostliny *A. thaliana* WT pro transformaci a následně transformované rostliny pro získání homozygotní linie byly pěstovány ve fytotronu při podmínkách 16 h den, kdy teplota byla udržována na 19 °C a intenzita světla byla 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 8 h noc, kdy teplota byla udržována na 18 °C, relativní vlhkost vzduchu byla po celou dobu 65%. Semínka *A. thaliana* byla před samotným zasazením minimálně 24 hod. namočena ve vodě.

Rostliny *A. thaliana* s fenotypem – WT, *kolhcb8*, overexpresní linie *oelhcb8 C* a R, použité pro experiment na pozorování vlivu vysoké intenzity osvětlení na jednotlivé fenotypy *A. thaliana* byly pěstovány při podmínkách 8 h den (22 °C, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a 16 h noc (20 °C). Pro experimenty byly pak použity šesti týdenní rostliny.

Rostliny *A. thaliana* s fenotypem – WT, *oelhcb8*, byly první tři týdny pěstovány při podmínkách 8 h den (22 °C, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a 16 h noc (20 °C). Po třech týdnech byly rozděleny do skupin, kdy jedna skupina zůstávala u původních podmínek (normální podmínky NL), druhá skupina byla vystavena vysokému osvětlení 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a poslední byla vystavena vysokému osvětlení 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a suchu. Po následujících třech týdnech byly rostliny analyzovány.

3.2.2 PCR s Q5 polymerázou

Reakce PCR (Polymerase chain reaction) s Q5 polymerázou byla využita pro amplifikaci promotoru CaMV35s. K provedení byl použit protokol pro PCR s Q5 polymerázou – PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. Pro reakci byly využity dva primery Forward Primer (FP) a Reverse Primer (RP) (Tab. 1), kdy každý měl zásobní koncentraci 100 μM , byl z nich utvořen roztok, který obsahoval 1 díl FP, 1 díl RP a 2 díly destilované vody, o výsledné koncentraci 25 μM , která byl přidán do reakce. Jako templát byla využita pDNA. Reakce probíhala v objemu 25 μl a jednotlivé složky této reakce jsou uvedeny v Tab. 2. Podmínky pro průběh PCR, kdy teploty a délka jednotlivých kroků, byly uzpůsobeny vybraným primerům pro reakci a délce templátu, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 1. Primery použité k PCR s Q5 polymerázou

Primer	Sekvence
attB_CaMV35s_RP	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGTAGTCCC CCGTGTTCTCTCC
attB_CaMV35s_FP	GGGGACAACCTTGTATAGAAAAGTTGTACATG GAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACC

Tabulka 2. Složky reakce PCR s Q5 polymerázou a jejich objem v reakci (převzato a upraveno dle použitého protokolu)

Složka reakce	Objem složek [μl]
5x Q5 reakčního pufru	5
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerasa	0,25
dNTPs (10 mM)	0,5
Templátová DNA	1
Směs primerů (25 μM)	0,5
Destilovaná voda	17,75

Tabulka 3. Jednotlivé kroky PCR s Q5 polymerázou, jejich délka trvání a počet opakování (převzato a upraveno dle použitého protokolu)

Teplota	Doba	Opakování
98 °C	30 s	1x
98 °C	10 s	
72 °C	30 s	34x
72 °C	1 min	
72 °C	2 min	1x
4 °C	∞	1x

3.2.3 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu

Agarosový gel o koncentraci agarosy 1,2% byl připraven rozpuštěním 0,6 g agarosy v 50 ml 0,5x TBE pufru pomocí přivedení roztoku k bodu varu. Následně byl roztok s agarosou, po krátkém zchlazení, nalit do horizontální elektroforetické vaničky a do roztoku byl umístěn plastový hřebínek k vytvoření jamek pro nanesení vzorku. Po ztuhnutí roztoku v gel byl plastový hřebínek opatrně vytáhnout.

Elektroforéza byla využita pro vyhodnocení úspěšnosti PCR reakce a pro analýzu výsledků. Elektroforéza probíhala po dobu 60 minut při 90 V a 200 A. Pro určení velikosti produktu byl použit GeneRuler™ Express DNA Ladder, který se dělí na pásy o definované velikosti. Po konci elektroforézy byl gel obarven v ethidium bromid po dobu 15 minut. Po obarvení byl gel odfočen v UV transiluminátoru (400 ms).

3.2.4 Purifikace vzorku s DNA

K purifikaci produktu PCR byl použit QiAquick PCR purification Kit Protocol. Všechny odstředovací kroky byly provedeny při 17 900 xg (13000 rpm) ve stolní centrifuzě při pokojové teplotě.

K PCR vzorku byl přidán fosfátový pufr (PB pufr) v poměru 1:5 (1 díl vzorku a 5 dílů pufru) a roztok byl promíchán. Do sběrné zkumavky byla umístěna spinkolona QiAquick (dále již jen kolona). Na kolonu byl napipetován vzorek a kolona byla centrifugována po dobu 30-60 s.

Po centrifugaci byl supernatant znehodnocen a kolona byla vrácena do stejné sběrné zkumavky. Na kolonu bylo napipetováno 0,75 ml promývacího pufru (PE pufr) a následně proběhla centrifugace 30-60 s. Supernatant byl znehodnocen, kolona byla vrácena do původní sběrné zkumavky a následovala centrifugace po dobu 60 s.

Spinkolona byla po centrifugaci přemístěna do nové 1,5 ml sběrné zkumavky. Na spinkolonu bylo napipetováno 50 µl pufr EB a následovala centrifugace po dobu 60 s.

U přečištěné DNA byla změřena její koncentrace pomocí NanoDrop spektrofotometru.

3.2.5 Gateway klonování – BP reakce

BP reakce proběhla v objemu 10 μ l. Pro proběhnutí BP reakce bylo potřeba do mikrozkušavky namíchat CaMV35s promotor s attB konci, aby jeho látkové množství bylo 50 fmol (vzorec pro přepočet fmol na ng uveden níže), 1 μ l pDONR vektoru o koncentraci 150 ng/l, tyto dvě složky se následně doplnily do 8 μ l TE pufr (Tris-EDTA pufr) o pH 8,0 a k vzniklému roztoku byly přidány 2 μ l BP klonasa enzymový mix. Výsledný reakční roztok byl následně promíchán pomocí vortexu po dobu 2x2s.

$$ng = (fmol)(N)(660 \frac{fg}{fmol})(\frac{1}{10^6} \frac{ng}{fg})$$

Roztok byl ponechán k inkubaci po dobu minimálně 1 hodiny při pokojové teplotě (25°C). Po uplynutí této doby byl k reakci přidán 1 μ l proteinasy K. Následně byla reakce inkubována po dobu 10 minut (min) při 37°C pro zastavení reakce.

3.2.6 Gateway klonování – LR reakce

Do mikrozkušavky byly namíhány donorové vektory *pDONR::CaMV35s* a *pDONR207::ATlhcb8* (10 fmol), destinační vektor pH7m246W-FAST o (20 fmol) (vzorec pro přepočet fmolů na ng uveden níže), tento roztok byl doplněn do 8 μ l TE pufr (pH 8,0) a nakonec byly přidány 2 μ l LR klonasy. Vzniklý roztok byl následně promíchán pomocí vortexu po dobu 2x2s.

$$ng = (fmol)(N)(660 \frac{fg}{fmol})(\frac{1}{10^6} \frac{ng}{fg})$$

Následně byl roztok inkubován přes noc při pokojové teplotě (25°C). Po inkubaci byl do roztoku přidán 1 μ l proteinkinasy a poté byl roztok inkubován 10 min při 37°C pro zastavení reakce.

3.2.7 Transformace *E. coli*

Transformace bakterií *E. coli* proběhla pomocí metody heatshock. Kompetentní bakterie byly nechány k roztátí na ledu po dobu 20–30 min. Poté k nim byla napipetována příslušná DNA pro transformaci. Následně byla směs ponechána k inkubaci na ledě po dobu 20 min. Po uplynutí inkubace na ledě byla směs přesunuta do termobloku vyhřátého na 42°C, kde byla ponechána po dobu 30 s. Poté byla přenesena zpět na led, kde byla 2 minuty ponechána. Ke směsi bylo přidáno tekuté LB médium a poté byla celá směs dána na třepačku, kde byla ponechána 1 hod při 37°C.

Bakterie *E. coli*, pro další experimenty, byly naočkovány na pevné LB médium s přídatkem antibiotika (spektinomycin), poté byly inkubovány přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo z vyrostlých kolonií na médiu vybráno 10–20 izolovaných kolonií, které byly následně přečárkovány na novou misku s LB médium. A přečárkované kolonie byly poté ponechány přes noc na inkubaci v inkubátoru při teplotě 37°C.

3.2.8 Izolace DNA z *E. coli*

Pro izolaci plazmidů z *E. coli* byl využit kit – Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge, a k němu příslušný protokol. Tento protokol je navrhnut pro izolaci až 20 µg „high-copy“ plasmidové DNA z 1-5 ml jednodenní kultury *E. coli* v LB mediu. Všechny kroky protokolu by měly být prováděny za pokojové teploty. Protokol byl upraven pro menší vstupní objem.

Před samotným začátkem postupu z protokolu bylo potřeba připravení jednodenní kulturu *E. coli*. Z Petriho misek s přečárkovanými koloniemi *E. coli* byly kolonie přeneseny pomocí pipetové špičky do zkumavky s 5 ml tekutého LB média s 5 µl spektinomycinu. Poté byla zkumavka nechána na třepačce při 37 °C k inkubaci přes noc. Následující den, bylo médium rozděleno do mikrozskumavek po 2ml a pomocí centrifugace ve stolní centrifuze po dobu 3 min za pokojové teploty při >8000 rpm byly z každé mikrozskumavky získané bakterie *E. coli* pro izolaci plazmidů. Buňky *E. coli* byly obsaženy v peletu, supernatant byl znehodnocen.

Bakteriální buňky byly rozsuspendovány v 125 µl pufru P1 a byly přeneseny do mikrocentrifugační zkumavky. Poté bylo přidáno 125 µl pufru P2 a směs byla promíchána otočením zkumavky 4-6krát. Následně bylo přidáno 175 µl pufru N3, směs byla následně okamžitě promíchána pomocí otočení zkumavky 4-6krát. Zkumavka byla centrifugována po dobu 5 min při 17 900 xg, po centrifugaci se utvořil bílý pelet. 800 µl supernatantu po centrifugaci bylo napipetováno na QIAprep 2.0 spinkolonu (dále jen kolona), ta byla poté centrifugována 30–60 s. Průtok byl poté odlit a kolona byla promyta 0,5 ml pufru PB a centrifugována po dobu 30–60 s. Průtok byl poté odlit. Kolona byla promyta 0,75 ml PE pufru a centrifugována po dobu 30–60 s. Průtok byl odlit a kolona byla poté opět centrifugována po dobu 1 min. Kolona byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Na kolonu byl napipetováno 50 µl pufr

EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5). Zkumavka i se spinkolonou byla ponechána 1 min stát a následně byla centrifugována po dobu 1 min.

U získané DNA byla změřena její koncentrace pomocí NanoDrop spektrofotometru.

3.2.9 Sangerovo sekvenování

K ověření správnosti sekvence části konstruktů vložených do bakterií *E. coli* bylo využito automatického Sangerova sekvenování s PCR. Automatické Sangerovo sekvenování s PCR, zefektivňuje proces sekvenování DNA kombinací efektivity PCR amplifikace a přesnosti Sangerova sekvenování. Nejprve se malé množství vzorku DNA amplifikuje pomocí PCR k získání dostatečného množství materiálu pro sekvenování. Po amplifikaci se k cílové DNA vážou sekvenční primery a provádí se reakce cyklického sekvenování. Tato reakce zahrnuje DNA polymerázu, standardní dNTPs a fluorescenčně značené ddNTPs, což vede k vzniku terminovaným DNA fragmentům různých délek. Tyto fragmenty jsou separovány podle velikosti pomocí kapilární elektroforézy, přičemž laserem indukovaná fluorescence umožňuje přesné určení velikosti a identifikaci fragmentů. Výsledné elektroferogramy jsou analyzovány pomocí bioinformatického softwaru k určení sekvence DNA. Jedna sekvenační reakce vždy proběhla v objemu 10 µl. Sangerova sekvenace byla provedena dvakrát.

(1) Sangerova sekvenace byla použita k ověření správnosti donorového vektoru pDONRP4-P1R s promotorem CaMV35s, který byl transformován do bakterií *E. coli*. Sekvenovány byly čtyři plazmidy izolované z transformovaných bakterií *E. coli*. K sekvenaci byly využity čtyři primery (Tab. 4), které byly zvoleny tak aby vznikl dostatečný překryv mezi jednotlivými vytvořenými fragmenty.

Každý plazmid byl sekvenován ze čtyřech plazmidů, proto bylo celkem provedeno 16 reakcí. Každá reakce probíhala v objemu 10 µl. Složky jedné reakce jsou uvedeny v Tab. 5 a podmínky PCR (tvorba fragmentů) jsou uvedeny v Tab. 6..

(2) Po druhé bylo Sangerovo sekvenování využito k ověření *pH7m246W-FAST::CaMV35s::Atlhcb8* vloženého do plasmidu *E. coli*. Tento finální konstrukt musel být ověřen před transformací *A. tumefaciens* a následnou transformací *A. thaliana*. Samotný postup se od postupu uvedeného výše lišil pouze v použitých primerech. Primery použité pro tyto sekvenační reakce jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 4. Seznam primerů a jejich sekvence použité pro sekvenaci plazmidů izolovaných z *E. coli*

Primer	Sekvence
M13fp	GTAAAACGACGGCCAG
M13rp	GGAAACAGCTATGACCAT
CaMV35s_seq_FP1	GACGTAAGGGATGACGCACA
CaMV35s_seq_RP1	GGGTCCATCTTTGGGACCAC

Tab. 5. Složky pro jednu sekvenační reakci a jejich příslušný objem

Složka reakce	Objem složek [μl]
Sekvenační pufr	1,5
Big dye	0,5
Příslušný primer (10 μM)	1
Příslušný plasmid (60 ng·l⁻¹)	1
Destilovaná voda	5,5

Tab. 6. Parametry PCR použité pro vytvoření fragmentů pro sekvenaci

Teplota	Doba	Opakování
98 °C	5 min	1x
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	59x
60 °C	4 min	
4 °C	∞	1x

Tab. 7 Seznam primerů a jejich sekvence použité pro sekvenaci plazmidů izolovaných z E. coli

Primer	Sekvence
Hyg_FP1	TCCTACATCGAAGCTGAAAG
AT8_seq_FP1	GTAAAACGACGGCCAG
AT8_seq_FP2	CTGTAAGAGCCTCTACGGCG
CaMV35s_seq_FP1	GACGTAAGGGATGACGCACA
CaMV35s_seq_RP1	GGGTCCATCTTTGGGACCAC
AT8_seq_RP1	TTGACACGTGGACAGTCTCG
AT8_seq_RP2	TCGGTTGGATTCGTAATAATTGAGT
AT43seq_FP1	GGATCGATGATCGGAGACCG
Prom4.1_seq_RP1	AGGCATGCGAGAGCTTGAG

3.2.10 Colony PCR

Colony PCR je metoda, která se většinou používá k ověření transformace organismů, protože je to metoda rychlého zobrazení přítomnosti požadovaného konstruktů v transformovaném organismu. Pro provedení colony PCR byl využíván Phire Plant Direct PCR Kit od Thermo Scientific a k němu příslušný protokol. Jednotlivé složky reakce a jejich objem pro jednu reakci v 10 μ l jsou uvedeny v Tab. 8.

Colony PCR probíhá v několika krocích, jejichž parametry jsou popsány v Tab.9. Teplota u hybridizace není určena, protože tato teplota se odvíjí od zvolených primerů, proto se může v jednotlivých postupech lišit, jednotlivé teploty pro primery je možné určit pomocí The NEB Tm Calculator. Doba u extenze se odvíjí od délky templátu, obecně je určeno, že pokud má templát velikost pod 1kb (kilobáze) trvá extenze 20 s a poté se na každou další kilobázi přidává 20 s.

Tab 8. Jednotlivé složky pro reakci na PCR colony a jejich objem převzato z protokolu pro Phire Plant Direct PCR Master Mix od Thermo Scientific

Složka reakce	Objem složek [μl]
2x Phire Plant Direct PCR Master Mix	5
Směs primerů (25 μM)	0,2
Zkoumaný vzorek DNA	0,25
Destilovaná voda	4,55

Tab. 9. Jednotlivé kroky a jejich obecné parametry pro colony PCR převzato z protokolu pro Phire Plant Direct PCR Master Mix od Thermo Scientific

Kroky PCR cyklu	Teplota	Doba	Opakování
Počáteční denaturace	98 °C	5 min	1x
Denaturace	98 °C	5 s	
Hybridizace (dosednutí primerů)	X °C	5 s	35-40x
Extenze	72 °C	20 s ≤ 1 kb 20 s/kb	
Finální extenze	72 °C	1 min	1x
Ukončení reakce a uchování	4 °C	∞	1x

Tato metoda byla využita v několika případech.

(1) Ověření přítomnosti promotoru CaMV35s v plasmidu transformovaných bakterií *E.coli* proběhlo pomocí primerů M13F a M13R uvedených v Tab. 10. jejich teplota pro hybridizaci byla 55 °C a doba extenze byla 30 s.

(2) Ověření konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* transformovaného do *E. coli* proběhlo pomocí primerů prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 (Tab. 11.) , jejich teplota pro hybridizaci byla 65°C a délka extenze byla 40 s.

Tab. 10. Primery použity pro PCR colony pro ověření přítomnosti promotoru CaMV35s v plasmidu transformovaných bakterií *E. coli* obsahující konstrukt *pDONR::CaMV35s*

Primer	Sekvence
M13fp	GTAAAACGACGGCCAG
M13rp	GGAAACAGCTATGACCAT

Tab. 11.. Primery použity pro PCR colony pro konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* transformovaného do *E. coli*

Primer	Sekvence
prom4.1seq_RP1	AGGCATGCGAGAGCTTGAG
AT8_seq_FP1	TCCACCTAGGCGAACCAAAC

(3) Ověření konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* transformovaného do *E. coli* proběhlo pomocí primerů *CaMV35s_seq_FP1* a *AT8_seq_FP1* (Tab. 12.) , jejich teplota pro hybridizaci byla 65°C a délka extenze byla 40 s.

(4) Ověření transformace *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* do *A. tumefaciens* *prom4.1seq_RP1* a *AT8_seq_FP1* (Tab. 11) , jejich teplota pro hybridizaci byla 65°C a délka extenze byla 40 s.

(5) Ověření T-plasmidu u transformovaných rostlin proběhlo pomocí primerů *prom4.1seq_RP1* a *AT8_seq_FP1* (Tab. 11.), jejich teplota pro hybridizaci byla 65°C a délka extenze byla 40 s. Jako vzorek byla použita malá část listu transformovaných rostlin.

Tabulka 12. Primery použity pro PCR colony pro konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* transformovaného do *E. coli*

Primer	Sekvence
CaMV35s_seq_FP1	GACGTAAGGGATGACGCACA
AT8_seq_FP1	TCCACCTAGGCGAACCAAAC

3.2.11 Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Před samotnou transformací bylo nutné si připravit do nádoby tekutý dusík, do další nádoby led a nechat rozehrát termoblok na 37°C pro transformaci *A. tumefaciens* pomocí metody freeze-thaw. Také bylo nutné si připravit minimálně dvě misky s médiem YEB s obsahem antibiotik rifampicin, gentamycin, spektinomycin.

Kompetentní buňky *A. tumefaciens* GV3101 pro transformaci, skladovány při teplotě -80°C, byly dány na led a na ně bylo napipetováno 7,1 μl · 1-1,5 μg -1 konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8*. Poté byly buňky nechány na ledu do skoro úplného roztátí. Buňky i s napipetovaným plazmidem byly ponořeny na 30s do tekutého dusíku, poté dány na led a co nejrychleji přesunuty do termobloku (37°C), kde byly ponechány po dobu 5 min. Po uplynutí této doby byly buňky opět přeneseny na led, kde byly několik minut ponechány a následně k nim bylo připipetováno 900 μl YEB média. Celá směs poté byla umístěna na 4 hod na třepačku (28°C, 220–250 rpm). Celá směs byla následně centrifugována po dobu 2 min při 8000 xg. Načež bylo odebráno 900 μl supernatantu, a pelet byl rozsuspendován ve zbytku supernatantu a následně byla směs rozdělena v poměru 1:4 na dvě misky s pevným médiem YEB s obsahem antibiotik – gentamycin, rifampicin, spektinomycin. Misky byly nechány k inkubaci při teplotě 28°C po dobu 2-3 dní.

3.2.12 Transformace *Arabidopsis thaliana*

Pro transformaci rostlin byla využita metoda floral dip neboli metoda namáčení květů, provedena podle protokolu upraveného podle Clough a Bent (1998). Pro transformaci byly použity bakterie *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8*. První den bylo do zkumavky připraveno 5 ml tekutého YEB média s antibiotiky spectinomycin, gentamycin, rifampicin, do tohoto média byla naočkována kultura *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8*. Kultura v médiu byla inkubována na třepačce přes noc při 28 °C a 225 rpm.

Následující den byla bakteriální suspenze naředěna tak, že 1 ml původní bakteriální suspenze byl přenesen do 100 ml čerstvého YEB média s antibiotiky spectinomycin, gentamycin, rifampicin. Naředěná bakteriální suspenze byla opět ponechána k inkubaci přes noc na třepačce při 28 °C a 225 rpm.

V pořadí třetí den byly narostlé bakterie *A. tumefaciens* stočeny po dobu 20 min při 4 °C a 4500 rpm. Supernatant byl znehodnocen a pelet byl rozsuspendován v 5% sacharóze, tak aby OD₆₀₀ (optická hustota při vlnové délce 600 nm) dosahovalo hodnoty 0,8. Následně byl k suspenzi přidán acetosyringon do výsledné koncentrace 200 μmol·l⁻¹ pro urychlení přenosu T-DNA a smáčidlo Silwet L-77 do výsledné koncentrace 0,05 %. Poté proběhlo samotné namáčení květů v připravené suspenzi, které trvalo přibližně 3 s. Samotné rostliny *A. thaliana* byly předpřipraveny tak, že z nich byly odstraněny již vytvořené šesule a starší odkvétající květy, aby se zlepšil výsledek transformace. Po namáčení květů byly rostliny zabaleny do igelitových sáčků, aby se udržovala vlhkost. Do sáčků byly poté udělány díry, aby se zajistila výměna plynů, a takto zabalené rostliny byly ponechány ve tmě po dobu 24 hod. Poté z nich byly sáčky odstraněny a rostliny byly dále pěstovány ve fytotronu při podmínkách stejných jako před transformací do doby, než jim dozrály semena. Po dozrání byla semena sklizena a připravena pro následující selekci.

3.2.13 Selekcce transformovaných semen

Semena byla selektována pomocí fluorescenční lupy. Selekcce pomocí fluorescenční lupy mohla proběhnout díky selekčnímu markeru FAST (fluorescence accumulating seed technology), který byl součástí kazety T-DNA vložené do rostlin.

Metoda FAST je metoda vyvinuta pro identifikaci transformovaných semen v jejich fázi dormance. Je to nedestruktivní metoda. Marker FAST obsahoval v tomto případě gen kódující GFP (green fluorescent protein) a je pod kontrolou přirozeného promotoru *AtOLE1pro*, tudíž byl použit konstrukt OLE1-GFP podle Shimada et al., 2010. Díky tomu bylo možné selektovat semena pod fluorescenční lampou.

V případě výběru semen bylo pohlíženo na intenzitu fluorescenčního signálu, jejíž míra indikovala počet insertů v transgenní rostlině. Vybraná semena byla dále zasazena a pěstována ve fytotronu za stejných podmínek jako jeho rodič.

3.2.14 Izolace DNA z rostlin *A. thaliana*

Izolace DNA z rostlin byla provedena pomocí NucleoSpin Plant II kitu. Před samotným použitím příslušného kitu, byly listy (2 středně velké listy) odebrány z transformovaných rostlin a následně lyofilizovány. Samotný proces lyofilizace probíhal přibližně 12 hod. Následně byly k lyofilizovaným listům přidány skleněné

kuličky a listy byly pomocí nich homogenizovány na homogenizátoru a to při 4 otáčkách/min po dobu 4 minut.

Všechny odstředivací kroky byly provedeny při 11.000 xg

Do mikrozkušavek s rozmělněným rostlinným materiálem bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru PL1 a mikrozkušavky byly důkladně promíchány na vortexu. Následně bylo na dno každé zkumavky přidáno 10 μ l Rnasy A a obsah byl opět promíchán. Vzorky byly následně vloženy do vodní lázně zahřáté na 65°C, kde byly ponechány 20 min, kdy v polovině této doby byly promíchány. Spolu se vzorky byl do vodní lázně vložen i eluční pufr PE, aby se zahřál na 65 °C. Tímto byla provedena lýze buněk.

V dalším kroku byly fialově označené filtry z kitu vloženy do mikrozkušavek o objemu 2 ml bez víček. Tyto filtry byly použity pro přečištění směsi získané v předchozím kroku, kdy bylo 400 μ l směsi napipetováno na filtr, a následně proběhla centrifugace podobu 2 min. V mikrozkušavce se po centrifugaci nacházel zelený filtrát a samotný fialový filtr byl vyjmut.

Filtrát byl přelit do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 450 μ l vazebného pufru (PC), obsah mikrozkušavky byl následně promíchán pomocí vortexu.

Do čistých mikrozkušavek bez víčka jsou byly křemičitanové filtry se zeleným označením. Na tyto křemičitanové filtry se naváže DNA ze vzorků připravených pomocí kroků výše. Na zelený filtr je napipetováno 700 μ l vzorku a mikrozkušavky s filtry a vzorky se následně nechají stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby jsou mikrozkušavky centrifugovány po dobu 1 min. Filtrát je vylit a filtr s navázanou DNA je poté navrácen do původní mikrozkušavky.

Na filtr bylo poté nanášeno pomocí pipety 400 μ l promývacího pufru PW1 a poté je mikrozkušavka s filtrem centrifugována po dobu 1 min. Poté byl filtrát vylit a na filtr bylo pipetováno 700 μ l promývacího pufru PW2 a poté je mikrozkušavka s filtrem centrifugována po dobu 1 min. Filtrát byl opět vylit a na filtr bylo pipetováno 200 μ l promývacího pufru PW2, a nakonec byla mikrozkušavka s filtrem centrifugována po dobu 2 min.

Filtr byl přesunut do 1,5 ml mikrozkušavky s ustříhlé víčko a na filtr bylo napipetováno 50 μ l pufru PE, který byl zahřátý na 65 °C a zkumavka s filtrem byla

nechána ve vodní lázni (65°C) po dobu 5 minut. Následně je zkumavka centrifugována po dobu 1 min. A celý tento krok je zopakován.

Po izolaci je koncentrace DNA stanovena pomocí NanoDrop a poté uchovávána při -20°C.

3.2.15 ddPCR

Metoda ddPCR (Droplet digital polymerase chain reaction) byla použita pro zjištění počtu kopií T-DNA v jednotlivých generacích transformovaných, díky čemuž bylo možné získat homozygotní linii. Tato metoda se skládá z několika kroků. Nejdříve je důležitá příprava vzorku, která se sestává z štěpení DNA pomocí MfeI a namíchání složek vzorku, poté je nutná generace droplet, následně probíhá PCR, a nakonec analýza vzorku.

Příprava vzorku pro ddPCR

Štěpení DNA jednotlivých vzorků probíhá v jamkové destičce v objemu 10 μl . V jedné jamce je vzorek DNA naředěný vodou do objemu 8 μl , tak aby v reakci bylo 200 ng DNA. K takto naředěné DNA se přidá 1 μl Cutsmart 10x a 1 μl MfeI o koncentraci 2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (MfeI se ředí pomocí Cutsmart 1x). Vzorky jsou poté po dobu 60 min vystaveny teplotě 37°C. Po uplynutí této doby je do každé jamky přidáno 90 μl vody, čímž je DNA ve vzorku naředěná na 2ng· μl^{-1} . Pro přípravu vzorku pro ddPCR jsou potřeba 2 μl naštěpené a naředěné DNA.

Reakce probíhá v 20 μl , je však potřeba namíchat minimálně 21 μl , aby se při přepipetování nenabrali bublinky. Jednotlivé složky jedné reakce jsou uvedeny v Tab. 13. Primery pro referenci a primery pro target jsou uvedeny v Tab. 14. Reakce se pipetují do jamkové destičky pro PCR, kdy všechny komponenty reakce se nejdříve smíchají a DNA se přidává nakonec.

Tab. 13. Jednotlivé složky reakce pro ddPCR a jejich objemy

Složka reakce	Objem složek [μl]
ddPCR supermix	10
Primery pro referenci (každý 25μM)	0,36
Primery pro target (každý 25μM)	0,36
Probe REF	0,5
Probe TARGET	0,5
Destilovaná voda	7,28
DNA	2

Generování droplet

Generování droplet proběhlo pomocí QX200 Generátor droplet. Do prostřední řady DG8TM kazety bylo napipetováno 20 μl připravené reakce, kdy bylo nutné zkontrolovat zda při přepipetování nevznikly bubliny a případně je odstranit, a do spodní řady této kazety bylo napipetováno 60 μl oleje pro generování droplet. Kazeta byla následně zatáhnuta gumičkou a poté byla vložena do QX200 Generátoru droplet. Droplety jsou vygenerovány v horní řadě destičky (přibližně 20000 droplet/vzorek).

PCR

Po vygenerování droplet následuje PCR. Do jamkové destičky pro PCR bylo napipetováno vždy 40 μl vzorku s vygenerovanými droplety. Pipetování droplet musí probíhat velmi pomalu – nabírání i vypouštění, aby nedošlo k porušení vygenerovaných droplet. Destička se vzorky je následně zatavena pomocí fólie za použití Bio-Rad PX1TM PCR Plate Sealer. Poté byla destička dána do PCR thermocycleru. Parametry PCR jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 14 Parametry PCR pro amplifikaci vzorku droplet

Teplota *	Doba	Opakování
98 °C	10 min	1x
94 °C	30 s	39x
60 °C	1 min	
4 °C	∞	1x

*Ramp rate = 2°C/s

Výsledná analýza vzorku droplet

Analýza vzorku droplet proběhla pomocí přístroje QX200 Droplet Reader a nastavení experimentu proběhlo pomocí programu QuantaSoft™. Před samotným použitím je přístroj zkontrolován, zda je připraven k použití. Po spuštění programu QuantaSoft je zvolen experiment CNV2 (copy number variation se 2 probami), následně byl zvolen supermix – ddPCR Supermix for Probes., poté target a reference. Target sekvence byla měřena v prvním kanálu, kde byla měřena fluorescence sondy FAM, jenž je součástí TAV prvním kanálu byla měřena fluorescence sondy FAM, TaqMan probe na sekvenci genu pro hygromycinovou rezistenci, která je součástí T-DNA, která je obsažena v transformovaných rostlinách. Reference byla následně měřena v druhém kanálu, kde byla měřena fluorescence sondy VIC, součást probe pro referenční gen AAP1 (aminokyselinová permeáza 1). Počet kopií reference na genom, vůči kterému je sledován target je nastaven pro AAP1 na 2 kopie na diploidní genom. Po nastavení přístroje do něj byla vložena ddPCR destička s amplifikovanými vzorky droplet a přístroj je poté spuštěn.

3.2.16 PEA meter (Plant efficiency analyzer)

Hodnota F_v/F_m , jakožto základní fluorescenční poměr definován jako poměr variabilní (F_v) a maximální (F_m) fluorescence, kdy variabilní fluorescence je určena jako okamžitá hodnota fluorescence zmenšenou o minimální fluorescenci (F_0). Pro výpočet F_v je použita hodnota maximální fluorescence F_m , které bylo dosaženo krátce po náhlém ozáření rostliny, jež byla před ozářením zatemněna, dostatečně silným světelným pulzem, který způsobí uzavření všech reakčních PS II, zahlcení fotochemické deexcitační cesty, a tudíž prudký nárůst fluorescence. Proto platí $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$. Tato hodnota je obecným indikátorem pro snížení funkce nebo poškození RC PS II.

Pro zjištění hodnoty F_v/F_M byl využit PEA meter. A toto měření bylo provedeno ve dvou experimentech.

(1) Měření bylo provedeno při ozáření světlem o intenzitě $2500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 5 s, při excitaci 40% u listů rostlin *A. thaliana* s různým fenotypem jež byly vystaveny vysoké intenzitě světla $2500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ čase 0min, 1 hod, 2 hod a 4 hod po vystavení rostlin světlu. Listy byly vždy před samotným měřením na 30 min zatemněny.

(2) Měření bylo provedeno při ozáření světlem o intenzitě $2500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 2 s, při excitaci 40% u listů rostlin *A. thaliana* s různým fenotypem, kdy jednotlivé fenotypy byly pěstovány při různých podmínkách – při normálním světlé, při zvýšené intenzitě světla a při zvýšené intenzitě světla a suchu. Listy byly vždy před samotným měřením na 30 min zatemněny.

3.2.17 Měření obsahu chlorofylu

Pro zjištění obsahu chlorofylu v listech různých fenotypů rostlin *A. thaliana* byl využit chlorofylmetr SPAD 502. Tento přístroj měří propustnost listu při dvou vlnových délkách – 650 nm a 940 nm, kdy při 650 nm je vysoká absorbance chlorofylu a u 940 nm je naopak nízká absorbance chlorofylu. Na základě těchto dvou hodnot přístroj vyhodnocuje obsah chlorofylu v listu. Tato metoda je nedestruktivní a není nutnost k extrakci pigmentů.

Metoda byla využita pro zjištění obsahu chlorofylu u listů rostlin *A. thaliana* s různým fenotypem jež byly vystaveny vysoké intenzitě světla $2500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ čase 0min, 1 hod, 2 hod a 4 hod po vystavení rostlin světlu. Listy byly vždy před samotným měřením na 30 min zatemněny.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

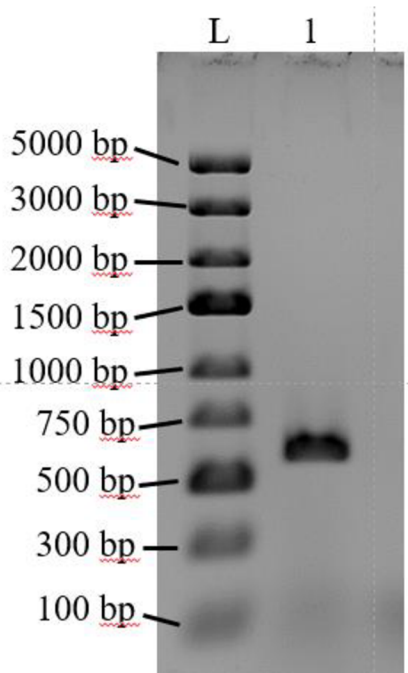
4.1 Příprava rostlin *A. thaliana* s overexpresí proteinu LHCb8

4.1.1. Příprava donorového vektoru pDONRP4-P1R s promotorem CaMV35s

Pro přípravu donorového vektoru s promotorem musel být nejdříve amplifikován promotor CaMV35s. CaMV35s promotor pochází z viru mozaiky kvěťáku (anglicky Cauliflower mosaic virus odtud zkratka CaMV). V dnešní době je CaMV35s promotor jeden z nejkompexněji studovaných a experimentálně používaným transkripčním promotorem s aktivitou v rostlinách. Promotor má délku 343 bp, obsahuje několik regulačních prvků a má modulární stavbu. Jedním z nejdůležitějších regulačních prvků je TATA-box (Amack et. al. 2020).

Amplifikace promotoru CaMV35s proběhla pomocí PCR s Q5 polymerázou. Pro tuto metodu byly navrženy primery attB_CaMV35s_RP, attB_CaMV35s_FP. Jako templát byla použita pDNA. pDNA je plazmidová DNA, která se používá ve vakcínách a v genové terapii. pDNA se obecně připravuje z kultur *E. coli* pomocí protokolu alkalické lýzy vyvinutého Birnboimem a Dolyem (Birnboim & Doly, 1979) (Smrekar et. al., 2010). Po provedené amplifikaci byla provedena analýza produktu PCR reakce pomocí horizontální elektroforézy na 1,2 % agarosovém gelu (parametry pro elektroforézu 60 min, 90 V, 400 A). Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen na 15 minut do ethidium bromidu pro obarvení produktů PCR. Následně byl gel vystaven UV světlu pro zobrazení výsledku.

Výsledná analýza agarosového gelu po elektroforéze potvrdila amplifikaci promotoru CaMV35s, protože produkt PCR reakce měl předpokládanou velikost a to přibližně 593 bp (Obrázek 5.). Velikost produktu byla porovnána s ladderem GeneRuler™ Express DNA Ladder, který měl definovanou velikost bandů.



Obrázek 5. Výsledek amplifikace promotoru CaMV35s pomocí PCR s Q5 polymerázou. L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA Ladder. Předpokládaná velikost produktu PCR s Q5 polymerázou, který je označen číslem 1 je 593 bp

Po potvrzení amplifikace promotoru CaMV35s byl produkt PCR reakce přečištěn pomocí QIAquick PCR purifikačního kitu. Po přečištění produktu byla pomocí NanoDrop spektrofotometru určena koncentrace 158 ng/μl DNA ve vzorku. Koncentrace byla určena na základě poměru změřené absorbance vzorku při vlnových délkách 260 nm (při této vlnové délce je stanoveno absorpční maximum DNA) a absorbance při 280 nm (absorpční maximum stanoveno pro proteiny), kdy poměr těchto dvou absorbancí pro čistou DNA je přibližně určen na hodnotu 1,8.

Samotná příprava donorového vektoru pDONRP4-P1R s promotorem CaMV35s proběhla pomocí Gateway klonování – BP reakce. CaMV35s promotor s attB konci, byl v reakci potřebný v látkovém množství 50 fmol, k přepočtu na ng byl použit vzorec uvedený níže, kde N je délka DNA v bp.

$$\text{ng} = (\text{fmol})(N)\left(660 \frac{\text{fg}}{\text{fmol}}\right)\left(\frac{1}{10^6} \frac{\text{ng}}{\text{fg}}\right)$$

$$\text{ng} = (50)(593)(660)\left(\frac{1}{10^6}\right)$$

$$\text{ng} = 19,569 \cong 19,6$$

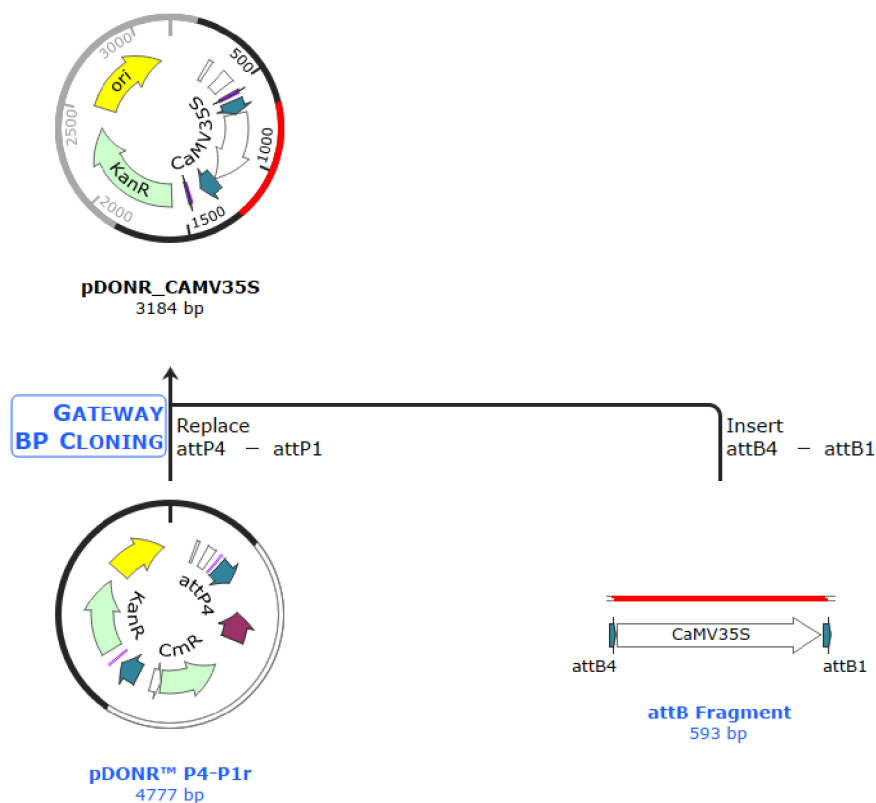
Pro BP reakci bylo zapotřebí 19,6 ng DNA (CaMV35s), zásobní DNA měla koncentraci 15 ng μl^{-1} . Po přepočtu (uveden níže) bylo zjištěno že do reakce se musí přidat 1,31 μl DNA (CaMV35s). Dále do reakce měl být přidán 1 μl 150ng $\cdot \mu\text{l}^{-1}$ pDONR vektoru, zásobní koncentrace byla 117 ng/ μl , tudíž po přepočtu bylo určeno, že do reakce má být dáno 0,78 μl zásobního pDONR vektoru. Následně byly do BP reakce přidány další definované složky.

$$\text{CaMV35s: } x = \frac{19,6 \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]}{15 \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} * 1 [\mu\text{l}] \qquad \text{pDONR: } y = \frac{117 \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]}{150 \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} * 1 [\mu\text{l}]$$

$$x = 1,31 \mu\text{l} \qquad y = 0,78 \mu\text{l}$$

Po provedení BP reakce, schéma jejího průběhu je zaznamenáno na Obr 6., byly vzniklým konstruktem pDONR::CaMV35s transformovány bakterie *E. coli* metodu heat shock.

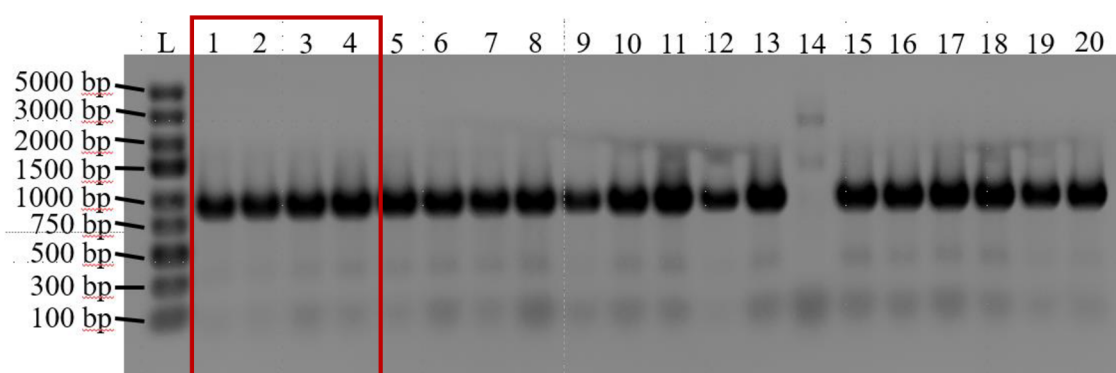
Transformované bakterie byly následně rozpěstovány na LB médiu. Následně bylo vybráno 20 izolovaných kolonií, které byly přečárkovány na novou misku s LB médiem a příslušnými antibiotiky. U těchto přečárkovaných kolonií byla následně provedena colony PCR s primery M13rp a M13fp, pro potvrzení přítomnosti CaMV35s.



Obrázek 6 Schéma průběhu BP reakce – vložení amplifikovaného CaMV35s do vektoru pDONRp4-P1r. Vytvořeno pomocí SnapGene

Pro analýzu produktů colony PCR byla využita elektroforéza na agarosovém gelu. Předpokládaná velikost produktu colony PCR odpovídala přibližně 930 bp, porovnáním této informace a výsledků vizualizovaných na agarosovém gelu bylo možné potvrdit přítomnost promotoru CaMV35s u všech vybraných kolonií mimo kolonie označené číslem 14 (Obr. 7).

Po úspěšném potvrzení přítomnosti CaMV35s promotoru u většiny vybraných transformovaných kolonií *E. coli*, byly vybrány čtyři kolonie (na Obr. 7 vybrané kolonie označeny červeným ohraničením) pro izolaci jejich DNA, která byla provedena pomocí kitu – Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge. Tyto kolonie byly označeny číslicemi 1-4. Koncentrace izolované DNA z jednotlivých kolonií jsou zapsány v Tab. 15.

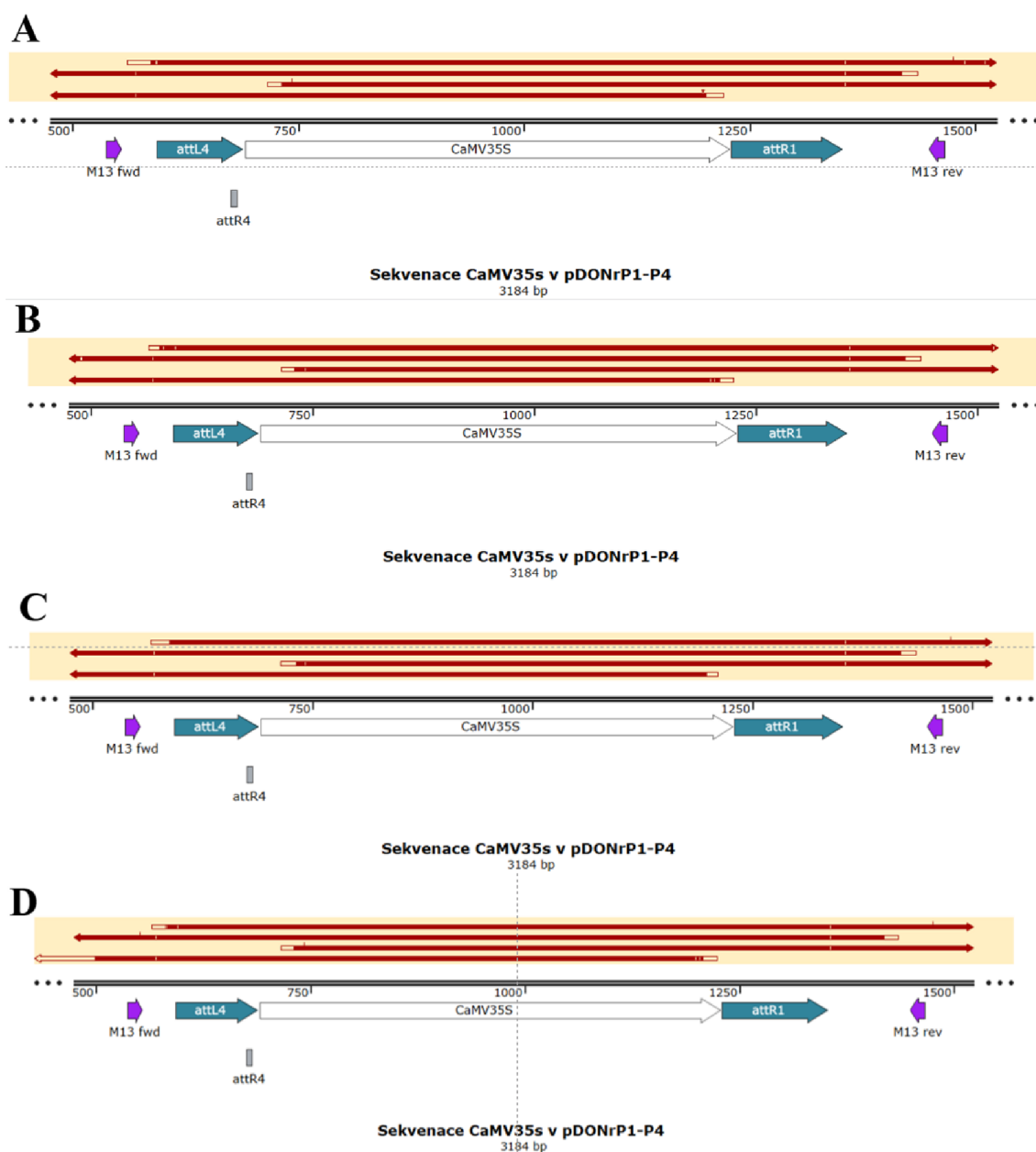


Obrázek 7. Ověření přítomnosti CaMV35s promotoru u transformovaných kolonií bakterií *E. coli* pomocí colony PCR a příslušných primerů. Jednotlivé kolonie jsou označeny číslicemi 1-20, L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA Ladder. Předpokládaná velikost produktů colony PCR je 930 bp.

Tab. 15. Koncentrace izolované DNA z jednotlivých kolonií transformovaných bakterií *E. coli*

Kolonie <i>E. coli</i>	Koncentrace izolované DNA [ng μ l ⁻¹]
1	269,2
2	231,9
3	320,8
4	321,9

Izolovaná DNA byla následně použita pro Sangerovu sekvenaci, která byla provedena pro ověření správnosti sekvence vloženého promotoru CaMV35s. Získané sekvenogramy – překrývající se sekvenované fragmenty získané amplifikací z DNA kolonií transformovaných *E. coli*, po porovnání s očekávanou sekvencí (Obr. 8.) potvrdily správnost sekvence u všech vybraných kolonií. Po potvrzení sekvence byla izolovaná DNA následně použita pro LR reakci – druhý krok Gateway klonování.



Obrázek 8. Ověření správnosti sekvence CaMV35s promotoru v pDONrP4-P1. Obrázek je rozdělen do částí A-D, kdy každá část odpovídá výsledku sekvenování kolonií 1-4 transformovaných *E. coli*. U všech částí jsou porovnávány sekvenované fragmenty (vyznačeny červenou barvou) a kontrolní očekávanou sekvencí – která obsahuje amplifikovaný promotor CaMV35s a primery M13rp a M13fp. Vytvořeno pomocí programu SnapGene.

4.1.2 Příprava konstruktů pro transformaci *A. thaliana*

Pro přípravu konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* byla využita LR reakce – Gateway klonování. Byly využity donorové vektory *pDONr207::ATlhcb8* (dodaný školitelem) a *pDONrP4-P1::CaMV35s* (připravený pomocí BP reakce, Obr. 4), jako destinační vektor byl použit *pH7m24G-FAST* (dodaný školitelem, viz, Shimada et. al., 2010).

Každý z uvedených donorových vektorů byl potřeba v látkovém množství 10 fmol a destinační vektor byl zapotřebí v látkové množství 20 fmol. Výpočet provedený pro získání množství jednotlivých vektorů pro LR reakci je uveden níže (Obr. 9), kde *N* v vzorci je délka DNA v bp.

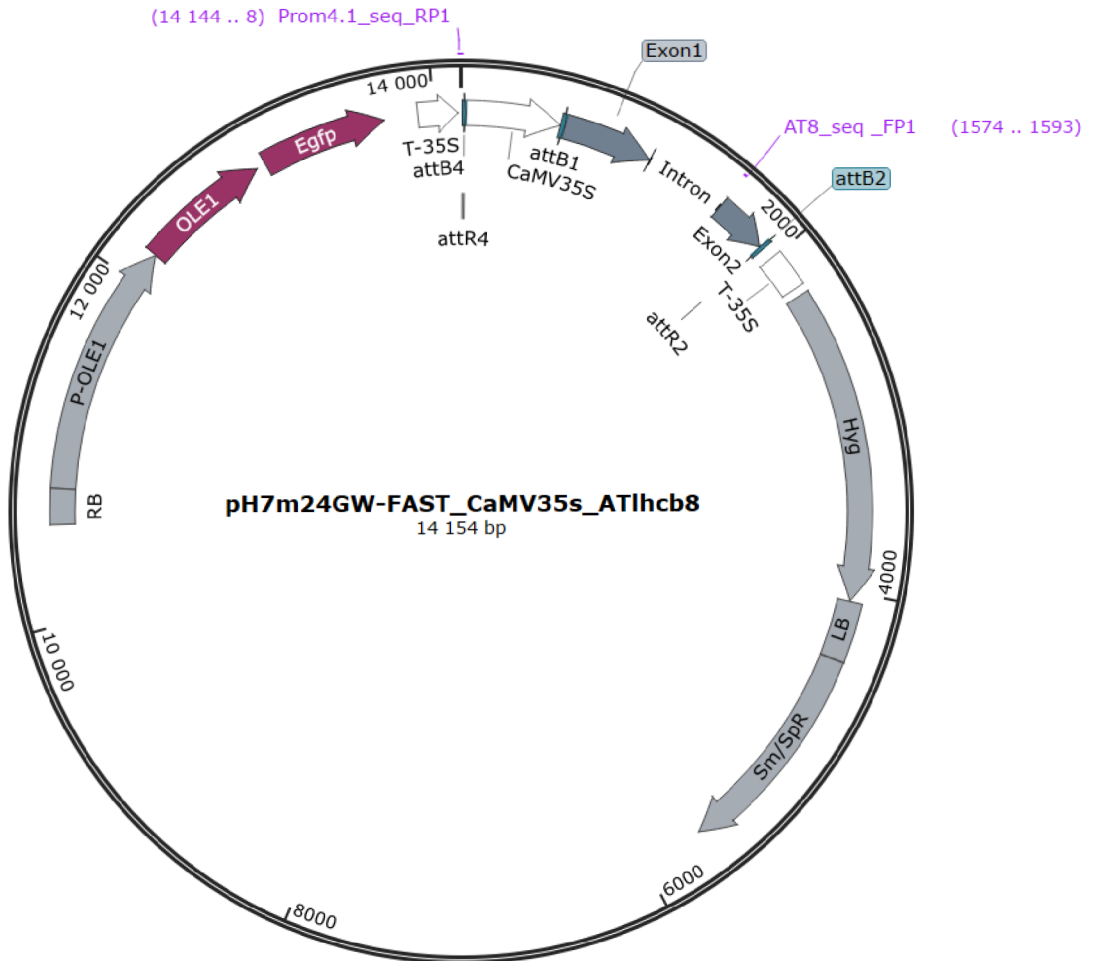
Bylo zjištěno, že pro LR reakci je zapotřebí 21,01 ng *pDONrP4-P1::CaMV35s*, 30,89 ng *pDONr207::ATlhcb8* a 183,97 ng *pH7m24G-FAST*.

$$ng = (fmol)(N)(660 \frac{fg}{fmol}) (\frac{1}{10^6} \frac{ng}{fg})$$

<i>pDONrP4-P1::CaMV35s</i>	<i>pDONr207::ATlhcb8</i>	<i>pH7m24G-FAST</i>
$ng = (10)(3184)(600)(1 \cdot 10^{-6})$	$ng = (10)(4680)(600)(1 \cdot 10^{-6})$	$ng = (10)(13937)(600)(1 \cdot 10^{-6})$
<u>$ng = 21,01$</u>	<u>$ng = 30,89$</u>	<u>$ng = 183,97$</u>

Obrázek 9. Přepočítání fmolů na ng pro LR reakci

Po provedení LR reakce vznikl konstrukt *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8*, struktura tohoto konstruktu je zobrazena na Obr. 10. Tento konstrukt byl následně transformován do bakterií *E.coli* metodou heat-shock.

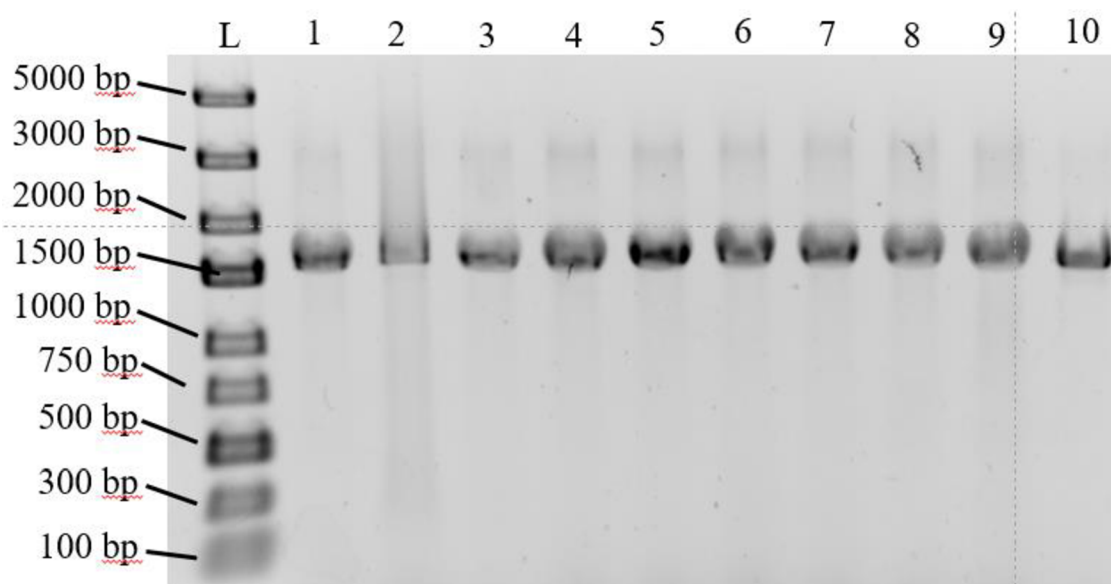


Obrázek 10. Sekvence a části konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* připraveného k transformaci *A. thaliana*

Transformované bakterie byly následně rozpěstovány na LB médiu. Následně bylo vybráno 10 izolovaných kolonií, které byly přečárkovány na novou misku s LB médiem a příslušnými antibiotiky. U těchto přečárkových kolonií byla následně provedena colony PCR s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 (Tab. 11), pro potvrzení přítomnosti konstruktů v koloniích transformovaných bakterií *E. coli* a tím i potvrzení proběhnutí LR reakce.

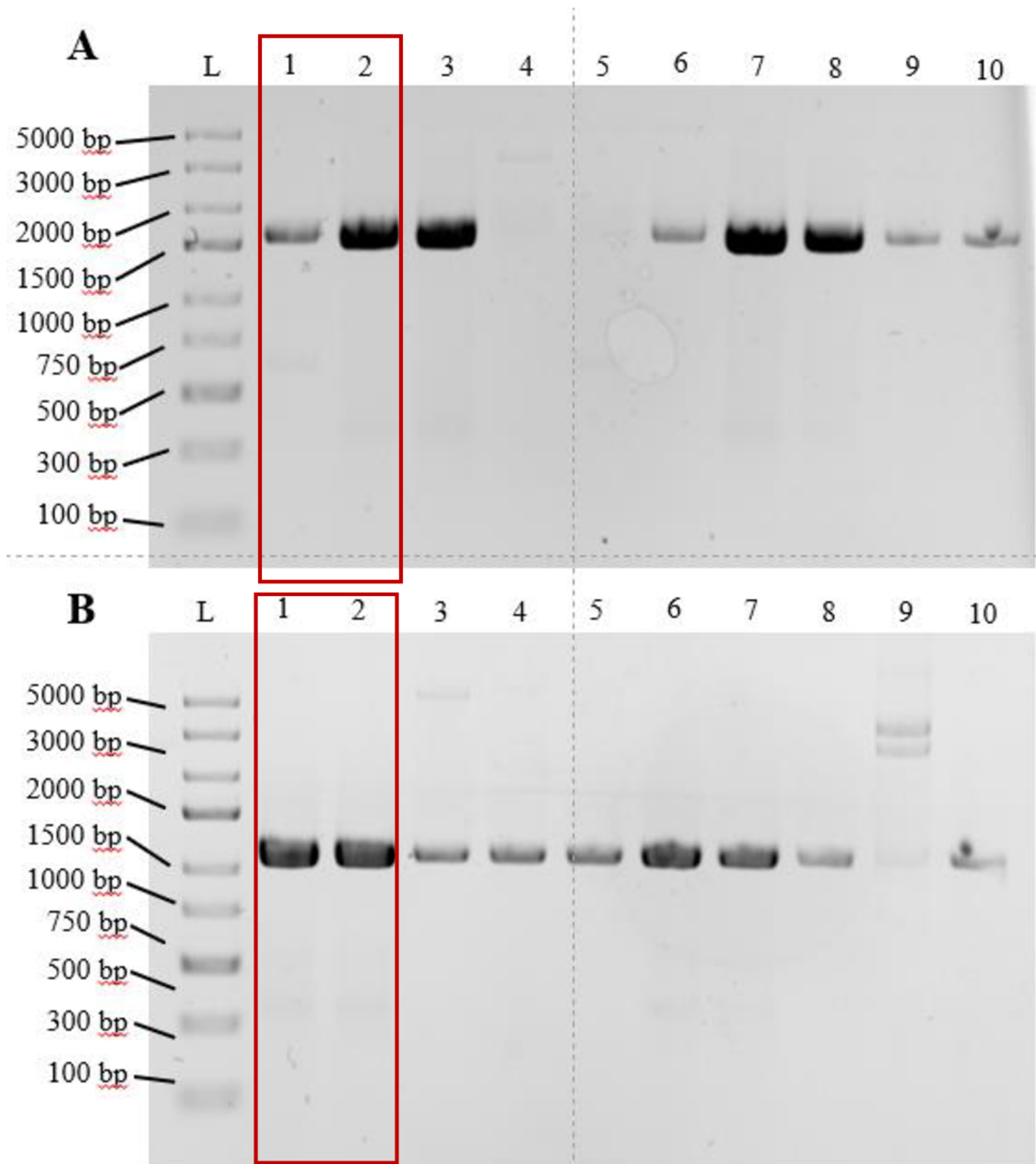
Produkty colony PCR byly analyzovány pomocí elektroforézy na 1.2% agarosovém gelu. Předpokládaná velikost produktu colony PCR byla 1600 bp, po aplikaci tohoto předpokladu při analýze výsledného gelu, bylo možné potvrdit přítomnost konstruktů zájmu u všech kolonií transformovaných bakterií *E. coli* (Obr. 11).

Po potvrzení úspěšnosti LR reakce byly původně transformované bakterie *E. coli* opět rozpěstovány na tuhém LB médiu s přidavkem spektinomycinu. Následně byla vybrána 10 izolovaných kolonií, které byly přečárkovány na novou misku s pevným LB médiem s obsahem spektinomycinu. U těchto kolonií byla následně provedena colony PCR ve dvou provedeních, jedenkrát s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 (Tab. 11) a po druhé s primery CaMV35s_seq_FP1 a AT8_seq_FP1 (Tab. 12.). Colony PCR byla provedena pro potvrzení přítomnosti výsledného konstruktů LR reakce u kolonií transformovaných bakterií *E. coli*.



Obrázek 11. Ověření přítomnosti konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* u transformovaných kolonií bakterií *E. coli* pomocí colony PCR a příslušných primerů. Jednotlivé kolonie jsou označeny číslicemi 1-10, L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA Ladder. Předpokládaná velikost produktu byla 1600 bp.

Produkty obou provedených colony PCR byly analyzovány pomocí elektroforézy na 1.2% agarosovém gelu. Předpokládaná velikost produktu colony PCR s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 byla 1600 bp, po aplikaci tohoto předpokladu při analýze výsledného gelu, bylo možné potvrdit přítomnost konstruktů zájmu u všech kolonií transformovaných bakterií *E. coli*, kromě kolonií označených číslem 4 a 5, kde očekávaný pásy o velikosti přibližně 1600 bp nebyly přítomny (Obr. 12A). Předpokládaná velikost produktu colony PCR s primery CaMV35s_seq_FP1 a AT8_seq_FP1 byla 1100 bp, po aplikaci tohoto předpokladu při analýze výsledného gelu, bylo možné potvrdit přítomnost konstruktů u všech kolonií transformovaných bakterií *E. coli*, kromě kolonie označené číslem 9, kde očekávaný pás nebyl přítomen (Obr. 12B).



Obrázek 12. Ověření přítomnosti konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* u transformovaných kolonií bakterií *E. coli* pomocí colony PCR.

A – Produkty colony PCR provedené s primery *prom4.1seq_RP1* a *AT8_seq_FP1*. Jednotlivé kolonie jsou označeny číslicemi 1-10, L označuje použitý ladder *GeneRuler Express DNA Ladder*. Předpokládaná velikost produktu přibližně 1600 bp.

B – Produkty colony PCR provedené s primery *CaMV35s_seq_FP1* a *AT8_seq_FP1*. Jednotlivé kolonie jsou označeny číslicemi 1-10, L označuje použitý ladder *GeneRuler Express DNA Ladder*. Předpokládaná velikost produktu přibližně 1100 bp.

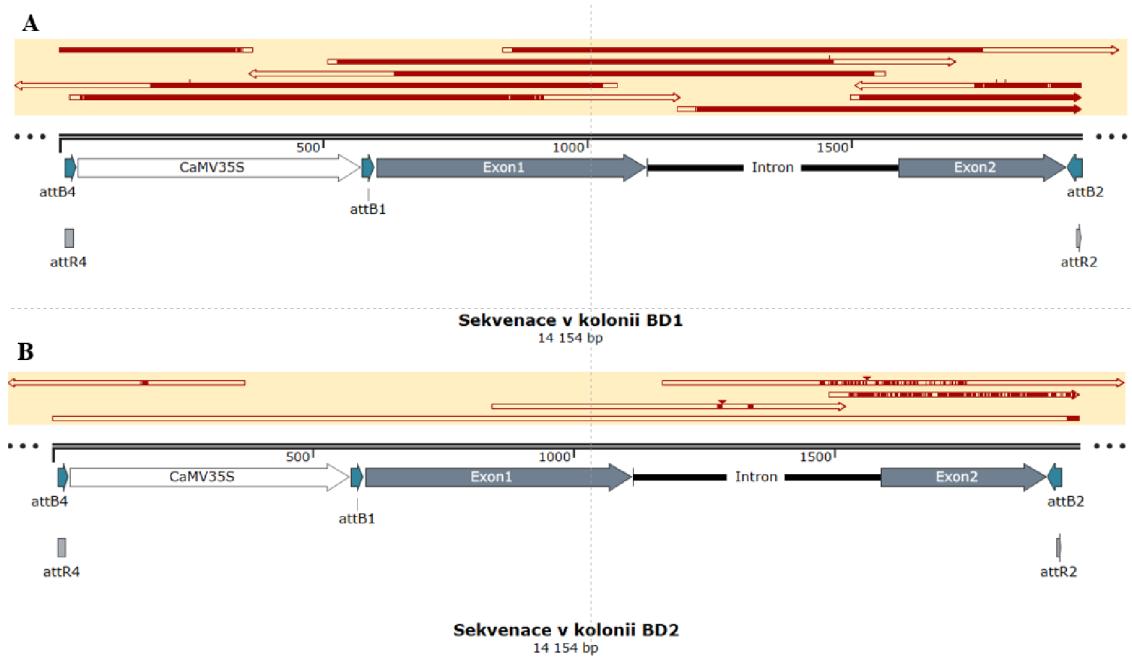
Po potvrzení přítomnosti *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* u kolonií transformovaných bakterií *E. coli*, byly vybrány dvě kolonie (na Obr. 9A a 9B. označeny červeným ohraničením) pro izolaci DNA. U izolované DNA byla určena její koncentrace pomocí NanoDrop spektrofotometru, koncentrace izolované DNA jsou označeny v Tab. 16, kolonie, ze kterých byla izolována DNA, byly označeny jako BD1 a BD2.

Pro ověření správnosti částí sekvence *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* byla použita Sangerova sekvenace. K Sangerově sekvenaci byla použita izolovaná DNA z kolonií BD1 a BD2. Pro vytvoření fragmentů sekvence byly využity primery uvedené v Tab 7.

Po porovnání sekvenogramů (získaných pomocí programu SnapGene) s očekávanou sekvencí potvrdily správnost sekvence u kolonie BD1, jednotlivé sekvenční fragmenty se dostatečně shodovali s předpokládanou sekvencí (Obr. 13A). U kolonie BD2 správnost sekvence potvrzena nebyla (Obr. 13B), získané sekvence fragmentů se neshodovali se sekvencí předpokládanou, dva sekvenční fragmenty nemohly být kvůli své nízké kvalitě zařazeny do sekvenogramu. Proto byla pro další experimenty používána DNA izolovaná z kolonií BD1.

Tabulka 16. Koncentrace DNA izolované z kolonií *E. coli* – BD1 a BD2

Kolonie <i>E. coli</i>	Koncentrace DNA [ng·μl ⁻¹]
BD1	210,3
BD2	234,3



Obrázek 13. Ověření sekvence části konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::AtLhcb8* transformovaného do *E. coli* Obrázek je rozdělen do částí A a B. Očekávaná sekvence obsahuje promotor CaMV35s a exony a intron genu *AtLHCB8*

A – Sekvence v kolonii BD1. Porovnávají sekvencované fragmenty (vyznačeny červenou barvou) a kontrolní očekávanou sekvencí

B – Sekvence v kolonii BD2. Porovnávají sekvencované fragmenty (vyznačeny červenou barvou) a kontrolní očekávanou sekvencí

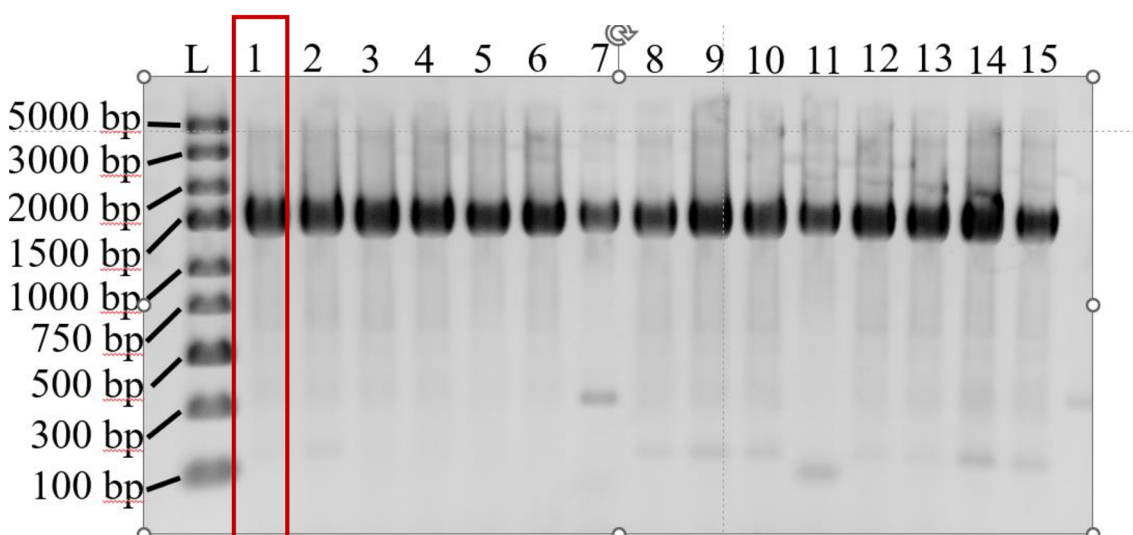
4.1.3 Transformace rostlin *A. thaliana*

Před samotnou transformací rostlin *A. thaliana* musely být nejprve transformovány bakterie *A. tumefaciens* kmen GV3101, které zprostředkují přenos T-DNA do rostliny. *A. tumefaciens* byly transformovány pomocí metody freeze-thaw.

Transformované bakterie *A. tumefaciens* byly následně rozpěstovány na pevném médiu YEB s obsahem antibiotik – gentamycin, rifampicin, spektinomycin. Po rozpěstování bylo vybráno 15 kolonií, které následně podrobeny colony PCR s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 pro ověření přítomnosti konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8*.

Produkty colony PCR byly analyzovány pomocí elektroforézy na 1.2% agarosovém gelu. Předpokládaná velikost produktu colony PCR s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 byla 1600 bp, Po porovnání předpokládané velikosti s velikostí pásů zobrazených na gelu (Obr. 14), byla prokázána přítomnost požadovaného konstruktů u všech 15 kolonií transformovaných *A. tumefaciens*.

Následně byla provedena transformace *A. thaliana* (WT, ekotyp Col-0). Pro transformaci *A. thaliana* byla využita kolonie označená číslem 1 (na Obr. 11 zaznačena v červeném rámečku). Transformováno bylo 6 rostlin, jejichž semena po dozrání byla sklizena a využita pro selekci homozygotní linie *ATlhcb8*.



Obrázek 14. Ověření přítomnosti konstruktů *pH7m246W-FAST::CaMV35s::ATlhcb8* u transformovaných kolonií bakterií *A. tumefaciens* pomocí colony PCR a příslušných primerů. Jednotlivé kolonie jsou označeny číslicemi 1-15, L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA

4.2 Selektce homozygotních linií *A. thaliana* se zvýšenou expresí LHCB8

4.2.1 Selektce transformovaných semen

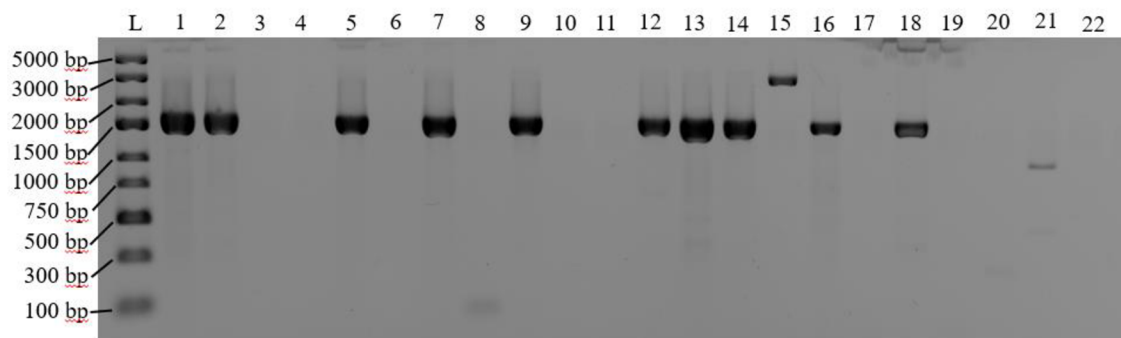
Díky přítomnosti konstruktů OLE1-GFP (podle Shimada et. al. 2010) v T-DNA kazetě vložené do transformovaných rostlin, mohla být transformovaná semena selektována na základě jejich fluorescence. Semena získaná z transformovaných rostlin bylo proto pozorována pod fluorescenční lampou a fluoreskující semena (Obr. 15) byla poté vybrána a následně připravena pro zasazení. Následně bylo 25 ze vybraných semen, které byly namočený na 48 h a poté zasazeny.

U vyrostlých rostlin byla následně provedena colony PCR pro potvrzení přítomnosti T-DNA: U jednotlivých rostlin, které byly staré zhruba dva týdny, byl odebrán vzorek z listu. Pro PCR colony stačil vzorek o velikosti 5 mm, proto mohly být použité i velmi mladé rostliny. PCR colony s použitím Phire Plant Direct PCR Kit byla provedena s primery prom4.1seq_RP1 a AT8_seq_FP1 (viz. kapitola 3.2.10).

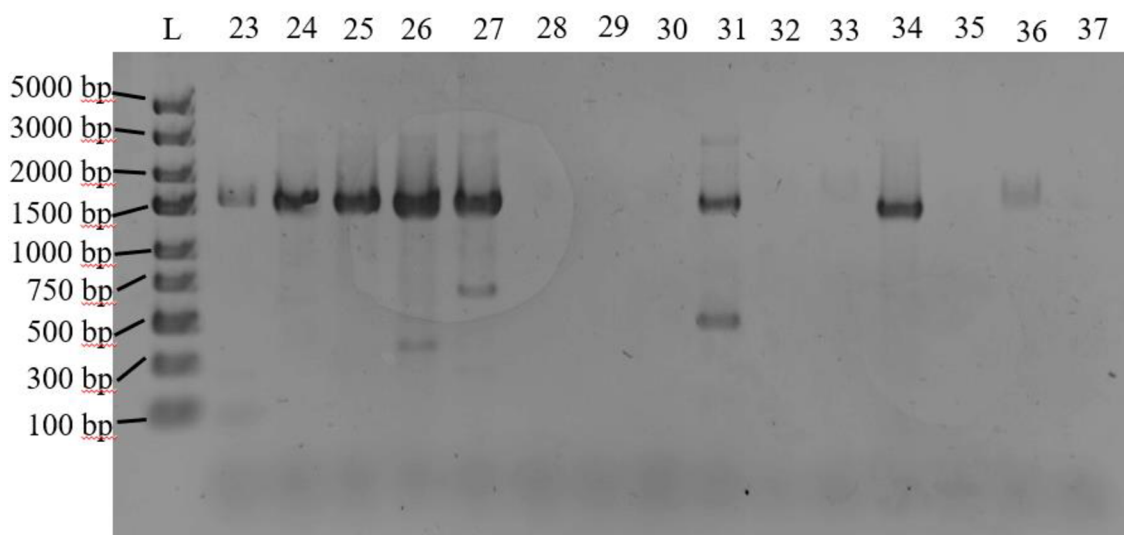
Předpokládaná velikost produktu colony PCR byla 1600 bp, po porovnání této velikosti s pásy zobrazenými na gelu (Obr.16), byla prokázána přítomnost T-DNA u 10 z 22 testovaných rostlin. Kvůli nízkému počtu rostlin, u nichž byla potvrzena přítomnost T-DNA, byly zasazeny další vyselektovaná semena a u vyrostlých rostlin byla opět provedena colony PCR. Kdy po analýze gelu (Obr.17) byla prokázána přítomnost T-DNA u 7 z 15 testovaných rostlin.



Obrázek 15. Selektce semen na základě fluorescenčního signálu. Nalevo nafocena selektovaná semínka a napravo jsou již zobrazeny fluoreskující semena pro selekci



Obrázek 16. Ověření přítomnosti T-DNA u transformovaných rostlin *A. thaliana*. Jednotlivé zkoumané rostliny jsou značeny čísly 1-22. L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA. Předpokládaná velikost produktu je 1600 bp.



Obrázek 17. Ověření přítomnosti T-DNA u transformovaných rostlin *A. thaliana*. Jednotlivé zkoumané rostliny jsou značeny čísly 23-37 v návaznosti na předchozí vzorky. L označuje použitý ladder GeneRuler Express DNA. Předpokládaná velikost produktu je 1600 bp.

Rostliny, u nichž byla prokázána přítomnost T-DNA insertu, byly dále podrobeny metodě ddPCR, díky níž bylo možné určit počet kopií T-DNA v rámci rostliny.

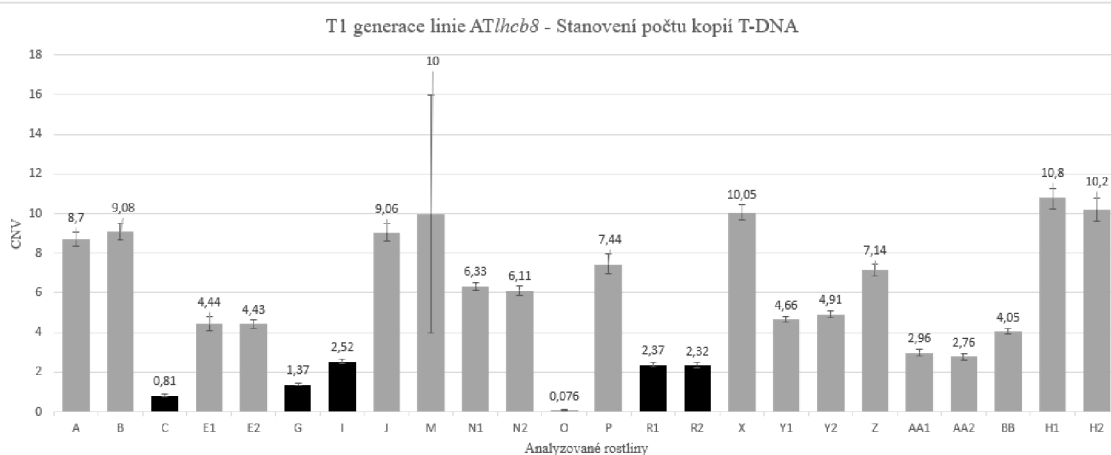
4.2.2 Určení počtu kopií T-DNA u T1 generace linie Atlhcb8 a výběr heterozygotů

Pro určení počtu T-DNA v jednotlivých rostlinách T1 generace linie Atlhcb8 byla použita ddPCR. Před samotným provedením ddPCR byla nejdříve ze zkoumaných rostlin izolována DNA pomocí NucleoSpin Plant II kitu. Získaná DNA byla poté naředěna a naštěpena restrikcčním enzymem MfeI. A takto připravená DNA byla následně použita pro ddPCR.

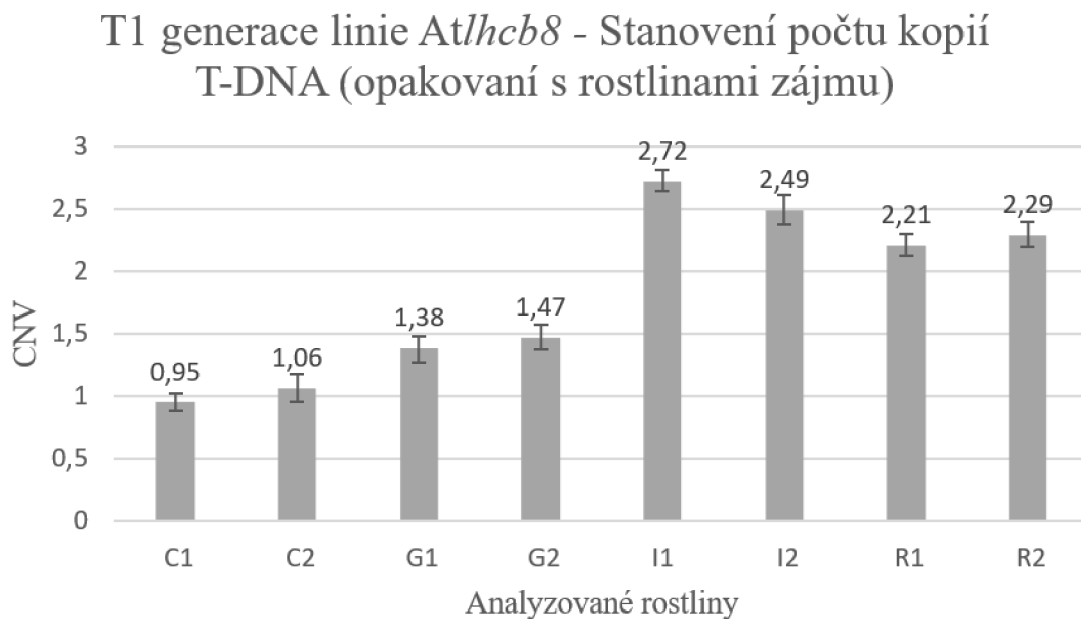
Cílem stanovení počtu kopií T-DNA bylo získání heterozygotních jedinců v rámci T1 generace linie ATlhcb8, kteří by měly nejlépe jednu maximálně dvě kopie T-DNA. Informaci o počtu kopií udává hodnota CNV (copy variation number), přesněji tato hodnota udává počet výskytu sekvence pro hygromycinovou rezistenci, která je součástí T-DNA, v rámci genomu dané rostliny.

Po provedení ddPCR byly na základě výsledků CNV vybrány dvě rostliny označené jako C (CNV = 0,81) a G (CNV = 1,37), které obsahovaly pravděpodobně jen jednu kopii T-DNA a dvě rostliny označené jako I (CNV = 2,52) a R (CNV = 2,34), které obsahovaly pravděpodobně dvě kopie T-DNA. Výsledky ddPCR u všech vybraných rostlin jsou zaneseny v grafu (Obr.), černě jsou vyznačeny výsledky CNV u rostlin, které byly vybrány pro další zkoumání. Jednotlivé rostliny jsou pojmenovány písmeny.

U vybraných rostlin C, G, I a R bylo ddPCR provedeno znovu pro potvrzení výsledků. Výsledky tohoto opakování jsou zaznamenány na Obr. 18. kdy u jednotlivých rostlin proběhlo měření dvakrát. Na základě těchto výsledků byly pro další pokračování vybrány právě tyto rostliny, jejichž semena byly po dozrání opět selektována na základě jejich fluorescenčního signálu a poté vybraná semena byla zasazena pro vypěstování T2 generace, ze které byly následně selektováni homozygotní jedinci.



Obrázek 18. Stanovení počtu kopií T-DNA T1 generace u linie *Atlhcb8*. Rostliny označeny písmeny a číslicemi (určují první nebo druhé měření). Chybové úsečky odpovídají 95% Poissonovu rozmezí. Černé sloupce označují rostliny odpovídající požadavkům



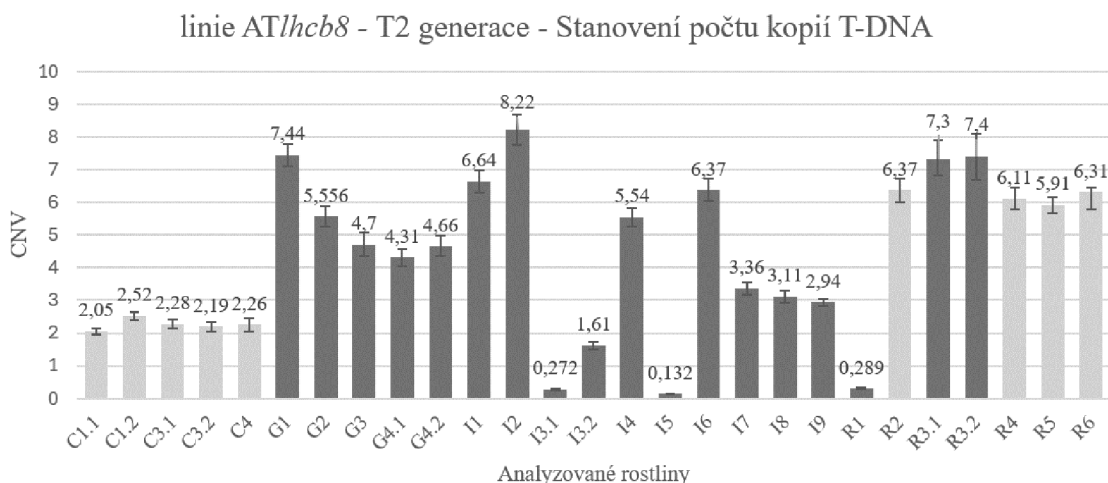
Obrázek 19. Ověření počtu kopií T-DNA T1 generace v linii *Atlhcb8*. Rostliny označeny písmeny a číslicemi (určují první nebo druhé měření). Chybové úsečky odpovídají 95% Poissonovu rozmezí

4.2.3 Určení homozygotů v T2 generaci

Při analýze T2 generace linie *Atlhcb8* byly analyzováni 3 potomci C rostliny z T1 generace, 4 potomci G rostliny z T1 generace, 9 potomků I rostliny z T1 generace a 6 potomků R rostliny z T1 generace.

Na základě provedené ddPCR byly potomci rostliny C označeni jako homozygoti, protože CNV potomků odpovídalo dvojnásobku CNV rodiče (Obr. 20.). Takto byly označeni i potomci rostliny R jako homozygoti (Obr. 20.).

Takto byly vyselektovány dvě homozygotní linie *oelhcb8* označené jako C a R. Pro fyziologickou charakterizaci byly následně zvoleni potomci rostliny C1 a potomci rostliny R3.



Obrázek 20. Určení počtu kopií T-DNA u T2 generace *Atlhcb8* linie a určení homozygotních jedinců v T2 generaci. Světle označené sloupce označují jedince, u kterých byla potvrzena homozygotnost. Chybové úsečky odpovídají 95% Poissonovu rozmezí.

4.3 Charakterizace fenotypu

Pro charakterizaci fenotypu byly porovnány potomci rostliny C1 a potomci rostliny R3 s WT *A. thaliana* a *s kolhcb8* *A. thaliana* – linie s vyřazeným genem *LHCB8*. Při porovnání těchto různých fenotypů se fenotypy od sebe navzájem neliší. Mají podobně velké listy, počet listů je také vzájemně podobný. Proto se dá konstatovat, že vytvořený overexpresní mutant se fenotypově neliší od WT a ani od jedinců z linie *kolhcb8* (Obr. 21).



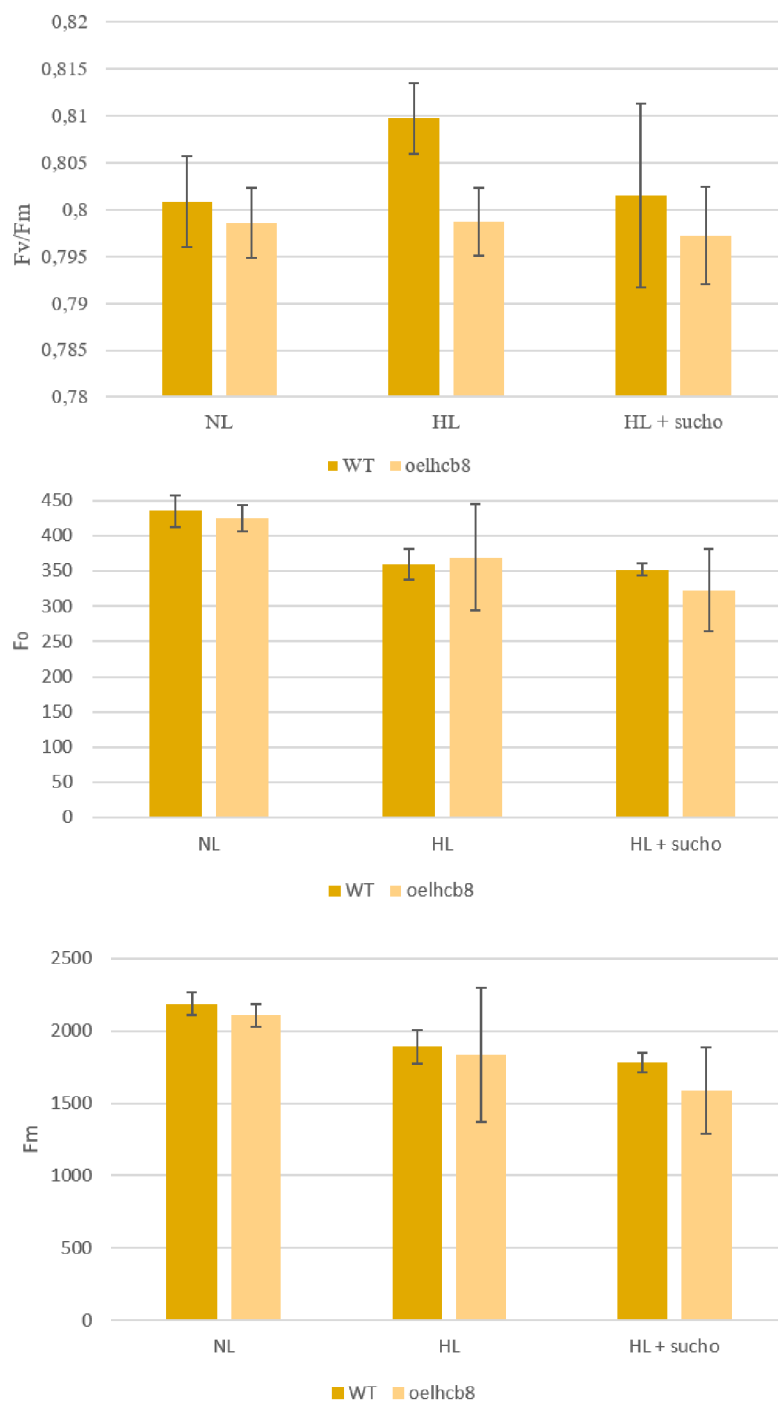
Obrázek 21. Porovnání fenotypů WT, *kolhcb8*, C1 *oelhcb8* a R3 *oelhcb8* *A. thaliana*

4.4 Charakterizace overexpresních linií za normálních a stresových podmínek

Rostliny typu WT a *oelhcb8* byly nejdříve tři týdny pěstovány za normálních podmínek. Po uplynutí 3 týdnů byly rozděleny do třech skupin, ve kterých byly zastoupeny vždy všechny typy. První skupina byla dále pěstována za stejných podmínek, druhá skupina byla vystavena vysokému osvětlení a třetí skupina byla vystavena vysokému osvětlení a suchu (parametry pro pěstování jsou uvedeny v kapitole 3.2.1). Po dalších třech týdnech růstu při jiných podmínkách byly rostliny analyzovány pomocí PEA metru. Byla změřena jejich hodnota F_v/F_m , čímž je určen maximální kvantový výtěžek, díky kterému je možné charakterizovat snížení funkčnosti či poškození fotosystému II. Dále byly porovnány hodnoty F_0 a F_m .

Měření F_v/F_m na listech rostlin, které rostly za normálního světla proběhlo v deseti opakováních, byla určena směrodatná odchylka a data byla zprůměrována. U rostlin, které rostly při vysokém osvětlení bylo měření také provedeno v deseti opakováních, data byla zprůměrována a byla určena jejich směrodatná odchylka. U rostlin, co rostly při vysokém osvětlení a za sucha, bylo měření provedeno ve čtyřech opakováních, menší množství opakování bylo způsobeno nedostatkem kvalitních listů. Měření bylo vždy prováděno na listech, které byly 30 min zatemněny a probíhalo při osvětlení zeleným světlem.

Po analýze dat je možné pozorovat, že všechny pozorované hodnoty F_v/F_m , F_0 a F_m byly větší u WT než u rostlin *oelhcb8* při všech podmínkách Obr.22.. Z výsledků lze vyvodit závěr že v porovnání *oelhcb8* s WT, jsou oba fenotypy na tom velmi podobně v rámci kvantového výtěžku fotochemie PSII, *oelhcb8* nabývaly spíše menší hodnoty, avšak k přesnějším závěrům by musela být udělána hlubší analýza.



Obrázek 22. Porovnání hodnot F_v/F_m , F_0 a F_m naměřených u genotypů WT a *oelhcb8* za podmínek normálního osvětlení (NL), vysokého osvětlení (HL) a vysokého osvětlení a sucha (HL + sucho). Výsledky uváděny jako průměrná hodnota a chybová úsečka jako směrodatná odchylka, pro NL a HL n=10, pro HL+sucho n=4

4.5 Porovnání genotypů při působení vysoké intenzity záření

Tento experiment byl proveden na rostlinách o genotypch WT, *kolhcb8* a *oelhcb8*. Měření bylo provedeno u listů rostlin *A. thaliana* s různým genotypem jež byly vystaveny vysoké intenzitě světla $2500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ čase 0 min (na 5 listech), 1 hod (na 3 listech), 2 hod (na 3 listech) a 4 hod (na 3 listech) po vystavení rostlin světlu. Listy byly vždy před samotným měřením na 30 min zatemněny. Při druhém opakování proběhlo měření v čase 1 hod (na 1 listu), 2 hod (na dvou listech) a 4 hod (na třech listech).

Bylo měřena hodnota Fv/Fm pomocí PEA metru a množství chlorofylu v listech pomocí chlorofylmetru SPAD 502. Po vyhodnocení výsledku obsahu chlorofylu v jednotlivých genotypch při stresu z vysokého osvětlení, byl zjištěn lehký pokles v obsahu chlorofylu a/b v listech (Tab. 17 a Tab. 18) v průběhu času, avšak žádné průkazné rozdíly mezi jednotlivými genotypy, objeveny nebyly. Pro zjištění přesnějších dat by bylo potřeba rostliny vystavit vysoké intenzitě záření na delší dobu v řádu dnů.

Tabulka 17. Množství chlorofylu v listech genotypů *A. thaliana* (WT, *kolhcb8*, *oelhcb8* C1 a R3) v časech 0 min (n=25), 1h (n=15), 2h (n=15) a 4 h (n=15) od ozáření. Hodnoty relativního obsahu chlorofylu jsou uváděné jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou SD (jednotlivé n uvedeny u intervalu měření)

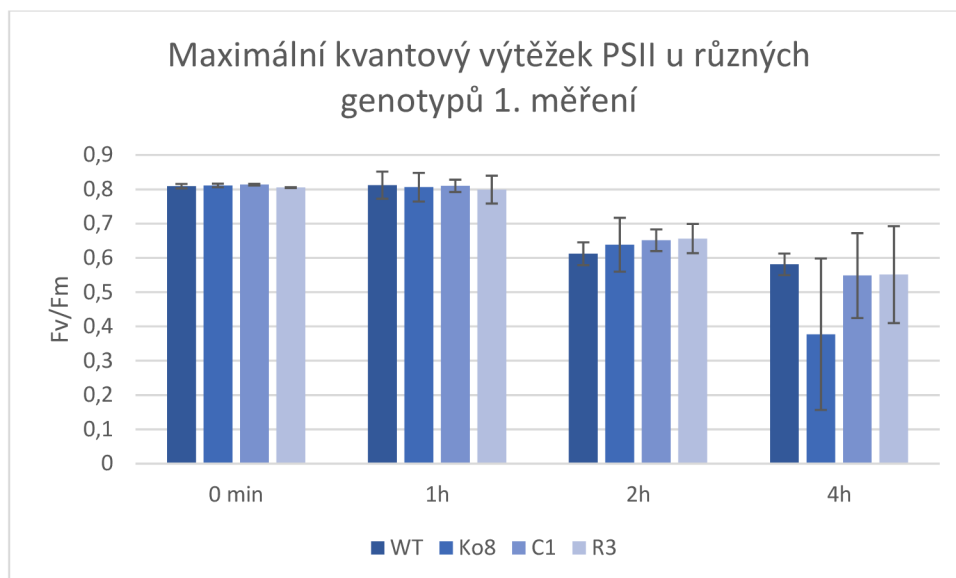
	Relativní obsah Chl*			
	0 min	1h	2h	4h
WT	23,108 ±1,210	18,748±1,112	19,120±0,873	19,360 ± 0,879
<i>kolhcb8</i>	22,480 ±1,406	20,926±0,835	18,100±1,838	16,493 ± 3,109
C1 <i>oelhcb8</i>	20,568 ±2,380	19,700±1,500	19,660±1,188	19,680 ± 1,903
R3 <i>oelhcb8</i>	22,376 ±1,296	18,586±2,664	19,660±1,899	19,820 ± 3,072

Tabulka 18 Opakování měření množství chlorofylu v listech genotypů *A. thaliana* (WT, *kolhcb8*, *oelhcb8* C1 a R3) v časech 1h (n=5), 2h (n=10) a 4 h (n=15) od ozáření. Hodnoty relativního obsahu chlorofylu jsou uváděné jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou SD (jednotlivé n uvedeny u intervalu měření)

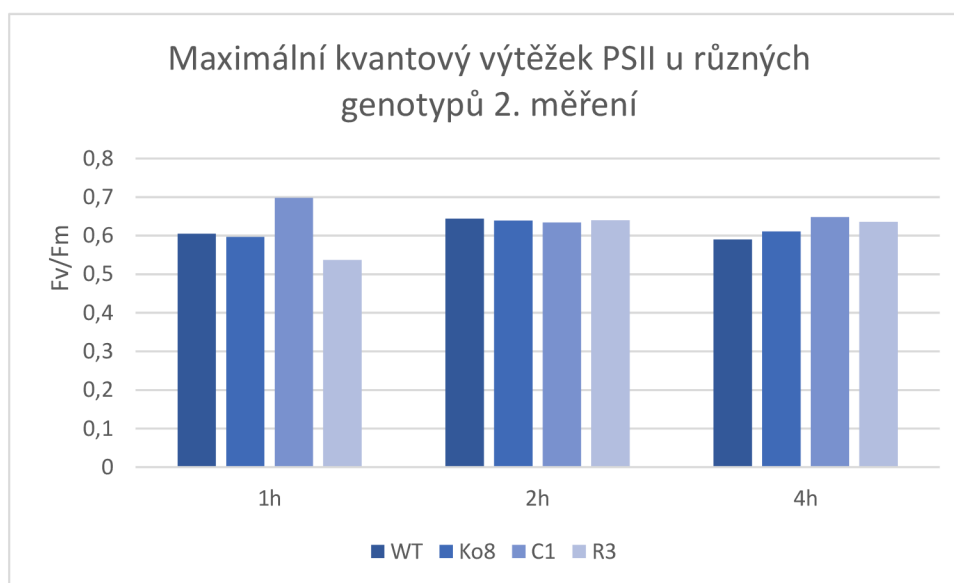
	Relativní obsah Chl*		
	1 h	2 h	4 h
WT	19,020±0,641	21,1±0,561	21,86 ± 2,234
<i>kolhcb8</i>	19,740±0,820	21,58±0,948	20,947 ± 1,161
C1 <i>oelhcb8</i>	21,38±0,683	18,43±2,313	22,173 ± 1,112
R3 <i>oelhcb8</i>	19,140±0,313	20,95±2,066	22,8260 ± 1,226

Dále byly měřeny hodnoty Fv/Fm pomocí PEA metru. Měření probíhalo ve dvou dnech, hodnoty z prvního dne vypovídají, že mezi jednotlivými genotypy není výrazný rozdíl v jejich hodnotě Fv/Fm, jediný výrazný propad vůči ostatním genotypům byl zaznamenán u *kolhcb8* při měření po 4h (Obr 23.).

Měření druhý den mělo velmi podobné výsledky jako měření první den, kdy jednotlivé genotypy na tom byly téměř totožně, jediná výjimka byla u C1 *oelhcb8*, který při měření po 1 hodině vykazoval vyšší hodnoty Fv/Fm, než ostatní genotypy (Obr 24.), avšak vzhledem že toto měření bylo provedeno pouze v jednom opakování není tato hodnota moc průkazná.



Obrázek 23. 1. Měření F_v/F_m u genotypů WT, *kolhcb8* (ko8), *oelhcb8* C1 a R3, během intervalů 0min ($n=5$), 1 hod ($n=3$), 2 hod ($n=3$) a 4 hod ($n=3$), kdy byly jednotlivé genotypy osvětleny světlem o intenzitě $2500 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Hodnoty jsou průměrné a chybové úsečky odpovídají SD (kdy n je uvedeno u jednotlivých intervalů měření)



Obrázek 24. 2. Měření F_v/F_m u genotypů WT, *kolhcb8* (ko8), *oelhcb8* C1 a R3, během intervalů 1 hod ($n=1$), 2 hod ($n=2$) a 4 hod ($n=3$), kdy byly jednotlivé genotypy osvětleny světlem o intenzitě $2500 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Hodnoty jsou průměrné a chybové úsečky nejsou uvedeny, protože opakování nebylo dostatečné

5 ZÁVĚR

V teoretickém úvodu byla objasněna funkce světlosběrných proteinů, hlavně tedy proteinu LHCB8, na který je tato práce zaměřená. Také byl více vysvětlen průběh Gateway klonování, který byl stěžejní metodou při získání mutantů *A. thaliana*.

Cílem této práce byla příprava overexpresní *A. thaliana* se zvýšenou expresí LHCB8 proteinu a její následná charakteristika. V rámci metodologie bylo využito spousty novodobých moderních metod, které zjednodušují práci vědcům v jejich bádání. Díky metodám jako jsou ddPCR a selekční metoda FAST pro selekci semen je možné urychlit zdlouhavý proces transformace organismů a následné získání homozygotní linie.

V rámci experimentální části byla připravena overexpresní linie *A. thaliana*, která by měla vykazovat zvýšenou expresy LHCB8 proteinu. A díky tomu mohl být lépe pochopena funkčnost tohoto světlosběrného proteinu při dalším zkoumání. V této práci byla provedena jen základní charakterizace této overexpresní linie, a proto jako taková nepřinesla mnoho nových informací o funkci proteinu LHCB8. Hlavním úspěchem této práce bylo vytvoření a získání homozygotní linie *oelhcb8*.

6. LITERATURA

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Büchel, C. (2015). Evolution and function of light harvesting proteins. *Journal of Plant Physiology*, 172, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.018>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Chen, Y.-E., Ma, J., Wu, N., Su, Y.-Q., Zhang, Z.-W., Yuan, M., Zhang, H.-Y., Zeng, X.-Y., & Yuan, S. (2018). The roles of *Arabidopsis* proteins of Lhcb4, Lhcb5 and Lhcb6 in oxidative stress under natural light conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.014>
- de Bianchi, S., Betterle, N., Kouril, R., Cazzaniga, S., Boekema, E., Bassi, R., & Dall'Osto, L. (2011). *Arabidopsis* mutants deleted in the light-harvesting protein lhcb4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. *The Plant Cell*, 23(7), 2659–2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087320>
- Ilíková, I., Ilík, P., Opatíková, M., Arshad, R., Nosek, L., Karlický, V., Kučerová, Z., Roudnický, P., Pospíšil, P., Lazár, D., Bartoš, J., & Kouřil, R. (2021). Towards spruce-type photosystem II: Consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab396>
- Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll ab-binding proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1184(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90148-1)
- Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 4(6), 236–240. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01419-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01419-3)
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273. <https://doi.org/10.1042/ebc20160016>
- Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., & Jansson, S. (2006). Abundantly and rarely expressed lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiology*, 140(3), 793–804. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073304>
- Kouřil, R., Nosek, L., Opatíková, M., Arshad, R., Semchonok, D. A., Chamrád, I., Lenobel, R., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2020). Unique organization of photosystem II supercomplexes and megacomplexes in Norway spruce. *The Plant Journal*, 104(1), 215–225. <https://doi.org/10.1111/tbj.14918>
- Lan, Y., Song, Y., Zhao, F., Cao, Y., Luo, D., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. (2022). Phylogenetic, structural and functional evolution of the LHC gene family in plant species. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 488. <https://doi.org/10.3390/ijms24010488>
- Reece-Hoyes, J. S., & Walhout, A. J. M. (2018a). Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), pdb.top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>
- Rochaix, J.-D., & Bassi, R. (2019). LHC-like proteins involved in stress responses and biogenesis/repair of the photosynthetic apparatus. *Biochemical Journal*, 476(3), 581–593. <https://doi.org/10.1042/bcj20180718>

- Roose, J. (n.d.). Photosystem II. New Under The Sun Blog.
<https://newunderthesunblog.wordpress.com/the-basics/the-light-reactions/photosystem-ii/>
- Shimada, T. L., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 61(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.04060.x>
- Smrekar, F., Podgornik, A., Ciringer, M., Kontrec, S., Raspor, P., Štrancar, A., & Peterka, M. (2010). Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns. *Vaccine*, 28(8), 2039–2045. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.061>
- SORIANO, Maria. *Plasmids 101: Gateway Cloning*. Online. Addgene blog. 2017. Dostupné z: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>. [cit. 2024-05-06]
- Xu, P., Roy, L. M., & Croce, R. (2017). Functional organization of photosystem II antenna complexes: CP29 under the spotlight. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(10), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.07.003>
- Zhao, S., Gao, H., Luo, J., Wang, H., Dong, Q., Wang, Y., Yang, K., Mao, K., & Ma, F. (2020). Genome-wide analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding gene family in apple (*Malus domestica*) and functional characterization of MdLhcb4.3, which confers tolerance to drought and osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.022>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

At	Arabidopsis thaliana (huseníček rolní)
Atlhcb8	linie s transformovaným AtLHCB8
C2	dimerní jádro PSII
C2S2M2	forma superkomplexu PSII obsahující dimerní jádro, dva S a dva M trimery
CNV	variabilita počtu kopií CP24 LHCB6 CP26 LHCB5 CP29 LHCB4
ddNTPs	dideoxyribonukleotidy
ddPCR	digitální dropletová PCR
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	deoxyribonukleotidy
EB	eluční pufr
F0	minimální fluorescence chlorofylu
FAST	technologie pro selekci semen založená na jejich fluorescenci
Fm	maximální fluorescence chlorofylu
FS	fotosyntéza
Fv/Fm	maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII
GFP	zelený fluorescenční protein
HL	záření o vysokých intenzitách
Chl	chlorofyl
LB médium	lysogenní bujón, médium využité pro pěstování E. coli
LHC	světlosběrný komplex
LHCII	světlosběrný komplex II
LHCs	světlosběrné komplexy
oelhcb8	homozygotní overexpresní linie
OLE1	protein oleosin 1
PB pufr	fosfátový pufr
PC	vazebný pufr pro navázání DNA na membránu (izolace DNA)
PCR	polymerizační řetězová reakce
PE pufr	promývací pufr
PL1	lyzační pufr (izolace DNA)
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PSII-LHCII	superkomplex fotosystému II
PW1, PW2	promývací pufr
TAE	tris-acetát-ethylendiamintetraoctová kyselina
T-DNA	transferová DNA
TE pufr	Tris-EDTA pufr
WT	divoký typ
YEB médium	médium pro růst A. tumefaciens