

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Pavel Brázda

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Detekce virového transgenů v transgenních
rostlinách hrachu (*Pisum sativum* L.)**

Bakalářská práce

Pavel Brázda

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením
Doc. RNDr. Milana Navrátila, CSc. s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za pomoc při tvorbě práce a cenné odborné rady, dále bych chtěl poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D., Mgr. Janě Petrusové, RNDr. Petru Nádvoříkovi, Ph.D. a Janě Veselské.

SOUHRN

Viry způsobují významné ekonomické ztráty na plodinách. Tyto ztráty je možno snížit používáním rezistentních plodin. Rezistentní kultivary lze získat klasickým šlechtěním nebo transgenozí. Nejefektivnějším způsobem jak získat rezistentní plodiny je aktivovat post-transkripční umlčování specificky proti danému viru vnesením transgenu, který při transkripci vytváří vlásenku mezi „sense“ a „antisense“ sekvencí vlastního nukleotidového řetězce.

V experimentální části bakalářské práce bylo testováno, zda v rostlinách transformovaného hrachu odrůdy RAMAN T2 a T3 generace je přítomen transgen. Transgen byl detekován nepřímo v rostlinách T2 a T3 generace pomocí PCR s primery 35S F/R, které amplifikovaly úsek 35S promotoru. Transgen v rostlinách T3 generace byl přímo detekován pomocí dot blot hybridizace se specifickou sondou značenou digoxigeninem.

SUMMARY

Viruses cause high economical losses to crops. By using resistant crops it is possible to decrease these losses. Resistant cultivars can be gained by classical breeding or transgenesis. The most effective way of gaining resistant plants is to activate specific post-transcriptional gene silencing against given virus by inserting transgene which forms a hairpin between *sense* and *antisense* sequence of respective nucleotide strand during transcription.

In experimental part of this bachelor thesis, transformed pea plants of the cultivar RAMAN of the T2 and T3 generation were tested for the presence of the transgene. The transgene was indirectly detected in T2 and T3 generation via PCR using 35S F/R primers which amplified the 35S promotor of the transgene. The transgene in T3 generation was directly detected via dot blot hybridization with specific digoxigenin-labelled probe.

OBSAH

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 9 |
| 2 | CÍLE PRÁCE | 10 |
| 3 | SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY | 11 |
| 3.1 | Virus mozaiky hrachu přenosné semenem | 11 |
| 3.2 | Transgenoze | 11 |
| 3.2.1 | Golden rice | 11 |
| 3.2.2 | Bt-kukuřice | 12 |
| 3.3 | Rezistence | 12 |
| 3.4 | Rezistence rostlin pomocí PTGS (Post-transcriptional gene silencing) | 13 |
| 3.4.1 | Objevení PTGS | 13 |
| 3.4.2 | Post-transkripční umlčování genů | 14 |
| 3.4.3 | Využití PTGS | 14 |
| 3.4.4 | Detekce a stanovení počtu kopií transgenu | 15 |
| 3.4.4.1 | Invader assay | 16 |
| 3.4.4.2 | Southern blot hybridizace | 17 |
| 3.4.4.3 | Kvantitativní PCR | 18 |
| 4 | MATERIÁL A METODY | 21 |
| 4.1 | Biologický materiál | 21 |
| 4.2 | Pufry pro izolaci DNA, elektroforetickou separaci a dot blot hybridizaci | 22 |
| 4.3 | Použité přístroje | 23 |
| 4.4 | Izolace DNA | 23 |
| 4.5 | PCR detekce transgenu v transformovaných rostlinách hrachu | 25 |
| 4.6 | Detekce transgenu pomocí dot blot hybridizace | 26 |
| 4.6.1 | Syntéza DIG sondy | 26 |
| 4.6.2 | Testování aktivity PSbMV-P sondy | 27 |
| 4.6.3 | Optimalizace Dot blot hybridizace | 29 |
| 4.6.4 | Detekce transgenu pomocí Dot blot hybridizace | 30 |
| 5 | VÝSLEDKY | 32 |
| 5.1 | Izolace DNA | 32 |
| 5.2 | Detekce transgenu | 33 |
| 5.2.1 | Detekce transgenu pomocí PCR | 33 |
| 5.2.2 | Přímá detekce transgenu pomocí dot blot hybridizace | 35 |

| | | |
|---|------------------------------------|----|
| 6 | DISKUZE | 38 |
| 7 | ZÁVĚR | 40 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 41 |
| 9 | LITERATURA | 43 |

1 ÚVOD

Již od počátku své existence člověk ovlivňovat prostředí kolem sebe. Domestikoval si různá zvířata a začal cíleně pěstovat vybrané plodiny. Během staletí křížil vybrané druhy zvířat a plodin, aby získal pokud možno maximální výtěžek s minimálním vkladem. Díky jeho snaze si v dnešní době můžeme vybírat z nepřeberného množství odrůd kulturních rostlin a plemen domestikovaných zvířat.

Vyšlechtění nové odrůdy trvá dlouhou dobu a ne pokaždé se podaří získat požadovaný znak či vlastnost. Některé znaky nebo jejich kombinace není možné normálním křížením získat. V dnešní době se stále většími znalostmi z oblasti molekulární biologie, genetiky, cytologie, fyziologie, ale i jiných věd je možné toto vylepšování urychlit. Tam, kde by šlechtitel strávil půl života na vyšlechtění nové odrůdy, lze nyní tuto dobu podstatně zkrátit. Vnesením požadovaného genu či souboru genů do organismu vznikne geneticky modifikovaný organismus nesoucí nové vlastnosti. Podle zákona 78/2004 Sb. O nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty je geneticky modifikovaný organismus každý, kterému byla změněna genetická informace genetickou modifikací tj. vnesením nukleové kyseliny způsobem, kterého nelze dosáhnout přirozenou rekombinací. Způsob inserce je podle výše uvedeného zákona důležitý, protože rozhoduje o tom, zda se bude organismus považovat za GMO.

Většina geneticky modifikovaných organismů vzniká za nějakým účelem. Některé jsou určeny pouze k prováděnému výzkumu, zatímco jiné byly navrženy tak, aby nějakým způsobem pomohly člověku. Jedná se například o zvýšení rezistence rostlin k patogenům, konkrétně k ječmeni (*Hordeum vulgare* L.) proti viru žluté zakrslosti ječmene (BYDV). Ječmen obsahoval transgen BYDV polymerázy v „sense“ a „antisense“ orientaci, která měla tvořit vlásenku a aktivovat post-transkripční umlčování. Devět z 25 linií transformovaných rostlin vykazovalo vysokou rezistenci (Wang a kol. 2000).

2 CÍLE PRÁCE

- Shromáždění literatury a vypracování literární rešerše na téma detekce transgenu v transformovaných rostlinách.
- Optimalizace izolace DNA z rostlin hrachu pro detekci transgenu.
- Stanovení transgenu v transgenních rostlinách hrachu.

3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

3.1 Virus mozaiky hrachu přenosné semenem

Virus mozaiky hrachu přenosné semenem (PSbMV) je systematicky zařazen do čeledi *Potyviriidae* rodu *Potyvirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdB/ICTVdB>). Genom PSbMV je tvořen jednovláknovou „positive-sense“ RNA (ribonukleová kyselina). Vlákničitá virová částice je chráněna kapsidou složenou z obalových proteinů. Kapsida již není obalena. Jedním z významných hostitelů je například hrách (*Pisum sativum* L.). Příznaky napadení tímto patogenem u hrachu jsou svinutka listů, vybělení žilek, častá sterilita a zdeformovaná semena. PSbMV způsobuje nemalé škody na úrodě a rezistencí plodin by se tomu dalo předejít například vložením části genetické informace viru do hrachu a navozením indukované rezistence.

3.2 Transgenoze

Transgenoze je postup, při kterém je vložen cizí gen do genomu jiného organismu. Inzertovaný gen může pocházet i z genetické informace hostitele např. za účelem sledování jeho zvýšené nebo snížené exprese. V dnešní době je známo několik způsobů, jak vložit transgen do rostlin. K získání transgenních plodin se používá například mikrobombardování, elektroporace nebo vložení transgenu pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Brown 2006; Ondřej a Drobník 2002). V dnešní době je možné se setkat s mnohými transgenními plodinami. Uvedu pouze dva vybrané případy: Golden rice a bt-kukuřici.

3.2.1 Golden rice

Tradiční odrůdy rýže (*Oryza sativa* L.) neobsahují β -karoten, prekurzor vitamínu A, v endospermu. Jeho nedostatek způsobuje lidem problémy se zrakem. Obohacením rýže o β -karoten se tomu pomůže předcházet. K dosažení produkce kompletního β -karotenu v rýži bylo nutno vložit do rostlin rýže geny pro fytoensyntasu,

fytoendesaturasu a lykopen- β -cyklasu. Tyto vložené geny umožnily transgenní rýži syntetizovat β -karoten v endospermu a zvýšit její nutriční hodnotu (Ye a kol. 2000).

3.2.2 Bt-kukuřice

Jiným příkladem transgenních organismů jsou bt-plodiny. Název těchto rostlin pochází od bakterie *Bacillus thuringiensis*, která produkuje insekticidní protein. Využitím funkce proteinu získáme rezistentní rostliny proti býložravým motýlům (*Lepidoptera*) pomocí genetického inženýrství. Příkladem konkrétní rostliny může být kukuřice (*Zea L.*). Kukuřice je napadána asijským zavíječem kukuřičným (*Ostrinia furnacalis*). Do této rostliny byl vnesen gen kódující aktivní insekticidní protein (ICP) z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Tento protein je pro zavíječe toxický. Transgenní rostliny měly dostatečnou expresi ICP (s výjimkou pylu) na to, aby usmrtily 95 % larev asijského zavíječe kukuřičného (He a kol. 2003).

3.3 Rezistence

Pokud má hostitel schopnost klást odpor invazivnímu patogenu, definujeme tuto schopnost jako rezistenci. Rezistence není statickou veličinou a její stupeň se mění v průběhu stáří rostliny, vlivem předcházející infekce a dalších biotických a abiotických faktorů. Projevuje se pouze ve spojení hostitele s určitou rasou nebo kmenem patogena. Indukovanou rezistencí je charakterizován stav, kdy se zvýší hladina rezistence vůči patogenu (Kúdela a kol. 1989).

Přirozená rezistence vůči virům je dána přítomností R genů rezistence v genetické informaci hostitele (Fraser 1987). Mezi rostlinou a patogenem při geneticky řízené rezistenci probíhají interakce mezi faktory typu rezistence-vnímavost a virulence-avirulence. Tyto vztahy určí, zda napadená rostlina bude rezistentní, nebo vnímavá k určitému patogenu. Interakci rostlina-virus je možné popsat pomocí tří modelů. První - pozitivní - model předpokládá, že rezistentní rostlina produkuje inhibitor replikace viru. Pokud inhibitor interaguje s odpovídajícím produktem virového genu, je replikační cyklus viru inhibován a výsledkem je rezistence rostliny proti virové infekci. Pokud k primární interakci nedojde, bude umožněna infekce rostliny.

Druhý - negativní - model vychází z předpokladu, že hostitelská rostlina má protein, který po interakci s virem umožní produktivní infekci a rostlina bude vnímavou. Nehostitelská rostlina nenesse tento protein schopný interakce s virem, a tedy nedojde k produktivní infekci.

Výsledkem posledního modelu není „všechno, nebo nic“ jako u předcházejících dvou modelů, ale kvantitativní interakce produktů genů, které podle ustanovení rovnováhy reakce rozhodnou o rezistenci, nebo o vnímavosti hostitele.

Genetickým inženýrstvím lze umožnit rostlinám specificky se bránit pomocí indukované rezistence. Dva hlavní mechanismy indukované rezistence vůči virům jsou rezistence zprostředkovaná obalovým proteinem a zprostředkovaná RNA (Gal-On a Shibolet 2006).

Infekci buňky provází rozbalování viru z kapsidy. Uvolněním virové genetické informace nastává replikace viru využitím proteosyntetického aparátu buňky. Infekci se dá předejít transformací rostliny. Transgenní rostlina může obsahovat gen pro virový obalový protein, ze kterého se sestavuje kapsida. Transgenní protein bude exprimován a jeho nadbytek může zamezit rozbalení virové částice a uvolnění virové nukleové kyseliny (Lin a kol. 2007). Druhou strategií je rezistence zprostředkovaná post-transkripčním umlčováním genů popsaná v kapitole 3.4.

3.4 Rezistence rostlin pomocí PTGS (Post-transcriptional gene silencing)

3.4.1 Objevení PTGS

Post-transkripční umlčování (PTGS) bylo objeveno týmem Napoliho při vložení chimérického genu pro chalcon syntasu do petúnie (*Petunia hybrida* L.) (Kanazawa a kol. 2008). Chimérický transgen obsahoval 35S promotor a cDNA kódující sekvenci pro chalcon syntasu, která je klíčovým enzymem v biosyntéze flavonoidů. Napoli a kol. (1990) očekávali tmavější barvy květů petúnie, transformované rostliny však vykazovaly na rozdíl od rodičovských fenotypů bílé květy, nebo květy s tmavým podkladem a bílými sektory. Transgenní rostliny nesoucí odlišné barvy květů ve srovnání s rodičovskými měly dramaticky sníženou expresi endogenního genu.

3.4.2 Post-transkripční umlčování genů

Post-transkripční umlčování genů je proces, který vedle regulace exprese genů může vést ke snížení exprese (trans)genů nebo replikace viru v případě indukované rezistence. PTGS v průběhu indukované rezistence je spuštěno buď překonáním limitní koncentrace produkované RNA odvozené od transgenů, nebo je jeho aktivace spojována s přítomností tandemových, obrácených repetitiv (Kooter a kol. 1999). Stamm a kol. (1997) uvádí podobně jako Kooter a kol. (1999), že aktivace PTGS doprovází vícekopiové místa inserce transgenů. Tang a kol. (2006) zjistili, že pokud se objeví tři kopie transgenů na stejném chromozomu je vysoká pravděpodobnost, že budou post-transkripčně umlčeny. S větším počtem kopií transgenů na stejném chromozomu roste i pravděpodobnost umlčení 76,5 % se 4 kopiemi a 94,3 % u 7 kopií. PTGS může být ještě spuštěno i meziprodukty během replikace RNA virů nebo z transkriptů vytvářejících vlásenku (Xie a kol. 2004).

Ať je příčinou vysoce pravděpodobné aktivace PTGS kterýkoli z výše uvedených způsobů (hybridizace komplementární RNA z repetitiv, překonání limitní koncentrace RNA, syntéza komplementárního řetězce k ssRNA pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy), dojde k vytvoření dsRNA (Xie a kol. 2004), která spustí PTGS (Kanazawa 2008). Multipodjednotkový typ enzymu RNAasy III, DICER, rozpoznává dsRNA a štípe ji na malé dsRNA. Naštípaná dsRNA se nazývá siRNA (small interfering RNA). Tyto malé RNA fragmenty jsou dlouhé 21-25 nukleotidů s přesahem 2-3 nukleotidů na 3' konci (Waterhouse a kol. 2001). Multipodjednotkový komplex RISC (RNA-induced silencing complex) degraduje za účasti siRNA komplementární RNA transkript (Travella a Keller 2009). Vytvořené siRNA se nutně nemusí inkorporovat do RISC, ale mohou hybridizovat s dalšími RNA transkripty. Následně enzym RNA-dependentní-RNA polymeráza použije hybridizované siRNA jako primery a dosyntetizuje komplementární řetězec za vytvoření dsRNA. Vzniklá dsRNA opět slouží jako substrát pro DICER. Výsledkem je post-transkripční umlčení replikace RNA viru, transgenů a endogenního genu přítomností ještě většího počtu siRNA v buňce, které zabraňují další expresi komplementární RNA.

3.4.3 Využití PTGS

PTGS lze využít k vytvoření transgenních rostlin rezistentních vůči určitému patogenu. Například Vassilakos a kol. (2008) získali rezistentní rostliny tabáku transformované genem 57K „read-through“ virovou polymerázou viru nekrotické kadeřavosti tabáku (TRV).

K experimentům byly použity geograficky a sérologicky odlišné izoláty viru TRV. Po mechanické inokulaci transgenních rostlin na list se u rostlin infikovaných izolátem TVR-PpK20 projevila vysoká rezistence, nižší byla pozorována po inokulaci vysoce patogením izolátem TRV-GR. Získaná rezistence byla efektivní i proti přirozené infekci tj. viru přenášeném hlísticemi (*Trichodorus similis*, *Paratrichodorus pachydermus*), kdy vysokou rezistenci vykazovaly transgenní rostliny inokulované izolátem PpK20 a naopak nízkou rezistenci transgenní rostliny vůči izolátu TRV-GR. Jedna třetina transgenních rostlin po inokulaci kořene izolátem viru PpK20 vykazovala infekci kořene, narozdíl od kořenů rostlin inokulovaných TRV-GR byla přítomna infekce u všech transgenních rostlin.

Chen a kol. (2004) studovali, jaké procento rezistentních rostlin získají transformací tabáku (*Nicotiana benthamiana* L.) delší (větší pravděpodobnost aktivace PTGS) nebo kratší obrácenou repeticí transgenu odvozeného z virové RNA 2 viru mozaiky okurky (CMV). Druhý cíl autorů byl, jaké procento transformovaných rostlin bude rezistentní vůči CMV, pokud budou obsahovat jen „sense“, nebo „antisense“ orientace transgenu. Transformanti obsahující delší obrácenou repetici v R0 generaci vykazovali vysokou rezistenci v 75 % testovaných rostlin, ale transgenní rostliny obsahující kratší konstrukt byly rezistentní pouze v 30 % testovaných rostlin. Prokazatelně nižší rezistenci maximálně do 21 % testovaných rostlin bylo získáno z rostlin odvozených od konstruktů pouze v „sense“, nebo „antisense“ orientaci.

3.4.4 Detekce a stanovení počtu kopií transgenu

Hlavním cílem experimentální části práce bylo stanovit přítomnost transgenu v transformovaných rostlinách hrachu. PCR (polymerázová řetězová reakce) detekci lze využít pro „screening“ primárních transformantů tj. k detekci studovaného genu v jejich genetickém materiálu. Srivastava a Raj (2008) vnesli do rostlin tabáku (*Nicotiana benthamiana* L.) transgen, který byl odvozen z obalového proteinu viru mozaiky okurky (CMV). Primární transformanti byli detekováni pomocí PCR se specifickými primery. Výsledek PCR analýzy T0 generace transformantů byl, že 84 % rostlin neslo stanovovaný transgen.

Další, kteří použili PCR k detekci transgenu, byli Fan a kol. (2009), kteří stanovili přítomnost obalového proteinu pocházejícího z *Papaya ringspot virus* (PRSV)

v papáji (*Carica papaya* L.). Pomocí PCR detekovali 35S promotor, terminátor i transgen. Získané PCR výsledky byly specifické a reprodukovatelné.

Pomocí PCR lze zjistit, zda daná potravina obsahuje příměs transformovaných rostlin. Hurst a kol. (1999) zkoušeli zda může být použita PCR k detekci GMO (geneticky modifikovaných organismů) v potravinách. Provedli PCR se směsnými vzorky netransformované a transgenní sóji (Roundup ready) a kukuřice (Event 176). Zjistili, že PCR je dostatečně citlivá na detekci směsného vzorku sušiny do 0,01 % obsahu transgenní sóji a do 0,001 % obsahu transgenní kukuřice ve směsi s netransformovanými rostlinami. Podobného výsledku dosáhli i Lee a kol. (2009). Dokázali stanovit příměs transgenní sóji (Roundup ready) v brukvi řepce olejce (*Brassica napus* L.) do 0,01 % pomocí LAMP (loop mediated isothermal amplification) techniky. K detekci transgenů použili obvykle používanou sekvenci 35S promotoru a terminátoru pro gen nopalín syntasy. Pro každou sekvenci bylo navrženo 6 primerů, které amplifikovaly daný úsek.

LAMP technika je postavená na navržení 4 primerů tak, aby byly schopny tvořit vlásenky z produktu reakce při konstantní teplotě. Dva z použitých primerů obsahují na 5' konci obrácenou sekvenci, která je přítomna ještě jednou po směru syntézy produktu, proto dochází k vytváření vlásenek (Notomi a kol. 2000). Lee a kol. (2009) použili o 2 primery více, protože užitím 6 místo 4 primerů je dosaženo lepší citlivosti reakce (Nagamine a kol. 2002).

3.4.4.1 Invader assay

Pro detekci přítomnosti transgenů je ve většině případů využita PCR. Samotná technika PCR ale nedá informaci o počtu kopií transgenů (s výjimkou její varianty kvantitativní PCR). Toto číslo udává, kolikrát se do genomu transgen vložil. Gupta a kol. (2008) použili relativně novou techniku non PCR-based Invader assay ke zjištění počtu kopií. Invader assay je založena na vniknutí (invazi) oligonukleotidu mezi hybridizovanou sondou a templát. Část sondy, která po invazi oligonukleotidu, nehybridizuje k templátu je odštěpena „cleavase“ enzymy. Navázáním odštěpeného raménka první sondy na druhou sondu obsahující fluorofor sousedící se zhášečem, dojde k odštěpení fluoroforu a vzniku signálu.

Invader assay byla užita ke stanovení nízkého počtu kopií (tj. 1 až 2) genu pro inositol transferasu (IMT) v kukuřici (Gupta a kol. 2007). Získané výsledky korelovaly s analýzou pomocí Southern blot hybridizace. K určení počtu kopií transgenů pomocí

Invader assay byla připravena kalibrační křivka obsahující 1 až 16 kopií IMT transgenů, a to pomocí ředění IMT plazmidu roztokem DNA získané z netransformovaných rostlin kukuřice. Stejně tak byla celková genomická DNA 4-kopiové transgenní kukuřice rozředěna s netransformovanou DNA k simulaci 1-3 kopií a byla provedena technika Invader assay. Výsledky s pomocí Invader assay byly porovnány se stanovením pomocí Southern blot hybridizace, kde byla zjištěna vysoká korelace u transgenních plodin obsahujících nízký počet kopií.

3.4.4.2 Southern blot hybridizace

Namísto Invader assay, která je spolu s kvantitativní-PCR (qPCR) relativně nově používanou technikou k určení počtu kopií transgenů, je Southern blot hybridizace klasicky používanou technikou k tomuto účelu. Stanovení počtu kopií transgenů pomocí Southern blot hybridizace spočívá buď v rozštípnutí místa uvnitř, nebo blízko transgenů restrikční endonukleásou a následné elektroforetické separaci vniklých segmentů. Po přidání specifické sondy hybridizující s transgenem, je možné detekovat segment(y) transgenů. Pokud bude transgen specificky rozstřižen restrikční endonukleásou se vzácným štěpným místem ne uvnitř konstruktů, ale na jednom či druhém konci, tak po hybridizaci se sondou budou na nylonové membráně patrné bandy větší než původní velikost konstruktů a jedna kopie bude reprezentována jedním bandem. Využitím vzácného štěpného místa uvnitř transgenů se po hybridizaci se sondou objeví naopak dva hybridizační signály (Yuan a kol. 2007). K určení počtu kopií transgenů je možné využít Southern blot hybridizace za předpokladu, že bude na membráně stejné množství DNA, protože intenzita signálu se může lišit. Důvodem je skutečnost, že ve výsledku ze Southern blot hybridizace pak není snadné odhalit přítomnost tandemových repetitivních obsažených v transgenů. Jednou z možností jak tomu předejít je zařazení vnitřního standardu spolu s testovanými rostlinami. Druhou možností, jak odhalit u testovaných rostlin případné tandemové repetice v transgenů, je provést Southern blot hybridizaci hodnocených rostlin s „falešnými“ transformovanými rostlinami, tj. vytvořením jednokopiových a vícekopiových „transformantů“ přidáním různě naředěného plazmidu k netransformovaným rostlinám (Bhat a Srinivazan 2002).

Tougou a kol. (2006) chtěli vytvořit rezistentní rostliny sóji (*Glycine max* L.) proti *Soybean dwarf virus* (SDV), a tak transformovali rostliny sóji obrácenou repetitivní obalového proteinu SDV oddělenými genem pro β -glukuronidasu (GUS).

U tří rostlin T0 generace stanovili počet kopií transgenů vložených do genomu pomocí Southern blot hybridizace, kde detekovali až 9 restričních fragmentů (9 kopií).

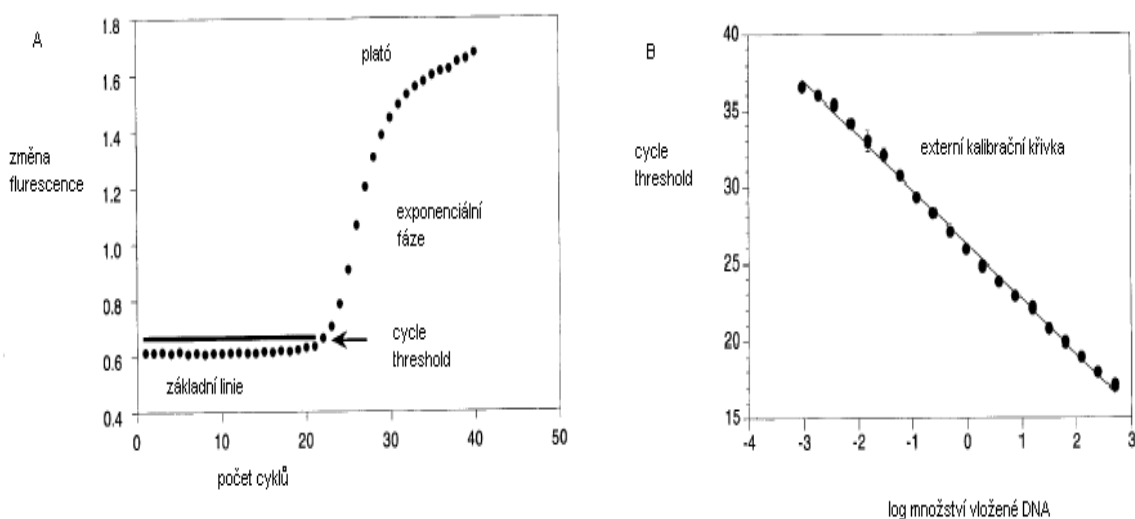
Srivastava a Raj (2008) stanovovali pomocí Southern blot hybridizace počet kopií transgenů (obalového proteinu viru mosaiky okurky) vložených do genomu transformovaného tabáku (*Nicotiana benthamiana* L.). Byl proveden „screening“ 14 transgenních linií T0 generace. K nastříhání genomické DNA byla použita endonukleáza *HindIII*, která měla jediné cílové místo v transgenu. DNA byla poté fixována na membránu a hybridizována se sondou. Dvě z linií, které byly vybrány pro další experimenty, měly pouze 1 kopii transgenů v genomu a byly dále testovány na rezistenci proti viru mosaiky okurky. Vybrané linie vykazovaly kompletní rezistenci proti viru.

Podobně charakterizovali počet kopií vloženého transgenů i Youk a kol. (2009) v transgenních rostlinách melounu (*Citrullus lanatus* L.), který nadexprimoval obalový protein viru zeleno-skvrnitě mozaiky okurky (CGMMV). Pomocí Southern blot analýzy detekovali jednu kopii transgenů CGMMV-CP. Použité restriční endonukleázy (*AflIII*, *BamHI*, *BglII*) měly cílové místo uvnitř transgenů, ale ne sekvenci hybridizující se sondou. Jeden hybridizační band proto odpovídal 1 kopii v genomu. Autoři zjistili, že transformované rostliny obsahují jednu kopii transgenů.

3.4.4.3 Kvantitativní PCR

Na rozdíl od určení počtu kopií Southern blot hybridizací není stanovení pomocí kvantitativní PCR tak drahé, časově náročné a nevyžaduje 10 µg vzorku (Yuan a kol. 2007). Technika real-time PCR umožňuje detekci a měření PCR produktu po každém cyklu v reálném čase. Real-time PCR se od standardní PCR odlišuje v podstatě tím, že ve směsi je přítomna chemikálie, která nám oznamuje po každém cyklu množství PCR produktu. Variantou real-time PCR je využití kvantitativní PCR (qPCR) k určení počtu kopií, kterou se budu dále zabývat. Probíhající reakci zaznamenává real-time PCR cykler do grafu (Obr.1 A). Na ose y v grafu je umístěna změna fluorescence a na ose x se nachází počet cyklů. V průběhu reakce se utváří charakteristická křivka, která se dělí na základní linii, exponenciální fázi a plató v horní části. Souběžně s základní linií běží tzv. práh cyklu (cycle threshold), který protíná křivku v bodě. Tento bod je charakterizován větší fluorescencí než pozadí. Od tohoto bodu se tvoří reprodukovatelná data z grafu (Arya a kol. 2005).

Obr. 1 Výstupy z real-time PCR cyklieru (upraveno podle Heid a kol. 2010)



Pomocí hodnot z grafu je možno vytvořit externí kalibrační křivku (Obr. 1 B), pokud byl standard rozředěn 10^x . Nejdříve začíná exponenciálně růst největší koncentrace standardu v grafu, nejpозději stoupá nejméně koncentrovaná. Na ose x je nanášen logaritmus vložené koncentrace standardu a na ose y cycle threshold. Z rovnice vytvořené kalibrační křivkou lze určit počet kopií transgenů (Gachon a kol. 2004).

Druhým způsobem je stanovení pomocí interního retenčního genu a transgenů. Interní referenční gen by se měl exprimovat stále stejně v průběhu vývoje a růstu. Určuje se kolikrát se liší fluorescence interního referenčního genu a vzorku (Arya a kol. 2005).

Pro vizualizaci PCR reakce tzv. „real-time“ je mnoho způsobů. Je možné použít fluorescenční chemikálie, sondu s fluoroforem, nebo primery s modifikovanými nukleotidy. Nejvíce používaný je fluorofor SYBR Green, který po přidání do reakční směsi se bude vmezeřovat do dsDNA a pouze poté bude fluoreskovat. Výhodou jeho použití je jeho univerzálnost a nízká cena. Naproti tomu TaqMan chemismus je založen na syntéze sondy s fluoroforem na 5' konci a zhášečem na 3' konci. Princip pak spočívá v odstřižení fluoroforu Taq polymerázou při syntéze druhého vlákna a jeho následné fluorescenci. Poměrně nedávnou alternativou k TaqMan sondě je LNA. LNA (locking nucleic acids) se odlišuje od TaqMan sondy v tom, že obsahuje modifikované nukleotidy. Při navázání LNA sondy na cílovou sekvenci modifikované nukleotidy změní konformaci a uzavřou tuto strukturu na cílovém místě. LNA sondy mají zvýšenou teplotu tání, jsou kratší a mnohem více specifické v porovnání s TaqMan sondami (Gašpaříč a kol. 2008).

Podobné TaqMan sondám jsou „scorpions“ sondy a molekulární majáky (molecular beacons). Obě metody vychází z vlásenky utvořené ze sondy, kdy jsou fluorofor a zhášec blízko sebe a dochází k rozrušení vlásenkové struktury při hybridizaci k templátu za vzniku fluorescence (Heid a kol. 1996).

Další alternativou k vizualizaci qPCR je Plexor technologie. Plexor nevyužívá sondu se zhášecem a fluoroforem, ale modifikovaný nukleotid s fluoroforem na 5' konci jednoho z primerů. Největší signál je na začátku reakce a postupně se snižuje s tím, jak je k modifikovaným nukleotidům na 5' konci produktu řazen v opačném řetězci zhášec. Plexor je možné využít především tam, kde je předností citlivost, nízká cena a jednoduchost (Gašpaříč a kol. 2008).

Yi a kol. (2008) stanovovali počet kopií transgenů (GFP) pomocí qPCR v transgenním bavlníku (*Gossypium hirsutum* L.) u 28 rostlin T₀ generace, které byly transformovány GFP (green fluorescent protein) genem a selektivním genem pro neomycin fosfotransferasu II (NPTII). K určení počtu kopií GFP a NPTII v genomu bavlníku použili metodu stanovení pomocí endogenního referenčního genu ubiquitin-konjugujícího enzymu (UBC1). Analýza 28 T₀ transformantů ukázala, že 2 transgenní rostliny neobsahují GFP a ostatní obsahují jednu nebo více kopií GFP (třináct rostlin obsahuje jednu kopii GFP, tři rostliny 2 kopie GFP, tři rostliny 3 kopie GFP a sedm rostlin více kopií GFP). Podobné výsledky byly získány analýzou rostlin pomocí Southern blot hybridizace, ale u sedmi transgenních rostlin bylo přítomno více kopií GFP pomocí real-time PCR než Southern blot hybridizace. Autoři odůvodnili tento nesouhlas nedostatečnou separací segmentů DNA v agarosovém gelu a dospěli k přesvědčení, že jejich qPCR je v určování počtů kopií přesnější Southern blot hybridizace.

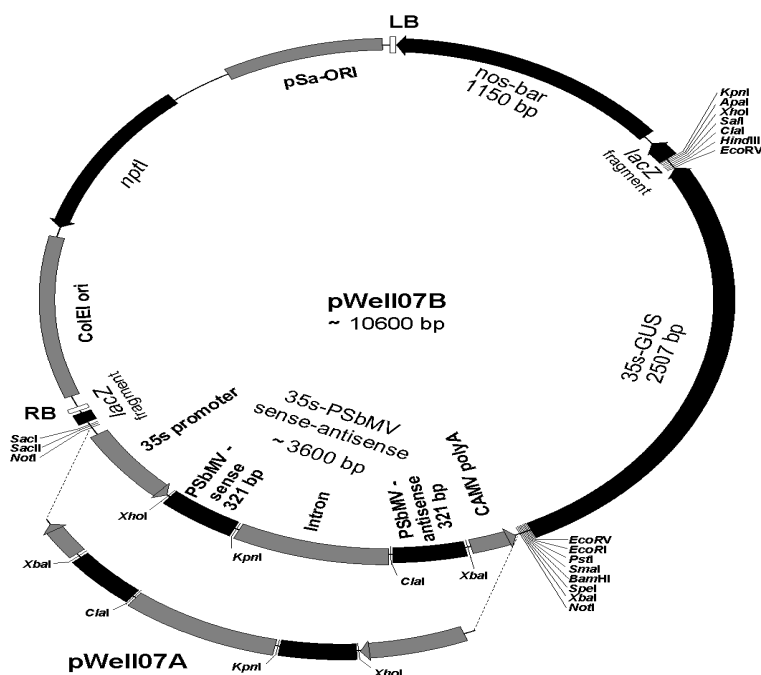
Schmitt a Parrot (2001) využili qPCR k ověření počtu kopií transgenů dříve určených transformovaných rostlin sóji (*Glycine max* L.), obsahující transgen bt-insekticidní gen Cry1Ac z *Bacillus thuringiensis*, a transformovaných rostlin podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.), obsahující hygromycin B fosfotransferasu, pomocí Southern blot hybridizace. Určení počtu kopií bylo provedeno jak metodou standardní křivky, tak metodou stanovení pomocí referenčního genu (genu pro lektin). Bylo zjištěno, že transgenní sója buď neobsahuje kopii, nebo obsahuje až dvě kopie transgenů a že transgenní podzemnice olejná obsahuje 2 kopie genu pro hygromycin B fosfotransferasu. Jejich výsledky se shodovaly s určením počtu kopií transgenů pomocí Southern blot hybridizací.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Transformované rostliny hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN linie 10025 byly získány ve spolupráci se společností Agritec výzkum, šlechtění a služby s.r.o. Šumperk, Mendelovou univerzitou v Brně, Univerzitou Palackého v Olomouci a Výzkumným ústavem pěstivařským spol. s.r.o. Troubsko. K transformaci rostlin byl použit plazmid pWell07A, který obsahoval transgen obalového proteinu (CP) odvozený od viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Konstrukt transgenu (PSbMV-CP) je složen z 35S promotoru, „sense“ a „antisense“ segmentu sekvence plášťového proteinu viru semenem přenosné mozaiky hrachu, intronu vloženého mezi „sense“ a „antisense“ sekvence a CAMV polyA sekvence (Obr. 1).

Obr. 1 Plazmid pWell07A obsahující transgen (PSbMV-CP)



Převzato od Doc. RNDr. Milana Navrátila, CSc.

Ke zjištění přítomnosti transgenu PSbMV CP byly použity transformované linie hrachu (*Pisum sativum* L.) kultivaru RAMAN T2 a T3 generace, které byly inokulovány virem PSbMV, a netransformované rostliny hrachu odrůdy RAMAN jako negativní kontroly.

Semena rostlin byla vyseta do substrátu Classman 4. Rostliny byly kultivovány ve fytotronu 16 hodin den při 22 °C a 8 hodin noc při 18 °C.

4.2 Pufry pro izolaci DNA, elektroforetickou separaci a dot blot hybridizaci

| | |
|--------------------------|--|
| Extrakční pufr: | 100 mmol/l Tris-HCl, pH 7,8 0,5 mol/l NaCl 50 mmol/l EDTA těsně před použitím přidat do 1 ml pufru 3 µl metkaptoetanolu |
| TE pufr: | 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8 1 mmol/l EDTA, |
| TAE pufr: | 40 mmol/l Tris-báze, pH 7,8 10 mmol/l octanu sodného 1 mmol/l EDTA; 28 mmol/l kys. octové |
| Pufr kyseliny maleinové: | 0,1 mol/l maleinové kyseliny, pH 7,5 (pevný NaOH) 0,15 mol/l NaCl |
| SSC pufr 20x: | 3 mol/l NaCl 0,3 mol/l dihydrátu citranu sodného, pH 7 |
| Prehybridizační pufr: | 5x SSC 0,1% SDS 1x blokovací reagens (Roche) |
| Promývací pufr 1: | 0,2x SSC 1% SDS |
| Promývací pufr 2: | 0,1x SSC 1% SDS |
| Promývací pufr 3: | 0,1 mol/l maleinové kyseliny, pH 7,5 0,15 mol/l NaCl 0,3% Tween 20 |
| Blokovací reagens (10%): | 10g blokovacího reagens (Roche) rozpustit v 90 ml pufru kyseliny maleinové |
| Detekční pufr: | 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 9,5 0,1 mol/l NaCl |

4.3 Použité přístroje

| | |
|-----------------------------|--|
| Spektrofotometr | Nanodrop 1000, Thermo scientific, Biotech |
| Minitřepačka | 231, IKA Works Inc. |
| Centrifugy | Spectrafuge mini C1301, Labnet international Inc. MR22i Jouan, Trigon-plus Biofuge pico, Heraeus, Kendro Laboratory products |
| Vodní lázeň | Grant sub, P-lab a.s. |
| Lyofilizátor | Speed Vac SPD 111, Thermo Savant |
| Termocyklery | T-personal B/M, Whatman Biometra Thermocycler TC-XP, Bioer |
| Elektroforetická komora | Fisherbrand |
| Zdroj stejnosměrného napětí | PowerPack P25, Biometra |
| PCR pracovní stanice s UV | Herolab clean cab plus, Schoeller s.r.o. |
| Orbitální třepačka | OS-10s Biosan, Biotech |
| Inkubátor | TH30, Edmund Bühler GmbH, Trigon plus |

4.4 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly porovnány postupy extrakce pomocí kitu Easy DNA (Invitrogen) a SDS (Delaporta a kol. 1983) s extrahováním fenol-chloroformem (Tel-Zur a kol. 1999). Extrakce DNA prováděná kitem byla provedena dle návodu přiloženému ke kitu a postup u extrakce SDS s fenol-chloroformem jsem uvedl v Postupu 1. K izolaci DNA bylo použito cca 170 mg listu u kontrol a 100 mg listu u transformovaných rostlin. Získaná celková genomická DNA byla rozpuštěna ve 20 μ l TE pufru. Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru.

Postup 1: Izolace DNA pomocí SDS s následným extrahováním fenol-chloroformem

1. Bylo homogenizováno cca 170 mg vzorku listu v třecí misce na ledu s 1 ml extrakčního pufru.
2. Homogenát byl přenesen do 1,5 ml mikrozkuřavky a k němu bylo přidáno 100 μ l 20% SDS.

3. Vzorek byl protřepán, krátce stočen na centrifuze a byl inkubován ve vodní lázni 10 min při 65 °C.
4. Do mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl 5 mol/l octanu draselného, mikrozkušavka byla protřepána a stočena. Vzorek byl umístěn do ledové lázně po dobu 20 minut.
5. Vzorek byl centrifugován 20 minut při 18 000 g při 4 °C. Bylo odpipetováno 700 µl supernatantu do nové 1,5ml mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno 460 µl izopropanolu (99,7%), mikrozkušavka byla několikrát převrácena a umístěna na 30 min. do -20 °C.
6. Supernatant byl odstraněn po centrifugaci 20 minut při 18 000 g při 4 °C, byl přidán 200 µl vychlazeného 70% etanolu a mikrozkušavka byla protřepána.
7. Byla provedena centrifugace 20 min při 18 000 g při 4 °C a supernatant byl odstraněn a sediment byl sušen na lyofilizátoru 15 minut při 50 °C. Sediment byl rozpuštěn v 0,5 ml TE pufru.
8. Bylo přidáno 0,5 ml směsi fenol-chloroform 1:1 (fenol – Sigma, kat. no. 203-632-7, chloroform p. a.) ke vzorku. Vzorek byl protřepán a poté byl centrifugován 10 min při 10000 g při pokojové teplotě.
9. Bylo přepipetováno 400 µl roztoku z horní vodné fáze do nové 1,5ml mikrozkušavky a poté byl zopakován krok 8.
10. Bylo přeneseno 300 µl z horní fáze do nové 1,5ml mikrozkušavky. Ke 300 µl roztoku bylo přidáno 300 µl chloroformu (p. a.).
11. Vzorek byl protřepán, centrifugován 10 min při 10000 g při pokojové teplotě a byla přenesena vodná fáze cca 200 µl do nové 1,5ml mikrozkušavky.
12. Vzorek byl srážen s 0,5 ml izopropanolu (99,7%) po dobu 30 min při -20 °C.
13. Byla provedena centrifugace vzorku po dobu 30 min při 18 000 g při 4 °C. Supernatant byl vylit a mikrozkušavka se nechala odkapat dnem vzhůru na filtračním papíru.
14. K sedimentu bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného 70% etanolu k sedimentu a poté byl zopakován krok 13.
15. Sediment byl vysušen za 20 min při 45 °C.
16. Vzorek byl rozpuštěn v 20 µl TE pufru.

4.5 PCR detekce transgenů v transformovaných rostlinách hrachu

K detekci transgenů v rostlinách hrachu (*Pisum sativum* L.) kultivaru RAMAN linie 10025 T2 a T3 generace byla použita PCR s primery KpnI x XhoI, ClaI x XbaI, KpnI x ClaI. Tyto tři kombinace primerů byly navrženy k amplifikaci „sense“ a „antisense“ sekvence pro PSbMV CP. Dále byly navrženy primery Pavel 1 F/R, Pavel 2 F/R a Pavel 3 F/R pomocí programu PrimerSelect LaserGene (DNASTAR Inc.). K detekci reportérového genu byly použity primery GUS inv F/R (Agritec výzkum, šlechtění a služby s.r.o. Šumperk). Poslední primery, které byly zkoušeny, byly 35S F/R (Agritec výzkum, šlechtění a služby s.r.o. Šumperk) k detekci 35S promotoru.

Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tab. 1. Do PCR bylo vloženo od 50 do 100 ng celkové genomické DNA z transformovaných linií hrachu (*Pisum sativum* L.) kultivaru RAMAN linie 10025 T2 a T3 generace. Podmínky pro jednotlivé reakce jsou uvedeny (Tab. 2). PCR reakční směs pro různé primery byla připravena podle Tab. 3. Objem u všech reakcí činil 20 µl s výjimkou 25 µl pro kombinaci primerů GUS inv F/R. PCR reakce byla provedena na termocykleru a PCR produkty byly separovány elektroforeticky v 1,5% agarose/TAE pufru cca 40 minut při 70 V (agarosa – agarosa 1, Amresco, Biotechnology Grade, kat. no. 0710-500G) v elektroforetické komoře připojené ke zdroji stejnosměrného napětí.

Tab. 1 Sekvence použitých primerů

| Název primeru | Sekvence primeru |
|---------------|-------------------------------------|
| KpnI | 5' - CATTATCTGTCTGAAAGTTGG - 3' |
| XhoI | 5' - CTCGAGACAAGGGTGGAGTAGCA - 3' |
| ClaI | 5' - ATCGATACAAGGGTGGAGTAGCA - 3' |
| XbaI | 5' - TCTAGAGCGCCATTATCTGTCTGAA - 3' |
| 35S R | 5' - GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3' |
| 35S F | 5' - GCT CCT ACA AAT GCC ATC A - 3' |
| GUS inv F | 5' - TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG - 3' |
| GUS inv R | 5' - GATCGCGAAAACCTGTGGAAT - 3' |
| Pavel 1 R | 5' - GCGCCATTATCTGTCTGA - 3' |
| Pavel 1 F | 5' - CAAGTTTTGGCAAGTGGT - 3' |
| Pavel 2 R | 5' - GAGATGTCAACTTGTGCTGGATT - 3' |
| Pavel 2 F | 5' - CCCTGGGGCCTTTTGAA - 3' |
| Pavel 3 R | 5' - ATGACGCACAATCCCCTATC - 3' |
| Pavel 3 F | 5' - AACCCAATTTCCCAACTGTA - 3' |

Tab. 2 Podmínky reakcí s primery

| Kombinace primerů | Podmínky PCR reakce |
|---|---|
| Kpn1 x Xho1 Cla1 x Xba1 Kpn1 x Cla1 | 3 min 95 °C, 35x: 1 min 95 °C, 1 min 51 °C, 1 min 72 °C, 5 min 72 °C Podmínky stejné jako Kpn1 x Xho1, odlišná teplota nasedání primerů 51 °C, Podmínky stejné jako Kpn1 x Xho1, odlišná teplota nasedání primerů 55 °C |
| GUS inv F/R | 2,5 min 95 °C, 35x: 30 s 94 °C, 30 s 56 °C, 30 s 72 °C, 5 min 72 °C |
| Pavel 1 F/R | 2 min 94 °C, 35x: 30 s 94°C, 30 s 50 °C, 30 s 72°C, 7 min 72 °C |
| Pavel 2 F/R | 2 min 94 °C, 35x: 30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 60 s 72 °C, 7 min 72 °C |
| Pavel 3 F/R | Podmínky stejné jako u Pavel 2 |
| 35S F/R | 2 min 94 °C , 35x: 30 s 94 °C, 30 s 51 °C, 30 s 72 °C, 7 min 72 °C |

Tab. 3 Složení směsí pro reakce PCR.

| Kombinace primerů | Složení PCR směsi | Objem reakce (μl) |
|---|---|-------------------|
| Kpn1 x Xho1 Cla1 x Xba1 Kpn1 x Cla1 Pavel 1 F/R 35S F/R | Pufř 1x, MgCl ₂ 1,5 mmol/l, dNTP 200 μmo/l, Primer 0,4 μmol/l, Taq pol 1 U/reakce, vzorek 3 μl | 20 |
| GUS inv F/R | Pufř 1x, MgCl ₂ 1,5 mmol/l, dNTP 200 μmol/l, Primer 0,3 μmol/l, Taq pol 1 U/reakce, vzorek 3 μl | 25 |
| Pavel 2 F/R Pavel 3 F/R | Pufř 1x, MgCl ₂ 1,5 mmol/l, dNTP 200 μmol/l, Primer 0,4 μmol/l, Taq pol 1 U/reakce, vzorek 2 μl | 20 |

4.6 Detekce transgenů pomocí dot blot hybridizace

K detekování transgenů byla použita dot blot hybridizace. Dot blot hybridizace je založena na nanesení denaturované DNA na nylonovou N⁺ membránu, její fixaci, hybridizaci se specifickou sondou značenou digoxigeninem a následnou detekci navázaných anti-DIG Fab fragment protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatase pomocí rozkladu chromogenního substrátu NBT/BCIP.

4.6.1 Syntéza DIG sondy

Jako templát pro syntézu sondy sloužil plazmid PSBX, který obsahoval sekvenci pro plášťový protein viru PSbMV. Plazmid byl štípán restriční endonukleázou *BsaI* (New England Biolabs .Inc, kat. no. R0535S) 1 hod při 50 °C (1 μl enzym 10 U/ μl, 5 μl pufř, 36 μl vody, 8 μl plazmidu 75,5 ng/ μl). Linearizovaný PSBX plazmid byl přečištěn pomocí QIAPrep Spin Miniprep kitu (Qiagen). DIG sonda (PSbMV-P) obsahující sekvenci

obalového proteinu viru PSbMV byla připravena v termocykleru za podmínek 2 min 95 °C, 30 cyklů po 30 s při 95 °C, 1 min 55 °C, 45 s 72 °C a závěrečnou elongací 10 min při 72 °C pomocí PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche). Upravený rozpis PCR reakční směsi podle kitu je uveden v Tab. 4. K reakci byly použity primery M13 (Promega) F: 5'-GTAAAACGACGGCCA-3', R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Sekvence PCR syntetizované sondy je znázorněna na Obr. 2.

Tab. 4 Reakční směs pro syntézu sondy

| Název položky | množství položky (μl) |
|---|-----------------------|
| PCR pufr s MgCl ₂ 10x (vial 3) | 5 |
| PCR DIG mix pro syntézu sondy (vial 2) | 5 |
| M13 F 20 pmol/μl | 1 |
| M13 R 20 pmol/μl | 1 |
| Enzym mix (vial 1) | 0,75 |
| Plazmidová DNA 0,5 ng/μl | 2 |
| destilovaná voda | 35,25 |
| výsledný objem | 50 |

Obr. 2 Sekvence sondy použitá pro Dot blot hybridizaci



4.6.2 Testování aktivity PSbMV-P sondy

Aktivita PSbMV-P sondy byla testována při ředění 20x, 2 000x, 6 600x 20 000x, 66 000x, 200 000x, 666 000x, 2 000 000x v TE pufru obsahujícím FISH sperm (5 μg/ml) dle Dig Application Manual for Filter Hybridization (Roche Molecular Biochemicals, 2000). Pozitivní kontrolou byla CCAT sonda (RNDr. Petr Nádvořík, Ph.D.), jako negativní kontrola byl použit TE pufr s FISH spermem. Při experimentu se postupovalo dle Postupu 2.

Postup 2: Testování aktivity sondy

1. PSbMV-P sonda byla naředěna s FISH spermem (5 µg/ml) v TE pufru na 20x, 2 000x, 6 600x, 20 000x, 66 000x, 200 000x, 666 000x, 2 000 000x a vše bylo umístěno na led (Tab. 5). Pozitivní kontrolou byla CCAT sonda a negativní FISH sperm.

Tab. 5 Ředění DIG PCR připravené sondy

| No. | Odebráno (µl) | Z roztoku | Fish sperm (µl) | Cel. ředění |
|-----|---------------|-----------|-----------------|-------------|
| 1 | 1 | zásobní | 19 | 20x |
| 2 | 2 | 1 | 198 | 2 000x |
| 3 | 15 | 2 | 35 | 6 600x |
| 4 | 5 | 2 | 45 | 20 000x |
| 5 | 5 | 3 | 45 | 66 000x |
| 6 | 5 | 4 | 45 | 200 000x |
| 7 | 5 | 5 | 45 | 660 000x |
| 8 | 5 | 6 | 45 | 2 000 000x |
| 9 | - | - | 50 | - |

2. Na N+ Hybond membránu bylo naneseno po 2 µl ředění sondy tj. od 20x do 2 000 000x, 2 µl pozitivní kontroly (CCAT sondy) a 2 µl negativní kontroly (TE pufru obsahujícího FISH sperm). Membrána byla usušena.
3. Membrána byla zapečena při 1,8 MJ na 260 s.
4. Na Petriho misku byla umístěna membrána a k ní bylo přidáno 10 ml promývacího pufru 3. Petriho miska byla inkubována 2 min na orbitální třepačce (50 otáček/min) v inkubátoru při 37 °C v inkubátoru. Pufř byl poté odstraněn.
5. Do Petriho misky byl přidáno 10 ml 1% blocking solution (Roche, kat. no. 11 096 176 001) na 30 minut při 50 otáčkách/min na orbitální třepačce při 37 °C v inkubátoru. Blokovací reagens bylo vyměněno za roztok protilátek anti-DIG alkalická fosfatáza Fab fragment (Roche, kat. no. 11 093 274 910) (5 µl roztoku protilátek do 10 ml 1% blokovacího reagens).
6. K membráně bylo přidáno 10 ml promývacího pufru 3 a byla inkubována 15 min při 50 otáčkách/min na orbitální třepačce při 37 °C v inkubátoru. Tento krok byl zopakován ještě jednou.
7. Bylo přidáno 10 ml detekčního pufru a byla inkubována 5 min 50 otáček/min na orbitální třepačce při 37 °C v inkubátoru.
8. Na Petriho misku bylo pipetováno 10 ml detekčního pufru s 32 µl pracovního roztoku NBT (nitro-blue tetrazonium chlorid) a 32 µl pracovního roztoku BCIP

(5-bromo-4-chloro-3'-indolyl fosfát). Pracovní roztok NBT byl připraven rozpuštěním 50 mg/1 ml 70% vodného roztoku dimethylformamidu a pracovní roztok BCIP 50 mg/1 ml 100% dimethylformamidu.

9. Odečtení výsledků bylo provedeno následujícího dne.

4.6.3 Optimalizace Dot blot hybridizace

K optimalizaci dot blot hybridizace byla použita celková genomická DNA izolovaná z netransformovaných linií hrachu (*Pisum sativum* L.) kultivaru RAMAN. Celková genomická DNA byla ošetřena RNAasou A (Promega, kat. no. A7973). Na 100 mg listu bylo přidáno 10 µl roztoku RNAasy A (1 mg/ml). RNAasa A byla inkubována s izolovanou DNA po dobu 30 min při 37 °C s 600 otáčkami/min na „mixing blocku“.

Optimalizace dot blot hybridizace se soustředila na stanovení optimální koncentrace formamidu v hybridizačním pufru. Byly testovány následující koncentrace formamidu: 0%, 5%, 10%, 15% a 20%. V každé variantě byla pozitivní kontrola – plazmid pWell07A (380 ng), dvě negativní kontroly – netransformované rostliny hrachu odrůdy RAMAN (cca 2600 ng) a blank – voda. Optimalizace byla provedena podle Postupu 3 (Dig Application Manual for Filter Hybridization, Roche Molecular Biochemicals, 2000).

Postup 3: Dot blot hybridizace

1. Vzorky byly denaturovány 95 °C po dobu 10 minut v thermocykleru a ihned byly přeneseny na led se solí.
2. Byla použita odpovídající velikost N+ Hybond (Amersham) membrány a tužkou byla membrána rozdělena do čtverců. K experimentu byly použity Petriho misky o průměru 4,5 cm, kterým odpovídala velikost ustřižené membrány. Na membránu byl nanesen veškerý vzorek a bylo přidáno 2 µl pozitivní kontroly i negativní kontroly.
3. Vzorky se nechaly vsáknout do membrány (cca 5 min) a byly fixovány na membránu 1,8 MJ na 260 s pod UV lampou.
4. K membráně byl přidán 1 ml prehybridizačního pufru obsahující 15% formamidu (pro optimalizaci bylo použito 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % formamidu). Membrána byla inkubována 30 min na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 42 °C v inkubátoru.

5. Před skončením inkubace membrány s prehybridizačním pufrem byla sonda denaturována po dobu 10 min při 95 °C v termocykleru a poté ihned přenesena na led se solí. Pufř v Petriho misce byl odstraněn a bylo přidáno 1 ml prehybridizačního pufru obsahujícího 15% formamid (pro optimalizaci bylo použito 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % formamidu) a 2 µl denaturované sondy. Hybridizace sondy k templátu byla provedena přes noc při 42 °C na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min v inkubátoru.
6. Membrána byla inkubována s 1 ml promývacího pufru 1 15 min na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 42 °C v inkubátoru.
7. Promývací pufř 1 byl vyměněn za 1 ml promývacího pufru 2 a Petriho miska byla inkubována 15 min na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 42 °C v inkubátoru.
8. Blokování membrány bylo provedeno 1 ml 1% blokovacího reagens (Roche, kat. no. 11 096 176 001) po dobu 30 min na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 37 °C v inkubátoru.
9. Po blokování membrány byl přidán 1 ml 1% blokovacího reagens s 0,5 µl anti-DIG alkalická fosfatasa Fab fragment protilátkami (Roche, kat. no. 11 093 274 910). Inkubace s protilátkami probíhala 1 hodinu na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 37 °C v inkubátoru.
10. Membrána byla promyta 1 ml promývacího pufru 3 po dobu 15 min na orbitální třepačce při 50 otáčkách/min při 37 °C v inkubátoru. Tento krok byl zopakován ještě jednou.
11. Promývací pufř byl odstraněn a k membráně byl přidán 1 ml detekčního pufru po dobu 5 min na orbitální třepačce 50 otáček/min 37 °C v inkubátoru. Pufř byl vyměněn za 1 ml čerstvého detekčního pufru doplněného pracovními roztoky NBT (nitro-blue tetrazonium chlorid) a BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyl fosfát). Do 5 ml detekčního pufru se přidává 16 µl pracovního roztoku NBT (50 mg/1 ml 70% vodného roztoku dimetylformamidu) a 16 µl pracovního roztoku BCIP (50 mg/1 ml 100% dimetylformamidu).
12. Membrána byla uložena do temna a výsledek byl hodnocen druhého dne.

4.6.4 Detekce transgenu pomocí Dot blot hybridizace

Detekce transgenu byla provedena podle Postupu 3. Na nylonovou N+ Hybond membránu bylo naneseno 380 ng DNA pozitivní kontroly (plazmid pWell07A),

cca 2600 ng DNA negativní kontroly (netransformované rostliny hrachu odrůdy RAMAN), blank (voda) a 2050 až 12 000 ng celkové genomické DNA z transformovaných rostlin linie 10025 hrachu (*Pisum sativum* L.) kultivaru RAMAN T3 generace. Celková genomická DNA z netransformovaných i transformovaných rostlin byla ošetřena RNAasou A (Promega, kat. no. A7973). Na 100 mg listu bylo přidáno 10 µl roztoku RNAasy A (1 mg/ml). RNAasa A byla inkubována s izolovanou DNA po dobu 30 min při 37 °C s 600 otáčkami/min na „mixing blocku“.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA

Bylo hodnoceno 50 rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN linie 10025 T2 a T3 generace se zvýšenou odolností proti viru PSbMV. Celková genomická DNA byla izolována pomocí extrakce SDS a fenol-chloroformem. Tímto postupem bylo získáno větší množství DNA než pomocí kitu Easy DNA kit (Invitrogen). Pro srovnání pomocí kitu bylo izolováno ze 70 mg listu 233 ng celkové genomické DNA, ale pomocí izolace SDS a extrahování fenol-chloroformem bylo ze 70 mg listu získáno 608 ng, tj. 2,5x více. Izolace pomocí kitu nebyla opakována; důvodem byl omezený počet semen, který byl k dispozici. Údaje o čistotě a koncentraci nukleových kyselin jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Vzorky hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN T2 a T3 generace

| No. | Název vzorku | VL (mg) | c (ng/ul) | 260/280 |
|-----|-------------------|---------|-----------|---------|
| 1 | RAMAN B T3 2/1/5 | 54 | 513 | 2,05 |
| 2 | RAMAN B T3 2/2/5 | 62 | 607 | 2,10 |
| 3 | RAMAN B T3 2/2/11 | 62 | 667 | 1,98 |
| 4 | RAMAN B T3 2/3/2 | 74 | 780 | 2,12 |
| 5 | RAMAN B T3 2/4/2 | 69 | 794 | 2,08 |
| 6 | RAMAN B T3 2/6/3 | 56 | 553 | 2,02 |
| 7 | RAMAN B T3 2/4/8 | 52 | 1126 | 2,12 |
| 8 | RAMAN B T3 2/4/10 | 60 | 1155 | 2,15 |
| 9 | RAMAN B T3 2/5/2 | 59 | 1174 | 2,12 |
| 10 | RAMAN B T3 2/5/3 | 64 | 1333 | 2,11 |
| 11 | RAMAN B T3 2/5/4 | 52 | 1221 | 2,13 |
| 12 | RAMAN B T3 2/5/5 | 41 | 1074 | 2,15 |
| 13 | RAMAN B T3 2/2/4 | 60 | 689 | 2,19 |
| 14 | RAMAN B T3 2/2/8 | 77 | 807 | 2,20 |
| 15 | RAMAN B T3 2/2/9 | 40 | 461 | 2,12 |
| 16 | RAMAN B T3 2/2/15 | 48 | 342 | 2,17 |
| 17 | RAMAN B T3 2/3/1 | 67 | 434 | 2,13 |
| 18 | RAMAN B T3 2/4/1 | 43 | 484 | 2,14 |
| 19 | RAMAN B T3 2/1/1 | 31 | 212 | 2,21 |
| 20 | RAMAN B T3 2/5/1 | 51 | 552 | 2,15 |
| 21 | RAMAN B T3 2/6/6 | 60 | 574 | 2,13 |
| 22 | RAMAN B T3 2/6/7 | 47 | 401 | 2,16 |
| 23 | RAMAN B T3 2/7/4 | 56 | 241 | 2,21 |
| 24 | RAMAN B T3 2/7/5 | 58 | 400 | 2,13 |
| 25 | RAMAN B T2 1/3 | 94 | 829 | 2,14 |
| 26 | RAMAN B T2 2/4 | 90 | 1225 | 2,16 |
| 27 | RAMAN B T2 1/5 | 80 | 990 | 2,11 |
| 28 | RAMAN B T2 1/7 | 61 | 531 | 2,08 |
| 29 | RAMAN B T2 2/2 | 65 | 71 | 1,98 |

Tab. 6 Vzorky hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN T2 a T3 generace (pokračování)

| No. | Název vzorku | VL (mg) | c (ng/ul) | 260/280 |
|-----|--------------------|---------|-----------|---------|
| 30 | RAMAN B T2 2/11 | 57 | 474 | 2,02 |
| 31 | RAMAN B T2 2/10 | 77 | 1268 | 1,60 |
| 32 | RAMAN B T2 2/9 | 69 | 609 | 1,99 |
| 33 | RAMAN B T2 2/8 | 66 | 1876 | 1,64 |
| 34 | RAMAN B T2 2/7 | 70 | 1506 | 1,84 |
| 35 | RAMAN B T2 2/5 | 55 | 278 | 1,96 |
| 36 | RAMAN B T2 2/4 | 78 | 415 | 2,11 |
| 37 | RAMAN B T2 2/3 | 54 | 258 | 2,14 |
| 38 | RAMAN B T2 2/2 | 88 | 554 | 2,05 |
| 39 | RAMAN B T2 2/1 | 63 | 565 | 1,76 |
| 40 | RAMAN B T3 2/2/2 | 65 | 443 | 2,08 |
| 41 | RAMAN B T3 2/2/6 | 60 | 446 | 2,08 |
| 42 | RAMAN B T3 2/2/7 | 83 | 439 | 2,15 |
| 43 | RAMAN B T3 2/5/6 | 63 | 276 | 2,11 |
| 44 | RAMAN B T3 2/6/4 | 51 | 349 | 2,16 |
| 45 | RAMAN B T3 2/7/6 | 58 | 243 | 2,14 |
| 46 | RAMAN B T3 1/1/2 | 61 | 747 | 2,24 |
| 47 | RAMAN B T3 1/3/5 | 54 | 559 | 2,17 |
| 48 | RAMAN B T3 1/4/3 | 38 | 653 | 2,24 |
| 49 | RAMAN B T3 1/5/7 | 47 | 292 | 2,22 |
| 50 | RAMAN B T3 1/6/1 | 43 | 2399 | 2,22 |
| N1 | Negativní kontrola | 189 | 2132 | 2,17 |
| N2 | Negativní kontrola | 161 | 1734 | 2,22 |
| N3 | Negativní kontrola | 172 | 3762 | 2,12 |
| N4 | Negativní kontrola | 183 | 2538 | 2,14 |
| N5 | Negativní kontrola | 188 | 2264 | 2,21 |
| N6 | Negativní kontrola | 101 | 451 | 2,18 |
| N7 | Negativní kontrola | 105 | 488 | 2,17 |

Vysvětlivky: VL – váha listu, c – koncentrace, zápis RAMAN B T3 X/Y/Z = hrách kultivaru RAMAN, náhradní vzorek, 3. generace, semeno x 1. generace semeno y 2. generace semeno y 3. generace, vzorky N1-N7 jsou negativní kontroly, Pozn.: u vzorků 1-2, 7-8, 29, 30-40, 42, 46-50 se nepodařilo detekovat transgen

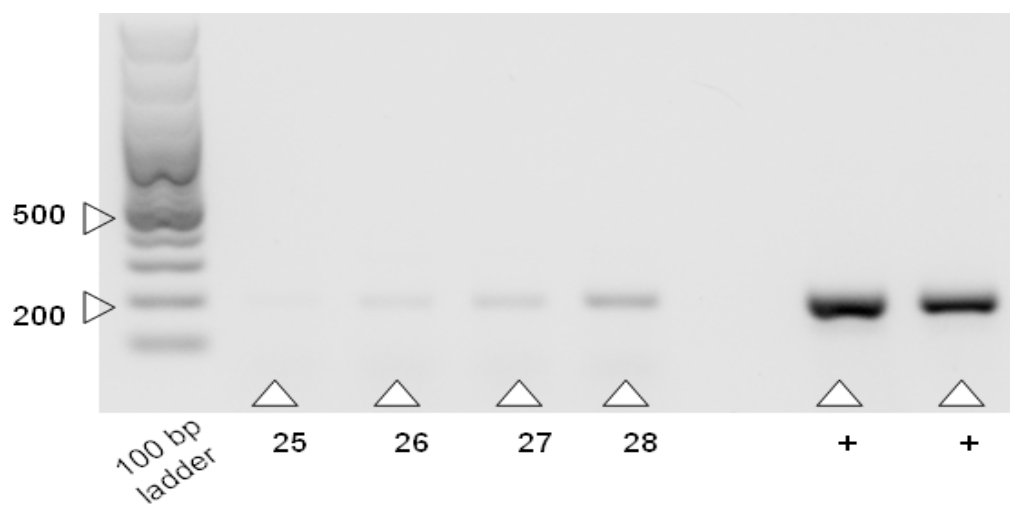
5.2 Detekce transgenu


5.2.1 Detekce transgenu pomocí PCR

Nepřímo jsem detekoval transgen v transgenních rostlinách hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN linie 10025 T2 a T3 generace u 8 vzorků z 25 transformovaných rostlin (25-28, 41, 43-45 viz Tab. 6). PCR technikou s primery 35S byla amplifikována sekvence 35S promotoru (200bp). Stejně velký produkt byl získán u pozitivní kontroly a žádný produkt nebyl získán u negativní kontroly. Byla také provedena

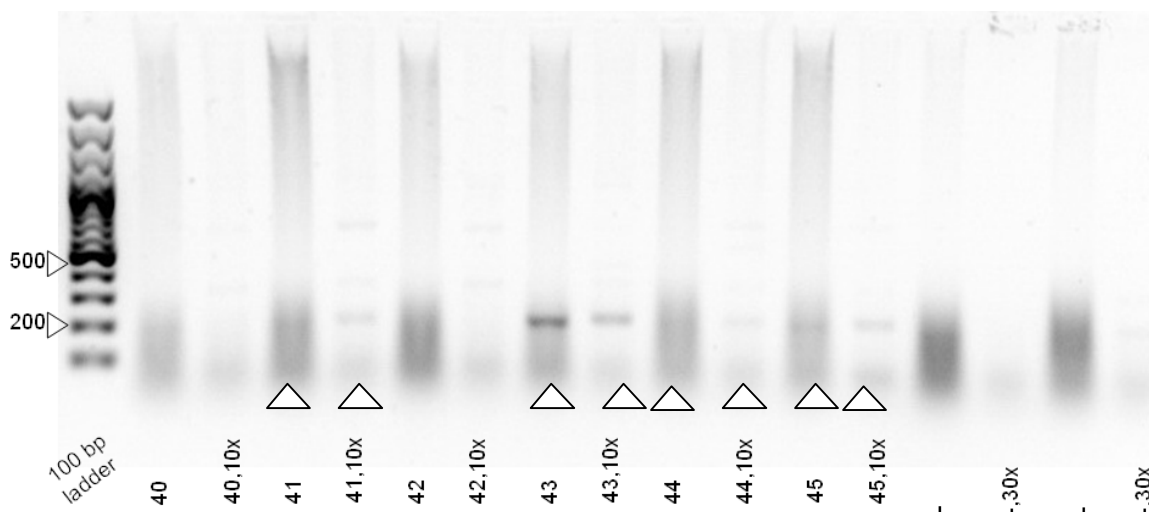
PCR detekce GUS genu pomocí primerů GUS inv F/R, ale tato nepřímá detekce byla neúspěšná. Nebyl získán produkt u transformovaných rostlin, ale byl získán produkt odpovídající velikosti u pozitivní kontroly. U ostatních kombinací primerů Kpn1 x Xho1, Cla1 x Xba1, Kpn1 x Cla1, Pavel 1 F/R, Pavel 2 F/R a Pavel 3 F/R, které amplifikují sekvenční PSbMV CP, nebyly žádné produkty očekávané velikosti s výjimkou pozitivní kontroly (plazmid pWell07A).

Obr.3 Detekce 35S promotoru v transgenních rostlinách hrachu



Vysvětlivky: 100 bp Plus DNA Ladder GeneRuler (Fermentas), 25-28 vzorky z transformovaných rostlin T2 generace odolných proti PSbMV viru, + pozitivní kontrola (plazmid pWell07A), pozitivní vzorek 

Obr. 4 Detekce 35S promotoru v transgenních rostlinách hrachu

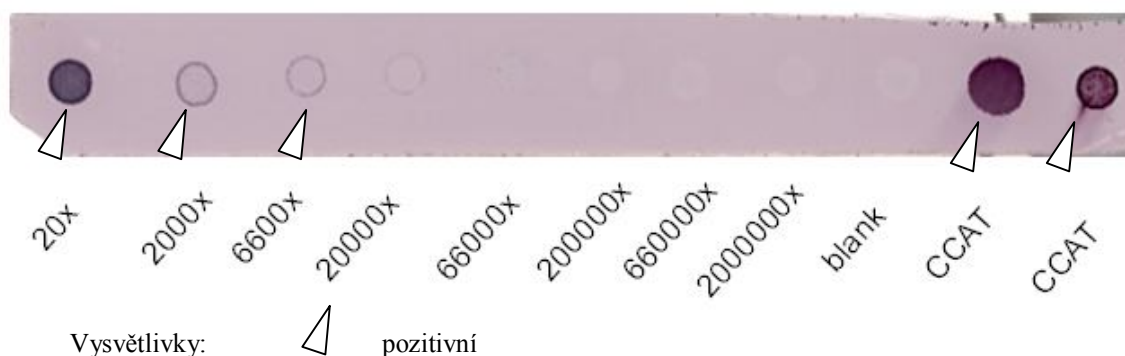


Vysvětlivky: 100 bp Plus DNA Ladder GeneRuler (Fermentas), 46-51 vzorky z transformovaných rostlin T3 generace odolných proti PSbMV viru (každý vzorek je přítomen jako neředěný a naředěný 10x), - negativní kontroly N6, N7 (u každé negativní kontroly je varianta neředěná a naředěná 30x), vzorek pozitivní \triangle

5.2.2 Přímá detekce transgenu pomocí dot blot hybridizace

Trangen se nepodařilo přímo detekovat pomocí PCR, a proto byla použita dot blot hybridizace. Pro detekci transgenu byla připravena PSbMV-P sonda pomocí kitu DIG Probe Synthesis od firmy Roche. PSbMV-P sonda poskytovala pozitivní reakci do 6 600x naředění, pozitivní kontrolou byla CCAT sonda a negativní FISH sperm (Obr. 4)

Obr. 4 Testování aktivity sondy

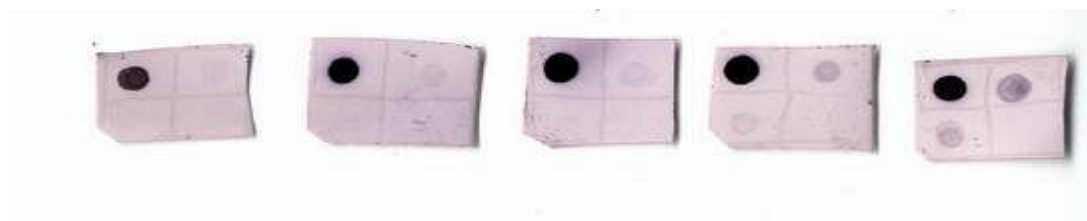


Vysvětlivky: \triangle pozitivní

Dot blot metoda byla optimalizována použitím různých koncentrací formamidu (0-20 %) pro pozitivní kontrolu plazmid pWell07, negativní kontroly

netransformované rostliny N1 a N2 a blank. Největší specifitu a nejmenší pozadí vykazovala 15% koncentrace formamidu v prehybridizačním pufru (Obr. 5).

Obr. 5 Optimalizace Dot blot použitím různé koncentrace formamidu (zprava membrána s 0 %, 5 %, 10 %, 15 % a 20 %)



Vysvětlivky: pozice vzorků na každé membráně vlevo nahoře: pozitivní kontrola, vpravo dole: blank a diagonálně: 2 negativní kontroly.

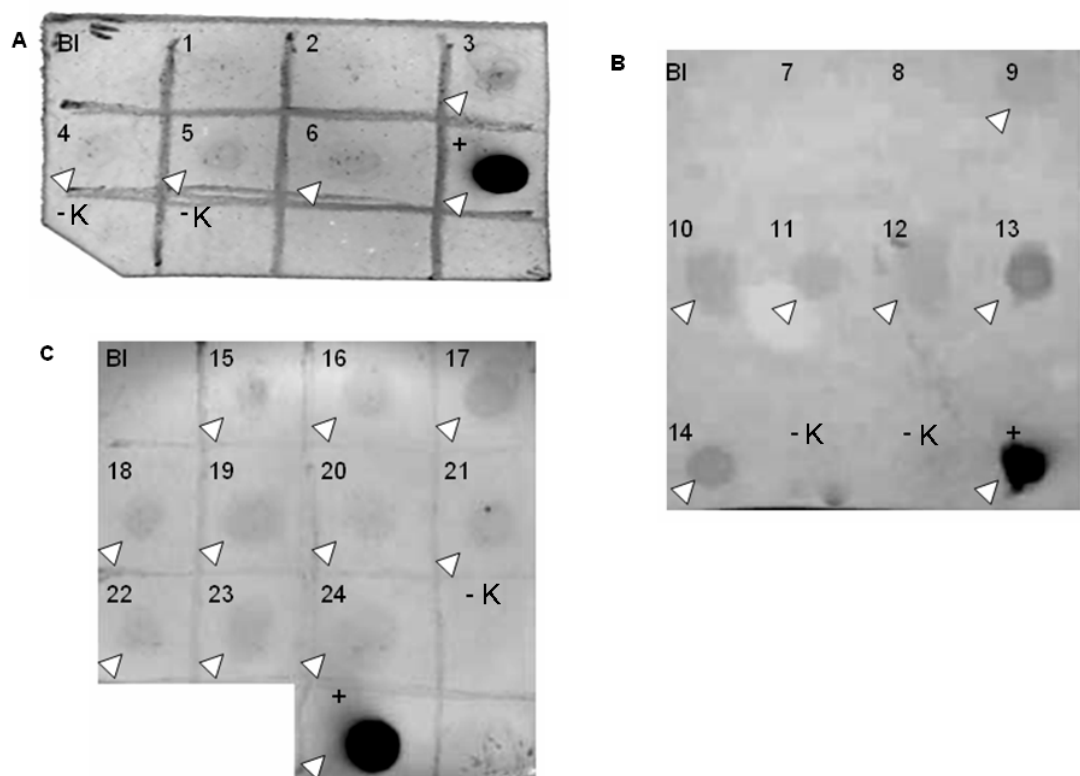
Dot blot hybridizace s 15% formamidem v prehybridizačním pufru byla použita k detekci transgenů v transgenních rostlinách hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN T3 generace. Výsledek dot blot hybridizace je uveden v Tab. 7 a na Obr. 6. Ze 24 testovaných vzorků bylo pozitivních 20. Pozitivní kontrola dávala pozitivní signál a negativní kontroly byly bez signálu.


Tab. 7 Výsledky Dot blot hybridizace

| No. | Název vzorku | ng na membránu | +/- | No. | Název vzorku | ng na membránu | +/- |
|-----|-------------------|----------------|-----|-----|--------------------|----------------|-----|
| 1 | RAMAN B T3 2/1/5 | 2052 | - | 16 | RAMAN B T3 2/2/15 | 6147 | + |
| 2 | RAMAN B T3 2/2/5 | 2430 | - | 17 | RAMAN B T3 2/3/1 | 7819 | + |
| 3 | RAMAN B T3 2/2/11 | 2666 | + | 18 | RAMAN B T3 2/4/1 | 8705 | + |
| 4 | RAMAN B T3 2/3/2 | 3120 | + | 19 | RAMAN B T3 2/1/1 | 3816 | + |
| 5 | RAMAN B T3 2/4/2 | 3174 | + | 20 | RAMAN B T3 2/5/1 | 9936 | + |
| 6 | RAMAN B T3 2/6/3 | 2210 | + | 21 | RAMAN B T3 2/6/6 | 10332 | + |
| 7 | RAMAN B T3 2/4/8 | 10137 | - | 22 | RAMAN B T3 2/6/7 | 7218 | + |
| 8 | RAMAN B T3 2/4/10 | 10392 | - | 23 | RAMAN B T3 2/7/4 | 4336 | + |
| 9 | RAMAN B T3 2/5/2 | 10562 | + | 24 | RAMAN B T3 2/7/5 | 7195 | + |
| 10 | RAMAN B T3 2/5/3 | 11999 | + | N1 | Negativní kontrola | 2324 | - |
| 11 | RAMAN B T3 2/5/4 | 10987 | + | N2 | Negativní kontrola | 1892 | - |
| 12 | RAMAN B T3 2/5/5 | 9670 | + | N3 | Negativní kontrola | 3564 | - |
| 13 | RAMAN B T3 2/2/4 | 6204 | + | N4 | Negativní kontrola | 2404 | - |
| 14 | RAMAN B T3 2/2/8 | 7265 | + | N5 | Negativní kontrola | 2145 | - |
| 15 | RAMAN B T3 2/2/9 | 8294 | + | - | - | - | - |

Vysvětlivky: +/- = pozitivní / negativní detekce, zápis RAMAN B T3 X/Y/Z = hrách kultivarů RAMAN, vzorek náhradní, 3. generace, semeno x 1. generace semeno y 2. generace semeno y 3. generace, vzorky N1-N5 jsou negativní kontroly

Obr. 6 Výsledek dot blot hybridizace vzorků 1-24



Vysvětlivky: BI blank, 1-24 vzorky transgenních rostlin hrachu rostlin (*Pisum sativum* L.) odrůdy RAMAN T3 generace, + pozitivní kontrola (plazmid pWell07A), -K negativní kontrola A: N1, N2 ; B: N3, N4; C: N5,  pozitivní vzorek

6 DISKUZE

Transgenní rostliny, se kterými byly prováděny experimenty, byly rezistentní vůči viru mozaiky hrachu přenosné semenem (PSbMV). Vlastní transgen představoval segment genu pro plášťový protein (CP) viru PSbMV v „sense“ a „anti-sense“ orientaci oddělený vloženým intronem. Při expresi transgenu bylo cílem vytvoření vlásenky z „sense“ a „anti-sense“ sekvence transkriptu a následné aktivaci PTGS, který indukuje resistenci proti PSbMV. Stěžejním úkolem experimentální části práce bylo stanovit přítomnost transgenu v transformovaných rostlinách hrachu.

Pomocí PCR bylo možno stanovit přítomnost 35S promotoru u 8 z 25 transgenních rostlin T2 a T3 generace. Primery amplifikující GUS gen a primery amplifikující sekvence obalového proteinu viru PSbMV nebylo možno detekovat transgen. V případě funkčního transgenu je detekce přítomnosti transgenu pomocí PCR určena specifickými primery, které amplifikují specifický produkt reakce o definované velikosti. Bylo usouzeno, že mohlo dojít k poškození konstruktů a v důsledku toho cílová místa pro nasedání primerů nebyla rozpoznána.

Většina autorů ale považuje PCR reakci za vhodnou techniku k detekci transgenů, detekují však vždy funkční nepoškozený transgen. Bai a kol. (2008) úspěšně detekovali obrácenou repetici polymerázového genu viru mozaiky cukrové třtiny (SCMV) v transformovaných rostlinách T0 generace kukuřice pomocí PCR. Další autoři, kteří byli úspěšní v detekci transgenů pomocí PCR, byli Hurst a kol. (1999) v transgenní sóji (Roundup ready) a kukuřici (Event 176), Wang a kol. (2000) v transgenním ječmeni (*Hordeum vulgare* L.), Srivastava a Raj (2008) v transgenním tabáku (*Nicotiana bethamiana* L.) a Fan a kol. (2009) v transformované papáji (*Carica papaya* L.).

Další technikou, která byla použita vedle PCR, byla dot blot hybridizace. Většina autorů nepoužívá dot blot hybridizaci k detekci transgenů a dávají přednost PCR, která spotřebuje výrazně méně DNA a její provedení je méně časově náročné. V mé bakalářské práci byla použita dot blot hybridizace, při které byla hybridizovaná PSbMV-P sonda detekována enzymaticky. Tato technika byla pro detekci transgenů úspěšná (20 pozitivních transformovaných rostlin z celkem 24 testovaných dot blot hybridizací), pozitivní výsledek mohl být odečten již od cca 3000 ng fixované DNA s minimální nespecifickou hybridizací na nylonové membráně. Odezva signálu byla však slabá a podporuje myšlenku, že mohlo dojít k poškození transgenů. Naproti tomu Bai a kol. (2008) fixovali na membránu

10 μg DNA, provedli mnohem citlivější detekci transgenu pomocí radioaktivně značené sondy a dosáhli mnohem silnějšího signálu.

V této práci byl transgen obtížně detekovatelný pomocí PCR a slabě pomocí dot blot hybridizace. Je pravděpodobné, že transgen byl poškozen. Jaký proces mohl zapříčinit poškození transgenu a tím ztížit jeho detekci? Choffnes a kol. (2001) zjistili, že rekombinace může vést až ke ztrátě transgenu. Hoenicka a Flaudung (2006) uvádí jako další možnosti nestability transgenu kromě již zmíněné rekombinace, umlčování genů, mutace nebo aktivace retrotranspozónů.

Pro charakteristiku transgenních linií hrachu, které v T3 generaci vykazují zvýšenou odolnost vůči PSbMV, bude nutné potvrdit, že došlo ke specifické indukci PTGS vůči zmíněnému viru, a to detekcí siRNA pocházejících z degradovaného viru.

7 ZÁVĚR

V souboru testovaných transformovaných rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.) linie 10025 kultivaru RAMAN T2 a T3 generace byl detekován PSbMV-CP transgen nepřímo pomocí PCR (35S promotor) a přímým stanovením pomocí dot blot hybridizace se specifickou sondou.

Nepřímým stanovením založeným na detekci 35S promotoru jsem testoval 25 transgenních rostlin hrachu T2 a T3 generace, z nichž 8 rostlin bylo pozitivní. Pomocí dot blot hybridizace se specifickou PSbMV-P sondou bylo z 24 hodnocených transgenních rostlin T3 generace hrachu 20 pozitivních.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|----------|---|
| BCIP | 5-bromo-4-chloro-3'- indolyl fosfát |
| BYDV | <i>Barley yellow dwarf virus</i> , virus žluté zakrslosti ječmene |
| CP | obalový protein |
| CAMV | <i>Cauliflower mosaic virus</i> , virus žluté mozaiky květáku |
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> , virus mozaiky okurky |
| CGMMV | <i>Cucumber green-mottle mosaic virus</i> , virus zelenoskrvnité mozaiky okurky |
| CGMMV-CP | transgen odvozený z obalového proteinu CGMMV |
| DIG | digoxigenin |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxynukleotid trifostát |
| dsRNA | dvouvláknová RNA |
| EDTA | etylendiamintetraoctová kyselina |
| GFP | green fluorescent protein |
| GMO | geneticky modifikovaný organismus |
| GUS | β -glukoronidasa |
| ICP | insecticial crystal protein |
| IMT | inositol transferasa |
| LAMP | loop mediated isothermal amplification |
| LNA | locking nucleic acids |
| NBT | nitro-blue tetrazonium chlorid |
| NPTII | neomycin phosphotransferase II |
| qPCR | kvantitativní PCR |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PRSV | <i>Papaya ringspot virus</i> |
| PSbMV | <i>Pea seed-borne mosaic virus</i> , virus mozaiky hrachu přenosné semenem |

| | |
|----------|---|
| PSbMV-CP | transgen („sense“ a „antisense“ segment CP viru PSbMV a mezi nimi intron) |
| PSbMV-P | DIG sonda se segmentem CP viru PSbMV z plazmidu PSBX |
| PTGS | post-transkripční umlčování genů |
| RISC | RNA-indukovaný umlčující komplex |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| SCMV | <i>Sugarcane mosaic virus</i> , virus mozaiky cukrové třtiny |
| SDV | <i>Soybean dwarf virus</i> |
| siRNA | malá interferující RNA |
| ssRNA | jednovláknová RNA |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TRV | <i>Tobacco rattle virus</i> , virus nekrotické kadeřavosti tabáku |
| UBC1 | ubiquitin-konjugující enzym |

9 LITERATURA

- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. H. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Reviews of Molecular Diagnostics* 5 (2): 209-219.
- Bai, Y., Yang, H., Qu, L., Zheng, J., Zhang, J., Wang, M., Xie, W., Zhou, X., Wang, G. (2008): Inverted-repeat transgenic maize plants resistant to *Sugarcane mosaic virus*. *Frontiers of Agriculture in China* 2 (2): 125-130.
- Bhat, S. R., Srinivazan, S. (2002): Molecular and genetic analyses of transgenic plants: consideration and approaches. *Plant Science* 163: 673-681.
- Brown, T. A. (2007): Přenos DNA do živých buněk In: *Klonování genů a analýza DNA (páté vydání)*. Universita Palackého v Olomouci, 87-106 (překlad).
- Delaporta, L. S., Wood, J., Hicks, J. B. (1983): A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4): 19-21.
- Dig Application Manual for Filter Hybridization, Roche Molecular Biochemicals, 2000.
- Fan, M-J., Chen, S., Kung, Y-J., Cheng, Y-H., Bau, H-J., Su, T-S., Yeh, S-D. (2009): Transgen-specific and event-specific molecular markers for characterization of transgenic papaya lines resistant to *Papaya ringspot virus*. *Transgenic Research* 18: 971-986.
- Fraser, R. S. S. (1987): Mechanismy resistance vůči virům. In: Lebeda, A. (Ed.) *Využití fytopatologických metod ve šlechtění zelenin na rezistenci k chorobám a škůdcům*. VHI Sempra, Výzkumný ústav zeleninařský, Československá vědeckotechnická společnost, Olomouc, 85-97.
- Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B. (2004): Real-time PCR: what relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany* 55 (402): 1445-1454.
- Gal-On, A., Shibolet, Y. M. (2006): Cross protection. In: Loebenstein, G., Carr, P. (Eds.) *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Springer, 261-288.
- Gašpaříč. M. B., Cankar, K., Žel, J., Gruden, K. (2008): Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 8: 26.
- Gupta, M., Nirunsuksiri, W., Schulenberg, G., Hartl, T., Novak, S., Bryan, J., Vanopdorp, N., Bing, J., Thomson, S (2008): A non-PCR-based Invader assay quantitatively detects single-copy genes in complex plant genomes. *Molecular Breeding* 21: 173-181.

- He, K., Wang, Z., Zhou, D., Wen, L., Song, Y., Yao, Z. (2003): Evaluation of transgenic bt corn for resistance to the Asian corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Journal of Economic Entomology* 96 (3): 935-940.
- Heid, Ch., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996): Real-time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Hoenicke, H., Flaudung, M. (2006): Transgene stability in woody plants In: Flaudung, M., Ewald, D. *Tree Transgenesis Recent Developments*. Springer, 304-314.
- Hurst, D. C., Knight, A., Bruce, J. I. (1999): PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* 5: 579-586.
- Chen, Y-K., Lohuis, D., Goldbach, R., Prins, M. (2004): High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. *Molecular Breeding* 14: 215-226.
- Choffnes, D.S., Philip, R., Vodkin, L. O. (2001): A transgenic locus in soybean exhibits a high level of recombination. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 756-762.
- ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4, April 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdB/ICTVdB>.
- Kanazawa A. (2008): RNA silencing manifested as visibly altered phenotypes in plants. *Plant Biotechnology* 25: 423-435.
- Kooter, J. M., Matzke, M. A., Meyer, P. (1999): Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Science* 4 (9): 340-347.
- Kůdela, V., Bartoš, P., Čáča, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebeda, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, E., Veselý, D. (1989): Reakce rostlin na infekční agens In: *Obecná fytopatologie*. Academia Praha.
- Lee, D., Mura, M. L., Allnut, T. R., Powell, W. (2009): Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences. *BCM Biotechnology* 9: 7.
- Lin, S-S., Henriques, R., Wu, H-W., Niu, Q-W., Yeh, S-D., Chua, N-H. (2007): Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnology Reports* 1: 125-134.
- McDowell, J. M., Woffenden, B. J. (2003): Plant disease resistant genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* 21(4): 178-183.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. (2002): Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular Cell Probes* 16 (3): 223-229.

- Napoli, C., Lemieux, Ch., Jorgensen, R. (1990), Introduction of a chimeric chalcone synthase Gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000): Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28 (12): e63.
- Ondřej, M., Drobník, J. (2002): Vektory, mechanismy a metody transgenozy In: *Transgenozy rostlin*. Academia Praha 73-107.
- Schmitt, M. A., Parrot, W. A. (2001): Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. *Plant Cell Reports* 20: 422-428.
- Srivastava, A., Raj, S. K. (2008): Coat protein-mediated resistance against an Indian isolate of the *Cucumber mosaic virus* subgroup IB in *Nicotiana bethamiana*. *Journal of Biosciences* 33 (2): 249-257.
- Stamm, M., Mol, J. N. M., Kooter, J. M. (1997): The Silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* 79: 3-12.
- Tang, W., Newton, R. J., Weidner, D. A. (2007): Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *Journal of Experimental Botany* 58 (3): 545-554.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D., Mizrahi, Y. (1999): Modified CTAB Procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (*Cactaceae*). *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 249-254.
- Travella, S., Keller, B. (2009) Down-regulation of Gene Expression by RNA-induced gene In: Jones, H. D., Shewry, P. R.: *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*. 478, Humana Press.
- Tougo, M., Furutani, N., Yamagishi, N., Shizukawa, Y., Takahata, Y., Hidaka, S. (2006): Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of *Soybean dwarf virus*. *Plant Cell Reports* 25: 1213-1218.
- Vassilakos, N., Bem, F., Tzima, A., Barker, H., Reavy, B., Karanastasi, E., Robinson, D. J. (2008): Resistance of transgenic tobacco plants incorporating the putative 57-kDa polymerase read-through gene of *Tobacco rattle virus* against rub-inoculated and nematode-transmitted virus. *Transgenic Research* 17: 929-941.

- Wang, M-B., Abbott, D. C., Waterhouse, P. M. (2000) A single-copy of virus derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to *Barley yellow dwarf virus*. *Molecular Plant Pathology* 1 (6): 347-356.
- Waterhouse, P. M., Wang, M-B., Lough, T. (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411(6839): 834-842.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A., M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., Carrington, J. C. (2004): Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *Public Library of Science Biology* 2 (5): 642-652.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. (2000): Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) Rice Endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Yi, C. X., Zhang, J., Chan, K. M., Liu, X. K., Hong, Y. (2008) Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Analytical Biochemistry* 375:150-152.
- Youk, E. S., Pack, I. S., Kim, Y-J., Yoon, W. K., Kim, Ch-G., Ryu, S. B., Harn, Ch. H., Jeong, S-Ch., Kim, H. M. (2009): A framework for molecular genetic assessment of transgenic watermelon rootstock line. *Plant Science* 176: 805-811.
- Yuan, J. S., Burriss, J., Stewart, N. R., Mentawab, A., Stewart, C. N. (2007): Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. *BMC Bioinformatics* 8 (Suppl 7): S6.