

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie

Klonování rostlinného genu pro peroxidázu

Brno 2015
Vedoucí diplomové práce:

Jiří Makatura
doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.

Anotace:

Peroxidáza je protein, který rostlinám umožňuje tvorbu polymeru ligninu. Ten je tvořen různými monomery, odvozenými od kyseliny skořicové, která je modifikována hydroxylací, methylací či redukcí a tak vznikají prekursory ligninu včetně kyseliny ferulové, hořčičné, kávové, coniferylalkoholů apod. K iniciaci polymerace je nutný vznik radikálů z těchto molekul. Ty pak samovolně polymerují a vytvářejí lignin. Rozsah lignifikace závisí na druhu rostliny a druhu pletiva.

Gen pro peroxidázu byl klonován do bakteriálního plasmidového vektoru za účelem následné přípravy eukaryotického systému určeného ke studiu funkce peroxidázy v heterologickém systému.

Annotations:

Peroxidase is a protein, which allows plants to create lignin. Lignin molecule is created by various monomers derived from cinnamic acid, which is modified by hydroxylation, methylation or reduction. This way develop Precursors of lignin are formed by this way including ferulic acid, mustard acid, caffeine acid, coniferylalcohols and so on. For initiation of polymerization formation of radicals from these molecules is necessary. The radicals spontaneously polymerize and create lignin. Lignification range depends on plant species and type of tissue.

The gene for peroxidase has been cloned to bacterial plasmid to prepare eukaryotic system in future. The eukaryotic system will be used to study of peroxidase function in heterologous system.

Klíčová slova:

Peroxidáza, lignin, klonování, rekombinantní proteiny, vliv stresu na rostliny.

Key words:

Peroxidase, lignin, cloning, recombinant proteins, effects of stress on plants.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Brně, 29. 3. 2015

Jiří Makatura

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Milanu Bartošovi, Ph.D a doc. PharmDr. Petru Babulovi, Ph.D. za neocenitelné rady a pomoc při psaní mé diplomové práce a ing. Haně Vítkové za cenné rady při práci v laboratoři.

1.	Úvod	7
2.	Buněčná stěna a enzymy	8
2.1.	Buněčná stěna rostlinné buňky	8
2.2.	Syntéza buněčné stěny	8
2.3.	Hlavní rostlinné fenolické látky	11
2.4.	Peroxidázy	14
2.4.1.	Funkce peroxidáz	14
2.4.2.	Struktura peroxidáz	16
2.4.3.	Rozdělení peroxidáz	17
2.5.	Charakteristika procesu lignifikace a peroxidáz <i>Zinnia elegans</i>	19
2.6.	Dřevnatění Cínie	19
2.7.	Poškození rostlin a jejich obrana	21
3.	Cíl práce	27
4.	Materiál a metody	28
4.1.	Příprava materiálu k izolaci mRNA a pasážovací médium	28
4.2.	Izolace RNA	28
4.3.	Média pro práci s bakteriálními buňkami <i>E. coli</i>	31
4.4.	Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu	32
5.1.	Pasážování a tvorba kalusu	33
5.2.	Určení sekvence genu a návrh primerů pro amplifikaci	34
5.3.	Izolace RNA	36
5.4.	Amplifikace	37
5.5.	Ligace	43
5.6.	Transformace	43
5.7.	Další práce s narostlými koloniemi	45
5.8.	Izolace plasmidové DNA	4746
6.	Diskuse	4847
6.1.	Izolace RNA	4847
6.3.	Určení nukleotidové sekvence a návrh primerů	49
6.4.	Příprava genu pro peroxidázu amplifikací	50
6.5.	Ligace a transformace bakteriální buněk <i>E. coli</i>	50
6.6.	Transformace	53
6.7.	Screening transformantů	53

6.8. Izolace plasmidové DNA a sekvenování	5453
7. Závěr	58
8. Seznam použitých zkratk	59
9. Literatura a zdroje	60

1. Úvod

Všechna živá stvoření se skládají z buněk - malých, membránou ohraničených jednotek naplněných koncentrovaným vodným roztokem chemických sloučenin a vybavených mimořádnou schopností vytvářet kopie sebe samých růstem a dělením. Buňky jsou základními funkčními jednotkami živých organismů a život závisí na schopnosti buněk uchovávat, třídit a překládat genetickou informaci.¹ To je podmínkou k vytvoření a udržení živého organismu. Na tvorbě funkčních struktur živého organismu se rozhodující mírou podílejí proteiny. To jsou makromolekuly, které provádějí většinu buněčných funkcí, slouží jako stavební kameny většiny buněčných struktur, mohou fungovat jako enzymy, které katalyzují buněčné chemické reakce, regulují genovou expresi, umožňují buněčný pohyb a vzájemnou komunikaci. Informace pro tvorbu proteinů, tzv. genetická informace, je uložena v genech. Geny se nacházejí na chromosomech v jádře.

Rekombinantní technologie dnes umožňuje nejen cíleně měnit genetickou informaci vedoucí k tvorbě pozměněných proteinů, ale také přenášet genetickou informaci z jednoho organismu do jiného. Genetická informace (ve formě DNA) může být živočišná, rostlinná či mikrobiální a může se začlenit do buněk bakteriálních, rostlinných, živočišných, do kvasinek či plísní nebo do celé rostliny či živočicha. K začlenění cizorodé DNA se používají uměle zkonstruované vektory na bázi plasmidů nebo virů. Ty jsou pak transformovány do speciálně upravených organismů, zejména prokaryotických buněk *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*, kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, do hmyzích nebo savčích buněk.²

Produkty rekombinantní technologie dnes nalézají využití v řadě průmyslových odvětví, ale také v terapii, nebo diagnostice onemocnění. Produkty rekombinantních technologií jsou především enzymy, peptidové hormony, vakcíny, cytokiny, interferony. V terapii cukrovky se dnes například běžně používá inzulin připravený rekombinantní technologií.²

2. Buněčná stěna a enzymy

2.1. Buněčná stěna rostlinné buňky

Buněčná stěna je jedním ze základních charakteristických rysů, kterým se rostlinná buňka odlišuje od buňky živočišné. Je primární mechanickou ochranou buňky. Sestává ze čtyř skupin polymerů: celulózy, hemicelulózy, pektinu a proteinů.³

Samotná buněčná stěna ale neposkytuje dostatečnou ochranu celé rostlině, k tomuto účelu složí krycí pletiva.⁴ Ta poskytují ochranu nejen proti patogenům a některým býložravým živočichům ale také chrání před ztrátou vody. Tato mechanická ochrana nadzemní části se skládá hlavně z celulózy, hemicelulózy, pektinu a je impregnována ligninem a suberinem, dále může být ještě zesílena z vnější strany trichomy, které často obsahují sekundární metabolity a z vnitřní strany vrstvami buněk, které jsou také impregnovány.⁵

2.2. Syntéza buněčné stěny

Ontogeneticky nejstarší částí buněčné stěny je střední lamela, jejíž tvorba začíná v poslední fázi buněčného dělení, kdy mikrotubuly v ekvatorální oblasti vytvářejí fragmoplast.⁶ Mezi střední lamelou a plasmalemou dceřiných buněk se tvoří nové primární buněčné stěny sekrecí membránových váčků a syntézou celulosových mikrofibril na povrchu plasmalemy.¹

Již během tvorby primární stěny nebo hned poté dochází ke zvětšování objemu buňky. Strukturu primární stěny tvoří xyloglukany a pektiny syntetizované v Golgiho aparátu a do buněčné stěny jsou transportovány v sekretorických váčcích.⁷ Po ukončení expanzního růstu se v některých buňkách tvoří stěna sekundární- tím, že ze strany plasmalemy se na primární stěnu ukládají nové vrstvy. Ty obvykle obsahují, kromě celulózy, pektinů xyloglukanů a dalších látek také 20- 30% ligninu.⁸

Impregnace buněčných stěn ligninem je podstatnou součástí dřevnatění. Lignin stěnám dodává extrémní odolnost proti roztržení a rozlomení a přitom zachovává jejich pružnost, zmenšuje také jejich prostupnost pro vodu. Stěna je zpevňována zvýšením počtu

vazeb mezi látkami již přítomnými, i vkládáním látek syntetizovaných *de novo*. Lignin je polymer, tvořený různými monomery, odvozenými od kyseliny skořicové. Ta je modifikována hydroxylací, methylací či redukcí, a tak vznikají prekursory ligninu včetně kyseliny ferulové, hořčičné, kávové, coniferylalkoholů apod. To se děje v Golgiho aparátu, odkud jsou prekursory ligninu exportovány do stěny. Tyto látky jsou dehydrogenovány peroxidázami za vzniku volných reaktivních radikálů. Ty pak samovolně polymerují a vytvářejí lignin. Rozsah lignifikace závisí na druhu pletiva.⁸

Během zpevňování se aktivují enzymy nezbytné pro syntézu základních stavebních kamenů ligninu, tj. aromatických alkoholů - fenylalaninmonyumiáza (PAL), chalkosyntáza (CHS) a chalkoizomeráza, i peroxidázy, které jsou nutné k polymeraci složek buněčné stěny. Peroxidázy vázané v buněčné stěně katalyzují polymerizaci fenolických látek na lignin a také vznik suberinu. Zvyšuje se syntéza proteinů bohatých na [hydroxyprolinhydroxyprolin](#). Aktivuje se NADPH oxidáza, lokalizovaná na vnější straně plazmatické membrány, která katalyzuje vznik superoxidu (O_2^-).⁸

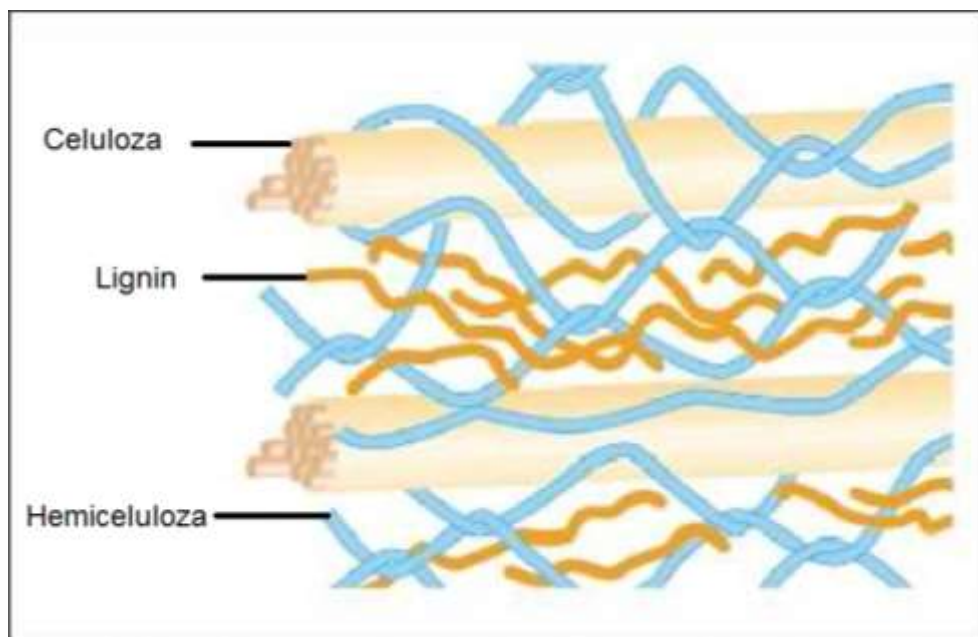
Impregnace buněčných stěn ligninem je podstatnou součástí dřevnatění. Lignin stěnám dodává extrémní odolnost proti roztržení a rozlomení a přitom zachovává jejich pružnost, zmenšuje také jejich prostupnost pro vodu. Stěna je zpevňována zvýšením počtu vazeb mezi látkami již přítomnými i vkládáním látek syntetizovaných *de novo*. Lignin je polymer, tvořený různými monomery, odvozenými od kyseliny skořicové. Ta, je modifikována hydroxylací, methylací či redukcí, a tak vznikají prekursory ligninu včetně kyseliny ferulové, hořčičné, kávové, coniferylalkoholů apod. To se děje v Golgiho aparátu, odkud jsou prekursory ligninu exportovány do stěny. Tyto látky jsou dehydrogenovány peroxidázami za vzniku volných reaktivních radikálů. Ty pak samovolně polymerují a vytvářejí lignin. Rozsah lignifikace závisí na druhu pletiva.¹²

Během zpevňování se aktivují enzymy nezbytné pro syntézu základních stavebních kamenů ligninu, tj. aromatických alkoholů - fenylalaninmonyumiáza (PAL), chalkosyntáza (CHS) a chalkoizomeráza, i peroxidázy, nutné k polymeraci složek buněčné stěny. Peroxidázy vázané v buněčné stěně katalyzují polymerizaci fenolických látek na lignin a vznik suberinu. Zvyšuje se syntéza proteinů bohatých na hydroxyprolin. Aktivuje se NADPH oxidáza, lokalizovaná na vnější straně plazmatické membrány, která katalyzuje vznik superoxidu (O_2^-).

Naformátováno: horní index

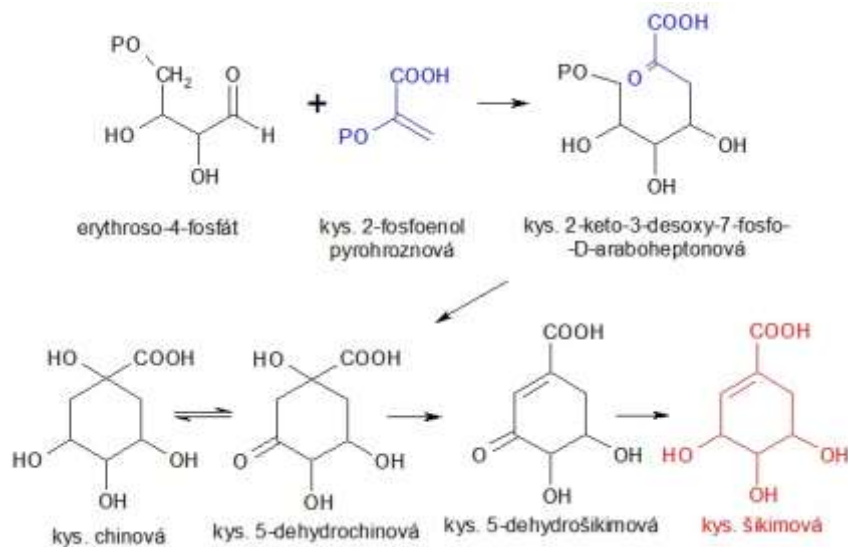
Peroxidázy vázané v buněčné stěně katalyzují polymerizaci fenolických látek na lignin a také vznik suberinu.⁸

Obr. 1: Model impregnace buněčné stěny ligninem, převzato z: kfrserver.natur.cuni.cz



Syntéza ligninu vychází z fenolických látek.⁷ Prekurzorem většiny fenolických látek přírodního původu je kyselina šikimová, produkt syntézy sacharidů vznikajících při fotosyntéze.

Obr. 2: Syntéza kyseliny šikimové



2.3. Hlavní rostlinné fenolické látky

Pro fenolické látky je charakteristický aromatický kruhový systém, který nese minimálně jednu OH skupinu. Patří mezi ně mnoho látek, které mají důležité fyziologické jako: (1) přenašeče elektronů, (2) ochrana před UV zářením, (3) lákadla opylovačů, (4) fytoalexiny, atd. a (5) impregnační materiál buněčných stěn a strukturální materiál dodávající rostlinám stabilitu.¹⁰

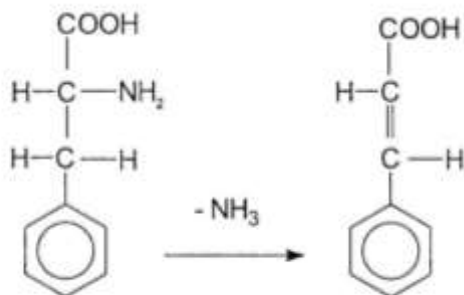
Tabulka 1: Přehled uhlíkatých skeletů jejich molekul lze rozdělit do čtyř tříd:

Jednoduché fenoly	hydrochinon, arbutin
Kyseliny fenolkarboxylové	kys. galová, pyrokatechová, p- hydroxybenzoová
Fenylpropanoidy	lignin, kumariny, skořicový alkohol, skupina kyselin skořicových
Flavonoidy	flavany, flavonoly, anthokyany

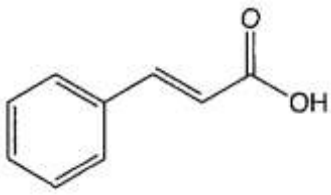
Pro syntézu ligninu jsou klíčové fenylpropanoidy. Biosyntéza fenylpropanoidu vychází od aminokyseliny fenylalaninu, který je produktem již popsané šikimátové metabolické

dráhy. Jejich charakteristickým znakem je tříuhlíkatý řetězec připojený k aromatickému fenolovému kruhu.¹⁰

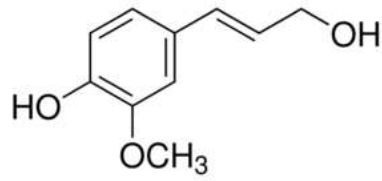
Obr.3: Přeměna fenylalaninu v kyselinu trans-skořicovou působením fenylalaninamoniaklyázy, při reakci se uvolňuje amoniak.



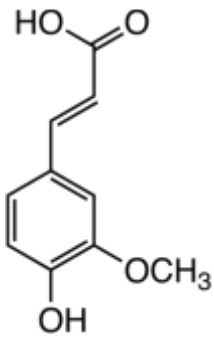
Základními fenylpropanoidy jsou kyselina skořicová a její deriváty, které vznikají její modifikací – hydroxylací, methylací či redukcí, a tak vznikají prekursorů ligninu v rostlinách se běžně vyskytující kyseliny p- kumarová, kávová, ferrulová a sinapová.¹⁰ Modifikace se uskutečňují v Golgiho aparátu, odkud jsou prekursorů ligninu exportovány do stěny. Tyto látky jsou dehydrogenovány peroxidázami za vzniku volných reaktivních radikálů. Ty pak samovolně polymerují a vytvářejí lignin. Rozsah lignifikace závisí na druhu pletiva.



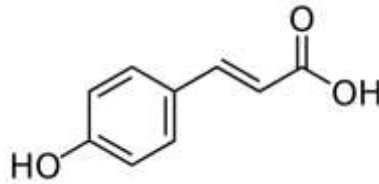
Kyselina skořicová



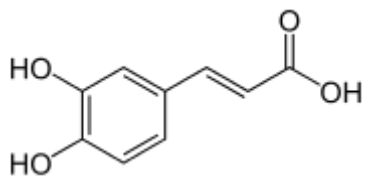
Konyferylalkohol



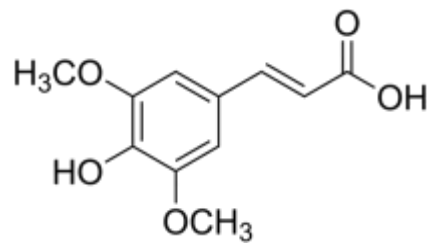
Kyselina ferrulová



Kyselina kumarová



Kyselina kávová



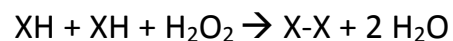
Kyselina sinapová

2.4. Peroxidázy

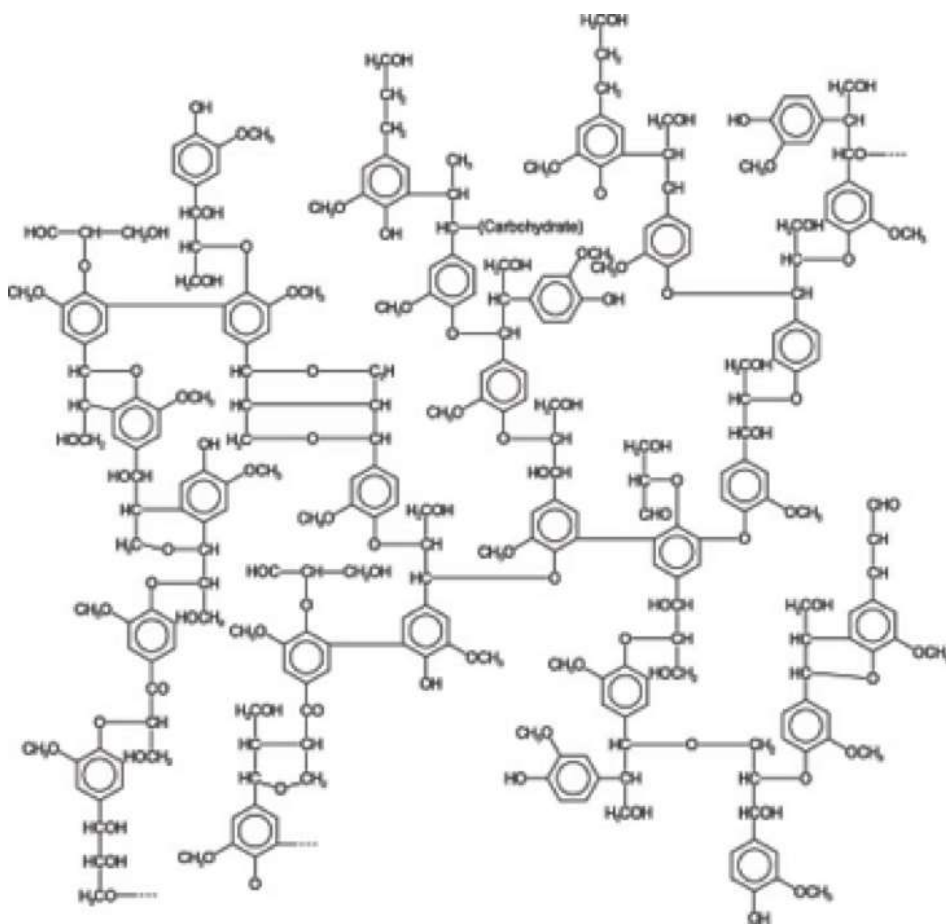
2.4.1. Funkce peroxidáz

Polymerázy potřebují k polymeraci H_2O_2 , který vzniká oxidací NADH a redukcí superoxidu (O_2^-) na rozhraní plazmatické membrány a buněčné stěny. Při polymeraci vzniká voda.⁸

Schéma reakce⁸:



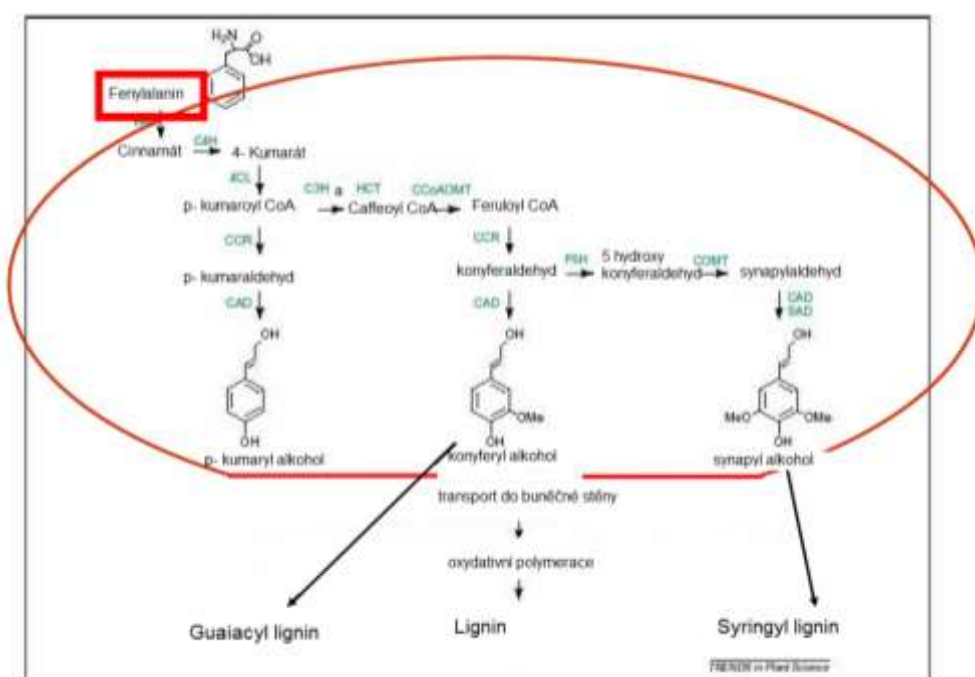
Obr. 4: Model teoretické molekuly ligninu, Převzato z: www.plantphys.net



Naformátováno: Zarovnat do bloku

Reakce je zprostředkována III. třídou rostlinných peroxidáz. Produktem reakce je opticky inaktivní, hydrofobní heteropolymer složený z H (hydroxyphenylových), G (guaiacylových) a S (syringylových) jednotek. Lignin je heteropolymer, který vzniká oxidativní polymerací tří monolignolů, p- coumaryl alkoholu, koniferyl alkoholu a sinapyl alkoholu.¹¹

Obr. 5: Fenylpropanoidní metabolismus vedoucí ke vzniku monolignolů – p-kumaryl alkoholu, koniferyl alkoholu a sinapyl alkoholu, převzato z: kfrserver.natur.cuni.cz



Lignin dvouděložných rostlin je složen převážně z Konyferyl alkoholu a Synapyl alkoholu. Lignin jednoděložných rostlin je tvořen Konyferyl alkoholem, Synapyl alkoholem a Kumaryl alkoholem.

Správná syntéza ligninu je extrémně náročná. Vyžaduje velké množství uhlíkových základních jednotek a redukcujících molekul. Rostliny nemají enzymatický aparát na rozklad ligninu, takže tvorba ligninu je nevratný proces. Zdřevnatělé buňky představují významné uložště uhlíku, a proto musí být vyvážený poměr nově syntetizovaného ligninu a zdrojů uhlíku. Metabolismus uhlíku (alokace) musí být proto enzymaticky řízen na mnoha úrovních.¹²

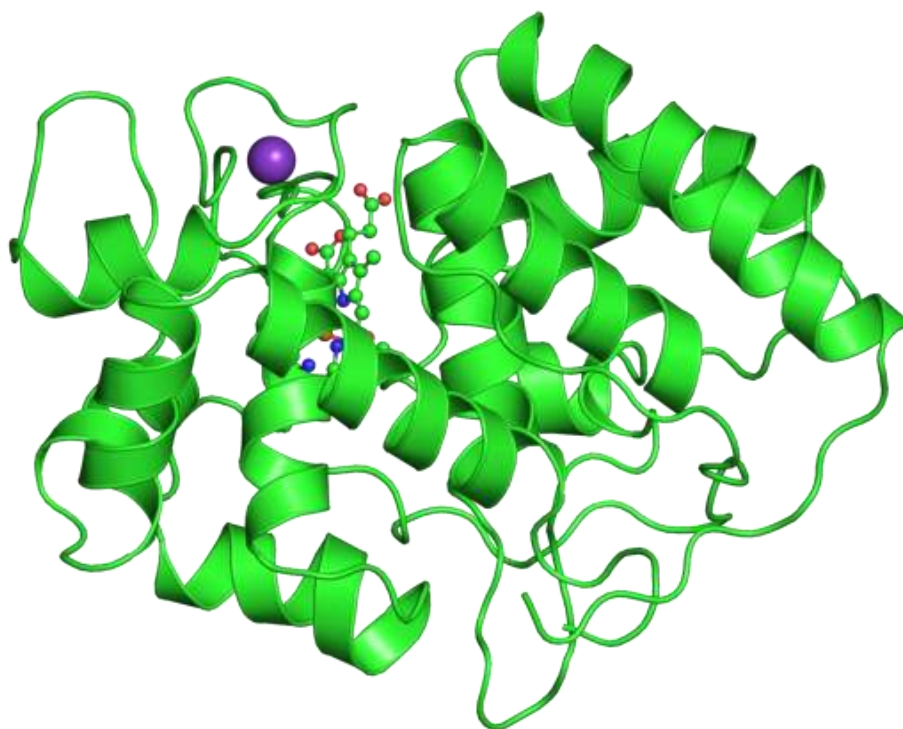
Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

A právě enzym pro peroxidázu, která je pro dřevnatění zásadní jsem se rozhodl izolovat, naklonovat a vložit do genetické výbavy transformované buňky.

2.4.2. Struktura peroxidáz

Peroxidáza je životně důležitý glykoprotein, v rostlinách je kódovaný velkým množstvím genů. Izofomy tohoto enzymu jsou kódovány ve více než 100 sekvencích.¹¹

Obr. 6: Hypotetický 3D model enzymu, převzato z <http://marid.bioc.cam.ac.uk>



V peroxidázách jsou dobře konzervované zbytky aminokyselin. Ve struktuře byla dále identifikována hemová struktura a místa vázající vápník a substrát. Tyto úseky byly v minulosti podrobně zkoumány. Vzhledem k získaným údajům by mohla být předpovězena hypotetická struktura membránově vázaných peroxidáz srovnáním se známými strukturami peroxidáz s dostatečnou sekvenční podobností. Hypotetické 3D modely byly vytvořeny pro, ZmPrx01, ZmPrx66, a ZmPrx70 ([Mika et al., 2008](#) and [Sottomayor et al., 2008](#)).¹¹

Počítačová analýza peroxidáz III. třídy odhalila 13-21 α -šroubovic a minimálně 2 a maximálně 11 β -listů., dále disulfidické můstky a glykosylovaná místa. I když všechny peroxidázy obsahují mezi 8 a 11 cysteinovými zbytky s podobnými pozicemi v sekvenci,

předpovídání modely ZmPrx24, ZmPrx58, a ZmPrx81 odhalily méně disulfidových vazeb, ve srovnání s ostatními. Struktura těchto peroxidáz vyžaduje ještě další zkoumání.¹²

Detailním zkoumáním peroxidáz se zabýval tým Doktora C. Gabaldóna ([já bych sem dal odkaz na citaci Los Angeles School district](#)). Jejich zásluhou byla určena a naklonována primární struktura peroxidázy *Z. elegans*. Geny kódující peroxidázu se skládají ze tří exonů a dvou intronů. Jejich struktura a pozice ukazují na to, že tento enzym patří do peroxidázové skupiny, popisované v Rýži (*Oryza sativa*) a Huseníčku (*Arabidopsis*). Studium sekvencí určujících peroxidázu ukázalo, že obsahují identickou sekvenci 966 bp ORF kódující 321aminokyselin, které se ovšem liší na 5' nepřekládaném konci (5'-UTR). Ačkoli je přesná úloha tohoto úseku zatím neznámá, je téměř jisté, že obsahuje informace, které se mohou podílet na sekundární struktuře a interagují s proteiny, které regulují transport mRNA, stabilitu a translaci. Nezralý polypeptid ZePrx obsahuje signální peptid (N terminální propeptid) o 30 aminokyselinách, který řídí vazbu peptidu na membránu endoplazmatického retikula.¹¹

2.4.3. Rozdělení peroxidáz

Peroxidázy - katalázy (pojmenované podle dvou hlavních enzymatických aktivit), také známé jako neživočišné peroxidázy, nebo bakteriální, houbové a rostlinné peroxidázy s hemovou strukturou. Tato skupina je patrně evolučně nejúspěšnější linií peroxidáz v eukaryotických i eukaryotických buňkách. V současné době splňuje kritéria pro zařazení do této skupiny přibližně 3630 proteinů. První klasifikace těchto enzymů byla prezentována v roce 1992 Karyn Welinderovou. Rozdělení bylo založeno na strukturální homologii, na které se autorka pokusila o rozdělení do tří hlavních skupin.¹³

Peroxidázy I. třídy jsou intracelulární neglykosylované proteiny, které můžeme nalézt v rostlinách, houbách a prokaryotech. Tyto proteiny nemají ve své struktuře disulfidické můstky nebo vápenaté ionty. Třída se dále dělí na cytochrom C peroxidázy, peroxidázy-katalázy a peroxidázy kyseliny askorbové. Jejich hlavní funkcí je likvidace nadbytečného peroxidu vodíku.¹³

Peroxidázy II. třídy jsou výhradně glykosylované proteiny s vápenatými ionty, disulfidickými můstky. Skupina sestává z ligninových peroxidáz, manganových peroxidáz

a univerzální peroxidázy. Jejich hlavním úkolem je degradace odumřelých částí rostlinných těl. Jenom peroxidázy jsou totiž schopné degradovat rostlinný lignin.¹³

Peroxidázy III. třídy tvoří velkou skupinu, přítomnou ve všech pozemních rostlinách s výjimkou jednobuněčných řas. Jsou to glykosylované proteiny stejně jako peroxidázy II. třídy a obsahují vápenaté ionty a čtyři nebo pět disulfidických můstků. Mají velmi důležitou roli ve dvou katalytických cyklech. V peroxidázovém cyklu přijímají elektrony od různých donor- molekul, jako jsou například fenoly a katalyzují redukci H_2O_2 . A byl také popsán samostatný hydroxylový cyklus, který vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku. V důsledku velkého počtu genů a počtu izoform a funkcí ve dvou katalytických cyklech se peroxidázy III. třídy podílejí na široké škále fyziologických procesů, jako jsou obranné reakce rostlin, elongace buněk, produkce kyslíku a produkce ligninu a suberinu.¹⁹ Protože se podílejí na velkém počtu fyziologických procesů, lze velmi snadno detekovat, jejich přítomnost. Nicméně přiřadit přesnou roli pro každý izoenzym peroxidázy je stále ještě nemožné.¹³

Tato základní klasifikace byla dále upřesněna a byla rozšířena ~~rozšířena~~ do dalších oddílů na základě převládajících specifíků ve všech třech třídách. Rozsáhlé sekvenční analýzy genových rodin ze všech tří skupin vedly k závěru, že všechny peroxidázy mají společného předchůdce ve třídě *Negibacteria*. Existuje předpoklad, že v průběhu evoluce se již diverzifikované geny pro Peroxidázy přenesly endosymbiózou do nově vytvořených eukaryotických buněk. Podrobnější fylogenetická analýza peroxidáz II. třídy a několika vybraných zástupců z I. a III. třídy, odhalila že I. třída se oddělila od hlavní vývojové linie velmi brzo a zbylé dvě prošly dalším vývojem.¹³

V závislosti na jejich interakci s komponenty buněčné stěny je lze ještě dále rozdělit do tří skupin¹⁴:

- a) volně navázané proteiny s málo nebo žádnými interakcemi s komponenty buněčné stěny;
- b) slabě vázané proteiny představující hydrofobní nebo iontové interakce s matricí;
- c) silně vázané proteiny, které jsou zesítěné s komponenty buněčné stěny kovalentní vazbou

Naformátováno: Ruština

2.5. Charakteristika procesu lignifikace a peroxidáz *Zinnia elegans*

Jako organismus vhodný k získání genetické informace jsem zvolil *Zinnia elegans*, protože studiem její peroxidázy se již zabýval prof. Gabaldón (viz. výše). Rostlina roste velmi rychle a je nenáročná na pěstování v laboratorních podmínkách.³ Tato rostlina je navíc běžně využívaná jako model pro studium diferenciaci xylemu. Rostlina se k tomu účelu dobře hodí díky dvojakosti dřevnatění na stonku a hypokotylu a díky komplementu izoenzymů, který je téměř omezen na bazický izoenzym. Proces dřevnatění *Zinnie* je unikátní v tom, že během svého vývoje umožňuje studovat dva modely dřevnatění. První se vyskytuje u nahosemenných a druhý u krytosemenných rostlin. Produktem lignifikace je opticky inaktivní, hydrofobní heteropolymer složený z H (hydroxyphenylových), G (guaiacylových) a S (syringylových) jednotek.¹¹

Zatímco hypokotyl rostlin starých 25- 30 dní je složen z G / S jednotek v poměru 42/58, tak lignin stonku obsahuje významné množství H jednotek v H / G / S poměru. Tak tedy S jednotky převažují v [hypokotylu zatímco](#) hypokotylu, zatímco G jednotky převažují ve stonku. V tomto ohledu je *Z. elegans* typický představitel krytosemenných. Lignin mladého stonku se podobá ligninu nahosemenných rostlin, protože (H + G) sám tvoří 78% ligninu stavebních bloků.¹¹

2.6. Dřevnatění *Cinie*

Vývoj prvního internodia *Cinie* můžeme rozdělit do tří jasně definovaných fází, které jasně určují morfologii rostliny a charakteristické dřevnatění. První fáze určuje tvar prvního páru pravých listů, a během této fáze začíná být vidět první internodium. Na konci této fáze začíná být formující se xylem pozorovatelný optickým mikroskopem. Utváří se 12 cévních svazků, zatímco vlákna floemu zůstávají nedostatečně vyvinutá. V této fázi jsou náznaky ligninu viditelné pouze za použití fluoroglucinolového testu a vlákna floemu ještě nejsou zdřevnatělá.¹⁵

Druhá fáze vývoje kmene (stonku), tj. 3. až 6. den po objevení prvního páru pravých listů, v ní rostlina plně využívá růstový potenciál prvních internodií. Stejná fáze nastává ve formaci xylemu, který v této fázi tvoří až 18 ligninových svazků viditelných po fluoroglucinolovém testu. Na konci této fáze (6 dnů po objevení prvního páru pravých listů) se obsah ligninu ve stonku zvyšuje maximální rychlostí, přestože je omezený pouze na oblast xylemu. Vlákná floemu jsou pouze slabě vidět po fluoroglucinolovém testu.¹⁵

Třetí fáze 6. až 9. den je charakterizována viditelnou ztrátou prodlužovacího potenciálu prvního internodia, po devátém dni se to projeví úplnou ztrátou růstového potenciálu. Na konci této fáze je xylem maximálně vyvinutý a floem začíná dřevnatět, což se opět snadno prokáže fluoroglucinolovým testem. Prodlužovací růst je nahrazen tloušťnutím a další vývoj xylemu začíná později.¹⁵

[Dejte pozor na to, že tento obrázek přesahuje okraje stránky!](#)

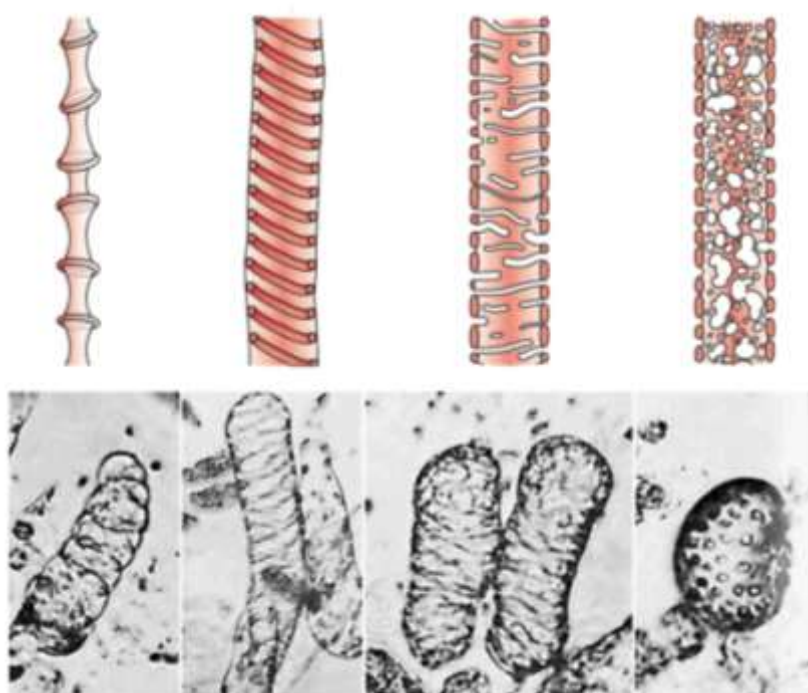
Obr. 7: Model diferenciacce xylemu u rostliny *Zinnia*, převzato z www.kfrserver.natur.cuni.cz

A) kruhový

B) spirální

C) síťkový

D) dírkovaný



Produkce H_2O_2 xylemem *Cinie* je komplikovaný proces, v jehož regulaci hrají klíčovou roli kalmodulin, fosfolipáza C (citlivá na neomycin sulfát) a proteinkináza (citlivá na staurosporin). Tato specifická produkce H_2O_2 poukazuje na analogii mezi mechanismem produkce H_2O_2 během lignifikace v xylému a v oxidativní reakci při hypersenzitivní reakci rostliny na stres.¹⁵

2.7. Poškození rostlin a jejich obrana

[Proboha, už jsem to říkal, tady máte jinak citovanou literaturu!](#)

Apoplastické peroxidázy III. třídy mají klíčovou roli v reakci rostlin na infekci patogenem a abiotický stres, například poranění. Různá poranění představují pro rostliny naprosto běžný stres, který může být způsoben hmyzem, spásáním dobyt看em, nebo jako důsledek zemědělských praktik. Běžné mechanické poranění ihned indukuje rychlou aktivaci genů pro peroxidázu, a tvorbu reaktivních forem kyslíku. Je dokázáno, že tato obranná reakce souvisí s aktivací i jiných apoplastických enzymů. Pozdější reakce na poranění zahrnují různé formy hojení například peroxidázou řízenou suberinizací nebo buněčnou smrt. Dostupné údaje naznačují, že reaktivní formy kyslíku zprostředkovávají buněčnou smrt i signalizaci ostatním buňkám. Peroxidázy jsou zodpovědné za tvorbu i likvidaci těchto molekul.¹⁶

U rostlin se během evoluce vyvinul efektivní mechanismus uvolňování ROS společně s aktivací fenylpropanoidové metabolické dráhy. ([Collinge and Slusarenko, 1987](#)), depozicí kalózy a řízenou polymerací a zesíťováním fenolických látek buněčné stěny (Bradley et al., 1992). Další způsoby obrany jsou suberinizace buněčné stěny (Bernards et al., 1999), a řízená buněčná smrt (Cui a kol., 2013) Produkce ROS, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidu (O_2^-) a hydroxylového radikálu (HO) - a reaktivních forem dusíku, jako je oxid dusnatý (NO) jako reakce na zranění ve spojení s kontrolou redoxních reakcí při hojení ran, jsou rysy společné rostlinám a živočichům. Prudké oxidativní reakce mohou přímo zabít patogeny. ROS zprostředkovávají degradaci jejich proteinů, nukleových kyselin a rozklad buněčných membrán, a také inhibují klíčení spor patogenů. Například, aplikace 25 μM H_2O_2 na *Peronospora tabacina*, *Cladosporium cucumerinum* a *Colletotrichum lagenarium* zcela inhibuje klíčení spor v těchto patogenů (Peng a Kuc 1992). ROS usnadňují dřevnatění a suberinizaci tkáně v místě poranění, čímž omezují šíření infekce. Systémové obranné reakce zahrnují produkci obranných bílkovin, tzv defensinů, které se hromadí v poraněných listech a také ve vzdálených neporušených listů (Green a Ryan, 1972). Podle Leóna et al. (2001), tyto indukovatelné proteiny mohou provádět opravy poškozené tkáně, a produkovat látky, aby se zabránilo šíření patogenu a upravovat metabolismus poškozených rostlin, které mají po zranění změněné nutriční nároky. Peroxidázy zdá se, se zapojují téměř do všech těchto dějů. První, kdo prokázal přínos prudkých oxidativních reakcí (oxidative burst) a jejich

přímou souvislost s peroxidázami při kontaktu s patogenem byl Profesor Paul Bolwell (Bolwell et al., 1995, Robertson et al., 1995 a Bolwell, 1996).¹⁶

Poškození rostlin zatím věda chápe nesprávně, protože v laboratoři se rostliny poraňují často pouze noži a lámáním. Je proto zajímavé, že i bez zraňování, tedy jenom mírným mechanickým namáháním můžeme zvýšit redoxní aktivitu. ([Benikhlef et al., 2013](#)). Uvolnění peroxidázy do apoplastu je tedy brzkou odpovědí rostliny na poranění (Minibayeva et al., 2009), tato reakce je také dobře dokumentována u rostlinných odpovědí na patogeny (např. Lehtonen et al., 2009). Důležité je, aby konkrétní Apoplastický enzym byl přítomen na správném místě ve správný čas, aby plnil svou funkci. To však závisí nejen na genové transkripci a syntéze bílkovin, ale také na sekreci a cílení na místo akce (PENEL a Dunand, 2009). Okamžité zvýšení aktivity peroxidázy ihned po poranění obvykle trvá alespoň několik hodin, a často předchází hromadění transkriptů peroxidázy (Holm et al., 2003) To naznačuje, že uvolňování peroxidázy do apoplastu a aktivace jejich post-translačních modifikací je zodpovědné za okamžité zvýšení jejich aktivity, mimo jiné to dokazuje, že uvolnění Apoplastických peroxidáz je zprostředkováno měnícími se podmínkami prostředí (Fecht-CHRISTOFFERS et al., 2003). Buněčná stěna má zřejmě obrovskou schopnost akumulovat různé izoformy peroxidázy. V kultivovaných buňkách *Catharanthus roseus*, byly pouze 4% z celkové aktivity peroxidázy vylučovány do růstového média ve srovnání s 45% protoplastů (Mera et al., 2003). Některé apoplastické peroxidázy vykazují abilitu k vápenatým iontům a v závislosti na nich mění konformaci pektinu ([Carpin et al., 2001](#)). Regulace sekrece peroxidázy byla pozorována na mnoha příkladech, ale dosud se nepodařilo objasnit její mechanismus. Tímto by se možná dal vysvětlit vliv peroxidáz na místa v buněčné stěně, kde mohou produkovat a odstraňovat ROS ([Delannoy et al., 2003](#)). Mnoho peroxidáz III. třídy má přesně určenou strukturu motivů vázajících Ca ionty. ([Cosio and Dunand, 2009](#)). Exogenní aplikace Ca^{2+} stimuluje aktivitu čisté apoplastické peroxidázy. ([Minibayeva et al., 2009](#) a [Plieth and Vollbehr, 2012](#)). Dále bylo prokázáno, že extracelulární peroxidáza izolovaná z latexu rostliny *Euphorbia* má afinitu ke kalmodulinu, Ca^{2+} a je to tedy dependentní regulační protein, a je silně aktivován současnou přítomností kalmodulinu a Ca^{2+} (Mura et al., 2005). Vzhledem k jejich komplexním biochemickým vlastnostem, může být činnost Apoplastické peroxidázy regulována na několika úrovních.¹⁷

Jedna z nejčastějších klasifikací extracelulárních peroxidáz je založena na jejich isoelektroforetické mobilitě, a jsou klasifikovány jako aniontové, kationtové nebo neutrální, (Kukavica et al., 2012). Změny Apoplastického pH, proto představují spínač, který může vyvolat aktivaci konkrétní izoformy peroxidázy. Je dobře známo, že po napadení patogenem dochází k alkalizaci Apoplastického média během 15-20 min, a shoduje se s prudkým nárůstem koncentrace ROS (Bolwell et al., 2002). Podobné změny pH se vyskytují také v reakci na zranění (Minibayeva et al., 2009). K rychlým přechodným změnám Apoplastického pH může dojít změnou v činnosti draselných a vápenatých kanálů během oxidativního vzplanutí (Bolwell a kol., 2002) a také sekrecí rychlého alkalizačního faktoru (RALF). Tento peptid, který způsobuje rychlou alkalizaci média pro buněčnou kultivaci, byl objeven v tabáku, vojtěšce, rajčatech a topolu (Pearce a kol., 2001 a Haruta et al., 2014). Mezi faktory, které ovlivňují aktivitu Apoplastické peroxidázy, patří různé posttranslační modifikace, jako je glykosylace a fosforylace, které mohou zvýšit účinnost a univerzálnost peroxidáz (Gabaldón et al., 2007). Většina vylučovaných peroxidáz je silně N-glykosylovaná, i když glykanová část může být v rozmezí od 0% do 25% celkové molekulové hmotnosti (Welinder, 1992). Glykosylace peroxidáz III. třídy se zdá být zapojena do uspořádání proteinů, stabilizace enzymů a jejich katalytických aktivit (Van Huystee et al., 2004). Úplnou glykosylací přečištěných peroxidáz z cívie elegans se dvěma předpokládanými místy N-glykosylace (181-NSTL a 191-NRSL) se snížila jejich schopnost oxidovat monolignoly (Gabaldón et al., 2007). Oboustranná fosforylace proteinů je další regulační mechanismus závod signálních drah v reakci na zranění. Dostupné údaje naznačují, že fosforylace / defosforylace Apoplastických peroxidáz umožňuje doladění jejich činnosti při rychlé reakci rostlin na poranění.¹⁷

Bezprostřední navýšení oxidačních reakcí po zranění může být krátkodobé, např. 10-20 min pro excizi v některých semenech (Roach a kol., 2008, Roach a kol., 2010 a Roach a kol., 2014), avšak ve většině případů trvá mnohem déle. Často se silná korelace nachází mezi nárůstem produkce ROS a aktivitou peroxidázy, což naznačuje, že kromě své klasické role H_2O_2 detoxikaci, jsou některé rostlinné peroxidázy schopny oxidační aktivity pro generování H_2O_2 při fyziologickém pH prostřednictvím přímých a nepřímých mechanismů (viz hodnocení podle Bolwell a Wojtaszek, 1997, Ros Barceló, 2000, Bolwell et al., 2002, Kawano, 2003, Mika a kol., 2004, Almagro et al., 2009 a O'Brien a kol., 2012a). Teoreticky mohou

peroxidázy generovat H_2O_2 redukcí sloučenin konjugovaných ze železa a kyslíku (oxyperoxidázy).¹⁷

Identifikace látek, které svojí redukcí umožňují peroxidázám vytvoření HO v apoplastu je zásadní pro pochopení role peroxidázy v nárůstu oxidačních reakcí. V úvahu připadají kyselina dihydroxyfumarová, indol-3-octová kyselina, NAD (P) H, a různé sulfhydrylové molekuly, které splňují požadované vlastnosti pro vznik ROS in vitro (Penel a Dunand, 2009).¹⁷

Nicméně, v reakci na zranění to může být právě sekrece těchto látek, co zvýší redukční potenciál, který zapříčiní oxidativní reakci. Ve skutečnosti mohou exogenní aplikace redukčního činidla jako je NADH stimulovat apoplastickou produkci kyslíkových O_2^- a $O_2^{\cdot-}$ Radikálů Radikálů. (Minibayeva et al., 2009).

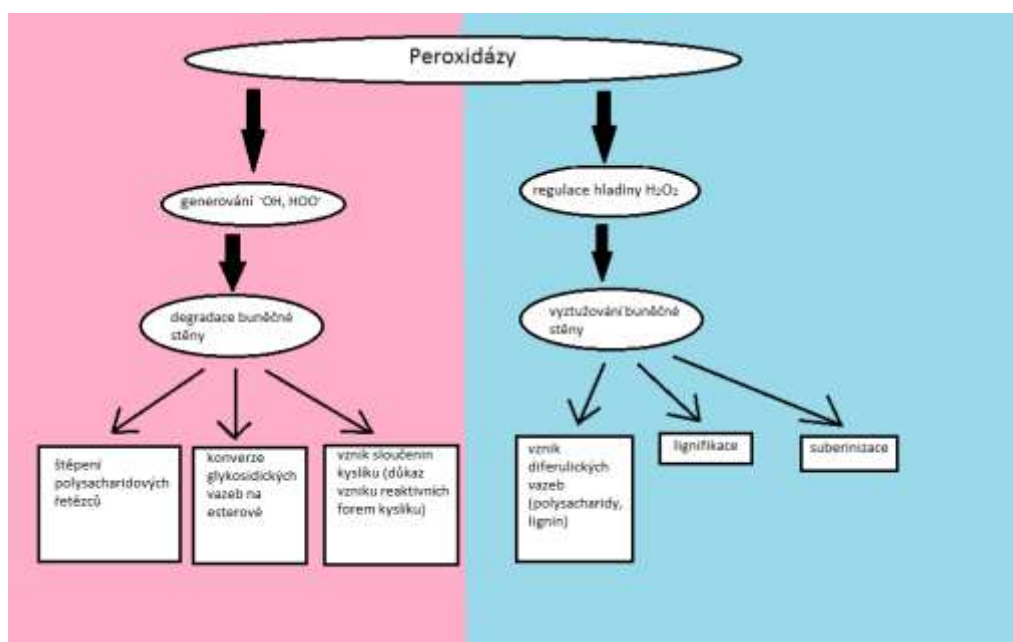
Naformátováno: dolní index

Naformátováno: horní index

Peroxidázy jsou klíčovými prvky i v pozdějších stádiích reakce rostlin na zranění, například posílení buněčné stěny prostřednictvím polymerace makromolekul, které jsou pak uloženy na extracelulárním povrchu, a také zesílení složek buněčné stěny (Almagro et al., 2009) Dehydrogenativní oxidace fenolických substrátů peroxidázou vede k tvorbě fenoxi radikálů a následné kopulaci nestabilních radikálů, které dále vedou k ne-enzymatické polymeraci monomerů (Hiraga et al., 2001) Hydroxycinnamyllové druhy alkoholů se polymerují do ligninu, zatímco hydroxyskořicové kyseliny, které obsahují alifatické skupiny, jsou začleněny do vysoce hydrofobního suberinu. Suberin se ukládá okolo zraněných pletiv (Hiraga et al., 2001). Některé genetické důkazy pro role peroxidáz ve zraněním indukované polymeraci ligninu a suberinizaci existují; například, způsob prostorová a časová exprese ran-indukovatelných aniontových peroxidáz silně koreluje s depozicí suberinu (Bernards et al., 1999 a Bernards a Razem, 2001).¹⁷

Dvojitá činnost peroxidáz buněčné stěny. Peroxidázy jsou schopné generovat reaktivní formy kyslíku (ROS), jako jsou OH^- a HOO^- , ale také mohou regulovat úroveň peroxidu vodíku (H_2O_2). Proto hrají klíčovou roli v buněčném růstu tím, že řídí jemnou rovnováhu mezi uvolňováním proteinů buněčné stěny (levá část obrázku) a *de novo* syntézou buněčné stěny / (pravá část obrázku). H / PRPs = Hydroxyprolin / Proline-Rich proteiny.¹⁴

Obr. 8: Znárodnění dvojitého působení peroxidáz



3. Cíl práce

Cílem mé práce bude klonování rekombinantního genu pro peroxidázu z mRNA po zpětné transkripci a amplifikaci metodou polymerázové řetězové reakce jako cDNA.

Sekvence cDNA bude ověřena sekvenováním [nebo PCR](#).

4. Materiál a metody

4.1. Příprava materiálu k izolaci mRNA a pasážovací médium

Na tuhém MS médiu jsem nechal vyklíčit nažky *Zinnia elegans*. Tyto nažky bylo nutné zbavit veškerých jiných organismů. Za tímto účelem jsem je opláchl v saponátu a potom v destilované vodě. Takto očištěné nažky jsem vložil do tuhého MS média a nechal 5 dní inkubovat. Z vyrostlých rostlinek jsem odstříhl děložní lístky a ty dále pasážoval.

Pro pasážování kalusů *Zinnia elegans* jsem použil tuhé MS médium.¹⁸ Jako zpevňující složku jsem použil agar. Médium bylo zakoupeno od firmy DUCHEFA BIOCHEMIE a jeho složení je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složení média pro pasážování kalusů

složka	Množství (mg/L)		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	K1	0.83
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	1,900	Na ₂ M ₀ O ₄ ·2H ₂ O	0.25
NH ₄ NO ₃	1,650	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170	Sucrose	30,000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	Myo-Inositol	100
Na ₂ EDTA	37.3	Nicotinic Acid	0.5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	Pyridoxine	0.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Thiamine HCl	0.1-1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	Glycine	2

Médium jsem sterilizoval autoklávním (teplota 121°C; tlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min.

4.2. Izolace RNA

Jako vhodný materiál k získání RNA jsem si zvolil buňky z apikálního meristému mladé rostlinky. K izolaci jsem použil RNeasy Plus Mini Kit od firmy QUIAGEN.

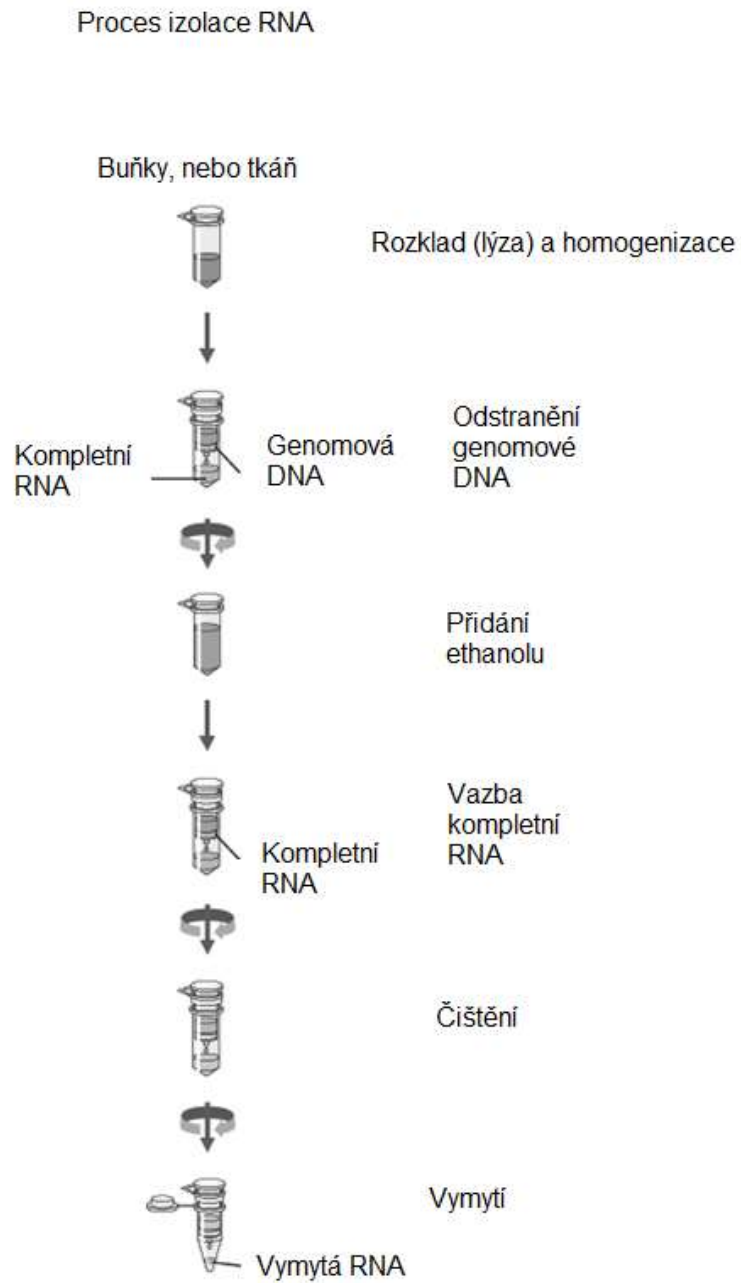
Postup:

1. Z MS media jsem odebral přibližně 2,5 g kalusu z rostliny *Zinnia elegans*. Celé množství rostlinné tkáně jsem přenesl do třecí misky a zalil dostatečným množstvím

Naformátováno: Zarovnat do bloku

- tekutého dusíku a ihned začal třít tloučkem. Po úplném rozrušení materiálu jsem přidal 350ul RLT Pufru. RLT pufr je nutný pro dokončení lýze buněk a inhibuje RNázy.
2. Pokračoval jsem v tření, až vznikla naprosto homogenní směs bez viditelných usazenin.
 3. Přenesl jsem lyzát do kolonek s vrstvou uzpůsobenou k zachycení zbytků buněčné stěny, které byly vsunuty do sběrných kolonek, a odstředoval na centrifuze 2 minuty při maximálních otáčkách.
 4. Přenesl jsem homogenizovaný lyzát do gDNA eliminačních kolonek umístěných ve sběrných kolonkách a centrifugoval 30 s při více než 10 000 otáčkách za minutu. Na membráně gDNA eliminační kolonky zůstala gDNA a pro další práci jsem použil složku, která prošla přes membránku.
 5. K materiálu jsem přidal 350 ul 70% ethanolu, který zajistil odstranění zbytků DNA.
 6. Přenesl jsem 700ul materiálu, ve kterém se může utvořit sraženina, do RNázy centrifugační kolonky, umístěné ve sběrné kolonce. Centrifugoval jsem 15 s při 10 000 otáčkách za minutu. Pro další práci jsem použil materiál zachycený na membránce a část, která protekla, jsem odstranil.
 7. Přidal jsem RW1 pufr do RNázy odstředivé kolonky a odstředoval 15 s při 10 000 otáčkách za minutu. Tento pufr slouží pročištění membrány v odstředivé kolonce.
 8. Do té samé kolonky jsem přidal 500ul RPE pufru a centrifugoval 15s při 10 000 otáčkách za minutu. Část, která protekla, jsem odstranil.
 9. Krok 8 jsem opakoval ještě jednou, odstředoval jsem 2 minuty. RPE pufr je schopen vymývat RNázy, které je potřeba odstranit. Vymyjí se a zůstanou ve sběrné kolonce.
 10. RNáza odstředivou kolonku jsem umístil na nové sběrné kolonky a odstředoval na plné otáčky (asi 150 000 otáček za minutu) po dobu 1 min. Část, která protekla, jsem odstranil. Na membráně mi zůstala izolovaná RNA.
 11. Kolonku s izolovanou RNA jsem na nové sběrné kolonky a přidal 40ul čištěné vody. (prostou enzymů, které by mohly rozložit izolát). Kolonku, s membránkou, a vodou jsem umístil do nové sběrné kolonky. Odstředoval jsem 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu. Do sběrné kolonky protekla voda s izolovanou RNA.

Obr. 9 Schéma izolačního postupu



Převzato z RNeasy Plus Mini Handbook 09/2010

4.3. Média pro práci s bakteriálními buňkami *E. coli*

Selekční média

LB médium selekční s ampicilinem		
LB-Broth (DIFCO)	0,25 g	2,5 % (w/v)
Ampicilin (100 mg/ml)	10 µl	100 µg/ml
Destilovaná voda	10 ml	

LB agar selekční s ampicilinem		
Destilovaná voda	10 ml	
LB-agar (DIFCO)	0,4 g	4,0 % (w/v)
Ampicilin (100 mg/ml)	10 µl	100 µg/ml
X-gal (20 mg/ml)	20 µl	40 µg/ml
IPTG (23,8 mg/ml)	10 µl	23,8 µg/ml

LB médium selekční s ampicilinem a chloramfenikolem		
Destilovaná voda	10 ml	
LB-Broth (DIFCO)	0,25 g	4,0 % (w/v)
Ampicilin (100 mg/ml)	10 µl	100 µg/ml
Chloramfenikol (17 mg/ml)	20 µl	34 µg/ml

LB agar selekční s ampicilinem a chloramfenikolem		
Destilovaná voda	10 ml	
LB-agar (DIFCO)	0,4 g	4,0 % (w/v)
Ampicilin (100 mg/ml)	10 µl	100 µg/ml
Chloramfenikol (17 mg/ml)	20 µl	34 µg/ml

4.4. Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

1,5% agarózový gel		
0,5× TBE pufr	30 ml	80 ml
Agaróza	0,45 g	1,2 g
ethidumbromid (0,15 mg/ml)	30 µl	80 µg/ml

5× TBE pufr (5× tris-borátový pufr)	
Kyselina boritá	27,5 g
Trishydroxymethyl-aminomethan	54 g
EDTA (pH 8,0)	20 ml
Destilovaná voda	Do 1000 ml

6× GLB (nanášecí elektroforetický pufr s barvičkou)	
Bromfenolová modř	0,5 g
Glycerol	50 ml
1× TBE pufr	do 200 ml

5. Výsledky

5.1. Pasážování a tvorba kalusu

Nažky *Zinnia elegans* jsem nechal vyklíčit s tuhým MS médiu.¹⁸ Z mladých rostlinek jsem odstříhl klíčící lístky a ty pak dále pasážoval při stálé laboratorní teplotě kolem 25 °C.

Naformátováno: Písmo: 12 b.

Obr. 10: Kalusy v laboratoři





5.2. Určení sekvence genu a návrh primerů pro amplifikaci

Z vědeckého článku prof. Gabaldona¹⁰ byla získána informace o nukleotidové sekvenci a podle ní navrženy primery, které byly objednány u firmy GeneriBiotech (Česká republika).

Nukleotidová sekvence RNA kódující enzym peroxidázu. Navržené primery jsou podtrženy.

Naformátováno: Zarovnat do bloku

TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATTGT AATACGACTC ACTATAGGGC
 GAATTGGGCC CTCTAGATGC ATGCTCGAGC GGCCGCCAGT GTGATGGATA TCTGCAGAAT
 TCGCCCTTCT AATACGACTC ACTATAGGGC AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACGCGGG
 GAAGCTAAGC TACTTACTCT TAGTTATAAA CATCAGCCTC AAGCTTTTTT CTCTTCACTA
 ATATTATGAG TTATCATAAG TCAAGTGGAA CTACATTAAT GGTTCTCTA TTTATGTTAC
 TTATATCAGT GAACTACTTC ATGTCATGTA ACGCTCAGTT GTCAACCACC TTTTACGATA
 CCACATGCCC TACTGCCTT TCAACCATTC GAACTTCTAT CAGAAGTTCG GTTTCAAGCA
 ACCGTCGCAA TGCAGCCTTG GTCATTGCC TTCTTTTTCA CGATTGTTTT GTTCAGGGAT
 GTGATGCCTC TCTTTTGCTA TCAGGTGCTG GTAGTGAGAG GGCGTCACCT GCCAATGACG
 GTGTGTTGGG CTATGAAGTT ATAGATGCCG CCAAAGCTGC GGTTGAAAGG GTGTGTCCTG
 GAGTTGTTTC GTGTGCTGAT ATACTAGCGG TTGCAGCTCG TGATGCTTCA GTTGCGGTTG
 GTGGGCCGTC ATGGACAGTA AGACTTGGAA GAAGAGATTC TACAACCTCG AACGCGGCAC
 AAGCCGCAAC TGATCTTCCA AGAGGGAACA TGGTTTTAAG TCAACTTATT AGTAACTTTG
 CCAATAAGGG ACTCAACACA AGAGAAATGG TCGCCTTATC AGGATCTCAC ACACTCGGTC
 AGGCAGATG TATAAGGTTT AGGGGAAGGA TATACAACAG TACATTAAGA ATAGAACCTA
 ATTTTAACAG ATCCCTTAGC CAAGCCTGCC CACCAACCGG TAACGATGCT ACCTTGCGAC
 CACTTGATTT GGTGACACCA AATTCGTTTCG ACAACAACCTA CTACAGGAAT CTTGTCACAA
 GTAGGGGTCT TCTTATATCA GACCAGGTGC TTTTAAACGC TGACTCTACC GATAGCATCG
 TGACTGAGTA TGTCAACAAT CCTGCAACGT TTGCCGCTGA TTTTGCTGCA GCCATGGTTA
 AGATGAGTGA AATTGGTGTT GTTACTGGTA CTAGTGGGAT TGTAAGGACT CTTTGC GGTA
 ATCCCAGTTA AAAAAAATA AGGAGATGTG ATGTTATATA TGTGCAGTTA TAAACAAGTA
 TTCTGCATGT GTTGTAATTC CGTAAAATGA ATAAAAGTCT CCTTTCAAAA TAAAAAATA
 AAAAAAAAAA A

Primer forward ZINF

5' ATG AGT TAT CAT AAG TCA AG 3'

Primer reverse ZINR

5' TTA ACT GGG ATT ACC GCA AA 3'

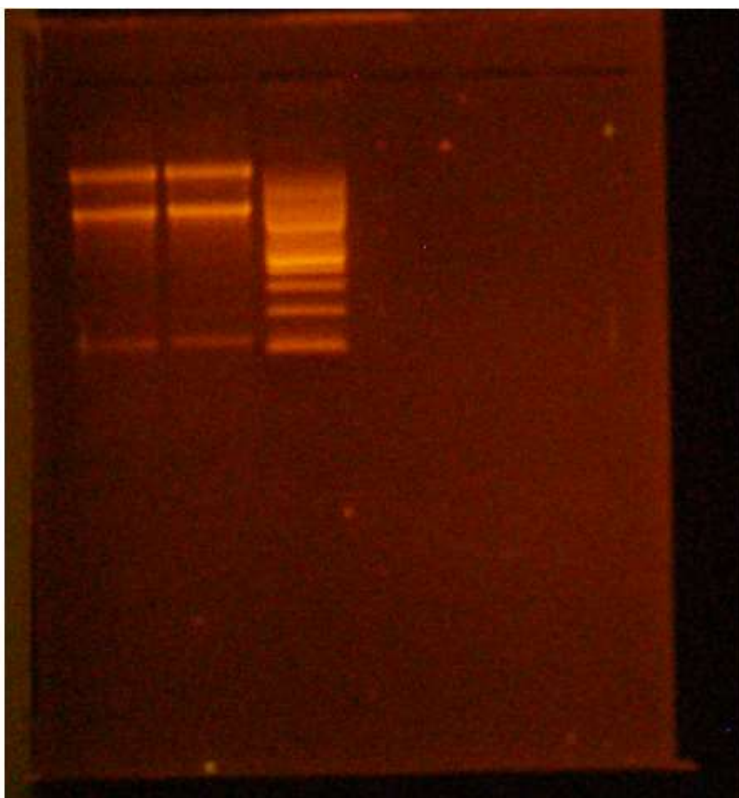
Délka amplikonu = 966 bp

5.3. Izolace RNA

Izolovaná RNA byla podrobena elektroforéze v 1,0% agarózovém gelu (12V/cm,90 minut), výsledek je zaznamenán na obr. 11. Ze 100 mg vstupního materiálu je možné získat ~~přibližně~~přibližně 45 ug RNA. Já jsem z 1,5 g tedy ~~získal~~mohl získat přibližně 675 ug RNA

Obr. 11: Výsledek izolace RNA,

1 2 ladder



5.4. Amplifikace

Gen pro peroxidázu jsem amplifikoval pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR).

Pro zjištění vhodné teploty annealingu (fáze, při které se primery připojují k jednořetězcové matici) jsem zvolil teplotní rozmezí od 50,0°C do 65,0°C. Přesné teploty jsou uvedeny v tabulce 3. Z dosažených výsledků je patrné, že nejvhodnější teplota pro annealing byla 52,2 až 61,0°C.

Naformátováno: Zarovnat do bloku

Tabulka 3: Teploty annealingu v jednotlivých reakčních jamkách

zkumavka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
teplota [°C]	50,0	50,4	51,3	52,5	54,2	56,4	58,9	61,0	62,7	63,9	64,7	65,0

V Tabulce 4 je uvedeno složení reakčních směsí pro PCR. V první části tabulky je seznam a množství jednotlivých vstupních komponent pro uskutečnění jedné reakce, druhé potom množství pro patnáctinásobek reakce.

Naformátováno: Zarovnat do bloku

Tabulka 4: Směs pro PCR-

komponenta	Množství [ul]	Množství [ul] x 15
Taq Man Rt enzyme mix	0,25	3,8
Taq Man RT PCR mix	5,00	75,0
primer ZinF (100uM)	0,25	3,8
primer ZinR (100uM)	0,25	3,8
Templát (RNA)	1,00	15,0
voda	3,25	49,0

V Tabulce 5 je PCR program, který měl zajistit získání DNA v dostatečném množství pro úspěšnou transformaci. Kroky 3, 4, a 5 jsem uzavřel do cyklu, který jsem nechal opakovat 34x.

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

Tabulka5: Struktura PCR programu

Krok č.	Program ZINNIA		
		teplota [°C]	doba trvání [s]
1	RT	48	900
2	AKT	95	600
3	DEN	95	15
4	ANNEALING	(50-65)	20
5	Polymerace	60	40
6		60	30
7		10	bez konce
8		END	

Výtěžek amplifikace jsem zhodnotil po provedení elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu. Pro tento účel jsem připravil 1,5% agarózový gel, do první jamky jsem nanal ladder v množství 5 μ l, do dalších vzorky v množství 2 μ l + 3 μ l promíchané s koncentrovaným nanášecím puřrem (6xGLB). Elektroforéza probíhala při 120 V 120 minut.

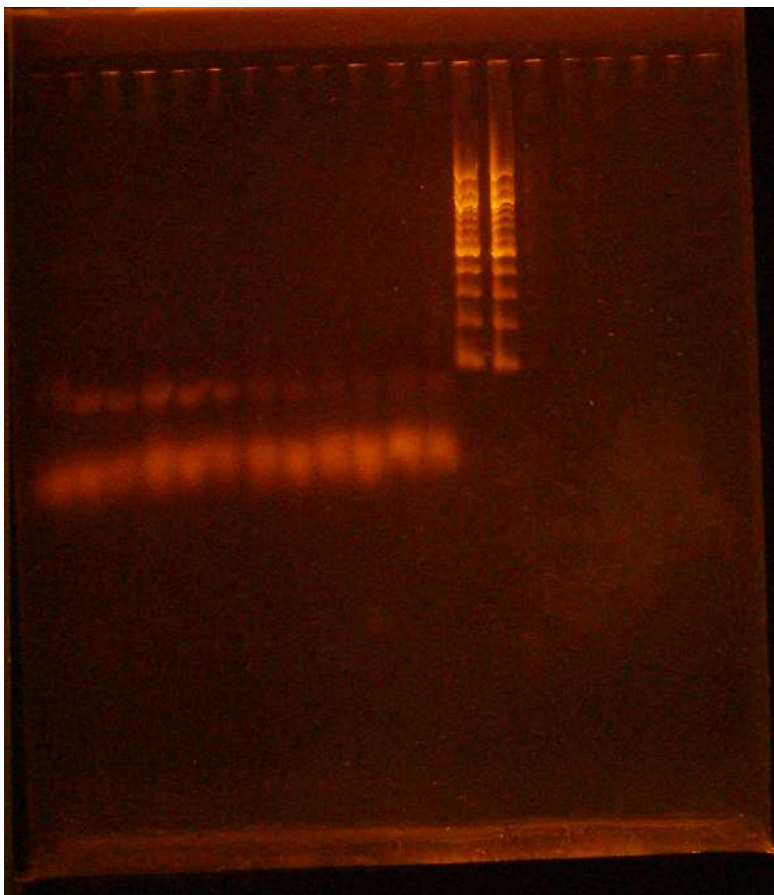
Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

Výsledek 1. Amplifikace je zaznamenán na obr. 12

Obr. 12: Amplifikace č. 1.

číslo reakční jamky

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 ladder [\(2x\)](#)



Výsledek první amplifikace byl neuspokojivý, protože amplikony nevznikaly v dostatečném množství. Jako možné řešení jsem upravil program ZINNIA. Jeho algoritmus / struktura je v tabulce 6.

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

Tabulka 6: Upravený program ZINNIA

Krok č.	Program ZINNIA		
		teplota [°C]	doba trvání [s]
1	RT	48	900
2	AKT	95	600
3	DEN	95	15
4	ANNEALING	(50-65)	90
5	Polymerace	60	40
6		60	30
7		10	bez konce
8		END	

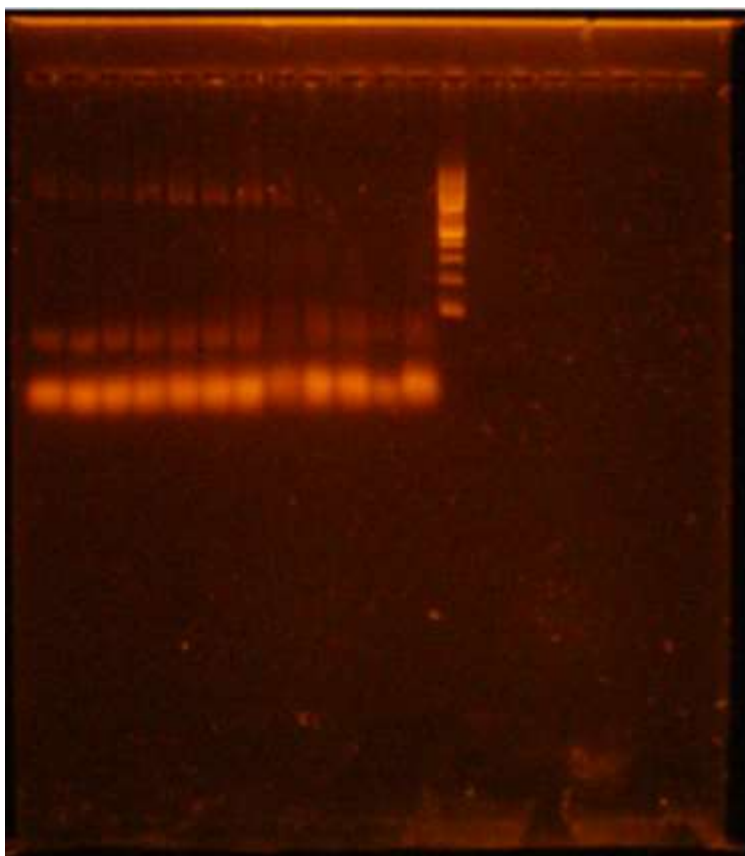
Po provedených změnách už byla kvalita i množství ampliconů vyhovující, což je patrné z obr. 13.

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

Obr. 13: Amplifikace č. 2

Číslo reakční jamky:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 ladder



Pro vyhodnocení amplifikace jsem použil elektroforézu v agarózovém gelu. Připravil jsem 1,5% agarózový gel, do první jamky jsem nanesl ladder v množství 5 μ l a vzorky jsem promíchal s koncentrovaným nanášecím pufrem (6 \times GLB), a to 5 μ l vzorku a 2 μ l 6 \times GLB, a nanesl postupně do jednotlivých jamek. Elektroforéza s 80 ml gelu pak probíhala při 120V 40 minut.

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

5.5. Ligace

Ligaci jsem uskutečnil za použití příslušného PCR produktu a komerčního vektoru pETBlue ze soupravy „1 AccepTor Vector Kit“ (INVITROGEN), která poskytuje standardizovaný set činidel vhodných k vysoce účinné ligaci a transformaci s každým typem plasmidového vektoru a inzertu.

Tabulka 7: Složení ligační směsi

1 μ l (~0.02 pmol)	AccepTor™ Vector (50 ng/ μ l)
0.5 – 4.0 μ l (0.1 – 0.2 pmol)	PCR product (or 2 μ l AccepTor™ Control Insert) X μ
5.0 μ l	Clonables™ 2X Ligation Premix
Nuclease-free water	to a total of 10 μ l

Celou směs je třeba před transformací inkubovat 30 minut při 16°C a pak je teprve vhodná k použití.

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

5.6. Transformace

Buňky NovaBlue Singles™ Competent je nutné nejprve rozmrazit a pak temperovat 5 minut na ledu, potom jsem k nim přidal 1 μ l ligační směsi a promíchal, po tomto kroku jsem buňky vrátil zpět na led na dobu 5 minut. Následně jsem provedl transformaci tzv. tepelným šokem. Směs jsem vložil do vodní lázně s teplotou 42°C na 30s. Tuto dobu je nutné přesně dodržet pro úspěch celé transformace. Po 30s jsem buňky vrátil zpět na led na dobu 2 min. Následkem těchto prudkých změn teploty buňky přijaly cizorodou DNA. V dalším kroku jsem nechal buňky regenerovat s-přídavkem 250 μ l SOC média. Toto médium umožňuje buňkám

regeneraci a expresi β -galaktozidázy a rezistence vůči ampicilinu. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 30 minut. Po této době se obnovilo buněčné dělení a buňky bylo možné vyset na selekční LB agar, na kterém jsme nechali buňky kultivovat při 37 °C přes noc. Pěstoval jsem na 4 Petriho miskách a v tabulce je uveden počet kolonií i s výsledkem modro/bílého testu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce

Tab. 8: Výsledek kultivace – počty kolonií

miska	modré kolonie	bílé kolonie
A	14	3
B	23	6
C	10	11
D	41	13

Počet bílých kolonií by měl odpovídat počtu úspěšných transformací.

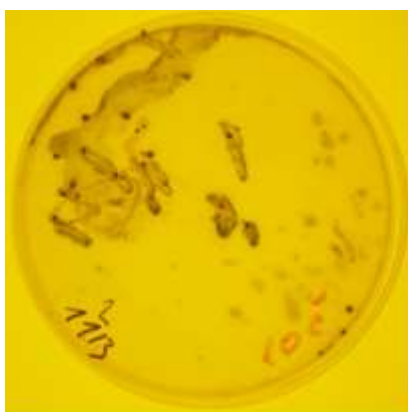
|

Obr. 14: Fotografie misek s koloniemi. Foceno fotoaparátem Olympus při denním světle. Barva kolonií není z fotografií poznat, protože při počítání jsem si je barevně značil pro lepší orientaci.

Miska A (14 modrých kolonií a 3 bílé)



Miska C (10 modrých kolonií a 11 bílých)



Miska B (23 modrých kolonií a 6 bílých)



Miska D (41 modrých kolonií a 13 bílých)



5.7. Další práce s narostlými koloniemi

~~Kultivace ve formě čárek~~ Vyrůstlé bakterie jsme ve formě čárek přeočkovali opět na LB selekční agar. Po přeočkování následovala opět kultivace při 37 °C po dobu 16 hodin, kultivoval jsem jen buňky z bílých kolonií. Ty totiž na základě modro/bílého testu měly obsahovat insert. Bohužel narostly jen modré čárky, což znamená, že buňky neobsahovaly mnou vkládaný insert a k bílému zbarvení došlo z jiných důvodů. Ve formě čárek narostly pouze modré bakterie.

Obr. 15: Výsledek kultivace kolonií ve formě čárek

Miska 1



Miska 2



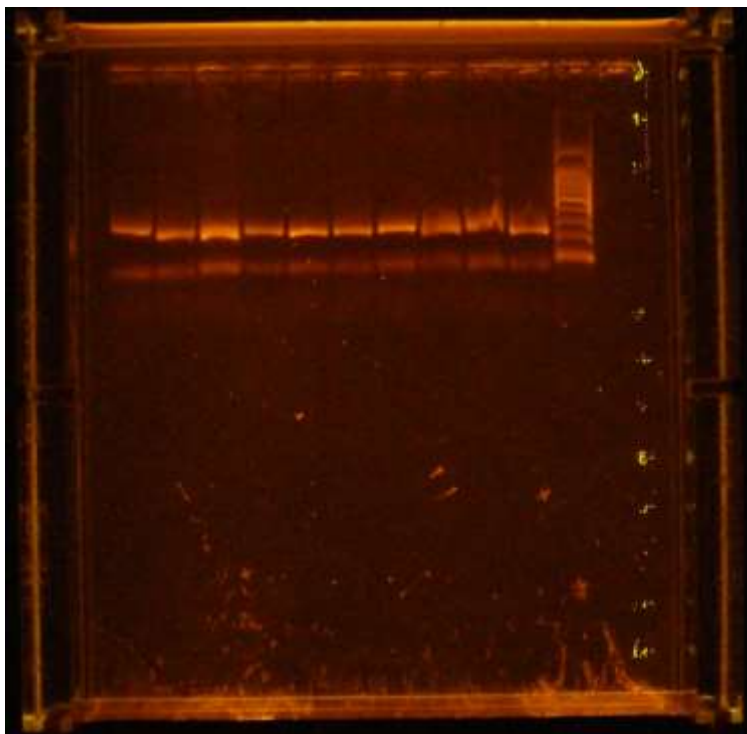
-5.8. Izolace plasmidové DNA a analýza konstruktů

Konstrukce použitého vektoru umožňuje izolaci úseku, který je navržen přímo k vložení inzertu. Obr. 17 Plasmidovou DNA jsem izoloval pomocí komerčně dostupného kitu z 10 kolonií. Izolovanou DNA jsem amplifikoval metodou PCR a provedl elektroforézu na 1,5 % agarózovém gelu. V případě, že by se transformace podařila by izolované a amplifikované fragmenty DNA měly velikost přes 1_400_bp. Jak je vidět na Obr. 16, mnou izolovaná DNA má velikost přibližně 400 bp. Což odpovídá velikosti úseku určenému k vkládání cizí DNA a je tedy jasné, že se mně nepodařilo do něj nic vložit.

Tady opravdu chybí popis

- 1) Jaký komerční kit jste použil pro izolaci plasmidové DNA
- 2) Jaké bylo složení směsi pro PCR a jaký program byl použit.

Obr. 16: Izolace ~~plasmidové~~ plasmidové DNA



6. Diskuse

6.1. Příprava rostlinného materiálu

Na tuhém a vysterilizovaném MS médiu jsem pasážoval kalusy z buněk apikálního meristému mladé rostlinky. Pasážování bylo úspěšné a získal jsem dokonce několik linií kalusů. [Obr.10](#) Dlouhodobým pasážováním jsem získal kvalitní zdroj mRNA.

6.2. Izolace RNA

Izoloval jsem RNA z kalusů apikálního meristému mladé rostlinky. Tyto buňky mají téměř neomezenou dělitelnost a jsou pluripotentní. Buněčné kultury, z dělicích se buněk (meristemické kultury) vytvářejí *in vitro* tzv. kalusy. Buňky meristemického kalusu se neustále dělí a proto je v nich velké množství RNA. Při izolaci genetického materiálu z rostlinných buněk je zapotřebí kompletní a rychlé rozbití výchozího materiálu. Tím se zajistí vysoké výtěžky a zamezí se degradaci RNA působením vnitrobuněčných enzymů. K izolaci RNA je možno použít jakýkoli rostlinný materiál, nejvhodnější jsou měkké tkáně, zejména rychle rostoucí klíčky rostlin, které obsahují velké množství genetického materiálu, mají méně polysacharidů a polyfenolů a buňky mají měkké buněčné stěny. Mechanické rozbití buněčné stěny je vhodné provést třením v misce. Možností jak si proces zjednodušit, je provést zmrazení tekutým dusíkem a následně podrtit zmraženou tkáň. Zmražením se stěna stane křehčí a zároveň se inhibují enzymy, které by degradovaly RNA.¹⁷

RNeasy Mini Kit Plus je určen pro izolaci RNA z malého množství živočišné buňky nebo tkáně. Souprava je kompatibilní s širokou škálou kultivovaných buněk a snadno lyzuje tkáň. Kontaminace genomovou DNA je účinně eliminována pomocí speciálně navržené gDNA eliminační kolony. Získaná RNA je připravená k použití a je ideální pro použití v úkonech, které jsou citlivé vzhledem k nežádoucí kontaminaci DNA, jako jsou např. metody kvantitativní PCR, RT PCR. Postup RNeasy Plus integruje patentované technologie firmy Qiagen pro selektivní odstranění dvouvláknové DNA s dobře zavedenou RNeasy technologií. Účinná izolace vysoce kvalitní RNA je zaručena, bez potřeby dalšího odstraňování DNA. Biologické vzorky jsou nejprve lyzovány a homogenizovány ve vysoce denaturačním

Naformátováno: Barva písma: Text 1

Naformátováno: Nadpis 2

Naformátováno: Písmo: není Tučné,
Barva písma: Text 1

Naformátováno: Písmo: (výchozí)
+Nadpisy (Cambria), Barva písma:
Akcent 1

guanidin-isothiokyanátu obsahujícím pufr, který okamžitě inaktivuje RNázy pro zajištění izolace intaktní RNA. Lyzát se pak nechá projít gDNA eliminační centrifugační kolonkou.¹⁸

Tato kolonka, v kombinaci s optimalizovaným vysoce slaným pufrům, umožňuje efektivní odstranění genomové DNA. V dalším kroku se do průtokové kolonky přidá ethanol, který zajistí odpovídající vazebné podmínky pro RNA, a vzorek je pak přenesen na ostředovací RNeasy kolonku, kde se kompletní RNA váže na membrány a nečistoty jsou účinně odplaveny. Vysoce kvalitní RNA se pak vymývá v 30 a více ul vody.¹⁷

S postupem RNeasy Plus jsou izolovány všechny molekuly RNA delší než 200 nukleotidů. Postup poskytuje „zkvalitněnou „ mRNA, protože většina RNA s velikostí <200 nukleotidů (jako je například 5.8S rRNA, 5S rRNA, tRNA a, které dohromady tvoří 15 - 20% z celkové RNA) jsou selektivně vyloučeny. Distribuce velikosti čištěné RNA je srovnatelná s metodou centrifugace přes CsCl vrstvu, kde není sedimentace malých molekul RNA příliš účinná.¹⁷

Kvalitu mnou izolované RNA jsem ověřil elektroforézou na agaróovém gelu. Na elektroforéze (viz. Obr. 11) jsem viděl izolované molekuly 28S a 18S rRNA, což je dobrým indikátorem kvalitní izolace. Tyto molekuly jsou v buňkách významně zastoupeny a na elektroforetickém gelu je možné je zaznamenat. Molekuly mRNA, kterých je mnoho druhů, na gelu vidět nejsou nebo jsou vidět ve formě „smíru“.

6.3. Určení nukleotidové sekvence a návrh primerů

Pro každou genetickou manipulaci je zásadní znalost sekvence zvoleného proteinu. Já jsem sekvenci cílového proteinu získal z odborného článku prof. Gabaldona¹⁰, který se studiem peroxidázy zabýval a podařilo se mu ji izolovat a zjistit její genetickou sekvenci.

Primery jsem pak navrhl podle počátečních a koncových nukleotidů v sekvenci. Pro návrh primerů pro standardní primer forward se musí shodovat s počátkem sekvence matricového vlákna DNA. Primer reverse jsem navrhnul podle konce kódující sekvence matricového vlákna. Návrh primerů je pro celou transformaci zásadní, a proto PCR je třeba brát v úvahu několik důležitých pravidel, mezi něž patří: délka zpravidla 18-25 nukleotidů, obsah G+C 40% až 60%, rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry, specifická primérů (na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa), absence

Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

komplementárních sekvencí v primerech (mohly by vést k tvorbě duplexů), absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek) a to nejdůležitější: zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'- koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát.¹⁷ Já jsem se ale musel držet struktury kódující sekvence genu, proto jsem většinu uvedených pravidel nemohl respektovat. Dodržel jsem ale délku primerů, která činila 20 a 20 nukleotidů, obsah G+C byl 20 a 15%. Přesné nasazení primerů na cílovou sekvenci jsem pak testoval použitím gradientového termocyklu, který umožňuje v jednom experimentu nastavit několik různých teplot připojení primerů (annealing).¹⁷ Výsledek diskutuji v kapitole 6.4.

6.4. Příprava genu pro peroxidázu amplifikací

Gen pro peroxidázu jsem amplifikoval metodou PCR. Program, který jsem pro reakci navrhl, se neukázal jako dostačující, a proto bylo nutné jej modifikovat. Pro zjištění vhodné teploty annealingu jsem nastavil teplotní gradient od 50°C do 65°C. Během tohoto kroku primery dosedají na matricové vlákno DNA, je teplota určujícím faktorem pro specifickou reakci. Podle vyfocených Agarozových gelů je vidět, že nejvhodnější teplota annealingu byla mezi 52,2°C a 58,9°C. Při nízkých teplotách není dostatečná specifická reakce, na gelu je možno pozorovat řadu nespecifických produktů a při vysokých teplotách se amplikony netvoří, protože se destabilizují vodíkové vazby mezi sekvencí a primerem.

~~A já jsem viděl toto:~~ Jak je vidět na Obr. 12, p Při teplotách annealingu do °C se opravdu tvořilo určité množství produktů, které ovšem nebyly dostatečně zřetelné. Při teplotách nad 58,9°C se nevytvořilo nic. Optimální byly hodnoty

6.5. Ligace a transformace bakteriální buněk *E. coli*

Dalším krokem bylo vložení amplikonů do vektoru. Použil jsem komerční vektor pETBlue-1 (obr. 17). Termostabilní DNA polymeráza často poskytuje amplikony, které mají jeden přecházející 3'-dA nukleotid, linearizovaný AccepTor vektor pak obsahuje jeden přesahující 3'-dU nukleotid a může se tudíž jednoduše spojit s amplikonem. Spojení

amplikonu a vektoru zajišťuje enzym DNA ligáza. Během transformace jsou dU nukleotidy nahrazeny dT nukleotidy a plasmid se normálně replikuje v bakteriální buňce.

6.6. Transformace

Transformace je proces vnesení tohoto produktu do bakteriální buňky. Součástí kitu, který jsem použil, byly NovaBlue kompetentní buňky, které jsem transformoval metodou tepelného šoku. Vektor, který jsem k transformaci použil, nese gen pro rezistenci na ampicilin (exprese β -laktamázy), což se dá využít k selekci buněk nesoucích vektor, při kultivaci na médiu obsahujícím ampicilin. Další gen, který vektor nese je gen pro β -galaktozidázu, čehož se využívá k vizuálnímu screeningu bakterií a k oddělení buněk obsahujících vektor s inzertem od buněk s vektorem bez inzertu.

pETBlue systém vektorů je soubor klonovacích vektorů, který umožňuje vysokou úroveň exprese zvolených genů v *E. coli*¹⁹. Soupravy Acceptor Vector jsou navrženy pro jednoduché vkládání PCR produktů s použitím termostabilní DNA polymerázy, jako je např. *Taq* DNA polymeráza. Tyto DNA polymerázy nechávají jednotlivé 3' dA přesahy na reakčních produktech. Linearizovaný Accep Tor vektor DNA obsahuje jednotlivé 3' dU přesahy a tak mohou být ligovány do PCR produktu bez modifikace. Souprava obsahuje ligační premix tj, unikátní ligační směs, která obsahuje ligázu, pufr a kofaktory pro rychlou a účinnou ligaci. Kit také obsahuje nachystané kompetentní buňky NovaBlue Singles pro transformaci a ligaci. Kit také obsahuje nachystané kompetentní buňky NovaBlue Singles pro transformaci a ligaci. Hostitelský kmen NovaBlue je vhodný pro klonování a ověření konstrukce vektorů Accep Tor díky vysoké účinnosti transformace a obsažené *recA endA* mutace, které vedou k vysokým výtěžkům a vynikající kvalitě plasmidové DNA.²⁰

Použití vektoru označeného AccepTor a kompetentních buněk NovaBlue Single umožňuje vizuální rozlišení kolonií obsahujících vektor s insertem a vektor bez insertu. Jedná se o tzv. modro/bílý test. Této vizuální identifikace klonů je dosaženo použitím oslabeného konstitutivního promotoru (*tet*) původem z *E. coli* k řízení exprese α -peptidu *lacZ*, samotná exprese cílového genu je pak řízena promotorem T7lac.²⁰

Polyklonovací místo je vloženo do genu pro β -galaktozidázu tak, že nedochází k posunu čtecího rámce, a tudíž není porušena struktura ani aktivita tohoto enzymu. V případě, že nedojde k včlenění inzertu do vektoru, dojde k expresi funkční β -galaktozidázy. Tento enzym štěpí v přítomnosti induktoru IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktosid) substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) na modře zbarvený produkt – vznikají modré kolonie. Vložení inzertu do polyklonovacího místa dojde k narušení exprese enzymu, a nedochází tedy k štěpení X-gal. Vzniklé kolonie jsou bílé.²⁰

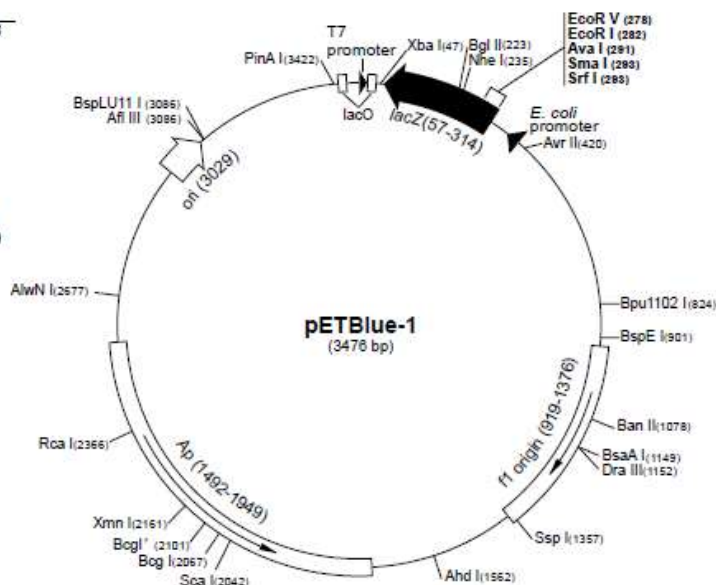
AccepTor vektor umožňuje modro/bílý screening transformantů, k rozlišení těch kolonií, jejichž bakterie mají rekombinantní plasmid, a které jej nemají. Když jsou bakterie naočkovány na X-gal/IPTG zkoušecí misku, kolonie s rekombinantním plasmidem jsou bílé a kolonie bez rekombinantního plasmidu modré.²⁰

Obr. 17: Mapa vektoru pETBlue-1 s vyznačením významných míst pro klonování, převzato z User Protocol TB248

Naformátováno: Zarovnat do bloku

pETBlue-1 sequence landmarks

<i>lac</i> operator	3429-3448
T7 promoter	1-17
<i>lac</i> operator	22-42
T7 transcription start	18
multiple cloning region (<i>EcoR</i> V- <i>Srf</i> I)	276-297
<i>lacZ</i> start codon	314
<i>lacZ</i> α -peptide ORF	57-314
<i>E. coli</i> promoter	364-392
f1 origin	919-1374
<i>bla</i> coding sequence	1492-2349
pUC origin	3029



~~pETBlue vektor umožňuje expresi zvolených genů v *E. coli* na vysoké úrovni. Expese proteinů bez N terminálního konce je dosaženo T7 RNA polymerázou řízenou z T7~~

promotoru. Ribozomální vazebné místo ve vektoru je vhodně umístěno od 5' k AccepTor klonovacímu místu (EcoRV) pro dosažení iniciace translace z místa počátku ATG. První primer pro PCR amplifikaci, která poskytne požadovaný produkt musí začínat kodonem ATG na 5' konci. Ligace provedená s AccepTor vektorem poskytne optimální vzdálenost mezi ribozomálním vazebným místem a translačním místem.²⁰ Zbytečné, expresi jsme nedělali

6.6. Transformace

Cílové proteiny vložené do vektoru pETBlue-1 mohou být exprimovány v expresních buňkách *E. coli* pouze pod podmínkou, že je insert ve správné orientaci vztahen k T7lac promotoru vektoru, a že insert obsahuje počáteční kodon ATG na svém 5' konci. Transkripce dále požaduje zdroj T7 RNA polymerázy, kterou dodávají expresní buňky pod kontrolou lacUV promotoru, a tudíž poskytují expresi T7 RNA polymerázy a klonovaných genů indukovanou IPTG. Exprese byla indukována pomocí IPTG. Tady možná popsat modro/bílý test.

6.7. Screening transformantů

AccepTor vector je přizpůsoben k vizuálnímu screeningu bakterií. Toho je dosaženo umístěním polyklonovacího místa v genu pro β -galaktozidázu a to tak, aby nedošlo k posunu čtecího rámce, tudíž aby nebyla porušena struktura ani aktivita enzymu. V případě, že nedojde k včlenění inzertu do vektoru, dojde k expresi funkční β -galaktozidázy a v přítomnosti induktoru IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktosid) a barevného substrátu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) enzym štěpí X-gal za vzniku modrého zbarvení – kolonie modrého fenotypu. Vložím inzertu do polyklonovacího místa dojde však k narušení exprese enzymu, β -galaktozidáza nevzniká, tudíž nemůže štěpit X-gal a vzniklé kolonie jsou bílého fenotypu. Navíc se mohou objevit i kolonie světle modré barvy nebo bílé kolonie modrající při skladování. Oboje pravděpodobně obsahují vektor s inzertem. Dochází zde k tvorbě malého množství β -galaktozidázy. Existují i další metody screeningu, jako např.

použití vektor-specifických primerů ohraničujících klonovací místo, tuto metodu jsem ovšem nevyužil. Po vysetí bakterií na selekční agar s ampicilinem jsem pozoroval modré a světle modré kolonie a menší množství bílých kolonií, což dávalo předpoklad pro úspěšnou transformaci.

6.8. Izolace plasmidové DNA a ověření konstruktů

K ověření úspěšnosti transformace, jsem izoloval plazmidovou-plasmidovou DNA z 10 kolonií, které před přeočkováním ve formě čárek měly bílou barvu. K izolaci jsem použil komerční kit. A izolovanou DNA amplifikoval metodou PCR. K vyhodnocení amplifikace jsem použil elektroforézu na agarózovém gelu.

Jak je vidět na Obrobr. 18, vektor je navržen tak, že místo pro vložení inzertu se nachází mezi dvěma primery. Primer forward - pETBlueT7UP primer #70725-3, a primer reverse - pETBlueDOWN primer #70603-3 Tato skutečnost umožňuje izolaci celého úseku, ať už s inzertem nebo bez něj.

Za předpokladu, že jeden ribonukleotid izolované RNA má molekulovou hmotnost 360, byAmplikon genu fragment, který jsem izoloval z plasmidů (má délku délka 966 nukleotidůbp), měl molekulovou hmotnost $360 \cdot 966 = 347760$. Po spojení s vektorem by měla být vzdálenost mezi primery použitými pro PCR (a tedy velikost amplikonů) mít velikost 1 416 bp a molekulovou hmotnost 509760.

Vektory bez naklonovaného genu pak poskytují amplikony o délce 200 nebo 400 jak výše uvádíte?

Protože měly všechny amplikony délku kolem bp, neprovedli jsme další ověření sekvenováním, protože konstrukty požadovaný inzert zjevně neobsahovaly.

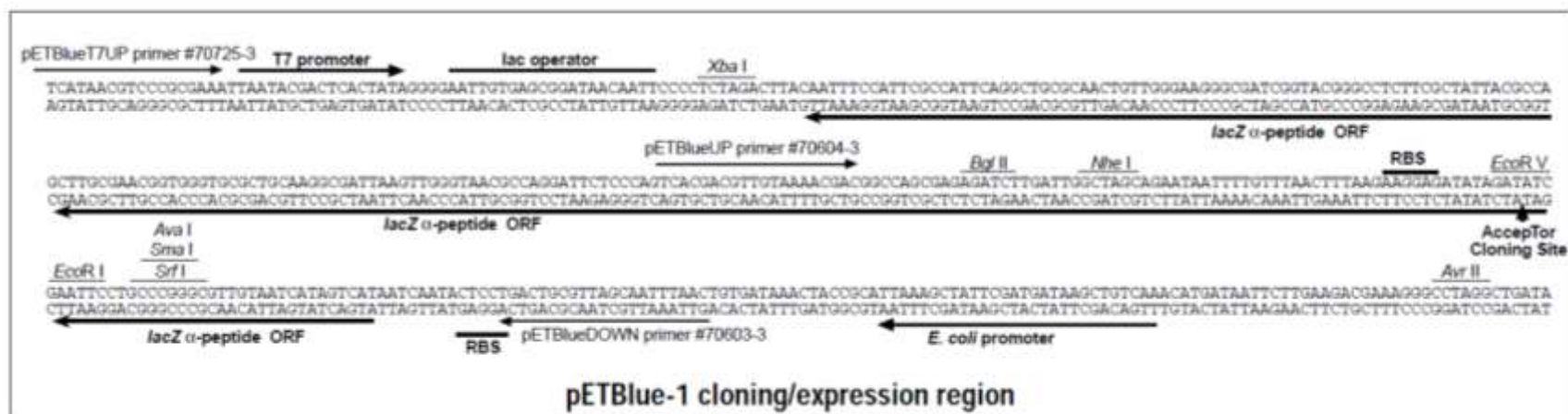
Naformátováno: Odsazení: První řádek: 1,25 cm

6.8. Izolace plasmidové DNA a ověření konstruktů

K ověření úspěšnosti transformace, jsem izoloval plasmidovou DNA z 10 kolonií, které před přeočkováním ve formě čárek měly bílou barvu. K izolaci jsem použil komerční kit. A izolovanou DNA amplifikoval metodou PCR. K vyhodnocení amplifikace jsem použil elektroforézu na agarózovém gelu.

Jak je vidět na Obr. 18, vektor je navržen tak, že místo pro vložení inzertu se nachází mezi dvěma primery. Primer forward – pETBlueT7UP primer #70725-3, a primer reverse – pETBlueDOWN primer #70603-3. Tato skutečnost umožňuje izolaci celého úseku, ať už s inzertem nebo bez něj. Za předpokladu, že jeden ribonukleotid izolované RNA má molekulovou hmotnost 360, by fragment, který jsem izoloval z plasmidů (délka 966 nukleotidů), měl molekulovou hmotnost $360 \cdot 966 = 347760$. Po spojení s vektorem by měl mít velikost 1416bp a molekulovou hmotnost 509760.

Obr. 18 struktura místa uzpůsobeného pro transformaci.



– z jakých kolonií jste izoloval plasmidy – z modrých či bílých?

– z kolika kolonií jste izoloval plasmid

– že byl výsledek sekvenování negativní, jak jste hledal ten inzert? Inzert jsme hledali jen takto, na sekvenování se už nic neposílá!

7. Závěr

- 1) Na Murashige- Skoog médiu jsem vypěstoval kulturu meristematičkých buněk *Zinnia elegans* ve formě kalusu.
- 2) Z buněk jsem izoloval mRNA, kterou jsem použil jako zdroj genetického materiálu. Její kvalitu jsem ověřil elektroforézou.
- 3) Provedl jsem zpětnou transkripci izolované mRNA.
- 4) Transkripty jsem amplifikoval pomocí specifických primerů a získal dostatečné množství dsDNA pro klonování.
- 5) Takto získanou DNA jsem vložil do plasmidového vektoru.
- 6) Výsledným konstruktem jsem transformoval buňky *E. coli*, které byly speciálně k tomuto účelu upraveny.
- 7) Transformované buňky jsem kultivoval na selekčním médiu a narostlé kolonie buněk jsem dále namnožil.
- 8) Z klonů jsem izoloval plasmidovou DNA, kterou jsem ~~nechal na přítomnost~~ osekvenovat komerčním subjektem-ověřil metodou PCR
- 9) Výsledky ~~sekvování~~ PCR nepotvrdily naklonování genu pro peroxidázu do plasmidového vektoru.

8. Seznam použitých zkratek

[Různé typy písma!!!!](#)

A	Adenin
C	Cytosin
cDNA	komplementární DNA kódující pouze oblasti exprese (complementary DNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
G	Guanin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktosid
LB	Luria- Bertani Bertani
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	Nikotinamidadenin dinukleotid fosfát nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
NADH	Nikotinamidadenin dinukleotid nikotinamidadenin dinukleotid
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
rpm	počet otáček za minutu (repeats per minute)
SOC médium	tekuté médium; složené z tryptanu, NaCl, kvasinkového extraktu, glukosy a vody
T	Thimin Thymin
TBE	pufr pro agarózovou elektroforézu; složený z Tris báze, kyseliny borité, ethyldiamintetraacetátu disodného a vody
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

9. Literatura a zdroje

[Proboha - opravte i velikost písma a formátování](#)

1. ALBERTS, B; BRAY, D; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P; *Základy buněčné biologie*, Esperero Publishing, Ústí nad Labem 1998
2. MAREŠOVÁ, J; Příprava rekombinantního proteinu TTF3 v prokaryotickém expresním systému. [Diplomová práce](#), VFU Brno 2010
3. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K399.php>
4. <http://botanika-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/2-bunecna-stena.html>
5. <http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Celuloza.pd>
6. NEČAS, O a kolektiv; *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, Praha, H& H 2000
7. GLOSSER, J, *Fyziologie rostlin* Masarykova univerzita, fakulta přírodovědecká, Brno 1995
8. PAVLOVÁ, L; *Fyziologie rostlin*, Praha, Karolinum 2006
9. KLOUDA, P; *Základy biochemie*, Pavel Klouda, Ostrava 2005
10. LUŠTINEC, J; ŽÁRSKÝ, V; *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2003
11. Carlos Gabaldón, Matías López-Serrano, Federico Pomar, Fuencisla Merino, Juan Cuello, M.A. Pedreño, A. Ros Barceló, Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures, *FEBS Letters*, Volume 580, Issue 18, 7 August 2006, s. 4311-4316
12. Sabine Lüthje, Claudia-Nicole Meisrimler, David Hopff, Benjamin Möller, Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants, *Phytochemistry*, Volume 72, Issue 10, July 2011, s. 1124-1135,
13. Marcel Zámocký, Paul G. Furtmüller, Christian Obinger, Evolution of structure and function of Class I peroxidases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 500, Issue 1, 1 August 2010, s. 45-57
14. Igor Cesarino, Pedro Araújo, Adriana Franco Paes Leme, Silvana Creste, Paulo Mazzafera, Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 62, January 2013, s. 1-10,
15. Alfonso Ros-Barceló, Federico Pomar, Matías López-Serrano, Pilar Martínez, María A Pedreño, Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 40, Issue 4, April 2002, Pages 325-332,

16. Farida Minibayeva, Richard Peter Beckett, Ilse Kranner, Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding, *Phytochemistry*, Available online 12 July 2014,
17. ŠMARDÁ, J; DOŠKAŘ, J, PANTŮČEK, R; RŮŽIČKOVÁ, V; KOPTÍKOVÁ, J; *Metody molekulární biologie*, Brno, Masarykova univerzita 2010
18. http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/bitstream/10603/9074/16/16_table.pdf
19. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/570661/suberin>
20. Novagen User Protocol TB248 Rev. E 0111 Jn
21. Farida Minibayeva, Richard Peter Beckett, Ilse Kranner, Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding, *Phytochemistry*, Available online 12 July 2014,
22. BARTOŠ, M; FOREJTNÍKOVÁ, H; BARTOŠOVÁ, L. *Biotechnologie pro farmaceuty: Návod k praktickým cvičením*. Brno : VFU Brno, 2006. 98 s.
23. SLAVÍKOVÁ, Z; *Morfologie rostlin*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2002
24. <http://marid.bioc.cam.ac.uk/credo/structures/2GHH>
25. http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-cytologie-rostlinna_bunka.html
26. http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/bunka/2010/0910_05.pdf
27. <http://study.upol.cz/predmet/BOT/PGSFB?lang=cs>
28. www.plantphys.net
29. BARTOŠ, M; KOLORZ, M; HOŠEK, J; BARTOŠOVÁ, L; *Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty: Návod k praktickým cvičením*. Brno, VFU Brno, 2008. 85 s.
30. RNeasy Plus Mini Handbook 09/2010
31. Larissa Barelli, Israel Enrique Padilla-Guerrero, Michael J. Bidochka, Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*, *Fungal Biology*, Volume 115, Issue 11, November 2011, s. 1174-1185
32. Andreas E. Voloudakis, Philippe Marmey, Etienne Delannoy, Aida Jalloul, Christelle Martinez, Michel Nicole, Molecular cloning and characterization of *Gossypium hirsutum* superoxide dismutase genes during cotton–*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* interaction, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 68, Issues 4–6, April–June 2006, s. 119-127
33. Edith Francoz, Philippe Ranocha, Huan Nguyen-Kim, Elisabeth Jamet, Vincent Burlat, Christophe Dunand, Roles of cell wall peroxidases in plant development, *Phytochemistry*, Volume 112, April 2015, s. 15-21,

34. Zhiqing Gong, Dajing Li, Chunquan Liu, Anwei Cheng, Wenliang Wang, Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 60, Issue 2, Part 2, March 2015, s. 1095-1099
35. Chii-Jeng Wang, Yuan-Li Chan, Chin Hui Shien, Kai-Wun Yeh, Molecular characterization of fruit-specific class III peroxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Journal of Plant Physiology*, Volume 177, 1 April 2015, s. 83-92,
36. Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik, V.P. Bulgakov, T.V. Avramenko, E.A. Günter, Y.S. Ovodov, T.I. Muzarok, Y.N. Zhuravlev, The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes*, *Journal of Biotechnology*, Volume 168, Issue 1, 10 October 2013, Pages 64-70,
37. Igor Cesarino, Pedro Araújo, Juliana Lischka Sampaio Mayer, Adriana Franco Paes Leme, Paulo Mazzafera, Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 55, June 2012, s. 66-76,
38. <http://www.stefajir.cz/?q=ampicilin>
39. Carolina Andreia Cateto, Maria Filomena Barreiro, Alírio Egídio Rodrigues, Mohamed Naceur Belgacem, Kinetic study of the formation of lignin-based polyurethanes in bulk, *Reactive and Functional Polymers*, Volume 71, Issue 8, August 2011, s. 863-869,
40. Edith Francoz, Philippe Ranocha, Huan Nguyen-Kim, Elisabeth Jamet, Vincent Burlat, Christophe Dunand, Roles of cell wall peroxidases in plant development, *Phytochemistry*, Available online 7 August 2014
41. <https://www.qiagen.com/cz/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/rneasy-plant-mini-kit/#productdetails>