

Jak vytvořit geneticky modifikovanou rostlinu?

Markéta Šámalová



**Oddělení
experimentální
biologie rostlin**

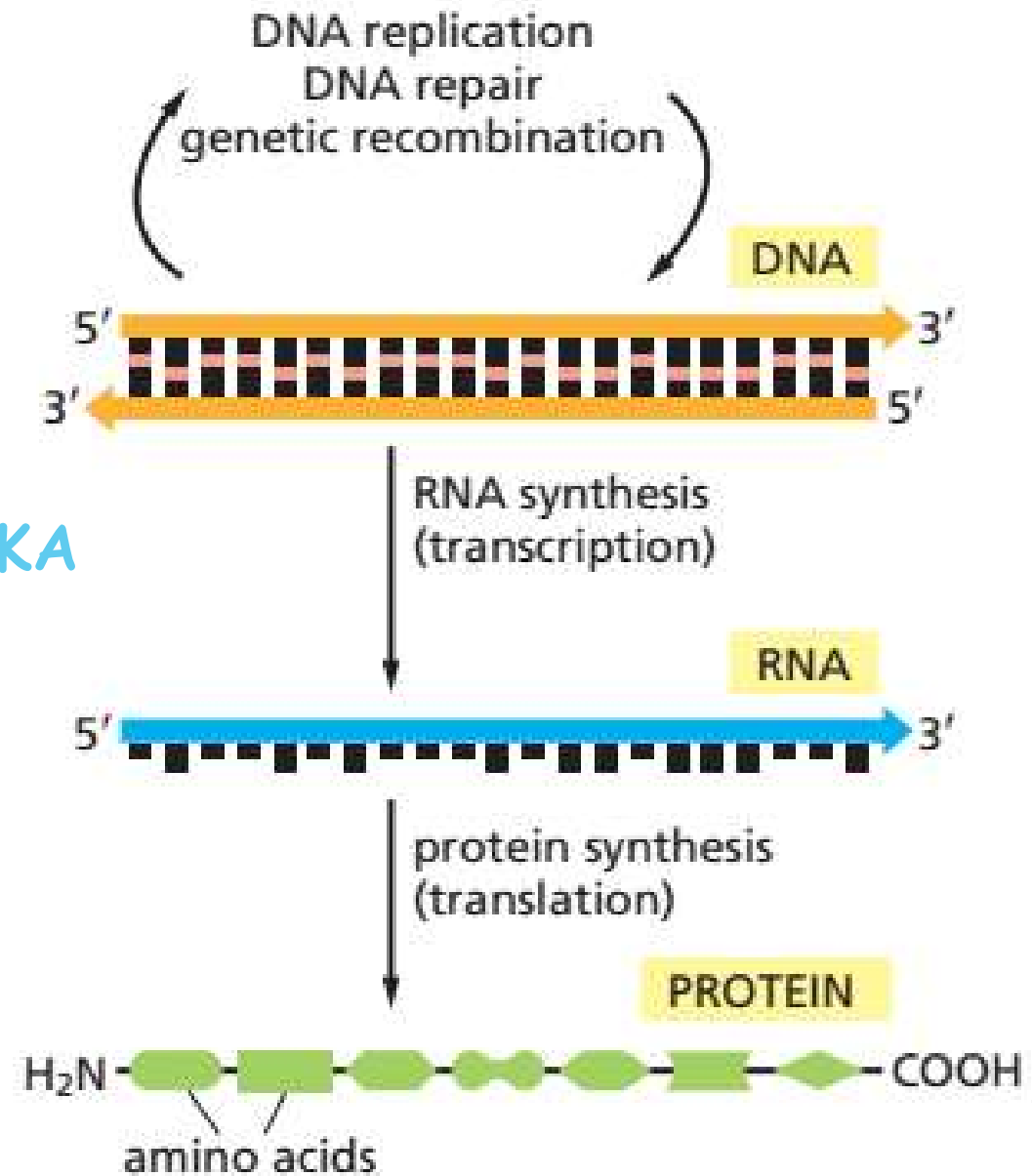


► GENOMIKA

► TRANSCRIPTOMIKA

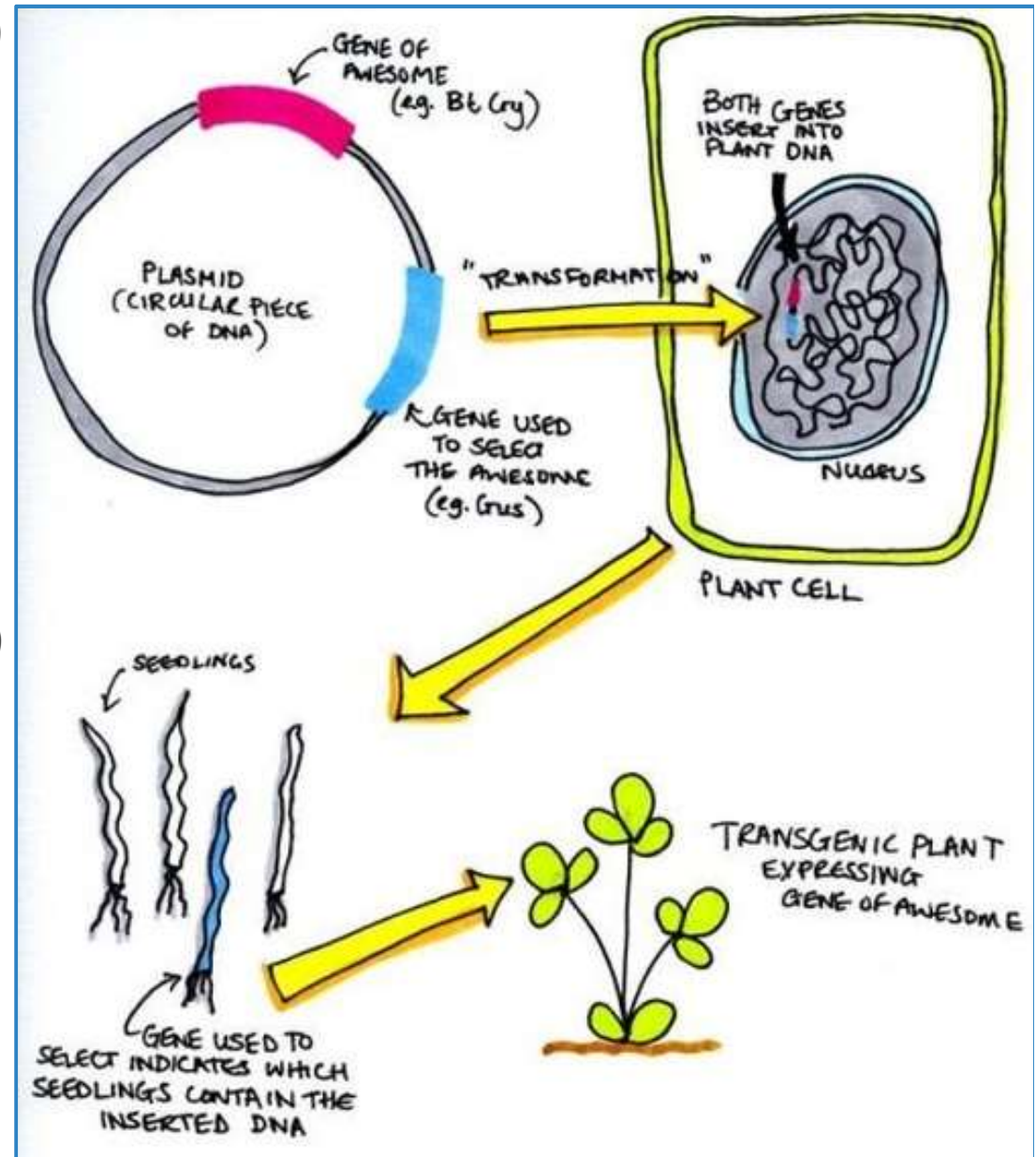
► PROTEOMIKA

► Další „OMICs“



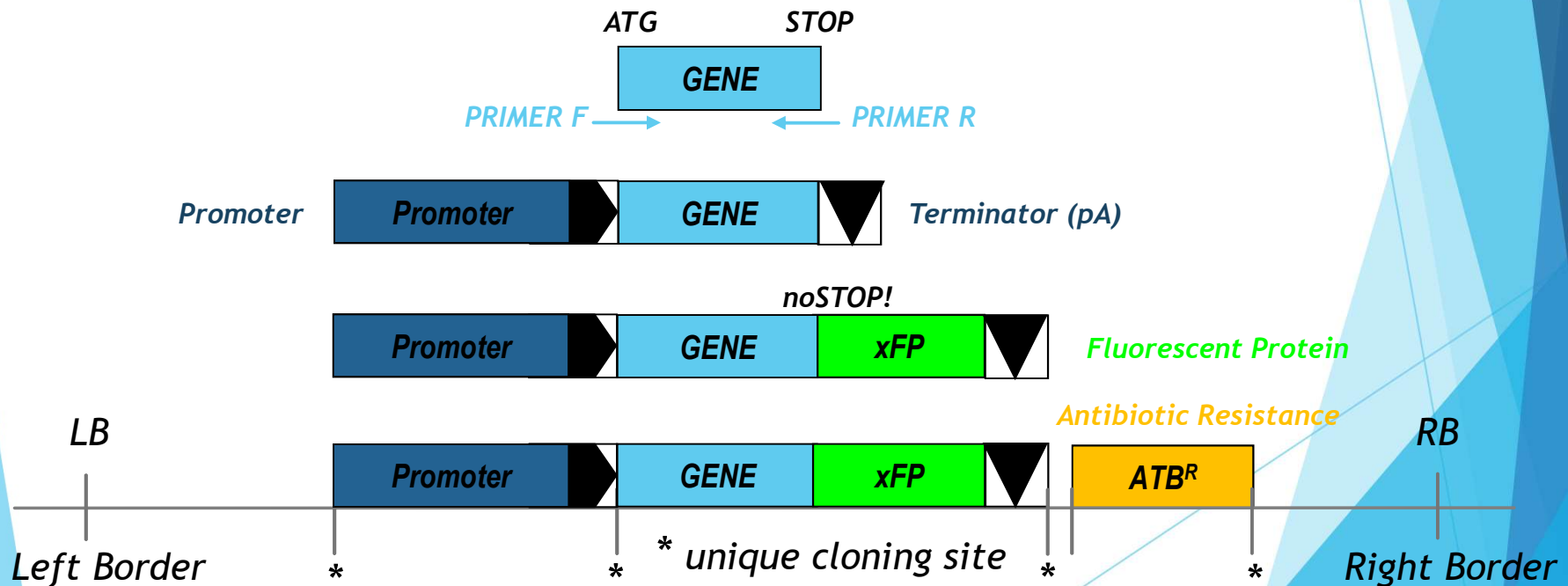
Kroky při tvorbě transgenní/GMO/upravené rostliny

- ▶ 1. Výběr genu (např. z databáze)
- ▶ 2. Navržení klonovací strategie a primerů (= oligos)
- ▶ 3. PCR a klonování genu do plazmidu (= vektoru)
- ▶ 4. Transformace *E. coli* a replikace plazmidu
- ▶ 5. Izolace plazmidu
- ▶ 6. Sekvenování genu (DNA)
- ▶ 7. (Re-klonování do binárního vektoru pro transformaci rostlin)
- ▶ 8. Transformace *Agrobacterium*
- ▶ 9. Transformace rostlin
 - ▶ *Arabidopsis* - "floral dip"
 - ▶ Tabák, rýže - techniky tkáňových kultur
 - ▶ (Transientní exprese)
- ▶ 10. Selektce transformantů



Klonování

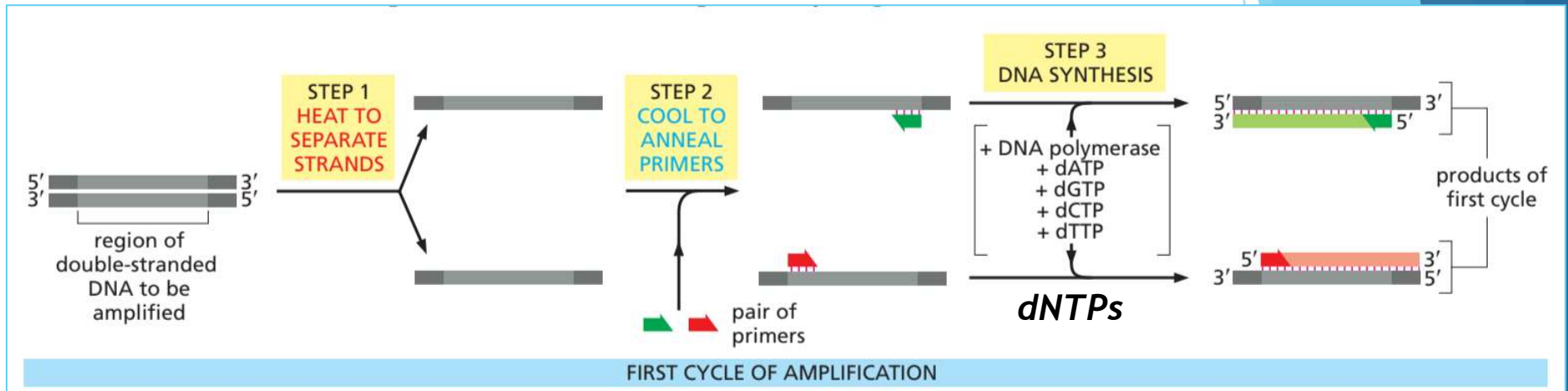
- ▶ V molekulární biologii se termín klonování DNA používá ve významu vytvoření mnoha identických kopií (obvykle miliard) molekul DNA - amplifikace určité sekvence DNA.
 - ▶ Geny lze klonovat pomocí bakterií nebo PCR (polymerázová řetězová reakce)
 - ▶ Klonovat lze jakoukoli DNA (fragment)
- ▶ **Klonovat lze jakéhokoliv jedince**



- ▶ Plasmid = kruhovitě uzavřená molekula DNA, schopná replikace

PCR ~ Polymerase Chain Reaction

- ▶ Pár PRIMERŮ (neboli OLIGOs) řídí syntézu požadovaného segmentu DNA

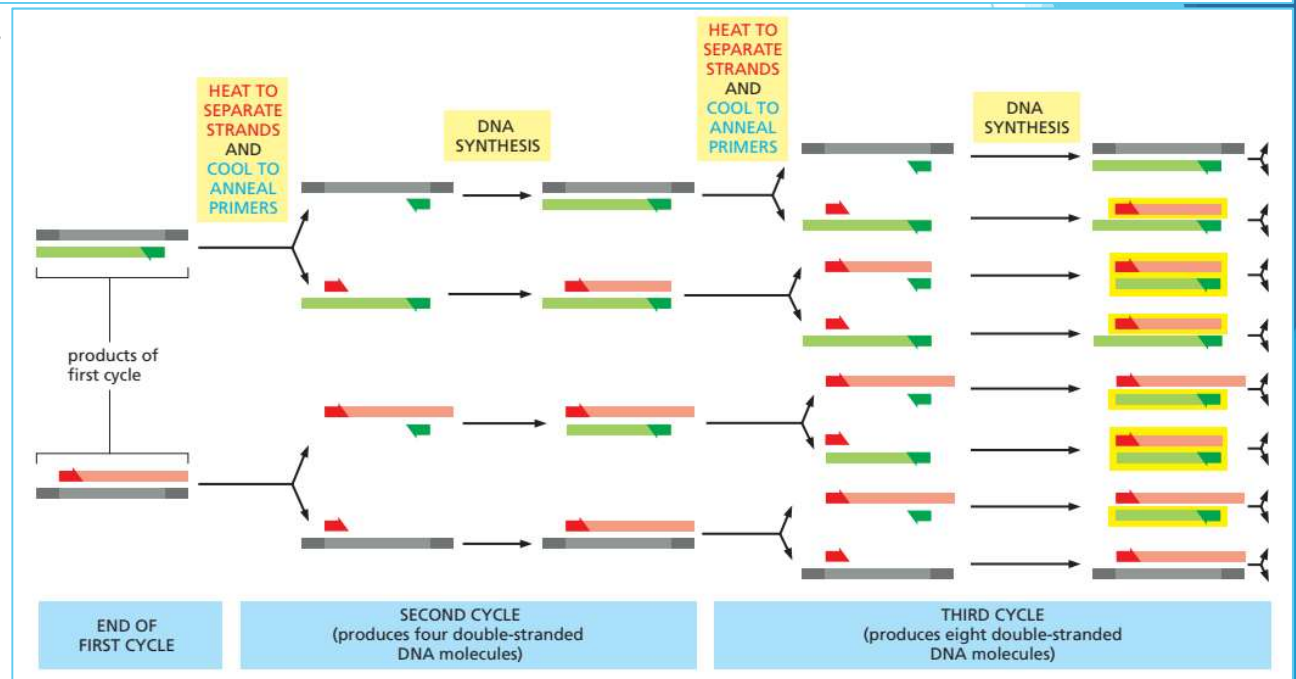


- ▶ Každý cyklus PCR zahrnuje 3 kroky:

- ▶ separaci vláken (*denaturation*)
- ▶ hybridizaci (*annealing*)
- ▶ syntézu DNA (*extension*)

- ▶ PCR používá k amplifikaci DNA opakovaní cyklů.

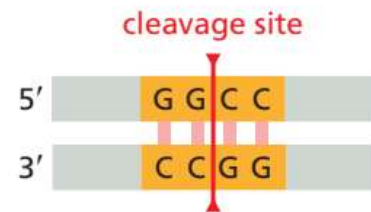
Speciální DNA polymeráza (z termofilní bakterie, *Taq*) stabilní při mnohem vyšších teplotách než eukaryotická DNA polymeráza.



Klasické klonování využívá restriční nukleázy

- ▶ Restriční nukleázy štěpí DNA ve specifických nukleotidových sekvencích
 - ▶ Pocházejí z bakterií, např. *EcoRI* pochází z *Escherichia coli* (*E. coli*)
 - ▶ Až 1000 komerčně dostupných!

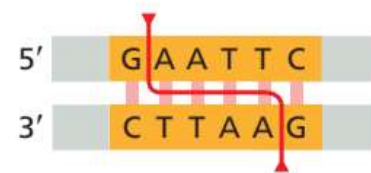
- ▶ **Blunt-ended DNA**



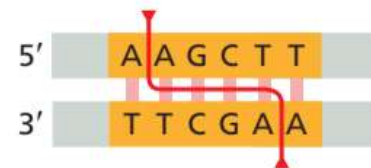
HaeIII



- ▶ **"sticky ends" - short, single-stranded overhangs**



EcoRI



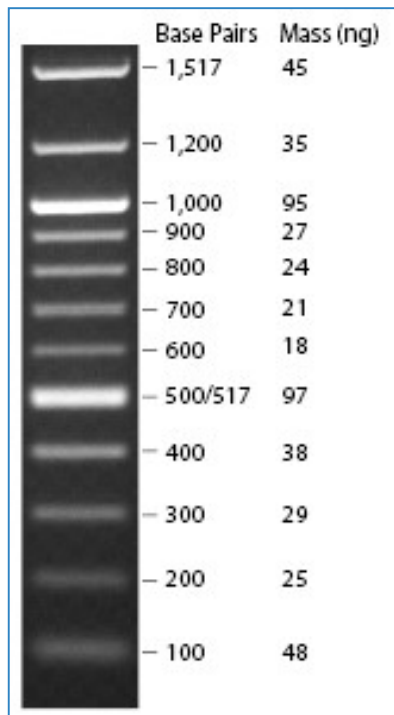
HindIII



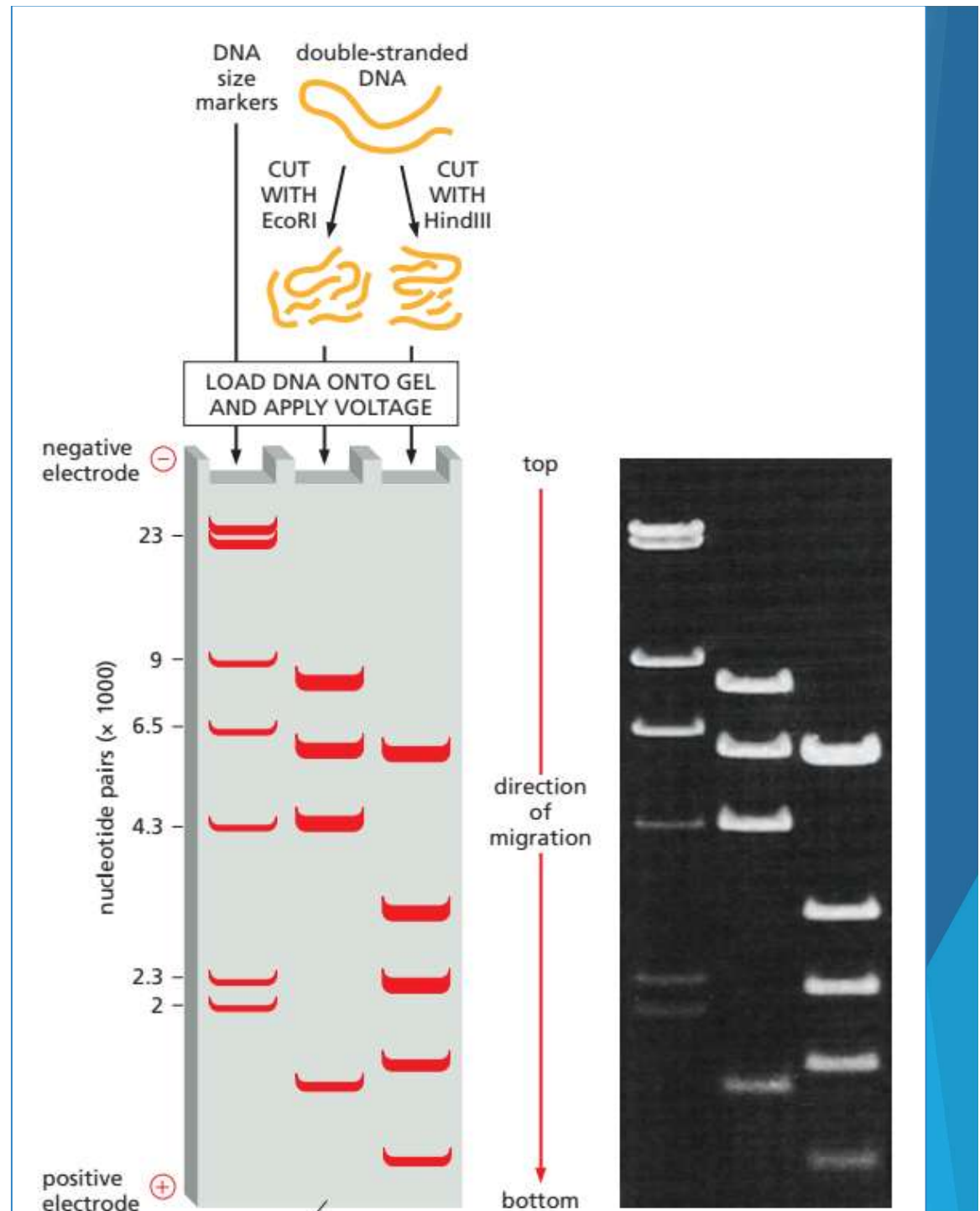
- ▶ Novější např. **GATEWAY klonování** ~ není potřeba restričních endonukleáz
 - ▶ Používá rekombinační sekvence, "Gateway att" místa a směs klonázy (*Clonase mix*)
 - ▶ *Golden Gate*, *Green Gate* (for plants), *GeneArt* jsou další klonovací systémy

Gelová elektroforéza rozděluje molekuly DNA podle jejich velikosti

- ▶ DNA běží od - k +

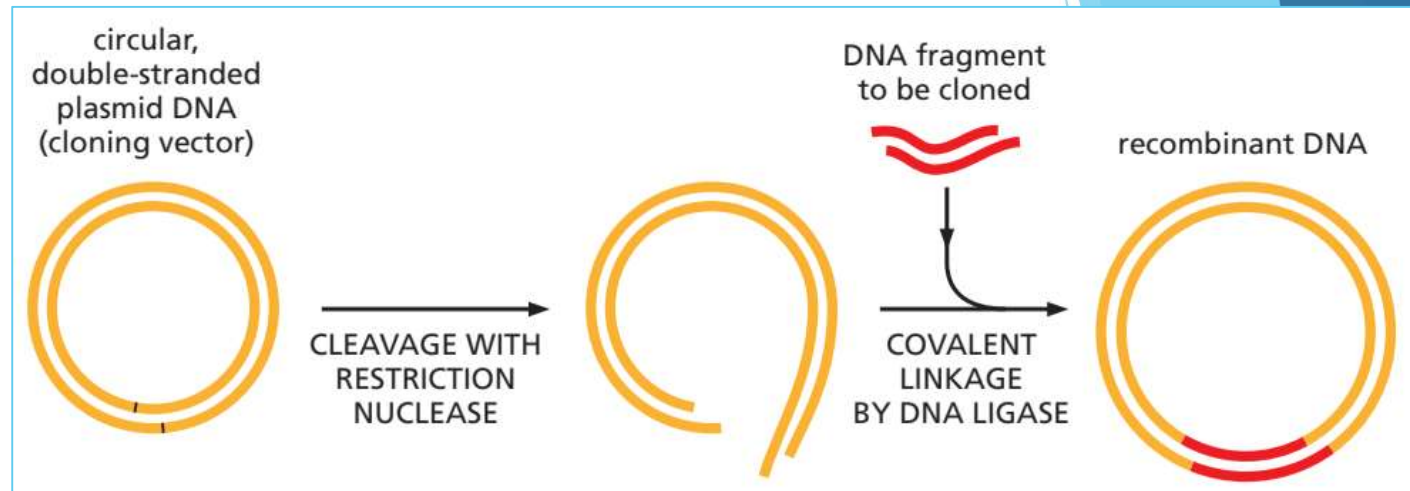


- ▶ DNA žebříček (DNA ladder)
 - ▶ DNA velikost a hmotnost

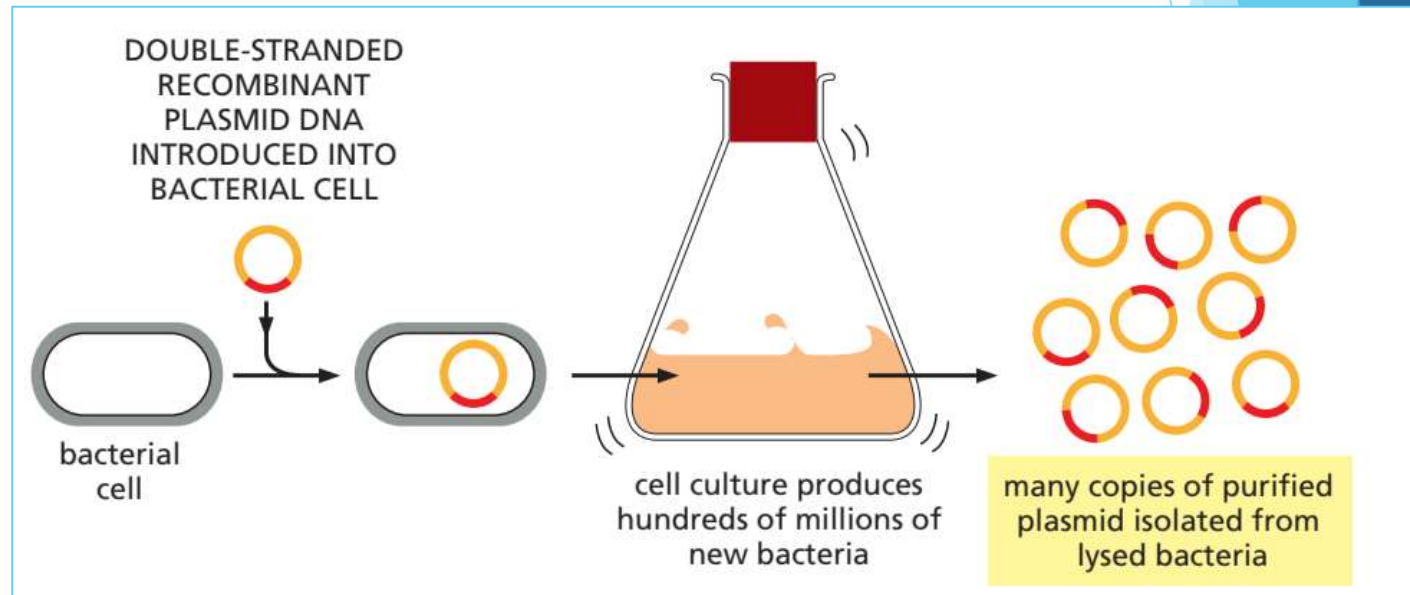


Ligace DNA a replikace fragmentů

- ▶ DNA fragment je vložen do bakteriálního plazmidu pomocí enzymu DNA ligázy.

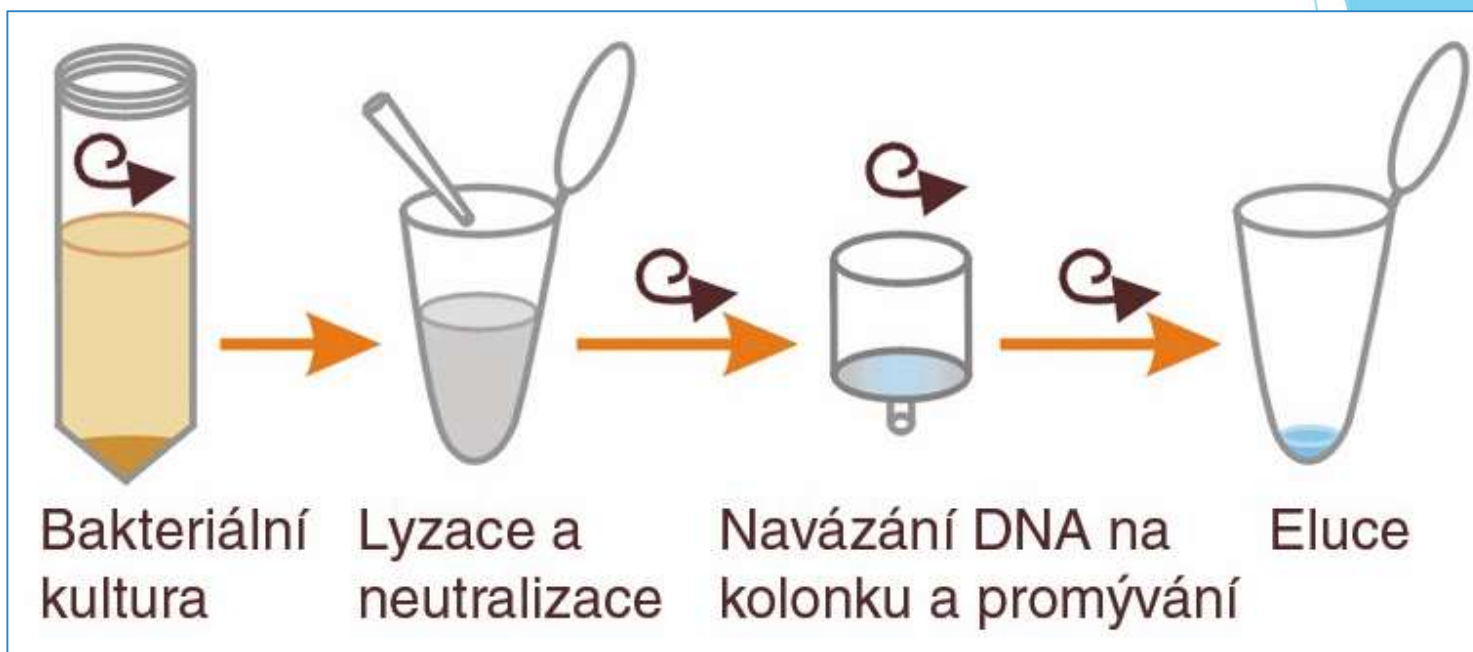


- ▶ DNA fragment může být replikován (klonován) uvnitř bakteriální buňky.



Izolace DNA

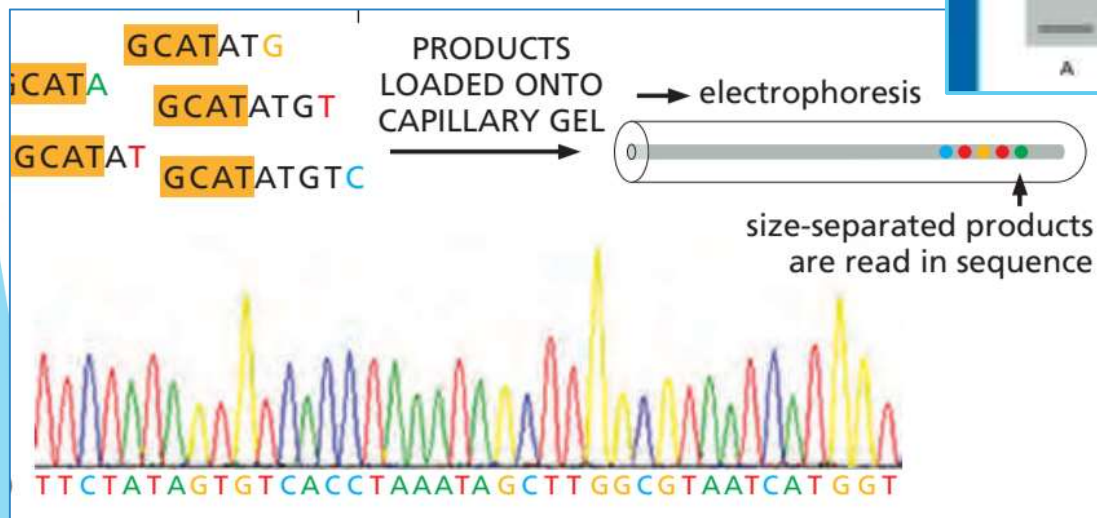
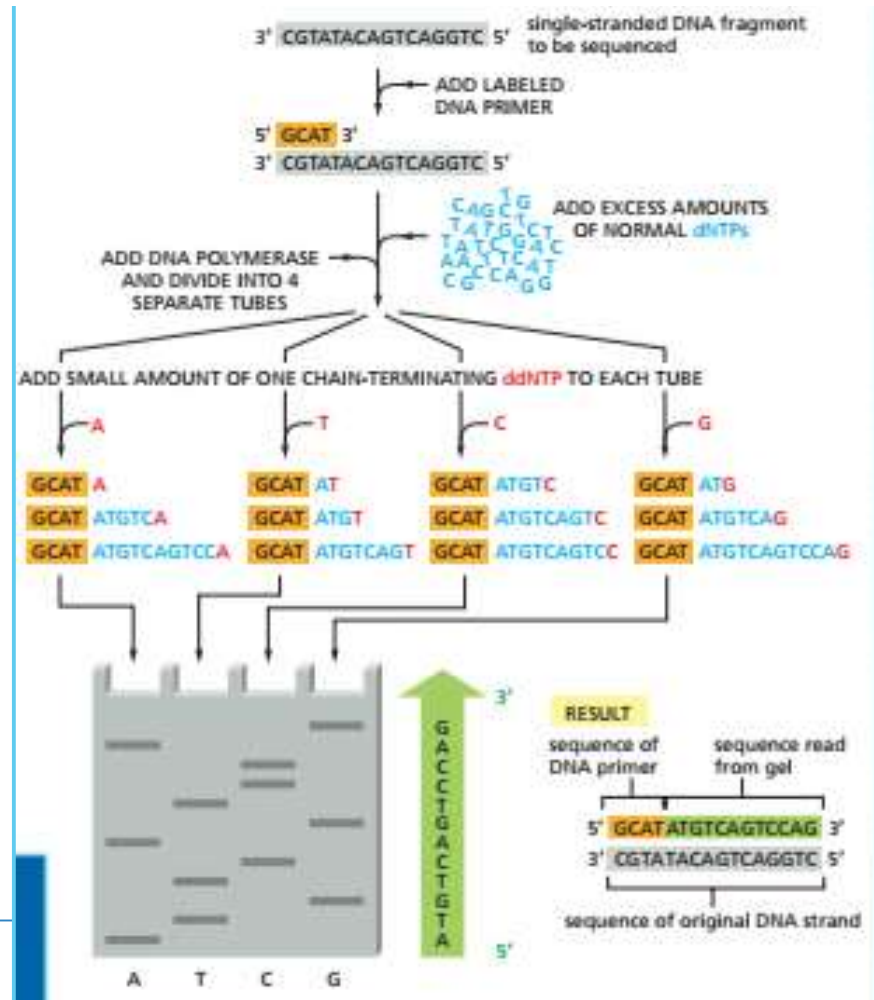
- ▶ **Izolace plasmidu:** 3 kroky - lyzace, neutralizace, DNA purifikace
 - ▶ často se používají komerčně dostupné KITy



- ▶ **Izolace genomové DNA (gDNA)**
 - ▶ Izolace genomové DNA z rostlin, hub i živočichů...

DNA (Sanger) sekvenování

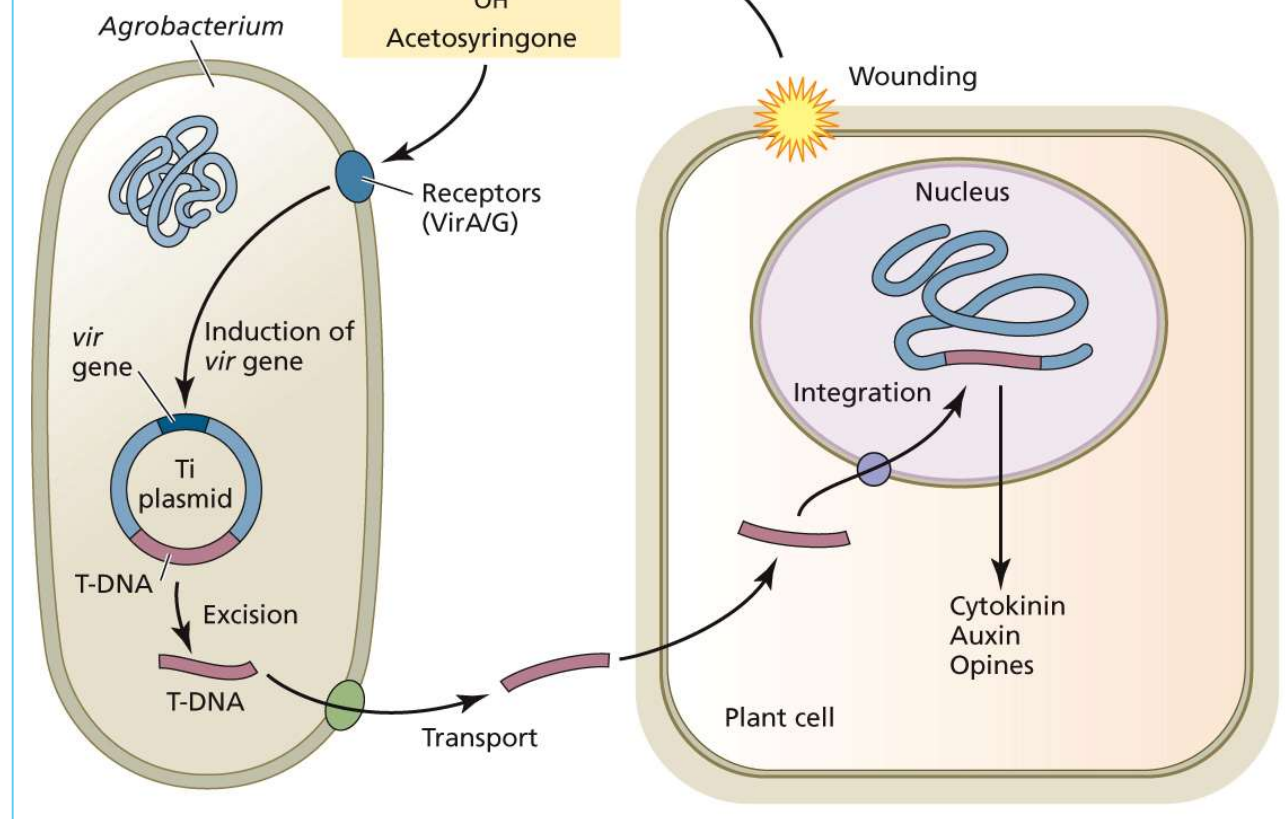
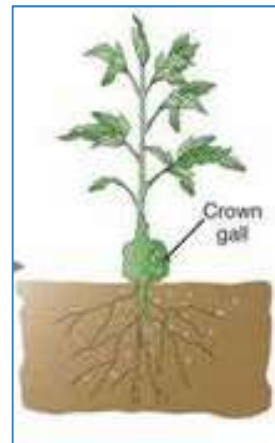
- ▶ Dideoxy sekvenování (vyvinuté Dr. Sangerem):
- ▶ používá primer, DNA polymerázu a speciální dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP)
 - ▶ když jsou inkorporovány do rostoucího řetězce DNA, ddNTP blokují jeho další prodloužení a také každý obsahuje různý fluorescenční marker,
- ▶ vytvoří se částečné kopie fragmentu DNA, který má být sekvenován,
- ▶ seřazení podle velikosti fragmentů DNA,
- ▶ automatizované vyhodnocení sekvence.



Second generation sequencing - e.g. Illumina

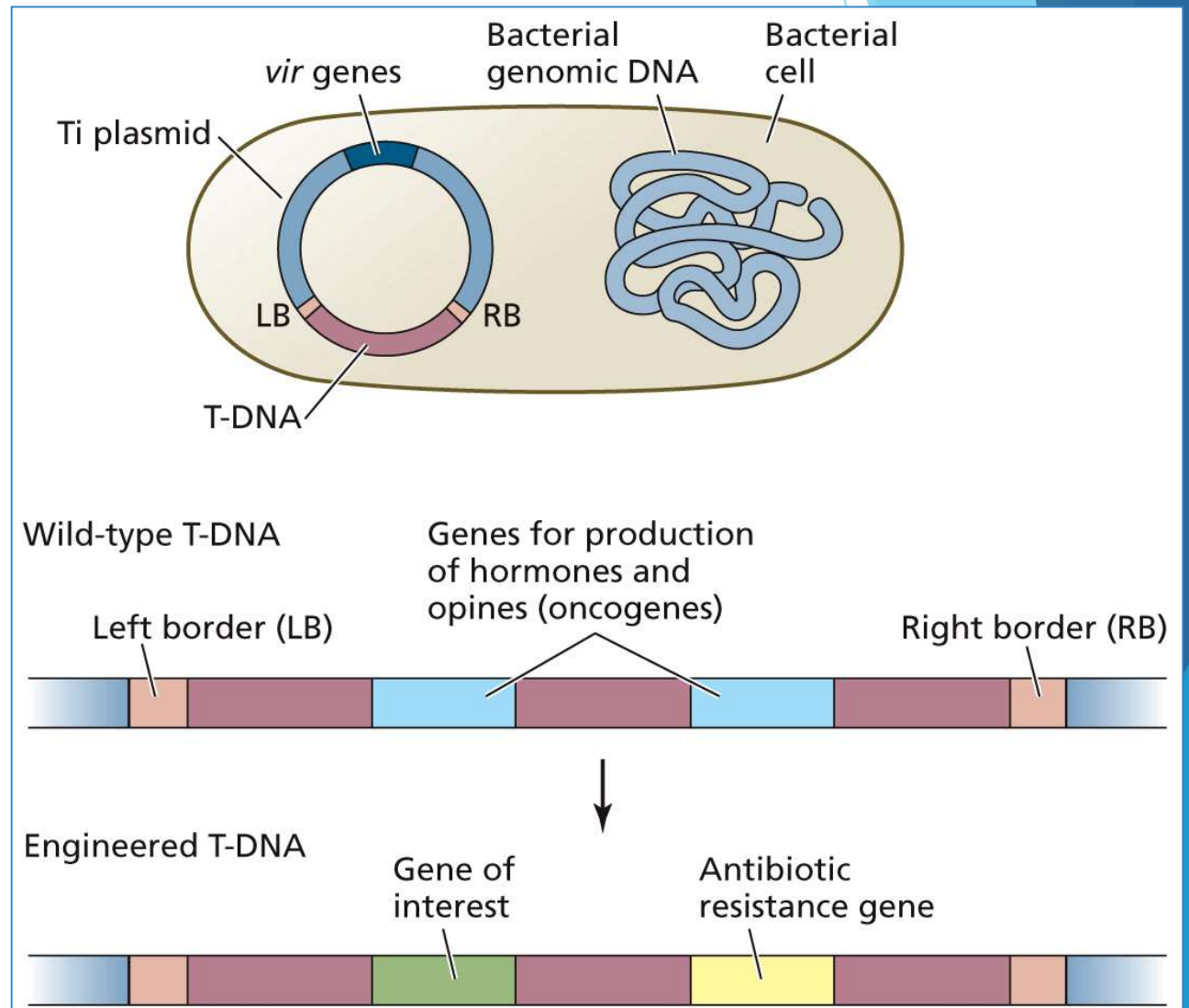
Transformace rostlinných buněk *Agrobacterium*

- ▶ V přírodě se vyskytující Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens*
- ▶ Ti plazmid dokáže vložit DNA do rostlinného genomu
- ▶ Přenese se pouze malá část plazmidu: **T-DNA**
- ▶ **Binární plazmid** obsahuje T-DNA a *vir* geny (virulence)
- ▶ Někdy *vir* geny mohou být na odděleném "helper" plazmidu

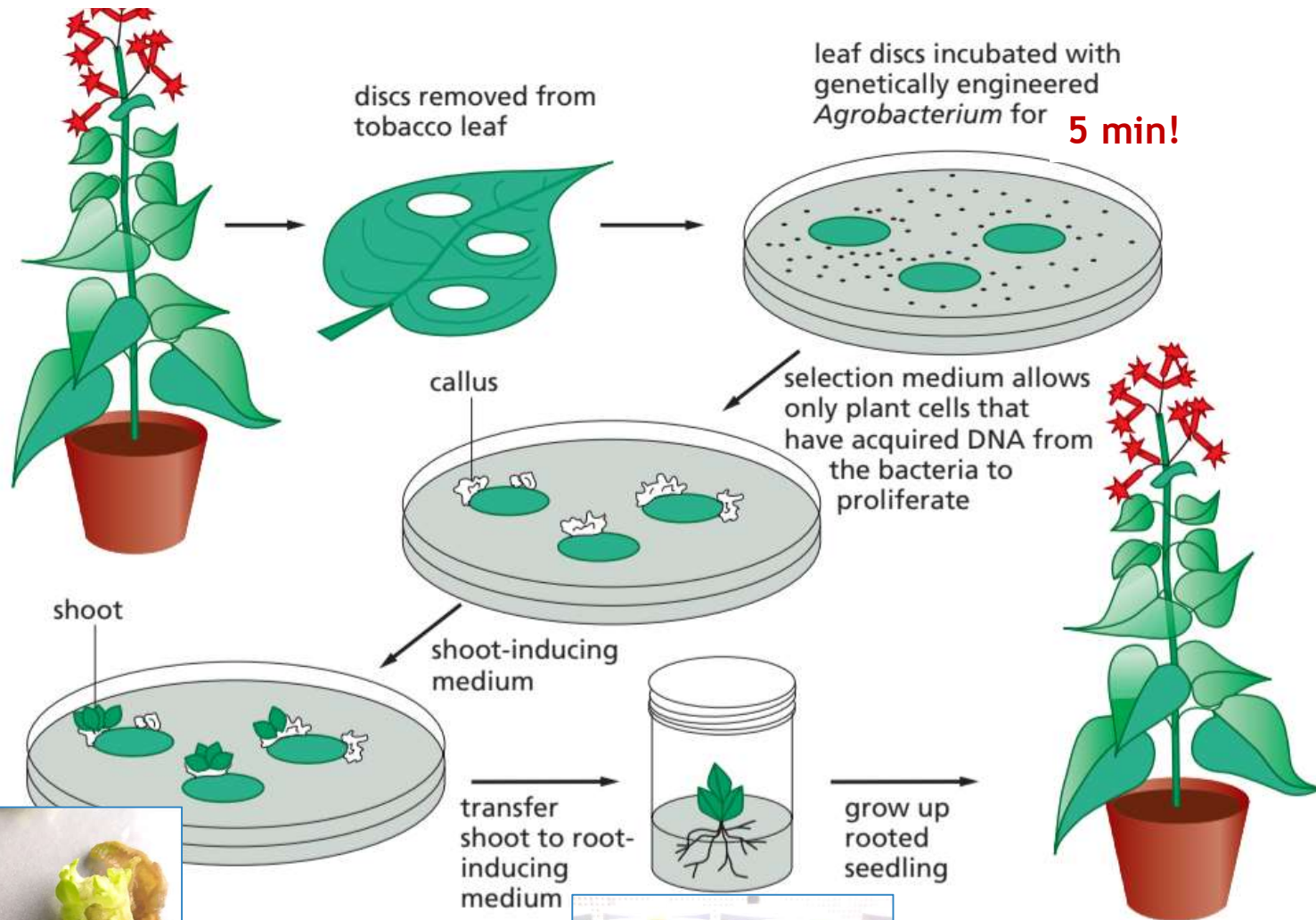


Transformace rostlinných buněk *Agrobacterium*

- ▶ V přírodě se vyskytující Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens*
- ▶ Ti plazmid dokáže vložit DNA do rostlinného genomu
- ▶ Přenese se pouze malá část plazmidu: **T-DNA**
- ▶ **Binární plazmid** obsahuje T-DNA a *vir* geny (virulence)
- ▶ Někdy *vir* geny mohou být na odděleném "helper" plazmidu



Transgenní rostliny vyrobené pomocí tkáňových kultur

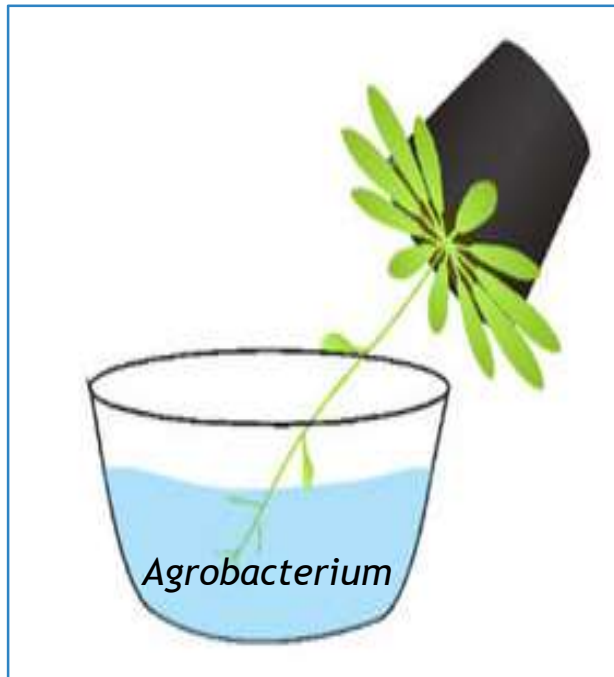


adult tobacco plant carrying transgene that was originally present in the bacterial plasmid

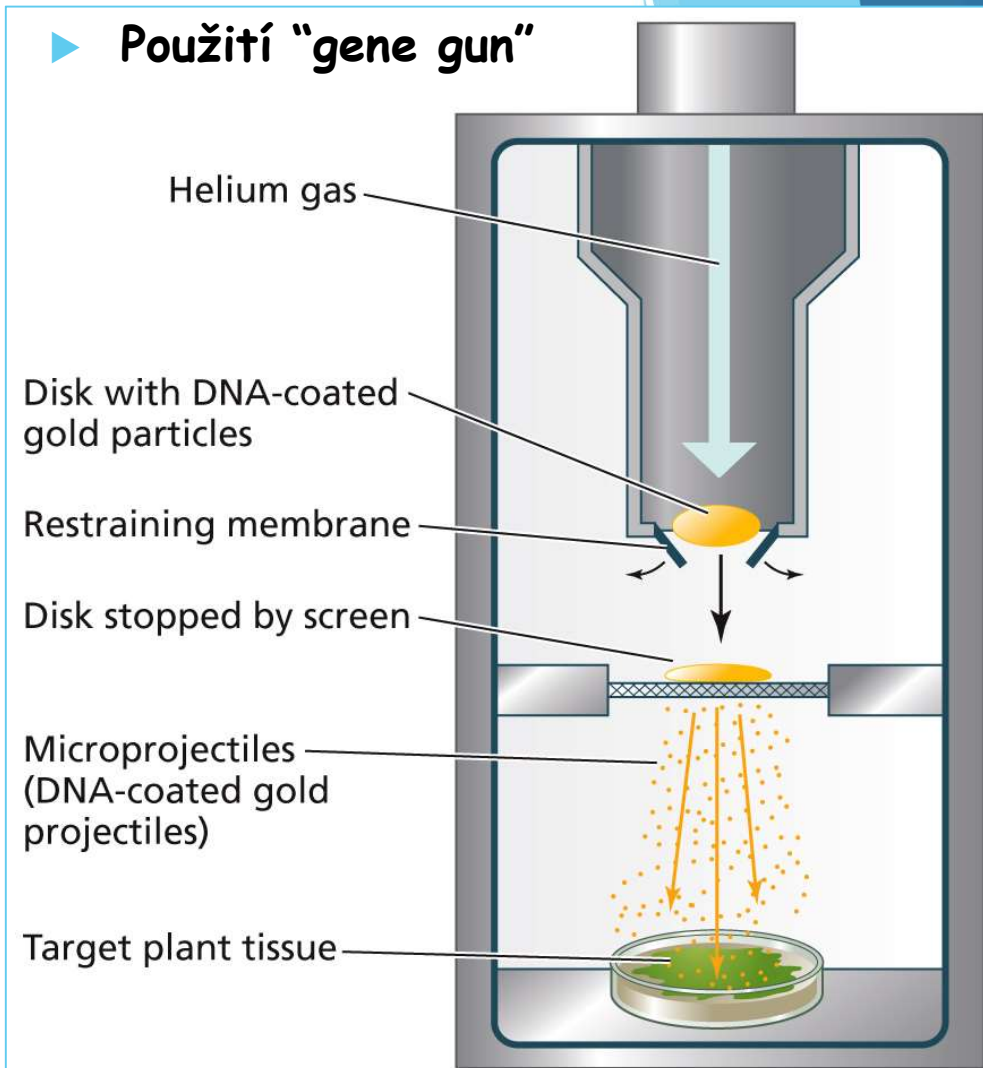


„Snadná“ transformace rostlinných buněk

- ▶ „floral dip“ metoda používaná se pro *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní)



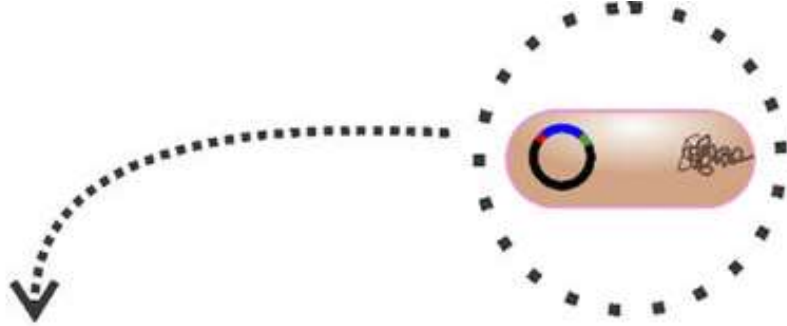
- ▶ Použití "gene gun"



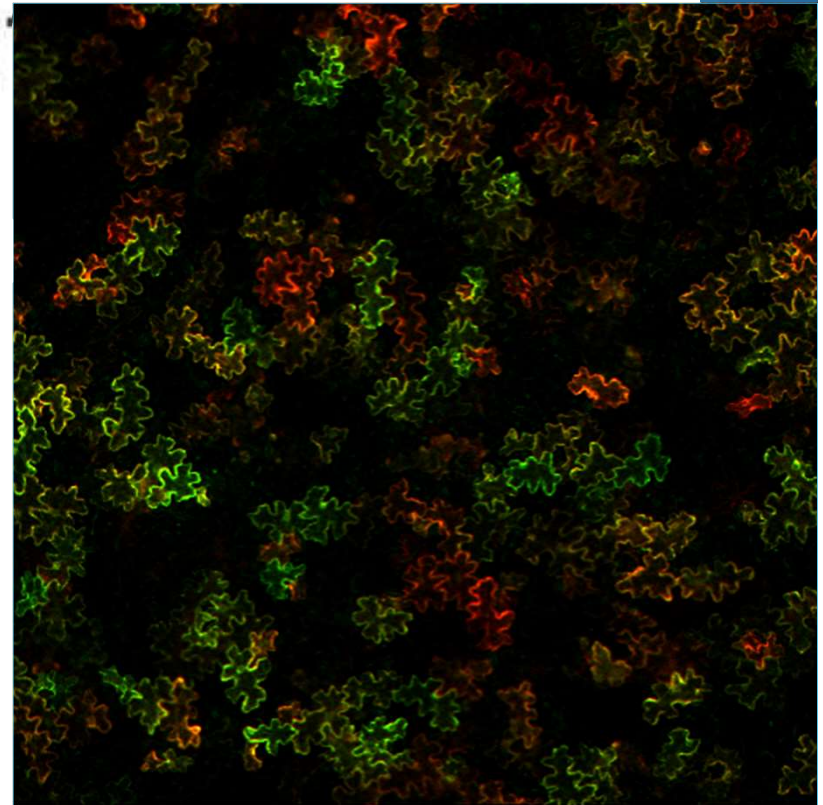
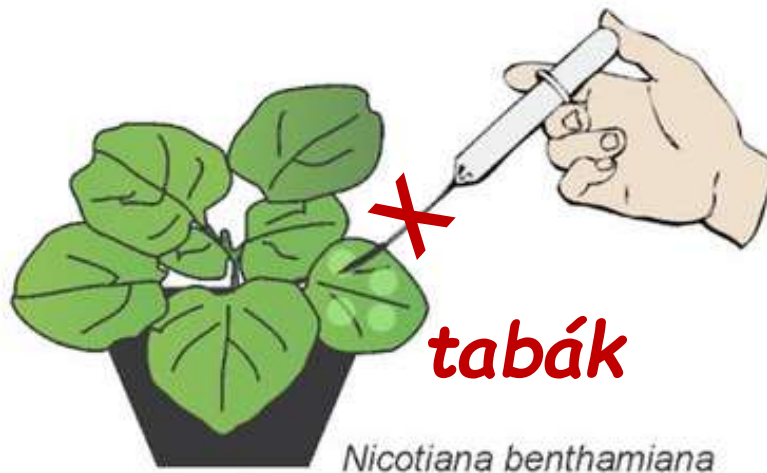
- ▶ *Agrobacterium* není zapotřebí!
- ▶ Ale the gun je zapotřebí!!!

Transientní genová exprese

- ▶ **Metoda "agroinfiltrace"**, velmi efektivní způsob, jak studovat geny
- ▶ Na principu dočasné vysoké transkripce DNA sekvencí, které se nemusí nutně integrovat do rostlinného genomu!
- ▶ *Přechodná exprese*, trvá pouze 48-72 hodin
 - ▶ Např. lokalizace fluorescenčního proteinu, interakce protein/protein



3. TRANSIENT GENE EXPRESSION ASSAY





Proč vyrobit geneticky
upravenou rostlinu?

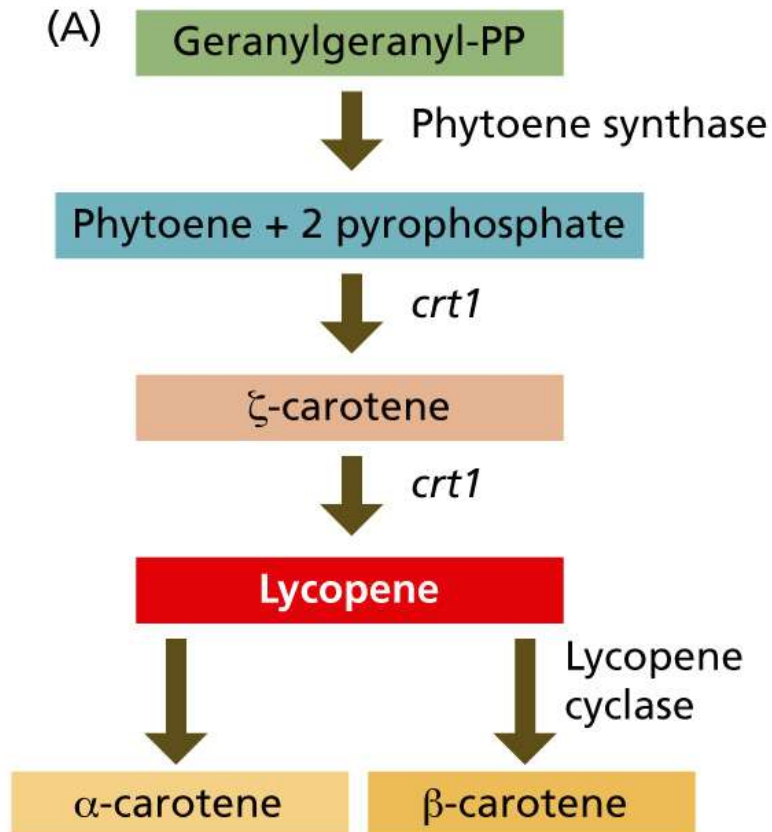
Proč vyrobit geneticky upravenou rostlinu?

- ▶ Pro studium exprese a funkce genu
 - ▶ Kdy a kde je gen exprimován?
 - ▶ Role promotoru a reportérových genů
 - ▶ Co se stane, když zvýšíme expresi genu?
 - ▶ Chemicky regulovatelné transkripční aktivační systémy
 - ▶ Co se stane, když snížíme expresi genu nebo jej vyřadíme z funkce?
 - ▶ amiRNA, CRISPR/Cas9
- ▶ Pro zlepšení vlastností rostlin
 - ▶ Klasické šlechtění a domestikace divoké trávy *teosinte* (vlevo) vedly po stovky let k plodině *Zea mays* (kukuřice, vpravo).



„Zlatá rýže“ byla vyrobena vložením 2 cizích genů zapojených do syntézy β -karotenu

Golden Rice



(B)



- ▶ **Golden Rice** je nutričním zdrojem pro-vitaminu A, který zlepšuje imunitní odpověď člověka na běžná onemocnění a významně snižuje dětskou slepotu, jejíž hlavní příčinou je nedostatek vitamínu A.
- ▶ *Byla získána již před > 20 lety, ale stále je zakázána.....*