

Stanovení změny exprese genů pro pathogenesis related (PR) proteiny u rostlin tabáku

TEORETICKÝ ÚVOD

Na počátku byly PR (pathogenesis related) proteiny identifikovány jako proteiny, které se nevyskytují ve zdravých rostlinách a po infekci patogenem dochází k jejich masivní akumulaci. Do dnešní doby je známa celá řada PR proteinů, které byly rozděleny do 14 tříd, jak je uvedeno v tabulce níže. Každá třída může být dále dělena na kyselé a bazické homology. Syntéza kyselých forem PR proteinů je obvykle spojena s infekcí patogenem a u rostlin jejich syntéza vyvolává tzv. systémově navozenou rezistenci (SAR – systemic acquired resistance). Na druhé straně syntéza bazických forem PR proteinů je spojena s poškozením nebo napadením rostliny herbivorním hmyzem. Jejich syntéza je poté spojena s tzv. rezistencí proti herbivornímu hmyzu (IRH - induced resistance against herbivores).

Třída	Název	Funkce
PR-1	PR-1 Tabák	neznámá
PR-2	PR-2 Tabák	β-1,3-glukanasa
PR-3	P, Q Tabák	chitinasa
PR-4	`R' Tabák	chitinasa
PR-5	S Tabák	podobný thaumatinu
PR-6	Inhibitor I Rajče	proteinasový-inhibitor
PR-7	“P” Rajče	endoproteinasa
PR-8	Chitinasa Okurka	chitinasa
PR-9	`lignin-forming peroxidase' Tabák	peroxidasa
PR-10	`PR1` Pšenice	podobný ribonuclease
PR-11	třída V Tabák	chitinasa
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionin
PR-14	LTP4 Pšenice	lipid-transfer protein

Literatura

1. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology
2. Edreva A. (2005): Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology 31(1-2), 105-124.
3. Mikeš V., Milat M-L., Ponchet M., Ricci P., Blein J-P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. FEBS Letters 416, 190-192.

POSTUP PRÁCE

Izolace celkové RNA z listu tabáku

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci celkové RNA z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 8h a 24h po aplikaci.

1. Odeberte 100 mg tkáně a vložte ji do 2.0 ml zkumavky společně s drtícím olůvkem.
2. Vložte zkumavky do drtící vložky, zašroubujte vložku víčkem a vhodte ji do kapalného dusíku. Po vymražení zasuňte vložku do pouzdra a asi minutu třepejte.
3. Poté vyjměte zkumavku z vložky, otevřete ji, pomocí pinzety vejměte olůvko a přidejte 1.0 ml TRI reagentu. Inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 0.2 ml chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 5-10 minut při pokojové teplotě
5. Horní vodnou fázi přeneste do čisté zkumavky a přidejte 1/10 objemu isopropanolu
6. Opatrně promíchejte a nechte stát při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut
7. Centrifugujte při 12 000xg po dobu 10 minut při 4°C.
8. Odsajte supernatant a přidejte k němu zbývající množství isopropanolu, aby celkový přidaný objem isopropanolum byl 500 ul.
9. Opatrně promíchejte a nechte stát při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut
10. Centrifugujte při 12 000xg po dobu 10 minut při 4°C.
11. Odstraňte supernatant a vysráženou RNA promyjte 1ml 75% ethanolu
12. Centrifugujte při 7500xg po dobu 5 minut při 4°C
13. Odstraňte supernatant a RNA nechte asi 10-15 minut vyschnout
14. Rozpusťte RNA ve formamidu předehřátém na 55°C.

Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA pomocí Nano-fotometru

Do dvou 1.5 ml zkumavek napipetujte 9 ul DEPC vody. Do jedné přidejte 1.0 ul formamidu (BLANK) a do druhé 1.0 ul vyizolované RNA. Promíchejte zkumavky na vortexu a krátce stočte.

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace RNA a ředící koeficient 10x.
2. Na čočku měřící kyvety nepipetujte 3 ul DEPC vody s formamidem a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3 ul ředěného vzorku RNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE)
6. Vytisknete koncentraci a hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

Elektroforéza vyizolované RNA

Příprava gelu:

1. Zahřejte 1.75 ml formaldehydu a 3.0 ml 10x MOPS pufru na 55°C.
2. Rozpusťte 0.4 g agarosu v 25 ml vody.
3. Zchladte agarosu na 55°C a přidejte formaldehyd, 10x MOPS pufr a 15 ul EtBr.
4. Nalijte gel

Připravte vzorek podle následující tabulky:

	Objem (ul)
RNA	3
formaldehyd	2.25
formamid	7.5
10x MOPS	0.75
Voda	1
Celkový	15

Inkubujte vzorek 15 minut při 55°C. Po denuraci přidejte 1.5 ul 10x nanášecí barvičky, promíchejte a naneste vzorek na gel. Jako elektroforetický pufr použijte 1x MOPS pufr.

Reverzní transkripce izolované RNA

Naředte vyizolovanou RNA na koncentraci 0.2 ug/ul a umístěte ji na led. Připravte reakční směs:

5 x RT ImPromII buffer	2.0 ul
25 mM MgCl ₂	2.2 ul
dNTPs	1.0 ul
Random Hexamers	0.5 ul
Voda	2.6 ul
Reverse transcriptase	0.5 ul
RNasin	0.1 ul

Přidejte do reakční směsi 1.0 ul naředěné RNA o koncentraci 0.2 ug/ul. Vložte zkumavku do termocykleru a nastavte následující program:

25°C	10 min
42°C	45 min
72°C	15 min
4°C	hold

Amplifikace cDNA genu pro PR1a protein pomocí RealTime PCR

Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1a nebo PR5a nebo PAL nebo EF1a:

2 x KAPA SYBR Mix	7.5 ul
F primer (10 uM)	0.5 ul
R primer (10 uM)	0.5 ul
Voda	5.0 ul

Reakční směs promícháme, krátce stočíme a přidáme 1.5 ul cDNA vzniklé po reverzní transkripci nebo kvantifikačních standardů. Vložte zkumavku do termocycleru a nastavte následující program:

95°C	2 min
95°C	20 s
60°C	40 s (odečet fluorescence) 40x

VYHODNOCENÍ

- Uvedte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované RNA
- Na základě výsledku RealTime PCR vypočítejte metodami absolutní nebo relativní kvantifikace za použití delta Ct metody, zdali dochází po přidání kryptogeinu ve sledovaných časových intervalech (8 a 24h) ke zvýšení exprese vybraných PR proteinů a o jak velké zvýšení se jedná.
- Dále na základě vypočtených výsledků porovnejte metodiky relativní a absolutní kvantifikace.