|  |  |
| --- | --- |
| **Jméno a UČO:** | **Datum:** |

**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 17 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** | **Typický zástupce** | **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 | P69 (rajče) | endoproteinasa |
| PR-8 | Chitinasa (okurka) | chitinasa |
| PR-9 | `lignin-forming peroxidase' (tabák) | peroxidasa |
| PR-10 | `PR1` (petržel) | podobný ribonuklease |
| PR-11 | chitinasa třídy V (tabák) | chitinasa |
| PR-12 | Rs-AFP3 (ředkvička) | defensin |
| PR-13 | THI2.1 (*Arabidopsis*) | thionin |
| PR-14  PR-15  PR-16 | LTP4 (ječmen)  OxOa (ječmen)  OxOLP (ječmen) | lipid-transfer protein  oxalát oxidasa  podobný oxalát oxidase |
| PR-17 | PRp27 (tabák) | neznámá |

**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.
4. van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J.(2006): Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135-162

**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 různých časových intervalech 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 vhoďte 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 ml Tri Reagentu. Inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 400 µl chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 15 minut při pokojové teplotě.
5. Centrifugujte 15 minut při 12 000 x g.
6. Horní fázi přeneste do čisté zkumavky, přidejte 400 µl 70% izopropanolu a nechte stát 10 minut při pokojové teplotě.
7. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
8. RNA pelet promyjte 400 µl 75% ethanolu a centrifugujte 3 minuty při 8 000 x g.
9. Opakujte krok 8.
10. Odstraňte ethanol a nechte RNA pelet vyschnout.
11. Rozpusťte RNA v 10 µl formamidu.

**Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA pomocí Nano-fotometru**

Do dvou zkumavek napipetujte 9 µl DEPC vody. Do jedné přidejte 1 µl formamidu (BLANK) a do druhé 1 µl 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 napipetujte 3 µl 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 µl ředěného vzorku RNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE)
6. Vytisknete koncentraci a hodnoty čistoty A260/280, A230/260 a naměřené spektrum.

**Reverzní transkripce izolované RNA**

1. Nařeďte vyizolovanou RNA na koncentraci 0.2 µg/µl a umístěte ji na led. Připravte reakční směs:

5 x RT ImPromII buffer 2.0 µl

25 mM MgCl2 2.2 µl

dNTPs 1.0 µl

Random Hexamers 0.5 µl

Voda 2.6 µl

Reverse transcriptase 0.5 µl

RNasin 0.1 µl

1. Přidejte do reakční směsi 1 µl naředěné RNA o koncentraci 0.2 µg/µl. Vložte zkumavku do termocycleru a nastavte následující program:

25oC 10 min

42oC 45 min

72oC 15 min

4oC hold

**Amplifikace genu pro PR1a, PR3, PR5 nebo PAL a EF1α pomocí RealTime PCR**

1. Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1a nebo PR3 nebo PR5a nebo PAL a EF1a:

2x Go Taq qPCR M. Mix 7.5 µl

F primer (10 µM) 0.5 µl

R primer (10 µM) 0.5 µl

Voda 5.0 µl

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

95°C 2:30

95°C 0:20 40x

60°C 0:40

95°C 0:15

60°C 0:30

95°C 0:15

**VYHODNOCENÍ**

* Uveďte 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 cryptogeinu 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.