

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	P ₆₉ (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 (<i>Arabidopsis</i>)	thionin
PR-14	LTP4 (ječmen)	lipid-transfer protein
PR-15	OxOa (ječmen)	oxalát oxidasa
PR-16	OxOLP (ječmen)	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 μ l 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 μ l 70% izopropanolu a nechte stát 10 minut při pokojové teplotě.
7. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
8. RNA pelet promyjte 400 μ l 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 μ l formamidu.

Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA pomocí Nano-fotometru

Do dvou zkumavek napipetujte 9 μ l DEPC vody. Do jedné přidejte 1 μ l formamidu (BLANK) a do druhé 1 μ l 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 μ l 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 μ l 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.

Reverzní transkripce izolované RNA

1. Naředte 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 MgCl ₂	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

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

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

2. 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	} 40x
95°C	0:20	
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.