

Jméno a UČO:

Datum:

## ÚLOHA D

### Identifikace neznámého elicitinu na základě jeho aktivity

#### TEORETICKÝ ÚVOD

Úspěšná obrana rostlin proti napadení patogenem je závislá na včasném rozpoznání a následné aktivaci indukované obrany. Pro účely rozpoznání různých látek, nejčastěji proteinů patogenního původu (produkty tzv. genů avirulence „Avr“), si rostliny vyvinuly celou řadu receptorů (produktů tzv. genů rezistence „R“).

Elicitiny jsou rodina malých proteinů, které jsou sekretované některými druhy patogenních oomycet rodů *Phytophthora* nebo *Pythium*. Tyto proteiny patří do skupiny molekulárních vzorů tzv. MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns). Tyto vzory se vyznačují právě touto vlastností, že dokáží indukovat rostlinnou obrannou odpověď. Navzdory, že se jedná o poměrně velkou rodinu proteinů, vyznačují se vysokou podobností terciální struktury a přibližnou stejnou velikostí 10 kDa. Sdílejí mezi sebou asi 60% identitu aminokyselinového složení, kdy přibližně z 30% jsou tvořeny serinem a treoninem, přičemž vůbec neobsahují tryptofan, histidin a arginin. Nejdůležitější rozdílností je počet lysinových zbytků v jejich primární struktuře, které nejvýrazněji přispívají k jejich rozdílnému celkovému náboji. Elicitiny můžeme právě z hlediska jejich rozdílných pI rozdělit do dvou skupin: **kyselé  $\alpha$ -elicitiny** a **bazické  $\beta$ -elicitiny**. Toto rozdělení taktéž dobře koreluje s jejich schopností vyvolávat rostlinnou obrannou reakci a způsobovat nekrózu, kdy  $\beta$ -elicitiny způsobují až 100 násobně vyšší nekrózu a celkovou biologickou odpověď oproti  $\alpha$ -elicitinům.

Po rozpoznání elicitinu nejprve dojde k indukci brzké obranné odpovědi rostlin, při které se začínají tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS), dochází k změně průtoku některých klíčových iontů plasmatickou membránou a produkci signálních molekul (SA, JA a etylenu). Všechny tyto děje mají za následek tzv. **hypersenzitivní odpověď (HR)**, která se vyznačuje projevem nekrotických lézí na povrchu napadeného pletiva. Z dlouhodobého hlediska pak elicitin vyvolávají expresi některých důležitých PR (pathogenesis related) proteinů a taktéž expresi genů kódujících enzymy účastnících se metabolických drah produkce různých sekundárních metabolitů jako je například PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) účastnící se fenylopropanoidní dráhy, která vede k produkci fytoalexinů. Dále pak elicitin vyvolávají indukci tzv. obranných proteinázových inhibitorů, které jsou součástí dráhy kyseliny jasmonové (JA).

# Úloha D - Identifikace neznámého elicitoru na základě jeho aktivity

## RT-qPCR

V praxi se často setkáváme s potřebou provést kvantifikaci transkriptu vybraného genu. V současné době se ke kvantifikaci transkriptů vybraných genů využívá především metoda reverzní transkripce ve spojení s metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR).

### Reverzní transkripce

V prvním kroku je nejprve provedena reverzní transkripce izolované celkové RNA. Reverzní transkripce (RT) je enzymatický proces, při kterém je podle templátové RNA syntetizována cDNA. RT je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza). Pro vlastní průběh reakce je tedy nezbytná přítomnost RNA, reverzní transkriptázy, směsi deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), reakčního pufru a primerů. Zpravidla se pro tyto účely využívají tři typy primerů:

- oligo dT primery – používají se v případě mRNA obsahující polyA 3'-konec, v případě dlouhých transkriptů nemusí dojít k úplnému přepisu
- směs náhodných hexaoligonukleotidů – nasedají náhodně na templátovou RNA, jsou vhodné zejména pro přepis celkové RNA a delších transkriptů
- sekvenčně specifické primery

### qPCR

V následujícím kroku je poté přepsaná cDNA specificky namnožena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Principem qPCR je kvantifikace množeného produktu v každém jednotlivém cyklu PCR. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Obvykle se používají interkalační barviva nebo specifické sondy.

### Vyhodnocení qPCR

Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je úměrná množství nově vzniklé DNA. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikační křivky a hodnoty Ct (Cycle threshold), při které došlo k překročení nastavené hladiny fluorescence. Pro vyhodnocení real-time PCR se může použít buď relativní, nebo absolutní kvantifikace. Absolutní kvantifikace umožňuje přímo určit výchozí počet kopií cílových molekul. Pro stanovení je třeba sestavit kalibrační křivku pro sérii standardů a z této křivky se pak odečítá koncentrace neznámého vzorku. Relativní kvantifikace popisuje relativní změnu exprese genu vůči vnitřnímu standardu. Jako vnitřní standard se využívá tzv. house-keeping gen, jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní. Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu house-keeping genu je možno použít několik metod. Metody používané pro výpočet relativní kvantifikace jsou buď již zmíněná metoda kalibračních křivek, nebo častěji používaná srovnávací  $\Delta\Delta Ct$  metoda. Základním předpokladem při

# Úloha D - Identifikace neznámého elicitinu na základě jeho aktivity

srovnávací  $\Delta\Delta Ct$  metodě je, že amplifikace cílového i house-keeping genu probíhá se stejnou účinností. K výpočtu celkového množství cílového genu se poté používá vztah:

$$R=(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$$

kde: E = efektivita PCR (0-1)

$$\Delta\Delta Ct= \Delta Ct \text{ testovaného vzorku} - \Delta Ct \text{ kontrolního vzorku}$$

$$\Delta Ct \text{ testovacího vzorku} = Ct \text{ cílového genu} - Ct \text{ housekeeping genu}$$

## Literatura

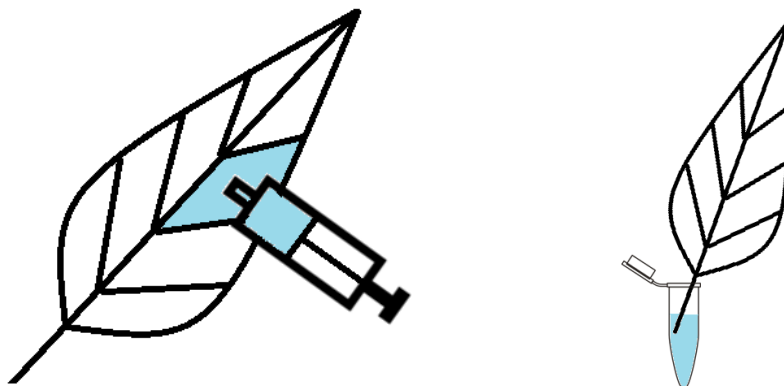
1. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology
2. Drevnina A. et al (2016): Nine things to know about elicitors. New Phytologist 212: 888-895.
3. van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J.(2006): Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135-162

## POSTUP PRÁCE

### Infiltrace neznámého vzorku do listu tabáku

Jednotlivé skupiny obdrží dva roztoky neznámého vzorku, jeden pro přímou infiltraci do listů tabáku pomocí injekční stříkačky a druhý pro nasátí nasátím skrze listovou petiolu.

1. Pro přímou infiltraci nasajte cca 2 ml do injekční stříkačky bez jehly a přiložte kolmo stříkačku k listu a mírným tlakem infiltrujte tekutinu ze stříkačky do mezibuněčných prostor listu a nechte působit 48 hod (Obrázek 1)  
***!Fixem lehce označte hranice infiltrované oblasti pro pozdější vyhodnocení!***
2. Pro infiltraci skrze petiolu napipetujte cca 300  $\mu$ l neznámého vzorku do malé 0.2ml eppendorfky a seříznutý list nechte nasát tekutinu z eppendorfky (viz. obrázek 1) po dobu cca 30 minut. Poté přendejte list do vody a inkubujte 48 hodin.



**Obrázek 1:** Přímá infiltrace neznámého vzorku (levý) infiltrace skrze petiolu (pravý)

# Úloha D - Identifikace neznámého elicitoru na základě jeho aktivity

**! Dříve než přejdete k odebrání vzorků rostlinné tkáně, vyfoťte si list, kde bude zachycena infiltrovaná area, pro pozdější vyhodnocení míry nekrózy!**

## Vyhodnocení nekrózy na listech

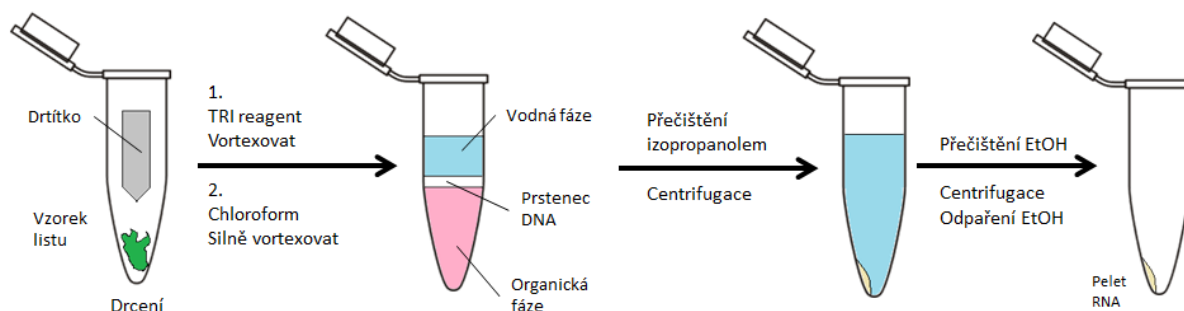
1. Vyfocené obrázky si otevřete v programu ImageJ nebo podobném programu, který umožňuje změření plochy v obrázku. (ImageJ [odkaz](#))
2. Pro vyhodnocení změřte plochu nástřiku ( $S_{NA}$ ) a plochu nekrózy ( $S_{NE}$ ).
3. Vypočítejte procentuální plochu nekrózy dle vzorce:

$$\text{Nekróza (\%)} = \frac{S_{NE}}{S_{NA}} \times 100$$

## Izolace celkové RNA z listu tabáku

1. Zmrazte odebranou tkáň v třecí misce tekutým dusíkem a rozdrťte ji tloučkem na co nejjemnější prášek.
2. Odeberte 100 mg rozdrčené tkáně a vložte ji do 2.0 ml zkumavky společně s drtícím olůvkem.
3. Vložte zkumavky do drtící vložky, zašroubujte vložku víčkem a vhoďte ji do kapalného dusíku. Po vymražení zasuněte vložku do pouzdra a asi minutu třepejte.
4. 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.
5. Přidejte 200  $\mu$ l chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 15 minut při pokojové teplotě.
6. Centrifugujte 15 minut při 12 000 x g.
7. Horní fázi přeneste do čisté zkumavky, přidejte 1/10 izopropanolu, promíchejte a nechte stát 7 minut při pokojové teplotě.
8. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
9. Supernatant přeneste do nové zkumavky a přidejte takové množství izopropanolu, aby celkový přidaný objem isopropanolu byl 500  $\mu$ l.
10. Promíchejte zkumavky a nechte stát 7 minut při pokojové teplotě.
11. Centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
12. RNA pelet promyjte 1 ml 75% ethanolu a centrifugujte 10 minut při 12 000 x g.
13. Odstraňte ethanol a nechte RNA pelet vyschnout.
14. Rozpusťte RNA v 10  $\mu$ l formamidu.

## Úloha D - Identifikace neznámého elicitoru na základě jeho aktivity



### Stanovení koncentrace a čistoty vyzolované RNA pomocí Nano-fotometru

Do dvou zkumavek napipetujte 9  $\mu\text{l}$  DEPC vody. Do jedné přidejte 1  $\mu\text{l}$  formamidu (BLANK) a do druhé 1  $\mu\text{l}$  vyzolované 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  $\mu\text{l}$  DEPC vody s formamidem a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku.
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 3  $\mu\text{l}$  ředěného vzorku RNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (zelené)
6. Vytisknete koncentraci a hodnoty čistoty  $A_{260/280}$ ,  $A_{230/260}$  a naměřené spektrum.

### Reverzní transkripce izolované RNA

1. Naředěte vyzolovanou RNA na koncentraci 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a umístěte ji na led. Připravte reakční směs:

5 x RT ImPromII buffer	2,0 $\mu\text{l}$
25 mM $\text{MgCl}_2$	2,2 $\mu\text{l}$
dNTPs	1,0 $\mu\text{l}$
Random Hexamers	0,5 $\mu\text{l}$
Voda	1,6 $\mu\text{l}$
Reverse transcriptase	0,5 $\mu\text{l}$
RNasin	0,1 $\mu\text{l}$

2. Přidejte do reakční směsi 2  $\mu\text{l}$  naředěné RNA o koncentraci 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Směs jemně promíchejte a krátce stočte. Vložte zkumavku do termocykléru a nastavte následující program:

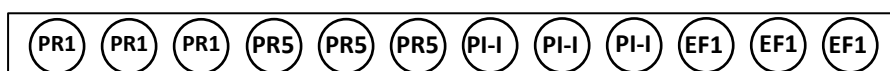
## Úloha D - Identifikace neznámého elicitoru na základě jeho aktivity

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

- Po reverzní transkripci přidejte k reakční směsi 40  $\mu$ l PCR vody, směs promíchejte a krátce stočte.

### Amplifikace genu pro PR1, PR5, PI-I a EF1 $\alpha$ pomocí RealTime PCR

- Každý vzorek budeme analyzovat v technickém triplikátu.



- Připravíme si reakční směs vztaženou na 1 vzorek dle následující tabulky, kdy k amplifikaci využijeme primery pro geny PR1, PR5, PI-I a EF1 $\alpha$ :

2x Luna qPCR Mix	7,5 $\mu$ l
F+R primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Voda	3,0 $\mu$ l

- Reakční směs napipetujeme do destičky, promícháme, krátce stočíme a přidáme 4  $\mu$ l cDNA vzniklé po reverzní transkripci nebo kvantifikačních standardů. Vložte destičku do termocykleru a nastavte následující program:

95°C	2:30	} 45 x
95°C	0:20	
60°C	0:40 (odečet signálu)	
95°C	0:15	
60°C	0:30	
Melting curve analysis		

### VYHODNOCENÍ

- Na základě výsledku RealTime PCR vypočítejte metodami absolutní nebo relativní kvantifikace za použití  $\Delta\Delta$ Ct metody, zdali dochází po přidání neznámého vzorku ve sledovaném časovém intervalu (24h) ke zvýšení transkriptů vybraných genů a o jak velké zvýšení se jedná.

## Úloha D - Identifikace neznámého elicitoru na základě jeho aktivity

- Z pořízených fotek vypočítejte dle vztahu z kapitoly „Vyhodnocení nekrózy“ míru nekrózy po přímé infiltraci a takéž po infiltraci skrze petiolu.
- Na základě výsledků z RT-PCR a nekrotického působení určete, jaký efektor byl ve vašem neznámém vzorku. Pro vyhodnocení použijte tabulku:

Tabulka 1: Schéma odpovědi rostlin tabáku na jednotlivé testované molekuly.

Typ molekuly		Nekróza		RT-qPCR			
		Přímá infiltrace	Nasátí petiolou	Přímá infiltrace PR1/PR5	Nasátí petiolou PI-I	Přímá infiltrace PR1/PR5	Nasátí petiolou PI-I
<b>Cryptogein</b>	$\beta$ -elicitor	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Infestin</b>	$\alpha$ -elicitor	+++	-/+	+++	+++	-/+	-/+
<b>K. salicylová</b>	Fytormon	-/+	-/+	+++	-/+	+++	-/+
<b>Voda</b>	Kontrola	-	-	-	-	-	-

### Nekróza:

### RT-PCR:

#### Relativní kvantifikace:

#### Absolutní kvantifikace:

### Výsledky:

Náš neznámý vzorek indukoval .....krát zvýšenou/sníženou/nezměněnou expresi PR5  
.....krát zvýšenou/sníženou/nezměněnou expresi PI-1

Náš neznámý vzorek způsoboval .....% nekrózu na listech tabáku po přímé infiltraci  
.....% nekrózu na listech tabáku po nasátí petiolou

Dle výsledků výše byl v našem neznámém vzorku .....

Odůvodněte: