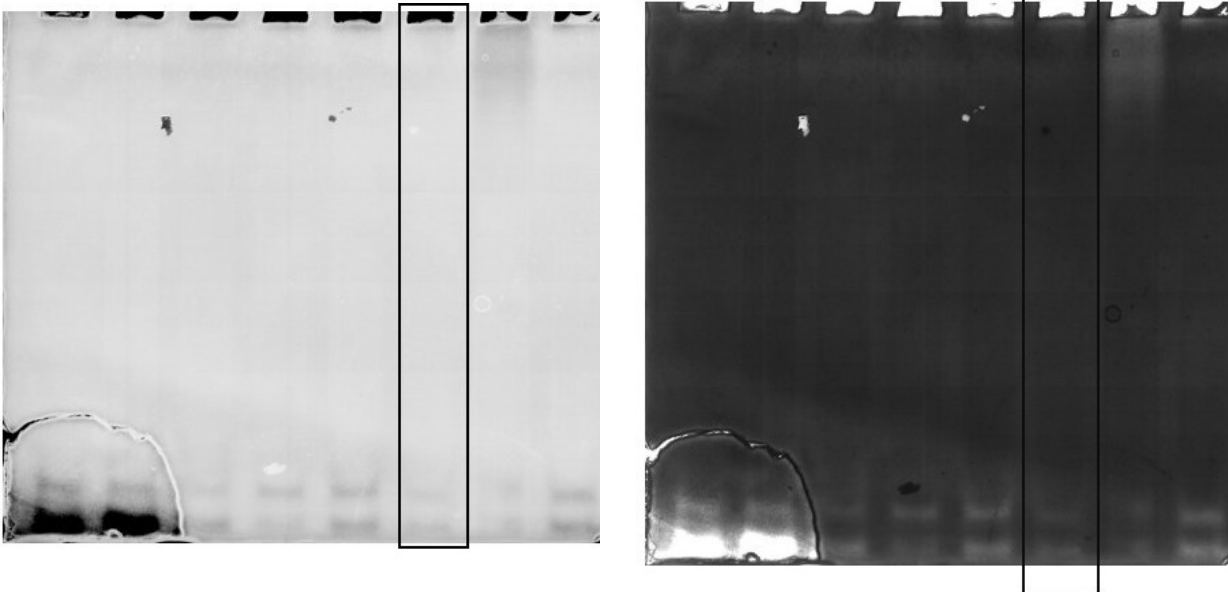


ÚLOHA A

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci jednotlivých látek v závislosti na čase.



Aktivita APX byla sledována jako achromatický proužek na pozadí.

Výsledek zdůvodněte.

6F	0,85	27100
	0,94	30700

APX je enzym zodpovědný za detoxifikaci peroxidu vodíku u rostlin. Katalyzuje reakci: $2 \text{ askorbát} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ monodehydroaskorbát} + 2 \text{H}_2\text{O}$. Po aplikaci patogenu na list tabáku dojde k obranné reakci rostliny a rostlina začíná produkovat peroxid vodíku a askorbát peroxidázu. Při infekci patogenem pozorujeme postupný pokles aktivity tohoto enzymu v důsledku nekrózy buněk, způsobené oxidačním stresem a podle intenzit proužků vyhodnocujeme aktivitu APX. Aktivita APX se vyskytuje u všech vzorků, u našeho vzorku byla aktivita nižší než u ostatních, což je doložené jak v tabulce, díky nižším hodnotám, tak pomocí slabě viditelného proužku.

- Spočítejte aktivitu phenylalanin amoniak-lyasy (PAL) v čase 24 h po aplikaci neznámého vzorku v pmol/s na mg rostlinného pletiva.

6	
D-Phe	L-Phe
0,845	0,954
0,828	0,925

D-Phe – 0,837, L-Phe – 0,940

dA= L-Phe – D-Phe = 0,940 – 0,837 = 0,103

$$C_{\text{produkt}} = A/(\epsilon \cdot l)$$

$$V_{\text{reakční směs}} = 150 + 150 + 125 = 425 \mu\text{l}$$

$$C_{\text{produkt}} = 0,103/(9530 \cdot 1)$$

$$C_{\text{produkt}} = 10,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$\text{přepočet: } y = 10,8 \cdot 10^{-6} \cdot 425 \cdot 10^{-6} / 86400 = 5,31 \cdot 10^{-14} \text{ mol/s} = 0,0531 \text{ pmol/s}$$

$$x = 0,0531 / 0,300 = 1,77 \cdot 10^{-4} \text{ pmol/s} \cdot \text{mg}$$

- Výsledky vyneste do grafu, kde budou srovnány změny aktivity PAL po aplikaci vašeho neznámého vzorku s kontrolou (voda).

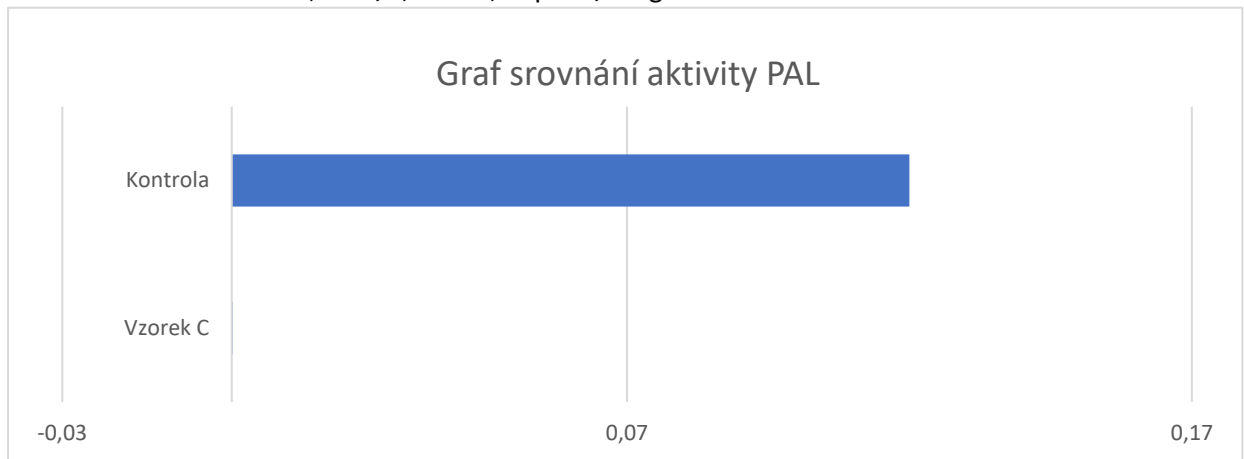
8	
D-Phe	L-Phe
0,866	0,926
0,876	0,956

$$dA = 0,941 - 0,871 = 0,07$$

$$C_{\text{produkt}} = 0,07/(9530 \cdot 1) = 7,35 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$y = 7,35 \cdot 10^{-6} \cdot 425 \cdot 10^{-6} / 86400 = 3,62 \cdot 10^{-14} \text{ mol/s} = 0,0362 \text{ pmol/s}$$

$$x = 0,0362 / 0,300 = 0,12 \text{ pmol/s} \cdot \text{mg}$$



- Výsledek zdůvodněte.

Z grafu je patrné, že aplikací neznámého vzorku došlo ke značnému nárůstu aktivity phenylalanin amoniak-lyasy, jež se účastní fenyl-propanoidní dráhy vedoucí ke vzniku antimikrobiálních látek-fytoalexinů.

ÚLOHA C

- Uveďte celkový počet kolonií po transformaci.

Tato část úlohy nebyla v praxi prováděna.

- Uveďte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.

Tato část úlohy nebyla v praxi prováděna.

- Uveďte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/ μl .

molekulová hm. plazmidu $2,08 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$

hm. 1 molekuly plazmidu $3,454 \cdot 10^9$ ng

10 000 kopií/ μ l $3,454 \cdot 10^{-5}$

100 000 kopií/ μ l $3,454 \cdot 10^{-4}$

1 000 000 kopií/ μ l $3,454 \cdot 10^{-3}$

10 000 000kopií/ μ l $3,454 \cdot 10^{-2}$

ÚLOHA D

Nekróza:

SNA= $96957+89139+202599= 388695$

SNE= $91668+76659+184911= 353238$

Nekróza = 90,9%

Přes petiolu:

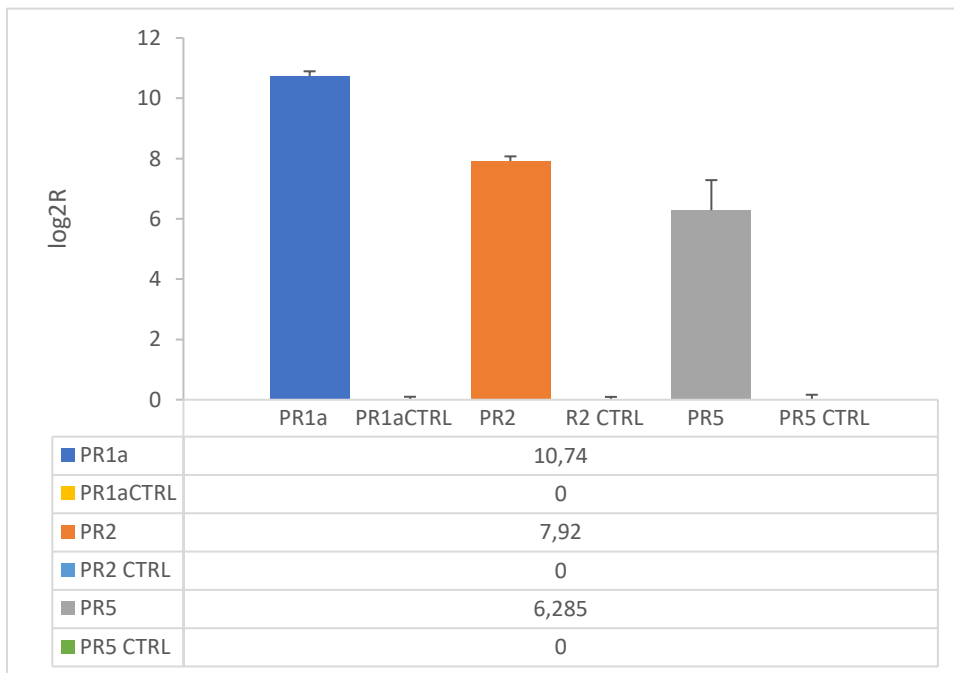
SNA= 1481604

SNE= 380120

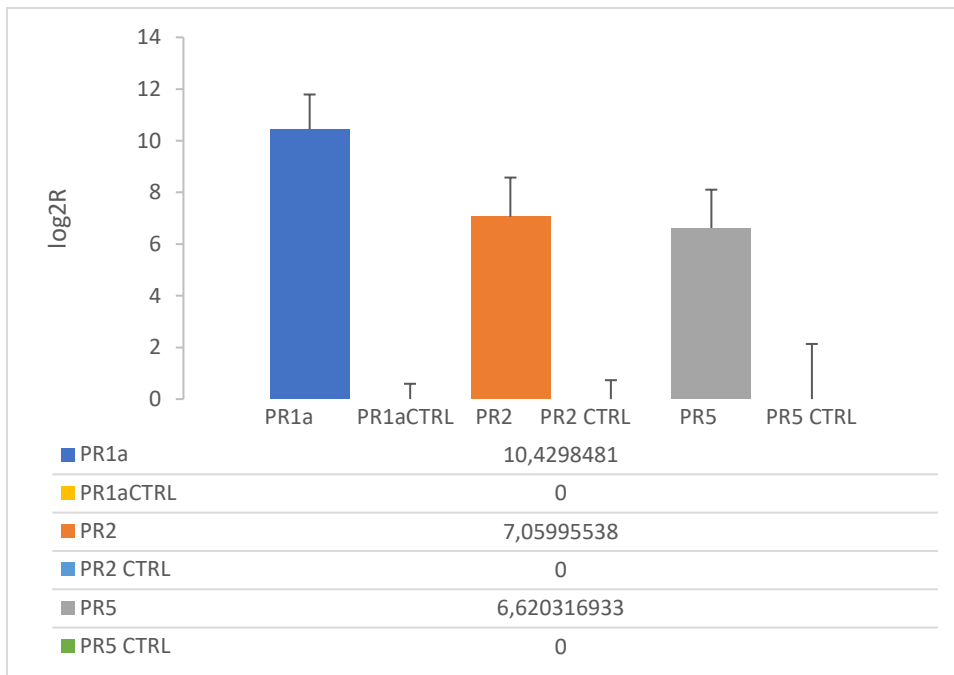
Nekróza= 25,7 %

RT-PCR:

Relativní kvantifikace:



Absolutní kvantifikace:



Výsledky:

Náš neznámý vzorek indukoval 6krát zvýšenou expresi PR5

10krát zvýšenou expresi PR-1

Náš neznámý vzorek způsoboval 90,9 % nekrózu na listech tabáku po přímé infiltraci

25,7 % nekrózu na listech tabáku po nasátí petiolou

Dle výsledků výše byl v našem neznámém vzorku infestin.

Odůvodněte:

Domníváme se, že náš neznámý vzorek obsahoval α -elicitin vzhledem k relativně velmi zřetelnému zvýšení transkriptů genů PR1a, PR2, PR5. Vzhledem k tomu, že tato skutečnost není rozhodující, dokládá naši domněnku výsledek nekrotického působení, kdy přímou infiltrací došlo k více než 90 % nekróze, a v případě nasátí petiolou pouze k 25 % nekróze. Tyto výsledky by měly svědčit o přítomnosti infestinu.

ÚLOHA E

A. Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované DNA.

$$c = 0,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Čistota izolované DNA změřená pomocí nanodropu vykazovala hodnotu 1,8, tedy lze usuzovat, že vzorek nebyl kontaminován proteiny ani zbytky organických činidel.

B. Na základě délky amplifikátu a výsledku restriční analýzy určete, jaký druh václavky obsahoval váš vzorek půdy, a výsledek zdůvodněte.

A. ostoyae C2

ÚLOHA F

- Zhodnoťte koncentraci a čistotu DNA izolované z bukálního stěru.

V jednom případě nám vyšlo 13 µg/µl DNA s čistotou 2,0, z čehož lze usuzovat, že DNA byla čistá v dostatečném množství. Ve druhém případě 3,5 µg/µl DNA s čistotou 1,75 značí kontaminaci izolované DNA ve značně menší koncentraci.

- Uveďte sekvenci štěpení pro restriční endonukleázu TaqI a interpretujte naměřený výsledek.

Endonukleáza specificky rozpoznává sekvenci TCGA, kdy štěpení provádí mezi T a C. Z výsledku elektroforézy lze vidět, že u 2 jedinců nedošlo k úplnému štěpení, což znamená, že jejich alely byly mutantní a nenesly restriční místo pro TaqI.

- Interpretujte zjištěné riziko celiakie u analyzovaného vzorku na základě real-time PCR analýzy.

Alela	Subalela	ŠM	MK
DQ2.5	DQA1*05	NEG	29,84
	DQB1*02:01	NEG	29,97
DR4	DRB1*04	NEG	NEG
	SYPL2	28,62	29,88
DQ8	DQB1*03:02	NEG	NEG
	DQA1*03	28,35	NEG

ŠM – HLA-DQ2 je negativní, HLA-DR4 je negativní, HLA-DQ8 je negativní

MK – HLA-DQ2 je pozitivní (nárůst emisního spektra před 35 cyklem u DQA1*05 i u DQB1*02), HLA-DR4 je negativní, HLA-DQ8 je negativní