

## POKROČILÉ PRAKTIKUM Z BIOCHEMIE

JMÉNO	UČO
Miroslava Velecká	499670
Jan Šimoník	473766

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

- Na základě Real-time 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:

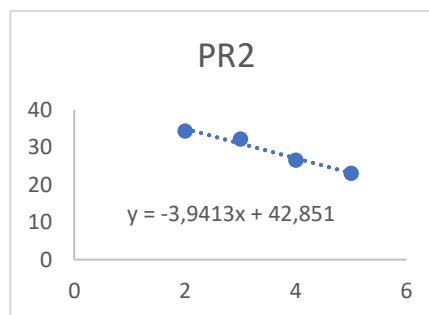
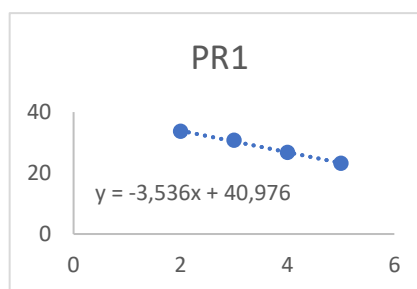
**Náš vzorek je kontrolní, proto pro kvantifikaci jsme si vybrali vzorek B**

Tabulka 1: Data

skupina	gen	ct	skupina	gen	ct
D	PR1a	22,03	B	PR1a	12,21
		19,77			11,67
		19,95			13,01
	PR2	24,24		PR2	12,48
		19,1			12,69
		18,93			14,5
	PR5	16,71		PR5	18,85
		16,39			17,61
		29,61			19,14
	EF1a	19,82		EF1a	17,74
		17,52			17,19
		17,6			17,08

Tabulka 2: kalibrační křivky

GEN	Cp	průměr	SD
PR1	23,44	23,225	0,215
	23,01		
	26,94	26,725	0,215
	26,51		
	30,85	30,795	0,055
	30,74		
	33,69	33,655	0,035
33,62			
PR2	23,16	23,085	0,075
	23,01		
	26,66	26,585	0,075
	26,51		
	31,06	32,20333	0,015
	31,03		
	34,52	34,35	0,17
34,18			
PR5	22,56	22,57	0,01
	22,58		
	25,97	26,065	0,095
	26,16		
	29,41	29,56	0,15
	29,71		







skupina	gen	ct	Kopie	Průměr	SD	Poměr G/HG	SD	R	SD	log2R	SD
	EF1a	19,82	840538,384	3225406,001	76738,09857	4,229251991	8,539088247	1	8,539088	0	5,28524
D	EF1a	17,52	3302144,1								
	EF1a	17,6	3148667,9								
	EF1a	17,74	2897048,86	3735222,358	602972,8872	0,100648491	0,099102666	0,023798	-0,07015	-5,39301	
B	EF1a	17,19	4018429,22								
	EF1a	17,08	4290188,99								

EF1avsPR2

skupina	gen	ct	Kopie	Průměr	SD	Poměr G/HG	SD	R	SD	log2R	SD
	PR2	24,24	52728,5739	762642,1901	504022,5075	0,135969133	0,116654416	1	0,116654	0	0,042528
D	PR2	19,1	1062146,09								
	PR2	18,93	1173051,91								
	PR2	12,48	50796419,5	37111558,39	15393560,27	33,69863644	19,05160763	247,8403	2483,25	7,953267	-2475,19
B	PR2	12,69	44931528,1								
	PR2	14,5	15606727,6								

PR2vsPR5

skupina	gen	ct	Kopie	Průměr	SD	Poměr G/HG	SD	R	SD	log2R	SD
	PR5	16,71	5014040,46	5608936,17	594895,7102	5,976069319	1,044834958	1	1,044835	0	0,01285
D	PR5	16,39	6203831,88								
	PR5	29,61	938,432051								
	PR5	18,85	1207202,4	1101277,746	105924,652	0,006663158	0,002179831	0,001115	0,000678	-9,80877	8,24627
B	PR5	17,61	2754925,19								
	PR5	19,14	995353,094								

PR5vsPR1

- Z poškozených fotek vypočítejte dle vztahu z kapitoly „Vyhodnocení nekrózy“ míru nekrózy po přímé infiltraci a taktéž po infiltraci skrze petiolu:



Náš vzorek byl D a měli jsme list nasátý skrze petiolu. Není zde náznak nekrózy (stejně to měly i skupiny, které měly přímou infiltraci vzorkem D).

$$\text{nekróza}(\%) = \frac{S_{NE}}{S_{NA}} \cdot 100$$

$$\text{nekróza}(\%) = \frac{0}{\text{celá plocha listu}} \cdot 100 = \mathbf{0\%}$$

$$\text{nekróza}(\%) = \frac{0}{4 \cdot \text{plocha infiltrace}} \cdot 100 = \mathbf{0\%}$$

- 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	PR1/PR2	PR5
<b>Cryptogein</b>	$\beta$ -elicitin	+++	+++	+++	+++
<b>Infestin</b>	$\alpha$ -elicitin	+++	-/+	+++	+++
<b>K. salicylová</b>	Fytohormon	-/+	-/+	+++	+
<b>Voda</b>	Kontrola	-	-	-	-

V našem neznámém vzorku byla voda.

### Výsledky:

Náš neznámý vzorek (D) indukoval...krát zvýšenou/sníženou/**nezměněnou** expresi PR5

...krát zvýšenou/sníženou/**nezměněnou** expresi PR-1

Náš neznámý vzorek (D) způsoboval **0%** nekrózu na listu tabáku po přímé infiltraci

**0%** nekrózu na listu tabáku po nasátí petiolou

**Dle výsledků výše byl v našem neznámém vzorku: voda**

Odůvodněte:

Náš vzorek nevykazoval známky nekrózy po nasátí petiolou ani po přímé infiltraci. Po PCR nevykazoval žádné zvýšení ani snížení exprese u všech genů.

Vzorek B který jsme si vybrali pro kvantifikaci vykazoval 10,4x sníženou expresi PR5, 5,5x sníženou expresi EF1a, 6,9x zvýšenou expresi PR1 a 8,9x zvýšenou expresi PR2. Jak vypadal list nevíme.