

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Bílkoviny na klíč

Daniel Bohutínský

Dvůr Králové nad Labem 2013

Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 4. Biologie

Bílkoviny na klíč

Pre-formed proteins

Autor: Daniel Bohutínský

Škola: Gymnázium Dvůr Králové nad Labem
náměstí Odboje 304
Dvůr Králové nad Labem
Královéhradecký kraj

Vedoucí práce: RNDr. Věra Čapková, CSc.

Konzultant: RNDr. Jana Dobroruková



Ústav experimentální botaniky

Akademie věd České republiky, v. v. i.

Dvůr Králové nad Labem 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Věry Čapkové, CSc. a veškerou použitou literaturu jsem uvedl v seznamu literatury. Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V dne podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat své lektorce a konzultantce RNDr. Věře Čapkové, CSc., za množství času, který mi věnovala, svoji trpělivost a obětavou pomoc v průběhu konání práce. Doktorka Čapková je kapacitou ve svém oboru. Věnovala této oblasti vědy značnou část svého života a výzkum biologie pylu posunula kupředu. Za svoji pracovitost a trpělivost si zaslouží můj obdiv. Proto je mi ctí, že jsem měl možnost pod jejím vedením pracovat.

Velké díky patří i Ing. Lucii Hozové a Mgr. Katarzyně Šolcové, které mě po část práce vedly, zodpovídaly na mé dotazy a pomáhaly s počátky práce v laboratoři. Musím přiznat, že jsou pro mě důležité a vždy na ně budu vzpomínat, neboť právě ony mě naučily pracovat v laboratoři.

Dále bych rád poděkoval zbytku vědeckého týmu, který mi pomohl, když bylo potřeba, zodpovídal četné dotazy a vždy navozoval velmi příjemné pracovní prostředí.

Poděkování si zaslouží i profesorka biologie RNDr. Jana Dobroruková. Je to pro mě velice důležitá žena. Paní profesorka mi totiž změnila život. To ona ve mně už před mnoha lety našla vášeň k biologii, kterou prohlubovala. Věřím, že nejsem jediný, komu paní profesorka dokázala obohatit život o radosti biologie. Je to skvělá a aktivní učitelka biologie, která už mnoho let podporuje mladé biology. Velice si cením toho, že jsem ji mohl zažít na našem gymnáziu.

Mé díky patří i organizátorům projektu Otevřená věda. Nebýt tohoto projektu, neměl bych možnost dostat se do tak kvalitního zařízení jako je Ústav experimentální botaniky s neméně kvalitním obsazením.

Anotace

Práce se zabývá regulací exprese genů u pylu tabáku (*Nicotiana tabacum* var. *Samson*). Zjistilo se, že si pyl během svého vývoje předem připraví a skladuje některé typy mRNA, které využije až ve chvíli, kdy z pylového zrna vyrůstá pylová láčka a prorůstá čnělkou k semeníku. V říši rostlin se jedná o druhý případ popsání regulace genů na úrovni mRNA.

Jedním ze způsobů skladování mRNA jsou EPP komplexy. Víme, že EPP komplexy uchovávají mnoho typů mRNA včetně mRNA NTP303. NTP303 kóduje stěnový protein p69, který hraje ve stavbě stěny nezbytnou roli.

V první části práce jsme lokalizovali protein p69. K jeho lokalizaci jsme využili expresní vektor vytvořený metodou přímého klonování, který pro zviditelnění obsahoval zeleně fluoreskující protein (GFP). Takto připravený vektor jsme nastřelili do zralého pylu, který jsme kultivovali *in vitro* a sledovali jsme expresi p69 s fluoreskujícím proteinem, díky čemuž jsme dokázali určit lokalizaci proteinu p69 pomocí fluorescenční mikroskopie.

V druhé části práce jsme se pokoušeli odhalit některé RNA vazebné bílkoviny regulující aktivaci mRNA NTP303. K tomu slouží hybridizační metoda North-western (hybridizace protein-RNA). Mým úkolem bylo vytvořit elektroforeticky rozdělená proteinová spektra EPP komplexů. Tato spektra byla následně hybridizována s fluorescenčně a radioaktivně (^{32}P) značenými sondami tvořenými úseky mRNA NTP303 (5'UTR, Y-element a 3'UTR).

Ve třetí části práce jsme se pokusili zjistit přítomnost a změny v N-glykosylaci všech proteinů vázajících se v RNP komplexech, polyzomech a EPP komplexech během různých stádiích vývoje samčího gametofytu. Glykoproteiny jsou proteiny, na které se vážou cukerné zbytky. V mnoha případech mají regulační funkci. Vytvořili jsme tak základ pro studium regulace exprese genů na základě glykoproteinů.

Celkově tato práce ujasnila odpovědi na pár otázek, ovšem také otevřela cestu k mnoha dalším otázkám.

Klíčová slova

pyl, *Nicotiana tabacum*, translační regulace genové exprese, EPP komplexy, polyzomy, RNP komplexy

Annotation

This essay handle the subject of the expression of the genes in tobacco (*Nicotiana tabacum* var. *Samson*). We know that pollen prepares some mRNAs during its growth which even keeps until the pollination and its growth into the pollen tube. It is the second case of gene regulation at the mRNA level known within plants.

One of the ways of keeping mRNA is using EPP complexes. We know that EPP complexes keep many types of mRNA, including the mRNA NTP303. The NTP303 gene codes the important cell wall protein p69.

The first part of our project was to localize the protein p69. To its localization we used the express vector created by the method of the directional cloning containing the green fluorescent protein GFP. We shot the prepared vector into the mature tobacco pollen. We cultivated the transformed pollen and we observed the expression of the protein complex p69-GFP *in vitro* using fluorescent microscopy. We were able to find the localization of the p69 *in situ*.

In the second part we wanted to find some RNA binding proteins which probably regulate the activation of the mRNA NTP303. We used a North-western hybridization method (hybridization RNA-protein). I had to isolate and divide protein spectrum of the EPP complexes using the electrophoresis. These divided spectrums were hybridized with fluorescent and radioactive (³²P) marked probes made from the parts of the mRNA NTP303 (5'UTR, Y-element and 3'UTR).

In the third part of our project we tried to find out changes in an N-glycosylation of all proteins bonded to RNP complexes, polysomes and EPP complexes during different stages of the male gametophyte's growth. Glycoprotein is protein bound to glucose residues, which in many cases act as regulating element. That is the first step in studying regulation of gene expression based on glykoproteins.

All of that explains few questions, but leads to many new questions.

Obsah

Úvod.....	8
Teoretická část	10
Vývoj mikrogametofytu	10
Mikrosporogeneze	10
Mikrogametogeneze	11
Opylení a růst pylové láčky	11
Charakteristika RNP	12
Charakteristika polyzomů.....	13
Charakteristika EPP komplexů.....	13
Charakteristika genu NTP303	13
Charakteristika mRNA NTP303.....	14
Metodika	15
Rostlinný materiál	15
Sběr rostlinného materiálu.....	15
Použité metody k lokalizaci p69	15
CTAB extrakce DNA	15
Kvantifikace DNA	15
PCR.....	16
Gelová horizontální elektroforéza DNA	16
Extrakce DNA z agarózového gelu	16
Přímé klonování (pENTR™ Directional TOPO® Cloning, firma Invitrogen).....	16
Transformace do kompetentních buněk	18
Miniprep a Midiprep.....	18
Restrikce plazmidů	18
Sekvence DNA	18
Transientní transformace pylových zrn pomocí přístroje Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (firma BioRad).....	18
Kultivace pylu <i>in vitro</i>	20
Fluorescenční mikroskopie.....	20
Použité metody k detekci mRNA NTP303 vazebných regulačních proteinů	21
Homogenizace pylu	21
Subcelulární frakcionace	21

Extrakce proteinů.....	21
Kvantitativní stanovení proteinů	22
1-D SDS-PAGE proteinů	22
Barvení proteinů na gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G250	22
Blotování	23
North-western hybridizace	23
Detekce glykoproteinů	23
Praktická část	25
Lokalizace proteinu p69	25
Detekce regulačních proteinů mRNA NTP303.....	26
Detekce glykoproteinů	27
Závěr a diskuze	29
Použitá literatura	30
Přílohy.....	I

Úvod

Schopnost rozmnožování je základní charakteristikou živé hmoty. V průběhu evoluce vzniklo mnoho způsobů rozmnožování, jednoduchým dělením jednobuněčných počínaje, složitými a důmyslnými cestami živočichů a rostlin konče.

Všichni jsme se učili, že můžeme rozlišit rozmnožování vegetativní a generativní. Vegetativní rozmnožování je jednoduché, méně náročné a co do počtu potomků často efektivnější. Jeho nevýhodou je kumulace nežádoucích mutací v populaci. Proto nalézáme jen málo striktně nepohlavně se rozmnožujících organismů.

Další a důmyslnější je pohlavní (generativní) rozmnožování. U rostlin při něm dochází ke střídání dvou generací, generace diploidní (sporofyt) a haploidní (gametofyt). Tento jev se nazývá rodozměna (metageneze). Rodozměnu rozlišujeme dvojího typu. Poměrně vzácně se vyskytující rodozměnu izomorfní, kdy je tvar a velikost sporofytu srovnatelný s gametofytem (ta byla zjištěna např. u fosilních rhyniových rostlin nebo u některých recentních druhů řas), a rodozměnu heteromorfní, kdy jedna z forem převyšuje nad druhou. U naprosté většiny taxonů je sporofyt dominantní generací. Jediné výjimky jsou mechorosty, u kterých je dominantní gametofyt. Ten je představován samotnou rostlinkou a sporofyt je tvořen štětem s tobolkou obsahující spory. Rostliny výtrusné a semenné upřednostňující sporofyt mají redukovaný gametofyt. Gametofyt kaprad'orostů je představován zejména malým lístkem, zvaný prokel (*prothallium*). Nahosemenné a krytosemenné rostliny zašly ještě dále, zredukovaly gametofyt jen na několik málo buněk. Čím více je gametofyt redukován, tím samozřejmě vzrůstá jeho závislost na sporofytu. Tudíž v této fázi je gametofyt zcela závislý. Jedinou výjimku tvoří právě pyl, který se samostatně vyskytuje právě ve chvíli, kdy je uvolněn z prašníků, aby mohl být větrem či hmyzem přenesen na bliznu.

Jak již bylo nastíněno, gametofyt krytosemenných existuje ve dvou formách – samčí (mikrogametofyt) a samičí (megagametofyt). Samčí gametofyt, pyl a po vyklíčení pylová láčka, je pouze jakýmsi transportním zařízením dvou spermatických buněk, které jsou v něm uloženy. Když dojde k opylení a následně oplodnění, dochází k splynutí jedné spermatické buňky s vaječnou buňkou. Vznikne diploidní zygota, která je zárodkem sporofytu. Druhá spermatická buňka splyne s centrálním jádrem zárodečného vaku a vznikne endosperm. Splynutím se cyklus rodozměny uzavírá. Celý proces je velmi přesně regulovaný a tato práce se věnuje jednomu z dílčích kroků. Konkrétněji procesům probíhajících v době zrání pylového zrna, opylení a růstu pylové láčky.

Pyl během svého vývoje předpřipravuje některé typy mRNA, které skladuje a využívá je až o několik dní později během růstu pylových láček. Skladovat mRNA lze ve formě RNP komplexů, polyzomů nebo EPP komplexů.

Jednou z těchto mRNA je mRNA NTP303, která je syntetizovaná již během zrání pylu a to v obrovském množství (Weterings et al., 1992). Není ihned přepisovaná do formy proteinu p69 (Wittink et al., 2000), ale je skladovaná ve formě EPP komplexů. K translaci této mRNA dochází až při růstu pylové láčky. mRNA NTP303 i protein p69 jsou tedy pylově specifické. Protein p69 je stěnový protein. Naznačuje to vzrůstající množství proteinu v láčce v průběhu

jejího růstu. V minulosti byla její přítomnost potvrzená extrakcí z buněčné stěny (Čapková et al., 1997), ale nebyla prokázána *in situ*.

Cílem práce bylo lokalizovat protein p69 v rostoucí pylové láčce, protože její lokalizace v buněčné stěně byla prokázána pouze biochemicky a izotopicky po extrakci buněčných stěn.

Proto jsme se rozhodli protein p69 označit pomocí GFP, čímž jsme dokázali jeho lokalizaci pod fluorescenčním mikroskopem.

Dále jsme se zajímali o to, jaké proteiny zprostředkovávají regulaci exprese skladovaného mRNA NTP303. Když už existující mRNA NTP303 je uchovávána v EPP komplexech, musí existovat nějaké proteiny, které zamezují translaci. Naším úkolem tedy bylo zjistit, jaké proteiny to jsou a na které oblasti mRNA NTP303 nasedají.

Provedli jsme také pilotní pokus pro studium intenzity glykosylace proteinů během vývoje pylu v různých frakcích mRNA (RNP, EPP komplexy a polyzomy).

Teoretická část

Předložená práce se zabývá regulací exprese genů v modelové rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum* var. *Samson*).

Tabák je pro tyto účely vhodnou modelovou rostlinou z několika důvodů. Jeho pyl je dvoubuněčný, tudíž je metabolicky málo aktivní a proto dobře skladovatelný, lze jej skladovat rok při teplotě -20°C , aniž by se změnila jeho funkční a biochemická aktivita. Další důvody jsou také zcela praktické. Například velikost celé rostliny, která se mohutně větví. Květy jsou hojné, velké a bohaté na pyl. Kultivace pylu *in vitro* (v laboratorních podmínkách) je snadná a vykultivované láčky lze použít pro biochemické analýzy. Oproti tomu trojbuněčný pyl např. huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je metabolicky aktivní již při přenosu na bliznu, nedá se skladovat a pro malé květy je jeho sběr velmi obtížný.

Vývoj mikrogametofytu

K vývoji samčího gametofytu slouží samčí pohlavní (generativní) orgán – tyčinka (*stamen*). Tyčinky se skládají ze dvou částí – prašníku (*anthera*) a nitky (*filamentum*). Nitka nese prašník, vyzdvihuje jej z květu a dělá jej přístupnějším. Prašník je důležitou strukturou, vzniká v něm pyl. Je ve většině případů tvořen dvěma prašnými váčky. Každý z obou prašných váčků je tvořen dvěma prašnými pouzdry.

Stěna vyvinutého prašníku má několik vrstev. První z nich je vnější pokožková (epidermální) vrstva, která bývá pokrytá kutikulou. Pod epidermální vrstvou se nachází podpokožková (subepidermální) vrstva. Její buňky s různě ztloustlými stěnami umožňují praskání a tím otvírání zralého prašníku. Následuje vrstva, jež se nazývá střední vrstva (mezofyl). Ta je složena z parenchymatických buněk, které při dozrávání prašníku odumírají. Poslední, vnitřní vrstvou je výstelka (tapetum). Buňky tapeta jsou v přímém kontaktu s mikrosporocyty, mikrosporami a nakonec i s pylovými zrny. Tapetální buňky jsou bohaté na proteiny, nukleové kyseliny a mitochondrie. Vyživují buňky mikrogametofytu během celé mikrosporogeneze a značně je ovlivňují i během mikrogametogeneze (Erdelská, 1974).

Mikrosporogeneze

Mikrosporogeneze je proces odehrávající se v prašných pouzdrech v přítomnosti tapeta, které hraje ve vývoji pylu nezbytnou roli. Vyživuje mikrospory a mladý pyl, vytváří kalózu (β -1,3-glukan) a později i exinu – vnější obal pylu.

V prašném pouzdře se nacházejí diploidní mateřské buňky (mikrosporocyty, meiocyty). Před první meiózou jsou mateřské buňky spojeny s buňkami tapeta pomocí plasmodezmat. V profázi I. meiózy se tato plasmodezmata ruší a začínají se stavět kalózové stěny kolem meiocyttů. Jádro se redukčně dělí a nastupuje druhá fáze meiózy, při níž se obě jádra mitoticky duplikují. Po skončení karyokineze jsou v buňce 4 jádra s haploidním počtem chromozomů. Poté se vytvoří i buněčná stěna, která jádra oddělí a vznikne tetráda (tzv. simultánní oddělení – k cytokinezi dochází až po vzniku všech čtyř jader). Tetráda je obalena silnou kalózovou vrstvou, která funguje jako molekulární síto, které nepropouští makromolekuly. Izoluje ji tak ve chvíli, kdy v ní probíhají procesy velice odlišné od těch, co probíhají v okolních

buňkách. Následně se v tapetálních buňkách začne produkovat enzym kaláza, který je aktivován změnou pH a který rozpouští kalózu. Po rozložení kalózy se tetráda rozpadne a uvolní se čtyři mikrospory.

Mikrogametogeneze

Při mikrogametogenezi se mikrospory začnou vyvíjet v pylová zrna. Mikrospora narůstá a obklopuje se typickou stěnou pylového zrna, exinou. Tu vytváří buňky tapeta podléhající buněčné smrti (apoptóze). Důležitou složkou exiny je sporopolenin. Sporopolenin je velice odolný biopolymer složený z mastných kyselin, fenolů, fenylypropanoidů, lipidů a karotenoidů, které způsobují jeho žluté zabarvení (<http://en.wikipedia.org/wiki/Sporopollenin>). Chrání pyl proti mechanickým a chemickým vlivům i proti vlivu UV záření. V cytoplazmě mikrospory se tvoří vakuoly, které se postupně spojují v jednu velkou centrální vakuolu. Jádro se z důvodu rostoucí vakuoly posune ze středu ke stěně mikrospory. Zde dochází k první pylové mitóze, která je asymetrická. Její asymetričnost je rozhodujícím faktorem pro pokračování mikrogametogeneze. U pylu tabáku je mitóza úplná – dochází i k cytokinezi. Výsledkem jsou dvě různé buňky, přičemž menší buňka se nachází v té větší. Vzniká útvar „buňka v buňce“. Menší buňka se nazývá generativní buňka, větší je buňka vegetativní.

Generativní buňka se od vegetativní neliší jenom tvarem a velikostí, ale také i strukturou a obsahem. Generativní buňka neobsahuje žádné zásobní látky, její malé jádro obsahuje velmi kondenzovanou DNA. Jinak generativní buňka obsahuje všechny základní orgány, avšak v redukovaném množství.

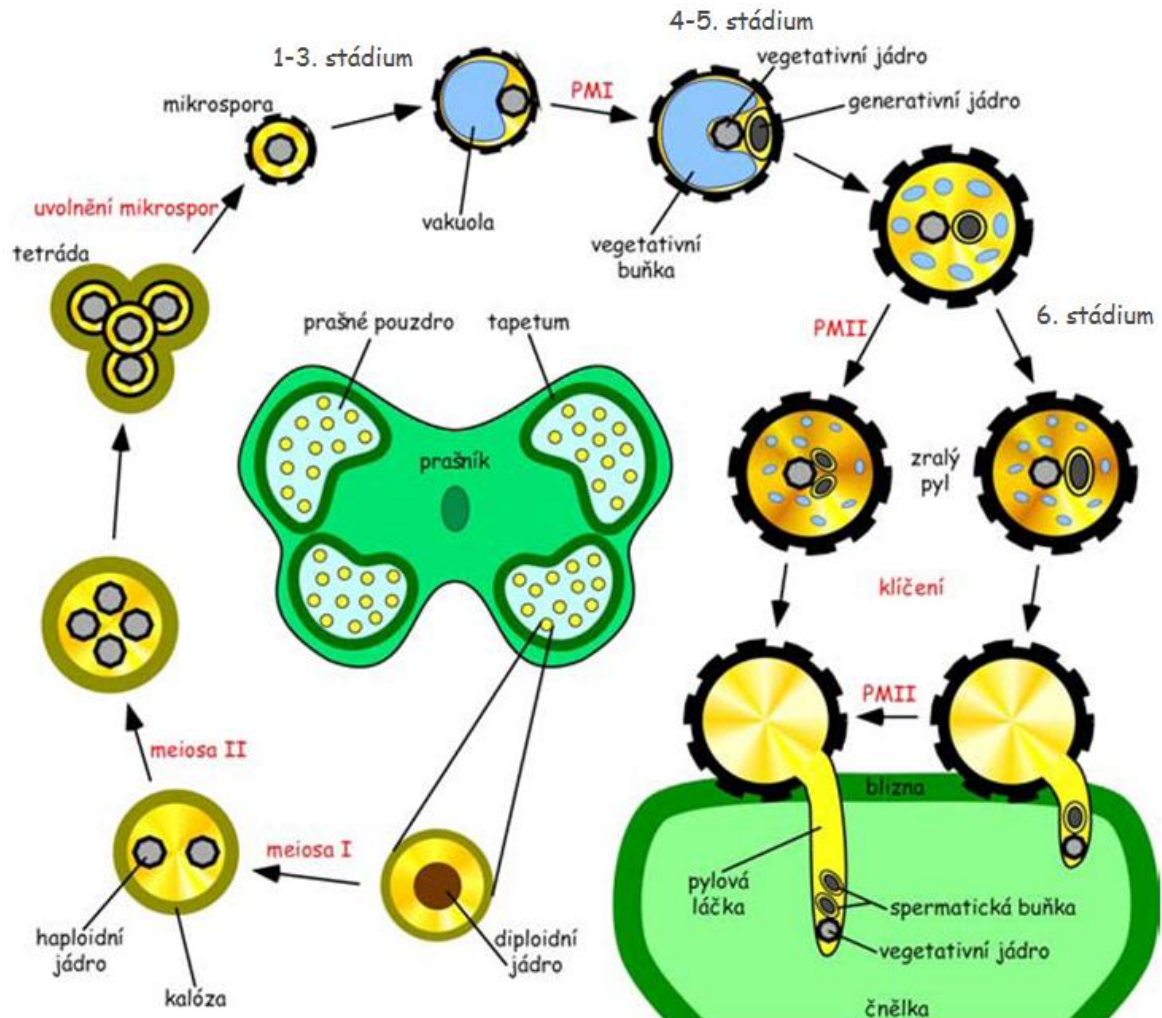
Vegetativní buňka je metabolicky velmi aktivní. Akumuluje volné aminokyseliny a některé zásobní látky, jako jsou škroby a tuky. Některé živiny jsou sporofytického původu (konkrétně z buněk tapeta). Jádro této buňky bývá větší než generativní jádro. U tabáku byly nalezeny neaktivních formy mRNA. Jedná se o některé RNP, polyzomy a EPP komplexy (viz dále). Tyto mRNA jsou důležité pro translaci v době růstu pylové láčky. (Honys et al. 2000).

U některých druhů rostlin proběhne druhá pylová mitóza, kdy se dělí generativní buňka a vznikají dvě spermatické buňky ještě před kontaktem pylu s bliznou. Takové rostliny nazýváme rostliny s trojbuněčným pylem (např. huseníček). U tabáku, jakožto rostliny s dvojbuněčným pylem, to probíhá později až při prorůstání pylové láčky čnělkou. V poslední fázi zrání pylu se pylové zrno silně dehydratuje. Zralý pyl je uvolněn z prašníků a je schopen opylení.

Opylení a růst pylové láčky

Při opylení dopadne pyl na povrch blizny, kde se nacházejí papilární buňky, které se podílejí na zachycení pylu příslušného druhu. Pyl se rehydratuje, znovu se startují metabolické procesy a nastává fáze aktivace pylu, kdy se aktivují biologické procesy uvnitř pylového zrna před vyklíčením. V druhé fázi pylové zrno začne klíčit a z vegetativní buňky vyrůstá jedním z klíčících pórů pylová láčka. Vegetativní jádro je v této době inaktivní a neprodukuje žádné mRNA. Proto se v této fázi pro syntézu stavebních proteinů používají transkripty (mRNA), které byly transkribovány už při vývoji pylu. Ve třetí fázi se pylová láčka prodlužuje a prorůstá vodícím pletivem, které napomáhá udržet pylové láčce směr růstu. V případě

tabáku a dalších rostlin s dvoubuněčným pylem dochází v této době (mezi osmou až třináctou hodinou po dopadu na bliznu) k druhé pylové mitóze a vznikají dvě spermatické buňky. V poslední fázi se pylová láčka nadále prodlužuje. U tabáku dorůstá délky až 4 cm, ale například u kukuřice je jejich délka až 30 cm. To celé během několika dní. Poté, co pylová láčka doroste k semeníku, vyhledá vajíčko, vrostle do otvoru klového, kde praskne a vstřelí spermatické buňky do vajíčka.



Obrázek 1: Vývoj mikrogametofytu. Uvolnění mikrospor končí mikrosporogeneze. PMI nebo II – první nebo druhá pylová mitóza. © Honys a Twell

Charakteristika RNP

RNP, ribonukleoproteiny lze v širším slova smyslu chápat jako kteroukoliv RNA asociovanou s proteiny. Jenže každá RNA se vždy asociuje s proteiny. RNA vycházející z jádra do cytoplasmy musí být obalena vysokým počtem proteinů, které zajišťují průchod jadernými póry.

V této práci označení RNP omezíme jen pro skupinu komplexů, které jsou lineární a často jsou ukotvené na cytoskeletu. Často tedy obsahují mRNA kódující cytoskeletální komponenty

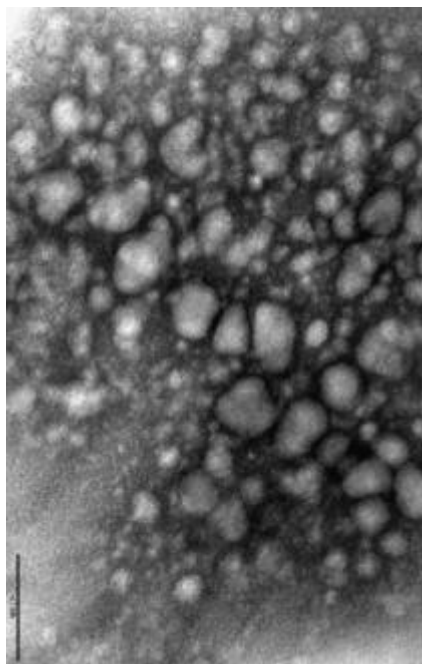
nebo sekreční proteiny a jsou poměrně abundantní (hojné). Při izolaci z pylu je to nejlehčí složka z post-mitochondriální frakce (viz Metodika).

Charakteristika polyzomů

Polyzomy (rovněž polyribozomy) obsahují cyklickou mRNA (to za pomoci několika iniciačních faktorů nacházejících se jak na začátku mRNA tak i na poly(A) konci, které mRNA zacyklí). Díky tomu se na jedné mRNA může nacházet několik ribozomů najednou. Navíc po ukončení syntézy na jednom ribozomu se ribozom může rychleji dostat opět na začátek mRNA k syntéze dalšího proteinu. To celou proteosyntézu zefektivňuje.

Charakteristika EPP komplexů

EPP komplexy jsou tvořeny mRNA, malými i velkými ribozomálními podjednotkami a iniciačními faktory (Honys et al., 2009). Jejich označení je odvozeno způsobem izolace. EPP komplexy lze izolovat pomocí subcelulární frakcionace (viz Metodika), kdy se pro oddělení EPP komplexů a polyzomů používá pufr s vysokým obsahem soli (KCl a zároveň s nízkou hladinou Mg^{2+}) a s obsahem chelatonu EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), který vyvazuje hořčnaté kationty z ribozomů. Další složkou pufru je antibiotikum puromycin. Puromycin se váže v ribozomu do P-oblasti (místo, kde dochází ke spojování aminokyselin do řetězce), čímž znemožní pokračování syntézy polypeptidu. Díky vysoké hladině soli, nízké hladině Mg^{2+} , EDTA a puromycinu se polyzomy inaktivují a destabilizují a lze tak jejich fragmenty oddělit od EPP (EDTA, Puromycin Partikule) komplexů pomocí centrifugace.



Obrázek 2: Skenovací elektronová mikroskopie EPP komplexů (David Reňák, nepublikováno).

Charakteristika genu NTP303

NTP303 (Nicotiana Tabacum Pollen gen číslo 303) je pylově specifický gen, kódující protein g69. Genomická sekvence genu NTP303 je dlouhá 2 157 bp (base pair – páru bazí).

Charakteristika mRNA NTP303

Na obrázku 3 je schéma molekuly mRNA NTP303. Červeně je zvýrazněna tzv. čepička. Ta vzniká už během syntézy RNA v jádře a je tvořená guaninovým nukleotidem s navázanou methylovou skupinou. Zabraňuje degradaci RNA a je místem, kde se můžou zachycovat vazebné proteiny.

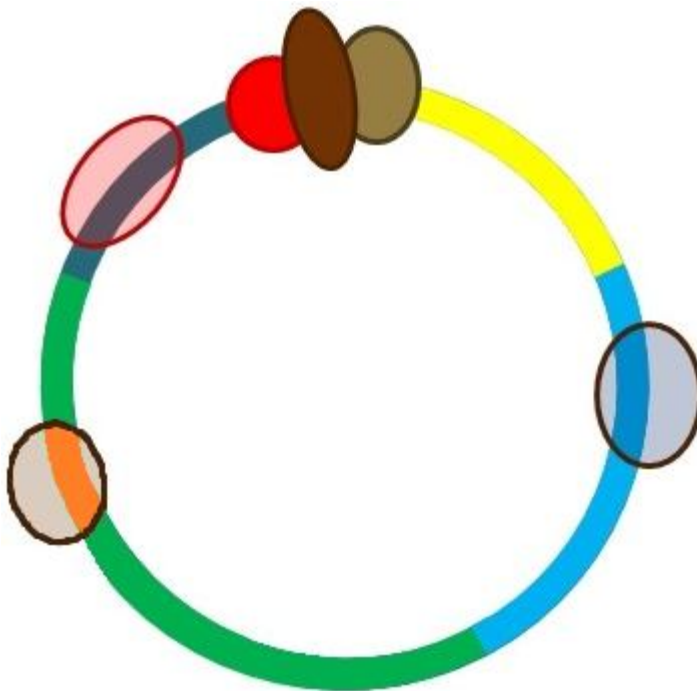
Tmavě modře je zvýrazněn 5'UTR (UnTranslated Region – netranslatovatelná oblast). Očekáváme, že na tuto sekvenci se budou vázat některé proteiny, které tak budou regulovat expresi NTP303.

Zeleně je zobrazen samotný čtecí rámeček. Obsahuje kódovanou sekvenci RNA. Podle této sekvence ribozomy syntetizují proteiny.

Oranžově je zvýrazněn Y-element. To je pravděpodobně jedno z vazebných míst v mRNA NTP303. Na tuto oblast se zřejmě také budou vázat proteiny, ovlivňující expresi (Honys, 2000, nepublikováno).

Světle modře je 3'UTR. Je to také netranslatovaná oblast, ovšem nalézá se na 3' konci RNA. Tato oblast se pravděpodobně také podílí na regulaci exprese.

Žlutě je poly-A konec. Vzniká po ukončení transkripce (je jednou z posttranskripčních modifikací) pomocí poly(A) polymerázy během procesu polyadenylace. Je tvořen 40-250 adeninovými nukleotidy.



Obrázek 3: Schéma mRNA NTP303. Červeně je methylovaná čepička s iniciačními faktory (hnědě). V tmavě modré oblasti 5'UTR, v místě Y-elementu (oranžově) a ve světle modře označené oblasti 3'UTR jsou vyznačená místa, kde se mohou vázat vazebné proteiny.

Metodika

Rostlinný materiál

Veškeré pokusy probíhaly na modelové rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*) pěstovaném v japanech. K práci jsme potřebovali pyl v 5. stádiu vývoje, zralý pyl a pylové láčky po čtyřech hodinách kultivace.

Sběr rostlinného materiálu

Sbírají se poupata ve stádiu 5 (viz obr. č. 1), která jsou dva dny před plným vykvetením. Vypreparují se prašníky z 20 květů. Prašníky jsou zalaty 0,8 – 4 ml 5% roztoku sacharózy s inhibítorem proteáz. Ve vychlazené třecí misce se prašníky rozbijí a následně se vortexují. Dále se pyl filtruje přes jemné sítko. Čistý pyl se centrifuguje při přetížení 2000 g pět minut za teploty 4°C. Takto získaný vzorek pylu se uchovává při -80°C.

Pyl ve stádiu 6 je už téměř zralý a vhodný pro naše účely. Z posbíraných poupat se separují prašníky, které se nechají po dobu 24 hodin schnout na filtračním papíře, čímž popraskají a uvolní pyl. Ten se sesbírání a uchovává se při teplotě -20°C. Takto pyl vydrží použitelný až jeden rok – do nové vegetační sezóny.

Pro získání pylových láček je nutné pyl kultivovat. Povrch pylu tabáku je velmi nepolárního charakteru. *In vivo* je jeho rehydratace zajištěna pomocí papilárních buněk, které se vyskytují na blizně. Pro *in vitro* kultivace musíme pyl dvě minuty intenzivně vortexovat v živném médiu, aby došlo k jeho smáčení a možnosti rehydratace. Kultivace pylu probíhá v živném médiu, které připomíná prostředí blizny. Kulturu v Erlenmayerových baňkách je nutné třepat, aby byla kultura dostatečně okysličená.

Použité metody k lokalizaci p69

Spektrum použitých metod je pro rozsah celé práce poměrně široké. Výčet s krátkými komentáři je následující:

1. CTAB extrakce DNA

Pro získání genomové DNA z pletiv rostlin se využívá CTAB extrakce. Látka CTAB (Cetyl Trimethyl-Amonium Bromid) je tenzid (saponát), který umožňuje izolaci DNA. Takto izolovaná DNA je vhodná i pro další úkony jako je např. PCR.

CTAB extrakce spočívá v rozrušení veškerých membránových struktur za nízké teploty (aby nedošlo k destrukci DNA) a následném pročišťování v různých pufrch (které obsahují CTAB), během kterého se provádí soustava centrifugací.

2. Kvantifikace DNA

Po každé reakci, která pracuje s DNA, se pro jistotu vzorek kvantifikuje. K tomu se používá fotospektrometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Tento přístroj je nenáročný na materiál – stačí pouze 2 µl vzorku.

Princip měření koncentrace DNA spočívá v absorbanci světla, kterou NanoDrop 1000 měří a vyhodnocuje.

3. PCR

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) je jednou z nejčastěji užívaných metod v molekulární biologii. Slouží k mnohonásobnému namnožení kteréhokoliv úseku DNA a to zcela *in vitro* na přístroji termocykleru (např. od firmy Eppendorf, Biometra, atd.).

4. Gelová horizontální elektroforéza DNA

Gelová DNA elektroforéza je metoda, která se využívá ke stanovení délky analyzovaných úseků DNA. Funguje na poměrně jednoduchém principu, na „průchodu“ DNA porézním agarózovým nebo polyakrylamidovým gelem v elektrickém poli.

5. Extrakce DNA z agarózového gelu

Po proběhnutí DNA elektroforézy je možné izolovat DNA z agarózového gelu a využít ji k dalším analýzám.

Vyřízne se kousek agarózového gelu obsahující požadovanou DNA. Agaróza se pomocí pufru a zvýšené teploty (50°C) rozpustí. DNA je z gelu extrahovaná kitem QIAquick (QIAGEN) podle manuálu (viz protokoly v přílohách). Získaná DNA lze použít k dalším analýzám.

6. Přímé klonování (pENTR™ Directional TOPO® Cloning, firma Invitrogen)

Firma Invitrogen™ popisuje technologii Gateway® jako univerzální klonovací metodu, která využívá výhody místně specifické rekombinace převzaté od bakteriofága lambda.

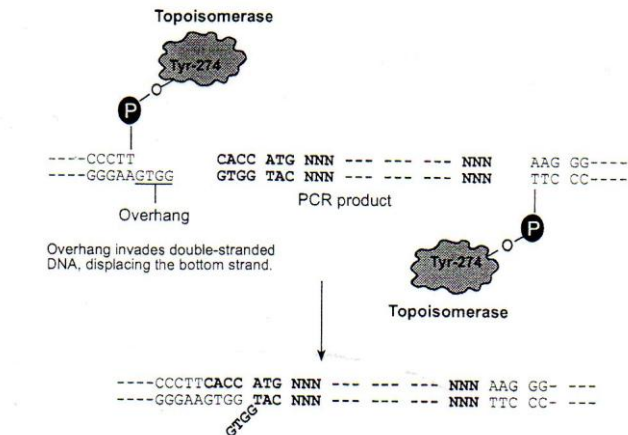
Postupné kroky jsou následující:

- 1) Zaklonovat (blunt-ends) PCR produkt do komerčního pENTR™ TOPO® vektoru a vytvořit tak entry klon.
- 2) Vytvořit expresní konstrukt pomocí LR rekombinační reakce mezi entry klonem a destinačním vektorem.
- 3) Vložit expresní konstrukt do modelového organismu (bakterie, kvasinky, hmyz, savci, rostliny,...) a nechat syntetizovat rekombinační protein.

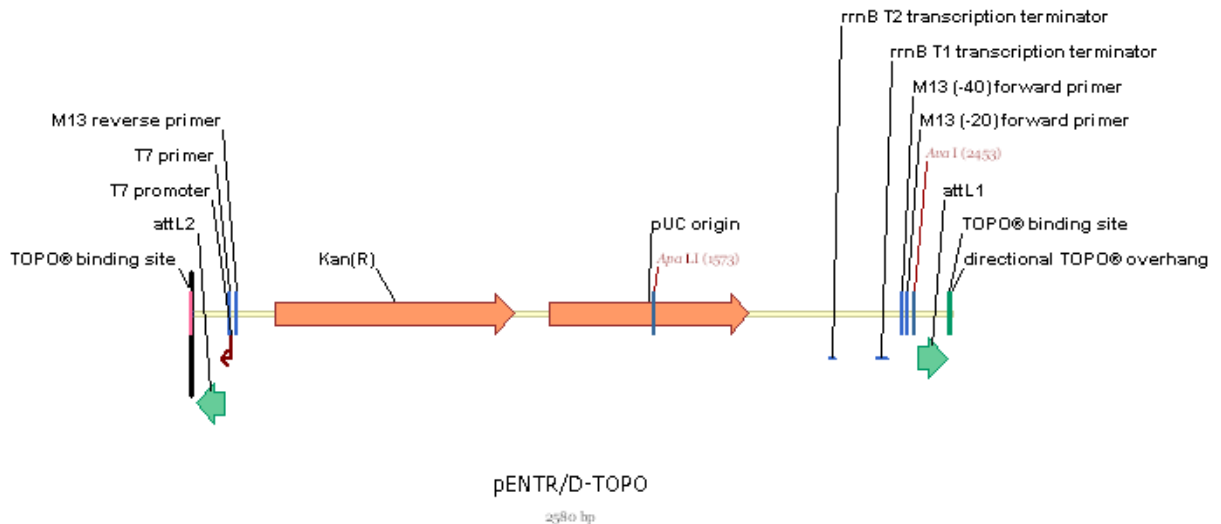
Ad 1) Zaklonování předem definovaného úseku DNA se dosáhne pomocí proteinu topoizomeráza I, který je získáván z viru *Vaccinia*. Ten se váže na specifické místo (CCCTT) v DNA a štípe fosfodiesterovou vazbu (ribóza-fosfát-ribóza) ve vlákně. Energie z rozbití vazby je uložena do nové kovalentní vazby mezi fosfátem (z vlákna DNA) a tyrosylem (aminokyselina z topoizomerázy I). Tato vazba může být následně atakována 5' hydroxylem z původního vlákna a opět přeměněna na vazbu ve vlákně DNA (Invitrogen, 2007).

Pro naše účely to znamená, že topoizomeráza I, která je navázána na obou koncích lineárního vektoru pENTR/D-TOPO dokáže navázat PCR produkt. Správná orientace je zajištěna krátkými sekvencemi na obou činitelích. GTGG je na konci vektoru a k tomu komplementární sekvence (CACC) je na PCR produktu. Vazba mezi tyrosylem (z topoizomerázy I) a fosfátem je ovlivněna 5' hydroxylem z DNA PCR produktu, což způsobí rozbití této vazby, přesmyk sekvencí mezi úseky DNA za pomoci topoizomerázy I a navázání PCR produktu na vektor (viz obrázek č. 4). Vzniká entry klon, který je transformací do kompetentních

buněk (laboratorně upravené *E. coli*) namnožen, selektován a ověřený izolován z bakterií do formy čistého konstrukt, se kterým se pracuje dále.



Obrázek 4: Spojením PCR produktu a vektoru vzniká entry klon. (zdroj: User Manual pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen).



Obrázek 5: Schematická mapa entry klonu (Kan(R) - gen pro resistenci vůči kanamycinu, pUC origin - oblast, kde začíná replikace, attL1 a attL2 - rekombinační místa pro LR reakci, Apa I a Ava I – restrikční oblasti; zdroj: program NTI Vector).

Ad 2) V druhém kroku následuje LR rekombinační reakce mezi entry klonem a destinačním vektorem. Rekombinaci zprostředkovává LR Clonase™ II Enzyme Mix, který obsahuje vlastní enzymy a potřebný 5X LR reakční pufr.

Jako destinační vektor jsme použili pKGWFS7,0. pKGWFS7,0 obsahuje gen pro GFP. LR rekombinace probíhá mezi attL a attR místy (attL1 a attL2 jsou na entry klonu, místa attR1 a attR2 jsou na destinačním vektoru).

Ad 3) LR reakcí vznikne expresní konstrukt, který je možné vpravit do buněk mnoha typů organismů od bakterií, přes kvasinky až k rostlinám a po savce, kde probíhá syntéza rekombinačního proteinu. Z pravidla se nejdříve transformují bakterie, které konstrukt namnoží a ze kterých jej můžeme získat ve velkém množství pomocí metody Miniprep a Midiprep. Po získání dostatečného množství konstruktu jej lze používat i do dalších

modelových organismů. V našem případě nastřelujeme konstrukt na zlatých partikulích do pylových zrn.

7. Transformace do kompetentních buněk

Poté, co je vektor (entry klon i expresní klon) připraven, obvykle se transformuje do kompetentních buněk TOP 10 (firma Invitrogen; laboratorně upravené *E. coli*). Toho se dosáhne pomocí heat shocku – smícháním bakterií s plazmidem (kruhová DNA) a vystavení vysoké teploty (obvykle 42°C) po relativně krátkou dobu (obvykle 45 s). To bakterie donutí přijmout plazmid a zapojit ho do svého metabolismu. Bakterie se poté přemístí na agarózový gel s antibiotikem. Bakterie, které přijaly správný plazmid, s ním přijaly i resistenci proti antibiotiku. To způsobí, že na plotnách (Petriho misky s agarem) vyrostou jen ty bakterie obsahující plazmid.

8. Miniprep a Midiprep

Miniprep a Midiprep jsou velice podobné metody fungující na stejném principu. Liší se jen v použitém množství vzorku (existuje ještě Maxiprep, ten jsme ale nevyužívali).

Obě metody slouží k izolaci velkého množství plazmidu z kompetentních buněk. Využívá se série různých pufrů a centrifugací.

9. Restrikce plazmidů

Restrikce je reakce, používaná pro ověřování správnosti rekombinačních reakcí. Každý vektor obsahuje místa, která dokážou restrikční enzymy rozstříhnout (bývají to často krátké palindromické sekvence). Z programů jsme schopni vypočítat, jak by měl vypadat správně rekombinovaný vektor. Proto se vypočítá, na jak velké úseky jsou restrikční enzymy schopny plazmidy rozstípat. Po provedení restrikční reakce se úseky rozdělí pomocí elektroforézy a podle jejich délky můžeme určit, zda velikost vektoru souhlasí.

10. Sekvence DNA

Pomocí sekvenace můžeme určit pořadí nukleotidů v DNA. Reakce probíhá v sekvenátoru. Pro obtížnost a nákladnost této metody jsou sekvenátory pouze na specializovaných stanovištích. My jsme ji využívali při ověřování správnosti rekombinace plazmidů.

11. Transientní transformace pylových zrn pomocí přístroje Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (firma BioRad)

Při této metodě bylo postupováno podle protokolu N. Bate (1996, nepublikováno), který modifikoval D. Honys (2003, nepublikováno).

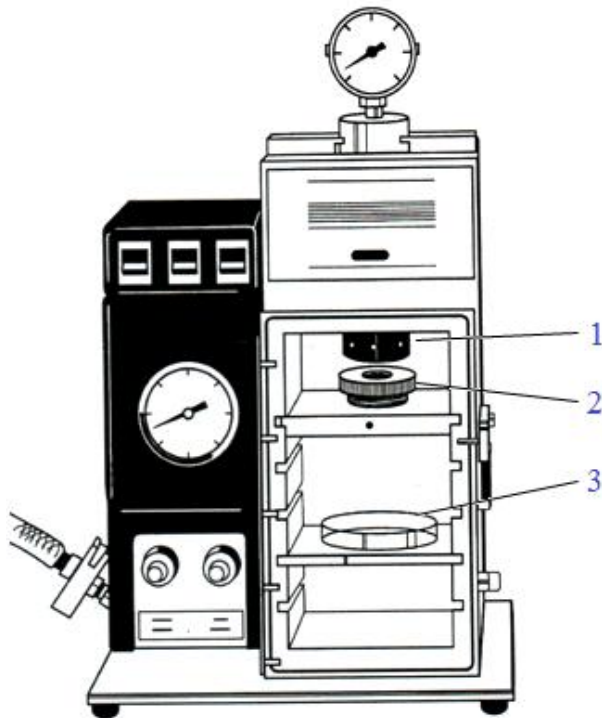
Přístroj slouží k rychlé transientní (přechodné) transformaci rostlinných pletiv, v našem případě pylových zrn tabáku.

Celý proces transformace probíhá ve dvou krocích:

- 1) příprava mikroprojektilů
- 2) vlastní nastřelování

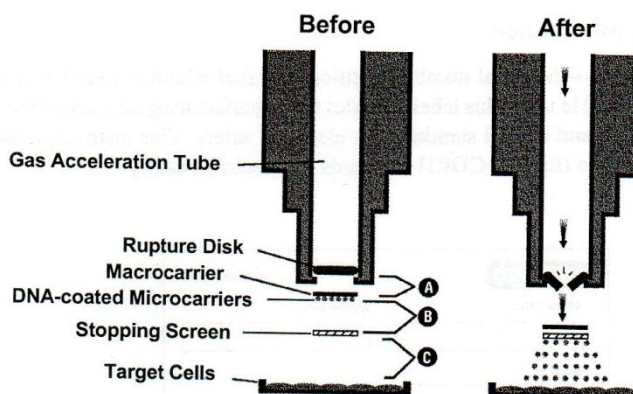
Ad 1) Mikroprojektily jsou tvořeny malými zlatými částicemi ($\Phi=1,6\mu\text{m}$), které jsou pomocí spermidinu (získávaného z rybího semene) obalovány expresním vektorem.

Ad 2) K samotnému nastřelení pylu jsme použili přístroj Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System.



Obrázek 6: Schéma přístroje Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systém (Honys, 2009).

1. Kovová hlavice, do které se umisťuje tvrdá plastová membrána (rupture disk), která praskne při přetlaku 1100 psi (pound per square inch).
2. Kovový úchyt pro membránu (macrocarrier), na které jsou naneseny částice zlata (DNA-coated microcarriers) s expresním konstruktem, a síťka (stopping screen), která zajišťuje rovnoměrnou disperzi zlata a zachycuje zbytky membrány.
3. Petriho miska s nitrocelulózovou membránou, na které je nanesený pyl (target cells).



Obrázek 7: Bližší schéma nastřelování pletiv: Gas Acceleration Tube – plyn (helium) urychlující hlavěň, Rupture Disk – praskající membrána, Macrocarrier – nosič, plastová membrána, na níž jsou nanesené mikroprojektily, DNA-coated Microcarriers – mikroprojektily obalené DNA, Stopping Screen – kovová síťka zachytávající fragmenty ruptury disk a macrocarrier, Target cells – cílové buňky, pylová zrna.

Po transformování pylu se nechá kultivovat. Poté lze pozorovat signál v pylových láčkách pod fluorescenčním mikroskopem.

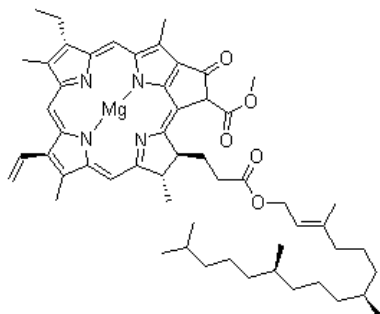
12. Kultivace pylu *in vitro*

Kultivace je popsána v kapitole Rostlinný materiál.

Kultivace pro fluorescenční mikroskopii probíhá v intervalu 4-16 hodin na kývačce v temném a chladném prostředí. Poté se pyl pozoruje pod fluorescenčním mikroskopem.

13. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je často používanou metodou pro zjišťování struktur v tkáních a samotných buňkách. Využívá fluorescence různých látek. Obvykle fluorescenční sloučeniny obsahují množství dvojných vazeb a konjugovaných elektronových systémů. Například chlorofyl – zelené fotosyntetizující barvivo, obsahuje 4 pyrrolové cykly spojené methylovými můstky (=CH–).



Obrázek 8: Struktura chlorofylu (<http://www.fkp.jku.at/fkp/bilder/Chlorophyll.jpg>).

Když jej exponujeme pod UV světlem, svítí červeně. To se děje díky absorbování energie světla, což vede k excitaci elektronů na vyšší energetickou hladinu. Při opětovném uvolňování energie se část promění v tepelnou energii a zbytek se při seskoku elektronů zpět na nižší (původní) energetickou hladinu vyzáří ve formě fotonu – světla. Díky tomu, že část přijaté energie se přeměnila na teplo, tak posléze vyzářený foton má vždy nižší energii, což se projeví na barvě světla. Děje-li se uvolňování přebytečné energie bezprostředně po expozici, mluvíme o fluorescenci, světélkuje-li látka i delší dobu po expozici, jedná se o fosforescenci.

Stejně tak i protein GFP (Green fluorescent protein), který využijeme při lokalizaci hledané bílkoviny, světélkuje pod UV světlem. GFP byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria* a dnes se hojně využívá v molekulární biologii pro lokalizaci mnoha druhů proteinů.



Obrázek 9: Struktura GFP (zdroj: http://en.wikipedia.org/wiki/File:GFP_structure.png).

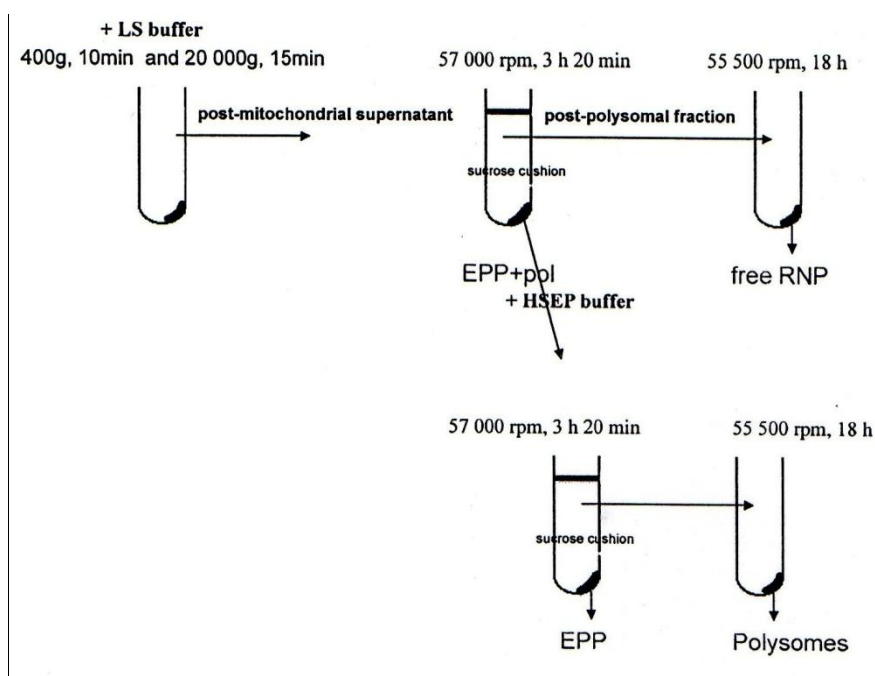
Použité metody k detekci mRNA NTP303 vazebných regulačních proteinů

1. Homogenizace pylu

Nasbíraný pyl se homogenizuje za velice nízkých teplot tekutého dusíku. Homogenizace pylu slouží k rozrušení buněk pylu pro uvolnění buněčných struktur, které jsou následně separovány na subcelulární funkční frakce. Veškeré následující kroky probíhají na ledu.

2. Subcelulární frakcionace

Metoda subcelulární frakcionace slouží k rozdělení buněk na několik frakcí. Homogenát je nejprve zbavován nežádoucích složek, jader, mitochondrií a rozrušených stěn na stolní chlazené centrifuze Sigma (typ 2-16K; 400 g po 10 minut v LS pufriu). Další subcelulární separace tří požadovaných frakcí, polyzomů, RNP a EPP komplexů je popsána v popisu obrázku č. 10.



Obrázek 10: Schéma subcelulární frakcionace na ultracentrifuze Backman L-70. Všechna stádia mikogametofytu byla centrifugována v LS pufriu (viz přílohy), pročištěný homogenát byl navrstven na 30% cukerný polštářek připravený ve frakcionačním pufriu (viz příloha) a centrifugován po dobu 3 hodin a 20 minut při 57 000 rpm při 4°C. Obě složky (supernatant i sediment) byly dále použity. Ze supernatantu jsme získali prodlouženou centrifugací (18 hodin) při otáčkách 55 500 rpm volné RNP. Zatímco ze sedimentu jsme po aplikaci HSEP destabilizačního pufriu jsme vydělili EPP komplexy od polyzomů pomocí další centrifugací přes cukerný polštářek za stejných podmínek. EPP komplexy, inertní vůči destabilizačnímu pufriu, sedimentovaly a polyzomy uvolněné do supernatantu byly následně centrifugovány prodlouženou centrifugací.

3. Extrakce proteinů

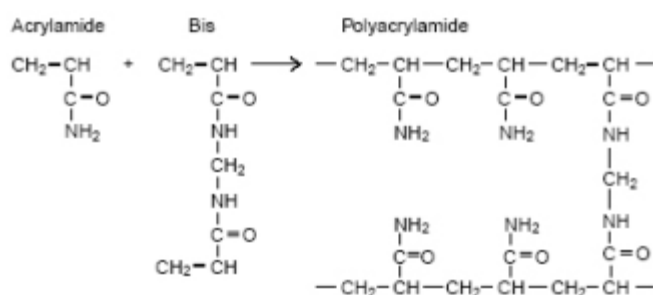
Pokud chceme získat proteiny obsažené v komplexech, které by se mohly podílet na blokaci translace mRNA, musíme je buď extrahovat nebo získat lyzí komplexů. Lyzační technika nám umožní získat kvantitativně i kvalitativně optimální vzorky. (Pro složení lyzačního pufriu viz příloha.)

4. Kvantitativní stanovení proteinů

Je to metoda, která slouží ke změření koncentrace proteinů v roztoku. Postupovali jsme podle komerčního kitu 2-D Quant kit, firma GE Healthcare. Prvním krokem je připravit si řadu roztoků se známou koncentrací proteinu albuminu. Změřením absorbance na spektrofotometru se vytyčí kalibrační křivka, od které lze odečítat hodnotu koncentrace našeho vzorku.

5. 1-D SDS-PAGE proteinů

Název lze přeložit takto: 1-D znamená jednodimenzionální, tedy jednorozměrný, SDS (dodecylsírán sodný) je detergent, který rozruší konformaci proteinů, denaturuje je a překryje jejich elektrický náboj, takže dělení proteinů v elektrickém poli probíhá pouze na základě jejich hmotnosti. PAGE znamená polyakrylamidová gelová elektroforéza. Gel, ve kterém dochází k rozdělení proteinů, je tedy tvořen polyakrylamidem a bis-polyakrylamidem.



Obrázek 11: Struktura polyakrylamidu. Zdroj: http://216.74.34.73/m/37/Article/Bulletin_1156_1.jpg.

Princip elektroforézy spočívá v tom, že každá elektricky nabitá molekula má tendenci se pohybovat v elektrickém poli. V případě záporně nabitých proteinů platí, že se pohybují k anodě. Překážkou je jim právě zmíněný polyakrylamidový gel. Gel je porézní a proteiny v něm putují. Proteiny o nižší molekulové hmotnosti procházejí gelem snadněji, tedy rychleji.

Na rozdíl od DNA horizontální gelové elektroforézy je tu ještě zvláštnost ta, že jeden gel je tvořen dvěma dílčími gely, gelem zaostřovacím a rozdělovacím (pro složení gelů viz přílohy). Zaostřovacím gelem je tvořen pouze prostor v okolí jamek pro nanášení vzorků a zhruba ještě centimetrová část od dna jamky k dělicímu gelu. V tomto prostoru se proteiny zbavují nečistot, což zpřesňuje výsledek. V dělicím gelu dochází k přehlednému rozdělení. K lepšímu zaostření bandů (proužků na gelu) ještě napomáhá proměnlivé elektrické pole.

Po skončení elektroforézy máme více možností, co s gelem udělat. Proteiny jsme buď vizualizovali barvou Coomassie Brilliant Blue G250, nebo jsme je přenášeli pomocí blotování na nitrocelulóзовou membránu.

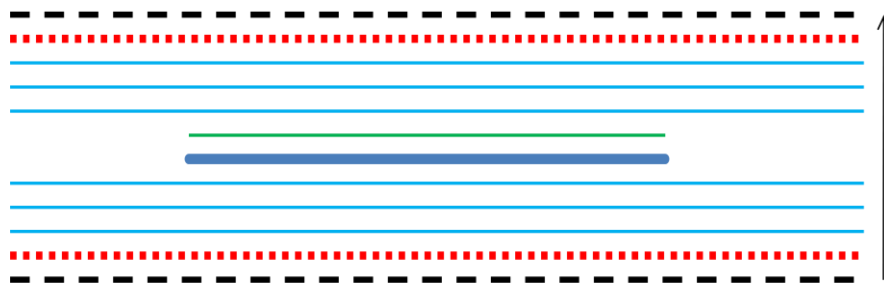
6. Barvení proteinů na gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G250

Gely se barví roztokem Coomassie Brilliant Blue v alkoholu, poté se gely odbarvují a nakonec se promývají v destilované vodě. Výsledkem jsou modré bandy.

Největší výhodou barvení za pomoci Coomassie Brilliant Blue je to, že gely je možné později použít na sekvenaci proteinů.

7. Blotování

Blotování je přenos proteinů z gelu na nitrocelulóзовou membránu. Blot se provádí v zařízení zvaném sandwich. Ten je tvořen plastovou kostrou, která mezi sebou svírá dvě houbovitě desky, mezi nimiž je 6 vrstev filtračního papíru a uprostřed je gel a nitrocelulóзовá membrána.



Obrázek 12: Schéma blotovacího sandwiche. Plastová kostra (černě), houbovitě desky (červeně), filtrační papíry (bledě modře), elektroforetický gel (tmavě modře) a nitrocelulóзовá membrána (zeleně); šipka znázorňuje směr pohybu proteinů.

Přenos probíhá 16 hodin v nádrži s blotovacím pufrem (složení viz přílohy).

Membrána je nadále využívána při North-western hybridizaci a pro detekci glykoproteinů.

8. North-western hybridizace

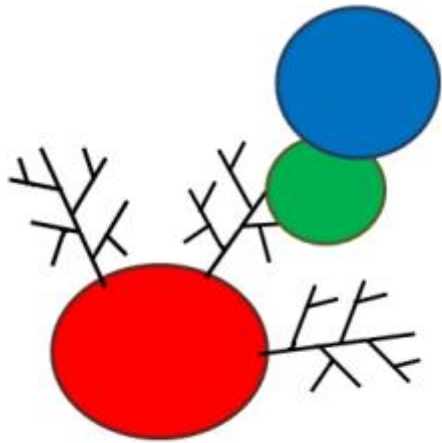
Hybridizaci membrány s přenesenými proteiny s izotopicky značenými úseky mRNA NTP303, které si na membráně „vyberou“ příslušný vazebný protein.

Detekce glykoproteinů

Proteiny, které jsme analyzovali, pocházely z devíti vzorků. Jsou to RNP, EPP komplexy a polyzomy. Každá frakce byla izolována z nezralých pylových zrn 5. stádia, ze zralých zrn a z pylových láček po čtyřhodinové kultivaci.

Prvním roztokem před detekcí je pufr TTBS (viz přílohy). Je to aktivační roztok, který připravuje membránu k detekci. Následuje promývání v TTBS obohaceném o Concanavalin A. Concanavalin A je lektin získaný z bobovité rostliny *Canavalia ensiformis*. Lektiny obecně jsou proteiny, které mají schopnost vázat se na cukerné zbytky. Očekáváme tedy, že se naváží na glykoproteiny právě přes cukerné zbytky.

Membrána se promývá a následně nasycuje peroxidázou rozpuštěnou v TTBS pufru. Ta se naváže na lektin. Přebytečná peroxidáza se z membrány vymyje čistým TTBS. Po důkladném promytí se následně přidá chloronaftol (4-chloro-1-naftol) rozpuštěný v TTBS pufru. Chloronaftol vizualizuje komplex (viz obrázek). Následuje poslední krok – přidání peroxidu vodíku. Peroxid je štěpen pomocí peroxidázy, což vede k barevné reakci – komplex zmodrá. Touto reakcí vizualizujeme glykoproteiny na membráně.



Obrázek 13: Schéma glykoproteinů (červeně), na kterém je přes cukerné zbytky (černě) navázaný lektin (zeleně), na kterém je navázaná peroxidáza s chlofonaftolem (modře).

Praktická část

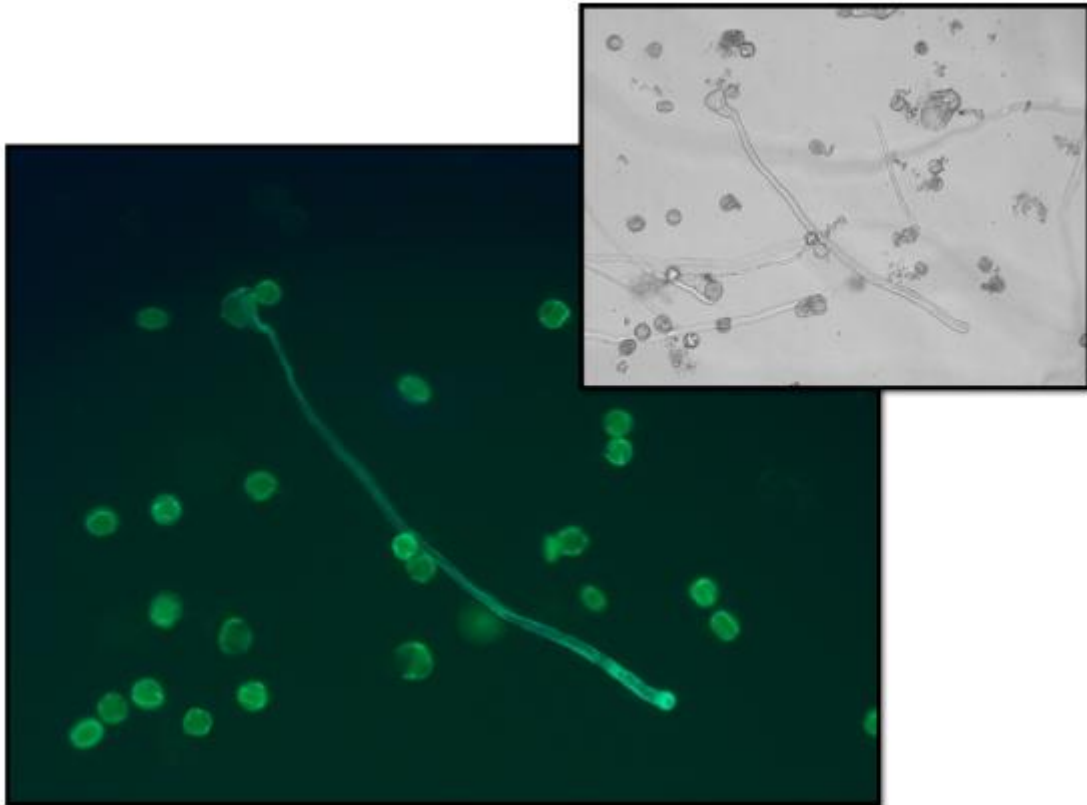
Použité metody jsou stručně charakterizovány v kapitole Metodika, přesné protokoly práce, podle kterých je možné pokusy opakovat, jsou naopak pro svou rozsáhlost vloženy do příloh. Proto je v této kapitole uveden pouze krátký souhrn úkonů, které vedly k výsledkům, s drobnými komentáři a samotné výsledky.

Lokalizace proteinu p69

V první části práce jsme lokalizovali protein p69. Základním krokem bylo vytvořit expresní vektor pomocí klonování. Z počátku jsme používali metodu klonování (MultiSite Gateway™, firma Invitrogen). Pro její složitost jsme se později rozhodli pro o něco jednodušší metodu přímého klonování (pENTR™ Directional TOPO® Cloning, firma Invitrogen).

Nicméně přesný postup je následující: nejdříve je nutné obstarat si vzorek DNA tabáku. DNA tabáku jsme extrahovali z listů pomocí metody CTAB. Touto metodou jsme extrahovali veškerou DNA. Výsledek jsme změřili na Nanodropu. Abychom se zbavili nepotřebné DNA a izolovali jen gen NTP303, provedli jsme PCR. PCR produkt (gen NTP303) jsme izolovali pomocí elektroforézy, díky které jsme i zjistili správnost extrahované DNA. DNA NTP303 jsme z gelu vyřízli a izolovali pomocí kitu QIAquick (firma QIAgen). Následovalo měření pomocí Nanodropu.

Dalším krokem je klonování. Rekombinací jsme vytvořili entry klon. Ten byl pomocí heat shocku invertován (vložen) do kompetentních buněk. Buňky se kultivovaly a selektovaly přes noc a druhý den jsme pokračovali ověřováním kolonií pomocí colony PCR. Kolonie, které obsahovaly správný plazmid (entry klon), jsme kultivovali v LB brothu s antibiotikem. Z buněk jsme druhý den extrahovali entry klon pomocí Miniprepu. Ten jsme následně ověřovali pomocí PCR, restrikční analýzy a sekvenace. Vzorky, které se prokázaly jako správné, jsme použili pro tvorbu expresních klonů pomocí LR rekombinace. LR rekombinace probíhala s destinačním vektorem přes noc 16 hodin. Poté následovala opět transformace kompetentních buněk pomocí heat shocku. Tentokrát jsme však insertovali expresní klon. Transformované buňky jsme přes noc selektovali na plotnách s antibiotikem. Druhý den jsme provedli colony PCR pro zjištění, zda se expresní klon správně vložil do buněk. Kolonie se správným insertem jsme opět kultivovali v LB brothu s antibiotikem. Následující den jsme izolovali expresní klon z buněk pomocí Miniprepu a provedli jsme ověřování pomocí PCR, restrikční analýzy a sekvenace. Pozitivní kolonie jsme opět kultivovali v LB brothu, tentokrát však ve větším množství, abychom mohli provést Midiprep. Expresní klon získaný Midiprepeem jsme použili k přípravě projektilů k transformaci pylu. Po transformování pylu byl kultivován a následující den byly pod fluorescenčním mikroskopem pozorovány pylové láčky se signálem.



Obrázek 14: Snímek pozitivní pylové láčky pod fluorescenčním mikroskopem (vlevo) a pod světelným mikroskopem (vpravo).

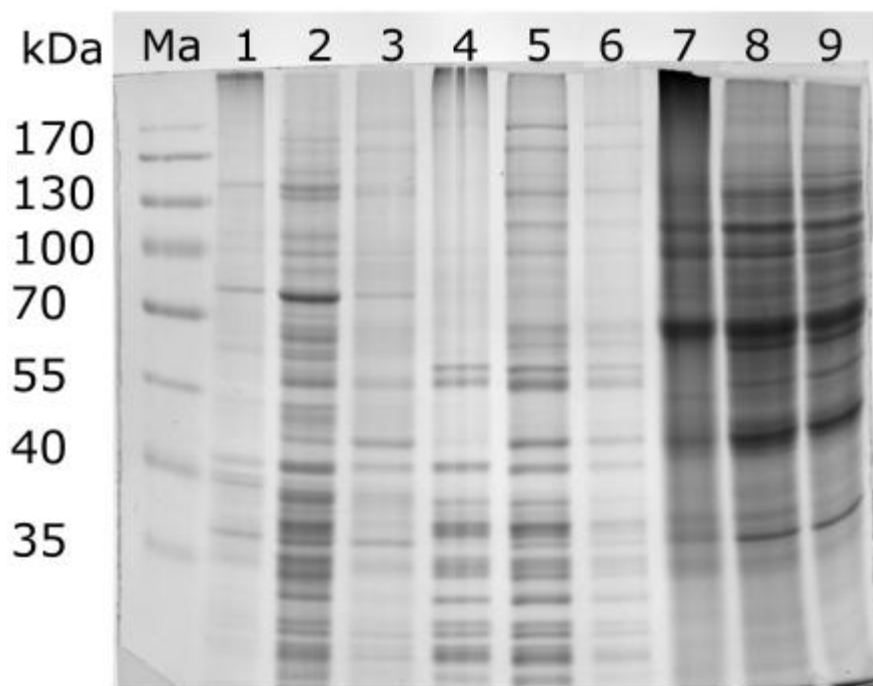
Pro porovnání můžete vidět snímek ze světelného a z fluorescenčního mikroskopu. Je zřetelné, že jedna z láček obsahuje signál (ten je vyvolaný fluorescencí proteinového komplexu p69::GFP). Tímto jsme potvrdili hypotézu o tom, že protein p69 se nachází ve stěně pylové láčky. K podrobnějším analýzám bude využit elektronový mikroskop.

Detekce regulačních proteinů mRNA NTP303

Druhá část práce se zabývala detekcí regulačních proteinů mRNA NTP303 pomocí North-western blotu, hybridizace protein-RNA. K blotu jsou tedy potřeba dvě věci – templát ve formě membrány s proteiny a sonda jako úsek RNA. Mým úkolem bylo vytvořit templát v podobě elektroforeticky rozdělených proteinů na nitrocelulózové membráně. Sondy (též probe) vytvořit nemohu, protože se k tomu využívá radioaktivně označený fosfor ^{32}P , se kterým nemám oprávnění pracovat. Tuto část tedy obstará vědecký pracovník s povolením.

Zestručnělý postup je následující: během vegetační sezóny tabáku jsme sesbírali pyl. Ten se uchovává v -20°C (za těchto podmínek jeho biochemická a funkční aktivita vydrží jeden rok) a později se zpracovává. My jej používali k získání polyzomů, RNP a EPP komplexů. Toho jsme dosáhli nejprve homogenizací pylu a subcelulární frakcionací. Všechny získané frakce byly následně také lyzovány ve dvojnásobně koncentrovaném vzorkovém pufru pro 1-D SDS PAGE. Stanovili jsme jejich koncentraci pomocí (2-D Quant kit, firma GE Healthcare) spektrofotometrem (typ BioMate3, od firmy Thermo). Z kalibrační křivky albuminu jsme odečítali hodnoty našich vzorků. Proteiny jsme následně elektroforeticky rozdělili. V přístroji na elektroforézu se proteiny dělí současně na dvou identických gelech. Jeden gel jsme obarvili

pomocí Coomassie Brilliant Blue G250, zatímco druhý jsme blotovali a dosáhli tak nitrocelulóзовé membrány s rozděleným proteinovým spektrem EPP komplexů.



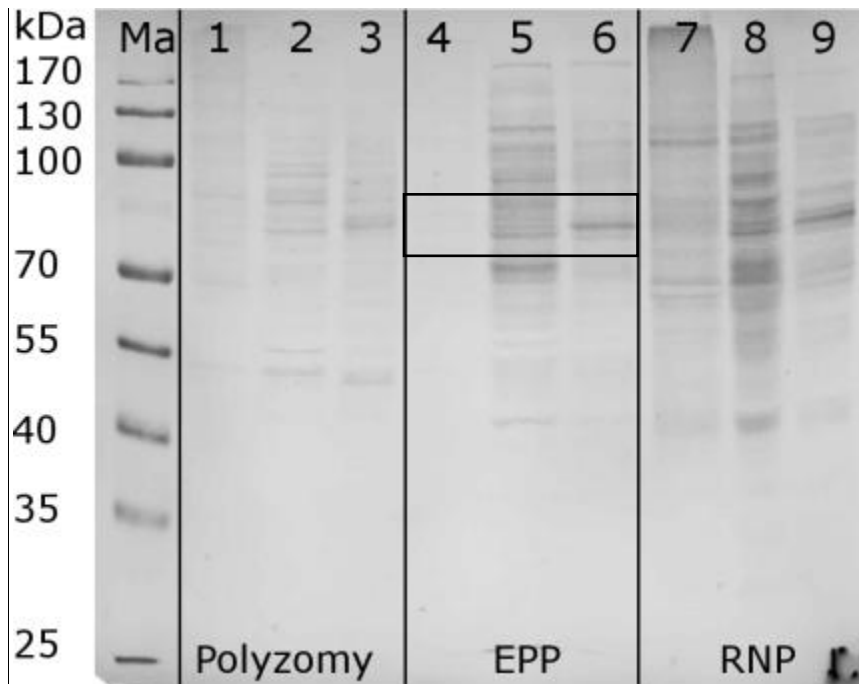
Obrázek 15: Coomassie Brilliant Blue obarvený gel z 1-D SDS PAGE (spektrum elektroforeticky rozdělených proteinů) tří subcelulárních frakcí (polyzomů, EPP komplexů a RNP komplexů) izolovaných ze zrajících pylových zrn (5. stádium), ze zralých pylových zrn a z pylových láček po čtyřech hodinách kultivace (Ma – hmotnostní marker, 1 – polyzomy 5. stádia, 2 – polyzomy ze zralých pylových zrn, 3 – polyzomy z pyl. Láček po čtyřech hodinách kultivace, 4 – EPP komplexy z 5).

Taková membrána už je vhodná pro North-western hybridizaci – hybridizace protein-RNA. Po hybridizaci jsou na membráně vidět jenom místa, kam nasedly radioaktivně označené sondy. Proto se porovnává s gelem, který je obarvený Coomassie Blue a zjišťuje se tak, na jaké proteiny nasedá sonda vytvořená z úseků mRNA NTP303. Zjistíme tak proteiny, které nasedají na mRNA NTP303 *in vivo*. Pro identifikaci konkrétních vazebných regulačních proteinů je možné vyříznout kousek gelu s označeným bandem, izolovat protein a zjistit jeho sekvenci aminokyselin. To už je však otázka dalších postupů.

Detekce glykoproteinů

V poslední části jsme provedli pilotní pokus zkoumající přítomnost glykoproteinů. v RNP, EPP a polyzomech v 5. stádiu vývoje pylu, ve zralém pylu a v pylové láčce po čtyřech hodinách kultivace.

Glykoproteiny jsme detekovali na nitrocelulóзовé membráně připravené stejným způsobem jako pro hybridizaci se sondami v předchozím úkolu.



Obrázek 16: Western blot SDS PAGE membrána po detekci N-glykoproteinů pomocí lektinu concanavalinu A. Ma – hmotnostní marker, 1 – polyzomy 5. stádia, 2 – polyzomy ze zralých pylových zrn, 3 – polyzomy z pyl. Láček po čtyřech hodinách kultivace, 4 – EPP komplexy z 5.

Na obrázku můžeme vidět, že např. u vzorků 2 a 5 je vyšší míra glykosylace. Vzhledem k tomu, že glykosylace mívá mít funkci regulační, můžeme očekávat, že proteiny ve stádiu pylového zrna budou potlačovány právě jejich glykosylací.



Obrázek 17: Výřez z předchozího obrázku.

Například na tomto obrázku můžeme vidět, že se míra glykosylace v různých vývojových stádiích nemění pouze kvantitativně ale i kvalitativně.

Závěr a diskuze

V první části práce se nám podařilo lokalizovat protein p69. Lokalizovali jsme ho v buněčné stěně pylové láčky. Dosud byla jeho přítomnost v pylové láčce známá jenom z pokusů, které pracovaly s extrahovanou buněčnou stěnou. Nyní se nám ale povedlo prokázat její umístění *in situ* – na místě. Vyloučili jsme tak i možnost, že by se protein p69 vyskytoval i jinde než právě v buněčné stěně.

V druhé části práce jsme připravili nitrocelulóзовé membrány s elektroforeticky rozděleným proteinovým spektrem polyzomů, RNP a EPP komplexů z 5. stádia vývoje pylu, ze zralých pylových zrn a z pylových láček po 4 hodinách kultivace. Tyto membrány poslouží k North-western hybridizaci, se kterou budeme schopni určit, jaké proteiny se vážou na mRNA NTP303 a pravděpodobně ovlivňují její aktivaci či deaktivaci a tím ovlivňují syntézu proteinu p69.

Ve třetí části jsme analyzovali spektra N-glykoproteinů objevujících se během vývoje mikrogametofytu v jednotlivých komplexech (EPP a RNP komplexech a v polyzomech). Pomocí lektinu concanavalinu A jsme zjistili, že skutečně dochází k těmto změnám a nejenom ke změnám kvantitativním, ale i kvalitativním. N-glykosylace ovlivňuje funkční strukturu proteinům. Tyto proteiny by mohly mít nejrůznější funkce včetně regulační. Tyto předběžné výsledky budou dále rozšířeny a jednotlivé budou N-glykoproteiny identifikovány.

Těmito úlohami jsem se zapojil do výzkumu Laboratoře biologie pylu na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. pod grantem Funkční charakterizace unikátních zásobních ribonukleoproteinových částic v pylu (p501/11/1462) uděleného pro zkoumání regulace v samčím gametofytu (pylu a pylové láčce).

Použitá literatura

1. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, 630 s. ISBN 80-902-9060-4.
2. CAMPBELL, Neil A. a REECE, J. B. *Biologie*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006, xxxiv, 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
3. ČAPKOVÁ, Věra, A. FIDLEROVÁ, T. a AMSTEL, A. F. CROES, C. MATA, J. SCHRAUWEN, G. J. WULLEMS a J. TUPÝ, Role of N-glycosylation of 66 and 69kDa glykoproteins in wall formation during pollen tube growth in vitro. *European Journal of Cell Biology*. 1997 č. 72, s. 282-285.
4. ČAPKOVÁ, Věra, E. HRABĚTOVÁ a J. TUPÝ. Proteins Changes in Tobacco Pollen Culture: a Newly Synthesized Protein Related to Pollen Tube Growth. *Plant Physiol*. 1987, č. 130, s. 307-314.
5. ERDELSKÁ, Oľga a Karol ERDELSKÝ. *Základy embriológie semenných rastlín*. Vyd. 1. Bratislava: Polygrafické stredisko UK, 1974, 96 s.
6. HONYS, David, REŇÁK, D., FECIKOVÁ, J., JÉDELSKÝ, P. L., NEBESÁŘOVÁ, J., DOBREV, P., ČAPKOVÁ, V. Cytoskeleton-Associated Large RNP Complexes in Tobacco Male Gametophyte (EPPs) Are Associated with Ribosomes and Are Involved in Protein Synthesis, Processing, and Localization. *Journal of Proteome Research*. 2009 č. 8, s. 2015-2031
7. Invitrogen, 2007: User manual pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Invitrogen, Version H, 2007
8. WETERINGS, K. A. P., SCHRAUWEN, J. A. M., WULLEMS, G. J. a TWELL, D., Functional dissection of the promoter of the pollen-specific gene NTP303 reveals a novel pollen-specific and conserved cis-regulatory element. *Plant Journal*. 1995, č. 8, s. 55-63.
9. WINSNIEWSKY, Jacek, ZOUGMAN A., NAGARAJ N. a MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 2009 č. 6, s. 359-362.
10. WITTINK, F. R. A., KNUIMAN, B., DERKENS, J., ČAPKOVÁ, V., TWELL, D., SCHRAUWEN, J. A. M. a WULLEMS, G. J. The pollen-specific gene ntp303 encodes a 69 kD glykoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall. *Sexual plant Reproduction*. 2000 č. 18, s. 359-370.

Přílohy

Protokoly k experimentům

K samotné práci přikládám ještě protokoly, podle kterých jsem pracoval a podle kterých je možné pokusy zopakovat.

Lokalizace p69

CTAB extrakce z rostlinných pletiv

K izolaci DNA byl použit list tabáku (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*).

Postup:

1. Prvním krokem je sběr rostlinného pletiva. List tabáku jsme si obstarali ve skleníku Ústavu experimentální botaniky. Vzorky jsme zamrazili v tekutém dusíku a rozdrtili v misce s tloučkem. Drť jsme vložili do zkumavek.
2. Přidali jsme 250 μ l DNA extrakčního pufru.
3. Rychle zvortexovali a vzorky temperovali při pokojové teplotě po dobu 20 minut.
4. V digestoři jsme přidali 250 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (3-methyl-1-butanol) v poměru 24:1 a pečlivě zamíchali.
5. Vzorky jsme 10 minut točili v centrifuze MiniSpin (Eppendorf) při rychlosti 13 000 rpm. Vodní (svrchní) fázi jsme přemístili do nové zkumavky. Přidali jsme 140 μ l izopropanolu.
6. Vzorky jsme ponechali 5 minut při pokojové teplotě.
7. Vzorky jsme zvortexovali a vložili do centrifugy na 7 minut při 13 000 rpm. Po ukončení stáčení jsme odstranili supernatant.
8. Pelet (sediment) jsme pročistili 1 ml 99,8% etanolem a vzorky opět točili 7 minut při 13 000 rpm.
9. Odsáli jsme etanol a zopakovali bod 11, abychom vzorky co nejvíce pročistili.
10. Opět jsme odsáli etanol a vzorky jsme sušili 10 minut ve vakuu.
11. Vzorky jsme rozpustili v ddH₂O a inkubovali při teplotě 55°C po dobu 5-10 minut.
12. Vzorky jsme zvortexovali a umístili do -20°C.

Kvantifikace

Koncentrace DNA *Nicotiana tabacum* byla 12,1 ng/ μ l (změřeno pomocí spektrometru NanoDrop 1000 od firmy Thermo SCIENTIFIC).

Phusion PCR

Z celkové genomové DNA byl pomocí Phusion PCR amplifikován gen NTP303. Použili jsme upravený F primer. Ten na 5' konci obsahuje ještě sekvenci CACC, která zprostředkovává rekombinaci genu s plazmidem.

Primery:

NTP303_D-TOPO_F: CACCCTCGCAACGTGTGTATCCTAAAAC

NTP303_D-TOPO_R: TTACCCCTCCCCTTTGATTC

Očekávaná délka produktu je 2453 bp.

PCR Phusion

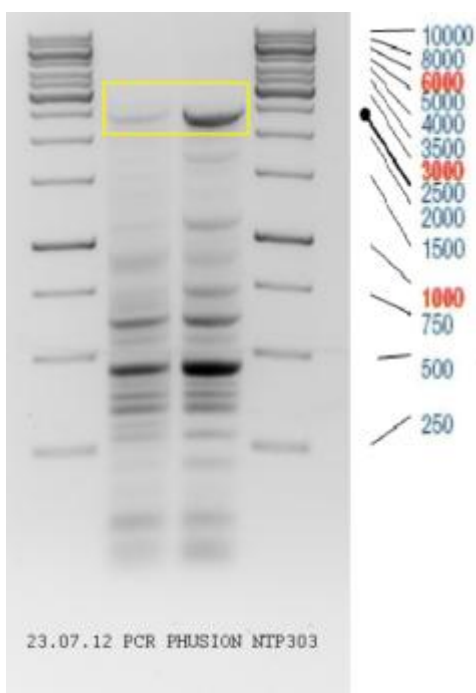
Reakční směs:

HF pufr	5 μ l
dNTP	0,5 μ l
MgCl ₂	1 μ l
Primer F	1 μ l
Primer R	1 μ l
DNA	1 μ l
Phusion polymeráza	0,3 μ l
<u>H₂O</u>	<u>15,2 μl</u>
Celkový objem	25 μ l

Cyklus:

1. Denaturace: 98°C 2 min
2. Denaturace: 98°C 10 s
3. Annealing: 55°C 20 s
4. Elongace: 72°C 1 min 30 s
5. Elongace: 72°C 10 s
6. Stabilní fáze: 4°C ∞

Kroky 2-4 se opakují 40x



DNA elektroforéza

Gel na elektroforézu – 120 ml TAE a v tom 1,8 g agarózy → 1,5% gel

Voltáž byla proměnná: 10 minut na 100 V a po deseti minutách jsme voltáž zvýšili na 120 V.

Očekávaná délka produktu je 2453 pb. Obrázek ukazuje, že zvolený band tomu odpovídá.

Extrakce DNA z agarózového gelu pomocí protokolu QIAquick (od firmy QIAGEN)

Hmotnost prvního vzorku z gelu byla 126 mg (k tomu bylo přidáno 378 μ l QG pufru – rozpouští agarózu) a druhého 82 mg (k tomu bylo přidáno 246 μ l QC pufru).

Postup:

1. Nejdříve jsme pomocí skalpelu vyřízli fragment DNA z agarózového gelu a co nejvíce jej očistili.
2. Poté jsme vyříznutý gel zvážili. K vzorku jsme přidali trojnásobný objem QG pufru než je hmotnost (objem) gelu (100 mg ~ 100 μ l).
3. Vzorky jsme inkubovali 10 minut při teplotě 50°C (nebo dokud se gel zcela nerozpustí). K urychlení rozpouštění je možné se vzorky zatřepat.
4. Zkontrolovali jsme, zdali se gel zcela rozpustil a zdali se roztok zabarvil žlutě. (Oranžová nebo fialová barva značí zásaditost roztoku, která by znemožňovala následující postup. V takových případech se do vzorku titruje 3 M octan sodný s pH 5,0, dokud gel zcela nezežloutne.)
5. Do vzorku se přidá jeden objem izopropanolu. (Vážil-li vyříznutý kousek gelu například 100 mg, přidává se 100 μ l izopropanolu).
6. Mezitím jsme připravili QIAquick spin kolonky jejich umístěním do 2 ml sběrných zkumavek.
7. Celý roztok jsme přemístili do kolonek, které jsme poté jednu minutu centrifugovali, při 13000 rpm. (Maximální objem kolonky je 800 μ l, při převýšení tohoto objemu po centrifugaci je možné přidat zbytek vzorku a opakovat centrifugaci.)
8. Po centrifugaci jsme odstranili kapalinu ze sběrné zkumavky (ta prosákla skrz membránu v QIAquick kolonky, kde se uchytila DNA).
9. K pročištění se dále doporučuje přidat 0,5 ml QG pufru. Minutu jsme centrifugovali při 13000 rpm a poté vylili odpadní roztok ze sběrné zkumavky. (Tímto krokem se DNA přichycená na membráně pročistí od zbytků agarózy.)
10. Pročišťování jsme opakovali, tentokrát však s objemem 0,75 ml PE pufru.
11. Centrifugace 1 min, 13000 rpm.
12. Poté bylo třeba odstranit zcentrifugovaný roztok a na sucho kolonky ještě jednou stočit po dobu jedné minuty při 13 000 rpm.
13. Sběrnou zkumavku jsme poté vyhodili a kolonku jsme přesunuli do klasické 1,5ml zkumavky.
14. K vymytí DNA z kolonky jsme využili 25 μ l elučního EB pufru. EB pufr jsme nechali minutu působit a poté se minutu centrifugovat při 13000 rpm.
15. DNA byla takto izolována z agarózového gelu. Musela se změřit na přístroji NanoDrop. S DNA jsme dále pracovali. Takto připravená DNA byla použita tvorbě entry klonu NTP303::pENTR/D-TOPO.

Kvantifikace vzorku DNA

Pomocí NanoDropu 1000 (firma Thermo SCIENTIFIC) jsme zjistili koncentraci:

Číslo vzorku	Koncentrac (ng/ μ l)
NTP303_1	12,5
NTP303_2	5,5

Příprava entry klonu

Pro obě reakce jsme zvolili poměr hmotností 10 ng NTP303 : 15 ng TOPO vektoru. Na základě koncentrací sestavíme reakční směsi:

Reakční směs	Obecně:	pro vzorek 1:	pro vzorek 2:
PCR produkt (DNA)	0,5-4 μl	0,8 μl	1,8 μl
Sůl	1 μl	1 μl	1 μl
pENTR/D-TOPO	1 μl	1 μl	1 μl
dd H ₂ O	- celkový objem 6 μl	3,2 μl	2,2 μl

Reakce probíhá 30 minut při laboratorní teplotě.

Transformace do kompetentních buněk *E. coli* TOP 10

Poté jsou do směsi přidány kompetentní buňky TOP10 (firma Invitrogen), které jsou uchovávané v -80°C.

Reakční směs (Shodná pro oba vzorky):

Kompetentní buňky TOP10	25 μl
Entry klon NTP303::pENTR/ D-TOPO	3 μl

Kompetentní buňky jsme s entry kolnem ponechali 30 minut na ledu a poté jsme provedli heat shock (42°C, 45s ve vodní lázni).

Poté jsme k buňkám přidali 250 μl živného S.O.C. média. Buňky jsme dali do suché třepačky (1 hod, 37°C, 225 rpm). Dále celou směs jsme přemístili na Petriho misku s LB agarem obsahující 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycinu, a jemně rozetřeli hokejkou po celém agaru. Misku s agarem jsme vložili do termostatu (37°C) a nechali jsme je přes noc kultivovat.

Ověřování kolonií pomocí colony PCR

Druhý den jsme na první plotně zaznamenali 57 a na druhé 60 kolonií.

Vytypovali jsme 10 kolonií z každé plotny, přeočkovali je a provedli s nimi colony PCR. Pomocí colony PCR pouze ověřujeme, zdali se gen NTP303 rekombinoval s plazmidem pENTR/ D-TOPO. Proto použijeme stejné, specifické primery, jako jsme použili v předcházející Phusion PCR.

Colony PCR

Reakční směs:

Pufr	2,5 μl
dNTP	0,5 μl
Primer F	1 μl
Primer R	1 μl
Merci polymeráza	0,15 μl
Bakteriální kolonie	
<u>dd H₂O</u>	<u>19,85 μl</u>
Celkový objem	25 μl

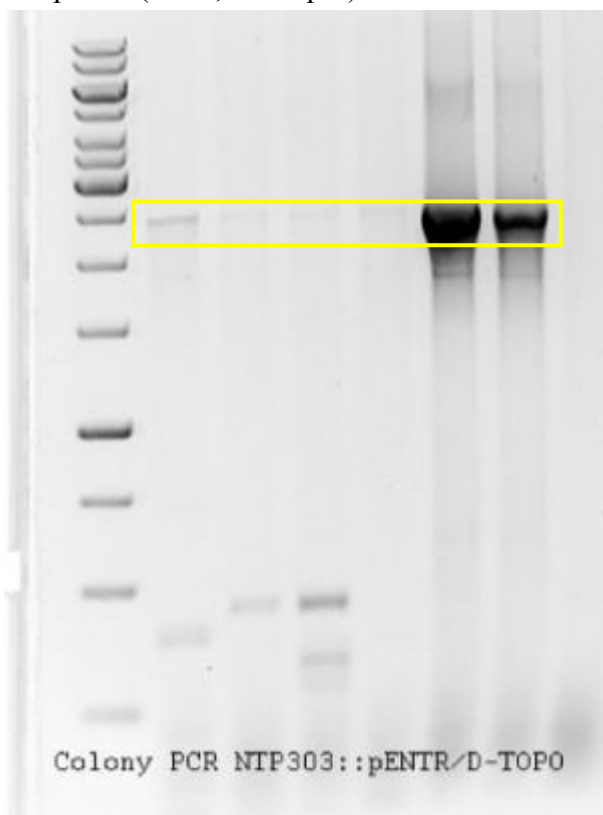
Cyklus:

1. Denaturace: 96°C 10 min
2. Denaturace: 96°C 30 s
3. Annealing: 58°C 30 s
4. Elongace: 72°C 2 min 30s
5. Elongace: 72°C 10 min
6. Stabilní fáze: 4°C ∞

Kroky 2-4 se opakují 40x

Očekávaná délka produktu je stejná jako při Phusion PCR – 2453 bp.

Souběžně s přípravou Colony PCR jsme si připravovali i bakterie ke kultivaci v suché třepačce (37°C, 225 rpm). Následnou kulturu poté použijeme pro izolaci velkého množství



čistého entry klonu. K tomu jsme využili pročišťovací metodu Miniprep.

Miniprep

Kulturu kompetentních buněk (5 ml) jsme po 16 hodinách v suché třepačce vyjmuli a dále jsme pokračovali podle protokolu purifikačního protokolu kitu GeneJet™ Plazmid Miniprep od firmy Thermo scientific.

Celý postup probíhá za laboratorní teploty. Všechny následující centrifugace nesmí probíhat při vyšším g než je 12 000 g. (Tzn. 10 000 – 14 000 rpm, závisí na typu rotoru.)

1. Sérií centrifugací se oddělí buňky od zbytku živného média. Po usazení veškeré buněčné hmoty jsme resuspendovali buňky v 250 μ l resuspendačního pufu. To slouží k rozvolnění pelletu, který vznikl předcházející centrifugací.
2. Poté jsme přidali 250 μ l lyzačního pufu. Ten slouží k lýze buněk. Je nutné roztok jemně zamíchat otočením zkumavek 4-6x.
3. Poté jsme přidali 350 μ l neutralizačního pufu. Vzorky jsme opět jemně promíchali obracením zkumavek, opět 4-6x.
4. Vzorky jsme nechali 5 minut na ledě, poté jsme je centrifugovali po dobu osmi minut. To slouží k usazení pozůstatků buněk a chromozomů.
5. Dále jsme přemísliili supernatant do speciálních kolonek GeneJet™ (ty jsou zasazené do sběrných zkumavek) pipetováním.
6. Vzorek jsme centrifugovali po dobu jedné minuty. Po centrifugaci jsme odstranili procentrifugovaný roztok ze sběrných zkumavek.

7. Následně jsme přidali 500 μl čistícího pufru. Centrifugovali jsme po dobu 30-60 sekund. Poté jsme přidali roztok ze sběrných zkumavek. Tento krok slouží k odstranění veškerých nečistot a zbytku z buněk od plazmidové DNA.
8. Opakovali jsme krok kroku číslo 7.
9. Pro úplné odstranění zbytků čistícího pufru jsme kolony centrifugovali ještě jednou, tentokrát však bez žádného pufru.
10. Poté jsme kolonky GeneJet™ přemístili do nové tradiční 1,5 ml zkumavky. Přidali jsme 50 μl elučního pufru na střed membránky kolonky. Soustava jsme inkobovali 2 minuty při laboratorní teplotě a poté jsme jej centrifugovali po dobu 2 minut.
11. Po odstranění kolony zbyla tradiční mikrozkuhavka s roztokem plazmidu. Plazmid uchováváme při teplotě -20°C .

Tabulka koncentrací plazmidů získaných pomocí Miniprepu:

Plazmid		Koncentrace (ng/ μl)
NTP303::pENTR TOPO_1	D-	128,87
NTP303::pENTR TOPO_2	D-	221,77

Ověřování entry klonu NTP303::pENTR/D-TOPO

Ověřování pomocí PCR

PCR

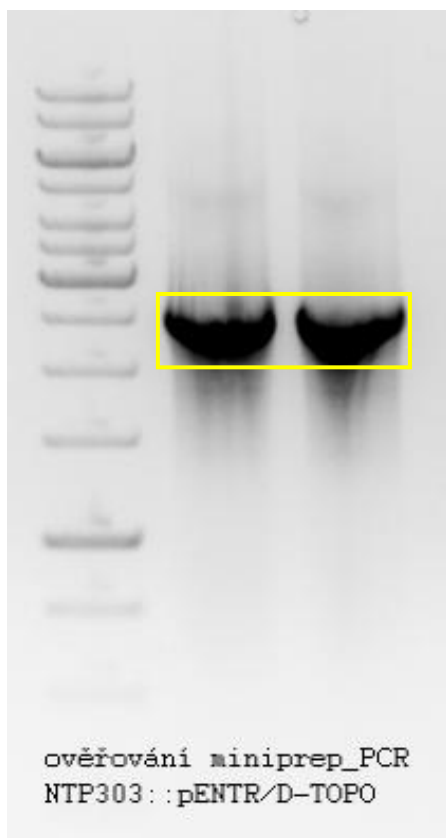
Reakční směs:

Pufr	2,5 μl
dNTP	0,5 μl
Primer F	1 μl
Primer R	1 μl
Merci polymeráza	0,15 μl
DNA	1 μl
<u>dd H₂O</u>	<u>19,85 μl</u>
Celkový objem	25 μl

Cyklus:

1. Denaturace: 96°C 2 min
2. Denaturace: 96°C 30 s
3. Annealing: 58°C 30 s
4. Elongace: 72°C 2 min 30s
5. Elongace: 72°C 10 min
6. Stabilní fáze: 4°C ∞

Kroky 2-4 se opakují 40x



Ověřování pomocí restrikce

Pro ověření vektoru NTP303::pENTR/D-TOPO jsme uskutečnili dvě restrikční reakce. Reakce byly připraveny na základě údajů z programů NTI Vector a Double Digestion (délka fragmentů) a Thermo scientific.

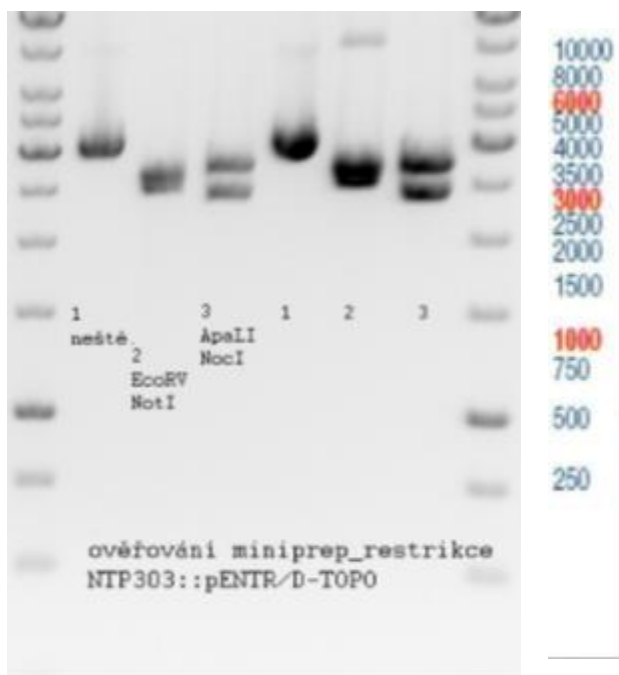
1. Reakce:	
Plazmid	2,5 μ l
Pufr O	1 μ l
Restr. en. EcoRV	2 μ l
Restr. en. Not	1 μ l
dd H ₂ O	3,5 μ l
Celkový objem	10 μ l

Očekávaná délka fragmentů pro první reakci je 2 597 a 2 434 pb.

2. Reakce:	
Plazmid	2,5 μ l
Pufr T	1 μ l
Restr. en. ApaLI	1 μ l
Restr. en. NcoI	1 μ l
dd H ₂ O	4,5 μ l
Celkový objem	10 μ l

Očekávaná délka fragmentů pro první reakci je 2 659 a 2 373 pb.

Připravené reakce se umístí se do termostatu na 2 hodiny při teplotě 37°C.



(neště. = neštěpený, negativní kontrola)

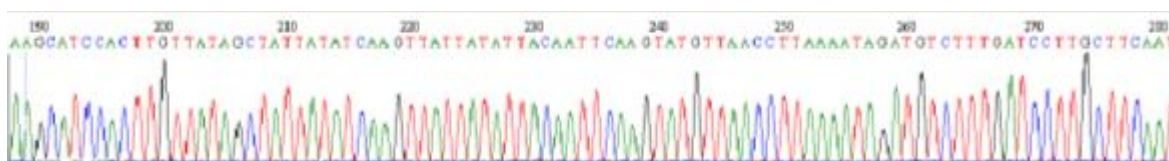
Ověřování pomocí sekvenace

Vzorky byly odeslány na Ústav parazitologie Univerzity Karlovy v Praze k sekvenaci.

Reakční směs:

Plazmid (150-300ng/μl)	1μl
Primery Specificke (F/R; 3,2-5 pmol)	1μl
ddH ₂ O	12μl
Celkový objem 14 μl	

Výsledek sekvenování byl pozitivní.



LR rekombinační reakce

Touto reakcí se vytvoří expresní klon NTP303::pKGWFS7,0

Název vzorku	Koncentrace (ng/μl)
NTP303::pENTR/D-TOPO	351
pKGWFS7,0	178

Reakční směs	pro 1. vzorek:	pro 2. vzorek:
Entry klon NTP303::pENTR/D-TOPO	1 μ l	0,5 μ l
Destinační vektor pKGWFS7,0	1 μ l	1 μ l
TE buffer pH8,0	2 μ l	2,5 μ l
LR klonázní II enzymatický mix	1 μ l	1 μ l
Celkový objem	5 μ l	5 μ l

(Reakční směs se nejdříve namíchá, ovšem bez LR klonázního II enzymatického mixu. Ten je uchováván při teplotě -80°C . Rozmrazování zabere cca 2 minuty. Po použití LR klonázní mix putuje zpět do teploty -80°C .)

Tyto reakční směsi se ponechají přes 16 h v termostatu při teplotě 25°C .

Pro ukončení rekombinační reakce se do reakční směsi přidá proteináza K – 0,5 μ l. Ta štěpí LR klonázy – zastavuje tak reakci.

Transformace kompetentních buněk destinačním vektorem NTP303::pKGWFS7,0

Do prvního vzorku jsme přidali 25 μ l a do druhého 50 μ l kompetentních buněk.

Transformace nejdříve probíhá 30 minut na ledu.

Poté se provádí heat shock – 45 sekund ve vodní lázni s 42°C .

Kultivace transformovaných kompetentních buněk

Do prvního vzorku jsme přidali 250 μ l a do druhého 500 μ l živného S.O.C. média.

Vzorky jsme nechali hodinu kultivovat v suché třepačce při 37°C a 225 rpm.

Poté jsme kultury nanесли na agarové plotny s antibiotikem spektinomycin $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Plotny jsme inkubovali přes noc v termostatu při 37°C .

Ověřování kolonií pomocí Colony PCR

(Stejně jako při tvorbě entry klonů.)

Zarovnej čísla do rady

PCR

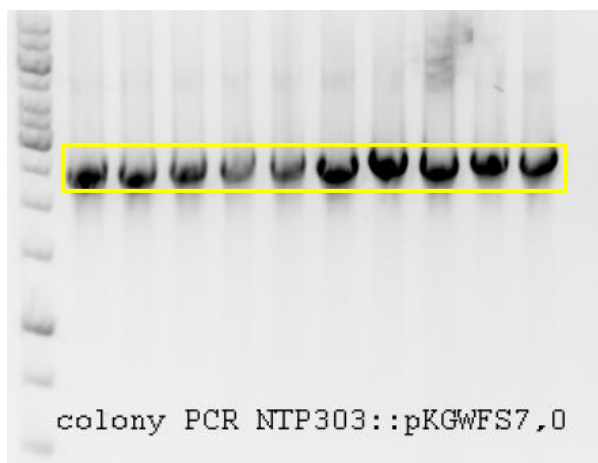
Reakční směs:

Puf	2,5 μ l
dNTP	0,5 μ l
Primer F	1 μ l
Primer R	1 μ l
Merci polymeráza	0,15 μ l
Bakteriální kolonie	-
dd H ₂ O	19,85 μ l
Celkový objem	25 μ l

Cyklus:

3. Denaturace:	96°C	2 min
4. Denaturace:	96°C	30 s
5. Annealing:	58°C	30 s
6. Elongace:	72°C	2 min 30s
7. Elongace:	72°C	10 min
8. Stabilní fáze:	4°C	∞

Kroky 2-4 se opakují 40x



Výsledek elektroforezy byl pozitivní. Nabrali jsme vzorek z namnožené kultury na agarové plotně a nechali jsme buňky kultivovat přes noc v LB brotu v suché třepačce při 37°C a 225 rpm.

Vytvořené zásobní glyceroly 700 μ l + 300 μ l 50% glycerolu jsme následně uložili do mrazáku při -80°C.

Miniprepy

Podle stejného protokolu nahoře.

Koncentrace entry klonů z Miniprepu byla změřena na přístroji NanoDrop.

Vzorek	Koncentrace (ng/ μ l)
NTP303::pKGWFS7,0_1	91,89
NTP303::pKGWFS7,0_2	110,28
NTP303::pKGWFS7,0_3	115,99
NTP303::pKGWFS7,0_4	301,09

Ověřování Miniprepu

Ověřování pomocí PCR

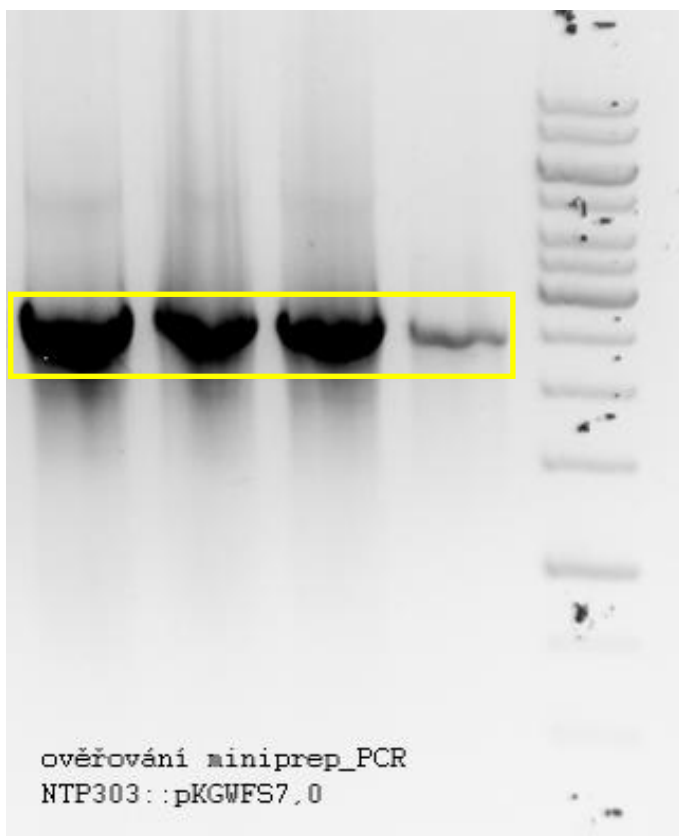
PCR

Reakční směs:

Pufr	2,5 μ l
dNTP	0,5 μ l
Primer F	1 μ l
Primer R	1 μ l
Merci polymeráza	0,15 μ l
DNA	1 μ l
dd H ₂ O	19,85 μ l
Celkový objem	25 μ l

Cyklus:

1. Denaturace: 96°C 10 min
2. Denaturace: 96°C 30 s
3. Annealing: 58°C 30 s
4. Elongace: 72°C 2 min 30s
5. Elongace: 72°C 10 min
6. Stabilní fáze: 4°C ∞



Kroky 2-4 se opakují 40x.

Ověřování pomocí restrikce

Pro ověření vektoru NTP303::pKGWFS7,0 jsme uskutečnili dvě restrikční reakce. Reakce byly připraveny na základě údajů z programů NTI Vector a Double Digestion.

1. Reakce:

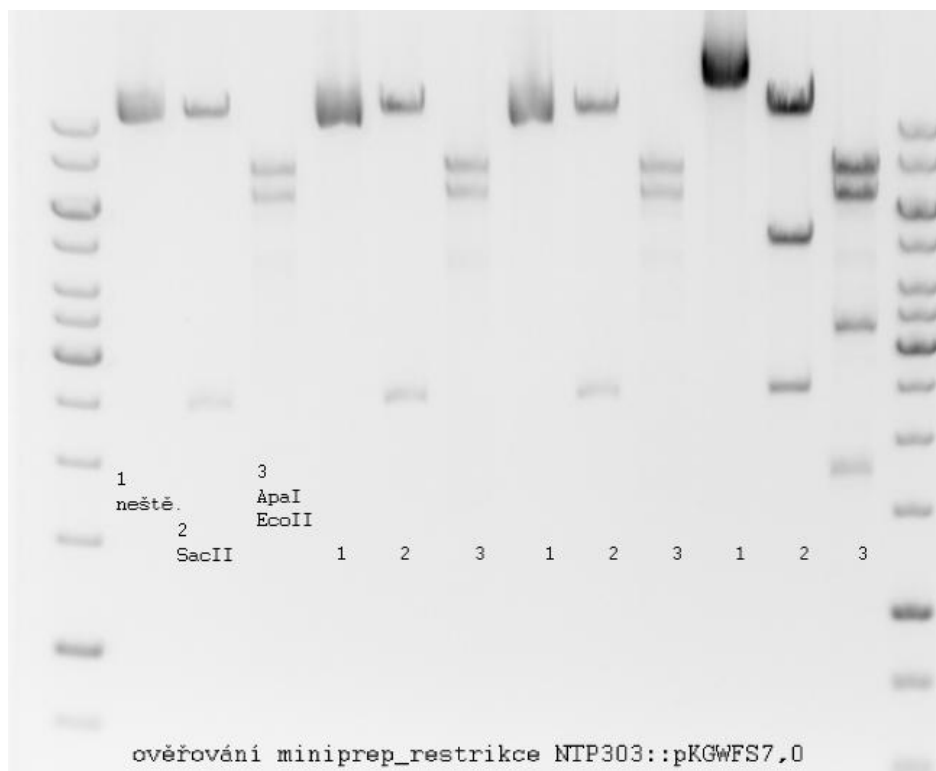
Plazmid	2,5 μ l
Pufr B	1 μ l
Restr. en. SacII (Cfr42I)	1 μ l
<u>dd H₂O</u>	<u>5,5 μl</u>
Celkový objem	10 μ l

Očekávaná délka fragmentů pro první reakci je 10 780, 2 516 a 234 pb.

2. Reakce:

Plazmid	2,5 μ l
Pufr B	1 μ l
Restr. en. ApaI	1 μ l
Restr. en. BsaI (Eco31I)	2 μ l
<u>dd H₂O</u>	<u>3,5 μl</u>
Celkový objem	10 μ l

Očekávaná délka fragmentů pro první reakci je 7 228 a 6 305 pb.



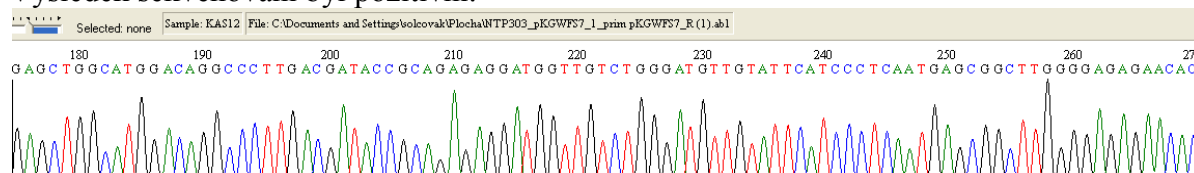
Ověřování pomocí sekvenace

Vzorky byly odeslány na Ústav parazitologie Univerzity Karlovy v Praze k sekvenaci.

Reakční směs:

Plazmid (150-300ng/μl)	1 μl
Primery Specificke (F/R; 3,2-5 pmol)	1 μl
ddH ₂ O	12 μl
Celkový objem	14 μl

Výsledek sekvenování byl pozitivní.



Proto byly kompetentní buňky s vektorem NTP303::pKGWFS7,0 byly ze zásobních glycerolových roztoků uchovávaných v -80°C.

Kompetentní buňky byly nejdříve kultivovány ve zkumavkách 5 ml LB média a 5 μl antibiotika spektomycin 100 μg·ml⁻¹ v suché třepačce po dobu 8 hodin, při teplotě 37°C a při 225 rpm.

Po osmi hodinách se kultura přeočkovala v poměru 1:1 000 do Erlenmayerových baněk s 50 ml téhož média. Kultivace probíhala přes noc (cca 16 hodin) v suché třepačce při 37°C a 225 rpm.

Po ukončení kultivace byla změřena koncentrace buněk v kultuře pomocí spektrometru.

	Absorbance (600 nm)
1	1,387
2	1,382

Midiprep protokol podle kitu od firmy Thermo scientific (GeneJET Plazmid Midiprep Kit)

1. Celé médium jsme stáčeli v 50 ml falkonách po dobu 10 minut při 5 000 g. Poté jsme odstranili supernatant.
2. Buněčný pelet jsme resuspendovali pipetováním nahoru a dolu ve 2 ml resuspendačního pufru.
3. Poté jsme přidali 2 ml lyzačního pufru a šetrně vzorek zamíchali otočením falkony 4-6x. Roztok jsme poté 3 minuty inkubovali při pokojové teplotě.
4. Následně jsme přidali 2 ml neutralizačního pufru a opět jsme opatrným otáčením (5-8x) roztok zamíchali.
5. Poté jsme přidali 500 µl endotoxin binding reagentu. Celý roztok jsme zamíchali šetrným převrácením zkumavky (5-8x). Celá směs se 5 minut inkubovala při pokojové teplotě.
6. Poté jsme roztok centrifugovali 20 minut při 20 000 rpm.
7. Supernatant jsme přemístili do 15ml falkon. K tomu jsme přidali stejný objem (jako bylo supernatantu) 96% etanolu. Směs jsme opět míchali přetáčením zkumavek (5-6x).
8. Poté jsme přemísili maximálně 5,5 ml vzorku do kolonek, které jsou součástí kitu. Následně jsme centrifugovali po dobu tří minut při 2 000 g v centrifuze s výkyvným rotorem.
9. Opakovali jsme krok 8.
10. Poté jsme přidali 4 ml čistícího roztoku I. Následně jsme centrifugovali po dobu 2 minut při 3 000 g ve výkyvném rotoru. Odstranili jsme přebytečný roztok.
11. Následně jsme přidali 4 ml čistícího roztoku II. Opět jsme centrifugovali ve výkyvném rotoru 2 minuty při 3 000 g. Odstranili jsme přebytečný roztok.
12. Opakovali jsme krok číslo 11 s čistícím roztokem II.
13. Pro úplné odstranění přebytečného roztoku jsme centrifugovali 5 minut při 3 000 g opět ve výkyvném rotoru.
14. Ke konci jsme přemístili kolonku s plazmidem do čisté falkony. Přidali jsme 200 µl elučního pufru doprostřed membrány. Eluční pufr jsme nechali 2 minuty působit při pokojové teplotě a poté jsme centrifugovali 5 minut při 3 000 g.
15. Izolovaný plazmid uchováváme při teplotě -20°C.

Koncentrace vyizolovaného plazmidu jsme změřili na přístroji NanoDrop.

Vzorek	Koncentrace ng/µl
NTP303::pKGWFS7,0_1	327,46
NTP303::pKGWFS7,0_2	307,76

BPDS – Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (firma BIORAD)

Přístroj slouží k transienční transformaci rostlinných pletiv.

Na každých 5 mg pylu se přidá 100 µl SMM-MES média a dlouze se vortexuje pro úplnou disperzi pylu v médiu.

Mezitím jsme si připravili náboj:

Směs pro jeden vzorek:

Zlaté částice (v glycerolu, průměr 1,6 µm)	6,25 µl
Plazmid (cca 1 µg/µl)	3 µl
2,5 M CaCl ₂	6,25 µl
<u>0,1 M spermidin</u>	<u>2,5 µl</u>
Celkový objem	18 µl

Směs jsme 3 minuty vortexovali, aby došlo k navázání plazmidu na zlaté partikule.

Směs se poté promyje 200 µl 70% etanolu. Etanol jsme odstranili a směs promyli 200 µl 100 % etanolu. Poté jsme přidali 10 µl 100% etanolu na jeden vzorek.

Náboj jsme vytvořili tak, že na membránu usazenou v kovovém kroužku jsme napipetovali 10 µl suspenze zlata s plazmidem a etanolu.

Po nastřílení pylu jsme každý jeho vzorek nechali kultivovat v Petriho miskách s 2 ml SMM-MES média na Mini rocking platform (firma Biometra). Kultivovali jsme 6 vzorků; dva vzorky 4 hodiny, další dva 6 hodin a poslední dva O/N (over night, cca 16 hodin).

Kultivační médium pro pylové láčky SMM-MES (sugar mineral medium MES-buffered):

175 mM sacharóza (apyrogenní)

1,6 H₃BO₃

3 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O

0,8 mM MgSO₄·H₂O

1 mM KNO₃

25 mM MES

KOH do pH 5,9

Sterilizace 100 °C 40 minut

Pozorování – fluorescenční mikroskopie

Každý vzorek jsem na Petriho miskách mikroskopoval pod fluorescenčním mikroskopem.

Roztoky pro vytvoření nitrocelulózových membrán pro North-western hybridizaci

Homogenizační pufr pro subcelulární frakcionaci:

Pufr	Ls pufr	HSEP pufr
Tris-Cl, pH 9,0	200 mM	200 mM
KCl	25 mM	500 mM
MgOAc	60 mM	2 mM

DTT	2 mM	2 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM
PTE	1 %	1 %
Cykloheximid	1 mM	-
EDTA, pH 8,0	-	50 mM
Puromycin	-	0,2 mM
Sacharóza	250 mM	250 mM

Elektroforetický pufr 10x (zásobní roztok bez SDS):

Tris (250mM)	30,3 g
Glycin (1,92 M)	144 g
Doplnit vodu do 1000 ml	

Elektroforetický pufr pro 1-D SDS PAGE:

10x zásobní roztok	100 ml
10% SDS	10ml
<u>H₂O</u>	<u>890 ml</u>
Celkový objem	1 l

Lyzační pufr:

100mM Tris-Cl 6,8
4% SDS
0,1M DTT

Vzorkový pufr pro 1-D SDS PAGE:

2x ředěný lyzační pufr s 10% glycerolem.

Složení elektroforetických gelů:

Gel	dělicí	zaostřovací
Voda	18,25 ml	12,3 ml
Akrylamid/bis-akrylamid (Biorad, 40% T, 37,5:1)	12,5 ml	2,5 ml
Tris-Cl pH 8,8 (1M ⊖)	18,75 ml	-
Tris-Cl pH 6,8 (0,5M ⊖)	-	5 ml
SDS 10%	0,5 ml	0,2 ml
Persíran amonný 44%	125 μl	31,2 μl
Temed	24 μl	30 μl

Toto množství je pro 4 gely. Poslední dvě složky jsou crosslinkery, katalyzují polymeraci akrylamidu.

Složení blotovacího pufru:

10x Tris-glycin	100 ml
Metanol	200 ml
<u>d H₂O</u>	<u>700 ml</u>
Celkový objem	1 l
Commassie Brilliant Blue G250	

Barvicí roztok:

5% síran hlinitý 50 g na 400 ml H₂O

0,02% CBB G250	200 mg ve 100 ml etanolu
<u>2% kyselina ortho-fosforečná</u>	<u>23,5 ml</u>
Celkový objem	1 l

Odbarvovací roztok:

10% etanol	100 ml
<u>2% kyselina ortho-fosforečná</u>	<u>23,5 ml</u>
Celkový objem	1 l

Protokol k detekci glykoproteinů

1) TTBS pufr

Příprava:

500mM roztok NaCl

80mM roztok Tris-Cl pH 7,6

0,1% Tween 20

500 ml TTBS

Membrána se po dobu jedné hodiny aktivuje v TTBS pufru.

2) Concanavalin A:

Přidává se do TTBS pufru v koncentraci 2,5 mg concanavalinu A na 100 ml TTBS.

V tomto roztoku se membrána promývá po dobu jedné hodiny.

3) Pro odplavení přebytečného concanavalinu se membrána promývá půl hodiny v čistém TTBS pufru.

4) Půl hodiny se membrána inkubuje v roztoku TTBS s peroxidázou v koncentraci 5 mg peroxidázy na 100 ml TTBS.

5) Membrána se opět promývá v čistém TTBS po dobu třiceti až pětáctyřiceti minut.

6) Přidává se roztok chloronaftolu.

45 mg chloronaftolu se rozpustí v 15 ml metanolu s 60 ml 10mM Tris-Cl pH 6,8

7) Poslední krok je přikapávání peroxidu. Začíná se na 15 μ l a pokračuje se do takového objemu, dokud peroxidáza nezareaguje a nezmodrá.