

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky



Možnosti využití signálního genu pro zeleně fluoreskující protein k identifikaci a selekci transformantů lnu

Bakalářská práce
2007

Václav Kůta

Školitel: RNDr. Slavomír Rakouský, Csc.

Bakalářská diplomová práce v nezkrácené podobě

Kůta Václav (2007): Možnosti využití signálního genu pro zeleně fluoreskující protein k identifikaci a selekci transformantů lnu [Possibilities of the green fluorescent protein signal gene utilization for flax transformants identification and selection. Bc. Thesis, in Czech.], Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

An aim of the thesis was to verify possibilities of *in vitro* identification and selection of transformed flax tissues and plants based on the fluorescence assessment of objects transformed with a construct bearing the *gfp* gene coding for green fluorescent protein (GFP). Effect of plant genotype, explant type and modifications of the transformation protocol on fluorescence was evaluated too, as well as the possibility of use for selection of transgenic individuals.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 20. 12. 2007

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, RNDr. S. Rakouskému, za pomoc při sepisování této práce, a za to že mě naučil mnoho věcí, které s prací souvisí, ať už po teoretické stránce, nebo např. co se týče zásad sterilní práce v laboratoři. Dále bych rád poděkoval svým kolegům z laboratoře za pomoc při některých pokusech. Zvláštní poděkování věnuji M. Hraškovi, za jeho četné zkušenosti a rady, obrovskou pomoc při provádění molekulárních a vizuálních analýz, a především za jeho trpělivost.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2. 1. Len setý	3
2. 2. Tranformace rostlin bakteriemi rodu <i>Agrobacterium</i>	3
2. 2. 1. bakterie rodu <i>Agrobacterium</i>	3
2. 2. 2. Ti- plazmidy	4
2. 2. 3. Vektory pro transformaci	5
2. 2. 4. Přímé a nepřímé metody transgenoze	6
2. 2. 5. Typy transgenů	6
2. 2. 5. 1. Selektovatelné transgeny	7
2. 2. 5. 2. Reportérové (signální) transgeny	7
2. 3. Gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)	9
2. 3. 1. Historie	9
2. 3. 2. Struktura GFP	10
2. 3. 3. Mechanismus fluorescence	11
2. 3. 4. Emisní spektrum a mutageneze <i>GFP</i>	12
2. 3. 5. Metody detekce GFP	14
2. 3. 6. Možnosti využití GFP v transgenních rostlinách	15
3. Materiál a metodika	17
3. 1. Materiál	17
3. 1. 1. Gen <i>m-gfp5-ER</i>	18
3. 2. Postup transformace lnu	18
3. 2. 1. Sterilizace semen	18
3. 2. 2. Výsev semen	19
3. 2. 3. Příprava bakteriální kultury	19
3. 2. 4. Stanovení vhodné hustoty bakterií podle optické density	19
3. 2. 5. Kokultivace v inkubačním roztoku	19
3. 2. 6. Kokultivace na agarovém C médiu	20
3. 2. 7. Debakterizace a indukce organogeneze	20
3. 2. 8. Selekcce transformantů a klonování vyselektovaných regenerantů	21
3. 3. Příprava kultivačních médií	21
3. 4. Vizuální detekce GFP	22
3. 5. Molekulární detekce <i>gfp</i>	22
3. 5. 1. Izolace DNA	22
3. 5. 2. PCR	23
3. 5. 3. Southern-blot hybridizace	25
4. Výsledky	28
4. 1. Transformační pokusy	28
4. 2. Regenerace a klonování explantátů	29
4. 3. Vizuální detekce GFP	30
4. 4. Molekulární detekce	34
4. 5. Transformační pokus 1	36
4. 6. Transformační pokus 2	38
5. Diskuse	43
6. Závěr	47
7. Seznam použité literatury	49
8. Příloha	53

1. Úvod

Jedním z největších problémů dnešní doby je neustále se zvyšující počet obyvatel naší planety, což má za následek stále větší nároky na produkci potravin. Podíl zemědělsky využitelné a orné půdy však neustále klesá a pokud jsou odhady správné a do roku 2025 dosáhne světová populace počtu 8,5 miliard, budeme muset přijít na způsob, jak současnou celosvětovou produkci potravin zvýšit o 50%.

Již od počátků zemědělství se pěstitelé snažili nejrůznějšími způsoby zvýšit úrodu, např. tím, že záměrně vybírali určité rostliny s preferovanými vlastnostmi – prováděli umělou selekci. Pokud se tyto žádoucí znaky nevyskytovaly v hojném počtu a v žádaném směru, našel člověk prostředky, jak je vyvolat. Na organismy působil nezvyklými podmínkami, vystavoval je např. záření nebo různým chemikáliím a způsoboval tedy indukované mutace. Tak začala éra šlechtění. Postupně šlechtitelé vyvinuli řadu metod, jak zasáhnout do přirozeného přenosu genetické informace, jako polyploidizace (zmnožení sad chromozomů, např. působením kolchicinu) nebo fúze protoplastů (splynutí dvou buněk, často i nepříbuzných druhů, zbavených buněčných stěn). Všechny tyto konvenční metody šlechtění však mají jednu velkou nevýhodu – jsou sázkou do loterie a jejich výsledky jsou zcela náhodné. Indukujeme-li třeba mutace zářením, vznikne mnoho změn a musíme vybírat z obrovského množství, abychom našli tu, která je pro nás žádoucí. I tak ale neznáme molekulární podstatu dané změny.

Tento problém eliminují nové metody, založené na znalosti mechanismu přenosu genů na potomstvo a struktury nukleových kyselin, souhrnně označované jako genové manipulace. Genové manipulace jsou fenoménem několika mála posledních dekad a zahrnují všechny nekonvenční techniky, které mají za cíl touto cestou upravit rostlinný genom. Jednou z těchto technik je transgenóza (transformace), což je obecně začlenění části genetické informace jednoho organismu do genomu jiného organismu. Cestou transgenózy sice prozatím nelze přímo zvyšovat produkci rostlin, inkorporací cizorodých genů (transgenů) však lze nepřímo zvýšit výnosy, vylepšit kvalitu produkce nebo např. produkovat rostliny rezistentní vůči hmyzím škůdcům nebo herbicidům. Přenos genů se uskutečňuje prostřednictvím vektorů, většinou bakteriálních. K těmto účelům se nejčastěji používá bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jejíž plasmidy mají přirozenou schopnost začleňovat část své genetické informace do jaderné DNA rostlin. Pomocí restriktivních enzymů lze do těchto plasmidů vkládat libovolné geny, které se pak do rostlinného genomu inkorporují.

I přes značné úspěchy, kterých bylo ve šlechtění rostlin díky transgenozí dosaženo, je tato technika neustále předmětem intenzivního vývoje, neboť její efektivita je zatím poměrně nízká – řádově v jednotkách, maximálně však do desíti procent pozměněných buněk. Proto probíhají rozsáhlé výzkumy za účelem zvýšení efektivity transformací, především vyvíjení co nejučinnějších vektorových konstruktů a selekčních metod. Přestože intenzivní vývoj genových manipulací může pomoci vyřešit stále naléhavější problém hrozícího nedostatku potravin, stále bohužel panuje obecně negativní postoj veřejnosti ke geneticky upraveným rostlinám a geneticky modifikovaným organismům (GMO) vůbec. Ačkoli ještě nebyl pozorován jediný případ, kdy by GMO způsobily poškození zdraví nebo ekologickou škodu, animosita proti nim je stále přživována, dnes i z dobře maskovaných pohnutek ekonomických (Drobník, 1997).

V procesu vlastní transformace je po vnesení cizorodé DNA nutné oddělit (selektovat) transgenní rostliny od netransgenních, k čemuž nejčastěji slouží transgeny kódující rezistence k selekčním látkám. Pak je také důležité monitorovat lokalizaci exprese námi vnášeného genu. K tomuto účelu slouží tzv. signální (reportérové) geny, což jsou obecně geny, jejichž exprese může být vizualizována a kvantitativně hodnocena. Pokud je signální gen fúzován spolu s dalším vnášeným transgenem, můžeme díky tomuto spojení poměrně snadno zjistit přesnou lokalizaci jeho exprese. Mezi často využívané signální geny patří také gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP), jehož exprese může být zviditelněna pomocí fluorescence.

Cílem mé práce bylo pokusit se o transformaci rostlinných explantátů, pocházejících ze lnu setého (*Linum usitatissimum* L.), genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP) a jeho expresi pak ověřit vizuálními a molekulárními metodami. Zjišťoval jsem také, jaký vliv na transformaci má genotyp (odrůda), typ explantátu, případně kultivační podmínky.

Modelovou rostlinou pro transgenozí rostlin je huseníček (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.), velmi významný je také tabák (*Nicotiana tabacum* L.). V popředí zájmu jsou i hospodářsky nejvýznamnější plodiny jako obiloviny, brambory, bavlník, rajčata nebo sója. Len setý je co se týče transformace spíše okrajovou rostlinou, avšak hospodářsky významnou, především díky lněnému vláknu a oleji, a v současné době se navíc stále více uplatňuje i ve farmacii a potravinářství.

2. Literární přehled

2. 1. Len setý

Protože veškerý rostlinný materiál mé práce byl odvozen ze semenáčků lnu setého, považuji za vhodné se alespoň zběžně o této hospodářsky významné rostlině zmínit. Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je jednoletá, až přes půl metru vysoká bylina s přímými, hustě listanými lodyhami. Listy jsou čárkovitě kopinaté až čárkovité, špičaté, trojžilné, celokrajné. Květy má uspořádané v bohatých vrcholičnatých květenstvích, koruny jsou pětičetné, světle modré až bílé, tobolky obvykle kulatě vejčité. Kveté v červnu a červenci. Len patří mezi dvouděložné rostliny, do řádu kakostokvětých (Geraniales) a čeledi lnovitých (Linaceae). Je to prastará kulturní rostlina, původem z Přední Asie. Pěstuje se zejména v podhůří jako textilní surovina k získávání vláken, zpracovávaných v lnářském průmyslu. Jiná forma lnu má tobolky větší a její semena jsou surovinou, z níž se tlačí lněný olej, využívaný v řadě průmyslových odvětví i potravinářství (Kobelková, 2002).

Je známo, že len je poměrně obtížně transformovatelná rostlina (s malou účinností transformace). První úspěšná transformace lnu pomocí bakterie *A. tumefaciens* proběhla v roce 1983 (přehled Rakouský a Tejklová, 1999). Zpočátku byly přenášeny celé úseky T-DNA, poté se přešlo k přenosu hospodářsky významných genů. Zatím existuje pouze jediná transgenní odrůda (CDC Triffid) se zvýšenou tolerancí k reziduíům herbicidů typu sulfonylmočoviny v půdě (McHughen *et al.*, 1997).

2. 2. Transformace rostlin bakteriemi rodu *Agrobacterium*

2. 2. 1. bakterie rodu *Agrobacterium*

Bakterie *Agrobacterium* patří mezi gramnegativní půdní bakterie, které jsou schopny indukce morfogenetických změn v rostlinách. Vnášejí do rostlinných buněk genetickou informaci pro syntézu nových látek – opinů (případně agrocinopinů), které může využít právě jen indukující bakterie. Opiny bakteriím slouží jako zdroj uhlíku, dusíku a energie.

Morfogenetické změny v rostlinách jsou schopny indukovat i jiné bakterie čeledi *Rhizobiaceae*, do níž rod *Agrobacterium* náleží – rody *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas* a *Corynebacterium*. Bakterie rodů *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a

Azorhizobium se stávají trvalými složkami pletiv kořenových hlízek leguminózních rostlin, bakterie rodů *Pseudomonas* a *Corynebacterium* indukují změny pouze po dobu své přítomnosti v rostlině (Ondřej a Drobník, 2002).

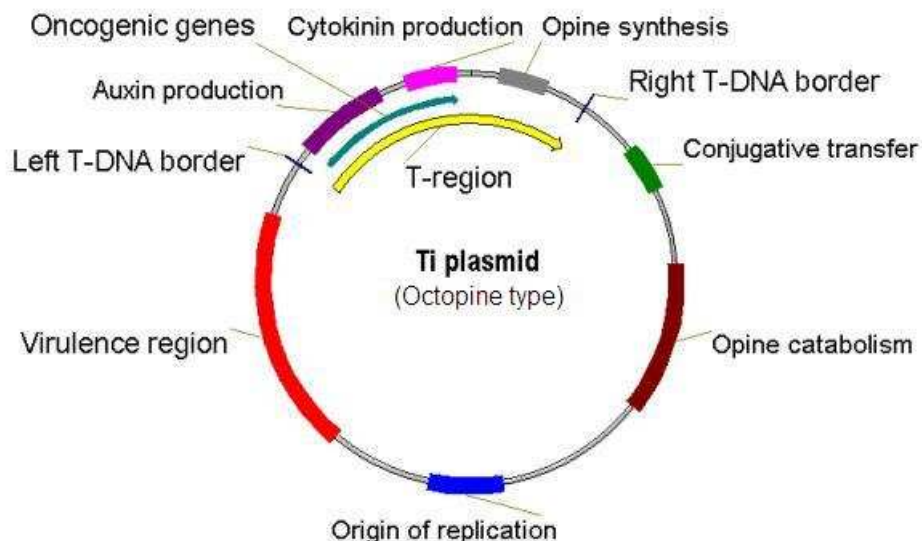
Pouze u bakterií rodu *Agrobacterium* (jsou známy čtyři druhy, z nichž nejvýznamnější je *A. tumefaciens*) byla prokázána schopnost indukce trvalých změn pomocí přenosu svých specifických genů, lokalizovaných v plazmidu Ti (tumor-inducing), případně Ri (root-inducing), do rostlinného genomu. Ti a Ri plazmidy nesou konstantní část, tzv. T-DNA (transferred DNA), integrující se do rostlinného genomu a nesoucí geny pro syntézu již zmiňovaných opinů, a dále také geny pro syntézu auxinů a cytokininů, za účelem co největší produkce opinů. Zvýšená hladina těchto rostlinných hormonů totiž způsobuje vznik nediferencovaných rostlinných nádorů (crown galls). Důležitá pro interakci agrobakteria s rostlinnou buňkou je chemotaxe. Rostlinné pletivo musí být poraněno, čímž se uvolní fenolické látky typu acetosyringonu, které přitahují bakterii k rostlině a zároveň aktivují přenos bakteriální DNA do buněk (Hiei *et al.*, 1997).

Rod *Agrobacterium* má čtyři druhy: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* a *A. vitis*. Rostlinná pletiva transformovaná *A. rhizogenes* rostou jako kořeny, *A. tumefaciens* způsobuje krčkové nádory dvouděložných rostlin (Hooykaas *et al.*, 1992).

2. 2. 2. Ti- plazmidy

Ti-plazmid má délku většinou 150-200 kb a rozeznáváme dva základní typy těchto plazmidů: oktopinový a nopalinový. T-DNA nopalinového typu je kompaktní, zatímco oktopinová T-DNA je rozdělena na levý (TL) a pravý (TR) úsek, přičemž geny pro diferenciaci a nádorový růst jsou lokalizovány v TL.

Ti plazmid má dva úseky nutné k indukci nádorů: T-DNA, která vstupuje do rostlinných buněk, ale nemá žádné geny pro vlastní integraci; a oblast virulence (vir-region), který obsahuje geny pro přenos T-DNA do rostlinných buněk (viz obr. 1).



Obr. 1. Struktura Ti plasmidu oktopinového typu (převzato z http://arabidopsis.info/students/paaras/t_dna.htm)

2. 2. 3. Vektory pro transformaci

Integrace T-DNA do rostlinného genomu se začalo užívat při transgenozí rostlin. V první fázi transformačních pokusů byly inaktivovány jednotlivé geny T-DNA vnášením transpozonů, až z ní zbyly pouze hraniční úseky (25b), což jsou jediné sekvence nezbytné pro přenos T-DNA do rostlinného genomu. Ti-plazmid obsahuje mnoho cílových míst pro restriční endonukleázy, ale neexistují taková restriční místa, která by se nacházela pouze v blízkosti hraničních sekvencí T-DNA. T-DNA plazmidu Ti je však možno modifikovat rekombinací s homologním úsekem malého plazmidového vektoru (intermediárního plazmidu), přičemž do tohoto homologního úseku lze restričním štěpením a ligací vnést námi požadovaný gen nebo skupinu genů, které chceme začlenit do rostlinného genomu. Dalším zdokonalením bylo rozdělení funkcí původního plazmidu Ti na dva plazmidy, z nichž jeden nese pouze úsek virulence a druhý obsahuje T-DNA nesenou jiným typem plazmidu (binární vektory), což umožňuje skutečnost, že úsek virulence a T-DNA nutně nemusejí být společně přítomny na jednom plazmidu (Ondřej *et al.*, 1999).

2. 2. 4. Přímé a nepřímé metody transgenoze

Nejčastěji používaným způsobem transgenoze je přirozený systém bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (případně *A. rhizogenes*). Transgenoze listových pletiv pomocí této bakterie se někdy nazývá disková metoda a spočívá v tom, že se z asepticky kultivovaných rostlin na agaru korkovrtem (či jiným nástrojem) vysekají listové terčíky a ty se pak kultivují v suspenzi bakterií *Agrobacterium*. Bakterie nesou vektorový konstrukt obsahující žádoucí a selekční gen. Po kokultivaci se terčíky přenesou na agarové médium s antibiotikem kanamycinem nebo jiným selekčním agens pro selekci transformovaných buněk (Ondřej a Drobník, 2002). Výborných výsledků při transformaci agrobakteriemi bylo dosaženo např. na tabáku *N. tabacum*.

Ne vždy je však možná nebo dobře použitelná transformace vektorovým systémem bakterie *A. tumefaciens*, jako např. u většiny jednoděložných rostlin. Proto byly vyvinuty metody přímé transformace, tedy bez využití bakterií *Agrobacterium*. Poměrně málo používaná metoda transformace protoplastů spočívá odstranění buněčné stěny a vnesení vzniklých protoplastů do roztoku s cizorodou DNA. Přenos DNA do protoplastů pak můžeme podpořit např. elektroporací, dodáním polyetylglykolu do roztoku DNA nebo mikroinjekcemi do jader. Velkého rozšíření v současné době dosáhly metody transgenoze buněk a pletiv, zahrnující různé modifikace kokultivační techniky nebo metodu zvanou „mikrobombardování“, kde se používají mikroprojektily z inertního kovu (zlaté nebo wolframové kuličky) s plazmidovou DNA na povrchu, které jsou vstřelovány do rostlinných buněk pomocí různých vysokotlakých zařízení (Ondřej a Drobník, 2002).

2. 2. 5. Typy transgenů

Pomocí transformace lze do rostlinného genomu včlenit různé cizí geny (transgeny), jejichž expresí můžeme dosáhnout např. zvýšení odolnosti rostlin vůči různým nepříznivým podmínkám okolního prostředí nebo herbicidům. Běžně užívané herbicidy často účinkují pouze na určitou skupinu plevelů a mnohdy jen v určitém stádiu jejich vývoje. Musí se proto používat kombinace herbicidů a aplikace několikrát opakovat, což je nejen nákladné, ale i zatěžuje životní prostředí. Použití univerzálního (totálního) herbicidu by bylo úspornější, ale zničilo by i plodinu. Odtud pramení snaha získat plodiny odolné vůči takovýmto univerzálním herbicidům. Uplatnění transgenoze v zemědělství je proto obrovské.

Aby mohly být vnášené transgeny exprimovány v rostlinných buňkách, je nezbytné, aby byly opatřeny rostlinnými regulačními sekvencemi – promotorem (zaváděcí sekvencí) a terminátorem (terminační sekvencí). Takovéto transgeny, jejichž úseky pochází z genomů různých druhů, se nazývají chimérické. Pro selekci transgenních buněk z mnohem větší populace buněk netransformovaných jsou nezbytné též transgeny selektovací (selektovatelné) a reportérové (signální).

2. 2. 5. 1. Selektovatelné transgeny

Pro zajištění snadné selekce transgenních buněk je nutné, aby vnášená T-DNA obsahovala nějaký selektovatelný gen. Pro tento účel jsou vhodné geny pro rezistenci k látce, která je přidána do agarového média a pro jedince bez této rezistence má letální účinek či jej jinak značně znevýhodňuje. Selektční systémy lze zjednodušeně rozdělit na pozitivní a negativní (Mikky, a McHugh, 2004).

Při negativní selekci nesou transformované buňky selektovatelný transgen pro rezistenci vůči nějaké toxické látce (např. antibiotiku, herbicidu), zatímco netransformované buňky a tkáň v selekčním prostředí hynou. Často při tom do svého okolí uvolňují toxické látky, které bohužel působí inhibičně na regeneraci transformovaných rostlinných pletiv (Penna *et al.*, 2002). Nejčastěji používaným selektovatelným genem (markerem) je gen pro rezistenci ke kanamycinu (*nptII*), který kóduje enzym neomycinfosfotransferázu II. Mnohem méně používané jsou chimérické transgeny *hpt* pro rezistenci k hygromycinu (antibiotiku, které blokuje proteosyntézu u prokaryot i eukaryot) nebo geny *pat* a *bar* podmiňující rezistenci k herbicidům na bázi fosfinotricinu.

Na rozdíl od negativní selekce, při pozitivní selekci netransformované buňky (rostliny) na selekčním médiu nehynou, pouze trpí nedostatkem nějaké živiny (Joersbo a Okkels, 1996) a tím je inhibován jejich růst. Mezi takto selektovatelné transgeny patří např. gen *xyIA* pro enzym xyloisomerasu, *pmi* pro fosfomanosoisomerasu. K selekci transformantů však lze využít i jiné geny, jako je např. bakteriální gen *gus* pro β -glukuronidázu, (viz níže).

2. 2. 5. 2. Reportérové (signální) transgeny

Signální transgeny jsou chimérické transgeny, jejichž exprese může být vizualizována a také mnohdy kvantitativně měřena, a to většinou jako barevná reakce nebo fluorescence. Po jejich fúzi s námi vnášeným genem tak dobře prozrazují přesnou lokalizaci jeho exprese.

Prvním, pro transformace rostlin použitým reportérovým transgenem, byl gen pro chloramfenikolacetyltransferázu, enzym, který způsobuje acetylaci chloramfenikolu. Metoda

užívající tento transgen je založena na autoradiografické detekci acetylovaného chloramfenikolu značeného izotopem ^{14}C a dodaného k proteinovým extraktům transgenických rostlin s chloramfenikolacetyltransferázou (Ondřej a Drobník, 2002), Tento poměrně náročný a přitom málo účinný systém byl záhy překonán.

Na druhé straně jiný, dříve poměrně málo používaný transgen *luc* pro luciferázu ze světlušky (*Photinus pyralis*) doznal v současnosti širšího uplatnění. Po transformaci a expresi transgenu dochází k emisi kvantitativně měřitelného viditelného záření (Ondřej a Drobník, 2002). Problém ale je, že je nezbytné přidávat substrát luciferin, který špatně proniká do pletiv a je značně drahý.

Velmi rozšířený je transgen pro β -glukuronidázu (GUS), enzym, který štěpí β -glykosidické vazby mezi kyselinou glukuronovou a necukernou složkou (aglykolem) a mění substráty na bázi glukuronidů na modře zbarvené či fluoreskující látky. V genovém inženýrství se využívá bakteriálního genu *gusA* (*uidA*) z *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Aktivitu GUS enzymu lze detekovat fluorescenčně v homogenátu se substrátem 4-methylumbelliferylglukuronidem (MUG), který fluoreskuje pouze pokud je rozštěpen na β -glukuronid a 4-methylumbelliferon; nebo histologicky pomocí barviva X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronová kyselina), které po rozštěpení dává modrou krystalickou sloučeninu (Ondřej a Drobník, 2002). Nevýhodou detekce pomocí GUS je ale určitá nespecifická aktivita rostlinných pletiv. Gen *gus* lze zároveň použít jako pozitivně selektovatelný transgen. Selekcí agens jsou β -glukuronidy odvozené z neaktivního cytokininu benzyladenin-N-3-glukuronidu. Působením β -glukuronidázy je hydrolyticky uvolňován aktivní cytokinin benzyladenin, který stimuluje buněčné dělení a regeneraci transformovaných tkání, zatímco tkáň netransformované trpí nedostatkem cytokininů. Je také možno použít kyselinu cellobiuronovou (CbA) jako selekcí látku, protože tato kyselina je disacharidem sestávajícím z glukózy a kyseliny glukuronové, mezi nimiž je glykosidická vazba. Tato vazba je štěpena β -glukuronidázou, přičemž se uvolňuje glukóza sloužící v tomto případě jako jediný zdroj energie. Netransformované rostliny nedokáží tento zdroj energie využít a strádají (citováno z Gazdová, 2007).

V současné době asi nejpoužívanější a nejperspektivnější je transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP).

2. 3. Gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP, z anglického green fluorescent protein) byl klonován z tichomořské medúzy *Aequorea victoria* a jeho produkt má schopnost přeměňovat modré nebo ultrafialové světlo na světlo zelené. V medúze se vyskytuje společně s proteinem aequorinem, který v přítomnosti Ca^{2+} iontů vydává modré světlo a GFP ho přeměňuje na světlo zelené. Gen pro GFP lze spojit, fúzovat, s genem pro protein, o který se zajímáme, takže zeleně fluoreskující protein je vhodný ke sledování lokalizací různých proteinů v buňce (tzv. protein tagging). Mezi jeho velké výhody patří vysoká odolnost ať už vůči nepříznivým hodnotám pH či působení denaturačních látek a značná termostabilita až do 65 °C, a také to, že není fototoxický, na rozdíl od jiných fluorescenčních molekul, jako fluorescein isothiokyanát (FITC) (Hraška *et al.* 2006).

2. 3. 1. Historie

V šedesátých letech byl GFP poprvé purifikován z *A. victoria* a krátce na to byla jeho fluorescence zkoumána japonským vědcem Osamu Shimomurou (Shinomura 1979). Avšak jako pomocný nástroj v molekulární biologii mohl být GFP použit až po roce 1992, kdy Douglas Prasher navrhl a prezentoval klonování nukleotidové sekvence genu pro GFP v časopise *Gene* (Prasher *et al.*, 1992). Prasher poté poslal vzorky cDNA do několika laboratoří a v laboratoři Martina Chalfie se podařilo navodit expresi *GFP* v buňkách bakterie *E. coli* a v hlístici *Coenorhabditis elegans*, přičemž výsledky byly zveřejněny v časopise *Science* v r. 1994 (Chalfie *et al.*, 1994). O měsíc později laboratoř Fredericka Tsuji zveřejnila expresi rekombinantního proteinu. Zajímavé je, že standardní wtGFP (wild- type) protein má schopnost fluorescence při pokojové teplotě a bez potřeby vnějších kofaktorů nacházejících se v medúze. Na druhou stranu má několik nežádoucích vlastností, které bylo nutné eliminovat, jako např. dva excitační vrcholy, nízká fotostabilita nebo slabá schopnost sbalení- utváření středového chromoforu- při 37 °C. V roce 1995 skupina vědců kolem Tsiena vytvořila mutantu S65T s krystalickou strukturou a od té doby bylo v genu pro GFP navozeno mnoho mutací (ať už přímou nebo náhodnou mutagenezí). Dnes máme k dispozici celou řadu GFP derivátů (převzato z http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein a doplněno).

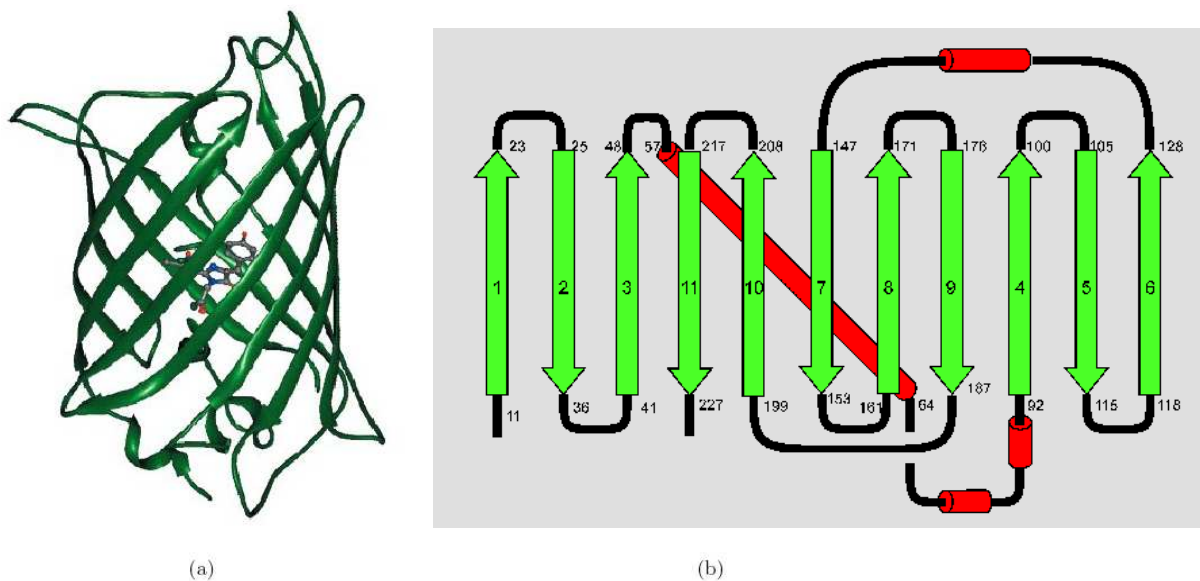
2. 3. 2. Struktura GFP

Zeleně fluoreskující protein se skládá z 238 aminokyselin a jeho nemodifikovaná „divoká“ verze má molekulovou hmotnost 27 kDa.

Aminokyselinová sekvence GFP:

```
MSKGEELFTGVVPLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICTTGKLPVP
WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMGDKPKNGIKVNFKIRH
NIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEFVTA
ARITHGMDELYK
```

GFP má unikátní sudovitý (can-like) tvar (tato struktura se v angličtině nazývá beta-barrel), přičemž průměr cylindrů je zhruba 30 Å a délka je 40 Å. Skládá se z jedenácti β -pásek (listů), tvořících stěnu „sudu“ a jedné α -helixové šroubovice probíhající středem a nesoucí fluorescenční centrum. α -helix zároveň utváří strukturu čepičky uzavírající oba konce „sudu“ (viz obr. 2) (Yang et al., 1996).



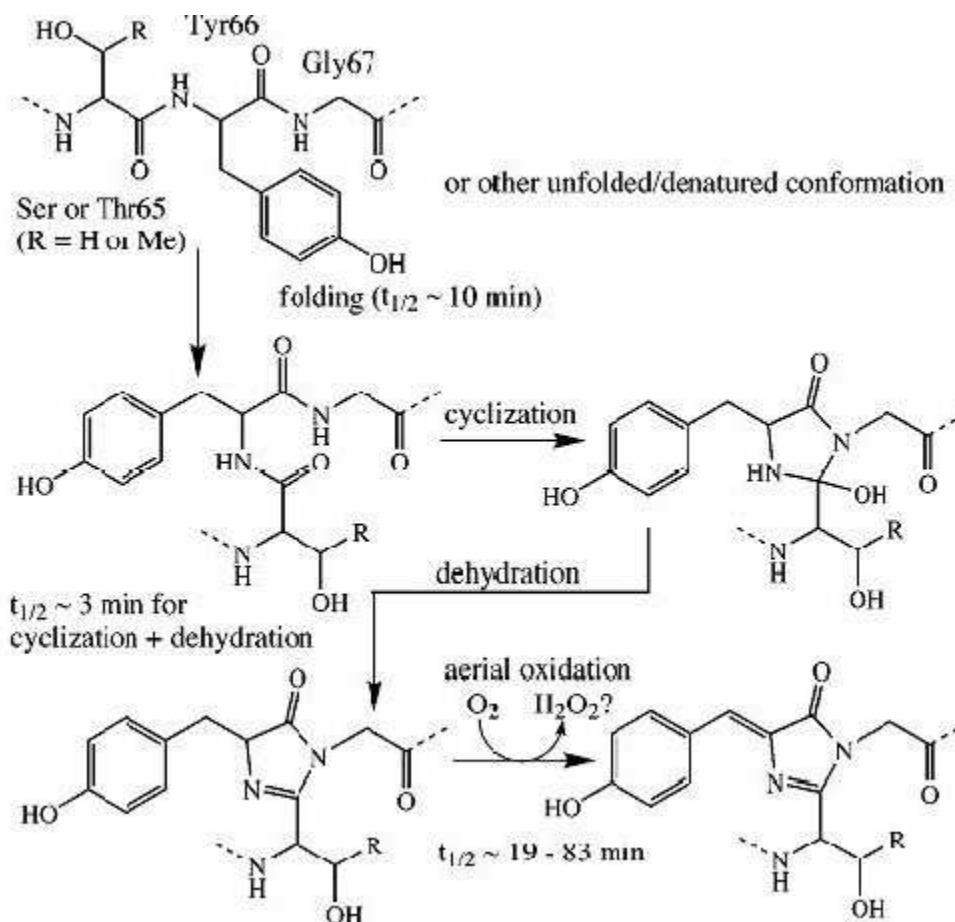
Obr. 2. Modely struktury GFP proteinu:

- trojrozměrné znázornění proteinu – beta-barrel s chromoforem uprostřed
- beta-listy znázorněny zeleně, alfa-helixy červeně a spojovací smyčky černě (převzato z <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP3.htm>)

2. 3. 3. Mechanismus fluorescence

Vlastní chromofor je tvořen tripeptidem Ser65-Tyr66-Gly67. Tento tripeptid je po absorpci excitačního světla aktivován a dochází k postranslačním modifikacím. Tyto modifikace zahrnují rychlou cyklizaci Ser65 a Gly67 a pomalou oxidaci Tyr66 za vzniku 4-(p-hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-onu (viz obr. 3). GFP je jediný známý protein, který fluoreskuje bez dodávání substrátů nebo kofaktorů (Ondřej a Drobník, 2002). GFP má také řadu variant, fluoreskujících v jiných barevných spektrech než je zelený kanál. Tyto odlišnosti jsou dány hlavně strukturou středového chromoforu. Kupříkladu hlavním rozdílem mezi wtGFP a jeho červeným analogem, DsRed, je, že DsRed protein má jednu dvojnou vazbu navíc, která zvyšuje konjugaci chromoforu a způsobuje posun do červené části spektra.

Obr. 3. Sekvence postranslačních modifikací (podle Cubbit *et al.*) při utváření a aktivaci chromoforu GFP (Tsien, 1998)



2. 3. 4. Emisní spektrum a mutageneze GFP

Produkt standardního „divokého“ genu, protein GFP (wtGFP, wild type GFP) z *A. victoria* má hlavní excitační maximum na vlnové délce 395 nm (UV záření) a vedlejší na 475 nm (modré světlo). Jeho emisní maximum je na 509 nm (zelená oblast viditelného spektra). GFP z mořské sasanky *Renilla reniformis* má pouze jeden excitační vrchol, a to 498 nm.

Excitační spektra wtGFP však nejsou zcela vyhovující pro běžně používané sady optických filtrů. Proto byla vyvinuta řada mutantních forem *gfp*. První důležitá modifikace byla bodová (single point) mutace S65T (Tsien, 1995). Tato mutace dramaticky zvýšila úroveň fluorescence a fotostability a posunula excitační vrchol na 488 nm (červená oblast spektra), přičemž emisní vrchol zůstal na 509 nm. Tato forma vyhovuje spektrálním vlastnostem většině běžně dostupným fluoresceinovým (FITC) filtrům. Dalším krokem byla bodová mutace F64L, která přinesla schopnost sbalení proteinu při 37 °C a vzniku vylepšené formy GFP (EGFP, enhanced GFP). Forma superfolder GFP, vyvinutá několika mutacemi za účelem schopnosti rychlého sbalení GFP, dokonce i když je fúzován s těžko sbalitelnými peptidy, byla vytvořena v r. 2006 (http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein).

Dnes známé deriváty GFP mohou být rozděleny do sedmi kategorií, lišících se různými odlišujícími se komponentami v chromoforu:

- 1) přírodní (wild type) směs neutrálního fenolu a záporného fenolátu
- 2) fenolátový anion (např. EGFP, Emerald)
- 3) neutrální fenol (např. H9)
- 4) fenolátový anion s π -elektronovou konjugací mezi nahrazeným tyrosinovým zbytkem a chromoforem. Deriváty s touto strukturou mají emisní vrchol posunutý do žluté oblasti spektra a nazývají se yellow fluorescent proteins (YFPs) (např. Topaz)
- 5) indol. Tyto deriváty, jejichž chromofor vytváří spíše indolovou než fenolovou složku, se nazývají cyan fluorescent proteins (CFPs) (napr. W1B)
- 6) imidazol (blue fluorescent proteins) (např. P4-3)
- 7) fenyl

(viz tab. 1 a obr. 4)

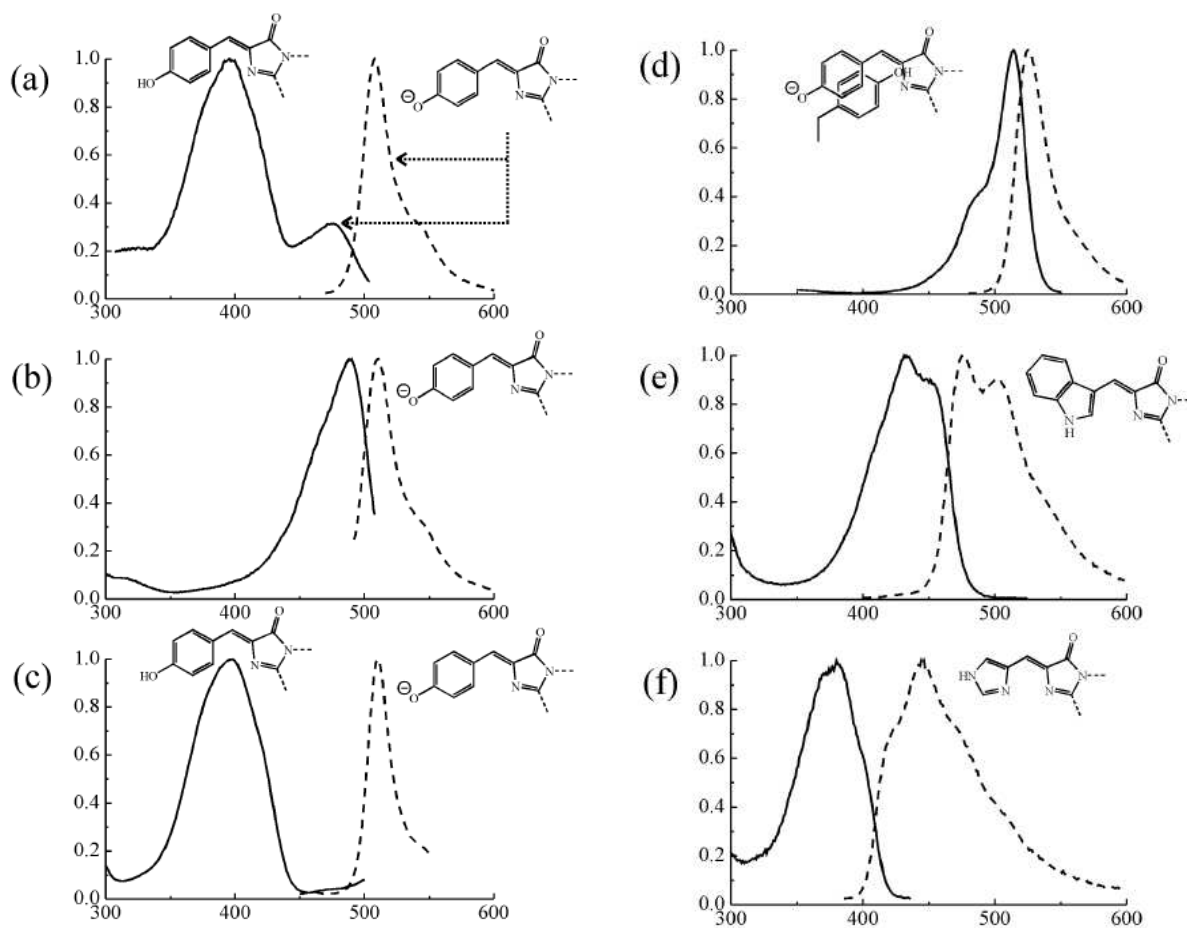
Třídy 1-4 jsou odvozeny z polypeptidů s tyrosinem na pozici 66, zatímco třídy 5-7 mají na této pozici Trp, His nebo Phe. YFP a CFP varianty jsou často používány pro tzv. fluorescence resonance energy transfer (FRET) experimenty.

Mutation ^a	Common name	λ_{exc} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^c	Rel. fl. ^d @ 37°C	References ^e
Class 1, wild-type					
None or Q80R	Wild type	395–397 (25–30) 470–475 (9.5–14)	504 (0.79)	6	43, 45
F99S, M153T, V163A	Cycle 3	397 (30) 475 (6.5–8.5)	506 (0.79)	100	43, 45
Class 2, phenolate anion					
S65T	EGFP	489 (52–58)	509–511 (0.64)	12	43–45
F64L, S65T		488 (55–57)	507–509 (0.60)	20	43–45
F64L, S65T, V163A		488 (42)	511 (0.58)	54	44
S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	Emerald	487 (57.5)	509 (0.68)	100	44
Class 3, neutral phenol					
S202F, T203I	H9	399 (20)	511 (0.60)	13	44
T203I, S72A, Y145F	H9–40	399 (29)	511 (0.64)	100	44
Class 4, phenolate anion with stacked π-electron system (yellow fluorescent proteins)					
S65G, S72A, T203F	10C Q69K	512 (65.5)	522 (0.70)	6	44
S65G, S72A, T203H		508 (48.5)	518 (0.78)	12	44
S65G, V68L, Q69K, S72A, T203Y		516 (62)	529 (0.71)	50	44
S65G, V68L, S72A, T203Y	10C	514 (83.4)	527 (0.61)	58	44
S65G, S72A, K79R, T203Y	Topaz	514 (94.5)	527 (0.60)	100	44
Class 5, indole in chromophore (cyan fluorescent proteins)					
Y66W	W7	436	485	—	21
Y66W, N146I, M153T, V163A		434 (23.9) 452	476 (0.42) 505	61	44
F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	W1B or ECFP	434 (32.5) 452	476 (0.4) 505	80	44
S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	W1C	435 (21.2)	495 (0.39)	100	44
Class 6, imidazole in chromophore (blue fluorescent proteins)					
Y66H	BFP	384 (21)	448 (0.24)	18	44
Y66H, Y145F	P4–3	382 (22.3)	446 (0.3)	52	44
F64L, Y66H, Y145F	EBFP	380–383 (26.3–31)	440–447 (0.17–0.26)	100	43, 44
Class 7, phenyl in chromophore					
Y66F		360	442	—	22

Tab. 1. Spektrální charakteristiky hlavních tříd GFP (Tsien, 1998).

Vysvětlivky:

- substituční mutace jsou vyznačeny jednopísmenným kódem aminokyseliny v původní sekvenci, číslem pozice v sekvenci a jednopísmenným kódem nahrazující aminokyseliny
- λ_{exc} je excitační vrchol v nanometrech, ϵ je extinkční koeficient v jednotkách $10^3 M^{-1}cm^{-1}$
- λ_{em} je emisní vrchol v nm, QY je fluorescence quantum yield (výnos)
- relativní intenzita fluorescence proteinů exprimovaných v *E. coli* při 37°C ze stejného vektorového pozadí za podobných podmínek
- odkazy pouze na kvantitativní spektrální a optická data



Obr. 4. Fluorescenční excitační a emisní spektra (plné a čárkované čáry) pro typické zástupce z šesti hlavních skupin GFP mutantů spolu se strukturou jejich chromoforů. Tam, kde je zakreslená pouze jedna struktura chromoforu, excitační i emisní spektrum vychází z jedné konformace. *Vysvětlivky: a) wild type, b) Emerald, c) H9-40, d) Topaz, e) WIB, f) P4-3*

2. 3. 5. Metody detekce GFP

Při vizuální detekci GFP je nutno mít k dispozici zdroj excitačního světla 395 nm z běžného zdroje, nebo 480 nm z xenonové výbojky a hraniční filtr nebo monochromátor. Pro nejjednodušší vizuální detekci GFP fluorescence postačuje UV lampa nebo jiný ruční zdroj ultrafialového či modrého světla, přesnější pozorování však vyžaduje metod fluorescenční mikroskopie (Haseloff 1999). Ukázalo se, že dostačující jsou klasické mikroskopy či stereomikroskopy (binolupy) (Elliot *et al.* 1999). Pro detailnější pozorování se používají konfokální laserové skanovací mikroskopy, které umožňují např. přesnou subcelulární lokalizaci GFP nebo rekonstrukci trojrozměrných struktur (Haseloff 1999). Při použití UV je nutné z důvodu ochrany očí použít UV filtr. V případě excitace modrým světlem jsou vhodné

žluté nebo oranžové ochranné filtry. Lze použít i mikroskop s filtrem pro oddělení excitačního a emitovaného světla. Výhodou vizuálního pozorování je finanční nenáročnost, nevýhodou je však malá rozlišovací schopnost lidského oka (převzato z Hraška, 2003).

Další zobrazovací metodou je digitální zobrazování za pomoci počítače, které je mnohem citlivější než pozorování lidským okem, vyžaduje však určitou zručnost při ovládnání daného počítačového programu (Hraška, 2003).

2. 3. 6. Možnosti využití GFP v transgenních rostlinách

Gen pro zeleně fluoreskující protein je dnes velmi hojně používaný markerový gen při studiu exprese genů a fyziologických procesů v živých organismech. Na rozdíl od mnoha jiných signálních genů je detekce jeho exprese nedestruktivní a může být prováděna v žijících buňkách v reálném čase. Pomocí GFP lze sledovat lokalizaci proteinů v buňkách, a v konečném důsledku tedy i aktivity organel, mitotického aparátu nebo cytoskeletu. Za pomoci běžných klonovacích technik je možno klonovaný protein spojit s GFP a introdukovat do příslušného organismu. Tato biotechnologická metoda se někdy nazývá protein tagging. Výsledný fúzní produkt je pak možno sledovat pod fluorescenčním mikroskopem (převzato z Hraška, 2003).

Hlavní využití GFP je pak sledování exprese požadovaného genu. Pokud provedeme fúzi tohoto genu s genem pro GFP (aby byly řízeny jedním promotorem), pomocí fluorescence pak snadno poznáme místo a úroveň jeho exprese. Takto může GFP spolehlivě nahradit ostatní metody využívající produkty signálních genů jako β -glukuronidázu nebo luciferázu (Hraška et al., 2006).

Neupravený GFP byl s úspěchem použit při transformaci různých rostlin, především tabáku, ale např. i některých citrusů (převzato z Hraška, 2003). U některých rostlin, jako *Arabidopsis*, tabák, kukuřice nebo pšenice ale wtGFP podléhá delecii 84 nukleotidů v úseku mezi 380 – 463 bází, což vede ke ztrátě 28 aminokyselin. Bylo zjištěno, že tento chybějící úsek, bohatý na AU báze (68%), vykazuje podobnost s rostlinným intronem, je tedy v průběhu transkripce vystřižen a následný produkt je neaktivní (Haseloff *et al.*, 1997, Haseloff a Siemering, 1998). Tento jev, známý jako kryptický sestřih (cryptic splicing), je nutno pro použití *gfp* jako signálního genu odstranit (viz kapitola Materiál a metodika).

Ačkoli jsem uvedl, že GFP pro rostlinu není toxický, ukázalo se, že při excitaci GFP může docházet ke vzniku volných radikálů. Jistou dobu byl pak kladen důraz na tvorbu nových mutantů, kde by GFP bylo cíleno do jiných organel než je jádro, např. do endoplazmatického

retikula (Stewart, 2001), viz Materiál a metodika. Mimo jiné, takto cílený GFP vede ke zvýšení úrovně fluorescence transgenních rostlin a také ke snížení rizika možné fytotoxicity. Nicméně recentní informace dokazují, že GFP není nijak fytotoxický či nebezpečný vůči vyšším organismům (Richards *et al.*, 2003).

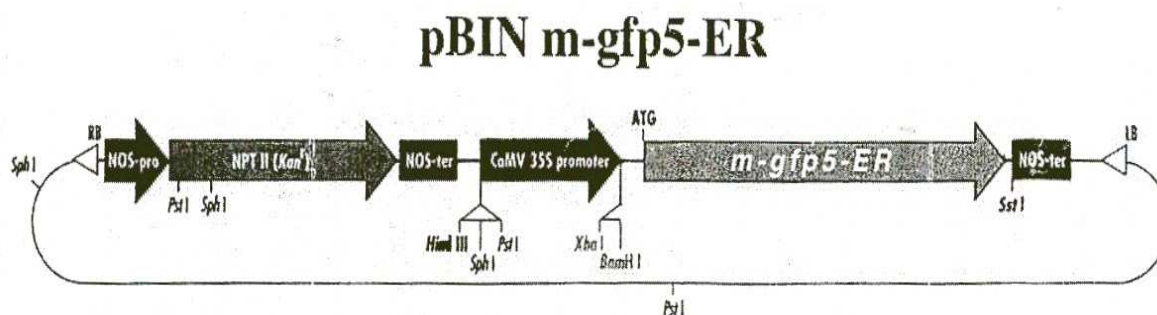
3. Materiál a metodika

3. 1. Materiál

Výchozím materiálem jsou asepticky předpěstované klíčnicí rostliny lnu. Z těchto rostlin jsou izolovány segmenty hypokotylů, které jsou kokultivovány v suspenzi bakteriální kultury nesoucí ve svém plazmidu příslušný konstrukt. Po proniknutí bakterií do epidermálních, případně až do subepidermálních buněk a po začlenění konstrukt (nebo jeho části) do genomu rostliny je indukována regenerace rostlin organogenezí z epidermálních a subepidermálních buněk. V tomto systému nejprve regenerují stonkové pupeny, které se dále vyvíjejí v kulturu mnohonásobných prýtů. Samotné bakterie jsou postupně eliminovány antibiotiky a pomocí selektivního antibiotika jsou mezi všemi regeneranty vybráni transformovaní jedinci (odolní k přítomnosti selektivního antibiotika).

Zaměřil jsem se na dvě odrůdy (genotypy) lnu: Biltstar (olejná forma, vyvinutá společností Van de Bilt Zaden, Holandsko) a Venica (přadná forma, vyšlechtěná firmou Agritec, s.r.o., Šumperk, ČR).

K transformaci byly použity bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (kmen LB4404) nesoucí plazmidové vektory pBIN se signálním genem *m-gfp5-ER* (Haseloff *et al.*, 1997), obr. 5. Ten je řízen promotorem viru žilkovitosti květáku CaMV 35S, a obsahuje selektovatelný gen *nptII*, který kóduje neomycinfosfotransferázu, umožňující selekci transformantů na základě nově získané rezistence vůči antibiotiku kanamycinu.



Obr. 5. Schéma plazmidového vektoru pBIN *m-gfp5-ER*. U pravé hraniční sekvence T-DNA (RB) je umístěn promotor genu pro nopalinsyntázu (NOS), který řídí projev genu *nptII* pro neomycinfosfotranferázu II. Gen *m-gfp5-ER* je řízen promotorem CaMV 35S. Obě dvě sekvence mají terminátor stejného typu, NOS. Ve schématu jsou vyznačeny lokalizace cílových sekvencí pro jednotlivé restriktivní endonukleázy (Haseloff *et al.*, 1997).

3. 1. 1. Gen *m-gfp5-ER*

Gen *m-gfp5-ER* byl autory (Haselof *et al.*, 1997) upraven tak, aby bylo zabráněno jevu, známému jako kryptický sestřih (viz Literární přehled). Mutací byla změněna sekvence nukleotidů v předpokládaných místech sestřihu a následně byl i snížen obsah AU bází v samotném „intronu“. Spojením se sekvencemi charakteristickými pro endoplazmatické retikulum (ER) bylo u *m-gfp5-ER* dosaženo toho, že GFP je cílen do této organely, čímž se dosáhlo zvýšení úrovně fluorescence transgenních rostlin a také snížení rizika možné fytotoxicity v podobě vznikajících volných radikálů.

3. 2. Postup transformace lnu

Na začátek musím zdůraznit, že veškerá manipulace s rostlinným i bakteriálním materiálem (snad kromě první fáze sterilizace semen) se musí provádět pomocí sterilních nástrojů (ponořených v ethanolu a opálených na kahanu) ve sterilním prostředí boxu s laminárním prouděním (tzv. flow-boxu). Protože nakládáme s geneticky modifikovanými organismy, je také neméně důležité všechny nástroje, které přišly do styku ať už s vektorovými bakteriemi nebo transgenními rostlinnými explantáty, vysterilizovat buď zmíněným opálením nad plamenem nebo v autoklávu (při 121°C na 35 min).

3. 2. 1. Sterilizace semen

Od každé odrůdy jsem vybral 100 nepoškozených semen a umístil do sterilních 25 ml Erlenmayerových baněk uzavřených hliníkovou fólií. Po 2 minuty jsem semena proplachoval v 70% ethanolu, poté sterilizoval na třepače v roztoku Savo zředěném v poměru 1:9 vodou, s kapkou smácedla (Jar). Po 50 minutách jsem roztok slil (zbytek sterilizačního činidla jsem odebral pipetou se sterilní špičkou) a nahradil jej sterilní destilovanou vodou, která byla v Erlenmayerových baňkách ponechána 5 minut. Poté jsem vodu slil a přidal opět čerstvou. Tento postup jsem opakoval ještě 3× za účelem důkladného vymytí zbytků sterilizačního roztoku Sava, přičemž pokaždé jsem nechal další várku dest. vody působit o několik minut déle.

3. 2. 2. Výsev semen

Den před aseptickým výsevem semen jsem vysterilizoval v autoklávu kolem 24 ks 125ml sterilních přesnídávkových lahviček s navlhčenou buničitou vatou (á 15 ml dest. vody) uzavřených hliníkovou folií. Do nich jsem pak umístil vysterilizovaná semena, většinou po osmi až deseti semenech na lahvičku. Do poloviny skleniček jsem nasadil semena odrůdy Biltstar, do druhé cv. Venica. Nechal jsem je klíčit v kultivační místnosti při cca. 22 °C, přičemž první 4 dny byly zakryté a dalších zhruba 8 dní byly vystaveny 16hod. fotoperiodě ($60\text{-}90 \mu\text{mol(PAR)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

3. 2. 3. Příprava bakteriální kultury

Vektorové bakterie (*A. tumefaciens*, kmen LB4404 s vektorem *m-gfp5-ER*) byly uchovávány při velmi nízké teplotě ($-70 \text{ }^\circ\text{C}$) v glycerinu. 2 dny před jejich použitím pro transformační pokus byly přeočkovány do tekutého LK média (Langley a Kado 1972) (20 ml ve 100 ml Erlenmayerově baňce) s antibiotikem kanamycin o konečné koncentraci 50 mg l^{-1} . Bakterie v LK médiu jsem nechal růst 1,5 dne ve tmě na temperované třepačce při $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. 2. 4. Stanovení vhodné hustoty bakterií podle optické density

20 ml LK média s namnoženými bakteriemi jsem rozlil do 4 ks 10ml zkumavek a nechal centrifugovat 5 min při 4000 ot/min. Poté jsem slil supernatant a v jedné zkumavce jsem nechal trochu LK média. Důkladným promícháním peletu s LK médiem a postupným přenášením do dalších zkumavek s peletem jsem dosáhl postupného zvyšování koncentrace bakterií. LK médium s vysokou koncentrací bakterií jsem pak z poslední zkumavky přelil do Erlenmayerovy baňky a část odebral do 1 cm kyvety z křemičitého skla. Na spektrofotometru Boeco S-30 jsem změřil optickou denzitu při 600 nm (předtím bylo nutno fotometr zkalibrovat na roztok 10 mM MgSO_4 /blank/ nebo LB-médium při stejné vlnové délce, podle toho, v čem byla prováděna kokultivace). Bakteriální kulturu jsem následně naředil sterilním LK médiem na konečnou hodnotu optické denzity 0,2–0,3 ve 20 ml inkubačního roztoku MgSO_4 .

3. 2. 5. Kokultivace v inkubačním roztoku

Vyklíčené rostlinky lnu jsem nastříhal do 4 ks $\varnothing 9 \text{ cm}$ Petriho misek, 2 pro každou odrůdu, přičemž vždy jedna byla určena pro budoucí transformanty a jedna pro kontrolní explantáty. Děložní lístky jsem odstříhl tak, aby střížená plocha nebyla moc malá a hypokotyly jsem nastříhal na 4-5 mm dlouhé segmenty. Jako inkubačního roztoku jsem používal sterilní 10

mM síran hořečnatý (MgSO_4). Nastříhané rostlinné segmenty jsem zalil 20 ml 10 mM MgSO_4 a po 30 minutách jej odsál pipetou se sterilní špičkou. Do dvou Petriho misek, u nichž jsem si zvolil, že nastříhané explantáty v nich budou sloužit pro kontrolu, jsem nalil opět 20 ml 10 mM MgSO_4 , explantáty pro transformaci ve zbylých dvou miskách jsem zalil takovým množstvím roztoku MgSO_4 , aby po přidání bakteriální suspenze měl roztok 20 ml a jeho optická densita byla 0,2–0,3. Toto množství bakteriální suspenze jsem si spočetl podle její optické density, kterou jsem si předtím změřil (většinou kolem 5 ml), a přidal jej k inkubačnímu roztoku pipetou se sterilní špičkou. Vše jsem promíchal jemným pokyvováním Petriho misek, aby do styku se suspenzí bakterií přišly všechny rostlinné segmenty, zakryl misky a nechal 3 hodiny kokultivovat na rozptýleném světle ve flow-boxu při laboratorní teplotě.

3. 2. 6. Kokultivace na agarovém C médiu

Po uplynutí stanovené doby jsem pipetou odsál roztok MgSO_4 , případně s bakteriální suspenzí a hypokotyle a děložní lístky jsem osušil sterilním filtračním papírem. Poté jsem explantáty vyskládal na malé plastové Petriho misky ($\varnothing 6$ cm) s agarovým C médiem pro kokultivaci a kalogenezi (1–1,5 mg l^{-1} BAP a 0,02–0,1 mg l^{-1} NAA) bez antibiotik, misky uzavřel dvojitou vrstvou PE fólie a nechal kokultivovat 3 – 4 dny za šera v kultivační místnosti (misky jsem zakryl gázou).

3. 2. 7. Debakterizace a indukce organogeneze

Potenciálně transformované explantáty jsem přenesl do dvou Erl. baněk (zvlášť pro každou odrůdu), dvakrát je promyl ve sterilní destilované vodě a na závěr v roztoku Claforanu o koncentraci 1000 mg na 1 l vody. Poté jsem explantáty důkladně osušil sterilním filtračním papírem a přenesl je na regenerační R médium, jehož základem je MS médium podle Murashige a Skooga (1962), se 3% sacharózou, inositolem (100 mg l^{-1}) a vitamíny B5 (Gamborg *et al.*, 1968), doplněné antibiotiky Timentinem (500 mg l^{-1}) a kanamycinem (100 mg l^{-1}) pro eliminaci vektorových bakterií a selekci transformantů, a růstovými látkami (0,1–1 μM , případně 1 mg l^{-1} BAP a 0,005 μM NAA) pro indukci regenerace. Poté jsem explantáty nechal kultivovat 3 – 4 týdny v kultivační místnosti při teplotě 22 ± 2 °C, na 16 hod. fotoperiodě, 60 – 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR.

3. 2. 8. Selektce transformantů a klonování vyselektovaných regenerantů

Po 3 – 4 týdnech jsem explantáty přenesl na čerstvé R-médium, přičemž koncentrace kanamycinu byla ponechána na úrovni 100 mg l^{-1} , ale koncentraci Timentinu jsem v průběhu subkultivací postupně snižoval na 350, dále 250 a 150 mg l^{-1} . Poslední koncentraci jsem ponechal i v dalších pasážích, aby nedošlo ke zotavení příležitostně přežívajících bakterií a jejich opětovnému nárůstu.

Regenerované výhony (alespoň 1 cm vysoké) jsou postupně oddělovány od primárních explantátů a přenášeny na čerstvé K (klonovací) médium s antibiotiky Timentinem (jeho koncentrace závisela na koncentraci Timentinu /Ti/ v R médiu, z něhož byly výhony odebrány. První přesazení většinou bývalo na K médium s 350 mg l^{-1} Ti) a kanamycinem (50 mg l^{-1}) a růstovými látkami ($0,01 \text{ } \mu\text{M}$ BAP a $0,005 \text{ } \mu\text{M}$ – $0,002 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA). Vždy po 3 – 4 týdnech bylo potřeba výhony přesadit na čerstvé K médium, mimo jiné kvůli hromadění nežádoucích produktů metabolismu, které na růst výhonů působí inhibičně. Obsah Timentinu byl vždy snižován stejně jako u R médií, zatímco kanamycin (Kn) byl ponechán v původní koncentraci 50 mg l^{-1} . Během přesazování jsem delší výhony rozstříhal na 2 – 3 cm dlouhé segmenty a každý přesadil jako samostatný výhon.

3. 3. Příprava kultivačních médií

Používal jsem dva typy kultivačních médií: tekuté LK médium (Langley a Kado 1972) pro kultivaci a namnožení vektorových bakterií *A. tumefaciens*, a agarová média pro regeneraci a další kultivaci rostlin.

LK médium pro bakterie jsem připravoval v 500 ml kádince s redestilovanou vodou, kam jsem za stálého míchání přidával jednotlivé ingredience. Po změření a úpravě pH jsem médium doplnil redestilovanou vodou do požadovaného objemu, přelil do Erl. baňky a nechal zklávkovat při $121 \text{ } ^\circ\text{C}$ po 35 min. Po zchladnutí média jsem ve sterilním prostředí flow boxu přidal kanamycin, který jsem nechal předem autosterilizovat ve sterilní destilované vodě a poté zředil na koncentraci 10 mg Kn/ 10 ml vody, přičemž na každých 10 ml LK média pak připadalo 0,5 ml tohoto zásobního roztoku kanamycinu. Médium jsem pečlivě promíchal a rozlil do 100ml Erl. baněk po 20 ml.

Agarová média jsem připravoval v 1000ml kádince s redestilovanou vodou, do které jsem postupně přidával složky příslušného média v pořadí sacharóza, inositol, MS soli (Sigma, USA) a růstové látky (BAP a NAA). Poté jsem upravil pH média pomocí 1N nebo 0,1N

KOH, případně HCl, přelil jej do sterilizovatelné Erlenmayerovy baňky (jejíž objem by měl být minimálně 3x větší než objem média), doplnil redestilovanou vodou do požadovaného objemu, přidal agar do koncentrace 0,8 % (Plant agar, Duchefa, Holandsko) a uzavřel hliníkovou fólií. Média jsem nechal sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 35 min, poté přemístil do flow boxu a až po zchlazení média přibližně na 50 °C jsem přidal antibiotika, která není možno autoklávat díky jejich termolabilitě. Před aplikací antibiotik bylo nutno je vždy nechat autosterilizovat minimálně 1,5 hodiny v co nejmenším množství sterilní destilované vody (stačí tolik, aby se v ní antibiotika rozpustila pro dosažení jejich co největší koncentrace) v malé Erlenmayerově baňce na třepačce. Po důkladném promíchání bylo médium rozlito do kultivačních nádob (do Petriho misek pro C a R média nebo do 15ml plastických zkumavek pro K média).

C, R a K média mají za základ MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Přehled složení jednotlivých kultivačních médií je uveden v příloze.

3. 4. Vizualní detekce GFP

Pro pozorování fluorescence rostlinných objektů za aseptických podmínek jsem používal binokulární mikroskop Leica MZ12 s okulárem 10x a adaptérem pro GFP. Jako nejvhodnější se ukázal objektiv 0,63x. Používal jsem zoom v rozmezí 6,3x-10x. Zdrojem excitačního světla (395 nm) byla rtuťová výbojka a oddělení excitačního světla od světla emitovaného (525 nm) zajišťovala sada optických filtrů (Hraška *et al.*, 2005). Fotodokumentaci jsem prováděl pomocí fotoaparátu Olympus C-5050 s ultrazoomem.

3. 5. Molekulární detekce *gfp*

3. 5. 1. Izolace DNA (podle upraveného protokolu Fér, 2006)

Izolaci DNA jsem prováděl podle výše uvedeného protokolu, který principiálně vychází z CTAB metody dle Doyle a Doyle (1990). Jako materiál pro izolaci DNA jsem použil celé kalusy nebo v případě primárních regenerantů nejmladší části výhonů (svrchní části o délce zhruba 3 cm). Rostlinnou tkáň (cca. 50-100 mg) jsem přenesl do mikrozkušavek Eppendorf (1,5 ml) a následně homogenizoval v tekutém dusíku, v případě kalusů pouze při pokojové

teplotě, protože obsahují hodně vody a v dusíku vždy příliš ztvrdly a jejich následná homogenizace byla obtížná. K rozdrcenému materiálu jsem přidal 700 µl roztoku CTAB (hexadecyltrimethylamonium bromid) s přidavkem 2 % (v/v) β-merkptoethanolu a malé množství (cca. 10 mg.) PVP (m.h. 40 000). Obsah mikrozkušavky jsem poté promíchal na stolním vortex mixeru a nechal 30 min inkubovat při 60 °C za občasného promíchání mírným převrácením. Poté jsem přidal 500 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1), ponechal asi po 5 min stát a pak opatrně promíchal převrácením. Následně jsem obsah mikrozkušavky stočil na centrifuze při 14 000 ot/min po dobu 5 min, při pokojové teplotě. Svrchní čirou fází, obsahující DNA jsem opatrně odpipetoval do nových Epp. zkumavek, vysrážel přidáním 500 µl vychlazeného (–20 °C) isopropanolu, mírně převrátil a dal na cca. 30 min do mrazáku (–20 °C). Toto je okamžik, ve kterém lze izolaci DNA přerušit do druhého dne. Po vyjmutí z mrazáku jsem směs centrifugoval po dobu 5 min za stejných otáček jako v předcházejícím kroku, tentokrát však při 4 °C. Po centrifugaci jsem opatrně slil supernatant a k peletu přidal 400 µl vychlazeného čistého 96% ethanolu. Po následné inkubaci (15 min při 37 °C) a centrifugaci při 4 °C jsem slil supernatant, k peletu přidal 500 µl vychlazeného 70% ethanolu a stočil v centrifuze, tentokrát jen 2 minuty při 14 000 ot. a opět při 4 °C. DNA jsem pak nechal vyschnout ve flow boxu na vrstvě sterilní buničiny, aby ve zkumavkách nezůstaly nežádoucí kapičky ethanolu, a poté rozpustil v 50 µl sterilní destilované vody. Vzorky izolované DNA jsem pak uchovával v mrazáku při –20 °C.

3. 5. 2. PCR

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce byla prováděna v gradientovém termocykleru TC-XP s blokem Xp-C (dodavatel KRD, ČR). Reakce probíhala v reakční směsi o objemu 20 µl:

- 10 µl PPP Master Mix
- 0,5 µl primer F (0,16 µM)
- 0,5 µl primer R (0,16 µM)
- 7 µl PCR H₂O
- 2 µl DNA (cca 50 ng)

Reakční směs (bez DNA) jsem vždy připravoval v takovém množství, jaké vyžadoval počet všech vzorků DNA, které jsem chtěl amplifikovat. Poté jsem ji rozpipetoval do mikrozkušavek po 18 µl master mixu a 2 µl roztoku DNA jsem přidal až v posledním kroku. Veškerou manipulaci s DNA, primery a master-mixy jsem prováděl za neustálého chlazení na

ledu kvůli termolabilnosti nukleových kyselin a pro snížení rizika nescifického nasednutí primerů a pozvolnému rozběhnutí PCR reakce ještě před vložením do cycleru. U pozdějších PCR detekcí jsem používal Combi PPP Master Mix, který obsahoval DNA polymerázu pro tzv. hot start PCR. Takováto DNA polymeráza je modifikována vazbou s blokační molekulou inhibitoru, která brání enzymu v jeho činnosti. Tento inhibitor se od DNA polymerázy oddělí až po působení zvýšené teploty po určitý časový úsek. Použitím takovéto polymerázy lze dosáhnout vyšší specifity celé reakce.

Používal jsem tento teplotní program:

1. 94 °C, 5 minut	počáteční denaturace	1x
2. 94 °C, 1 minuta	denaturace	35x
3. různá teplota (podle typu primerů), 1 minuta		
	annealing primerů	35x
4. 72°C, 1 minuta	extenze primerů	35x
5. 72°C, 7 minut	závěrečná extenze	1x
6. 4°C, ∞		

3. 5. 2. 1. Použité primery

Při polymerázové řetězové reakci jsem používal 3 typy primerů:

- kontrolní primery pro detekci specifických sekvencí pro len (FAD3A)
- kontrolní primery pro detekci specifických sekvencí pro *Agrobacterium*- vir oblast úseku Ti plazmidu
- Pro detekci genu *gfp* jsem používal primery GFP5-U/L nebo Eady GFP5 (Hraška *et al.*, 2008b, Eady *et al.* 2000).

Přítomnost T-DNA lze v tomto případě ověřit i primery pro *nptII* úsek (kanamycinová rezistence). I když vyjde PCR detekce přítomnosti genu pro GFP pozitivní, nemusí to nutně znamenat, že se exprimuje v rostlinných buňkách. Signál totiž může pocházet z agrobakterií, které přežily v rostlinné tkáni. Proto jsem používal i kontrolní primery specifické pro sekvence bakteriálních Ti-plazmidů, konkrétně pro *vir*-oblast. Pro tento účel jsem používal primery VirA1/A2. Ještě je vhodné jako interní kontrolu použít primery detekující sekvence specifické pro samotnou rostlinu, ať už transformovanou, nebo kontrolní. Použitím takovýchto primerů jsem si ověřil, jestli v reakční směsi vůbec došlo k PCR reakci, neboť cílová sekvence pro tyto primery musí být vždy přítomna v každé DNA vyizolované ze lnu a tudíž i

vždy amplifikována při správně probíhající PCR. K tomu mi posloužily primery FAD3A (viz tab. 2)

Tab 2. Použité primery a jejich základní údaje

Název primeru	Sekvence (nahore forward, dole reward)	Teplota annealingu	Velikost amplifikovaného fragmentu [bp]
GFP5-U/L	5'-ACCCAGATCATATGAAGCGG-3' (20-mer) 5'-TTGGGATCTTTCGAAAGGGC-3' (20-mer)	54 °C	415
GFP5-Eady-U/L	5'-ACGTCTCGAGCTCTTAAAGCTCATCATG-3' (28-mer) 5'-ACGTCTCGAGGATCCAAGGAGATATAACA-3' (29mer)	51 °C	850
VirA1/A2	5'-AATTCACCGACGCGGCAGGATTTTAAGACAG-3'(31-mer) 5'-AGCTTTGGTACGAGAGACTATTTTCGCGTAG-3' (30-mer)	57 °C	1120
FAD3A-F/R	5'-CAGTGACCTGTTCGCACCG-3' (19-mer) 5'-CCCGGCTAGGGTGATCAT-3' (18-mer)	57 °C	650

3. 5. 2. 2. Elektroforéza

Produkty PCR byly vyhodnoceny pomocí elektroforézy. Byl použit 2% agarózový gel. Na 100 ml koloidního roztoku bylo použito 1,5 g agarózy (Invitrogen, dodavatel KRD, ČR), 20 ml 5×TBE pufru a 80 ml vody.

Příprava 10×TBE elektroforézového pufru: 108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) a doplnit vodou do objemu 1 l. 5×TBE pufr pak připravíme tím, že 500 ml 10×TBE pufru doplníme vodou do 1 l, a analogicky 1×TBE pufr, který se lije do elektroforetické vany, připravíme zředěním 10×TBE pufru desetkrát.

Po rozvaření a mírném ochlazení roztoku jsem přidal 2 µl roztoku ethidiumbromidu a nechal ztuhnout cca. 30 min. Do každé jamky jsem nanášel zhruba 18 µl PCR produktů reakční směsi. Jako marker molekulových hmotností pro určení velikosti fragmentů DNA jsem použil 100 bp či 1kb standard molekulové hmotnosti (ladder). Vlastní elektroforéza probíhala kolem 1,5 hod při napětí 80 V. Gel byl vizualizován na transluminátoru (Vilber Lourmat, Francie) pomocí CCD kamery a výsledky detekce fragmentů jsem vyfotografoval.

3. 5. 3. Southern-blot hybridizace

Hybridizaci DNA na membráně jsem použil pro ověření sekvenční specifity PCR produktů získaných z rutinních detekcí přítomnosti *gfp5* genu v DNA lnu. DNA/ PCR produkty z vybraných elektroforéz jsem průběžně blotoval na membrány (viz. postup níže), které jsem

uchovával v ledničce při 4 °C a poté hybridizoval se značenou DNA sondou, která velikostí odpovídala celému úseku transgenu *gfp* (viz. postup níže).

3. 5. 3. 1. Příprava hybridizační sondy

Pro neradioaktivní značení DNA sondy alkalickou fosfatázou jsem použil soupravu (kit) od firmy Amersham (AlkPhos Direkt Labeling Kit, GE Healthcare-Amersham, Velká Británie). DNA pro přípravu sondy jsem získal z PCR reakce za použití primerů Eady GFP5 (viz. 3. 5. 2. 1) a plazmidu pBIN mgfp5-ER jako templátu. PCR reakční směs jsem po skončení reakce nanesl na gel a po elektroforéze jsem na UV transluminátoru opatrně vyřízl pruhy gelu obsahující DNA o požadované velikosti. Izolaci DNA z gelu jsem provedl kitem QIAquick Gel Extraction Kit of firmy Qiagen (SRN). Získanou DNA jsem naředil na pracovní koncentraci 10 ng/μl. Ze zásobního roztoku dodaného v kitu jsem odebral 20 μl cross-linkeru a smíchal s 80 μl vody na protokolem požadovanou koncentraci. 10 μl naředěné DNA (pro optimální naznačení sondy nesmí celková koncentrace DNA přesáhnout 100 ng) jsem považil 5 min, poté nechal zchladit na ledu a krátce stočit. Dle protokolu pro AlkPhos značící sadu jsem pak postupně přidal 10 μl reakčního pufru, 2 μl značící směsi „labelling reagents“ a 10 μl cross-linkeru v pracovní koncentraci a lehce stočil na stolní mikrocetru. Značící reakci jsem nechal 30 min inkubovat při teplotě 37 °C. Takto připravenou sondu jsem pak skladoval na ledu a do 2 h použil pro hybridizaci.

3. 5. 3. 2. Příprava membrány

Pro navázání DNA jsem použil kladně nabitou nylonovou membránu Hybond N⁺ (GE Healthcare, Amersham, Velká Británie). Ustříhl jsem část Hybond N⁺ membrány o velikosti zhruba 10 x 10 cm a zvlhčil jsem ji destilovanou vodou. Poté jsem membránu na 5 min ponořil do roztoku ATB („alkaline transferase buffer“ – na 1 litr 16 g 0,4M NaOH a 58,4 g 1M NaCl) a poté očistil protažením ve 2x SSC (na 1 litr 20x SSC 175,3 g NaCl a 88,2 g citronanu sodného na 1litr, 2x SSC připravíme jeho zředěním 10x).

3. 5. 3. 3. Blotování

Pro přenos DNA z gelu jsem zvolil tzv. alkalický blot. Agarózový gel jsem přenesl do roztoku ATB na 15 min a poté do nového ATB na 20 min za mírného třepání. Na připravenou podložku jsem na sebe navrstvil papírové ručníky, suchý Whatman 3MM papír, Whatman 3MM papír navlhčený v ATB, membránu, gel, navlhčený Whatman 3MM papír, most z filtračního papíru ponořený na obou koncích do ATB. Celou sestavu jsem pak mírně zatížil

závažím. Po transferu, který trvá přibližně 2 hodiny, jsem membránu protáhl ve 2x SSC. Při tomto způsobu přenosu DNA není třeba membránu zapékat či fixovat UV zářením a membránu lze skladovat při 4 °C.

3. 5. 3. 4. Hybridizace

Dle protokolu pro AlkPhos značící sadu jsem si připravil hybridizační pufr – na 100 ml 4 g 0,5M NaCl; 2,92 g 4% blocking reagents obsahující mlíčí lososa (salmon sperm, 1 µl/ml hybridizačního roztoku). Připravený hybridizační pufr jsem pak nechal v hybridizační peci předeřhřát na 55 °C. Takto předeřhřátý pufr jsem přidal do předeřhřáté hybridizační tuby s vloženou membránou a tuto jsem nechal prehybridizovat 20 min při 55 °C. Poté jsem přidal značenou DNA sondu (10 ng/ml) a nechal hybridizovat při 65 °C přes noc. Druhý den jsem hybridizační pufr odstranil a membránu promyl nejprve v předeřhřátém promývacím pufru (na 1 l 120 g 2M močoviny, 1 g 0,1% SDS /sodium dodecyl sulfát/, 50 ml 1M NaPO₄, 8,7 g 150mM NaCl, 1 ml 1M MgCl₂ a 2 g 0,2% blocking reagents) 10 min při 55 °C a poté dvakrát ve vymývacím pufru (na 1 l 121 g 1M Tris báze, 112 g 2M NaCl, pH na 10, poté zředit 20x a přidat 2 ml/l 1M MgCl₂) po pěti minutách. Veškeré použité roztoky a promývací pufry jsem připravil dle protokolu pro AlkPhos značící sadu.

3. 5. 3. 5. Detekce

Hybridizovanou a promytou membránu jsem nechal okapat a položil jí na mikrotenový sáček. Poté jsem přidal cca 2 ml značícího substrátu (CDP Star, GE Healthcare, Amersham, Velká Británie), přehnul sáček a substrát rovnoměrně rozválel po celé ploše. Po cca. 3 min jsem mikrotenovou fólii dostatečně utěsnil, aby CDP Star neunikl do vyvolávací kazety a přilepil ji do vyvolávací kazety. V temné komoře jsem na membránu v kazetě přiložil hypersenzitivní film (GE Healthcare, Amersham, Velká Británie) a nechal 15 minut exponovat. Poté jsem film vyvolal po 3 min ve vývojce (Fomadon R09) a 10 min v ustalovači (Fomafix).

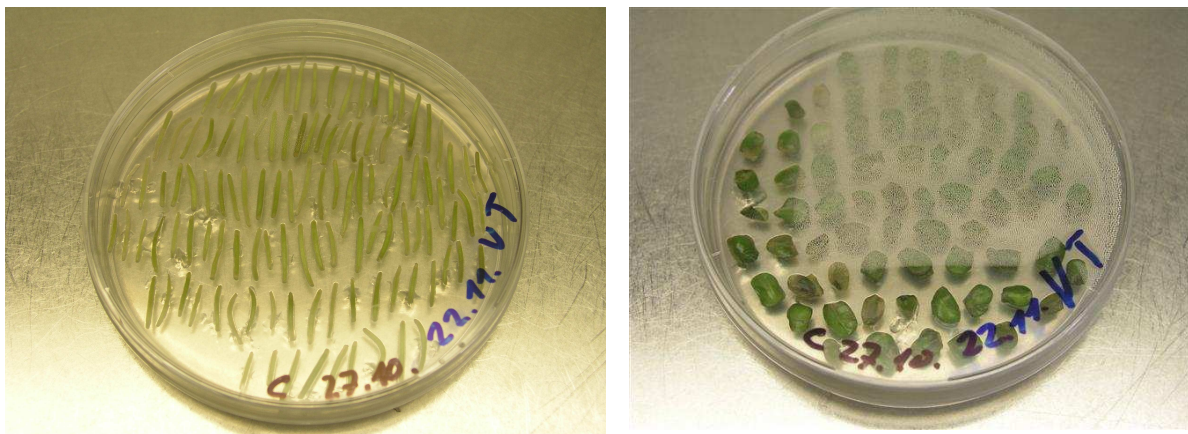
4. Výsledky

4. 1. Transformační pokusy

Celý transformační proces má tyto stěžejní fáze: vlastní transformace rostlinných segmentů agrobakteriemi; kalogeneze a vizuální detekce GFP u kalusů; regenerace neboli tvorba výhonů a jejich klonování; izolace DNA a molekulární detekce genu pro GFP u regenerantů.

Je důležité si uvědomit, že od okamžiku výsevu semen je nutno zacházet s rostlinným materiálem asepticky, avšak i při dodržení těchto zásad je náš materiál nesmírně náchylný ke kontaminaci v podobě různých plísní či kvasinkových povlaků. Kontaminované explantáty samozřejmě nelze k další práci použít a je nutné je co nejdříve odstranit, aby se kontaminace v kultivační místnosti nešířila. Během své práce jsem se kontaminací často setkával a několikrát jsem musel celý transformační pokus ukončit, pokud byla rozsáhlá. Zde je třeba poznamenat, že kontaminace byla často zapříčiněna již napadením semen lnu pocházejících z běžných polních podmínek, která byla použita jako výchozí zdroj hypokotylů a děložních lístků. Veškeré statistiky a závěry, které zde budu uvádět jsou vyvozeny ze dvou transformačních pokusů, které byly zdárně zakončeny úspěšnou izolací DNA.

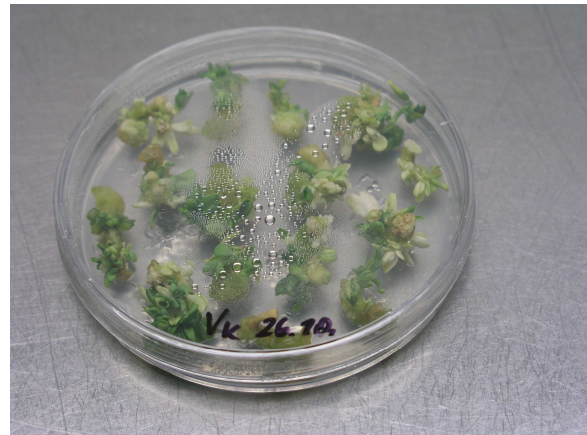
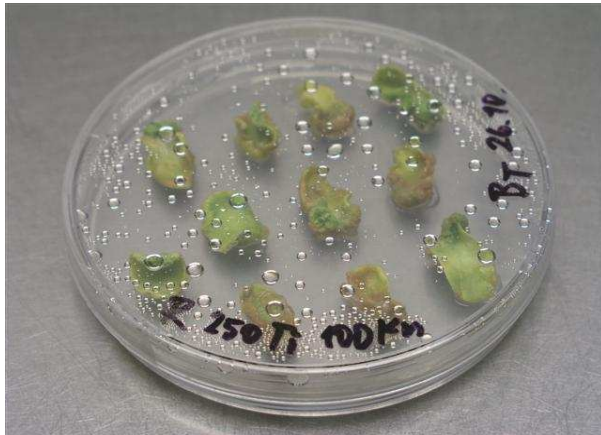
Transformaci jsem prováděl modifikovanou diskovou metodou, na částech asi dva týdny starých semenáčků, konkrétně segmentech hypokotylů a děložních lístcích. Vlastní kokultivace probíhala v roztoku 10mM $MgSO_4$ po dobu 3 hodin a poté 3 dny na agarovém C médiu bez antibiotik (obr. 6). Následně byla provedena debakterizace, a to promytím explantátů v roztoku Claforanu a následným nasazením na kultivační média s antibiotiky kanamycinem (za účelem selekce) a Timentinem.



Obr. 6 Kokultivace explantátů (vlevo segmentů hypokotylů, vpravo děložních lístků) na agarovém C médiu bez antibiotik)

4. 2. Regenerace a klonování explantátů

Regenerace explantátů probíhala ve dvou krocích na kultivačních médiích, jejichž složení je popsáno v kapitole Materiál a metodika, přičemž počáteční koncentrace růstových látek v nich obsažených byla v takovém poměru, aby navozovala kalogenezi (obr. 7). Po třídní kokultivaci byly explantáty přeneseny na R médium. Zhruba po deseti dnech transformované i netransformované explantáty začaly na regeneračním médiu vytvářet kalusy. Asi každé tři týdny bylo nutno explantáty přesadit na čerstvé R médium, neboť hromadící se produkty metabolismu působí na růst inhibičně. S každým přesazením jsem vždy o trochu snížil hladinu Timentinu, přidávaného do média pro snížení rizika vzniku kontaminace. Již po těchto třech týdnech bylo často možné odebrat první výhony (regeneranty). Výhony jsem přesazoval do zkumavek na klonovací média (obr. 8), jeho přesné složení je popsáno v kapitole Materiál a metodika. Přitom jsem vždy vzal v úvahu, jaká byla koncentrace antibiotik v předchozím médiu. Postupné snižování koncentrace antibiotik v kultivačních médiích zajišťovalo eliminaci vektorových bakterií v rostlinné tkáni. Při oddělování výhonů z kalusů jsem si vždy u každého výhonu poznamenal, zda vyrostl z děložního lístku nebo ze segmentu hypokotylu, abych poté mohl porovnat, zda má typ rostlinného orgánu vliv na kvantitu nebo kvalitu výhonů. Jak jsem zjistil, hypokotylu mají mnohem větší regenerační schopnost oproti děložním lístkům, ze kterých se mi podařilo odebrat výhonů pouze velmi málo. Každé tři týdny, kdy jsem kalusy přesazoval, jsem z nich odstříhával další výhony, přičemž samotné výhony jsem také množil tak, že po dosažení určité délky jsem je rozdělil zhruba na polovinu a přesadil je na další klonovací médium. Při přesazování jsem k další práci vybíral vždy jen nejlepší exempláře, ať už se jednalo o kalusy nebo regeneranty, a uvadlý, nekrotizovaný nebo kontaminovaný rostlinný materiál jsem vyřazoval. Takto bylo možné v konečné fázi pokusu získat řádově desítky regenerovaných rostlin. U každého výhonu jsem si dělal poznámky pomocí mnou zvolených kombinací písmen a čísel, abych měl přehled o jeho „genealogii“. Mohl jsem tedy vždy snadno zjistit, které výhony pocházejí z jakého původního výhonu a nakonec i ze kterého explantátu.



Obr. 7. Porovnání regenerace pupenů a výhonů děložních a hypokotylových explantátů na regeneračním médiu R. Na obrázku vlevo se tvoří na některých místech děložních lístků zatím jen kalusy, ze segmentů hypokotylů – vpravo již začínají regenerovat výhony.



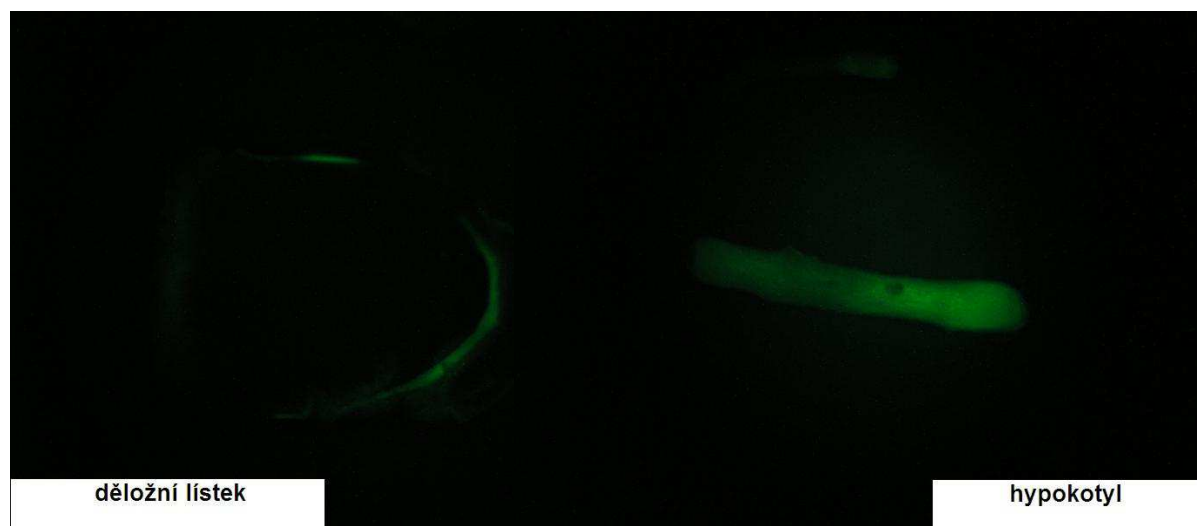
Obr. 8. Regenerované výhony lnu na klonovacím médiu

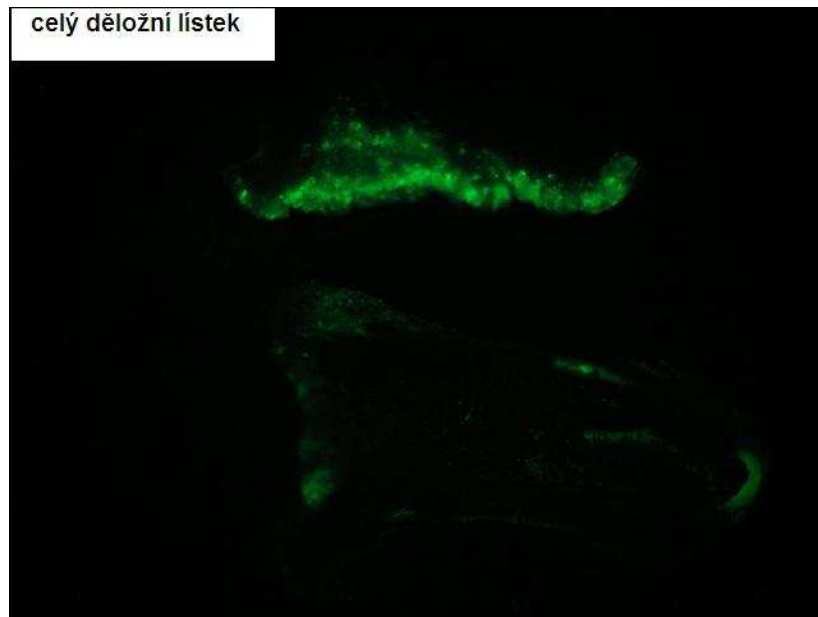
4. 3. Vizuální detekce GFP

Explantáty byly podrobeny dlouhodobému pozorování pod binokulárním mikroskopem s nástavcem pro vizualizaci GFP. Již po třídní kokultivaci a přesazení na regenerační médium bylo možno pozorovat fluorescenci u některých explantátů. Pozorování fluorescence bylo prováděno zhruba dvakrát do týdne a u vhodných preparátů byla pořízena fotodokumentace. Výsledky jsem si zapisoval do tabulky, abych měl přehled jak se vyvíjí poměr fluoreskujících explantátů ku nefluoreskujícím. Důležité je si uvědomit, že z domněle transformovaných explantátů fluoreskoval vždy pouze zlomek, a to, že rostlina fluoreskuje ještě neznamená, že je nutně GFP pozitivní. U některých rostlin lnu (a především u odrůdy Venica) jsem se totiž setkal s jevem zvaným autofluorescence, což znamená že pletiva

emitovala záření s podobnou vlnovou délkou jako GFP. Důvodem byla pravděpodobně přítomnost doposud neidentifikovaných fenolických látek a ve lnu hojně se vyskytujících polysacharidů. Intenzita této autofluorescence však byla rozdílná u jednotlivých typů explantátů a dokonce u obou odrůd lnu. U odrůdy Biltstar mi slabá autofluorescence zpravidla nebránila v úspěšné detekci GFP fluorescence, avšak u odrůdy Venica jsem tyto dva druhy záření často nedokázal spolehlivě odlišit. Proto jsem se při vizuálních detekcích soustředil spíše na odrůdu Biltstar. Jak jsem zjistil, skutečně GFP pozitivní rostlina, u níž byla následně přítomnost transgenu *gfp* potvrzena výsledky molekulárních analýz, má při velkém zvětšení (63x) na místě exprese GFP jakoby jasně zářící zelená ložiska, shluky buněk, připomínající krystalky (obr. 10 a 11). Pro studium bylo vždy důležité souběžně pozorovat kontrolní netransformované explantáty (obr. 9). Poznat GFP pozitivní rostlinu při vizuální detekci si vyžádalo určitou zkušenost a praxi a jedná se spíše o empirickou záležitost. Největší intenzitu fluorescence jsem pozoroval na střížných plochách explantátů, naproti tomu na čepelích děložních lístků se objevovaly pouze jakési fluoreskující „ostrůvky“, a u některých hypokotylů jen podélné fluoreskující pruhy. Nicméně i tyto oblasti fluorescence byly lokalizovány do míst poranění jednotlivých explantátů, s největší pravděpodobností způsobených nástroji při přípravě tkání před kokultivací. Z pozorování tedy bylo patrné, že fluorescence GFP se přednostně vyskytovala v místech poranění rostlinných pletiv, do kterých mohly vniknout bakterie *A. tumefaciens*. V těchto místech pak docházelo přednostně k tvorbě kalusů a následně i výhonů (regenerantů). Jakmile se začaly na kalusech tvořit regeneranty, začala být vizuální detekce GFP velmi nesnadná a nepříliš neobjektivní.

Obr. 9. Kontrolní explantáty odrůdy Biltstar (zvětšení 40x)– je zřetelné, že vykazují pouze minimální fluorescenci (vlevo část děložního lístku, vpravo hypokotylu).



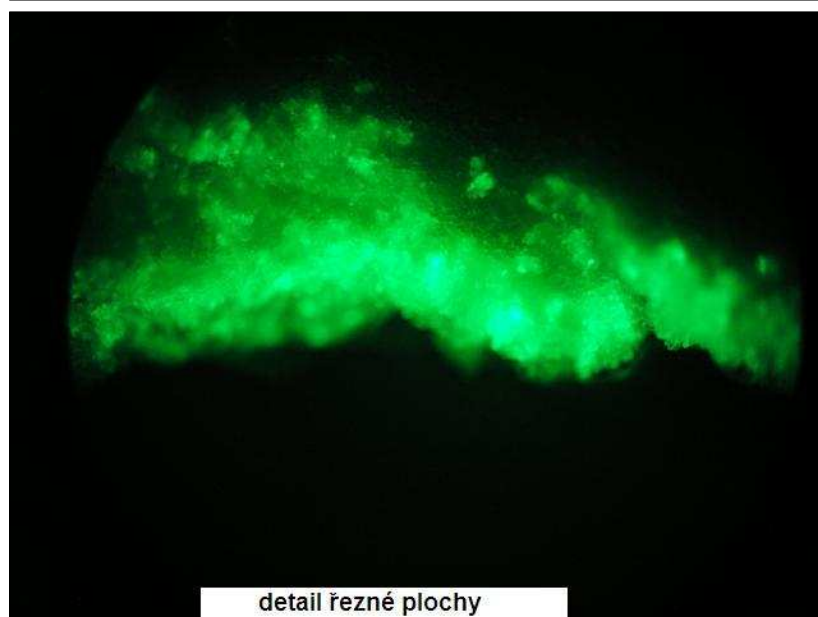


Obr. 10(a-f). Fotografie explantátů děložních lístků odrůdy Biltstar s GFP fluorescencí při různých zvětšeních. Jedná se o explantáty z prvního transformačního pokusu.

obr. 10a (zvětšení 45x): explantát děložního lístku ve stadiu 10 dní po transformaci. Fluorescence je nejmarkantnější v okolí střížné plochy, naopak zbytek čepele vykazuje fluorescenci pouze minimální



obr. 10b (zvětšení 45x): kalus tvořící se na explantátu z děložního lístku. Jak je z obrázku patrné, kalusy jsou místy silné fluorescence, nejspíše v důsledku integrace transgenů *gfp*

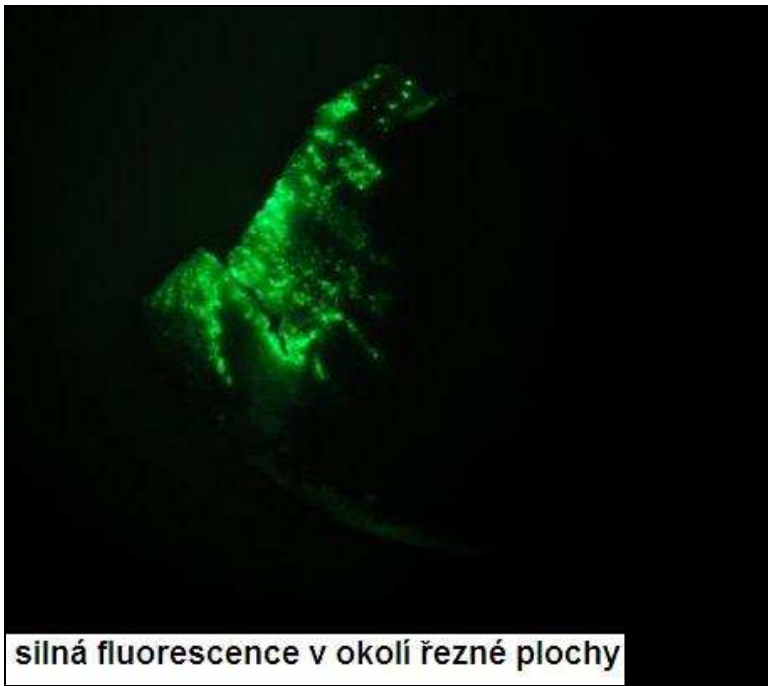


obr. 10c (zvětšení 63x): na tomto detailním snímku je dobře vidět, že fluoreskující oblasti se skládají z jasně zářících oblastí vzniklých dělením transformovaných buněk

detail fluoreskujícího ložiska
na děložním lístku



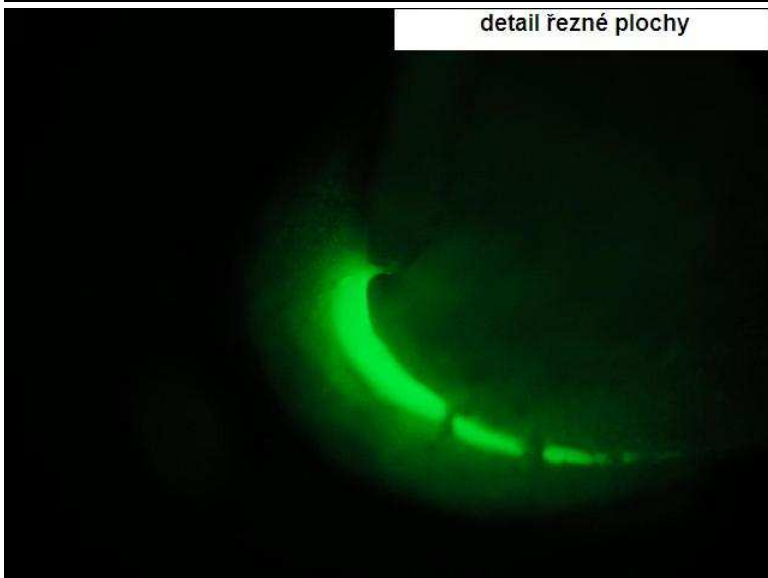
obr. 10d (zvětšení 50x): čepele
děložních lístků obecně vykazují
slabou fluorescenci, ale na některých
explantátech se místy vyskytují
takovéto shluky fluoreskujících buněk
svědčících o proběhlé transformaci



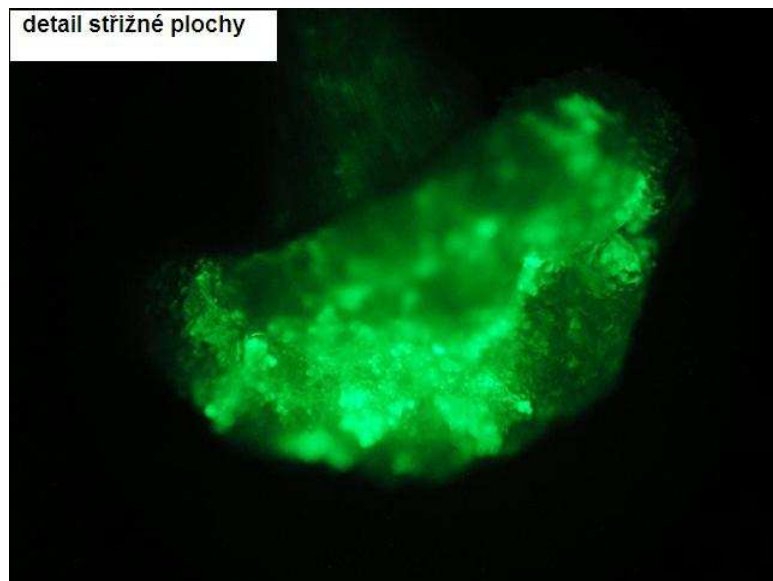
silná fluorescence v okolí řezné plochy

obr. 10e (zvětšení 45x)

detail řezné plochy

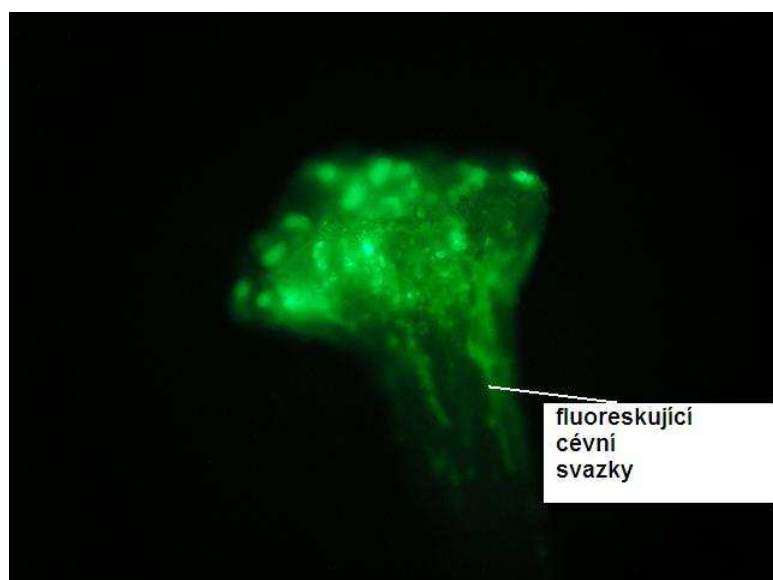


obr. 10f (zvětšení 50x)

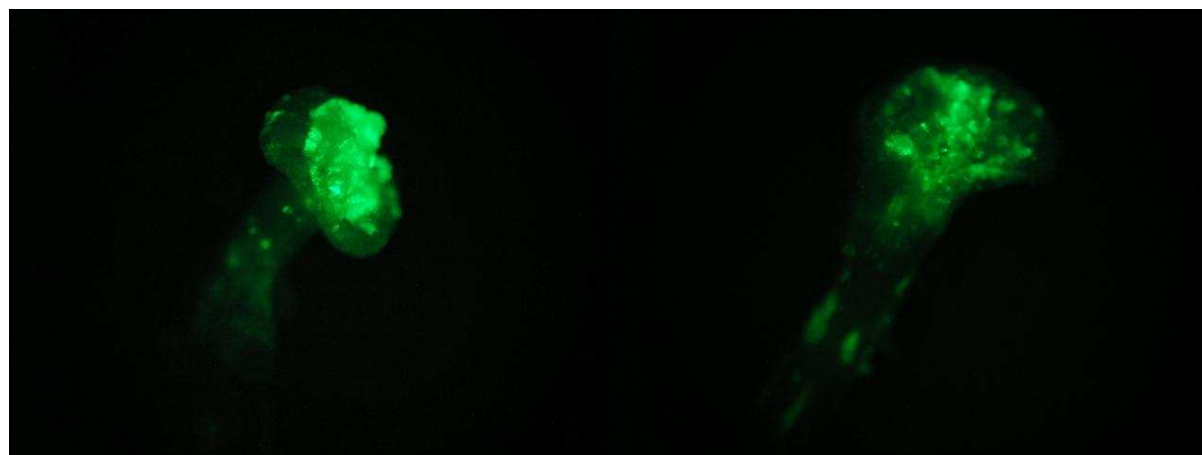


Obr. 11 (a-c). Fotografie hypocotylů (z prvního transformačního pokusu) odrůdy Biltstar s GFP fluorescencí.

obr. 11a (zvětšení 63x): střížná plocha je, podobně jako u děložních lístků, místem nejintenzivnější fluorescence



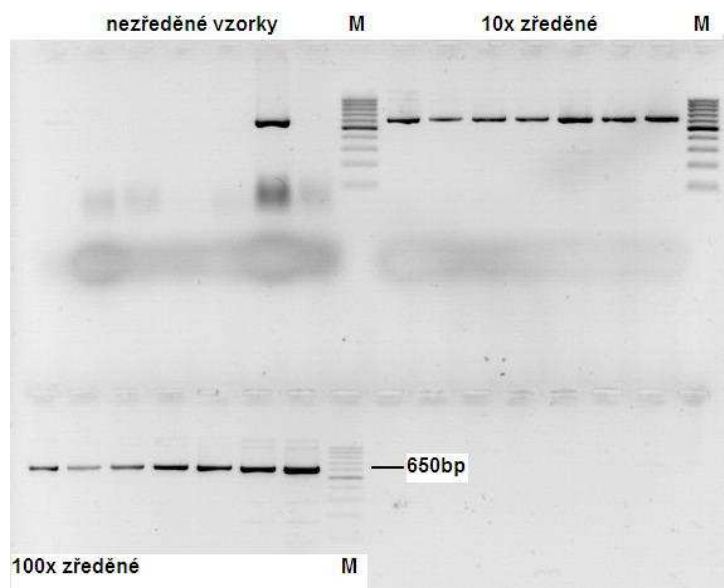
obr. 11b (zvětšení 55x): u některých hypocotylů jsou silným zdrojem fluorescence také vodivá pletiva, což naznačuje, že došlo k transformaci buněk cévních svazků



obr. 11c (zvětšení 50x): explantáty segmentů hypocotylů ve stádiu 10 dní po transformaci

4. 4. Molekulární detekce

Jak jsem ve své práci prokázal, u strašících prýtlů již byla vizuální detekce fluorescence GFP velice obtížná, nicméně tyto již skýtaly dostatečnou velikost pro odběr vzorků pro izolace DNA a tedy ověření přítomnosti příslušného transgenu *gfp* v pletivech molekulárními metodami. Součástí mé práce nebylo převedení rostlinek do půdního substrátu, proto jsem je v závěrečných fázích pokusu použil k izolacím celkové DNA a následné detekci genu pro GFP pomocí PCR celých výhonů či kalusů. Jak se ukázalo v úvodní etapě práce, má DNA po izolaci některými metodami nejspíše na sobě stále ještě navázány různé proteiny či jiné inhibiční látky, které patrně brání nasednutí primerů a správné funkci DNA polymerázy. Výsledky PCR detekcí jsou pak často obtížně intrerpretovatelné. S touto komplikací se však bohužel setkávají i jiné laboratoře pracující se lnem (ústní sdělení). Východiskem by patrně bylo získání absolutně čisté DNA po přečištění v gradientu CsCl, ale tato metoda je dosti pracná a vyžaduje mnohem větší množství výchozího rostlinného materiálu než jsem měl k dispozici. Nicméně po konzultacích s partnerským pracovištěm (Agritec, s.r.o., Šumperk) jsem se pokusil ředěním snížit koncentraci inhibičních látek v roztoku DNA.. Získanou DNA jsem tedy zředil 10× (2 ml vzorku DNA + 18 ml redestilované vody) nebo až 100× (2 ml desetkrát zředěné DNA + 18 ml vody). Pro kontrolu správného zředění DNA jsem při PCR použil primery FAD3A, které detekují sekvence vlastní pro rostlinnou DNA (obr. 12).



Obr. 12. Produkty PCR s primery FAD3A analyzované elektroforézou na agarózovém gelu při použití různých zředění DNA – 0× (nahore vlevo), 10× (vpravo nahore) a 100× (vlevo dole). M – 1 kbp standard molekulové hmotnosti DNA. PCR byla pro každé ředění provedena v 7 opakováních se stejným vzorkem DNA. U nezředěných vzorků proběhla amplifikace pouze v jednom případě. Už 10 násobné naředění však razantně zvýšilo účinnost PCR. Další ředění DNA patrně již nemělo výraznější vliv na průběh PCR..

Z výsledků PCR reakcí jsem zjistil, že ani 100 násobné zředění roztoků DNA nemá negativní vliv na výsledky reakce. Naopak, zdá se že reakce probíhala lépe než s nezředěnou DNA (viz. obr.12). Zředěním DNA se mi patrně podařilo dosáhnout výrazného snížení inhibičních látek, přičemž v roztoku zůstal dostatečný počet molekul DNA, nutný pro zdárný průběh PCR reakce. Tento fakt jsem již však nijak dále nesledoval a spokojil jsem se pro další práci s příznivým výsledkem reakce.

Pro vlastní detekci genu pro GFP se ukázaly být nejvhodnější primery GFP5 Eady nebo GFP5 u/1 . Pro kontrolu přítomnosti/ nepřítomnosti agrobakteria v rostlinném materiálu jsem používal primery Vir A1/2, detekující sekvenci ve vir-oblasti, což je část plazmidu, která se do rostliny nepřenáší.

4. 5. Transformační pokus 1

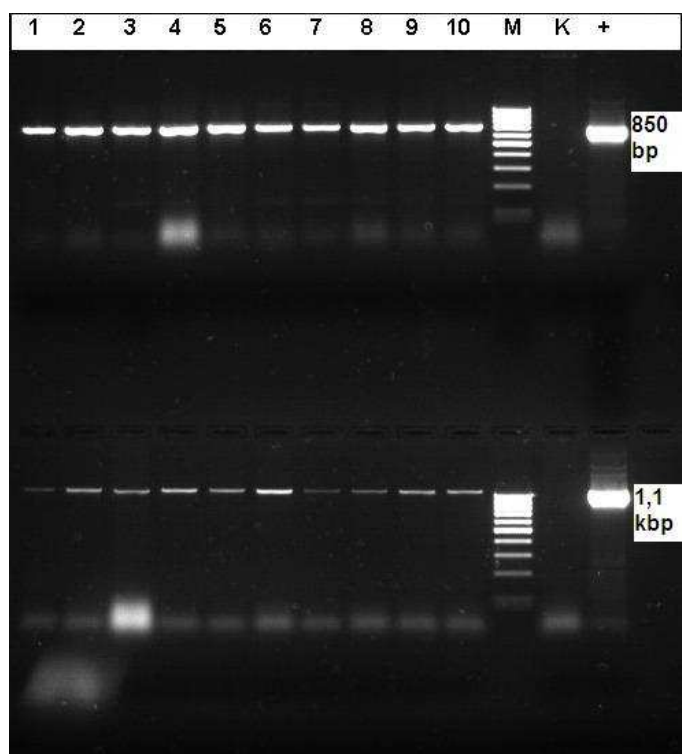
V tomto pokusu jsem se mimo jiné zaměřil i na vliv způsobu aplikace Claforanu na účinnost debakterizace. Po třídní kokultivaci na C médiu by se měla zahájit eliminace agrobakteria z rostlinného materiálu. Prvním krokem standardní metodiky používané v naší laboratoři je propláchnutí explantátů v koncentrovaném roztoku Claforanu (100 mg l^{-1}). V daném případě jsem se rozhodl tento krok ve snaze podpořit regenerační schopnosti explantátů vynechat a debakterizaci provádět pouze prostřednictvím antibiotik v kultivačních médiích.

Jak bylo zjištěno při následném mikroskopickém pozorování explantátů, intenzita fluorescence byla velmi silná už bezprostředně po kokultivaci, což bylo pravděpodobně důsledkem intenzivní transienční exprese. Asi měsíc po transformaci jsem odebral fluoreskující kalusy (na některých již byly drobné výhony) a izoloval z nich DNA. Konkrétně jsem měl k dispozici celkem 13 vzorků DNA (7 od odrůdy Biltstar, 5 od cv. Venica), u kterých jsem provedl PCR, nejprve s primery GFP-5. U dvanácti vzorků byla přítomnost genu GFP prokázána.

Poté jsem u stejných vzorků provedl kontrolní PCR s primery VIR A1/2, detekující sekvence *vir*-oblasti bakteriálních plasmidů. Výsledek byl pozitivní u deseti vzorků. U těchto jedinců tedy molekulární analýza sice prokázala přítomnost genu pro GFP, nicméně na základě výsledků PCR s primery pro *vir* oblast Ti plazmidu nelze jednoznačně určit, jestli templátem pro PCR byla DNA z rostlin či z přežívajících bakterií *A. tumefaciens*. Tento výsledek potvrdil, že vynechání razantního promývání explantátů v procesu debakterizace má

významný vliv na prodloužení doby setrvání bakterií v rostlinných tkáních a ve svém důsledku vede k jejich nežádoucí kontaminaci a možným falešně pozitivním výsledkům. Explantáty jsem tedy dodatečně promyl v roztoku Claforanu (1000 mg l^{-1}) a nasadil je na regenerační médium se zpětně zvýšenou koncentrací antibiotika Timentin ($z 250 \text{ mg l}^{-1}$ na 500 mg l^{-1}).

V závěrečné fázi pokusu (zhruba 4 měsíce po transformaci) jsem měl k dispozici 29 výhonů, z nichž jsem izoloval DNA a opět provedl PCR. Z toho 27 vzorků bylo pozitivních na detekci *gfp* genu, a z těchto vzorků byl u 24 pozorován pozitivní signál při detekci vir-oblasti (obr. 13).



Obr. 13. Výsledky PCR detekce genu *gfp* a vir-oblasti. Vzorky DNA pocházely z výhonů odrůdy Biltstar (1–10: transformované rostliny, K: kontrolní, DNA z netransformované rostliny), + pozitivní kontrola (plazmid pBIN). Nahoře byly použity primery Eady GFP5, dole stejné vzorky, ale s primery VIR-A1/2. M – 1 kbp standard molekulové hmotnosti. Všechny vzorky na gelu se sice ukázaly být *gfp* pozitivní, zároveň ale u všech byla potvrzena přítomnost agrobakteria.

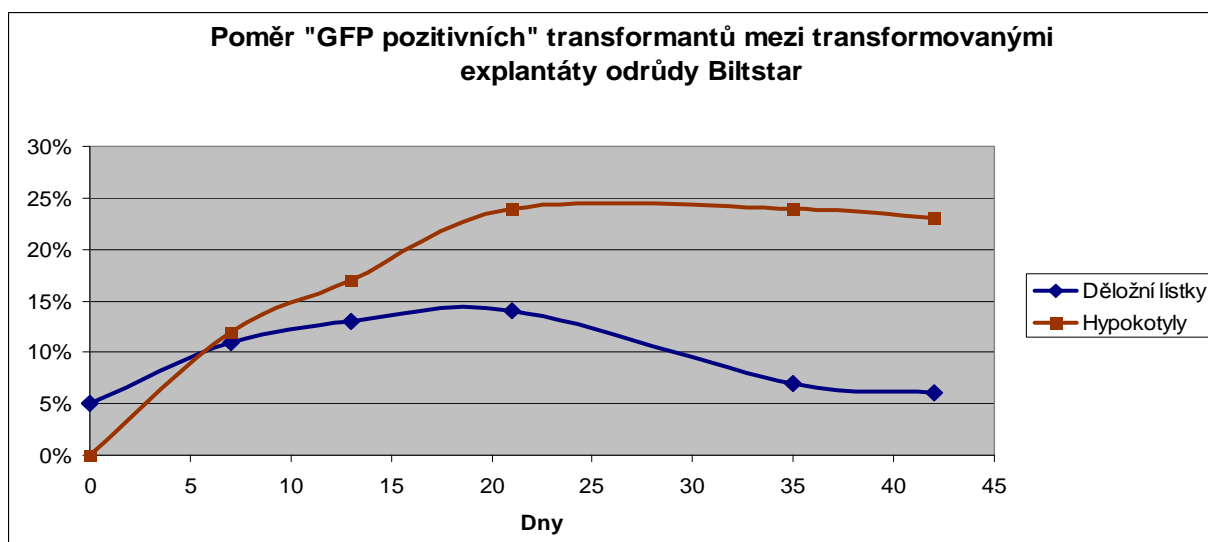
Pozitivní výsledek při detekci sekvencí charakteristických pro *vir*-oblast jasně indikuje, že se agrobakteria i přes dodatečné promytí explantátů v Claforanu a opětovném zvýšení koncentrace antibiotik nepodařilo zcela eliminovat a v explantátech přetrvala i po čtyřech měsících. Nemohl jsem tedy s jistotou tvrdit, že dříve pozorovaný signál pro GFP pochází pouze z rostlinné DNA. Přítomnosti bakteriální DNA definitivně prokázala nezbytnost razantní dekontaminace a z dalších transformačních pokusů jsem již tento krok nevylučoval.

4. 6. Transformační pokus 2

V dalším pokusu jsem se rozhodl zpřísnit debakterizaci a také se více zaměřit na vizuální detekci fluorescence GFP. Explantáty jsem po kokultivaci na C médiu bez antibiotik promyl v roztoku Claforanu (1000 mg l^{-1}) a koncentraci Timentinu v regeneračním médiu jsem postupně snižoval z 500 mg l^{-1} , vždy po 4 týdnech. Počáteční GFP fluorescence byla výrazně nižší než při prvním pokusu, nejspíše díky tomu, že jsem promytím explantátů v Claforanu značně omezil setrvání buněk agrobakteria v explantátech a v důsledku tak snížil úroveň transientní exprese. Při vizuální detekci jsem si vždy označil kalusy, které vykazují fluorescenci, a předpokládal tedy, že jsou *gfp* pozitivní (viz tab. 3 a graf 1).

Doba po transformaci [dní]	Kontrola		Bakterizované explantáty			
	D [ks]	H [ks]	D (GFP+) [ks]	D (celkem) [ks]	H (GFP+) [ks]	H (celkem) [ks]
Biltstar						
7 (Ti 500)	26	19	4	87	0	207
14	26	19	10	87	24	207
21	26	19	11	87	36	207
28	26	19	12	87	50	207
35 (→ Ti 350)	19	19	6	87	47	196
42	19	19	6	87	47	196
Venica						
7 (Ti 500)	9	46	2	31	15	227
14	9	46	3	31	15	227
21	9	46	6	31	16	227
28	9	46	12	31	23	227
35 (→ Ti 350)	7	30	4	21	22	132
42	7	30	4	21	22	132

Tab. 3. Počty hodnocených explantátů lnu v transformačním pokusu č. 2 v průběhu kalogeneze a regenerace, nahoře pro odrůdu Biltstar, dole pro odrůdu Venica. Levý sloupec ukazuje dobu, která uplynula od transformace, případně jaká byla koncentrace Timentinu v médiu, na které byly explantáty přesazeny. Data jsou rozdělena podle typu orgánu – hypokotyly (H) a děložní lístky (D). Explantáty, které vykazovaly GFP fluorescenci, jsou označeny GFP+.



Graf 1. Vývoj poměru transformovaných explantátů z celkového počtu bakterizovaných explantátů, u nichž jsem pozoroval GFP fluorescenci, během kalogeneze a organogeneze.

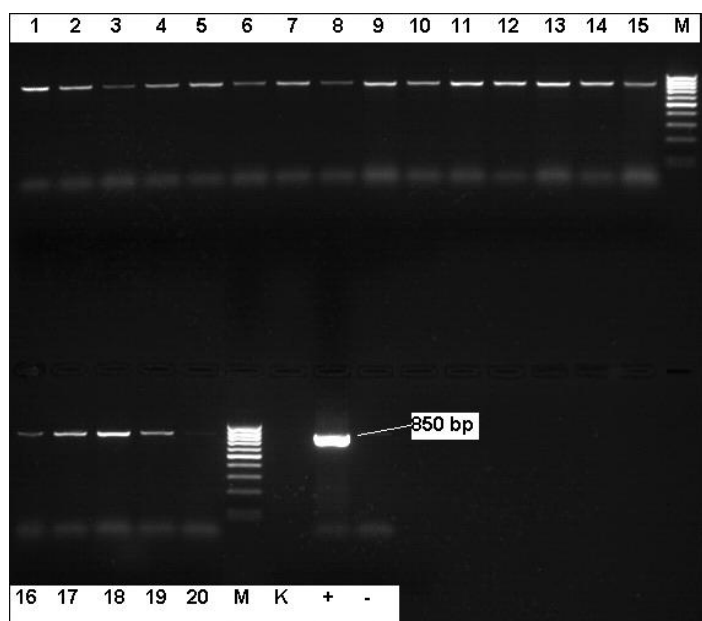
Jak je patrné z tabulky 3 a z grafu 1, větší podíl potenciálních transformantů se nacházel mezi segmenty hypokotylů než u děložních lístků. Zhruba do 20. dne se počet fluoreskujících explantátů postupně zvyšoval, poté se ustálil- v případě hypokotylů, nebo dokonce začal klesat, v případě děložních lístků. Co se týče odrůdy Venica, výsledky je nutno brát s větší rezervou, neboť autofluorescence byla u této odrůdy značně vysoká. Obecně, po 40. dnu už fluorescenci explantátů většinou nebylo možno pozorovat díky tvořícím se výhonům. Výhony, které jsem získal z GFP pozitivních kalusů, jsem si také označil, abych poté mohl srovnat výsledky vizuální a molekulární detekce.

První sérií výhonů regenerovaných z kalusů (celkem 43) jsem odebral 4 týdny po transformaci, přičemž jsem si označil ty, které jsem získal z explantátů, u nichž jsem pozoroval fluorescenci. Jejich klonováním jsem postupně zvyšoval počet rostlin, nicméně mnoho regenerantů podlehl nekrotizaci nebo kontaminaci, takže jejich konečný počet se o tolik nezvýšil. Druhou sérii výhonů jsem odebral z kalusů 8 týdnů po transformaci (celkem 65 výhonů) a jejich počet se pak dokonce pomalu snižoval. 16 týdnů po transformaci jsem klonování výhonů ukončil a provedl izolaci DNA u nejlepších exemplářů (viz tab. 4).

Doba po transformaci [týdnů] a koncentrace Timentinu [mg . l ⁻¹]	Biltstar				Venica	
	Celkový počet výhonů	T (celkem)	T (GFP+)	K	T	K
První výhony						
4 (→ 350 Ti)	43	32	10	1	5	3
8 (→ 250 Ti)	49	40	13	1	3	5
12 (→ 150 Ti)	58	49	12	2	4	3
16 - izolace DNA	22	20	9	2		
Druhé výhony						
8 (→ 250 Ti)	65	48	17	8	7	2
12 (→ 150 Ti)	54	44	19	5	4	1
16 - izolace DNA	20	17	9	3		

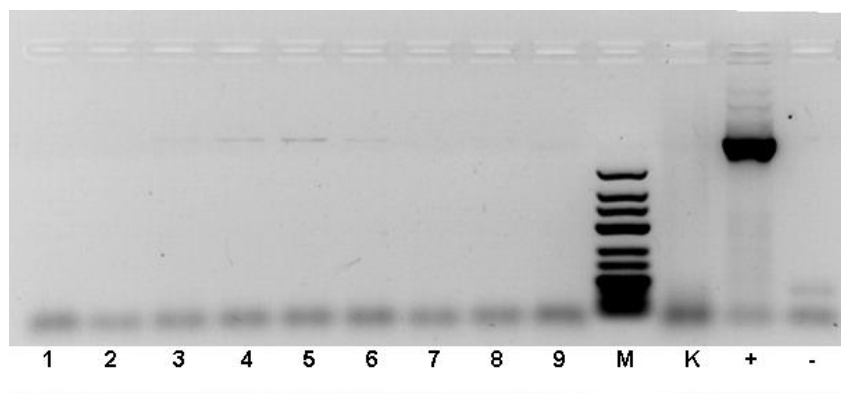
Tab. 4. Počty výhonů, které jsem odebral ve dvou sériích, množil na klonovacím médiu a kde jsem mikroskopicky hodnotil fluorescenci původních explantátů. Vlevo je v týdnech uvedena doba, jaká uplynula od transformace a koncentrace Timentinu (Ti) v klonovacím médiu, na které jsem je přesazoval. GFP+ jsou označeny výhony, které jsem odebral z explantátů vykazujících fluorescenci; T – výhonů z potenciálně transformovaných explantátů; K - kontrolní výhony odvozené z netransformovaných explantátů

DNA jsem izoloval pouze ze vzorků pocházejících z odrůdy Biltstar, protože všechny výhony z odrůdy Venica byly poměrně rozsáhle nekrotizované. Z první série výhonů jsem získal 20 vzorků DNA, z druhé série 17. Celkem jsem tedy měl 37 vzorků DNA, přičemž jsem se soustředil hlavně na ty, které pocházely z kalusů vykazujících fluorescenci (těch jsem měl celkem 18). Nejprve detekci genu *gfp* pomocí primerů GFP5 Eady. Téměř u všech vzorků (34 ze 37) byl výsledek pozitivní (viz obr. 14) – přítomnost genu *gfp* u nich byla tedy prokázána.



Obr. 14. Ukázka výsledků molekulární detekce transgenu *gfp* u některých vzorků DNA z regenerovaných výhonů odrůdy Biltstar, získaných v rámci pokusu 2. Při PCR byly použity primery Eady GFP5. 1–20: transformované vzorky; K: kontrolní vzorek (DNA z netransformované rostliny); +: pozitivní kontrola (plazmid pBIN); -: negativní kontrola (Master mix bez DNA); M - 1 kbp standard molekulové hmotnosti. Přítomnost genu *gfp* byla v tomto případě prokázána u všech vzorků, kromě jednoho.

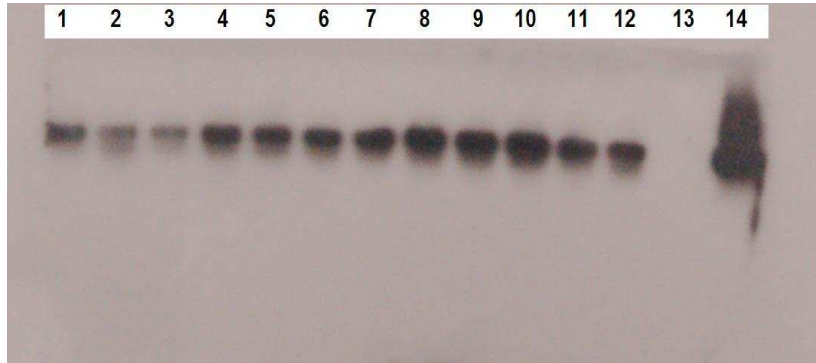
Vzorky výhonů pocházejících z explantátů, které jsem si během vizuální detekce označil jako GFP pozitivní, jsem pak podrobil detekci vir-oblasti pomocí primerů VIR A1/2. Z 16 vzorků, u nichž jsem molekulární analýzu provedl, byly pouze 2 průkazně pozitivní (obr. 15), což znamená že agrobakterium bylo z rostlinného materiálu se značnou pravděpodobností již v dané době eliminováno.



Obr. 15. Ukázka elektroforeogramu produktů PCR reakce s primery VIR A1/2 pro detekci bakteriální vir-oblasti ve vzorcích regenerantů odrůdy Bilstar z 2. transformačního pokusu. 1 – 9: transformované rostliny; K: netransformovaná rostlina; +: pozitivní kontrola (plazmid pBIN); -: negativní kontrola (PCR Master Mix bez templátové DNA); M: 1kbp standard molekulové hmotnosti. U vzorků 4 a 5 je patrný pruh poukazující na přítomnost *vir* oblasti ve vzorku DNA, avšak u drtivé většiny vzorků nebyla zjištěna přítomnost přeživších bakterií.

U vybraných jedinců, kteří byli odděleni z intenzivně fluoreskujících kalusů a u kterých byla na základě PCR potvrzena přítomnost genu *gfp* a zároveň vyloučena přítomnost bakterií *A. tumefaciens* jsem provedl další PCR, tentokrát s primery GFP5. Protože jsem měl rovněž k dispozici DNA sondu pro *gfp* gen, rozhodl jsem se provést u těchto vzorků ověření sekvenční specifity získaných produktů PCR pomocí Southern-blot hybridizace za vysoké stringency promývání. Získaný pozitivní signál na fotografickém filmu potvrdil vysokou specifitu a přesnost proběhlé PCR (viz obr 13).

Obr. 15. Fotografie membrány po southern-blot hybridizaci PCR produktů se specifickou sondou pro gen *gfp*. Membrána byla vystavena 15 min expozici ve fotografické kazetě. 1-12, PCR produkty z DNA pocházející z transgenní DNA, 13 značí PCR směs s kontrolní DNA, pocházející z netransformované rostliny. 14 značí pozitivní kontrolu (plazmidovou DNA). Hybridizace prokázala, že se gen *gfp* nacházel ve všech vzorcích, a integrována byla pouze jedna kopie genu



5. Diskuse

Cílem mé diplomové práce bylo posouzení možnosti využití projevu markerového genu *gfp* pro zeleně fluoreskující protein (GFP) jako alternativní metody k případné budoucí selekci transformovaných pletiv a rostlin *lnu*, který je poměrně obtížným objektem některých biotechnologických studií a aplikací (Millam *et al.*, 2005). Stěžejní částí mé práce byla vizuální detekce fluorescence, jakožto projevu exprese genu *gfp* u transformovaných rostlin. Tu jsem prováděl pomocí speciálního binokulárního mikroskopu se zdrojem UV záření. Takovouto průkaznost přítomnosti genového produktu GFP, zvláště v případě *lnu*, je však nutno brát s určitou rezervou, neboť pozorování pouhým okem, byť při velkém zvětšení binokulárního mikroskopu může být zatíženo poměrně velkou chybou (Hraška, 2003). Značné komplikace se studiem projevů GFP u *lnu* prezentovaly i některé zahraniční laboratoře zabývající se touto problematikou (Jordan, 2006 – nepublikované ústní sdělení). Nicméně lze takto na základě fluorescence GFP usuzovat na transgenní charakter pozorovaných buněk a tkání a provádět prvotní selekci získaného materiálu. Právě s ohledem na časnou selekci a snahu co nejdříve vybrat nejlepší materiál pro další práci dnes stoupají nároky na možnost nejenom sledovat prostou přítomnost GFP, ale také kvantitativně hodnotit studovaný materiál. Toto však nebylo předmětem mé práce. Danou otázku by bylo nejspíše možné spolehlivě posoudit na základě objektivního hodnocení množství emitovaného záření GFP analýzou obrazu (Hraška, 2005). Na druhé straně problém hodnocení genové exprese tímto způsobem již nebyl předmětem tohoto vstupního studia vzhledem ke své komplexnosti a náročnosti.

Zřetelnou GFP fluorescenci jsem u řady explantátů pozoroval ihned po kokultivaci s bakteriemi *A. tumefaciens*, tj. zhruba po čtvrtém dnu. S největší pravděpodobností se však jednalo o následek transientní exprese (Elliot *et al.* 1999), neboli expresi genu *gfp*, dosud nezačleněného do rostlinného genomu. To by potvrdzoval i fakt, že při prvním pokusu, kdy jsem explantáty po kokultivaci nepromyl v Claforanu, tyto explantáty prokazovaly větší úroveň fluorescence (rozsahem i intenzitou) než při druhém pokusu, při němž jsem debakterizaci v roztoku Claforanu provedl a agrobakterií v rostlinné tkáni se proto muselo nacházet méně. Intenzita fluorescence pak během několika dní jakoby zeslábla, pravděpodobně následkem degradace nezačleněné T-DNA nebo „umlčení“ integrované T-DNA (gene silencing). Tento jev je běžný i u jiných markerových genů, jako např. *uidA* (GUS) (Rakouský *et al.* 1997). Protože jsem si byl skutečnosti transientní exprese vědom, začal jsem fluorescenci řádně vyhodnocovat až zhruba týden po kokultivaci. Lze předpokládat, že v této fázi pokusu probíhala nejučinnější debakterizace, neboť explantáty se

nacházely na kultivačním médiu s vysokou koncentrací eliminačních antibiotik, což v konečném důsledku také snižovalo výskyt a projevy transientní exprese. Úroveň fluorescence začala vzrůstat zhruba po dvou týdnech, což už jsem považoval za důsledek růstu a dělení buněk se stabilně integrovaným transgenem. Fluorescence byla zpočátku patrná nejvíce na střižných plochách či jiných poraněných částech. Později se začala objevovat další fluorescenční ložiska v podobě drobných jasně zelených „krůpějí“ na čepelích děložních lístků a podélných pásů na hypokotylech. Podle mého názoru tyto pásy kopírovaly probíhající cévní svazky a mechanická poranění způsobená během manipulace s rostlinným materiálem. Vyšší intenzitu fluorescence u vodivých pletiv lze vysvětlit buď tím, že exprese genu *gfp* (přesněji CaMV 35S promotoru) je částečně orgánově specifická (Hraška 2003) nebo mají vodivá pletiva větší afinitu k infekci agrobakteriemi (Maximova *et al.* 1998). Jak však ukazují výsledky některých nejnovějších prací (Hraška *et al.* 2008a), i přes obecně prezentovaný konstitutivní charakter tohoto promotoru, skutečně nejvyšší úroveň fluorescence je zpravidla vázána na vodivá pletiva.

U kontrolních (netransformovaných) explantátů odrůdy Biltstar jsem také někdy pozoroval určitou úroveň fluorescence na pozadí, oproti transformovaným však většinou byla nesrovnatelně nižší. Tato slabá fluorescence mi zpravidla nebránila v úspěšné detekci GFP fluorescence. Existují i různé filtry, pomocí nichž lze slabé autofluorescenci zabránit či ji alespoň omezit (Maximova *et al.* 1998, Elliot *et al.* 1999). U odrůdy Venica ale byla situace odlišná - kontrolní explantáty totiž vykazovaly stejnou úroveň fluorescence jako transformované. Tato silná autofluorescence mi bránila ve spolehlivé detekci GFP fluorescence a vysvětluji si ji tím, že v tkáních odrůdy Venica se vyskytují sloučeniny, které emitují světlo se stejnou vlnovou délkou jako zeleně fluoreskující protein (Hraška a Rakouský, 2005).

U pupenů na kalusech, z nichž později vyrostly výhony, jsem mohl fluorescenci ještě pozorovat, s růstem výhonu ale signál velmi rychle slábl a u vlastních výhonů už jsem žádnou fluorescenci nezaznamenal. Příčinou se zdá být zvyšující se obsah chlorofylu (případně nějakého jiného rostlinného pigmentu) přítomného v listech. Jiné výzkumy na dalších rostlinných objektech prokázaly GFP fluorescenci i u starších rostlinek, a to u jak jednotlivých buněk (např. průduchy, Kim *et al.* 2004), tak i celých orgánů, většinou však s nízkým obsahem chlorofylu, jako jsou květní lístky, tyčinky, pestíky, kořeny (Elliot *et al.* 1999). Podobná situace byla těž prezentována v případě mladých rostlinek a semenáčků (Kamaté *et al.* 2000). Chlorofyl totiž vykazuje silnou červenou autofluorescenci, která interferuje se zelenou fluorescencí GFP a zastíňuje ji (Cho *et al.* 2000). Některým autorům se

podářilo úspěšně detekovat GFP fluorescence i přes chlorofylové pozadí (Goldman *et al.* 2003), použitím různých sad filtrů, které zesilují GFP signál oddělením nežádoucí autofluorescence (Ahlandsberg *et al.* 1999). Interference s autofluorescencí chlorofylu je nejpravděpodobnějším vysvětlením ztráty fluorescence u zelených výhonů, ale existují i jiné teorie, jako ontogeneticky specifická exprese promotoru CaMV 35S (Ponappa *et al.* 1999); změna hustoty buněčné cytoplasmy vlivem zvětšujících se vakuol bez GFP (Maximova *et al.* 1998); nebo umlčení (silencing) genu *gfp* (Voinett a Baulcomb 1997).

Pouze pro úplnost dodám, že kromě cílového genotypu a tkáně se úroveň GFP fluorescence může lišit podle použitého promotoru. U embryí ječmene např. bylo prokázáno, že pokud je použit promotor genu pro aktin rýže (*Act1*), projeví se silnější transientní exprese *gfp*, než při použití promotoru genu pro endosperm-specifický hordein (Cho *et al.* 2002).

Při vizuálním sledování fluorescence jsem si označoval explantáty, které prokazatelně vykazovaly GFP fluorescenci a následně i výhony, které jsem z nich získal. Předpokládal jsem, že tyto výhony budou alespoň z části transformované, i když u nich exprese genu *gfp* nebylo možno sledovat vizuálně z důvodů uvedených výše. V závěrečné fázi pokusu jsem se tento předpoklad pokusil prokázat pomocí molekulárních detekcí. Z celkových 37 vzorků DNA jsem měl k dispozici 18 vzorků DNA pocházejících z GFP pozitivních výhonů. Molekulární detekce genu *gfp* byla pozitivní u všech těchto vzorků a detekce bakteriální *vir*-oblasti byla pozitivní pouze u dvou, což znamená, že signál pro gen *gfp* v převážné většině případů pocházel z rostlinné DNA. Z tohoto zjištění je tedy patrné, že lze vizuální pozorování fluorescence GFP využít jako účinný nástroj pro sledování exprese transgenů v rostlinách lnu. Na základě takovýchto pozorování je tedy možné provádět účinnou prvotní selekci získaného materiálu. Při transformaci fúzním genem by tak bylo možné pomocí GFP fluorescence snadno odlišit transformované explantáty mezi všemi potenciálními transformanty. Momentálně mí kolegové provádějí slibné pokusy o transformaci lnu fúzním genem *gfp-SPI2* (gen pro rezistenci vůči některým hmyzím škůdcům) využívající GFP jako signálu.

V předchozím pokusu jsem provedl ten samý postup, kdy jsem izoloval DNA z explantátů ve fázi asi měsíc po transformaci. Kromě jednoho byla u všech 13 vzorků prokázána přítomnost genu *gfp*. Následná PCR s použitím primerů specifických pro *vir*-oblast však prokázala přítomnost agrobakterií u deseti z testovaných vzorků. Tuto skutečnost jsem nepovažoval za nic zvláštního, neboť jsem si byl vědom, že 4 týdny po transformaci ještě nemohou být všechny bakterie z rostlinné tkáně eliminovány. Proto jsem molekulární detekci provedl znovu u 4 měsíce starých výhonů. U 24 vzorků z 27 byla znovu prokázána přítomnost agrobakteria a nemohl jsem proto vyloučit transientní expresi. Jediný rozdíl v transformačním

postupu obou pokusů byl ten, že v prvním pokusu jsem nepromyl explantáty v roztoku Claforanu ihned po kokultivaci. Zdá se tedy, že tento krok je nezbytný pro celou debakterizaci, pravděpodobně důležitější než univerzální debakterizace zprostředkovaná Timentinem. Při vynechání tohoto kroku se bakterie pravděpodobně dostanou hlouběji do rostlinné tkáně, kde je antibiotika přidávaná do kultivačních médií již nedokážou zcela vyhubit.

6. Závěr

Provedl jsem transformaci explantátů lnu setého (*Linum usitatissimum* L.), konkrétně jeho dvou odrůd Biltstar a Venica, konstruktem se signálním genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP), přesněji jeho modifikací *m-gfp5-ER*, s cílem zjistit, zda je možno v budoucnu tento markerový systém využít i pro len. K přenosu transgenů jsem použil bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Expresi tohoto genu, která se projevuje zelenou fluorescencí, jsem pak ověřoval vizuálně pomocí stereomikroskopu se speciálním zdrojem UV záření. Z explantátů, pocházejících z děložních lístků a segmentů hypokotylů zhruba dva týdny starých semenáčků, byly úspěšně regenerovány výhony, které sloužily pro molekulární detekci genu *gfp* pomocí PCR.

Zjistil jsem, že GFP fluorescenci bylo možno pozorovat už bezprostředně po kokultivaci. Protože tato fáze znamená teprve začátek debakterizačního procesu, šlo s největší pravděpodobností pouze o projev transgenů ve stadiu tzv. transientní exprese. Prokazatelně GFP pozitivní explantáty jsem pozoroval až zhruba 2 týdny po transformaci. Úroveň fluorescence se začala mírně zvyšovat, stejně jako počet fluoreskujících explantátů. GFP fluorescence byla nesrovnatelně markantnější na střížných plochách a poraněných oblastech.

V této souvislosti se nabízí možnost využít daných zjištění k vývoji a dalšímu zdokonalování postupů, jak zvýšit účinnost transformace u lnu. V naší laboratoři se mí kolegové např. nyní zabývají zefektivněním transformačních postupů pomocí sonikace, neboli vystavení explantátů ultrazvuku, která se zatím jeví jako poměrně perspektivní.

S postupně se tvořícími výhony, tedy kolem 4. týdnu po transformaci, začala intenzita fluorescence rapidně klesat, nicméně u explantátů, které byly na výhony chudší, byla patrná i po šesti týdnech. U samotných výhonů jsem už nepozoroval fluorescenci žádnou.

Nutno zdůraznit, že odrůda Venica vykazovala velmi silnou autofluorescenci. Explantáty této odrůdy navíc příliš často podléhaly kontaminacím a nekrotizacím a podařilo se mi získat pouze velmi málo výhonů, se kterými bych pak mohl dále pracovat. Proto tato odrůda není vhodná k transformačním pokusům, používajícím *gfp* jako markerový gen.

V budoucích pracích bych však navrhoval intenzitu emitovaného světla GFP kvantifikovat systémem analýzy obrazu (Hraška *et al.*, 2005). Tím by se jednoznačně odlišila autofluorescence netransformovaných pletiv od fluorescence transformantů a hlavně by systém byl dobře využitelný k výběru transformantů, případně výběru transformantů s nejvyšší úrovní exprese transgenů(ů).

Přítomnost genu *gfp* byla zjištěna v drtivé většině vzorků transformovaných rostlin. U prvního pokusu, při němž jsem transformanty nepromyl v roztoku Claforanu, byla přítomnost agrobakteria v rostlinném materiálu zjištěna prostřednictvím primerů detekujících *vir*-oblast u 10 ze 13 případů ve vzorcích získaných z explantátů zhruba měsíc po transformaci, a u 24 z 27 *gfp* pozitivních vzorků získaných z výhonů v závěrečné fázi pokusu. Přitom eliminaci bakterií nezajistilo ani dodatečné promytí explantátů v roztoků Claforanu a zpětné zvýšení antibiotika Timentinu.

Ve druhém transformačním pokusu jsem explantáty promyl v Claforanu ihned po kokultivaci a prodloužil jsem intervaly mezi snížením koncentrace Timentinu v kultivačních médiích na 4 týdny. Přítomnost genu *gfp* byla prokázána u 34 ze 37 vzorků a pouze u dvou z 18 vzorků pocházejících z GFP pozitivních výhonů jsem zjistil přítomnost agrobakteria. Protože se takto prokázal transgenní charakter většiny regenerantů, postup promytí explantátů včetně jejich závěrečného promytí v Claforanu se tedy zdá být velmi účinný a nezbytný pro odstranění vektorových bakterií z pletiv lnu, a tedy i omezení úrovně transienční exprese GFP.

7. Seznam použité literatury

Ahlandsberg S., Sathish P., Sun Ch., Jansson Ch. (1999): Green fluorescent protein as a reporter system in the transformation of barley cultivars. *Physiol. Plant.* 107: 194-200

Anonym: Green fluorescent protein
http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein

Blumenthal A., Kuznetzova L., Edelbaum O., Raskin V., Levy M., Sela I. (1999): Measurement of green fluorescence protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression. *Plant Sci.* 142: 93-99

Černý J. (2006): Fluorescenční mikroskopie. Učební texty PřF UK, Praha

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13–15

Drobník J. (1997): GMO – geneticky modifikované organismy. *Živa* 2: 51-53

Elliott A. R., Campbell J. A., Dugdale B., Brettell R., Grof C. P. (1999): Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Rep.* 18: 707-714

Gazdová J. (2007): Molekulární analýza transgenních rostlin *Solanum tuberosum* získaných po vnesení genu pro manózo-6-fosfátizomerázu. Magisterská práce BF JU, České Budějovice. 57 s.

Goldman J. J., Hanna W. W., Fleming G., Ozias-Akins P. (2003): Fertile transgenic pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature embryo-derived embryogenic tissues. *Plant Cell Rep.* 24: 482-486

Halfhill M., Millwood R., Stewart C. Jr.: Green fluorescent protein quantification in whole plants. In Peňa L (ed): *Methods in Molecular Biology*, vol. 286: *Transgenic Plants – Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa. Pp. 215-225

Haseloff J. (1999): GFP variants for multispectral imaging in living cells. *Methods Cell Biol.* 58: 139-151

Haseloff J., Siemering K.R. (1998): The uses of GFP in plants. In Chalfie M., Kain S.R. (eds.): *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*. Wiley-Liss Inc., Chichester. Pp. 191-220

Haseloff J., Siemering K.R., Prasher C., Hodge S. (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localisation of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2122-27

Heim R., Cubitt A., Tsien R. (1995): Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-4

Hiei Y., Komari T., Kubo T. (1997): Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Mol. Biol.* 35: 205-218

Hooykaas P. J., Schilperoot R. A. (1992): *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38

Hraška M. (2003): Tvorba a detekce GFP transformantů rostlin. Diplomová práce JU ZF, České Budějovice, 67 s.

Hraška M., Rakouský S. (2005): GFP dedetection in low level signal/noise ratio plant samples. *Journal of applied biomedicine* 3 (Suppl. 1), S1-S58

Hraška M., Rakouský S., Kocábek T. (2005): Use of a simple semiquantitative method for appraisal of green fluorescent protein gene expression in transgenic tobacco plants. *Biol. Plant.* 49: 313-316

Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006): Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86: 303-318

Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2008a): Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* - v tisku

Hraška M., Rakouský S., Čurn V., Heřmanová V. (2008b): Sample topography and position within plant body influence the detection of the intensity of green fluorescent protein (GFP) fluorescence in the leaves of transgenic tobacco. *Plant. Cell Rep.* 27: 67-77

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 : 802-5

Cho M. J., Ha C. D., Lemaux P. G. (2000): Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep.* 19: 1084-89

Cho M. J., Choi H. W., Jian W., Ha Ch. D., Lemaux P. G. (2002): Endosperm-specific expression of green fluorescent protein driven by the hordein promoter is stably inherited in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Physiol. Plant.* 115: 144-154

Jefferson R., Burgess S., Hirsch D. (1986): β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8447-51

Joersbo M., Okkels T. (1996): A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep.* 16: 219- 221

Kamaté K., Rodriguez-Llorente I. D., Scholte M., Durand P., Ratet P., Kondorosi E., Trinh T. H. (2000): Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.* 19: 647-653

- Kobelková A.** (2002): Optimalizace transformačního procesu u lnu setého (*Linum usitatissimum*). Bakalářská práce BF JU, České Budějovice. 45 s.
- Kim C. K., Chung J. D., Park S. H., Burrell A. M., Kamo K. K., Byrne D. H.** (2004): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using green fluorescent protein (GFP) gene. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 78: 107-111
- Langley R. A., Kado C. I.** (1972): Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoguanidine and relationship of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. *Mut. Res.* 14: 277-286
- Maximova S. N., Dandekar A. M., Guiltinan M. J.** (1998): Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol. Biol.* 37: 549-559
- Miki B., McHugh S.** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193–232
- Millam S., Obert B., Pret'ová A.** (2005): Plant cell and biotechnology studies in *Linium usitatissimum*- a review. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 82: 93-103
- McHughen A., Rowland G., Holm F., Bhatti S. Kenaschuk E.** (1997): CDC Triffid transgenic flax. *Can. J. Plant Sci.* 77: 641-3
- Murashige T., Skoog F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.* 15: 473-497,
- Ondřej M.** (2000): Přítomnost a budoucnost transgenních odrůd rostlin. *Živa* 6: 243-245
- Ondřej M., Drobník J.** (2002): Transgenozé rostlin. Academia, Praha. 316 s.
- Ondřej M., Kocábek T., Rakouský S., Wiesnerová D.** (1999): Segregation of T-DNA inserts in the offspring of *Arabidopsis thaliana* after *Agrobacterium* transformation. *Biol. Plant* 42: 185-195
- Penna S., László S., Swennen R.** (2002): Positive selectable marker gene for routine plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 38: 125-128
- Phillips G.** (2001): Green fluorescent protein - a bright idea for the study of bacterial protein localization . *FEMS Microbiol Lett* 204: 9-18
- Ponappa T., Brzozowski A. E., Finer J. J.** (1999): Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Rep.* 19: 6-12
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J.** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229–233

Richards H.A., Han C.T., Hopkins R.G., Failla M.L., Ward W.W., Stewart C.N. (2003) Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J Nutr* 133:1909–1912

Rakoušký S., Tejklová E. (1999): Methods and prospects of flax transgenesis. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 35: 125-9

Rakoušký S., Kocábek T., Vincenciová R., Ondřej M. (1997/98): Transient β -glucuronidase activity after infiltration of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biol Plant* 40: 33-41

Shaner N., Steinbach P., Tsien R. (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2: 905-9

Shinomura O. (1979) Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett* 104:220–222

Stewart C. Jr. (2001): The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 20: 376-382

Tsien R. (1998): The Green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-44

Voinnet O., Baulcombe D. C. (1997): Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389: 553

Yang F., Moss L., Phillips G. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14: 1246-51

8. Příloha - Použitá kultivační média

Tekuté LK médium (Langley a Kado 1972) pro kultivaci *A. tumefaciens*

Složka	Dávka (mg l⁻¹)
Sacharóza	10000
Kasein hydrolyzát	8000
Kvasničný extrakt	4000
KH ₂ PO ₄	2000
MgSO ₄ .7H ₂ O	300

pH 6,5

MS médium s vitamíny B5 (základ)

Složka	mg.l⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
kyselina nikotinová	1,0
pyridoxin HCl	1,0
thiamin HCl	10,0

C médium pro kalogenezi

<u>Složka</u>	<u>Dávka (mg l⁻¹)</u>
sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	1,5
NAA	0,1
Agar	8 000

pH 5,5

R médium (regenerační médium)

<u>Složka</u>	<u>Dávka (mg l⁻¹)</u>
Sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	1
NAA	0,02
Agar	8 000

pH 5,5

K médium (klonovací médium)

<u>Složka</u>	<u>Dávka (mg l⁻¹)</u>
Sacharóza	30 000
Myo-inositol	100
MS soli s vit. B5	4 410
BAP	0,0112
NAA	0,00093
Agar	8 000

pH 5,5