

# Jak vytvořit geneticky modifikovanou rostlinu?

Markéta Šámalová



**Oddělení  
experimentální  
biologie rostlin**

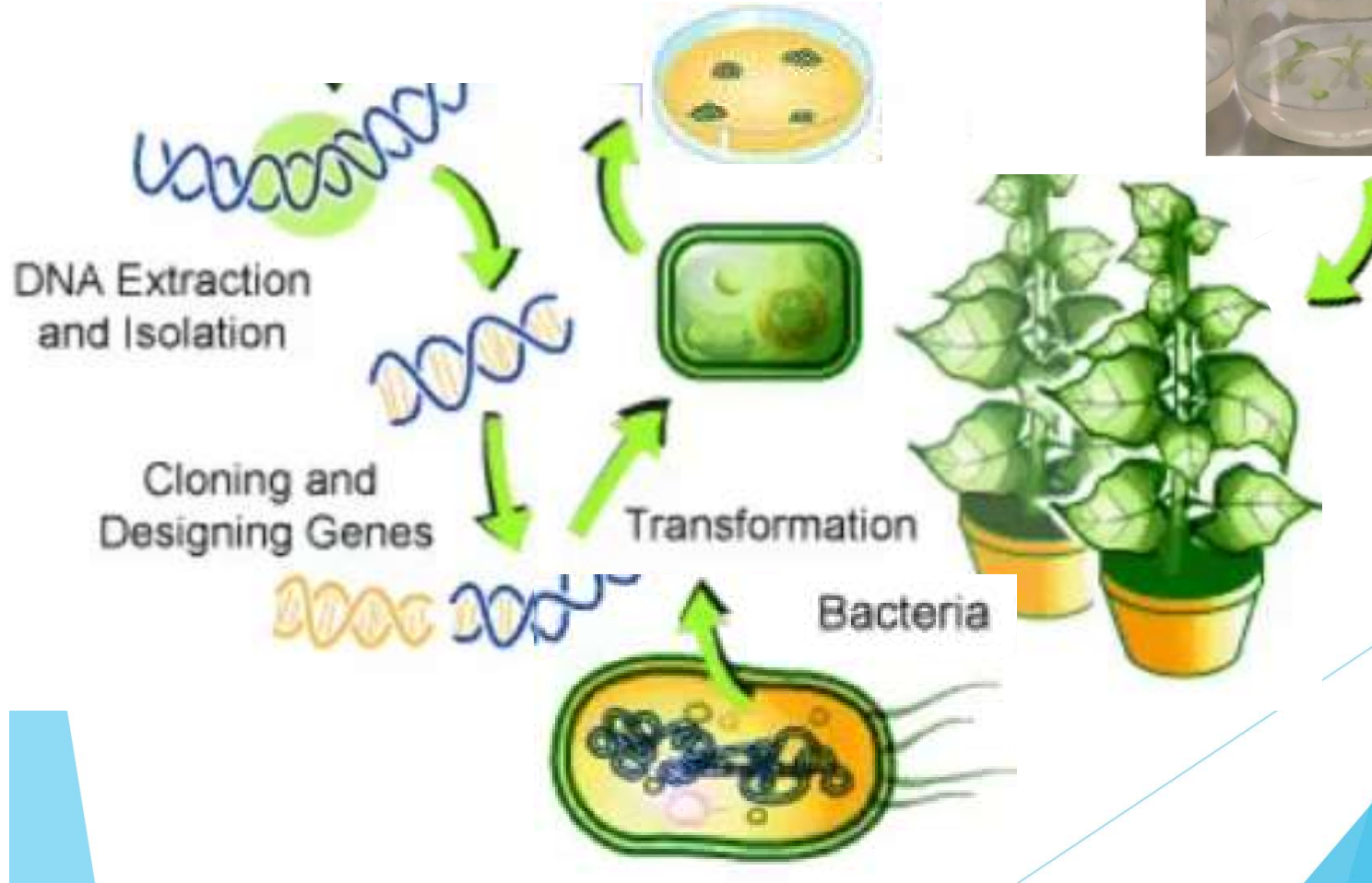


**CEITEC**



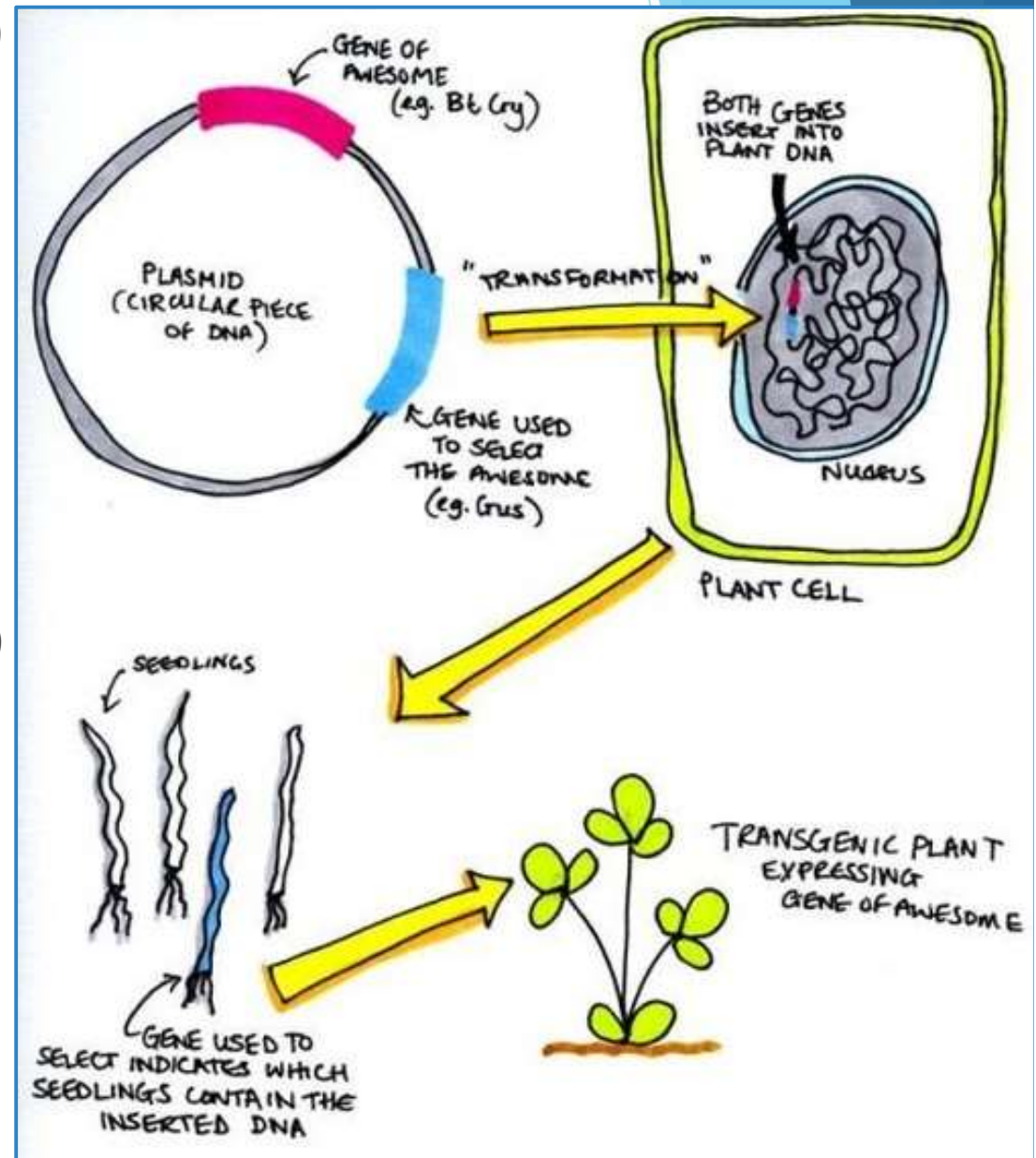
# Transformací

- ▶ vznikne transgenní rostlina nebo *GMO*
- ▶ přes tkáňové kultury
  - ▶ tabák, rýže



# Kroky při tvorbě transgenní/GMO rostliny

- ▶ 1. Výběr genu (např. z databáze)
- ▶ 2. Navržení klonovací strategie a primerů (= oligos)
- ▶ 3. PCR a klonování genu do plazmidu (= vektoru)
- ▶ 4. Transformace *E. coli* a replikace plazmidu
- ▶ 5. Izolace plazmidu
- ▶ 6. Sekvenování genu (DNA)
- ▶ 7. (Re-klonování do binárního vektoru pro transformaci rostlin)
- ▶ 8. Transformace *Agrobacteria*
- ▶ 9. Transformace rostlin
  - ▶ *Arabidopsis* - "floral dip"
  - ▶ Tabák, rýže - techniky tkáňových kultur
  - ▶ Transientní exprese
- ▶ 10. Selektce transformantů



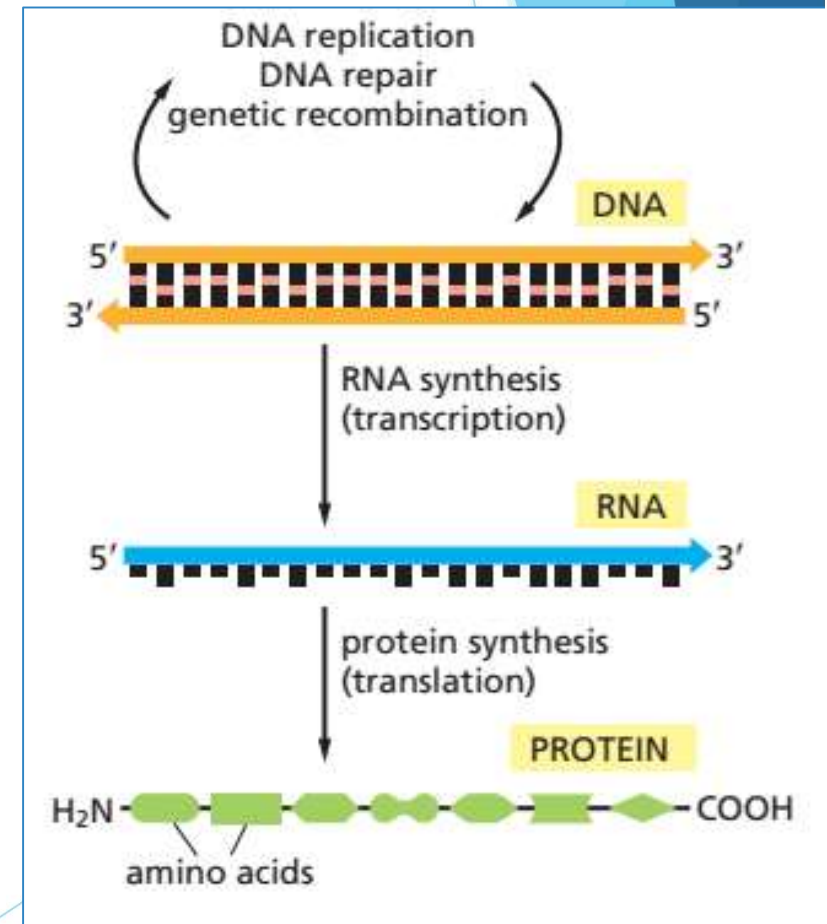
# GENOMIKA (GENOMICS)

- ▶ Zásadní pro buněčnou a molekulární biologii
  - ▶ Analýza a manipulace s DNA

▶ Transkriptomika

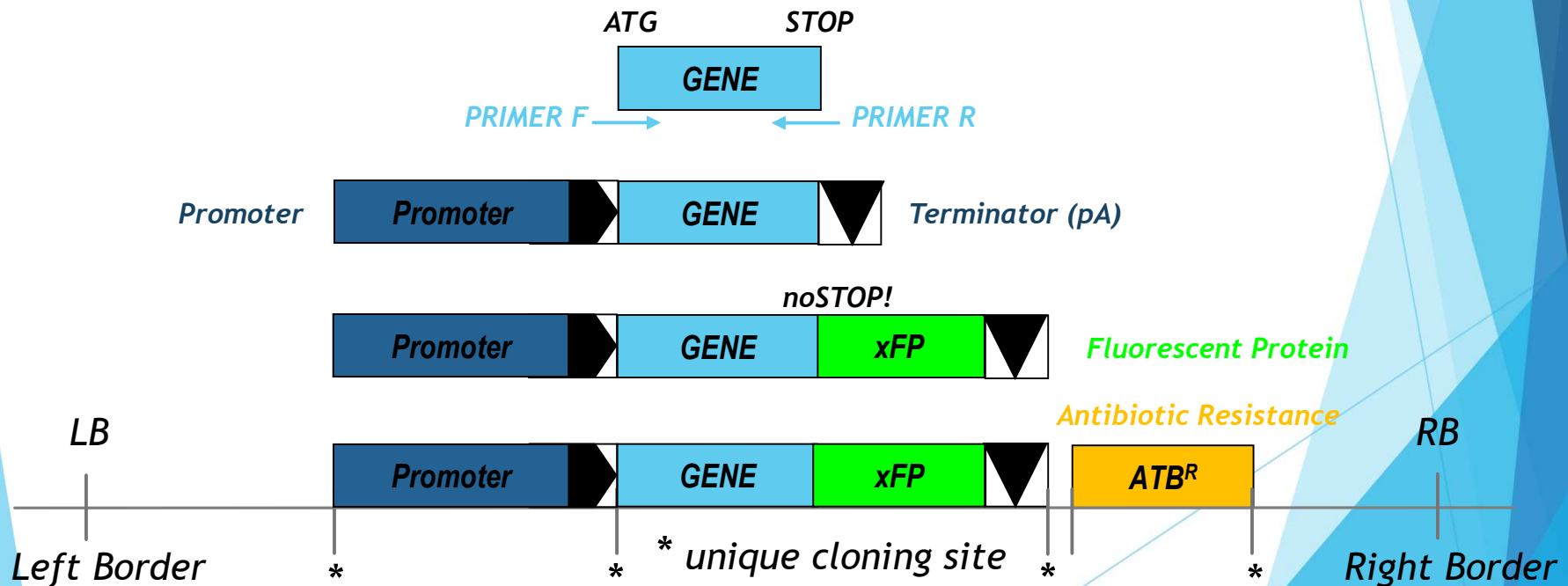
▶ Proteomika

▶ Další „omiky“



# Klonování

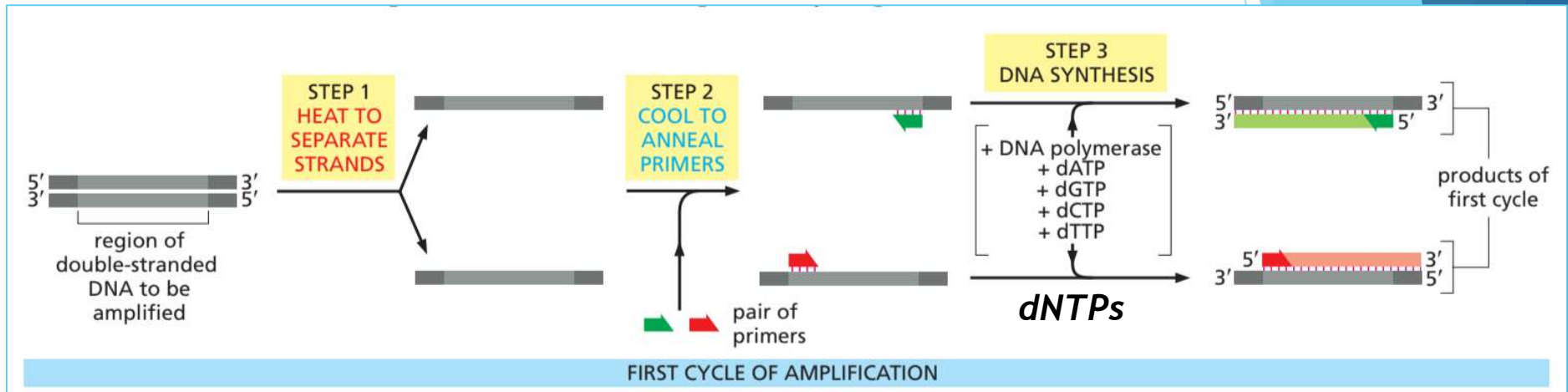
- ▶ V molekulární biologii se termín klonování DNA používá ve významu vytvoření mnoha identických kopií (obvykle miliard) molekul DNA - amplifikace určité sekvence DNA.
  - ▶ Geny lze klonovat pomocí bakterií nebo PCR (polymerázová řetězová reakce)
  - ▶ Klonovat lze jakoukoli DNA (fragment)
- ▶ **Klonovat lze jakéhokoliv jedince**



- ▶ Plasmid = kruhovitě uzavřená molekula DNA, schopná replikace

# PCR ~ Polymerase Chain Reaction

- ▶ Pár PRIMERŮ (neboli OLIGOs) řídí syntézu požadovaného segmentu DNA

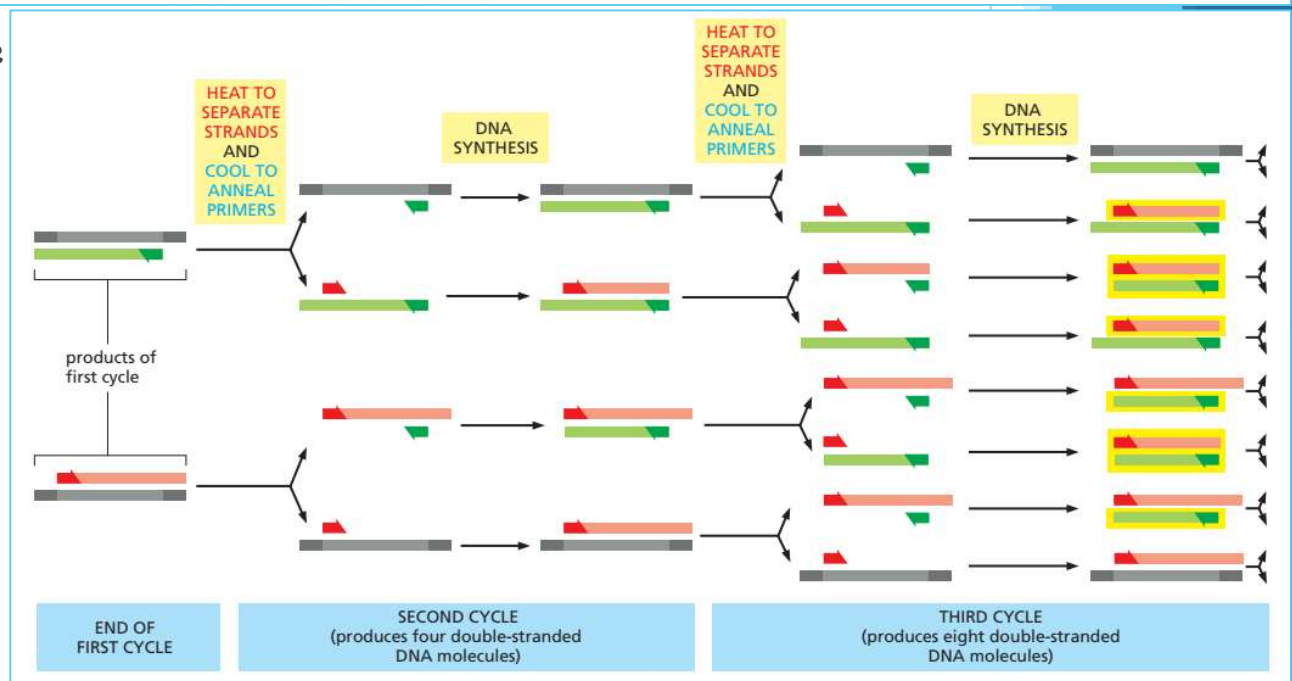


- ▶ Každý cyklus PCR zahrnuje 3 kroky:

- ▶ separaci vláken (*denaturation*)
- ▶ hybridizaci (*annealing*)
- ▶ syntézu DNA (*extension*)

- ▶ Speciální DNA polymeráza (z termofilní bakterie, *Taq*) stabilní při mnohem vyšších teplotách než eukaryotická DNA polymeráza.

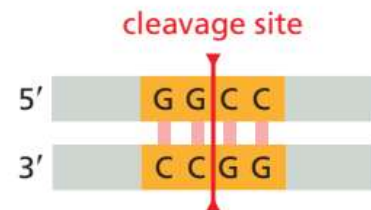
PCR používá k amplifikaci DNA opakovaní cyklů.



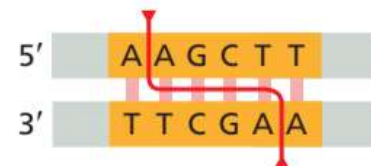
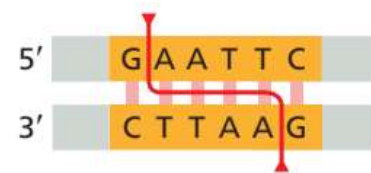
# Klasické klonování využívá restriční nukleázy

- ▶ Restriční nukleázy štěpí DNA ve specifických nukleotidových sekvencích
  - ▶ Pocházejí z bakterií, např. *EcoRI* pochází z *Escherichia coli* (*E. coli*)
  - ▶ Až 1000 komerčně dostupných!

- ▶ **Blunt-ended DNA**



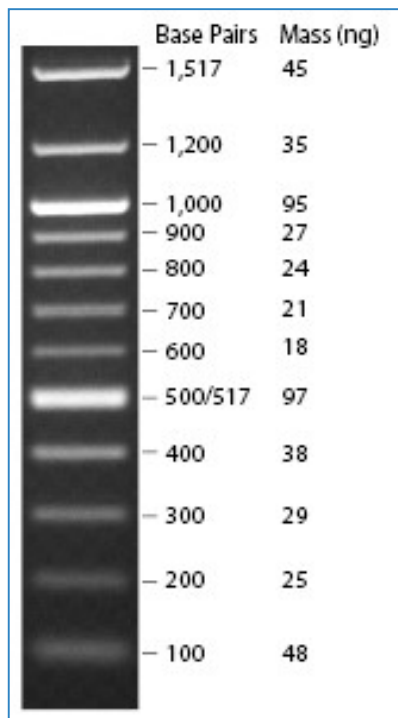
- ▶ **"sticky ends" - short, single-stranded overhangs**



- ▶ Novější např. **GATEWAY klonování** ~ není potřeba restričních endonukleáz
  - ▶ Používá rekombinační sekvence, "Gateway att" místa a směs klonázy (*Clonase mix*)
  - ▶ *Golden Gate*, *Green Gate* (for plants), *GeneArt* jsou další klonovací systémy

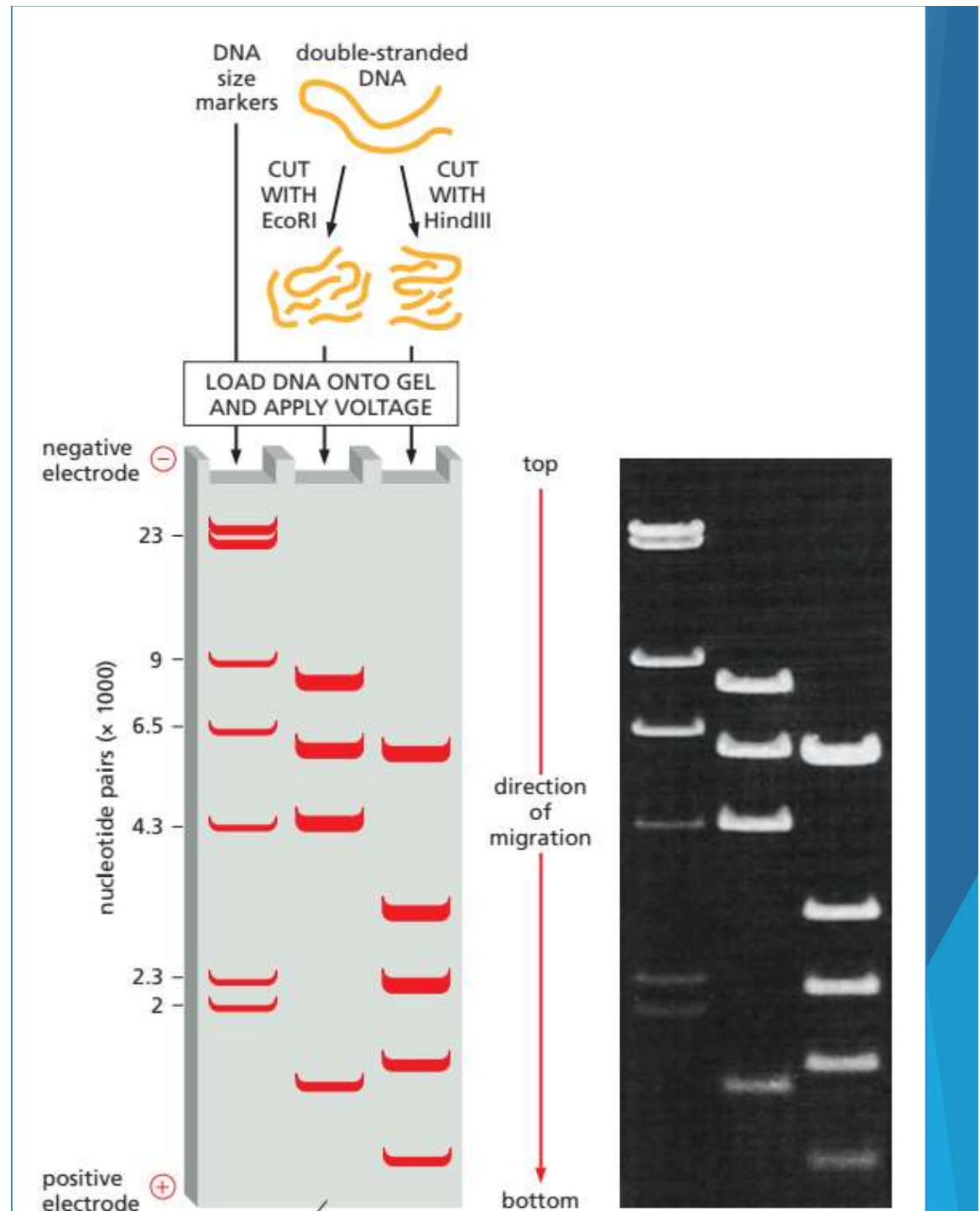
# Gelová elektroforéza rozděluje molekuly DNA podle jejich velikosti

▶ DNA běží od - k +



▶ DNA žebříček (DNA ladder)

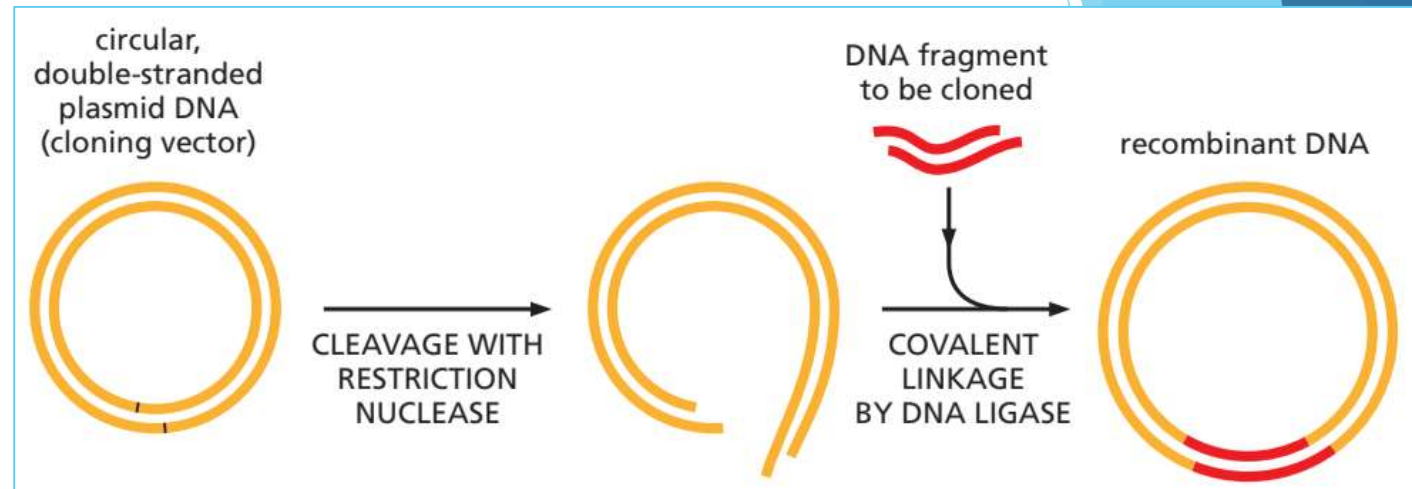
▶ DNA velikost a hmotnost



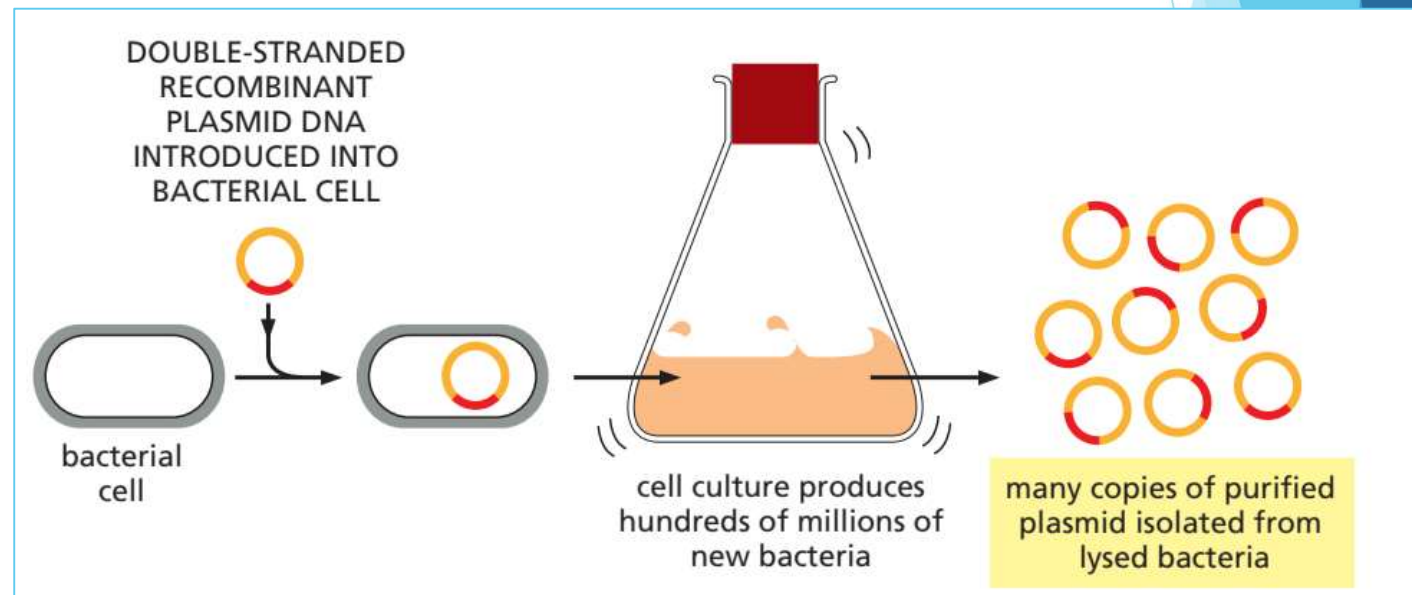


# Ligace DNA a replikace fragmentů

- ▶ DNA fragment je vložen do bakteriálního plazmidu pomocí enzymu DNA ligázy.

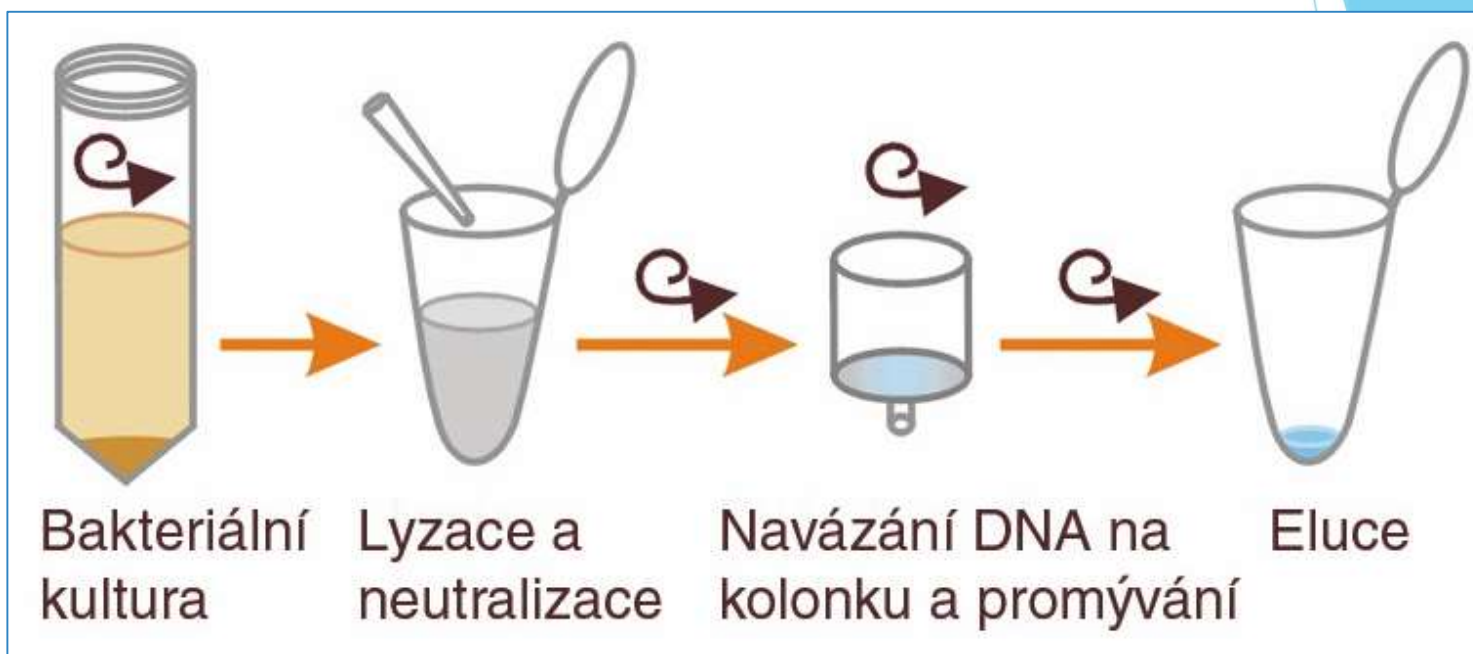


- ▶ DNA fragment může být replikován (klonován) uvnitř bakteriální buňky.



# Izolace DNA

- ▶ **Izolace plasmidu:** 3 kroky - lyzace, neutralizace, DNA purifikace
  - ▶ často se používají komerčně dostupné KITy



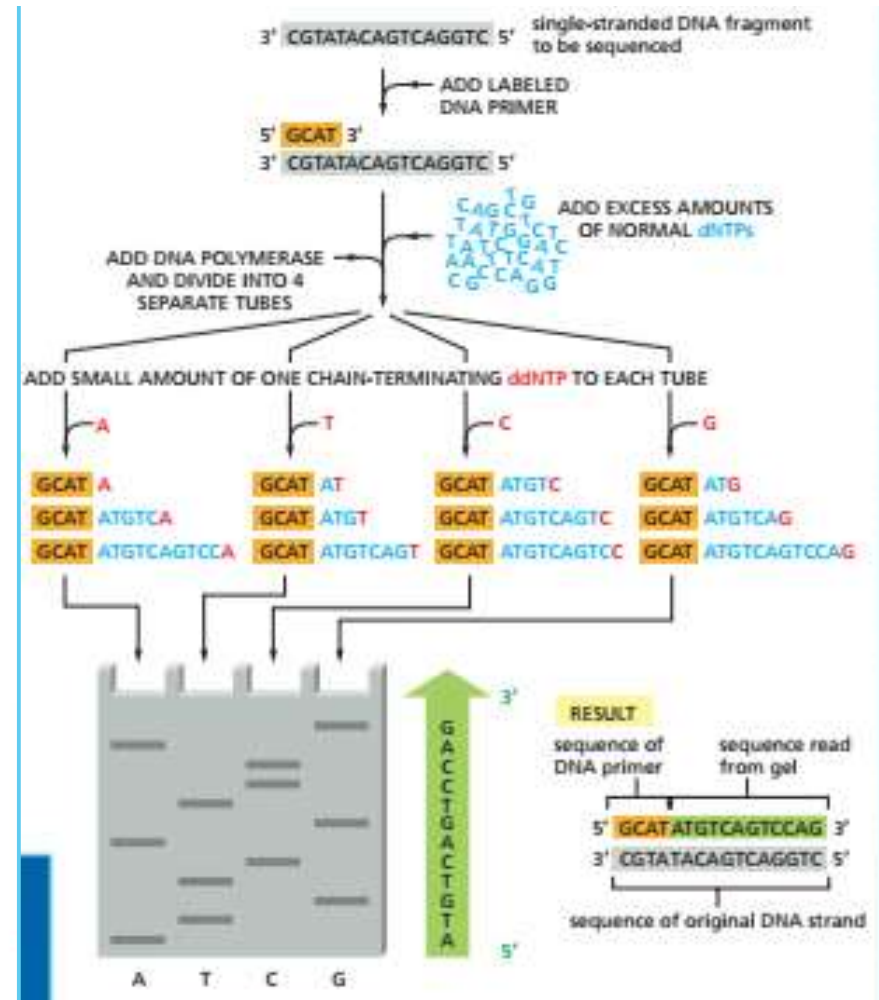
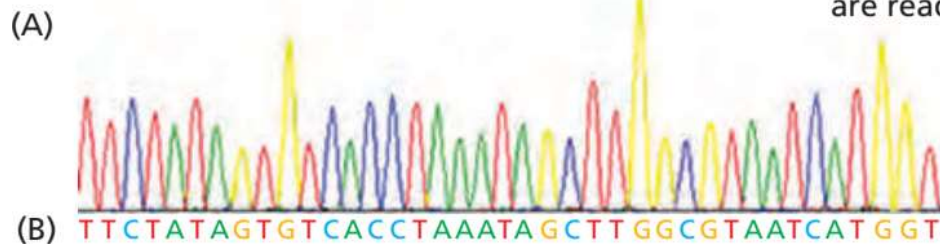
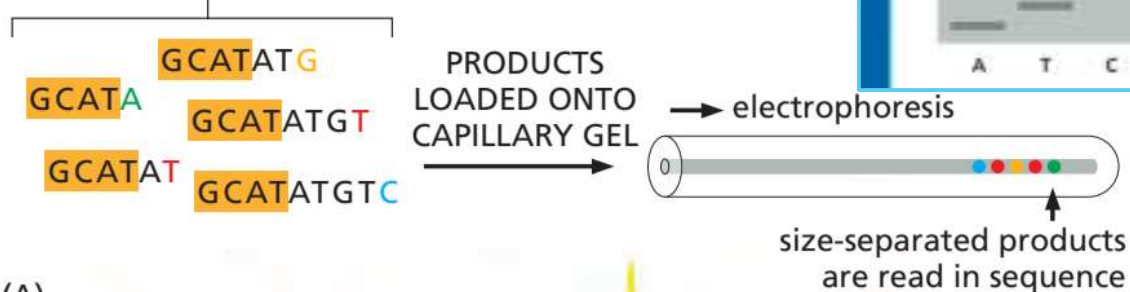
- ▶ **Izolace genomové DNA (gDNA)**
  - ▶ Izolace genomové DNA z rostlin, hub i živočichů...

# DNA (Sanger) sekvenování

- ▶ Dideoxy sekvenování (vyvinuté Dr. Sangerem):
- ▶ používá primer, DNA polymerázu a speciální dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP)
- ▶ když jsou inkorporovány do rostoucího řetězce DNA, ddNTP blokují jeho další prodlužování
- ▶ vytvoří se částečné kopie fragmentu DNA, který má být sekvenován
- ▶ seřazení podle velikosti fragmentů DNA...

## AUTOMATED DIDEOXY SEQUENCING

mixture of DNA products, each containing a chain-terminating ddNTP labeled with a different fluorescent marker



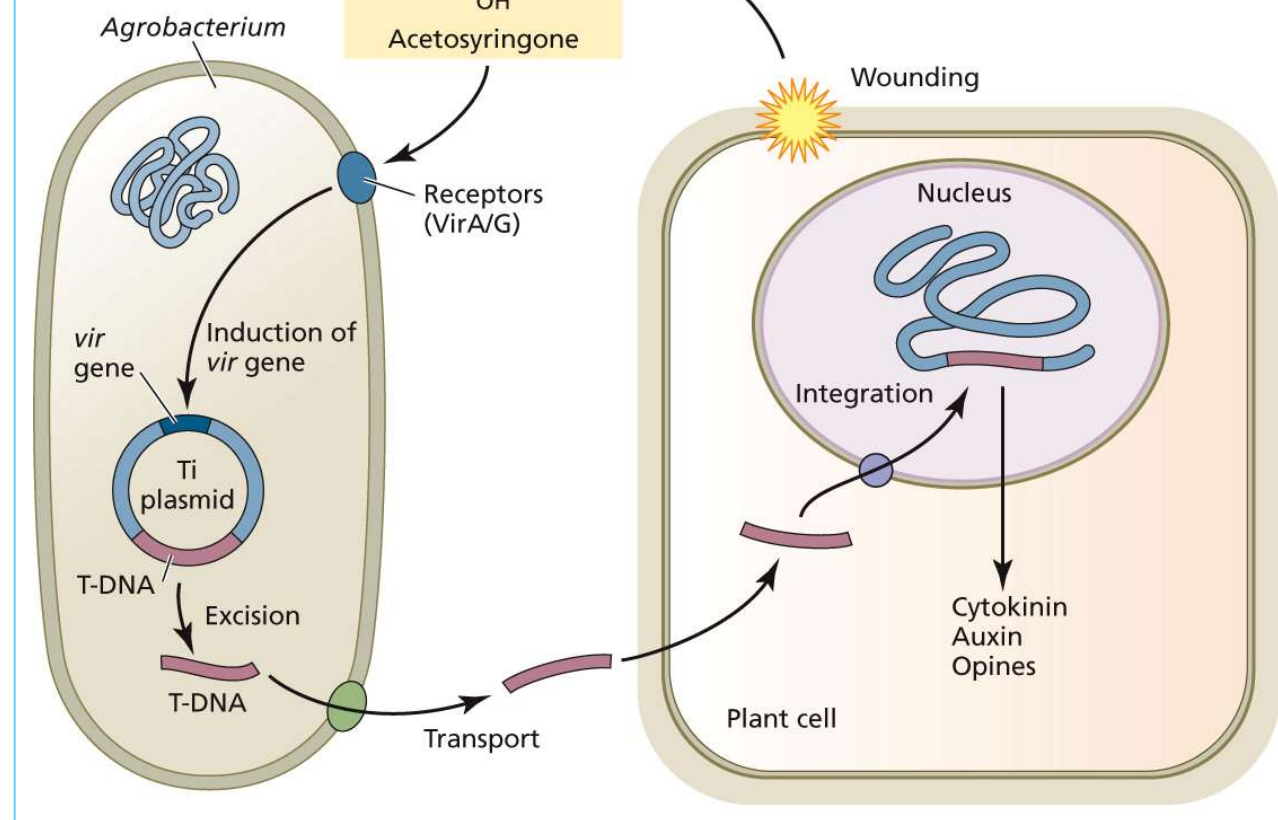
Second generation sequencing - e.g. Illumina

# Transformace rostlinných buněk *Agrobacterium*

- ▶ V přírodě se vyskytující Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens*
- ▶ Ti plazmid dokáže vložit DNA do rostlinného genomu
- ▶ Přenese se pouze malá část plazmidu: **T-DNA**
- ▶ **Binární plazmid** obsahuje T-DNA a *vir* geny
- ▶ Někdy *vir* geny mohou být na odděleném "helper" plazmidu

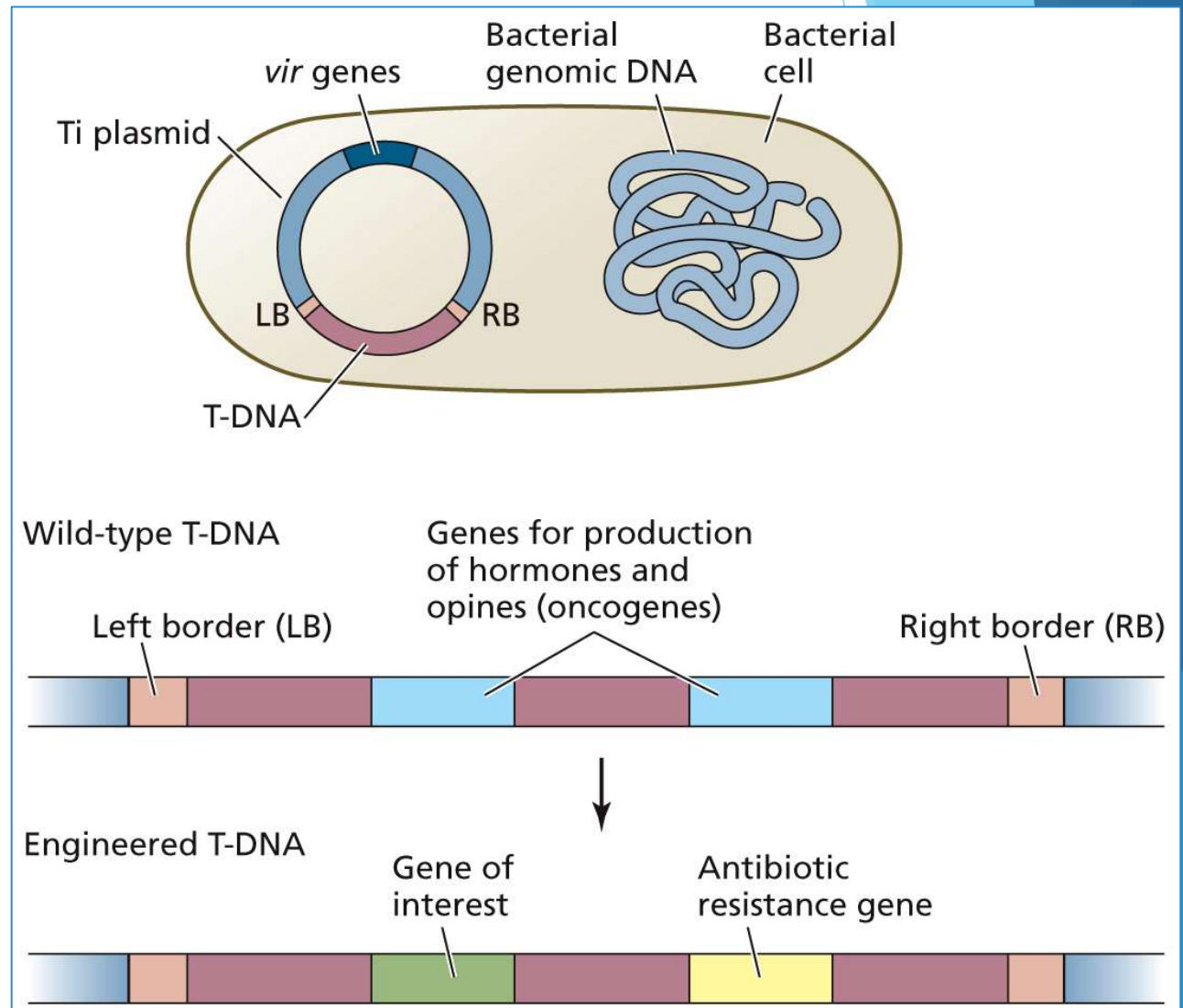


- ▶ *Acetosyringone* se používá jako chemický atraktant např. při transienční expresi

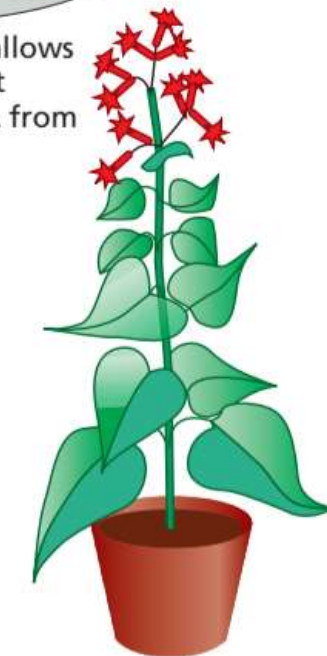
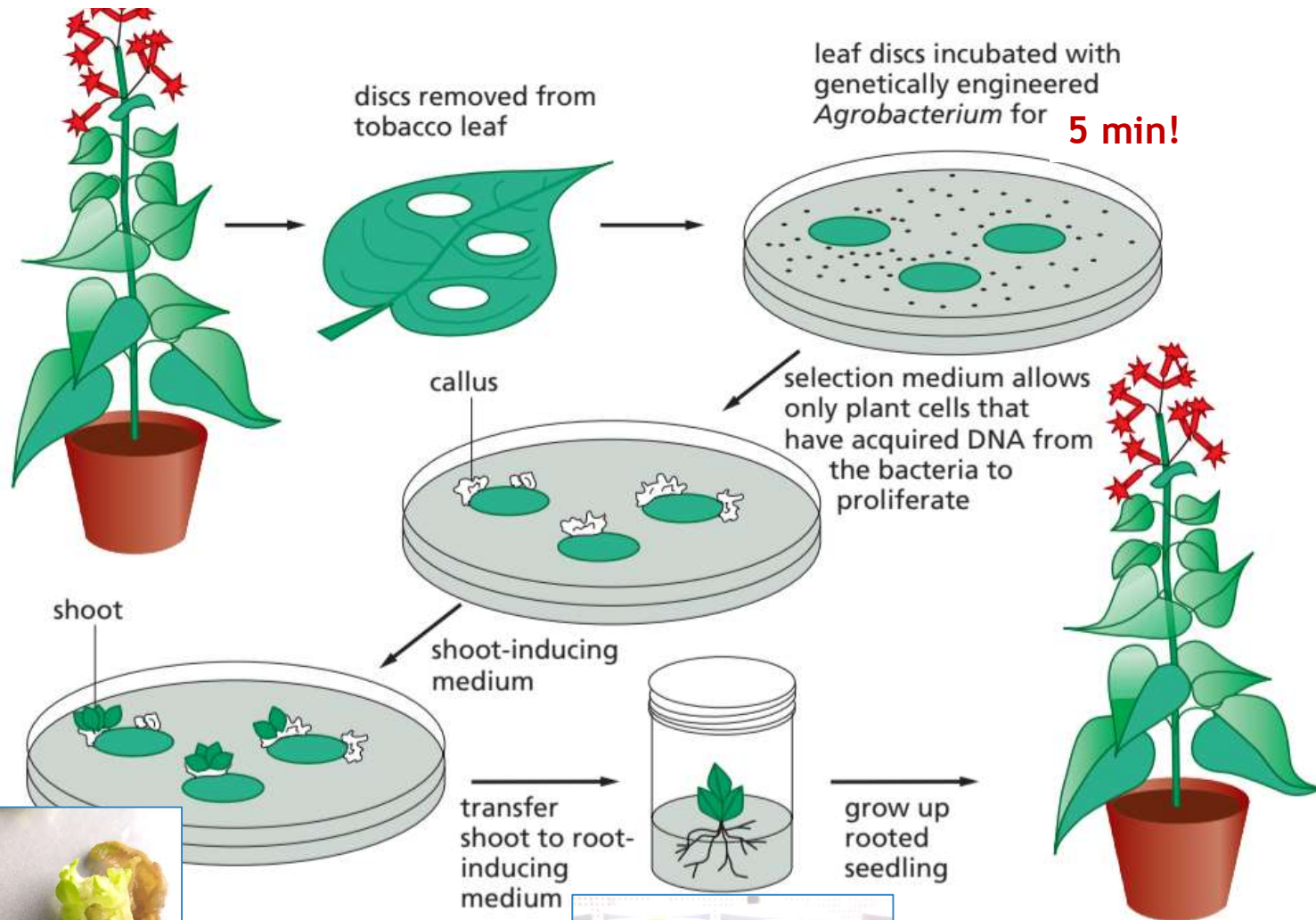


# Transformace rostlinných buněk *Agrobacterium*

- ▶ V přírodě se vyskytující Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens*
- ▶ Ti plazmid dokáže vložit DNA do rostlinného genomu
- ▶ Přenese se pouze malá část plazmidu: **T-DNA**
- ▶ **Binární plazmid** obsahuje T-DNA a *vir* geny
- ▶ Někdy *vir* geny mohou být na odděleném "**helper**" plazmidu

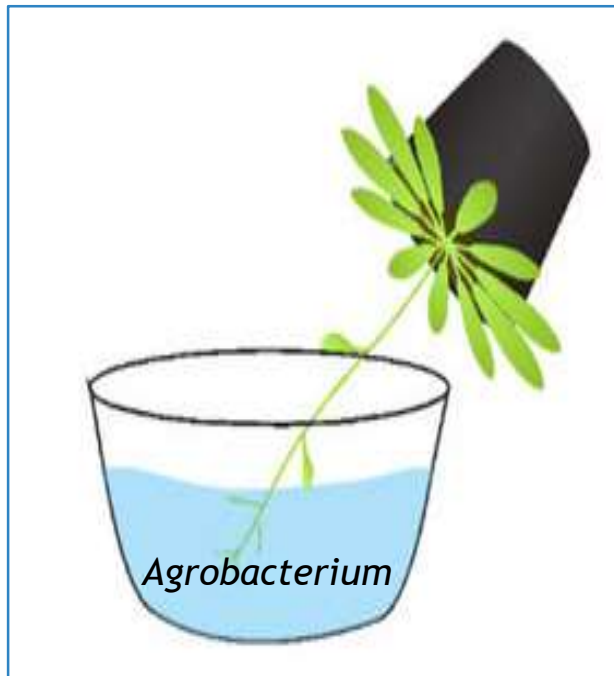


# Transgenní rostliny vyrobené pomocí tkáňových kultur

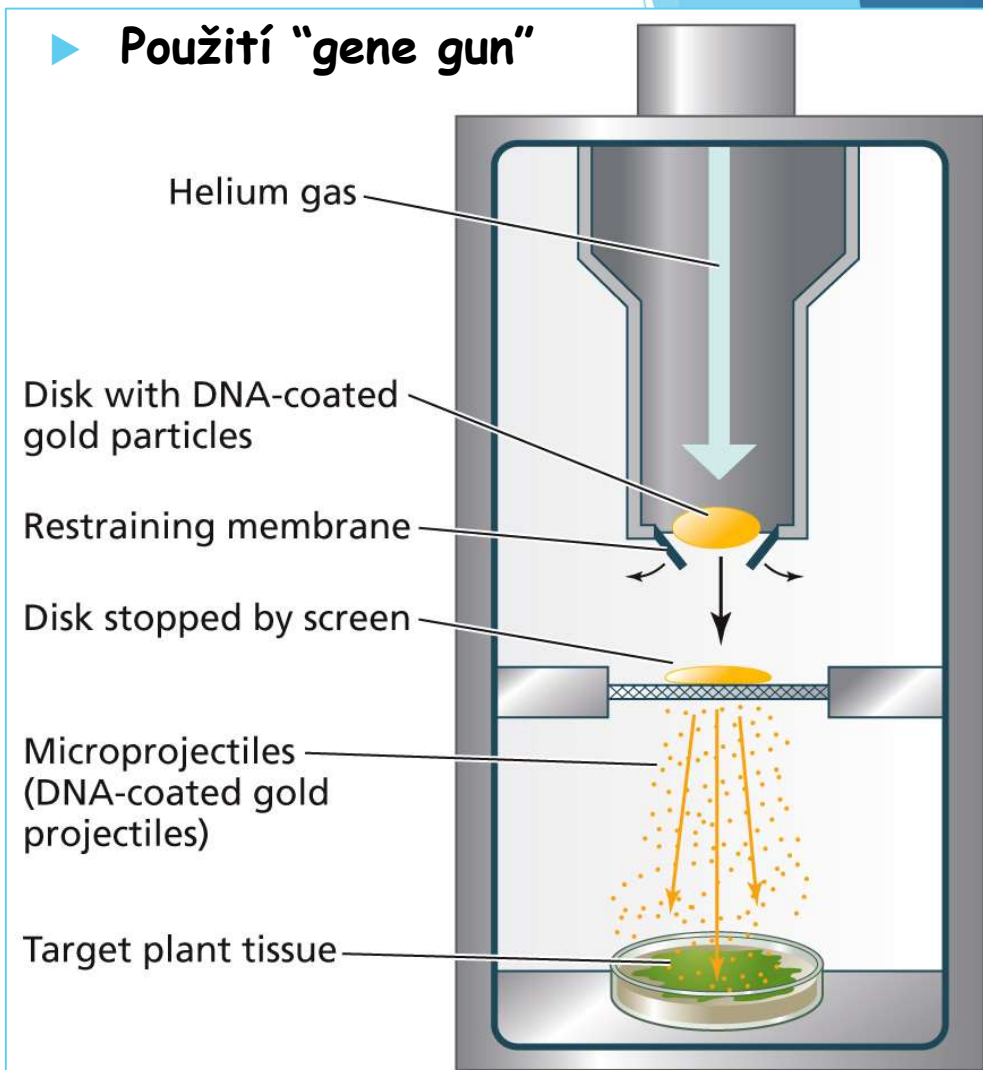


# „Snadná“ transformace rostlinných buněk

- ▶ „floral dip“ metoda používaná pro *Arabidopsis thaliana*



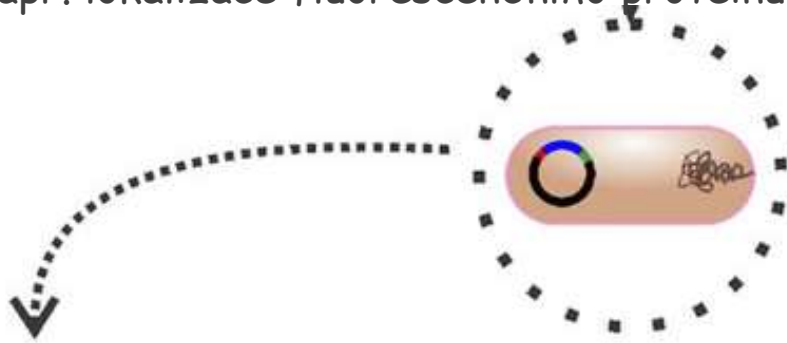
- ▶ Použití "gene gun"



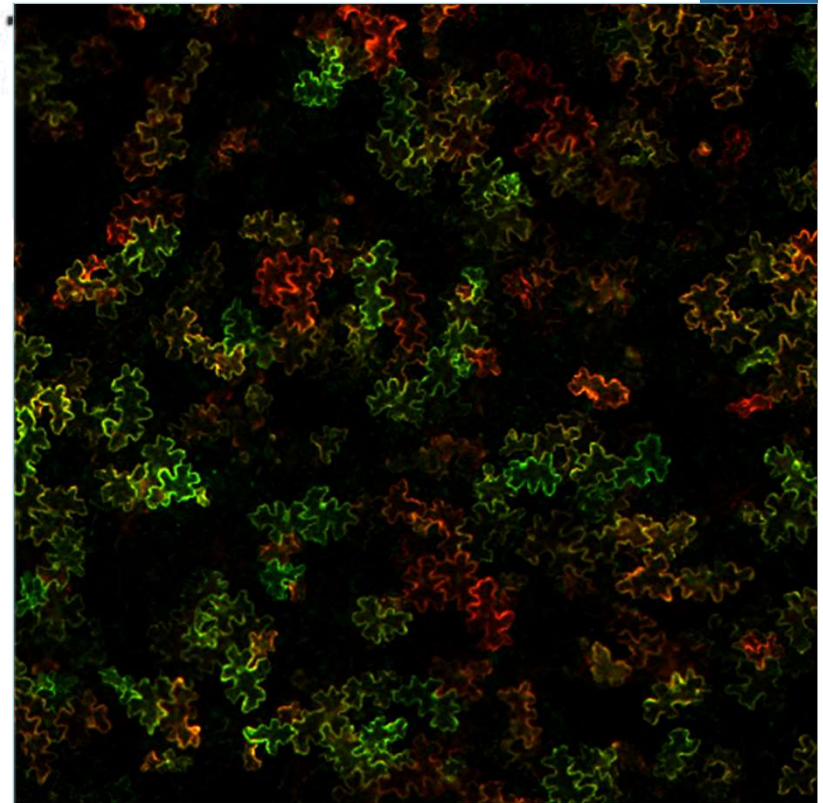
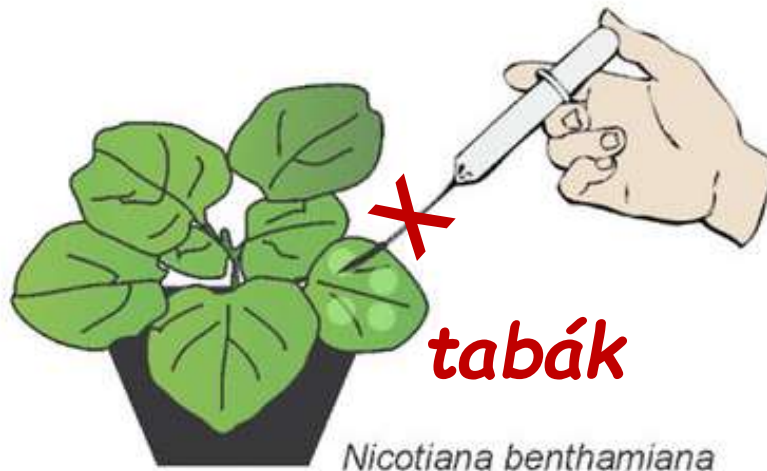
- ▶ *Agrobacterium* není zapotřebí!
- ▶ Ale the gun je zapotřebí!!!

# Transientní genová exprese

- ▶ **Metoda "agroinfiltrace"**, velmi efektivní způsob, jak studovat geny
- ▶ Na principu dočasné vysoké transkripce DNA sekvencí, které se nemusí nutně integrovat do rostlinného genomu!
- ▶ *Přechodná exprese*, trvá pouze 48-72 hodin
  - ▶ Např. lokalizace fluorescenčního proteinu, interakce protein/protein



## 3. TRANSIENT GENE EXPRESSION ASSAY







Proč vyrobit transgenní rostlinu?

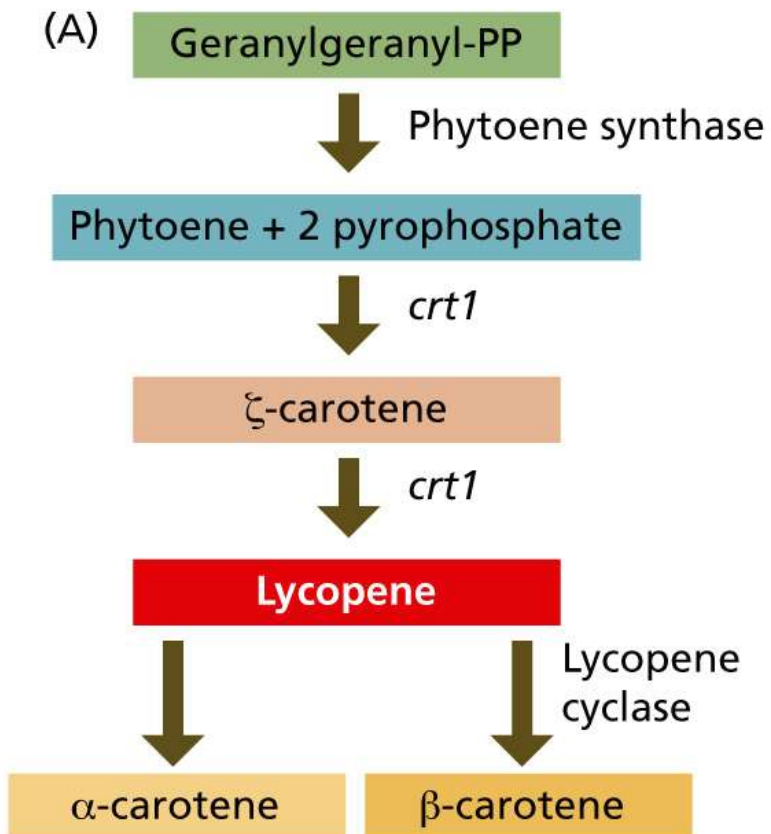
# Proč vyrobit transgenní rostlinu nebo *GMO*?

- ▶ **Pro studium exprese a funkce genu**
  - ▶ Kdy a kde je gen exprimován?
    - ▶ Role promotoru a reportérových genů
  - ▶ Co se stane, když zvýšíme expresi genu?
    - ▶ Chemicky regulovatelné transkripční aktivační systémy
  - ▶ Co se stane, když snížíme expresi genu nebo jej vyřadíme z funkce?
    - ▶ amiRNA, CRISPR/Cas9
- ▶ **Pro zlepšení vlastností rostlin**
  - ▶ Klasické šlechtění a domestikace divoké trávy *teosinte* (vlevo) vedly po stovky let k plodině *Zea mays* (kukuřice, vpravo).



# „Zlatá rýže“ byla vyrobena vložením 2 cizích genů zapojených do syntézy $\beta$ -karotenu

## Golden Rice



(B)



- ▶ **Golden Rice** je nutričním zdrojem pro-vitaminu A, který zlepšuje imunitní odpověď člověka na běžná onemocnění a významně snižuje dětskou slepotu, jejíž hlavní příčinou je nedostatek vitamínu A.
- ▶ *Byla získána již před 20 lety, ale stále je zakázána.....*