

Příprava transgenního lnu s geny pro syntézu glutathionu

Jitka Najmanová,
Pavel Kotrba,
Martina Macková,
Tomáš Macek



Fytoremediace

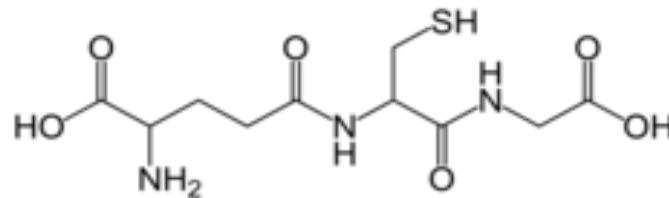
- Ekonomicky atraktivní, neinvazivní remediační metoda s účastí rostlin
- ALE! Těžké kovy inhibují růst většiny rostlin (kromě hyperakumulátorů)
- Genetická manipulace rychle rostoucích rostlin pro zlepšení jejich odolnosti vůči těžkým kovům a zvýšení akumulace kovu v rostlině

Přirozená obrana rostliny vůči těžkým kovům

- Syntéza látek schopných vázat kovy:

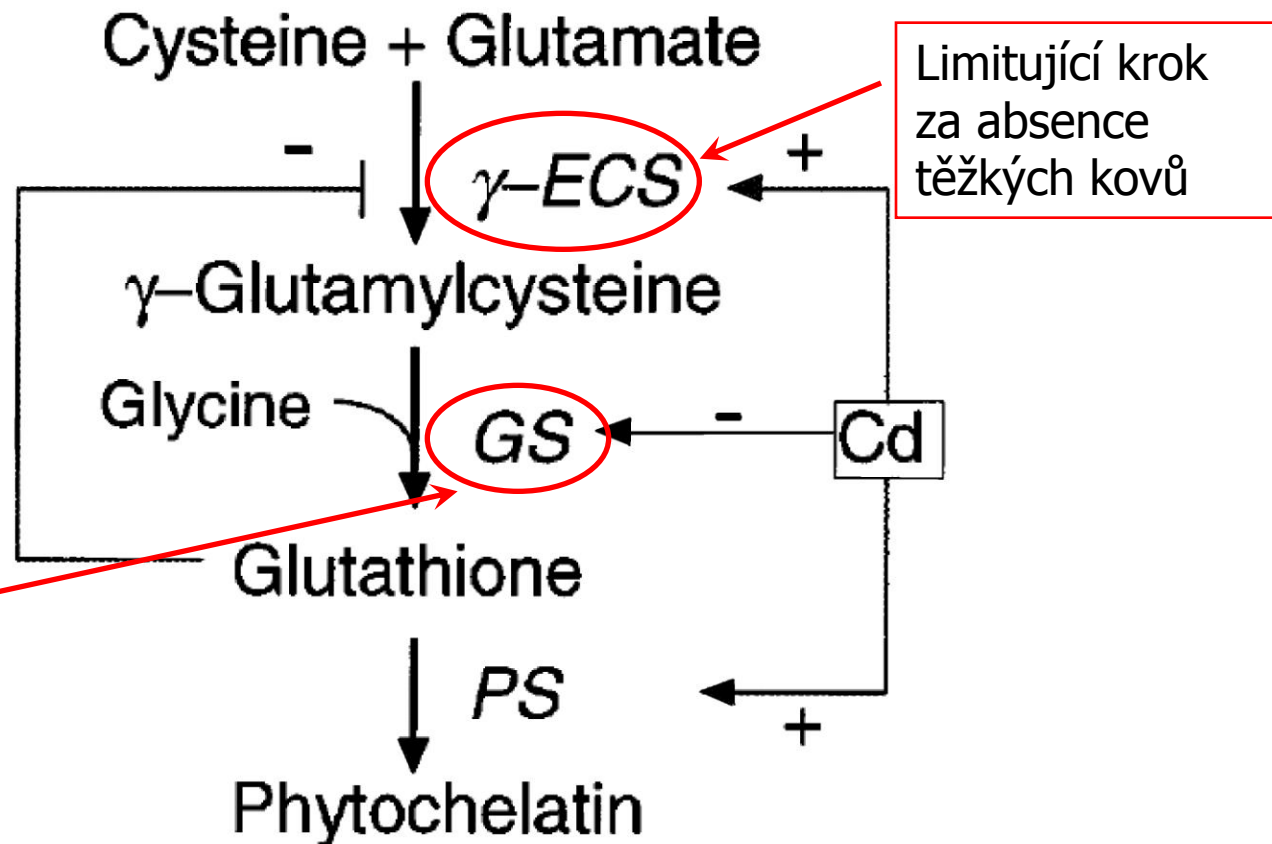
- Glutathion

γ -GluCysGly



- Neutralizace potenciálně toxických xenobiotik
- Prekursor fytochelatinů
- Metalothioneiny (γ -GluCys) $_n$ -R
- Fytochelatiny (γ -GluCys) $_n$ +1 Gly

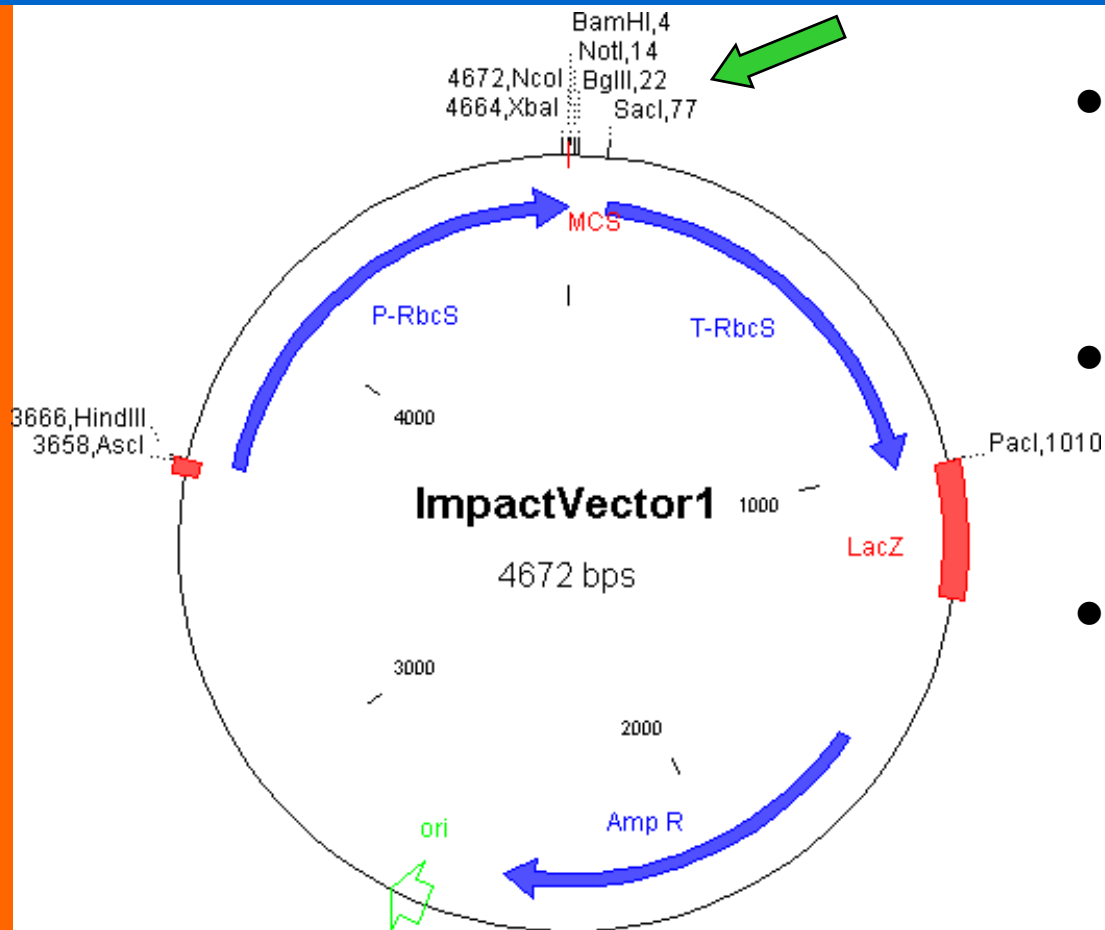
Syntéza glutathionu a fytochelatinů



Vkládané geny

- Gen **GSH1**
 - kóduje γ - glutamylcysteinsynthetasu (γ -ECS)
- Gen **GSH2**
 - kóduje glutathionsynthetasu (*GS*)
- Gen **GUS** – reportérový gen
 - kóduje β -glukuronidasu – ověření funkčnosti promotoru

Klonování genů

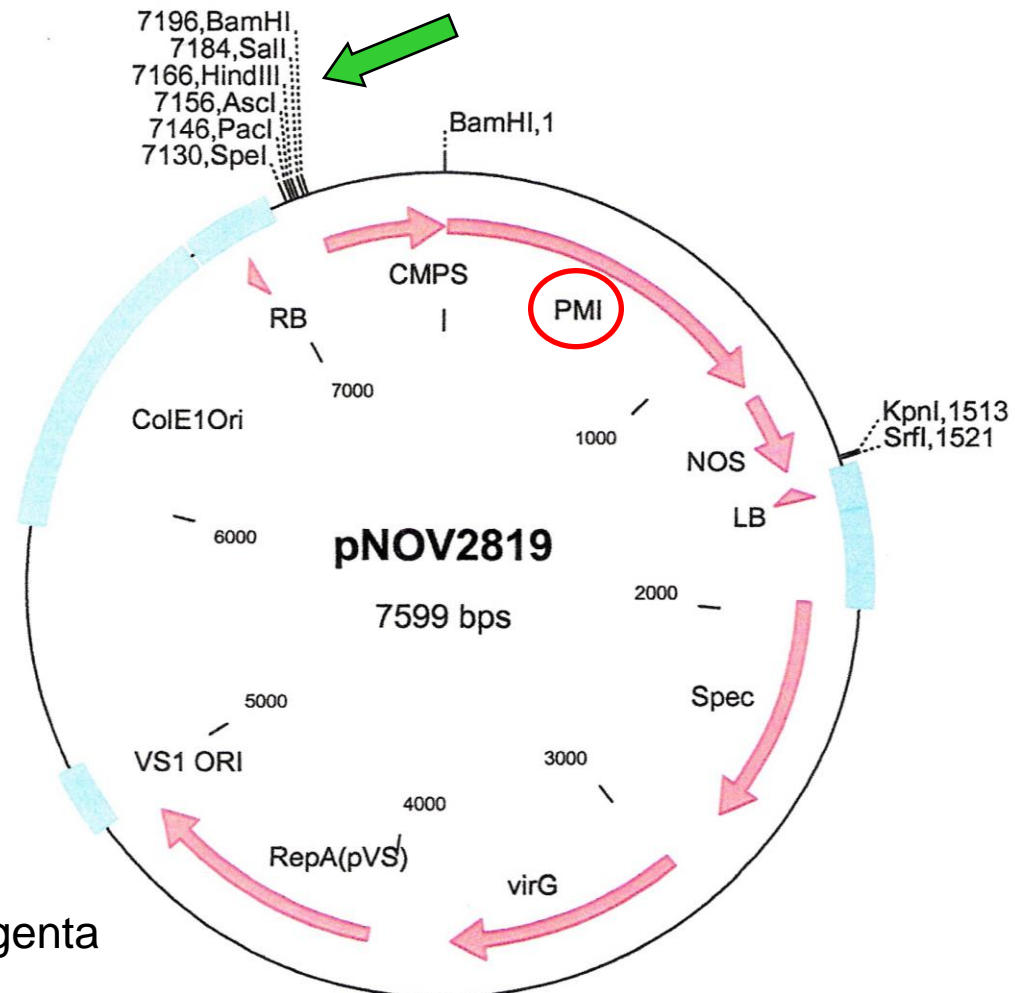


- geny vloženy do *Impact Vector 1.1* pomocí nested PCR
- Rubisco promotor (P-RbcS) a terminátor (T-RbcS)
- vznikly vektory:
 - pIV1 (gen GSH1)
 - pIV2 (gen GSH2)
 - pIV3 (gen GUS)

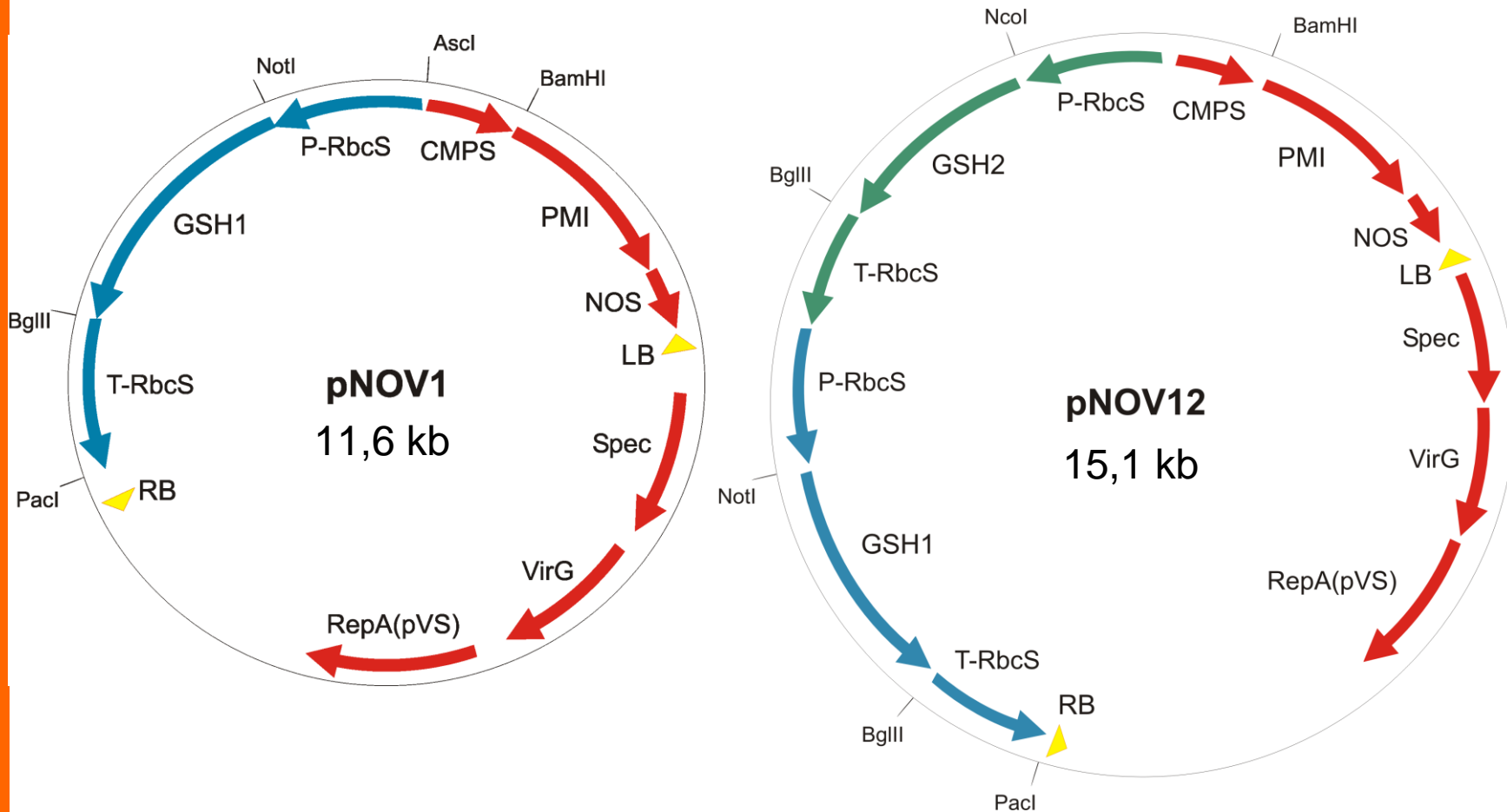
Klonování genů

- expresní jednotky vloženy do restričních míst *Ascl/Pacl* vektoru *pNOV2819*
- binární vektor pro agrobakteriální transformaci
- gen PMI pro selekci rostlin na manose

pNOV2819 poskytnut firmou Syngenta

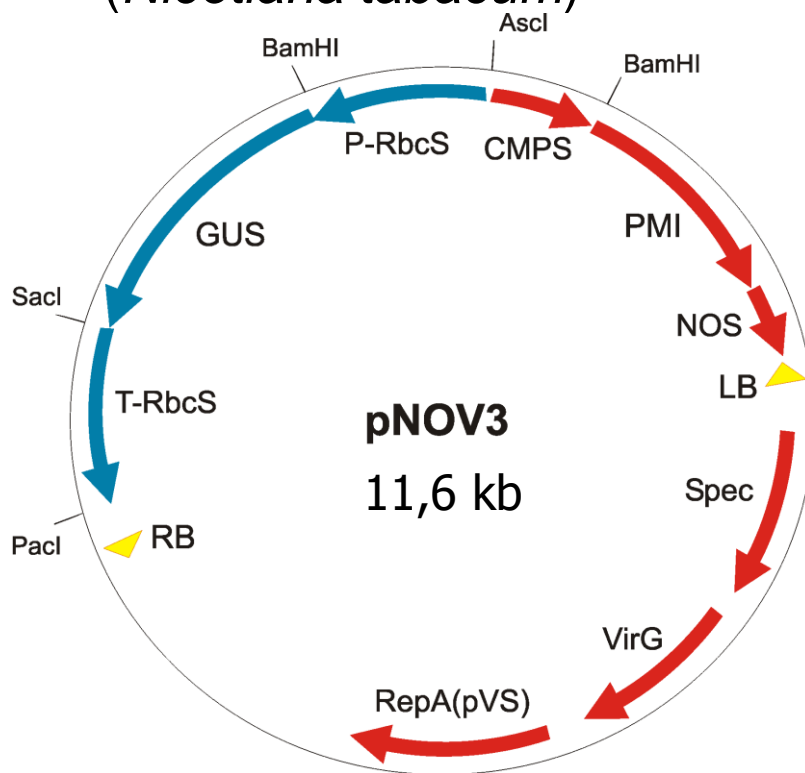


Výsledné konstrukty pro trvalou transformaci



Ověření funkčnosti Rubisco promotoru

- Transientní exprese vektoru pNOV3 (gen GUS) v listech tabáku (*Nicotiana tabacum*)



- dočasná transformace
- nejvyšší exprese po 3 dnech
- histochemická reakce se substrátem pro β -glukuronidasu
- modré zbarvení listů

Transientní exprese v listech tabáku



Metoda pro sledování účinku exprese genů v rostlině

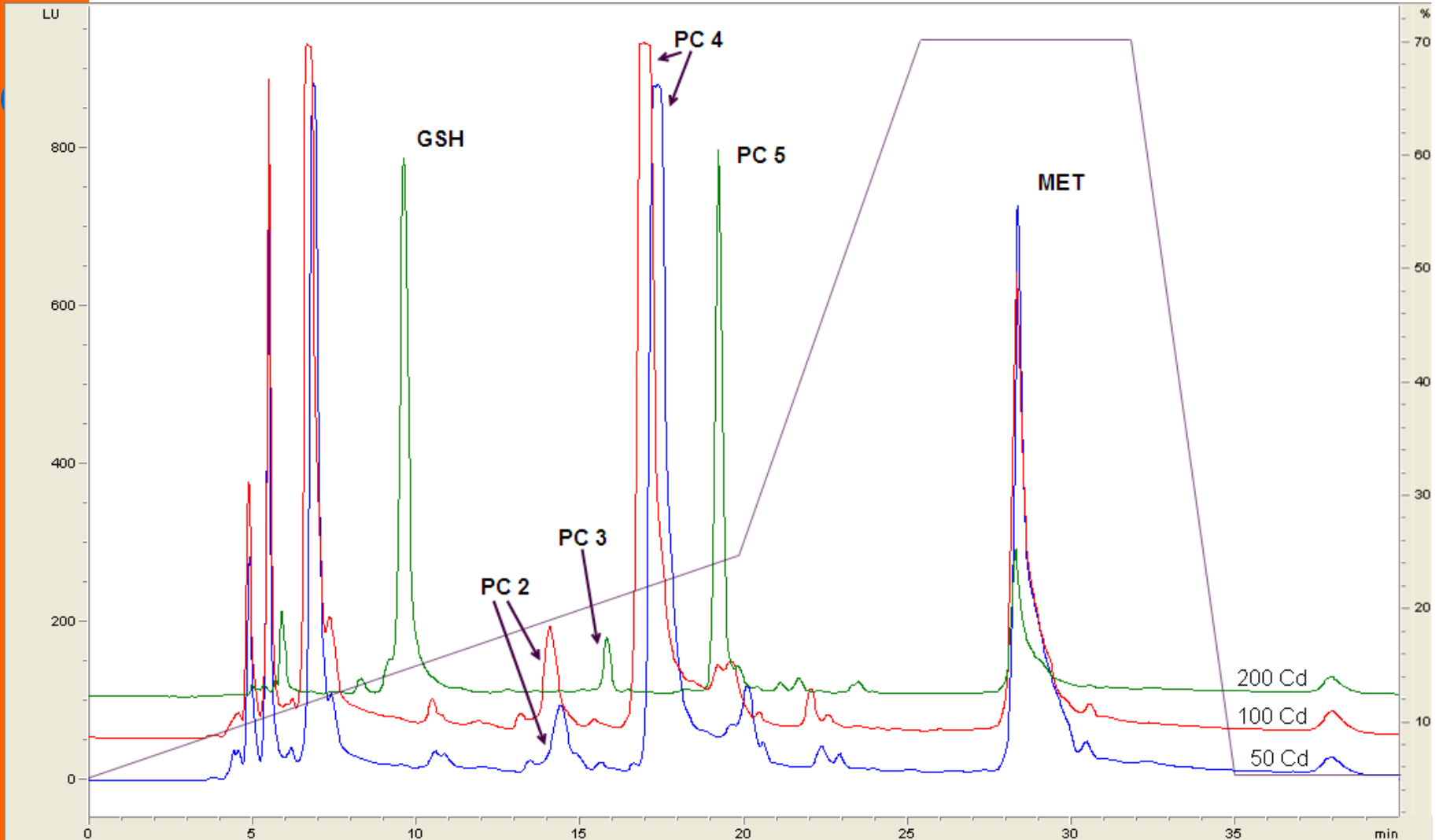
- očekávané zvýšení množství glutathionu a fytochelatinů v transformovaných rostlinách
- HPLC s fluorescenčním detektorem
- fluorescenční značení SH- skupin

Stanovení GSH a PCs ve Inu

- monitorování změn v obsahu GSH a PCs u rostlin stresovaných kadmíem
- 10 denní výhonky Inu
- 50 μM , 100 μM a 200 μM CdCl_2



Stanovení GSH a PCs



Plány do budoucna

- Trvalá transformace tabáku a Inu plasmidy pNOV1 a pNOV12
- Ověření schopnosti transformovaných rostlin akumulovat větší množství kadmia
- Stanovení obsahu GSH a PCs u transformovaných rostlin

Děkuji za pozornost



*Práce byla sponzorovaná
granty: MŠMT 1M06030 a
FRVŠ 1157/2008*