

Příprava transgenních lnů obsahujících gen pro zvýšenou akumulaci těžkých kovů



Linum usitatissimum

Remediace

➤ konvenční metody – finančně nákladné




➤ využití mikroorganismů – pro biodostupné a degradovatelné kontaminanty




Fytoremediace

➤ využití rostlin pro degradaci, zadržení či metabolizaci jak organických tak anorganických kontaminantů



- 
- energeticky a finančně méně náročná
 - estetický vliv
 - zabránění rozšiřování kontaminace větrnou a vodní erozí
 - podpora růstu mikrobiálních konsorcií pro další detoxifikaci
 - zachování půdních vlastností
 - použitelnost na velké plochy

- 
- časová náročnost
 - vysoká koncentrace kontaminantů je toxická i pro rostliny
 - chybí rostlinné druhy schopné akumulovat kontaminanty ve vysoké koncentraci a zároveň tvořit dostatek biomasy

Rostliny a jejich schopnost akumulovat těžké kovy

- *Thlaspi caerulescens* (Penízek modrý)
 - 1800 mg Cd/kg sušiny, 51600 mg Zn/kg sušiny



- *Thlaspi rotundifolium*
 - 8200 mg Pb/kg sušiny
 - přírůstek biomasy za 5 měsíců je 50 mg



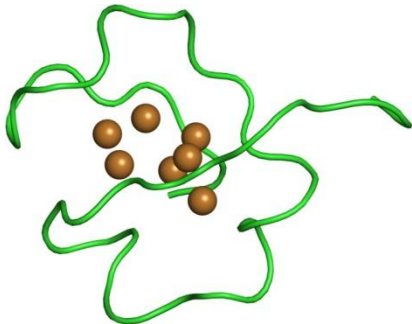
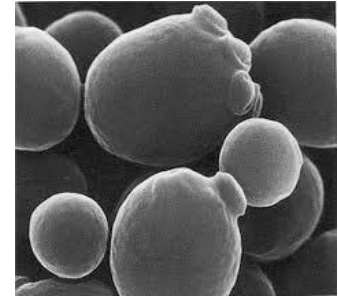
- *Ipomoea alpina* - rod z řádu svlačcovitých
 - nejlepší hyperakumulátor Cu - 12300mg /kg sušiny



- *Sebertia acuminata* - Ni tvoří až 25% hm. sušiny biomasy

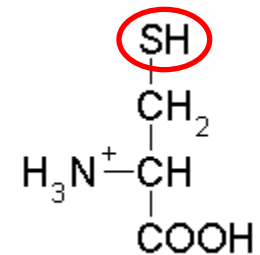
Gen *CUP*

➤ získán z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



➤ kóduje protein metalothionein, který je zodpovědný za zvýšení akumulace těžkých kovů

➤ gen *CUP* spojen s histidonovou kotvou (6 histidin) → *HisCUP*



cystein

Macek T., Macková M., Pavlíková D., Száková J., Truksa M., Singh Cundy A., Kotrba P. a kol. (2002): Accumulation of Cadmium by Transgenic Tobacco. *Acta Biotechnologica* **22**: 101–106.

Postup práce

Příprava konstruktů pNOV/RbcS/HisCUP



Agrobacterium tumefaciens + pNOV/RbcS/HisCUP

Transientní exprese

- tabák viržinský
- metoda pro ověření exprese genů v rostlinách

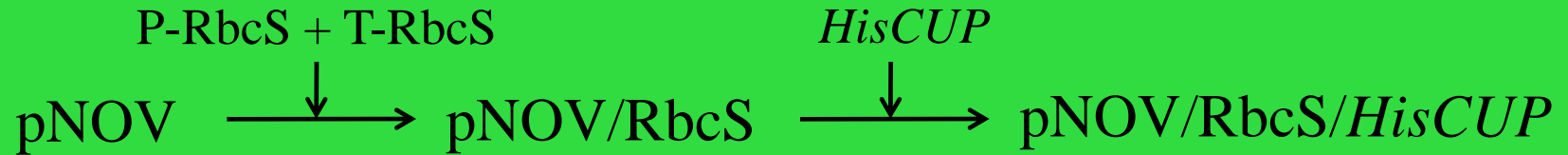


Trvalá transformace

- len setý
- metoda pro získání transgenních rostlin



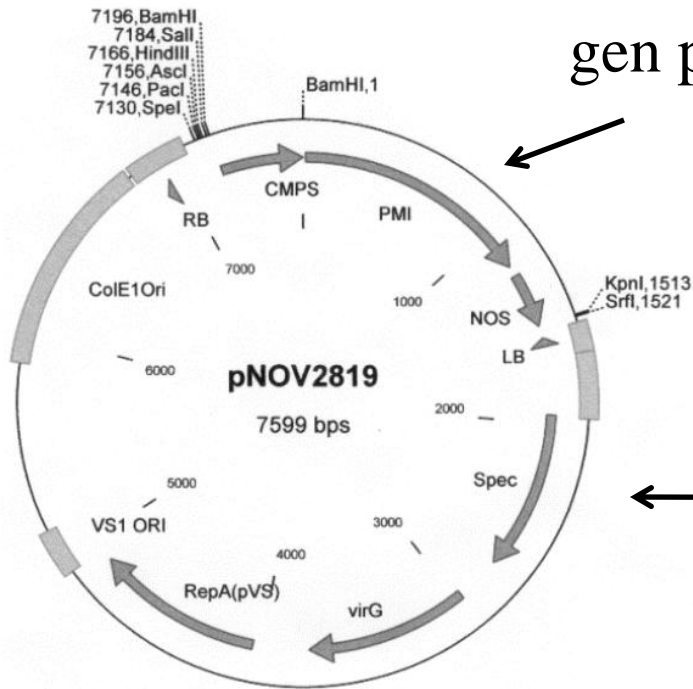
Příprava konstruktu s genem *HisCUP*



gen pro fosfomannosaisomerasu (PMI)

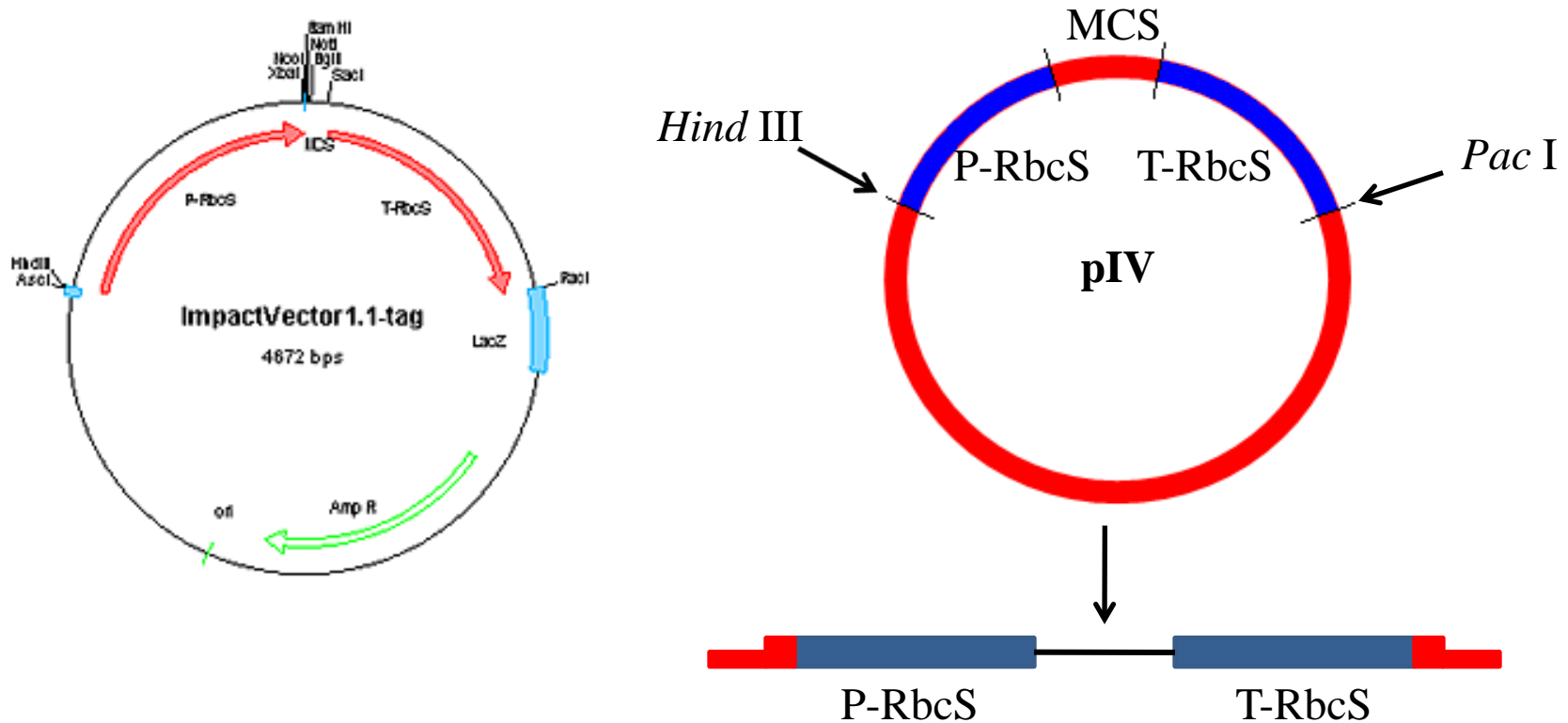
- selekce transgenních rostlin na médiu s mannosou

← rezistence ke spektinomycinu



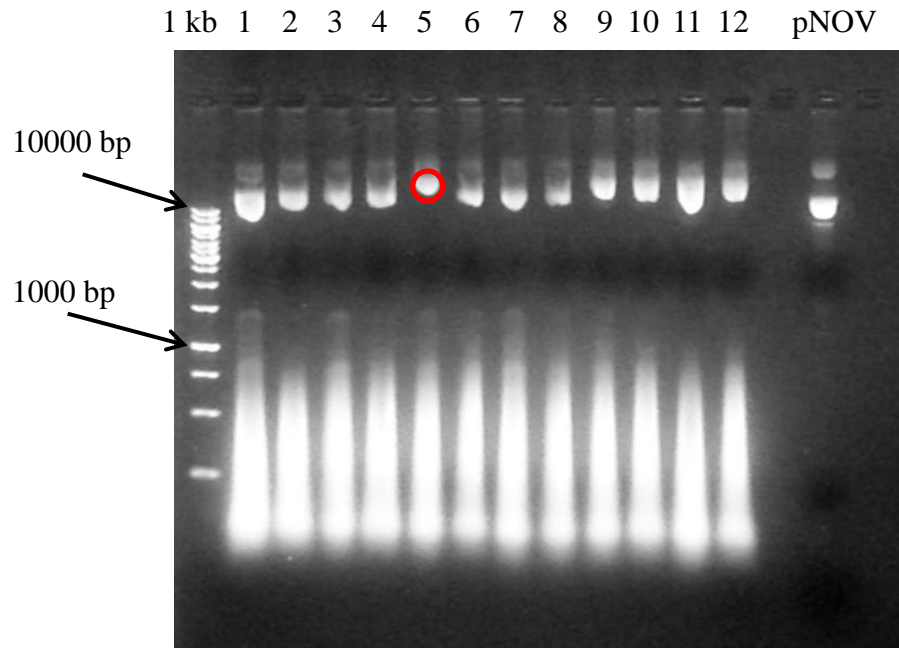
Rostlinný vektor pNOV2819 (Syngenta)

Klonování kazety RbcS do pNOV



- z plazmidu pIV byla pomocí restričních enzymů vyštěpena kazeta obsahující promotor (P-RbcS) a terminátor (T-RbcS) proteinu RUBISCO

Ověření ligace RbcS do pNOV



1 kb – standard 1kb DNA LADDER

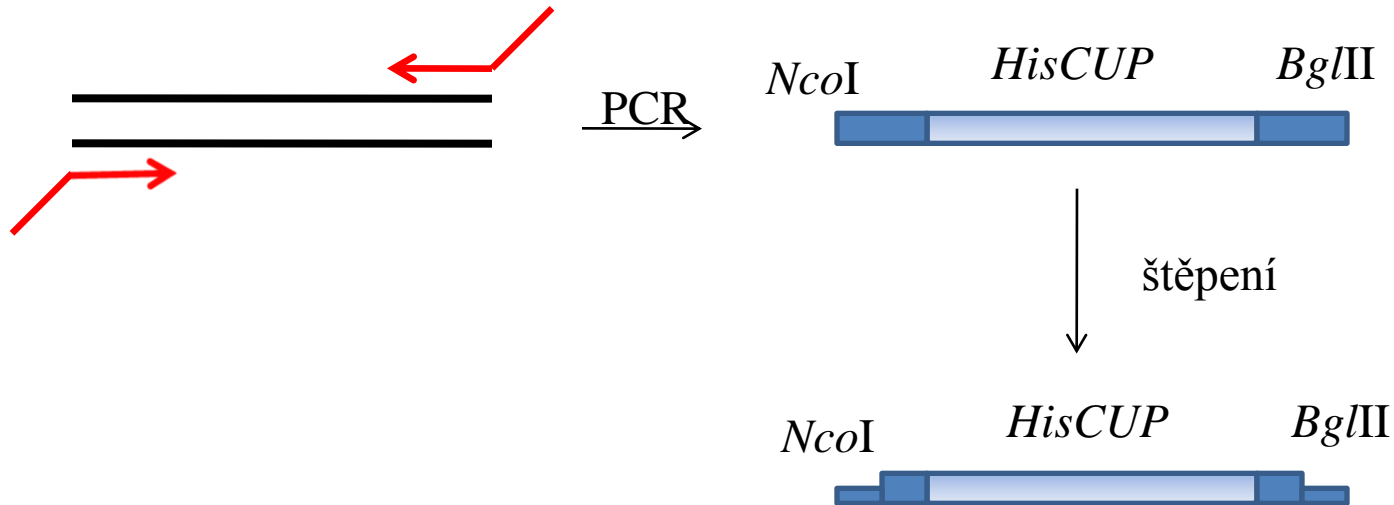
1-12 – plazmidová DNA pNOV/RbcS



Připraven konstrukt pNOV/RbcS

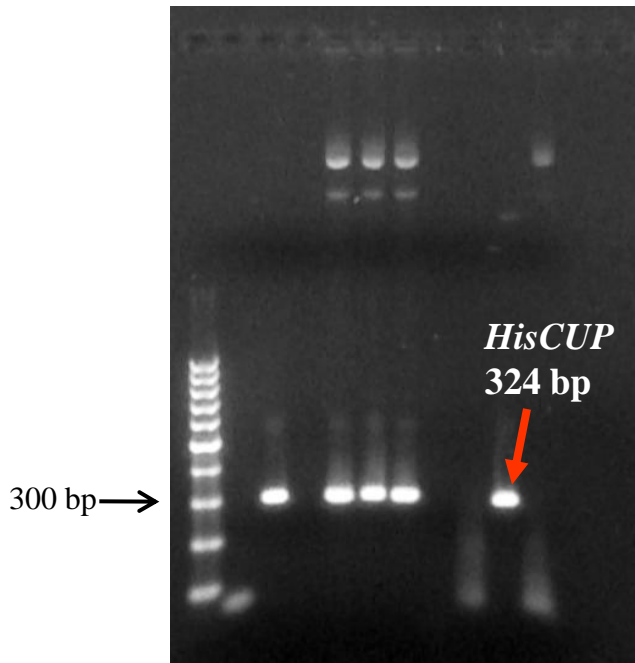
Příprava konstruktu s genem *HisCUP*

- z plazmidu pTrc*HisCUP* byl získán gen *HisCUP* polymerasovou řetězovou reakcí s primery obsahujícími navíc místa pro restriční endonukleázy



Ověření ligace genu *HisCUP* do pNOV/RbcS

100 bp 1 2 3 4 5 6 7 NK PK pNOV/RbcS



➤ přítomnost genu *HisCUP* v konstrukt
ověřena metodou PCR a restriční štěpením

100 bp – standard 100 bp DNA LADDER

1-7 – pl. DNA z jednotlivých kolonií 1-7

NK – PCR s vodou

PK – PCR s pTrc*HisCUP* (324 bp)



Připraven konstrukt pNOV/RbcS/*HisCUP*

Transformace bakterie *Agrobacterium tumefaciens*



- plazmid pNOV/RbcS/*HisCUP* byl elektroporací vnesen do bakterie *Agrobacterium tumefaciens* C58-C1.



Agrobacterium tumefaciens

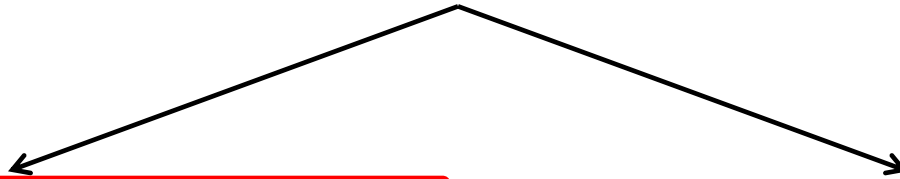
- bakterie *Agrobacterium tumefaciens* je schopna vnést část své plazmidové DNA (T-DNA) do chromozomu rostlinné buňky

Postup práce

Příprava konstruktů pNOV/RbcS/HisCUP



Agrobacterium tumefaciens + pNOV/RbcS/HisCUP



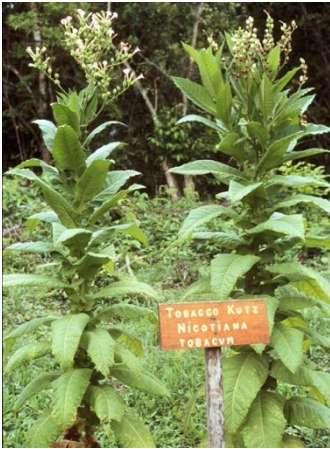
Transientní exprese

- tabák viržinský
- metoda pro ověření exprese genů v rostlinách

Trvalá transformace

- len setý
- metoda pro získání transgenních rostlin

Ověření exprese genu *HisCUP* v rostlinách *Nicotiana tabacum*



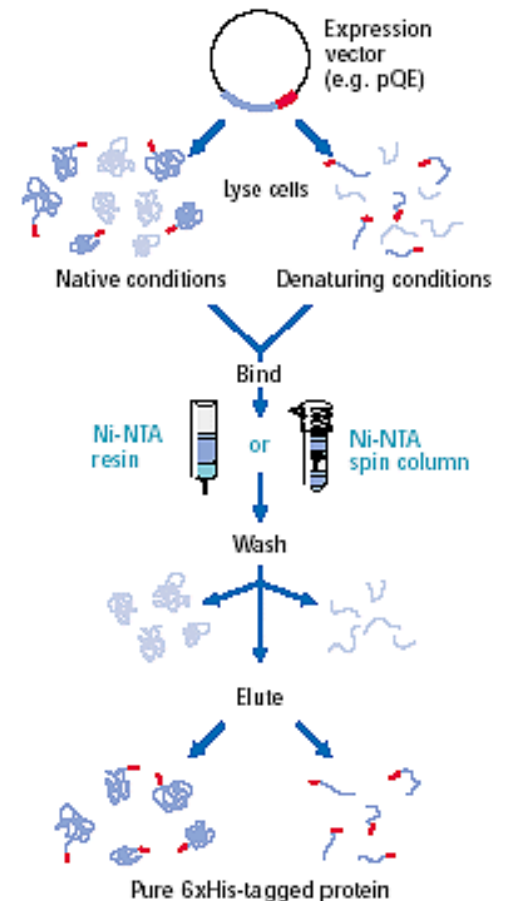
Tabák viržinský

- metodou transientní exprese
- po třech dnech sklizení listů

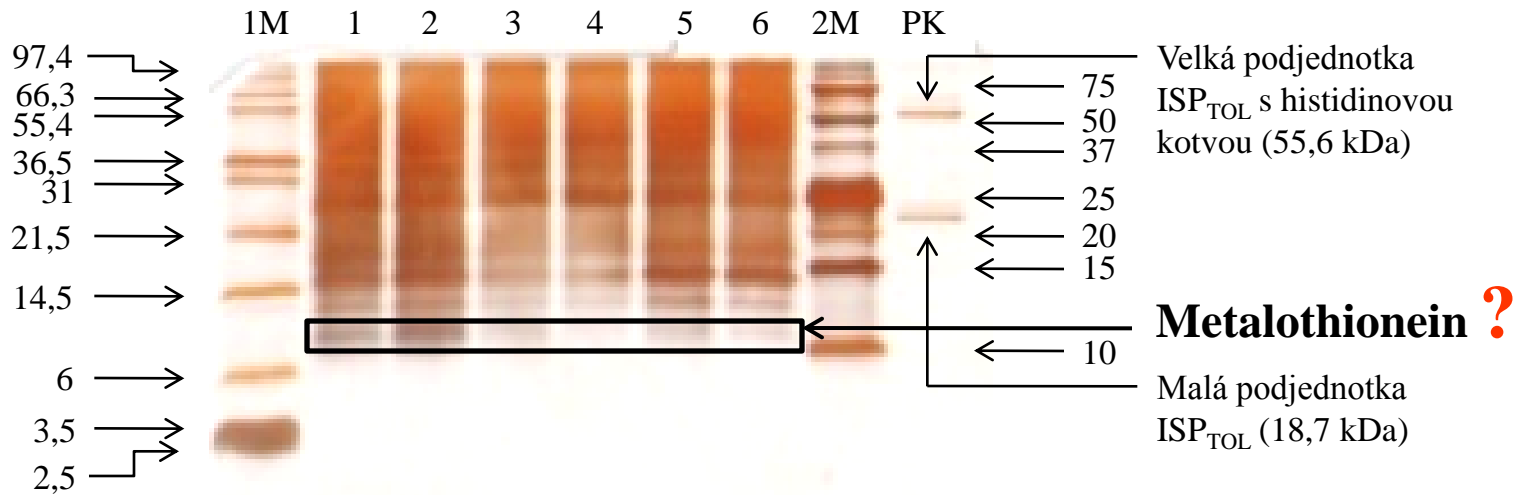
➤ izolace metalothioneinu pomocí Ni-NTA

➤ tricin SDS elektroforéza

Protein Purification with the Ni-NTA Protein Purification System



Ověření exprese genu *HisCUP* v roślinách *Nicotiana tabacum*



1M – standard MARK 12™ upstained standards

1 – 1. frakce – transientní exprese

2 – 2. frakce – transientní exprese

3 – 3. frakce – transientní exprese

2M – standard DUAL COLOR STANDARDS

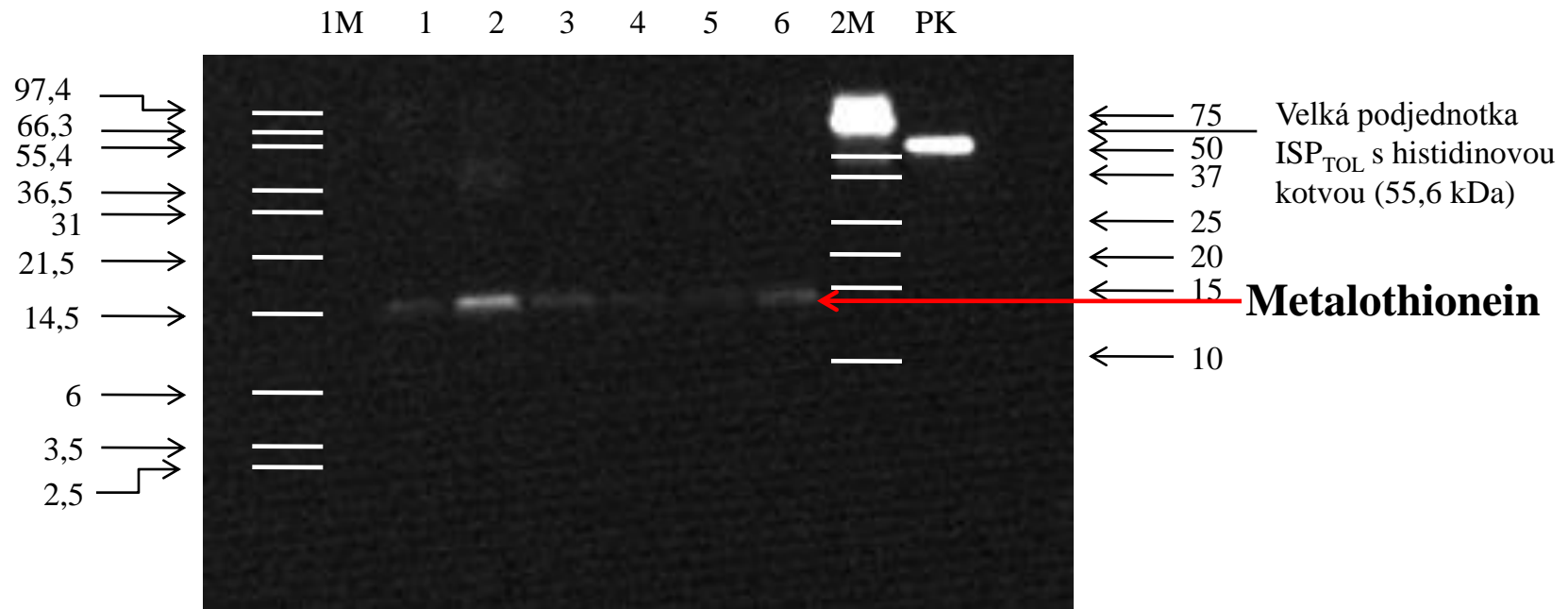
PK – pozitivní kontrola toluendioxygenasa

4 – 4. frakce – transientní exprese

5 – 1. frakce – negativní kontrola

6 – 2. frakce – negativní kontrola

Ověření exprese genu *HisCUP* v roślinách *Nicotiana tabacum*



1M – standard MARK 12™ upstained standards

1 – 1. frakce – transientní exprese

4 – 4. frakce – transientní exprese

2 – 2. frakce – transientní exprese

5 – 1. frakce – negativní kontrola

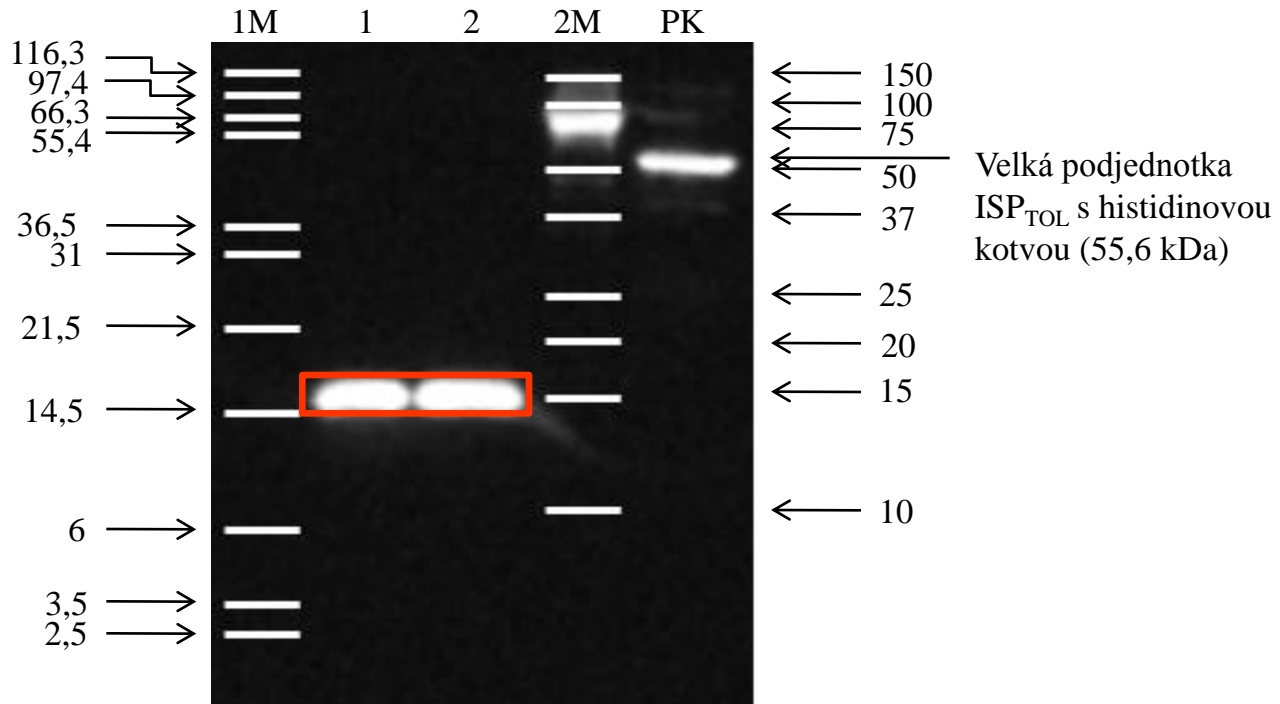
3 – 3. frakce – transientní exprese

6 – 2. frakce – negativní kontrola

2M – standard DUAL COLOR STANDARDS

PK – pozitivní kontrola toluendioxygenasa

Exprese genu *HisCUP* v bakteriích *E. coli* B121 (DE3)



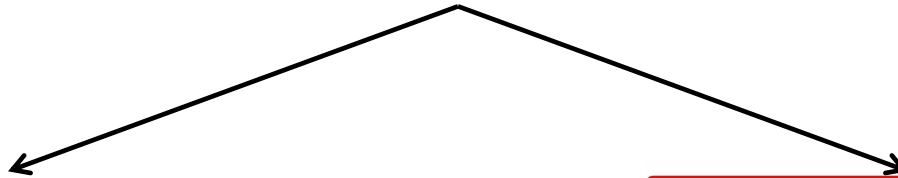
- 1M** – standard MARK 12™ upstained standards
- 1** – 3.+ 4. frakce – exprese v *E. coli* B121 (DE3)
- 2** – 7. frakce – exprese v *E. coli* B121 (DE3)
- 2M** – standard DUAL COLOR STANDARDS
- PK** – pozitivní kontrola toluendioxygenasa

Postup práce

Příprava konstruktů pNOV/RbcS/HisCUP



Agrobacterium tumefaciens + pNOV/RbcS/HisCUP



Transientní exprese

- tabák viržinský
- metoda pro ověření exprese genů v rostlinách

Trvalá transformace

- len setý
- metoda pro získání transgenních rostlin

Porovnání rostlin lnu a tabáku

Len setý

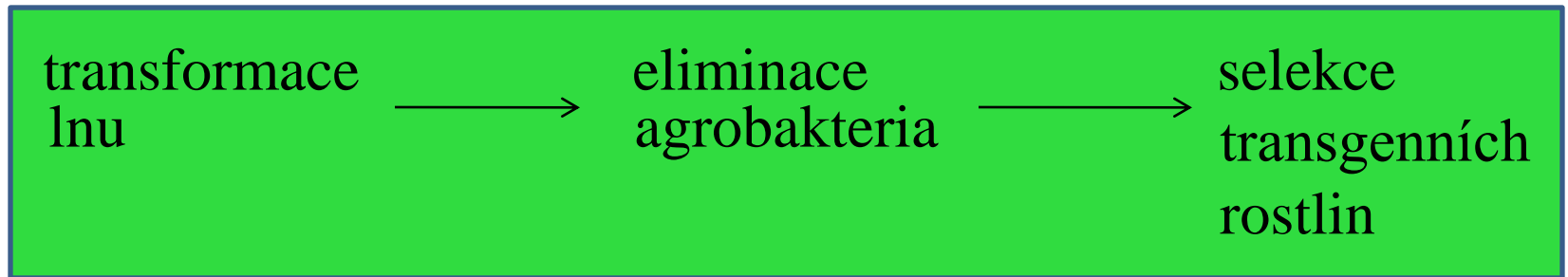
- malá plocha listů – velmi obtížně proveditelná transientní exprese
- nižší úspěšnost transformace
- dlouhá selekce transgenních rostlin – tvorba chimérických rostlin
- zatím ne zcela dořešen postup regenerace - stále se optimalizuje
- obtížná tvorba kořenů

Tabák viržinský

- snadné provedení transientní exprese
- vyšší úspěšnost tvorby transgenních rostlin
- snadná a rychlejší selekce transgenních rostlin
- standardní postup regenerace, dokonalá znalost podmínek
- optimalizované kořenící médium

Transformace rostlin lnu setého

- pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidem pNOV/RbcS/HisCUP

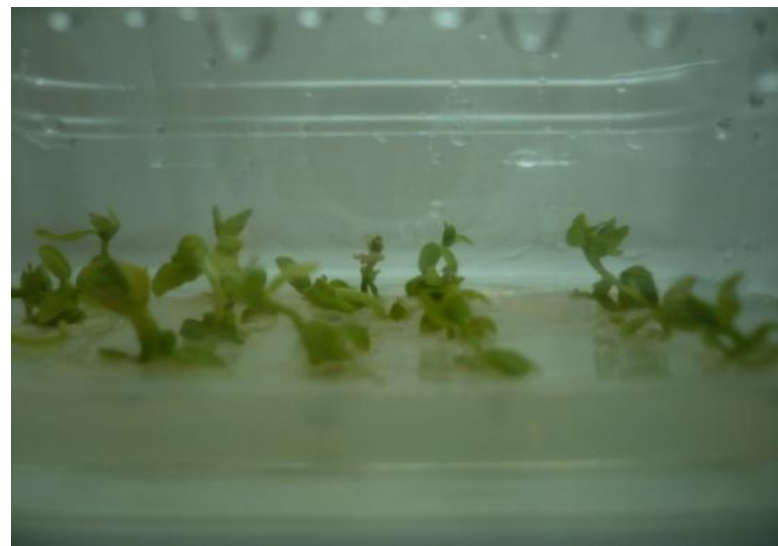


↓
na médiu s mannosou

Transformace rostlin lnu setého



Hypokotyl s regeneranty



Regenerující rostliny

Závěr

- byl připraven rostlinný konstrukt pNOV/RbcS/*HisCUP* a byla ověřena sekvence genu *HisCUP*.
- připravený plazmid byl vnesen do bakterie *Agrobacterium tumefaciens* C58-C1
- byl proveden pokus ověření exprese vektoru v tabáku metodou transientní exprese, expresi se však zatím nepodařilo jednoznačně potvrdit
- byl zahájen pokus trvalé transformace lnu setého bakterií *Agrobacterium tumefaciens* obsahující pNOV/RbcS/*HisCUP*

Děkuji za pozornost

Práce byla podporována granty 1M06030, MSM 6046137305, Z40550506, MSMT č. 21/2010.