

Název úlohy:

TRANZIENTNÍ TRANSFORMACE POKOŽKOVÝCH BUNĚK LISTŮ *NICOTIANA BENTAMIANA* A *ARABIDOPSIS THALIANA*

Rostlinný materiál:

Mladé rostliny *Nicotiana bentamiana*, listy *Arabidopsis thaliana*

Bakteriální kmeny:

Agrobacterium tumefaciens nesoucí konstrukt kódující: GFP; GFP fúzané se signálními sekvencemi pro lumen ER (viz protokol vizualizace endoplazmatického retikula); GFP fúzané s rostlinným fimbrinem (s aktinem asociovaným proteinem), GFP fúzané s rostlinným tubulinem.

DNA pro bio-balistickou metodu:

GFP fúzané se signálními sekvencemi pro lumen ER, GFP fúzané s rostlinným fimbrinem (s aktinem asociovaným proteinem), GFP fúzané s rostlinným tubulinem.

Princip metody transformace infiltrací bakterií *A. tumefaciens*:

Do buněk listové pokožky mladých rostlin jsou prostřednictvím póru vneseny bakterie *A. tumefaciens*, jejichž genetický materiál byl pozměněn tak, aby byla optimalizována přirozená schopnost této bakterie vnášet své geny do genomu rostlinných buněk (transformace). Tato bakterie nese zároveň DNA konstrukt, který kóduje námi studovaný protein fúzaný s molekulární značkou GFP. Po vnesení do rostlinné buňky v průběhu transformace je tento konstrukt rostlinnou buňkou přepisován a je syntetizován studovaný protein s molekulární značkou.

Po vnesení bakterií do prostor mezofylu listu zahajují bakterie transformaci jednotlivých buněk. Transformované buňky začínají studovaný protein syntetizovat během několika desítek hodin po transformaci.

Kvůli schopnosti rostlinných buněk účinně potlačovat expresi „cizích“ genů (tzv. silencing), je možno společně s výše popsányi bakteriemi vnášet i další kmen *A. tumefaciens*, který nese konstrukt p19, kódující faktor, který jevu silencingu zabraňuje. Vzhledem ke krátkodobé expresi není pro účely praktika supresor využíván.

Princip metody transformace bio-balistickou metodou:

Do buněk je vpravována DNA ve formě zlatých nanopartikulí (1-0,6 μm) obalených DNA. Partikule jsou vystřelovány z pistole pod tlakem heliového plynu (150 psi). Při zasažení jádra dochází často k přepisu DNA a tedy k expresi daného vektoru v zasažené - transformované buňce.

Postup transformace:

Infiltrace:

Naplňte směsí bakteriální suspenze 2ml stříkačku. Přitiskněte ji ke spodní straně listů *N. bentamiana* a pomalým a stálým tlakem infiltrujte bakteriální suspenzi do mezofylu listů (roztok proniká do mezofylu skrze průduchy). Fixou označte hranice plochy, kam pronikla bakteriální suspenze.

Použijte pro transformaci listy cca ve 2/3 výšky rostlin. Na rostlině se 4-5ti listy lze transformovat 2-3 listy. Inkubujte rostliny v kultivační místnosti 22°C, 16hod/světlo, 8hod/tma, po dobu 1-2 dnů.

Bio-balistika:

Podložte list *Arabidopsis* několika vrstvami buničité vaty (vrchní stranou dolů; transformována bude abaxiální strana), překryjte sítkou. Jemně přitiskněte na list ústí pistole a aplikujte 2 výstřely. List uchovávejte ve vlhké komůrce po dobu 24-48 hodin.

Pozorování:

Vystříhňte kousek z plochy transformovaného listu, která byla infiltrována bakteriální suspenzí nebo bio-balistikou, a umístěte do kapky vody na podložní sklíčko. Pozorujte pod fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopem.

Úkol:

Ve fluorescenčním mikroskopu a konfokálním mikroskopu pozorujte buňky pokožky listu. Popište distribuci molekulární značky, stanovte, která buněčná struktura je molekulární značkou vizualizovaná. Všimněte si detailně transformace volného GFP, popište jeho distribuci.