

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina KOŠMRLJ

**OPTIMIZACIJA POSTOPKOV PREHODNE
TRANSFORMACIJE CELIČNE KULTURE TOBAKA
BY-2 Z UPORABO SPOROČILNEGA GENA ZA
ZELENO FLUORESCIRAJOČI PROTEIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina KOŠMRLJ

**OPTIMIZACIJA POSTOPKOV PREHODNE TRANSFORMACIJE
CELIČNE KULTURE TOBAKA BY-2 Z UPORABO SPOROČILNEGA
GENA ZA ZELENO FLUORESCIRAJOČI PROTEIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OPTIMIZATION OF BY-2 TOBACCO CELL LINE TRANSIENT
TRANSFORMATION USING MARKER GENE FOR GREEN
FLUORESCENT PROTEIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za dodiplomski študij Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca, za recenzentko pa izr. prof. dr. Kristino Gruden.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut BOHANEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Kristina GRUDEN
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Nacionalni inštitut za biologijo

Datum zagovora: 28. julij 2010

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kristina Košmrlj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.3: 58.086.83: 577.21 (043.2)
KG	rastlinska biotehnologija / celična kultura tobaka BY-2 / protoplasti / viabilnost / prehodna transformacija / sporočilni geni
AV	KOŠMRLJ, Kristina
SA	BOHANEČ, Borut (mentor) / GRUDEN, Kristina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	OPTIMIZACIJA POSTOPKOV PREHODNE TRANSFORMACIJE CELIČNE KULTURE TOBAKA BY-2 Z UPORABO SPOROČILNEGA GENA ZA ZELENO FLUORESCIRAJOČI PROTEIN
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 36 str., 12 pregl., 7 sl., 40 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Celična kultura tobaka BY-2 se uporablja v številnih laboratorjih po svetu. Izkazuje jo predvsem visoka stopnja proliferacije celic. Za poskuse transformacije je celična kultura primerna zaradi enostavnega gojenja, izolacije protoplastov in nizke avtofluorescence, ki bi lahko bila moteča pri detekciji transformiranih protoplastov. Cilj diplomskega dela je bila vzpostavitev celične kulture, optimizacija postopka za izolacijo protoplastov in metode za določanje viabilnosti ter preučitev in optimizacija faktorjev, ki vplivajo na uspeh prehodne transformacije. Ugotovili smo, da je potrebna vsaj 3-urna inkubacija celične kulture z litičnimi encimi, da zagotovimo ustrezno razgradnjo celične stene za kasnejšo uspešno transformacijo. Kot bolj primerno se je izkazala celulaza Onozuka R-10 v kombinaciji z macerocimom R-10 in pektoliazom Y23, saj smo tako dosegali višjo viabilnost protoplastov kot z uporabo celulaze Onozuka RS. Za določanje viabilnosti protoplastov smo uporabili 2 postopka. Po barvanju s fluorescein diacetatom lahko določamo viabilnost s pomočjo pretočnega citometra ali pa uporabimo barvanje s fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom hkrati ter štejemo obarvane protoplaste pod mikroskopom. Slednja metoda je predvsem primerna za manjše število vzorcev. Najvišji delež transformiranih protoplastov (9,04 %) smo dobili z uporabo 15 minutne inkubacije v temi na sobni temperaturi s 60 µg plazmida pHBT-sgfpS65T in 20 % raztopine PEG4000 s kalcijevim nitratom, kateri nismo umerjali pH vrednosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 602.3: 58.086.83: 577.21 (043.2)
CX	plant biotechnology / BY-2 tobacco cell line / protoplasts / viability / transient transformation / marker genes
AU	KOŠMRLJ, Kristina
AA	BOHANEC, Borut (supervisor) / GRUDEN, Kristina (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2010
TI	OPTIMIZATION OF BY-2 TOBACCO CELL LINE TRANSIENT TRANSFORMATION USING MARKER GENE FOR GREEN FLUORESCENT PROTEIN
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	IX, 36 p., 12 tab., 7 fig., 40 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Tobacco cell line BY-2 has been used in numerous laboratories worldwide. It is known for its unique characteristics such as high growth rate and homogeneity. The cell line is suitable for transformation experiments because of simple cultivation, protoplast isolation and low autofluorescence, which is of particular importance, when light emitting marker proteins, such as the green fluorescence protein (GFP), are being used. The aim of our study was to successfully introduce the BY-2 tobacco cell line and to optimize the procedure for protoplast isolation and viability determination, as well as to evaluate and optimize the factors affecting transient transformation. We found out that at least a 3 hour long incubation with lytic enzymes is needed to provide a suitable cell wall degradation, leading to successful transformation. Higher viability of protoplasts was achieved with the use of Onozuka R-10 cellulose in combination with R-10 macerozyme and Y23 pectolyase than with the use of Onozuka RS cellulose. We either used only fluorescein diacetate staining and determined the viability using flow cytometer or simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide and examined the samples by fluorescence microscopy. The latter procedure is useful especially for smaller number of samples. The highest percentage of transformed protoplasts (9,04 %) was obtained by 15 minutes incubation at room temperature in complete darkness using 60 µg of pHBT-sgfpS65T plasmid and 20 % PEG4000 in a calcium nitrate solution without adjusting the pH value.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 CELIČNA LINIJA BY-2.....	2
2.2 PROTOPLASTI.....	3
2.2.1 Določanje viabilnosti protoplastov s fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom.....	6
2.3 GENSKE TRANSFORMACIJE.....	7
2.3.1 Metode genskih transformacij rastlin	7
2.3.1.1 Postopki indirektnega vnosa DNA v celico.....	8
2.3.1.2 Postopki direktnega vnosa DNA v celico.....	8
2.3.1.2.1 Transformacija z uporabo polietilenglikola.....	9
2.3.1 Sporočilni gen za zeleno fluorescirajoči protein	10
3 MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 CELIČNA KULTURA BY-2.....	13
3.2 METODE.....	13
3.2.1 Gojenje celične kulture.....	13
3.2.1.1 Priprava modificiranega Linsmaier & Skoog gojišča.....	13
3.2.1.2 Subkultivacija celične kulture.....	14
3.2.2 Izolacija protoplastov	15
3.2.2.1 Optimizacija izolacije protoplastov.....	15
3.2.2.2 Določanje viabilnosti protoplastov na pretočnem citometru.....	15
3.2.3 Transformacija.....	16
3.2.3.1 Splošna shema postopka transformacije.....	16
3.2.3.2 Priprava raztopin za poskuse transformacije.....	16
3.2.3.3 Optimizacija suspenzije protoplastov.....	17
3.2.3.4 Izbira plazmidne DNA in koncentracije.....	17
3.2.3.5 Optimizacija raztopine polietilenglikola.....	18
3.2.3.6 Optimizacija postopka inkubacije protoplastov z raztopino PEG in plazmidno DNA.....	18
3.2.3.7 Pregled protoplastov po transformaciji.....	18

3.2.3.7.1 Ocena viabilnosti protoplastov po transformaciji.....	18
3.2.3.7.2 Ocena uspešnosti transformacije.....	19
4 REZULTATI.....	20
4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTOPLASTOV.....	20
4.2 TRANSFORMACIJA.....	21
4.2.1 Optimizacija priprave suspenzije protoplastov.....	21
4.2.2 Izbira plazmidne DNA in koncentracije.....	22
4.2.3 Vpliv sestave raztopine PEG na viabilnost protoplastov in uspešnost transformacije.....	25
4.2.4 Optimizacija postopka inkubacije protoplastov z raztopino PEG in plazmidno DNA.....	25
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	27
5.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTOPLASTOV.....	27
5.2 TRANSFORMACIJA.....	28
6 POVZETEK.....	32
7 VIRI.....	33
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekaj komercialno dostopnih encimov, ki se uporabljajo za razgradnjo celične stene pri produkciji protoplastov (Chawla, 2009: 108).....	5
Preglednica 2: Najbolj pogoste oblike GFP, ki se uporabljajo v rastlinski biotehnologiji. Mutacije so zapisane v standardni obliki (na primer: S65T = mutacija 65. aminokislina iz serina v treonin) (Stewart, 2001: 377).....	11
Preglednica 3: Sestava modificiranega Linsmaier in Skoog gojišča za gojenje BY-2 celične linije.....	14
Preglednica 4: Podatki o uporabljenih plazmidih. HBT je himerni promotor, ki je sestavljen iz promotorja gena koruze C4PPDK ter ojačevalca promotorja CaMV 35S.....	17
Preglednica 5: Sestava uporabljenih raztopin polietilenglikola (PEG).....	18
Preglednica 6: Karakteristike uporabljenih filtrskih blokov pri mikroskopiranju.....	19
Preglednica 7: Primerjava viabilnosti protoplastov po enourni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA.....	21
Preglednica 8: Primerjava viabilnosti protoplastov po dvourni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA.....	21
Preglednica 9: Primerjava viabilnosti protoplastov po triurni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA.....	21
Preglednica 10: Primerjava uspešnosti transformacije glede na različno trajanje inkubacije suspenzije protoplastov (100 µl) z 20 % PEG s kalcijevim nitratom (100 µl) in plazmidno DNA s koncentracijo 1 µg/µl (pHBT-sgfpS65T)	24
Preglednica 11: Primerjava uspešnosti transformacije glede na različno količino uporabljene plazmidne DNA s koncentracijo 1 µg/µl (pHBT-sgfpS65T) ob uporabi 100 µl 20 % PEG s kalcijevim nitratom in 100 µl suspenzije protoplastov.....	24
Preglednica 12: Primerjava vpliva različnih postopkov inkubacije reakcijske mešanice pri povišani temperaturi na viabilnost protoplastov ob uporabi 20 % PEG s kalcijevim nitratom.....	26

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice kulture BY-2.....	2
Slika 2: Protoplasti, izolirani iz celične kulture BY-2.....	4
Slika 3: Protoplasti po barvanju s FDA in PI.....	7
Slika 4: Prikaz določanja viabilnosti protoplastov s pomočjo meritev na pretočnem citometru. a) Biparametrični prikaz viabilnih (R2) in neviabilnih (R1) protoplastov. X-os predstavlja relativno intenziteto ekscitirane zelene fluorescence, y-os pa merilo granuliranosti delcev, določeno z merilcem stranskega sipanja neekscitirane modre laserske svetlobe. b) Prikaz stranskega sipanja. c) Sipanje svetlobe na „rdečem“ kanalu. d) Skupni prikaz meritev na „zelenem“ kanalu. e) Prikaz skupine R1 na „zelenem“ kanalu. f) Prikaz skupine R2 na „zelenem“ kanalu.....	20
Slika 5: Primer transformiranega protoplasta (svetlo zelen) v primerjavi z netransformiranimi, ki so brez dodatka vidne svetlobe slabo vidni.....	22
Slika 6: Različna intenziteta izražanja GFP proteina.....	23
Slika 7: Negativna kontrola transformacije z genom za GFP. Na sliki je vidna avtofluorescenca protoplastov.....	23

SEZNAM OKRAJŠAV

A	alanin
BY-2	Bright Yellow 2
DAPI	4,6 diamidino-2-fenil-indol
DNA	deoksiribonukleinska kislina
F	fenilalanin
FDA	fluorescein diacetat
G	glicin
GFP	zeleno fluorescirajoči protein
GUS	β -glukoronidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
L	levcin
LS	Linsmaier in Skoog
M	metionin
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kislina
PEG	polietilenglikol
PEG4000	polietilenglikol z molsko maso 4000 g/mol
PI	propidijev jodid
rpm	obrati na minuto
S	serin
T	treonin
V	valin
Y	tirozin
2,4-D	2,4-diklorfenoksiocetna kislina

1 UVOD

Celično kulturo tobaka BY-2 so vzpostavili leta 1972. Do sedaj je bila zaradi svojih lastnosti uporabljena v številnih raziskavah. Za optimizacijo postopka transformacije je predvsem primerna zaradi hitre rasti in razmeroma enostavnega gojenja v pogojih *in vitro*. Tako imamo skozi vse leto na voljo zelo uniformen izhodiščni material za izolacijo protoplastov. Pomembna lastnost protoplastov, pridobljenih iz celičnih suspenzij, je nizka avtofluorescenca, ki je lahko moteča pri prepoznavanju transformiranih protoplastov. Protoplaste lahko transformiramo na različne načine, vendar je transformacija s PEG (polietilenglikol) kljub delovni intenzivnosti primerna za delo na manjšem številu vzorcev, poleg tega pa ne potrebujemo zahtevnejše opreme. Rezultat transformacije je lahko tako prehodna kot tudi trajna transformacija protoplastov.

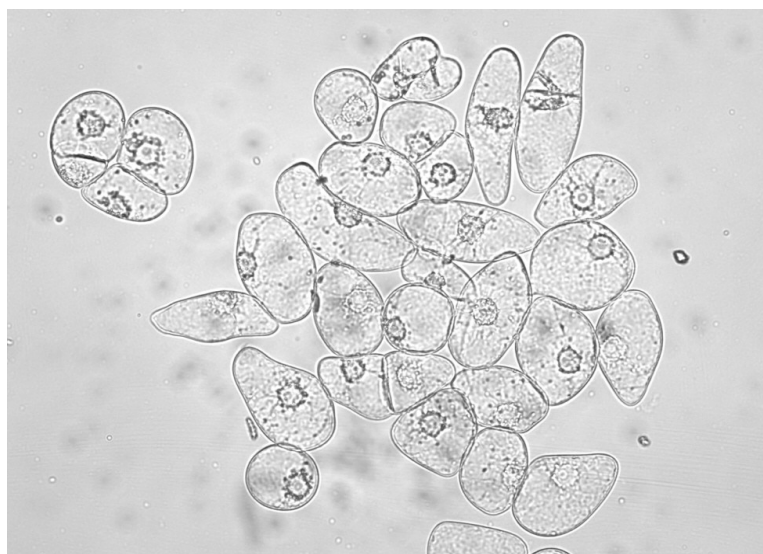
1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je uvedba celične kulture tobaka BY-2 in optimiziran postopek izolacije protoplastov, ki zagotavlja ustrezno viabilnost za kasnejšo transformacijo s pomočjo PEG. Za izolirane protoplaste je bilo potrebno osvojiti in prilagoditi tudi postopke določanja viabilnosti protoplastov s pomočjo fluorescenčne mikroskopije in pretočne citometrije. Cilj je bila prehodna transformacija z genom, ki izraža zeleno fluorescirajoči protein (GFP). Postopek je uporaben za študijo delovanja promotorjev in ekspresije tarčnih genov s pomočjo fuzije z genom za GFP. Podoben postopek se lahko uvede tudi pri drugih rastlinskih vrstah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIČNA LINIJA BY-2

Celična kultura tobaka BY-2 je bila vzpostavljena iz kalusa tobaka (*Nicotiana tabacum* L.) kultivarja Bright Yellow 2 na centralnem raziskovalnem inštitutu japonskega podjetja Japan Tobacco and Salt Public Corporation in se sedaj uporablja v številnih laboratorijih po svetu. Izmed 40 vrst *Nicotiana* in 3 vrst *Populus* je imela ravno ta linija najvišjo stopnjo proliferacije (Kato in sod., 1972). Gojimo jo v gojišču po Linsmeier in Skoog (1965) z dodatkom saharoze in 2,4-D (2,4-diklorfenoksiocetna kislina). Z uporabo gojišča in metodo gojenja po Nagata in sod. (1992) lahko dosežemo med 80- in 100-kratno pomnožitev celic v sedmih dneh. Delno je za visoko stopnjo proliferacije odgovorna koncentracija fosfata v gojišču, ki je veliko višja kot v običajnem Murashige in Skoog (1962) gojišču. Visoka poraba fosfata v prvih treh dneh po subkultivaciji je značilna za celično kulturo BY-2. V stacionarni fazi rasti so celice vakuolizirane in paličaste oblike, ki se po subkultivaciji v sveže gojišče spremenijo v sferično obliko z veliko citoplazme.



Slika 1: Celice kulture BY-2

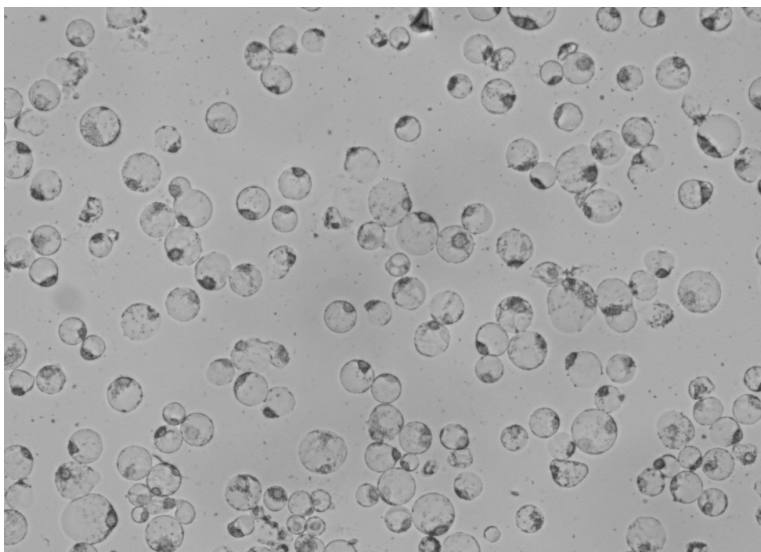
Po barvanju z DAPI (4,6 diamidino-2-fenil-indol) so opazili visok porast intenzitete fluorescence plastidnih nukleoidov po subkultivaciji celic iz stacionarne faze rasti, ki je po dveh dneh postopoma začela upadati. 6 ur po subkultivaciji v sveže gojišče so opazili izjemno povečanje vsebnosti DNA (deoksiribonukleinska kislina) v plastidih, ki je doseglo maksimum po 28 urah. Z dodatnimi testi so dokazali, da prvi dan kultivacije celice proizvajajo preferenčno plastidno DNA v primerjavi z jedrno. Drugi dan prihaja pretežno do cepitve plastidov. Število kopij plastidne DNA na celico naraste prvi dan kultivacije iz

$1 \cdot 10^4$ na $11 \cdot 10^4$, do sedmega dneva kultivacije ponovno pade na začetno vrednost. Na osnovi teh odkritij so nadaljevali študije celičnih organelov na celični kulturi BY-2. Kot prednost se je izkazala tudi izredno enostavna izolacija organelov iz protoplastov. Rezultat je bilo odkritje mesta začetka replikacije (angl. origin of replication) plastidne DNA pri višjih rastlinah (Takeda in sod., 1992). Nagata in sod. (1992, 1999) ter Samuels in sod. (1998) poročajo o metodi, s katero je mogoče doseči visoko sinhronost celic v kulturi BY-2. Kombinacija uporabe tretiranja celic z afidikolinom, ki inhibira sintezo DNA, in propizamida, ki inhibira formacijo mikrotubulov delitvenega vretena, privede do celične kulture z 80- do 95-odstotnim mitotskim indeksom, ki predstavlja delež celic v mitozii. Primerljiva stopnja sinhronizacije celic je bila pri celični kulturi vrste *Arabidopsis thaliana* dosežena veliko kasneje (Menges in sod., 2002). Visoko sinhronizirane celične kulture so zelo primerne za študije celičnega cikla. Tako je bilo s pomočjo celične kulture BY-2 izvedenih več študij o vlogi ciklinov ter delovanju mikrotubulov med celično delitvijo. Velika prednost *A. thaliana* pa je dostopnost mutantnih linij, ki jih pri celični kulturi BY-2 ni (Geelen in Inze, 2001).

Celična kultura BY-2 se uporablja tudi za študije diferenciacije v celice različnih tkiv. Pri gojenju v tekočem gojišču tvorijo majhne skupke, ki so sestavljeni iz nekaj celic. Vsaka celica je direktno izpostavljena gojišču kar omogoča oceno vpliva okolja (hranila, hormoni itd.) na posamezno celico. S pomočjo celične kulture BY-2 je bilo izvedenih več študij o diferenciaciji in dediferenciaciji celic, specializiranih v shranjevanje škroba, predvsem na osnovi dinamike morfologije plastidov, oblike celic, izražanja genov in vpliva hormonov (Miyazawa in Sakai, 2006).

2.2 PROTOPLASTI

Protoplast rastlinske celice je sestavljen iz plazmaleme in vseh struktur znotraj plazmaleme, torej rastlinska celica, kateri je bila na kakršenkoli način odstranjena celična stena. Prvi protoplasti so bili izolirani z mehansko metodo leta 1892, vendar se je ta izkazala za precej neuporabno zaradi delovne intenzivnosti in nizkih donosov. Leta 1960 je prvič uspelo izolirati protoplaste z uporabo encimov (Coking, 1960), ki razgrajujejo celično steno. Encimska metoda je kmalu postala vodilna za izolacijo protoplastov. Pod ustreznimi pogoji je mogoča regeneracija celične stene, tako so protoplasti postali zanimivi tudi za postopke transformacije in zlitja (fuzije) protoplastov, pridobljenih iz somatskih celic. Na ta način lahko pridobivamo tudi nove rastlinske vrste.



Slika 2: Protoplasti, izolirani iz celične kulture BY-2

Na uspeh izolacije protoplastov vpliva več faktorjev, kot so izhodni rastlinski material, uporabljeni encimi in pogoji encimske izolacije. Protoplaste lahko izoliramo iz različnih rastlinskih tkiv (listi, korenine, embriji, mikrospore itd.) kot tudi iz kalusa in suspenzijskih celičnih kultur. Najbolj primerno tkivo za izolacijo je mezofilno tkivo mladih listov, saj omogoča izolacijo velikega števila uniformnih protoplastov. Če izoliramo protoplaste iz kalusnega tkiva ali suspenzijskih celičnih kultur, je najbolje izbrati zgodnjo logaritemsko fazo rasti. Da izoliramo protoplaste, potrebujemo litične encime, ki razgradijo komponente primarne in sekundarne strukture celične stene (celulozo in hemicelulozo) ter osrednjo lamelo, ki je sestavljena pretežno iz pektina. V te namene uporabljamo številne encime, ki jih proizvajajo glive (preglednica 1).

Preglednica 1: Nekaj komercialno dostopnih encimov, ki se uporabljajo za razgradnjo celične stene pri produkciji protoplastov (Chawla, 2009: 108)

Encim	Izvor
Celulaza Onozuka R-10	<i>Trichoderma viride</i>
Celulaza Onozuka RS	<i>Trichoderma viride</i>
Celulizin	<i>Trichoderma viride</i>
Driselaza	<i>Irpex lacteus</i>
MeicelazaP-1	<i>Trichoderma viride</i>
Hemicelulaza	<i>Aspergillus niger</i>
Hemicelulaza H-2125	<i>Rhizopus spp.</i>
Rocim HP 150	<i>Aspergillus niger</i>
Helikaza	<i>Helix pomatia</i>
Maceraza	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Macerocim R-10	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Pektoliaza	<i>Aspergillus japonicus</i>
Zimoliaza	<i>Arthrobacter luteus</i>

Za delovanje encimov moramo zagotoviti ustrezne pogoje. V večini primerov je pH vrednost gojišča za encime med 4,7 in 6,0 ter temperatura od 25 do 30 °C. Tudi trajanje inkubacije z encimi se razlikuje. Lahko je dovolj že 30 minut, medtem ko nekateri vzorci zahtevajo daljšo inkubacijo (do 20 ur). Za izolacijo in kasnejše gojenje protoplastov potrebujemo primerno izotonično gojišče, saj bi protoplasti drugače popokali. V ta namen dodajamo gojiščem različne ionske in neionske topljence. Kot neionske topljence uporabljamo predvsem manitol, sorbitol, glukozo, fruktozo, galaktozo in saharozo. Soli, kot so kalijev klorid, kalcijev klorid in magnezijev sulfat, predstavljajo ionske topljence. V primernem gojišču so sveže izolirani protoplasti sferične oblike (Chawla, 2009).

Za izolacijo protoplastov iz celične kulture BY-2 priporočajo Stoeckel in Takeda (2002) ter Aoyagi (2006) encime celulazo Onozuka RS, macerocim Onozuka R-10 in pektoliazo Y23, vendar Mathur in sod. (1995), sicer za izolacijo iz listnega tkiva vrste *A. thaliana*, poročajo o boljših rezultatih s celulazo Onozuka R-10.

Pri uporabi celulaze Onozuka RS za izolacijo protoplastov iz celične kulture tobaka BY-2 naj bi zadostovala 1 do 1,5 urna inkubacija z encimi (Stoeckel in Takeda, 2002). Pri uporabi celulaze R-10 in listov kot izhodnega materiala Yoo in sod. (2007) uporabljajo 3,5-urno inkubacijo, medtem ko drugi predlagajo prekonočno inkubacijo.

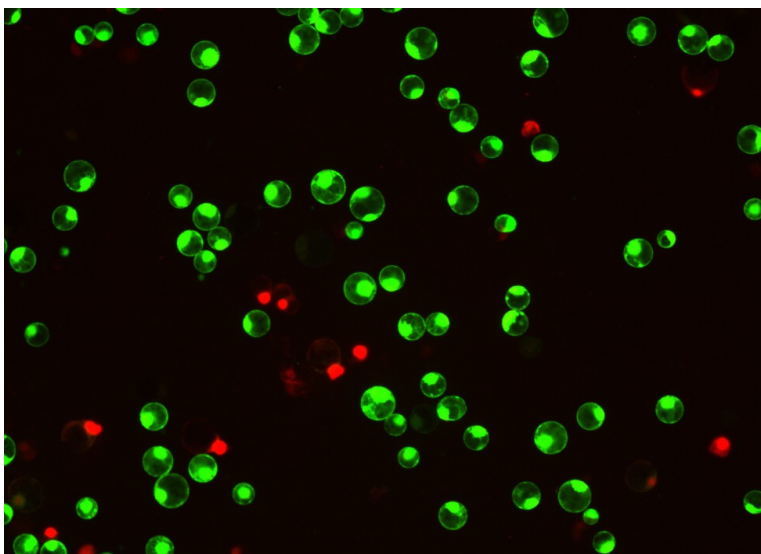
Nugent in sod. (2006) ter Joen in sod. (2007) priporočajo rahlo stresanje med inkubacijo z encimi, medtem ko drugi avtorji ne poročajo o uporabi stresanja.

Za gojenje protoplastov po transformaciji se uporabljajo različna gojišča. Locatelli in sod. (2003) uporabljajo raztopino W5, prav tako tudi Maddumage in sod. (2002), vendar brez dodatka glukoze. Osnova raztopine W5 so soli natrijev, kalcijev in kalijev klorid. Yoo in sod. (2007) uporabljajo gojišče W1, ki vsebuje manitol in kalijev klorid. V uporabi so tudi gojišča z nekoliko drugačno sestavo. Tako Mathur in Koncz (1998) priporočata gojišče, ki vsebuje MS makro- in mikroelemente, Gamborg B5 vitamine in saharozo ali manitol. Vrednost pH, ki je ponavadi 5,8, stabiliziramo z dodatkom MES (2-(N-morfolino) etansulfonska kislina). Na splošno velja, da naj bi gojišča za protoplaste imela nizko koncentracijo železa in cinka ter naj ne bi vsebovala amonija. Nasprotno naj bi bila koncentracija kalcija 2- do 4-krat višja od koncentracije v gojišču za celične kulture. Za vzpodbujanje celične delitve se gojiščem dodajajo tudi različni avksini. S spreminjanjem razmerja avksinov in citokininom stimuliramo morfogenezo (Chawla, 2009).

Ponavadi protoplaste gojimo v popolni temi ali ob rahli osvetlitvi. Jakost osvetlitve lahko povečamo po nekaj dneh kultivacije na 2000 do 5000 lux. Idealna temperatura gojenja se giblje med 20 in 28 °C (Chawla, 2009).

2.2.1 Določanje viabilnosti protoplastov s fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom

Viabilnost protoplastov določamo z barvanjem s FDA (fluorescein diacetat), ki po mnenju Davey in sod. (2005) ostaja najbolj zanesljiva metoda za določanje viabilnosti protoplastov. Neviabilne celice obarvamo s PI (propidijev jodid). FDA je nepolarna spojina, ki prehaja skozi celično membrano živih celic, kjer celične esteraze cepijo diacetatno skupino, preostali fluorescein ostaja v celicah in fluorescira. PI prehaja membrane tako viabilnih kot tudi neviabilnih celic, vendar se iz živih nemudoma izloči, v mrtvih pa se veže na DNA. Jedra neviabilnih celic svetijo močno rdeče (Jones in Senft, 1985).



Slika 3: Protoplasti po barvanju s FDA in PI

2.3 GENSKE TRANSFORMACIJE

Transformacija je vnos DNA konstrukta v gostiteljsko celico. Na področju žlahtnjenja rastlin se transformacije izvajajo predvsem z namenom izboljšanja kmetijskih lastnosti. Uporabnost se kaže tudi v kreiranju novih proizvodov za potrebe kozmetične, farmacevtske ali splošne industrije. Metode genskega inženiringa so bile že v 60. letih 20. stoletja razvite pri bakterijah in se od takrat naprej neprestano dopolnjujejo. Od sredine osemdesetih let 20. stoletja te metode niso več omejene samo na bakterije, temveč jih je možno z modifikacijami uporabljati pri praktično vseh živih organizimih (Bohanec, 2004).

Poznamo prehodno in trajno transformacijo. Pri prehodni transformaciji se transgen izraža le krajši čas in se ne prenaša na potomce. Vzpostavitev prehodnega izražanja transgena je izredno uporabna pri študijah izražanja genov kakor tudi pri optimiziranju faktorjev, ki vplivajo na uspeh samega transformacijskega postopka. Le pri manjšem deležu celic se transgen vključi v plastidni ali jedrni genom in se prenaša na potomce. Iz teh celic je možno razviti transgene rastline ob predpostavki, da je poznan učinkovit postopek za regeneracijo (Chawla, 2009).

2.3.1 Metode genskih transformacij rastlin

Postopke vnosa DNA v rastlinske celice oziroma tkiva delimo na neposredni oziroma direktni način (vnos gole DNA brez pomoči vektorja) in posredni oziroma indirektni način (vnos s pomočjo vektorjev).

2.3.1.1 Postopki indirektnega vnosa DNA v celico

Posredni način transformacij rastlin omogoča predvsem bakterija *Agrobacterium tumefaciens* ter njej sorodna vrsta *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* je talna bakterija, ki v naravi vdre v rastline na ranjenem mestu ter na njih izzove nastanek tumorjev oziroma kalusnega tkiva. Ta lastnost se deduje s Ti plazmidom. Del tega plazmida bakterija vključi v rastlinski genom ob pomoči beljakovin, ki jih kodira isti plazmid. V tem primeru ne gre za prenos gole DNA, saj je ta zavarovana z beljakovinami, ki olajšajo vstop DNA v citoplazmo in jedro. V transformacijske namene je bil plazmid nekoliko modificiran, saj so izključeni bakteriji koristni geni, namesto teh pa je vključen željeni konstrukt (Bohanec, 2004).

Kot vektor bi bilo možno uporabljati tudi rastlinske viruse. Zaenkrat se raziskuje na različnih skupinah virusov (družine DNA virusov *Caulimoviridae* in *Geminiviridae* ter različni RNA virusi, med katerimi je najbolj znan virus tobakovega mozaika), ki bi lahko bili uporabni za transformacijo rastlin (Chawla, 2009).

2.3.1.2 Postopki direktnega vnosa DNA v celico

Poznamo različne postopke direktnega vnosa DNA v rastlinske celice, med katerimi so najbolj znani elektroporacija, biolistika, mikro- in makroinjiciranje, vnos s pomočjo liposomov ter vnos s pomočjo uporabe PEG.

Elektroporacija je tehnika, ki temelji na reverznem povečanju permeabilnosti celične membrane s pomočjo električnih impulzov. Tako je omogočena difuzija različnih makromolekul, med katerimi je tudi DNA. Uporablja se lahko za transformacijo protoplastov, vendar je možna tudi transformacija rastlinskih celic s celično steno.

Pri mikro- in makroinjiciranju DNA vbrizgamo direktno v jedro oziroma željen organel celice, ki je bila predhodno fiksirana.

Liposomi so umetni vezikli, zgrajeni iz lipidnega dvosloja, s pomočjo katerih lahko v celico vnašamo različne snovi. Uporabljajo se za vnos DNA v protoplaste, lahko tudi v kombinaciji s PEG. Velika prednost je predvsem zaščita DNA pred razgradnjo z nukleazami (Chawla, 2009).

DNA lahko naneseemo tudi na majhne delce zlata ali volframa s premerom 0,1 do 1,5 μm in z njimi obstreljujemo celice. Postopek imenujemo biolistika. Običajno uporabljamo t. i. gensko pištolo (angl. gene gun). Delce naneseemo na membrane ali plastične „izstrelke“, jih nato s pomočjo potisnjene plina (helij ali dušik) močno pospešimo in „ustrelimo“ v tarčno tkivo. Tako delci prodrejo skozi celično steno in omogočijo vnos DNA. Metoda se

uporablja predvsem kot alternativa za vrste, pri katerih posredni vnos ni uspel, in plastidno transformacijo (Bohanec, 2004).

2.3.1.2.1 Transformacija z uporabo polietilenglikola

Transformacija z uporabo PEG drugače kot prej opisane direktne metode vnosa DNA v celico, ki spadajo med fizikalne metode, spada med kemične metode, saj s kemijskim agensom destabiliziramo celično membrano in tako omogočimo prehod molekul v celico.

Za transformacijo potrebujemo suspenzijo protoplastov, katerim dodamo plazmidno DNA ter raztopino PEG, ki vsebuje osmotike. Sledi nekaj minutna inkubacija. Rezultat je lahko tako prehodna kakor tudi trajna transformacija protoplastov.

Na uspešnost transformacije z uporabo PEG vpliva več faktorjev in sicer rastlinski material za izolacijo protoplastov, izbira plazmida, raztopina PEG, postopek inkubacije s plazmidno DNA in PEG itd.

Večina poskusov je bila izvedena z uporabo 40 % raztopino PEG z molekulsko maso 4000 g/mol (PEG4000). Mathur in Koncz (1998) sicer ob uporabi 40 % raztopine PEG z molsko maso 1450 g/mol predlagata uporabo 20 ali celo manj odstotno raztopino, v kolikor je po postopku transformacije preveč protoplastov poškodovanih. Yoo in sod. (2007) poročajo o boljših rezultatih z uporabo PEG4000 določenega proizvajalca. Za vnos DNA v protoplaste so v raztopini PEG nujno potrebni dvovalentni kalcijevi ali magnezijevi ioni. Gallie (2001) poroča o izredno nizki uspešnosti transformacije protoplastov vrste *Daucus carota* L. brez prisotnosti le-teh ionov v raztopini PEG. Prav tako ugotavlja, da se uspešnost transformacije viša z uporabo bolj koncentrirane raztopine PEG.

Glede trajanja inkubacije protoplastov skupaj z raztopino PEG in plazmidno DNA se mnenja razlikujejo. Yoo in sod. (2007) uporabljajo največ 15-minutno inkubacijo, pri čemer naj bi 5-minutna že zadostovala, medtem ko Joen in sod. (2007) poročajo o boljših rezultatih s 30-minutno inkubacijo v primerjavi z 10-minutno. Nekateri avtorji z različnimi postopki inkubacije pri povišani temperaturi dosegajo boljše rezultate v primerjavi z inkubacijo pri sobni temperaturi. Po mnenju Maddumage in sod. (2002) je optimalna temperatura inkubacije med 37 in 42 °C.

Uporaba transformacijskega postopka s PEG ima kar nekaj prednosti. Kljub delovni intenzivnosti je vseeno cenejša od uporabe biolistike (Nugent in sod., 2006), saj ne potrebujemo posebne laboratorijske opreme. Pri nekaterih rastlinskih vrstah še ni uspelo pridobiti zadovoljivih rezultatov s transformacijo z uporabo *A. tumefaciens*, v teh primerih se je transformacija z uporabo PEG izkazala kot dobra alternativa (Mathur in Koncz,

1998). Verjetno največja slabost metode pa je regeneracija rastlin iz protoplastov, kadar želimo doseči trajno transformacijo rastlin. Tako je spekter rastlinskih vrst, pri katerih je transformacija z uporabo PEG smotrna, relativno ozek (Chawla, 2009). V kolikor želimo doseči prehodno transformacijo, lahko ekspresijo transgena detektiramo že po 2 do 24 urah inkubacije, pri čemer ni nujno zagotavljanje sterilnih pogojev (Yoo in sod., 2007).

2.3.1 Sporočilni gen za zeleno fluorescirajoči protein

Za selekcijo oziroma detekcijo transformiranih celic potrebujemo način, s katerim lahko preverimo, ali se željeni gen res izraža. Seleksijski gen daje celicam, ki imajo vključen gen, določeno prednost pri razvoju. Kot seleksijski marker večinoma uporabljamo gene za odpornost na antibiotike in herbicide. Poznamo pa tudi t. i. sporočilne oziroma markerske gene, ki omogočajo vizuelno prepoznavanje genskih produktov. Starejši markerski gen je denimo gen za GUS (β -glukoronidaza), kjer se tkivo z izraženim markerskim genom obarva modro. Velika pomankljivost tega načina detekcije je, da proučevano tkivo uničimo. Novejši markerski gen za „zeleno fluorescirajoči protein“ (GFP) je pridobljen iz meduze *Aequorea victoria* in ob izražanju povzroča fluorescenco živega tkiva, ki jo je mogoče opazovati pod fluorescentnim mikroskopom. Markerski geni se večinoma uporabljajo pri študijah ekspresije genov, vendar lahko gen za GFP nadomesti tudi seleksijski gen, saj lahko transformirane regenerante preprosto odberemo na osnovi izražene fluorescence (Bohanec, 2004).

GFP ob pravilnem zvitju, prisotnosti kisika in osvetljen z UV (395 nm) ali modro svetlobo (475 nm) emitira svetlo zeleno fluorescenco (509 nm). Za izražanje fluorescence ne potrebuje endogenih niti eksogenih substratov, je zelo stabilen in nima negativnih vplivov na rast, razvoj in fertilitnost rastlin (Stewart, 2001).

O izražanju divjega tipa GFP v rastlinskih celicah prvi poročajo Niedz in sod. (1995). Pri svojih študijah so uporabili protoplaste vrste *Citrus sinensis*. Hu in Cheng (1995) sta dokazala izražanje divjega tipa še v protoplastih koruze, medtem ko jima tega ni uspelo pri tobaku in repnjakovcu. Vzrok neuspehu je bila verjetno nizka ekspresija divjega tipa GFP. Z uporabo močnejšega promotorja je uspelo Sheen in sod. (1995) dokazati izražanje tudi v teh dveh vrstah. Nizka ekspresija divjega tipa GFP je raziskovalce vzpodbudila k iskanju in razvijanju novih oblik GFP z mutacijami in substitucijami, ki so omogočile intenzivnejšo fluorescenco in lažjo detekcijo (Stewart, 2001).

Heim in sod. (1995) poročajo o mutaciji serina na 65. mestu v treonin, ki ima za posledico višjo intenziteto fluorescence, hitrejšo formacijo kromofora, počasnejšo fotokemijsko razgradnjo ter enojen ekscitacijski (pri 489 nm) in emisijski vrh (pri 511 nm). Za učinkovito izražanje v rastlinskih celicah so divjemu tipu GFP odstranili kriptični intron

(Haseloff in sod., 1997), ki je bil razlog za nizko ekspresijo. Dodatno ojačitev fluorescence so dosegli z optimizacijo rabe kodonov (angl. codon optimization) za izbrane vrste (Haas in sod. 1996). Različne oblike GFP so zbrane v Preglednici 2.

Preglednica 2: Najbolj pogoste oblike GFP, ki se uporabljajo v rastlinski biotehnologiji. Mutacije so zapisane v standardni obliki (na primer: S65T = mutacija 65. aminokislina iz serina v treonin) (Stewart, 2001: 377)

Mutanta (vir)	Ekscitacija in emisija (nm)	Modifikacija
Divji tip (<i>Aequorea victoria</i>)	Glavni ekscitacijski vrh 395, 475 / 507	/
mGFP4 (Haseloff)	Glavni ekscitacijski vrh 395, 475 / 509	Sprememba kriptičnega introna, optimizacija rabe kodonov, usmerjena mutageneza
mGFP5 (Haseloff)	395, 475 / 509	Sprememba kriptičnega introna, Mutacije: V163A, S167T, S175G, optimizacija rabe kodonov, usmerjena mutageneza
sGFP(S65T) (Chiu)	489 / 511	Sprememba kriptičnega introna, S65T, optimizacija rabe kodonov
pGFP(S65T) (Pang)	489 / 511	Sprememba kriptičnega introna, S65T, optimizacija rabe kodonov, dodan intron
eGFP (Clontech, Yang)	488 / 507	Sprememba kriptičnega introna. F64L, S65T, Y145F, optimizacija rabe kodonov
smGFP (Davis in Vierstra)	Glavni ekscitacijski vrh 395, 475 / 509	Sprememba kriptičnega introna, F99S, M153T, V163A, usmerjena mutageneza
smRS-GFP (Davis in Vierstra)	490 / 510	Sprememba kriptičnega introna, S65T, F99S, M153T, V163A, usmerjena mutageneza

Splošno je markerski gen za GFP uporaben za vrsto študij delovanja promotorjev in v raznih študijah prehodne ali trajne transformacije brez uporabe dodatnih postopkov barvanja, fiksacije ali disekcije tkiva. Relativno nizka molekulska masa GFP daje možnost uporabe proteina kot fluorescirajoče značke v fuzijskih proteinih, s katerimi lahko proučujemo sortiranje in lokalizacijo proteinov v celici. Možno je slediti interakcijam in konformacijskim spremembam proteinov *in vivo*. Uporaben je za selekcijo mutantov, mapiranje, raziskave rekombinacij in transpozicij. Prav tako je možno sporočilni gen uporabiti za študije inducibilnih promotorjev in študij odziva rastlinskih celic na stresne dejavnike v okolju. Fluorescenca sGFP(S65T) je več kot 100-krat višja od fluorescence

divjega tipa GFP, kar je izredno pomembno pri študiji šibkih promotorjev, saj tako lažje detektiramo njihovo delovanje. Različica je zelo uporabna tudi za študije delovanja inducibilnih promotorjev. Tako lahko zaradi hitre formacije kromofora preučujemo odgovor rastlin v realnem času (Chiu in sod., 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CELIČNA KULTURA BY-2

Za poskuse transformacije smo uporabili celično kulturo tobaka BY-2, ki nam jo je posredoval dr. Alisher Touraev (Institute of Microbiology and Genetics, Vienna Biocenter, Vienna University). Kultura je bila prvotno vzpostavljena na centralnem raziskovalnem inštitutu japonskega podjetja Japan Tobacco and Salt Public Corporation (Kato in sod., 1972).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celične kulture

3.2.1.1 Priprava modificiranega Linsmaier & Skoog gojišča

Gojišče (preglednica 3) po Linsmaier & Skoog (1965) z modifikacijami po Nagata in sod. (1992) smo pripravili iz založnih raztopin ter saharoze. Založno raztopino modificiranih LS (Linsmaier & Skoog) vitaminov smo filtrsko sterilizirali (pore velikosti 0,22 μm ; sterilni filtrski vakuum sistem) in jo dodali gojišču v laminariju. pH vrednost gojišča smo umerili z dodajanjem 1 N KOH in jo merili z elektronskim pH metrom. Pred avtoklaviranjem je gojišče imelo pH 5,8. Pred uporabo smo gojišče avtoklavirali 20 minut pri 121 °C ter ga tako kot vse založne raztopine hranili v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica 3: Sestava modificiranega Linsmaier in Skoog gojišča za gojenje BY-2 celične linije

Sestavine	Koncentracija v založni raztopini (g/l)	Za pripravo 1 litra tekočega gojišča
MS Makroelementi 10x		100 ml
KNO ₃	19	
NH ₄ NO ₃	16,5	
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
MS Mikroelementi 1000x		1 ml
MnSO ₄ * H ₂ O	16,9	
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	8,6	
H ₃ BO ₃	6,2	
Na ₂ MoO ₄	0,25	
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,025	
KI	0,83	
Fe-EDTA 200x		5 ml
Na ₂ -EDTA	7,45	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	2,23	
Modificirani LS vitamini 1000x		1 ml
Mioinozitol	100	
Tiamin HCl	1	
KH₂PO₄	185	1 ml
2,4-D v 50 % etanolu	10	0,02 ml
Saharoza		30 g

3.2.1.2 Subkultivacija celične kulture

Celično kulturo smo gojili v tekočem modificiranem Linsmaier & Skoog gojišču v 100 mililitrskih erlenmajericah na stresalniku (130 rpm) v temi pri 24 ± 1 °C. Erlenmajerice, pokrite z dvojno plastjo aluminijaste folije, smo predhodno sterilizirali v suhem sterilizatorju 3 ure pri 170 °C. Kulturo smo subkultivirali v laminariju vsakih 7 dni, pri čemer je bilo razmerje kulture in svežega gojišča 1:10. Pri tem smo pipetirali z avtoklaviranimi nastavki za pipete z odrezano konico. Ob vsaki subkultivaciji smo eno erlenmajerico, ki ni kazala znakov kontaminacije, pustili neodprto do naslednje subkultivacije, da bi imeli rezervo v primeru okužbe kulture.

3.2.2 Izolacija protoplastov

Najprej smo pripravili gojišče za encime (8 mM CaCl₂, 25 mM MES, 450 mM manitol), kateremu smo umerili pH na 5,6 z dodajanjem 1 N KOH. Tik pred uporabo smo dodali 3 % celulaze Onozuka RS, 0,2 % macerocima Onozuka R-10 in 0,1 % pektolaze Y23 po Stoeckel in Takeda (2002) ter dobljeno raztopino filtrsko sterilizirali. Gojišče za encime in posamezne encime smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Sledila je koinkubacija 3 ml raztopine z encimi in 1 ml suspenzije celic v plastičnih petrijevkah s premerom 35 mm v temi pri 30 ± 1 °C ter rahlem stresanju (15 rpm). Pridobljene protoplaste smo s serološko pipeto prenesli v steklene epruvete in centrifugirali 5 minut pri 800 rpm. Supernatant, v katerem se nahajajo encimi, smo pazljivo odpipetirali in zavrgli. Potem smo postopoma in z vmesnim mešanjem dodali 3 ml raztopine W5, ponovno centrifugirali 5 minut pri 800 rpm in postopek ponovili še dvakrat. Pelet smo razredčili v 1 ml raztopine W5 ter inkubirali na ledu 30 minut, kot predlagajo Yoo in sod. (2007). Pred začetkom postopka transformacije smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 800 rpm, zavrgli supernatant in umerili koncentracijo protoplastov na željeno vrednost z določanjem števila protoplastov v mililitru s pomočjo štetja na hemocitometru pod mikroskopom ter dodajanjem ustreznega volumna raztopine MaCa.

3.2.2.1 Optimizacija izolacije protoplastov

Da bi optimizirali čas inkubacije z encimi in določili celulozo, ki je bolj primerna za izolacijo protoplastov, smo preizkusili delovanje dveh različnih celulaz in sicer Onozuka RS in Onozuka R-10, slednjo priporoča Mathur in sod. (1995), ter inkubirali 1, 2 oziroma 3 ure. Za ta poskus smo uporabili kulturo 7 in 14 dni po subkultivaciji.

3.2.2.2 Določanje viabilnosti protoplastov na pretočnem citometru

Dobljene protoplaste, redčene z raztopino W5 v razmerju 1:1, smo obarvali z raztopino FDA s koncentracijo 1 µg/ml, kot priporočata Mlejnek in Prochazka (2002). Po dodatku FDA smo protoplaste inkubirali na sobni temperaturi 5 minut in jih do meritev hranili na ledu v temi. Viabilni protoplasti so fluorescirali zeleno. Za meritve ozadja oziroma avtofluorescence smo pripravili vzorec brez dodatka FDA.

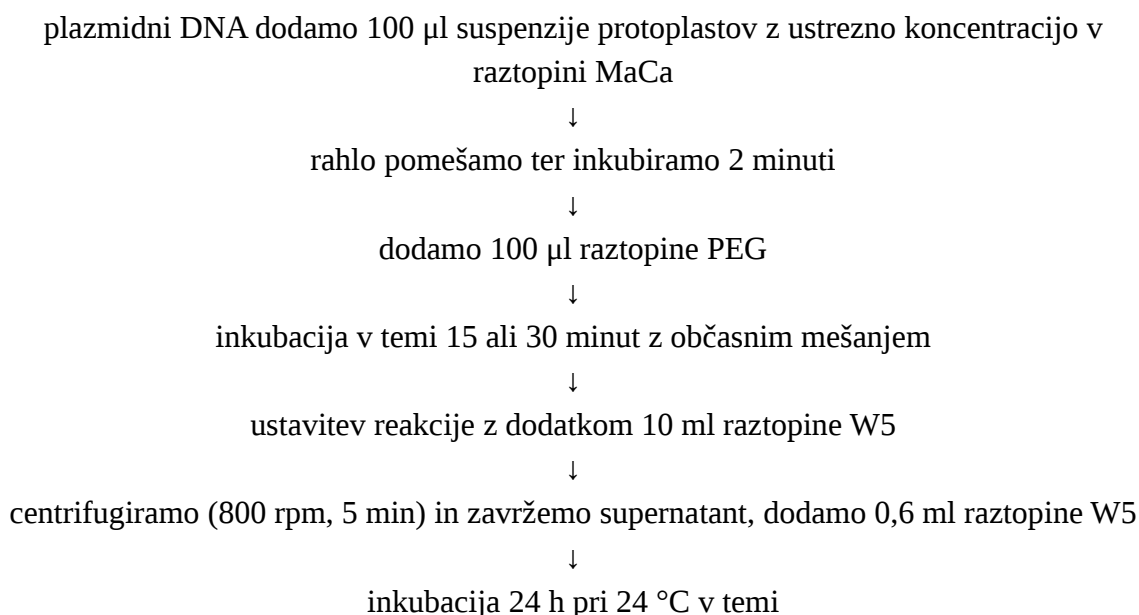
Za določanje viabilnosti protoplastov z barvanjem s FDA na pretočnem citometru smo uporabili enake nastavitve kot za določanje uspešnosti transformacije z zeleno fluorescirajočim proteinom (Bohanec in sod., 2002). Za meritve smo uporabili pretočni citometer PAS Partec. Izvor svetlobe je bil 20 mW argonski laser z valovno dolžino 488 nm. Nastavitev elektronskega ojačanja je bila 120 enot v nastavitvi log3 na kanalu FL1 (zeleno). Sipanje modre svetlobe smo merili na merilniku stranskega sipanja, kar služi kot merilo strukture celic. Vzbujeno svetlobo smo detektirali s pasovnoprepustnim filtrom (angl. bandpass) EX 488 za stransko sipanje in EM 520 (515 do 650 nm) za FL1. V

vsakem vzorcu smo analizirali 10000 celic. Meritve smo opravili s programsko opremo Partec FloMax ver. 2.3.

3.2.3 Transformacija

Skozi poskuse transformacije smo poskušali optimizirati protokol za transformacijo protoplastov. Začeli smo s kombinacijo protokola različnih avtorjev, kasneje pa prilagajali koncentracije nekaterih komponent, čase inkubacij in druge parametre. Pri poskusih smo uporabili protoplaste, izolirane iz celične kulture 3 do 7 dni po subkultivaciji v sveže gojišče. Za transformacijo in 24-urno inkubacijo smo uporabili steklene epruvete.

3.2.3.1 Splošna shema postopka transformacije



3.2.3.2 Priprava raztopin za poskuse transformacije

Pred začetkom poskusov transformacije smo pripravili več raztopin. Raztopina W5, ki smo jo uporabili tudi pri izolaciji protoplastov, po Locatelli in sod. (2003) vsebuje 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM glukozo, pH 5,8 z dodatkom 2 mM MES po Yoo in sod. (2007). Sterilizirali smo jo s filtrsko sterilizacijo in jo hranili v temi pri sobni temperaturi.

Raztopini MaCa po Locatelli in sod. (2003), ki vsebuje 0,5 M manitol, 20 mM CaCl₂ in 0,1 % MES, smo umerili pH na 5,8, jo avtoklavirali 20 min pri 121 °C ter hranili v temi pri sobni temperaturi.

Pripravili smo več raztopin PEG4000 (polietilenglikol z molsko maso 4000 g/mol), ki so zbrane v preglednici 5. Raztopino smo vedno pripravili svežo vsaj 1 uro pred poskusom, da

se PEG popolnoma raztopi (Yoo in sod., 2007).

3.2.3.3 Optimizacija suspenzije protoplastov

Različni avtorji priporočajo različne koncentracije suspenzije protoplastov oziroma število protoplastov. Yoo in sod. (2007) uporabljajo suspenzijo s koncentracijo $2 \cdot 10^5$ protoplastov/ml, v končni reakciji pa le $2 \cdot 10^4$ protoplastov. Locatelli in sod. (2003) pa koncentracijo $3 \cdot 10^6$ protoplastov/ml oziroma $1 \cdot 10^6$ protoplastov v reakciji. Izvedli smo več poskusov z različnimi koncentracijami suspenzije protoplastov od $2 \cdot 10^5$ do $2 \cdot 10^6$ protoplastov/ml.

Sprva smo protoplaste pred transformacijo redčili z raztopino MaCa ter jih pri izolaciji spirali z raztopino W5. Po nekaj neuspešnih poskusih transformacije smo preizkusili primernost raztopine W5 oziroma MaCa skozi celoten postopek izolacije protoplastov ter transformacije (do vključno ustavitve reakcije transformacije).

3.2.3.4 Izbira plazmidne DNA in koncentracije

V preliminarnih poskusih smo uporabili večje plazmide (približno 13 kb), vendar transformacija ni bila uspešna. Za vse poskuse, opisane v diplomskem delu, smo uporabili plazmida pCaMV-sgfpS65T in pHBT-sgfpS65T. Podatki o plazmidih so zbrani v Preglednici 4. Plazmida pCaMV-sgfpS65T in pHBT-sgfpS65T smo s kompletom za izolacijo plazmidne DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit, izolirano po navodilih proizvajalca) uspeli izolirati v koncentracijah od 119 do 304 ng/ μ l in pri poskusih uporabili približno 10 μ g plazmidne DNA v reakcijski mešanici (100 μ l suspenzije protoplastov, 100 μ l raztopine PEG).

Preglednica 4: Podatki o uporabljenih plazmidih. HBT je himerni promotor, ki je sestavljen iz promotorja gena koruze C4PPDK ter ojačevalca promotorja CaMV 35S

Ime plazmida	Promotor	Oblika GFP	Dodatni element	Vektor	Dolžina (kb)	Referenca
pCaMV-sgfpS65T	CaMV35S	sGFP(S65T)	/	pUC18	4,09	Sheen in sod. (1995)
pHBT-sgfpS65T	HBT	sGFP(S65T)	35S enhancer	pUC18	4,09	Sheen in sod. (1995)

Ker rezultati niso bili zadovoljivi, smo se odločili, da plazmid pHBT-sgfpS65T, s katerim smo do tedaj dobili najboljše rezultate, poskusimo izolirati v višji koncentraciji (vsaj 1 μ g/ μ l). Izolacija plazmidne DNA je bila narejena na podjetju Bia Separations d.o.o. z anionsko izmenjevalno kromatografijo s HPLC CIM® DEAE monolitnimi diski. Ekstrakcijski medij plazmidne DNA je bil 10 mM Tris-HCl s pH vrednostjo 7,4. Preverili

smo uspešnost transformacije z različnimi količinami plazmidne DNA v reakcijski mešanici.

3.2.3.5 Optimizacija raztopine polietilenglikola

V poskusih smo uporabili raztopine PEG, ki so zbrane v Preglednici 5. Raztopino PEG s kalcijevim nitratom smo pripravili po Locatelli in sod. (2003), uporabo kalcijevega klorida kot tudi nižjo koncentracijo PEG (20 %) pa priporočajo Yoo in sod. (2007). Uporabili smo tudi raztopine PEG z višjo pH vrednostjo (Schillberg in sod., 1997).

Preglednica 5: Sestava uporabljenih raztopin polietilenglikola (PEG)

Različica raztopine PEG	Sestavine				pH
	PEG4000 (%)	Manitol (mM)	Ca(NO ₃) ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)	
40 % PEG s kalcijevim nitratom	40	400	100	0	Brez umerjanja (≈ 5,8)
20 % PEG s kalcijevim nitratom	20	400	100	0	Brez umerjanja (≈ 5,5)
40 % PEG s kalcijevim kloridom	40	400	0	100	Brez umerjanja (≈ 5,3)
40 % PEG s kalcijevim nitratom pH 9	40	400	100	0	≈ 9
20 % PEG s kalcijevim nitratom pH 9	20	400	100	0	≈ 9

3.2.3.6 Optimizacija postopka inkubacije protoplastov z raztopino PEG in plazmidno DNA

Najprej smo inkubirali suspenzijo protoplastov z raztopino PEG in plazmidno DNA 30 minut v temi pri sobni temperaturi in občasnem mešanju. Ker so bili protoplasti velikokrat zelo poškodovani, smo se odločili, da preverimo, ali s krajšo inkubacijo (15 min) dobimo manj poškodovane protoplaste. Prav tako smo preverili učinkovitost 5-minutne inkubacije suspenzije protoplastov pri 42 °C ob sočasnem mešanju, kateri je sledila 0,5-minutna inkubacija na ledu pred dodatkom plazmidne DNA in PEG, ki jo predlaga Radchuk in sod. (2002), ter inkubacijo suspenzije protoplastov skupaj s plazmidno DNA in PEG pri 42 °C ob sočasnem mešanju, ki smo jo pred in po tem inkubirali na ledu 20 minut (Maddumage in sod., 2002).

3.2.3.7 Pregled protoplastov po transformaciji

3.2.3.7.1 Ocena viabilnosti protoplastov po transformaciji

Za oceno živosti protoplastov po transformaciji smo uporabili barvanje s PI in FDA hkrati

(Mlejnek in Prochazka, 2002). Vzorce smo pregledali pod fluorescentnim mikroskopom. Izbrali smo 5 naključnih vidnih polj pri 10-kratni povečavi in prešteli viabilne ter neviabilne protoplaste. Viabilne protoplaste, ki so se obarvali s FDA, smo prešteli z uporabo filtrskega bloka Nikon B1E. Neviabilne protoplaste, katerih jedra so se obarvala rdeče s PI, smo prešteli z uporabo filtrskega bloka 31002 TRITC (Rhodamine)/DiI/Cy3™. Podrobnosti o uporabljenih filtrskih blokih so zbrane v Preglednici 6. Iz dobljenih podatkov smo izračunali delež viabilnih protoplastov po transformaciji.

Preglednica 6: Karakteristike uporabljenih filtrskih blokov pri mikroskopiranju

Ime filtrskega bloka	Vzbujevalni filter EX (nm)	Dikroično zrcalo DM (nm)	Barierni filter BA (nm)
Nikon B1E	470 do 490	505	520 do 560
31002 TRITC (Rhodamine)/DiI/Cy3™	D540/25x	565DCLP	D605/55m

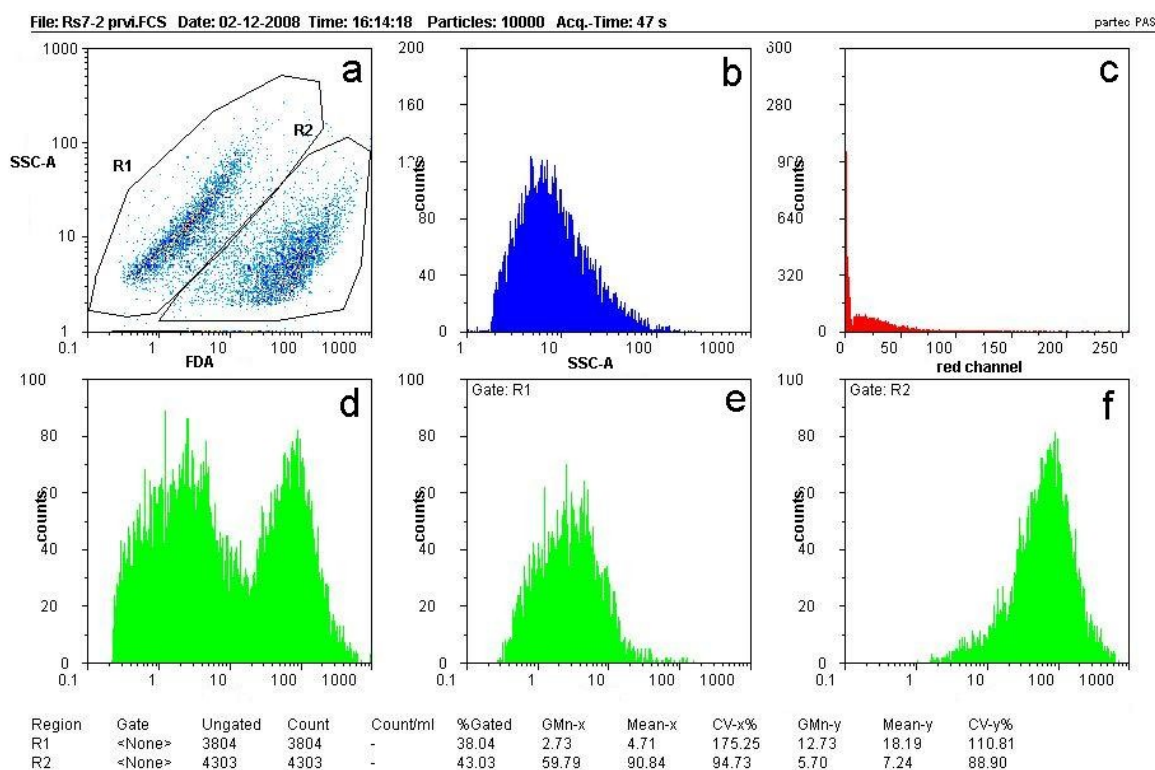
3.2.3.7.2 Ocena uspešnosti transformacije

Uspešnost transformacije smo preverjali 24 ur po transformaciji. Vzorce smo pregledali pod fluorescentnim mikroskopom. Izbrali smo 5 naključnih vidnih polj pri 10-kratni povečavi in prešteli transformirane protoplaste, ki ob uporabi filtrskega bloka Nikon B1E svetijo močno zeleno. Nato smo rahlo odprli zaslonko ter prešteli še nesvetleče protoplaste, pri katerih transformacija ni uspela. Iz teh podatkov smo izračunali delež uspešno transformiranih protoplastov.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTOPLASTOV

Za določanje optimalnega časa inkubacije celične kulture z litičnimi encimi smo uporabili barvanje s FDA in štetje obarvanih (viabilnih) protoplastov s pomočjo pretočnega citometra (slika 4).



Slika 4: Prikaz določanja viabilnosti protoplastov s pomočjo meritev na pretočnem citometru. a) Biparametrični prikaz viabilnih (R2) in neviabilnih (R1) protoplastov. x-os predstavlja relativno intenziteto ekscitirane zelene fluorescence, y-os pa merilo granularnosti delcev, določeno z merilcem stranskega sipanja neekscitirane modre laserske svetlobe. b) Prikaz stranskega sipanja. c) Sipanje svetlobe na „rdečem“ kanalu. d) Skupni prikaz meritev na „zelenem“ kanalu. e) Prikaz skupine R1 na „zelenem“ kanalu. f) Prikaz skupine R2 na „zelenem“ kanalu.

Preglednica 7: Primerjava viabilnosti protoplastov po enurni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA

Encim	Starost celične kulture (dan)	Viabilnost izoliranih protoplastov iz različno stare celične kulture (v %)	Povprečje viabilnosti izoliranih protoplastov glede na uporabljeno celulazo (v %)
Onozuka R-10	7	81,6	75,1
	14	68,5	
Onozuka RS	7	70,7	67,7
	14	64,4	

Preglednica 8: Primerjava viabilnosti protoplastov po dvourni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA

Encim	Starost celične kulture (dan)	Viabilnost izoliranih protoplastov iz različno stare celične kulture (v %)	Povprečje viabilnosti izoliranih protoplastov glede na uporabljeno celulazo (v %)
Onozuka R-10	7	78,0	73,4
	14	68,8	
Onozuka RS	7	57,9	62,2
	14	66,5	

Preglednica 9: Primerjava viabilnosti protoplastov po triurni inkubaciji celične kulture različne starosti (7 oziroma 14 dni po subkultivaciji) z različnima celulazama (Onozuka RS oziroma R-10) določena s pomočjo pretočne citometrije po barvanju s FDA

Encim	Starost celične kulture (dan)	Viabilnost izoliranih protoplastov iz različno stare celične kulture (v %)	Povprečje viabilnosti izoliranih protoplastov glede na uporabljeno celulazo (v %)
Onozuka R-10	7	66,8	64,3
	14	61,8	
Onozuka RS	7	52,8	51,6
	14	50,5	

4.2 TRANSFORMACIJA

Skozi poskuse transformacije protoplastov smo se soočali s slabo ponovljivostjo poskusov in velikokrat tudi izredno nizko viabilnostjo protoplastov po postopku transformacije, kar otežuje interpretacijo rezultatov.

4.2.1 Optimizacija priprave suspenzije protoplastov

Najnižja uporabljena koncentracija protoplastov, s katero nam je uspela transformacija, je bila $5 \cdot 10^5$ protoplastov / ml oziroma $1,2 \cdot 10^5$ protoplastov v reakciji, vendar koncentracije

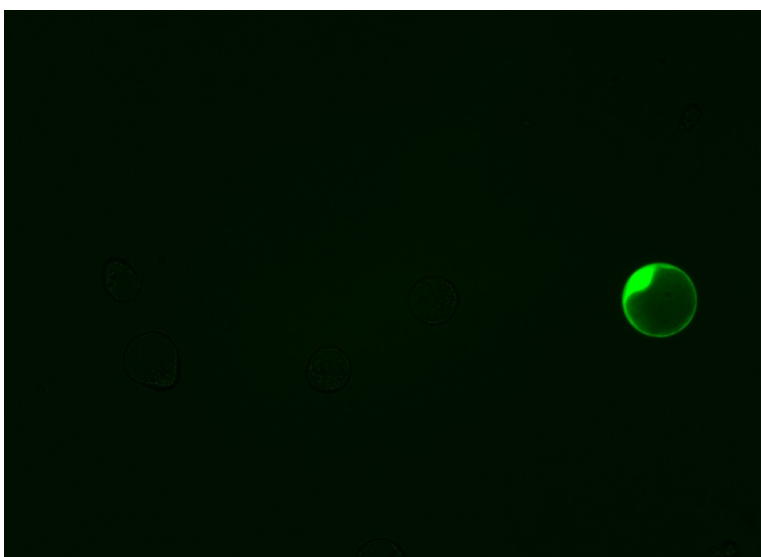
višje od $5 \cdot 10^5$ protoplastov / ml niso nujno zagotovile uspešne transformacije.

Ko smo primerjali uporabo medija MaCa oziroma W5 med postopkom izolacije protoplastov ter pri redčenju protoplastov pred transformacijo, smo opazili veliko boljšo viabilnost v primeru uporabe medija MaCa. Viabilnost negativne kontrole (brez plazmidne DNA) je bila 42,6 %, medtem ko je viabilnost negativne kontrole z medijem W5 bila le 7,92 % (viabilnost smo določali po 24 urni inkubaciji v temi).

Opazili smo, da protoplasti v suspenziji tvorijo skupke, kar bi lahko negativno vplivalo na uspeh transformacije. Preizkusili smo, ali se skupkom izognemo, če znižamo čas in hitrost centrifugiranja iz 5 minut pri 800 rpm na 4 minute pri 600 rpm. Kljub manj skupkom transformacija ni uspela.

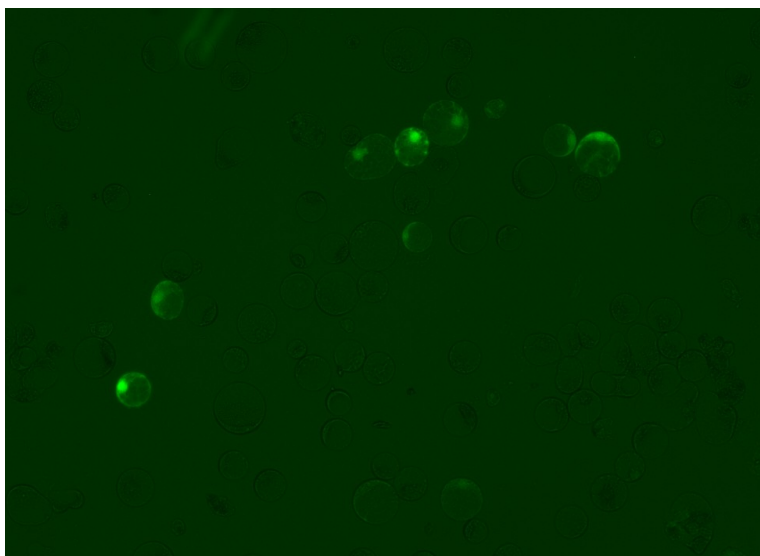
4.2.2 Izbira plazmidne DNA in koncentracije

Transformirane protoplaste smo pri pregledu pod mikroskopom in uporabi filtrskega bloka Nikon B1E opazili kot močno zeleno svetleče protoplaste. Netransformirani protoplasti so brez dodatka vidne svetlobe (odprte zaslonke) slabo vidni (slika 5).



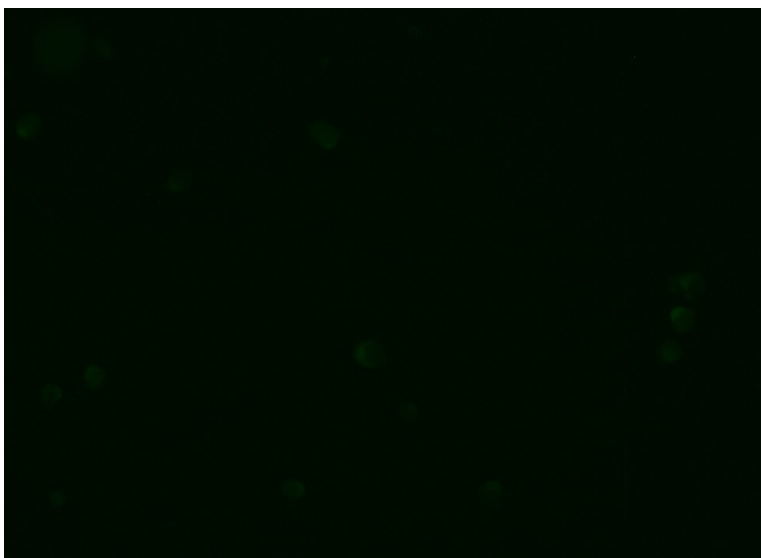
Slika 5: Primer transformiranega protoplasta (svetlo zelen) v primerjavi z netransformiranimi, ki so brez dodatka vidne svetlobe slabo vidni

Pri pregledu uspešno transformiranih protoplastov smo opazili, da se razlikujejo po intenziteti izražanja GFP proteina. Lokacija izražanja je sicer enaka, vendar opazimo različno močno intenziteto zelene barve (slika 6).



Slika 6: Različna intenziteta izražanja GFP proteina

Vsak poskus je vseboval negativno kontrolo, kateri ni bila dodana plazmidna DNA z zapisom za GFP. Pri pregledu pod mikroskopom opazimo, da tudi ti protoplasti kažejo rahlo zeleno svetlobo, vendar po celotni površini in veliko šibkejše kot transformirani protoplasti (slika 7).



Slika 7: Negativna kontrola transformacije z genom za GFP. Na sliki je vidna avtofluorescenca protoplastov

Pri poskusih transformacije protoplastov smo uporabili dva različna plazmida z zapisom za sporočilni gen za GFP (preglednica 4). Prve transformirane protoplaste smo dobili z uporabo približno 10 µg plazmida pHBT-sgfpS65T. Transformacija nam ni uspela s plazmidom pCaMV-sgfpS65T, kljub temu da smo uporabili enako količino plazmidne

DNA na reakcijo.

Preverili smo uspešnost transformacije z različnimi količinami plazmidne DNA (plazmid pHBT-sgfpS65T s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). V prvem poskusu smo uporabili 10 in 30 μg / reakcijo ob 15- oziroma 30-minutni inkubaciji protoplastov z raztopino PEG (20 % PEG s kalcijevim nitratom brez umerjanja pH vrednosti) in plazmidno DNA. Želeli smo določiti najbolj primerno trajanje inkubacije in količino plazmida na reakcijo. Najboljši rezultat (7,10 % transformiranih protoplastov) smo dobili pri vzorcu s 15-minutno inkubacijo in 30 μg plazmidne DNA (preglednica 10).

Preglednica 10: Primerjava uspešnosti transformacije glede na različno trajanje inkubacije suspenzije protoplastov (100 μl) z 20 % PEG s kalcijevim nitratom (100 μl) in plazmidno DNA s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (pHBT-sgfpS65T)

Količina plazmidne DNA (μg)	Odstotek transformiranih protoplastov glede na različno trajanje inkubacije s PEG in plazmidno DNA		Povprečje
	15 min	30 min	
10	5,41 %	4,66 %	5,04 %
30	7,10 %	3,71 %	5,41 %
Povprečje	6,26 %	4,19 %	

Preverili smo tudi, ali je uspešnost transformacije odvisna od količine plazmidne DNA v reakciji. Uporabili smo različne količine plazmidne DNA (plazmid pHBT-sgfpS65T s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in sicer 3, 10, 30 in 60 μg na reakcijo. Inkubacija plazmidne DNA, PEG (20 % PEG s kalcijevim nitratom brez umerjanja pH vrednosti) in protoplastov je trajala 15 minut. Najvišji delež transformiranih protoplastov (9,04 %) smo dobili pri 60 μg uporabljene plazmidne DNA (preglednica 11).

Preglednica 11: Primerjava uspešnosti transformacije glede na različno količino uporabljene plazmidne DNA s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (pHBT-sgfpS65T) ob uporabi 100 μl 20 % PEG s kalcijevim nitratom in 100 μl suspenzije protoplastov

Količina plazmidne DNA (μg)	Odstotek transformiranih protoplastov
3	1,23 %
10	8,70 %
30	8,51 %
60	9,04 %

4.2.3 Vpliv sestave raztopine PEG na viabilnost protoplastov in uspešnost transformacije

Preizkusili smo različne raztopine PEG (preglednica 5). Najprej smo poskuse izvajali s 40 % raztopino PEG s kalcijevim nitratom brez umerjanja pH vrednosti. Uspešnost transformacije je bila izredno nizka (našli smo le posamezne uspešno transformirane protoplaste), zato smo se odločili, da preverimo, ali z drugačnimi raztopinami PEG dobimo višji delež transformiranih protoplastov. S 40 % raztopino PEG s kalcijevim kloridom nam transformacija ni uspela, zato smo raztopino izključili iz poskusov. Ravno tako nam transformacija ni uspela z uporabo raztopine PEG s pH vrednostjo približno 9. Z uporabo 20 % raztopine PEG smo pričakovali višjo viabilnost protoplastov po postopku transformacije. Tako smo po 15-minutni inkubaciji protoplastov s 20 % raztopino PEG s kalcijevim nitratom dobili 85,37 % viabilnost protoplastov, medtem ko smo pri uporabi 40 % raztopine dobili 59,53 % (določanje viabilnosti direktno po postopku transformacije)

4.2.4 Optimizacija postopka inkubacije protoplastov z raztopino PEG in plazmidno DNA

Po prvih poskusih transformacije s 30-minutno inkubacijo protoplastov, raztopine PEG in plazmidne DNA smo opazili, da so bili protoplasti velikokrat zelo poškodovani. Primerjali smo uspešnost transformacije (preglednica 10) in viabilnost protoplastov med 30- in 15-minutno inkubacijo. Viabilnost protoplastov negativne kontrole (brez dodane plazmidne DNA) 15-minutne inkubacije z 20 % raztopino PEG s kalcijevim nitratom je bila višja (68,94 %) kot viabilnost negativne kontrole 30-minutne inkubacije (46,72 %). Viabilnost smo določali po 24-urni inkubaciji v temi.

Nekateri avtorji priporočajo inkubacijo suspenzije protoplastov skupaj ali brez plazmidne DNA in PEG pri povišani temperaturi (42 °C). S tem postopkom naj bi dobili višji delež uspešno transformiranih protoplastov. Preizkusili smo 2 različna postopka inkubacije. V prvem postopku smo inkubirali samo suspenzijo protoplastov (100 µl) na 42 °C (Radchuk in sod., 2002), pri drugem pa suspenzijo protoplastov (100 µl) skupaj s plazmidno DNA in 100 µl PEG (Maddumage in sod., 2002). V obeh primerih smo našli posamezne transformirane protoplaste. Pri postopku po Maddumage in sod. (2002) je bila viabilnost vzorca inkubiranega pri povišani temperaturi nižja (7,87 %) kot viabilnost vzorca inkubiranega na sobni temperaturi (49,61 %), medtem ko sta bili pri postopku po Radchuk in sod. (2002) viabilnosti vzorcev približno enaki (preglednica 12). Viabilnost smo določali po 24-urni inkubaciji v temi.

Preglednica 12: Primerjava vpliva različnih postopkov inkubacije reakcijske mešanice pri povišani temperaturi na viabilnost protoplastov ob uporabi 20 % PEG s kalcijevim nitratom

	Viabilnost	
	Inkubacija pri sobni temperaturi	Inkubacija pri povišani temperaturi
Postopek po Muddamage in sod. (2002)	49,61 %	7,87 %
Postopek po Radchuk in sod. (2002)	36,13 %	39,29 %

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTOPLASTOV

Z metodo izolacije protoplastov iz celične kulture BY-2 po Stoeckel in Takeda (2002) nam je uspelo izolirati protoplaste, vendar smo ugotovili, da je čas, ki ga predlagata za izolacijo, prekratek, saj so bile še vedno vidne celice, ki niso popolnoma okrogle, torej celična stena še ni bila popolnoma razgrajena. Zato smo čas inkubacije podaljšali na vsaj 3 ure, kljub temu da je viabilnost protoplastov po 3 urah inkubacije nižja kot po 1 uri.

Da bi zagotovili višjo viabilnost pri enakem času inkubacije, smo preizkusili še delovanje celulaze Onozuka R-10, s katero so Mathur in sod. (1995) dosegli boljše donose. Enako smo potrdili z našimi testi, tako je pri vseh poskusih viabilnost protoplastov, izoliranih s celulazo Onozuka R-10, višja v primerjavi s viabilnostjo protoplastov, izoliranih s celulazo Onozuka RS. Učinkovitost teh dveh encimov je primerjal tudi Aoyagi (2006). Pri izolaciji protoplastov iz celične kulture BY-2 je uspel pridobiti več viabilnih protoplastov / ml z uporabo celulaze Onozuka RS, kar je v nasprotju z našimi rezultati.

Pri primerjavi viabilnosti protoplastov, izoliranih iz različno stare celične kulture (7 ali 14 dni po subkultivaciji v sveže gojišče), smo ugotovili, da je viabilnost v povprečju (ne glede na vrsto uporabljene celulaze) višja pri protoplastih, izoliranih iz suspenzije 7. dan po subkultivaciji. Izstopata le vzorca, izolirana s celulazo Onozuka RS po dvourni inkubaciji, kjer je viabilnost protoplastov, izoliranih iz 7 dni stare kulture, nižja od viabilnosti protoplastov, izoliranih iz 14 dni stare kulture. Nižja viabilnost protoplastov izoliranih iz 14 dni stare celične kulture je bila pričakovana, saj je celična kultura takrat že v stacionarni fazi rasti, ki je avtorji ne priporočajo za izolacijo protoplastov (Aoyagi, 2006; Chawla, 2009).

Za pripravo protoplastov, ki smo jih uporabili za poskuse transformacije, smo uporabljali triurno inkubacijo 3 do 7 dni starih celic ter celulazo Onozuka R-10. Postopek izolacije protoplastov bi lahko še izboljšali. Viabilnost protoplastov, izoliranih iz 7 dni stare kulture, je bila 66,8 %. Najbolj primerna starost celic BY-2 za izolacijo protoplastov glede na viabilnost in hitrost izolacije protoplastov je po mnenju Aoyagi (2006) 5 dni. Vredno bi bilo poskusiti, ali dobimo višjo viabilnost ob uporabi mlajše kulture. Prav tako bi viabilnost verjetno lahko izboljšali z optimizacijo koncentracij uporabljenih encimov, sestavin gojišča za encime ter dodatkom govejega serumskega albumina (BSA) v gojišče. Dodatek BSA priporočajo tako Yoo in sod. (2007) kot tudi Mussio in Rusig (2006), saj naj bi predstavljal substrat za proteaze ter zaščito encimov za razgradnjo celične stene pred toksičnimi spojinami, ki se izločajo iz poškodovanih celic. Aoyagi (2006) poroča o nižji

viabilnosti protoplastov pri uporabi celulaze Onozuka R-10 v koncentracijah višjih od 1 %. Naša koncentracija je bila višja (3 %) in je tako eden izmed možnih razlogov za razmeroma nizko viabilnost.

Vsekakor bi lahko trajanje inkubacije z encimi poskusili optimizirati s pomočjo uporabe barvila kalkofluor belo (angl. calcofluor white), ki obarva celično steno (Chawla, 2009). Tako bi lahko bolj natančno določili čas, ki je potreben za popolno razgradnjo celične stene, ki je predpogoj za uspešno transformacijo. V naših poskusih smo to določili le na podlagi oblike celic, ne pa tudi potrdili z uporabo barvila.

Barvanje protoplastov s FDA in določanje viabilnosti s pomočjo meritev na pretočnem citometru je učinkovita in hitra metoda, predvsem primerna za večje število vzorcev. Poleg hitrosti je prednost metode predvsem to, da viabilnost določimo na večjem številu protoplastov, saj pri hkratnem barvanju s FDA in PI in štetjem obarvanih protoplastov pod mikroskopom, ki smo ga uporabili za določanje viabilnosti po transformaciji, določamo viabilnost na nekaj 100 protoplastih.

5.2 TRANSFORMACIJA

Najnižja koncentracija protoplastov, s katero nam je uspela transformacija, je bila $5 \cdot 10^5$ protoplastov/ml oziroma $1,2 \cdot 10^5$ protoplastov v reakciji, vendar sama uporaba enake ali višje koncentracije ni bila zagotovilo za uspešno transformacijo. Izolacija protoplastov iz celice kulture BY-2 v višjih koncentracijah ni težavna, zato vsaj za začetek optimizacije postopka ni razloga, da bi uporabljali nižjo koncentracijo, saj se tudi mnenja različnih avtorjev glede koncentracije zelo razlikujejo.

Skozi vse poskuse transformacije smo se soočali s slabo ponovljivostjo rezultatov in pogoste nizke viabilnosti protoplastov. Domnevali smo, da bi vzrok lahko bila sprememba gojišča za protoplaste pri prenosu iz W5 v MaCa pred transformacijo. V primeru, ko smo skozi celoten postopek uporabili MaCa, smo dobili višjo viabilnost kot pri uporabi W5. Rezultat je bil pričakovan, saj raztopina MaCa vsebuje 0,5 M manitol, medtem ko raztopina W5 vsebuje izredno nizko koncentracijo glukoze (5 mM). Koncentracija neionskega ozmotika, kot sta glukoza in manitol, naj bi bila od 0,3 do 0,7 M. Alternativa neionskim so ionski ozmotiki, kot sta kalijev in kalcijev klorid, ki sta poleg natrijevega klorida in glukoze sestavine raztopine W5, vendar boljša učinkovitost v primerjavi z manitolom ni bila potrjena (Chawla, 2009). Locatelli in sod. (2003) uporabljajo pri transformaciji tobakovih protoplastov, izoliranih iz mezofilnega tkiva listov, enak postopek spremembe medija ter dosega do 60 % transformiranih protoplastov ter ne poročajo o nizki viabilnosti. Če predpostavljamo, da se zahteve protoplastov, pridobljenih iz iste rastlinske vrste ne razlikujejo bistveno, lahko izključimo možnost, da je za slabo

ponovljivost kriv stres zaradi prenosa iz gojišča W5 v MaCa.

Po izolaciji protoplastov smo opazili, da le ti v suspenziji tvorijo skupke, kar bi lahko negativno vplivalo na uspešnost transformacijskega postopka, saj lahko otežijo dostop PEG in plazmidne DNA do posameznih protoplastov. Izvedli smo poskus z uporabo centrifugiranja krajši čas in pri nižji hitrosti, vendar kljub manj skupkom transformacija ni uspela. Yoo in sod. (2007) centrifugirajo protoplaste pred postopkom transformacije le enkrat, sicer z isto hitrostjo, a krajši čas (1 do 2 minuti). Direktno pred transformacijo pa namesto centrifugiranja uporabljajo 15-minutno sedimentacijo na ledu. Način centrifugiranja je lahko odgovoren le za nekoliko slabši uspeh transformacije, nikakor pa ne za slabo ponovljivost rezultatov, zato lahko z uporabo centrifugiranja in sedimentacije po Yoo in sod. (2007) pričakujemo izboljšanje uspešnosti transformacije v manjši meri.

V predhodnih poskusih z večjimi plazmidi (približno 13 kb) z zapisom za sporočilni gen za GFP nam transformacija protoplastov ni uspela, zato smo nadaljevali z manjšimi plazmidi, saj Parveez in Majid (2008), ki sta primerjala odvisnost uspešnosti transformacije z biolistiko od velikosti plazmidov, poročata o višjih odstotkih transformantov s plazmidi manjših velikosti. Veliki plazmidi (večji od 10 kb) naj bi bili bolj podvrženi fragmentaciji med postopkom transformacije in tako zmanjšali uspešnost prehodne transformacije. Ob uporabi enake količine plazmidne DNA je v primeru večjih plazmidov na voljo tudi manjše število kopij plazmida na posamezen protoplast. Verjetnost za uspešno transformacijo se tako ob uporabi enakega števila protoplastov zmanjša. Plazmida (pCaMV-sgfpS65T in pHBT-sgfpS65T), ki smo ju uporabili pri poskusih opisanih v diplomskem delu, sta manjša (4,09 kb), tako velikost ni bila omejujoč faktor. Ravno s tema plazmidoma sta Parveez in Majid (2008) dobila najboljše rezultate. Vseeno s pCaMV-sgfpS65T nismo uspeli dokazati izražanja gena za GFP. Prve transformirane protoplaste smo dobili s plazmidom pHBT-sgfpS65T, ki nosi zapis za isto obliko GFP in je po velikosti enak pCaMV-sgfpS65T, vendar vsebuje drug promotor. HBT je himerni promotor, sestavljen iz promotorja gena koruze C4PPDK ter ojačevalca promotorja CaMV 35S. Sheen in sod. (1995) so pri transformaciji protoplastov koruze z uporabo plazmida s promotorjem HBT zaznali 15-krat močnejšo fluorescenco GFP kot z uporabo promotorja CaMV 35S. Možno je, da je bila intenziteta fluorescence protoplastov, transformiranih s pCaMV-sgfpS65T, nižja v primerjavi s fluorescenco protoplastov, transformiranih s pHBT-sgfpS65T, in je tako nismo prepoznali kot uspešne transformacije. Manj verjetno je namreč, da bi razlog za neuspešno transformacijo bil promotor CaMV 35S, saj gre za močan konstitutiven promotor, ki ga uporabljajo tudi za transformacijo tobakovih protoplastov.

Optimizacijo uporabljene količine plazmidne DNA in trajanje inkubacije s PEG smo izvajali s pHBT-sgfpS65T s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pri prvem poskusu smo primerjali

učinkovitost uporabe različne količine plazmidne DNA in različno trajanje inkubacije s PEG. Splošno lahko zaključimo, da je bila bolj uspešna 15-minutna inkubacija s PEG, saj dobimo v povprečju višji delež uspešno transformiranih protoplastov (6,26 %) kot s 30-minutno inkubacijo (4,10 %). Najboljši rezultat smo dobili pri 15-minutni inkubaciji protoplastov s 30 µg plazmidne DNA (7,10 %), kar je nekoliko več kot pri 10 µg uporabljene plazmidne DNA. Zato smo želeli preveriti, ali z več plazmidne DNA / reakcijo, dobimo višji delež transformiranih protoplastov. V ta namen smo preverili uspešnost 3, 10, 30 in 60 µg ob 15-minutni inkubaciji. Razlike med uspešnostjo 10, 30 in 60 µg so zelo majhne, kar nakazuje, da uspešnost transformacije od 10 µg uporabljene plazmidne DNA dalje ne narašča več. Do podobnega zaključka so prišli tudi Locatelli in sod. (2003), vendar pri uporabi sporočilnega gena za GUS in veliko manjših količinah plazmidne DNA. Od določene količine plazmidne DNA naprej število kopij gena preseže število protoplastov in naj zato uporabljena količina ne bi bila več omejujoč faktor in imela vpliva na končen delež celic, ki izražajo sporočilni gen, ampak le še na intenziteto izražanja.

Pri poskusih z različnimi raztopinami PEG, smo ugotovili, da je najbolj primerna 20 % raztopina PEG s kalcijevim nitratom, kateri nismo umerjali pH. Transformacija je sicer uspela tudi s 40 % raztopino, vendar je bila viabilnost protoplastov nižja kot po tretiranju z 20 % raztopino. Ker imamo tako na voljo manj viabilnih protoplastov, je posledično tudi uspešnost transformacije nižja. Bolj koncentrirana raztopina PEG sicer omogoča višji odstotek protoplastov, ki izražajo sporočilni gen (Gallie, 2001), vendar je potrebno najti kompromis z viabilnostjo protoplastov. Izrednega pomena pri transformaciji s PEG je prisotnost dvovalentnih kalcijevih ali magnezijevih ionov. Gojišče MaCa in uporabljene raztopine PEG vsebujejo le kalcijeve ione, ki jim Gallie (2001) pripisuje večji pomen, vseeno pa ob prisotnosti magnezijevih in kalcijevih poroča o boljši rezultatih. Neuspeh z uporabo raztopine PEG s kalcijevim kloridom je verjetno le naključen, saj vsebuje enako koncentracijo kalcijevih ionov kot raztopina s kalcijevim nitratom. Uporaba raztopine PEG z višjo pH vrednostjo verjetno negativno vpliva na viabilnost protoplastov, zato je tudi uspeh transformacije slabši. Raztopina PEG, kateri ne umerjamo pH, ima pH v rahlo kislem območju (5,5 do 5,8), kar približno ustreza tudi ostalim raztopinam in gojiščem, uporabljenih v poskusih transformacije in gojenju ter izolaciji protoplastov. Stres za protoplaste je manjši, posledično verjetno tudi viabilnost večja. Raztopine PEG po priporočilu Yoo in sod. (2007) nismo avtoklavirali, saj za tako kratke poskuse uporaba sterilnih pogojev ni potrebna, poleg tega pa bi se spremenila pH vrednost raztopine, kar neugodno vpliva na protoplaste.

S 15-minutno inkubacijo protoplastov s plazmidno DNA in PEG smo dobili večji delež transformiranih protoplastov kot tudi višjo viabilnost v primerjavi s 30-minutno

inkubacijo. Vredno bi bilo poskusiti, ali s krajšo inkubacijo dobimo boljše rezultate, saj Yoo in sod. (2007) menijo, da 5-minutna inkubacija že zadostuje. Z uporabo inkubacije pri povišani temperaturi smo pričakovali občutno izboljšanje deleža transformiranih protoplastov, vendar smo pri obeh različicah inkubacije našli le posamezne transformirane protoplaste in v primeru inkubacije po Maddumage in sod. (2002) tudi veliko nižjo viabilnost protoplastov v primerjavi z vzorcem, inkubiranim pri sobni temperaturi. Pri postopku po Radchuk in sod. (2002) sta viabilnosti vzorcev primerljive. Nižjo viabilnost bi lahko razložila možna sprememba pH reakcijske mešanice, zaradi inkubacije PEG pri povišani temperaturi. Optimizacijo postopka je zato priporočljivo nadaljevati z inkubacijo pri sobni temperaturi.

Sočasno barvanje s FDA in PI ter štetje obarvanih protoplastov pod mikroskopom je dobra metoda za določanje viabilnosti vzorca, saj v primeru majhnega števila vzorcev ni zamudno. V primeru večjega števila vzorcev bi bilo meritve priporočljivo izvajati na pretočnem citometru, kot smo to storili pri določanju viabilnosti protoplastov po izolaciji. Rezultat bi bil tudi natančnejši, saj je pridobljen na osnovi večjega števila protoplastov.

Določanje uspešnosti transformacije s pomočjo štetja pod mikroskopom je nekoliko bolj subjektivno, saj lahko spregledamo protoplaste, ki šibkejše fluorescirajo. Kljub šibki avtofluorescenci protoplastov, izoliranih iz suspenzijskih kultur ali koreninskega tkiva (Mathur in Koncz, 1998), je možno, da bi šibkejše izražen GFP zamenjali za avtofluorescenco. Izražanje GFP ločimo od avtofluorescence po mestu fluorescence, saj pri uspešno transformiranem protoplastu fluorescira predvsem jedro in citoplazma tik ob celični membrani, medtem ko pri netransformiranem protoplastu zaznamo šibko fluorescenco po celotnem protoplastu. Za potrebe naših poskusov je bila metoda primerna.

Kljub uspešni transformaciji nam ni uspelo doseči visokih odstotkov transformiranih protoplastov. Chiu in sod. (1996) poročajo o več kot 80 % uspešnosti transformacije tobakovih protoplastov, izoliranih iz mezofilnega tkiva listov. Za uporabo prehodne transformacije za različne študije ekspresije in delovanja promotorjev je priporočljiva vsaj 50 % uspešnost transformacije (Yoo in sod., 2007), saj lahko le tako z gotovostjo trdimo, da je nek rezultat posledica delovanja promotorja ali izražanja gena. Kot možen razlog nizke uspešnosti navajajo predvsem kvaliteto izhodiščnega materiala, torej viabilnosti protoplastov. Izboljšanje odstotka transformiranih protoplastov bi bilo mogoče pričakovati tudi z uporabo nosilne DNA (angl. carrier DNA). Radchuk in sod. (2002) pri transformaciji vrste *Brassica oleracea* brez uporabe nosilne DNA niso uspeli transformirati protoplastov.

6 POVZETEK

Za študije izražanja genov, fuzijskih proteinov in delovanja promotorjev potrebujemo ponovljiv postopek, ki zagotavlja ustrezno raven uspešno transformiranih protoplastov. Na uspeh transformacije vpliva več faktorjev, ki smo jih poskušali preučiti in optimizirati v diplomskem delu. Predhodno pa je bilo potrebno še optimizirati postopek za izolacijo in metodo za določanje viabilnosti protoplastov iz celične kulture BY-2.

Celično kulturo BY-2 nam je uspelo gojiti skozi daljše časovno obdobje brez okužb ter iz nje izolirati protoplaste, ki smo jih uporabili za poskuse transformacije. Ugotovili smo, da je potrebna vsaj 3-urna inkubacija z litičnimi encimi, da zagotovimo ustrezno razgradnjo celične stene, ki je predpogoj za uspešno transformacijo s PEG, kar je v nasprotju s protokolom po Stoeckel in Takeda (2002), ki predlagata krajšo inkubacijo. Naši rezultati kažejo, da je za izolacijo protoplastov iz celične kulture BY-2 bolj primerna celulaza Onozuka R-10, saj je viabilnost protoplastov višja v primerjavi s protoplasti, izoliranimi s celulazo Onozuka RS.

Za ugotavljanje viabilnosti protoplastov smo uvedli dva postopka. Prvi temelji na obarvanju viabilnih celic s FDA in uporabo pretočnega citometra ter je izredno primeren za določanje viabilnosti velikega števila vzorcev naenkrat. V kolikor delamo z manjšim številom vzorcev zadostuje barvanje s FDA in PI, s katerim se obarvajo jedra neviabilnih protoplastov, hkrati ter štetje pod mikroskopom.

Preučili smo faktorje, ki vplivajo na uspeh transformacije. Kljub razmeroma nizki uspešnosti transformacije lahko zaključimo, da je za transformacijo protoplastov, izoliranih iz celične kulture BY-2, najbolj primerna 15-minutna inkubacija protoplastov s 20 % raztopinon PEG s kalcijevim nitratom. Najboljše rezultate smo dosegali s plazmidom pHBT-sgfpS65T.

Skozi poskuse smo se soočali s slabo ponovljivostjo rezultatov in velikokrat tudi nizko viabilnostjo protoplastov. Delno izboljšanje rezultatov je pričakovati z nadaljnjo optimizacijo gojišč za inkubacijo protoplastov po transformaciji in uporabo celične kulture v zgodnji logaritemski fazi rasti.

7 VIRI

- Aoyagi H. 2006. Development of a quantitative method for determination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells. *Biotechnology Letters*, 28: 1687-1694
- Bohanec B. 2004. *Osnove rastlinske biotehnologije*. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-29
- Bohanec B., Luthar Z., Rudolf K. 2002. A protocol for quantitative analysis of green fluorescent protein-transformed plants, using multiparameter flow cytometry with cluster analysis. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 44: 145-153
- Chawla H.S., 2009. *Introduction to plant biotechnology*. 3rd ed. Enfield, Science Publishers Inc.: 105-130
- Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 6, 3: 325-330
- Cocking E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 927-929
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. 2005. Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171
- Gallie D.R. 2001. Transgenic carrot (*Daucus carota* L.). V: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 47. Transgenic crops II. Bajaj Y.P.S. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 147-156
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158
- Geelen D.N.V., Inze D.G. 2001. A bright future for the Bright Yellow-2 cell culture. *Plant Physiology*, 127: 1375-1379
- Haas J., Park E.-C., Seed B. 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology*, 6: 315-324

- Haseloff J., Semering K.R., Prasher D., Hodge S. 1997. Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 2122-2127
- Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature*, 373: 663-664
- Hu W., Cheng C.-L. 1995. Expression of *Aequorea* green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Letters*, 369: 331-334
- Joen J.M., Ahn N.Y., Son B.H., Kim C.Y., Han C., Kim G., Gal S.W., Lee S. 2007. Efficient transient expression and transformation of PEG-mediated gene uptake into mesophyll protoplasts of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88: 225-232
- Jones K.H., Senft J.A. 1985. An improved method to determine cell simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33, 1: 77-79
- Kato K., Matsumoto T., Koiwai A., Nishida K., Nogushi M., Takami E. 1972. Liquid suspension cultures of tobacco cells. V: Fermentation technology today. *Proceedings of the IVth international fermentation symposium, March 19-25, 1972, Kyoto, Japan*. Terui G. (ed.). Osaka, Society of Fermentation Technology of Japan: 689-695
- Linsmaier E. M., Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 1: 100-127
- Locatelli F., Vannini C., Magnani E., Coraggio I., Bracale M. 2003. Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount. *Plant Cell Reports*, 21: 865-871
- Maddumage R., Fung R. M. W., Weir I., Ding H., Simons J. L., Allan A. C. 2002. Efficient transient transformation of suspension culture-derived apple protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 77-82
- Mathur J., Koncz C. 1998. PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. *Methods in Molecular Biology*, 82: 267-276
- Mathur J., Koncz C., Szabados L. 1995. A simple method for isolation, liquid culture,

- transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Reports*, 14: 221-226
- Menges M., Murray J.A.H. 2002. Synchronous arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant Journal*, 30, 2: 203-212
- Miyazawa Y., Sakai A. 2006. Tobacco BY-2 cells as a model for differentiation in heterotrophic plant cells. V: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 58. Tobacco BY-2 Cells: From cellular dynamics to omics. Nagata T., Matsuoka K., Inze D. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 119-132
- Mlejnek P., Prochazka S. 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 215: 158-166
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum*, 15: 473-497
- Mussio I., Rusig A. 2006. Isolation of protoplasts from *Fucus serratus* and *F. vesiculosus* (Fucales, Phaeophyceae): factors affecting protoplast yield. *Journal of Applied Phycology*, 18: 733-740
- Nagata T., Kumagai F. 1999. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods in Cell Science*, 21: 123-127
- Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. 1992. Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cells in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132: 1-30
- Niedz R.P., Sussman M.R., Satterlee J.S. 1995. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Reports*, 14: 403-406
- Nugent G.D., Coyne S., Nguyen T.T., Kavanagh T.A., Dix P.J. 2006. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Science*, 170: 135-142
- Parveez G.K.A., Majid N.A. 2008. Factors affecting green fluorescence protein (GFP) gene expression in oil palm after microprojectile bombardment. *Journal of Oil Palm Research*, 20: 495-507
- Radchuk V., Ryschka U., Schumann G., Klocke E. 2002. Genetic transformation of

cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. *Physiologia Plantarum*, 114: 429-438

Samuels A. L., Meehl J. M., Lipe M., Staehelin L. A. 1998. Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization. *Protoplasma*, 202, 3-4: 232-236

Schillberg S., Zimmermann S., Prüfer D., Schuman D., Fische R. 1997. Transient gene expression in plant protoplasts. V: *Recombinant proteins from plants: Production and isolation of clinically useful compounds*. Cunningham C., Porter A J.R. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 165-175

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D.W. 1995. Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant Journal*, 8: 777-784

Stewart C.N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 20: 376-382

Stoeckel H., Takeda K. 2002. Plasmalemmal voltage-activated K⁺ currents in protoplasts from tobacco BY-2 cells: Possible regulation by actin microfilaments. *Protoplasma*, 220: 79-87

Takeda Y., Hirokawa H., Nagata T. 1992. The replication origin of proplastid DNA in cultured cells of tobacco. *Molecular and General Genetics*, 232, 2: 191-198

Yoo S. D., Cho Y. H., Sheen J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2, 7: 1565-1572

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Bohancu, da mi je omogočil izdelavo diplomske naloge na željenem področju, in za vso pomoč ter nasvete pri njeni izdelavi.

Hvala tudi vsem sodelavcem Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, predvsem za vse lepe trenutke, ki sem jih preživela z vami.

Najlepša hvala staršem, da sta me podpirala skozi vsa ta leta. Hvala tudi bratoma, v zadnjem času predvsem za potrpežljivost pri računalniških vprašanjih. Brez vas ne bi bila to, kar sem.

Ni strašnejše puščave, kot življenje brez prijateljev (Gracián). Prijatelji, hvala, ker ste z mano.