Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

**Βιοτεχνολογία Φυτών**

Εργαστηριακή Άσκηση 3

Επιλογή γενετικά τροποποιημένων φυτών—έλεγχος γενοτύπου για ανίχνευση Τ-DNA ενθέσεων

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

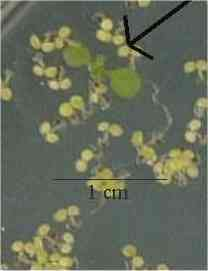
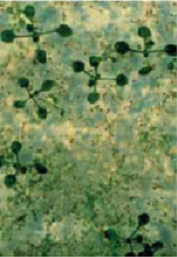
Γκαραγκούνης Κώστας

2018

**Στόχος:** Σ΄αυτή την άσκηση θα μάθετε να επιλέγετε μετασχηματισμένα φυτά Arabidopsis και να τα ελέγχετε για την παρουσία T-DNA σε γονίδιο του ενδιαφέροντός σας.

**Εισαγωγή:** Στην προηγούμενη εργαστηριακή άσκηση μάθατε να βρίσκετε και να παραγγέλνετε διαγονιδιακές σειρές Arabidopsis με ενθέματα T-DNA σε γονίδιο που θέλετε να μελετήσετε. Επίσης, μάθατε να σχεδιάζετε εκκινητές για να ελέγξετε τον γενότυπο αυτών των φυτών με PCR. Στην παρούσα άσκηση θα εξοικειωθείτε με την διαδικασία που θ’ ακολουθούσατε εάν είχατε αυτά τα φυτά στο εργαστήριό σας.

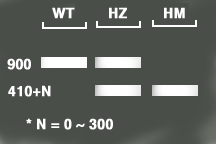
Στο πρώτο μέρος της άσκησης θα σας δοθούνε σπέρματα μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* πρώτης γενιάς (Τ1 γενιά). Εφ’ όσον πρόκειται για πρώτη γενιά μετασχηματισμένων φυτών, αναμένεται ένα ποσοστό (Τι ποσοστό;) των σπερμάτων να είναι μη-μετασχηματισμένα (wild type). Για να διευκολύνεται η επιλογή μετασχηματισμένων φυτών, οι περισσότερες διαγονιδιακές σειρές φυτών φέρουνε ένα γονίδιο «επιλογής» στο Τ-DNA το οποίο προσδίδει στα μετασχηματισμένα φυτά ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνο ή άλλο εύκολα επιλέξιμο χαρακτηριστικό, όπως μια φθορίζουσα πρωτεϊνη ή χρωστική. Στην προκειμένη περίπτωση το γονίδιο επιλογής προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, το οποίο προκαλεί θάνατο σε φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 1). Φυτά που επιλέγονται με βάση το χαρακτηριστικό που αποκτούν από το γονίδιο επιλογής είναι πολύ πιθανά μετασχηματισμένα με το επιθυμητό T-DNA. Ανάλογα με τον τελικό στόχο του πειράματος που σχεδιάζουμε, τα επιλεγμένα φυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούνε αμέσως μετά σε περαιτέρω χειρισμούς. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθεί επιπλέον βήμα ελέγχου για να εξακριβωθεί οτι τα φυτά είναι όντως μετασχηματισμένα (σε ποιες περιπτώσεις νομίζετε οτι αρκεί μόνο αυτό το βήμα επιλογής;).

***Εικονα 1:*** *Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών Αrabidopsis thaliana με ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη. Ένα ανθεκτικό φυτό (και άρα πιθανά μετασχηματισμένο) υποδεικνύεται με βέλος στην φωτογραφία αριστερά.*

Σε περιπτώσεις, λοιπόν, που επιθυμούμε: 1) να επιβεβαιώσουμε οτι όντως τα επιλεγμένα φυτά φέρουνε το επιθυμητό T-DNA, 2) να ελέγξουμε σε τι ζυγωτική κατάσταση υπάρχει αυτό το Τ-DNA, αλλά και 3) να εντοπίσουμε/επιβεβαιώσουμε τη θέση ένθεσης του Τ-DNA στο γονιδίωμα, χρησιμοποιούμε PCR. Στην Εικόνα 2 φαίνεται ένα σχεδιάγραμμα για το πώς σχεδιάζονται εκκινητές για την ανίχνευση Τ-DNA  και της ζυγωτικής του κατάστασης όταν είναι γνωστή (έστω κατά προσέγγιση) η θέση ένθεσής του στο φυτικο γονιδίωμα. Σ΄αυτή την άσκηση θα σας δοθούνε ολοκληρωμένες αντιδράσεις PCR, που έγιναν σε δείγματα γενομικού DNA απομονωμένα από Τ1 απογόνους μιας μετασχηματισμένης φυτικής σειράς, τις οποίες θα ηλεκτροφορήσετε σε πηκτή αγαρόζης για να εντοπίσετε μετασχηματισμενα φυτά καθώς και την ζυγωτική κατάστασή του Τ-DNA που ανιχνεύετε. Πώς θ’ ανιχνεύατε ένα Τ-DNA, την ζυγωτική του κατάσταση, και τη θέση ένθεσης, εφ’ όσον η τελευταία δεν είναι γνωστή;

**α) Σχεδιασμός εκκινητών** **β)** **Πιθανά αποτελέσματα PCR**



**Εικόνα 2:** Σχεδιασμός εκκινητών και αναμενώμενα αποτελέσματα αντιδράσεων PCR για την ανίχνευση του Τ-DNA και έλεγχο της ζυγωτικής κατάστασής του, όταν είναι γνωστή η θέση ένθεσης στο φυτικό γονιδίωμα (σχήματα απο SignalSalk.edu). LP, RP: αριστερός και δεξιός γενομικός εκκινητής, ΒΡ: εκκινητής συνοριακού του T-DNA, BPos: η απόσταση του ΒΡ απο το άκρο του T-DNA, Flanking sequence: η γενομική αλληλουχία απο το άκρο του Τ-DNA μέχρι τον RP. WT, HZ και HM: wild type (αγρίου τύπου), heterozygous (ετερόζυγο) και homozygous (ομόζυγο) φυτό, αντίστοιχα.

**Άσκηση:**

1. **Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών—εκβλάστηση σπερμάτων**
2. Αποστειρώστε τους σπόρους εμβαπτίζοντάς τους σε 70% αιθανόλη για 30-60 sec και κατόπιν σε 30% χλωρίνη εμπορίου (2.625% υποχλωριώδες νάτριο)/ 0.05% Tween20 για 5 min. Ξεπλύνετε πολύ καλά με αποστειρωμένο νερό. Εναλλακτικά, τοποθετήστε τους σπόρους σε τρυβλία και υπό κενό, παρουσία ατμών χλωρίνης (100 ml χλωρίνη εμπορίου στο οποίο έχουν προστεθεί 3 ml ΗCl) για 4 ή 15h.
3. Eτοιμάστε τρυβλία με 1/2Χ MS θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, 0.8% άγαρ και 50 μg/ ml καναμυκίνη. Προσθέστε vancomycin σε συγκέντρωση 500mg/l για τον έλεγχο ανάπτυξης βακτηρίων. Στεγνώστε καλά τα τρυβλία, αφήνοντας ελάχιστα ανοιχτά τα καπάκια για 20-30 min.
4. Απλώστε ομοιόμορφα τους αποστειρωμένους σπόρους σε πυκνότητα περίπου 100-150 σπόροι (~15 mg) ανά τρυβλίο αναμιγνύοντας. Μη μετακινήσετε τα τρυβλία για 10-15 min, οπότε το υγρό θα απορροφηθεί στο θρεπτικό μέσο. Διαφορετικά αφήστε τα καπάκια ελαφρώς ανοικτά. Χρησιμοποιήστε διαφορετικό τρυβλίο για κάθε φυτική σειρά.
5. Κλείστε τα τρυβλία με Parafilm. Αφήστε στους 4 οC για 1 ημέρα και κατόπιν μεταφέρετε τους σε θάλαμο ανάπτυξης υπό συνεχές φως (50-100 μEinsteins m-2 sec-1) για 7-10 ημέρες. Τα μετασχηματισμένα φυτά θα αναπτύσσονται ως πράσινα φυτάρια.

**2. Έλεγχος γενότυπου για την ανίχνευση Τ-DNA ενθεμάτων.**

Η κάθε ομάδα θα φορτώσει δύο αντιδράσεις PCR που έχουν γίνει σε δείγμα DNA απο το ίδιο φυτό, αλλά με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Η μία αντίδραση (LR) ενισχύει το αγρίου τύπου γονίδιο και η άλλη (BR) ενισχύει τμήμα του Τ-DNA μαζί με τμήμα του φυσιολογικόυ γονιδίου απο τη θέση ένθεσης του T-DNA μέχρι τον RP (βλέπε Εικόνα 2). Οι PCRs που αναλύει κάθε ομάδα προέρχονται απο διαφορετικά φυτά Τ1 γενιάς. Με βάση τ’ αποτελέσματα που θα πάρετε συνολικά, ποια φυτά πρέπει να διατηρηθούν για παραγωγή σπερμάτων και επόμενους πειραματικούς χειρισμούς;