

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Εργαστηρικές Ασκήσεις του Μαθήματος
«Βιοτεχνολογία Φυτών»
8^{ου} εξαμήνου

Αθήνα, 2019

Σύνοψη των εργαστηρικών ασκήσεων:

Άσκηση 1: Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο του ηλεκτροπαλμού (electroporation)

Άσκηση 2: Σταθερός μετασχηματισμός φυτών *Arabidopsis thaliana* - Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών

Άσκηση 3: Παροδικός μετασχηματισμός φυτών *Nicotiana benthamiana*

Άσκηση 4: Καταγραφή και παρατήρηση των φυτών – συζήτηση των αποτελεσμάτων

Άσκηση 1. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με ηλεκτροπόρωση

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό

➤ Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) αναπτύσσεται σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο LB για 6 ώρες στους 28°C.

- 0.1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $OD_{550}=0,5-0,7$.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10min στις 3500 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος γλυκερόλης (10%v/v) (πυκνότητα $10^{11}-10^{12}$ βακτήρια/ml). Δείγματα των 45μl μοιράζονται σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχονται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C.

Μετασχηματισμός

- Σε 45μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επώζεται στον πάγο για 5min.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέτα ηλεκτρισμού, διαμέτρου 0.2cm.
- Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Οι παράμετροι για το σύστημα της BioRad® Gene PulserII είναι χωρητικότητα 25μF, αντίσταση 400Ω ή 600Ω και ηλεκτρικό πεδίο 1,8kV χρονικής διάρκειας 8-12msec.
- Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμειξη του δείγματος και επώαση για 3 ώρες στους 28°C.

- Φυγοκέντρωση του δείγματος για 1min στις 10000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl θρεπτικού μέσου LB.
- Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή τόσο του *Agrobacterium* και του πλασμιδίου Ti, όσο και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα.
- Επώαση των τριβλίων για 36-48 ώρες σε θάλαμο 28°C.

Για να επιλέξουμε τα μετασχηματισμένα κύτταρα *Agrobacterium* με τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα εφαρμόζουμε την συνδυασμένη δράση τριών αντιβιοτικών. Η επιλογή γίνεται σε στερεά τρυβλία με LB που περιέχουν 50mg/L Ριφαμπικίνη για την επιλογή των κυττάρων του *Agrobacterium*, 50mg/L Τζενταμυκίνη για την επιλογή του Ti πλασμιδίου του στελέχους GV3101 και 50mg/L Καναμυκίνη για την επιλογή του δυαδικού φορέα.

Άσκηση 2. Μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana* και επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών

Μέθοδος διείσδυσης με εφαρμογή κενού σε ολόκληρα φυτά *Arabidopsis*

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους (Bechtold & Pelletier, 1998). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση οικότυπων *Columbia* και *Landsberg erecta*. Με επιμέρους όμως τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το σταθερό μετασχηματισμό άλλων οικότυπων *Arabidopsis thaliana*. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό μετασχηματισμένων φυτών που θα δημιουργηθούν είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας και το στέλεχος του *Agrobacterium*, η καλή εφαρμογή του κενού, και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμό. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, 95% περίπου των φυτών δίνουν μετασχηματισμένα σπέρματα.

Ανάπτυξη φυτών και διείσδυση με κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium*

- Όταν τα φυτά φτάσουν ένα ύψος 20-25cm και τα πρώτα άνθη έχουν σχηματιστεί, είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν.
- Αναπτύσσουμε μία καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που φέρει την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5ml θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες στους 28°C.

1ml αυτής της καλλιέργειας μεταφέρεται σε 500 ml θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει $OD_{600}=2.0$.

Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5min στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύονται σε 750 ml διαλύματος διείσδυσης (IM). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες.

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 500ml και όλο το δοχείο τοποθετείται σε έναν κάδο κενού. Ένα δοχείο που περιέχει 4 ανεπτυγμένα φυτά αναποδογυρίζεται και τα φυτά εμβαπτίζονται μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium*. Προσέχουμε τα φυτά να είναι βυθισμένα ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που

αρχίζουν να εμφανίζονται στη βάση της ροζέτας. Συνίσταται το χώμα να ενυδατώνεται καλά πριν την διείσδυση, ώστε να απορροφά όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτών.

Ο κάδος κενού κλείνεται αεροστεγώς και με τη βοήθεια μιας αντλίας λαδιού εφαρμόζεται κενό 400 mm Hg, για 5-10 λεπτά.

Μεταφορά των φυτών σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι), μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους.

Μόλις τα φυτά αφυδατωθούν, γίνεται συγκομιδή των σπερμάτων τους.

Επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς

- Σπέρματα T1 γενιάς αποστειρώνονται και επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής MS. Το θρεπτικό μέσο φέρει είναι εμπλουτισμένο με κατάλληλα αντιβιοτικά που θα βοηθήσουν για την ορθή επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το αντιβιοτικό υγρομυκίνη (30μg/mL) και σεφοταξίμη (50μg/mL).
- Τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).
- Τα τρυβλία επωάζονται σε αυτές τις συνθήκες για περίπου 14 ημέρες.
- Μετά από 5-7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσονται σε σκούρα πράσινα φυτά και έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους είναι κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύσσουν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και έχουν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών από τα μη μετασχηματισμένα είναι πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά αναπτύσσουν σχεδόν φυσιολογική ρίζα και δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνεται και τελικά νεκρώνονται.

Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρονται σε άλλα τρυβλία με θρεπτικό μέσο 1xMS, χωρίς αντιβιοτικό προκειμένου να αναπτυχθούν όσο το δυνατό καλύτερα μέχρι το στάδιο της ροζέτας και τότε μεταφέρονται στο χώμα για να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους στις ίδιες συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας.

Σχετική βιβλιογραφία

Bechtold N, Pelletier G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**: 259-266.

Άσκηση 3. Παροδικός μετασχηματισμός επιδερμικών κυττάρων φύλλων καπνού (*Nicotiana benthamiana*)

Καλλιέργεια και προετοιμασία κυττάρων

- Επιλογή μονής αποικίας και καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (5ml), με τριπλή επιλογή (ριφαμπικίνη Rif- προαιρετικό, τζενταμυκίνη Gen και καναμυκίνη Kan). Ανάπτυξη για 1-2 ημέρες, έως ότου θολώσει καλά.
- 1,5mL από την κάθε καλλιέργεια τοποθετούνται σε eppendorfs.
- Φυγοκέντρηση στις 3.500rpm για 10΄
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα ξεπλένεται με 1ml dilution buffer. Χρειάζεται πολλή προσοχή διότι το βακτηριακό ίζημα μπορεί εύκολα να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηρίων.
- Απομακρύνεται το dilution buffer και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μL Dilution buffer. Τα διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το επόμενο βήμα.

Ποσοτικοποίηση των κυττάρων – προετοιμασία βακτηριακού διαλύματος για μικροέγχυση στα επιδερμικά κύτταρα του φύλλου των φυτών

- Κάνουμε αραιώσεις 1:20 σε νέο eppendorf tube (50μL από τα κύτταρα που έχουμε επαναδιαλύσει + 950μL Dilution Buffer) και προσδιορίζουμε την οπτική απορρόφηση στα 600nm.
- Για την παρασκευή του βακτηριακού διαλύματος μικροέγχυσης, κάνουμε τους υπολογισμούς έτσι ώστε η τελική οπτική απορρόφηση της κατασκευής μας στο διάλυμα να είναι 0,7, ενώ της καλλιέργειας που φέρει τον ιικό αναστολέα του μηχανισμού γονιδιακής αποσιώπησης του φυτού, p19, να είναι ίση με 1. Βάζουμε τις ανάλογες ποσότητες από τα διαλύματα των βακτηρίων, ρυθμίζουμε τον τελικό όγκο με Dilution buffer και προσθέτουμε Acetosyringone σε τελική συγκέντρωση 150μM.

Διαλύματα

Dilution Buffer: 10mM MgCl₂
10mM MES, pH: 5.6

Induction Buffer: 10mM MgCl₂
10mM MES, pH: 5.6
150μM Acetosyringone

- Επωάζουμε τα βακτηριακά διαλύματα στους 28°C για 2-3hrs. Αναδεύουμε ανα τακτά χρονικά διαστήματα.
- Με χρήση σύριγγας του 1mL (χωρίς βελόνα) παίρνουμε το βακτηριακό διάλυμα και με προσοχή το εγχύουμε στην απαξονική (κάτω) πλευρά της επιδερμίδας των φύλλων καπνού, μέχρι να καλυφθεί σχεδόν όλη η επιφάνεια του φύλλου (δείτε σχετικό βίντεο εδώ: https://www.youtube.com/watch?v=GHc7PU_jG2M).
- Σημαίνουμε τα μετασχηματισμένα φύλλα (με κλωστή ή χαρτοταινία) και τα επιστρέφουμε στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών.
- Το μέγιστο της έκφρασης του διαγονιδίου είναι 48-72hrs μετά την έγχυση.

Σχετική βιβλιογραφία

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**:949-956.