# Ćwiczenie II

## Zad. 1 Transfer roślin z hodowli w warunkach *in vitro* do fitotronu

Ukorzenione pędy roślin uprawianych w warunkach sterylnych *in vitro* np. takie, które poddane zostały mikrorozmnażaniu lub transformacji genetycznej można przesadzić do ziemi (warunki niesteryle*, in vivo*, *ex vitro*) w celu ich dalszej analizy. Na ćwiczeniach będziemy przenosić do fitotronu rośliny *Nicotiana tabacum* var. Samsun o fenotypie dzikim (*wt*, *wild type*), które zostały rozmnożone w KFiBR. W związku z tym, że zmiana warunków uprawy jest dla rośliny czynnikiem stresogennym należy czynności opisane poniżej wykonywać w jak najkrótszym czasie i możliwie delikatnie.

1. Każda para ćwiczeniowa otrzymuje jedną roślinę tytoniu szlachetnego do posadzenia w doniczce (w styczniu liście tych roślin zostaną wykorzystane do agroinfiltracji)
2. Doniczkę o średnicy 10 cm wypełniamy mieszanką ziemi ogrodowej i torfu na środku robimy dołek, do którego zostanie przeniesiona roślina.
3. Pojemnik z ukorzenionym pędem tytoniu otwieramy i delikatnie wyjmujemy roślinę wraz z pożywką stałą MS2, w której jest ona ukorzeniona. W tym celu najlepiej delikatnie chwycić roślinę u podstawy łodygi, tak aby nie uszkodzić liści, które mogą zajmować większą część pojemnika.
4. Korzenie rośliny wraz z pożywką zanurzamy w ciepłej wodzie (nie gorącej!) i delikatnie oczyszczamy z pożywki**. Usunięcie wszystkich resztek pożywki z korzeni** jest bardzo ważnym etapem – kluczowym dla uzyskania zdrowych upraw *ex vivo*. Resztki pożywki pozostawione na korzeniach mogą być przyczyną zagrzybienia i gnicia korzeni a w konsekwencji mogą doprowadzić do zamarcia całej rośliny. Należy jednocześnie jednak uważać, aby jak najmniej uszkodzić korzenie. Korzenie prawidłowo oczyszczone z pożywki nie są śliskie w dotyku.
5. Tak przygotowaną roślinę wkładamy do doniczki z ziemią w taki sposób, aby bryła korzeniowa całkowicie mieściła się w dołku w ziemi i aby korzenie nie były poplątane – w miarę potrzeby należy powiększyć dołek dostosowując jego rozmiary do rozmiarów korzeni rośliny. Delikatnie zasypujemy korzenie i lekko dociskamy glebę wokół (stabilizujemy roślinę).
6. Podlewamy roślinę i jak najszybciej przenosimy do inkubatora (mikropropagatora)
7. Mikropropagator jest specjalną kuwetą zaopatrzoną w przezroczystą pokrywę umożliwiającą regulowanie wilgotności powietrza w bezpośrednim sąsiedztwie rośliny. Rośliny uprawiane *in vitro* rosną w warunkach bardzo wysokiej wilgotności względnej powietrza (~100%). Wzrost roślin przy takiej wilgotności skutkuje redukcją grubości warstwy kutikuli znajdującej się na powierzchni liści i większości organów nadziemnych rośliny. Transfer roślin rosnących w warunkach *in vivo* do warunków *ex vivo* wymaga ich aklimatyzacji do niższej wilgotności powietrza. Rośliny potrzebują kilku dni na uzupełnienie ochronnej warstwy kutikuli dlatego tuż po przesadzeniu do doniczek wkładamy je do zamkniętego mikropropagatora. Dodatkowo na dno kuwety mikropropagatora nalewamy warstwę wody. Po tygodniu należy stopniowo (w odstępach kilkudniowych) otworzyć otwory wentylacyjne w pokrywie inkubatora. Po około dwóch tygodniach można na ogół rośliny całkowicie odsłonić.
8. Po około miesiącu rośliny przesadzamy do większych doniczek. Należy pamiętać też o regularnym uzupełnianiu zawartości substancji odżywczych w podłożu uprawnym. W zależności od rodzaju użytego preparatu rośliny nawozimy od kilku do kilkunastu razy w ciągu okresu wegetacyjnego.

## Zad. 2

## Izolacja ekstraktów z linii DN5 *Nicotiana tabacum* var. Samsun stabilnie transformowanych genem ludzkiej rekombinowanej dezoksyrybonukleazy I

Linie *Nt*DN5 to rośliny tytoniu szlachetnego *Nicotiana tabacum* L var Samsun, który został stabilnie zmodyfikowany genem DN5 kodującym ludzką dezoksyrybonukleazę I (hDNaza I). Gen DN5 jest zoptymalizowaną sekwencją kodującą izoformę I DNazy I zapisaną w genie DNASE I na chromosomie 16. Transgeniczne linie *Nt*DN5 wytwarzają aktywne białko ludzkiej DNazy I, którego detekcji można dokonać m.in. metodą Western blot, DNA-SDS-PAGE, RED (radial enzyme diffusion) a także poprzez pomiary aktywności przy wykorzystaniu metody Kunitz’a (metoda hiperchromiczna) lub metody z zastosowaniem DNA wybarwionego zielenią metylową. Wszystkie wymienione metody analizy zostaną dokładniej omówione podczas zajęć, natomiast zadaniem Państwa będzie najpierw wyizolowanie ekstraktów z transgenicznych linii *Nt*DN5 oraz kontrolnych linii dzikich (wild type, *Nt* wt). Ekstrakty te zostaną zamrożone, aby na następnych ćwiczeniach móc je wykorzystać do analizy aktywności nukleazowej za pomocą metody RED.

Ekstrakcja:

1. Każda para ćwiczeniowa otrzyma do analizy 2 rośliny transgeniczne (2 rośliny należące do różnych linii *Nt*DN5 i 1 *Nt* wt)
2. 5g pociętej nożyczkami tkanki rośliny dzikiej (Nt *wt*) wkładamy do moździerza, zalewamy 5 ml zimnego buforu ekstrakcyjnego (50 mM Tris) a następnie silnie rozcieramy w celu uzyskania jednolitej masy (kilka minut).
3. Uzyskany homogenat roślinny przelewamy do 15 ml falkonu, podpisujemy i odstawiamy do lodówki.
4. Moździerz należy popłukać w wodzie destylowanej i wytrzeć ręcznikiem papierowym do sucha.
5. Kolejne ekstrakty izolujemy zgodnie z wytycznymi zawartymi w punktach 2-4.
6. Po wyizolowaniu wszystkich ekstraktów wirujemy je przy 4500 rpm, 20 min. przy 4°C. Klarowny supernatant przelewamy do nowych falkonów.
7. Falkony z ekstraktami mrozimy w -80°C.

**UWAGA! GMO!**

NACZYNIA POBRUDZONE RESZTKAMI ROŚLIN TRANSGENICZNYCH MYJEMY W WODZIE DESTYLOWANEJ A NASTĘPNIE TĘ WODĘ ZLEWAMY DO NACZYŃ PLASTIKOWYCH PRZYGOTOWANYCH NA ODPADY BIOLOGICZNE. RĘCZNIKI PAPIEROWE I WSZELKIE ODPADY POTENCJALNIE KONTAMINOWANE **GMO** WYRZUCAMY DO SPECJALNYCH POJEMNIKÓW PRZEZNACZONYCH NA **ODPADY SKAŻONE BIOLOGICZNIE**.