

Využitie jednovláknových konštruktov v transformačných pokusoch u *Chlamydomonas reinhardtii*

Andrea Pleceníková, Miroslava Slaninová

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, Bratislava
plecenikova@fns.uniba.sk

Chlamydomonas reinhardtii je jednobunková dvojbičíkatá zelená riasa, ktorá má spoločné znaky nielen s rastlinami ale aj so živočíchmi. Jej nevýhodou ako modelového organizmu je nízka účinnosť homologickej rekombinácie (HR) v bunkách, čo bráni jej využitiu v reverznej genetike. Podobne ako vyššie eukaryoty preferuje namiesto HR spájanie nehomologických koncov (NHEJ) a vnášajú DNA do buniek tak prevažne začleňuje do génomu na náhodné miesta.

Cieľom našej práce bolo zvýšiť efektivitu HR použitím jednovláknových konštruktov (ssDNA) namiesto klasických dvojláknových lineárnych, alebo cirkulárnych molekúl DNA. Riasový kmeň *C. reinhardtii* 302cw15 *arg2* (*arg7-8*) sme za týmto účelom transformovali metódou so sklenenými guľôčkami. Využili sme auxotrofiu daného kmeňa, ktorý nedokáže syntetizovať arginín, kvôli bodovej mutácii v *arg2* géne. Táto mutácia je presne definovaná ako tranzícia ⁶⁰⁷³G na A, ktorá spôsobí zámenu ²⁸⁸Gly na Ser v mutantnom proteíne [1]. Riasy sme v prvom kroku transformovali dvojláknovými konštruktami s neúplným *ARG2* génom štandardného typu. Na selekčnom médiu bez prídania arginínu môžu v tomto prípade rásť len transformanty, v ktorých prebehla homologická rekombinácia medzi vnášaným a endogénnym mutantným génom. Získaný pomer HR/NEHJ by sa mal neskôr porovnať medzi jednovláknovými a dvojláknovými vektormi.

Jednovláknovú DNA s fragmentom *ARG7* génu sme sa snažili pripraviť viacerými spôsobmi. Prvý spôsob prípravy ssDNA využíval fagemid pBluescript II KS (+), špeciálne bakteriálne bunky *XL1-Blue MRF'* a ich infekciu pomocným fágom VCS M13. Pri infekcii buniek s fagemidom sa tvorí jeho jednovláknová forma, vbaľuje sa do obalov fága a dostáva sa z buniek do kultivačného média odkiaľ ho môžeme izolovať. Tento postup sa ukázal byť veľmi neefektívny, keďže pre vznik ssDNA fagemidu je limitujúcim faktorom jeho veľkosť. Avšak čím je homologická oblasť vo vektore menšia, tým je nižšia aj transformačná účinnosť daného vektora. Navyše sa nám takýmto spôsobom nepodarilo izolovať dostatočné množstvo ssDNA potrebné na transformáciu rias. Druhý spôsob prípravy ssDNA využíval phi29 DNA polymerázu, ktorá umožňuje replikáciu cirkulárnych DNA takmer neobmedzenej dĺžky pomocou amplifikácie valivou kružnicou. Nepodarilo sa nám však dokázať jednovláknovú povahu vzniknutých produktov a domnievame sa, že dochádzalo k rozvetvenej amplifikácii, pričom vznikal dvojláknový produkt. Vzhľadom na nutnosť dlhšieho homologického úseku a väčšieho množstva DNA sa zvolené postupy ukázali ako neefektívne.

Práca bola podporená grantami VEGA 1/0279/09 a UK/112/2010.

[1] Mages, *Prostist.*, **2007**, 158, 435–446.