

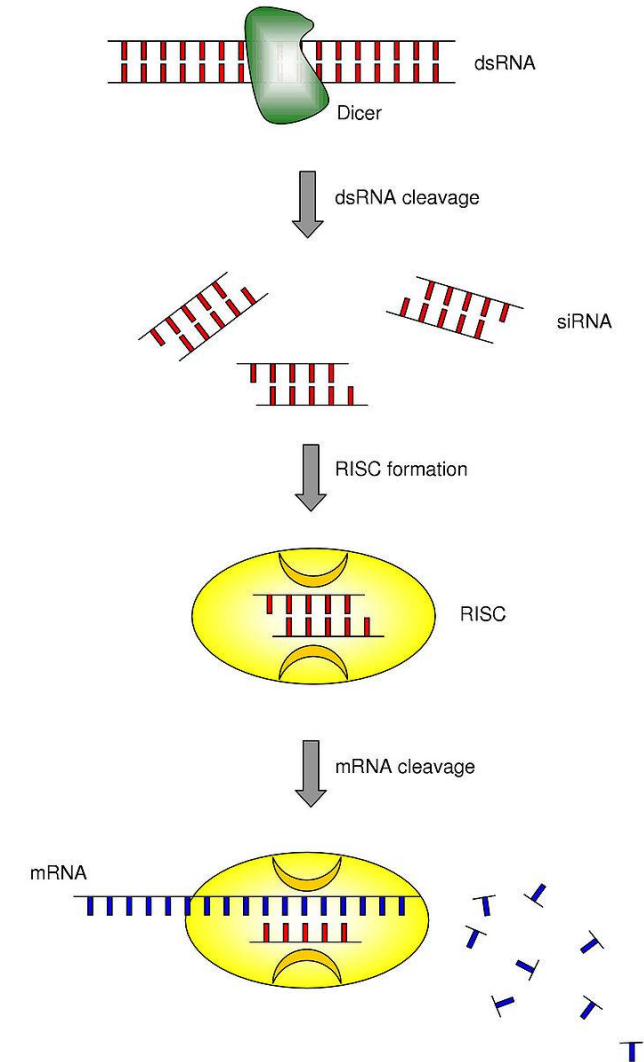
Výroba a aplikace dvojřetězcové RNA

Projekt BIPC

RNA interference

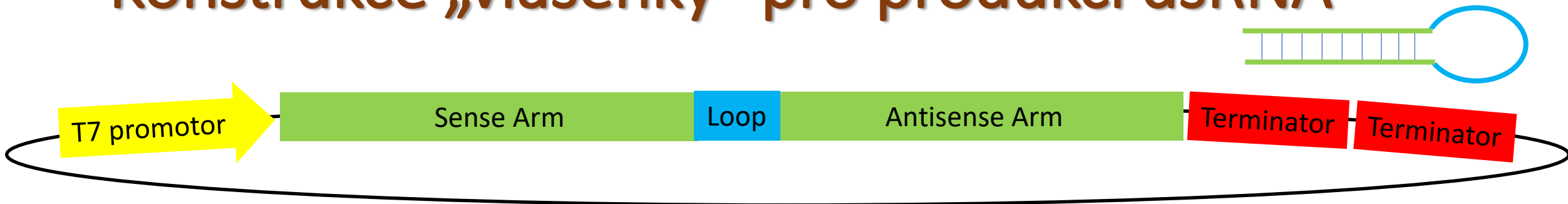
- dsRNA
 - ➔ potlačení genové exprese prostřednictvím translační nebo transkripční represe
 - Obrana proti virům/role v regulaci stability a translace mRNA
 - Prokázaná citlivost mandelínek na RNAi

Zhu et al., 2011; San Miguel and Scott, 2016; Máximo et al., 2020; Mehlhorn et al., 2020; Petek et al., 2020; Doğan et al., 2021

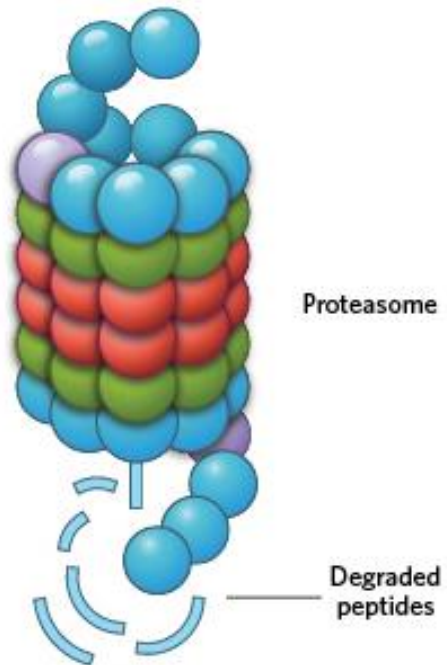


Mechanism of RNA interference (RNAi)
(Mocellin & Provenzano, 2004)

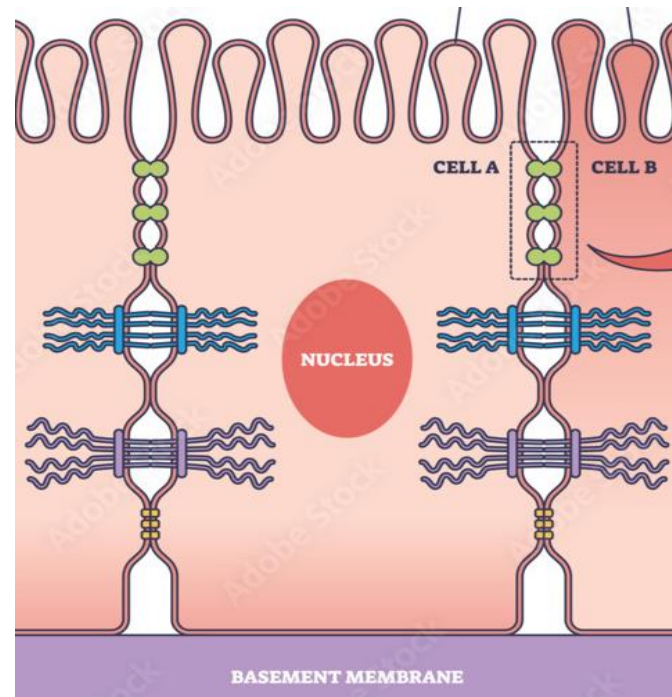
Konstrukce „vlásenky“ pro produkci dsRNA



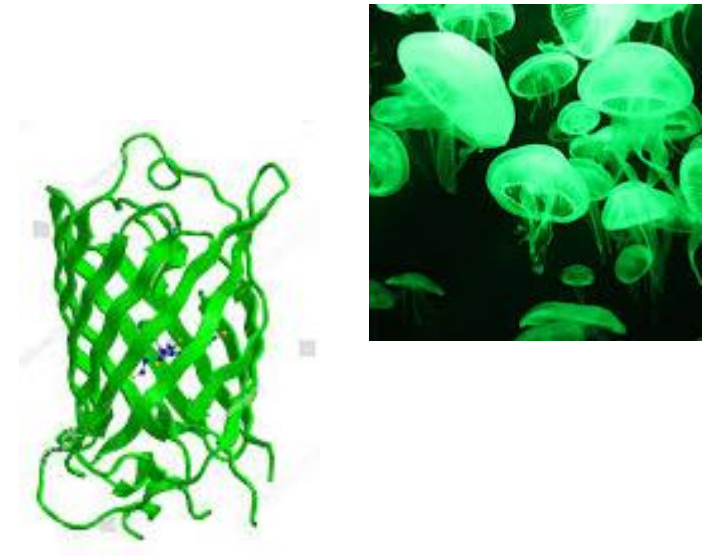
Proteazomová podjednotka Beta 5
„Ledprona“



protein Mesh pro kohezi střeva



Zelený fluorescenční
(kontrola)



Vlásenkové konstrukty pro mandelinku

Proteazomová podjednotka „Ledprona“

GGATCCGAAATTAATACGACTCACTATAGAGGTGCGGCAGACTGTGTTTATTGGGACCGTGTACTGGCCA
AACAAATGTAGAATGTATGAATTAAGGAACAGGGAGCGTATTTCTGTAGCAGCTGCTTCCAAATTGATGGCA
AACATGGTATACAATTACAAGGGAATGGGACTGTCAATGGGAATGATGTTAGCAGGATGGGATAAAAGAG
TAGACTCAGAGGGTACCAGAACACCTGGAAAAGTCTTTAGTGTGGGTTCAAGTTCAATTTATGCATTTGG
TGTCTTGGATTCCGGATACAAATGGGATTGACGGATGAGGAGGCTTACGATTTGGGTCGCAGGGCAATT
TACCATGCCACACAGAGATGCCTACTCTGGAGGTATCGTGAGGGTTTATCACATGAAGGAGACTGGTT
GGATACATATTGATAACAATGATTGTAATGATTTACATTATAAGTACCAGGCTGAGAAGGAAGATTTGGtaag
cgccccctaaaatccctttggcacatgtgtcctgaggggagaggcagcgacctgtagatgggacgggggcactaacctcagggttggg
gtACC

gggACCtctgaatgtgagtatcgccatgtaagcccagttattggccaatctcagaaagctcctggctccctggaggatggagagagaaaa
accagCAAATCTTCCTTCTCAGCCTGGTACTTATAATGTAAATCATTACAATCATTGTTATCAATATGTATCCAA
CCAGTCTCCTTCATGTGATAAACCTCACGATACCTCCAGAGTAGGCATCTCTGTGTGTGGCATGGTAAATT
GCCCTGCGACCCAAATCGTAAGCCTCCTCATCCGTCAAATCCCATTGTATCCGGAATCCAAGACACAAA
TGCATAAATTGAACCTGAACCCACACTAAAGACTTTTCCAGGTGTTCTGGTACCCTCTGAGTCTACTTTTT
ATCCCATCCTGCTAACATCATTCCCATTGACAGTCCCATTCCCTTGTAAATTGTATACCATGTTTGCCATCAATT
TGGAAGCAGCTGCTACAGAAATACGCTCCCTGTTCTTAATTCATACATTCTACATTGTTTGCCAGTACAC
GGTCCCAATAAACACAGTCTGCCGCACCTATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAG
GGGTTTTTGAATTC

Kontrolní konstrukt (GFP)

GGATCCGAAATTAATACGACTCACTATAGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA
TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCC
CACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA
GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACT
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTtaagcg
ccccctaaaatccctttggcacatgtgtcctgaggggagaggcagcgacctgtagatgggacgggggcactaacctcagggtt
tgggtACC

gggtaccgagtatcgccatgtaagcccagttattggccaatctcagaaagctcctggctccctggaggatggagagagaaaaacc
agAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTG
TACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGT
TCACCAGGGTGTGCCCCCGAAGTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGA
AGATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGT
GGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGG
GCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCC
TCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACCTGTGGATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCT
TTGAGGGGTTTTTGAATTC

Izolace dsRNA z E. coli HT115 (0,5 mM IPTG, 6 hodin indukce)

	GeneRuler 1kb+				HT115			
Plasmid	-	pUC57	pUC57	pUC57	pUC57	pET22+	pET22+	pET22+
Terminator		1x	1x	2x	2x	1x	1x	1x
IPTG		-	+	-	+	-	+	+



Mandelinka – pitva střev ošetřených dospělých jedinců

GFP



Mesh – in vitro



DsRNA specifická pro Mesh způsobuje problémy v předžaludku (zůstane plný), potrava se nedostává do dalších částí střeva.