

Anna Olejnik

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

Autor korespondencyjny – A. Olejnik, e-mail: aniao@nico.ihar.poznan.pl

DOI: 10.5604/12338273.1083015

Metody analizy ekspresji genów w badaniach nad rzepakiem*

Methods for gene expression analysis in studies of oilseed rape

Słowa kluczowe: SAGE, mikromacierze DNA, qRT-PCR, hodowla molekularna, rzepak (*Brassica napus* L.)

Streszczenie

W pracy przedstawiono przegląd metod analizy ekspresji genów z zastosowaniem technik: mikromacierzy DNA, seryjnej analizy ekspresji genów (SAGE), jak również odwrotnej transkrypcji – RT-PCR oraz qRT-PCR. Zaprezentowano możliwości wykorzystania poszczególnych technik wraz z przykładami ich praktycznego zastosowania w badaniach molekularnych rzepaku.

Key words: SAGE, DNA microarray, qRT-PCR, molecular breeding, oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Abstract

This paper presents an overview of gene expression analysis methods, including: DNA microarrays, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), as well as reverse transcription techniques: RT-PCR and qRT-PCR. It also includes some examples of application of the methods in molecular studies on oilseed rape genome and transcriptome.

Wprowadzenie

Nowoczesne metody i techniki biologii molekularnej oraz biotechnologii umożliwiają szczegółową analizę struktury i funkcji genów, a także poznanie czynników warunkujących ich ekspresję. Powoduje to postęp w badaniach podstawowych zajmujących się genomiką strukturalną i funkcjonalną, a następnie pozwala na zastosowanie ich wyników między innymi w medycynie oraz w hodowli roślin uprawnych.

Badanie zależności pomiędzy genotypem a fenotypem rośliny jest ważnym aspektem nowoczesnej hodowli wspomaganą markerami molekularnymi. Rozwój technik molekularnych stwarza coraz większe możliwości poznania podstaw

* Praca wykonana w ramach projektu PBZ-MNISW – 2/3/2006/19/IGR/1.

genetycznych cech użytkowych roślin uprawnych. Dzięki temu możliwe jest opracowanie nowych markerów, np. dla hodowli molekularnej (Snowdon i in. 2005). Poznanie funkcji genów poprzez badanie zmian ich ekspresji w odpowiedzi na czynniki stresowe jest niezbędne dla wprowadzenia nowych genotypów do hodowli odpornościowej. W zależności od potrzeb, w pracach badawczych prowadzonych na roślinach uprawnych (np. *Brassica napus*) i modelowych (np. *Arabidopsis thaliana*) stosuje się wiele metod oceny ekspresji genów, zarówno w badaniach roślin transgeniczných, jak i nietransformowanych.

Metody analizy ekspresji genów dzieli się na metody o niskiej i wysokiej rozdzielczości. Metody o niskiej rozdzielczości takie jak mikromacierze DNA oraz SAGE, wykorzystywane są głównie jako badania przesiewowe. Natomiast do metod o wysokiej rozdzielczości zaliczamy: hybrydyzację typu Northern, RT-PCR (ang. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) i qRT-PCR (ang. quantitative RT-PCR), NGS (ang. Next Generation Sequencing, sekwencjonowanie nowej generacji) oraz użycie genów reporterowych. W pracy przedstawiono wybrane techniki analizy ekspresji genów oraz przykłady ich zastosowania w pracach nad rzepakiem. W zestawieniu nie ujęto techniki sekwencjonowania nowej generacji, gdyż nie jest jeszcze upowszechniona w badaniach ekspresji genów rzepaku.

Analiza kolekcji klonów EST

EST (ang. Expressed Sequence Tag) jest to krótki, zsekwencjonowany fragment cDNA odpowiadający genowi, który ulega ekspresji. W celu analizy profilu ekspresji badanego organizmu w danych warunkach niezbędne jest skonstruowanie biblioteki EST. W bazach danych dostępne są sekwencje EST pochodzące z różnych tkanek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), na przykład z korzeni roślin rzepaku poddanych stresowi suszy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/EV223001.1>). Stworzenie własnej kolekcji klonów EST analizowanej rośliny poddanej działaniu stresu (np. patogenu) pozwala porównać fragmenty sekwencji DNA z dostępnymi w bazach, również dla innych gatunków i wnioskować o tym, jakie geny ulegają zmienionej ekspresji.

W celu zidentyfikowania potencjalnych genów powiązanych z wrażliwością roślin rzepaku na uszkodzenia spowodowane przez pchełkę rzepakową porównywano biblioteki EST z liściami uszkodzonych i nieuszkodzonych przez insekty (Gruber i in. 2012). Badania wykazały różnice w ekspresji dwudziestu dwóch genów o nieznannej funkcji, sześciu kodujących białka sygnałowe oraz genu czynnika transkrypcyjnego zawierającego domenę palca cynkowego.

Mikromacierze DNA

Mikromacierz DNA ma postać płytki z regularnie naniesionymi sondami, które poprzez hybrydyzację wiążą komplementarne cząsteczki DNA lub RNA.

W badaniach ekspresji genów stosuje się dwa rodzaje mikromacierzy: cDNA i oligonukleotydowe, które różnią się rodzajem zastosowanych sond.

W technologii mikromacierzy cDNA (Shalon i in. 1996) sondy nanoszone są na płytkę przy użyciu specjalnej drukarki. W eksperymencie do jednej macierzy hybrydizowane są dwie próby pochodzące z porównywanych organizmów, np. rośliny poddanej stresowi i rosnącej w warunkach optymalnych. W tym systemie jednemu genowi odpowiada jedna plamka cDNA, a nanoszone próby są znakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (najczęściej czerwonym i zielonym). Uzyskany wynik w postaci barwnego sygnału pozwala śledzić zmiany ekspresji genów wywołane zastosowanym czynnikiem (np. działaniem stresu). Mimo, że dostępne są komercyjne systemy tego typu, zaletą mikromacierzy cDNA jest możliwość samodzielnego zaprojektowania i relatywnie niedrogiego ich wydrukowania. Niewątpliwie wygodna jest także uproszczona analiza pozwalająca na bezpośrednie porównanie dwóch prób na jednej mikromacierzy. Wadą jest konieczność analizy porównywanych prób w jednym czasie i brak standaryzacji wyników uzyskanych na samodzielnie wykonanych macierzach, co utrudnia ich porównywanie pomiędzy laboratoriami (Żmieńko i in. 2008).

Mikromacierze oligonukleotydowe wytwarzane są poprzez syntezę oligonukleotydów bezpośrednio na płytce z zastosowaniem techniki zwanej fotolitoografią. Dzięki temu możliwe jest bardzo gęste upakowanie sond na 1 cm² (ok. 6 milionów). W analizie na mikromacierzach oligonukleotydowych stosuje się znakowanie prób jednym barwnikiem i hybrydyzuje z oddzielnymi mikromacierzami. Próby w eksperymentach dotyczących analizy ekspresji genów stanowią wyizolowany i wyznakowany RNA z badanego organizmu. Cząsteczki komplementarne hybrydyzują i powstaje sygnał, który jest odbierany przez specjalne czytniki. Dane analizowane są dla każdej mikromacierzy oddzielnie. Zaletą stosowania komercyjnych mikromacierzy jest możliwość porównywania standaryzowanych wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach, a także prób otrzymywanych w dużym odstępie czasu, np. analiza jednej rośliny przed i po długotrwałym traktowaniu chłodem, czy badanie kolejnych pokoleń roślin o długim okresie wegetacji. Wadą tego typu systemów jest niedostępność mikromacierzy dla większości roślin uprawnych i duże koszty wytworzenia ich na zamówienie (Żmieńko i in. 2008).

Mikromacierze cDNA wykorzystano również w badaniach nad ekspresją genów występujących w jądrach komórek bielmowych w różnych stadiach rozwoju zarodka w nasionach rzepaku (Huang i in. 2009). Porównywano stadia: globularne, sercowate i torpedy. Zidentyfikowano 1229 unikalnych sekwencji, które ulegały istotnie zmienionej ekspresji w trakcie rozwoju bielma. Wyniki uzyskane w eksperymencie z zastosowaniem mikromacierzy zostały potwierdzone poprzez analizę RT-PCR. Połączenie analizy EST, profili białkowych i danych uzyskanych z mikromacierzy pozwoliło na identyfikację szlaków metabolicznych,

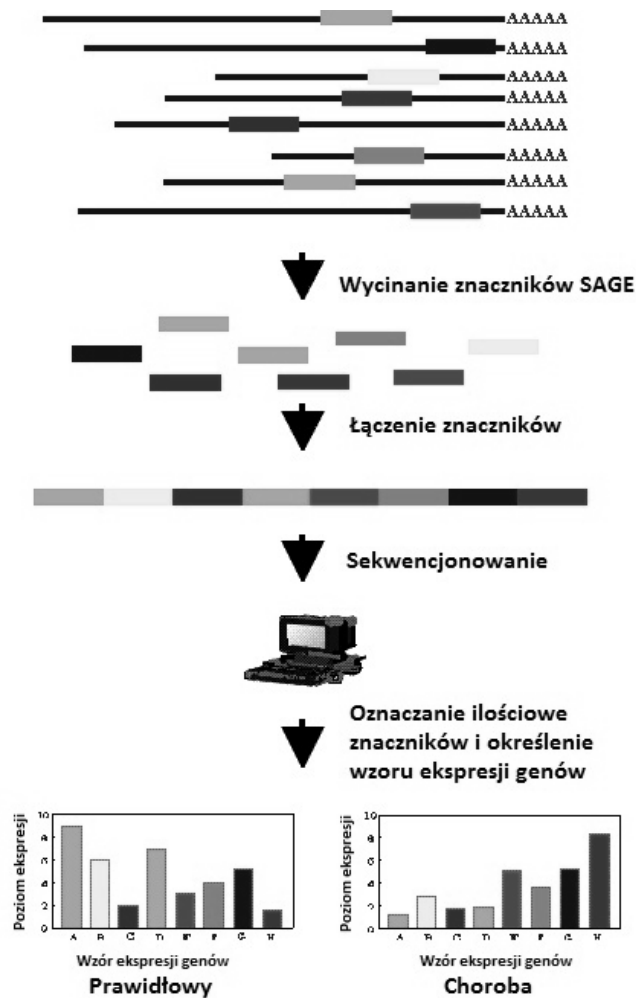
a także czynników transkrypcyjnych podlegających zmianom ekspresji w bielmie, w trakcie rozwoju zarodka.

U rzepaku często wykorzystuje się mikromacierze *A. thaliana* ze względu na brak dostępności sekwencji genomowej. Dla wyjaśnienia mechanizmu genowej męskiej sterylności w dwóch liniach rzepaku zastosowano mikromacierz ATH (firmy Affymetrix) zawierającą zestaw 22 810 sond reprezentujących 80% genów *A. thaliana* (Chen i in. 2009). Porównywane linie wsobne o wysoce ujednoliconym materiale genetycznym różniły się jednym allelem genu *Bnms1*, kontrolującego recesywną genową męską sterylność u rzepaku. W eksperymencie z zastosowaniem mikromacierzy wyznaczono profil ekspresji genów pąka kwiatowego. Wytypowano geny, których ekspresja została zahamowana i przyporządkowano je do grup funkcyjnych, a następnie poddano dalszym analizom. Wykazano, że *Bnms1* może być zaangażowany w metabolizm kwasów tłuszczowych, natomiast mutacja homologiczna w tym genie może blokować syntezę sporopoleniny lub też zapobiegać jej odkładaniu na powierzchni mikrospor, przez co nie dopuszcza do wytworzenia egzyny.

SAGE

SAGE (ang. Serial Analysis of Gene Expression) jest wydajną metodą pozwalającą na jednoczesną analizę produktów ekspresji wielu genów (Velculescu i in. 1995). Opiera się na skonstruowaniu biblioteki SAGE i sekwencjonowaniu otrzymanych klonów. Całkowity mRNA badanego organizmu jest poddawany odwrotnej transkrypcji. Otrzymany cDNA (ang. complementary DNA) jest hydrolizowany enzymem restrykcyjnym na małe fragmenty (ok. 12nt), które po ligacji klonuje się do wektorów plazmidowych. Utworzona w ten sposób biblioteka SAGE poddawana jest sekwencjonowaniu. Krótkie sekwencje (znaczniki genów) pozwalają na jednoznaczne przyporządkowanie ich do konkretnego genu. Liczba znaczników jednego genu odpowiada poziomowi jego ekspresji (Yamamoto i in. 2001).

Technikę seryjnej analizy ekspresji genów wykorzystano w badaniach nad rozwojem nasion rzepaku (*B. napus*) (Obermeier i in. 2009). Przy użyciu zmodyfikowanej metody LongSAGE, w oparciu o dłuższe, 21-nukleotydowe znaczniki, badano różnice w ekspresji genów w nasionach na różnym etapie rozwoju (23- i 35-dniowe). Zidentyfikowano geny różniące się ekspresją w 23. i 35. dniu po zapyleniu i poszukiwano ich odpowiedników w bazach danych. Badania te wykazały zmianę w ekspresji genów w trakcie rozwoju nasion, między innymi genów zaangażowanych w procesy rozwojowe, takie jak proliferacja komórek czy formowanie okrywy nasiennej (w 23. dniu po zapyleniu), do genów odpowiedzialnych za procesy metaboliczne, w tym akumulacji białek i odkładanie tłuszczów (w 35. dniu po zapyleniu).

Rys. 1. Metoda SAGE – schemat, na podstawie <http://www.sagenet.org/>

RT-PCR i qRT-PCR

Kolejną z metod o wysokiej rozdzielczości, wykorzystywaną w ostatnich latach, jest metoda RT-PCR (ang. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), oraz jej unowocześniona wersja z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, Real Time PCR). Jest to metoda dokładna, stosunkowo szybka i wysoce powtarzalna. W RT-PCR reakcja odwrotnej transkrypcji jest połączona z PCR, a wyniki uwidocznione są poprzez elektroforezę. Rozwinięciem tej metody, umożliwiającym ilościowe określenie poziomu ekspresji, jest PCR w czasie rzeczywistym na matrycy cDNA.

Real Time PCR przeprowadzony na matrycy uzyskanej w trakcie odwrotnej transkrypcji pozwala określić ilość cDNA w badanej próbce. W porównaniu do genu referencyjnego daje to pewien obraz rzeczywistego poziomu transkrypcji w komórce. Technika reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym polega na rejestrowaniu przez komputer fluorescencji generowanej w przebiegu PCR. Na podstawie tych danych powstaje wykres przebiegu reakcji, których wynikiem jest wartość progowa cyklu (C_T). Im mniejsza wyjściowa liczba kopii amplifikowanego DNA, tym większa wartość progowa cyklu. Do uzyskania wyniku niezbędna jest krzywa wzorcowa, utworzona z wartości C_T szeregu prób o znanych ilościach początkowych matrycy. Na podstawie porównania wartości progowej cyklu analizowanej próby z krzywą wzorcową wyznacza się liczbę kopii badanej sekwencji (Valasek i Repa 2005).

Do analizy PCR w czasie rzeczywistym opracowano kilka technik opartych na fluorescencji. Można je podzielić na specyficzne, w których stosowane sondy znakowane fluorescencyjnie są komplementarne do badanego fragmentu oraz mniej specyficzne, opierające się na pomiarze fluorescencji wywołanej połączeniem fluorochromu (np. SybrGreen I) z produktem PCR. Detekcja specyficzna odbywa się w oparciu o wyznakowane fluorescencyjnie startery lub sondę, które hybrydują w miejscu występowania analizowanej sekwencji. Detekcja przy użyciu SybrGreen I może być obciążona błędami. Ze względu na niespecyficzne wiązanie się SybrGreen I do dwuniciowych cząsteczek DNA, może się on wiązać z niespecyficznymi produktami lub z dimerami starterów, jeśli takie powstaną w mieszaninie reakcyjnej. Aby zapobiec odczytywaniu błędnych wyników jako pozytywnych, w eksperymencie wykonuje się dodatkową analizę krzywej topnienia produktu reakcji (Bustin i Nolan 2004).

Podczas analizy ekspresji genów należy wziąć pod uwagę nie zawsze jednakową wydajność odwrotnej transkrypcji, co może zmienić ostateczny wynik. Dlatego w tych badaniach należy posłużyć się dodatkowym standardem w postaci analizy genu referencyjnego. Uzyskane wyniki dla badanego transkryptu odnosi się zawsze do genu referencyjnego (Valasek i Repa 2005). Tym mianem określa się gen o stałej ekspresji w komórce badanego gatunku. Najczęściej stosowane w tym celu są geny metabolizmu podstawowego, jako ulegające konstytutywnej ekspresji. Najczęściej stosowanymi genami referencyjnymi są: *β -aktyna*, *18S rRNA*, *GADPH*, *UBQ*. W badaniach porównawczych ośmiu genów referencyjnych na potrzeby badań genomu rzepaku dowiedziono, że geny: *UPI*, *UBC9*, *UBC21* i *TIP41* wykazują największą stabilność w tkankach wegetatywnych, zaś geny *ACT7*, *UBC21*, *TIP41* i *PP2A* są najbardziej stabilne spośród testowanych genów w dojrzewających zarodkach (Chen i in. 2010). Analizę ekspresji genu metodą qRT-PCR można przeprowadzić w sposób bezwzględny, który pozwala określić początkową ilość matrycy. Wynikiem może być na przykład liczba kopii badanego genu w przeliczeniu na komórkę, gram tkanki itd. Jednak w badaniach zmian

ekspresji genów pod wpływem różnych czynników lub też analizie ekspresji wprowadzonych genów stosowana jest względna analiza ekspresji. Uzyskany metodą qRT-PCR wynik dla badanej próby jest porównywany do wyniku dla próby kontrolnej, która pochodzi z organizmu nietraktowanego danym czynnikiem lub nietransformowanego. Wynikiem jest procentowa zmiana ekspresji badanego genu w danej próbie, w stosunku do przyjętej stuprocentowej ekspresji tego genu w próbie kontrolnej (Wyska i Rosiak 2006).

PCR w czasie rzeczywistym jest nie tylko samodzielną techniką analizy ekspresji genów, pozwalającą na jednoznaczne określenie poziomu ekspresji genu w komórkach czy tkankach organizmów w różnych warunkach, używana jest do określenia liczby kopii transgeny, a także stanowi metodę kontrolną dla eksperymentów mikromacierzowych.

RT-PCR w czasie rzeczywistym stosuje się na przykład do analizy szlaków metabolicznych. U rzepaku przeprowadzono transformacje wielogenowe, podczas których wprowadzono siedem genów szlaku syntezy karotenoidów (Fujisawa i in. 2009). Po uzyskaniu roślin przeprowadzono analizę ekspresji wprowadzonych genów oraz genów natywnych związanych z produkcją karotenoidów. Badania te wykazały, że ekspresja wprowadzonych genów powodowała zmiany w ekspresji genów natywnych. PCR w czasie rzeczywistym na matrycy cDNA zastosowano również w badaniu ekspresji genów odpowiedzialnych za przekazywanie informacji o stresie wprowadzonych do rzepaku na drodze agrottransformacji (Olejnik 2012 – praca doktorska). Poziom ekspresji odnoszono do rośliny nietransformowanej, w której przyjęto ekspresję badanego genu na poziomie 100%. Określono poziom nadekspresji każdego z 3 genów wprowadzonych do genomu rzepaku oraz zbadano wpływ ich ekspresji na fizjologię rośliny.

Geny reporterowe

Użycie genów reporterowych takich jak *GFP* (białko zielonej fluorescencji) czy *GUS* (beta-glukuronidaza) pozwala na śledzenie ekspresji genu wprowadzonego na drodze transformacji. W tym przypadku możliwe jest również specyficzne określenie tkanek, czy nawet komórek, w których następuje ekspresja. Z wymienionych genów korzystniejsze jest zastosowanie *GFP*, gdyż jego ekspresję można śledzić przyżyciowo (Chudakov i in. 2005). Produktem genu *GFP*, pochodzącego z meduzy *Aequorea victoria*, jest białko fluoryzujące na zielono pod wpływem promieniowania UV. Zastosowanie tego genu w biotechnologii jest wszechstronne, od opracowywania metod wprowadzania genów i dobierania odpowiednich promotorów do konstruktów, poprzez śledzenie przepływu transgenów między organizmami, po zastosowanie zmodyfikowanych białek świecących różnymi kolorami w celu porównywania ekspresji kilku genów w danych warunkach. Zastosowanie tego białka jako przyżyciowego wskaźnika ekspresji transgeny, pozwala na jego identyfikację w roślinie bez potrzeby uszkodzenia lub jej całkowitej utraty (Halfhill

i in. 2001). Połączenie genu *GFP* z wprowadzonym genem pod wspólnym promotorem umożliwia jego pośrednią identyfikację i kontrolę ekspresji. Zwiększa także skuteczność selekcji roślin o pożądanym cechach jeszcze w warunkach *in vitro*. Pozwala to uniknąć stosowania genów oporności na antybiotyki jako genów selekcyjnych w transformacjach genetycznych i utrzymywania roślin nietransgenicznym do momentu, kiedy analiza jest możliwa do wykonania (zazwyczaj po regeneracji i przeniesieniu do gleby). Takie zastosowanie *GFP* daje również możliwość kontroli przepływu transgenów w środowisku (Stewart 1996). Jest to gen o łatwej, taniej i jednoznacznej identyfikacji ekspresji. Nie wymaga nakładu pracy laboratoryjnej i biegłości w obsłudze aparatury (Halfhill i in. 2001).

Gen reporterowy *GUS* zastosowano w badaniach nad wprowadzeniem do rzepaku rekombinowanego białka (MLC), mającego pełnić rolę jadalnej szczepionki przeciwko malarii (Lee i in. 2011). Przy użyciu genu reporterowego obserwowano pośrednio ekspresję wprowadzonego właściwego genu *MLC*. Wyniki te potwierdzono testem PCR na obecność fragmentu genu *MLC* (prawie 90% zgodność). Przydatność transgenicznego rzepaku jako szczepionki jadalnej przeciwko malarii została dodatkowo potwierdzona w badaniu na myszach.

Zastosowanie w transformacji rzepaku genem *cry1Ac* genu markerowego *GFP* pozwoliło na przeprowadzenie badań nad przepływem transgenów w środowisku i możliwością przenoszenia ich do gatunków spokrewnionych. Krzyżowano rzepak transgeniczny z gorczycą (*Brassica juncea*), a następnie wykonano dwukrotnie krzyżowanie wsteczne. Gen markerowy *GFP* posłużył do sprawdzenia ekspresji transgenów w kolejnych pokoleniach uzyskanych mieszańców. Wykazano korelację pomiędzy intensywnością świecenia białka zielonej fluorescencji a zawartością białka CRY1Ac. Ekspresja wprowadzonego genu ulega zmniejszeniu w kolejnych pokoleniach krzyżowania wstecznego. Ponadto w badaniach tych udowodniono, że białko zielonej fluorescencji jest przydatnym markerem transgenów w środowisku (Lei i in. 2011).

Podsumowanie

Współczesne metody badania ekspresji genów dostarczają ogromnej ilości danych, które odpowiednio analizowane dają obraz zmian w roślinie, zarówno w trakcie wzrostu, dojrzewania, jak i działania mechanizmów obronnych. Można wówczas wnioskować o genach odpowiedzialnych np. za odporność na choroby, szkodniki i stropy abiotyczne czy zmiany w wytwarzaniu poszczególnych substancji, tj. kwasów tłuszczowych, karotenoidów itp. Prowadzi to do opracowania nowych markerów molekularnych, a także wspomaga precyzyjną selekcję pożądanym genotypów w procesach nowoczesnej hodowli roślin uprawnych.

Literatura

- Bustin S.A., Nolan T. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15: 155-166.
- Chen Y., Lei S., Zhou Z., Zeng F., Yi B., Wen J., Shen J., Ma C., Tu J., Fu T. 2009. Analysis of gene expression profile in pollen development of recessive genic male sterile *Brassica napus* L. line S45A. *Plant Cell Reports*, 28: 1363-1372.
- Chen X., Truksa M., Shah S., Weselake R.J. 2010. A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*. *Analytical Biochemistry*, 405: 138-140.
- Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in Biotechnology*, 23: 605-613.
- Fujisawa M., Takita E., Harada H., Sakurai N., Suzuki H., Ohyama K., Shibata D., Misawa N. 2009. Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1319-1332.
- Gruber M., Wu L., Links M., Gietvaj B., Durkin J., Lewis C., Sharpe A., Lydiate D., Hegedus D. 2012. Analysis of expressed sequence tags in *Brassica napus* cotyledons damaged by crucifer flea beetle feeding. *Genome*, 55: 118-133.
- Halfhill M.D., Richards H.A., Mabon S.A., Stewart Jr. C.N. 2001. Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theoretical Applied Genetics*, 103: 659-667.
- Huang Y., Chen L., Wang L., Vijayan K., Phan S., Liu Z., Wan L., Ross A., Xiang D., Datla R., Pan Y., Zou J. 2009. Probing the endosperm gene expression landscape in *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 10:256.
- Lei L., Stewart Jr. C.N., Tang Z.-X., Wei W. 2011. Dynamic expression of green fluorescent protein and *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in interspecific hybrids and successive backcross generations (BC1 and BC2) between transgenic *Brassica napus* crop and wild *Brassica juncea*. *Annals of Applied Biology*, 159: 212-219.
- Lee C., Kim H.-H., Choi K.M., Chung K.W., Choi Y.K., Jang M.J., Kim T.-S., Chung N.-J., Rhie H.-G., Lee H.-S., Sohn Y., Kim H., Lee S.-J., L., Lee H.-W. 2011. Murine immune responses to a Plasmodium vivax-derived chimeric recombinant protein expressed in *Brassica napus*. *Malaria Journal*, 10: 106.
- Obermeier C., Hosseini B., Friedt W., Snowdon R. 2009. Gene expression profiling via LongSAGE in a non-model plant species: a case study in seeds of *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 10: 295.
- Olejnik A. 2012. Optymalizacja transformacji zarodków mikrosporowych rzepaku ozimego przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* genami *ABII*, *CDPK6* i *SKI* oraz analiza ekspresji transgenów. Praca doktorska, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB.
- Snowdon R., Link K., Badani A.G., Friedt W. 2005. Plant Breeding: Recent Advances in Molecular Breeding of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). W: K. Esser, U. Lüttge, W. Beyschlag, J. Murata (red.), *Progress in Botany*, Vol. 66. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg, 16: 144-163.
- Stewart Jr. C.N. 1996. Transgene flow and persistence may be monitored by using *in vivo* markers such as GFP. *BioSafety Journal*, 2: 3.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159.

- Wyska E., Rosiak M. 2006. Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w badaniach farmakokinetycznych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60: 660-666.
- Yamamoto M., Wakatsuki T., Hada A., Ryo A. 2001. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *Journal of Immunological Methods*, 250: 45-66.
- Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M. 2008. Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej. *Biotechnologia*, 83: 39-53.