

Úkol č. II

Identifikace transgenních rostlin

Arabidopsis thaliana

Agrobacterium tumefaciens

T-DNA

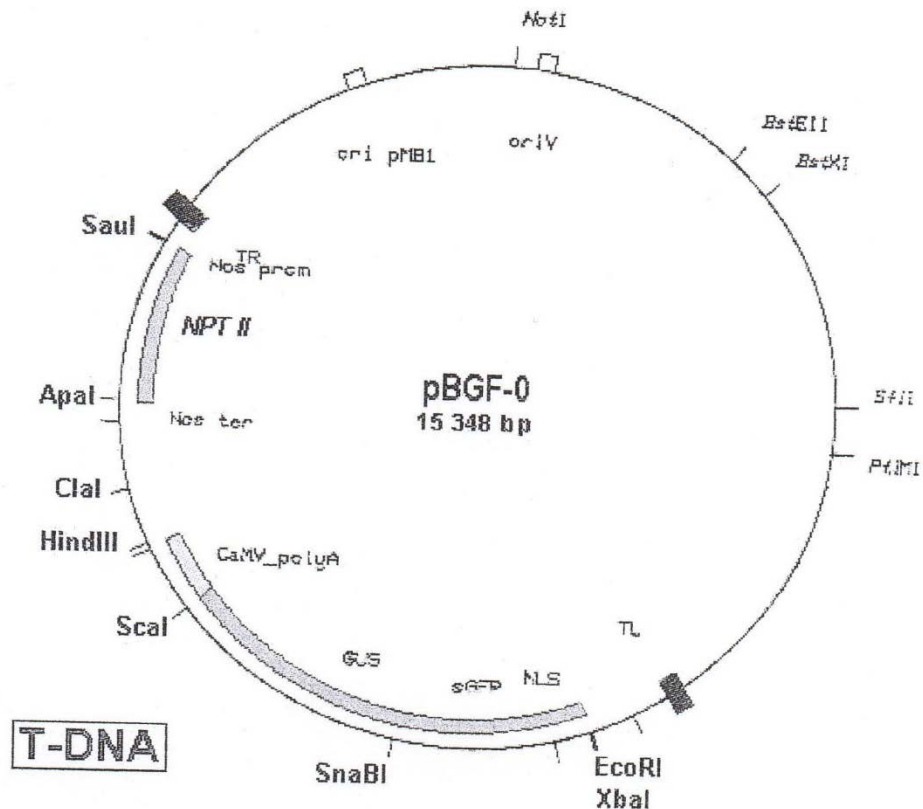
Geny selekční

NPT, *HYG*,

Basta

Geny signální

GUS, *GFP*



Metody identifikace transgenních rostlin

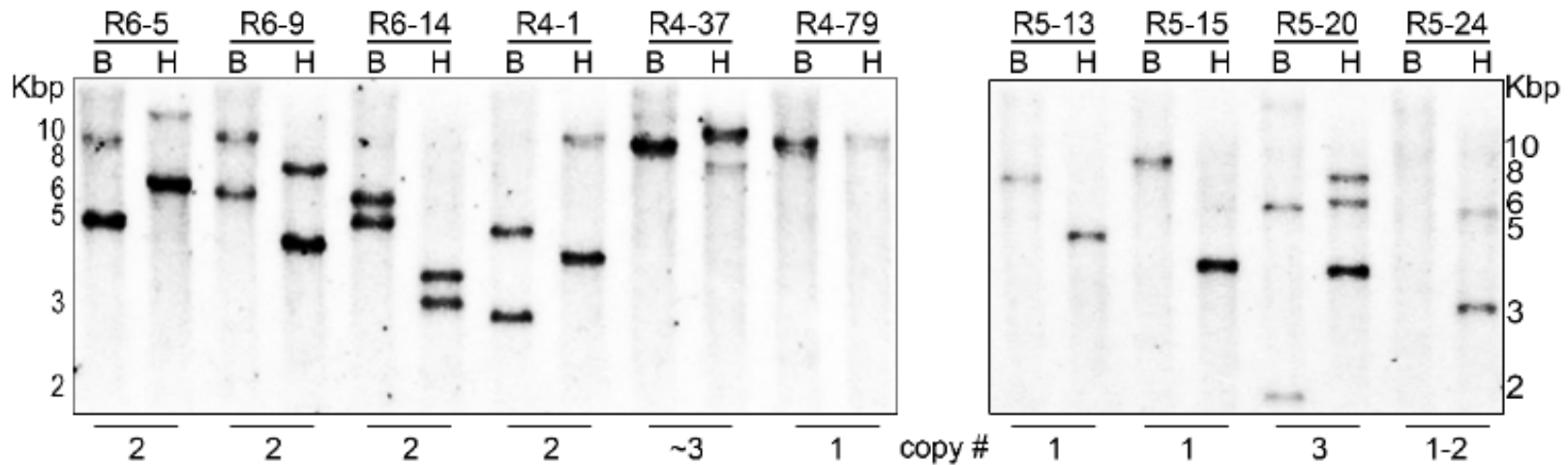
1) Selektce na médiu s antibiotikem –
kanamycin,

Gen *NPT* (*neomycin phosphotransferase*)

2) Polymerázová řetězová reakce

3) Southernova hybridizace

Southernova hybridizace a počet inzertů



Transgenní rýže, linie R

Značená sonda pro gen *HPTII*

Restriktázy B - *Bam*HI, H - *Hind*III

Selekce na médiu s antibiotikem

Postup

Materiál:

Kontrola Wassilevskaja

transformované linie – RJG, ER4

- 1. Příprava selekčního média s antibiotikem a bez antibiotika (kanamycin)**
- 2. Sterilizace semen, metodika**
- 3. Výsev na misky**
- 4. Vyhodnocení klíčících rostlin Kan^R, Kan^S**
- 5. Vyhodnocení počtu inzertů Kan^R : Kan^S**
- 6. Přesazení rostlin Kan^R, důkaz PCR**

Vyhodnocení počtu inzertů

Rezistence ke kanamycinu je dominantní znak

- **1 inzert 3 : 1 Kan^R : Kan^S**
 - **2 inzerty 15 : 1**
 - **3 inzerty 63 : 1**
1. Jak se změní štěpné poměry, jestliže 2 a více inzertů je ve vazbě?
 2. Určení počtu inzertů u testovaných inzerčních linií.
 3. Přesazení rostlin a identifikace inzertu PCR.

PCR pro *NPT*

Postup

Polymerázová řetězová reakce

Primery pro *NPT*

5' CCCGCTCAGAAAGAAGAACTCGTCA 3'

5' TGGCTGCTATTGGGCGAAGTG 3'

Program pro amplifikaci genu *NPT*

(94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 60s) 35x

Složení reakční směsi

d H ₂ O	5,6	μl
dNTP	0,25	200 μM
5x PCR pufr	2,0	
Primer-1	0,5	
Primer-2	0,5	
Go Taq-polymeráza	0,15	0,75 U
<u>Rostlinná DNA</u>	<u>1,0</u>	
	10,0	