

# Úkol č. II

## Identifikace transgenních rostlin

### *Arabidopsis thaliana*

*Agrobacterium tumefaciens*

T-DNA

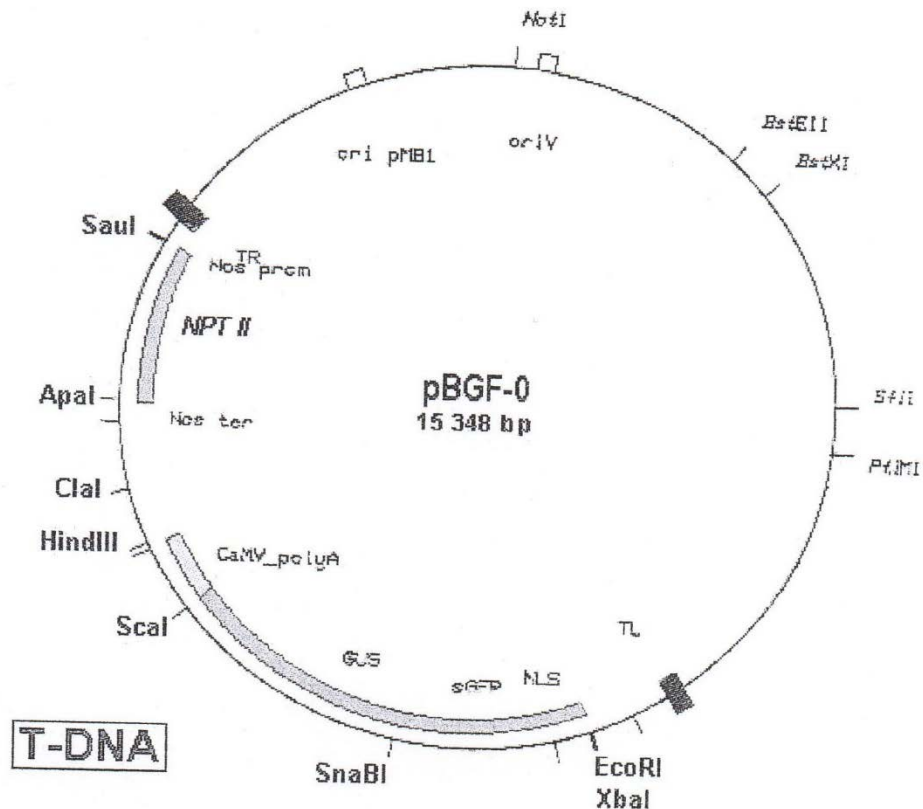
Geny selekční

*NPT*, *HYG*,

Basta

Geny signální

*GUS*, *GFP*



# Metody identifikace transgenních rostlin

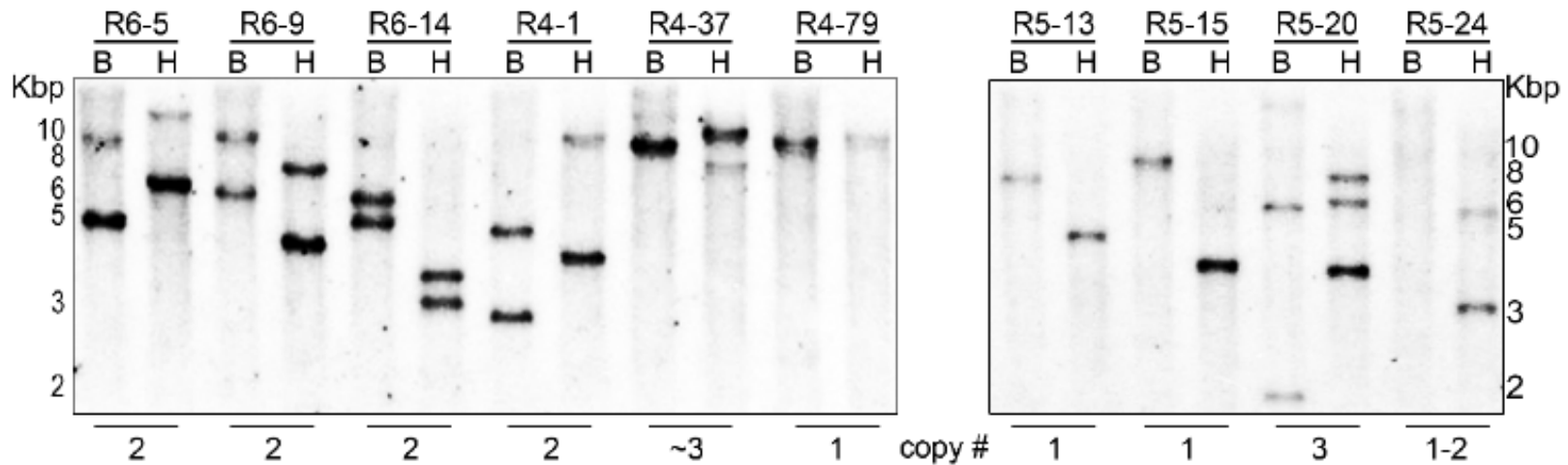
1) Selektce na médiu s antibiotikem –  
kanamycin,

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<sup>R</sup>, Kan<sup>S</sup>**
- 5. Vyhodnocení počtu inzertů Kan<sup>R</sup> : Kan<sup>S</sup>**
- 6. Přesazení rostlin Kan<sup>R</sup>, důkaz PCR**

# Vyhodnocení počtu inzertů

**Rezistence ke kanamycinu je dominantní znak**

- **1 inzert 3 : 1 Kan<sup>R</sup> : Kan<sup>S</sup>**
  - **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 <sub>2</sub> 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	