|  |  |
| --- | --- |
| **Jméno a UČO:** | **Datum:** |

**Identifikace jednotlivých druhů**

**Václavek ze vzorku půdy**

**VYHODNOCENÍ**

1. Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované DNA.
2. Na základě délky amplifikátu a výsledku restrikční analýzy určete, jaký druh václavky obsahoval váš vzorek půdy, a výsledek zdůvodněte.
3. Porovnejte separaci DNA fragmentů pomocí agarozové elektroforézy a HPLC.
4. Na základě sekvencí jednotlivých druhů václavek z NCBI databáze zkuste navrhnout dvojice specifických primerů a TaqMan sondu pro detekci Vámi identifikovaného druhu václavky.

**ÚLOHA A**

**Analýza izoenzymů askorbát peroxidasy (APX) pomocí nativní PAGE a aktivity phenylalanin amoniak-lyasy (PAL)**

**VYHODNOCENÍ**

* Srovnejte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci jednotlivých látek v závislosti na čase.
* Výsledek zdůvodněte.
* Spočítejte aktivitu fenylalanin amoniak-lyasy (PAL) v čase 24h po aplikaci neznámého vzorku v kat na g rostlinného pletiva.
* Výsledky vyneste do grafu, kde budou srovnány změny aktivity PAL po aplikaci vašeho neznámého vzorku s kontrolou (voda).
* Výsledek zdůvodněte.

**ÚLOHA C**

**Klonování PCR produktu do plasmidu**

**VYHODNOCENÍ**

* Uveďte přibližnou délku klonovaného PCR produktu
* Uveďte celkový počet kolonií po transformaci.
* Uveďte kvantitu a čistotu vyizolované plasmidové DNA.
* Uveďte vypočítané hodnoty koncentrací plasmidové DNA pro jednotlivý počet kopií/µl.

**Úloha D**

**Identifikace neznámého elicitinu na základě jeho aktivity**

**VYHODNOCENÍ**

* Na základě výsledku RealTime PCR vypočítejte metodami absolutní nebo relativní kvantifikace za použití ΔΔCt metody, zdali dochází po přidání neznámého vzorku ve sledovaném časovém intervalu (24h) ke zvýšení transkriptů vybraných genů a o jak velké zvýšení se jedná.
* Z pořízených fotek vypočítejte dle vztahu z kapitoly „Vyhodnocení nekrózy“ míru nekrózy po přímé infiltraci a taktéž po infiltraci skrze petiolu.
* Na základě výsledků z RT-PCR a nekrotického působení určete, jaký efektor byl ve vašem neznámém vzorku. Pro vyhodnocení použijte tabulku:

Tabulka 1: Schéma odpovědi rostlin tabáku na jednotlivé testované molekuly.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Typ molekuly | Nekróza | RT-qPCR |
|  |  | Přímá infiltrace | Nasátí petiolou | PR5 | ntPRP27 |
| Cryptogein | -elicitin | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Infestin | -elicitin | +++ | -/+ | +++ | +++ |
| K. salicylová | Fytohormon | -/+ | -/+ | +++ | + |
| Voda | Kontrola | - | - | - | - |

**Nekróza:**

**RT-PCR:**

**Relativní kvantifikace:**

**Absolutní kvantifikace:**

**Výsledky:**

Náš neznámý vzorek indukoval .......krát zvýšenou/sníženou/nezměněnou expresi PR5

 .......krát zvýšenou/sníženou/nezměněnou expresi PI-1

Náš neznámý vzorek způsoboval ……..% nekrózu na listech tabáku po přímé infiltraci

 .…….% nekrózu na listech tabáku po nasátí petiolou

**Dle výsledků výše byl v našem neznámém vzorku …………………………….. .**

Odůvodněte:

**Úloha E**

**Analýza polymorfismu pro ADH a stanovení její aktivity v séru**

**VYHODNOCENÍ**

* Vypočtěte specifickou aktivitu ADH (Ɛ440 NDMA = 34·103 M-1.cm-1) v kat/ml séra

**Úloha F**

**Analýza Leidenské mutace**

**VYHODNOCENÍ**

* Na základě výsledku restrikční analýzy určete, jaký genotyp genu pro FV obsahoval váš vzorek krve a jestli jste nositeli Leidenské mutace.