

CG020 Genomika

Přednáška 2 – dokončení

Identifikace genů

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

(dokončení přednášky 02)

- **Postupy „přímé“ a reverzní genetiky**
 - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- **Identifikace genů *ab initio***
 - struktura genů a jejich vyhledávání
 - genomová kolinearita a genová homologie
- **Experimentální identifikace genů**
 - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
 - EST knihovny
 - přímá a reverzní genetiky



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace sekvenčně-specifického mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**

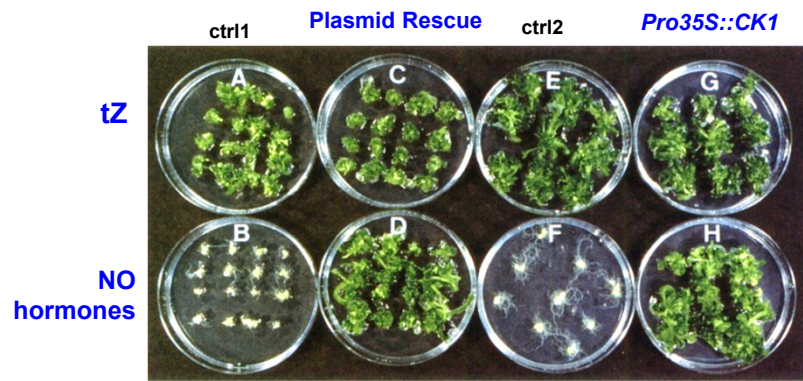


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace *CK1* aktivační mutagenézí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



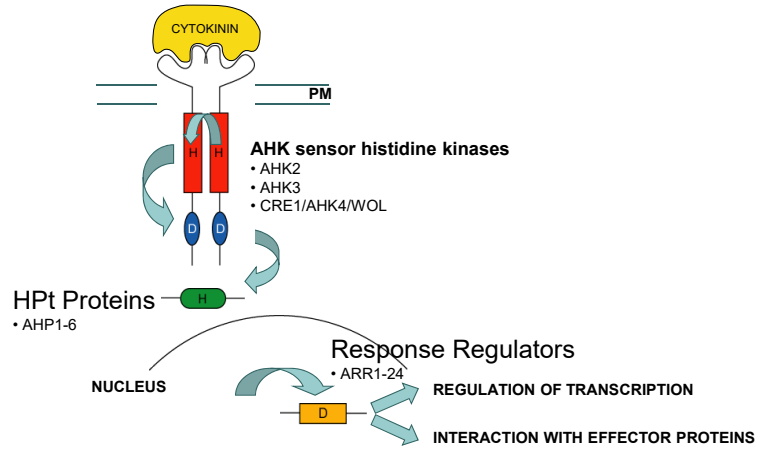
Kakimoto, *Science*, 1996



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Signal Transduction via MSP

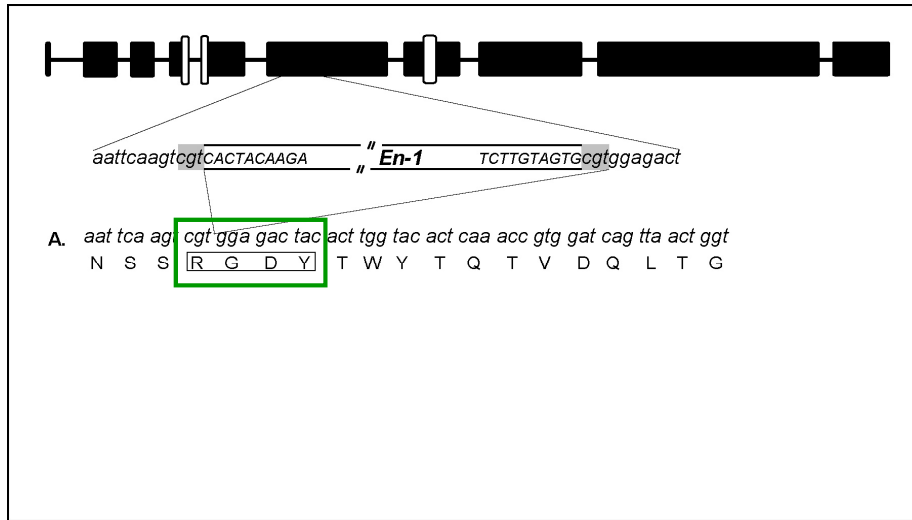




Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**

Identification of insertional *cki1* mutant allele



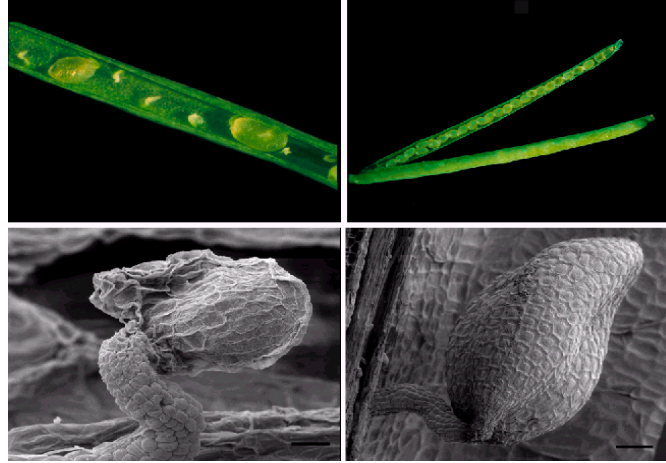
Hormonal regulations of plant development



CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/cki1-i

CKI1/CKI1



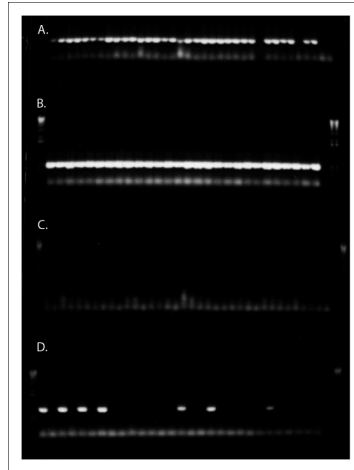
Hejätko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

Hormonal regulations of plant development



CKI1 and Megagametogenesis

- *cki1-i* is not transmitted through the female gametophyte



A. ♂ wt x ♀ *CKI1/cki1-i*



CKI1 specific primers (PCR positive control)

B. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

C. ♂ wt x ♀ *CKI1/cki1-i*

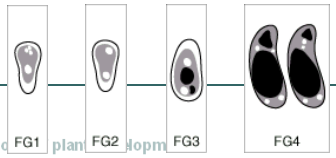
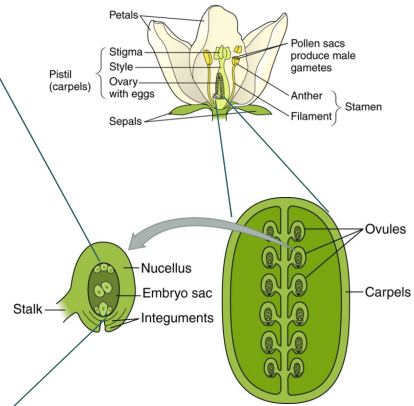
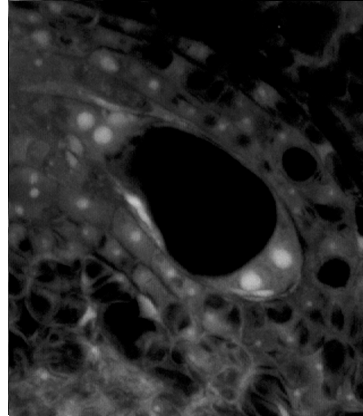


cki1-i specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

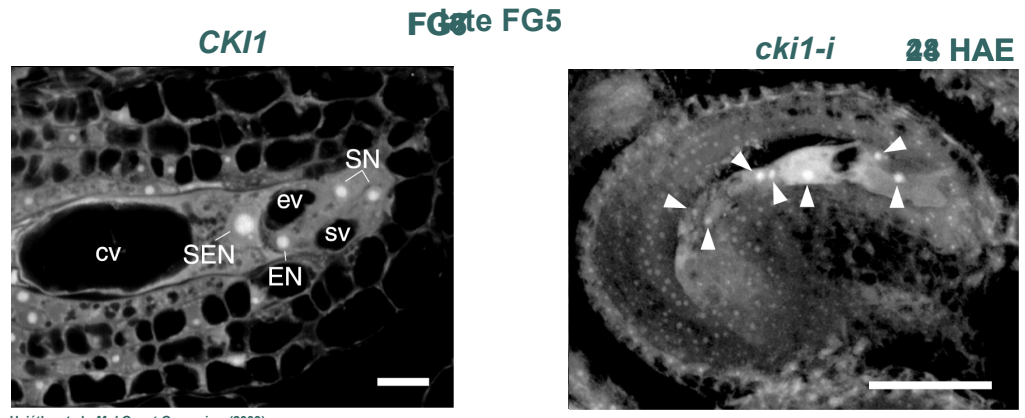
FG 1



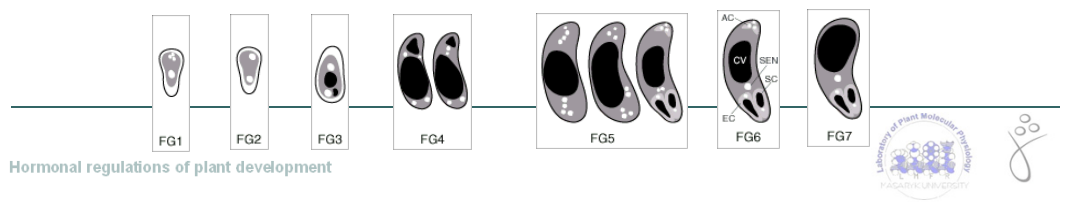
Hormonal regulation



CKI1 and Megagametogenesis



Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

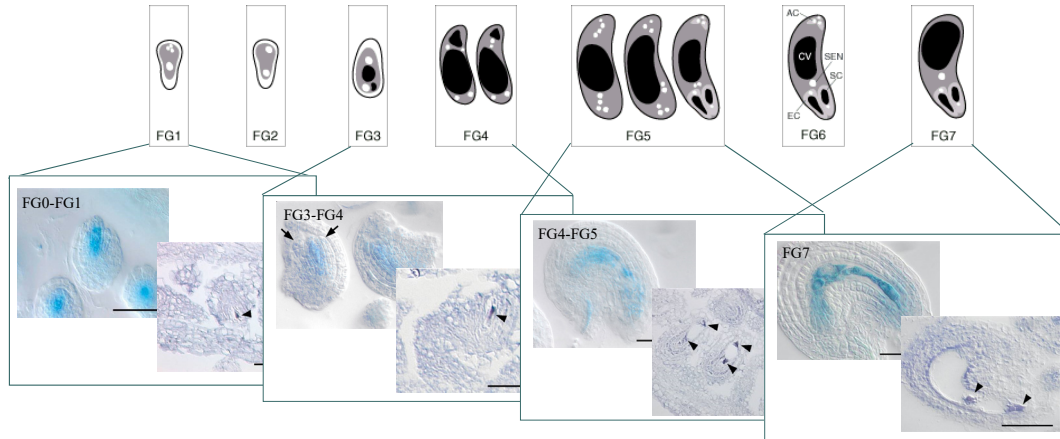




Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity

CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



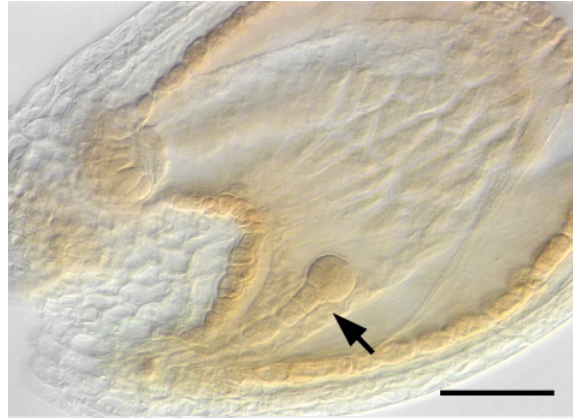
Hormonal regulations of plant development



Paternal *CKI1* is Expressed in the *Arabidopsis* Sporophyte Early after Fertilization

♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)



Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

Hormonal regulations of plant development





CG020 Genomika

Přednáška 3

Reverzní genetika

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



Hormonal regulations of plant development



Genomika 03

▪ Zdrojová literatura

- **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey
<http://www.bioinfbook.org/index.php>
- **Plant Functional Genomics**, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Mello, C.C. and Conte Jr., D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **431**, 338-342.
- Klinakis et al.. (2000) Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO Rep*, **1**, 416.
- Hansen et al.. (2003) A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *PNAS*, **100**, 9918.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Přístupy „klasické“ genetiky versus „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU
2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ
3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

EMS



$h \times n$

T-DNA

„Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM



(retro)transposons



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- **Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů**
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- **Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací**
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenu



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Typy inzerčních mutagenů

- Mobilní elementy

- **Autonomní transpozony (*En-1*)**

- obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
 - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány

- Stabilní elementy

- **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**

- mutant *En/Spm* transpozonu, který mutací v genu pro transponázu ztratil autonomii
 - může být aktivován křížením s linií nesoucí *En/Spm* transpozon

- **T-DNA**

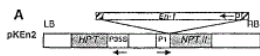
- zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

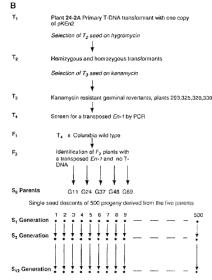
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Knihovny inzerčních mutantů (u rostlin)

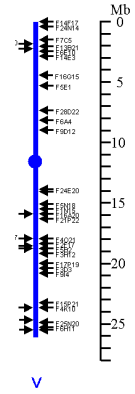
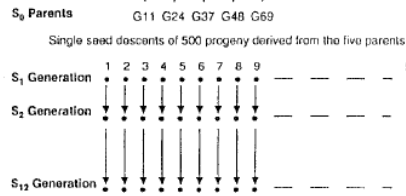
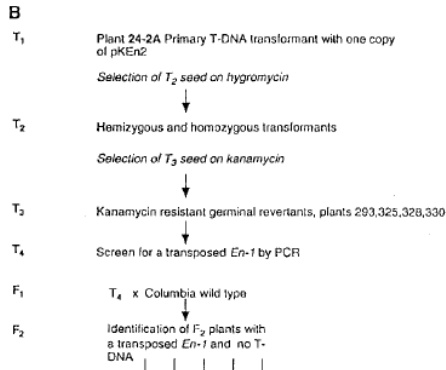


příprava transgenních rostlin

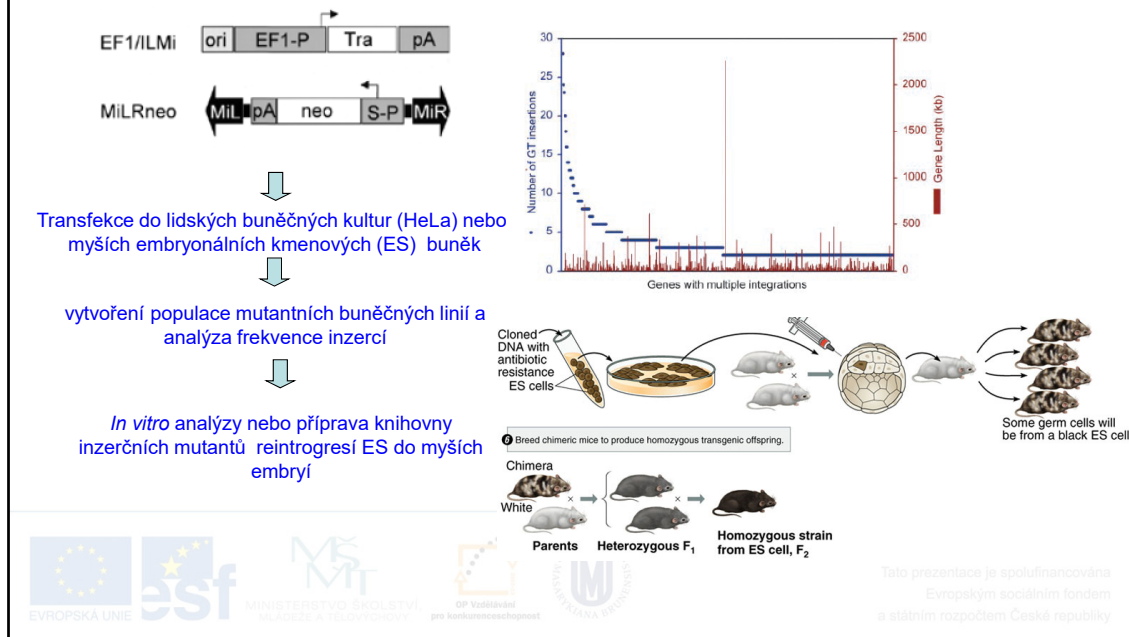
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



Technologii inzerční mutagenese lze využít i u živočichů. Zda se využívají např. transpozony odvozené z *Drosophily* (transpozon Minos, viz schéma vlevo nahoře (Klinakis et al., 2000)). V tomto případě bylo nutno provést kotransfekci s tzv. helper plasmíem, kódujícím transponázu (neautonomní transpozon). Neo kóduje rezistenci k neomycinu, šipky ukazují směr transkripce řízený příslušnými promotory, pA je polyadenylační signál, ori je počátek replikace viru SV40, S-P je promotor téhož viru. Pro identifikaci insercí „in frame“ se zasaženými geny lze využít transpozony, obsahující fúzi akceptorových míst sestřihu s ORF reportérového genu, např. lacZ-neo (bez AUG kodonu). Tento přístup umožňuje identifikovat inserce do aktivních genů prostřednictvím selekce inzerčních mutantů na rezistenci k neomycinu, resp. vykazující β -galaktozidázovou aktivitu (Klinakis et al., 2000).

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

- autonomní *En/Spm*, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledávání pomocí PCR



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

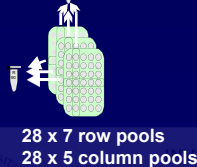
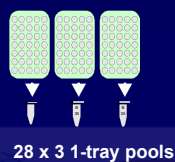
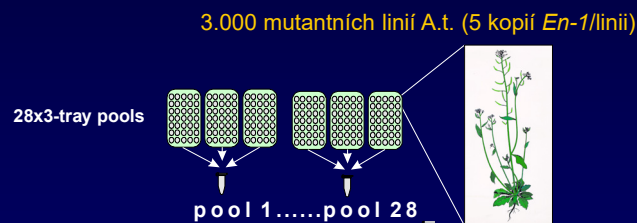


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)



STICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou



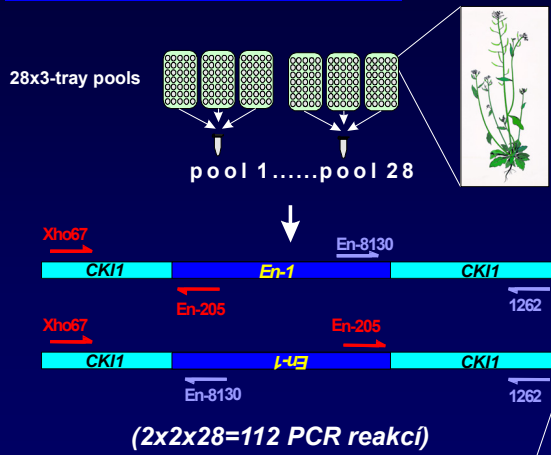
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)



Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou
 - identifikace pozitivní linie pomocí Identifikace pozitivního „tácu“, řady a sloupce



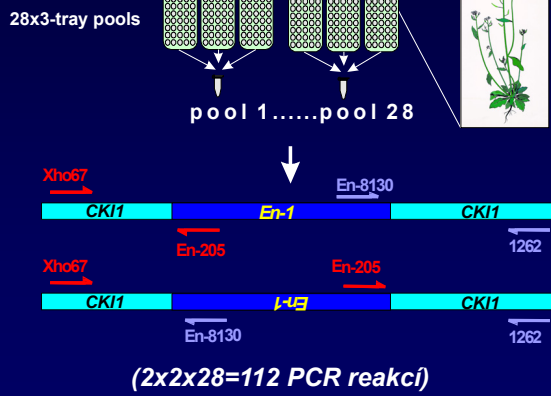
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

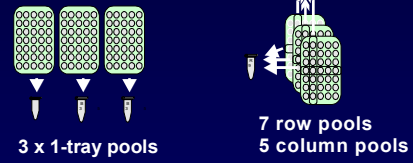
Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)



2. Identifikace linie nesoucí inzerci



(dalších 5+7+3=15 PCR reakcí)

Celkem 112+15=127 PCR reakcí

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - hybridizace s produkty iPCR na filtrech



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Inzerční knihovna dSpm mutantů

- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines),
John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA a semena v Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 linií
- průměrně 1.2 izerce na linii
- neautonomní transposon
- PCR vyhledávání nebo hybridizace s iPCR filtry
- SINS (sequenced insertion sites) databáze

<http://nasc.nott.ac.uk>



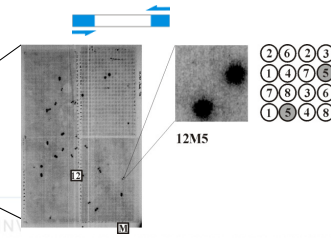
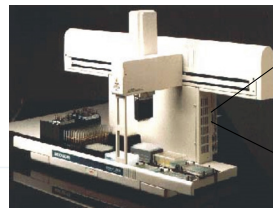
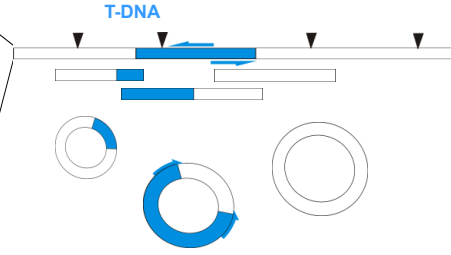
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

- izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace
- štěpení restriční endonukleázou
- ligace, vznik cirkulární DNA
- inverzní PCR (iPCR) pomocí T-DNA specifických primerů
- příprava nylonových filtrů s produkty iPCR v přesně daném vzorci (poloze) pomocí robota
- hybridizace s genově specifickou sondou



Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích



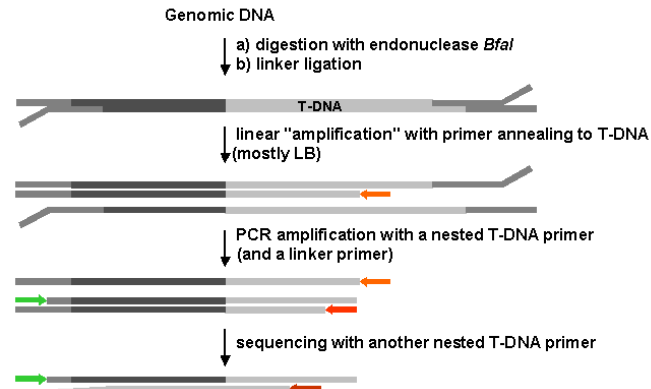
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Příprava knihoven z populace *A. thaliana* mutované pomocí T-DNA

Sequencing of flanking sequence fragments



GABI-Kat (MPIZ, Köln)

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



EVROPSKÝ VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována
evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

```
>Insert_SALK:029311: Order line 029311 | View in AGE
Length = 460

Score = 484 bits (244), Expect = e-135
Identities = 250/252 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagocggttttatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 400

Query: 1510 acaaggatacaacaatagagacagtcacatgtatatacacaataggatggtctcctcaatg 1569
      |||
Sbjct: 399 acaaggatacaacaatagagacagtcacatgtatatacacaataggatggtctcctcaatg 340

Query: 1570 tgtgctttagggacatttggatgtcacaacattttccacatggtacactcatag 1629
      |||
Sbjct: 339 tgtgctttagggacatttggatgtcacaacattttccacatggtacactcatag 280





Query: 1630 attagcccacttaggaggtctctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaat 1689
      |||
Sbjct: 279 attagcccacttaggaggtctctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
      |||
Sbjct: 219 atgattccaaac 208

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (91%)
Strand = Plus / Plus

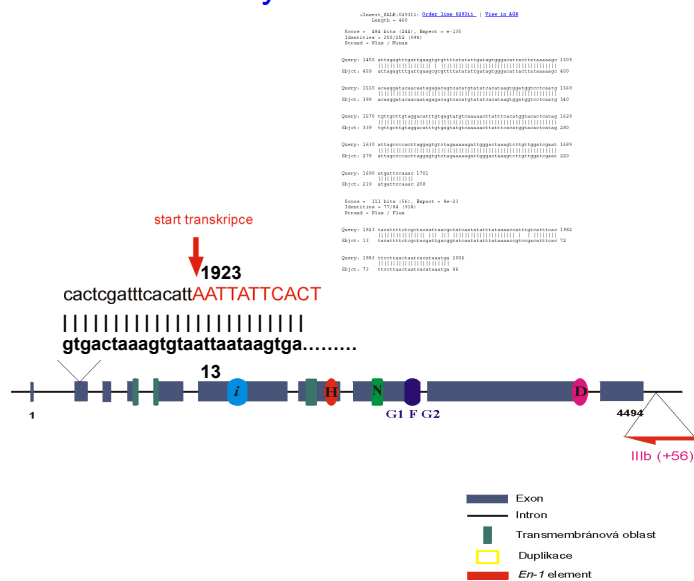
Query: 1923 tacattttctogtacaattaacgatatcaatatatttataaaacatttggcatttccac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogtacaattaacgatatcaatatatttataaaacatttggcatttccac 72

Query: 1983 ttccttaactaactacataaatga 2006
      |||
Sbjct: 73 ttccttaactaactacataaatga 96
```

EVROPSKÁ UNIE  **est** [ALUK INSCH INRGE](#) view details in romanian on insert sequences in ALUK  **MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY**  **OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost**  **SLOVAKIA BRUNES**

.NI
ána
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

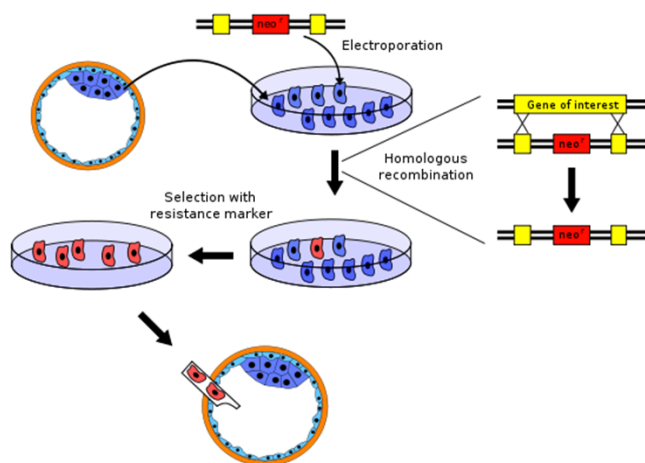
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Knocking-Out the Gene

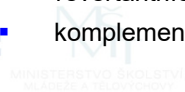


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- **Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů**
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- **Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací**
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

- přítomnost **více inzercí** v jedné linii
- možnost vzniku **nezávislé bodové mutace**
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány **chromozomové aberace** a **přestavby** (duplikace, inverze, delece)



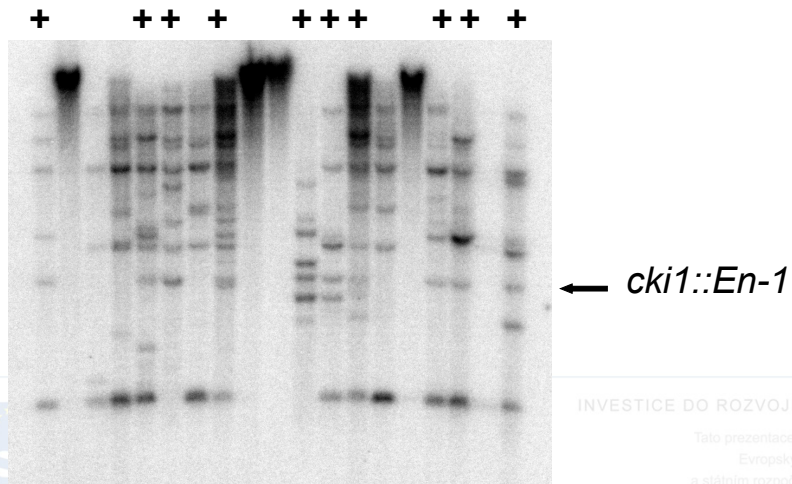
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- Kosegregační analýza

- kosegregace specifického fragmentu např. po inzerci T-DNA (nebo působení EMS atd.) do genomu s pozorovaným fenotypem



Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů



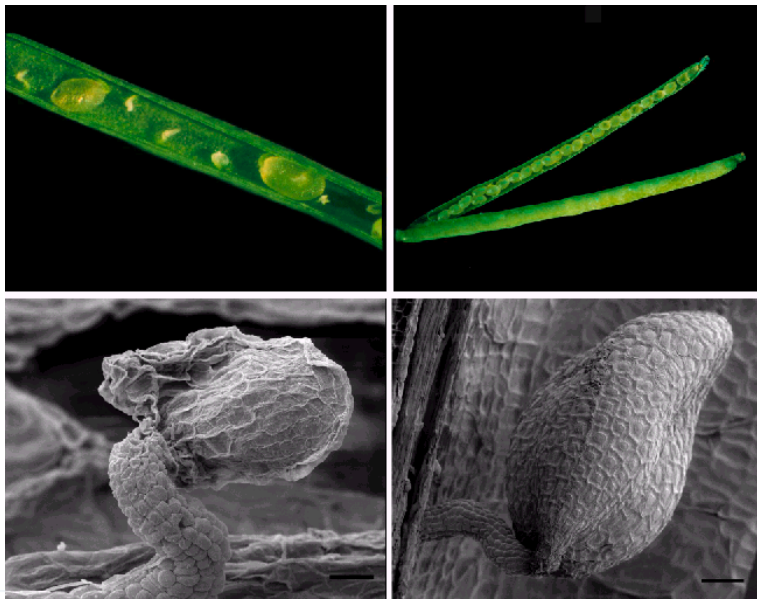
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Fenotyp šesulí *cki1::En-1/CK11*

cki1::En-1/CK11

CK11/CK11



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

1. Izolace revertantních linií

- PCR vyhledávání ve **246** rostlinách segregující populace
- z **90** *cki1::En-1* pozitivních **9** rostlin mělo kromě šesulí mutantních i šesule standardního typu



Analýza potomstva

- potvrzení absence inzerce pomocí PCR
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTcgtggagact

A. aat tca agt **cg**t **gga gac tac** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

B. aat tca agt **gg**t **acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

C. aat tca agt cgt **ac**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa
 N S S R T E T T L G T L K P W I S .

D. aat tca agt cgc **gt**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa
 N S S R V E T T L G T L K P W I S .



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
 Evropským sociálním fondem
 a státním rozpočtem České republiky

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

- analýza fenotypu segregující populace (*CKI1/CKI1 CKI1/cki1::En-1*)
- PCR analýza rostlin s mutantním fenotypem-identifikace rostlin bez inzerce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

`aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTGTAGTcgtggagact`

A. `aat tca agt cgt gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt`
`N S S R G D Y T W Y T Q T V D Q L T G`

B. `aat tca agt ggt acg act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt`
`N S S G T T W Y T Q T V D Q L T G`

C. `aat tca agt cgt acg gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa`
`N S S R T E T T L G T L K P W I S .`

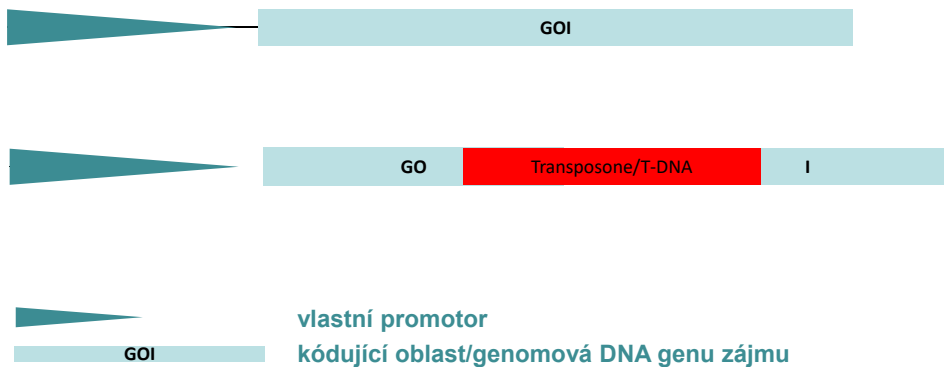
D. `aat tca agt cgc gtg gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa`
`N S S R V E T T L G T L K P W I S .`



INVESTICE DO ROZVOJE VZDELÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Komplementace mutantní linie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Komplementace mutantní linie



WT(Col-0)

cop1-4

*p35S::
AtCOP1
1-5*

*p35S::
OsCOP1
16-10*

*p35S::
PpCOP1
9-8*

cop1-4

Ranjan et al., 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Klíčové koncepty

- Jak reverzní genetika zkoumá gen a jeho funkci?
 - Cílené umlčení genu
 - Vyhledání v knihovnách inzerčních mutantů
 - Homologní rekombinace
 - Analýza fenotypu
 - Potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenu



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky