

Növényi transzformáció és a transzgénikus növények

Előadók:

Tamás László Ph.D.

Pólya Sára

Tóth Gábor

A tantárgy tematikája:

1. A Polimeráz láncreakció (PCR) módszer alapjai. A DNS szerkezete és a DNS replikáció. A reakcióelegy komponensei, a reakció ciklusba szervezése, s a ciklus egyes lépéseinek részletes ismertetése. Az amplifikáció mennyiségi viszonyai, korlátai, a keletkezett termék mennyiségi kimutathatóságának határai.

Növényi DNS és RNS tisztítás módszereinek ismertetése, az egyes módszerek összehasonlítása előnyökkel és hátrányokkal. Élelmiszerekből és különböző feldolgozottságú növényi termékekből történő DNS kinyerés lehetőségei és korlátai.

A PCR reakció specificitása, a mutáció keletkezés okai. Primer tervezés szempontjai, az olvadáspont meghatározása különböző algoritmusok szerint. PCR inhibitorok, DNS szennyezés.

2., A Hot start technika és a különböző kivitelezési megoldások ismertetése előnyökkel és hátrányokkal.

Az RT-PCR módszer ismertetése. A reverz transzkripció folyamata és az alkalmazott reverz transzkriptáz enzimek jellemzése. RT-PCR stratégiák, s módszer kritikus pontjainak ismertetése. Az RT-PCR primerek tervezése.

3., PCR termékek detektálása különböző módjainak (gélelektroforézis (agaróz és kapilláris), hibridizáció, PCR-ELISA, real-time).

A kvantitatív PCR alapjai. PCR kinetika és a keletkezett termék mennyiségének összefüggései. Az egyes módszerek (hagyományos end-point, kompetitív és real-time PCR) részletes ismertetése. Az előnyök, hátrányok, valamint a kritikus pontok vizsgálata.

A PCR felhasználása a DNS fragment mennyiségének mérésére (real-time PCR)

4., A real-time PCR módszernél alkalmazott detektálási lehetőségek részletes ismertetése.

Primer és próba tervezés a real-time PCR-hez. A real-time PCR előnyei simplex, és multiplex reakcióban, a kritikus pontok ismertetése.

Kvantitatív real-time PCR alapjai és alkalmazása. A PCR hatékonyság tanulmányozása, a különböző függvények illesztése. Abszolút és relatív mennyiség meghatározása.

5., A PCR felhasználása preparatív célokra

DNS szekvenciák amplifikációja

„Hagyományos”, vagy standard PCR alkalmazása DNS szekvenciák jelenlétének, vagy hiányának kimutatására. Alkalmazási lehetőségek. Mutáns és vad típusú gének kimutatásának és megkülönböztetésének lehetőségei PCR módszerrel.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) kimutatás és detektálás, valamint a módszer alkalmazásának szempontjai. Mutáns és vad allélek kimutatása.

Allél specifikus PCR.

6., A Nested PCR előnyei és alkalmazásának körülményei, kritikus pontjai. Primer tervezés szabályai. A láncreakció hatékonysága és az oligonukleotid olvadási pontjának összefüggései, tervezése A Multiplex PCR lehetőségei, alkalmazása: Microsatellite analízis, Allél analízis, GM növények genotipizálása.

Rapid kompetitív PCR részletes ismertetése előnyökkel és hátrányokkal. Belső standard gének használatának lehetőségei és a terméketektálás hatékonyságának javítása. Touch down PCR reakció körülményeinek beállítása és a módszer alkalmazása.

7., A PCR felhasználása preparatív célokra

DNS szekvenciák izolálása

LA-PCR (Long Accurate) felhasználása nagy méretű gének szekvencia darabok felszaporítására, klónozásra. Kereskedelmi forgalomban kapható enzimek ismertetése, alkalmazásuk előnyei és hátrányai. Aszimmetrikus PCR alkalmazásának lehetőségei és a reakció körülmények tervezésének szempontjai.

Az inverz PCR felhasználása ismeretlen szekvenciájú szakaszok klónozásában és megismerésében.

8., A degenerált PCR előnyei ismert aminosav szekvenciával rendelkező fehérjék génjeinek klónozásában. Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL-PCR) alapjai és alkalmazása. Primertervezés és program szervezés a sikeres amplifikáláshoz.

A PCR felhasználása mutációs célokra

Hely specifikus mutáció

Ragados végek hozzáadása ismert szekvenciájú DNS fragmentekhez klónozás céljából. A primer tervezés szempontjai, a PCR program ciklusszervezésének kérdései.

9., Hely specifikus mutáció (aminósav csere a fehérjében, nukleinsav deléció, inszerció) módszereinek ismertetése. Primer tervezés szempontjai.

A megaprimer módszer részletes ismertetése. mRNS-ből kiindulva, nem klónozott géneken cDNS templáton.

10., DNS fragmentek pontos fúziója PCR technikával, megaprimer módszerrel, mind klónozott, mind nem klónozott DNS fragmentek felhasználásával.

Gene shuffling

Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling (DOGS) módszer ismertetése, primer tervezés szempontjai és a ciklus szervezés kérdései.

11., Random mutagenézis módszereinek ismertetése.

A PCR felhasználása markerezési célokra

Az irodalomban ismert főbb markerezési technikák (RAPD, DAF, AP-PCR) elméleti és gyakorlati alapjainak ismertetése, a primer tervezéstől az előnyök és a hátrányok ismertetéséig.

12., Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) módszer ismertetése, s alkalmazása markerezésre alkalmas DNS szekvenciák keresésében.

Mikroszatellit PCR módszereinek ismertetése a növényi marker fejlesztésben genotípusok azonosításában.

14., Transzgenikus növények kimutatása különböző PCR technikákkal. A GM szennyezés kimutatása minőségi és mennyiségi szinten élelmiszerekben.