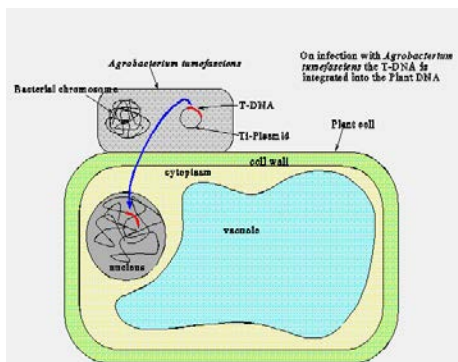


ΑΣΚΗΣΗ 3



Παροδικός μετασχηματισμός φυτών *Nicotiana tabacum* με τη μέθοδο της ένεσης. Έλεγχος του παροδικού μετασχηματισμού με έκθεση των φύλλων σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Μεθοδολογία:

- 1) Δίνεται καλλιέργεια *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101::35S::GFP) (**μπουκαλάκι no.7**). Φυγοκεντρήστε 8 ml της καλλιέργειας στα 4000 rpm για 10 λεπτά.
- 2) Πετάξτε το υπερκείμενο και επαναιωρήστε τα κύτταρα σε 4-8ml IM (B).
- 3) Φωτομετρήστε και αραιώστε την καλλιέργεια με IM (B) σε OD₆₀₀: 0.1-0.5.
- 4) Προσθέστε στην καλλιέργεια μία σταγόνα AS (**eppendorf no. 8**) και ανακινείστε.
- 5) Αφήστε την καλλιέργεια σε RT για >30 (60-90) λεπτά.
- 6) Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα των 2ml ενέστε από ένα σημείο του κάτω μέρους ενός φύλλου 1-2 ml θρεπτικού IM (B) στο μισό φύλλο. Ενέστε στο άλλο μισό του φύλλου την καλλιέργεια GV3101::35S::GFP.
- 7) Παρατηρήστε μετά την πάροδο 48 ωρών την έκφραση του γονιδίου GFP κάτω από λάμπα UV στο μισό φύλλο που είχε ενεθεί με την καλλιέργεια. Το άλλο μισό που είχε ενεθεί με το θρεπτικό IM δεν φθορίζει.