**Transformacja przejściowa *Nicotiana tabacum* w systemie *Agrobacterium,* metodą agroinfiltracji**

Materiał: liście/małe rośliny *N. tabacum* lub *N. benthamiana*.

 Zawiesina *Agrobacterium tumefaciens* transformowanej plazmidem zawierający gen kodujący GFP.

UWAGA!!!!!! PRACA Z GMO!!! WYMAGA SZCZEGÓLNYCH ŚRODKÓW OSTROŻNOŚCI!!!!!

Pracę z materiałem roślinnym i bakteryjnym modyfikowanym genetycznie można rozpocząć jedynie po odbyciu szkolenia prowadzonego uprawnioną do tego osobę (przez prowadzącego zajęcia).

Wszystkie odpady, jakie miały kontakt z organizmami GMO należy odłożyć do specjalnych pojemników w celu dalszej utylizacji (rękawiczki, ręczniki papierowe, strzykawki, probówki, materiał roślinny, zawiesina bakterii) natomiast pozostały sprzęt poddać sterylizacji alkoholem etylowym (narzędzia metalowe, szkło laboratoryjne, powierzchnie robocze).

Przenoszenie organizmów GMO miedzy laboratoriami przeznaczonymi do pracy z GMO możliwe jest tylko zamkniętych, oznakowanych pojemnikach, pod nadzorem osoby prowadzącej zajęcia.

**Wykonanie:**

Z dobrze uwodnionej, eksponowanej przez co najmniej 2 h na światło (bardzo ważne! – aparaty szparkowe roślin muszą być otwarte) rośliny pobrać liść z możliwie długim, nie uszkodzonym ogonkiem liściowym.

Liść umieścić w probówce typu eppendorf (najlepiej z oderwanym wieczkiem) napełnionej wodą destylowaną, następnie wylot probówki wraz z liściem uszczelnić parafilmem przez kilkukrotne owinięcie probówki.

Układ zważyć z dokładnością do co najmniej 0.01g .

Na szalce petriego umieścić kilka ręczników papierowych. Procedurę infiltracji wykonywać nad tak przygotowaną szalką.

Agroinfiltracja:

Do strzykawki pobrać około 5 ml wody/zawiesiny bakterii. Wylot strzykawki przyłożyć do spodniej strony liści i delikatnie podtrzymując tkankę liścia z drugiej strony wtłaczać wodę/zawiesinę bakterii do przestrzeni międzykomórkowych mezofilu liścia. Infiltrowana tkanka staje się wyraźnie ciemniejsza. Należy zachować szczególną ostrożność aby nie uszkodzić liścia lub nie rozpryskiwać zawiesiny.

 Infiltracji powinno być poddane około ¾ do 4/5 obszaru liścia.

Poddane infiltracji liście osuszyć delikatnie papierowym ręcznikiem i ponownie zważyć. Obliczyć ilość /objętość zawiesiny bakterii wprowadzonej do tkanki liścia.

Infiltrowane liście umieścić w warunkach analogicznych w jakich hodowane były rośliny, w inkubatorze, zapewniającym wysoką wilgotność powietrza. Obserwacji/ analizy ekspresji białka GFP dokonać bezpośrednio po infiltracji oraz w kolejnych dniach (po 24, 48 oraz 72 h) .

Obserwację przeprowadzić w ciemni, umieszczając liść na płycie transiluminatora i obserwując liść w świetle UV.