

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

OPTIMALIZACE EXTRAKCE DNA Z ROSTLINNÉHO
MATERIÁLU PRO NÁSLEDNÉ PCR METODY

Optimization of DNA extraction from plant material for
subsequent PCR analyses

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Veronika Kučabová (Machalová)

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 122 b/08 stud
(botanika) KATA*

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT č. 0021620828, grantového projektu GAČR č. 206/06/0598 a GAAV č. B6407401.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Tomáše Féra a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. září 2008.



Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Tomášovi Férovi za jeho odborné vedení, mnoho dobrých rad a nápadů v průběhu mé bakalářské práce, které vedly k jejímu zdárnému dokončení.

Dále bych ráda poděkovala své kolegyni Mgr. Evě Rejzkové za povzbuzující slova v nejtěžších chvílích, za pomoc a příjemnou společnost v DNA laboratoři. Děkuji také celému kolektivu Katedry botaniky za přátelskou atmosféru a podporu při studiu.

A konečně největší dík patří mému manželovi a mé rodině za jejich lásku, podporu a trpělivost.

Obsah:

Seznam zkratk a symbolů:	6
1. Úvod	8
2. Cíle práce	9
3. Přehled a rozbor literatury	10
3.1 Charakteristika rodu <i>Curcuma</i>	10
3.2 Charakteristika rodu <i>Pimpinella</i>	10
3.3 Faktory ovlivňující výběr vhodné metody izolace DNA.....	10
3.4 Izolace DNA z rostlinného materiálu	11
3.4.1 Lyze buněk rostlinné tkáně	11
3.4.2 Izolace DNA metodou CTAB	11
3.4.3 Modifikace protokolu izolace DNA metodou CTAB.....	13
3.4.4 Izolace DNA pomocí kitu.....	14
3.4.5 Purifikace DNA pomocí kitu	14
3.2.6 Kontrola koncentrace a čistoty DNA.....	15
3.5 Molekulární analýza AFLP.....	16
3.5.1 Restrikce	17
3.5.2 Ligace	17
3.5.3 Preamplifikace	18
3.5.4 Selektivní amplifikace	18
3.5.5 Separace a analýza produktů AFLP.....	19
4. Experimentální část	20
4.1 Seznam použitých chemikálií	20
4.2 Příprava pufrů	20
4.3 Seznam použitých přístrojů a softwarů.....	21
4.4 Příprava vzorků.....	21
4.5 Izolace a purifikace DNA	22
4.5.1 Postup pro izolaci DNA modifikovanou metodou CTAB.....	22
4.5.2 Postup pro izolaci DNA pomocí kitu.....	22
4.5.3 Postup pro purifikaci DNA pomocí kitu.....	22
4.6 Kontrola a příprava DNA pro analýzu AFLP.....	23
4.7 AFLP analýza	23

5. Výsledky a diskuse	24
5.1 Spektrofotometrická kontrola koncentrace a čistoty DNA.....	24
5.2 Elektroforetická kontrola čistoty DNA.....	25
5.3 Otestování použitelnosti získané DNA pro analýzu AFLP	27
6. Závěr	29
7. Soupis bibliografických citací	30

Seznam zkratk a symbolů:

A	absorbance
AFLP	amplified fragment length polymorphism (délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)
ATP.....	adenosintrifosfát, makroergická sloučenina
BSA	bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)
CTAB.....	cetyltrimethylamonium bromid
dd H ₂ O	redestilovaná voda
DIECA	diethyldithiokarbomová kyselina
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
DNTP.....	deoxynukleotidtrifosfáty
<i>Eco R I</i>	endonukleáza, enzym katalyzující hydrolytické štěpení fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách, izolovaný z bakterie <i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	ethylen diamintetra-acetát
g	gram
l	litr
μl.....	mikrolitr (10 ⁻⁶ l)
mm.....	milimetr (10 ⁻³ m)
mol.....	jednotka látkového množství
<i>Mse I</i>	endonukleáza, enzym katalyzující hydrolytické štěpení fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách, izolovaný z bakterie <i>Micrococcus</i>
NaOAc.....	acetát sodný
ng	nanogram (10 ⁻⁹ g)
nm	nanometr (10 ⁻⁹ m)
nmol.....	nanomol (10 ⁻⁹ mol)
PA mix.....	preamplifikační mix
PCR.....	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pmol.....	pikomol (10 ⁻¹² mol)
PVP	polyvinylpyrrolidon
RNA.....	ribonukleová kyselina
<i>RNáza</i>	enzym katalyzující hydrolýzu RNA, izolovaný z pankreatu
rpm.....	(revolutions per minute) otáčky za minutu
SDS.....	sodium dodecyl sulfát

T4 ligaseenzym katalyzující tvorbu vazby mezi fosfátem a hydroxylem,
izolovaný z bakterie *Escherichia coli*

TAE pufr..... Tris acetát EDTA pufr

Taq polymeráza ...enzym katalyzující syntézu DNA z volných nukleotidů, izolovaný
z bakterie *Thermophilus aquaticus*

TE pufr..... Tris EDTA pufr

Ujednotka aktivity enzymu ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} = 16,6 \text{ nkat}$), množství
přeměněného substrátu za jednotku času

UV záření..... ultrafialové záření

V volt

w%hmotnostní procento

w_v%objemové procento

1. Úvod

Od roku 1869, kdy Miescher poprvé izoloval nukleovou kyselinu z bílých krvinek obsažených v hnisu, dosáhla biochemie velkého pokroku. Nukleové kyseliny představují molekuly, které jsou důležitým cílem laboratorní analýzy. Metody DNA a RNA nám dnes umožňují detekovat několik málo molekul sledované látky. Pomocí PCR jsme schopni z několika málo kopií jedné molekuly získat milion a více násobek. Je tak možné studovat sekvence DNA živočišného, bakteriálního či rostlinného genomu.¹ Tyto metody mají široké spektrum využití, a to jak v medicíně, tak i v rostlinné výrobě či botanice.

V poslední době nabylo na významu zkoumání rostlin na úrovni DNA. Lze takto získat informace o příbuznosti a jiných vztazích, které slouží k sestavení genového rodokmenu a určení prostorových map, nebo např. k výběru nejlepších linií pro šlechtění.²

Základem úspěšného provedení molekulární analýzy je kvalitní DNA. U rostlinné tkáně musíme brát v potaz obsah sekundárních metabolitů, jako jsou polyfenoly, organické kyseliny, polysacharidy, latex či jiné. Při izolaci DNA nemusí být tyto látky dokonale odstraněny. Jsou koizolovány. Způsobují poškození DNA a inhibice enzymatických reakcí. Obsah sekundárních metabolitů závisí na druhu rostlinné tkáně. Problém získat kvalitní a čistou DNA z důvodu vysokého obsahu těchto látek je zejména u exotických druhů rostlin.³

Kromě sekundárních metabolitů má vliv na kvalitu DNA stáří rostlinného materiálu. Ve většině případů je k dispozici pouze sušený či herbářový materiál, jehož DNA je částečně degradovaná.⁴

Pro velké množství rostlinných druhů s různou biochemickou kompozicí a pro různé stáří materiálu není možné používat pro izolaci DNA jediný protokol. Proto se do stávajícího protokolu zavádějí specifické modifikace.⁵ Takto upravené protokoly umožňují izolaci DNA o dostatečné kvalitě tak, aby byla použitelná pro následnou molekulární analýzu.

2. Cíle práce

Předkládaná bakalářská práce vznikla ve spolupráci s DNA laboratoří Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze s cílem navrhnout a optimalizovat vhodné postupy izolace DNA z rostlinné tkáně rodu *Curcuma* a *Pimpinella* pro následnou analýzu AFLP.

V teoretické části bakalářské práce jsou shrnuty literární údaje, na základě kterých jsou navrženy vhodné postupy pro izolaci DNA z dané tkáně. Následuje experimentální část práce, kde jsou navržené postupy realizovány a použitelnost takto získané DNA pro analýzu AFLP otestována.

3. Přehled a rozbor literatury

3.1 Charakteristika rodu *Curcuma*

Patří do čeledi *Zingiberaceae* (zázvorovité) a má svá přirozená stanoviště v oblasti jihovýchodní Asie. Užitečně významné druhy jsou pěstovány v tropech celého světa. Tato aromatická rostlina, známá jako zlatě zbarvená přísada koření kari, má vysoký obsah polyfenolických látek, polysacharidů, alkaloidů a jiných sekundárních metabolitů.⁶ Využívá se k úpravě pokrmů, k barvení textilu či k výrobě léčiv (curcumin). Má antioxidační, protialergenní a baktericidní účinky.⁷

Molekulární analýza rodu *Curcuma* odhaluje původ a fylogenetické vztahy ekonomicky významných druhů.

3.2 Charakteristika rodu *Pimpinella*

Patří do čeledi *Apiaceae* (miříkovité). Vyskytuje se hojně po celé Evropě, v jižní Asii a Africe. Používá se zejména v léčitelství. Je známá jako koření anýz. Obsahuje silice s aromatickými kumaríny (pimpinellin) a deriváty eugenolu, dále třísloviny, hořčiny, soli vápníku a draslíku, pektin, sliz, saponin a tanin. Působí dezinfekčně, detoxikačně a hojivě.⁷

Molekulární analýza rodu *Pimpinella* umožňuje zjistit intra- a extrapopulační variabilitu, a tím odvodit vnitrodruhové vztahy.

3.3 Faktory ovlivňující výběr vhodné metody izolace DNA

Pro izolaci DNA je k dispozici pestrá škála protokolů. Výběr vhodné metody závisí na mnoha faktorech. V první řadě je to typ výchozího biologického materiálu.

Základem všech izolačních postupů je lyze buněk, ze kterých chceme DNA získat. U běžných buněk (např. z krve, ze slin) stačí obvykle rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem. Pro narušení pevných tkání nebo houbových či rostlinných buněk s buněčnou stěnou musí být použito mechanické síly.³

Dalším rozhodujícím faktorem při výběru metody izolace DNA je to, k čemu budeme DNA dále používat. Následné PCR metody jsou různě náročné na kvalitu a kvantitu DNA. V některých případech stačí i DNA horší kvality a v nízké koncentraci.

V extrémním případě je možné použít jen zlyzované buňky. Většina PCR metod ale vyžaduje DNA o vysoké čistotě. Výchozí biologické materiály obsahují množství látek, které při následném zpracování mohou některé reakce inhibovat. Proto se pro izolaci DNA z různých biologických materiálů používají různě modifikované postupy.⁵ V poslední době se často používají komerčně vyráběné soupravy (kity), které jsou velmi spolehlivé, avšak výrazně dražší než klasické izolační postupy. Dalším faktorem pro výběr vhodné metody izolace DNA jsou tedy finanční možnosti pracoviště.

3.4 Izolace DNA z rostlinného materiálu

3.4.1 Lyze buněk rostlinné tkáně

Rostlinné buňky mají n rozdíl od běžných buněk navíc buněčnou stěnu, která musí být narušena použitím mechanické síly. Nejméně destruktivní metodou je drcení rostlinného materiálu zmrazeného tekutým dusíkem v třecí misce. To je možné pouze v případě, že je k dispozici čerstvý materiál.³

Pozornost vědců je mnohdy soustředěna na významné rody rostlin vyskytující se po celém světě. Vzorky těchto rostlin jsou dopravovány do molekulárně biologických laboratoří až po určité době. Aby se uchovala určitá kvalita vzorků, jsou mezi tím usušeny a skladovány v silikagelu.⁸ Metoda pro narušení buněčné stěny u sušených materiálů spočívá v drcení skleněnými nebo wolframkarbidovými kuličkami v třepacích zařízeních (např třepací mlýn MM200, Retsch). Při tomto způsobu však dochází k degradaci DNA.³

3.4.2 Izolace DNA metodou CTAB

Uvolnění buněčného obsahu do pufru

Po narušení struktury buněčné stěny se buněčný obsah včetně nukleových kyselin uvolní do lyzačního pufru. Tento pufr obsahuje chemikálie, které svými vlastnostmi udržují nukleové kyseliny nepoškozené a zároveň od nich oddělují proteiny či ostatní nežádoucí komponenty. Pro zvýšení účinku izolace se vzorek v pufru inkubuje určitou dobu při 65 °C.³

Obecně používaný lyzační pufr je složen z detergentů, díky nimž dochází k rozpuštění biomembrán a denaturaci proteinů. Detergenty jsou amfipatické molekuly,

kteře mají hydrofilní a hydrofobní oblast. Ve vodných roztocích se agregují do malých shluků a tvoří tzv. micely. Hydrofobní konec se váže na membránový protein a hydrofilní část se snaží převést protein do roztoku v podobě komplexu protein-detergent. Silné iontové detergenty jako je např. sodium dodecyl sulfát (SDS) mohou kromě převádění membránových proteinů do roztoku uvolňovat některé vazby v proteinech, a tak způsobit denaturaci proteinů.⁹ U izolace DNA z rostlin se nejčastěji používá cetyltrimethylamonium bromid (CTAB).^{10, 11}

Kromě detergentu lyzační pufr obsahuje Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl), který udržuje pH pufru na hodnotě 8 – 9, a to není optimální pH pro degradační enzymy nukleových kyselin – nukleázy.¹²

V lyzačním pufru je důležitá koncentrace NaCl > 1 mol l⁻¹, ta způsobuje oddělení nukleových proteinů histonů od DNA a udržuje při precipitaci polysacharidy v roztoku.¹⁹

Poslední důležitou součástí lyzačního pufru je ethylen diamintetra-acetát (EDTA). Ten chelatuje ionty vápníku, které slouží jako kofaktor nukleáz. Ty bez vápníku nepracují, takže se tím zabrání rozštěpání DNA.¹²

Extrakce nukleových kyselin

Metoda extrakce ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí pufru a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs chloroform-isoamylalkohol. Chloroform je organické nepolární rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem lyzátu. Směs se tedy rozdělí na dvě fáze - horní vodnou a dolní chloroformovou. Protřepáváním dochází k mísení fází a k denaturaci proteinů, které se po centrifugaci a po separaci obou fází objeví ve formě bílé sraženiny na fázovém rozhraní. Horní vodná fáze obsahující nukleové kyseliny se odpipetuje do nové zkumavky a extrakce se opakuje tak dlouho, dokud se na rozhraní obou fází objevují vysrážené proteiny.³

Precipitace nukleových kyselin

Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného alkoholu. Pro zvýšení efektu srážení se vzorek s alkoholem inkubuje určitou dobu při -20 °C. Po centrifugaci se na dně zkumavky objeví mléčně zakalený sediment (pelet). Toto zakalení je způsobeno koprecipitovanými solemi, které také zvyšují účinnost srážení. Soli je nutné odstranit a to promytím 70% ethanolem. Někdy se po precipitaci objeví pelet černý nebo jinak zbarvený. To znamená, že došlo ke koprecipitaci nejen solí, ale také jiných nežádoucích chemických látek, které nebyly předchozími kroky

dostatečně odstraněny. Tento problém nastává u rostlin s vysokým obsahem polyfenolů či polysacharidů.³

Převedení nukleových kyselin do roztoku

Dle potřeby je možné převést nukleové kyseliny do roztoku. Pelet se rozpustí v redestilované vodě nebo v eluačním TE pufru. Tento pufr obsahuje Tris-HCl (udržuje pH pufru v požadovaném rozmezí) a EDTA (chelatuje vápenaté ionty). DNA rozpuštěná v TE pufru může být uchována týdnů při teplotě 4 °C, roky při -80 °C.³ Každé rozmrazení a znovuzmrazení poškozuje DNA.

Odstranění RNA

Pokud potřebujeme pracovat pouze s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy. Tento enzym může být přidán již do lyzačního pufru, a RNA je tak odstraněna na počátku izolace. Nebo může být přidán po rozpuštění peletu v TE pufru na konci izolace.³ U řady PCR aplikací však přítomnost RNA není nežádoucí.

3.4.3 Modifikace protokolu izolace DNA metodou CTAB

Odstranění polyfenolických látek

Polyfenoly velmi snadno podléhají oxidačním reakcím. Jejich oxidační produkty způsobují poškození DNA a znemožňují přístupnost některým enzymům.¹³ Škodlivý vliv polyfenolických látek může být neutralizován několika způsoby:

- Přidáním adsorbentů polyfenolických látek, jako je hovězí sérový albumin (BSA) nebo polyvinylpyrrolidon (PVP), do lyzačního pufru.¹⁴
- Přidáním fenoloxidázového inhibitoru diethyldithiokarbomové kyseliny (DIECA) do lyzačního pufru.¹⁵
- Inhibicí samotné oxidační reakce antioxidantem β -merkptoethanolem.¹⁶
- Naředěním polyfenolických látek zvýšením poměru lyzačního pufru k rostlinnému materiálu.³

Odstranění polysacharidů

Polysacharidy rozpustné ve vodě bývají koizolovány spolu s DNA. Ukazatelem této koizolace je, že po převedení DNA do roztoku TE pufru je takto připravená DNA velmi

viskózní. Přítomnost polysacharidů inhibuje aktivitu restričních enzymů a Taq DNA polymerázy.¹³ Nežádoucí polysacharidy mohou být odstraněny několika způsoby:

- Zvýšením koncentrace CTAB v lyzačním pufru dojde k vysrážení určitého množství polysacharidů.¹⁷
- Precipitací DNA alkoholem při pokojové teplotě.¹⁸
- Přidáním 1,25 M NaCl do precipitačního kroku. V roztoku NaCl-ethanol dojde jednak k rozpuštění polysacharidů v roztoku NaCl, a zároveň k vysrážení DNA ethanolem.¹⁹

3.4.4 Izolace DNA pomocí kitu

Kity jsou komerčně vyráběné soupravy pro izolaci DNA (např. DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen, Invisorb Spin Plant Mini Kit od firmy Invitex). Jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku. Poskytují standardizované výsledky a mnohdy řeší problém izolace DNA o vysoké čistotě.³ Manipulace s těmito soupravami je velmi jednoduchá a celý proces izolace trvá poměrně krátkou dobu. Při izolaci kitem nedochází ke styku s toxickými látkami jako je chloroform nebo β -merkaptoethanol. Nevýhodou používání kitů je jejich vysoká cena.

Izolace DNA kitem je založena na adsorpci na silikát. K roztoku obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Protřepáním se usnadní navázání DNA na silikátové částice. Ostatní nežádoucí látky zůstávají v roztoku a lze je pak elegantně odstranit. Součástí soupravy jsou nástavce na mikroskopické skleničky obsahující jemný filtr (kolonky), který silikátové částice s navázanou DNA zachytí. Poté dochází k promývání kolonky promývacími puframi a k odstranění zbytků nečistot. Nakonec se čistá DNA rozpustí v TE pufru.

U některých kitů se na místo silikátu používají speciální pryskyřice. Princip izolace DNA je stejný.

3.4.5 Purifikace DNA pomocí kitu

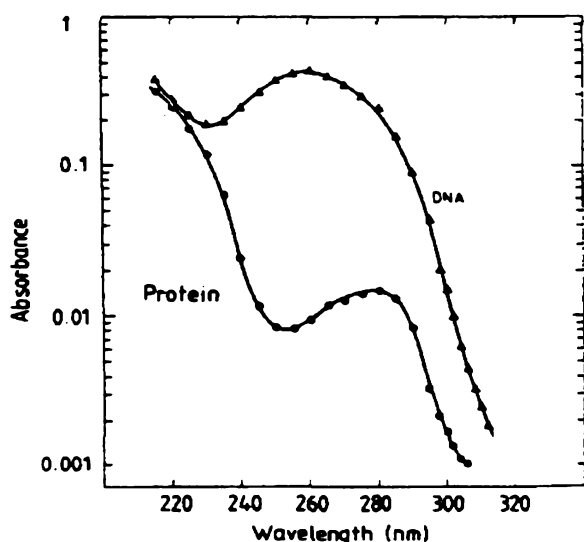
Kromě izolace DNA lze pomocí kitu purifikovat již vyizolovanou DNA.³ K tomuto účelu jsou na trhu k dispozici speciálně upravené kity (např. JETquick General DNA Clean-Up Kit od firmy Genomed). Princip purifikace DNA kitem je stejný jako u izolace

kitem, liší se složení některých pufrů a velikost jemného filtru v kolonkách. Cena purifikace je daleko nižší než cena izolace kitem. Proto je mnohdy DNA nejdříve vyizolovaná klasickou CTAB metodou a poté, neodpovídá-li čistota DNA požadavkům, následně přečištěna purifikačním kitem.

3.2.6 Kontrola koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometricky

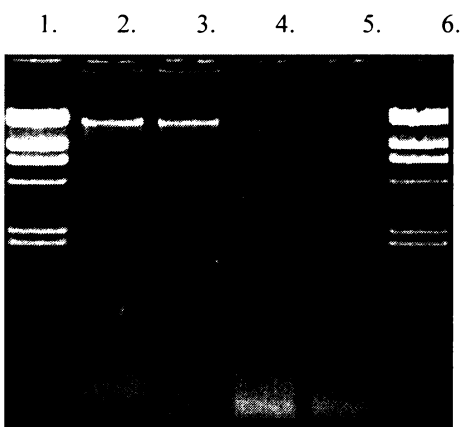
Nejčastější způsob měření koncentrace nukleových kyselin je založen na tom, že aromatické struktury bází absorbují UV záření určitých vlnových délek. Intenzitu absorpce látek rozpuštěných v roztoku lze měřit spektrofotometrem. Pokud jsou v roztoku pouze nukleové kyseliny, míra absorpce při 260 nm odpovídá koncentraci těchto kyselin (Obrázek 1). Protože jsou ale nukleové kyseliny izolovány z buněk, jsou jejich roztoky kontaminovány bílkovinami. Ty obsahují aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, které také absorbují UV záření. Pokud změříme absorbanci čistého vodného roztoku nukleových kyselin při různých vlnových délkách, získáme křivku s absorpčním maximem při 260 nm. Pokud je ale vzorek kontaminován bílkovinami, křivka se zvedá také při 280 nm. Z poměru A_{260}/A_{280} lze tedy zjistit čistotu vzorku, resp. znečištění vzorku proteiny. Hodnota A_{260} u čistého vzorku je vzhledem k A_{280} dvojnásobná. Poměr je tedy 2,0. U vzorku kontaminovaného bílkovinami se hodnota A_{280} zvedá, a poměr tak klesá. Pokud se hodnota poměru A_{260}/A_{280} pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0, vzorek není kontaminovaný bílkovinami a je možné ho použít pro následnou molekulární analýzu.^{20, 21}



Obrázek 1: Absorpční spektrum vodného roztoku nukleových kyselin.²¹

Elektroforeticky

Elektroforéza je metoda založená na separaci DNA v agarózovém gelu. Umožňuje kontrolu integrity DNA a hrubý odhad množství. DNA se separuje na základě svého náboje a molekulární hmotnosti. Vzorek je nanesen do jamky v gelu. Do vedlejší jamky je nanesen srovnávací standard, který obsahuje směs molekul nukleových kyselin o známé molekulové hmotnosti a koncentraci. Gel je umístěn do elektrického pole mezi kladnou a zápornou elektrodu. Záporně nabitě molekuly nukleových kyselin se prodírají trojrozměrnou sítí vláken směrem ke kladné elektrodě. Malé molekuly se pohybují rychleji, větší zaostávají. Pro zviditelnění separovaných molekul se používá fluorescenční barvivo ethidium bromid. Ten se naváže na DNA a při excitaci UV zářením molekuly DNA fluoreskují. Množství fluorescence je úměrné celkovému množství DNA. Srovnáním fluorescence vzorku s fluorescencí standardu (např. Lambda DNA *Hind*III Marker; Příloha A) může být odhadnuta koncentrace DNA.²⁰ Pokud je DNA degradovaná, na gelu se objeví světlý pruh, tzv. „smear“ (šmouha). Pokud je DNA kontaminovaná, ve vzorku jsou přítomny zbytky polysacharidů a jiných koizolovaných látek, zůstává v jamce a nedojde k separaci.



Obrázek 2: DNA po separaci v agarózovém gelu. 1, 6 - srovnávací standard Lambda DNA *Hind*III Marker (Příloha A), 2, 3 - vysokomolekulární DNA, 4, 5 – degradovaná DNA.

3.5 Molekulární analýza AFLP

V dnešní době slouží k získání genetické informace molekulární metody založené na PCR reakci. Tyto metody umožňují sledování evolučních vztahů nejen mezi druhy, ale také uvnitř a mezi populacemi jednoho druhu.

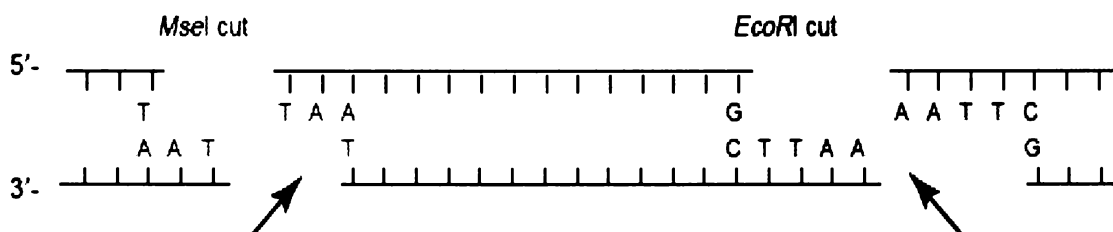
Mezi nejpoužívanější molekulární metody patří Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP; délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů).^{22, 23, 24} Metoda umožňuje rozdělit sledované příbuzné organismy nebo jedince jednoho druhu na základě DNA genotypizace a vytvořit tzv. fingerprint. Využívá odlišnosti v sekvenci DNA, kterou lze detekovat pomocí restričních enzymů a následné amplifikace specifických fragmentů.

AFLP je metoda velmi citlivá na kvalitu a koncentraci DNA, proto je nutné zvolit vhodný postup pro izolaci DNA.

AFLP se skládá z několika po sobě jdoucích kroků:

3.5.1 Restrikce

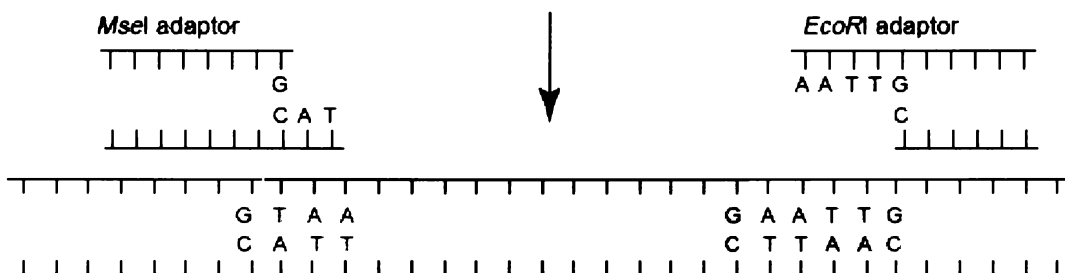
Izolovaná DNA se pomocí restričních endonukleáz *EcoRI* a *MseI* specificky naštípe na krátké fragmenty (Obrázek 3). Nukleázy katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Restriční endonukleázy štěpí DNA pouze v místech se specifickou krátkou sekvencí nukleotidů. Štěpením vznikají tři druhy fragmentů ohraničených restričními místy *EcoRI* × *MseI*, *EcoRI* × *EcoRI* a *MseI* × *MseI*.



Obrázek 3: AFLP - Úsek DNA štěpený enzymy *EcoRI* a *MseI*.²⁴

3.5.2 Ligace

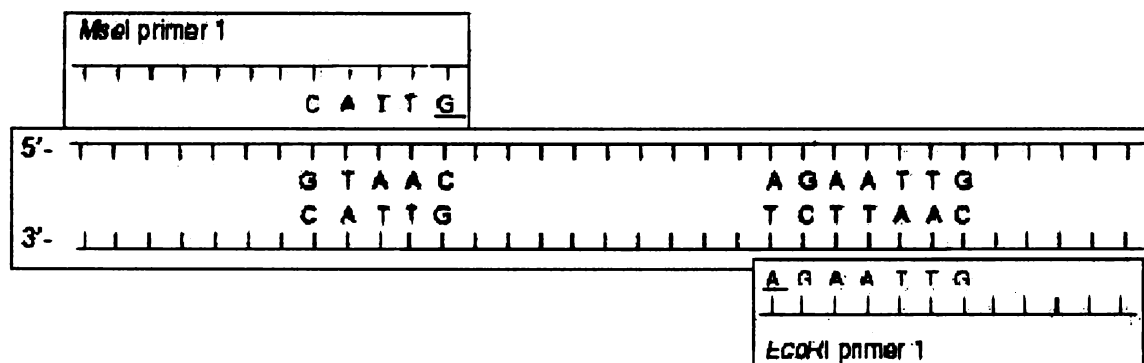
Jde o navázání adaptérů na specifické restriční místo. Adaptéry jsou krátké dvouřetězcové úseky DNA, které obsahují krátkou sekvenci nukleotidů nutnou pro navázání primerů v dalším kroku a zároveň jsou kompatibilní s restričním místem pro *EcoRI* nebo *MseI* (Obrázek 4). Ligace adaptorů je katalyzována T4 ligázou a probíhá v pufru za přítomnosti ATP.



Obrázek 4: AFLP - Ligace adaptérů na krátké DNA fragmenty.²⁴

3.5.3 Preamplifikace

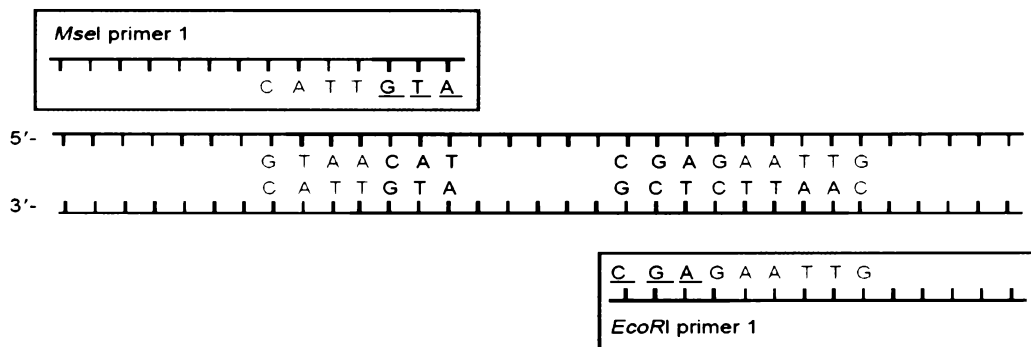
Při PCR reakci s primery kompatibilními se sekvencí adaptorů a s jedním tzv. selektivním nukleotidem (Obrázek 5) dojde k amplifikaci pouze těch fragmentů, které mají za restrikčním místem právě selektivní nukleotid(y). V tomto kroku tedy dochází k redukci počtu fragmentů DNA, resp. je amplifikována pouze 1/16 fragmentů. Preselektivními primery se také namnoží pouze ty, které jsou ohraničeny restrikčními místy *EcoRI* x *MseI*.



Obrázek 5: AFLP - Preamplifikace fragmentů s restrikčním místem *EcoRI* x *MseI* a selektivním nukleotidem.²⁴

3.5.4 Selektivní amplifikace

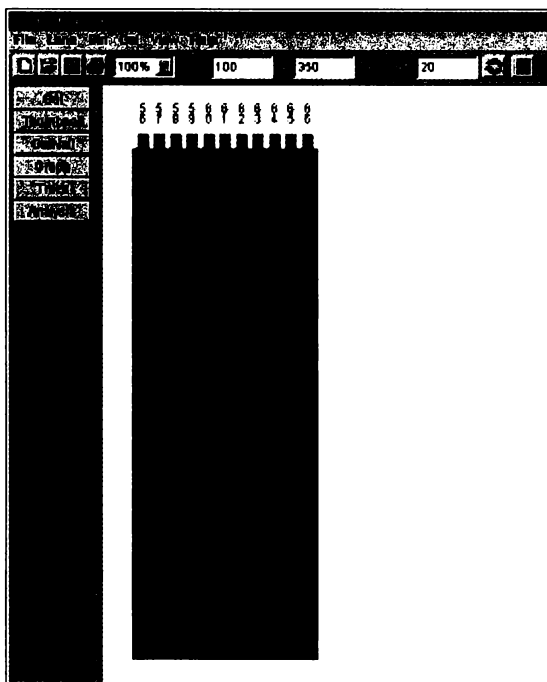
Jde o finální namnožení fragmentů selektivními primery, z nichž jeden je fluorescenčně označen kvůli následné vizualizaci produktů. Selektivní primery mají tři tzv. selektivní nukleotidy a amplifikují se tedy pouze ty fragmenty, které jsou ohraničeny restrikčním místem a určitou sekvencí tří nukleotidů (Obrázek 6). Délka a počet selektivně amplifikovaných fragmentů jsou velmi specifické znaky pro každého jedince.



Obrázek 6: AFLP – Selektivní amplifikace fragmentů s restričním místem a třemi nukleotidy.²⁴

3.5.5 Separace a analýza produktů AFLP

Separace a následná vizualizace produktů AFLP se provádí pomocí genetického analyzátoru, ve kterém probíhá kapilární elektroforéza (např. ABI 3100 Avant, Applied Biosystems). Fluorescenčně značené produkty jsou separovány v polyakrylamidovém gelu a při separaci (na konci kapiláry) detekovány laserovým detektorem. Signály se dále vyhodnocují příslušnými programy (např. GeneScan),²⁵ porovnávají se spektra fragmentů (např. v programu Genographer; Obrázek 7)²⁶ a získávají se tzv. DNA fingerprinty analyzovaných jedinců. Výsledkem je potom matice binárních znaků, kterou lze vyhodnocovat specifickými statistickými metodami a hodnotit podobnosti mezi jedinci a genetickou strukturu populací.



Obrázek 7: AFLP - DNA fingerprinty souboru jedinců hodnocených v programu Genographer v 1.6.²⁶

4. Experimentální část

4.1 Seznam použitých chemikálií

Acetát sodný (NaOAc), $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, p. a., Lachema

AFLP Core Reagent Kit , Invitrogen

AFLP Pre-Amp Primer Mix I, Invitrogen

Agarose, biotechnology grade, Amresco

Buffer with $MgCl_2$ for RED*Taq*, 10 ×, Sigma Aldrich

Silikagel, SiO_2 , Penta

Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), $C_{20}H_{44}NBr$, high purity grade, Amresco

DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen

dNTP, 10 nmol μl^{-1} , Fermentas

EcoRI primery fluorescenčně značené, 1 pmol μl^{-1} , Applied Biosystems

MseI primery, 5 pmol μl^{-1} , Applied Biosystems

Ethanol, C_2H_5OH , čistý 96%, P-Lab

Ethylendiamintetra acetát (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$, ultra pure grade, Amresco

Ethidium bromid, 10 g l^{-1} , Top-Bio

Chlorid sodný, NaCl, p. a., Roth

Chloroform, $CHCl_3$, p. a., Lachema

Isoamylalkohol, $C_5H_{12}O$, p. a., Lachema

Isopropanol, C_3H_8O , p. a., Penta

JETquick General DNA Clean-Up Kit, Genomed

Jump Star Red *Taq* DNA polymerase, 1 U μl^{-1} , Sigma Aldrich

Lambda DNA *HindIII* Marker, 0,1 g l^{-1} , Fermentas

2- merkptoethanol, C_2H_6OS , biotechnology grade, Amresco

Polyvinylpyrrolidon (PVP), $(C_6H_9NO)_x$, Carl Roth

RNase A, 10 g l^{-1} , Fermentas

Tris, $C_4H_{18}NO_3$, ultra pure grade, Amresco

4.2 Příprava pufřů

(Přiloha B)

4.3 Seznam použitých přístrojů a softwarů

Centrifuga 5415R, Eppendorf, Německo
Dokumentační systém Gel Logik 100, Kodak, UK
1D Image Analysis Software v 3.6.1, Kodak, UK
Elektroforetická sestava HU6, Sigma Aldrich, USA
GeneScan Analysis Software v 3.7, Applied Biosystems, USA
Genetický analyzátor ABI 3100 Avant, Applied Biosystems, USA
GenoGrapher, J, Benham 2001 v 1.6, Montana State University, USA
Pipeta Research Family Variable 2,5, Eppendorf, Německo
Pipeta Research Family Variable 10, Eppendorf, Německo
Pipeta Research Family Variable 20, Eppendorf, Německo
Pipeta Research Family Variable 100, Eppendorf, Německo
Pipeta Research Family Variable 200, Eppendorf, Německo
Pipeta Research Family Variable 1000, Eppendorf, Německo
Spektrofotometr Biophotometer, Eppendorf, Německo
Termomixer Comfort, Eppendorf, Německo
Transluminátor UVT 20M, Herolab, Německo
Třepací mlýn MM200, Retsch, Německo
Váhy 440-21N, Kern, Německo
Vortex GENIE 2, Scientific Industries, USA
Zdroj napětí Consort E 132, Sigma Aldrich, USA

4.4 Příprava vzorků

Rostlinný materiál rodu *Curcuma* a *Pimpinella* byl usušen a uskladněn v silikagelu. Pro izolaci DNA byly vybrány čtyři vzorky rodu *Curcuma* a čtyři vzorky rodu *Pimpinella*. Bezprostředně před izolací DNA bylo naváženo 20 mg sušeného materiálu do 2 ml mikrozkupek a přidáno 5 - 10 skleněných kuliček o průměru 3 mm. Mikrozkupek byly poté vloženy do třepacího mlýnu a materiál byl 10 minut drcen na prach při frekvenci 30 otáček za sekundu.

4.5 Izolace a purifikace DNA

4.5.1 Postup pro izolaci DNA modifikovanou metodou CTAB

Modifikovanou metodou CTAB byla izolovaná DNA dvou vzorků rodu *Curcuma* a dvou vzorků rodu *Pimpinella*.

Do mikrozkušavek s rozdrceným materiálem bylo přidáno 700 μ l CTAB pufru obsahujícího 2-merkaptoethanol (Příloha B) a 10 μ l RNázy A. Vzorky byly důkladně promíchány na vortexu a poté inkubovány 30 minut při 60 °C a 1 400 rpm v termomixéru. Během inkubace byl přidán PVP ($w\% = 2$). Po inkubaci následovalo přidání 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1) a důkladné promíchání. Poté byly vzorky centrifugovány 6 minut při 14 000 rpm. a následně přepipetován supernatant do nových 2 ml mikrozkušavek. Opět bylo přidáno 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol, vše promícháno a poté centrifugováno 6 minut při 14 000 rpm. Supernatant byl přepipetován do 1,5 ml mikrozkušavek a bylo přidáno 500 μ l vychlazeného isopropanolu. Směs byla opatrně promíchána převrácením a inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány 3 minuty při 14 000 rpm. Po centrifugaci následovalo odstranění supernatantu a k peletu na dně zkumavky bylo přidáno 400 μ l vychlazeného 96% ethanolu. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37 °C a 1 200 rpm v termomixéru. Po inkubaci byly centrifugovány 3 minuty při 14 000 rpm, opět následovalo odstranění supernatantu a k peletu bylo přidáno 200 μ l vychlazeného 70% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány 3 minuty při 14 000 rpm, byl odstraněn supernatant a pelet sušen na termomixéru 5 minut při 65 °C. Po vysušení byl pelet rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru (Příloha B).

4.5.2 Postup pro izolaci DNA pomocí kitu

Pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) byla izolovaná DNA dvou vzorků rodu *Curcuma* a dvou vzorků rodu *Pimpinella*. Izolace DNA byla provedena dle protokolu ke kitu (Příloha C).

4.5.3 Postup pro purifikaci DNA pomocí kitu

Ze vzorků DNA *Pimpinella 1* a *2* izolovaných metodou CTAB bylo odebráno 50 μ l a následně purifikováno kitem JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed). Purifikace byla provedena dle protokolu ke kitu (Příloha D).

4.6 Kontrola a příprava DNA pro analýzu AFLP

Kvalita a kvantita všech vzorků DNA byla zkontrolována spektrofotometricky. BIOPhotometrem byla změřena absorbance při 260 a 280 nm a následně přepočítána na koncentraci v $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ a ukazatel kontaminace bílkovinami A260/A280. Kvalita byla ověřena také elektroforeticky. 5 μl DNA bylo naneseno na 0,8% agarózový gel v $1\times$ TAE pufru (Příloha B) s přidavkem ethidium bromidu (1000:1). Elektroforetická separace probíhala 30 minut při 10 V cm^{-1} . Po separaci byla provedena vizualizace transluminátorem při 254 nm a obrázek byl pořízen dokumentačním systémem Gel Logic 100 Kodak a softwarem 1D Image Analysis Software Kodak.²⁷ DNA více koncentrovaných vzorků byla naředěna na pracovní koncentraci 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

4.7 AFLP analýza

Metoda byla provedena dle standardního protokolu²³ za použití AFLP Core Reagent Kit a AFLP Pre-Amp Primer Mix I (Příloha E). Separace AFLP produktů proběhla na genetickém analyzátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři PřF UK (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab/>). Data z genetického analyzátoru byla analyzována programem GeneScan v 3.7 (fragmentům byly přiřazeny délky porovnáním s vnitřním standardem GeneScan ROX 500) a AFLP fragmenty byly dále hodnoceny pomocí programu GenoGrapher v 1.6.^{25, 26}

5. Výsledky a diskuse

5.1 Spektrofotometrická kontrola koncentrace a čistoty DNA

Tabulka 1: Hodnoty koncentrace a poměru absorbancí A260/A280 vzorků DNA získaných různými metodami izolace či purifikace DNA.

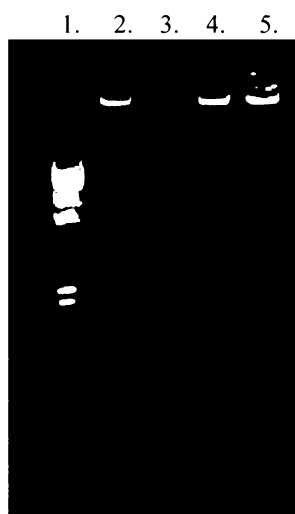
Metoda izolace či purifikace DNA	Č. vzorku	Koncentrace [ng μl^{-1}]	A260/A280
CTAB	<i>Curcuma 1</i>	232	1,69
CTAB	<i>Curcuma 2</i>	239	1,70
CTAB	<i>Pimpinella 1</i>	372	1,60
CTAB	<i>Pimpinella 2</i>	218	1,60
Dneasy Plant Mini Kit	<i>Curcuma 3</i>	131	1,78
Dneasy Plant Mini Kit	<i>Curcuma 4</i>	141	1,79
Dneasy Plant Mini Kit	<i>Pimpinella 3</i>	162	1,75
Dneasy Plant Mini Kit	<i>Pimpinella 4</i>	185	1,76
Jet Quick General DNA Clean-Up Kit	<i>Pimpinella 1 purif.</i>	26	1,75
Jet Quick General DNA Clean-Up Kit	<i>Pimpinella 2 purif.</i>	27	1,75

Vzorky izolované metodou CTAB měly vysokou koncentraci DNA dostatečnou pro následnou analýzu AFLP. Poměr absorbancí A260/A280 vyjadřující kontaminaci DNA bílkovinami by měl být v ideálním případě 1,8 – 2,0. U vzorků izolovaných metodou CTAB byl tento poměr nižší, DNA byla tedy kontaminovaná bílkovinami (Tabulka 1).

Vzorky izolované komerčním kitem DNeasy Plant Mini Kit měly dostatečně vysokou koncentraci DNA a poměr A260/A280 byl vyšší než u izolace metodou CTAB. Z toho vyplývá, že DNA vyizolovaná komerčním kitem byla méně kontaminovaná bílkovinami než DNA vyizolovaná metodou CTAB (Tabulka 1).

Ze vzorků *Pimpinella 1* a *2* bylo po izolaci metodou CTAB odebráno 50 μl DNA a následně purifikováno komerčním kitem Jet Quick General DNA Clean-Up Kit. Při purifikaci došlo k velkým ztrátám a výsledná koncentrace DNA byla nízká. Poměr A260/A280 se však zvýšil, což znamená, že kontaminace bílkovinami byla částečně odstraněna (Tabulka 1).

5.2 Elektroforetická kontrola čistoty DNA



Obrázek 8: DNA izolovaná metodou CTAB. 1 - srovnávací standard Lambda DNA *Hind*III Marker (Příloha A), 2 - *Curcuma* 1, 3 - *Curcuma* 2, 4 - *Pimpinella* 1, 5 - *Pimpinella* 2.

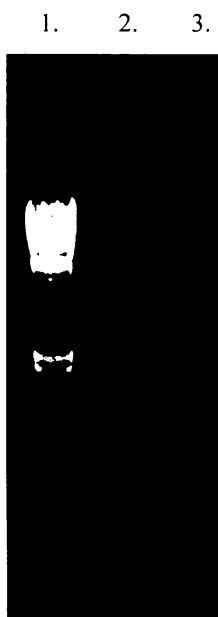
DNA izolovaná metodou CTAB nebyla dostatečně čistá. Dle elektroforetické kontroly na agarózovém gelu (Obrázek 8) DNA zůstala v jamce, nedošlo k separaci. DNA byla kontaminovaná polysacharidy a jinými látkami.



Obrázek 9: DNA izolovaná kitem DNeasy Plant Mini Kit. 1 – srovnávací standard Lambda DNA *Hind*III Marker (Příloha A), 2 - *Curcuma* 3, 3 - *Curcuma* 4, 4 - *Pimpinella* 3, 5 - *Pimpinella* 4.

DNA izolovaná kitem DNeasy Plant Mini Kit byla dle elektroforetické kontroly na agarózovém gelu (Obrázek 9) čistá bez zbytků nežádoucích látek.

Světlý pruh, tzv. „smear“, značil částečnou degradaci DNA. Ta byla způsobena sušeným a již starším výchozím materiálem.



Obrázek 10: DNA izolovaná metodou CTAB a následně purifikovaná kitem Jet Quick General DNA Clean - Up Kit. 1 – srovnávací standard Lambda DNA *Hind*III Marker (Příloha A), 2 - *Pimpinella 1 purif.*, 3 - *Pimpinella 2 purif.*

Dle elektroforetické kontroly byla pomocí purifikačního kitu Jet Quick General DNA Clean-Up Kit úspěšně odstraněna kontaminace DNA koizolovanými nežádoucími látkami (Obrázek 10).

5.3 Otestování použitelnosti získané DNA pro analýzu AFLP

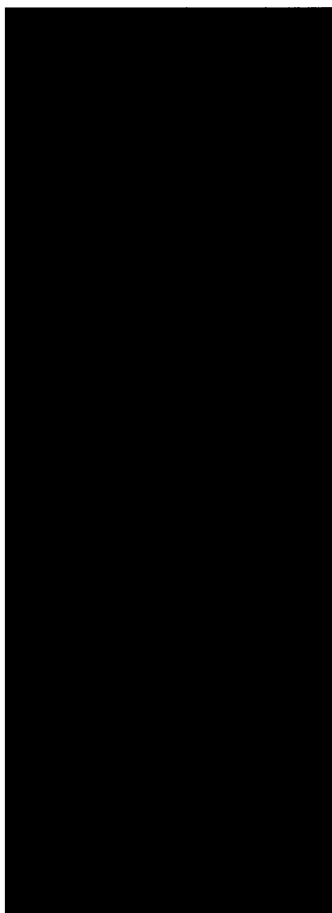


Obrázek 11: DNA fingerprinty vzorků *Curcuma* izolovaných různými metodami, hodnocených v programu GenoGrapher²⁶, oblast AFLP fragmentů o délkách 100 – 300 bp, tři kombinace selektivních primerů. 1, 5, 9 - *Curcuma 1* (metoda CTAB), 2, 6, 10 - *Curcuma 2* (metoda CTAB), 3, 7, 11 - *Curcuma 3* (DNeasy Plant Mini Kit), 4, 8, 12 - *Curcuma 4* (DNeasy Plant Mini Kit).

DNA *Curcuma 1* a *Curcuma 2* izolovaná metodou CTAB nebyla dle získaných dat použitelná pro analýzu AFLP (Obrázek 11, vzorky 1, 2, 5, 6, 9, 10). Signál fragmentů AFLP u všech tří kombinací selektivních primerů byl velmi slabý nebo žádný. Metodou CTAB došlo ke koizolaci nežádoucích látek, které způsobily inhibici aktivity restričních enzymů a *Taq* polymerázy. V důsledku toho nedošlo ke specifickému našťipání DNA restričními endonukleázami již v prvním kroku AFLP, nebo neproběhlo namnožení preselektivních či selektivních fragmentů.

DNA *Curcuma 3* a *Curcuma 4* izolovaná kitem DNeasy Plant Mini Kit byla dle získaných dat vhodná pro analýzu AFLP (Obrázek 11, vzorky 3, 4, 7, 8, 11, 12). Signál, počet a délka produktů AFLP byly vyhovující.

1. 2. 3. 4. 5. 6.



Obrázek 12: DNA fingerprinty vzorků *Pimpinella* izolovaných různými metodami, hodnocených v programu GenoGrapher²⁶, oblast AFLP fragmentů o délkách 100 – 300 bp, jedna kombinace selektivních primerů,

1 - *Pimpinella 1* (metoda CTAB), 2 - *Pimpinella 2* (metoda CTAB), 3 - *Pimpinella 1 purif.* (Jet Quick General DNA Clean-Up Kit), 4 - *Pimpinella 2 purif.* (Jet Quick General DNA Clean-Up Kit), 5 - *Pimpinella 3* (DNeasy Plant Mini Kit), 6 - *Pimpinella 4* (DNeasy Plant Mini Kit).

DNA *Pimpinella 1* a 2 izolovaná metodou CTAB nebyla dle získaných dat vhodná pro analýzu AFLP (Obrázek 12, vzorky 1 a 2). Nízký počet fragmentů AFLP a jejich délka 100 – 150 bp zcela nevyhovovaly jakémukoli hodnocení. Stejně jako u rodu *Curcuma* byly metodou CTAB spolu s DNA koizolovány nežádoucí látky způsobující inhibice některých reakcí. Následnou purifikací kitem Jet Quick General DNA Clean-Up Kit byla kontaminace nežádoucími látkami u vzorků *Pimpinella 1* a 2 efektivně odstraněna (Obrázek 12, vzorky 3 a 4). Získané fragmenty AFLP byly použitelné pro další hodnocení.

DNA *Pimpinella 2* a 3 izolovaná kitem DNeasy Plant Mini Kit byla dle získaných dat vhodná pro analýzu AFLP (Obrázek 12, vzorky 5 a 6). Při izolaci DNA komerčním kitem nedošlo ke koizolaci nežádoucích látek a všechny kroky AFLP proběhly vpořádku.

6. Závěr

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat vhodný postup pro izolaci DNA z rostlinné tkáně rodů *Curcuma* a *Pimpinella* a ověřit použitelnost takto získané DNA pro následnou analýzu AFLP. U obou rodů bylo bráno v úvahu, že mohou mít vysoký obsah sekundárních metabolitů, které mají vliv na kvalitu izolované DNA a inhibují následné PCR reakce. Na základě literárních údajů byla pro izolaci DNA nejprve navržena, a poté experimentálně ověřena metoda CTAB s modifikovanými kroky. Tyto modifikace měly pomoci efektivně izolovat DNA od nežádoucích látek. Získaná DNA měla dle spektrofotometrické a elektroforetické kontroly vysokou koncentraci, ale nebyla dostatečně čistá. Při ověření použitelnosti takto izolované DNA rodů *Curcuma* a *Pimpinella* pro analýzu AFLP se prokázalo, že metoda CTAB s modifikovanými kroky není vhodná. U vzorků DNA rodu *Pimpinella* izolovaných metodou CTAB byla dodatečně provedena následná purifikace kitem Jet Quick General DNA Clean-Up Kit. Spektrofotometrická a elektroforetická kontrola ukázala, že došlo ke značnému snížení koncentrace DNA, ale také k úspěšnému odstranění koizolovaných nežádoucích látek. I když požadovaná vstupní koncentrace DNA pro analýzu AFLP má být vyšší, než byla koncentrace DNA po purifikaci kitem, byla ověřena použitelnost této DNA. Signály získaných fragmentů AFLP byly dostatečné a purifikace DNA rodu *Pimpinella* kitem Jet Quick General DNA Clean-Up Kit je tedy vhodná.

Další navrženou metodou pro izolaci DNA z rostlinné tkáně obou rodů byla izolace komerčním kitem DNeasy Plant Mini Kit. Po izolaci byla provedena kontrola čistoty a koncentrace DNA a následně byla ověřena použitelnost získané DNA pro analýzu AFLP. Dle získaných signálů fragmentů AFLP je DNA rodů *Curcuma* a *Pimpinella* izolovaná metodou DNeasy Plant Mini Kit vhodná pro analýzu AFLP.

Ze získaných výsledků vyplývá, že úspěšné provedení molekulární analýzy závisí na kvalitě vstupní DNA. Základem všeho je tedy dobře zvolit metodu izolace DNA. Získat kvalitní DNA, a to zejména z rostlinné tkáně, bývá mnohdy problém. Proto se u některých rostlinných druhů vyplatí rovnou zvolit finančně náročnější metodu pro izolaci DNA, a to komerční kit optimalizovaný pro rostlinnou tkáň.

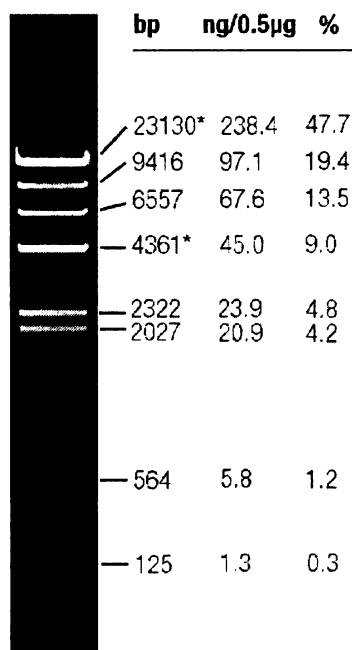
7. Soupis bibliografických citací

1. Bezouška, K.; Boubelík, M.; Brdička, F.; Cvrčková, F.; Forejt, J.; Fuchs, O.; Hatina, J.; Havlas, Z.; Holeňa, O.; Hořejší, V.; Chaloupka, J.; Markoš, A.; Smetana, K.; Vondrášek, J.; Vyskot, B.: *Molekulární biologie a genetika VIII*. Vyd. Praha, Ústav molekulární genetiky AV ČR 1998.
2. Henry, R. J.: *Plant Genotyping*. Oxon, CAB International 2001.
3. Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
4. Drábková, L.; Kirschner, J.: Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*. **20**, 161-175 (2002).
5. Porebsky, S.; Bailey, L. G.; Baum, B. R.: Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. **15**, 8 – 15 (1997).
6. Syamkumar, S.; Lowarence, B.; Sasikumar, B.: Isolation and amplification of DNA from rhizomes of tumeric and ginger. *Plant Molecular Biology Reporter*. **21**, 171a – 171e (2003).
7. Pazdera, Z.: *Fotografický herbář*. Dostupné z URL: <<http://botanika.wendys.cz/>> [cit. 25.7. 2008]
8. Doyle, J. J. and Dickson, E. E.: Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. **36**, 715 – 722 (1987)
9. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem, vyd. Espero Publishing s.r.o. 1998.
10. Doyle, J. J. and Doyle, J. L.: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. **19**, 11-15 (1987).
11. Murray, M. G.; Thompson, W. F.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
12. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2., opravené vydání, Academia Praha, AV ČR 1996.
13. David, V. J.; David, L.; Hurley, B.; Leonard, B.: Plant DNA isolation: a method to effeciently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*. **44**, 379 – 386 (1995).

14. Kim, C. S.; Lee, C. H.; Shin, J. S.; Chung, Y. S.; Hyung, N. I.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
15. Peterson, D. G.; Boehm, K. S.; Stack, S. M.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
16. Fernandez, J. F.; Sork, V. L.; Gallego, G.; Lopéz, J.; Bohorquez, A.; Tohme, J.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
17. Doyle, J. J. and Doyle, J. L.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
18. Barker, J. H. A.; Matthes, M.; Arnold, G. M.; Edwards, K. J.; Ahman, I.; Larsson, S.; Karp, A.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
19. Fang, G.; Hammar, S.; Grumet, R.: Methodology. In: Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Kahl, G. (eds.): *DNA Fingerprinting in Plants*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press 2005.
20. Průša, R.: *Základy analytických metod v klinické a molekulární biologii*. Praha, vyd. 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED s.r.o.1997.
21. Diffey, B. L.: Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology*. **36**, 299 – 328 (1991).
22. Meudt, H. M.; Clarke, A. C.: Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science*. **12**, 106 – 117 (2007).
23. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijmans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. **23**, 4407 – 4414 (1995).
24. Urlich, G.; Muller; Wolfenbarger, L. L.: AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE*. **14**, 389 – 394 (1999).
25. GeneScan [Analysis software, CD-ROM] Ver. 3.7. USA, Applied Biosystems 2001.
26. Benham, J.: GenoGrapher [Analysis software, on-line] Ver. 1.6. USA, Montana State Univerzity 2001. Dostupné z URL: <<http://hordeum.oscs.montana.edu/>>
27. 1D Image Analysis Software [CD-ROM] Ver. 3.6.1 UK, Kodak 2002.

Příloha A: Srovnávací standard Lambda DNA *Hind*III Marker (Fermentas)

<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/convlambdamarkers.htm>



0.5µg/lane,
8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

Příloha B: Příprava pufrů

CTAB pufr (izolace DNA)

Tris 6,057 g
EDTA 2,922 g
NaCl 40,950 g
CTAB 10,000 g
Doplnit do 500 ml ddH₂O
pH - 8
2- mercaptoethanol w_V% = 2

10 × TE pufr (izolace DNA)

Tris 1,211 g
EDTA 0,292 g
Doplnit do 100 ml ddH₂O
pH - 8

10 × TAE pufr (elektroforéza)

Tris 48,400 g
NaOAc 27,200 g
EDTA 2,922 g
Doplnit do 1000 ml ddH₂O

Protocol: Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)

Important points before starting

- If using the DNeasy Plant Mini Kit for the first time, read “Important Notes” (page 16).
- Ensure that you are familiar with operating the TissueRuptor or the TissueLyser. See “Disruption and homogenization using the TissueRuptor”, page 17, or “Disruption and homogenization using the TissueLyser System”, page 17. Refer to the *TissueRuptor User Manual* or the *TissueLyser Handbook* for operating instructions.
- Buffer AP1 may develop a yellow color upon storage. This does not affect the procedure.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.

Things to do before starting

- Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrate may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 65°C to redissolve (before adding ethanol to Buffer AP3/E). Do not heat Buffer AP3/E after ethanol has been added.
- Buffer AW and Buffer AP3/E are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

Procedure

1. For disruption using the TissueRuptor, follow step 2; for disruption using the TissueLyser, follow steps 3–6.

Alternatively, plant or fungal tissue can be ground to a fine powder under liquid nitrogen using a mortar and pestle. Transfer the tissue powder and liquid nitrogen to an appropriately sized tube and allow the liquid nitrogen to evaporate. Do not allow the sample to thaw. Proceed immediately to step 7.

2. **TissueRuptor procedure:** Place the sample material (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) into a 2 ml microcentrifuge tube. Add liquid nitrogen to the tube, and freeze the sample for 30 s. Keep the sample submerged in liquid nitrogen, and disrupt for approximately 30 s at full speed. Allow the liquid nitrogen to evaporate, and proceed immediately to step 7.

Alternatively, fresh or lyophilized material can be directly disrupted in lysis buffer (after step 7) without using liquid nitrogen, but this may cause shearing of high-molecular-weight DNA. We do not recommend disrupting frozen material in lysis buffer as this can result in low yields and degraded DNA.

3. **Tissuelyser procedure: Place the sample material (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) into a 2 ml safe-lock microcentrifuge tube, together with a 3 mm tungsten carbide bead. Freeze the tubes in liquid nitrogen for 30 s.**

When using lyophilized tissue, the tubes do not need to be frozen in liquid nitrogen.

4. **Place the tubes into the Tissuelyser Adapter Set 2 x 24, and fix into the clamps of the Tissuelyser. Immediately grind the samples for 1 min at 30 Hz.**
5. **Disassemble the adaptor set, remove the tubes, and refreeze in liquid nitrogen for 30 s.**

When using lyophilized tissue, the tubes do not need to be frozen in liquid nitrogen.

6. **Repeat step 4, reversing the position of the tubes within the adaptor set. Proceed immediately to step 7.**

To prevent variation in sample homogenization, the adaptor sets should be removed from the Tissuelyser and disassembled after the first disruption step. For the second disruption step, the adaptor sets should be reassembled so that the tube order is reversed. Rotating the racks of tubes in this way ensures that all samples are thoroughly and equally disrupted.

Note: The majority of plant tissue is ground to a fine powder after 2 disruption steps, however, for some materials one disruption step may be sufficient. Other tissues, such as seeds and roots, may require disruption steps. Optimization of the disruption procedure may be required for some plant material.

7. **Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 100 mg (wet weight) or 20 mg (dried) disrupted plant or fungal tissue and vortex vigorously.**

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumps of tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In rare cases, where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

8. **Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2 or 3 times during incubation by inverting tube.**

This step lyses the cells.

9. **Add 130 μ l Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.**
This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides.
10. **Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).**
Some plant materials can generate very viscous lysates and large amounts of precipitates during this step. This can result in shearing of the DNA in the next step (see "Lysate filtration with QIAshredder", page 21). In this case, optimal results are obtained if the majority of these precipitates are removed by centrifugation for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm). After centrifugation, apply supernatant to QIAshredder Mini spin column and continue with step 11.
11. **Pipet the lysate into the QIAshredder Mini spin column (lilac) placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at 20,000 x g (14,000 rpm).**
It may be necessary to cut the end off the pipet tip to apply the lysate to the QIAshredder Mini spin column. The QIAshredder Mini spin column removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 12.
12. **Transfer the flow-through fraction from step 11 into a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet.**
Typically 450 μ l of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case, determine the volume for the next step.
13. **Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate, and mix by pipetting.**
For example, to 450 μ l lysate, add 675 μ l Buffer AP3/E. Reduce the amount of Buffer AP3/E accordingly if the volume of lysate is smaller. A precipitate may form after the addition of Buffer AP3/E, but this will not affect the DNeasy procedure.
Note: Ensure that ethanol has been added to Buffer AP3/E. See "Things to do before starting", page 24.
Note: It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.
14. **Pipet 650 μ l of the mixture from step 13, including any precipitate that may have formed, into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (corresponds to ≥ 8000 rpm for most microcentrifuges), and discard the flow-through.* Reuse the collection tube in step 15.**
15. **Repeat step 14 with remaining sample. Discard flow-through* and collection tube.**

* Flow-through fractions contain Buffer AP3/E, and are therefore not compatible with bleach. See page 7 for safety information.

16. Place the DNeasy Mini spin column into a new 2 ml collection tube (supplied), add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through and reuse the collection tube in step 17.

Note: Ensure that ethanol is added to Buffer AW. See “Things to do before starting”, page 24.

17. Add 500 μ l Buffer AW to the DNeasy Mini spin column, and centrifuge for 2 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the membrane.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

After washing with Buffer AW, the DNeasy Mini spin column membrane is usually only slightly colored. In the rare case that the membrane remains significantly colored after washing with Buffer AW, refer to “Darkly colored membrane or green/yellow eluate after washing with Buffer AW” in the Troubleshooting Guide on page 45.

Note: Following the centrifugation, remove the DNeasy Mini spin column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through, as this will result in carryover of ethanol.

18. Transfer the DNeasy Mini spin column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied), and pipet 100 μ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C), and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm) to elute.

Elution with 50 μ l (instead of 100 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA (>20 μ g) are loaded, eluting with 200 μ l (instead of 100 μ l) increases yield. See “Elution”, page 21.

19. Repeat step 18 once.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates. See “Elution”, page 21.

Note: More than 200 μ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

<http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK%20CleanUp%20Protocol.PDF>

Protocol / General DNA Clean-Up

Very important!

- Before starting the procedure, make sure that solution M2 is reconstituted, as indicated on the bottle's label.
- The JETQUICK procedure is not sensitive to detergents (like Triton X-100, NP40) in the assay. Nevertheless, concentrations > 0.1% of Tween 20 should be avoided.
- All centrifugation steps are carried out at maximum speed (approx. 13,000 rpm) in a conventional table-top microfuge.

1. **Sample Preparation** Add **400 µl** of solution **M1** to up to **100 µl DNA assay** and mix thoroughly.

***Important:** Make sure that the volume of your DNA assay does not exceed 100 µl. When **DNA assays > 100 µl are used**, scale up solution M1 proportionally. In this case, multiple loadings of the spin column (step 2 of the protocol) are required.*

2. **Column Loading** Place a **JETQUICK spin column** into a 2 ml receiver tube. Load the mixture from step 1 into the prepared spin column. Centrifuge at **maximum speed** for **1 min**. Discard the flowthrough.

Protocol / General DNA Clean-Up

3. Column Washing Re-insert the spin column into the empty receiver tube and add **700 μ l of reconstituted solution M2**. Centrifuge at **maximum speed** for **1 min**.

Discard flowthrough and place the JETQUICK column back into the same receiver tube. Centrifuge **again** at **maximum speed** for **1 min**.

***Important:** Residual solution M2 will not be completely removed unless the flowthrough is discarded before this additional centrifugation. Solution M2 contains ethanol, and residual ethanol may interfere with subsequent reactions. The additional centrifugation assures that no residual ethanol is carried over into the next step of the protocol.*

4. DNA Elution Place the **JETQUICK spin column** into a new 1.5 ml microfuge tube and add **50 μ l of sterile water** (or **buffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8.0**) directly onto the center of the silica matrix of the JETQUICK spin column. Centrifuge at **maximum speed** for **2 min**.

***Important:** Higher DNA concentrations will be obtained if the elution is carried out in only 30 μ l elution buffer volume. In this case, preheat your elution buffer to 65-70 °C, add the buffer onto the center of the silica matrix of the spin column and let stand for 1 min before centrifugation. Preheated elution buffer is generally recommended when larger DNA is eluted. DNA eluted in water should be stored at -20 °C.*

Příloha E: AFLP protokol (dle originálního Invitrogen protokolu)

1. Restrikce (AFLP Core Reagent Kit)

Pufr 1,0 µl

Eco RI/MseI 0,4 µl

ddH₂O 1,1 µl

Promíchat a přidat 2,5 µl DNA o pracovní koncentraci 50 ng/µl.

Inkubovat při 37°C 3 hodiny.

2. Ligace (AFLP Core Reagent Kit)

Adaptor solution 4,8 µl

T4 ligase 0,2 µl

Promíchat a přidat 5 µl ligační směsi k restrikci.

Inkubovat 37°C 10 hodin.

3. Preamplifikace (AFLP Pre-Amp Primer Mix I)

PA mix 4,0 µl

10 × Buffer with MgCl₂ 0,5 µl

Red *Taq* polymerase 0,1 µl

Promíchat a přidat 0,5 µl restrikční/ligační směs.

Cyklus:

72 °C 2:00 min.

94 °C 0:01 min.

56 °C 0:30 min. 20x opakovat

72 °C 2:00 min.

60 °C 30:00 min.

4. Selektivní amplifikace

ddH₂O 5,1 µl

10 × Buffer with MgCl₂ 1,0 µl

dNTP 0,2 µl

Eco RI primer 0,5 µl

Mse I primer 0,5 µl

Red *Taq* polymerase 0,2 µl

Promíchat a přidat 2,3 µl 10x naředěné preamplifikační směsi.

Cyklus:

94 °C 2:00 min.

65 °C 0:30 min.

72 °C 2:00 min.

94 °C 0:01 min.

64 °C 0:30 min. (-1°C/cyklus) 8x opakovat

72 °C 2:00 min.

94 °C 0:01 min.

56 °C 0:30 min. 23x opakovat

72 °C 2:00 min.

60 °C 30:00 min.