Izolacija genomske DNA iz zrna pšenice

Stilin, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:129560

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Anamarija Stilin

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer Hortikultura

Izolacija genomske DNA iz zrna pšenice

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Anamarija Stilin

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer Hortikultura

Izolacija genomske DNA iz zrna pšenice

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv.prof.dr.dc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura

Završni rad

Anamarija Stilin

Izolacija genomske DNA iz zrna pšenice

Sažetak:Pšenica je iza kukuruza druga najznačajnija žitarica iz porodice trava. Cilj ovog rada bio je uspješno izolirati genomsku DNA iz mljevenog zrna pšenice bez primjesa. Samo istraživanje provelo se u dvije faze: u prvoj fazi provedene su dvije metode izolacije DNA iz zrna pšenice, a to su modificirana CTAB metoda s dodatkom PVP i SDS metoda, a DNeasy® Plant Mini Kit test korišten je kao brza provjera kvalitete DNA . Druga faza sastoji se od spektrofotometrijske analize izolirane DNA. Modificirana CTAB metoda se pokazala kao najuspješnija s optimalnom čistoćom i koncentracijom izolirane DNA (A260/280 2,00 – 1,99, A260/230 2,19 – 2,34, koncentracija 97,10 – 181 ng/µL).

Ključne riječi: DNA, izolacija DNA, pšenica, CTAB metoda, SDS metoda, DNeasy® Plant Mini Kit, spektrofotometrijska analiza

23 stranica, 3 tablice, 20 slika, 17 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničjih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek
Under graduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Anamarija Stilin

Genomic DNA extraction from wheat grain

Summary: The wheat besides corn is the world the second most important crop of the grass family. The aim of this work was to successfully isolate genomic DNA from milled wheat grains without secondary methabolutes. The research was carried out in two phases: in the first phase were used two DNA isolation methods: modified CTAB method with PVP supplement and SDS method, and the DNeasy® Plant Mini Kit test was used as a quick DNA quality check. Second phase consist of spectrophotometric determination isolated DNA. Modified CTAB method was most successful generating optimal DNA quality and quantity results (A260/280 2.00 – 1.99, A260/230 2.19 – 2.34, concentration 97.10 – 181 ng/µL).

Keywords: DNA, DNA isolation, wheat, CTAB, SDS, DNeasy® Plant Mini Kit, Spectrophotometric analysis

23 pages, 3 tables, 20 figures, 17references

BSc Thesis is archived in Library of Agrobiotehnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty Agrobiotehnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. MATERIJAL I METODE 3
2.1.Biljni materijal 3
2.2. Priprema biljnog materijala 4
2.3. Otopine i puferi za izolaciju genomske DNA 5
2.4. Laboratorijski materijal i uređaji 7
2.5. Izolacija genomske DNA 8
2.5.1. Izolacija genomske DNA prema DNeasy® Kit 8
2.5.2. Izolacija genomske DNA prema modificiranoj CTAB metodi 10
2.5.3. Izolacija genomske DNA prema SDS metodi 13
2.6. Mjerenje čistoće uzoraka 15
3. REZULTATI I RASPRAVA 17
4. ZAKLJUČAK 20
5. POPIS LITERATURE 22

1. UVOD

Pšenica je najvažniji ratarski usjev i ona je najstarija i najznačajnija žitarica na svijetu. Uzgaja se na 23% svjetski obradivih površina. Pripada jednogodišnjim biljkama roda *Triticum*, iz porodice *Poaceae* (trave). Poznata je 10.000 godina i uzgajala se u Iraku, Maloj Aziji, Kini i Egiptu, a kasnije se počela uzgajati u Europi, Sjedinjenim Američkim državama i Australiji. U Hrvatskoj se na oplemenjivanju pšenice i stvaranju novih sorata najviše radi u Poljoprivrednom institutu Osijek i Bc institutu (Bc od Botinec) za oplemenjivanje bilja i proizvodnju bilja u Zagrebu. U Hrvatskoj je od 1945. godine (završetka II. Svjetskog rata)do danas priznato oko 200 domaćih, uglavnom ozimih sorata pšenice, a na 98% površina siju se visokorodne sorte domaćeg podrijetla (Hrvatska Enciklopedija). Prema podatcima FAO-a (FAOSTAT, 2010.) ili Organizacije za prehranu i poljoprivredu pšenica se u svijetu uzgajala na oko 217 milijuna hektara (Kovačević i Rastija, 2014.).

DNA ili deoksiribonukleinska kiselina je nasljedni materijal koji je prisutan u skoro svim živim bićima. Molekula DNA sastavljena je od dva polinukleotidna lanca, a svaki polinukleotidni lanac sastoji se od 4 različita nukleotida. Nukleotidi su građeni od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze. Dušične baze dijelimo na: adenin (A), timin (T), citozin (C) i gvanin (G). Fosfati (PO_4^{3-}) daju molekuli DNA negativan naboj zbog čega joj je svojstvo topljivosti u vodi dobro. (Pavlica, 2012.)

Tijekom godina provodile su se različite metode izolacije DNA. Pervaniz i sur. (2011.) izolirali su DNA iz lista i zrna žitarica pomoću modificirane CTAB (Cetil trimetilamonijev bromid) metode, a njihov je omjer apsorbanci A260/A280 između 1,93 i 2,27 što ukazuje da je DNA kontaminirama proteinima i polisaharidima. Datukishvili i sur. (2010.) proveli su izolaciju DNA iz soje, pšenice, ječma, zobi i kukuruznog brašna prema DNAeasy® Kit, Wizard® Kit i CTAB metodi i dobili omjer apsorbanci A260/A280 između 1,4 i 1,6 što ukazuje na kontaminiranost uzoraka proteinima. Xia i sur. (2019.) su koristeći modificiranu SDS (Natrij dodecil sulfat) metodu na soji izmjerili visoku čistoću DNA pomoću omjera apsorbanci A260/A280 koja je iznosila 1,86 i 1,94. Omjer apsorbanci A260/A280 kao i omjer apsorbanci A260/A230 varira od sorte do sorte i ovisi o čistoći izolirane DNA.

Kako bi se izolirana DNA mogla koristiti u genetskim istraživanjima ona mora biti čista i kvalitetna, a njezinu kvalitetu smanjuje prisutnost polisaharida, proteina i inhibitora DNA polimeraze (Tinin, alkaloidi i polifenoli). Zbog prisutnosti navedenih sekundarnih metabolita je uzorak DNA uveličan i nečist. DNA se može izolirati iz lista ili zrna biljaka. Najčešća je izolacija DNA iz listova pomoću tekućeg dušika koji smrzava tkivo i zbog čega se tkivo može usitniti do veličine praha. Kemijski sadržaj zrna je vrlo važan tijekom izolacije DNA jer tijekom izdvajanja pri velikoj količini je očitavanje čistoće DNA otežano. Zrno pšenice sadržava oko 66,4% ugljikohidrata, 13% bjelančevina, 3% celuloze, 1,5% masti, 1,7% mineralnih tvari i 14,4 % vode (Hrvatska Enciklopedija). Izolacija DNA iz zrna je zahtjevnija jer 80 do 90 % zrna čini endosperm s perifernim i unutarnjim dijelom. U perifernom dijelu endosperma nalaze se bjelančevine (albumin i globulin), ulja, pigment ksantofil, enzim dijastaza koji sudjeluje u procesu klijanja (razgradnje škroba), a u unutarnjem dijelu nalazi se škrobna zrnca i rezervne bjelančevine (glijadin i glutenin). U zrnu pšenice postoje dvije frakcije škroba, a to su amiloza koja je topljiva u vodi a čini 23-27% udjela u ukupnoj masi škroba i amilopektin koji se zagrijavanjem pretvara u škrobno ljepilo (Kovačić i Rastija, 2014.).

Cilj ovog istraživanja je izdvojiti genomsku DNA iz zrna pšenice komercijalno dostupnim testom za izolaciju DNeasy® Kit uz modificiranu CTAB metodu i SDS metodu.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

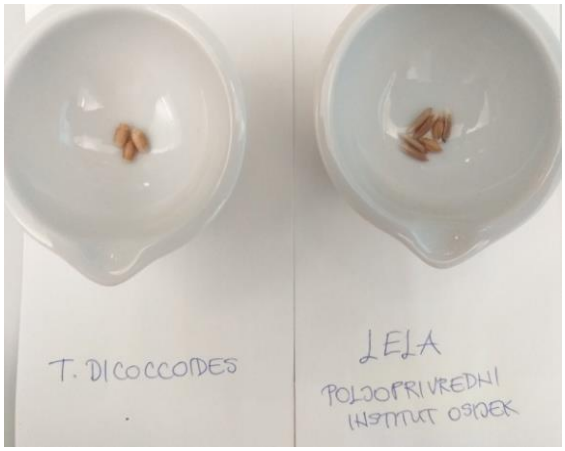
Prehrana čovječanstva postaje sve ozbiljniji problem jer količina proizvodnje hrane danas ne zadovoljava potrebe, a populacija ljudi na Zemlji se znatno povećava. Ratarske kulture kao što su pšenica, riža i kukuruz odnosno žitarice imaju glavnu ulogu u ishrani čovjeka. Prinos ovih kultura nije konstantan, mijenja se s vremenskim neprilikama ili ljudskom neaktivnošću. Iz godine u godinu mijenjaju se visine i kakvoće prinosa stoga je potrebno oplemenjivati sorte koje danas postoje kako bismo proizveli biljke viših i kvalitetnijih karakteristika. U ovome istraživanju su odabrane vrste pšenice *T. aestivum ssp. vulgare* i *T. turgidum ssp. dicoccoides* koje se razlikuju morfološki i fiziološki.

Triticum turgidum ssp. dvozni pir, nastala je križanjem *Triticum boeticum* AA genoma i *Triticum speltoides* BB genoma, što znači da ima genom kao i *Triticum durum*, a to je AABB. Otkrio ju je u Sjevernom Izraelu agronom i botaničar Aaron Aarosohum 1906. godine. Pripada divljim sortama pšenice i ona je tetraploidna (2n=4x=28). *T. dicoccoides* je divlji predak iz kojeg su dalje proizvedene kultivirane tetraploidne i heksaploidne sorte pšenice. Razmnožava se pretežito samooplodnjom. Od značajnih karakteristika *T. dicoccoides* koje su od poljoprivredne važnosti su otpornost na žutu ili prugastu hrđu (*Puccinia stiiformis West.*) i žitnu hrđu (*Puccinia graminis f. sp. tritici*) (Peng i sur., 2000.).

Lela je heksaploidna (2n=6x=42, *T. aestivum ssp. vulgare*) sorta ozime pšenice kreirana u Poljoprivrednom institutu Osijek. Priznata je 2006. godine u Hrvatskoj od Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva Republike Hrvatske. Rodnost ove sorte varira od 10-12 t/ha i ima visoka pekarska i mlinarska kvalitetna zrna. Prema ispitivanju Poljoprivrednog instituta u Osijeku srednje vrijednosti sorte Lela: visina biljke 82,3 cm, broj klasića/klasu 19,6 i broj zrna/klasu 43,3. Visina biljaka varira od 75-90 cm, te je sorta pokazala najveću hektolitarsku masu i masu 1000 zrna. Tijekom pokusa 2009 i 2010. Godine pokazalo se da je težina sorte Lela varirala od 68,7 kg/ha do 85,0 kg/ha (Drezner i sur., 2011.).

2.2. Priprema biljnog materijala

Zrno pšenice je dobiveno iz gen kolekcije žitarica Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Odvojena su zrna za izolaciju (slika 1) i samljeveno je u tarioniku, a potom je ponovno samljeveno u mlinu. Izvagano je 0.01 g samljevenog zrna koje se koristilo u istoj količini za svaku provedenu metodu izolacije DNA (slika 2).



Slika 1. Zrno *T. dicoccoides* i Lela
(foto original: A. Stilin)

Slika 2. Izvagano 0.01 g samljevenog zrna
(foto original: A. Stilin)

2.3. Otopine i puferi za izolaciju genomske DNA

Tijekom izolacije DNA korišteni su različiti pufere i otopine.

Puferi prema DNeasy® Kit:

AP1 pufer

AW1 pufer i AW 2 pufer

AE pufer

Izolacijski pufer prema CTAB metodi(prema Pervaiz i sur.,2011.), za 100 ml otopine:

2 g CTAB (F.W.=364,5)

100 mM 1M TRIS-HCl[iz 1M otopine, pH 8,0]

1.4 MNaCl (F.W.=58,44)

20 mM EDTA (iz 0,5M otopine, pH=8)

1% PVP (polivinilpirolidon 40,000)

Proteinaza K (50 μg/ ml)

CTAB ili Cetil trimetilamonijev bromid je kationski deterdžent čija je uloga odvojiti sadržaj unutarnje stanice. Uloga mu je odvajanje proteina i polisaharida iz nukleinskih kiselina (Plant Methods, 2019.).

Izolacijski pufer prema natrium bisulfit metodi, za 100 ml otopine:

10 ml TRISH-HCL (iz 1M otopine, pH 8,0)

10 ml EDTA (iz 0.5M otopine, pH 8,0)

10 ml NaCl (iz 5M otopine)

Otopina je autoklavirana.

Uloga SDS u izolacijskom puferu je razdvajanje bjelančevina od nukleinskih kiselina. Inhibira upotrebu nukleinskih kiselina nizvodno jer ne može spriječiti oksidaciju (Plant Methods, 2019.).

Fenol- kloroform - izoamilni alkohol (25:24:1), za 100 ml otopine:

96 ml kloroforma (F.W.=119,4)

4 ml izoamilnog alkohola (F.W.=88,15)

Fenol denaturira proteine. Kloroform povećava učinkovitost fenola tijekom denaturacije proteina , a omogućava odvajanje organske i vodene faze u kojoj se nalazi DNA i denaturira lipide. Izoamilni alkohol sprječava emulgaciju otopine i pjenjenje između interfaza (Genetic Education, 2019.).

1 M TRIS-HCL, pH 8,0, za 100 ml otopine:

12,11 g TRIS (F.W.=121,14) otopiti u cca. 80 ml

destilirane vode. Svesti ph na 8,0 s HCL (F.W.=36,46).

Otopina je autoklavirana.

Uloga Tris ili tris hidroksimetil aminometana je održavanje stabilne pH otopine, a njegovim korištenjem može se povećati propusnost stanične stijenke (Genetic Education, 2018.)

0,5 M EDTA, pH 8,0, za 1 litru otopine:

186,12 g EDTA (F.W.=372,24) otopiti u cca. 800 ml destilirane vode.

Otopinu je bilo potrebno dugo miješati i zagrijati na cca. 70-80˚C. pH vrijednost je svedena na pH 8,0, tek nakon hlađenja, otopina se titrirala s cca. 20 g NaOH. Otopina je autoklavirana.

EDTA ili Etilendiamintetraoctena kiselina djeluje kao kelatno sredstvo, a kelatira metalni ion u enzimima i tako deaktivira enzim. Tako smanjuje aktivnost DNaze i RNaze (Genetic Education, 2018.).

2.4. Laboratorijski materijal i uređaji

Prije početka postupka izolacije DNA bilo potrebno je pripremiti sav potreban materijal, počevši od radnog prostora koji mora biti čist i steriliziran, laboratorijskog pribora i uređaja te kemikalija koje će se koristiti. Od laboratorijskog pribora korišteni su: tarionici i tučak, pipete i odgovarajući nastavci, sterilizirane tubice, stalak za tubice, odmjerne tikvice i menzure i laboratorijske čaše (slika 3). Od ostalog pribor: špatule, kutije od stiropora u kojima su pomoću leda ohlađeni uzorci DNA. Zbog otrovnog plina kloroform-izoamilnog alkohola korišten je digestor koji sadrži jak ventilacijski sustav i usisava otrovne plinove koje pročišćava. Za zagrijavanje uzoraka i kemikalija korištena je vodena kupelj. Također je korištena vrtložna miješalica (vorteks) i centrifuga za dobivanje uzoraka (slika 4).

Slika 3. Laboratorijski pribor
(foto original: A. Stilin)

Slika 4. Centrifuga
(foto original: A. Stilin)

2.5. Izolacija genomske DNA

2.5.1. Izolacija genomske DNA prema DNeasy® Kit

DNeasy® Kit je komercijalni set reagensa tvrtke Qiagen za izolaciju DNA (slika 5). Korišten je radi vrlo dobre kvalitete i brze izolacije DNA. Postupak izolacije se izvodio na sobnoj temperaturi od 15 do 20 °C. Uzorci DNeasy® Kit metode mogu se uskladištiti i do godinu dana na sobnoj temperaturi.

1.Korak

U tubice od 2 ml stavljeno je 0.01 g samljevenog zrna i uliven je AP1 pufer. U promiješane tubice i dodano je 4 μL RNA-ze koja je prethodno centrifugirana 30 sekundi. Potom su tubice s uzorkom stavljene na vrtložnu miješalicu odnosno vortex (slika 5) radi bolje homogenizacije tkiva samog uzorka s puferom.

Slika 5. Komercijalni set reagensa tvrtke Qiagen

(foto original: A. Stilin)

Slika 6. Vortex

(foto original: A. Stilin)

2.Korak

Homogenizirani uzorci ostavljeni su u vodenoj kupelji 10 minuta na 65℃. Tijekom inkubacije uzorci su se preokretali kako se ne bi stvrdnuli na dnu tubice. Uzorcima je dodano 130 µL P3 pufera te su dobro promiješani. Uzorci su ostavljeni da se ohlade na ledu kako bi se detergenti, proteini i polisaharidi nataložili na dnu tubice. Nastala smjesa stavljena je u centrifugu 8 minuta na 13.200 rpm.

3. Korak

Nastala smjesa pretresena je u „QIAshredder“ tubice (slika 7). Uzorci su se centrifugirali 3 minute na 13.200 rpm i zatim je premješten gornji dio tubice na novu donju tubicu [Collection tubes (2ml)50] pazeći pritom da nastala peleta ostane na dnu tubice. Dodano je 1.5 volumena AW1 pufera i pomiješano pipetom.

4. Korak

Pipetom je preneseno 650 µL uzorka u DNeasy® mini „spin column“ (gornja tubica) u tubice od 2 ml. Uzorci su centrifugirani 1 minutu na 8.000 rpm. Tekući dio se odbaci. Dodano je preostalih 650 µL uzorka (slika 8). Uzorci su ponovno centrifugirani i tekući dio se odbaci.

Slika 7. „QIAshredder“tubice
(foto original: A. Stilin)

Slika 8. Dodavanje 650 µL uzorka DNA u tubice
(foto original: A. Stilin)

5. Korak

U mini „spin column“ tubice dodano je 500 µL AW2 pufera i centrifugirali su se uzorci4 minute na 13.200 rpm. Prenesen je „spin column“ na običnu tubicu od 2 ml. U „spin column“ tubici se kroz membranu otopio uzorak DNA pomoću 100 µL AE pufera (slika 9). Potom su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi i centrifugirani 1 minutu na 8.000 rpm. Uzorcima je ponovno dodan AE pufer te su inkubirani i centrifugirani.

Slika 9. Silikonska membrana kroz koju je otopljen uzorak DNA
(foto original: A. Stilin)

2.5.2. Izolacija genomske DNA prema modificiranoj CTAB metodi

Prije početka izolacije DNA dodano je 400 µL izolacijskog pufera u tubice s 0.01 g samljevenog zrna pšenice i ostavljene su u vodenoj kupelji 30 minuta na 65℃.

1. Korak

Uzorcima je dodano 500 µL fenol-kloroform-izoamilnog alkohola u omjeru 25:24:1 (slika 10) te su se promiješani i preokretali 10 minuta. Potom su uzorci ohlađeni na ledu. Nakon hlađenja uzorci su se centrifugirali 10 minuta na 12.000 rpm. Nakon centrifugiranja može se uočiti

tekuća faza u kojoj se nalazi DNA i kruta faza odnosno nastali disk u kojem se nalaze ostatci mljevenog zrna (slika 11). Pipetom je prenesena tekuća faza u nove tubice.

Slika 10. Dodavanje kloroform-izoamilnog alkohola (foto original: A. Stilin)

Slika 11. Nastali disk od ostataka zrna (foto original:A. Stilin)

2. Korak

Uzorcima je dodano 2/3 volumena ohlađenog izopropanola. Zatim su tubice ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta kako bi se stvorio talog DNA.

3. Korak

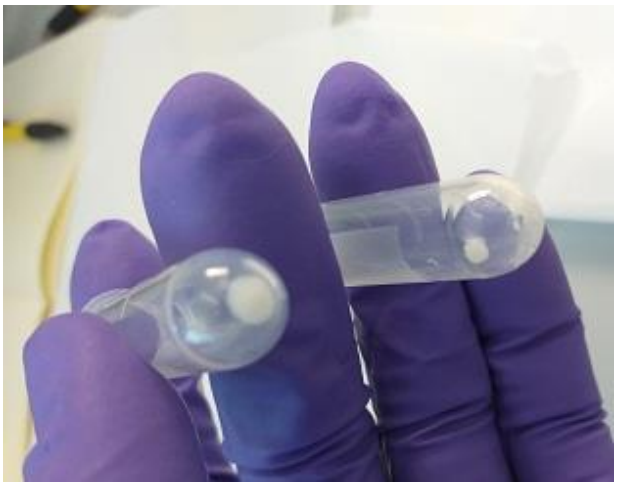
Tubice s nataloženom DNA ostavljene su u centrifugi 5 minuta na 12.000 rpm. Na dnu tubice stvorila se peleta stoga je izdvojena tekuća faza (slika 12). Uslijedilo je pranje peleta. Pelete su oprane s 500 µL 70% -tnog etanola lagano tresući tubice prstom. Centrifugirani su uzorci i izlivena je tekuća faza. Kako bi se uklonila RNA iz uzorka dodan je 1 µL RNA-ze pa su uzorci inkubirani 30 minuta na 37℃.

4. Korak

U uzorke je dodano 50 μL natrijeva acetata koji su stajali na sobnoj temperaturi 10 minuta. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 12.00 rpm nakon što im je dodano 500 µL 70% -tnog etanola. Tekuća faza se izlila stoga su pelete ostavljene na sušenju (slika 13). Sušenje peleta se radi kako bi se uklonio ostatak zaostalog etanola u tubici.

5. Korak

Kada su se pelete osušile i postale gotovo prozirne u tubice je dodano 100 µL TE pufera i pelete su se otopile. Nakon otapanja tubice su uskladištene u hladnjaku na 4℃.



Slika 12. Pelete DNA modificirane CTAB metode (foto original: A. Stilin)

Slika 13. Sušenje peleta (foto original: A. Stilin)

2.5.3. Izolacija genomske DNA prema SDS metodi

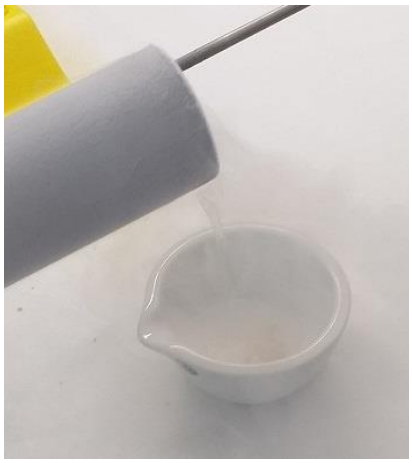
Metoda izolacije DNA prema SDS metodi je vrlo slična CTAB metodi prema Pervaiz i sur. U ovoj metodi koristi se SDS izolacijski pufer kojem se neposredno prije upotrebe dodaje Natrijev bisulfit.

1. Korak

Samljeveno je 0.01 g zrna pšenice u tarioniku s tekućim dušikom (slika 14) i uzorcima je dodan 1 ml izolacijskog pufera. Tubice su dobro promiješane na vorteksu radi bolje homogenizacije tkiva te su ostavljene u vodenoj kupelji 45 minuta na 65℃. Uzorci su se preokretali svakih 5 minuta (slika 15).

2. Korak

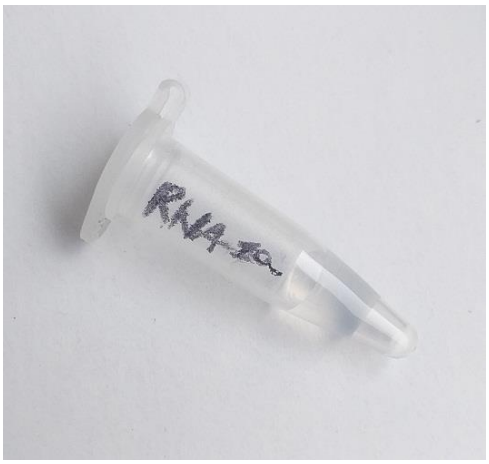
Ohlađenim uzorcima na ledu (slika 16) dodano je 670 µL kloroform- izoamilnog alkohola (omjera 24:1), promiješani su uzorci i ostavljeni su da odstoje 20 minuta. Uzorci su centrifugirani 13 minuta na 12.00 rpm-a. Pipetom je izvučeno 650 µL uzorka i preneseni su u novu tubicu. Uzorcima je dodano 20 µL RNA-ze (slika 17), promiješani su i inkubirani u vodenoj kupelji 20 minuta na 37 ℃.



Slika 14. Dodavanje tekućeg dušika (foto original: A. Stilin)

Slika 15. Preokretanje uzoraka (foto original: A. Stilin)

Slika 16. Hlađenje uzoraka na ledu
(foto original: A. Stilin)



Slika 17. RNA-za
(foto original: A. Stilin)

3. Korak

Uzorci su se prvo ohladili i dodano im je 650 µL 0,7 Vol izopropanola. Preokretali su se dok paučinasta DNA nije postala vidljiva. Zatim su centrifugirani 2 minute na 11.000 rpm-a i nakon toga izliven je tekući dio iz tubica.

4. Korak

Uslijedilo je pranje peleta. Dodano je 500 µL 0,2 M natrij-acetata u 76 % etanolu uzorcima, a prali su se 30 minuta lagano tresući tubice prstom. Nakon pranja uzorci su se centrifugirali 5 minuta na 11.000 rpm-a pa je izliven tekući dio. Ovaj dio postupka se ponavljao uz korištenje 500 µL 10 mM amonij acetata u 76 % etanolu.

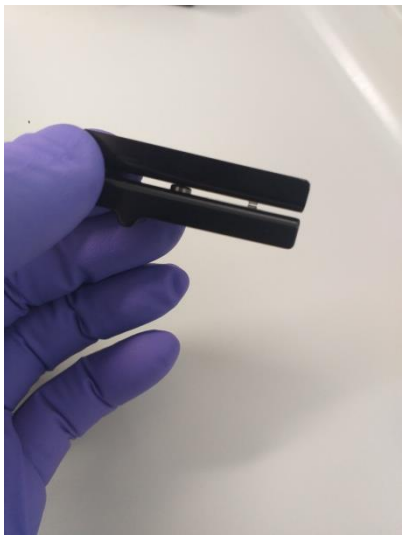
5. Korak

Tubice s peletama ostavljene su otvorene 45 minuta da bi se osušile te kako bi preostali etanol ishlapio. Nakon toga uzorci su otopljeni sa 100 µL $TE_{0,1}$ pufera. Uzorci su uskladišteni u hladnjaku na -20 ℃.

2.6. Mjerenje čistoće uzoraka

Za mjerenje čistoće dobivenih uzoraka DNA korišten je Eppendorf BioPhotometar D30 odnosno spektrofotometar koji utvrđuje standarde analiziranih uzoraka (slika 18). Ovaj uređaj omogućuje jednostavno i brzo programiranje te na zaslonu korisnicima uz jednostavne upute pomaže odabrati jedinice koje su im potrebne za dobivanje podataka koji će im dalje koristiti u analizi. Svi podatci, obrađeni i neobrađeni su jasno vidljivi na zaslonu. Pomoću UV kiveta mjeri se čistoća uzoraka (slika 19). Spektrofotometar je uređaj koji se koristi za određivanje UV,VIS i IR dijela spektra. Njime kvantitativno određujemo frakciju svjetla koja prolazi kroz otopinu čija se čistoća određuje. Mjerenje obično traje 5 sekundi i za vrijeme mjerenja svjetlost prolazi kroz uzorak i njenim se intenzitetom pomoću senzora izračunava njezina emisija. Odnosi vrijednosti apsorbance na valnim duljinama 230, 260 i 280 nm (260 nm / 230 nm i 260 nm / 280 nm). Vrijednosti apsorbancija na valnim duljinama 230, 260 i 280 nm daju jasne podatke o čistoći uzoraka. Vrijednosti čistog uzorka DNA su: A 260/ A 230 ≥ 2.0, A 260/ A 280 = 1,8 -2,0. Valne duljine u velikoj mjeri ovise o pH vrijednosti. Nukleinske kiseline se po pravilu ne smiju mjeriti u vodi ali se smiju mjeriti u vrijednosti od 7- 7,2 pH (npr. TE pufer) (Eppendorf Uputstvo za upotrebu).

Slika 18. Spektrofotometar
(foto original: A. Stilin)



Slika 19. UV kiveta za mjerenje čistoće uzoraka
(foto original: A. Stilin)

Prije analize uzoraka u spektrofotometru se prvo odradio test sa slijepom probom (TE pufer). Nakon što se utvrdilo da su valne duljine 0 započinje se s analizom uzoraka. Prije pipetiranja uzoraka svaki je uzorak je bilo potrebno prvo promiješati, a zatim pipetom u količini 2,5µlprenijeti na UV kivetu. Uzorak je postavljen tako da se u središnji krug koji je označen na staklenom dijelu kivete otpipetira uzorak u obliku kapljice. Uzorak ne smije prelaziti crtu kruga i mora se spojiti sa suprotnom stranom kivete kada se ona sklopi. Tada je uzorak stavljen u spektrofotometar (slika 20.) kojem se prije uporabe namjeste željeni naziv, datum i ostale opcije (Kappler-Hanno i sur., 2015.).

Slika 20. Postavljanje UV kivete u spektrofotometar
(foto original: A. Stilin)

Dobivene rezultate zabilježimo i nastavimo s daljnjom analizom ponavljajući navedeni postupak. Vrlo je važno da prije svake uporabe UV kivete potrebno ju je oprati s Mili-Q® vodom. Mili-Q® vodom se peru kivete jer iza nje ne ostaju nikakve supstance na kiveti i dobiva se čisti uzorak. Mili-Q® vodu dobivamo iz Mili-Q® Integral uređaja kojim dobivamo čistu i ultračistu vodu.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Svaka biljka ima različit kemijski sastav, ali većina ih sadrži elemente koji onemogućuju mjerenje čistoće DNA za daljnja istraživanja. Mnogo spojeva ne dopušta poboljšavanje molekule DNA kao što su polisaharidi, lipidi i polifenoli. Da navedene molekule ne inhibiraju poboljšavanje DNA ona bi mola stvoriti nova snažnija svojstva koja bi bila otpornija na abiotičke i biotičke čimbenike. Poboljšana svojstva bi omogućila veću otpornost na različite vremenske ne prilike kao što su suša, preobilne kiše te veća otpornost prema štetnicima i bolestima stoga su danas utjelovljene oplemenjivačke organizacije koje tijekom svoga rada pokušavaju i uspijevaju promijeniti svojstva DNA kako bi se stvorile biljke s boljim poboljšanim svojstvima. Sam postupak izolacije DNA je kompliciran jer dolazi do stvaranja kompleksa nukleinskih kiselina s polifenolima i polisaharidima. DNA u kojem dođe do nastanka takvih kompleksa nisu pogodna za PCR amplifikaciju. (Rezadoost i sur., 2016.)

Kako bi se izolirala DNA iz zrna korišten je komercijalno dostupan DNeasy® Kit zbog vrlo brzog postupka koji traje u prosjeku 3 sata, zatim su korištene dvije uobičajene metode: modificirana CTAB metoda i SDS metoda. Postupci izolacije DNA u ovom radu su relativno brzi i jednostavni, a uključuju sve potrebne elemente za izolaciju kvalitetne i čiste DNA. Cilj istraživanja bio je dobiti reprezentativne uzorke izolirane DNA iz samljevenog zrna pšenice. U oba dvije metode izolacije DNA dobivena je peleta koja se prvo sušila na sobnoj temperaturi dok peleta DNA nije postala gotovo prozirna, a poslije toga se otapala u puferu. U metodama su korišteni različiti puferi. Uzorak sorte Lela prema SDS metodi i nije se u potpunosti osušio i bio je bijele boje. Ako se uzorak ne osuši i ne postane proziran to znači da je kontaminiran suviškom proteina, polisaharida, lipida i dr. Nakon što su se pelete DNA otopile uslijedila je analiza uzoraka spektrofotometrom.

Tijekom analize korištene su valne duljine od 230, 260 i 280 nm. U uzorcima DNA normalan omjer apsorbancija valnih duljina između 260 i 280 nm trebao bi biti između 1,8 do 2,0. Ako je omjer apsorbanci manji od 1,8 uzorak sadržava veću količinu sekundarnih metabolita od normale, a ako je omjer veći od 2,0 tada se uzorku nalazi višak etanola koji nije otpipetiran ili nije ispario tijekom sušenja peleta (Kappler-Hanno i sur., 2015.). Učinkovitost provedenih

postupaka izolacije DNA i njegova čistoća prikazani su s dobivenim rezultatima valnih duljina A260/A280 i A260/A230 nm.

Dobiveni podatci za DNAeasy® Kit navedeni su u tablici 1, podatci za SDS metodu prikazani su u tablici broj 2,a podatci za modificiranu CTAB metodu prikazani su u tablici 3.

Tablica 1. Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu DNeasy® Kit

	Omjer A260/A280	Omjer A260/A230	Koncentracija DNA u ng/μL
T. dicoccoides	2,14	2,52	56,73
Lela	2,23	2,54	6,96

Tablica 2. Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu SDS metode

	Omjer A260/A280	Omjer A260/A230	Koncentracija DNA u ng/μL
T. dicoccoides	1,98	2,30	79,21
Lela	1,03	1,99	31,13

Tablica 3. Čistoća i koncentracija izolirane DNA prema protokolu modificirane CTAB metode

	Omjer A260/A280	Omjer A260/A230	Koncentracija DNA u ng/μL
T. dicoccoides	2,00	2,19	97,10
Lela	1,99	2,34	181

Spektrofotometrijskom analizom dokazano je i odstupanje u valnim duljinama A260/A230 čiji omjer treba biti veći od 2,0. Razlozi zbog kojih bi omjer između valnih duljina A260/A230 bio niži nego što je normalno su: preostali ugljikohidrati, nataložen glikogen, rezidue fenola i gvanina. A ako je omjer viši od 2,5 vjerojatno je došlo do greške pri stavljanju uzorka na UV kivetu. Uzorak nije prenesen direktno na središnju kružnicu ili kiveta nije dobro očišćena.

Prema modificiranoj CTAB metodi prema Pervaiz i sur. (2011.) dobiveni su podatci prema kojima možemo očitati kvalitetu DNA. Omjer između apsorbanci A260/A280 korišten je kako bi procijenili čistoću DNA te je njihov omjer unutar granica visoke čistoće od 1,99 do 2,00, a Pervaiz i sur. očitali su omjer od 1,93 do 2,27 što ukazuje na neznatnu razinu kontaminacije DNA proteinima (tirozina i triptofana) i polisaharidima.

Datukishvili i sur. (2010.) su proveli izolaciju genomske DNA prema DNeasy® Kit, Wizard® Kit i CTAB metodi. Izolaciju DNA proveli su na soji (*Glycine max*.), pšenici (*Triticum aestivum*), ječmu (*Hordeum vulgare*), zobi (*Avena sativa*) i na kukuruznom brašnu (*Zea mays*). Koristeći spektrofotometrijsku analizi nakon sve tri metode utvrdili su da DNA nije bila kontaminirana s RNA, a to dokazuje omjer apsorbanci A260/A280 koji je iznosio 1,9. Očitali su omjer između apsorbanci A260/A280 prema Wizard® Kit i CTAB metodi u nekoliko uzoraka DNA te je iznosio između 1,4 i 1,6 što ukazuje da su uzorci kontaminirani proteinima dok uzorci koji su dobiveni prema modificiranoj CTAB metodi ukazuju na visoku čistoću DNA. Iako je korišten DNeasy® Kit radi provjere čistoće DNA omjer između apsorbanci A260/A280 od 2,14 do 2,23 ukazuje na višak etanola koji je ostao u uzorku, a prema Datukishvili i sur. najveću čistoću DNA dobili su prema ovoj izolaciji i omjer njihovih apsorbanci A260/A280 iznosio je između 1,6 do 1,8.

Protokol izolacije DNA iz klijavog zrna pšenice *Triticum aestivum* proveli su Mohammadi i sur. (2012.) temeljem na činjenici da klijavo zrno ne sadrži polisaharide i polifenole. Koristeći Nanodrop ND-1000 izmjerili su omjer apsorbanci A260/A280 između 1,60 do 1,82 što ukazuje na vrlo dobru čistoću DNA. Dobili su omjer apsorbance A260/A230kojije nešto niži, između 1,2 do 1,82, a omjer kod sve tri metode koje su provedene u laboratoriju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek ove apsorbance su bile više od 2,0 što je prema pravilima uredu. Niži omjer apsorbanci A260/A230 može biti i posljedica veće količine NaCl u izolacijskom puferu ili ono ukazuje na povećanu količinu polisaharida ili ostatka etanola.

Prema modificiranoj SDS metodi Xia i sur. (2019.) proveli su izolaciju DNA na sjemenu soje. Omjer apsorbanci A260/A280 soje iznosi između 1,86 i 1,94 što ukazuje na visoku čistoću DNA, a omjeri apsorbanci koji su dobiveni u laboratoriju fakulteta mjereći čistoću DNA prema SDS metodi iznose 1,99 i 2,30 i to ukazuje na višak etanola u uzorcima DNA.

4. ZAKLJUČAK

Prema dobivenim kvalitativnim i kvantitativnim podatcima ovog istraživanja utvrdili smo da se komercijalno dostupnim testom za izolaciju DNA, DNeasy® Kit, ne mogu dobiti čisti uzorci već su oni malo izvan granica omjera valnih duljina A260/A280 što nam govori da se u uzorcima nalazi višak etanola. Prema podatcima uzoraka SDS metode možemo zaključiti da uzorci prema omjeru A260/A280 sadržavaju veću količinu sekundarnih metabolita, dok nam podatci za omjer A260/A230 koji su nešto niži govore da je preostalo ugljikohidrata u uzorcima. Izolacijom DNA prema CTAB metodi s modifikacijama dobili smo podatke koji zadovoljavaju kriterije odnosno nalaze se unutar granica omjera zadanih valnih duljina (A260/280 2,00 – 1,99, A260/230 2,19 – 2,34, koncentracija 97,10 – 181 ng/µL). Prema postupcima izolacije genomske DNA iz zrna pšenice i dobivenih podataka zaključili smo da iz brzih metoda izolacije možemo dobiti približnu kvalitetu izoliranih uzoraka i da je modificirana CTAB metoda prikladnija metoda izolacije jer je kvaliteta i čistoća DNA visoka.

5. POPIS LITERATURE

1. Pavlica, M. (2012.): Geni, DNA i kromosomi. U: Mrežni udžbenik iz Genetike: 1. Genetika- Zakoni o nasljeđivanju. Pavoković, D. (ur.), Sveučilišna Naklada Liber, Zagreb http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl1.html Datum pristupa: 15.06.2019.
2. Hrvatska Enciklopedija, Mrežno izdanje: Pšenica (22.06.2012.). Leksikografski zavod Miroslava Krleže.
3. Kovačević, V., Rastija, M. (2014.): Žitarice, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 1-15.
4. Tomasović, S., Javor, P., Sesar, B., Havrda, S. (1995.): Rad na oplemenjivanju tvrde pšenice ozimog tipa (*Triticum durum Defs.*) u Hrvatskoj. Sjemenarstvo, 12(95)6: 402.
5. Peng, J., Korol, A. B., Fahima, T., Roder, M. S., Ronin, Y. I., Li, Y. C., Nevo, E. (2000.): Molecular Genetic Maps In Wild Emmer Wheat, *Triticum dicoccoides*: Genome-Wild Coverage, Massive Negative Interference, and PutativeQuasi-Linkage. PMC Journals,10 (10): 1509-1531. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310947/ Datum pristupa: 19.06.2019.
6. Španić, V., Drezner, G., Dvojković, K., Marić, S., Guberac, V. (2011.): Response of winter wheat genotypes to different environmental conditions / Climate change: challenges and opportunities in agriculture, Otto Veisz (ur.), Budimpešta. Poljoprivredni istraživački institut Mađarske akademije znanosti, 340-343.
7. Peng, J. (2013): Gene discoveryin *T. dicoccoides*, the Direct Progenitor of Cultivated Wheat. Cereal research communications, 41(1): 1-22.
8. Barbier, F. F., Chabikwa, T. G., Ahsan, M. U., Cook, S. E., Powell, R., Tanurdzic, M., Beveridge, C. A. (2019.): A phenol / chloroform free method to extract nuceleic acids

from recaleitrant, woody tropicals species for gene expression and sequencing. Plant Methods, 15: 62.

9. Chauhan, T. (2018.): Importance of Tris- EDTA (TE) bufferin DNA extraction. Genetic Education, 42:26.
10. Chauhan, T. (2018.): Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparationof Chemicals and Protocol. Genetic Education, 42: 29.
11. Pervaiz, Z. H., Turi, N. A., Khaliq, I., Rabbani, M.A., Malik, S.A. (2011): A modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. Genetics and Molecular Research, 10 (3): 1669-1673.
12. Eppendorf (2015.): Uputstvo za upotrebu Spektrofotometra
13. Datukishvili, N., Gabridadze, I., Kutateladze, T., Karseladze, M., Vishnepolsky, B. (2010.): Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops. International Journal of Food Science and Technology, 45: 1316-1320.
14. Mohammadi, M., Torkamaneh, D., Hashemi, M., Mehrabi, R., Ebrahimi, A. (2012.): Fast and inexpensive DNA isolation from wheat (Triticum aestivum) and another small grains. Wheat Information Service, 114: 17-20.
15. Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Bu, G., Xin, Y., Lin, B., Liu, C. (2019.): A modified SDS-based DNA extraction method from raw soy bean. Bioscience Reports, 39:2.
16. Kappler-Hanno, K., Armbrect-Ihle, M., Kubasch, R. (2015.): Vodič za rješavanje problema s mjerenjima nukleinskih kiselina pomoću Eppendorf BioPhotometer D30 i Eppendorf BioSpectrometer. DOC Player, 13:6.
17. Rezadoost, M. H., Kordrostami, M., Kumleh, H.H. (2016.): Anefficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. PMC Journals, 6(1):61.