

Utjecaj metode izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze

Dobiš, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:583454>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Lovro Dobiš

Stručni prijediplomski studij Vinogradarstvo-vinarstvo-voćarstvo

Utjecaj metode izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Lovro Dobiš

Stručni prijediplomski studij Vinogradarstvo-vinarstvo-voćarstvo

Utjecaj metode izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. doc. dr. sc. Sunčica Kujundžić, mentor
2. prof. dr. sc. Sonja Petrović, član
3. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, član

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Stručni prijediplomski studij Vinogradarstvo-vinarstvo-voćarstvo

Završni rad

Lovro Dobiš

Utjecaj metode izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze

Sažetak: Izolacija DNA predstavlja ključni korak u provedbi molekularnih i genetskih analiza. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih metoda izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze. Istraživanje je provedeno na pet različitih sorti vinove loze (Graševina, Merlot, Frankovka, Chardonnay, Sauvignon bijeli). Genomska DNA izolirana je iz mladih listova vinove loze. Za izolaciju genomske DNA iz tkiva lista vinove loze korištene su četiri različite metode izolacije: metoda A (Nucleo Spin Plant II, PL1), metoda B (Nucleo Spin Plant II, PL2), metoda C (CTAB + 2-merkapttoetanol) i metoda D (CTAB + PVP-40). Koncentracija i čistoća izolirane DNA provjerene su korištenjem spektrofotometra i horizontalne elektroforeze. Najmanja prosječna koncentracija DNA uzoraka zabilježena je kod metode A, a najveća prosječna koncentracija DNA zabilježena je kod metode C. Svi uzorci imali su dobar omjer apsorbanci A260/A280. Svi uzorci osim onih iz metode D imali su dobar omjer apsorbanci A260/A230. Elektroforezom je potvrđena zadovoljavajuća kvaliteta uzoraka.

Ključne riječi: metoda izolacije, kvaliteta DNA, vinova loza

22 stranice, 5 tablica, 12 slika, 15 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Professional study Viticulture-Oenology-Pomology

Final work

Lovro Dobiš

Influence of the extraction method on DNA quality in grapevine

Summary: DNA extraction represents a key step in the implementation of molecular and genetic analyses. The aim of this research was to examine the influence of different extraction methods on DNA quality in grapevines. The research was conducted on five different grape varieties (Graševina, Merlot, Frankovka, Chardonnay, Sauvignon blanc). Genomic DNA was extracted from young vine leaves. Four different extraction methods were used to extract genomic DNA from grapevine leaf tissue: method A (Nucleo Spin Plant II, PL1), method B (Nucleo Spin Plant II, PL2), method C (CTAB + 2-mercaptoethanol) and method D (CTAB + PVP-40). The concentration and purity of the extracted DNA was checked using a spectrophotometer and horizontal electrophoresis. The lowest average concentration of DNA samples was recorded with method A, and the highest average concentration of DNA was recorded with method C. All samples had a good A260/A280 absorbance ratio. All samples except those from method D had a good A260/A230 absorbance ratio. The satisfactory quality of the samples was confirmed by electrophoresis.

Key words: extraction method, DNA quality, grapevine

22 pages, 5 tables, 12 figures, 15 references

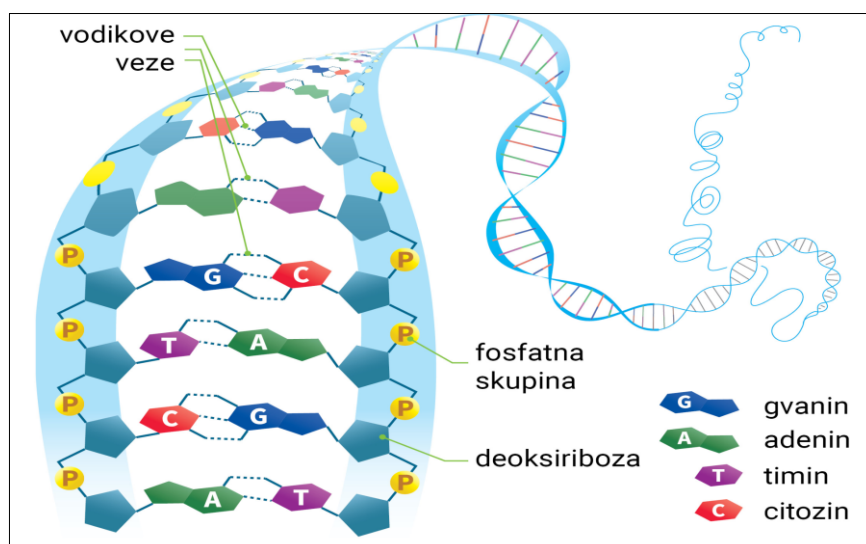
Final work is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Agrobiotechnical Sciences Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj istraživanja.....	3
2. MATERIJAL I METODE.....	4
2.1. Biljni materijal.....	4
2.2. Izolacija DNA.....	4
2.2.1. Metoda izolacije A	5
2.2.2. Metoda izolacije B	7
2.2.3. Metoda izolacije C	8
2.2.4. Metoda izolacije D	10
2.3. Provjera kvalitete DNA.....	11
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	13
4. ZAKLJUČAK.....	20
5. POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

DNA (deoksiribonukleinska kiselina) je molekula koja sadrži biološke upute neophodne za rast, razvoj, preživljavanje i reprodukciju svih živih organizama. DNA je građena kao dvostruka uzvojnica, a prvi koji su predložili takav model DNA bili su Watson i Crick (Slika 1). Molekula DNA sastoji se od dva lanca koji su građeni od nukleotida. Svaki nukleotid sastoji se od dušične baze, šećera deoksiriboze i fosfatne skupine. Nukleotidi su međusobno povezani kovalentnom vezom između fosfatne skupine jednog nukleotida i šećera deoksiriboze drugog nukleotida. Četiri dušične baze (adenin – timin, gvanin - citozin) međusobno su povezane vodikovim vezama. Ovakvo vezanje uzrokuje da se dva lanca spiralno okreću jedan oko drugoga u obliku dvostruke uzvojnice (Molnar i Gair, 2015.).



Slika 1. Građa molekule DNA (<https://edutorij.e-skole.hr>)

Izolacija genomske DNA visoke kvalitete neophodna je za provedbu većine molekularnih i genetskih analiza te je kao takva od ključnoga značaja. Do danas je razvijen veliki broj različitih metoda izolacije koje su prilagođene različitim biljnim vrstama i različitim tipovima biljnoga tkiva (Lemke i sur., 2011.).

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) i njoj bliske vrste sve više su predmet opsežnih genetskih istraživanja zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti i globalnoj važnosti vinove loze (Nazhad i sur., 2008.). Genom vinove loze (*Vitis vinifera* L.) je diploidan ($2n=38$) i relativno male veličine (499 Mb) (Adam-Blondon, 2014.). Unatoč tome, izolacija DNA iz vinove loze je

otežana zbog prisutnosti nečistoća kao što su polifenoli i polisaharidi, a koji imaju sposobnost vezanja za nukleinske kiseline tijekom procesa izolacije (Nazhad i sur., 2008.).

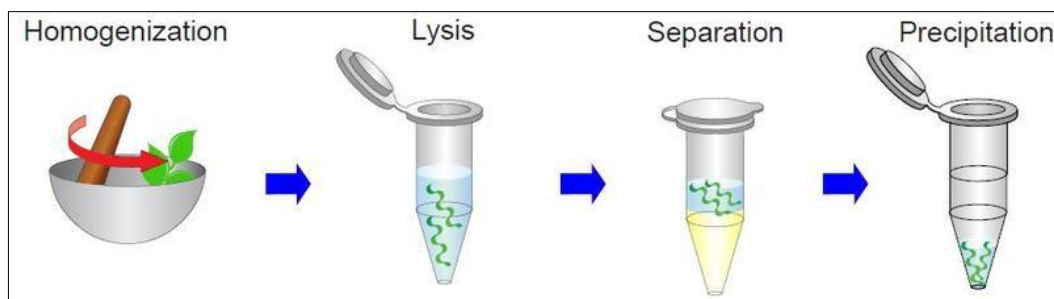
Dobar izolacijski protokol trebao bi omogućiti dobivanje čiste, intaktne i funkcionalne DNA kao i dobar prinos DNA. Također, protokol treba biti brz i jednostavan, ekonomski isplativ i pouzdan (Marsal i sur., 2013.).

Uspješnost izolacije DNA među ostalim ovisi o vrsti tkiva iz kojeg se provodi izolacija, uvjetima čuvanje biljnog materijala te o sastavu izolacijskog pufera. DNA se može izolirati iz različitih biljnih dijelova kao što su sjeme, listovi, korijen, kalus, endosperm i dr., uz nužnu optimizaciju protokola ovisno o vrsti korištenog tkiva (Öner i sur., 2023.).

Za izolaciju DNA iz vinove loze najčešće se koristi tkivo mladih listova. Njihova glavna prednost je lakoća rukovanja u laboratorijskim uvjetima, a glavni nedostatak ovisnost o biološkom ciklusu biljke te potreba za hlađenjem uzoraka tijekom transporta. S druge strane, tkivo sjemena ili stabljike dostupnije je tijekom godine, lakše se transportira, ali je izolacija DNA iz takvog tkiva znatno zahtjevnija (Marsal i sur., 2013.).

Izolacija DNA iz starijih listova vinove loze teža je nego kod mladih listova, budući da stariji listovi sadrže više sekundarnih metabolita kao što su polisaharidi, polifenoli i tanini (Lo Piccolo i sur., 2012.)

Postupak izolacije DNA (Slika 2) sastoji se u pravilu od homogenizacije tkiva, razgradnje (lize) stanične i jezgrine membrane kako bi se oslobodio sadržaj stanice i njena DNA, odvajanja molekule DNA od ostalih primjesa koje se nalaze u staničnom lizatu (lipidi, proteini, druge nukleinske kiseline) te izdvajanja, taloženja i pročišćavanja DNA (Dairawan i Shetty, 2020.).



Slika 2. Pojednostavljena shema izolacije DNA (<https://www.bio-helix.com/>)

Uspješnost samog postupka izolacije uvelike ovisi o kvaliteti i specifičnostima pojedinih kemikalija i reagensa koji se koriste za izolaciju. Razumijevanje njihove uloge ključno je za optimizaciju postupka izolacije DNA te osiguravanje visoke kvalitete izolirane DNA (<https://www.excedr.com/>).

Za procjenu prinosa i čistoće DNA najčešće se koristi spektrofotometrijska metoda gdje se određuju omjeri apsorbanci A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Omjer A_{260}/A_{280} koji se kreće u rasponu od 1,8 do 2,0 obično se smatra optimalnim, odnosno ukazuje na čistu DNA. Omjer A_{260}/A_{230} trebao bi se kretati u rasponu od 2,0 do 2,2. Odstupanje od navedenih vrijednosti ukazuju na prisutnost različitih primjesa koje mogu onečistiti uzorak DNA. (<https://www.thermofisher.com/hr>). DNA se može ispitati i elektroforetskom metodom, gdje je u gelu moguće uočiti primjese koje migriraju na drugačiji način od same DNA.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih metoda izolacije na kvalitetu DNA kod vinove loze.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na pet različitih sorti vinove loze (Graševina, Merlot, Frankovka, Chardonnay, Sauvignon bijeli) koje su dio pokusnog nasada Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (Slika 3).



Slika 3. Pokušalište Mandićevac Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (Dobiš, L.)

2.2. Izolacija DNA

Genomska DNA izolirana je iz mladih listova vinove loze koji su prikupljeni u travnju 2024. godine na Pokušalištu Mandićevac (FAZOS). Listovi su do početka izolacije čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

Za izolaciju genomske DNA iz tkiva lista vinove loze korištene su četiri različite metode izolacije koje smo označili slovima A, B, C i D.

2.2.1. Metoda izolacije A

Izolacija je provedena pomoću komercijalnog kita **Nucleo Spin Plant II** (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) sa pripadajućim kemikalijama i tubicama. Za lizu stanica korišten je pufer **PL1 na bazi CTAB-a** (cetiltrimetilamonijev bromid).

Izolacija je provedena prema protokolu koji je dobiven od strane proizvođača, uz manje modifikacije. Postupak je opisan u nastavku:

- Prije same izolacije u pufer PW2 dodan je etanol prema uputama proizvođača, a u liofiliziranu RNAzu A dodana je voda.
- Cca. 70 mg tkiva lista homogenizirano je u tarioniku uz pomoć tučka i tekućeg dušika (Slika 4).
- U homogenizirano tkivo tj. prah dodano je 400 µl PL1 pufera, a uzorci su zatim kratko vorteksirani.
- U uzorke je dodano 10 µl RNAze A te su uzorci promiješani.
- Uzorci su stavljeni 30 minuta u vodenu kupelj na 65 °C.
- Nucleo Spin Filter postavljen je u tubice od 2 ml te je u njih usipan lizat. Tubice su centrifugirane 2 minute na 11 000 x g nakon čega je prikupljen filtrat, a odbačen Nucleo Spin Filter.
- Budući da je u filtratu bila vidljiva peleta čisti superNAtant prenesen je u nove tubice.
- U uzorke je zatim dodano 450 µl PC pufera koji služi za vezanje DNA te su uzorci kratko vorteksirani.
- U nove tubice od 2 ml postavljena je Nucleo Spin Plant II Column membrana te je dodano cca. 700 µl uzorka. Uzorci su potom centrifugirani 1 minutu na 11 000 x g, a filtrat je odbačen.
- Na Nucleo Spin Plant II Column membranu dodano je 400 µl PW1 pufera za ispiranje. Uzorci su stajali 2 minute na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirani 1 minutu na 11 000 x g. Filtrat je odbačen.

- Na Nucleo Spin Plant II Column membranu dodano je 700 μ l PW2 pufera za ispiranje. Uzorci su stajali 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirani 1 minutu na 11 000 x g. Filtrat je odbačen.
- Na Nucleo Spin Plant II Column membranu dodano je 200 μ l PW2 pufera za ispiranje. Uzorci su stajali 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirani 2 minute na 11 000 x g. Filtrat je odbačen.
- Nucleo Spin Plant II Column membrana prebačena je u novu tubicu od 1,5 ml. Na membranu je dodano 50 μ l PE pufera koji služi za eluiranje DNA (pufer je prethodno zagrijan na 65 °C).
- Uzorci su inkubirani 5 minuta na 65 °C, a potom centrifugirani 1 minutu na 11 000 x g.
- Postupak elucije je ponovljen s dodatnih 50 μ L PE pufera u istoj tubici.



Slika 4. Homogenizacija tkiva pomoću tekućeg dušika (Dobiš, L.)

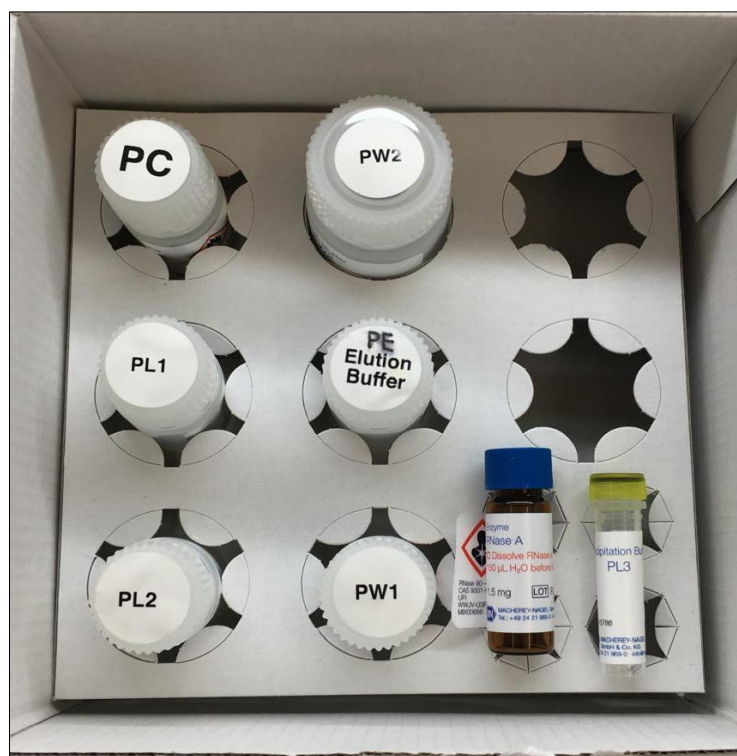
2.2.2. Metoda izolacije B

Izolacija je provedena pomoću komercijalnog kita **Nucleo Spin Plant II** (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG), koji je korišten i za provedbu metode A (Slika 5). Međutim, umjesto pufera PL1, za lizu stanicu ovdje je korišten pufer **PL2 na bazi SDS-a** (natrijev dodecil sulfat).

U nastavku je prikazan postupak lize stanica:

- Nakon homogenizacije tkiva (cca. 70 mg tkiva lista), dobiveni prah prebačen je u nove tubice kojima je dodano 300 µl pufera PL2. Uzorci su kratko vorteksirani.
- U uzorke je dodano 10 µl RNaze A te su uzorci promiješani.
- Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji 30 minuta na 65 °C.
- Nakon toga u uzorke je dodano 75 µl PL3 pufera za taloženje. Uzorci su promiješani i inkubirani 5 minuta na ledu.

Nakon provedene lize stanica dobiveni lizat prebačen je na Nucleo Spin Filter te je daljnji postupak izolacije DNA bio identičan onome koji je prikazan kod metode izolacije A.



Slika 5. Kit za izolaciju DNA (Dobiš, L.)

2.2.3. Metoda izolacije C

Otopine korištene za izolaciju i njihova priprema opisani su u nastavku:

-> **2 % CTAB pufer** (100 ml) pripremljen je miješanjem 2 g CTAB-a, 10 ml 1M TRIS-HCl (pH 8,0), 8,18 g NaCl i 4 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0). Tekućina je filtrirana te je neposredno prije izolacije u digestoru dodano 0,2 ml **2-merkaptetanola**.

1 M TRIS-HCl (pH 8,0) pripremljen je s 12,11 g TRIS-a koji je otopljen u cca. 80 ml dvostruko destilirane vode. pH je sveden na 8,00 koncentriranom HCl. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom. Otopina je autoklavirana.

0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) pripremljena je otapanjem 18,61 g Na₂EDTA u cca. 50 ml dvostruko destilirane vode uz dugo miješanje i grijanje. Nakon što je otopina ohlađena dodano je 2 g NaOH pločica. Otopina NaOH korištena je za titraciju. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom. Otopina je autoklavirana.

-> **Kloroform izoamilni alkohol 24:1** (100 ml) pripremljen je miješanjem 96 ml kloroforma i 4 ml izoamil alkohola u digestoru).

-> **RNAza A** (10 mg/ml) pripremljena je otapanjem 100 mg RNAze A u 10 ml TRIS-HCl/NaCl mješavine. Otopina je kuhana 15 minuta uronjena u čašu proključale vode. Nakon što se ohladila raspodijeljena je na manje volumene.

Tris-HCl/NaCl mješavina pripremljena je miješanjem 100 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) sa 30 µl 5 M NaCl. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destilirane vode. Otopina je filtrirana.

5 M NaCl (100 ml) pripremljen je od 29,22 g NaCl koji je otopljen u dvostruko destiliranoj vodi. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom. Otopina je autoklavirana.

-> **0,2 mM natrij acetat u 76 % etanolu** pripremljen je miješanjem 6,7 ml 3 M natrij acetat i 79,2 ml 96 % etanola. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom.

3 M natrij acetat (pH 5,2) pripremljen je otapanjem 40,82 g natrija acetata u cca. 50 ml dvostruko destilirane vode. pH je podešen pomoću octene kiseline. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom. Otopina je filtrirana i autoklavirana.

-> **10 mM amonij acetat u 76 % etanolu** pripremljen je miješanjem 2 ml 5 M amonij acetata i 76 ml 96 % etanola. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom.

5 M amonij acetat pripremljen je otapanjem 38,54 g amonij acetata u cca. 60 ml dvostruko destilirane vode. Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom.

-> **1X TE pufer** pripremljen je miješanjem 1 ml 1 M TRIS-HCl (pH 8,0) i 200 µl 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0). Volumen je nadopunjen do 100 ml s dvostruko destiliranom vodom. Otopina je autoklavirana.

-> **Hladni izopropanol** (-20°C)

Izolacija je provedena prema modificiranom CTAB protokolu (Doyle i Doyle, 1987.) U nastavku je prikazan postupak izolacije:

- Prije izolacije 2 % CTAB pufer zagrijan je na 65 °C
- Odvagano je cca. 80 mg tkiva lista vinove loze. Tkivo je homogenizirano uz pomoć tekućeg dušika. U dobiveni prah dodano je 1000 µl izolacijskog pufera. Uzorci su kratko vorteksirani i potom inkubirani u vodenoj kupelji 60 minuta na 65 °C (Slika 6).
- Uzorci su nakon inkubacije prebačeni na led te je u digestoru uzorcima dodano 450 µl kloroform izoamilnog alkohola. Nakon toga uzorci su stavljeni na treskalicu 30 minuta.
- Uzorci su potom centrifugirani 8 minuta na 15 000 rpm. Nakon centrifugiranja u tubicama se formirao disk (krute nečistoće) te su se izdvojile dvije faze. Pipetom je pažljivo izvučena gornja vodenasta faza iznad diska te je prebačena u nove tubice.
- U tubice je zatim dodano 16 µl RNAze A te su stavljene na treskalicu 30 minuta na 40 °C.
- Nakon toga dodano je 650 µl hladnog izopropanola. Izopropanol je ostavljen u tubicama 90 minuta uz povremeno okretanje.
- Uzorci su centrifugirani 2 minute na 15 000 rpm. Nakon centrifugiranja na dnu tubica formirala se bijela DNA peleta. Tekućina iznad pelete je odbačena.
- U uzorke je stavljeno 500 µl 0,2 mM natrij acetat u 76 % etanolu. DNA je prana 30 minuta pomoću treskalice. Nakon toga uzorci su centrifugirani 2 minute na 15 000 rpm. Tekućina iznad peleta je pažljivo odbačena.

- Zatim je dodano 500 μ l 10 mM amonij acetat u 76 % etanolu te je DNA prana još 10 min. Nakon pranja uzorci su centrifugirani 2 minute na 15 000 rpm. Tekućina iznad peleta je pažljivo odbačena.
- Tubice s peletama su ostavljene da se suše 30 minuta na zraku.
- Nakon toga u svaku tubicu dodano je 100 μ l 1X TE pufera u svrhu otapanja DNA peleta

2.2.4. Metoda izolacije D

Metoda izolacije D razlikovala se od prethodne metode (metoda C) samo po sastavu izolacijskog pufera. U **2 % CTAB** pufer kod metode D dodan je **PVP-40 (polivinil pirolidon)**, ali nije dodavan 2-merkaptoetanol.

Izolacijski pufer pripremljen je na sljedeći način: Odvagano je 2,0 g CTAB i 1,0 g PVP-40. Menzurom je odmjereno 28,0 ml 5 M NaCl; 10,0 ml 1 M TRIS pH 8,0 i 4,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0. Sastojci su pomiješani i volumen je nadopunjen do 100 ml dvostruko destiliranom vodom.

Cijeli postupak izolacije bio je identičan onome prikazanom kod metode C.



Slika 6. Inkubacija uzoraka u vodenj kupelji (Dobiš, L.)

2.3. Provjera kvalitete DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA provjerena je pomoću spektrofotometra i elektroforeze.

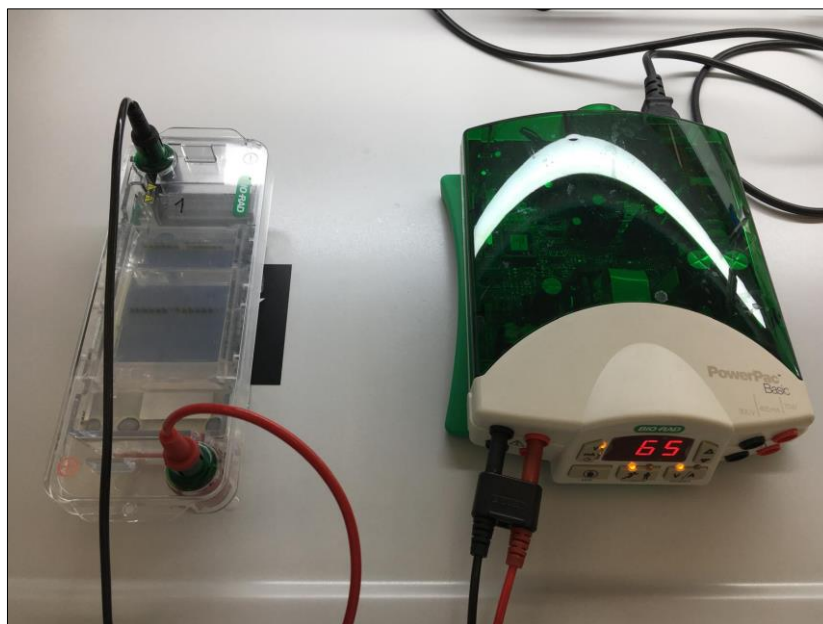
Za analizu DNA pomoću spektrofotometra (Eppendorf BioPhotometer® D30) pipetom je izdvojeno 2,5 µl DNA uzorka te prebačeno na kivetu od 1 mm, koja je zatim postavljena u uređaj (Slika 7). Prije mjerenja, uređaju je kao slijepa proba zadan pufer koji je korišten za otapanje DNA (PE pufer u slučaju metode A i metode B te 1X TE pufer u slučaju metode C i metode D). Pomoću uređaja dobiveni su podatci o koncentraciji DNA izraženi u ng/µl, omjeri apsorbanci na 260 nm i 280 nm valne duljine kao i omjeri apsorbanci na 230 nm i 260 nm valne duljine.

Izolirani uzorci DNA analizirani su i pomoću uređaja za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad Mini-Sub Cell GT). Pripremljen je 1 % agarozni gel na način da je odvagano 0,42 g agaroze koja je otopljena u 60 ml 1X TAE pufera (200 ml 5X TAE + 800 ml dvostruko destilirane H₂O; 5X TAE: 24,2 g TRIS, 10 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8, 5,7 ml COOH, nadopunjeno dvostruko destiliranom vodom do 1 L). Gel je kuhan u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje nakon čega je prohladen i u njega su dodane dvije kapi fluorescentne boje (Olerup SSP® GelRed™). Potom je izliven u pripremljenu kadicu te su postavljeni češljići za formiranje jažica. Nakon što se gel stisnuo prebačen je u uređaj za horizontalnu elektroforezu, koji je napunjen 1X TAE puferom.

U svaku jažicu pipetom je stavljeno 5 µl uzorka, a uzorci su pripremljeni na sljedeći način: 2 µl TE pufera + 2 µl boje (6X Blue/Orange Loading Dye, Promega) + 1 µl DNA uzorka. DNA ljestve od 1 kb pripremljene su na sljedeći način: 4 µl TE pufera + 1 µl boje (6X Blue/Orange Loading Dye, Promega) + 1 µl DNA Ladder 1kb. Uređaj je priključen na izvor napajanja i podešen na 65 V (Slika 8). Nakon završene elektroforeze gel je uslikan pomoću uređaja za slikanje gela Syngene G:Box s pripadajućim softverom.



Slika 7. Spektrofotometar Eppendorf BioPhotometer® D30 (Dobiš, L.)



Slika 8. Horizontalna elektroforeza DNA uzoraka (Dobiš, L.)

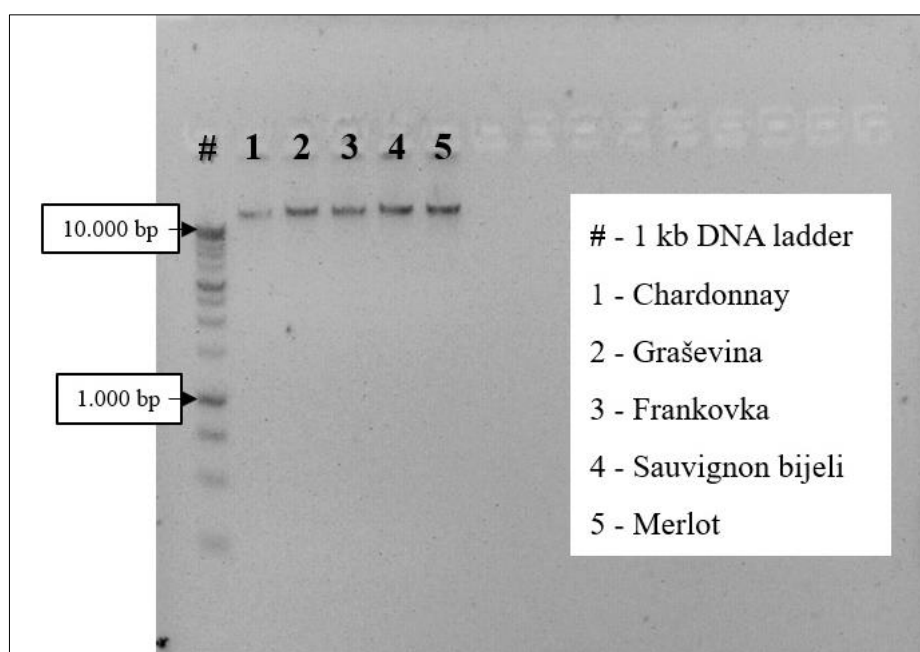
3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon provedene izolacije DNA i njene analize spektrofotometrijskom i elektroforetskom metodom, prikupljeni podaci su analizirani kako bi se utvrdile razlike u kvaliteti DNA između pojedinih metoda izolacije.

U Tablici 1 prikazane su koncentracije i omjeri apsorbanci uzoraka dobivenih metodom A. Koncentracije DNA uzoraka kretale su se od 25,88 ng/μl do 35,42 ng/μl. Omjeri apsorbanci A260/A280 kretali su se od 1,81 do 1,92, a omjeri apsorbanci A260/A230 kretali su se od 2,01 do 2,16. Na temelju omjera apsorbanci utvrđeno je da su svi uzorci bili zadovoljavajuće čistoće. Elektroforetskom metodom potvrđeno je da se radi o uzorcima DNA dobre kvalitete (Slika 9).

Tablica 1. Koncentracije i omjeri apsorbanci DNA uzoraka dobivenih metodom A

Metoda A	Koncentracija (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Chardonnay	25,88	1,85	2,02
Graševina	32,65	1,81	2,01
Frankovka	28,73	1,85	2,16
Sauvignon bijeli	31,44	1,87	2,04
Merlot	35,42	1,92	2,16

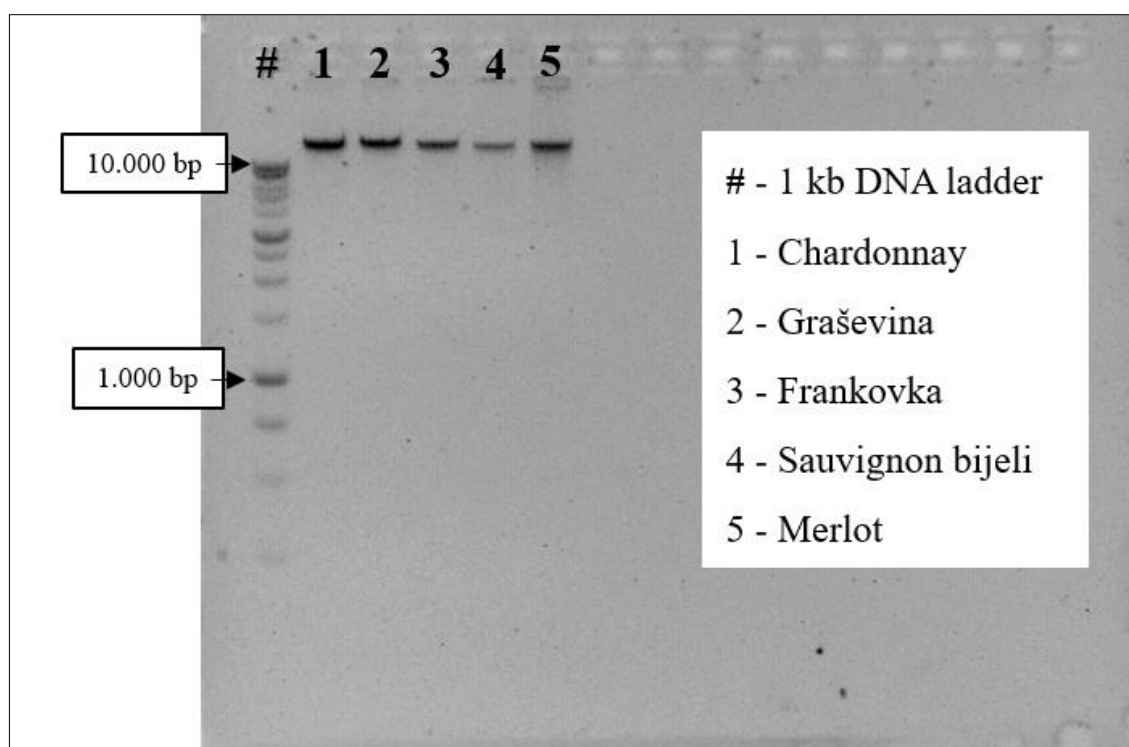


Slika 9. Agarozni gel s uzorcima DNA – A metoda (Dobiš, L.)

U Tablici 2 prikazane su koncentracije i omjeri apsorbanci uzoraka dobivenih metodom B. Koncentracije DNA uzoraka kretale su se od 25,78 ng/μl do 51,81 ng/μl. Omjeri apsorbanci A260/A280 kretali su se od 1,81 do 2,01, a omjeri apsorbanci A260/A230 kretali su se od 2,10 do 2,42. Na temelju omjera apsorbanci zaključeno je da su svi uzorci bili zadovoljavajuće čistoće što je potvrđeno i elektroforetskom metodom (Slika 10).

Tablica 2. Koncentracije i omjeri apsorbanci DNA uzoraka dobivenih metodom B

Metoda B	Koncentracija (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Chardonnay	51,81	1,85	2,13
Graševina	45,03	1,83	2,10
Frankovka	32,18	1,81	2,21
Sauvignon bijeli	25,78	1,82	2,11
Merlot	51,76	2,01	2,42

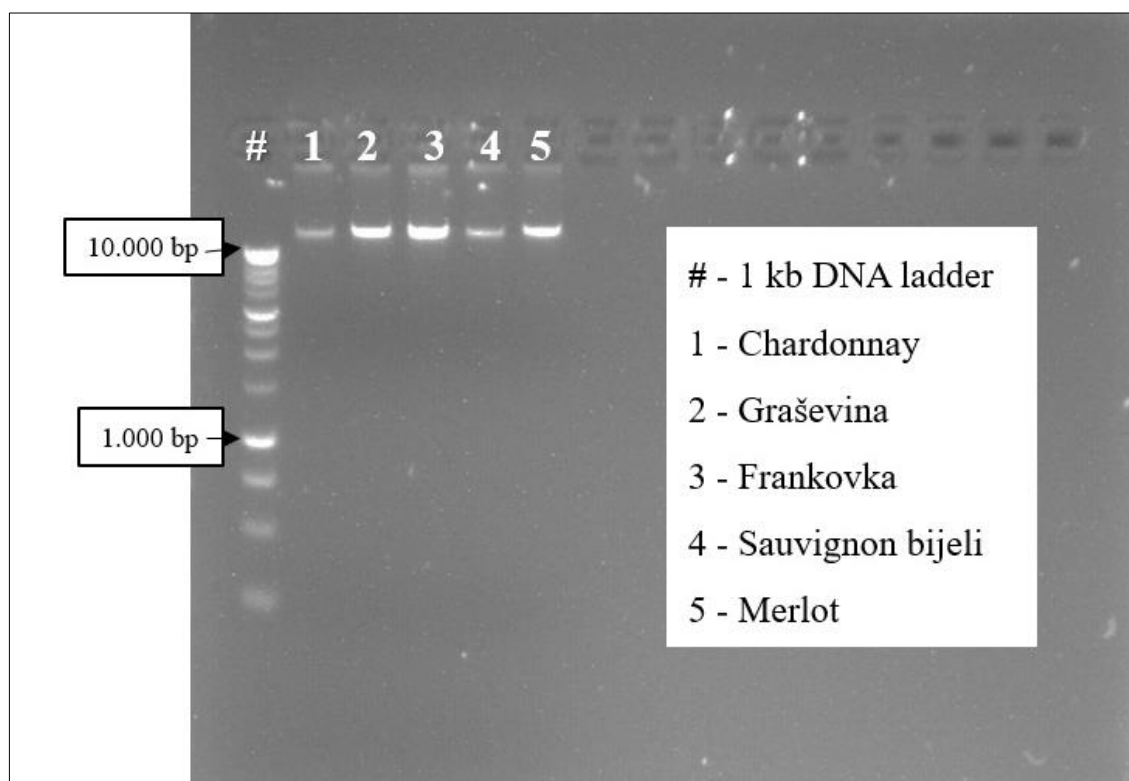


Slika 10. Agarozni gel s uzorcima DNA – B metoda (Dobiš, L.)

U Tablici 3 prikazane su koncentracije i omjeri apsorbanci uzoraka dobivenih metodom C. Koncentracije DNA uzoraka kretale su se od 162,28 ng/ μ l do 251,25 ng/ μ l. Omjeri apsorbanci A260/A280 kretali su se od 1,82 do 1,90, a omjeri apsorbanci A260/A230 kretali su se od 1,90 do 2,20. Na temelju omjera apsorbanci utvrđeno je da su svi uzorci bili zadovoljavajuće čistoće. Elektroforetskom metodom potvrđena je kvaliteta DNA uzoraka (Slika 11).

Tablica 3. Koncentracije i omjeri apsorbanci DNA uzoraka dobivenih metodom C

Metoda C	Koncentracija (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
Chardonnay	162,28	1,82	1,98
Graševina	251,25	1,90	2,20
Frankovka	223,44	1,82	1,90
Sauvignon bijeli	162,29	1,86	2,04
Merlot	219,01	1,83	2,01

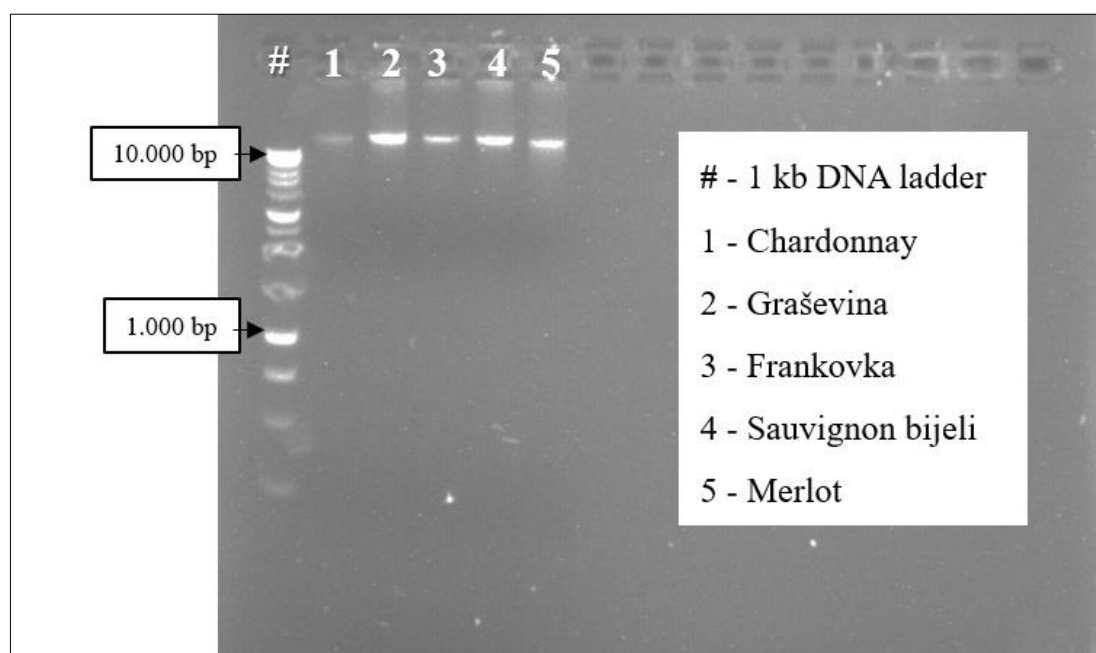


Slika 11. Agarozni gel s uzorcima DNA – C metoda (Dobiš, L.)

U Tablici 4 prikazane su koncentracije i omjeri apsorbanci uzoraka dobivenih metodom D. Koncentracije DNA uzoraka kretale su se od 67,86 ng/μl do 150,77 ng/μl. Omjeri apsorbanci A260/A280 kretali su se od 1,75 do 1,82, a omjeri apsorbanci A260/A230 kretali su se od 1,12 do 1,54. Niske vrijednosti omjera apsorbanci A260/A230 ukazuju na onečišćenje uzoraka odnosno prisutnost nečistoća koje apsorbiraju valne duljine 230 nm i manje. Međutim, nakon što su uzorci analizirani elektroforetski nije uočeno da je došlo do znatnijeg narušavanja kvalitete DNA usprkos niskim vrijednostima A260/A230 (Slika 12). Kvalitetu uzoraka trebalo bi dodatno provjeriti PCR analizom kako bi se ispitala njihova prihvatljivost za specifične genetske analize.

Tablica 4. Koncentracije i omjeri apsorbanci DNA uzoraka dobivenih metodom D

Metoda D	Koncentracija (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Chardonnay	67,86	1,81	1,42
Graševina	132,35	1,75	1,21
Frankovka	80,39	1,77	1,12
Sauvignon bijeli	150,77	1,78	1,16
Merlot	118,17	1,82	1,54



Slika 12. Agarozni gel s uzorcima DNA – D metoda (Dobiš, L.)

Tablica 5. Prosječne vrijednosti koncentracija i omjera apsorbanci DNA uzoraka

Metoda izolacije	Prosječne vrijednosti		
	Koncentracija (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
A	30,82	1,86	2,08
B	41,31	1,86	2,19
C	203,65	1,85	2,03
D	109,91	1,79	1,29

U Tablici 5 prikazane su prosječne vrijednosti koncentracija DNA i omjera apsorbanci DNA uzoraka po pojedinim metodama. Najmanja prosječna koncentracija DNA uzoraka zabilježena je kod metode A, a najveća prosječna koncentracija zabilježena je kod metode C. Najmanji prosječni omjer apsorbanci A260/A280 zabilježen je kod metode D, a najveći kod metoda A i B. Najmanji prosječni omjer apsorbanci A260/A230 zabilježen je kod metode D, a najveći kod metode B.

Iz podataka je vidljivo da su A i B metoda rezultirale uzorcima niže koncentracije DNA, ali dobre kvalitete. Metoda C je uz visoke koncentracije DNA imala i dobru kvalitetu. Metoda D unatoč višim koncentracijama DNA nije imala dobre omjere apsorbanci A260/A230.

Niski omjeri A260/A230 mogu ukazivati na probleme sa uzorkom ili samim protokolom, a najčešće su posljedica prijenosa ugljikohidrata, zaostalog fenola, zaostalog gvanidina ili glikogena (<https://www.thermofisher.com/hr>).

Lucena-Aguilar i sur. (2016.) navode da se omjer apsorbanci A260/A230 smatra upitnim pokazateljem kvalitete DNA budući da pokazuje nestabilne vrijednosti kada se za otapanje DNA koristi slani pufer. Zbog toga od dva DNA uzorka objektivno iste čistoće, manje koncentrirani uzorak pokazat će niži omjer A260/A230 zbog apsorbancije soli na 230 nm.

Glavna prednost A i B metode, odnosno komercijalnih kitova za izolaciju, jest njihova brzina tj. kratko trajanje same metode. S druge strane, metoda C zahtijeva znatno više vremena za provedbu protokola, ali i manje troškova u odnosu na komercijalne kitove. Također, bitno je napomenuti da C i D metoda uključuju primjenu štetnih kemikalija (2-merkaptetanol, kloroform) koje nose sa sobom određene rizike za ljudsko zdravlje.

Akkurt (2012.) navodi da je prednost komercijalnih setova za izolaciju manja upotreba kemikalija te kraći postupak izolacije odnosno brže dobivanje rezultata. S druge strane, nedostaci su visoki troškovi, neponovljivost rezultata deklariranih od strane proizvođača, kao i neprikladnost izolirane DNA za pojedina biotehnološka istraživanja.

Metoda C i D razlikovale su se po sastavu izolacijskog pufera, gdje je kod C metode u izolacijski pufer dodan 2-merkaptetanol, a kod D metode PVP-40. Pojedini autori navode da je za optimalne rezultate odnosno visoku čistoću DNA poželjno zajedno kombinirati 2-merkaptetanol i PVP-40. Primjerice, Öner i sur. (2023.) su ispitivali više različitih metoda izolacije koje se zasnivaju na klasičnoj CTAB metodi, odnosno primjeni CTAB pufera. Istraživanjem su utvrdili da se najboljom pokazala metoda kod koje je CTAB puferu dodana kombinacija 2-merkaptetanola i PVP-40. Navedena metoda rezultirala je uzorcima DNA vinove loze visoke kvalitete i prinosa.

Lo Piccolo i sur. (2012.) također navode uspješnu izolaciju DNA iz listova vinove loze metodom na bazi CTAB pufera, uz primjenu 2-merkaptetanola, PVP-40 te 2,5 M NaCl. Čistoća DNA potvrđena je omjerima A260/A280 i A260/A230.

Nazhad i sur. (2008.) ispitivali su tri različite metode za izolaciju DNA iz listova vinove loze: SDS, CTAB i modificirani CTAB. Modificirana CTAB metoda je jedina rezultirala s DNA pogodnom za PCR analizu, neovisno o uvjetima rasta biljnog materijala i starosti samoga lista. Kvaliteta je provjerena spektrofotometrom, elektroforezom na 1,2 % agaroznom gelu te PCR analizom.

Marsal i sur. (2011.) navode uspješnu primjenu metode za izolaciju DNA iz tkiva lista, stabljike i sjemena vinove loze, koja koristi kombinaciju CTAB-a i DTAB-a (dodecil trimetil amonijev bromid). Metoda je brza, zahtijeva malu količinu biljnog materijala te ne zahtijeva tretman s RNazom.

Akkurt (2012.) je uspoređivao šest različitih protokola za izolaciju DNA iz lista vinove loze od čega tri komercijalna kita. Kvaliteta DNA provjerena je spektrofotometrom, elektroforezom i PCR analizom. Prinos i čistoća DNA bili su bolji kod uzoraka dobivenih klasičnim metodama izolacije u odnosu na komercijalne kitove.

Prilikom odabira metode izolacije bitno je voditi računa o tome da je ista brza, jednostavna, ekonomična, prilagođena određenoj vrsti uzorka te omogućava dobivanje DNA uzoraka

visoke kvalitete, koji su prikladni za daljnje provođenje specifičnih analiza kao što su PCR, sekvencioniranje, različite vrste mapiranja, genetski inženjering i sl.

4. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog laboratorijskog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

- Najmanja prosječna koncentracija DNA uzoraka zabilježena je kod metode A (Nucleo Spin Plant II, PL1)
- Najveća prosječna koncentracija DNA uzoraka zabilježena je kod metode C (CTAB + 2-merkaptetanol)
- Prosječne vrijednosti omjera apsorbanci A260/A280 kretale su se u rasponu 1,79 – 1,86
- Na temelju vrijednosti omjera apsorbanci A260/A280 utvrđeno je da su svi uzorci bili dobre čistoće
- Prosječne vrijednosti omjera apsorbanci A260/A230 kretale su se u rasponu 1,29 – 2,19
- Na temelju vrijednosti omjera apsorbanci A260/A230 utvrđena je dobra čistoća svih uzoraka osim onih dobivenih metodom D (CTAB + PVP-40)
- Elektroforetska analiza pokazala je zadovoljavajuću kvalitetu svih uzoraka

5. POPIS LITERATURE

1. Adam-Blondon, A. F. (2010.): Grapevine genome update and beyond. In X InteRNAtional Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1046 (pp. 311-318).
2. Akkurt, M. (2012.): Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Genetics and molecular Research, 11(3): 2343-2351.
3. Dairawan, M., Shetty, P. J. (2020.): The evolution of DNA extraction methods. Am. J. Biomed. Sci. Res, 8(1): 39-45.
4. Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin, 19: 11.
5. Lemke, L., Rex, M., Zyprian, E., Töpfer, R. (2011.): A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.). Vitis, 50(1): 7-10.
6. Lo Piccolo, S., Alfonzo, A., Conigliaro, G., Moschetti, G., Burrzano, S., Barone, A. (2012.): A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. African JouRNAl of Biotechnology, 11(45): 10305.
7. Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., Aguilar-Quesada, R. (2016.): DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. Biopreservation and biobanking, 14(4): 264-270.
8. Marsal, G., Baiges, I., Canals, J. M., Zamora, F., Fort, F. (2011.): A fast, efficient method for extracting DNA from leaves, stems, and seeds of *Vitis vinifera* L. American jouRNAl of enology and viticulture, 62(3): 376-381.
9. Marsal, G., Boronat, N., Canals, J. M., Zamora, F., Fort, F. (2013.): Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. OENO One, 47(4): 227-237.
10. Molnar, C., Gair, J. (2015.): Concepts of biology. Chapter 9: Introduction to Molecular Biology. BCcampus.

11. Nazhad, N. R., Solouki, M. (2008.): Separation of DNA for molecular markers analysis from leaves of the *Vitis vinifera*. *Pakistan JouRNAI of Biological Science*, 11(11): 1436-1442.
12. Öner, T. Ö., Temel, M., Pamay, S., Abacı, A. K., Akkale, H. B. K. (2022.): An Improved Method for Efficient DNA Extraction from Grapevine. *InteRNAtional JouRNAI of Life Sciences and Biotechnology*, 6(1): 21-36.
13. Excedr: What Is DNA Extraction? Separating Cellular Materials. 29 January 2024. <https://www.excedr.com/blog/what-is-dna-extraction> (datum pristupa 7.7.2024.)
14. The Science Learning Hub – Pokapū Akoranga Pūtaiao (New Zealand Government): DNA extraction. 18 June 2009. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction> (datum pristupa 7.7.2024.)
15. Thermo Fisher Scientific: Assessment of Nucleic Acid Purity. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> (datum pristupa 9.7.2024.).