

# UTJECAJ RAZLIČITIH METODA NA KVALITETU IZOLIRANE DNA

---

**Brica, Marina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:166320>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



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](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Marina Brica, apsolvant

Preddiplomski studij, smjer Bilinogojstvo

**UTJECAJ RAZLIČITIH METODA NA KVALITETU**  
**IZOLIRANE DNA**

**Završni rad**

Osijek, 2013.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Marina Brica, absolvent

Preddiplomski studij, smjer Bilinogojstvo

**UTJECAJ RAZLIČITIH METODA NA KVALITETU**  
**IZOLIRANE DNA**

**Završni rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnoga rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. prof.dr.sc. Vlado Guberac, član

Osijek, 2013.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. MATERIJAL I METODE.....	3
2.1. Biljni materijal .....	3
2.1.1. Pšenica ( <i>Triticum aestivum ssp. vulgare</i> ).....	3
2.2. Priprema biljnog materijala .....	4
2.3. Metode izolacije.....	5
2.3.1. Puferi i otopine korišteni u metodama izolacije DNA .....	5
2.3.2. Modificirana CTAB metoda.....	8
2.3.3. Modificirana SDS metoda .....	12
2.3.4. BIOBASIC metoda.....	12
2.4. Mjerenje čistoće i koncentracije DNA.....	14
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4. ZAKLJUČAK .....	17
5. POPIS LITERATURE .....	18
6. SAŽETAK.....	20
7. SUMMARY .....	21
8. POPIS SLIKA .....	22
9. POPIS TABLICA.....	22
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	23

## 1. UVOD

Deoksiribonukleinska kiselina (eng. Deoxyribonucleic acid), DNA je genetski, nasljedni materijal prisutan u stanicama organizama svih živih bića, od najjednostavnijih do najsloženijih. Sastoji se od dva antiparalelna polinukleotidna lanca povezana vodikovim vezama. Svaki lanac sastoji se od velikog broja međusobno povezanih nukleotida, a svaki nukleotid se sastoji od šećera deoksiriboze, fosfata i dušične baze (<http://www.ffst.hr>).

Šećer svakog nukleotida vezan je za fosfat idućeg kovalentnom vezom, a za svaki šećer je vezana jedna od četiri dušične baze: adenin (A), timin (T), citozin (C), gvanin (G). Varijabilnost redoslijeda baza i velika dužina molekule DNA osigurava pohranu velikog broja informacija u DNA. Dva antiparalelna lanca molekule DNA povezana su preko dušičnih baza tako da se povezuju baze adenin i timin, odnosno gvanin i citozin. Fosfati ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) daju molekuli DNA negativan naboj, što je čini dobro topljivom u vodi (<http://www.ffst.hr>).

DNA izolacija je proces pročišćavanja DNA iz uzorka kombinacijom fizikalnih i kemijskih metoda. Prvu izolaciju DNA je napravio Friedrich Miescher 1869. godine (<http://hr.wikipedia.org>).

Metode koje se koriste za izoliranje DNA ovise o veličini uzorka. Unatoč raznim metodama, postoje neke sličnosti među njima. Općenito, cilj im je odvojiti DNA koja se nalazi u jezgri stanice iz drugih staničnih komponenti. Izolacija DNA je potrebna za genetske analize, koja se koristi u znanstvene, medicinske ili druge svrhe (<http://www.enotes.com>).

Obično je vrlo teško izdvojiti i pročistiti kvalitetnu DNA iz žitarica zbog zaostalih polisaharida, proteina i DNA, kao inhibitora polimeraze kao što su tanini, alkaloidi te polifenoli u ekstraktima. Prisutnost ovih spojeva smanjuje kvalitetu i količinu izolirane DNA. Polisaharidi su univerzalni onečišćivači tvari u biljnim ekstraktima i uzrokom su stvaranja sluzavih DNA nakupina koje su teške za rukovanje i onemogućuju daljnje analize kao što je metoda lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) (<http://www.enotes.com>).

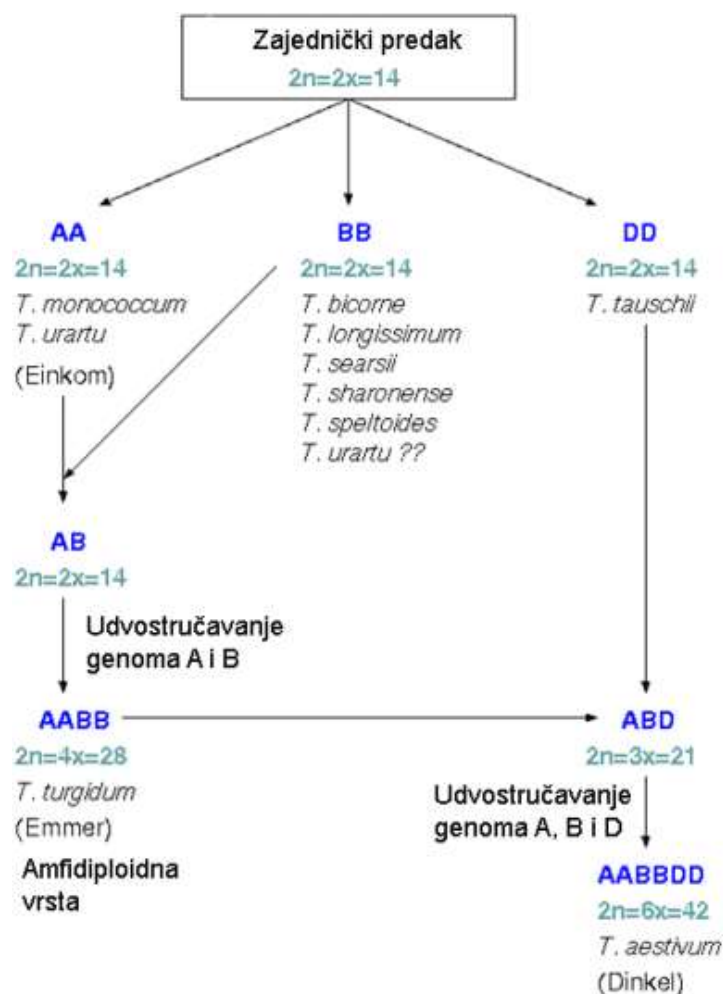
Protokoli za izolaciju temelje se na sljedećim postupcima: liziranje stanica, uklanjanje staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula (ugljikohidrati, lipidi, fosfolipidi), kemijskom ekstrakcijom (fenol-kloroform) ili enzimskim reakcijama (proteinaza K, RNA-za), izdvajanje DNA taloženjem, pomoću alkohola (apsolutni etanol), otapanje DNA u TE (Tris-EDTA) puferu, pH 8,0 ili vodi. Cilj istraživanja u ovom radu je bio utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA koristeći tri različite metode izolacije.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1. Biljni materijal

#### 2.1.1. Pšenica (*Triticum aestivum ssp. vulgare*)

Današnja pšenica je porijeklom od divljeg pretka iz roda *Triticum* koji je sličan divljem jednozrncu (*Triticum monococcoides*). Evolucijom je dalje nastao kulturni jednozrncac (*Triticum monococcum*), a od njega kulturni dvozrncac (*Triticum dicoccum*). Jedino diploidne pšenice tj. divlji i kulturni jednozrnci nisu alopoliploidi. Njihova genetska konstitucija AA ima osobiti značaj u evoluciji cijeloga roda *Triticum* jer je poslužila kao osnova za stvaranje tetraploidne pšenice (*Triticum durum*), a zatim i heksaploidne pšenice (*Triticum aestivum*) (Pavičević, 1986).



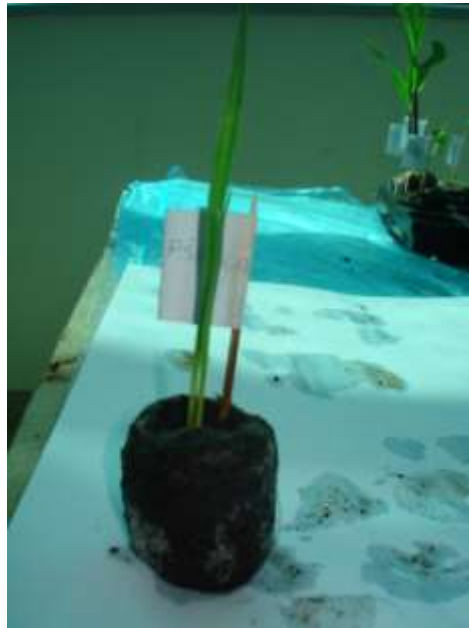
Slika 1. Porijeklo kultivirane aloheksaploidne pšenice

(<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl10.html>)

Pšenica je porijeklom iz srednje Azije, zapadnog Irana i južnog Balkana. Postoje dva osnovna tipa pšenice, a to su ozima i jara pšenica. Faze koje biljka prolazi u svom životnom ciklusu: klijanje, nicanje, ukorjenjivanje, busanje, vlatanje, klasanje i cvatnja, formiranje, nalijevanje i sazrijevanje zrna. Površina pod pšenicom 2011. godine bilo je 782 000 tona, a prosječni prinos za tu istu godinu je bio 5,2 t/ha (Statistički ljetopis 2012.).

## 2.2. Priprema biljnog materijala

Sjeme pšenice stavljeno je na naklijavanje u komoru 10.4.2013. godine. Komora je namještena na temperaturu od 20°C u kojoj je 12 sati dan, a 12 sati noć. U komori je pšenica bila 14 dana. Nakon 14 dana pšenica je izvađena (slika 2) i odvagani su listovi težine 0,20 g. Listovi su stavljeni u označenu papirnatu kuvertu koja je spremljena u zamrzivač na -80°C do izolacije DNA. Ovako pripremljen biljni materijal može se čuvati duže vrijeme. Prije svake metode izolacije biljno tkivo je usitnjeno koristeći tekući dušik.



Slika 2. Klijanac pšenice

(foto: Marina B.)



## 2.3. Metode izolacije

Za izolaciju DNA iz biljke pšenice korištene su tri različite metode :

Metoda 1: CTAB metoda prema Doyle i Doyle (1990.) modificirana prema Grljušić (2003.)

Metoda 2: modificirana SDS metoda prema Lore Westphal (Marker Course manual 2004.)

Metoda 3: komercijalni kit BIOBASIC (Bio Basic Inc.).

U različitim metodama izolacije korišteni su sljedeći reagensi i otopine (Tablica 1).

Tablica 1. Metode izolacija DNA i korištene otopine i reagensi

Reagensi i otopine	Metode izolacije DNA		
	CTAB	SDS	BIOBASIC
Izolacijski pufer	2% CTAB	20% SDS	PCL pufer
Organska otapala	kloroform izoamil alkohol, izopropanol, etanol	izopropanol	kloroform, izopropanol, etanol
Enzimi	RNAza-A	-	RNAza-A
Reagensi	natrij acetat i amonij acetat u 76% etanolu	5M natrij acetat	PP pufer
Pufer za otapanje DNA	1 x TE puffer	1 x TE pufer	1 x TE pufer

### 2.3.1. Puferi i otopine korišteni u metodama izolacije DNA

Prije početka izolacije DNA navedenim metodama bilo je potrebno pripremiti sljedeće otopine i reagense koje čine komponente izolacijskih pufera i ostalih reagensa u analizi.

- 1M TRIS-HCl, pH=8,0 (za 100 ml otopine): 12,11 g TRIS baza (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), F.W.=121.14) otopljeno je u cca. 80 ml d.d. H<sub>2</sub>O. Svedeno je na pH 8,0 s koncentriranom HCl (Hydrochloric acid; F.W.=36.46), te dopunjeno do 100 ml s d.d. H<sub>2</sub>O. Otopinu je bilo potrebno autoklavirati.

- 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA (za 200 ml otopine): 37,22 g Na<sub>2</sub>EDTA (EDTA (Etylendiamintetaacetic acid) disodium salt; F.W.=372.24) otopljeno je u cca. 100 ml d.d. H<sub>2</sub>O dugim i snažnim mješanjem (staviti na stirer i eventualno zagrijati na cca. 70-80°C). Nakon hlađenja dodano je cca. 4 g NaOH pločica i namješteno na pH 8,0. Otopina se istodobno miješala i mjerio se pH sve dok se nije postigao željeni pH 8,0. Titriralo se s NaOH otopinom. Nadopunjeno je s d.d. H<sub>2</sub>O do 200 ml. Otopinu je bilo potrebno autoklavirati.
- TRIS – HCl/NaCl mješavina (za 100 ml otopine): pomiješano je 100 µl 1M TRIS-HCl (pH 8,0) s 30 µl 5M NaCl i dopunjeno do 100 ml s d.d. H<sub>2</sub>O.
- 5 M NaCl (za 100 ml otopine): 29,22 g NaCl (Sodium chloride; F.W.=58.44) otopljeno je u cca. 70 ml d.d. H<sub>2</sub>O. Nadopunjeno je do 100 ml otopine s d.d. H<sub>2</sub>O, te autoklavirano.
- 5 M kalijev acetat (F.W. 98.14) za 100 ml otopine: odvagano je 49,07 g kalijevog acetata u čašu od 200 ml, otopljen je u cca. 70 ml d.d. H<sub>2</sub>O i nadopunjeno do konačnog volumena. Otopina je autoklavirana.
- 1X TE pufer za otapanje izolirane DNA, (pH 8,0), za 200 ml otopine: odmjereno je 2 ml TRIS-HCl 1M otopine, pH 8,0 i 400 µl 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0 otopine te nadopunjeno s d.d. H<sub>2</sub>O do 200 ml. Otopinu je potrebno autoklavirati, a zatim držati na +4°C ili na sobnoj temperaturi.
- Otopina enzima RNaze A (Rnase A-otopina (10 mg RnaseA/ml). Za 100 ml otopine bilo je potrebno 100 mg RNA-za A i 10 ml Tris – HCl/NaCl. Enzim je otopljen u Tris-HCl/NaCl mješavini koja je prije toga filtrirana kroz filter 0,2 µm. Otopina RNaza-A kuhana je na laboratorijskom kuhalu 15 minuta uronjena u čašu ključale vode. Nakon toga otopina je ostavljena da se polako hladi na sobnoj temperaturi (najbolje ju je ostaviti hladiti preko noći). Hladna otopina raspodijeljena je u manje volumene (500 µl) i spremljena u zamrzivač na -20 °C.
- Kloroform izoamil alkohol (SEVAG) 24:1 (za 100 ml otopine): 96 ml kloroforma (Chloroform, F.W.=119.4) i 4 ml izoamil alkohola (Isoamyl alcohol, F.W.=88.15). Pomiješano je 96 ml kloroforma s 4 ml izoamil alkohola unutar digestora (otrovno!).
- Otopina 70% etanola: 70% etanol dobiven je tako da se u autoklavirnu bocu pomiješa 140 ml C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH absol. s 60 ml H<sub>2</sub>O ili tako da se potrebna količina etanola i vode izračuna prema osnovnoj formuli za izračunavanje koncentracija :

$$c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2$$

gdje je:  $c_1$  – početna koncentracija

$c_2$  – konačna koncentracija

$v_1$  – potreban volumen

$v_2$  – konačni volumen ili volumen uzorka

$$v_1 \times 0,96 = 100 \times 0,7$$

$$v_1 = \frac{100 \times 0,7}{0,96}$$

$$v_1 = 72,92$$

Tako je za 100 ml ( $v_2$ ) 70% etanola ( $c_2$ ) odmjereno 72,92 ml ( $v_1$ ) 96% etanola ( $c_1$ ) i nadoliveno do 100 ml s d.d.  $H_2O$  ( $v_1 \times 0,96 = 100 \times 0,7$ ;  $v_1 = (100 \times 0,7) / 0,96$ ;  $v_1 = 72,92$ ).

2% CTAB pufer za izolaciju DNA (100 ml):

- 2 g CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; F.W.=364.5)
- 20 ml 1M TRIS-HCl, pH=8,0 (Tris(hydroxymethyl) aminomethane); F.W.=121.14)
- 16,36 g NaCl (Sodium chloride, F.W.=58.44)
- 8 ml 0,5M  $Na_2EDTA$ , pH=8,0
- 0,4 ml 2-merkaptioetanol (mercaptoethanol, F.W.=78,13)

U čašu od 200 ml izliveno je cca. 80 ml sterilizirane d.d.  $H_2O$ , stavljen je magnet i čaša je stavljena na mješalicu (stirer). Nakon toga dodane su komponente (sve navedene osim 2-merkaptioetanol) i nakon toga zagrijano na  $50^\circ C$ . Kad je tekućina postala potpuno prozirna (dugo se kuhalo, jer se CTAB relativno teško topi) i kada se ohladilo do sobne temperature filtrirano je kroz filter (fi 0,2  $\mu m$ ). Otopina iz injekcije tiskana je polako, kako ne bi došlo do pucanja filtera. Nakon filtriranja dodano je 0,2 ml merkaptioetanol (otrovno i smrdi). Dopunjeno je steriliziranom d.d.  $H_2O$  do 100 ml. Otopina je pripremana u digestoru.

20% SDS pufer za izolaciju DNA (100 ml):

- 6 ml 20% SDS\*
- 83 ml d.d. $H_2O$

- 5 ml 1M TRIS-HCl , pH=8,0 (Tris(hydroxymethyl) aminomethane); F.W.=121.14)
- 4 ml 5M NaCl (Sodium chloride, F.W.=58.44)
- 2 ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8,0
- 154,2 g DDT (Dithiothreitol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>); M.W. 154,2)

\* 20%-tna SDS otopina, za 1 lit. otopine: 200 g SDS (Natriumlaurylsulfat/Sodium dodecyl sulfate; F.W.=288.38) je otopljeno u 900 ml destilirane vode, nakon čega je sve zagrijano na cca. 68°C kako bi se poboljšala topivost. Nakon hlađenja boca je nadopunjena s destiliranom vodom do konačnog volumena.

Navedene komponente se pomiješaju u čaši od 200 ml u digestoru, neposredno prije same izolacije dodaje se DDT.

Prije samih protokola izolacije DNA kod sve tri metode biljno tkivo je trebalo usitniti. Prvo je pripremljen potreban pribor (slika 3), a biljni materijal je donešen s -80°C u kutiji sa ledom. Nakon toga u tarionik je dodan tekući dušik i kada je malo ispario stavljen je biljni materijal. Kada je tekući dušik ispario laganim kružnim pokretima tučka biljno tkivo je usitnjeno do konzistencije finoga praha (slika 4).



Slika 3. Pribor za usitnjavanje tkiva

(foto: Marina B.)



Slika 4. Usitnjeno biljno tkivo

(foto: Marina B.)

### 2.3.2. Modificirana CTAB metoda

- ✓ U vodenoj kupelji zagrijan je 2% CTAB pufer na temperaturu od 65-68°C. U svaki uzorak dodano je 1000 µl prethodno zagrijanog CTAB pufera (slika 5), poslije

dodavanja pufera protrešeni su na vortexu (slika 6) i stavljeni na 65°C u vodenu kupelj (slika 7) 45 minuta uz povremeno mućkanje.



Slika 5. Dodavanje CTAB pufera

(foto: Marina B.)



Slika 6. Vortex

(foto: Marina B.)



Slika 7. Vodena kupelj

(foto: Marina B.)

- ✓ Nakon inkubacije u vodenoj kupelji tubice su premještene u posudu s ledom i svakom uzorku dodano je 670  $\mu$ l SEVAGA (kloroform izoamil alkohola). Nakon dodavanja alkohola svaki uzorak je pojedinačno protrešen rukom (okretana tubica) i zatim je cijela partija uzoraka mućkana u stalku 30 minuta.
- ✓ Slijedilo je centrifugiranje na maksimalnoj brzini (14 000 o/min.) sedam do osam minuta. Iz centrifuge su tubice vađene pažljivo da se disk ne razbije, a pipetom s odrezanim vrhom izvučena je vodenasta faza u novu obilježenu tubicu od 2 ml. Izdvojeno je 750 ml vodenaste faze (slika 9).



Slika 8. Uzorak nakon centrifugiranja

(foto: Marina B.)



Slika 9. Izdvajanje vodenaste faze

(foto: Marina B.)

- ✓ Dodano je 16  $\mu$ l RNAze i ostavljeno na sobnoj temperaturi uz trešnju na treskalici i povremeno ručno cca. 30 minuta.
- ✓ U uzorak je dodano cca. 650  $\mu$ l 0,7 V hladnog izopropanola. Nakon dodavanja uzorak je lagano okretan dok DNA nije postala vidljiva. U izopropanolu su stajali jedan sat uz povremeno okretanje tubica rukom. Nakon jednog sata tubice su centrifugirane 1 minutu na 14 000 o/min. i nakon toga pažljivo je izlivena tekućina da se formirana peleta (slika 10) ne izlije.



Slika 10. Formirana peleta

(foto: Marina B.)

- ✓ Dodano je 500  $\mu$ l 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu i peleta je ispirana cca. 30 minuta lagano tresući tubicu prstom. Nakon toga centrifugirano je 2 minute pri 14 000 o/min. i izlivena je tekuća faza.

- ✓ Dodano je 500  $\mu$ l 10 mM amonij acetata u 76% etanolu i peleta je prana cca. 10 minuta. Poslije toga opet je išla u centrifugu 1 minutu pri 14 000 o/min., te je izlivena tekuća faza.
- ✓ Pažljivo je mikropipetom izvađen preostali etanol, a tubice su ostavljene otvorene (slika 11) cca. 45-60 minuta u komori gdje nema prašine.



Slika 11. Sušenje peleta

(foto: Marina B.)

- ✓ Osušanim peletama dodano je 100  $\mu$ l 1X TE pufera (slika 12). Nakon što su pelete despiralizirane tubice su stavljene na sekundu u centrifugu (kako ne bi kapljice tekućine ostale na stjenkama tubice) i spremljene u hladnjak na +4 °C. Idući dan još jednom su protrešene prstom i uzorci su spremljeni u zamrzivač na -20 °C.



Slika 12. Pribor za dodavanje 1X TE pufera

(foto: Marina B.)

### 2.3.3. Modificirana SDS metoda

- ✓ U vodenu kupelj stavljen je SDS izolacijski pufer i dodan DDT. U uzorak je dodano 1 ml izolacijskog pufera i dobro promiješano (vorteksom) dok se sadržaj u tubici nije dobro izhomogenizirao.
- ✓ Uzorci su zatim stavljeni u vodenu kupelj na 68°C, 10 minuta.
- ✓ U ohlađene uzorke dodano je 75 ml kalijevog acetata i dobro promiješano na vorteksu.
- ✓ Nakon miješanja uzorci su inkubirani u kutiji s ledom 20 minuta.
- ✓ Slijedilo je centrifugiranje na brzini 14000 rpm, 20 minuta. U ovom koraku dolazi do razdvajanja tekuće (supernatant) od krute faze, a između tih faza stvara se disk od krutog materijala (dijelova biljne stanice).
- ✓ Tubice su pažljivo izvađene iz centrifuge da se disk ne razbije, mikropipetom je izvađeno 110 µl supernatanta u novu obilježenu tubicu od 2 ml.
- ✓ U svaki uzorak dodano je 75 µl izopropanola i tubice su stavljene kako bi se istaložila DNA u zamrzivač na -20°C, 30 minuta.
- ✓ Slijedilo je centrifugiranje na brzini 14000 rpm, 10 minuta.
- ✓ Pažljivo je izliven supernatant, a peleta DNA je stavljena na sušenje u komoru.
- ✓ Nakon cca. 30 minuta u tubicu s osušenom DNA peletom odmjeren je 50 µl TE pufera.
- ✓ Slijedilo je otapanje DNA pelete 1h na sobnoj temperaturi, nakon čega su tubice stavljene u zamrzivač na -20°C.

### 2.3.4. BIOBASIC metoda

U komercijalnom kitu ponuđene su sljedeće otopine za izolaciju DNA: PCL pufer, PP pufer i TE pufer (slika 13).



Slika 13. BIOBASIC kit

(foto: Marina B.)



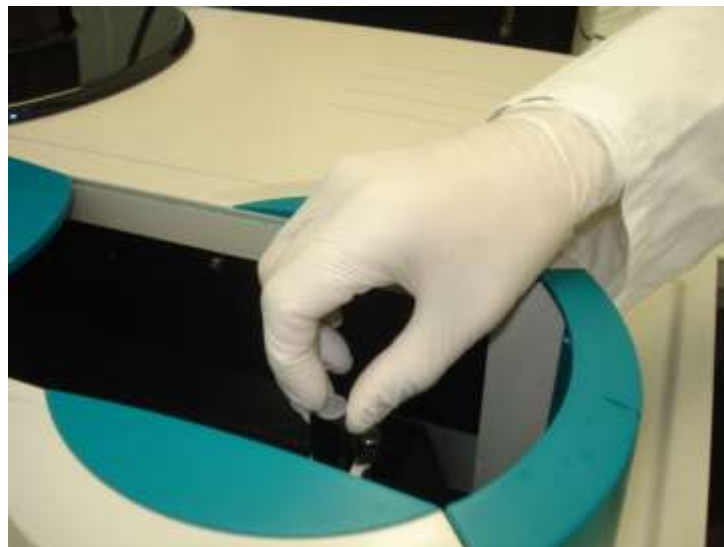
- ✓ Bočica s PCL puferom je zagrijana na 65°C u vodenoj kupelji.
- ✓ U tubicu, vol. 1,5 ml s 0,002 g biljnog tkiva u prahu, dodano je 400 µl pufera PCL i inkubirano u kupelji na 65°C, 10-20 minuta.
- ✓ Dodano je 20 µl RNAze u tubicu s uzorkom, te je uzorak promiješan na vorteksu.
- ✓ Slijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- ✓ Dodano je 200 µl pufera PP, miješano s okretanjem tubice, zatim je inkubirano na -20°C 5 minuta.
- ✓ Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta na 12 000 x g, a supernatant je zatim pažljivo pipetom premješten u novu obilježenu tubicu od 1,5 ml.
- ✓ Dodano je 0,2 ml kloroforma u supernatant, dobro promiješano okretajući tubicu 10 puta.
- ✓ Slijedilo je centrifugiranje na 12 000 x g dvije minute, a supernatant je pažljivo premješten u novu obilježenu čistu tubicu od 1,5 ml i dodan je isti volumen izopropanola (cca. 0,3-0,5 ml) u otopinu, dobro promiješano okretajući 10 puta.
- ✓ Slijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi 2-5 minuta.
- ✓ Tubice su centrifugirane 5 minuta pri 12 000 x g i pažljivo je odbačen supernatant.
- ✓ Dodano je 1 ml hladnog 75% etanola u tubicu, dobro promiješano okretajući tubice 10 puta.
- ✓ Nakon centrifugiranja 1 minutu pri 12 000 x g i odbačen je supernatant i još jednom je ponovljeno ispiranje pelete s 1 ml hladnog 75% etanola
- ✓ Pelete su sušene na zraku na sobnoj temperaturi sa otvorenim poklopcem 2-5 minuta.
- ✓ Nakon sušenja u tubice je dodano 50-200 µl prethodno zagrijanog TE pufera za otapanje DNA pelete, tubice su stavljene na 4°C par sati sve dok DNA peleta nije potpuno otopljena.
- ✓ DNA pelete su zatim stavljene u hladnjak na temperaturi od -20°C.

## 2.4. Mjerenje čistoće i koncentracije DNA

Čistoću i uspješnost izolirane DNA provjerili smo spektrofotometrijski. Spektrofotometrija je jedan od načina kvantifikacije biomolekula. To je, u principu, fotoelektrično mjerenje zračenja koje neka supstanca apsorbira na određenoj valnoj dužini. Prema područjima valnih dužina izvora svjetla, razlikuje se ultraljubičasta (200-400 nm), vidljiva (400-760 nm) i infracrvena (iznad 750 nm) spektrofotometrija (<http://www.scribd.com/>). Količina apsorbiranog svjetla određene valne dužine odgovara koncentraciji ispitivane supstance. Što se nukleinskih kiselina tiče, spektrofotometrijom se mjeri apsorbance na 260 i 280 nm. Potpuno čista DNA ima OD (optical density ili optička gustoća)  $A_{260}/A_{280}$  koja iznosi 1,8-2,0. Koncentracija DNA se računa po formuli:

$$\text{Koncentracija DNA} = A_{260} \times \text{razrjeđenje} \times 50$$

Razrjeđenje u ovom slučaju iznosi 50.



Slika 14. Mjerenje apsorbance na 260 i 280 nm

(foto: Marina B.)

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Vrlo često se uspoređuju različite metode izolacije DNA kako bi se, ovisno o nastavku istraživanja, pronašla najpovoljnija. Tako je velik broj istraživanja proveden primjenom različitih metoda izolacije DNA na različitim biljnim vrstama. Jasbeer i sur. (2009.) su proveli istraživanje na kukuruzu (*Zea mays* L.) koristeći sedam različitih metoda izolacije DNA kako bi utvrdili koja od njih će biti najbolja za istraživanje identifikacije GMO hibrida. Komparativnu analizu šest različitih metoda izolacije DNA proveli su Tan i sur. (2013.) na stočnom grašku (*Vigna unguiculata* L. Walp) u svrhu pronalaska metode koja će biti ekonomična, brza i producirati čistu DNA visoke koncentracije za velik broj PCR reakcija.

Sve tri korištene metode su bile učinkovite, jer je molekula DNA iz biljke pšenice uspješno izolirana. Dobiveni rezultati čistoće i koncentracije DNA prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Čistoća i koncentracija izolirane DNA

	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>A260/A280</b>	<b>Koncentracija (ng/μl)</b>
<b>CTAB</b>	0,912	0,475	1,92	2280
<b>SDS</b>	1,12	0,610	1,83	2800
<b>BIOBASIC kit</b>	0,193	0,112	1,73	482,5

Spekrofotometrijskom analizom najčistija DNA, pri čemu je omjer absorbanci iznosio 1,92 je utvrđena koristeći modificiranu CTAB metodu, a istom metodom je dobivena koncentracija od 2280 ng/μl. Modificirana SDS metoda se također pokazala uspješnom jer je rezultirala omjerom absorbanci od 1,83 dok je imala najveću koncentraciju koja je iznosila 2800 ng/μl. Najnižu koncentraciju izolirane DNA (482,5 ng/μl) i ujedno nepovoljan omjer absorbanci (1,73) utvrđen je BIOBASIC metodom. Navedno istraživanje je sukladno rezultatima Abd-Elsalam i sur. (2011.) koji su dobili slične rezultate spektrofotometrijskom analizom čistoće DNA iz lista pšenice koristeći CTAB metodu, omjer absorbanci A260/A280 je bio u rasponu od 1,6 do 1,8. Prema istraživanju Mohammdi i sur. (2012.) minimalna koncentracija dobivene DNA iz lista pšenice bila je 500 ng/μl, a omjer se kretao u rasponu od 1,60-1,82. Xin i Chen (2012.) su primjenom

CTAB metode dobili omjer A260/A280 koji je iznosio 1,82, dok se u istraživanju Ejaz i sur. (2013.) omjer A260/A280 kretao između 1,81-1,99, a koncentracija izolirane DNA između 559-590 ng/ $\mu$ l.

Korištenjem CTAB i SDS metoda izolacije DNA dobiju se veće količine izolirane DNA i bolja čistoća same DNA, a BIOBASIC kit je brza i lagana metoda izolacije s kojom se dobije prihvatljiva čistoća DNA, ali relativno male količine te se može koristiti za neosjetljive analize koje ne zahtijevaju vrlo čistu DNA, a ujedno i ako su rezultati brzo potrebni jer vremenski ne traje dugo. U daljnjem istraživanju usporedbe ovih triju metoda trebalo bi se pristupiti elektroforetskoj analizi izolirane DNA uspoređujući je sa standardom, tj. DNA poznate duljine, te digestiji s restrikcijским endonukleazama kako bi se utvrdilo koja od njih će biti najpogodnija za analize temeljene na PCR reakciji.

#### 4. ZAKLJUČAK

- DNA je izolirana primjenom sve tri metode za izolaciju, CTAB, SDS i BIOBASIC.
- Spektrofotometrijskom analizom najčistija DNA utvrđena je primjenom CTAB metode pri čemu je omjer apsorbanci iznosio 1,92, slijedi SDS metoda (1,83) i BIOBASIC metoda čijom primjenom je utvrđen najnepovoljniji omjer apsorbanci od 1,73.
- Najveća koncentracija DNA utvrđena je primjenom SDS metode i iznosila je 2800 ng/μl, slijedi CTAB metoda s 2280 ng/μl, a najmanja koncentracija od 482,5 ng/μl dobivena je primjenom BIOBASIC metode.
- Sve metode su se pokazale učinkovitima za izolaciju DNA iz lista biljke pšenice te se mogu koristiti ovisno o svrsi daljnjeg istraživanja.

## 5. POPIS LITERATURE

Abd-Elsalam, K., Bahkali A., Moslem M., Amin O., Niessen L. (2011.): An Optimized Protocol for DNA Extraction from Wheat Seeds and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) to Detect *Fusarium graminearum* Contamination of Wheat Grain. International Journal of Molecular Sciences, 12:3459-3472.

Dorđević, V., Sarić, M., Borojević, S., Đokić, A., Miladinović, N., Šuput, M., Ševarlić, J., Otašević, S., Patarčić, A., Pajević, R., Jevtić, S., Perić, Đ., Vučić, N., Kosovac, Z., Kostić, B., Jovanić, M., Milošević, P., Šenborn, B., Tošović, S., (1965.): Pšenica, Zadruga knjiga, Beograd.

Ejaz, M., Gaisheng, Z., Qidi, Z., Xinbo, Z. (2013.): A Rapid and Efficient Method for the Isolation of Mitochondrial DNA From Wheat Crop. Journal of Agricultural Science; Canadian Center of Science and Education Vol. 5, No. 6:1916-9760.

Jasbeer, K., Son, R., Mohamad Ghazali, F., Cheah, Y. K. (2009.): Real-time PCR evaluation of seven DNA extraction methods for the purpose of GMO analysis. International Food Research Journal , 16:329-341.

Mirko Gagro (1997): Ratarstvo obiteljskog gospodarstva, Žitarice i zrnate mahunarke. Zagreb.

Mohammadi, M., Torkamaneh, D., Hashemi, M., Mehrabi, R., Ebrahimi, A. (2012.): Fast and inexpensive DNA isolation from wheat (*Triticum aestivum*) and other small grains. Wheat Inf. Serv. 114:17-20.

Paićević, Lj. (1986.): O evoluciji i nekim mogućnostima daljeg unapređenja kulture pšenice. Poljoprivredni institut, Titograd, 2-3:3-17.

Tan, H., Huang, H., Tie, M., Ma, J., Li, H. (2013.): Comparative Analysis of Six DNA Extraction Methods in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Journal of Agricultural Science; Canadian Center of Science and Education Vol. 5, No. 7:1916-9760.

Xin, Z., Chen, J. (2012.): A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*, 8:26.

Interneski izvori:

Pavlica, M. (2012.): Mrežni udžbenik Genetika. <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/> 19.09.2013.

[http://www.ffst.hr/odsjeci/uciteljski/nastava/Prirodoslovlje/prirodoslovlje%202011\\_2012/Vjezba%207\\_Izolacija%20i%20mikroskopiranje%20molekule%20DNA.pdf](http://www.ffst.hr/odsjeci/uciteljski/nastava/Prirodoslovlje/prirodoslovlje%202011_2012/Vjezba%207_Izolacija%20i%20mikroskopiranje%20molekule%20DNA.pdf) 02.07.2013.

<http://www.enotes.com/dna-isolation-methods-reference/dna-isolation-methods> 02.07.2013.

[http://www.obz.hr/vanjski/CD\\_AGBASE2/HTM/psenica.htm](http://www.obz.hr/vanjski/CD_AGBASE2/HTM/psenica.htm) 07.07.2013.

[http://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf](http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf) 13.07.2013.

<http://www.scribd.com/doc/33180402/Biologija-Stanica-i-Humana-Genetika-Vjezbe> 14.07.2013.

<http://www.medri.uniri.hr/katedre/Patologija/medicina/Patologija/skripte/Molekularne%20metode%20u%20patologiji%202009%20SKRIPTA%20PROF.pdf> 10.09.2013.

## 6. SAŽETAK

Deoksiribonukleinska kiselina, DNA je genetski, nasljedni materijal prisutan u stanicama organizama svih živih bića, od najjednostavnijih do najsloženijih. Obično je vrlo teško izdvojiti i pročistiti kvalitetnu DNA iz žitarica zbog pojave polisaharida, proteina i DNA, kao inhibitora polimeraze kao što su tanini, alkaloidi, te polifenoli u ekstraktima. Ciljevi ovoga istraživanja bili su utvrditi kvalitetu i koncentraciju izolirane DNA iz biljke pšenice koristeći tri različite metode izolacije. Kvaliteta izoliranih DNA izmjerena je na spektrofotometru, tako što su izmjerene apsorbance na 260 i 280 nm. Omjeri absorbanci ( $A_{260}/A_{280}$ ) su se kretali u rasponu od 1,92 (CTAB metoda), do 1,73 (BIOBASIC metoda). Najveća koncentracija DNA dobivena je primjenom SDS metode i to 2280 ng/ $\mu$ l, zatim 2280 ng/ $\mu$ l primjenom CTAB metode i najmanja koncentracija je dobivena BIOBASIC metodom (482,5 ng/ $\mu$ l). Sve tri metode su se pokazale učinkovitima za izolaciju DNA iz lista biljke pšenice te se mogu koristiti ovisno o svrsi daljnjeg istraživanja.



## 7. SUMMARY

Deoxyribonucleic acid, DNA is the genetic hereditary material is present in cells of all living beings, from the simplest to the most complex. Usually it is very difficult to extract and purify high quality DNA from cereal because of presence of polysaccharides and proteins, as well as polymerase inhibitors such as tannins, alkaloids and polyphenols. The objective of this study was to determine the quality and quantity of the extracted isolated DNA from wheat seedlings using three different extraction methods, CTAB, SDS and a BIOBASIC commercial kit. The purity of the extracted DNA was measured by spectrophotometer using the absorbance at 260 and 280 nm. Absorbance ratio ( $A_{260}/A_{280}$ ) ranged from 1.92 for CTAB method, to 1.73 for BIOBASIC method. The highest concentration of DNA was obtained using the SDS method, which yielded 2800 ng/ $\mu$ l, then 2280 ng/ $\mu$ l using CTAB method, and the lowest concentration was obtained by BIOBASIC method (482.5 ng/ $\mu$ l). All DNA extraction methods proved effective for DNA extraction from wheat seedlings and can be used depending on the purpose of further research.

## 8. POPIS SLIKA

Broj	Opis	Izvor
1.	Porijeklo kultivirane aloheksaploidne pšenice	<a href="http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr">http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr</a>
2.	Klijanac pšenice	Foto: Brica, M.
3.	Pribor za usitnjavanje tkiva	Foto: Brica, M.
4.	Usitnjeno biljno tkivo	Foto: Brica, M.
5.	Dodavanje CTAB pufera	Foto: Brica, M.
6.	Vortex	Foto: Brica, M.
7.	Vodena kupelj	Foto: Brica, M.
8.	Uzorak nakon centrifugiranja	Foto: Brica, M.
9.	Izdvajanje vodenaste faze	Foto: Brica, M.
10.	Formirana peleta	Foto: Brica, M.
11.	Sušenje peleta	Foto: Brica, M.
12.	Pribor za dodavanje 1X TE pufera	Foto: Brica, M.
13.	BIOBASIC kit	Foto: Brica, M.
14.	Mjerenje apsorbance na 260 i 280 nm	Foto: Brica, M.

## 9. POPIS TABLICA

Broj	Opis
1.	Metode izolacija DNA i korištene otopine i reagensi
2.	Čistoća i koncentracija izolirane DNA

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J.J.Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

### UTJECAJ RAZLIČITIH METODA NA KVALITETU IZOLIRANE DNA

#### INFLUENCE OF DIFFERENT DNA EXTRACTION METHODS ON DNA QUALITY

Marina Brica

Deoksiribonukleinska kiselina, DNA je genetski, nasljedni materijal prisutan u stanicama organizama svih živih bića, od najjednostavnijih do najsloženijih. Obično je vrlo teško izdvojiti i pročistiti kvalitetnu DNA iz žitarica zbog pojave polisaharida, proteina i DNA, kao inhibitora polimeraze kao što su tanini, alkaloidi, te polifenoli u ekstraktima. Ciljevi ovoga istraživanja bili su utvrditi kvalitetu i koncentraciju izolirane DNA iz biljke pšenice koristeći tri različite metode izolacije. Kvaliteta izoliranih DNA izmjerena je na spektrofotometru, tako što su izmjerene apsorbance na 260 i 280 nm. Omjeri apsorbanci ( $A_{260}/A_{280}$ ) su se kretali u rasponu od 1,92 (CTAB metoda), do 1,73 (BIOBASIC metoda). Najveća koncentracija DNA dobivena je primjenom SDS metode i to 2800 ng/ $\mu$ l, zatim 2280 ng/ $\mu$ l primjenom CTAB metode i najmanja koncentracija je dobivena BIOBASIC metodom (482,5 ng/ $\mu$ l). Sve tri metode su se pokazale učinkovitima za izolaciju DNA iz lista biljke pšenice te se mogu koristiti ovisno o svrsi daljnjeg istraživanja.

Ključne riječi: DNA, izolacija, pšenica, spektrofotometrija

Deoxyribonucleic acid, DNA is the genetic hereditary material is present in cells of all living beings, from the simplest to the most complex. Usually it is very difficult to extract and purify high quality DNA from cereal because of presence of polysaccharides and proteins, as well as polymerase inhibitors such as tannins, alkaloids and polyphenols. The objective of this study was to determine the quality and quantity of the extracted isolated DNA from wheat seedlings using three different extraction methods, CTAB, SDS and a BIOBASIC commercial kit. The purity of the extracted DNA was measured by spectrophotometer using the absorbance at 260 and 280 nm. Absorbance ratio ( $A_{260}/A_{280}$ ) ranged from 1.92 for CTAB method, to 1.73 for BIOBASIC method. The highest concentration of DNA was obtained using the SDS method, which yielded 2800 ng/ $\mu$ l, then 2280 ng/ $\mu$ l using CTAB method, and the lowest concentration was obtained by BIOBASIC method (482.5 ng/ $\mu$ l). All DNA extraction methods proved effective for DNA extraction from wheat seedlings and can be used depending on the purpose of further research.

Key words: DNA, extraction, wheat, spectrophotometry

Datum obrane: