

# METODE IZOLACIJE DNA ZA LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE

---

**Kurilj, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:803561>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-12**



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 JURAJA STROSSMAYERA

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Matej Kurilj, apsolvant

Preddiplomski studij smjera Hortikultura

**METODE IZOLACIJE DNA ZA LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE**

**Završni rad**

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURAJA STROSSMAYERA

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Matej Kurilj, aspolvent

Preddiplomski studij smjera Hortikultura

## **METODE IZOLACIJE DNA ZA LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE**

**Završni rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. doc.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2016.

## **Sadržaj**

1. UVOD	1
2. MATERIJALI I METODE	3
2.1. Biljni materijal	3
2.2. Priprema biljnog tkiva za izolaciju DNA	4
2.3. Metode izolacije DNA	6
2.4. Utvrđivanje kvalitete i količine izolirane DNA	13
2.5. Očitvanje rezultata elektroforeze	13
3. REZULTATI I RASPRAVA	14
4. ZAKLJUČAK	16
5. LITERATURA	17
6. SAŽETAK	18
7. SUMMARY	19
8. POPIS SLIKA	20
9. POPIS TABLICA	20

Temeljna dokumentacijska kartica

## 1. Uvod

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, u ljekovito bilje ubrajaju se one biljne vrste čiji jedan dio ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za kemijsko farmaceutske sinteze. U aromatično bilje ubrajaju se vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih tvari posebnog mirisa ili okusa koje se iskorištavaju za spravljanje mirisa, kozmetičkih proizvoda, napitaka i aroma za namirnice potrebnih za život (WHO, 2001.). Prisutnost trenda koji preporučava zdraviji život koristeći neke drugačije načine prehrane i bavljenje sportom sve je popularniji. Samim time upotreba aromatičnog i ljekovitog bilja sve je češća.

Uloga izolacije DNA u genetskim istraživanjima je utvrditi razlike između prirodnih populacija, odrediti pripadnost vrsti. U svrhu fenotipizacije biljne vrste, najčešće se kombinira morfološka različitost te različitost na razini DNA. Istraživanje na razini DNA zahtijeva da molekula DNA bude čista i kvalitetna. Većinom sve vrste medicinskog, ljekovitog i aromatičnog bilja sadrže velike količine polisaharida, polifenola i ostalih sekundarnih metabolita (Stöckigt i sur., 1995.). Baš te tvari stvaraju probleme prilikom izolacije (pretjerane obojanosti molekula DNA) te djeluju tako da dovode do degradacije DNA te sprječavaju uspješnost DNA izolacije (Azmat i sur., 2012.). Metode i protokoli DNA izolacije zahtijevaju posebne tehnike te upotrebu određenih kemikalija koje mogu neutralizirati ili potpuno ukloniti velike količine sekundarnih metabolita koje sadržaju ove biljne vrste.

Cilj rada je opisati postupak prikupljanja i izolacije molekula DNA te utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA kod biljnih vrsta koje se koriste u medicinske svrhe. No, s druge strane pokušati i odrediti najbolju metodu za izolaciju molekule DNA iz mladih listova ljekovitog i aromatičnog bilja. Prilikom istraživanja korišteni su ružmarin, kadulja, kamilica, lavanda, ljupčac, menta, ruta i anis. Sve biljke su bile uzgajane u kontroliranim uvjetima. Osim toga, ispitat će se učinkovitost tri metode izolacije DNA: CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) metoda prema Doyle i Doyle, (1990.), SDS (Sodium dodecyl sulfate) metoda prema Schweitzer i sur. (1995.) te FA-UniZG-DNA metoda prema Bolarić i sur. (2014.).

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Biljni materijal

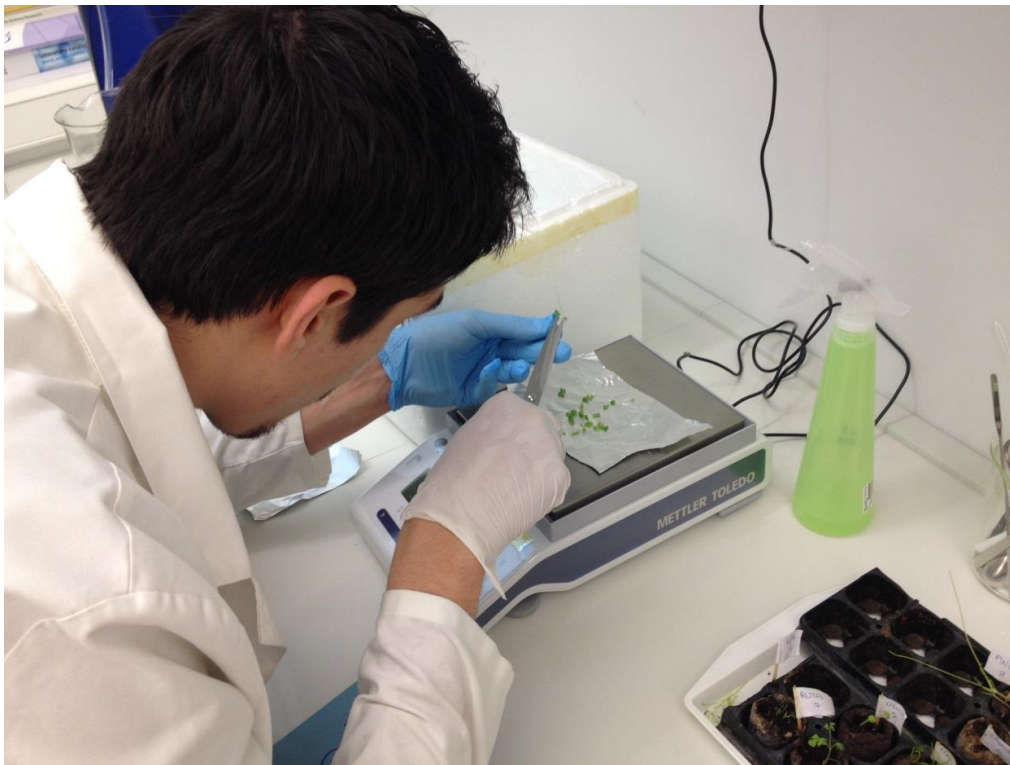
Ovo je istraživanje provedeno na osam biljnih vrsta koje uključuju: ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*), kadulja (*Salvia officinalis L.*), kamilica (*Matricaria chamomilla L.*), lavanda (*Lavandula officinalis L.*), ljupčac (*Levisticum officinale L.*), menta (*Mentha crispa L.*), ruta (*Ruta graveolens L.*) i anis (*Pimpinella anisum L.*). Sjeme biljaka je kupljeno u poljoprivrednim ljekarnama te su stavljena na naklijavanje u plitice koje su sadržavale supstrat (slika 1.). Budući da je došlo do pojave patogena u komori, biljke su bile ponovo naklijane u Laboratoriju za sjemenarstvo. Tijekom razvoja biljaka uzeti su uzorci mladih listova, starih 20 dana, koji su korišteni prilikom izolacije DNA.



Slika 1. Biljni materijal stavljen na naklijavanje (Foto original: Matej Kurilj)

## 2.2. Priprema biljnog tkiva za izolaciju DNA

Škarama su odstranjeni svi zdravi listovi s mladih biljaka (slika 2), koji su zatim izvagani kako bi imali dovoljno lisne mase za izolaciju, ali i ponavljanje postupka u slučaju loše kvalitete DNA. Nakon rezanja listova jedne biljne vrste škare su dezinficirane alkoholom.



Slika 2. Odstranjivanje mladih listova i njihovo vaganje ( Foto original: Matej Kurilj)

Nakon što je lisna masa izvagana spremljena je prvo u aluminijsku foliju te nakon toga u kuvertu. Svaka kuverta bila je propisno označena kako ne bi došlo do miješanja uzoraka (slika 3).



Slika 3. Pohranjivanje listova u kuverte ( Foto original: Matej Kurilj)

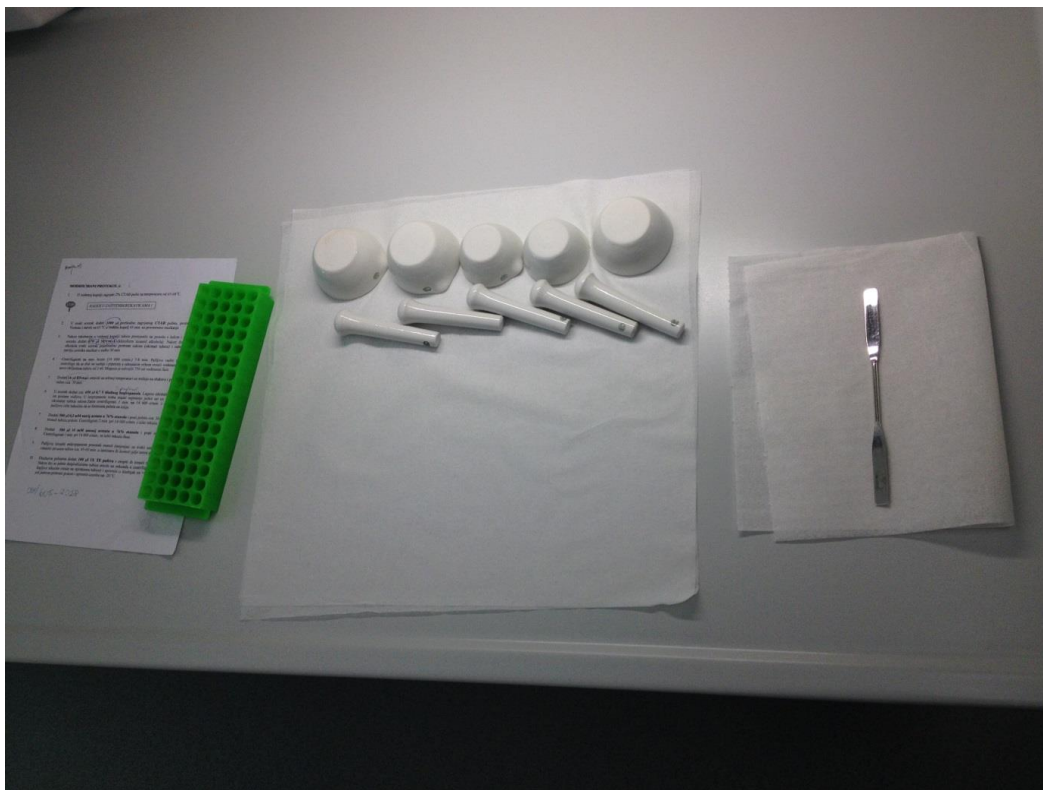
Uzorci lisne mase pohranjeni su na  $-80^{\circ}\text{C}$  u ultra hladni zamrzivač kako bi se sačuvali u prvobitnom stanju i kako bi se spriječila degradacija biljne mase i u konačnici i molekule DNA (slika 4).

Prije same izolacije uzorci listova pohranjeni u aluminijskoj foliji su s ultra dubokog smrzavanja premješteni u kutiju s ledom kako se ne bi naglo otopili. Za potrebe izolacije odvagano je cca. 40 mg smrznutog lista koji su zatim stavljeni u tarionik (slika 5). U tarionik je prethodno uliven tekući dušik kako bi omogućio lakše mrvljenje biljnog tkiva. Lisnu masu bilo je potrebno izmrviti u sitni prah uz pomoć tučka kako bi se olakšala homogenizacija biljne mase u postupcima izolacije DNA.





Slika 4. Biljni materijal stavljen na  $-80^{\circ}\text{C}$  u ultra hladni zamrzivač. (Foto original: Matej Kurilj)



Slika 5. Materijal potreban za homogenizaciju biljnog tkiva (Foto original: Matej Kurilj)

### 2.3. Metode izolacije DNA

Na proučavanim biljnim vrstama ispitane su sljedeće metode izolacije DNA:

- a) CTAB metoda prema Doyle i Doyle (1990.) modificirana prema Grljušić (2003.)
- b) SDS metoda prema Schweizer i sur. (1995.) poznata i kao natrij-bisulfit metoda modificirana prema Bolarić i sur. (2005.)
- c) metoda kreirana u okviru ovih istraživanja u laboratoriju Zavoda za oplemenjivanje bilja genetiku biometriku i eksperimentiranje Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radnog naziva FA-Unizg-DNA (kreatorica metode Bolarić, S.)

#### 2.3.a. Protokol CTAB metode modificirane prema Grljušić (2003.)

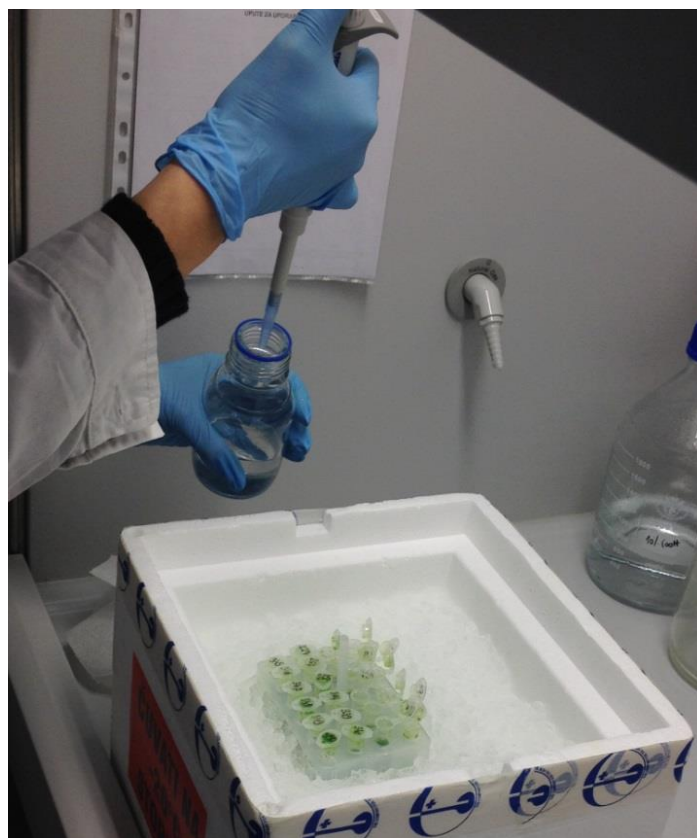
Tablica 1. Kemikalije potrebne za izolaciju DNA CTAB metodom

KEMIKALIJA	SASTAV
Izolacijski CTAB pufer	2% CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide
	100 mM TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane], pH8
	1,4 M NaCl
	20 mM EDTA ( EDTA disodium salt), pH8
	0,2 % $\beta$ -mercaptoethanol
kloroform-izoamilni alkohol	kloroform: izoamilni alkohol = 24:1
70% izopropanol (-20°)	
70% etanol	
TE pufer za otapanje i čuvanje DNA – pH8	TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethane EDTA – EDTA disodium salt

Izolacijski pufer stavljen je u vodenu kupelj kako bi se zagrijao na 65°C. Tubice volumena 2 ml ispunjene su s 40 mg izmrvljenog tkiva u koje je zatim dodano je 800  $\mu$ l prethodno zagrijanog CTAB pufera. Slijedilo je miješanje uzoraka na vorteksu kako bi se smjesa homogenizirala. Nakon što su 30 minuta bile u vodenoj kupelji na 65°C (slika 6), tubice su stavljene na led (oko 5 minuta) nakon čega je u njih dodano 800  $\mu$ l kloroform-izoamilnog alkohola (slika 7).

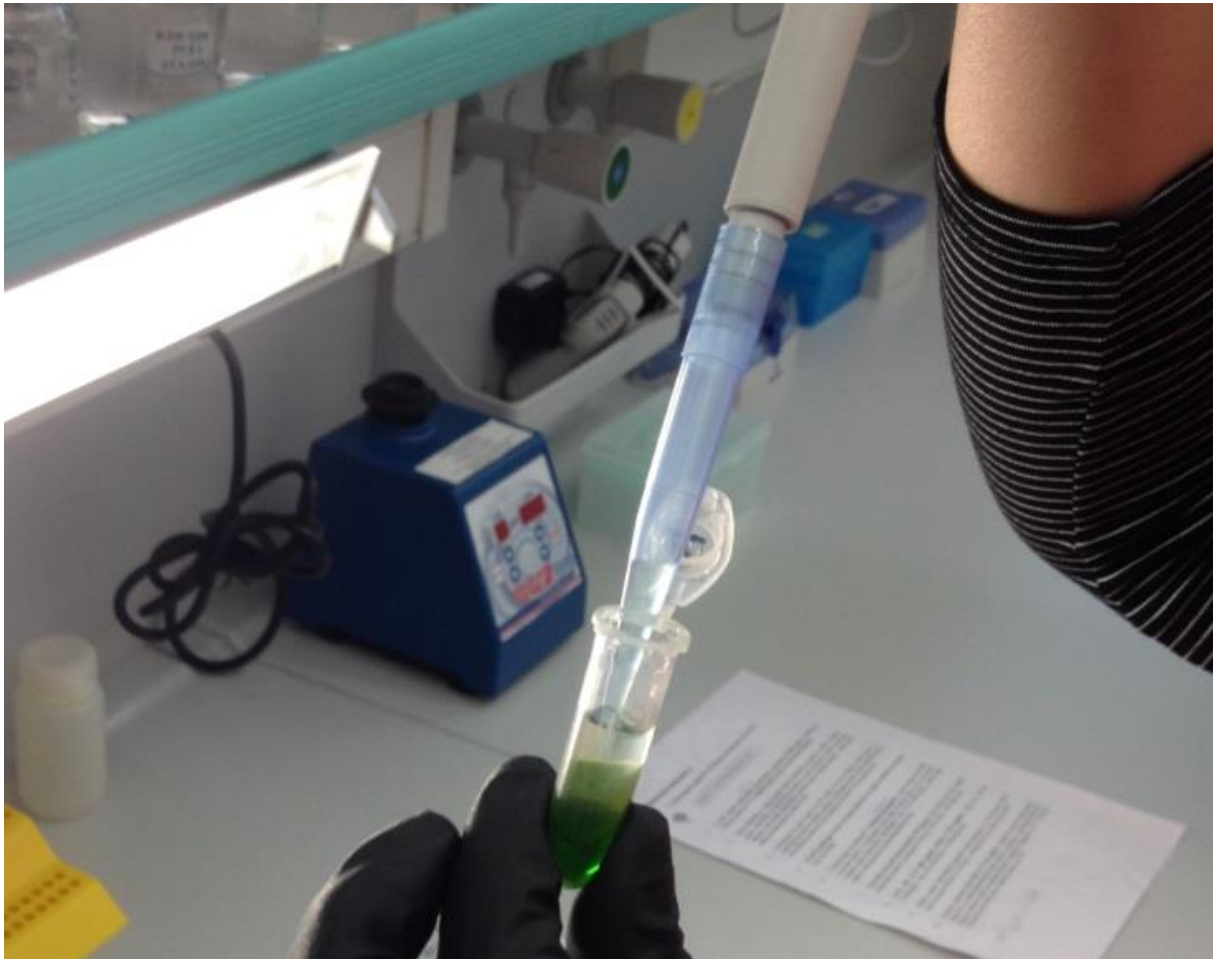


Slika 6. Uzorci u vodenoj kupelji na 65°C (Foto original: Matej Kurilj)



Slika 7. Dodavanje kloroform izoamil alkohola (Foto original: Matej Kurilj)

Svi uzorci su miješani 15-20 minuta laganim okretanjem ruke te su stavljeni 8 minuta na centrifugiranje pri brzini od 14000 rpm. Nakon centrifugiranja mikropipetom je izvučen supernatant (slika 8) i prebačen u novu tubicu u koju je dodano 15  $\mu$ l enzima RNAzeA.



Slika 8. Odvajanje supernatanta (Foto original: Matej Kurilj)

Nova smjesa je sat vremena ostavljena na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena u tubice je dodano 1/10 volumena 3M natrij-acetata i 2/3 volumena hladnog izopropanola. Tubice su laganim okretanjem ruke promiješane i smještene na  $-20^{\circ}\text{C}$  stupnjeva u trajanju od sat vremena. Ohlađeni uzorci stavljeni su u centrifugu 10 minuta na 14000 rpm nakon čega se u tubicama vidjela bijela pahuljica DNA. Iz tubica je izliven izopropanol, pazeći da bijela pahuljica ostane unutra. Nakon toga lupkajući prstima prvi puta je isprana DNA pomoću 500  $\mu$ l 70%-tnog etanola, nakon ispiranja etanol je izliven pazeći pritom da DNA ostane u tubici. Drugi puta dodana je ista količinu etanola, ali je sada tubica ostavljena na sobnoj temperaturi

20-30 minuta. Nakon što je drugi puta izliven etanol, tubice su ostavljene otvorene kako bi ostatak etanola ispario. Nakon što su se tubice osušile dodano je 100  $\mu$ l TE<sub>0,1</sub> pufera nakon čega su preko noći smještene u hladnjak. Idući dan lupkajući prstima tubice provjereno je je li DNA otopljena.

2.3.b. Modificirana SDS metoda prema Schweizer i sur. (1995.) poznata i kao natrij-bisulfit metoda modificirana prema Bolarić i sur. (2005.)

Tablica 2. Kemikalije potrebne za izolaciju DNA SDS metodom

KEMIKALIJA	SASTAV
natrij bisulfit pufer	10 ml TRIS-HCL pH 8
	10 ml EDTA (EDTA disodium salt), pH 8
	10 ml NaCl
	12,5 ml SDS – Natriumlaurylsulfat/ Sodium dodecyl sulfate
	38-50g natrij-bisulfit
kloroform-izoamilni alkohol	kloroform: izoamilni alkohol = 24:1
70% izopropanol (-20°)	
70% etanol	
TE pufer za otapanje i čuvanje DNA – pH8	TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethane EDTA – EDTA disodium salt

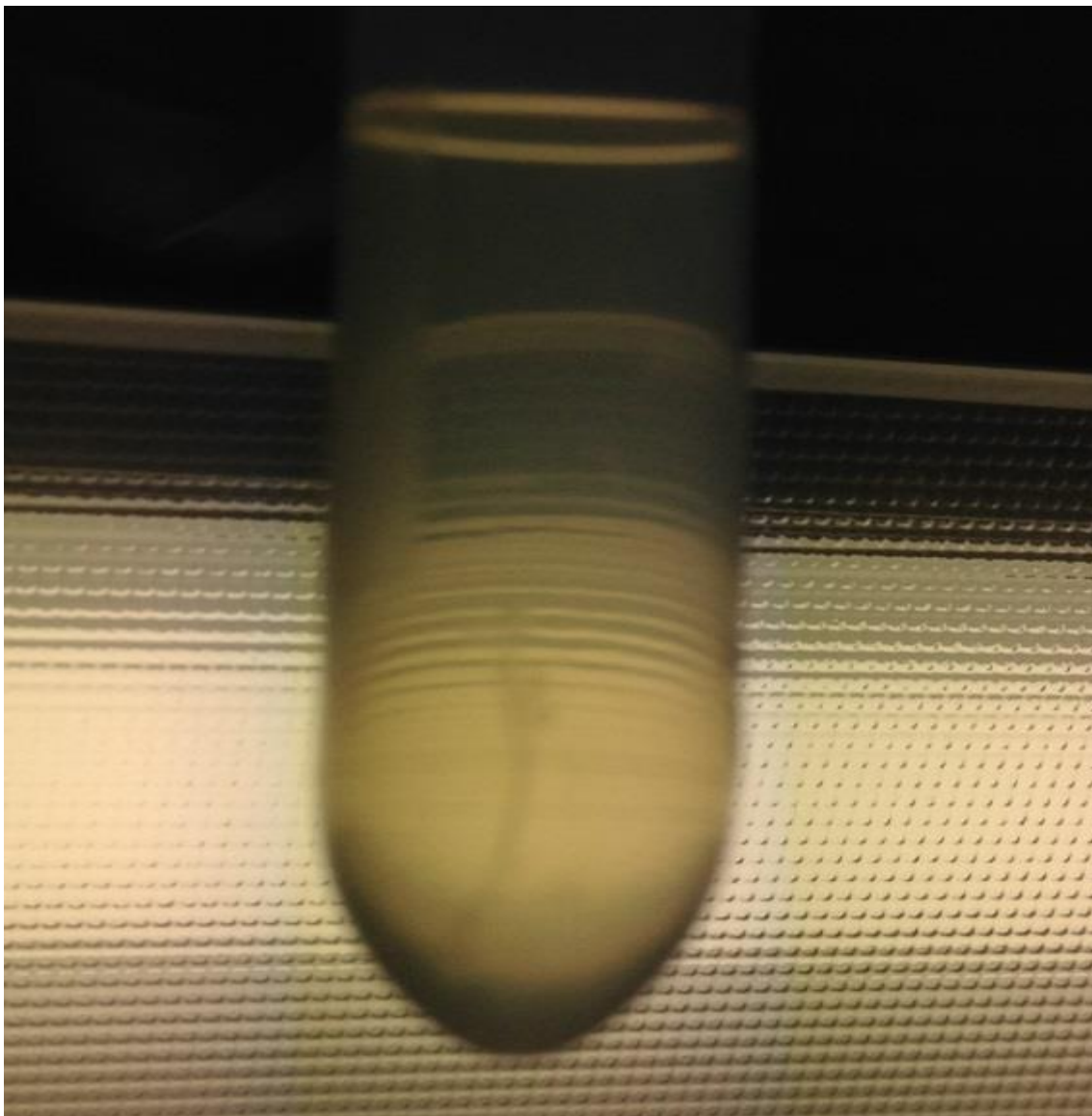
Dok je izolacijski pufer u vodenoj kupelji, u tubicu 2 ml je stavljeno 20 mg usitnjene lisne mase. Nakon toga dodano je 1 ml zagrijanog izolacijskog pufera te je sve promiješano vorteksom. Tubice su 45 minuta stajale u vodenoj kupelji na 60°C. Ohlađenim uzorcima dodano je 670  $\mu$ l kloroform-izoamil alkohola i laganim okretanjem tubica sadržaj je promiješan. Slijedilo je centrifugiranje uzoraka 10 minuta na 14000 rpm. Budući da je došlo

do razdvajanja tekuće i krute faze (slika 9) mikropipetom je izvučena tekuća faza (u kojoj se nalazi DNA molekula), u novu tubicu u koju je dodano 20  $\mu$ l RNAzeA.



Slika 9. Tekuća i kruta faza (Foto original: Matej Kurilj)

Nakon što su uzorci ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi, njima je dodano 650  $\mu$ l izopropanola. Kada DNA postane vidljiva (slika 10), tubice su centrifugirane 2 minute na 11000 rpm. DNA peleta je postala vidljiva na dnu tubice, a izopropanol je izliven naglim okretom tubice u pripremljenu čašu.



Slika 10. Vidljiva molekula DNA (Foto original: Matej Kurilj)

Nakon toga dodano je dodano 500  $\mu$ l 0,2 M natrij-acetata u 76% etanolu, te je 30 minuta laganim lupkanjem prstima isprana DNA. Uzorci su zatim stavljeni na centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 11000 rpm. Kada je završeno centrifugiranje tekućina je izlivena, a u tubice je zatim dodano je 500  $\mu$ l 10mM amonij-acetata u 76% etanolu u kojem je DNA drugi puta isprana. Uzorci su opet stavljeni na centrifugu 5 min na 11000 rpm. Supernatant je opet izliven, a tubice su ostavljene otvorene dok etanol nije ishlapio. Osušanim tubicama dodano je 100  $\mu$ l TE<sub>0,1</sub> pufera, a lupkajući prstom otopljena je DNA. Tubice su ostavljene stajati preko noći u hladnjaku. Idući dan uzorci su malo promiješani i spremljeni na -20°C.

### 2.3.c. FA-UniZG-DNA metoda

Tablica 3: Kemikalije potrebne za izolaciju DNA FA-UniZG-DNA metodom

KEMIKALIJA	SASTAV
Izolacijski CTAB pufer	2% CTAB – Cetyltrimethylammonium bromide
	100 mM TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane ], pH8
	1,4 M NaCl
	20 mM EDTA (EDTA disodium salt), pH8
	0,2 % $\beta$ -mercaptoethanol
	LiCl
kloroform-izoamilni alkohol	kloroform: izoamilni alkohol = 24:1
70% izopropanol (-20°)	
70% etanol	
TE pufer za otapanje i čuvanje DNA – pH8	Tris - Tris(hydroxymethyl)aminomethane EDTA - EDTA disodium salt

Tubica od 2 ml je ispunjena sa 30 mg izmrvljenog lisnog materijala, zatim je dodano 800  $\mu$ l izolacijskog pufera koji je zagrijan na 65°C. Uzorak je stavljen na vorteks, dodano je 400  $\mu$ l LiCl koji je zagrijan na 60°C i stavljen ponovo u vodenu kupelj 30 minuta na 60°C. Nakon što su se uzorci ohladili dodano je 670  $\mu$ l kloroform-izoamil alkohola. Tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi 20 minuta uz često miješanje. Uzorci su zatim stavljeni na centrifugiranje na 14000 rpm 10 minuta. Poslije centrifugiranja, gornja faza je izdvojena u nove tubice u koje je zatim dodano 20  $\mu$ l RNAzeA. Tubice su premještene u vodenu kupelj na 37°C, zbog boljeg i bržeg djelovanja enzima, u trajanju od 30 minuta. Ohlađenim uzorcima dodano je 300  $\mu$ l 5M NaCl nakon čega su tubice lagano promiješane okretanjem ruke. Nakon toga dodano je 700  $\mu$ l hladnog apsolutnog izopropanola te su uzorci ostavljeni stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon što je DNA postala vidljiva, uzorci su stavljeni na centrifugiranje u trajanju od 10 minuta na 11000 rpm. Supernatant je zatim izliven (pazeći da DNA peleta ostane zalijepljena za dno tubice), pelete su zatim isprane sa 670  $\mu$ l 0,2M natrij-acetata u 76% etanolu. Slijedilo je centrifugiranje pri 11000 rpm u trajanju od 5 minuta. Nakon toga ponovno je izliven supernatant, a peleta DNA isprana je sa 670  $\mu$ l 10mM amonij-acetata. Uzorci su zatim posljednji put stavljeni u centrifugu 10 minuta pri 11000 rpm. Iz tubica je



izliven tekući dio, a tubice su ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi. U osušene tubice dodano je 100  $\mu$ l TE<sub>0,1</sub> pufera kao bi se DNA peleta otopila, tubice su zatim premještene preko noći u hladnjak. Idući dan lagano lupkajući prstom promiješani su uzorci i spremljeni na -20°C.

#### **2.4. Utvrđivanje količine i kvalitete izolirane DNA**

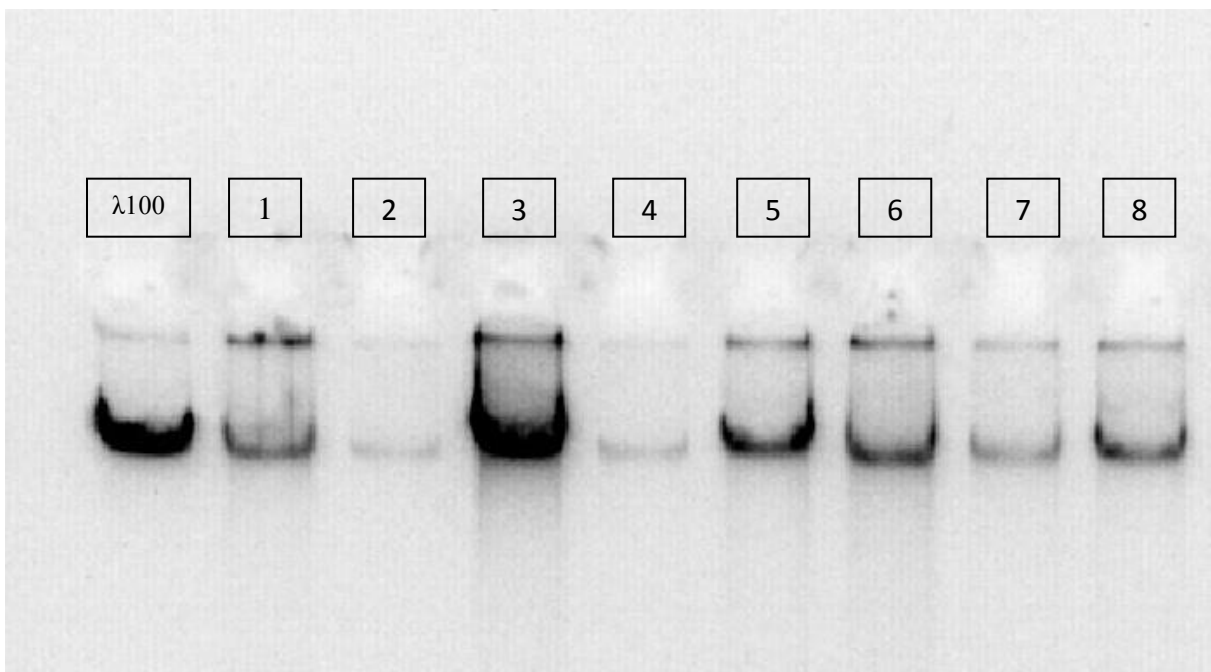
Ispitivanje kvalitete DNA provedena je elektroforetski u uspoređujući ju s  $\lambda$  DNA, čija je koncentracija unaprijed poznata. Uzorci DNA su izvađeni iz zamrzivača te otopljeni na sobnoj temperaturi nakon čega su stavljeni u kutiju s ledom. Za elektroforezu uzoraka DNA korišten je 0,8% agarozni gel zbog visoke razlučivosti, jer jesu DNA fragmenti velike mase (2 -10 kb). Prema volumenu kadice od 60 ml odvagano je 0,48g agaroze u Erlenmeyer tikvicu od 200 ml u koju je uliveno 60 ml 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) pufera. Tikvica je zatim stavljena u mikrovalnu pećnicu pri čemu se zagrijavanjem i povremenim miješanjem otopila agaroz. Slijedilo je hlađenje otopine u vodenoj kupelji do temperature od 40°C, nakon čega je u otopinu stavljeno četiri kapi OLERUP boje. OLERUP boja se interkalira između DNA baza te omogućava njenu vidljivost pod UV svjetlom. Zatim je otopina je izlivena u pripremljenu kadicu i stavljen je češalj za veličinu uzorka od 10  $\mu$ l. Slijedila je polimerizacija gela hlađenjem otopine agaroze i pufera. Nakon polimerizacije gela nanoseni su uzorci DNA i uzorak  $\lambda$  DNA koncentracije 100 ng/ $\mu$ l. Za pripremu DNA uzoraka i  $\lambda$  DNA za elektroforezu korišteno je 2  $\mu$ l razrijeđene DNA, 2  $\mu$ l STOP mixa (5x SGB) (1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA, Bromfenolblue boja, 87% glicerol, SDS) i 6  $\mu$ l d.d. H<sub>2</sub>O. Uvjeti elektroforeze bili su: 80 V, 60 mA i 50 W u trajanju od 60 minuta.

#### **2.5. Očitavanje rezultata elektroforeze**

Nakon što je napravljena elektroforeza agarozni gel s produktima stavljen je u Syngene® G:BOX F3 uređaja za snimanje i pomoću njega su fotografirani uzorci. Uređaj u sebi ima ugrađenu kameru rezolucije 3.8 megapixela kao i GeneSys softver. Rezultati su očitani pomoću Syngene® programa GeneTools, koji je kompatibilan s GeneSys softverom ver. 1.4.1.0.

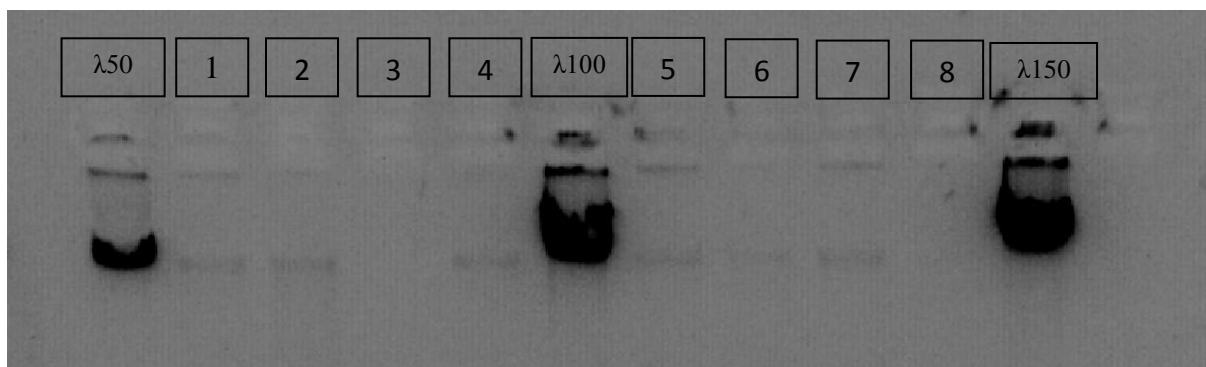
### 3. Rezultati i rasprava

Budući da su korištene tri metode izolacije, rezultati variraju ovisno o korištenoj metodi. Iako su Sharma i sur., (2010.) utvrdili da nema velike razlike između kvalitete izolirane DNA ukoliko je prilikom homogenizacije korišten tekući dušik ili ne, u ovom radu zajedničko svim metodama bila je homogenizacija tkiva prilikom koje je korišten tekući dušik te je dobivena zadovoljavajuća kvaliteta DNA. Kvaliteta i čistoća izolirane DNA bila je provjerena elektroforetski uspoređujući ju s DNA poznate koncentracije. Najbolje rezultate dala je najčešće korištena metoda izolacije DNA iz biljnog materijala – CTAB metoda. Pomoću ove metode dobivena je kvalitetna DNA iz svih biljnih vrsta na kojima je bila korištena izuzev kadulje i lavande (slika 11) . Kod te dvije vrste, DNA nije za odbaciti, niti je u jako lošem stanju, no nije kvalitetna kao kod ostalih biljaka. Procijenjena količina DNA iz uzoraka ružmarina, ljupčaca, mente i anisa je 30 ng/μl, najmanja je u kadulje i lavande (10 ng/μl), nešto veća (20 ng/μl) je u rute, a najveća, od čak 150 ng/μl, u kamilice. Sahu i sur. (2012.) koristeći ovu metodu imali su velike probleme prilikom izolacije jer su im pelete bile ljepljive i imale su visoku viskoznost. Budući da su biljke korištene u istraživanju bile ubrane u šumi, te su bile pod utjecajem vanjskih uvjeta, to je mogući razlog ljepljivosti i velike viskoznosti.



Slika 11. Elektroforegram ispitivanih DNA uzoraka dobivenih CTAB metodom ( $\lambda$ DNA 100 ng/  $\mu$ l; 1. ružmarin; 2. kadulja; 3. kamilica; 4. lavanda; 5. ljupčac; 6. menta; 7. ruta; 8. anis)

Pomoću Modificirane SDS metode prema Schweizer i sur. (1995) poznate i kao natrij-bisulfit metoda modificirane prema Bolarić i sur. (2005) uspješno su izolirane sve biljne vrste. No, najbolje rezultate ova metoda je dala u lavande i anisa. Kod ostalih biljnih materijala molekule DNA nisu imali visoku kvalitetu. Procijenjena DNA nije mogla biti očitana iz uzoraka kamilice i anisa, dok je kod ostalih uzoraka onda iznosila 10 ng/  $\mu$ l (slika 12).



Slika 12. Elektroforegram biljnih DNA uzoraka dobivena SDS metodom ( $\lambda$ DNA 50ng/ $\mu$ l; 1. ružmarin; 2. kadulja; 3. kamilica; 4. lavanda;  $\lambda$ 100; 5. ljupčac; 6. menta; 7. ruta; 8. anis;  $\lambda$ DNA 150 ng/ $\mu$ l)

Kao najneučinkovitija metoda bila je FA-UniZG-DNA metoda. DNA uzorci nisu bili ispitani elektroforetski zbog obojenosti DNA peleta. Dodatnim ispitivanjem trebalo bi se provjeriti zašto su rezultati takvi i gdje je došlo do jake želatinacije otopine u kojoj se nalazila DNA.

Razlika između korištenih metoda, izuzev pufera, su i u pranju peleta što može utjecati na čistoću dobivenu DNA. Baš taj korak ima veliki utjecaj na uklanjanje sekundarnih metabolita koji stvaraju probleme prilikom izolacije. Khanuja i sur. (1999.) navode kako dodavanje veće koncentracije PVP-a i  $\beta$ -mercaptoetanol pomaže prilikom odstranjivanja polifenola i dobivanja kvalitetnije molekule DNA, dok se s druge strane, veća koncentracija NaCl-a treba koristiti prilikom odstranjivanja polisaharida iz otopine.

Kako bi utvrdili je li izolirana DNA sposobna za daljnju primjenu može se koristiti digestija restrikcijskim endonukleazama, a u daljnjem istraživanju područje primjene izolirane DNA provjeriti će se PCR metodom.

#### **4. Zaključak**

Na primjeru osam biljnih vrsta koje pripadaju skupini medicinskih i aromatičnih biljaka provedeno je istraživanje kvalitete i količine izolirane DNA. Korištene su tri metode, od kojih se najbolja pokazala CTAB metoda prilikom koje je uspješno izolirana DNA iz svih osam biljnih vrsta. SDS metoda najbolje rezultate dala je kod anisa i lavande, dok je FA-UniZG-DNA metoda dala najlošije rezultate. Prekomjerna obojanost molekule DNA prilikom FA-UniZG-DNA metode razlog je što ti uzorci nisu bili pogodni za daljnju analizu.

## Literatura

Azmat, M.A., Khan, A.I., Cheema, H.M.N., Rajwana, I.A., Khan A.S., Khan, A.A. (2012): Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L.

Bolarić, S., Barth, S., Melechinger, A.E., Posselt, U.K., (2005.) Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breeding* 123:161-166

Doyle, J.J. Doyle, J.L. (1990.): A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15

Grljušić S. (2003). Genetska varijabilnost crvene djeteline (*Trifolium pratense* L.) nakon selekcije u brdsko-planinskim uvjetima. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S. (1999.): Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils 17:1-7

Sahu, S.K., Thangaraj, M., Kathiresan, K. (2012.): DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol

Schweizer, G.F., Baumer, M., Daniel, G., Rugel, H., Röder M.S. (1995.): RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene Rh2 in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 90: 920- 924.

Sharma, P., Joshi, N., Sharma, A. (2010.) Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen, Banasthali University, 610-614

Stöckigt, J., Obitz, P. Falkenhagen, H., Lutterbach, R., Endreß, S., (1995.): Natural products and enzymes from plant cell cultures, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 43:97-109

WHO (2001). *Legal Status of Traditional Medicine and Complementary/ Alternative medicine: A world wide review*. WHO Publishing 1

## **Sažetak**

Većinom sve vrste medicinskog, ljekovitog i aromatičnog bilja sadrže velike količine polisaharida, polifenola i ostalih sekundarnih metabolita. Cilj rada bio je opisati postupak izolacije molekule DNA te utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA kod biljnih vrsta koje se koriste u ljekovite svrhe. Biljne vrste korištene su istraživanju su: ružmarin, kadulja, kamilica, lavanda, ljupčac, menta, ruta i anis. One su uzgajane u kontroliranim uvjetima i nisu bile pod utjecajem vanjske sredine. Prilikom izolacije korištene su tri metode: CTAB, SDS i FA-UniZG-DNA. Tekući dušik korišten je kod homogenizacije biljnog tkiva, dok je kvaliteta i količina izolirane DNA testirana elektroforetski. CTAB metoda se pokazala najuspješnijom za izolaciju DNA iz svih ispitivanih biljnih vrsta.

**Ključne riječi:** medicinsko, ljekovito i aromatično bilje, izolacija DNA, tekući dušik, elektroforeza

## **Summary**

Most of all medical, medicinal and aromatic plants contain large amounts of polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolites. Aim of this research was to describe the process of isolation of DNA molecules and to determine the quality and quantity of isolated DNA in plant species which are used in medicinal purposes. Plant species used in this research are: rosemary, sage, chamomile, lavender, lovage, mint, anise and routes. They were grown in controlled area and hadn't any impact of external environment. We used three types of isolation methods: CTAB, SDS and FA-UniZG-DNA. Liquid nitrogen was used in homogenization of plant tissue, while purity and quality of isolated DNA was estimated by electrophoresis.

**Key words:** medical, medicinal and aromatic plants, DNA isolation, liquid nitrogen, electrophoresis

## Popis slika

Red. br.	Naziv slike	Stranica
Slika 1.	Biljni materijal stavljen na naklijavanje (Foto original: Matej Kurilj)	2
Slika 2.	Odstranjivanje mladih listova i njihovo vaganje ( Foto original: Matej Kurilj)	3
Slika 3.	Pohranjivanje listova u kuverte ( Foto original: Matej Kurilj)	4
Slika 4.	Biljni materijal stavljen na -80 <sup>0</sup> C u ultra hladni zamrzivač ( Foto original: Matej Kurilj)	5
Slika 5.	Materijal potreban za homogenizaciju biljnog tkiva (Foto original: Matej Kurilj)	6
Slika 6.	Uzorci u vodenoj kupelji na 65 <sup>0</sup> C (Foto original: Matej Kurilj)	8
Slika 7.	Dodavanje koloroform izoamil alkohola (Foto original: Matej Kurilj)	8
Slika 8.	Odvajanje supernatanta (Foto original: Matej Kurilj)	9
Slika 9,	Tekuća i kruta faza (Foto original: Matej Kurilj)	11
Slika 10.	Vidljiva molekula DNA (Foto original: Matej Kurilj)	12
Slika 11.	Elektroforegram ispitivanih DNA uzoraka dobivenih CTAB metodom ( λ100; 1. ružmarin; 2. kadulja; 3. kamilica; 4. lavanda; 5. ljupčac; 6. menta; 7. ruta; 8. anis)	14
Slika 12.	Elektroforegram biljnih DNA uzoraka dobivena SDS metodom ( λ50; 1. ružmarin; 2. kadulja; 3. kamilica; 4. lavanda; λ100; 5. ljupčac; 6. menta; 7. ruta; 8. anis; λ150)	15

## Popis tablica

Red. br.	Naziv tablice	Stranica
Tablica 1.	Kemikalije potrebne za izolaciju DNA CTAB metodom	7
Tablica 2.	Kemikalije potrebne za izolaciju DNA SDS metodom	10
Tablica 3.	Kemikalije potrebne za izolaciju DNA FA-UniZG-DNA metodom	13



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

### METODE IZOLACIJE DNA ZA LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE

### DNA ISOLATION METHODS FOR MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS

Matej Kurilj

#### **Sažetak**

Većinom sve vrste medicinskog, ljekovitog i aromatičnog bilja sadrže velike količine polisaharida, polifenola i ostalih sekundarnih metabolita. Cilj rada bio je opisati postupak izolacije molekule DNA te utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA kod biljnih vrsta koje se koriste u ljekovite svrhe. Biljne vrste korištene su istraživanju su: ružmarin, kadulja, kamilica, lavanda, ljupčac, menta, ruta i anis. One su uzgajane u kontroliranim uvjetima i nisu bile pod utjecajem vanjske sredine. Prilikom izolacije korištene su tri metode: CTAB, SDS i FA-UniZG-DNA. Tekući dušik korišten je kod homogenizacije biljnog tkiva, dok je kvaliteta i količina izolirane DNA testirana elektroforetski. CTAB metoda se pokazala najuspješnijom za izolaciju DNA iz svih ispitivanih biljnih vrsta.

**Ključne riječi:** medicinsko, ljekovito i aromatično bilje, izolacija DNA, tekući dušik, elektroforeza

#### **Summary**

Most of all medical, medicinal and aromatic plants contain large amounts of polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolites. Aim of this research was to describe the process of isolation of DNA molecules and to determine the quality and quantity of isolated DNA in plant species which are used in medicinal purposes. Plant species used in this research are: rosemary, sage, chamomile, lavender, lovage, mint, anise and routes. They were grown in controlled area and hadn't any impact of external environment. We used three types of isolation methods: CTAB, SDS and FA-UniZG-DNA. Liquid nitrogen was used in homogenization of plant tissue, while purity and quality of isolated DNA was estimated by electrophoresis.

**Key words:** medical, medicinal and aromatic plants, DNA isolation, liquid nitrogen, electrophoresis