IZOLACIJA I PROCJENA KVALITETE DNA IZ RAZLIČITIH BILJNIH VRSTA

Kesedžić, Marko

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:151:500128

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SADRŽAJ:

1. Uvod 1

2. Materijali i metode 3

2.1. Biljni materijal 3

2.1.1. Kukuruz (*Zea mays* L.) 3

2.1.2. Pšenica (*Triticum aestivum ssp. vulgare)* 3

2.1.3. Suncokret (*Helianthus annuus L.)* 3

2.1.4. Uljana repica (*Brassica napus var. oleifera)* 4

2.1.5. Lan (*Linum usitatissimum L.*) 4

2.1.6. Bundeva (*Cucurbita maxima Duchesne*) 4

2.1.7. Krastavac (*Cucumis sativus L.*) 4

2.2. Priprema biljnog materijala 5

2.3. Izolacija DNA 7

2.3.1. Priprema otopina 7

2.3.2. Protokol modificirane CTAB metode 10

2.3.3. Mjerenje čistoće uzoraka 15

2.3.4. Izračunavanje koncentracije DNA 16

3. Rezultati i rasprava 17

4. Zaključak 20

5. Popis literature 21

6. Sažetak 23

7. Summary 24

8. Popis slika 25

9. Popis tablica 26

10. Popis grafikona 26

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 27

1. Uvod

Ljude je uvijek intrigiralo nasljeđivanje bilo u njihovoj obitelji, bilo u njihovom vrtu među biljkama ili među životinjama. Kroz tisuće godina ljudi su selekcionirali na stotine biljnih životinjskih vrsta, rasa, sorti kako bi dobili udomaćene biljke i životinje s novim osobinama (npr. veći i ukusniji plodovi biljaka, krave koje daju više mlijeka, ovce koje daju više vune, veliki broj rasa pasa itd.). Ljudi su shvatili da se željene osobine mogu dobiti križanjem roditelja s određenim osobinama i da se mogu dalje prenositi potomstvom, ali nisu razumjeli pravu prirodu nasljeđa (Pavlica M., 2012.).

Osnovu teorije o nasljeđivanju postavio je Gregor Mendel krajem prošloga stoljeća. Proučavajući nasljeđivanja kod biljaka on je otkrio osnovne zakonitosti, a njegovi faktori nasljeđivanja su ono što danas nazivamo genima. Geni su osnova nasljeđivanja koja se prenose s generacije na generaciju. Više gena zajedno s nekim proteinima čini kromosome, koji su sastavni dijelovi stanične jezgre. Kromosome je moguće vidjeti svjetlosnim mikroskopom, ali tek nakon bojanja u stanicama koje se intenzivno mitotski dijele (npr. stanice korijena luka). Istraživač Avery 1944. godine je dokazao da je kemijska osnova gena tj. nasljeđivanja DNA. Deoksiribonukleinska kiselina (Deoxyribonucleic Acid, DNA) je središnja molekula života te osnovni nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića. DNA je sastavljena od dva lanca molekula koji su međusobno uvijeni jedan oko drugog u obliku dvostruke uzvojnice. Model dvostruke uzvojnice opisali su 1953. god. Watson i Crick. DNA lanac sastoji se od niza nukleotida, a svaki nukleotid od šećera deoksiriboze, fosfata i nukleotidnih baza: adenina (A), citozina (C), gvanina (G) i timina (T). Baze se sparuju vodikovim vezama na način da je adenin vezan sa timinom (A-T), a citozin sa gvaninom (C-G). Svaki pojedinačni kontakt je par baza (engl. base pair, bp), a cijeli ljudski genom ih ima oko 3 milijarde (Pavlica M., 2012.).

Smatra se da je kod brojnih biljnih vrsta teško izolirati DNA zbog visoke koncentracije sekundarnih metabolita kao što su polisaharidi i polifenoli. Kako bi se prevladao ovaj problem, razvijeno je nekoliko metoda izolacije. U ovom završnom radu je korištena metoda pod nazivom CTAB metoda (Doyle i Doyle 1987.) modificirana prema Grljušić (2003.). Cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) metoda je jedna od najpopularnijih protokola za izolaciju DNA. Za izolaciju je potrebna velika količina biljnog tkiva,

liofilizator ili tekući dušik, a znanstvenici preporučuju korištenje svježeg tkiva. Metodu je prvi koristio Saghai-Maroof (1984.) izolirajući DNA ječma, nakon čega je metoda postala vrlo popularna kao metoda izolacije DNA riže (Chen i Ronald, 1999.), pšenice (Petrović, 2012.) i drugih biljaka, zatim bakterija (Caccavo i sur., 1994.) i životinja (Shahjahan i sur., 1995.). Temeljni princip svih metoda izolacije molekule DNA temelji se na nekom izolacijskom puferu koji je na bazi detergenta i lužina koji uzrokuju lizu stanica, slijedi deproteinizacija enzimima i organskim otapalima, zatim taloženje u otopini alkohola i soli i na kraju pročišćavanje i otapanje izolirane DNA u vodi ili puferu. Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi kvalitetu i koncentraciju izolirane DNA iz biljke kukuruza, pšenice, suncokreta, uljane repice, lana, bundeve i krastavca.

2. Materijali i metode

2.1. Biljni materijal

Naša prehrana velikim dijelom se sastoji od biljaka stoga je potrebno oplemenjivati postojeće kultivare. Izolacija DNA nam pomaže pri stvaranju novih kultivara, a kao krajnji cilj trebalo bi biti stvaranje kultivara s većim prinosom, otpornijih na bolesti i štetnike. U ovom istraživanju odabrano je sedam biljnih kulturnih vrsta koje se koriste za ishranu ljudi i životinja te koje se međusobno razlikuju po kemijskom sastavu lista zbog ispitivanja učinkovitosti metode izolacije molekule DNA.

2.1.1. Kukuruz (*Zea mays* L.)

Kukuruz je biljka porijeklom iz Centralne Amerike koja je nakon otkrića Amerike prenesena u Europu i na ostale kontinente. Kukuruz spada u prosolike žitarice latinskog naziva *Zea mays* L. (Pucarić, 1997.). Po zasijanim površinama kukuruz je treća svjetska kultura, nakon pšenice i riže. Sije se na oko 130 milijuna hektara, a prosječni prirod iznosi 3.7 t/ha. Najveće površine zasijane kukuruzom imaju SAD (oko 28 milijuna ha), Kina (oko 19 milijuna ha), Brazil (oko 12,5 milijuna ha), Meksiko (oko 7 milijuna ha) i drugi (http://www.fao.org). U RH prema statističkom ljetopisu iz 2012. za 2011. godinu površine pod kukuruzom su iznosile 305 130 ha s prosječnim prinosom od 5,7 t/ha.

2.1.2. Pšenica (*Triticum aestivum ssp. vulgare)*

Prema pronađenim zapisima i nalazima utvrđeno je kako je pšenica poznata više od 10.000 godina. Uzgajana je u Iraku, Maloj Aziji, Kini i Egiptu. Pšenica je najvažniji ratarski usjev, a uzgaja se na oko 23% svjetskih obradivih površina (Đorđević i sur., 1965.). U RH prema statističkom ljetopisu iz 2012. u 2011. godini površine pod pšenicom su iznosile 149 797 ha s prosječnim prinosom od 5,2 t/ha.

2.1.3. Suncokret (*Helianthus annuus L.)*

Suncokret je naša najvažnija uljarica. Porijeklom je iz Amerike (Mexiko, Peru). Površina pod suncokretom 2011. godine je iznosila 30 041 ha s prosječnim prinosom od 2,8 t/ha (Vratarić i sur., 2004.).

2.1.4. Uljana repica (*Brassica napus var. oleifera)*

Kod nas se sad jedino uzgaja kupusna uljana repica (*Brassica napus var. oleifera*). Za ovu vrstu postoje ozimi i jari tipovi, a kod nas se uzgajaju više ozimi tipovi jer daju veći prinos. Uljana repica u listovima ima 36,89% proteina i 10,37% masti. (Mustapić i sur., 1984.)

2.1.5. Lan (*Linum usitatissimum L.*)

Lan se uzgaja na svim kontinentima. Uljani lan je kultura toplijih i suhih područja, pa se uzgaja više u južnim predjelima, dok predivom lanu više odgovara vlažniji i umjereniji klimat. Uzgaja se za proizvodnju vlakana i sjemena iz kojega se dobiva ulje. U RH se od 1930-tih godina postupno smanjivale površine zasijane lanom, a proizvodnja je potpuno prestala 1988.god. (Butorac, 2009.).

2.1.6. Bundeva (*Cucurbita maxima Duchesne*)

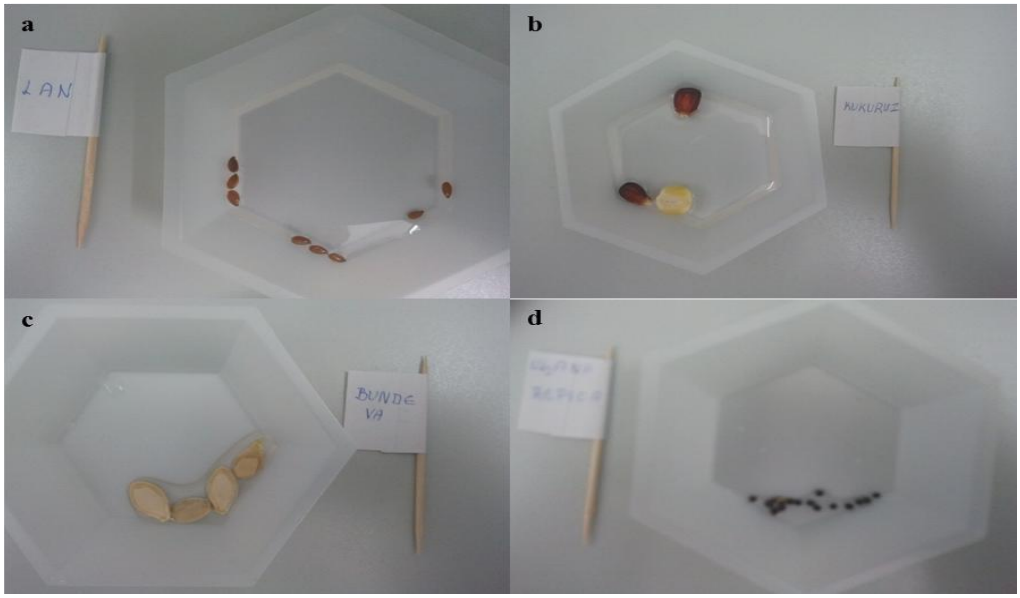
Buče su jednogodišnje biljke, a izvorno dolaze iz Amerike. Danas se uzgajaju kultivirane vrste u toplim područjima svijeta, a dozrijevaju u kasnu jesen. Naša statistika vodi tikve pod ostalo povrće (Lešić i sur., 2002.).

2.1.7. Krastavac (*Cucumis sativus L.*)

Krastavac je jednogodišnja zeljasta biljka i pripada porodici *Cucurbitaceae*. Uzgaja se kao salatni krastavac na otvorenom polju i u staklenicima i plastenicima, te kao industrijski (kornišon). Konzumira se u svježem stanju i kao kiseli krastavac, male je kalorične vrijednosti. Površine se u RH kreću oko 5 500ha s prosječnim prinosom od 7,4 t/ha (Parađiković, 2009.).

2.2. Priprema biljnog materijala

Ovo istraživanje je provedeno na sedam biljaka. Istraživanje je provedeno, kao što je prethodno navedeno, na kukuruzu (*Zea mays L.*), pšenici (*Triticum aestivum ssp. vulgare*), suncokretu (*Helianthus annuus L.*), uljanoj repici (*Brassica napus var. oleifera*), lanu (*Linum usitatissimum L.*), bundevi (*Cucurbita maxima Duchesne*) i krastavcu (*Cucumis sativus L.*). Sve kulture su prvo stavljene u vodu kako bi se potaknulo bubrenje sjemena (slika 1), a zatim na naklijavanje u kontroliranim uvjetima (slika 2), u komori 10.04.2013. godine.

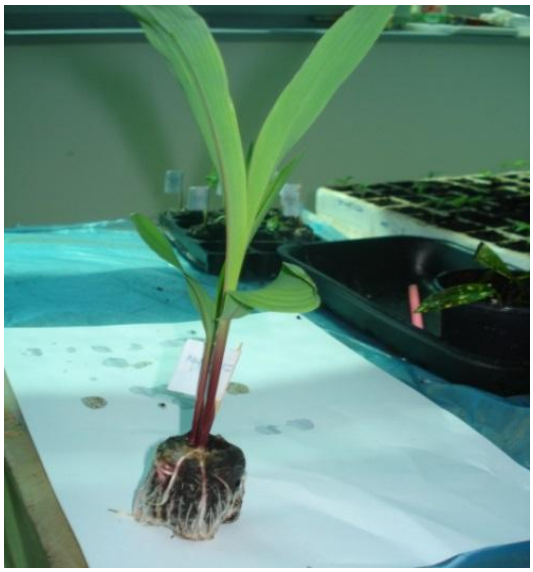


Slika 1. Bubrenje sjemenki lana (a), kukuruza (b), bundeve (c) i uljane repice (d) (foto original: M. Kesedžić)



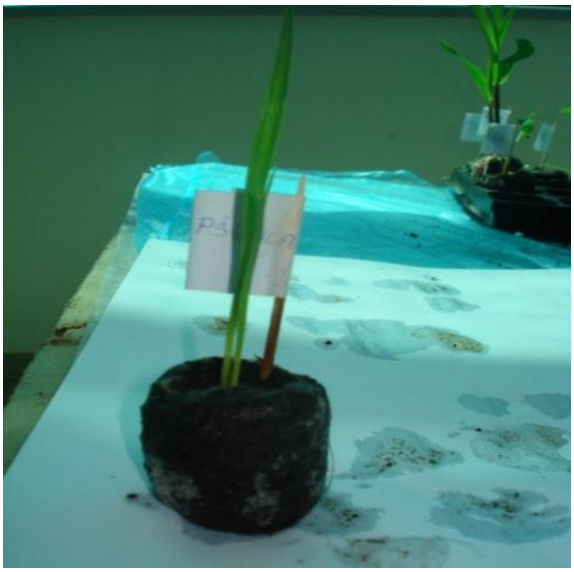
Slika 2. Posijano sjeme ispitivanih biljnih vrsta (foto original: M. Kesedžić)

Komora je programirana na temperaturu od 20˚C, 12h dan i 12h noć. U komori su biljke bile 14 dana. Nakon 14 dana biljke su izvađene iz komore u fazi tri lista (slike od 3 do 6). Za pripremu klijanaca za izolaciju DNA listovi su odrezani (slika 7) i izvagani na težinu od 0,20g (slika 8), zatim su stavljeni u hladnjak na -80˚C.



Slika 3. Klijanac biljke kukuruza

(foto original: M. Kesedžić)



Slika 4. Klijanac biljke pšenice

(foto original: M. Kesedžić)



Slika 5. Klijanac biljke lana
(foto original: M. Kesedžić)



Slika 6. Klijanac biljke uljane repice
(foto original: M. Kesedžić)



Slika 7. Uzimanje uzoraka

(foto original: M. Kesedžić)



Slika 8. Vaganje uzoraka

(foto original: M. Kesedžić)

2.3. Izolacija DNA

Prije početka izolacije DNA provjerena je postojeća količina svih kemikalija uključenih u postupak i pripremljene sve otopine prema utvrđenom laboratorijskome protokolu. Otopine potrebne za odabranu CTAB metodu (Doyle i Doyle 1987.), modificirana prema Grljušić 2003., prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Otopine potrebne za izolaciju DNA

	Otopina
1.	2% CTAB pufer
2.	Kloroform izoamilni alkohol (SEVAG)
3.	RNA-za A
4.	Hladni (-20 °C) izopropanol
5.	Hladni (-20 °C) 70% etanol
6.	1X TE pufer

2.3.1. Priprema otopina

- Korišteno je 100 ml 2% CTAB pufera za izolaciju. Za dobivanje pufera bile su potrebne sljedeće komponente:

- 2 g CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; F.W.=364.5)
- 10 ml 1M TRIS-HCl, pH=8,0 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane); F.W.=121.14)

- 8,08 g NaCl (Sodium chloride, F.W.=58.44)
- 4 ml 0,5M Na_2EDTA, pH=8,0 i
- 0,2 ml 2-merkaptoetanola (mercaptoethanol, F.W.=78,13)

Za pripremanje navedene otopine u čašu volumena 200 ml, u koju smo stavili magnet za miješanje, uliveno je 180 ml sterilizirane H_2O te sve zajedno stavljeno na miješalicu (stirer). Tijekom miješanja postepeno su dodavane sve komponente osim merkaptoetanola te je otopina kuhana na 50 °C, dok nije postala potpuno prozirna. Nakon što je otopina ohlađena do sobne temperature i filtrirana kroz filter papir promjera rupica 0,2 µm. Nakon filtriranja dodano je 0,2 ml 2-merkaptoetanola. Merkanptoetanol smo dodali u digestoru zbog isparavanja koja su otrovna te smo dopunili steriliziranom d.d. H_2O do 100 ml.

Za 1M Tris-HCl, pH=8,0 (za 100 ml otopine) smo otopili 12,11 g TRIS baze (Tris (hydroxymethyl) aminomethane), F.W.=121,14) u cca. 80 ml d.d. H_2O. Uređajem za mjerenje pH (pH-metrom) konstantno je provjeravan pH. Da bi dobili željeni pH od 8,0 dodana je koncentrirana HCl (Hydrochloric acid; F.W.=36,46) i dopunjeno do 100 ml s d.d. H_2O. Nakon toga otopinu smo stavili na autoklaviraje.

Za 200 ml 0,5M Na_2EDTA u cca. 100 ml d.d. H_2O otopljeno je 37,22 g Na_2EDTA (EDTA (Etylendiamintetraacetic acid) diosodium salt; F.W.=372,24) stavljena je na stirer i zagrijana na cca. 70-80 °C. Nakon hlađenja otopine dodali smo 4 g NaOH pločica i namjestili na pH 8,0. Otopinu smo istodobno miješali i mjerili pH sve dok pH nije bio 8,0 titriracijom s NaOH otopinom. Sa d.d. H_2O je nadopunjena do 200 ml. Otopinu smo nakon toga autoklavirali.

- kloroform izoamil alkohol (SEVAG) 24:1

Za 100 ml otopine potrebno je:

- 96 ml kloroforma (Chloroform, F.W.=119.4)
- 4 ml izoamil alkohola (Isoamyl alcohol, F.W.=88,15)

96 ml kloroforma pomiješali smo s 4 ml izoamilnog alkohola. Miješanje je obavljano unutar digestora jer su isparavanja otrovna.

- otopina enzima RNA-za A (RnaseA-otopina (10 mg RnaseA/ml)

Za 100 ml otopine potrebno je:

- 100 mg RNA-za A
- 10 ml Tris – HCl/NaCl

Mješavina Tris-HCl/NaCl je najprije filtrirana kroz filter papir 0,2 µm, nakon čega smo umiješali s enzimom. Zatim je otopina RNA-ze A kuhana u laboratorijskom kuhalu 15 minuta uronjena u čašu ključale vode. Nakon toga otopinu smo ostavili preko noći da se ohladi na sobnu temperaturu. Hladna otopina s enzimom je raspodijeljena u manje volumene od 500 µl i spremljena u zamrzivač na -20 °C.

Za 100 ml 5M NaCl, 29,22 g NaCl (Sodium chloride; F.W.=58,44) je otopljeno u cca. 70 ml d.d H_2O i nadopunjeno do 100 ml otopine s d.d. H_2O. Nakon toga otopina je stavljena na autoklaviranje.

- otopina izopropanola koju treba držati na -20 °C.
- otopina 70% etanola

70% etanol dobiven je miješanjem, u autoklaviranoj boci, 140 ml C_2H_5OH absol. s 60 ml H_2O ili da se izračunavanjem dobije potrebna količina etanola i vode prema osnovnoj formuli za izračunavanje koncentracija :

$$c1 \times v1 = c2 \times v2,$$

gdje je: c_1 – početna koncentracija

c_2 – konačna koncentracija

v_1 – potreban volumen

v_2 – konačni volumen ili volumen uzorka

$$v1 \times 0{,}96 = 100 \times 0{,}7$$

$$v1 = \frac{100 \times 0{,}7}{0{,}96}$$

$$v1 = 72{,}92$$

Tako da smo 100 ml (v_2) 70% etanola (c_2) odmjerili 72,92 ml (v_1) 96% etanola (c_1) i nadopunili do 100 ml s d.d. H_2O. Razrijeđeni etanol je stavljen u zamrzivač na -20 °C.

- 1X TE pufer za otapanje izolirane DNA**,** (pH 8,0)

Za 200 ml otopine 1X TE – pufera odmjereno je 2 ml TRIS-HCl 1M otopine (pH 8,0) i 400 µl 0,5 M Na_2EDTA (pH 8,0) otopine, te smo nadopunili s d.d. H_2O do 200 ml. Otopina je nakon toga autoklavirana i stavljena u hladnjak na +4 °C.

2.3.2. Protokol modificirane CTAB metode

Modifikacije se odnose na povećanje količine dodanog izolacijskog pufera i dužine kuhanja u kupelji, na smanjenje količine SEVAG-a, na rezanje vrha nastavka (tipsa) pipete pri odvajanju tekuće faze te na dio ekstrakcije nakon dodavanja RNA-ze. Isparavanje etanola iz uzorka obavljeno je u zatvorenom digestoru.

U vodenoj kupelji (slika 9) smo zagrijavali 2% CTAB pufer na temperaturu od 67˚C. Prije samog postupka izolacije bilo je potrebno usitniti biljno tkivo koje je prethodno bilo pohranjeno na -80˚C. Uzorci biljnog tkiva su prije same izolacije stavljeni na led (slika 10) kako bi se smanjila degradacija DNA. U pripremljeni tarionik s tučkom (slika 11) je uliven tekući dušik i nakon par sekundi dodano je 0,2 g prethodno izvaganog biljnog tkiva. Samim dodirom biljnog tkiva s tekućim dušikom tkivo postaje kruto i vrlo lomljivo. Laganim kružnim pokretima tučka, prije isparavanja tekućeg dušika, biljno tkivo je usitnjeno do oblika finog praha (slika 12).



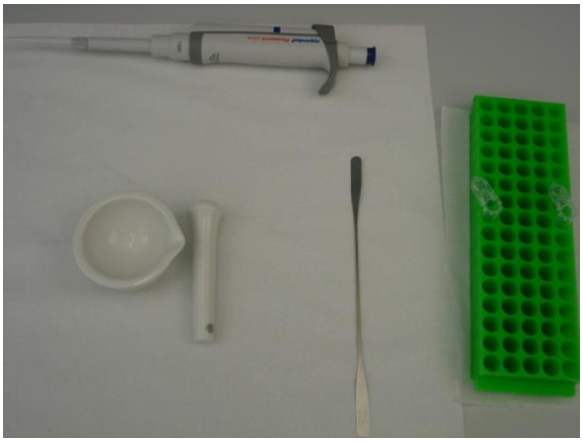
Slika 9. Vodena kupelj

(foto original: M. Kesedžić)



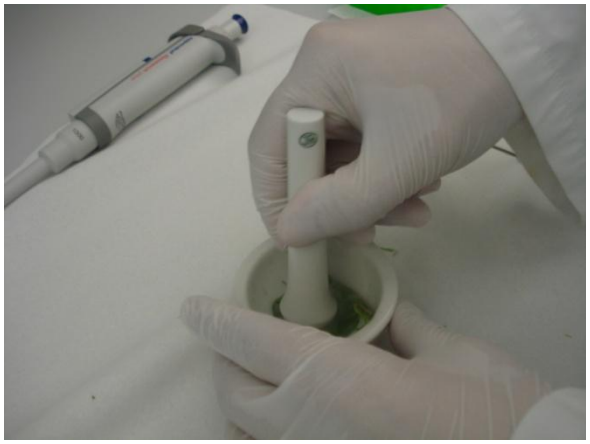
Slika 10. Biljno tkivo u ledu

(foto original: M. Kesedžić)



Slika 11. Pribor za usitnjavanje tkiva

(foto original: M. Kesedžić)



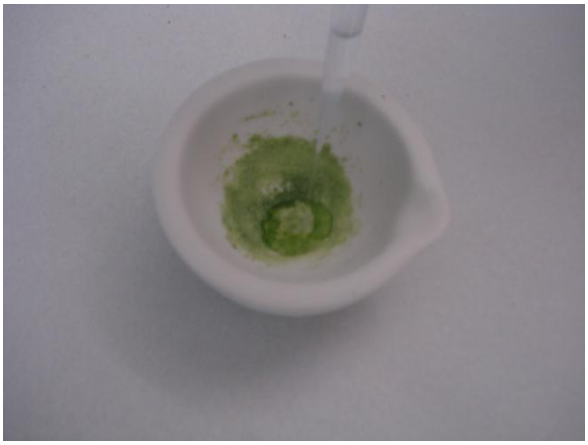
Slika 12. Usitnjavanje tkiva

(foto original: M. Kesedžić)

Nakon usitnjavanja biljnoga tkiva sama izolacija je podijeljena u sljedećih devet koraka:

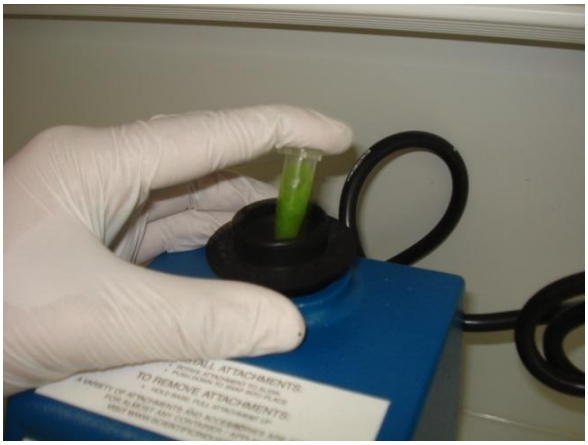
1. Korak

U svaki uzorak dodano je 1000 µl prethodno zagrijanog CTAB pufera (slika 13), nakon čega je svaka tubica promiješana na vrtložnoj miješalici (vortexu) (slika 16) radi bolje homogenizacije biljnog tkiva s puferom. Tubice su zatim stavljene na 65 °C u vodenu kupelj 45 minuta uz povremeno mućkanje (slika 15).



Slika 13. Dodavanje CTAB pufera

(foto original: M. Kesedžić)



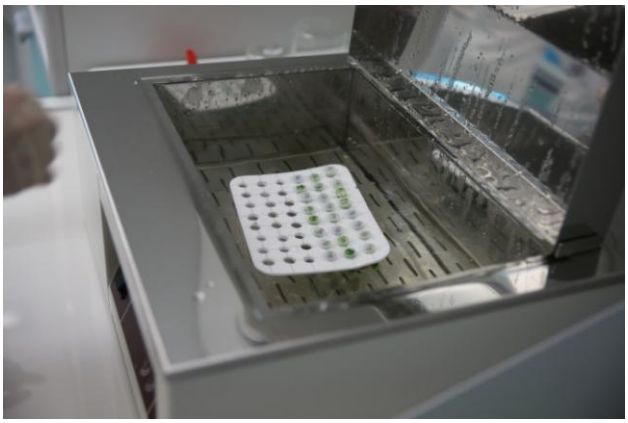
Slika 14. Vortex

(foto original: M. Kesedžić)

2. Korak

Nakon inkubacije u vodenoj kupelji tubice smo premjestili na posudu s ledom i svakom uzorku dodali 670 µl SEVAG-a (kloroform izoamilnog alkohola) u digestoru. Nakon

dodavanja alkohola trebali smo svaki uzorak pojedinačno protresti rukom (okretati tubicu) i zatim je cijela partija uzoraka mućkana u stalku 30 minuta na treskalici (slika 16.).



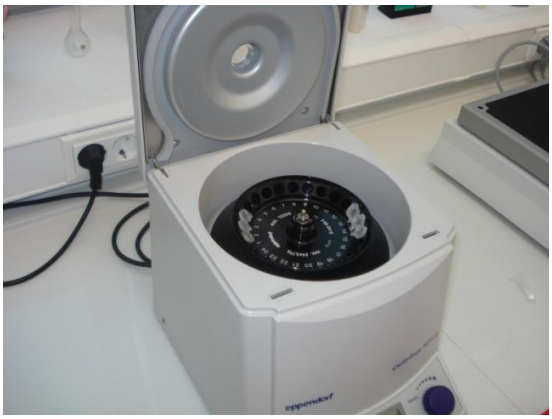
Slika 15. Uzorci u vodenoj kupelji
(foto original: M. Kesedžić)



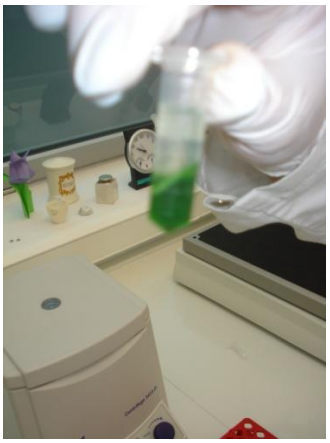
Slika 16. Treskalica sa uzorcima
(foto original: M. Kesedžić)

3. Korak

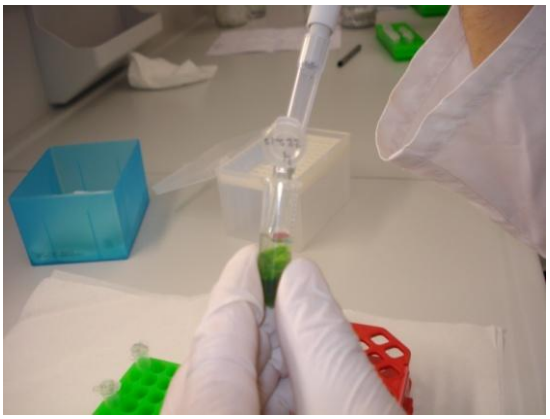
Uzorke smo zatim centrifugirali (slika 17) na maksimalnoj brzini od 14 000 o/min, osam minuta. Tubice su zatim pažljivo izvađene iz centrifuge. U tubicama su se vrlo dobro zamijetile dvije faze (slika 18): vodenasta (u kojoj je DNA) i zelena faza (u kojoj se nalaze ostaci biljnoga tkiva). Slijedilo je izvlačenje vodenaste faze s pipetom (kojoj je prethodno odrezan vrh) u novo obilježenu tubicu od 2 ml. Bilo je moguće izdvojiti 750 ml vodenaste faze (slika 19).



Slika 17. Centrifugiranje uzoraka
(foto original: M. Kesedžić)



Slika 18. Uzorak nakon centrifugiranja
(foto original: M. Kesedžić)



Slika 19. Izdvajanje vodenaste faze
(foto original: M. Kesedžić)

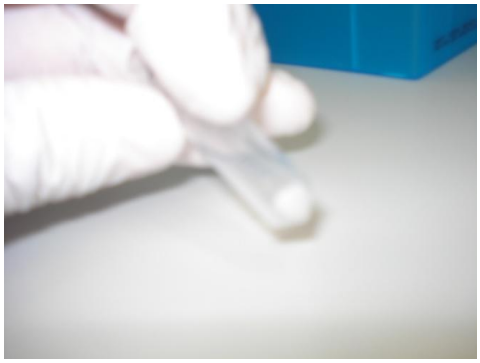
4. Korak

Nakon izvlačenja vodenaste faze u svaku tubicu je dodano 16 µl RNA-ze, nakon čega je cijela partija uzoraka ostavljena na sobnoj temperaturi uz trešnju na treskalici i povremeno ručno oko 30 minuta. Enzim RNA-za se dodaje kako bi se uklonila RNA.

5. Korak

U svaki uzorak dodano je 650 µl hladnog izopropanola. Tubice smo lagano okretali dok DNA nije postala vidljiva u obliku vrlo tankih paučinastih bijelih niti. U izopropanolu DNA je stajala jedan sat uz povremeno okretanje tubica rukom, zatim je centrifugirana 1 minutu na 14 000 o/min. Nakon toga DNA je bila zalijepljena za stijenke tubice (slika 20). Slijedilo je pažljivo izlijevanje izopropanola, da se formirana peleta ne bi izlila u

pripremljenu laboratorijsku čašu. Kod kukuruza i lana formirana peleta je bila obojana u svijetlo zelenkastu boju.



Slika 20. Formirana peleta
(foto original: M. Kesedžić)

6. Korak

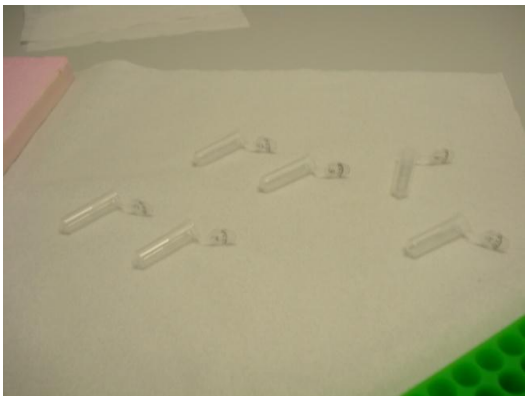
Tubice s peletama DNA su ispirane 30 minuta u 500 µl 0,2 mM natrij acetatu, lagano tresući tubice prstom, zatim 30 minuta u 76% etanolu.. Slijedilo je centrifugiranje 2 minute pri 14 000 o/min. te izlijevanje tekuće faze.

7. Korak

U svaku tubicu dodano je 500 µl 10 mM amonij acetata u 76% etanolu i peleta DNA je ispirana 10 minuta. Nakon toga peleta je još jednom centrifugirana 1 minutu pri 14 000 o/min. Nakon završetka centrifugiranja izlivena je tekuća faza. Ispiranje peleta DNA u navedenim otopinama je potrebno kako bi se uklonili mogući ostaci bjelančevina ili drugih nečistoća.

8. Korak

Pažljivo je mikropipetom odstranjen preostali etanol, a otvorene tubice su ostavljene 60 minuta u digestoru na sušenje (slika 21).



Slika 21. Sušenje pelete

(foto original: M. Kesedžić)

9. Korak

Osušenim peletama dodano je 100 µl 1X TE pufera (slika 22). Pelete DNA su otopljene laganim treskanjem tubice prstom. Nakon što su se pelete DNA despiralizirale tj. otopile, tubice su stavljene na sekundu u centrifugu (kako ne bi kapljice ostale na stijenkama tubice) i spremljene u hladnjak na +4 °C zbog što boljeg otapanja. Idući dan tubice su protresene prstom i spremljene u zamrzivač na -20 °C.



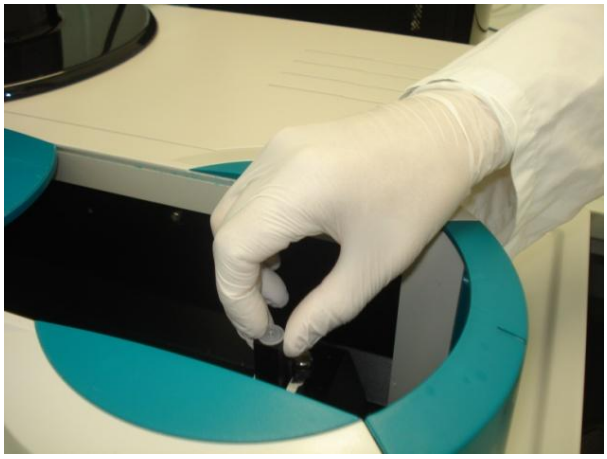
Slika 22. Pribor za dodavanje 1X TE pufera

(foto original: M. Kesedžić)

2.3.3. Mjerenje čistoće uzoraka

Čistoću dobivene DNA testiramo spektrofotometrom (slika 23). Spektrofotometar je u osnovi fotometar (uređaj za mjerenje intenziteta svjetlosti) koji može mjeriti intenzitet kao funkciju boje, ili još više specifično, valne duljine svjetlosti. Spektrofotometar

kvantitativno mjeri frakciju svjetla koja prolazi kroz mjerenu otopinu. U njemu, svjetlost iz lampe je vođena kroz monokromator, koji „izuzima“ određenu valnu duljinu svjetlosti iz kontinuiranog spektra. Svjetlost tada prolazi kroz mjereni uzorak i nakon njega se njezin intenzitet mjeri pomoću fotodiode ili drugog svjetlosnog senzora, nakon čega se izračunava njezina emisija.



Slika 23. Testiranje uzoraka spektrofotometrom
(foto original: M. Kesedžić)

Prije spektrofotometrijske analize uzorci otopljene DNA su dodatno razrijeđeni na koeficijent razrjeđenja 50, odmjereno je 750 µl TE pufera i 15 µl DNA. Za utvrđivanje čistoće DNA korištene su absorbance A 260nm i A 280nm. Upravo omjer između tih absorbanci ukazuje na čistoću izolirane DNA. Čista DNA ima omjer u rasponu 1,7-1,9.

2.3.4. Izračunavanje koncentracije DNA

Za dobivanje koncentracije DNA korištene su vrijednosti dobivene spektrofotometrijskom analizom i faktor razrjeđenja. Koristili smo se matematičkom formulom:

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

Razrjeđenje je u ovome istraživanju iznosilo 50. Kao primjer izračuna za koncentraciju DNA uzet ćemo rezultate dobivene za uljanu repicu gdje je:

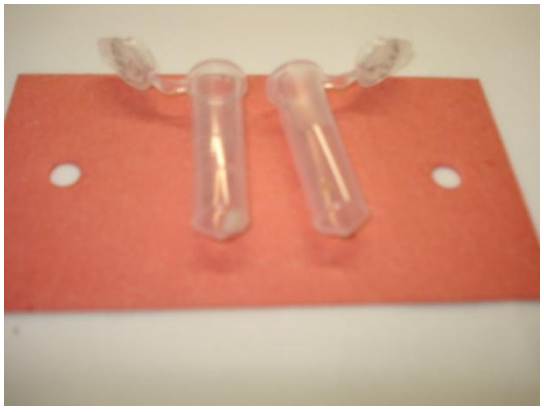
$$Koncentracija\ DNA = 0{,}096 \times 50 \times 50$$

$$= 240\ ng/\mu l$$

3. Rezultati i rasprava

Većina biljnih vrsta sadrži visoku razinu polisaharida, polifenola, pigmenata, soli i drugih sekundarnih metabolita (Antongiovanni i Sargentini, 1991.; Wen i Deng, 2002,; Marshall i sur., 2011.), koji čine DNA neupotrebljivom za biološka istraživanja. Izolacija biljne DNA je općenito teška, zbog stvaranja kompleksa nukleinskih kiselina sa sekundarnim spojevima kao što polisaharidi ili polifenoli. Takva DNA obično nije pogodna za PCR amplifikaciju. Za prevladavanje tih problema korišteno je nekoliko metoda kao što su sedimentacija u cezij-kloridu ili izolacija sa CTAB-om.

CTAB metoda je najraširenija metoda u kojoj su napravljene brojne izmjene (Kang i sur., 1998.; Allen i sur, 2006.; Tung Nguyen i sur., 2009.). Za ovaj završni rad korištena je CTAB metoda (Doyle i Doyle 1987.) modificirana prema Grljušić (2003.).
Primarni cilj ovoga istraživanja bio je dobivanje DNA pelete. U svih ispitivanih biljaka je dobivena peleta, a nakon sušenja DNA peleta kukuruza je i dalje bila obojana u zelenkastu (slika 25), vjerojatno je došlo do kontaminacije s topivim polisaharidima i pigmentima zbog kemijskoga sastava lista (Avato i sur., 1987. prema Chandler i Tracy, 2007.; Azim i sur., 1989.). Sličan rezultat primijećen je i tijekom izolacije DNA iz biljke bundeve, gdje je zamijećena sluzava i gusta otopina DNA, jer je izolacijom izolirana velika količina topivih polisaharida. Slične probleme i rezultate tijekom izolacije DNA navedenom metodom zabilježili su i Proebski i sur. (1997.) te Marshall i sur. (2011.).



Slika 24. Izolirana DNA biljke kukuruza

Nakon otapanja pelete DNA čistoća je provjerena spektrofotometrom. Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom analizom su prikazani u tablici 2. Za uspješnu izolaciju DNA omjer

absorbanci između A 260nm i A 280nm trebao bi biti u rasponu 1,7 – 1,9. Svaki omjer ispod 1,7 znak je povišene količine sekundarnih metabolita, a za omjer iznad 1,9 znak je viška etanola koji je vjerojatno ostao tijekom postupka ispiranja pelete.

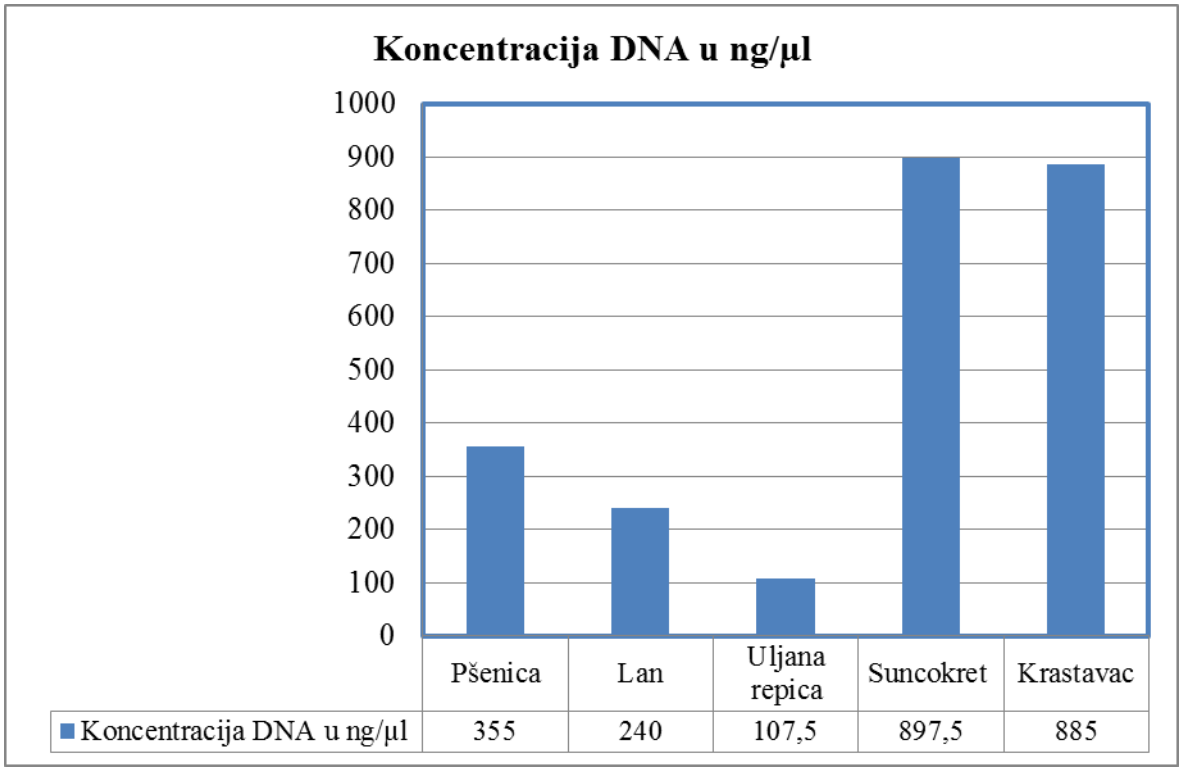
Dobiveni rezultati omjera između apsorbanci A 260nm i A 280nm potvrđuju učinkovitost korištene metode i čistoću izolirane DNA. Najbolji omjer zabilježen je u uljane repice, pšenice, suncokreta, krastavca i lana, dok je najmanji omjer zabilježen u kukuruza i bundeve (tablica 2). Korištena CTAB metoda pokazala se uspješnom kod vrsta koje ne sadrže sekundarne metabolite ili ih sadrže u tragovima.

Tablica 2. Rezultati čistoće dobiveni spektrofotometrijskom analizom i koncentracije izolirane DNA

	Omjer A260/A280	A 260nm	A 280nm	Koncentracija DNA ng/µl
Kukuruz	1,41	0,150	0,107	-
Pšenica	1,85	0,142	0,077	355
Suncokret	1,82	0,359	0,197	897,5
Uljana repica	1,89	0,043	0,022	107,5
Lan	1,70	0,096	0,057	240
Bundeva	1,36	0,355	0,261	-
Krastavac	1,80	0,354	0,197	885

Iz grafikona 1 vidimo da je najveća koncentracija DNA dobivena u biljke suncokreta (897,5 ng/µl), slijedi biljka krastavca s koncentracijom izolirane DNA od 885 ng/µl, pšenica (355 ng/µl), lan (240 ng/µl), dok je najmanja koncentracija od 107,5 ng/µl izolirane DNA dobivena za biljku uljane repice. Razlike u koncentracijama direktno su

vezane za način same izolacije, greške prilikom izlijevanja supernatanta ili ispiranja pelete DNA.



Grafikon 1. Koncentracija izolirane DNA ispitivanih biljnih vrsta

Korištena CTAB metoda se pokazala vrlo učinkovitom u većine ispitivanih biljnih vrsta dok će se određene prilagodbe trebati primijeniti za kukuruz i bundevu. Problemi se mogu ukloniti korištenjem visokih razina PVP-a i β-merkaptoetanola u puferu za neutralizaciju polifenola i oksidaciju sekundarnih metabolita (Nelson Brown i Meyers, 1998.). Većina polisaharida se mogu ukloniti i otopinom CTAB/NaCl te dodatnim ispiranjem DNA u visoko zaslanjenom TE puferu (Dehestani i sur., 2007).

4. Zaključak

1. Iz svih sedam kultura (kukuruz, pšenica, suncokret, uljana repica, lan, bundeva i krastavac) je izolirana molekula DNA.
2. Spektrofotometrijska analiza je potvrdila odgovarajuću čistoću DNA od 1,7 (lan) do 1,89 (uljana repica) za pet kultura dok su vrijednosti analize za dvije kulture bile nezadovoljavajuće i to za kukuruz 1,41 i bundevu 1,36.
3. Najveća količina izolirane DNA je utvrđena u suncokreta (897,5 ng/µl), a najmanja u uljane repice (107,5 ng/µl).
4. CTAB metoda se pokazala kao učinkovita za izolaciju DNA iz krastavca, pšenice, lana, uljana repice i suncokreta, dok je za kukuruz i bundevu potrebno metodu dodatno prilagoditi.

5. Popis literature

Allen, G.C., Vergara, M.A.F., Krasnyanski, S., Kumar, S., Thompson, W.F. (2006.): A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissue using cetyltrimethylammonium bromide, Nature protocols, 1: 2320- 2325.

Antongiovanni, M., Sargentini, C. (1991.): Variability in Chemical Composition of Straws. Options Mediterraneennes, Serie A: Seminaires Mediterraneens, 49-53.

Azim, A., Naseer, Z., Ali, A. (1989.): Nutritional evaluation of maize fodder at two different vegetative stages. AJAS Vol 2 (1): 27-34.

Butorac, J. (2009.): Predivo bilje, Kugler d.o.o., Zagreb.

Chandler, M.A., Tracy, W.F. (2007.): Identification of genomic regions affecting vegetative phase change in a sweet corn (*Zea mays* L.) population. Maydica 52: 407-414.

Chen, D. H., Ronald, P.C. (1999.): A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. Plant Molecular Biology Reporter, 17: 53-57.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.

Dehestani, A., Kazemi Tabar, S.K. (2007.): A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. Asian Journal of Plant Sciences 6 (6):977-981.

Gagro, M. (1998.): Industrijsko i krmno bilje, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.

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

Đorđević, 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, Zadružna knjiga, Beograd.

Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002.): Povrćarstvo, Zrinski, Čakovec.

Marshall, C.W., Shepard, L.D., Roskruge, N. (2011.): Determining the identity of New Zealand kamokamo (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) using mitochondrial DNA and morphological dana. Agronomy New Zeland 41, 157-166.

Matotan, Z. (2004.): Suvremena proizvodnja povrća, Nakladni zavod globus, Zagreb.

Mustapić, Z., Vratarić M., Rajčić L., (1984.): Proizvodnja i prerada uljane repice, Niro „Zadrugar“, Sarajevo.

Nelson Brown, R., Myers J.E. (1998.): A simple protocol for isolating DNA from fresh Cucurbita leaves, Cucurbit genetics cooperative report 21:46-47.

Parađiković, N. (2009.): Opće i specijalno povrćarstvo, Poljoprivredni fakultet, Osijek.

Petrović S., Marić, S., Čupić, T., Drezner, G., Karsai, I. (2012.): Assessment of genetic diversity in Croatian winter wheat varieties using SSR and AFLP markers, Poljoprivreda, Osijek, 18: 18-24.

Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. (1997.): Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter 15, 8-15.

Pucarić, A. (1997.): Proizvodnja kukuruza, Biblioteka Poljoprivredni savjetnik, Zagreb.

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. (1984.): Ribosomal DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:8014-8018.

Shahjahan, R.M., Hughes, K.J., Leopold, R.A., DeVault, J.D. (1995): Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. Biotechniques, 19: 332-334.

Tung Nguyen, C.T., Son, R., Raha, A.R., Lai, O.M., Clemente Michael, W.V.L. (2009): Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs), International Food Research Journal 16: 21-30.

Vratarić, M., Jurković, D., Ivezić, M., Pospišil, M., Koštuić, S., Sudarić, A., Josipović, M., Ćosić, J., Mađar S., Raspudić E., Vrgoč, D. (2004.): Suncokret: Heliatnthus annuus L., Poljoprivredni institut, Osijek.

Wen, X.P., Deng, X.X. (2002.): The extraction of genomic DNA from five species of Rosa (in Chinese). Seed, 126:18-21.

Internetski izvori:

Pavlica, M. (2012.): Mrežni udžbenik Genetika. http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/ 2.9.2013.

http://personal.bgsu.edu/~gangz/Page015-020_Extraction_Of_Total_Cellular_DNA.pdf 5.7.2013.

http://www.fao.org/home/en/ 10.6.2013.

Statistički ljetopis (2012.): http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf 10.6.2013.

6. Sažetak

Ljude je uvijek intrigiralo nasljeđivanje bilo u njihovoj obitelji, bilo u njihovom vrtu među biljkama ili među životinjama. Deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic Acid, DNA) je središnja molekula života te osnovni nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića. Oplemenjivački programi koriste izoliranu DNA u istraživanjima genetske različitosti, u stvaranju novih kultivara, kultivara s većim prinosom, otpornijih na bolesti i štetnike. Smatra se da je kod brojnih biljnih vrsta teško izolirati DNA zbog visoke koncentracije sekundarnih metabolita kao što su polisaharidi i polifenoli. Kako bi se prevladao ovaj problem, razvijeno je i ispitano nekoliko metoda izolacije. U ovom završnom radu je korištena metoda Cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) metoda. Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA iz biljke kukuruza, pšenice, suncokreta, uljane repice, lana bundeve i krastavca. Čistoća dobivene DNA testirana je spektrofotometrom, a na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je koncentracija DNA. Spektrofotometrijskom analizom dobivene su vrijednosti absorbanci na A 260nm i A 280nm, čijim omjerom su iščitane vrijednosti od 1,7 (lan) do 1,89 (uljana repica) za čistoću DNA. Vrijednosti spektrofotometrijske analize omjera absorbanci ispod 1,7 dobivene su za dvije kulture kukuruz (1,41) i bundevu (1,36) te su uzorci označeni kao nečisti. Korištena metoda pokazala se učinkovita za izolaciju DNA iz krastavca, pšenice, lana, uljane repice i suncokreta, dok je za kukuruz i bundevu potrebno metodu dodatno prilagoditi.

Ključne riječi: DNA, izolacija DNA, CTAB metoda, spektrofotometrijska analiza, čistoća DNA.

7. Summary

People were always interested in inheritance, either in their family or in their garden with plants or among animals. Deoxyribonucleic Acid or DNA is a basic life molecule, the most important carrier of heredity. The DNA controls growth and development of every living being. Breeding programs use this information that DNA gives in various research regarding genetic diversity, creating of new cultivars, cultivars with higher yield, good quality and resistance to pests and diseases. It is generally accepted that is very difficult and labours to extract DNA from many plants because of high concentrations of secondary metabolites, such as polysaccharides and polyphenols. To overcome this problem several DNA extraction methods were developed and utilized. In this research we used widely accepted Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method. Aims of this research were to determine quality and concentration of extracted DNA from maize, wheat, sunflower, oilseed rape, flax, pumpkin and cucumber. Quality of extracted DNA was estimated by spectrophotometer, and based on those measurements DNA concentration was calculated. Absorbance values (260 nm and 280 nm) ranged from 1.7 (for flax) till 1.89 (for oilseed rape). Absorbance ratio (A260/A280) lower than 1.7 was estimated in two DNA samples: maize (1.41) and pumpkin (1.36), and were classified as impure. CTAB method was very effective for five tested plant species (wheat, sunflower, oilseed rape, flax and cucumber) while further method modifications should be done for maize and pumpkin.

Keywords: DNA, DNA extraction, CTAB method, spectrophotometric analysis, DNA purity

8. Popis slika

Broj	Opis	Izvor
1.	Bubrenje sjemenki lana (a), kukuruza (b), bundeve (c) i uljane repice (d)	Kesedžić M. 2013.
2.	Posijano sjeme ispitivanih biljnih vrsta	Kesedžić M. 2013.
3.	Klijanac biljke kukuruza	Kesedžić M. 2013.
4.	Klijanac biljke pšenice	Kesedžić M. 2013.
5.	Klijanac biljke lana	Kesedžić M. 2013.
6.	Klijanac biljke uljane repice	Kesedžić M. 2013.
7.	Uzimanje uzoraka	Kesedžić M. 2013.
8.	Vaganje uzoraka	Kesedžić M. 2013.
9.	Vodena kupelj	Kesedžić M. 2013.
10.	Biljno tkivo u ledu	Kesedžić M. 2013.
11.	Pribor za usitnjavanje tkiva	Kesedžić M. 2013.
12.	Usitnjavanje tkiva	Kesedžić M. 2013.
13.	Dodavanje CTAB pufera	Kesedžić M. 2013.
14.	Vortex	Kesedžić M. 2013.
15.	Uzorak u vodenoj kupelji	Kesedžić M. 2013.
16.	Treskalica sa uzorcima	Kesedžić M. 2013.
17.	Centrifuga	Kesedžić M. 2013.
18.	Uzorak nakon centrifugiranja	Kesedžić M. 2013.
19.	Izdvajanje tekuće faze	Kesedžić M. 2013.
20.	Formirana peleta	Kesedžić M. 2013.
21.	Sušenje pelete	Kesedžić M. 2013.
22.	Pribor za dodavanje 1X TE pufera	Kesedžić M. 2013.
23.	Testiranje uzoraka spektrofotometrom	Kesedžić M. 2013.
24.	Izolirana DNA	Kesedžić M. 2013.

9. Popis tablica

Broj	Opis
1.	Potrebne otopine za izolaciju DNA
2.	Dobiveni rezultati spektrofotometrijskom analizom

10. Popis grafikona

Broj	Opis
1.	Koncentracija dobivenih DNA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

IZOLACIJA I PROCJENA KVALITETE DNA IZ RAZLIČITIH BILJNIH VRSTA

EXTRACTION AND ASSESSMENT OF DNA QUALITY FROM DIFFERENT PLANT SPECIES

Marko Kesedžić

Sažetak: Deoksiribonukleinska kiselina (Deoxyribonucleic Acid, DNA) je središnja molekula života te osnovni nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića. Oplemenjivački programi koriste izoliranu DNA u istraživanjima genetske različitosti, u stvaranju novih kultivara, kultivara s većim prinosom, otpornijih na bolesti i štetnike. U radu je korištena Cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) metoda. Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi kvalitetu i količinu izolirane DNA iz biljke kukuruza, pšenice, suncokreta, uljane repice, lana bundeve i krastavca. Čistoća dobivene DNA testirana je spektrofotometrom, a na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je koncentracija DNA. Spektrofotometrijskom analizom dobivene su vrijednosti absorbanci (A260nm i A280nm), a omjer je bio u rasponu od 1,7 (lan) do 1,89 (uljana repica). Omjeri absorbanci ispod 1,7 dobiveni su za dvije kulture kukuruz (1,41) i bundevu (1,36) te su uzorci označeni kao nečisti. Korištena metoda pokazala se učinkovita za izolaciju DNA iz , pšenice, suncokreta, uljane repice, lana i krastavca dok je za kukuruz i bundevu potrebno metodu dodatno prilagoditi.

Ključne riječi: DNA, izolacija DNA, CTAB metoda, spektrofotometrijska analiza, čistoća DNA.

Summary: Deoxyribonucleic Acid or DNA is a basic life molecule, the most important carrier of heredity. The DNA controls growth and development of every living being. Breeding programs use this information that DNA gives in various research regarding genetic diversity, creating of new cultivars, cultivars with higher yield, good quality and resistance to pests and diseases. widely accepted Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method is used in this research. Aims of this research were to determine quality and concentration of extracted DNA from maize, wheat, sunflower, olidseed rape, flax, pumpkin and cucumber. Quality of extracted DNA was estimated by spectrophotometer, and based on those measurements DNA concentration was calculated. Absorbance values (260 nm and 280 nm) ranged from 1.7 (for flax) till 1.89 (for oilseed rape). Absorbance ratio (A260/A280) lower than 1.7 was estimated in two DNA samples: maize (1.41) and pumpkin (1.36), and were classified as impure. CTAB method was very effective for five tested plant species (wheat, sunflower, olidseed rape, flax and cucumber) while further method modifications should be done for maize and pumpkin.

Keywords: DNA, DNA extraction, CTAB method, spectrophotometric analysis, DNA purity

Datum obrane: