



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin
řepky na stres chladem

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Michal Mandák

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem **Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin řepky na stres chladem** jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval Ing. Ireně Hoštičkové vedoucí mé bakalářské práce za její ochotu a pomoc nad rámec jejích povinností, že mi umožnila použít laboratoř na Zemědělské fakultě a dále pak za to, že pro mě odebírala vzorky rostlinek během mé nepřítomnosti.

Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin řepky na stres chladem

Abstrakt

Přestože podíl řepky olejky (*Brassica napus*) vůči ostatním olejnatým plodinám na světovém trhu neustále stoupá, její potenciál pro kultivaci je, tak jako u řady dalších plodin, stále omezený kvůli její citlivosti na abiotický stres chladem. Teoretická část této práce se proto zabývá problematikou rostlinného stresu a popisem metody RT-qPCR v kontextu vhodnosti jejího užití pro kvantifikaci změn ke kterým během chladového stresu dochází.

V praktické části byla provedena analýza genové exprese u vybraného dehydrinového genu *ERD10* včetně popisu odebrání vzorků z rostlin, způsob izolace RNA, reverzní transkripce do cDNA a vlastní RT-qPCR. Výzkumný soubor tvořili dvě odrůdy řepky Cadeli a Navajo podrobené stresu chladem při (2°C). Původním předpokladem bylo, že mezi těmito odrůdami bude znatelný rozdíl v úrovni exprese *ERD10* genu v závislosti na schopnosti těchto rostlin odolávat stresu chladem. Interpretace dat pak i přes jejich neúplnost tuto původní domněnku potvrdila. V průběhu prvních 6ti dní stresu chladem docházelo u odrůdy Navajo k znatelně vyšší expresi oproti odrůdě Cadeli. Na základě souvislosti mezi expresí *ERD10* a odolností vůči chladu by mělo být možné použít *ERD10* jako jeden z markerů k selekci chladu odolných genotypů.

Klíčová slova

Řepka olejka; abiotický stres; RT-qPCR; *ERD10*

Use of RT-PCR in cold stress reaction studies

Abstract

Although the share of rapeseed (*Brassica napus*) in comparison with other oil crops on the world market continues to rise, its cultivation potential, as with many other crops, is still limited due to its abiotic cold stress sensitivity. Therefore, the theoretical part of this thesis deals with the issue of plant stress and the description of the RT-qPCR method in the context of its suitability for quantification of changes that occur during cold stress.

In the practical part of this thesis, an analysis of gene expression in selected dehydrin gene *ERD10* was performed including description of sampling from plants, method of RNA isolation, reverse transcription into cDNA and own RT-qPCR. The research sample consisted of two rapeseed varieties Cadeli and Navajo subjected to cold stress at (2°C). The initial assumption was that there would be a noticeable difference in the expression level of the gene *ERD10* between these varieties, depending on the ability of these plants to withstand cold stress. Although some samples were not measured, the interpretation of the data confirmed original assumption. During the first 6 days of cold stress, the Navajo variety had a significantly higher expression of this gene than the Cadeli variety. Based on the association between *ERD10* expression and cold resistance, it should be possible to use *ERD10* as one of the markers for the selection of cold resistant genotypes.

Key words

Rapeseed; abiotic stress; RT-qPCR; *ERD10*

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1 Abiotický stres	9
2.2 Reakce na stres	10
2.3 Stres chladem	11
2.4 Mechanismus chladové aklimatizace	12
2.5 Zástupce dehydrinů <i>ERD10</i>	13
2.6 Brukev řepka (<i>Brassica napus</i>)	14
2.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR)	16
2.8 Izolace RNA a její úskalí	19
2.9 Reverzní transkripce (RT)	19
2.10 Amplifikační cyklus polymerázové řetězové reakce- PCR	21
2.11 Kinetika reakce	24
2.12 Vyhodnocování dat relativní a absolutní kvantifikací	29
2.13 Přístrojové vybavení	31
3. Hypotéza a cíl práce	34
3.1 Hypotéza	34
3.2 Cíl práce	34
4. Metodika	35
4.1 Příprava vzorků	35
4.2 Extrakce RNA	36
4.3 Přечиštění RNA	37
4.4 Přepis do cDNA	37
4.5 Vlastní amplifikace	38
5. Výsledky	40
5.1 Kontrola specifity cDNA	40

5.2	Vyhodnocení dat	40
6.	Diskuze	44
7.	Závěr.....	46
8.	Seznam literárních zdrojů.....	47

1. Úvod

Kulturní plodiny čelí během svého růstu mnoha překážkám, ať už od patogenů jako jsou bakterie, viry a plísně, tak od zemědělských škůdců. Avšak klimatické podmínky vždy měly tu nejzásadnější roli v produktivitě rostlinné výroby. V současné době se odhaduje, že abiotické stresy, jako vysoké teploty, nedostatek nebo naopak přebytek vláhy, vysoká salinita půdy, mráz a chlad, mají více než 50% podíl na ztrátě výnosnosti oproti maximálním genetickým schopnostem rostliny (MAHAJAN et al., 2005). Chladový stres, na který se tato studie zaměřuje, je jednou z největších překážek udržitelnosti výnosu z polí (YADAV, 2010).

Většina rostlin není vůči vlivům chladu zcela bezradná. Dokáží totiž vlivy stresorů alespoň částečně překonat procesem chladové aklimatizace, k němuž dochází po předchozí zkušenosti rostliny s nízkými teplotami nad bodem mrazu. Rostliny tak prochází fyziologickými změnami, jež redukuje buněčné poškození mrazem. Také získávají odolnost proti tvorbě extracelulárního ledu (CHINNUSAMY et al., 2007). Brukev řepka (*Brassica napus*) je vůči mrazu relativně odolná rostlina, výjimkou však mohou být především jarní mrazy, které mohou výrazně poničit její sazenice a tím zničit celou úrodu. Ozimá forma je obvykle vůči mrazu odolnější po delší dobu a je i schopna se otužit rychleji (FIEBELKORN et al., 2016).

Pochopení role genů podílejících se na stresové adaptaci rostliny může být užitečné v produkci nových transgenních kultivarů. Genetické inženýrství například využívá metod introgrese k začlenění žádoucích genů stresové odpovědi do genomu rostliny mnohem rychleji než by to bylo možno s použitím klasických šlechtitelských metod (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008). Zlepšování odolnosti rostlin vůči stresu je zásadní nejen pro zajišťování potravin pro stále rostoucí světovou populaci, ale také je důležité z hlediska produktivity a udržitelnost životního prostředí, protože plodiny se špatnou odolností mají zvýšenou spotřebu vody a hnojiv (FEDOROFF et al., 2010).

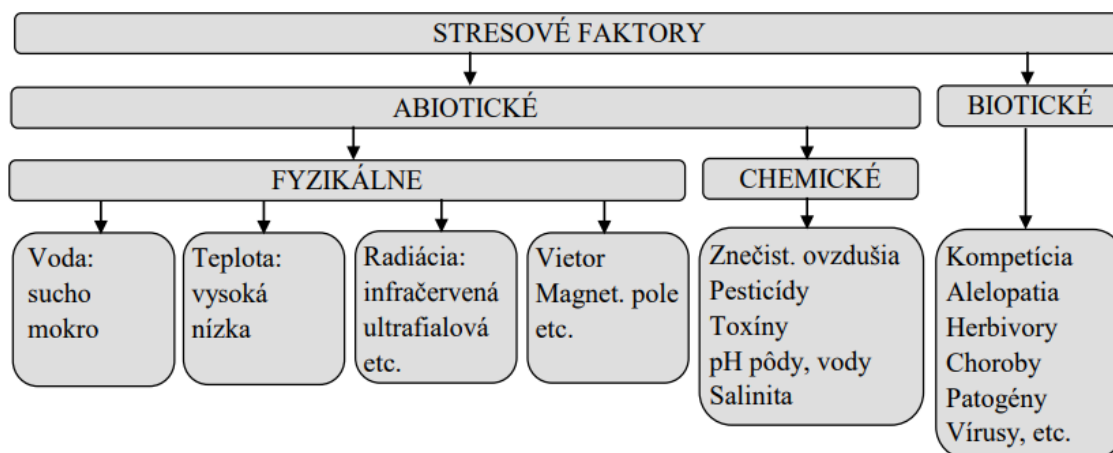
2. Teoretická část

2.1 *Abiotický stres*

Fyzikálně je stres definován jako mechanická síla aplikovaná na objekt. V odezvě na aplikovaný stres, pak objekt prochází změnou, ta je označována jako námaha. U organických systémů je však obtížnější definovat co stres je a co není. Přesné měření sil působících na rostlinu je obtížné hned z několika důvodů. Může za to komplikovaná interakce mezi prostředím a rostlinou. To co mohou být optimální podmínky pro jednu rostlinu, může být stresem pro jinou. Často se také stává, že různé faktory nepůsobí stres jednotlivě, ale jejich vzájemná kombinace již na rostlinu stresově působí (MAHAJAN et al., 2005; PESSARAKLI, 1999).

Nejpraktičtější definicí zřejmě je, že za abiotický stres můžeme považovat jakýkoliv fyzikální a chemický vliv, který nějakým způsobem poškozuje růst rostliny, její vývoj, celkovou kvalitu nebo výši výnosu (MAHAJAN et al., 2005).

Fyzikální stresory:	vysoké a nízké teploty, sucho, poranění, vítr, radiace, přesvětlení
Chemické stresory:	oxidativní stres, nedostatek kyslíku, zvýšená salinita půdy, nadbytek těžkých kovů, vyčerpání půdy (KUKLA et al., 2013)



Obrázek1: Schéma stresových faktorů (KUKLA et al., 2013)

V praxi je možné stres měřit na živých rostlinách přímo s využitím speciálních přístrojů sledujících parametry nějak související s fotosyntézou, například výměnu CO₂, fluorescenci chlorofylu nebo výpar vody (BAKER, 2008).

2.2 Reakce na stres

Pro rostliny, jakožto přisedlé organismy, je jedinou možností jak se vyrovnat s abiotickým stresem jejich adaptace na něj v místě růstu. Proto rostliny vyvinuly mnoho obranných strategií patrných jak z hlediska genotypu tak fenotypu (ROUACHED et al., 2015).

Komplexnějším způsobem jak čelit stresorům je aktivní odpověď, při té se rostliny prostředí adaptují. Adaptace probíhá postupně ve třech krocích vnímání stresu, přenosu stresového signálu a odpovědi na něj. Pokud je stres přítomen, rostliny jsou schopny při správném rozpoznání stresového signálu podnítit změny hned na několika úrovních. V morfologii rostliny, její fyziologii, chemických drahách a především změny v expresi specifických stresových genů (PESSARAKLI, 1999).

Nepřímým způsobem, kterým může rostlina na stres zareagovat je také stresový útek (stress escape). Samotná rostlina zde sice nepříznivé podmínky nepřečká, ale v metabolicky neaktivní podobě tvrdých semen zde přežívá alespoň její další generace (BLANVILLAIN et al., 2011). Dehydratovaná semena a spory hub jsou schopny přežít i při velmi nízkých teplotách bez jakýchkoliv známek poškození. Je to díky tomu, že zde dochází k mrznutí vody, aniž by se tvořily ledové krystalky. Toho se i často využívá k jejich uskladnění kryokonzervací (MAHAJAN et al., 2005).

Jednou z hlavních míst vnímání stresového signálu je cytoplazmatická membrána a vedle ní i ostatní buněčné membrány jako endoplazmatické retikulum, chloroplasty, mitochondrie a omezeně peroxizomy. Tyto membrány obsahují receptory schopné rozpoznat jak vlastní tak vnější signály. Změny způsobené stresy v lipidových strukturách a změny konformace lipoproteinových komplexů ihned signalizují buněčnou odpověď vyvolávající adaptivní reakci, takto se rostlina dokáže vyrovnat s účinky stresu. Kromě endomembránových organel je buňka schopna pociťovat i deformace v buněčné stěně. Teoreticky mohou být stresové signály a to obzvláště teplotní signály, vnímány kdekoliv v buňce. Stres má totiž neustálý dopad na funkce všech buněčných komponent (proteinů, DNA, RNA, cukrů, lipidů) i celých organel (PESSARAKLI, 1999; ZHU, 2016).

Fylogeneticky se signalizace stresu v rostlinách vyvinula zřejmě z energetické signalizace, naznačuje to podobnost jaderných signalizačních drah s proteinovými kinázami vyskytujícími se například i u kvasinek (SNF1) a savců (AMPK) (ZHU, 2016).

Přesný způsob jak rostliny cítí stresové signály a přizpůsobují se nepříznivým podmínkám, není zatím plně pochopen. Ne všechny stresové senzory byly zatím identifikovány. Zatím se zdá, že obtížnost v porozumění těmto procesům spočívá v nadbytečnosti genů, které tyto sensorové proteiny kódují. U testování dysfunkce v jediném genu při knockdown analýze nedochází ve stresové reakci k významným fenotypovým změnám, které by bylo možné snadno na rostlině pozorovat (ZHU, 2016).

Další nepříliš probádanou oblastí ze strany molekulárních biologů je jak se rostliny dokáží vyrovnat s výskytem několika rozdílných abiotických stresů zároveň. Jisté však je, že rostliny mají větší potíže vyrovnat se současným výskytem několika abiotických stresů najednou spíše než s jejich závažností (MITTLER, 2006).

2.3 *Stres chladem*

Mezi příznaky stresu chladem patří špatné klíčení, zakrnělé sazenice, žloutnutí listů (chloróza), nevyvinutí listu, vadnutí a nakonec i nekróza (YADAV, 2010).

Chlad také výrazně brzdí reprodukční vývoj rostlin. Pokud jsou například květy rýže vystaveny chladu během jejich otevírání, dojde ke sterilizaci květu. Z buněčného hlediska akutní dehydratace způsobená mrazem, vede ke změnám ve fluiditě lipidové dvojvrstvy. Vyšší obsah nenasycených mastných kyselin v membráně však tento stav zmírňuje

(MAHAJAN et al., 2005). Dále je přímo ovlivněna stabilita sekundární struktury RNA a DNA, i aktivita enzymů podílejících se na základních procesech, jako je transkripce a translace (SMALLWOOD et al., 2002).

Některé hospodářsky důležité plodiny, jako rýže, kukuřice, sója a rajčata, nejsou chladové aklimatizace schopny a jsou tak náchylné k poškození. Navíc nedokážou odolávat formování ledových krystalků v jejich tkáních. Nicméně i tyto rostliny se dokážou po vystavení chladu v omezené míře adaptovat. Tento proces je však dosud špatně pochopen (CHINNUSAMY et al., 2007).

2.4 Mechanismus chladové aklimatizace

Mechanismus chladové aklimatizace je založen na přetváření buněčných struktur, tkání a na metabolických změnách v rostlině (CHINNUSAMY et al., 2007). Hlavním účelem aklimatizace je však stabilizace a ochrana buněčných membrán tím že se sníží bod tuhnutí. Dochází tak skrze aktivaci antioxidantních mechanismů, zvýšení hladiny intercelulárního cukru a zvýšením hladin kryoprotekčních látek. Dále jsou zde například polyaminy chránící intracelulární proteiny tím, že indukují expresi genů kódujících molekulární chaperony (MAHAJAN et al., 2005).

Signalizační dráhy pro chladovou aklimatizaci jsou spuštěny velmi podobně, jako je tomu u stresových faktorů vysoké salinity a sucha. Je tomu tak proto, že je vždy ovlivněna distribuce vody v rostlině a propustnost lipidové dvojvrstvy, což vyvolává podobnou metabolickou reakci (BECK et al., 2007). Bylo prokázáno, že u *Brassica napus* jsou geny pro chladovou odpověď aktivovány zpomalením pohybu plazmatické membrány, ke kterému dojde po vystavení chladovému stresu (CHINNUSAMY et al., 2007). Receptory zde zaznamenají stresový signál, na něj navazuje aktivace druhých posílů, jako jsou Inositoltrisfosfát, reaktivní formy kyslíku (ROS) a vápenaté ionty. Zvýšená koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) vede k jejich navazování na proteiny vázající vápník, jinak známých jako Ca^{2+} senzory. Dojde tak ke změně jejich konformace, která přes další proteiny vede až k nastartování fosforylační kaskády, ta cílí na hlavní geny stresové odpovědi. Takto nakonec dochází k adaptaci rostliny a jejímu překonávání nepříznivých podmínek.

Změny genové exprese vyvolané stresem také mohou vyvolat tvorbu hormonů, jako je ABA, kyselina salicylová a ethylen. Tyto molekuly mohou sloužit k zesílení počátečních

signálů a zahájit druhé kolo signalizace stejnou cestou, nebo se podílet na spuštění jiné signální dráhy (MAHAJAN et al., 2005).

2.4.1 Jarovizace

S chladovou aklimatizací souvisí i proces jarovizace, při níž přecházejí rostliny z růstové fáze do fáze kvetení, pokud jsou vystaveny nízké teplotě po určitou dobu. Nicméně po jarovizaci a po skončení vegetačního období schopnost chladové aklimatizace klesne. Během jarovizace dochází k aktivaci drah souvisejících s chladovou aklimatizací, zabránění rozvoji květů během zimního období a v důsledku toho ochraně tepelně citlivých orgánů rostliny. Například u pšenice a spousty jiných obilovin jsou centrálními geny jarovizačních drah VRN1 a VRN2 (YAN et al, 2004).

2.4.2 Chaperony

Protože chybně složené proteiny mohou vést k mnoha problémům v buňce, všechny organismy jsou nuceny nějak udržovat proteostázu a zmírňovat účinky stresu (především tepelného) na proteom. Tento úkol zastávají molekulární chaperony a faktory remodelace proteinů. Tyto proteiny pomáhají proteinům nabývat svých biologicky aktivních konformací (TAIPALE et al., 2010). Hlavní skupinou chaperonů zastávajících tuto funkci jsou proteiny tepelného šoku (HSP), kromě mnoha aspektů proteinové homeostázy hrají úlohu i během buněčné signalizace. Geny kódující HSP jsou pod kontrolou transkripčních faktorů teplotního stresu (Hsfs). Podobně jako mnoho dalších proteinů, které regulující genovou aktivitu má Hsfs modulární strukturu a vyskytuje se v poměrně konzervativní podobě u všech eukaryot (SCHARF et al., 2012).

2.5 Zástupce dehydrinů ERD10

Protein *ERD10* je spolu s podobným proteinem *ERD14* členem rodiny dehydrinů, které jsou ve zvýšené míře exprimovány v reakci na stresové podněty vysoké salinity, sucha a chladu. *ERD10* in vitro působí jako chaperon schopný zabránit tepelně indukované agregaci nebo případně inaktivaci různých substrátů jako je lysozym, alkohol dehydrogenasa nebo citrátsyntáza. Na modelovém organismu huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) byla také rozpoznána určitá aktivita dehydrinů nespojená se

stresem. Bylo tomu během pozdní fáze vývoje semen a u tkání se zvýšenou proliferací jako jsou listy a špičky kořenů (KOVACS at al., 2008).

2.6 Brukev řepka (*Brassica napus*)

2.6.1 Botanický popis

Řepka olejka dosahuje výšky od 120-180 cm. Má dlouhý a mohutný hlavní kořen, z něhož vyrůstají rozvětvené lodyhy, ukončené protáhlým hrotem. Květy jsou žluté se čtyřmi různými kalichy a okvětními lístky, šesti tyčinkami a jedním pestíkem. Tmavě zelené listy jsou voskovité a hladké. Opylení u *Brassica napus* probíhá převážně samosprašně (BROWN et al, 2008).



Obrázek2: Řepka olejka (Autor: Walther Otto Müller)

Brassica napus vznikla původně hybridizací mezi druhy *Brassica campestris* (20 chromozomů) a *Brassica oleracea* (18 chromozomů) přibližně před 7500 lety. Došlo tím i k zdvojení chromozomů procesem allopolyploidie na současných 38. V nedávné době bylo v Číně dokončeno celkové genomové sekvenování řepky a jejích rodičovských druhů *Brassica campestris* a *Brassica oleracea*. V porovnání s modelovým druhem *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že čeleď brukvovitých (*Brassicaceae*) měla vždy

sklony ke genomovým duplikacím a fúzím (CHALHOUB a DENOEUDE, 2004; HU, 2016; SHEIDAI et al., 2012).

2.6.2 Pěstitelství

Je známo, že brukvovité rostliny byly již od nepaměti významnou součástí zemědělství. Archeologické nálezy naznačují, že byly pěstovány v oblasti jejich původu v Asii již 5000 př.n.l. První písemné zprávy, které zmiňují přímo olejnátou *Brassica napus* pocházejí z Indie 2000-1500 př.n.l. (GUPTA a PRATAP, 2007)

Zmínky o pěstování prvních olejnatých druhů řepky v Evropě pochází z vrcholného středověku, zde se její produkce rozšířila především v zaalpské oblasti (GUPTA a PRATAP, 2007). Řepka se zprvu prosazovala především jako zdroj oleje, později také jako potravina a krmivo. Tím jak zemědělci vybírali semena s vyšším obsahem oleje, urychlovali tak ztrátu vlivu glukosinolátových genů při současném navýšení exprese genů syntetizujících oleje. Postupně také docházelo k diverzifikaci dalších odrůd a jejich morfortypů. (CHALHOUB a DENOEUDE, 2004). Většímu rozšíření zabráňovaly hlavně vysoké hladiny kyseliny erukové, u té ostatně pokusy na zvířatech prokázaly myokarditidu a další negativní vlivy na srdeční sval, a dále pak glukosinoláty, které snižovaly výživovou hodnotu krmiva. První kultivar *Brassica napus* s nízkým obsahem glukosinolátu a kyseliny erukové byl vyvinut v Kanadě v roce 1974 (O'BRIEN, 2009). V roce 1978 byla tato odrůda registrována pod názvem Canola. S obsahem erukové kyseliny garantovaným pod 2% a obsahem alifatických glukosinolátů pod 30 μmol na gram semen se stala velmi úspěšnou plodinou (BROWN et al., 2008).

V současné době je řepka olejka třetím nejvýznamnějším zdrojem rostlinných olejů na světě po palmovém oleji a sójových bobech. Produkce řepky během posledních 25 let značně narostla a v současnosti přispívá přibližně 14% k celkové celosvětové produkci rostlinných olejů (GUPTA a PRATAP, 2007). Dnes je tento olej, se 7% nasycených mastných kyselin, zřejmě nutričně nejvyváženějším běžně dostupným rostlinným olejem. Především pro vysoký obsah mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a omega-6 a omega-3 mastných kyselin v ideálním poměru 2 ku 1 (O'BRIEN, 2009).

Další způsob využití pro řepkový olej představují biopaliva. Z důvodu stále obtížnější těžby fosilních paliv a snahy o ochranu životního prostředí se v Evropě začalo přidávat 5

% bionafty do nafty vyrobené z ropy. Tento trend stále pokračuje i přes nízkou efektivitu produkce a nízkou energetickou účinnost bionafty (VAN DUREN et al, 2015).

Řepku je možné pěstovat jak v ozimé variantě v zemích s dlouhou zimou jako například v Kanadě, tak v jarní variantě v mírnějších oblastech (SHEIDAI et al, 2012). Na našem území pěstujeme především ozimou formu ve všech pěstitelských oblastech do výšky 700 m. Nejvyšších výnosů a kvality s ní lze ale dosáhnout v bramborářských oblastech s lehkými až středními, hlinitopísčitymi a hlinitými půdami. Ideální průměrné roční teploty jsou pro řepku 6,5 - 8,5 °C, s ročním srážkovým úhrnem 550 až 750 mm (Bečka, 2007).

2.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR)

Počátky vývoje RT-qPCR sahají do roku 1983, kdy Kary Mullis s jeho spolupracovníky vyvinul původní polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a umožnil tak v podstatě mnohonásobně cyklicky amplifikovat jakoukoliv sekvenci DNA obsaženou v komplexním vzorku. Otevřely se tak mnohé možnosti v biomedicínském výzkumu, genovém inženýrství a nebo genovém sekvenování. Nicméně pro účely kvantitativní analýzy byla metoda jen obtížně použitelná. Při konvenční PCR reakci totiž probíhá celá amplifikace a až poté se analyzuje celkový produkt. Množství konečného amplikonu tak příliš nereprezentuje počáteční množství templátové DNA. Přesto byly vyvinuty některé kvantitativní metody jako například endpoint PCR. Lepší řešení tohoto problému se objevilo v roce 1992, kdy R. Higuchi a jeho spolupracovníci klasickou metodu PCR modifikovali. Tehdy ještě využili vlastnosti běžného fluorescenčního barviva ethidium bromidu (EtBr), u něj totiž při navázání na dsDNA dochází k navýšení míry fluorescence. S použitím tohoto jevu byli schopni zaznamenat videokamerou nárůst amplikonu během probíhajících PCR cyklů v průběhu každého okamžiku, proto je metoda také nazývána real-time PCR (KUBISTA et al, 2006; FRAGA et al, 2008; HIGUCHI et al, 1993). V principu metoda umožnila výpočet množství původní templátové DNA podle času kdy množství amplikonu dosáhlo hodnoty prahové detekce Ct (cycle threshold). Nejdříve se metoda začala využívat ke kvantifikaci specifických sekvencí nukleotidů v komplexních směsích jako u genotypování, měření virové zátěže a určování počtu genových kopií v rakovině tkáni. Později se začala kombinovat s reverzní transkripcí, kde proces přepisu RNA do cDNA umožnil studium hladiny genové exprese (FRAGA et al, 2008).

RT (reverse transcription)-qPCR je v současnosti standartní metodou k detekci a kvantifikaci cílové RNA v oblasti výzkumu i v klinické praxi. Často bývá nazývána tzv. zlatým standardem. K tomu přispívá stálé zdokonalování metodiky, citlivosti přístrojového vybavení a představování efektivnějších detekčních reagensů. Správně optimalizovaná metoda je natolik přesná a citlivá, že by měla být teoreticky schopna určit přítomnost i jediné molekuly cílové DNA, která byla původně přítomna ve vzorku. Tato vysoká citlivost se paradoxně může stát nedostatkem, znamená totiž i náchylnost ke kontaminaci cizorodou DNA (KUBISTA at al, 2006).

Oproti alternativním metodám je schopna detekovat sekvenci nukleových kyselin ve značném dynamickém rozsahu až pěti řádů. Při využití vhodných interních standardů se může variační koeficient pohybovat okolo 1-2%. U analýzy genové exprese je tak zajištěna dobrá reprodukovatelnost výsledků i v případě pouze nepatrných změn v míře exprese genu. (SEIFI at al, 2012).

Mezi další využití v klinické praxi patří ještě SNP (single nucleotide polymorphism) analýza, analýza chromozómových aberací a detekce proteinů pomocí real-time immuno PCR (KUBISTA at al, 2006).

2.7.1 Zhodnocení výhod a nevýhod vůči ostatním kvantitativním metodám

Alternativními metodami použitelnými k určení genové exprese jsou například northern blot a nuclease protection assay, HPLC, in situ hybridizace, různé gelové elektroforézy a mnoho dalších. Ve svém provedení jsou však často zdlouhavé, pracné, náchylné ke kontaminaci a často i nespolehlivé, některé dokonce využívají radioaktivity. Dále vyžadují relativně větší množství potřebného vzorku ke zpracování a nenabízí možnost analýzy více genů zároveň (FRAGA at al, 2008).

Nedostatky limitující real-time PCR postihují obvykle i klasickou PCR a i její ostatní modifikace. Jmenovitě se jedná o možnost kvantifikace jen relativně nízkého počtu cílových genů, problematické srovnání absolutního množství transkriptu mezi jednotlivými studiemi (možné pouze v případě stejného extrakčního postupu), možnost falešně negativních a falešně pozitivních výsledků u klinických testů, nebo někdy obtížný výběr vhodných PCR primerů nutný k zajištění specifčnosti a přesnosti výsledků (SEIFI at al, 2012; SMITH a OSBORN, 2009).

Významným nedostatkem pak může být i citlivost vůči PCR inhibitorům. Ty lze nalézt v biologických vzorcích odebíraných z tělních tekutin a tkání pro klinické nebo forenzní testy, jde například o hemoglobin a močovinu. Dalšími důležitými zdroji inhibice jsou činidla, která přicházejí do styku se vzorky během zpracování DNA. Patří mezi ně chlorid draselný a sodný společně s dalšími solemi, dále pak iontové detergenty jako deoxycholát sodný, sarkosyl, dodecylsírán sodný, ethanol, isopropanol, fenol a mnoho dalších (BESSETTI, 2007; SEIFI at al, 2012).

Inhibitory PCR působí buď přímo, navázáním na ssDNA a dsDNA. Nepřímý způsob je pak ovlivnění DNA polymerázy, kde inhibitory blokují její enzymatickou aktivitu, inhibováním kritických kofaktorů na nichž je funkce DNA polymerázy závislá. Dochází takto k blokaci hořčíku a jeho vazby na polymerázu, nebo případně k jeho přednostnímu navázání na inhibitor, což způsobuje snížení jeho dostupnosti v reakci (BESSETTI, 2007).

K očištění DNA od inhibitorů je dnes možné použít množství purifikačních metod často dostupných ve formě komerčních kitů jako např. DNA IQ™ System. Pokud není možné předejít přítomnosti inhibitorů ve vzorku, nebo ho alespoň vyčistit, lze tento problém často obejít použitím alternativních DNA polymeráz (Tfl, Pwo, Tth), ty mohou být vůči konkrétním inhibitorům rezistentní. Dalším elegantně prostým řešením může být i naředění vzorku, které množství inhibitorů sníží na přijatelnou úroveň (BESSETTI, 2007).

Pravděpodobně nejkritičtějším limitujícím faktorem v používání real-time PCR však v současnosti není technologie, ale spíše lidský faktor jako nesprávný postup zpracování vzorků, chybná analýza dat a docházení k neopodstatněným závěrům (SEIFI at al, 2012).

Nakonec je třeba brát v úvahu, že analýza real-time PCR měří hladiny mRNA, a proto pouze naznačuje možné změny v hladinách proteinů, přímo je nedemonstruje. Přestože je zde těsné spojení mezi mRNA a jejími proteinovými produkty, stále existují další regulační procesy, které silně ovlivňují celkový obsah proteinů i po vytvoření mRNA. Vogel a Marcotte, (2012) ve své práci demonstrují, že i po eliminaci možných chyb stále existují rozdíly mezi množstvím mRNA transkriptu a odpovídajícím objemem proteinu. Rozdíly připisují post-transkripčním, translačním a protein-degradačním kontrolním procesům, které se snaží zajistit ustálený obsah proteinů a dosáhnout tak homeostatické rovnováhy v buňce.

2.8 *Izolace RNA a její úskalí*

Izolace RNA je v porovnání se zpracováním DNA obtížnější. Problémem je především její vysoká labilita. Proto musí být při izolaci s RNA nakládáno opatrně k zajištění jak integrity samotné RNA a také k odstranění kontaminujících RNA nukleáz, genomové DNA a látek inhibujících procesy reverzní transkripce a PCR.

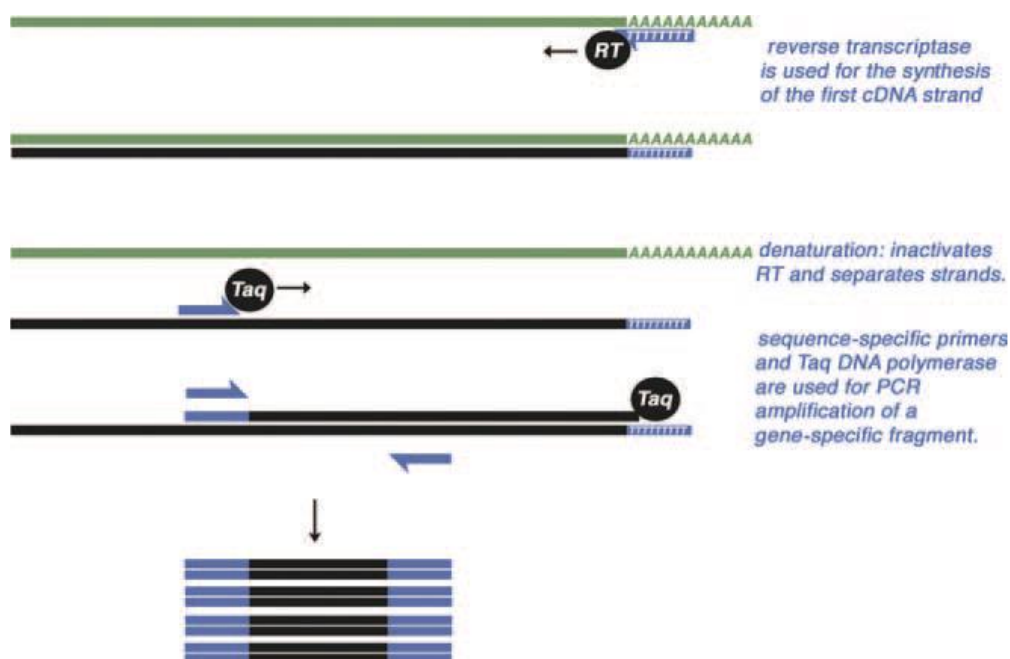
Potíže s odběrem vzorku, jeho množstvím, skladováním a dopravou často způsobují nestejnou kvalitu odebrané RNA, tento problém existuje u všech vzorků, zvláště to však platí pro klinickou praxi.

Již přes 20 let je nejběžnější metodou izolace RNA ze široké škály biologických materiálů tzv. jednokroková metoda užívající kyselinu guanidin thiokyanátovu, fenol a chloroform. Podstatou této metody je proces, během kterého je RNA separována od DNA z roztoku složeného z výše zmíněných látek. V takto vytvořeném kyselém prostředí se po centrifugaci RNA shromáždí v horní vodní fázi a přitom většina DNA a bílkovin zůstane buď v mezifázi, nebo v dolní organické fázi. Za působení isopropanolu se pak celková RNA vyzoluje vysrážením do peletu (CHOMCZYNSKI a SACCHI, 2006).

2.9 *Reverzní transkripce (RT)*

Vzhledem k tomu, že metoda PCR není schopna amplifikovat přímo RNA, je vždy nutné využít enzym reverzní transkriptázy jako mezikrok pro vygenerování cDNA. Reverzní transkriptázy se původně vyskytují jako součást retrovirů, například ve viru pro hepatitidu C nebo ve viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). Virus je takto schopen vygenerovat DNA ze svojí RNA a následně je vložit do hostitelského genomu. Laboratorně reakce probíhá hybridizací oligodeoxynukleotidového primeru na komplementární mRNA, enzym reverzní transkriptázy pak dokončí celý komplementární řetězec cDNA (VALASEK a REPA, 2005).

Za vhodných reakčních podmínek by mělo množství dané cDNA generované reverzní transkripcí být přímo úměrné množství RNA templátu. Pokud tomu tak není, negativně to ovlivní přesnost celé PCR (KUBISTA at al, 2006).



Obrázek3: Průběh reverzní transkripce (FRAGA at al, 2008)

Běžně používané reverzní transkriptázy jsou AMV (avian myeloblastosis virus), MMLV (murine leukemia viruses) a syntetické RT např. Omniscript, PowerScript, StrataScript, SuperScript II, SuperScript III. Syntetické transkriptázy často dosahují lepších výsledků, jsou schopny pracovat za vyšších teplot (vyšší teplota snižuje množství sekundárních struktur v RNA) a mají lepší aktivitu polymerázy. Na rozdíl od původních RT mají také běžně inaktivovanou ribonucleázovou H aktivitu, ta obvykle virům slouží k degradaci vytvářených RNA/DNA duplexů, v laboratorním prostředí tato aktivita není třeba a je dokonce nežádoucí, k denaturaci duplexů dojde jednoduše působením tepla (FRAGA at al, 2008).

Pro RT reakci se používají tři základní skupiny primerů: oligo (dT) primery, random sequence primery a genově specifické primery, reakce samotná sice žádné primery nezbytně nevyžaduje, ale v praxi jsou vždy použity kvůli lepší efektivitě transkripce.

Oligo (dT) primery hybridizují spolu s poly (A) koncem (polyadeninovým koncem) který je přítomný u většiny eukaryotické mRNA. Reverzní transkripce tak začíná od 3' konce mRNA. Vzhledem k tomu, že poly (A) konce tvoří struktury o vyšších řádech, primery na ně tak snadněji nasedají. Na druhou stranu má tato metoda poněkud vyšší nároky na kvalitu vzorku (konce totiž snadno degradují). Také může docházet k přednostní amplifikaci oblastí blízko k tomuto konci. Některé mRNA pak jako v případě genu pro histon poly (A) konec vůbec neobsahují, k přepisu tak nedochází. Další variantou jsou

anchored oligo(dT) primery, ty by měli údajně nabízet stejnoměrněji probíhající transkripci.

Random sequence primery jsou krátké oligomery o mnoha náhodně vytvořených sekvencích. Dokáží se navázat na veškerou tRNA, rRNA a mRNA a to po celé délce RNA transkriptu. Nejčastěji jsou šest (hexamers) nebo devět (nonamers) bází dlouhé. Výhodou je, že poskytují jednotnou reprezentaci všech sekvencí v mRNA.

Specifické primery se, jak název napovídá, váží pouze na přesně komplementární oblasti mRNA. To nabízí zvýšenou specificitu (schopnost kopírovat i malé množství templátu) a senzitivitu (schopnost templát přesně a v plné délce zkopírovat) během reverzní transkripce. U jednokrokové PCR, kde RT a PCR reakce probíhají ve stejné kolonce, se pak používají pouze specifické primery (KUBISTA et al, 2006).

2.10 Amplifikační cyklus polymerázové řetězové reakce- PCR

Průběh PCR je založen na třech krocích tepelných změn, opakujících se během přibližně 30 cyklů:

Denaturace

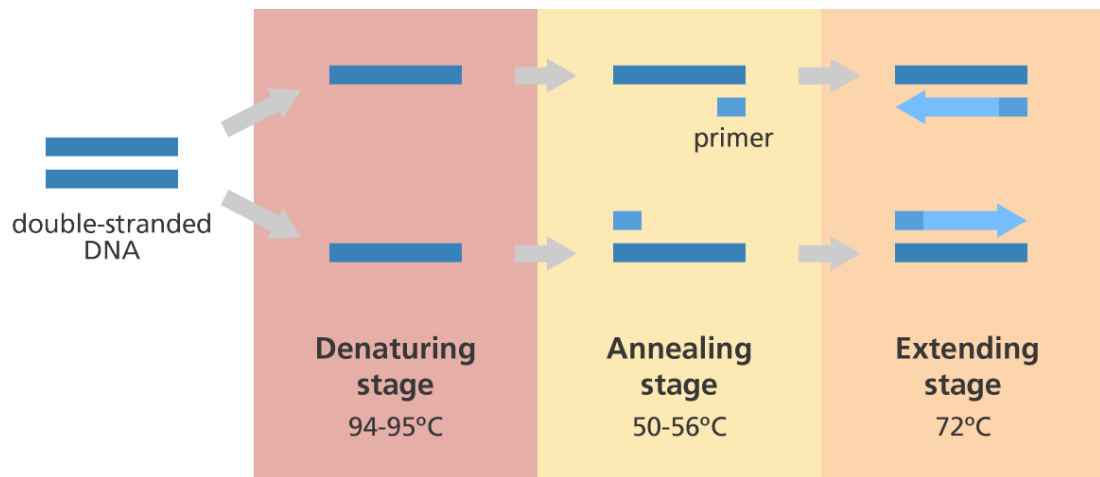
Pro denuraci krátkých sekvencí DNA je dostačující dosáhnout 95 °C a hned začít s chlazením. V případě delších sekvencí je pak alespoň v prvních několika cyklech doporučováno udržovat tuto teplotu po několik minut, než množství vytvářeného amplikonu převládne nad původním templátem. Amplikon je totiž typicky snazší denaturovat.

Annealing (nasedání primeru)

Ve skutečnosti se polymeráza nejprve naváže na primer a až poté se tento komplex váže na cílovou DNA. Teplota nasedání tohoto komplexu je závislá na použitých primerech. Teoreticky je to několik stupňů pod teplotou tání obou primerů. Doba nasedání je alespoň 30 sekund. Poskytnutí delšího času pak může zvýšit výtěžek reakce, ale na druhou stranu snižuje specificitu.

Elongace

Teplota polymerizace používaná u většiny PCR protokolů je 72 °C. Není tomu ani tak kvůli samotné DNA polymeráze, ta je schopna pracovat za nižších teplot, je tomu kvůli možnému formování vyšších struktur, které by bránily polymeráze ve volném pohybu po vláknech. Doba elongace pak závisí na délce produktu (KUBISTA at al, 2006).



Obrázek4: Průběh PCR (dostupné z <https://yourgenome.org>)

2.10.1 Používané reagensie

Templátová DNA

Výchozí DNA obsahující amplifikovaný fragment.

dNTP

dATP, dCTP, dGTP a dTTP představují čtyři základní kameny, z kterých DNA polymeráza syntetizuje nové vlákno.

Mg²⁺

Koncentrace chloridu hořečnatého je velmi důležitým faktorem v PCR. Vlivem jeho nízké koncentrace nedojde k amplifikaci zjiitelného množství produktu, při vysoké koncentraci zas dojde k vytvoření spousty nespecifických produktů a artefaktů. Typicky optimální koncentrace MgCl₂ je mezi 1 až 5 mmol.

Pufir

Pufir je nezbytný ke stabilizaci pH a vytvoření optimálních podmínek pro aktivitu DNA polymerázy. Nízké hodnoty pH <7 působí na DNA hydrolyticky, vysoké pH >10 pak zas způsobují deprotonaci a tím narušení fosfodiesterové vazby tvořící dvoušroubovici DNA. Pufry často obsahují tři základní složky Tris-Hcl, KCl a $MgCl_2$. Tris-Hcl je pár konjugované slabé kyseliny a báze, který udržuje hodnotu pH v roztoku mezi 8,0 a 9,5. KCl zas usnadňuje nasedání primeru na DNA templát tím, že snižuje jejich vzájemný negativní odpor. $MgCl_2$ usnadňuje rovněž nasedání primeru (působí jako stabilizační činidlo) a slouží jako kofaktor pro polymerázu.

Primery

Laboratorně používané primery jsou krátké úseky komplementární ssDNA specificky se vážící k cílové oblasti. Jejich délka se obvykle pohybuje okolo 18-25 bp. Vzhledem k tomu, že DNA polymeráza dokáže nukleotidy pouze přidávat k již existujícímu vláknku, používají se k vymezení požadovaného úseku vybraného pro amplifikaci. Primery jsou vždy používány v páru (forward a reverse) pro obě vlákna. V obou případech se od nich polymeráza pohybuje ve směru od 5' k 3' konci.

Návrh vhodného primeru je základním krokem k zajištění efektivní a specifické amplifikace. Primery by měly ideálně být komplementární s cílovou DNA a to zvláště na 3' konci. Zároveň by neměly být komplementární sami mezi sebou, jinak by docházelo k tvorbě primer-dimerů. Navíc by neměly obsahovat komplementární sekvence v rámci jednoho primeru, jinak dochází k tvorbě sekundárních struktur, které zabraňují nasedání primeru. Forward i reverse primery je třeba vybrat tak, aby měly zhruba stejnou teplotu tání. Oba primery by měly mít vyšší obsah GC párů kvůli jejich větší vaznosti a specifitě než je tomu u AT párů, zvláště je to důležité na 3' konci (ALFANDARY, 2015; SEIFI at al, 2012).

Dnes existuje na webu řada volně dostupných nástrojů (NCBI, Primer3, OLIGO7, FastPCR software, PerlPrimer), pomocí kterých lze *in silico* primery optimálně navrhnout (KALENDAR at al, 2011; LORENZ, 2012).

Taq polymeráza

DNA termostabilní Taq (*Thermus aquaticus*) polymeráza je používána, protože je schopna ustát denaturační fázi PCR aniž by u ní samotné došlo k degradaci (FRAGA at al, 2008; Ishmael a Stellato, 2008).

2.10.2 Ověření specificity PCR pomocí ELFO

Před provedením qPCR je vhodné ověřit specificitu reakce pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Vždy by měl být viditelný pouze jeden pruh o očekávané velikosti, jinak je třeba reakci dále optimalizovat. Ověření elektroforézou je zvláště vhodné při použití nespecifických fluorescenčních substrátů (FRAGA at al, 2008).

2.11 Kinetika reakce

U PCR se množství amplifikované DNA zkopíruje během každého cyklu, teoreticky by tedy množství amplifikované DNA mělo narůstat exponenciálně. To však běžně neodpovídá realitě. Přesto, bychom reakci měli optimalizovat alespoň na 90% účinnosti. V pozdějších fázích amplifikace pak efektivita dále nevyhnutelně klesá. Podle toho jak efektivně je amplikon produkován, lze PCR reakci rozdělit do tří až čtyř odlišných fází:

Lineární fáze

Předpokládá se, že amplifikační reakce zde probíhá exponenciálně. Kvůli zatím nízké úrovni fluorescence to však nelze potvrdit.

Raná exponenciální fáze a Ct hodnota

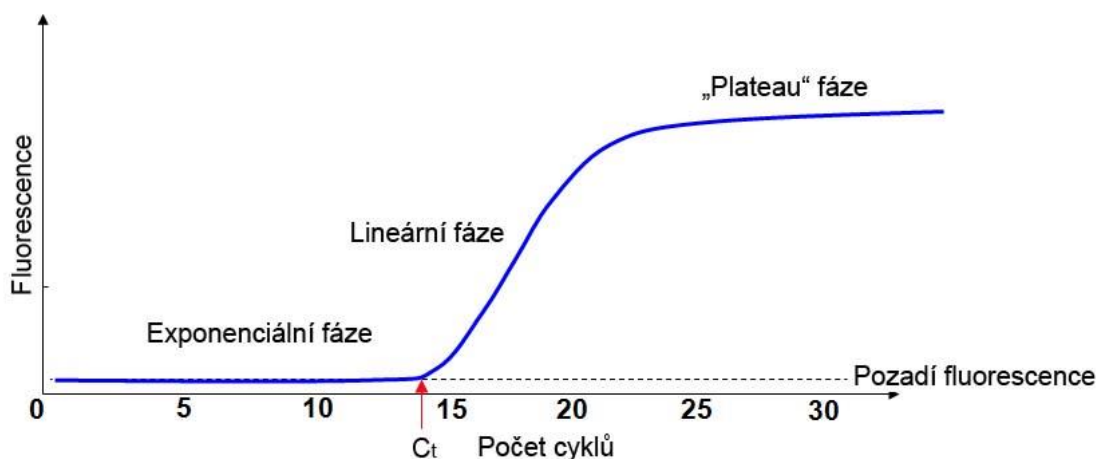
Zde množství fluorescence již překročí práh pozadí a stále exponenciálně stoupá. Amplifikaci je již možné zachytit detektorem. Cyklus během kterého k překročení prahu dochází je reprezentován jako Ct (cycle treshold). Hodnota Ct tedy značí číslo cyklu, při kterém amplikonem vygenerovaná fluorescence dosáhne svojí intenzitou určité úrovně. Tato úroveň může být stanovena libovolně nebo několika způsoby vypočtena, obecně by měla být umístěna co nejnižší, aniž by však byla ovlivněna ruchy na pozadí. Intenzita fluorescence v rané exponenciální fázi nejpřesněji odráží množství templátové DNA, a proto je právě na ni výpočet kvantifikace zaměřen.

Exponenciální fáze

Účinnost amplifikace již nedosahuje 100% a probíhá značně nerovnoměrně. K tomu obecně začne docházet, když množství amplikonu přesáhne řádově několik nanogramů na mikrolitr.

Plateau fáze

Nakonec reakce zpomaluje, dokud se zcela nezastaví v důsledku vyčerpání některých reagensů a kvůli množství naakumulovaného produktu. Množství fluorescence v této fázi již vůbec nereprezentuje množství amplikonu a proto není vhodné používat ji při výpočtu kvantifikace DNA. Tento fakt právě v minulosti způsoboval nepřesnost u endpoint PCR (TICHOPAD, 2003; FRAGA at al, 2008).



Obrázek5: Graf amplifikace (dostupné z <http://labguide.cz>)

2.11.1 Zdroje fluorescence

Fluorescenční substráty slouží, jako reportéry generující fluorescenční signál. Tím jak v průběhu reakce vzrůstá množství vytvářeného produktu, je tento růst u většiny metod reprezentován i korespondující silou fluorescence.

Fluorescenční substráty lze rozdělit do dvou základních kategorií. První skupinou jsou tzv. interkalační dsDNA činidla, ta se váží nekovalentně na dsDNA stejně na specifické i nespecifické sekvence. V roztoku před navázáním na dsDNA mají tyto substráty obvykle jen zanedbatelnou fluorescence. Předpokládá se, že když se substrát naváže na dsDNA způsobí to zamezení možnosti rotace jeho molekuly okolo vazby mezi dvěma aromatickými kruhy. Tím pádem zůstane fluorescence jako jediná z možností jak se substrát může zbavit pohlcované energie. Zástupci jsou např. SYBRGreen I a EvaGreen (NYGREN at al, 1998).

Výhodou interkalačních barviv a především SYBRGreenu je jejich cena, ta je totiž mnohem nižší než u alternativních metod. Nicméně, je nutné pokaždé analyzovat křivku tání po dokončení každého PCR testu kvůli možnosti nespecifické amplifikace a přítomnosti primer-dimerových struktur. Tvorba těchto struktur totiž spotřebovává reakční činidla nezbytně nutná pro amplifikační reakci, a tak zkresluje výsledky měření.

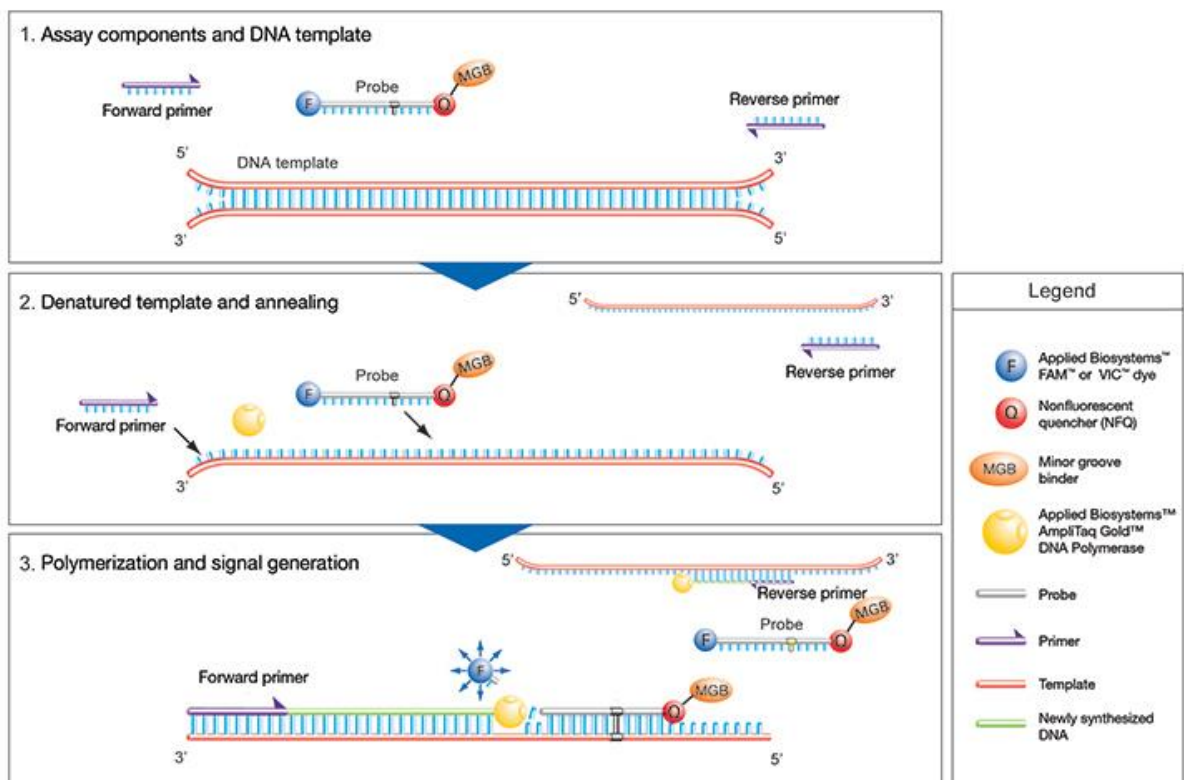
Analýza křivky tání se provádí na samém konci PCR, kde je fluorescence měřena jako funkce teploty. Při postupném zvyšování teploty dochází k přednostnímu rozpadu nespecifických struktur. Tento moment se označuje jako teplota tání, dochází během něj k uvolnění navázaného substrátu a tím k rozpoznatelnému poklesu fluorescence (NYGREN at al, 1998; KUBISTA at al, 2006).

Druhou skupinu substrátů tvoří fluorescenčně značené oligonukleotidy, což jsou vlastně malé molekulární fluorofory napojené na krátké úseky DNA případně RNA. Existují ve dvou formách jako reportér (donor) a quencher (akceptor). Reportér působí jako emitör fluorescenčního světla pokud je excitován světelným kvantem. Avšak v případě, že se v určité vzdálenosti od něj nachází i quencher, je energie fotonu přenesena na něj, to je označováno jako Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Quencher pak pohlcenou energii obvykle rozptýlí ve formě tepla, nebo jí vyzáří v závislosti na použité technologii.

Dělení podle typu fluorescenčních molekul:

Hydrolizační sondy (TaqMan, MGB-TaqMan, Snake assay) mají mechanismus účinku založen na exonukleázové aktivitě Taq polymerazy, která je schopna sondu během amplifikace degradovat a oddělit tak reportér od quencheru. Fluorescence je pak měřena

na konci fáze extenze a je úměrná množství specifického produktu. U této metody není možné provádět analýzu křivky tání.



Obrázek6: Průběh TaqMan signalizace (dostupné z <http://thermofisher.com>)

Hybridizační sondy (FRET, Molecular Beacons, HyBeacon) užívají dvě sondy navržené tak, aby při hybridizaci dosedli těsně vedle sebe. Donorová sonda je značena fluorochromem na 3' konci a akceptorová pak na 5' konci. Poté co se dostanou do kontaktu, akceptorový fluorochrom emituje záření získané od donoru na odlišné frekvenci. Fluorescence je měřena buď během nasedání primerů, nebo během fáze extenze a je přímo úměrná k množství specifického produktu. Použití těchto sond umožňuje analýzu křivky tání.

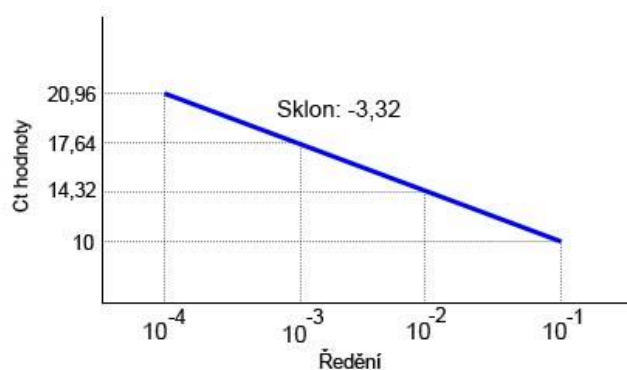
Primer-probes existují ve třech variantách Harpins, Cyclicons a Angler. Strukturou to jsou oligonukleotidy kombinující primer a sondu v jedné molekule. Jednoduchost tohoto řešení ho také činí cenově dostupnějším. K fluorescenci u nich dochází v závislosti na typu, buď během fáze nasedání primerů, nebo jejich extenze. Opět je u nich vhodné provést analýzu křivky tání k odhalení nespécifických produktů a primer-dimerových struktur.

Nakonec ještě zmíním analogy nukleových kyselin. Ty vytvářejí struktury podobající se běžným nukleovým kyselinám DNA a RNA pouze s tím rozdílem, že fosfátová kostra, pentózový sacharid, nebo nukleové báze byli nahrazeny nějakým jeho syntetickým analogem. U LNA (Locked Nucleic Acids) a PNA (Peptide Nucleic Acid) je mechanismus signalizace totožný s jejich běžnou variantou a pouze nabízejí lepší odolnost vůči nukleázám a zvýšenou afinitu ke komplementárním nukleovým kyselinám. Naproti tomu například u Plexor™ primerů je odlišných vlastností analogů využito i v mechanismu signalizace (NAVARRO at al, 2015).

2.11.2 Efektivita reakce

Účinnost PCR vyjadřuje rychlost, s jakou polymeráza konvertuje reagenty jako dNTP, primery a templátovou cDNA na amplikon. Ideálním stavem je zdvojnásobení amplikonu, což je reprezentováno 100%. Důvod pro měření efektivity je, že nám může odhalit chyby, kterých jsme se mohli během experimentu dopustit. Ty pak samozřejmě ovlivňují přesnost výsledků. Nízká účinnost reakce pod 90% může být způsobena kontaminací inhibitory polymerázy, nevhodným poměrem reagensů, jejich stářím, neoptimální teplotou během přisedání primerů, špatně navrženými primery nebo vytvářením sekundárních struktur během amplifikace. Vysoká účinnost reakce nad 110% je často způsobena tvorbou primer-dimerů nebo případně amplifikací nespecifického produktu. Nejčastější společnou příčinou jak vysoké tak nízké účinnosti reakce jsou však špatně nakalibrované pipety a chybná technika pipetování.

K popisu reakce lze použít standardní křivku, jejíž sklon vyjadřuje reakční efektivitu. Na křivce jsou vyneseny Ct hodnoty ředící řady připravené z templátové nebo také plazmidové cDNA. V ideálním případě by série amplifikací měla vyprodukovat rovnoměrně klesající křivku. U desítkového ředění při 100% efektivitě reakce sklon činí -3,32 (TAYLOR at al, 2010).



Obrázek7: Příklad standartní křivky (dostupné z <http://labguide.cz>)

2.12 Vyhodnocování dat relativní a absolutní kvantifikací

Testy qRT-PCR obecně používají jeden ze dvou standardních postupů; relativní a absolutní kvantifikaci a oba tyto postupy mohou být použity pro studium genové exprese. Zjišťujeme pomocí nich, nakolik se mění množství transkriptu ve sledovaných vzorcích (SELLARS at al, 2007).

2.12.1 Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace je obvykle prováděna v situacích, kdy je nutné určit absolutní množství původního transkriptu. Vyžaduje externí standart o známé koncentraci se kterým se provede série ředění pro vytvoření standartní křivky. Metoda se opírá o stejnou efektivitu amplifikace v kontrolní a cílové sekvenci. Standardní křivka reprezentuje lineární vztah mezi jejími Ct hodnotami, takto umožňuje stanovení koncentrace neznámého vzorku na základě porovnání s jeho Ct hodnotou. V případě určování množství mRNA je nutné navíc kontrolovat efektivitu reverzní transkripce. Tato metoda je obecně považována za pracnější kvůli nutnosti přípravy standartní křivky (SELLARS at al, 2007).

2.12.2 Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace porovnává expresi sledovaných genů vůči referenčnímu genu ze stejného vzorku, který by měl být konstantně exprimován napříč všemi sledovanými vzorky. Používá se v případech, kdy nám stačí znát relativní změnu v genové expresi, ke které došlo oproti původnímu stavu. U sledované sekvence provádíme porovnání vůči kalibrátoru, což je vzorek stejného genu, který neprošel experimentálními podmínkami.

Prvním krokem je výpočet rozdílů Ct mezi cílovým a referenčním genem, pro celou testovací řadu a kalibrátor tedy ΔCt . V druhém kroku se pak ΔCt každého vzorku z testovací řady odečítá od ΔCt kalibrátoru, získáme tak $\Delta\Delta Ct$. Ve třetím kroku hodnoty ještě dosadíme do vzorce.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dále u každé reakce musí být obvykle stanovena efektivita E, která je přibližně rovna 2. Koriguje se tak efektivita amplifikace PCR reakce mezi cílovým a referenčním genem. Pouze v případě, že předpokládáme velmi podobnou efektivitu, korekci použít nemusíme (SELLARS at al, 2007; KOZERA a RAPACZ, 2013).

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cp_{\text{target}} (\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cp_{\text{ref}} (\text{control} - \text{sample})}}$$

Obrázek8: Rovnice s korekcí efektivity (dostupné z <http://relative.gene-quantification.info>)

Mezi nejčastější referenční geny používané u qRT-PCR metody patří housekeeping geny jako 18S rRNA, β -actin, elongation factor-1 α a GAPDH. Nicméně úroveň exprese těchto referenčních genů se může výrazně lišit napříč všemi sledovanými vzorky, jak prokázaly některé nedávné studie. Proto se v poslední době více dbá na jejich vhodný výběr a často se k zajištění přesných výsledků používají tři nebo i více referenčních genů (SELLARS at al, 2007). Pokud provádíme již ověřený experiment ve stejných podmínkách, lze použít i jediný referenční gen (KOZERA a RAPACZ, 2013).

V případě, že zvolený referenční gen je exprimován nestabilně, zvyšuje se statistický šum, který znesnadňuje detekci malých změn. Horší však je, když je exprese referenčních genů pozmeněna experimentálními podmínkami nebo například vlivem nemoci, získané výsledky pak mohou být zcela zavádějící (DHEDA et al, 2005).

2.13 Přístrojové vybavení

V podstatě každý přístroj provádějící real-time PCR se skládá z počítačem řízeného termocykleru se zdrojem excitačního světla, který je integrovaný společně s fluorescenčním detekčním systémem a specializovaným softwarem, který analyzuje vstupní data a na jejich základě podává výsledky. Kromě toho je přesnost analýzy vždy úzce spojena s použitými reagensy (NAVARRO at al, 2015).

2.13.1 Excitační zdroje

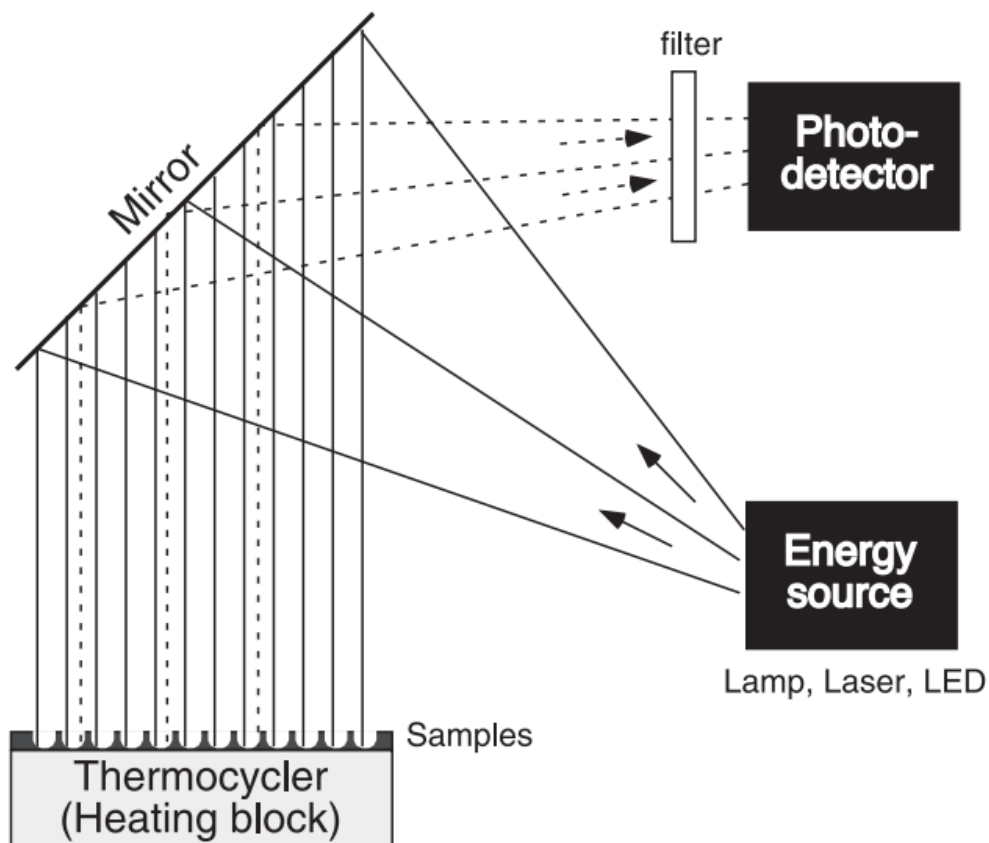
K excitaci fluorescenčních činidel se používají světelné lampy, světelné diody (LED) a lasery, všechny tyto zdroje by měly být schopny vyzařovat excitační záření o požadované frekvenci. LED diody a lasery operují v úzkém spektru, zatímco lampy jsou klasifikovány jako zařízení s širokým spektrem emisí, proto obvykle vyžadují korekci filtrem k dosažení požadované frekvence (VALASEK a REPA, 2005).

2.13.2 Fluorometrický detektor

Základní funkcí fluorometru je kontinuální detekce fluorescenčního signálu v požadovaném úseku spektra. Detektory zahrnují CCD (charge-coupled device) kamery, fotonásobící trubice nebo jiné typy fotodetektorů, ty obvykle také využívají filtry, které propouštějí na fotodetektor pouze požadovanou vlnovou délku. Detektor pak převádí dopadající záření na elektrický signál.

Vzhledem k tomu, že fluorescenční chemikálie jsou excitovány kratší vlnovou délkou než je pak vlnová délka emitovaná, fluorometr musí být schopný rozlišit sledované frekvence

ve stejný moment, některé přístroje detekují zároveň až 4 frekvence, což je také vyžadováno pro multiplex PCR (SEIFI at al, 2012).



Obrázek9: Diagram funkce termocyklu (Valasek a Repa, 2005)

2.13.3 Termocykler

Nejdůležitější část přístrojového vybavení tvoří termocykler zajišťující vlastní provedení PCR cyklu. V první řadě termocykler udržuje konzistentní teplotu mezi všemi reakčními jamkami, jakékoliv rozdíly v teplotě by totiž mohly vést k rozdílné účinnosti amplifikace. Toho je dosaženo použitím topného bloku, teplým vzduchem nebo kombinací obojího. Dále je termocykler samozřejmě schopen tyto teploty dynamicky měnit podle průběhu PCR. Teplovzdušné systémy jsou zpravidla schopny tyto změny provádět rychleji (VALASEK a REPA, 2005).

2.13.4 Vyhodnocovací software

Softwarové platformy umožňují jednoduše na základě vstupních dat analyzovat PCR tím, že nabízí grafický výstup výsledků testů zahrnujících amplifikaci a křivku tání. Křivka zobrazuje data týkající se kinetiky amplifikace cílové sekvence, zatímco disociační křivka odhaluje charakter konečného produktu amplifikace (VALASEK a REPA, 2005).

3. Hypotéza a cíl práce

3.1 Hypotéza

Aktivace drah spojených s chladovou aklimatizací by měla způsobit zvýšení exprese sledovaného genu *ERD10*. Lze tedy očekávat, že mezi zkoumanými odrůdami řepky Cadeli a Navajo a mezi jejich kontrolními a chladem stresovanými rostlinami bude patrný rozdíl v relativní expresi tohoto genu.

3.2 Cíl práce

Cílem této práce je podrobit rostliny řepky odrůd Cadeli a Navajo stresu chladem v kontrolovaném prostředí a porovnat relativní expresi genu *ERD10* u těchto a kontrolních rostlin.

4. Metodika

4.1 Příprava vzorků

Růst rostlin probíhal v kontrolovaném prostředí fytotronu při relativní vlhkosti vzduchu 85 %. Teplota přes den byla udržována na 21°C a během noci na 19°C. Světelná perioda trvala 14 hodin s 10 hodinami tmy.

Po pěti týdnech růstu byly obě stresové skupiny přesunuty do prostředí se 2°C, od toho okamžiku také začal odběr vzorků.

Z rostlinek byly vždy odebrány jen plně vyvinuté zdravé listy o střední velikosti. Odebrané listy byly vždy neprodleně zamrazeny tekutým dusíkem a uchovávány v mrazicím boxu za teploty -80 °C.

	Pořadí odebraných vzorků			
	Cadeli kontrolní rostliny 21°C	Cadeli stresované rostliny 2°C	Navajo kontrolní rostliny 21°C	Navajo stresované rostliny 2°C
0 den	1.		1.	
0,5 dne	2.			1.
1 den	3.	1.	2.	2.
1,5 dne	4.			
2 dny	5.	2.	3.	3.
2,5 dne	6.		4.	4.
3 dny	7.	3.	5.	5.
3,5 dne	8.	4.	6.	6.
4 dny	9.	5.	7.	7.
4,5 dne	10.	6.	8.	8.
5 dnů	11.	7.	9.	
6 dnů		8.	10.	9.
7 dnů	12.	9.	11.	10.
9 dnů		10.	12.	11.
11 dnů		11.	13.	
13 dnů		12.		12.
15 dnů		13.		13.
17 dnů			14.	
19 dnů	13.	14.	15.	
21 dnů	14.	15.	16.	14.
23 dnů	15.	16.	17.	15.
25 dnů	16.	17.	18.	
28 dnů	17.		19.	16.
31 dnů	18.		20.	17.

Tabulka1: Tabulka odběrových časů

4.2 *Extrakce RNA*

1. 100 mg vzorku pletiva bylo homogenizováno přímo v eppendorfkách v kapalném dusíku, poté byl přidán 1ml TRI Reagentu předehřátého na 60°C a vzorky byly ponechány 5 minut při pokojové teplotě.
2. Tekutá fáze byla separována centrifugací při 3 000 ot/min při teplotě 4°C po dobu 20 minut a přenesena do nové mikrozkušavky.
3. Do supernatantu bylo přidáno 0.2 ml chloroformu na každý ml použitého TRI reagentu, vortexováno 15 sekund a ponecháno 5 minut při pokojové teplotě. Následně centrifugováno při 10 500 ot/min při teplotě 4°C po dobu 15 minut.
4. Vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky a přidáno 0.5 objemu isopropanolu a 0.5 objemu 1.2 M NaCl v poměru vůči objemu vodné fáze. Fáze byla krátce zvortexována a ponechána při pokojové teplotě po 7 min, poté centrifugována při 10 500 ot/min o teplotě 4°C po dobu 10 minut.
5. Vodný supernatant byl opět odstraněn a zbylý pelet RNA byl přečištěn přidáním 1 ml 75% ethanolu na každý 1ml TRI reagentu. Supernatant byl krátce zvortexován a centrifugován při 8 500 ot/min při teplotě 4°C po dobu 5 minut. RNA pelet byl poté volně vysoušen po 7 minut.
6. Pelet byl opětovně rozpuštěn vortexováním spolu s 20 μ l DEPC-MQ vody a inkubován po 13 minut při 60°C. Vzorky byly poté ošetřeny přidáním 1 μ l inhibitoru RNáz k potlačení RNA degradace.

Při manipulaci a pipetování vzorky byly vždy drženy na ledu pro zpomalení degradace RNA.

Aliquoty z každého vzorku byly fotometricky otestovány na čistotu obsažené RNA na přístroji BioSpec-nano. K určení čistoty byly použity poměry absorbancí 260/280 nm. U čistého vzorku RNA je poměr absorbancí typicky ~2,0. Výrazně odlišné poměry hodnot mohou naznačovat přítomnost bílkovin, fenolu nebo jiných nečistot, které silně absorbují při 280 nm. Tento poměr může být dále ovlivněn pH a iontovou silou pufru, který je v blanku obsažen (DESJARDINS a CONKLIN, 2010).

Izolované vzorky RNA byly nakonec uchovány při teplotě -80°C do příštího dne.



Obrázek10: BioSpec-nano spektrofotometr

4.3 Přečištění RNA

Ještě před samotnou reverzní transkripcí byla RNA přečištěna od cizorodé DNA s použitím DNA removal kitu DNA-free™.

1. Do 20 μ l vzorku bylo přidáno 1/10 objemu (2 μ l) 10x DNase bufferu a 1 μ l rDNAázy.
2. Vzorky byly po 20 minut zahřívány při teplotě 37°C.
3. Bylo přidáno 1/10 objemu DNAáza inaktivačního pufru a ponecháno 2 minuty při pokojové teplotě.
4. Poté byly vzorky centrifugovány při 10 000 ot/min po 1.5 minuty a supernatant byl přenesen do čisté eppendorfky.

4.4 Přepis do cDNA

K provedení reverzní transkripce byl použit kit ImProm-II Reverse Transcription System.

4.4.1 Denaturace RNA a navázání primerů

1. K 3 μl přečištěných vzorků RNA byl vždy přidán 1 μl Oligo(dt)15 primeru a 1 μl nuclease free vody.
2. Vzorky byly po 5 minut zahřívány v termocycleru při teplotě 70°C.

4.4.2 Elongace

1. K vzorkům o objemech 5 μl bylo vždy přidáno
 - a. 6.6 μl nuclease free vody
 - b. 1 μl dNTP
 - c. 4 μl 5x RxN bufferu
 - d. 2.4 μl MgCl_2
 - e. 1 μl RT enzymu
2. Vzorky byly přemístěny do termocycleru kde byly zahřívány 5 minut při 25°C a následně 60 minut při 42°C.

4.5 Vlastní amplifikace

Amplifikace proběhla na detekčním systému QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR systém. Jako fluorescenční činidlo byl použit SYBR Green I.

Jako referenční gen byl použit gen Act kódující v buňce aktin.

4.5.1 Složení reakční směsi

K 1 μl cDNA byly vždy přidány následující reaktanty

- a. 5 μl Master mixu
- b. 2 μl vody
- c. 1 μl forward primeru
- d. 1 μl reverse primeru

4.5.2 Reakční cykly

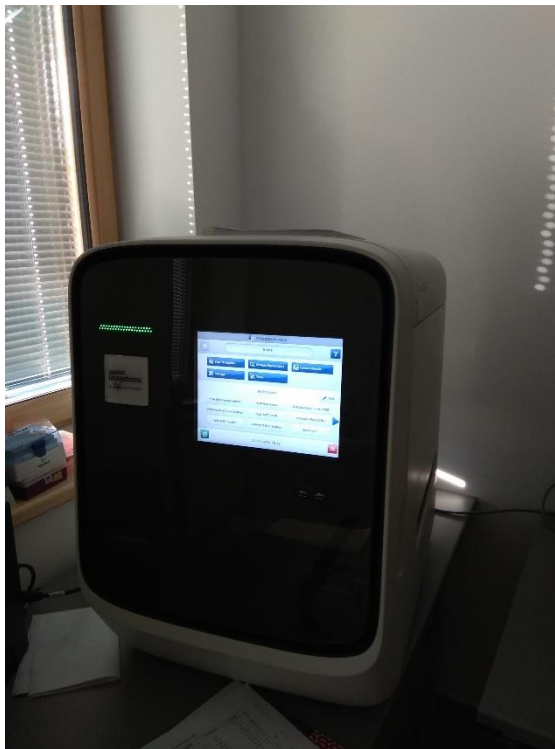
Fáze reakce proběhla ve 40 cyklech s rychlostí změny teploty 1,6 °C/s

1. při 50 °C po 2 minuty

2. při 95 °C po 10 minut
3. při 95 °C po 15 sekund
4. při 60 °C po 1 minutu

Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru QuantStudio Real-Time PCR System 1.3.

Relativní exprese byla vypočtena metodou relativní kvantifikace $\Delta\Delta C_t$ v tabulkovém editoru Microsoft Excel. Jako kalibrátor při výpočtu byl použit průměr ΔC_t ze všech vzorků kontrolních rostlin pro Cadeli i Navajo.



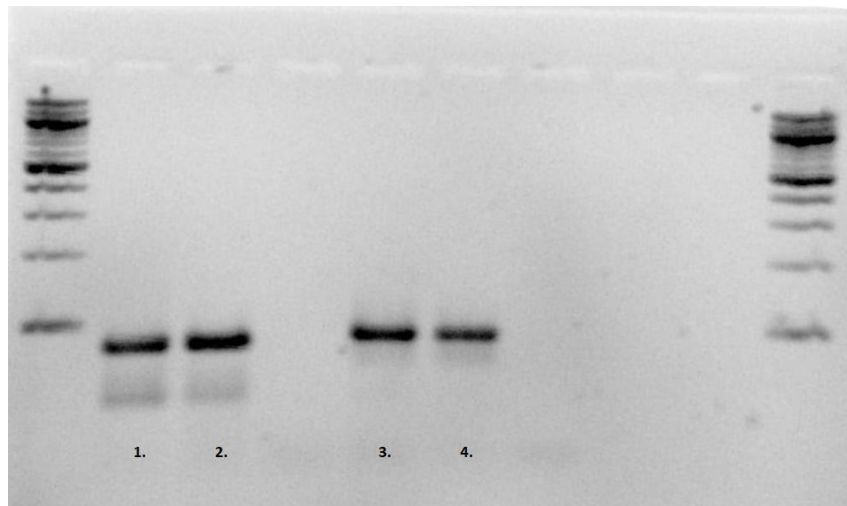
Obrázek 11: Real-time qPCR detekční systém

5. Výsledky

5.1 *Kontrola specificity cDNA*

Vynesené amplikony na 2% agarózovém gelu dle očekávání odpovídaly svojí velikostí vůči 100 bp ladderu.

1. Cadeli
2. Cadeli kontrola
3. Navajo
4. Navajo kontrola



Obrázek12: *ELFO Kontrola separace amplifikované cDNA*

5.2 *Vyhodnocení dat*

Data ukázala (viz. obr. 13), že obě stresované odrůdy Cadeli i Navajo vykazovaly vyšší hodnoty exprese genu *ERD10* vůči jejich kontrolním skupinám v průběhu celého experimentu. Výjimkou bylo období od 6 do 19 dne, kdy u odrůdy Navajo došlo k značnému poklesu exprese, avšak k závěru experimentu byl patrný opětovný nárůst.

Při vzájemném srovnání mezi stresovými skupinami Cadeli a Navajo vykazovala odrůda Navajo téměř vždy vyšší expresi genu *ERD10*, až na zmíněnou periodu od 6 do 19 dne kdy převládala exprese u stresovaných rostlin Cadeli. Nejvyšší míry exprese dosáhlo Navajo po 60 hodinách stresu, kdy byla relativní hodnota exprese 40x vyšší v poměru

vůči průměrné hodnotě exprese jejích kontrolních rostlin. U odrůdy Cadeli, pak k nejvyšší expresi došlo po 72 hodinách, hodnota v tento okamžik byla 13,2x vyšší než u kontrolní skupiny. Při vzájemném porovnání kontrolních rostlin obou odrůd nebyl u *ERD10* patrný žádný trend.

	Expresse Cadeli	Expresse Navajo
0,5 dne		16,2
1 den	6,3	9,3
1,5 dne		
2 dny	4,8	17,8
2,5 dne		40,1
3 dny	13,2	0,0
3,5 dne	0,3	15,0
4 dny	2,4	4,6
4,5 dne	4,2	6,2
5 dnů	2,5	
6 dnů	7,6	2,5
7 dnů	0,4	0,5
9 dnů	1,8	0,6
11 dnů	2,4	
13 dnů	2,3	0,5
15 dnů	0,2	0,8
17 dnů		
19 dnů	2,6	
21 dnů	0,7	2,1
23 dnů	1,4	8,7
25 dnů	2,5	
28 dnů		0,6
31 dnů		18,3

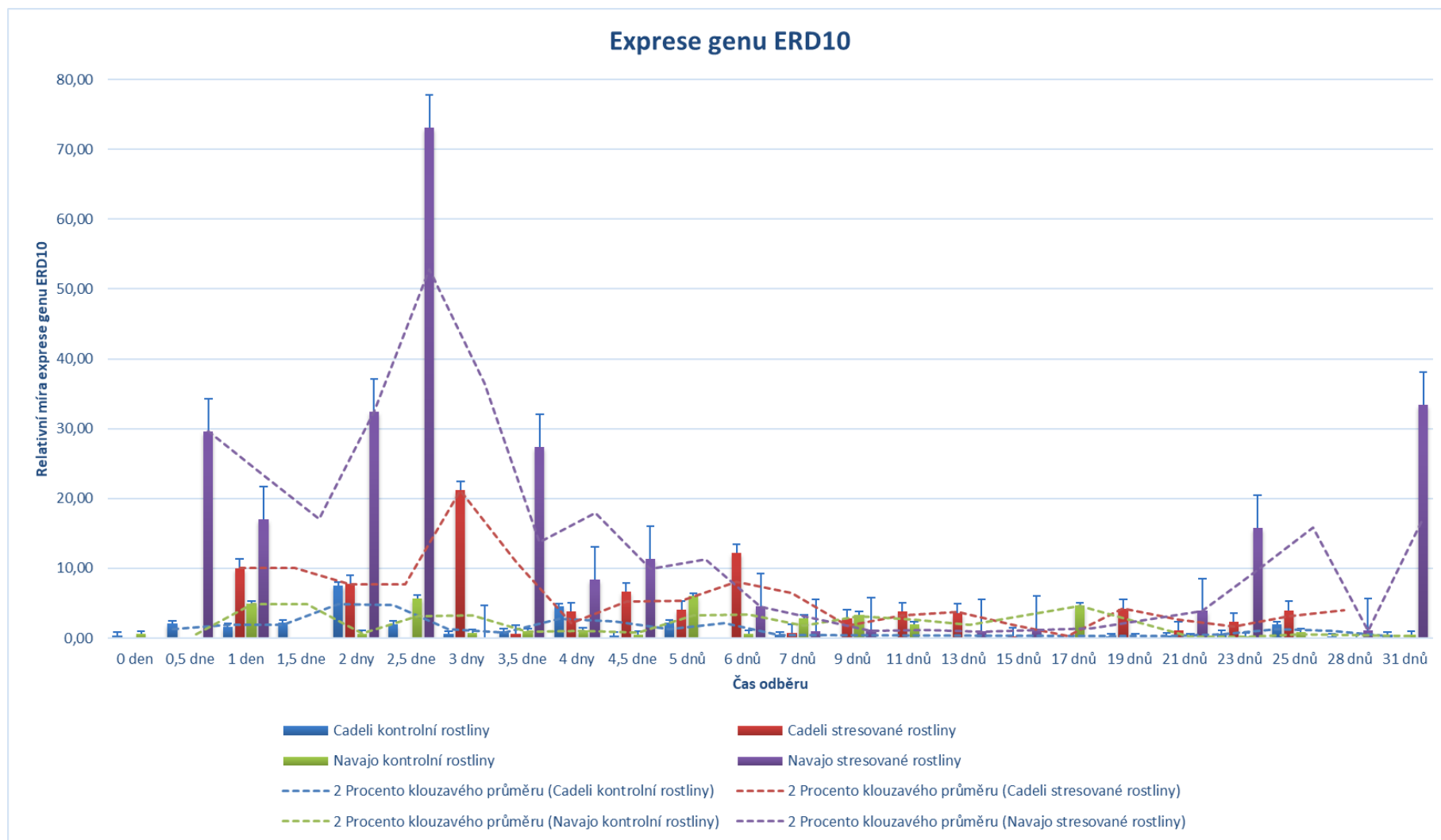
Tabulka2: Relativní hodnoty exprese *ERD10* u stresovaných rostlin v poměru vůči jejich kontrolním skupinám

Odběry nejsou bohužel kompletní, v některých případech se mi nepodařilo vyizolovat RNA v dostatečné kvalitě, to samozřejmě poněkud snížilo celkovou vypovídající hodnotu experimentu (viz. Tabulka1).

U analýzy rozptylu mezi jednotlivými skupinami rostlin nebyla potvrzena nulová hypotéza $P < 0.05$ a byl tak mezi nimi dokázán statisticky významný vztah.

<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	2220,62	3	740,2067	7,810584	0,0001487	2,739502302
Všechny výběry	6444,34	68	94,76971			
Celkem	8664,961	71				

Tabulka2: Analýza rozptylu (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami rostlin



Obrázek13: Vývoj hladiny exprese ERD10

6. Diskuze

Mezi jednotlivými odrůdami řepky existují znatelné rozdíly v jejich toleranci vůči jednotlivým stresorům. V případě odrůd Cadeli a Navajo jsou jejich reakce na chlad znatelně kontrastní. Navajo je obecně považována za více odolnou vůči chladovému stresu a Cadeli naopak je považována za spíše náchylnou odrůdu (URBAN, 2017).

Již dlouho je známo, že u rostlin během chladové aklimatizace dochází k biochemickým změnám a tyto změny jsou přisuzovány aktivaci určitých chladových genů (THOMASHOW, 1990).

Srovnání dat z tohoto experimentu ukázalo, že *ERD10* je exprimován ve vyšší míře u odrůdy Navajo oproti odrůdě Cadeli. Dále byla patrná příčinná souvislost mezi zvýšením hladiny exprese *ERD10* a chladovým stresem. Tento experiment sice nezahrnuje pozorování vlivu genu *ERD10* na fenotyp rostliny, ale na základě provedené rešerše lze očekávat (KOVACS at al., 2008), že ERD10 protein skutečně napomáhá rostlině zlepšit její chladovou odolnost. K přímému prokázání této skutečnosti by však bylo nutné například spojit tento experiment s vizuální kontrolou prospívání rostlin v průběhu stresového experimentu a zároveň je porovnat se stejnými odrůdami rostlin kde by byl gen ERD10 knockoutován, tak by se vyloučil vliv jiných dehydrinů a dalších chladových adaptačních mechanismů rostliny.

Předchozí studie Kagale at al. (2006) užívající metody Northern blot zaznamenala rovněž navýšení exprese *ERD10* u *Arabidopsis thaliana* a *Brassica napus* při zátěži suchem, kde jejich úroveň exprese kulminovala v 72 a 84 hodině. Zajímavé je, že zde byla také popsána závislost exprese a cirkadiálních rytmů. Také Jelínková at al. (2017) zaznamenala použitím metody rezonance povrchového plazmonu až 10x zvýšení množství proteinu ERD10 u odrůdy Navajo v porovnání s kontrolními rostlinami po 11 dnech stresu chladem. Naopak u odrůdy Cadeli došlo k patrnému navýšení akumulace dehydrinového proteinu ERD10 až po 42 dnech stresu.

Harenčák, (2018) ve své práci kde také mimo jiné sledoval expresi genu *ERD10* na odrůdách Cadeli a Navajo jen na kratším časovém úseku, pozoroval navýšení exprese během stresu chladem s největším nárůstem u obou odrůd po 48 hodinách chladu. V mém případě tomu bylo o 12 hodin později, respektive o 48 v případě odrůdy Cadeli.

Dále je nutné mít na paměti, že množství naměřené genové exprese nemusí nutně odrážet obsah přítomného proteinu (VOGEL A MARCOTTE, 2012). Nízká úroveň exprese *ERD10* patrná především u odrůdy Navajo trvajících od 7 do 23 dne experimentu je zřejmě způsobena množstvím naakumulovaného proteinu v buňce. Při dostatečném množství proteinu je tedy rostlina schopna reagovat snížením exprese genu *ERD10*. Podobný jev zaznamenali Danyluk at al (1998) při jejich imunoblotové analýze celkového obsahu proteinu WCOR410 (další z dehydrinů) u pšenice seté. Během 5 dne jejich experimentu dosáhla akumulace proteinu maxima a poté zvolna začala klesat i přesto, že prostředí stresovaných rostlin ponechali konstantně na 4 °C. Dá se očekávat, že v mém případě došlo k podobnému jevu. Závěrečná exprese *ERD10* se zřejmě u odrůdy Navajo opět nastartovala v důsledku snížení obsahu proteinu v buňkách. U odrůdy Cadeli byla exprese více plynulá a k tak zásadnímu výkyvu tedy nedošlo.

Pokud předpokládáme, že *ERD10* jako jeden z dehydrinů napomáhá rostlině se zvládnutím chladového stresu (KOVACS at al., 2008), je možno prakticky použít analýzu RT-qPCR k posouzení schopnosti sledované rostliny chladu odolávat. Ve šlechtitelské praxi by to mohlo znamenat, že tento gen by mohl být markerem pro výběr genotypů pro šlechtění odolných odrůd. Případně by mohlo být zajímavé použít *ERD10* u transgenního experimentu a vytvořit tak k chladu odolnější kultivar.

7. Závěr

Na základě výsledků mého experimentu mohu potvrdit původní domněnku, že u jednotlivých odrůd řepky dochází při stresovém působení chladu k rozdílům v relativní expresi genu *ERD10*. U odrůdy Navajo je pak relativní exprese tohoto genu znatelně vyšší než u odrůdy Cadeli. Tento výsledek koresponduje se skutečností, že Cadeli je všeobecně považována za k chladu náchylnější a odrůda Navajo za spíše odolnější.

V neposlední řadě mohu potvrdit vhodnost použití metody RT-qPCR ke kvantifikaci změn v genové expresi u rostlin. K experimentálnímu použití v podobném rozsahu se zřejmě jedná o nejpraktičtější běžně dostupnou metodu, která je přitom i dostatečně specifická.

8. Seznam literárních zdrojů

1. CHINNUSAMY, V., ZHU, J. & ZHU, J.-K., 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12(10), pp.444-451. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.07.002.
2. BEČKA, D., 2007. *Řepka ozimá: pěstitelský rádce*. Praha: Pro katedru rostlinné výroby 1rd ed., ČZU Praha: Kurent, p.7. Available at: <http://metodiky.agrobiologie.cz/PDF/KRV/Repka-ozima-pestitelsky-radce.pdf> [Accessed March 15, 2019].
3. FIEBELKORN, D. & RAHMAN, M., 2016. Development of a protocol for frost-tolerance evaluation in rapeseed/canola (*Brassica napus* L.). *The Crop Journal*, 4(2), pp.147-152. DOI: 10.1016/j.cj.2015.11.004.
4. MAHAJAN, S. & Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), pp.139-158. DOI: 10.1016/j.abb.2005.10.018.
5. BECK, E.H. et al., 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32(3), pp.501-510. DOI: 10.1007/s12038-007-0049-5.
6. YADAV, S.K., 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), pp.515-527. DOI: 10.1051/agro/2009050.
7. BOWLES, D.J. et al., 2002. Plants in a cold climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1423), pp.831-847. DOI: 10.1098/rstb.2002.1073.
8. BHATNAGAR-MATHUR, P., Vadez, V. & Sharma, K.K., 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3), pp.411-424. DOI:10.1007/s00299-007-0474-9.
9. KUKLA, J. & KUKLOVÁ, M., 2013. PÔSOBENIE ABIOTICKÝCH STRESOROV NA RASTLINY A EKOSYSTÉMY. In *Vliv abiotických a biotických stresorů na*

vlastnosti rostlin 2013. Praha - Ruzyně: Výzkumný ústav rostlinné výroby, p. 86. ISBN 978-80-7427-131-1.

10. BLANVILLAIN, R. et al., 2011. Stress tolerance to stress escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family. *The EMBO Journal*, 30(18), pp.3812-3822. DOI: 10.1038/emboj.2011.270.

11. ZHU, J.-K., 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), pp.313-324. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.029.

12. FEDOROFF, N.V. et al., 2010. Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century. *Science*, 327(5967), pp.833-834. DOI: 10.1126/science.1186834.

13. MITTLER, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), pp.15-19. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.11.002.

14. MOHAMMAD, P., 1999. *Handbook of plant and crop stress* 2nd ed., New York: M. Dekker, p. 315-316. ISBN 0-8247-1948-4.

15. YAN, L., 2004. The Wheat VRN2 Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science*, 303(5664), pp.1640-1644. DOI: 10.1126/science.1094305.

16. BAKER, N.R., 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), pp.89-113. DOI:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759.

17. ROUACHED, H. et al., 2015. Plants Coping Abiotic and Biotic Stresses: A Tale of Diligent Management. *BioMed Research International*, 2015, pp.1-2. DOI: 10.1155/2015/754754.

18. TAIPALE, M., JAROSZ, D.F. & LINDQUIST, S., 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7), pp.515-528. DOI: 10.1038/nrm2918.

19. SCHARF, K.-D. et al., 2012. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), pp.104-119. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2011.10.002.

20. CHALHOUB, B. et al., 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome, *Science*, 345(6199). DOI: 10.1126/science.
21. HU, Q. et al., 2017. 5(2). Rapeseed research and production in China, *The Crop Journal*, pp.127-135 DOI: 10.1016/j.cj.2016.06.005.
22. GUPTA, S.K. & PRATAP, A., 2007. History, Origin, and Evolution. *Rapeseed Breeding*, pp.1-20. DOI: 10.1016/S0065-2296(07)45001-7.
23. BROWN, J., DAVIS, J. B., LAUVER, M., WYSOCKI, D., 2008 Canola Growers' Manual. 1st ed. University of Idaho & Oregon State University. Available at https://www.uscanola.com/site/epage/102387_956.htm [Accessed March 15, 2019].
24. O'BRIEN, RICHARD, D., 2009 Fats and oils: formulating and processing for applications. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 1-4200-6166-6.
25. VAN DUREN, I. et al., 2015. Where to produce rapeseed biodiesel and why? Mapping European rapeseed energy efficiency. *Renewable Energy*, 74, pp.49-59. DOI: 10.1016/j.renene.2014.07.016.
26. SELLARS, M.J. et al., 2007. Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: A comparison of relative and absolute quantification procedures. *Journal of Biotechnology*, 129(3), pp.391-399. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.029.
27. DHEDA, K. et al., 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry*, 344(1), pp.141-143. DOI: 10.1016/j.ab.2005.05.022.
28. KOZERA, B. & RAPACZ, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), pp.391-406. DOI: 10.1007/s13353-013-0173-x.
29. TAYLOR, S. et al., 2010. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), pp.S1-S5. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
30. SHEIDAI, M. et al., 2012. Cytogenetic study of some rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars and their hybrids. *Caryologia*, 56(4), pp.387-397. DOI: 10.1080/00087114.2003.10589349.

31. KUBISTA, M. et al., 2006. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3). DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
32. FRAGA, D., MEULIA, T. & FENSTER, S., 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 00(1), pp.10.3.1-10.3.34. DOI: 10.1002/9780470089941.et1003s00.
33. VALASEK, M.A. & REPA, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), pp.151-159. DOI: 10.1152/advan.00019.2005.
34. SEIFI, M. et al., 2012. Overview of Real-Time PCR Principles. *Polymerase Chain Reaction*. DOI: 10.5772/39220.
35. HIGUCHI, R. et al., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, 11(9), pp.1026-1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
36. Bessetti, J., 2019. An Introduction to PCR Inhibitors [online]. © Promega Corporation. Available at: <https://www.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1001/an%20introduction%20to%20pcr%20inhibitors.pdf> [Accessed March 15, 2019].
37. CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), pp.581-585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
38. VOGEL, C. & MARCOTTE, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), pp.227-232. DOI: 10.1038/nrg3185.
39. SMITH, C.J. & OSBORN, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), pp.6-20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
40. NYGREN, J., SVANVIK, N. & KUBISTA, M., 1998. The Interactions Between the Fluorescent Dye Thiazole Orange and DNA. *John Wiley & Sons*, 1998(46), pp.39-51. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(199807)46:1<39::AID-BIP4>3.0.CO;2-Z.

41. NAVARRO, E. et al., 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, pp.231-250. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
42. KALENDAR, R., LEE, D. & SCHULMAN, A.H., 2011. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(2), pp.137-144. DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.04.009.
43. TICHOPAD, A., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31(20), p.122. DOI: 10.1093/nar/gng122.
44. WONG, M.L. & MEDRANO, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), pp.75-85. DOI: 10.2144/05391RV01.
45. ISHMAEL, F.T. & STELLATO, C., 2008. *Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician*, 101(4), pp.437-443. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60323-7.
46. ALFANDARY, R., 4 Tips for Efficient Primer Design. [online]. Available at: <http://genomecompiler.com/tips-for-efficient-primer-design/> [Accessed March 15, 2019].
47. LORENZ, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63). DOI: 10.3791/3998.
48. KOVACS, D. ET al., 2008. Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *PLANT PHYSIOLOGY*, 147(1), pp.381-390. DOI: 10.1104/pp.108.118208.
49. DESJARDINS, P. & CONKLIN, D., 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, (-1). DOI: 10.3791/2565.
50. URBAN, M., 2017. *Fyziologická a proteomická charakterizace vlivu abiotických stresů na ozimou formu brukve řepky olejky*. Disertace. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

51. THOMASHOW, M.F., 1990. Molecular Genetics of Cold Acclimation in Higher Plants. *Genomic Responses to Environmental Stress*, pp.99-131. DOI: 10.1016/S0065-2660(08)60525-8.
52. DANYLUK, J., 1998. *Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Wheat*. THE PLANT CELL ONLINE, 10(4), pp.623-638. DOI: 10.1105/tpc.10.4.623.
53. HARENČÁK, J., 2018. *Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin řepky na stres chladem*. Bakalářská práce. České Budějovice. ZF JU.
54. KAGALE, S. et al., 2006. *Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses*. *Planta*, 225(2), pp.353-364. DOI: 10.1007/s00425-006-0361-6.
55. JELÍNKOVÁ, I., et al., 2017. *Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé*. *Úroda: vědecká příloha* [online], 65(12), pp.215-217. Available at: https://c.vupt.cz/files/aktualni_poznatky/2017_vedecka_priloha_uroda_12.pdf [Accessed March 15, 2019].