

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Barbora Jílková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Izolace celkové RNA pro PCR
detekci rostlinných virů**

Bakalářská práce

Barbora Jílková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:.....

Podpis:

Souhrn

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se zaměřila na izolaci celkové RNA z rostlin pro PCR detekci rostlinných virů. Zabývala jsem se významem i historií PCR pro detekci rostlinných virů, jednotlivými metodami izolace RNA, komplikacemi provázejícími tyto metody i modifikacemi, které tyto komplikace řeší.

Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci izolace celkové RNA z rostlin pomocí komerčních izolačních kitů. Jednotlivé izolační kity byly porovnány ve výtěžku izolace RNA a bylo zjištěno, u kterých kitů dochází při izolaci celkové RNA k preferenci rRNA. Nejvyšší výtěžek izolace RNA prokázaly soupravy Plant/Fungi Total RNA Purification kit od firmy Norgen Biotek corp., GeneAll Ribospin Plant (při použití pufru REL) od firmy GeneAll Biotechnology a NucleoSpin RNA plant (při použití pufru RA1) od firmy Macherey-Nagel. Nejvyšší preference izolace rRNA k celkové izolované RNA byla zjištěna u vzorku izolovaného kitem GeneAll Ribospin Seed/Fruit od firmy GeneAll Biotechnology.

Summary

In the theoretical part of this bachelor thesis I focused on isolation of total RNA from plants for PCR-based detection of plant viruses. I described the importance and history of PCR for detection of plant viruses, isolation methods, complications which might arise with RNA isolation and a few modifications which were developed to deal with these complications.

Experimental part was focused on optimizing the total RNA isolation from plants using commercial isolation kits. These commercial kits were compared in amount of RNA isolated and how much they enriched isolation of rRNA in comparison with the total RNA. The results showed that isolation kits Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek corp.), GeneAll Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology) and NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel) had the highest amount of RNA isolated. The RNA isolated with kit GeneAll Ribospin Seed/Fruit had the highest ratio of rRNA in the total RNA.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení, věcné připomínky a čas, který mi věnoval. Mé díky patří i celému týmu Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů za příjemnou atmosféru a pomoc při zpracování experimentální části mé bakalářské práce. Stejně tak děkuji za podporu Interní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2016_003).

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	10
3. Seznam použitých zkratk a symbolů	11
4. Současný stav řešené problematiky	12
4.1 Diagnostika rostlinných virů	12
4.2 Polymerázová řetězová reakce v diagnostice rostlinných virů.....	12
4.3 Izolace nukleových kyselin pro PCR detekci rostlinných virů.....	13
4.4 Izolace celkové RNA.....	14
4.5 Fenol-chloroformová metoda izolace RNA	15
4.6 Varianta fenol-chloroformové metody izolace RNA s použitím CTAB.....	15
4.7 Extrakce RNA guanidinthiokyanátem.....	16
4.8 Adsorbce RNA na oxid křemičitý v roztoku chaotropní soli	16
4.9 Komerční kity pro izolaci RNA.....	17
4.10 Modifikace protokolů k izolaci RNA	17
4.11 Izolace RNA a odstranění inhibitorů PCR	20
4.12 Hodnocení kvality izolované RNA.....	21
4.13 Kvantitativní real-time RT-PCR.....	21
5. Materiál a metody	23
5.1 Biologický materiál	23
5.2 Použité chemikálie.....	23
5.3 Použité izolační kity	23
5.4 Použité roztoky a jejich složení	23
5.5 Použité přístroje.....	23
5.6 Izolace celkové RNA.....	24

5.7	Statistické hodnocení výsledků	28
5.8	Kvantitativní RT-PCR	29
5.9	Elektroforetická separace produktů qRT-PCR	30
6.	Výsledky	31
6.1	Izolace celkové RNA	31
6.2	Stanovení 18S rRNA ve vzorcích izolované RNA	34
7.	Diskuze	40
8.	Závěr	43
9.	Literatura	44

1. Úvod

Izolace celkové ribonukleové kyseliny z rostlin je důležitým krokem poskytujícím templát pro detekci rostlinných virů pomocí RT-PCR. Úspěšná izolace závisí na mnoha faktorech, jedním z nich jsou různé chemické a fyzikální vlastnosti rostlinných orgánů respektive pletiv. Izolace je komplikována rigidní buněčnou stěnou rostlin, v některých rostlinných pletivech i vysokým obsahem polysacharidů a sekundárních metabolitů, které mohou inhibovat PCR. K dispozici je poměrně široká škála metod pro izolaci RNA, patří zde historicky nejstarší izolace fenol-chloroformovou metodou, variantou této metody je použití cetylmethylammonium bromidu, který je vhodný pro odstranění polysacharidů, podobně je používán guanidin thiokyanát, chaotropní sůl užívaná při fenol-chloroformové metodě a adsorpci nukleových kyselin na oxid křemičitý. Komerčně dostupné kity pro izolaci RNA urychlují pracovní postup izolace. Metody izolace celkové RNA z rostlin jsou stále inovovány tak, aby byly překonány problémy s inhibitory PCR a byla zajištěna co nejvyšší koncentrace RNA ve vysoké kvalitě, umožňující citlivou detekci viru.

2. Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma „Izolace celkové RNA pro PCR detekci rostlinných virů“.
- Zvládnutí metod izolace celkové RNA a kvantitativní RT-PCR.
- Izolace celkové RNA z listů mandloně obecné (*Prunus dulcis*) pomocí komerčních kitů, porovnání výtěžnosti a kvality získané RNA.

3. Seznam použitých zkratek a symbolů

ANOVA - analysis of variance

bp - pár bází

CTAB - cetyltrimethylamonium bromid

DAS-ELISA - double antibody sandwich ELISA

DEPC - diethylpyrokarbonát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dsDNA - jednovláknová deoxyribonukleová kyselina

dsRNA - jednovláknová ribonukleová kyselina

DTT - dithiothreitol

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

HSD - honestly significant difference test

LAMP - izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou

PT- pokojová teplota

PCR - polymerázová řetězová reakce

PEG - polyethylenglykol

PVP - polyvinylpyrrolidon

qPCR - kvantitativní real-time PCR

RNA - ribonukleová kyselina

RNáza - ribonukleáza

rRNA - ribozomální RNA

RT-PCR - polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

SDS - dodecylsulfát sodný

ssDNA - dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

ssRNA - dvouvláknová ribonukleová kyselina

TAE - pufr (tris-acetát-ethylendiamintetraoctová kyselina)

Taq - termostabilní DNA polymeráza

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan

UV - ultrafialové světlo

4. Současný stav řešené problematiky

4.1 Diagnostika rostlinných virů

Diagnostika rostlinných virů je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou podmínky prostředí, symptomy infekce a také druh či kultivar rostliny. Obvykle je používáno více nezávislých metod k potvrzení předpokládané diagnózy, k určení přítomnosti či nepřítomnosti viru způsobujícího onemocnění jsou používány molekulární diagnostické metody, jako například ELISA, RT-PCR, biologické testy atd. Diagnostika umožňuje sledovat, jak dochází k šíření viru v prostoru a čase. Ze správné diagnózy vychází kroky ke kontrole choroby zahrnující likvidaci rostlin a případně jejich produktů, likvidaci vektorů přenášejících virus (aplikace insekticidů), karanténu nebo volbu rezistentního kultivaru. Molekulární diagnostické metody jsou důležité nejen v laboratořích pro diagnostiku rostlinných virů a inspekčních službách, ale i v mnoha výzkumných programech zkoumajících jejich etiologii a epidemiologii (Chilvers, 2012).

Výhodou molekulární diagnostiky je rychlost a možnost detekce a identifikace druhu, případně kmenu daného viru. Sérologie či imunoenzymatické metody jako je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jsou široce užívány v diagnostice rostlinných patogenů, především k identifikaci rostlinných virů (Chilvers, 2012). ELISA je rychlá metoda nabízející možnost průkazu přítomnosti a částečně i kvantifikaci viru v rostlinném pletivu. Vazbu viru se specifickou protilátkou je možno detekovat díky značení protilátky enzymem, který reaguje se substrátem za vzniku barevného, ve vodě rozpustného produktu (Makkouk *et* Kumari, 2006). První takto využitá metoda byla DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) v roce 1977 (Clark *et* Adams, 1977). Další možností v diagnostice rostlinných virů jsou metody založené na nukleových kyselinách, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR), hybridizace nukleových kyselin, kvantitativní real-time PCR (qPCR) a izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP), které mohou zajistit vyšší specifičnost a senzitivitu než imunoenzymatické metody (Chilvers, 2012).

4.2 Polymerázová řetězová reakce v diagnostice rostlinných virů

PCR je metoda exponenciální amplifikace specifických DNA sekvencí *in vitro* syntézou DNA. PCR vyvinul Kary Mullis v roce 1983 (Mullis, 1983). Specifičnost PCR je založena na syntetických oligonukleotidových primerech, které hybridizují na viru specifickou nukleovou kyselinu a definují konce sekvence, která má být amplifikována. PCR nabízí více výhod v porovnání k tradičním metodám diagnostiky, jako jsou například biologické testy

a ELISA. Má vysokou citlivost s teoretickým potenciálem detekce jediné molekuly v komplexní směsi bez užití radioaktivních sond, je rychlá a má široké spektrum aplikací. Citlivost PCR byla demonstrována Saiki a jeho spolupracovníky. S využitím termostabilní Taq polymerázy pro amplifikaci genu pro β -globin ve zředovací řadě normální genomické DNA společně s DNA mutantní buněčné linie s delecí genu pro β -globin v homozygotní konstituci a detekovali molekulu DNA genu pro β -globin přítomnou v jediné kopii v 10 μ g DNA (Saiki *et al.*, 1988). Podobně jako sérologické metody, užší i širší selektivita je možná v závislosti na volbě primerů, je možná detekce jednoho viru nebo více členů skupiny příbuzných virů. Na rozdíl od sérologie, kde je nutné vždy připravit nové specifické protilátky, vývoje primerů s širší či užší specifičností je dosaženo s nižší cenou (Henson *et French*, 1993). Například, Sanchez-Navarro *et al.* (1988) porovnali detekční limit viru nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ringspot virus*) pomocí DAS-ELISA testu, u kterého byl detekční limit v roztoku purifikovaného viru 0,8 až 4 ng/ml, v případě RT-PCR uvádí detekční limit 1,28 pg/ml.

Diagnostická PCR může být provedena přímo na virech obsahujících jednovláknovou (ss) DNA či dvouvláknovou (ds) DNA, zatímco viry obsahující RNA vyžadují krok reverzní transkripce, kdy dojde k vytvoření komplementární cDNA pro PCR amplifikaci (Henson *et French*, 1993). První zprávy o využití RT-PCR pro detekci rostlinných virů a viroidů se objevily na konci 90. let minulého století. Puchta *et Sanger* (1989) použili PCR k sekvenční analýze minimálního množství RNA viroidů. Vunsch *et al.* (1990) detekovali *Bean yellow mosaic virus* v mečíku (*Gladiolus* spp.). RT-PCR se běžně používá pro detekci virů ovocných stromů, například *Citrus yellow vein clearing virus* v citronících (*Citrus limon*) (Zhou *et al.*, 2017), pro detekci virů v druzích a/nebo kultivarech jabloní (*Malus*), hrušní (*Pyrus*), slivoní (*Prunus*) a pyronií (x *Pyronia*) *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple stem grooving virus* a *Apple stem pitting virus* (Menzel *et al.*, 2001), pro detekci virů révy vinné (*Vitis vinifera*) *Arabis mosaic virus*, *Grapevine fanleaf virus*, *Grapevine fleck virus*, *Grapevine leafroll associated virus-1* a *Grapevine leafroll associated virus-3* (Bertolini *et al.*, 2010).

4.3 Izolace nukleových kyselin pro PCR detekci rostlinných virů

Nukleové kyseliny použitelné v diagnostice pomocí PCR je možno izolovat z purifikovaného viru, extraktu z rostlinného pletiva, půdy či virových vektorů. Templát pro PCR nebo RT-PCR je izolovaná celková DNA či RNA z rostliny, dvouvláknová (ds) RNA nebo virově specifická nukleová kyselina (Khan *et Dijkstra*, 2002). Cílem izolace je získání templátu

v dostatečném množství a čistotě. PCR má vysokou citlivost, proto stačí pikogramy templátové nukleové kyseliny (Henson *et* French, 1993). Požadavky pro izolaci nukleových kyselin vhodných pro PCR se liší dle druhu rostliny, kultivaru, typu pletiva a také typu virové nukleové kyseliny (Khan *et* Dijkstra, 2002). Vzhledem k tomu, že většina rostlinných virů jsou RNA viry, budu se dále zabývat jen izolací RNA.

4.4 Izolace celkové RNA

RNA je nestabilní molekula, která je po extrakci z buněk velmi snadno degradována. Je několik typů přirozeně se vyskytující RNA v buňce, zahrnující ribozomální RNA (80 až 90 % buněčné RNA), mediátorovou RNA (2,5 až 5 %) a transferovou RNA (Buckingham *et* Flaws, 2007). RNA z rostlinného pletiva musí být uvolněna a oddělena od buněčných složek. Prvním krokem bývá homogenizace a lýze buněk. Jedna z nejčastěji užívaných metod pro rozrušení buněčné stěny je zmrazení pletiva v tekutém dusíku a rozetření na prášek ve třecí misce (Tan *et* Yiap, 2009). Pletivo je po celou dobu zmrazené, díky čemuž jsou ribonukleázy neaktivní. U odolnějších rostlinných pletiv lze vzorek smíchat s extrakčním pufrem a použít homogenizátor. Přídavek chaotropních látek do extrakčního pufru usnadňuje rozrušení buněčné stěny oslabením křížových vazeb v matrix buněčné stěny, zatímco přídavek detergentů slouží k rozpouštění membrán (Krieg, 1996).

Pro zajištění RNA dobré kvality a zabránění degradaci je nutno během procesu izolace RNA i po izolaci chránit vzorek před účinky ribonukleáz (RNáz). Zdrojem RNáz, které se nacházejí ve vzduchu, na površích, na pokožce i v tělových tekutinách, jsou mikroorganismy. Je nutno pracovat v ochranných rukavicích a pravidelně je měnit, RNázy z povrchu kůže mohou být snadno přeneseny na pipety, mikrozkuřavky či reagentie. Pipetové špičky a mikrozkuřavky by měly být označeny výrobcem jako „RNase-free“. Autoklávování je jedna z možností, jak sterilizovat pipetové špičky, ale nezaručuje, že byly RNázy zcela inaktivovány. Voda zbavená RNáz je komerčně dostupná nebo být připravena pomocí diethylpyrokarbonátu (DEPC). Po izolaci je RNA chráněna skladováním v - 80 °C (Carson *et al.*, 2012) a přídavkem inhibitorů RNáz.

Nejen pro potřeby PCR, ale také pro další metody molekulární biologie je potřeba izolovat čistou RNA vysoké kvality. Bylo publikováno velké množství protokolů a jejich modifikací a jsou dostupné i komerční kity pro izolaci RNA z rostlinných pletiv (Ghawana *et al.*, 2011).

4.5 Fenol-chloroformová metoda izolace RNA

Některá organická rozpouštědla mohou disociovat RNA od proteinu a využitím rozdílu v hydrofobicitě mezi RNA a proteinem je mohou rozdělit mezi dvě fáze. Nejčastěji užívaná látka pro tyto účely je fenol (Krieg, 1996). V roce 1956 Kirby použil fenol pro separování nukleových kyselin od proteinů. Buněčný lyzát je důkladně promíchán s roztokem fenolu nebo fenol-chloroformu, suspenze je centrifugována, čímž je oddělena spodní organická fáze tvořená fenolem a horní vodná fáze s nukleovými kyselinami, na rozhraní těchto fází se nacházejí vysrážené proteiny (Sambrook *et Russel*, 2001). Nukleové kyseliny obsažené v horní vodné fázi jsou v dalším kroku vysráženy pomocí ethanolu nebo isopropanolu nebo vysokou koncentrací solí (Buckingham *et Flaws*, 2007). Pro izolaci RNA se používá směs fenol-chloroformu kalibrovaná na pH 4,5, při tomto pH přechází DNA do organické fáze. Izolace s pomocí fenolu má své výhody i nevýhody. Fenol absorbuje při 260 i 280 nm (Mikkelsen, 2004), což může vést k ovlivnění měření koncentrace RNA na spektrofotometru. Zároveň je fenol hořlavá, žíravá a toxická sloučenina, která inhibuje PCR. Při použití fenolu nedochází zcela k inhibici RNáz (Sambrook *et Russel*, 2001).

4.6 Varianta fenol-chloroformové metody izolace RNA s použitím CTAB

Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) je silný neionogenní detergent, který sráží nukleové kyseliny a kyselé polysacharidy z roztoků s nízkou iontovou silou, přičemž proteiny a neutrální polysacharidy zůstávají za těchto podmínek v roztoku (Sambrook *et Russel*, 2001). V roztoku s vyšší iontovou silou nebude CTAB srážet nukleové kyseliny a bude tvořit komplexy s proteiny. Proto je CTAB vhodný pro purifikace nukleových kyselin z organismů produkujících značné množství polysacharidů, jako jsou některé gram-negativní bakterie a hlavně rostliny (Sambrook *et Russel*, 2001). V dalších krocích metoda využívá organická rozpouštědla a precipitaci ethanolem, nerozpustné částice jsou odstraněny centrifugací, proteiny jsou odstraněny smísením s chloroformem a centrifugací (Sambrook *et Russel*, 2001). Nukleové kyseliny jsou poté vysráženy a dostatečně promyty, aby byly odstraněny kontaminující soli (Tan *et Yiap*, 2009). Izolace s CTAB byla poprvé využita pro izolaci DNA ze semen ječmene (Doyle *et Doyle*, 1987), využívající pufrční systém podle Saghai-Marooof *et al.* (1984).

4.7 Extrakce RNA guanidinthiokyanátem

Guanidin thiokyanát (guanidin isothiokyanát) je silná chaotropní sůl rozpouštějící většinu buněčných složek, uvolňuje RNA a inhibuje ribonukleázy. Použití pro izolaci RNA bylo poprvé použito Ullrichem *et al.* (1977). Široce užívána je metoda podle Chirgwina (Chirgwin *et al.*, 1979): pletiva jsou homogenizována v pufru obsahujícím guanidin thiokyanát, 0,5% sodiumlauroyl sarkozin a β -merkptoethanol. Výsledný homogenát je navrsten na gradient chloridu cesného a RNA je přes noc centrifugována na sediment. Alternativou centrifugace může být precipitace pomocí ethanolu z lyzačního roztoku a opakovaná reprecipitace po rozpuštění v roztoku guanidin hydrochloridu. Ultracentrifugace je spolehlivá metoda pro získání RNA vysoké kvality pro libovolné účely, avšak je časově náročná a počet vzorků je limitován kapacitou centrifugy (Macfarlane *et* Dahle, 1998). Guanidin thiokyanátu je použito v guanidin thiokyanát–fenol–chloroformové extrakci, principem je oddělení RNA od DNA po extrakci kyselým roztokem skládajícím se z guanidin thiokyanátu, octanu sodného, fenolu a chloroformu, RNA nacházející se ve vodné fázi je srážena pomocí isopropanolu (Chomczynski *et* Sacchi, 1987).

Guanidin thiokyanát je součástí běžně používaného komerčně dostupného TRIzol reagent (Invitrogen). Původně byl vyvinut pro živočišné tkáně, obzvláště ty bohaté na RNázy, ale je použitelný i pro rostlinná pletiva (Ding *et al.*, 2007). TRIzol slouží k simultánní izolaci RNA, DNA i proteinů z biologických vzorků. Hlavními složkami je fenol a guanidin isothiokyanát, TRIzol je používán pro izolace z lidských, živočišných, rostlinných, kvasinkových nebo bakteriálních buněk (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>, navštíveno 30. 4. 2017).

4.8 Adsorbce RNA na oxid křemičitý v roztoku chaotropní soli

V přítomnosti vyšších koncentrací chaotropního činidla guanidin thiokyanátu se nukleové kyseliny váží na oxid křemičitý ve formě skleněných nebo silikátových částic (Boom, 1989). Metoda je užívána ve značném množství komerčně dostupných kitů pro izolaci nukleových kyselin. Oxid křemičitý je používán jako částice v suspenzi nebo je přítomen v kolonce. Během procesu izolace se nukleová kyselina přichytí na oxid křemičitý, zbytek roztoku je odstraněn centrifugací (Boom, 1989). K eluci nukleových kyselin z částic dochází roztokem, v němž nejsou přítomny chaotropní soli.

4.9 Komerční kity pro izolaci RNA

Pro izolaci RNA jsou vyráběny komerční kity různými biotechnologickými firmami po celém světě, mezi nejvýznamnější patří například Macherey-Nagel a Qiagen s ústředím společnosti v Německu, GeneAll Biotechnology s ústředím v Jižní Koreji, Norgen Biotek corp. s ústředím v Kanadě a další. Kit je souprava obsahující roztoky, zkumavky a kolonky pro přímé použití. Principem izolace RNA v kitech je adsorpce na fritu s oxidem křemičitým. Komerční kity nemusí být vhodné pro rostliny s vysokým obsahem polyfenolických sloučenin a polysacharidů a také mohou být relativně drahé (Li *et al.*, 2008), ale pracovní postup je většinou rychlý a vhodný pro rutinní izolace.

Jako příklad RNA izolačního kitu lze uvést RNeasy Plant Mini kit od firmy Qiagen, který poskytuje kolonky QIAshredder pro homogenizaci a filtraci rostlinných lyzátů mikrocentrifugací v kombinaci s RNeasy Mini spin kolonkami pro RNA purifikaci. RNeasy technologie kombinuje lýzi buněk s guanidinium isothiocyanátem a purifikaci na kolonkách se silikátovými membránami. Reziduální zbytky DNA mohou být odstraněny DNázou během izolačního procesu. (<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/total-rna/rneasy-plant-mini-kit/#orderinginformation>, navštíveno 30. 4. 2017).

4.10 Modifikace protokolů k izolaci RNA

Obecným problémem při izolacích RNA pro PCR detekci rostlinných virů jsou inhibitory PCR, obsažené ve formě fenolických sloučenin v rostlinách i jako součást reagentů užívaných k izolacím (organická rozpouštědla a fenol). Mackenzie *et al.* (1997) vylepšili RNA extrakci z dřevin pro RT-PCR detekci virových patogenů. Změna spočívá v modifikaci lyzačního pufru výrobce komerčního kitu, do kterého byl přidán polyvinylpyrrolidon (PVP) a pH upraveno na 5,0 pomocí 0,2 mol/l octanu sodného. Komerčně dostupný RNA izolační kit (RNeasy mini kit, Qiagen) s výše uvedenou modifikací byl použit pro detekci různých virů v hostitelských rostlinách jabloní (r. *Malus*), slivoní (r. *Prunus*), hrušní (r. *Pyrus*) a révy vinné (*Vitis vinifera*). Metoda byla úspěšně použita pro detekci pomocí RT-PCR například pro *Apple stem grooving virus*, *Apple stem pitting virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* v jejich hostitelích, přičemž metoda vykazovala stejnou efektivitu při extrakci virové RNA jak z listů, tak květů. Komerční kit je snadno dostupný, vylepšená izolace zmírňuje účinky inhibitorů PCR, je jednoduchá a rychlá.

Fenol-chloroformová metoda je sice účinná, ale vyžaduje zacházení s toxickými látkami. Fenol je žíravá, toxická a zdraví škodlivá sloučenina (Anonymous, 2013), chloroform je dráždivý a zdraví škodlivý (Anonymous, 2012a). Kundu *et al.* (2003) vytvořili protokol pro izolaci RNA bez použití fenol-chloroformu, ve které následně detekovali *Apple stem pitting virus* a *Apple stem grooving virus* ve dřevinách. Listy se symptomy přítomnosti viru byly homogenizovány s DEPC-ošetřenou vodou, tyto homogenáty byly centrifugovány a supernatanty byly přemístěny do čistých zkumavek a rozředěny buď v Tris-KCl-MgCl₂-DTT pufru (50 mmol/l Tris-HCl pH 8.3, 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂ and 10 mmol/l DTT) nebo v 1% Triton X-100 připraveném v DEPC ošetřené vodě. Mikrozkušavky s homogenátem byly vloženy do ledu na pět minut a poté byl homogenát použit pro RT-PCR. Supernatanty pocházející z jabloně domácí (*Malus domestica*) byly ředěny 10⁻², supernatanty z tabáku (*Nicotiana occidentalis*) a merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*) byly ředěny 10⁻¹ až 10⁻⁸. Tento protokol byl porovnán s klasickou fenol-chloroformovou metodou. Virus byl detekován pomocí RT-PCR u RNA z obou izolačních protokolů, avšak modifikovaný protokol se projevil jako jednodušší a vhodný pro rutinní detekci viru. Protokol nevyžaduje další krok RNA purifikace pro použití v RT-PCR, není nutné zacházení s fenolem a chloroformem, oproti fenol-chloroformové metodě vykazuje vysokou účinnost detekce a umožňuje detekci viru v nízké koncentraci.

Komerční izolační kity jsou pro izolaci RNA účinné a oblíbené, avšak mohou být poměrně drahé. Zacharzewska *et al.* (2014) vytvořili adaptaci protokolu silica capture jakožto alternativu ke komerčním izolačním kitům, kterou využili pro PCR detekci *Potato virus Y*. Suspenze silikátových částic byla připravena dle Booma (Boom *et al.*, 1990) a izolace provedena podle Malinowski (1997). Metoda kombinuje denaturační vlastnosti guanidin thiokyanátu, který zároveň inhibuje RNázy (Chomczynski *et Sacchi*, 1987) a schopnost silikátových částic vázat nukleové kyseliny v přítomnost chaotropních solí (Marko *et al.*, 1982). V porovnání s komerčními izolačními kity byla RT-PCR provedená na RNA izolované touto metodou stejně citlivá nebo citlivější než RNA izolovaná pomocí komerčně dostupných kitů a cena za izolaci byla nižší.

Diagnostický problém přítomnosti sekundárních metabolitů rostlin a kontaminaci mezi vzorky řešili Li *et al.* (2008). Jejich postup kombinuje modifikovaný CTAB protokol se semi-automatických homogenizátorem (FastPrepR instrument). Využití homogenizátoru místo drcení v tekutém dusíku pomocí třecí misky s tloučkem by mělo omezit kontaminaci mezi vzorky. Rostlinné pletivo bylo smíseno s CTAB pufrem (2% CTAB, 2% PVP-40, 100 mmol/l

Tris – HCl, pH 8,0, 1,4 mol/l NaCl, 20 mmol/l EDTA, 0,2% 2-merkaptoetanol) a ponecháno při -20 °C 5 až 15 minut, dokud nebyl homogenát částečně zmrazen. Poté byly vzorky homogenizovány pomocí FastPrepR Instrument (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY, USA). Homogenát byl centrifugován pět minut, supernatant byl smísen se směsí chloroformu/isoamylalkoholu (24:1). Směs byla centrifugována deset minut, supernatant byl smísen s isopropanolem a směs byla opět centrifugována 10 minut. Pelet byl promyt 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn ve 20 mmol/l Tris HCl, pH 8,0. Extrakty připravené pomocí modifikované CTAB izolace a RNeasy kitem byly porovnány pomocí RT-PCT v detekci virových patogenů. Byla porovnána úspěšnost detekce 28 druhů virů v různých hostitelích. 27 druhů virů bylo identifikováno v RNA získanou RNeasy izolačním kitem, tak i modifikovanou CTAB izolací. Pouze *Blackcurrant reversion virus* byl detekován pomocí modifikované CTAB izolace, RNA izolovaná komerčním RNeasy kitem pro detekci viru nestačila.

Sekundární metabolity rostlin interferují s izolací RNA hlavně u postupů užívajících guanidinové soli, tato interference byla pozorována obzvláště u léčivých rostlin jako je reveň (*Rheum australe*) a arnébie (*Arnebia euchroma*). Ghawana *et al.* (2011) vyřešili tuto interferenci využitím principu fenolové metody bez guanidinových solí, fenol byl zvolen jako silný denaturant proteinů a společně s SDS a EDTA jako inhibitor RNáz. pH bylo udržováno na kyselých hodnotách, aby umožnilo dostatečné rozdělení RNA do vodné fáze a ponechání DNA ve fenolické fázi. Tento protokol tvoří prostředí, ve kterém nedochází k oxidaci fenolických sloučenin a vede k jejich odstranění z extrakčního média. Rostlinné pletivo bylo homogenizováno v tekutém dusíku a během homogenizace k němu byl přidáván roztok I (fenol saturovaný Tris/HCl pufrém na pH 6,7 a smísený s dodecylsíránem sodným o koncentraci 0,1%, octanem sodným a ethylendiamintetraoctovou kyselinou 0,01 mol/l o pH 8,0). Poté byla přidána DEPC-ošetřená voda a byla třením smísená s homogenátem. Homogenát byl ponechán pět minut při pokojové teplotě, poté centrifugován. Supernatant byl smísen s isopropanolem, zvortexován, ponechán 10 minut při pokojové teplotě a poté centrifugován. RNA pelet byl promyt 70% etanolem, vysušen a rozpuštěn v DEPC ošetřené vodě. Protokol byl úspěšně použit při izolaci celkové RNA u devatenácti druhů rostlin a izolovanou RNA byla vhodná pro další aplikace včetně RT-PCR.

4.11 Izolace RNA a odstranění inhibitorů PCR

Rutinní diagnostika vyžaduje získání nukleové kyseliny vysoké kvality bez inhibitorů PCR. Přítomnost či nepřítomnost inhibitorů PCR lze určit provedením PCR s extraktem z neinfikovaného pletiva. Výskyt PCR inhibitorů byl prokázán v listech banánovníku (r. *Musa*), kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*) a paprik (*Capsicum* spp.), v listech a semenech podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) a fazole (*Phaseolus* spp.), v bulvách řepy (*Beta vulgaris*), v hlízách mečíku (*Gladiolus* spp.) a brambor (*Solanum tuberosum*) (Rowhani *et al.*, 1993, De Blas *et al.* 1994, Saiz *et al.*, 1994, Thomson *et Dietzgen*, 1995, Singh *et Singh*, 1996, Hoffmann *et al.*, 1997).

Obzvláště důležité je během izolace RNA odstranit inhibitory PCR v případě révy vinné (*Vitis vinifera*) (Brandt *et al.*, 1995) a ovocných stromů jako jsou jabloně (r. *Malus*), slivoně (r. *Prunus*) a hrušně (r. *Pyrus*) (Korachineck *et al.*, 1991). Většina standardních metod pro extrakci nukleových kyselin neodstraňuje kontaminující rostlinné polysacharidy nebo fenolické sloučeniny, které mají inhibiční efekt během následné PCR (Henson *et French*, 1993). Fenolické sloučeniny jsou oxidovány a tvoří quinony, které se vážou k RNA a překáží během RNA izolace či následujících aplikací. Sekundární metabolity precipitují s RNA a ovlivňují výtěžek, kvalitu a interferují s dalšími aplikacemi (Bugos *et al.*, 1995, Ghawana *et al.*, 2011).

Pokusy o překonání tohoto omezení zahrnují vývoj komplikovanějších extrakčních metod, které využívají polyvinylpyrrolidon (PVP) nebo kation-výměnné pryskyřice sloužící k chelataci polyfenolických sloučenin. Využití specializovaných polymerových matic, které ireversibilně adsorbují sloučeniny s inhibičním efektem, společně s polyethylenglykolovou (PEG) precipitací nukleových kyselin jako alternativou k ethanolové precipitaci nukleových kyselin, bylo popsáno při izolaci RNA pro RT-PCR detekci *Prune dwarf ilarvirus* v peckovinách (Parakh *et al.*, 1995). Modifikovaná RT-PCR technika, při níž je virová RNA izolovaná přímo z virových částic navázaných na protilátku, byla také popsána jako metoda pro zmírnění efektu PCR inhibitorů (Minafra *et al.*, 1994). Přídavek kyseliny citronové v extrakčním pufru zabraňuje tmavnutí extraktu z brambor a neutralizuje kyselinu chlorogenovou, hlavní složku fenolických sloučenin (Singh *et al.*, 1998).

4.12 Hodnocení kvality izolované RNA

Ke zhodnocení kvantity a čistoty extrahované RNA se nutno získat hodnoty absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Měření při 260 nm umožňuje výpočet koncentrace RNA obsažené ve vzorku. Naměřená absorbance rovna 1 odpovídá přibližně 40 µg/ml ss RNA. Poměr absorbancí 260/280 nm a umožňuje odhad míry čistoty RNA. Čistý vzorek RNA by měl mít poměr absorbancí naměřených vlnových délek při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) mezi 1,8 a 2,0. Pokud je zde přítomna kontaminace proteiny či fenolem, hodnota A_{260}/A_{280} bude nižší, je tak omezena přesná kvantifikace RNA (Chomczynski *et Sacchi*, 2006).

4.13 Kvantitativní real-time RT-PCR

Kvantitativní real-time PCR je spolehlivá metoda pro detekci a stanovení množství produktů generovaných v každém cyklu PCR, které jsou přímo úměrné množství templátu na začátku PCR (Arya *et al.*, 2005). Holland *et al.* (1991) demonstrovali exonukleázovou aktivitu ve směru 5'→3' DNA polymerázy (Taq polymeráza), termostabilního enzymu získaného z *Thermus aquaticus*. Taktéž poukázali, že odštěpení sondy během PCR 5' exonukleázovou aktivitou může být použito k detekci amplifikace specifických produktů. Navrhli oligonukleotidovou značenou sondu, která během PCR hybridizovala s cílovou sekvencí. Sonda byla značena radioaktivním izotopem fosforu ³²P na 5' konci a zároveň bylo znemožněno prodlužování sondy na 3' konci, aby nemohla fungovat jako primer. Sonda nahybridizovaná na vlákno produktu PCR byla degradována během amplifikace ve směru 5'→3' 5'exonukleázovou aktivitou Taq DNA polymerázy. Sonda byla degradována na fragmenty pouze tehdy, když byla cílová sekvence amplifikována. Po proběhnutí PCR byla zjištěno množství rozštěpené sondy chromatografií na tenké vrstvě.

Dvojitě značené oligonukleotidové sondy nevyžadují zpracování po proběhnutí PCR (Lee *et al.*, 1993), produkce ampliconů je monitorována v jejím průběhu. U těchto sond je reportérem fluorescenční značení na 5' konci a zhášec fluorescenčního značení na 3' konci. Dokud je sonda intaktní, blízkost zhášeče značně snižuje fluorescenci emitovanou fluorescenčním značením. Fluorescenční signál je emitován pouze po rozštěpení sondy, založené na principu fluorescenčního rezonančního přenosu energie (Zamecnick *et al.*, 1988). Je vyvinuto více reportérových systémů, například SYBR Green, TaqMan sondy, Scorpion sondy, a další. Fluorescenční barvivo SYBR Green se váže na dvouvláknovou DNA interkalací a po excitaci zdrojem záření emituje fluorescenci přibližně 1000x silnější než v nenavázané formě. Po každé denaturaci jsou molekuly SYBR Green uvolněny a opět interkalovány, když je nasyntetizován nový řetězec DNA. TaqMan sonda je citlivější a

eliminuje formování nespecifických produktů, avšak vyžaduje specifickou oligonukleotidovou sekvenci pro každý gen, který má být kvantifikován. Fluorescenční barvivo SYBR Green má nevýhodu ve vazbě na dimery primerů a další nespecifické produkty, ale je levnější a použitelné pro kterýkoliv DNA templát (Carson, 2012). Ať už je použit kterýkoliv z dostupných reportérů, pro sledování emise fluorescence během PCR je nutný modifikovaný termocykler (Arya *et al.*, 2005).

V experimentech zahrnujících kvantitativní real-time PCR se vyskytují chyby kvůli rozdílům ve kvalitě RNA nebo v rozdílu účinnosti cDNA syntézy a PCR amplifikace. Pro minimalizaci těchto chyb se užívá interní kontrola s buněčnou RNA, která je amplifikována zároveň s cílovou molekulou. Nejčastěji užívané geny sloužící jako interní kontrola jsou house-keeping geny, jako je β -aktin, cytoskeletární proteiny, glykolytické enzymy a ribozomální RNA (rRNA). V buňce by mělo docházet k expresi těchto genů na přibližně stejné úrovni ve všech fázích vývoje organismu (Arya *et al.*, 2005). Kvantitativní RT-PCR je citlivá metoda kombinující reverzní transkripci a real-time PCR amplifikaci, její častou aplikací je použití v analýze genové exprese (Arya *et al.*, 2005). V rostlinné virologii je často užívaná, například Veetil *et al.* (2016) detekovali *Strawberry necrotic shock virus* v jahodníku obecném (*Fragaria vesca*) pomocí kvantitativní RT-PCR, Harper *et al.* (2010) využil kvantitativní RT-PCR pro detekci *Tomato black ring virus* v merlíku čilském (*Chenopodium quinoa*).

5. Materiál a metody

5.1 Biologický materiál

Listy mandloně obecné (*Prunus dulcis*), odběr 28. 7. 2015 v Horních Věstonicích.

5.2 Použité chemikálie

Agarose I (Ambresco, katalogové číslo: 9012-36-6)

DNA Gel Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo: R0611)

Deionizovaná voda

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, katalogové číslo: SM0241)

GoodView Nucleid Acid Stain (SBS Genetech, katalogové číslo: HGV2)

MyTaq One-Step RT-PCR Kit (Bioline, katalogové číslo: BIO-65049)

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo: S7563)

β -merkптоethanol (SERVA, katalogové číslo: 28625.02)

70% ethanol (Lach-Ner, katalogové číslo: 20025-A96-M1000-1)

99,8% ethanol (Lach-Ner, katalogové číslo: 20025-U99-M1000-1)

5.3 Použité izolační kity

GeneAll Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology, katalogové číslo: 307-150)

GeneAll Ribospin Seed/Fruit (GeneAll Biotechnology, katalogové číslo 317-150)

NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel, katalogové číslo: 740955.10)

RNeasy plant mini kit (Qiagen, katalogové číslo: 74904)

Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, katalogové číslo: 25800)

5.4 Použité roztoky a jejich složení

5x TAE pufr (pH 8; 1000 ml, Tris - 24,2 g, ledová kyselina octová - 5,71 g, 0,5 mol/l EDTA - 10 ml), dále naředěno na 1x TAE pufr

5.5 Použité přístroje

Analytické váhy 440-33 N (Kern)

Termoblok DRI-BLOCK® DB-20 (Techne)

Centrifuga Biofuge pico (Heraus)

Vortex TTS 2 Yellowline (Maneko)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)

Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)

Mikrovlnná trouba (DAEWOO)

Minicentrifuga SpectrafugeTM 16M (Labnet)

NanoDrop 1000 Spectrofotometer (Thermo Fisher Scientific)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Přístroj na výrobu ledu Icematic F100, Compact Ice flakem (Gemini BV)

Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)

UV transluminátor G:Box, dokumentační systém GeneSnap (Syngene)

Software RotorGene R6 - 3000A (Corbett Research)

Termocyklér RotorGene R6 - 3000A (Corbett Research)

5.6 Izolace celkové RNA

Izolace celkové RNA pomocí kitu GeneAll Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology):

10 mg segment lyofilizovaného listu byl homogenizován ve 2 ml mikrozkuhavce s přidavkem 350 µl pufru RPL v homogenizátoru a poté 3 minuty inkubován při pokojové teplotě (PT). Mikrozkuhavka s lyzátem byla centrifugována při 10 000 g (30 sekund, PT). Lyzáte byl přemístěn do mikrozkuhavky s EzPure filtrem, přičemž nebyl poškozen vzniklý pelet na dně mikrozkuhavky. Mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT). Supernatant byl přemístěn do 1,5 ml mikrozkuhavky, bylo k němu napipetováno 350 µl 70% ethanolu a směs byla promísena pipetováním. Tato směs byla přepipetována na mini spin kolonku, centrifugována při 10 000 g (30 s, PT). Po centrifugaci byla odstraněna kapalina, která protékla kolonkou. Na mini spin kolonku bylo napipetováno 500 µl RBW pufru a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT) Po centrifugaci byla odstraněna kapalina, která protékla kolonkou. Na střed mini spin kolonky bylo napipetováno 70 µl reakční směsi DNázy I (pro vytvoření reakční směsi DNázy I byly smíseny 2 µl DNázy I se 70 µl pufru DRB a jemně promíseny převrácením zkuhavky) a mikrozkuhavka byla inkubována 10 minut. Po uplynutí inkubační doby bylo na kolonku napipetováno 500 µl RBW pufru a inkubováno 2 minuty (při PT), poté byla mikrozkuhavka centrifugována při 10 000 g (30 s, PT). Na kolonku bylo napipetováno 500 µl RNW pufru a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT). Na kolonku bylo opět napipetováno 500 µl RNW pufru a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT), prošlá kapalina byla po centrifugaci odstraněna. Mikrozkuhavka byla poté centrifugována ještě 60 sekund při 10 000 g (PT), aby byl odstraněn zbytek RNW pufru. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkuhavky. Na střed kolonky bylo napipetováno 50 µl vody zbavené RNáz a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (60 s, PT). Míra čistoty a koncentrace

izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na NanoDropu 1000 změřením poměru vlnových délek 260/280 a 260/230 nm. Vzorek byl uchováván v -70 °C.

Tento postup byl opakován u další série vzorků s použitím pufru REL místo pufru RPL během postupu izolace. Výrobce uvádí, že ve většině případů je RPL lepší pufr pro lýzi, ale ve vzorcích z některých druhů rostlin po jeho použití může dojít ke ztuhnutí vzorku vlivem přítomnosti endospermu či některých rostlinných metabolitů. Tento problém může být vyřešen použitím pufru REL.

Izolace celkové RNA pomocí kitu GeneAll Ribospin Seed/Fruit (GeneAll Biotechnology), použit protokol I:

10 mg segment lyofilizovaného listu byl homogenizován ve 2 ml mikrozkuhavce s přidavkem 500 µl pufru SL v homogenizátoru a poté 3 minuty inkubován při pokojové teplotě (PT). Mikrozkuhavka s lyzátem byla centrifugována při 10 000 g (60 sekund, PT), 600 µl lyzátu bylo přemístěno do mikrozkuhavky s EzPure filtrem. Mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (60 s, PT), poté bylo přepipetováno 500 µl supernatantu do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky, přičemž nebyl poškozen vzniklý pelet na dně mikrozkuhavky. K těmto 500 µl supernatantu bylo napipetováno 250 µl 99,8% ethanolu a promícháno převrácením zkuhavky. Tato směs byla napipetována na mini spin kolonku a centrifugována při 10 000 g (60 s, PT). Na kolonku bylo napipetováno 500 µl pufru RBW a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na střed mini spin kolonky bylo napipetováno 70 µl reakční směsi DNázy I (pro vytvoření reakční směsi DNázy I byly smíseny 2 µl DNázy I se 70 µl pufru DRB a jemně promíseny převrácením zkuhavky) a směs byla inkubována 10 minut (při PT). Po uplynutí inkubační doby bylo na kolonku napipetováno 500 µl RBW pufru na kolonku a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT), poté byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku napipetováno 500 µl RNW pufru na kolonku a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (30 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Mikrozkuhavka byla poté centrifugována ještě 60 sekund při 10 000 g (PT), aby byl odstraněn zbytek RNW pufru. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkuhavky. Na střed kolonky bylo napipetováno 50 µl vody zbavené RNáz a mikrozkuhavka byla centrifugována při 10 000 g (60 s, PT).

Míra čistoty a koncentrace izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na NanoDropu 1000 změřením poměru vlnových délek 260/280 a 260/230 nm. Vzorek byl uchováván v -70 °C.

Izolace celkové RNA pomocí kitu NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel):

10 mg segment lyofilizovaného listu byl homogenizován ve 2 ml mikrozkuhavce s přídavkem 350 µl pufru RA1 a 3,5 µl β-merkptoethanolu v homogenizátoru. Lyzát byl napipetován na NucleoSpin filtr umístěný v mikrozkuhavce a mikrozkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (60 s, PT). Supernatant byl přepipetován do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky tak, aby nebyl poškozen vzniklý pelet na dně mikrozkuhavky. K supernatantu bylo napipetováno 350 µl 70% ethanolu a roztok byl promísen pipetováním. Roztok byl nanesen na NucleoSpin RNA Plant kolonku umístěnou v mikrozkuhavce, která byla centrifugována při 11 000 g (30 s, PT). Kolonka byla poté přemístěna do čisté 2 ml mikrozkuhavky. Na kolonku bylo napipetováno 350 µl MDB pufru, mikrozkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (60 s, PT). Do středu kolonky bylo napipetováno 95 µl reakční směsi DNázy (pro vytvoření reakční směsi DNázy bylo smíšeno 10 µl DNázy se 100 µl reakčního pufru pro DNázu a jemně promíšeny převrácením zkuhavky), poté byla mikrozkuhavka inkubována 15 minut (při PT). Po uplynutí inkubační doby bylo na kolonku napipetováno 200 µl pufru RAW2, zkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (30 s, PT). Kolonka byla přemístěna do čisté 2 ml mikrozkuhavky. Na kolonku bylo napipetováno 600 µl pufru RA3, mikrozkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (30 s, PT), poté byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo napipetováno 250 µl pufru RA3, mikrozkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (120 s, PT). Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky a bylo na ni napipetováno 50 µl vody zbavené RNáz a mikrozkuhavka byla centrifugována při 11 000 g (60 s, PT). Míra čistoty a koncentrace izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na NanoDropu 1000 změřením poměru vlnových délek 260/280 nm a 260/230. Vzorek byl uchováván v -70 °C.

Tento postup byl opakován u další série vzorků s použitím pufru RAP místo pufru RA1 během postupu izolace. Pufř RA1 obsahuje guanidin thiokyanát, pufř RAP obsahuje guanidinhydrochlorid. Výrobce uvádí, že ve většině případů je RA1 pufř vhodnější pro lýzi díky silnějším detanuračním vlastnostem thiokyanátu, ale některé sekundární metabolity rostlin či hub mohou vést ke ztuhnutí vzorku při použití pufru RA1. Tento problém může být řešen použitím pufru RAP.

Izolace celkové RNA pomocí kitu RNeasy plant mini kit (Qiagen):

10 mg segment lyofilizovaného listu byl homogenizován ve 2 ml mikrozkušavce s přídavkem 450 µl pufru RLT v homogenizátoru a poté inkubován 3 minuty při 56 °C. Lyzát byl napipetován na QIAshredder spin kolonku umístěnou v 2 ml mikrozkušavce, mikrozkušavka byla centrifugována při 11 000 g (120 s, PT). Supernatant byl přemístěn do čisté 1,5 ml mikrozkušavky tak, aby nebyl poškozen pelet vzniklý po centrifugaci. K supernatantu bylo napipetováno 200 µl 99,8% ethanolu a roztok byl promísen pipetováním. Roztok byl napipetován na RNeasy spin kolonku umístěnou ve 2 ml mikrozkušavce, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 8 000 g (15 s, PT), poté byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo napipetováno 700 µl pufru RW1, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 8 000 g (15 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl pufru RPE, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 8 000 g (15 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl pufru RPE, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 8 000 g (120 s, PT). Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na střed kolonky bylo napipetováno 50 µl vody zbavené RNáz a mikrozkušavka byla centrifugována při 8 000 g (60 s, PT). Míra čistoty a koncentrace izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na NanoDropu 1000 změřením poměru vlnových délek 260/280 nm a 260/230. Vzorek byl uchováván v -70 °C.

Tento postup byl opakován u další série vzorků s použitím pufru RLC místo pufru RLT během postupu izolace. Pufr RTL obsahuje guanidin thiokyanát, pufr RLC obsahuje guanidinhydrochlorid. Výrobce uvádí, že ve většině případů je RLT pufr vhodnější pro lýzi díky silnějším detanuračním vlastnostem thiokyanátu, ale některé sekundární metabolity rostlin či hub mohou vést ke ztuhnutí vzorku při použití pufru RLT. Tento problém může být řešen použitím pufru RLC.

Izolace celkové RNA pomocí kitu Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek corp.):

V době provedení izolací nebyl k dispozici Plant/Fungi Total RNA purification kit (Norgen Biotek corp.), proto byly vzorky izolované touto soupravou poskytnuté do experimentu Mgr. Danou Šafářovou, Ph.D. Pro přehlednost je uveden použitý postup izolace RNA preferující malé RNA.

10 mg segment lyofilizovaného listu byl homogenizován ve 2 ml mikrozkušavce s přídavkem 600 µl pufru lyzačního pufru C v homogenizátoru a poté inkubován 5 minut při 55 °C. Během inkubace byl lyzát dvakrát promíchán převrácením mikrozkušavky. Lyzát byl přemístěn do mikrozkušavky na Filter kolonku a centrifugován při 20 000 g (120 s, PT). Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky tak, aby nebyl poškozen vzniklý pelet na dně zkumavky. K supernatantu bylo napipetováno 600 µl 99,8% ethanolu, roztok byl promíchán pomocí vortexu. 600 µl roztoku bylo přepipetováno do mikrozkušavky se Spin kolonkou, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 3 500 g (60 s, PT). Byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo napipetováno 400 µl promývacího roztoku A, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 20 000 g (60 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo opět napipetováno 400 µl promývacího roztoku A, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 20 000 g (60 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonku bylo potřetí napipetováno 400 µl promývacího roztoku A, mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 20 000 g (60 s, PT), byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována ještě jednou při 20 000 g (120 s, PT), aby byla kolonka dostatečně vysušena. Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, na kolonku bylo nanášeno 50 µl elučního roztoku A. Mikrozkušavka s kolonkou byla centrifugována při 200 g (120 s, PT) a poté ještě při 20 000 g (120 s, PT). Míra čistoty a koncentrace izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na NanoDropu 1000 změřením poměru vlnových délek 260/280 nm a 260/230. Vzorek byl uchováván v -70 °C.

Všechny izolace RNA byly minimálně třikrát opakovány s každým izolačním kitem. Kity nabízejí obvykle různý objem vody zbavené RNáz k eluci z kolonky (30 až 60 µl), v praktické části byly všechny izolace eluovány z kolonky s objemem 50 µl.

5.7 Statistické hodnocení výsledků

Dixonův test

U souboru dat z izolací RNA pomocí jednotlivých kitů a souboru dat komparativní koncentrace získané pomocí qRT-PCR bylo provedeno statistické hodnocení pro vyloučení extrémních hodnot. Dixonův test slouží k vyloučení extrémních hodnot u souboru dat s neznámým rozdělením, je vhodný pro soubory dat s malým počtem hodnot (Ellison *et al.*, 2009). Dixonův test byl proveden na webové stránce <http://contchart.com/outliers.aspx>.

Pokud Dixonův test vyloučil hodnotu a v souboru hodnot tímto krokem zůstaly jen dvě hodnoty, pak byl z těchto dvou hodnot vypočítán průměr pro získání třetí hodnoty.

ANOVA - Tukey test

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí software ANOVA Tukey testem. Pokud analýza odchylky (ANOVA – analysis of variance) poukáže na významný rozdíl, indikuje to, že alespoň jedna ze zkoumaných hodnot se liší od ostatních hodnot. ANOVA nedokáže informovat o rozdílu mezi jednotlivými skupinami, proto je provázena specifickým porovnáním dvou hodnot - Tukey testem (honestly significant difference test). Tukey test porovnává zkoumanou hodnotu se všemi ostatními zkoumanými hodnotami, což je aplikováno na celý set porovnání páru hodnot, a identifikuje jakýkoliv rozdíl mezi párem, který je větší než očekávaná standartní chyba (Salkind, 2010). P hodnota nižší než 0,01 udává, že pár zkoumaných hodnot je statisticky odlišný. Tukey test byl proveden na webové stránce http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/.

5.8 Kvantitativní RT-PCR

Pro qRT-PCR byly zvoleny primery PRU18S F1/R1 určené pro amplifikaci ribozomální RNA podjednotky 18S. Po provedení PCR reakce a elektroforetické separace by měly být přítomny amplikony o velikosti 200 párů bází. Reakční směs pro qRT-PCR byla připravena podle rozpisu uvedeného v tabulce 1. Reakční směs byla rozpipetována po 18 μ l do 0,2 ml PCR mikrozkušavek, poté byly přidány 2 μ l vzorku nebo voda v případě blanku. Byla napipetována kalibrační řada ve složení neřaděný vzorek, řaděný vzorek 10x, 100x, 1000x, 10000x ze vzorku celkové izolované RNA o koncentraci 42,14 ng/ μ l, izolován kitem NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel). qRT-PCR probíhala za podmínek uvedených v tabulce 2. Hodnoty relativní koncentrace z qRT-PCR byly vyhodnoceny programem Software RotorGene 6 - 3000A (Corbett Research), byl zvolen kalibrátor ze vzorků izolované celkové RNA (o koncentraci 42,14 ng/ μ l, izolován kitem NucleoSpin RNA Plant firmy Macherey-Nagel). Byla sestavena kalibrační křivka pro kontrolu přesnosti pipetování z připravené koncentrační řady. Po proběhnutí PCR reakce byla zkontrolována specifita produktu analýzou T_m produktu, průměr a směrodatná odchylka T_m produktu byla spočítána v programu Microsoft Office Excel 2007.

Tabulka 1: Složení qRT-PCR reakční směsi pro amplifikaci 18S rRNA

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem na 1 test
My Taq One-Step mix 2x	2 x	1 x	10 µl
Deionizovaná voda			6,25 µl
Forward primer	20 pmol/µl	0,1 pmol/µl	0,1 µl
Reverse primer	20 pmol/µl	0,1 pmol/µl	0,1 µl
Inhibitor RNáz	40 U/µl	20 U/reakce	0,5 µl
RT polymeráza	10 U/µl	2,5 U/reakce	0,25 µl
SYBR Green	0,1%	0,004%	0,8 µl

Tabulka 2: Podmínky qRT-PCR pro amplifikaci 18S rRNA

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	45°C	20 min	1
Aktivace polymerázy	95°C	60 s	1
Denaturace	95°C	15 s	40
Hybridizace	60°C	15 s	
Elongace	72°C	30 s	

5.9 Elektroforetická separace produktů qRT-PCR

Detekce produktů qRT-PCR byla provedena elektroforetickou separací v 1,5% agarosovém gelu v prostředí TAE pufru. Na 1 gel bylo použito 0,75 g agarosy a 50 ml 1x TAE pufru, po rozvaření byly do gelu přidány 2 µl fluorescenčního barviva GoodView (SBS Genetech), gel byl nalit do elektroforetické vaničky s přidávanými hřebínky pro vytvoření jamek a byl ponechán ke ztuhnutí 40 minut. Po 40 minutách byl do elektroforetické vaničky po rysku nalit 1x TAE pufr a hřebínky byly odstraněny. Do první jamky byl napipetován standard molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp (Fermentas), do dalších jamek bylo nanášeno 5 µl vzorku smíšeného s 3 µl nanášecího pufru. Elektroforetická komůrka byla napojena na zdroj stejnosměrného napětí, separace produktů probíhala při 80 V po dobu 40 minut. Produkty qRT-PCR byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru s použitím programu GeneSnap (Syngene).

6. Výsledky

6.1 Izolace celkové RNA

Byla izolována celková RNA z listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*) izolačními kity: GeneAll Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology) s použitím dvou různých pufrů (REL a RPL), GeneAll Ribospin Seed/Fruit (GeneAll Biotechnology), NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel) s použitím dvou různých pufrů (RAP a RA1), RNeasy plant mini kit (Qiagen) s použitím dvou různých pufrů (RLC a RLT) a Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen). Koncentrace RNA byla změřena pomocí NanoDrop 1000 spektrofotometru (viz tabulka 3). S hodnotami koncentrace RNA u jednotlivých izolačních kitů byl proveden Dixonův test pro vyloučení extrémních hodnot. Na základě Dixonova testu byly vyloučeny vzorky s hodnotami 7,18 ng/μl (NucleoSpin RNA plant, pufr RAP) a 50,19 ng/μl (RNeasy plant mini kit, pufr RLT), v počítání průměru a další části pokusu se s nimi nepracovalo. Nejvyšší průměrná koncentrace RNA byla stanovena u vzorků izolovaných kitem Plant/Fungi Total RNA Purification Kit od firmy Norgen (průměrná koncentrace RNA 69,6 ng/μl), dále byly naměřeny vysoké hodnoty koncentrace RNA vzorků izolovaných kity GeneAll Ribospin Plant s použitím REL pufru (průměrná koncentrace RNA 42,63 ng/μl) a NucleoSpin RNA plant (průměrná koncentrace RNA 33,53 ng/μl). Nejnižší průměrná koncentrace RNA byla stanovena u vzorků izolovaných kitem GeneAll Ribospin Seed/Fruit (průměrná koncentrace RNA 4,4 ng/μl).

Tabulka 3: Koncentrace a míra čistoty izolované RNA změřená na NanoDrop 1000 spektrofotometru

Použitý izolační kit	Poměr absorbancí (260/280)	Poměr absorbancí (260/230)	Koncentrace RNA [ng/μl]	Množství RNA v 50 μl [ng]	Průměrná koncentrace RNA [ng/μl]
GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr)	2,15	1,15	12,58	629	13,04
	1,87	0,26	11,6	580	
	2,06	1,06	14,94	747,5	
GeneAll Ribospin Plant (REL pufr)	2,09	1,80	36,32	1816	42,64
	2,12	1,90	46,79	2339,5	
	2,10	1,70	44,8	2240	

Použitý izolační kit	Poměr absorbancí (260/280)	Poměr absorbancí (260/230)	Koncentrace RNA [ng/μl]	Množství RNA v 50 μl [ng]	Průměrná koncentrace RNA [ng/μl]
GeneAll Ribospin Seed/Fruit	1,60	0,28	3,52	176	4,4
	1,56	0,67	5,15	257,5	
	1,44	0,67	4,52	226	
NucleoSpin RNA plant (pufr RA1)	2,00	0,82	42,14	2107	33,53
	1,83	0,37	36,31	1815,5	
	1,73	0,09	26,8	1340	
	1,92	1,10	28,86	1443	
NucleoSpin RNA plant (pufr RAP)	2,01	0,1	7,18*	359*	13,52
	1,99	0,38	13,49	674,5	
	0,49	0,24	13,56	678	
RNeasy plant mini kit (pufr RLT)	2,05	0,94	50,19*	2509,5*	16,75
	1,94	0,13	23,86	1193	
	1,83	0,06	24,42	1221	
	1,61	0,52	14,62	731	
	1,69	0,46	14,3	715	
	1,63	0,37	6,53	326,5	
RNeasy plant mini kit (pufr RLC)	1,48	0,44	9,26	463	13,31
	1,95	0,84	18,56	928	
	1,89	0,61	24,56	1228	
	1,40	0,45	8,75	437,5	
	1,20	0,41	5,41	270,5	
Plant/Fungi Total RNA Purification Kit	2,03	0,91	69,6	3480	69,6
	2,03	0,91	69,6	3480	
	2,03	0,91	69,6	3480	

* vyřazená hodnota

Na základě výtěžnosti izolace RNA bylo možno izolační kity rozdělit do dvou skupin. V I. skupině jsou kity s nižší výtěžností izolace RNA, rozptýl stanovené průměrné koncentrace RNA je 4,4 až 16,75 ng/μl, patří zde kity GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr), GeneAll Ribospin Seed/Fruit, NucleoSpin RNA plant (RAP pufr), RNeasy mini kit (RLT pufr) a RNeasy mini kit (RLC pufr). V II. skupině jsou kity s vyšší výtěžností izolace RNA,

rozptyl stanovené průměrné koncentrace RNA je 33,54 až 69,9 ng/μl, patří zde kity GeneAll Ribospin Plant (REL pufr), Plant/Fungi Total RNA Purification Kit a NucleoSpin RNA plant (RA1 pufr). Mezi I. a II. skupinou izolačních kitů byl zjištěn vysoce statisticky průkazný rozdíl ve výtěžnosti izolace RNA (viz tabulka 4).

Tabulka 4: Porovnání výtěžnosti izolace RNA komerčními kity Tukey testem

Komerční kit	Tukey HSD Q statistika	Tukey HSD p-hodnota	Tukey HSD inference
A ^I vs B ^{II}	8.9036	0.0010053	**
A ^I vs C ^I	2.6002	0.5912666	o
A ^I vs D ^{II}	6.5888	0.0028124	**
A ^I vs E ^I	0.1454	0.8999947	o
A ^I vs F ^I	1.2465	0.8999947	o
A ^I vs G ^I	0.0901	0.8999947	o
A ^I vs H ^{II}	17.0150	0.0010053	**
B ^{II} vs C ^I	11.5037	0.0010053	**
B ^{II} vs D ^{II}	2.9295	0.4642895	o
B ^{II} vs E ^I	8.7582	0.0010053	**
B ^{II} vs F ^I	8.7080	0.0010053	**
B ^{II} vs G ^I	9.8644	0.0010053	**
B ^{II} vs H ^{II}	8.1114	0.0010053	**
C ^I vs D ^{II}	9.3685	0.0010053	**
C ^I vs E ^I	2.7456	0.5356211	o
C ^I vs F ^I	4.1536	0.1148372	o
C ^I vs G ^I	2.9972	0.4372777	o
C ^I vs H ^{II}	19.6151	0.0010053	**
D ^{II} vs E ^I	6.4334	0.0036087	**
D ^{II} vs F ^I	6.1447	0.0057299	**
D ^{II} vs G ^I	7.4036	0.0010053	**
D ^{II} vs H ^{II}	11.6010	0.0010053	**
E ^I vs F ^I	1.0839	0.8999947	o
E ^I vs G ^I	0.0724	0.8999947	o
E ^I vs H ^{II}	16.8696	0.0010053	**

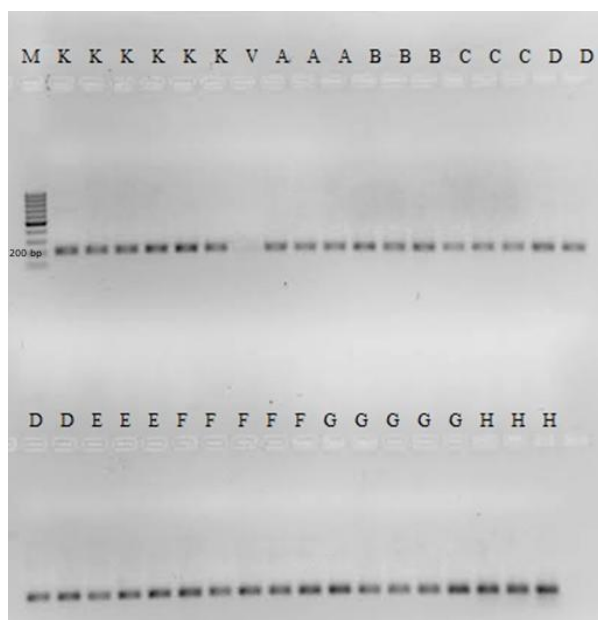
Komerční kit	Tukey HSD Q statistika	Tukey HSD p-hodnota	Tukey HSD inference
F ^I vs H ^{II}	17.7768	0.0010053	**
G ^I vs H ^{II}	18.9332	0.0010053	**

A GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr); **B** GeneAll Ribospin Plant (REL pufr); **C** GeneAll Ribospin Seed/Fruit; **D** NucleoSpin RNA plant (pufr RA1); **E** NucleoSpin RNA plant (pufr RAP); **F** RNeasy mini kit (pufr RLT); **G** RNeasy mini kit (pufr RLC); **H** Plant/Fungi Total RNA Purification Kit, o = stat. neprůkazný rozdíl, ** = vysoce statisticky průkazný rozdíl ($p < 0.01$), I = kit s nižší výtěžností RNA, II = kit s vyšší výtěžností RNA.

6.2 Stanovení 18S rRNA ve vzorcích izolované RNA

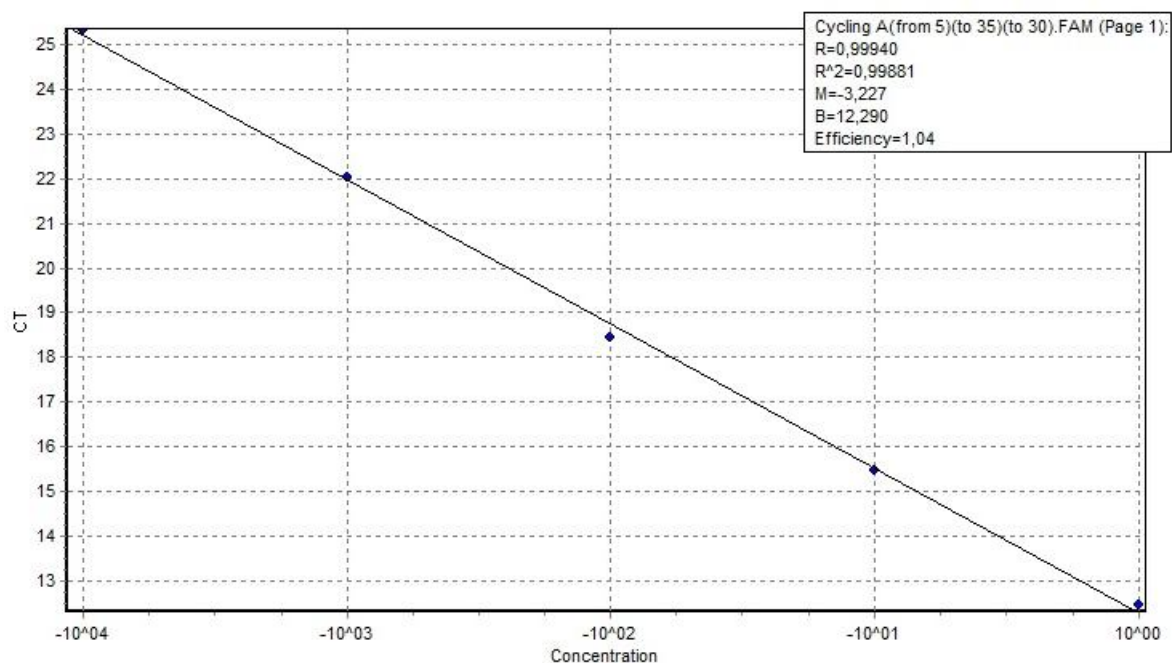
Vhodnost izolované RNA pro qRT-PCR byla ověřena amplifikací 18S rRNA pomocí primerů PRU18S F1/R1. Přítomnosti specifického RT-PCR produktu byla ověřena elektroforézou v 1,5% agarosovém gelu; ampikon o očekávané velikosti 200 párů bází byl přítomen u všech vzorků kromě slepého vzorku, kdy celková RNA byla nahrazena deionizovanou vodou (viz obrázek 1). Kalibrační křivka sestavená z ředící řady kalibrátoru (NucleoSpin RNA plant - pufr RA1; 42,14 ng/μl) dokládá, že pipetování a qRT-PCR proběhly správně (viz graf 1). Koeficient determinace kalibrační křivky má hodnotu 0,99; směrnice má hodnotu - 3,227, což odpovídá efektivitě reakce 104 %.

Obrázek 1: elektroforéza produktů qRT-PCR



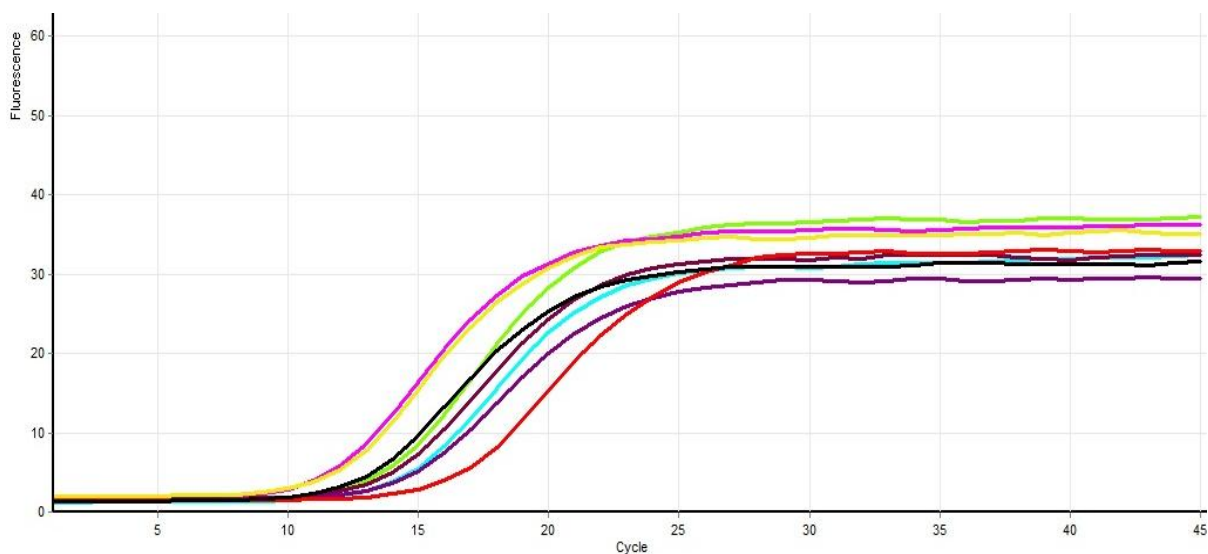
M Marker molekulové hmotnosti 100 bp; **K** Kalibrační řada (v pořadí: neředěný, ředěný 10x, ředěný 100x, ředěný 1000x, ředěný 10000x, ředěný 100000x); **V** Voda; **A** GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr); **B** GeneAll Ribospin Plant (REL pufr); **C** GeneAll Ribospin Seed/Fruit; **D** NucleoSpin RNA plant (pufr RA1); **E** NucleoSpin RNA plant (pufr RAP); **F** RNeasy mini kit (pufr RLT); **G** RNeasy mini kit (pufr RLC); **H** Plant/Fungi Total RNA Purification Kit.

Graf 1: Kalibrační křivka qRT-PCR



Relativní koncentrace byla stanovena modulem 'comparative quantification' analytického softwaru Rotor Gene R6 - 3000A (viz tabulka 5). Jako kalibrátor byl použit vzorek RNA s koncentrací 42,14 ng/ μ l (izolační kit NucleoSpin RNA plant, pufr RA1), který představuje 100% pro výpočet relativní koncentrace. Na základě Dixonova testu byly vyloučeny extrémní hodnoty relativní koncentrace 1,22 (GeneAll Ribospin Plant, pufr RPL); 0,78 (GeneAll Ribospin Seed/Fruit); 1,1 (NucleoSpin RNA plant, pufr RA1); 0,12 (NucleoSpin RNA plant, pufr RAP); 1,22 a 0,83 (RNeasy mini kit, pufr RLT); 0,12 a 0,06 (RNeasy mini kit, pufr RLC), v tabulce 5 jsou označeny hvězdičkou, k počítání průměru a relativního indexu nebyly použity. Vybrané amplifikační křivky vzorků RNA od každého použitého kitu jsou znázorněny na grafu 2; pro přehlednost grafu uvádím vždy jeden vzorek s nejvyšší vstupní koncentrací RNA od každého použitého izolačního kitu.

Graf 2: Vybrané amplifikační křivky vzorků RNA jednotlivých izolačních kitů



Zelená - GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr); **růžová** - GeneAll Ribospin Plant (REL pufr); **modrá** - GeneAll Ribospin Seed/Fruit; **hnědá** - NucleoSpin RNA plant (pufr RA1); **fialová** - NucleoSpin RNA plant (pufr RAP); **červená** - RNeasy mini kit (pufr RLT); **černá** - RNeasy mini kit (pufr RLC); **žlutá** - Plant/Fungi Total RNA Purification Kit.

Hodnoty relativní koncentrace byly použity pro výpočet relativního indexu, tj. relativní množství 18S rRNA kopií v jednom μl vzorku. Vyšší hodnota relativního indexu vyjadřuje preferenci izolace rRNA v rámci celkové RNA. Nejvyšší relativní index byl stanoven u kitu GeneAll Ribospin Seed/Fruit s relativním indexem 6,83 (viz tabulka 5), vysoký relativní index 4,33 byl stanoven u kitu GeneAll Ribospin Plant (pufr RPL). Nejnižší relativní index byl stanoven u kitu Plant/Fungi Total RNA Purification Kit s 0,88.

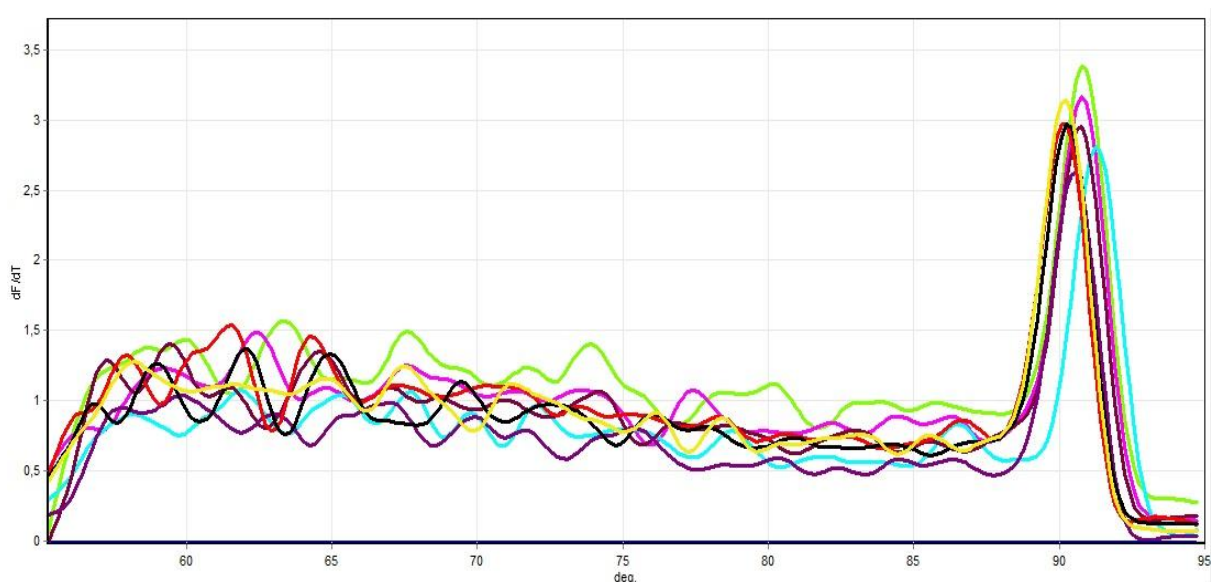
Tabulka 5: Relativní koncentrace 18S rRNA ve vzorcích celkové izolované RNA jednotlivými kity

Izolační kit	Koncentrace RNA [ng/μl]	Relativní koncentrace	Ø relativní koncentrace 18S rRNA	Ø relativní koncentrace 18S rRNA [%]	ng v reakci	Relativní index
GeneAll Ribospin Plant (pufr RPL)	12,58	1,16	1,13	113	26,08	4,33
	11,6	1,22*				
	14,94	1,1				
GeneAll Ribospin Plant (pufr REL)	36,32	1,22	1,22	122	85,26	1,43
	46,79	1,22				
	44,8	1,22				
GeneAll Ribospin Seed/Fruit	3,52	0,58	0,6	60	8,78	6,83
	5,15	0,78*				
	4,52	0,61				
NucleoSpin RNA plant (pufr RA1)	42,14	1,0	0,99	99	67,04	1,48
	36,31	1,05				
	26,8	0,91				
	28,86	1,1*				
NucleoSpin RNA plant (pufr RAP)	13,49	0,64	0,69	69	27,02	2,55
	13,53	0,74				
	13,56	0,12*				
RNeasy mini kit (pufr RLT)	23,86	1,22*	0,32	32	33,5	0,96
	24,42	0,27				
	14,62	0,61				
	14,3	0,82*				
	6,53	0,09				
RNeasy mini kit (pufr RLC)	9,26	0,12*	1,05	105	26,62	3,94
	18,56	1,22				
	24,56	1,22				
	8,75	0,71				
	5,41	0,06*				
Plant/Fungi Total RNA Purification Kit	69,6	1,22	1,22	122	139,2	0,88
	69,6	1,22				
	69,6	1,22				

* vyloučená hodnota, Ø průměr

Specifičnost qRT PCR produktů byla ověřena analýzou jejich křivek tání. Vrcholy křivek všech produktů odpovídaly průměrné $T_m = 90,7 \pm 0,34$ °C. Vybrané disociační křivky produktů PCR jsou znázorněny na grafu 3.

Graf 3: Vybrané derivované disociační křivky produktů qRT-PCR



Zelená - GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr); **růžová** - GeneAll Ribospin Plant (REL pufr); **modrá** - GeneAll Ribospin Seed/Fruit; **hnědá** - NucleoSpin RNA plant (pufr RA1); **fialová** - NucleoSpin RNA plant (pufr RAP); **červená** - RNeasy mini kit (pufr RLT); **černá** - RNeasy mini kit (pufr RLC); **žlutá** - Plant/Fungi Total RNA Purification Kit.

Na základě relativní koncentrace 18S rRNA ve vzorcích celkové RNA bylo možno izolační kity rozdělit do dvou skupin. V I. skupině jsou kity, pomocí kterých byla izolována celková RNA s nižší relativní koncentrací 18S rRNA, rozptyl hodnot je 0,32 až 0,69; patří zde kity GeneAll Ribospin Seed/Fruit, NucleoSpin RNA plant (pufr RAP) a RNeasy mini kit (pufr RLT). V II. skupině jsou kity, s pomocí kterých byla izolována celková RNA s vyšší relativní koncentrací 18S rRNA, rozptyl hodnot relativní koncentrace 18S rRNA je 0,99 až 1,22; patří zde kity GeneAll Ribospin Plant (pufr RPL), GeneAll Ribospin Plant (pufr REL), NucleoSpin RNA plant (pufr RA1), RNasy mini kit (pufr RLC) a Plant/Fungi Total RNA Purification Kit. Mezi hodnotami relativní koncentrace 18S rRNA ve vzorcích izolovaných soupravami I. a II. skupiny byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Porovnání relativních koncentrací 18S rRNA ve vzorcích celkové RNA izolovaných různými komerčními kity Tukey testem

Komerční kit	Tukey HSD Q statistika	Tukey HSD p-hodnota	Tukey HSD inference
A ^{II} vs B ^{II}	1.0846	0.8999947	o
A ^{II} vs C ^I	6.4672	0.0058589	**
A ^{II} vs D ^{II}	1.9281	0.8465205	o
A ^{II} vs E ^I	5.3023	0.0290215	**
A ^{II} vs F ^I	9.7209	0.0010053	**
A ^{II} vs G ^{II}	0.9641	0.8999947	o
A ^{II} vs H ^{II}	1.0846	0.8999947	o
B ^{II} vs C ^I	7.5518	0.0013330	**
B ^{II} vs D ^{II}	3.0127	0.4397164	o
B ^{II} vs E ^I	6.3869	0.0065454	**
B ^{II} vs F ^I	10.8055	0.0010053	**
B ^{II} vs G ^{II}	2.0486	0.8014185	o
B ^{II} vs H ^{II}	0.0000	0.8999947	o
C ^I vs D ^{II}	4.5391	0.0798374	**
C ^I vs E ^I	1.1649	0.8999947	o
C ^I vs F ^I	3.2537	0.3503668	o
C ^I vs G ^{II}	5.5032	0.0220798	**
C ^I vs H ^{II}	7.5518	0.0013330	**
D ^{II} vs E ^I	3.3742	0.3104136	o
D ^{II} vs G ^{II}	0.9641	0.8999947	o
D ^{II} vs H ^{II}	3.0127	0.4397164	o
E ^I vs F ^I	4.4186	0.0928141	o
E ^I vs H ^{II}	6.3869	0.0065454	**
F ^I vs G ^{II}	8.7569	0.0010053	**
F ^I vs H ^{II}	10.8055	0.0010053	**
G ^{II} vs H ^{II}	2.0486	0.8014185	o

A GeneAll Ribospin Plant (RPL pufr); B GeneAll Ribospin Plant (REL pufr); C GeneAll Ribospin Seed/Fruit; D NucleoSpin RNA plant (pufr RA1); E NucleoSpin RNA plant (pufr RAP); F RNeasy mini kit (pufr RLT); G RNeasy mini kit (pufr RLC); H Plant/Fungi Total RNA Purification Kit, o = stat. neprůkazné, ** = vysoce statisticky průkazný rozdíl (p<0.01), I = kit s nižší relativní koncentrací RNA, II = kit s vyšší relativní koncentrací RNA.

7. Diskuze

Hlavní limitující faktor pro použití PCR v rutinní diagnostice je v izolaci nukleové kyseliny vhodné kvality, bez inhibitorů PCR. Bylo otestováno pět komerčních izolačních kitů na izolaci RNA z mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Byl použit GeneAll Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology), GeneAll Ribospin Seed/Fruit (GeneAll Biotechnology), NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel), RNeasy plant mini kit (Qiagen) a Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek corp.).

Nejvyšší výtěžek RNA z testovaných izolačních kitů prokázal Plant/Fungi Total RNA Purification Kit, poměrně vysoký výtěžek RNA byl stanoven i u GeneAll Ribospin Plant (při použití pufru REL) a NucleoSpin RNA plant (RA1 pufr).

Nejnižší výtěžek RNA byl určen u kitu GeneAll Ribospin Seed/Fruit, což není překvapivé zjištění vzhledem k faktu, že tento izolační kit není primárně určen na izolaci RNA z listu, ale na izolaci RNA z plodů a semen.

Při použití kitu GeneAll Ribospin Plant bylo průměrně izolováno 0,65 µg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*) při použití pufru RPL, při použití pufru REL bylo izolováno průměrně 2,13 µg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Pro porovnání, výrobce uvádí 2,6 µg na 10 mg listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) a 1,6 µg na 10 mg listu tomelu japonského (*Diospyros kaki*) (Anonymous, 2012b). Kit byl úspěšně použit například pro izolaci celkové RNA z *Bunium persicum* pro selekci vhodných housekeeping genů v genové studii této rostliny (Zeidabadi *et al.*, 2015) nebo pro izolaci celkové RNA z trangenního hybridu topolu (*Populus alba* x *Populus glandulosa*), u kterého byla sledována exprese genu YUCCA6 pro flavin monooxygenázu (Ke *et al.*, 2015).

Při použití kitu NucleoSpin RNA plant bylo průměrně izolováno 1,68 µg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*) při použití pufru RA1, při použití pufru RAP bylo izolováno průměrně 0,67 µg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Výrobce uvádí obvyklé množství RNA izolované pomocí tohoto kitu 0,3 až 7 µg z 10 mg rostlinného materiálu; 4,8 µg RNA z 10 mg listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*); 3,6 µg na 10 mg listu kukuřice seté (*Zea mays*) (Anonymous, 2014). Kit byl úspěšně použit pro izolaci celkové RNA z listů *Hoya calycina* pro detekci viru *Capsicum chlorosis virus* (Melzer *et al.*, 2014) nebo pro izolaci celkové RNA z listů meruňky obecné (*Prunus armeniaca*) pro detekci *Little cherry virus 1* (Šafářová *et al.*, 2017).

Při použití RNeasy plant mini kit bylo průměrně izolováno 0,84 μg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*) při použití pufru RLT, při použití pufru RLC bylo izolováno průměrně 0,67 μg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Výrobce uvádí obvyklý výtěžek 6 μg na 10 mg listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*), 2,5 μg na 10 mg listu kukuřice seté (*Zea mays*) (Anonymous, 2012c). Kalinowska *et al.* (2012) provedli izolaci pomocí tohoto kitu a naměřili 2,07 μg na 10 mg listu hrušně (r. *Pyrus*). Xiao *et al.* (2015) provedli izolaci RNA tímto kitem z broskoně obecné (*Prunus persica*) a naměřili 9,48 μg RNA na 10 mg listu, u mladých i starých listů révy vinné (*Vitis vinifera*) byl výtěžek izolace 0,02 μg RNA na 10 mg listu. Kit byl úspěšně použit například pro izolaci celkové RNA z listů melounu cukrového (*Cucumis melo*) a okurky seté (*Cucumis sativus*) pro detekci *Cucurbit chlorotic yellows virus* (Hamed *et al.*, 2011) nebo pro izolaci celkové RNA z česneku kuchyňského (*Allium sativum*) pro detekci *Garlic virus A* (Gawande *et al.*, 2015).

Při použití Plant/Fungi Total RNA Purification Kit bylo průměrně izolováno 3,48 μg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Výrobce uvádí 12 μg na 10 mg listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*); 6,4 μg na 10 mg listu slivoně domácí (*Prunus domestica*) a 6 μg na 10 mg listu u broskvoně obecné (*Prunus persica*) (Anonymous, 2016). Xiao *et al.* (2015) izolovali tímto kitem RNA z broskoně obecné (*Prunus persica*) s výtěžkem 29 μg na 10 mg listu, u mladých listů révy vinné (*Vitis vinifera*) byl výtěžek 3,22 μg RNA na 10 mg listu, u starších listů uvádí 0,4 μg RNA na 10 mg listu. Kit byl použit například pro izolaci celkové RNA z lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) pro detekci *Potato mop-top virus* (Kalishuk *et al.*, 2016) nebo pro izolaci celkové RNA z listů révy vinné (*Vitis vinifera*) pro detekci *Grapevine leafroll-associated virus 4 a 7* (Ito *et al.*, 2013).

Při použití kitu Ribospin Seed/Fruit bylo průměrně izolováno 0,22 μg RNA z 10 mg lyofilizovaného listu mandloně obecné (*Prunus dulcis*). Výrobce kitu GeneAll Ribospin Seed/Fruit bohužel neuvádí možný výtěžek izolace RNA (Anonymous, 2015). Kit byl úspěšně použit pro izolaci RNA z plodů jahodníku (*Fragaria ananassa*) pro komparativní studii aktivity fenolických antioxidantů a genové exprese související s biosyntézou flavonoidů u letních a zimních kultivarů jahod (Park *et al.*, 2017).

Se vzorky RNA izolovanými jednotlivými kity byla provedena qRT-PCR, aby bylo zjištěno, do jaké míry jednotlivé izolační kity preferují izolaci ribozomální RNA. Překvapivě, nejvyšší relativní podíl rRNA byl naměřen u izolačního kitu GeneAll Ribospin Seed/Fruit. U tohoto kitu byl stanoven nejnižší výtěžek RNA z testovaných kitů, ale podle výsledků dochází

při izolaci k preferenci právě rRNA. Trochu menší relativní podíl, ale stále vyšší ve srovnání s ostatními izolačními kity, byl stanoven u kitu GeneAll Ribospin Plant (při použití pufru RPL). Nejmenší podíl ribozomální RNA byl naměřen u vzorků RNA izolovaných kitem Plant/Fungi Total RNA Purification Kit. U vzorků RNA tohoto kitu byl sice naměřen vysoký výtěžek izolace, ale byl použit postup upřednostňující malé RNA, což způsobilo malý podíl rRNA ve vzorku.

Samotný pracovní postup během izolací tří až šesti vzorků byl u všech izolačních kitů hotový do čtyřiceti minut i včetně ošetření DNázou. Návod k použití všech izolačních kitů nabízí ošetření DNázou, ale s výjimkou kitu NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel) je ošetření DNázou spíše na rozhodnutí uživatele kitu a není přímou součástí izolačního protokolu. Všechny kity pracují na principu izolace pomocí kolony s navázaným oxidem křemičitým, na který se vážou nukleové kyseliny v přítomnosti chaotropních solí. Výhodou je, že žádný z otestovaných kitů neuvádí fenol ani chloroform. Výrobce všech kitů uvádějí izolovanou RNA vhodnou pro další aplikace, jako je cDNA syntéza, RT-PCR, Northern Blotting a další.

Pro izolaci s vysokým výtěžkem se osvědčily kity II. skupiny s průměrným výtěžkem 1,68 až 3,5 μg RNA z 10 mg lyofilizovaných listů listu (tj. cca 100 mg čerstvého nebo zamraženého listu), patří zde kity GeneAll Ribospin Plant (REL pufr), Plant/Fungi Total RNA Purification Kit a NucleoSpin RNA plant (RA1 pufr). Výtěžek izolace se může lišit v závislosti na typu a stáří rostlinného materiálu, jeho úpravě (zda je čerstvý, lyofilizovaný, atd.), proto je vždy potřeba postup izolace ověřit na konkrétním rostlinném materiálu, se kterým pracujeme.

8. Závěr

V teoretické části práce byla vypracována rešerše zaměřena na izolaci celkové RNA pro detekci rostlinných virů pomocí PCR. Byly uvedeny metody izolace RNA, komplikace s nimi spojené a možnosti řešení těchto komplikací.

V experimentální části bylo vyzkoušeno a porovnáno pět komerčních kitů pro izolaci RNA, byl určen výtěžek izolace RNA těmito kity a byla zjištěna preference izolace rRNA jednotlivými izolačními kity. Nejvyšší výtěžek izolace byl získán pomocí souprav Plant/Fungi Total RNA Purification Kit od firmy Norgen Biotek, GeneAll Ribospin Plant (při použití pufru REL) od firmy GeneAll Biotechnology a NucleoSpin RNA plant (při použití pufru RA1) od firmy Macherey-Nagel. Nejvyšší preference izolace rRNA k celkové izolované RNA byla zjištěna u vzorku izolovaného kitem GeneAll Ribospin Seed/Fruit od firmy GeneAll Biotechnology.

9. Literatura

- Anonymous (2012a): Bezpečnostní list (chloroform). Lach-Ner, Neratovice.
- Anonymous (2012b): GeneAll Ribospin Plant protocol handbook. Gene All Biotechnology, Seoul.
- Anonymous (2012c): RNeasy mini handbook, 4th edition. Qiagen, Hilden.
- Anonymous (2013): Bezpečnostní list (fenol). Lach-Ner, Neratovice.
- Anonymous (2014): RNA isolation from plant (Nucleospin RNA plant user manual). Macherey-Nagel, Düren.
- Anonymous (2015): GeneAll Ribospin Seed/Fruit protocol handbook. GeneAll Biotechnology, Seoul.
- Anonymous (2016): Plant/Fungi Total RNA Purification Kit product insert. Norgen Biotek corp., Thorold.
- Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Hitendra R. H. P. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5: 209–219.
- Bertolini E., García J., Yuste A., Olmos A. (2010): High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 128: 283–287.
- Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Janse C. L., Wertheim van Dillen P. M. E., Van der Noordaa J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495–503.
- Brandt S., Ibl M., Himmler G. (1995): Coat protein gene sequence of an Austrian isolate of grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology* 140: 157-164.
- Buckingham L., Flaws M. L. (2007): *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications*, 2nd edition. F. A. Davis Company, Philadelphia (ISBN 9780803626775).
- Bugos R. C., Chiang V. L., Zhang X. H., Campbell E. R., Podila G. K., Campbell W. H. (1995): RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *BioTechniques* 19: 734-737.

- Carson S., Miller H. B., Witherow D. S. (2012): Molecular biology techniques: a classroom laboratory manual, 3rd edition. Elsevier, Amsterdam (ISBN 978-0-12-385544-2).
- Clark M. F., Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- De Blas C., Borja M. J., Saiz M., Romero J. (1994): Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 141: 323-329.
- Ding L., Sun Q., Wang Z., Sun Y., Xu Z. (2007): Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Analytical Biochemistry* 374: 426–428.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ellison S. L. R., Farrant T. J., Barwick V. (2009): Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide. RSC Publishing, Cambridge (ISBN 9780854041312).
- Gawande S. J., Gurav V. S., Ingle A. A., Gopal J. (2015): First report of garlic virus A in garlic from India. *Plant Disease* 9: 1288.
- Ghawana S., Paul A., Kumar H., Kumar A., Singh H., Bhardwaj P. K., Rani A., Singh R. A., Raizada J., Singh K., Kumar S. (2011): An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC Research Notes* 4: 85.
- Hamed K., Menzel W., Daffala G., Gadelseed A. M. A., Winter S. (2011): First report of cucurbit chlorotic yellows virus infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Disease* 10: 1321.
- Harper S. J., Delmiglio C., Ward L. I., Clover G. R. (2010): Detection of Tomato black ring virus by real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 171: 190-194.
- Henson J. M., French R. C. (1993): The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81-109.
- Hoffmann K., Sackey S. T., Maiss E., Adomako D., Vetten H. J. (1997): Immunocapture polymerase chain reaction for detection and characterization of Cacao swollen shoot virus A 1 isolates. *Journal of Phytopathology* 145: 205-212.

- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 7276-7280.
- Chilvers M. I. (2012): Molecular diagnostics in plant disease diagnostic clinics... What's the status? *Fungal Genomics & Biology* 2: 102.
- Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Chomczynski P., Sacchi N. (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1: 581-585.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Ito T., Nakaune R., Nakano M. (2013): Novel variants of grapevine leafroll-associated virus 4 and 7 detected from a grapevine showing leafroll symptoms. *Archives of Virology* 158: 273.
- Kalischuk M., Lynn J., Kawchuk L. (2016): First report of Potato mop-top virus infecting potatoes in Alberta. *Plant Disease* 12: 224.
- Ke Q., Wang Z., Ji Ch. Y., Jeong J. Ch., Lee H. S., Li H., Xu B., Deng X., Kwak S. S. (2015): Transgenic poplar expressing *Arabidopsis* YUCCA6 exhibits auxinoverproduction phenotypes and increased tolerance to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 94: 19-27.
- Khan J. A., Dijkstra J. (2002): *Plant viruses as molecular pathogens*. Food Products Press, New York (ISBN 1560228954).
- Kirby K. S. (1956): A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochemical Journal* 64: 405.
- Korschineck I., Himmler G., Sagl R., Steinkellner H., Katinger H. W. D. (1991): A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods* 31: 139-146.

- Krieg P. A. (1996): A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis. John Wiley & Sons, Hoboken (ISBN 9780471125365).
- Kundu J. K. (2003): A rapid and effective RNA release procedure for virus detection in woody plants by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta virologica* 47: 147–151.
- Lee L. G., Connell C. R., Bloch W. (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 21: 3761–3763.
- Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., Kinard G. (2008): A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154: 48–55.
- MacKenzie D. J., McLean M. A., Mukerji S., Green M. (1997): Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription – polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222–226.
- Makkouk K., Kumari S. G. (2006): Molecular diagnosis of plant viruses. *Arab Journal of Plant Protection* 24: 135-138.
- Malinowski T. (1997): Silica capture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): application for the detection of several plant viruses. *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens* 11: 445–448.
- Marko M. A., Chipperfield R., Birnboim H. C. (1982): A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Analytical Biochemistry* 121: 382–387.
- Melzer M. J., Shimabukuro J., Long M. H., Nelson S. C., Alvarez A. M., Borth W. B., Hu J. S. (2014): First report of Capsicum chlorosis virus infecting waxflower (*Hoya calycina* Schlechter) in the United States. *Plant Disease* 4: 571.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiß E. (2001): Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81–92.
- Mikkelsen S. R., Cortón E. (2004): Bioanalytical chemistry. John Wiley & Sons, Hoboken (ISBN 9781118302545).

- Minafra A., Hadidi A. (1994): Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Phytopathological Methods* 47: 175-188.
- Mullis K. (1987): Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Patent No. 4683202.
- Parakh D. R., Shamloul A. M., Hadidi A., Scott S. W., Waterworth H. E., Howell H. E., Mink G. I. (1995): Detection of prune dwarf ilarvirus from infected stone fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 386: 421-430.
- Park D., Park Y., Lee Y. H., Choi I. Y., Park K. Ch., Park S. U., Kim B. S., Yeoung Y. R., Park N. I. (2017): A comparative study of phenolic antioxidant activity and flavonoid biosynthesis-related gene expression between summer and winter strawberry cultivars. *Journal of Food Science* 82: 341–349.
- Puchta H., Sanger H. L. (1989): Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reaction (PCR). *Archives of Virology* 106: 335-340.
- Rowhani A., Chay C., Golino D. A., Falk B. W. (1993): Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83: 749-753.
- Saghai-Marroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 8014–8019.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Saiz M., Castro S., De Blas C., Romero J. (1994): Serotype specific detection of Bean common mosaic potyvirus in bean leaf and seed tissue by enzymatic amplification. *Journal of Phytopathological Methods* 50: 145-154.
- Salkind N. J. (2010): *Encyclopedia of research design*. SAGE Publications, Thousand Oaks (ISBN 9781506319315).
- Sambrook J., Russel D. (2001): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (ISBN 9780879695774).

- Sanchez-Navarro J. A., Aparicio F., Rowhani A., Pallás V. (1998): Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology* 47: 780–786.
- Singh M., Singh R. P. (1996): Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Phytopathological Methods* 60: 47-57.
- Singh R. P., (1998): Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *Journal of Virological Methods* 74: 125–138.
- Šafařová D., Faure C., Candresse T., Navrátil M., Nečas T., Marais A. (2017): First report of Little cherry virus 1 infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Disease* 5: 845.
- Tan S. Ch., Yiap B. Ch. (2009): DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 574398.
- Thomson D., Dietzgen R. G. (1995): Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods* 54: 85-95.
- Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M. (1977): Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196: 1313-1319.
- Veetil T. T., Ho T., Moyer C., Whitaker V. M., Tzanetakis I. E. (2016): Detection of Strawberry necrotic shock virus using conventional and TaqMan quantitative RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 235: 176-181.
- Vunsch R., Rosner A., Stein A. (1990): The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology* 117: 561-569.
- Xiao H., Kim W. S., Meng Baozhong (2015): A highly effective and versatile technology for the isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. *Virology Journal* 12: 171.
- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. (2014): The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of Potato virus Y. *American Journal of Potato Research* 91: 525–531.

- Zamecnick P. C., Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Wolf D. E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by non-radiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8790.
- Zeidabadi D. D., Javaran M. J., Dehghani H., Monfared S. R., Baghizadeh A. (2015): Selection of suitable housekeeping genes for gene expression study in caraway (*Bunium persicum*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 3: 50-58.
- Zhou Y., Chen H. M., Cao M. J., Wang X. F., Jin X., Liu K. H., Zhou Y. C. (2017): Occurrence, distribution, and molecular characterization of Citrus yellow vein clearing virus in China. *Plant Disease* 1: 137-143.