

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Izolace RNA třešně

Bakalářská práce

Autor práce: Karolína Vojáčková

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Izolace RNA třešně" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a trpělivost.

Izolace RNA třešně

Souhrn

Tématem bakalářské práce je izolace RNA třešně. Stěžejní tezí je pro mne sepsání literární rešerše na toto téma. Úvodní části práce věnují pozornost obecnému zakotvení v podobě kapitol, které přibližují témata RNA a stručný popis objektu zkoumání – třešně ptačí (*Prunus avium*). Třešeň ptačí je součástí tzv. ušlechtilých listnáčů. Výzkumy třešně ptačí se zabývají nedostatečným množstvím kvalitního sadebního materiálu, potřebného ke šlechtění nových odrůd. Největší pozornost je věnována metodám izolace RNA, jejich porovnáním a následným analýzám již izolované RNA. V práci je popsáno pět metod nejvíce používaných k izolaci RNA: fenol-chloroformová, adsorpce na silikát, CTAB, TRIzol, magnetická separace a možnost použití komerčně prodávaných kitů.

Fenol-chloroformová metoda rozděluje lyzát se směsí fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu na dvě fáze, horní vodnou, ve které jsou obsaženy nukleové kyseliny a dolní organickou.

Adsorpce na silikát využívá vlastnosti nukleových kyselin vázat se na povrch z oxidu křemičitého v přítomnosti chaotropních solí.

CTAB metoda zahrnuje použití extrakčního pufru s CTAB, který vytváří sraženinu s nukleovými kyselinami. Peleta je poté resuspendována v DEPC-vodě.

TRIzol metoda používá kombinaci guanidin thiokyanát-fenol-chloroform. Podobně jako fenol-chloroformová metoda vytváří sraženinu, ale působením guanidin thiokyanátu, horní fáze obsahuje pouze RNA.

Při magnetické separaci se nukleové kyseliny naváží na povrch magnetizovaných částic.

K následným genetickým analýzám, které mohou detekovat a kvantifikovat izolovanou RNA, mohou být použity analýzy RT-PCR, elektroforéza, microarray a hybridizační metody northern blot a dot-blot.

Bakalářská práce je kompilačního charakteru, a proto je koncipována jako literární rešerše informující o výše zmíněných tématech. Kromě vlastních stručných hodnocení, není v práci ucelená vědecká, potažmo výzkumná část.

Klíčová slova: *Prunus avium*, třešeň, nukleové kyseliny, extrakce a analýzy RNA

Ribonucleic acids extraction in sweet cherry

Summary

This bachelor thesis deals with the Isolation RNA in sweet cherries. The turning point was the literature review on this topic. First chapters mentions the problems of studying two main topics, which are RNA and a description of cherry (*Prunus avium*). Sweet cherry is a part of Noble hardwoods. Researches of sweet cherries can deal with an insufficient amount of quality planting material needed to breed new varieties. The biggest attention has given to the methods of RNA isolation, their comparison and analysis of already isolated RNA. The work describes five methods most commonly used for the isolation of RNA by phenol-chloroform, adsorption to silica, CTAB, TRIzol, magnetic separation and the using commercially marketed kits.

Phenol-chloroform method divides the lysate with a mixture of phenol, chloroform and isoamylalcohol in two phases, an upper aqueous, that includes the nucleic acids and lower organic.

Adsorption on silica using properties of nucleic acids bind to the surface of the silica in the presence of chaotropic salts.

CTAB method involves the use of extraction buffer with CTAB, which forms a precipitate with the nucleic acids. The pellet is then resuspended in DEPC-water.

TRIzol method uses a combination of guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform. Like the phenol-chloroform method produces a precipitate, but treatment with guanidine thiocyanate, upper phase contained only RNA.

During the magnetic separation are the nucleic acids bound to the surface of the magnetized particles.

Subsequent genetic analysis that can detect and quantify the isolated RNA may be used in RT-PCR analysis, electrophoresis, and microarray hybridization methods northern blot and dot blot.

Bachelor thesis has written as a compilation literature review to inform the about mentioned topics. Any own research part is not here, because of the compilation character.

Keywords: *Prunus avium*, sweet cherry, nucleic acids, extraction and analysis of ribonucleic acids

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Třešeň ptačí.....	10
3.1.1 Čeleď Rosaceae	10
3.1.2 Prunus avium	10
3.1.3 Biochemické vlastnosti	11
3.1.4 Ekologie	12
3.1.5 Rozmnožování	12
3.1.6 Výskyt.....	12
3.1.7 Odrůdy	13
3.1.8 Využití třešně ptačí	13
3.1.9 Noble Hardwoods	14
3.1.10 Šlechtění a výzkum třešně ptačí.....	14
3.2 RNA	15
3.2.1 Popis RNA	15
3.2.2 Struktura RNA	16
3.2.3 Funkce RNA	17
3.2.4 Druhy RNA.....	20
3.2.5 Stabilizace RNA	21
3.2.6 Výzkum RNA	21
3.3 Izolace RNA	22
3.3.1 Pravidla pro úspěšnou izolaci RNA.....	22
3.3.2 Izolace RNA z ovocných dřevin.....	23
3.4 Metody izolace RNA	24
3.4.1 Lýza buněk.....	24
3.4.2 Typy metod izolace RNA	24
3.4.3 Skladování izolované RNA	28
3.4.4 Hodnocení kvality RNA	29
3.5 Analýzy RNA	29
3.5.1 RT-PCR analýza (Reverse transcription-polymerase chain reaction)	29
3.5.2 Elektroforéza.....	31
3.5.3 Northern blot.....	32
3.5.4 Dot-blot.....	33
3.5.5 Microarray	33
4 Hodnocení metod používaných k extrakci a analýze RNA	35
5 Závěr	37

6	Seznam použité literatury	38
7	Seznam použitých zkratk	45
8	Seznam obrázků	46

1 Úvod

Ribonukleová kyselina bývala dlouhou dobu ve stínu nositelky genetické informace DNA. Tato důležitá molekula byla poprvé popsána na začátku 20. století chemiky, kteří si uvědomili chemické rozdíly mezi DNA a RNA. Přelomovým bodem pro intenzivnější studium RNA byla šedesátá léta 20. století. V té době zavedl Francis Crick pojem „centrální dogma“, jež popisuje tok informace v živých organismech ve směru DNA – RNA – protein.

S přibývajícím výzkumy bylo objeveno více druhů RNA, včetně jejich funkcí. Kromě třech základních, kterými jsou mRNA, tRNA a rRNA, i druhy nekódujících RNA, například mikroRNA, siRNA. Mezi funkce nepatří pouze přepis genetické informace do mRNA a její překlad z pořadí nukleotidů v mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci, ale i funkce katalytická. Pro další zkoumání RNA je nutné získávat vzorky vysoce kvalitní a čisté RNA. Izolace RNA je náročnější než izolace DNA, z důvodu její snadné degradovatelnosti působením RNáz. Naštěstí jsou stále vytvářeny nové a lepší metody pro izolaci RNA. V dnešní době je možné i zakoupení již připravených souprav určených k izolaci RNA s přesně popsaným postupem.

Izolace RNA u ovocných dřevin, tedy i třešně ptačí, je ztížena přítomností vysokého obsahu polyfenolů a polysacharidů. Z tohoto důvodu vzniklo mnoho rozličných variant metod, uzpůsobených přímo pro výzkum ovocných dřevin.

Právě metody izolace RNA a následné analýzy s ohledem na použití u třešně ptačí jsou předmětem této bakalářské práce.

2 Cíl práce

Cílem práce je zpracování literární rešerše, která se bude věnovat shromažďování informací o metodách, používaných k izolaci ribonukleové kyseliny s ohledem na použití u ovocných dřevin, v tomto případě třešně ptačí (*Prunus avium*). S návazností na popis metod, které mohou být využity pro analýzu izolované RNA.

Mezi cíle práce patří také kritické zhodnocení metod izolace i analýzy RNA a popis využití při šlechtění třešní.

3 Literární rešerše

3.1 Třešeň ptačí

Prunus avium (L.) Syn.: *Cerasus avium* (L.) Moench, *Prunus cerasus* L. var. *avium* L., *Cerasus nigra* Mill.), patřící do čeledě *Rosaceae* – růžovité (Jašková, 2008), je opadavý strom dorůstající výšky až dvacet pět metrů (Červenka et Cigánová, 1989). V České republice je tato ovocná dřevina považována za domácí. Pěstovaná je v mnoha odrůdách a nalezneme ji také jako planě rostoucí.

3.1.1 Čeleď Rosaceae

Početná čeleď *Rosaceae* – růžovité – zahrnující vytrvalé byliny, keře a stromy, patří pod třídu *Rosopsida* (vyšší dvouděložné) do řádu *Rosales* (růžotvaré). V současné době se člení na tři podčeledi, kterými jsou růžovité, jabloňovité a mandloňovité. Dříve byla dělena do čtyř podčeledí. Čtvrtou podčeledí byli tavolníkovité.

Zástupci čeledi *Rosaceae* jsou rozšířeni po celém světě. Celkově tato čeleď zahrnuje přes dva a půl tisíce druhů přibližně v devadesáti rodech – devatenáct rodů a přibližně dvě stě druhů je zastoupeno v původní české květeně. Nejvíce druhů tvoří ostružiníky, mochny a růže a z dřevin jsou to jabloně a hrušně (Hejný et Slavík, 1997).

Prunus avium, která je předmětem této bakalářské práce, patří do podčeledi mandloňovitých (*Amygdaloideae*), rodu *Prunus*. Rod *Prunus* zahrnuje společně s *Prunus avium* druhy, jako jsou *Prunus spinosa* (trnka obecná), *Prunus domestica* (slivoň švestka), *Prunus cerasus* (třešeň višně), *Prunus armeniaca* (meruňka obecná) *Prunus percisa* (broskvoň obecná) a další (Novák et. Skalický, 2012). Mnoho druhů z rodu *Prunus* je diploidních, to znamená, že obsahuje dvě sady chromozomů ($2n = 16$), některé druhy jsou tetraploidní ($4n = 32$) (Chrtek, 1992).

3.1.2 *Prunus avium*

Třešeň ptačí se dožívá věku osmdesáti až devadesáti let, v tomto věku bývá kmen široký i více než padesát centimetrů. Své dospělosti dosahuje ve dvaceti až dvaceti pěti letech věku, do čtyřicátého roku se vyznačuje rychlým růstem, který končí ve věku padesáti až šedesáti let.

Kořenový systém *Prunus avium* je kulovitý až kuželovitý, hlavní kořen je silný, postranní kořeny četné a bohatě větvené. Koruna je vejčitá. Mladá třešeň ptačí má kůru hladkou, červenohnědou, ve stáří však šedohnědou a odlupující se v tenkých pásech či v šupinách (Jašková, 2008).

Větve jsou vzpřímené. Mladší větvičky jsou silné, lesklé, červenohnědé, často popelavé (odumřelé buňky), starší větvičky jsou tmavohnědé, také lesklé, ale s prstencovitě se odlupující kůrou, s příčnými lenticelami. Postranní větvičky bývají krátké, kroužkované, uzlovité (Červenka et Cigánová, 1989).

Květní pupeny jsou zaokrouhlené, červenohnědé a jejich délka je šest až osm milimetrů. Často bývá několik pupenů pohromadě. S mnoha malými, vpředu zaokrouhlenými pupenovými šupinami, které jsou lepkavé. Listové pupeny má třešeň ptačí zašpičatělé, menší než pupeny květní (Červenka et Cigánová, 1989).

Listy mají lící stranu matnou a lysou (pouze ojediněle se můžou vyskytovat trichomy), na rubu jsou světlejší. Řapíky jsou až čtyři centimetry dlouhé, s jednou až dvěma hnědými žlázkami. Čepel listu je obvejčitá až eliptická, vrchol listu je protažený do špičky, která je po okrajích pilovitá (Martinovský et Pozděna, 1987).

Bílé květy (vzácně narůžovělé) jsou pětičetné a po dvou až šesti uspořádány v květenství (zdánlivé okolíky), na krátkých brachyblastech (Jašková, 2008). Květy se objevují raně, před olistěním v dubnu až květnu. (Vondráček, 1979). Květy a plody se vytváří převážně na dvouletém a tříletém dřevě.

Plodem planých druhů jsou peckovice malé, červené barvy, dozrávající v červenci. Mají nahořklou chuť a jsou nejedlé. Ovšem u kulturních odrůd jsou plody větší, mohou být jeden až jeden a půl centimetru velké. Barva plodů kulturních odrůd je nejčastěji červená, ale mohou se vyskytovat i oranžové až téměř černé plody (Martinovský et Pozděna, 1987). Pecka třešně ptačí je velká, světlé barvy, okrouhlá. Složena je ze zdřevnatělého endokarpu, který uzavírá jedno semeno (Fér, 1994).

3.1.3 Biochemické vlastnosti

Plody třešně jsou tvořeny z osmdesáti procent vodou, zbývající sušinu tvoří cukry (sacharóza, fruktóza a galaktóza), bílkoviny, lipidy a popeloviny. Obsahují také vitaminy skupiny C, B, E a A. Z minerálních látek například obsahují vápník, fosfor, draslík, železo, síru a hořčík. Energetická hodnota je 2680 kJ.kg⁻¹ (Kopec, 1998).

3.1.4 Ekologie

V České republice je rozšířena hojně, zejména v teplejších oblastech a v nižších oblastech mezofytika. Na chráněných místech dokáže růst i ve vyšších nadmořských výškách (Jašková, 2008).

Kulturní odrůdy jsou nejčastěji pěstovány na chráněných stanovištích teplejších oblastí na svazčitých půdách jižní či západní expozice. Často namrzají a trpí klejotokem, pokud jsou pěstovány v údolích, na rovinách a vlhkých místech – v období poupat a květů trpí jarními mrazíky. Na suchých stanovištích se třešním také nedaří – špatně rostou a jejich plody jsou malé (Vondráček, 1979).

3.1.5 Rozmnožování

Běžně se třešně rozmnožují pohlavně, jsou především hmyzosnubné (entomogamní), hlavními opylovači jsou včel. Semena s oblibou roznášejí i ptáci a drobní savci. Vyznačují se cizosprašností (alogamie) – nemohou být oplodněny vlastním pylem (Sus et Blažek, 2002). Jedinou samosprašnou odrůdou třešně je Stela. Uplatňuje se však i nepohlavní rozmnožování, v přírodě kořenovými výhonky (Dzhangaliev et al., 2003) a ve šlechtitelské praxi vegetativní množení roubováním, očkováním a zakořeňováním řízků kvůli zachování odrůd (Ferkel, 1958).

3.1.6 Výskyt

Třešeň ptačí je rozšířena v celé Evropě, kromě nejjižnějších oblastí. Roste i ve Střední Asii, na Kavkazu, v Malé Asii a v severozápadní Africe. Historickým centrem rozšíření třešně je pravděpodobně právě oblast mezi Sýrií, Malou Asií a Kavkazem, odkud se do Evropy dostala zřejmě při prvních etapách introdukce dřevin. První ušlechtilé odrůdy vznikly již ve starověké Persii. Nejstarší zaznamenaná zmínka o třešni je pravděpodobně z prvního století před našim letopočtem a to ve starých římských spisech (Kudrna, 1987).

V České republice je dle Chrtka (1992) třešeň ptačí rozšířena hojně, nejvíce v teplejších oblastech a nižších polohách. Střední Čechy, České středohoří a jižní Morava jsou hlavními produkčními oblastmi.

Vyskytuje se v křovinatých stráních, mezích a remízcích. Můžeme jí najít také podél komunikací a ve světlých listnatých lesích. Nachází se ve společenstvech svazů *Quercion*

pubescenti – petraeae a *Prunion spinosae* a je diagnostickým druhem svazu *Carpinion* (Jašková, 2008).

Může najít uplatnění i v parcích, většinou však dostávají přednost ozdobnější druhy, jakými jsou například plnokvěté kultivary. Proto má větší význam ve volné krajině – remízky, biokoridory (Fér, 1994).

3.1.7 Odrůdy

Plané maloploché třešně, tzv. ptáčnice, jsou varetou *avium*. Kulturně pěstované velkoploché třešně rozdělujeme dle tuhosti dužniny. Nejtuzší dužninu mají takzvané chrupky (varieta *juliana*), měkkou dužninu srdcovky (varieta *duracina*) a dužninu tuhou až polotuhou mají časně zrající polochrupky (Hejný et Slavík, 1992).

Dalším dělení třešní je podle barvy jejich slupky. Jsou známé černé odrůdy s tmavou slupkou, pestré se žlutočervenou slupkou a světlé se žlutou slupkou (Sus et Blažek, 2002). Výše zmíněné skupiny jsou označovány jako variety či poddruhy.

3.1.7.1 Nejčastěji pěstované odrůdy

Aranka, Karešova, Kaštánka, Rivan a Rychlice patří mezi nejčastěji pěstované odrůdy srdcovek. Oblíbenými odrůdy chrupek jsou Granát, Halka, Hedelfingelská (tmavá chrupka), Horka, Kordia, Napoleonova (pestrá chrupka), Těchlovan, Van – tmavá chrupka a Vilma. Pěstovanou polochrupkou je například Burlat. Nejranější odrůdou, zrající již v prvním třešňovém týdnu, je Rivan. Naopak nejpozději zrající odrůdou třešně je Vilma (Sus et Blažek, 2002).

3.1.8 Využití třešně ptačí

Třešeň ptačí je ovocný strom, pěstovaný především pro plody s prospěšnými látkami, jako jsou například vitamíny C a A, minerální látky a cukry. Plody se dají konzumovat čerstvé nebo konzervované a zpracovávají se v potravinářském průmyslu – výroba šťáv, vín, destilátů (Ferkl, 1958).

Nenahraditelné jsou třešně v lidovém léčitelství, ve kterém se zužitkují listy, květy i plody. Důležité zastoupení mají mezi medonosnými rostlinami.

Využití má i planě rostoucí *Prunus avium*, která se používá jako podnož nejen pro kulturně pěstované odrůdy třešní, ale také pro višně a sladkovišně (Chrtek, 1992).

Russel (2003) upozorňuje na význam třešně jako nejdůležitější dřeviny pro dřevařský průmysl z čeledi *Rosaceae*. Tvrdé dřevo *Prunus avium* patří mezi velmi ceněné pro svou výraznou kresbu. Jádru je žlutohnědé až červenohnědé, zato bělová část je smetanová až narůžovělá. Dřevo netrpí houbovými chorobami, což také zvyšuje jeho cenu. Třešň ptačí je často používána na zalesňování zemědělské půdy.

3.1.9 Noble Hardwoods

Prunus avium je řazena mezi „ušlechtilé listnáče“, neboli Noble Hardwoods. Zvýšená pozornost tzv. ušlechtilým listnáčům je věnována především z důvodu snahy rozšířit biodiverzitu lesních ekosystémů a zisku cenného dřeva, kterým by byl omezen dovoz dřeva z tropických oblastí (Kobliha et Janeček, 2001a). V Evropě se „ušlechtilým listnáčům“ věnuje především program EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Programme), sdružující odborníky z jejích členských zemí. Cílem EUFORGEN je podpora zachování genetických lesních zdrojů a jejich správné využívání v rámci trvale udržitelného obhospodařování lesů v Evropě (EUFORGEN).

Problémem je však nedostatečné množství kvalitního sadebního materiálu a proto se mu věnuje mnoho genetických výzkumných programů. Například ve Francii nedostatek osiva způsobil nekontrolovaný přenos semen (Kobliha et Janeček, 2001a).

3.1.10 Šlechtění a výzkum třešně ptačí

3.1.10.1 Šlechtění

Šlechtění probíhá, dokud nejsou splněny šlechtitelské cíle. U třešně ptačí jsou cílem genotypy stromů s kvalitním dřevem, vhodného tvaru kmene, vysokými přírůstky a také stromy odolné abiotickým i biotickým nepříznivým faktorům. Zahrnuje šlechtění samotné, testování a rozmnožování vhodných potomstev (Paule, 1992). V Evropě se nejvíce šlechtitelskému výzkumu třešně věnuje Francie a Německo (Kobliha et Janeček, 2001a).

V České republice probíhají od 90. let programy na záchranu a reprodukci genových zdrojů třešně. Šlechtění třešně ptačí na vysokou produkci a jakost dřeva pro obnovu lesa a zalesňování nelesních půd probíhá v projektu Lesnické fakulty České zemědělské univerzity

v Praze - NAZV EP 7138 „Šlechtění a pěstování třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v ČR“ (Kobliha et Janeček, 2001b).

V rámci zachování genetických zdrojů třešně, jsou zakládány semenné sady a klonové sady (Kobliha et Janeček, 2001a).

3.1.10.2 Výzkum

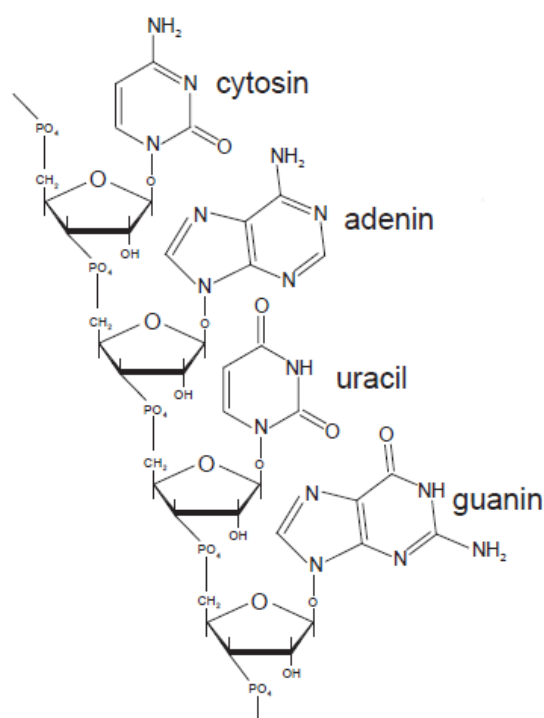
Genetický výzkum je zaměřen na testování šlechtitelského materiálu, vykazující vhodný fenotyp. Genotyp je vyhodnocen prostřednictvím testování potomstev, jež vzniklo z generativního či vegetativního rozmnožování. Při generativním rozmnožování je šlechtitelský materiál rozmnožován semeny. Vegetativní rozmnožování zahrnuje množení roubováním, řízkováním a rozmnožování *in vitro* (Kobliha et Janeček, 2001a).

Výzkum genofondu třešně s cílem získat nové genotypy, jež by byly produktivnější, odolnější k abiotickým i biotickým stresům, změnám klimatu, využívají molekulárně genetické metody (Kobliha et Janeček, 2001b), které vychází z izolace nukleových kyselin. Tato práce je zaměřena na problematiku izolace ribonukleové kyseliny.

3.2 RNA

3.2.1 Popis RNA

Ribonukleová kyselina je složena ze čtyř typů nukleotidů adeninu (A), cytosinu (C), guaninu (G) a uracilu (U). Uracil nahrazuje metylovaný analog thymin, který se vyskytuje v DNA. Jednotlivé nukleotidy se liší dusíkatými bázemi. Cytosin a uracil patří mezi pyrimidinové báze s jedním heterocyklem a adenin s guaninem mezi purinové báze se dvěma heterocykly. Dále RNA obsahuje cukernou složku ribózu, která má navíc na rozdíl od deoxyribózy (v DNA) 2' hydroxylovou skupinu, a fosfátovou skupinu. Všechny tyto složky – dusíkatá báze, ribóza, fosfátová skupina – tvoří nukleotid. Zmíněné nepatrné rozdíly v chemickém složení mezi RNA a DNA znamenají změny ve vlastnostech těchto nukleových kyselin a to hlavně zvýšenou reaktivitu RNA, její labilitu v alkalickém prostředí nebo například senzitivita k nukleolytickým enzymům. A právě tato vyšší reaktivita ovlivňuje její katalytické funkce. Funkční výjimečnost RNA je dána schopností plnit úlohu informační (jako genom) i výkonnou (jako fenotyp) (Alberts et al., 2008; Zdražil, 2007).



Obr. 1 – Nukleotidy RNA (Převzato z http://www.vedakolemnas.cz/miranda2/m2/sys/galerie-download/vkn_19web.pdf?0.5278496608656893).

3.2.2 Struktura RNA

DNA, stejně jako RNA, má schopnost tvořit Watsonovu a Crickovu dvoušroubovici, která má antiparalelně uspořádané komplementární řetězce. Ovšem intramolekulární uspořádání RNA je většinou jen částečně dvoušroubovicové, tedy jednořetězcové s určitým množstvím vlásenkových struktur s různě dlouhou dvouvláknovou částí a jednovláknovou smyčkou. Uspořádání molekul neboli konformace RNA dvoušroubovice je vždy forma A (2' -OH skupina ribózy se nevejde do jiné). RNA má také značnou flexibilitu všech jejích molekul a proto je schopna tvořit sekundární a terciální struktury, velmi známá je například struktura jetelového listu a obráceného písmene L u tRNA (Snustad et Simmons, 2009; Zdražil, 2007).

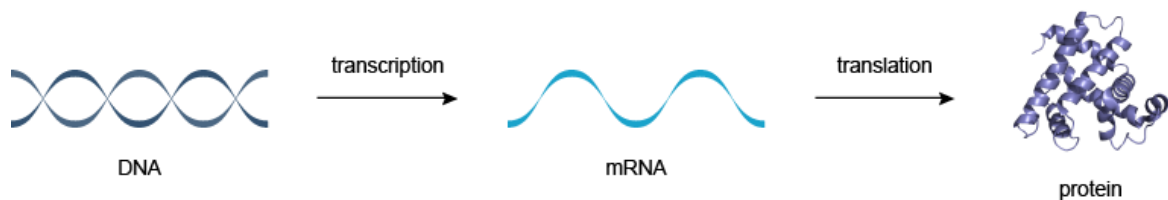
Je dokázané, že kromě známých nukleotidových párů, má sekundární struktura RNA schopnost obsahovat až 27 neobvyklých párů se dvěma vodíkovými vazbami, jako například G-U, A-C, A-A, G-G, A-G, U-U nebo U-C (Zdražil, 2007).

Z toho vyplývá, že molekuly RNA mohou tvořit nejen stabilní struktury podobné DNA a plnit tak odpovídající genetickou funkci, ale i vysoce flexibilní a složité konformace, které připomínají struktury proteinů (Alberts et al., 2008; Zdražil, 2007).

3.2.3 Funkce RNA

3.2.3.1 Centrální dogma

Ribonukleová kyselina je součástí centrálního dogmatu molekulární biologie, popisující přenos genetických informací uchovávaných v DNA transkripcí do RNA a translací RNA do proteinů (Snustad et Simmons, 2009).



Obr. 2 – Centrální dogma (Převzato z <http://www.atdbio.com/content/14/Transcription-Translation-and-Replication>)

3.2.3.1.1 Transkripce

Transkripce je přepis genetické informace do RNA. Nejdříve se při transkripci tvoří tzv. pre-messenger RNA (pre-mRNA). Pre-mRNA je upravena pro dosažení požadované molekuly mRNA v procesu nazývaném splicing neboli sestřih RNA. Při transkripci se do mRNA přepíše celý gen, tedy exony i introny. Exony na rozdíl od intronů obsahují informaci o pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Díky sestřihu se odstraní z molekuly introny a ponechají se pouze exony, které tvoří funkční mRNA (Snustad et Simmons, 2009).

Pro průběh transkripce je důležitá přítomnost enzymů katalyzujících transkripci. Na rozdíl u prokaryoty (s jednou RNA-polymerázou) mají eukaryoty tři RNA-polyméryzy: I, II a III. RNA-polymeráza I se nachází v jadérku a katalyzuje syntézu ribozomových RNA (kromě 5S RNA). RNA-polymeráza II se vyskytuje v jádře, kde přepisuje jaderné geny, kódující proteiny. Také RNA-polymeráza III je v jádře a katalyzuje syntézu molekul tRNA, molekul 5S rRNA a malých jaderných RNA. Všechny tři druhy RNA-polymeráz potřebují k zahájení syntézy RNA pomoc transkripčních faktorů (proteiny). Nejdříve dochází k rozvolnění DNA a uvolnění jednoho řetězce sloužícího jako matrice (templátu) pro syntézu komplementárního

vlákna RNA. Po uvolnění RNA-polymerázy z iniciačních komplexů se začne katalyzovat elongace řetězce RNA, dokud RNA polymeráza nenarazí na terminační sekvenci (Alberts et al., 2008).

3.2.3.1.2 Translace

Při translaci se genetické informace překládají z pořadí nukleotidů v mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Translace probíhá za účasti rRNA. Aminokyseliny do místa syntézy (ribosomů) přenášejí tRNA, každá aminokyselina má svojí specifickou tRNA. Kodóny neboli triplety – tři za sebou jdoucí báze mRNA - udávají druh aminokyseliny, pro syntézu jsou důležité i start a stop kodóny. Ke každému kodónu je komplementární antikodon, což jsou tři za sebou jdoucí báze tRNA. Právě na tRNA závisí translace mRNA do proteinu, protože pouze tRNA je schopna rozpoznat a spárovat (díky funkci enzymů nazývaných aminoacyl-tRNA-synthetasy) se jednou částí s kodonem v mRNA a jinou částí vázat aminokyselinu (Snustad et Simmons, 2009).

Translace probíhá na ribosomech, obsahujících čtyři vazebná místa – jedno pro mRNA a tři pro tRNA (E-místo, A-místo a P-místo). Každý ribozom je tvořen velkou podjednotkou, katalyzující vznik peptidové vazby mezi polypeptidovým řetězcem a aminokyselinou, a malou podjednotkou, zodpovídající za nasednutí tRNA na kodon mRNA (Alberts et al., 2008; Snustad et Simmons, 2009).

Průběh translace lze rozdělit do několika fází – iniciace, elongace a terminace. Nejdříve se mRNA připojí na malou podjednotku ribozomu (za pomoci iniciačních faktorů), který se po molekule mRNA posunuje a hledá iniciační neboli start kodon AUG, ke kterému je připojen methionin. Pokud je iniciační kodón nalezen, od malé ribozomální jednotky se odpoutá několik iniciačních faktorů, a tím umožní navázání velké ribozomální podjednotky. Jelikož se iniciační tRNA naváže přímo do P-místa, může ihned začít elongace, tedy prodlužování řetězce, navázáním druhé tRNA s aminokyselinou do A-místa (Snustad et Simmons, 2009).

Prodlužování řetězce probíhá za neustálého opakování tříkrokového cyklu: aminoacyl-tRNA se naváže do A-místa, následně vznikne nová peptidová vazba mezi novou aminokyselinou a peptidovým řetězcem a nakonec se ribozom posune o tři nukleotidy podél mRNA, tím uvolní tRNA bez navázané aminokyseliny z E-místa a z A-místa se přenesou do P-místa. Do uvolněného A-místa se ihned může navázat jiná tRNA s připojeno

aminokyselinou. Celý proces se opakuje, dokud ribozom nenarazí na terminační neboli stop-kodon, čímž začne poslední fáze translace – terminace (Alberts et al., 2008).

Stop-kodonu není přiřazena aminokyselina, místo aminokyseliny se na tRNA naváže molekula vody a uvolní konec hotového polypeptidového řetězce z tRNA v P-místě (Alberts et al., 2008).

3.2.3.2 Funkce katalytická

Ribonukleové kyseliny nejenomže plní již zmíněnou funkci při přenosu a překládání genetických informací, ale mohou vykonávat například ještě funkci katalytickou. Katalyzátory jsou látky, urychlující chemickou reakci a z reakce vychází nezměněny. RNA s touto funkcí nesou název ribozymy (Morávková et Forstová, 2008).

RNA také fungují jako primery neboli oligonukleotidová očka při replikaci RNA. A dokonce může být ribonukleová kyselina i nositelem genetické informace, jak je tomu u mnoha virů (Morávková et Forstová, 2008).

3.2.3.2.1 Ribozymy

Ribozymy byly objeveny v roce 1982 v laboratoři Thomase Czecha (University of Colorado), kde společně se svým týmem objevil, že intron prvoka *Tetrahymena thermophila* je schopen *in vitro* samosestříhu z prekurzoru rRNA bez přítomnosti proteinu. Tím bylo zpochybněno tvrzení o výhradním působení proteinů jako biologických katalyzátorů (Tekewe et al., 2012). V roce 1989 byli za tuto práci Thomas Czech a Sidney Altman oceněni Nobelovou cenou (Snustad et Simmons, 2009). Jedná se o enzymy nukleových kyselin, katalyzující chemické reakce, podobně jako enzymy bílkovin. Nacházejí se v ribosomech, kde se podílí na tvorbě bílkovinného řetězce. Výzkum ribozymů je zajímavý především pro možnou důležitou roli při sestříhu RNA a syntéze tRNA. Také by mohly být klíčovým důkazem v teorii „RNA světa“ (Lilley, 2003).

Ribozymy mohou být rozděleny do dvou skupin, na základě jejich velikosti a reakčního mechanismu, na malé a velké ribozymy. Malé ribozymy mají délku od 30 do 150 nukleotidů, zatímco velké ribozymy jsou dlouhé několik stovek až 3000 nukleotidů (Tekewe et al., 2012).

3.2.4 Druhy RNA

3.2.4.1 Základní druhy RNA

Z výše uvedeného textu vyplývá, že v buňce existují tři základní tradiční druhy RNA. Mediátorová RNA (mRNA – anglicky messenger RNA), která přenáší genetickou informaci z DNA do ribozomů, tvoří pouze 1 - 5 procent celkové RNA. V eukaryotických buňkách je mRNA vyráběna v buněčném jádře (Alberts et al., 2008; Snustad et Simmons, 2009).

Dále transferová RNA (tRNA), která zajišťuje přenos správných aminokyselin do nově vznikajícího řetězce, podílí se tedy na proteosyntéze, se skládá se ze 70 až 90 nukleotidů (Alberts et al., 2008; Snustad et Simmons, 2009).

Třetím a zároveň nejhojnějším druhem RNA je rRNA, tedy ribozomální. V buněčné RNA je obsažena přibližně v osmdesáti procentech. Vyskytuje se v ribozomech, kde tvoří jejich jádro. Rozeznávají kodony mRNA a podílí se také na tvorbě peptidové vazby. Jedná se o stavební složku ribozomálních podjednotek (Zdražil, 2007). rRNA slouží ke správné orientaci tRNA a na nich navázaných aminokyselin. Také je hlavním činitelem katalyzující syntézu proteinů (Snustad et Simmons, 2009).

3.2.4.2 Nekódující druhy RNA

K těmto základním druhům se řadí, poněkud nově, nekódující RNA, které mají důležitou úlohu při regulačních procesech (translaci, transkripci). Nekódující RNA se dále rozdělují na dlouhé nekódující RNA (lncRNA – z anglického long non-coding RNA) s délkou více než 200 nukleotidů a krátké nekódující RNA. Krátké nekódující RNA se rozdělují na krátké jaderné a jadéřkové RNA (snRNA z anglického short nuclear a snoRNA z anglického short nucleolar RNA), mikro RNA (miRNA) a krátké interferující RNA (siRNA z anglického short interfering RNA) (Snustad et Simmons, 2009; Staněk, 2015).

snRNA jsou strukturální složkou jaderných struktur tzv. spliceozomů, vyštěpující introny (Jonák, 2007). Jsou tedy nezbytné pro sestřih pre-mRNA. Podobnou funkci mají i snoRNA, ale plní ji u rRNA – jsou nezbytné pro vyzrání rRNA a tvorbu ribozomů. (Snustad et Simmons, 2009; Staněk, 2015).

MiRNA a siRNA plní téměř identickou funkci – nasednutí na cílovou molekulu mRNA a umlčení jejího přepisu do bílkoviny, liší se však ve způsobu vzniku. Jsou dlouhé pouze dvacet jedna až dvacet čtyři nukleotidů (Jonák, 2007). Všechny popsané typy RNA vznikají transkripcí, ale pouze mRNA podléhá translaci (Snustad et Simmons, 2009).

3.2.5 Stabilizace RNA

Ribonukleová kyselina se stává nestabilní v okamžiku odběru vzorku – je důležité okamžité zmrazení v tekutém dusíku a uložení při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vhodné je použití stabilizačních roztoků – například RNAlater (Ambion, The RNA Company).

RNAlater je stabilizační činidlo, eliminující nutnost vzorky ihned zpracovat či zamrazit v tekutém dusíku. Díky RNAlater lze vzorek uchovávat stabilní po delší dobu – až čtyři týdny při teplotě $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, až sedm dní při teplotě $18 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ či jeden den při teplotě až $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorek lze v činidlo také archivovat, teplota však musí být $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pro delší archivaci). Před archivací musí být vzorek nejdříve přes noc inkubován při teplotě $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté přenesen do teploty archivace. Takto uchovanou rotlinnou tkáň lze rozmrazit a znovu zamrazit až dvacetkrát bez vlivu na jakost či výnos RNA (Ambion, The RNA Company).

3.2.6 Výzkum RNA

3.2.6.1 Výzkum RNA v České republice

Českých vědců, zabývajících se výzkumem RNA, je poměrně mnoho. Dokonce i Grantová agentura ČR grantově podpořila vytvoření Centra pro RNA biologii. V roce 2003 založil Dr. Martin Pospíšek vědeckou konferenci „RNA klub“. Na této konferenci se každoročně vědci, kteří studují RNA, scházejí. V dnešní době na této konferenci prezentují své výsledky i vědci z okolních zemí (Staněk, 2015).

3.2.6.2 Výzkum RNA ve světě

Ribonukleová kyselina je předmětem zkoumání mnoha vědeckých skupin a řada vědců byla za svůj výzkum oceněna Nobelovou cenou – například A. R. Todd za výzkum struktury a syntézy nukleosidů a nukleotidů (1957), dále za rozluštění genetického kódu R. W. Holley, H. G. Khorana a M. W. Nirenberg (1968), W. Gilbert za objev sekvenační metody DNA (1980). Vědec W. Gilbert (1986) navrhl dokonce koncept „RNA světa“ jako možného počátku živých organismů na Zemi (Staněk, 2015).

Gilbertova (1986) teorie „RNA světa“ vychází z poznatku, že RNA je schopná stejně jako DNA uchovávat a předávat genetickou informaci a také katalyzovat různé chemické reakce. „RNA svět“ jsou tedy hypotetická skupina prehistorických buněk, ve kterých

ribonukleové kyseliny předávají genetickou informaci a katalyzují chemické reakce, jež jsou nezbytné pro život. Pokud by bylo toto tvrzení dokázáno, vyřešila by se dávná otázka, zda byla nejdříve slepice či vejce – tedy DNA nebo bílkoviny. Uchovávání genetické informace se přeneslo z RNA na DNA (DNA je chemicky stabilnější a tím vhodnější) a proteiny převzaly buněčné funkce, včetně té katalytické, pro které se lépe hodí. Klíčovou molekulou pro fungování světa RNA je molekula ribonukleové kyseliny, katalyzující syntézu RNA, schopná sama sebe kopírovat a zároveň vyrábět jiné RNA.

3.3 Izolace RNA

Izolovat můžeme celkovou (neboli totální) RNA nebo pouze mRNA. Celková RNA je v podstatě roztok všech typů RNA, základních (mRNA, rRNA, tRNA) a krátkých RNA. Obsahuje také kontaminující DNA, ale lze se jí zbavit působením DNázy. Izolace RNA je technicky mnohem náročnější než izolace DNA, protože má nestabilní charakter a vzorky RNA z různých tkání se liší v obsahu polysacharidů a sekundárních metabolitů. Meisel et al. (2005), potvrzuje, že ovocné stromy, tedy i třešeň, obsahují tyto látky ve velkém množství. Přitom kvalita a integrita RNA je velice důležitá pro mnoho studií v rostlinné molekulární biologii (Gambino et al., 2008).

3.3.1 Pravidla pro úspěšnou izolaci RNA

Pro zdárnou izolaci RNA musí být dodržováno několik následujících pravidel. Prvním z nich je používání sterilních rukavic (Bioline Ltd., The PCR Company, 2011).

Extrakci RNA nezjednodušují ani RNázy, což jsou odolné enzymy, které štěpí RNA, proto musíme veškerý používaný materiál a vodné roztoky, těchto enzymů zbavit. K tomu můžeme použít inhibitory RNáz, například DEPC a chaotropní soli - guanidin isiothiokyanát (GITC). Proti působení RNáz musíme vzorky RNA chránit i po izolaci a to skladováním při teplotách -70 °C (Sambrook et Russell, 2001).

Používáme vodu ošetřenou DEPC, protože diethyl pyrokarbonát (DEPC) modifikuje zbytky histidinu v bílkovinách a tím inaktivuje RNázy. Obvykle se používá 0,1% roztok DEPC. Ve vodných roztocích se DEPC rozkládá na CO₂ a etanol. Lze jej inaktivovat autoklávováním, protože i malé množství DEPC, které zůstane v roztoku, může inaktivovat biochemické reakce a modifikovat RNA. 1 ml DEPC vystačí na 1 litr roztoku (Sambrook et Russell, 2001).

Dekontaminace je dalším pravidlem. Pro inaktivaci RNáz lze žáruvzdorné sklo péct při teplotě 180 °C až několik hodin a materiály z polykarbonátu či polystyrénu můžeme dekontaminovat 15 minutovým namočením do 3% peroxidu vodíku a následně opláchnout vodou, která je bez RNáz (Bioline Ltd., The PCR Company, 2011).

Vždy se musíme ujistit, aby všechny komerčně zakoupená činidla a chemikálie zaručovaly, že jsou bez RNáz. Před použitím lze doporučit testování každé šarže.

Také se doporučuje používání jednorázových plastových nádob, které mohou výrazně snížit riziko kontaminace vzorků, nebo v případě kontaminace alespoň minimalizují šíření (Bioline Ltd., The PCR Company, 2011).

3.3.2 Izolace RNA z ovocných dřevin

Extrakci RNA z ovocných stromů, ztěžuje vysoké množství obsažených polyfenolů a polysacharidů, proto většina konvenčních metod v získání RNA vysoké kvality a čistoty selhala. Z toho důvodu je dnes možné najít mnoho modifikací existujících metod (Hu et al., 2002).

Polysacharidy se spolusrázejí s proteiny a vytváří sraženiny, jež jsou opětovně těžko rozpustné. Nejčastěji jsou odstraněny využitím CTAB. Polyfenoly, které jsou snadno oxidovatelné, se spolusráží s proteiny a nukleovými kyselinami. Nukleové kyseliny se tak stávají nerozpustné. Polyfenoly je možné odstranit přidáním PVP k extrakčnímu pufru (Salzman et al., 1999).

Hu et al. (2002) použili k extrakci RNA z ovocných dřevin modifikovanou CTAB metodu a následnou analýzu provedli RT-PCR a northern blot analýzou.

Izolací RNA z rostlinných tkání s vysokým obsahem polyfenolů a polysacharidů se zabýval například Vasanthaiah et al. (2008), konkrétně u révy vinné (*Vitis vinifera*). Použili vlastní metodu zahrnující vysokou koncentraci nerozpustného PVP a předeřátého extrakčního pufru. Množství izolované RNA bylo stanoveno měřením absorbance 230, 260 a 280 nm ve vodě a integritu RNA elektroforézou na agarózovém gelu.

Izolací RNA z broskvoní se zabývali Meisel et al. (2005). Využili fenol-chloroformovou metodu a metodu guanidium thiokyanát-fenol-chloroformovou metodu. Pro analýzu RNA zvolili RT-PCR.

3.4 Metody izolace RNA

3.4.1 Lýza buněk

Všechny níže popsané metody mají společný začátek – jako první musí být nukleové kyseliny (v našem případě RNA) uvolněny z buněčného obsahu. Postup, kterým provedeme lýzu buněk, musí být dostatečně účinný, aby došlo k narušení výchozího vzorku, ovšem ne na tolik, aby zničil nukleovou kyselinu. Proto volíme mezi mechanickým poškozením buňky či šetrnějšími způsoby - fyzikálně, chemicky či enzymaticky (Grard et al., 2007).

Mechanické poškození poškozují buňku za pomoci fyzikálních sil - proces je označován jako homogenizace. Zkoumaný vzorek lze rozřezat skalpelem nebo rozemlít ve vortexu pomocí kuliček. Takový postup může být velice časově náročný, při zpracování většího množství vzorků (Geciova et al., 2002).

Mezi fyzikální lýzu buněk patří osmotický šok, kdy je buňka vystavena vysokému osmotickému tlaku. Chemické narušení buněk využívá permeabilitu buněčné membrány a enzymatická lýza buněk enzymaticky nepatrně rozmělní proteiny (Geciova et al., 2002).

Konvenční metody pro izolaci RNA obvykle zahrnují použití lyzačních roztoků s detergenty, jako jsou dodecylsírán sodný (SDS) nebo cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), denaturačních organických rozpouštědel – fenol či chloroform, redukčních činidel – β -merkaptoethanol a dithiotreitol, nebo denaturačních činidel (chaotropních solí) – guanidin thiokyanát (Gambino et al., 2008).

3.4.2 Typy metod izolace RNA

3.4.2.1 Fenol-chloroformová izolace

Nejznámější metodou pro izolaci nukleových kyselin je fenol-chloroformová extrakce. Metoda je založena na práci Kirbyho z roku 1956. Fenol-chloroformová izolace ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné v pufru (vodné prostředí), zatímco jsou ostatní složky lyzátu odstraněny. Lyzát buněk je promíchán se směsí fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (případně lze použít pouze roztok fenolu). Aby byla metoda účinná pro izolaci RNA, musí mít fenol pH 5-6 a vyšší teplotu. Směs se rozdělí na dvě fáze, dolní chloroformovou a horní vodnou, stane se tak díky chloroformu, organickému rozpouštědлу, které se nemísí s vodným roztokem lyzátu. Následným protřepáváním dochází k mísení obou fází a fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze,

protože přidaný izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Po dokončení protřepání, je roztok odstředěn pro dokonalé oddělení fází a na jejich rozhraní se obvykle objeví prstenec sražených proteinů, který má bílou barvu. Poté je horní fáze, která obsahuje nukleové kyseliny, přenesena do nové čisté zkumavky. Aby proteiny byly odstraněny dokonale, musí být extrakci zopakována opětovným přidáním směsi fenol-chloroform-izoamylalkoholu a protřepávat, dokud se na rozhraní nepřestane objevovat již zmíněný prstenec s vysráženými proteiny. Protože izolujeme rostlinné buňky, je nutné odstranit i polysacharidy extrakcí s CTAB. Posledním krokem fenol-chloroformové metody je další extrakce, pouze se směsí chloroformu s izoamylalkoholem (v poměru 24:1), z důvodu odstranění stop fenolu (Sambrook et Russell, 2006; Zumbo, 2012).

Vysrážet nukleové kyseliny z přečištěného vodného roztoku, můžeme přidáním koncentrovaného etanolu, kdy se po odstředění objeví pelet (mléčně zbarvený sediment) na dně zkumavky. Účinnost srážení zvyšují soli – u izolace RNA se jedná o soli guanidinové - které se srážejí s nukleovými kyselinami a dávají peletu bílé zbarvení. Soli je poté nutno odmyt 70% etanolem. Po odsátí supernatantu, můžeme čisté nukleové kyseliny rozpustit ve vodě nebo ve vodném pufru. Abychom získali pouze RNA z nukleových kyselin, odstraníme DNA za pomoci DNáz (Sambrook et Russell, 2006).

Fenol-chloroformová metoda je bohužel velmi časově náročná, pracná a vyžaduje mnoho spotřebního materiálu, proto je použití této tradiční metody na ústupu a bývá nahrazována použitím speciálních kolonek, jejichž matrix na sebe naváže RNA z připraveného lyzátu, a dalšími komerčně dostupnými produkty (Burdychová et Sládková, 2007).

3.4.2.2 Adsorpční metoda

Adsorpční metoda, jak uvádí Melzak (1996), využívá vlastnost nukleových kyselin vázat se na povrchy z SiO_2 (oxidu křemičitého), tedy skla, v přítomnosti chaotropních solí. Mezi chaotropní soli patří jodid sodný (NaI), guanidin thiokyanát a guanidin hydrochlorid. Tyto soli se společně se suspenzí silikátových částic přidávají k roztoku, který obsahuje zlyzovaný buněčný obsah. Silikátové části se váží k RNA (tuto vazbu můžeme usnadnit protřepáváním), zatímco ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku. Lze je snadno odstranit – centrifugací nebo sedimentací. Roztok nad částicemi se následně odsaje a supernatant propláchne novou dávkou pufru s chaotropními solemi. RNA, která je přečištěná, se lze

snadno uvolnit přidáním vody či vodné pufru – tentokrát bez obsahu chaotropních solí. Po odstředění na dně zůstanou již jen samotné částice a nad nimi čistý roztok RNA.

Adsorpční metoda je velice oblíbená pro její rychlost a jednoduchost, i proto jsou na této metodě založeny komerční soupravy (kity). Z této metody také vychází izolace kolonkovou metodou, při které nejdříve proběhne lýze buněk, následuje vysrážení RNA etanolem a navázání na křemíkovou membránu kolony. Dále se navázaná RNA promývá. Posledním krokem je eluce – uvolnění promyté RNA z kolony do zkumavky (Melzak et al., 1996).

3.4.2.3 Izolace RNA za použití CTAB

V roce 1993 vytvořil Chang se svým kolektivem protokol, využívající extrakční pufr s cetrimoniumbromidem (též cetyltrimethylamoniumbromid) neboli CTAB. Tato metoda po homogenizaci materiálu zahrnuje inkubaci s extrakčním roztokem CTAB při teplotě 65 – 68 °C. Extrakční roztok obsahuje detergent CTAB, který poruší membrány, denaturuje proteiny a uvolňuje proteiny; dále pufr udržující optimální pH 8 – 9; soli uvolňující proteiny, udržující polysacharidy v rozpustné formě a vysolující PCR inhibitory; redukční činidla – merkaptoethanol – blokující oxidační procesy, které vedou k destrukci nukleových kyselin; chelatační činidla (EDTA), která blokují dvojmocné ionty kovů a může obsahovat i další složky, jako například PVP, který odstraňuje polyfenoly. Dalším krokem této metody je přidavek roztoku chloroform-isoamylalkohol, jež způsobí vysrážení polysacharidy a proteiny, také rozpustí tuky a oddělí od sebe fáze, které se objeví až po centrifugaci. Centrifugace následuje po 5 minutové inkubaci a jejím výsledkem je supernatant neboli vodná fáze s extrahovanými nukleovými kyselinami (tuto fázi odpipetujeme a dále s ní pracujeme), fáze s vysráženými proteiny a polysacharidy a jako poslední organická fáze. Ze supernatantu, přeneseného do nové zkumavky, vysrážíme nukleové kyseliny etanolem nebo izopropanolem (nejlépe ponechat přes noc) a následně izolujeme precipitát nukleových kyselin centrifugací. Nukleové kyseliny poté vysušíme. Získaný odparek se rozpouští ve vhodném roztoku.

Bohužel klasický postup byl velice časově náročný, a proto vzniklo mnoho modifikací toho protokolu se snahou postup urychlit. Jeden z těchto upravených protokolů například vytvořil Gambino et al. (2005), tím bylo umožněno izolovat RNA v pouhých třech hodinách. Navíc je možné izolovat RNA z různých druhů dřevin, včetně třešně. Postup je následovný. V mikrocentrifugační zkumavce zahřejeme extrakční pufr – obsahující CTAB, PVP, Tris, EDTA a β -merkaptoethanol, přidáme vzorek, ze kterého chceme izolovat RNA, inkubujeme,

poté se přidá chloroform s izoamylalkoholem v poměru 24:1 a vše se centrifuguje. Odebereme supernatant a provedeme druhou extrakci s chloroform-izoamylalkoholem. Supernatant přeneseme do nové zkumavky, přidáme chlorid lithný ve směsi s ethanolem, který se používá pro srážení RNA, a směs znovu inkubujeme. Po centrifugaci se objeví peleta nukleových kyselin, kterou resuspendujeme v SSTE pufru a vše se společně s přidaným přehřátým chloroform-izoamylalkoholem centrifuguje. Supernatant je opět přenesen do nové zkumavky, kde se po přidání studeného izopropanolu vysráží RNA. Naposledy centrifugujeme a peletu promyjeme se 70% ethanolem, vysušíme a resuspendujeme v DEPC-vodě. Většina protokolů popisuje obdobný postup, ale liší se například v obsahu látek tvořící extrakční pufr nebo době či teplotě centrifugace.

3.4.2.4 TRIzol single step metoda

Metodu, která používá kombinaci guanidin thiokyanát-fenol-chloroform, vytvořili Chomczynski et Sacchi (1987). Do té doby byla nejpoužívanější metodou izolace na základě guanidinium thiokyanátu, která ovšem vyžadovala dlouhé hodiny ultracentrifugací s roztokem chloridu cesného. Guanidin thiokyanát poskytuje metodě výhodu v podobě deaktivace RNáz v průběhu procesu izolace.

Podobně jako tomu bylo u izolace pomocí fenol-chloroformu, je prvním krokem lýza buněk, ovšem tentokrát je v lyzačním roztoku obsažen guanidin thiokyanát a fenol. K lyzátu se přidá chloroform a vše se důkladně protřepe. Zmíněná denaturační činidla (guanidin thiokyanát, fenol a chloroform) způsobí oddělení proteinů od nukleových kyselin, avšak až centrifugace rozdělí roztok na tři fáze. Horní vodnou obsahující RNA, mezifázi s DNA a dolní fázi organickou s denaturovanými proteiny. RNA z horní vodné fáze musí být odebrána velice opatrně, aby nebyla kontaminována s mezifází, poté je precipitována a oplachována alkoholy (Chomczynski et Sacchi, 1987).

3.4.2.5 Magnetická separace

Magnetická separace je prováděna za použití magnetizovaných částic – MPs – na jejich povrch (s podobnými vlastnostmi jako silikát) se naváží nukleové kyseliny a následně se oddělí od zbytku směsi. Tato metoda má tři části: promytí – imobilizace – eluce. Nejdříve jsou magnetizované částice promyty, aby došlo k oddělení od roztoku, ve kterém byly uchovány a imobilizují se – přidáním k roztoku nukleových kyselin. Imobilizace je

nedůležitější část metody, dochází k izolaci nukleových kyselin, pevným navázáním na částice – na základě afinity NK k látce na povrchu magnetizovaných částic. Imobilizace probíhá v opakujících se cyklech třepání a centrifugace. Poté se znovu promyjí, čímž se odstraní kontaminanty, a přidá se eluční roztok. Při eluci se roztok s nukleovými kyselinami zahřívá a působením teploty a pH elučního roztoku, se nukleové kyseliny uvolní z částic. Působením vnějšího magnetického pole, jsou poté magnetizované částice přichyceny ke stěnám zkumavky a roztok, který již obsahuje pouze nukleové kyseliny, se přenesse do nové zkumavky (Vlčnovská et al., 2012).

3.4.2.6 RNA extrakční kity a TRIsure™

Izolovat RNA nemusíme pouze tradičními metodami, v dnešní době je mnoho komerčně nabízených souprav pro extrakci RNA.

Jedná se o RNA extrakční soupravy neboli kity, které mohou být manuální nebo založené na technologii membránových kolon. K dispozici jsou také automatické izolátory, ke kterým jsou dodány i kompatibilní extrakční kity, fungující buď na principu využití magnetických částic, ale i membránových kolon. Pro každý typ materiálu je dostupný příslušný izolační protokol. (Bioline Ltd., 2011). Například jedním z kitů, který lze použít pro izolaci RNA jak z čerstvých rostlinných tkání, tak i zmrazených, je ISOLATE Plant RNA Mini Kit od výrobce Bioline. Tento kit je vytvořen pro rychlou a efektivní izolaci extrémně čisté celkové RNA z různých tkání rostlin (listy, kůra, kořeny apod.) (Bioline Ltd., 2011).

TRIsure™ (Bioline) je činidlo, udržující integritu extrahované RNA, zatímco narušuje buňku a následně rozpouští buněčné komponenty. Postup je popsán v protokolu od výrobce, který slibuje, že izolovaná RNA je vysoce kvalitní s výbornou čistotou a koncentrací. Bez nutnosti dalších úprav a čištění, je ihned připravena k dalšímu použití (Bioline Ltd., 2011).

3.4.3 Skladování izolované RNA

Pokud bychom pracně izolovanou RNA skladovali nevhodným způsobem, RNA by degradovala a nebyla by použitelná pro následné analýzy. Rozhodující je působení RNáz, teplota a doba uchovávání RNA. Bílek (2008) při svém výzkumu zjistil, že není významný rozdíl degradace RNA, která byla uchovávána ve vodě ošetřené DEPC či RNA prosté vodě.

Degradovatelnost RNA je také ovlivněna vlivem času a působením teploty. Bylo zjištěno, že RNA uchovávaná při teplotě 20 °C zcela degraduje po jednom týdnu. Pokud byl

izolovaný vzorek uchováván při teplotě 5 °C, degradace probíhala pozvolněji – v prvním týdnu byla pouze nepatrná, ovšem v dalších týdnech již byla výraznější. Nejideálnějšími teplotami pro skladování vyizolované RNA jsou teploty mezi -20 °C až -70 °C, při kterých RNA degraduje i po několika týdnech pouze nepatrně (Sedláčková et al., 2009). Není tedy zásadní rozdíl mezi skladováním vzorků izolované RNA v lednici nebo mrazáku (Bílek et al., 2008).

3.4.4 Hodnocení kvality RNA

Spektrofotometrie se používá pro kvalifikaci vyčištěné celkové RNA pomocí spektrofotometru měřící absorpci záření při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm (Gasic et al., 2004). Současně bývá často používán typ spektrofotometru nazývaný „NanoDrop“. Tento typ přístroje dokáže analyzovat vzorek ve velikosti 0,5 až 2 µl. Využívá k tomu optický kabel, na jehož konec je napipetován vzorek a pomocí druhého optického kabelu se vytvoří kontakt se vzorkem, jako zdroj světla slouží pulsní xenonová lampa. Přístroj pak analyzuje světlo, které prochází vzorkem (NanoDrop).

3.5 Analýzy RNA

3.5.1 RT-PCR analýza (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

Modifikovaná polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí vychází ze základní polymerázové řetězové reakce (PCR), nejčastěji probíhající ve tříkolových cyklech, zahrnující denaturaci, připojení primerů a syntézu. Metoda bude popsána níže (Bartůňková et Paulík, 2005).

3.5.1.1 Základní polymerázová řetězová reakce

Základní PCR musí obsahovat vzorek DNA se zkoumaným vzorkem, syntetické oligonukleotidy, směs všech deoxynukleotidtrifosfátů, Mg^{2+} ionty, *Taq* polymerázu a PCR pufr. Vše začíná přípravou syntetických oligonukleotidů (primery), sloužící jako základ pro tvorbu nových vláken a to tím, že specificky hybridizují na obou koncích cílového úseku DNA. V dnešní době dokáží syntetizovat primery o požadované sekvenci automatizované přístroje bez větších finančních nákladů. První fází PCR je tepelná denaturace (při teplotě 95 °C) vzorku DNA, kterou vzniknou dva jednoduché řetězce. Poté co teplota vzorku klesne k 50

– 60 °C, dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA (Bartůňková et Paulík, 2005). Termostabilní DNA polymeráza dále katalyzuje syntézu nových vláken, často se používá takzvaná *Taq* polymeráza - jedná se o DNA polymerázu izolovanou z bakterie *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Díky tomuto enzymu se prodlužují vlákna DNA směrem od obou primerů (od 5' konce ke 3' konci). Aby došlo k denuraci nově vytvořených DNA duplexů, je nutno zkumavku s PCR reakcí po dokončení syntézy obou vláken zahřát na 95 °C a celý cyklus může začít znovu. Každým dalším cyklem denaturace a syntézy, se počet kopií úseku mezi nasedlými primery zdvojnásobí. Ovšem logaritmicky roste pouze množství kopií požadované sekvence DNA, ostatní úseky výchozí DNA se neamplifikují (Saiki et al., 1988).

Modifikací klasické PCR je také tzv. real-time PCR, která má výhodu v rychlosti a vysoké citlivosti, díky tomu je vhodná k testování velkého množství vzorků. Záznam amplifikace je založený na principu fluorescence.

3.5.1.2 Reverzně-transkriptázová PCR

Reverzně-transkriptázová PCR na rozdíl od PCR dokáže detekovat mRNA. Při této metodě je nejdříve mRNA přepsána do cDNA za pomoci reverzní transkriptázy získané například z MLV (Molonyho virus myši leukemie) nebo AMV (virus ptačí myeloblastózy), která je inaktivována po skončení syntézy prvního vlákna cDNA. Úseky DNA potřebné k analýze, dále množíme pomocí klasické polymerázové řetězové reakce (Šmarda et al., 2005).

Bartůňková et Paulík (2005) tvrdí, že celý postup také může být zjednodušen provedením reverzní transkripce a PCR v jedné reakci. To za určitých podmínek umožňuje již výše zmíněná *Taq* polymeráza, mající kromě DNA polymerázové i aktivitu reverzně-transkriptázovou (Saiki et al., 1988).

Jako primery u RT-PCR mohou být použity specifické oligonukleotidy, směs náhodných oligonukleotidů či oligo(dT) primer, navazující se na poly(A) terminální část molekuly mRNA – tím umožňuje syntézu cDNA ve směru od 5' k 3' konci (Bartůňková et Paulík, 2005).

RT-PCR byla použita při analýze dvouvláknové RNA *Prunus avium* s příznaky stem pitting viru (Zhang et al., 1998).

3.5.1.3 Reverzní transkripce následovaná kvantitativní PCR

RT-qPCR neboli reverzní transkripce následovaná kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí, je modifikací RT-PCR analýzy, kterou lze využít i u krátkých RNA. Při této analýze je používán termocykler se zařízením měřící fluorescenční záření po každém cyklu PCR. Právě fluorescenční barviva a sondy, se používají při sledování nově syntetizovaných vláken DNA. Z křivek, které jsou výstupem RT-qPCR a ukazují nárůst množství PCR produktu v čase, lze stanovit absolutní kvantifikaci původní množství sledované RNA nebo relativní kvantifikaci, kdy je stanovovaná RNA vyjádřena jako relativní poměr k množství referenčního genu (Bustin et al., 2005).

RT-qPCR využili například Zhu et al. (2015) při výzkumu pupenů *Prunus pseudocerasus* při dormanci.

3.5.2 Elektroforéza

Elektroforéza, jež je ústřední metodou molekulární biologie, se používá pro oddělení nukleových kyselin a proteinů, které se od sebe liší velikostí nebo náboji. Elektroforéza je založena na skutečnosti, že se v roztoku molekuly biopolymerů pohybují rychlostí závisící na poměru jejich náboje a hmotnosti (molekula s větším nábojem se v elektrickém poli bude pohybovat rychleji, než molekula s menším nábojem, i přesto že budou mít stejnou hmotnost a tvar). Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, udělující jim záporný náboj, proto se v gelu pohybují od katody k anodě. Bez ohledu na velikost, mají nukleové kyseliny téměř stejný poměr náboje a hmotnosti. Proto by nebylo možné rozdělit nukleové kyseliny podle velikosti při elektroforéze probíhající pouze v roztoku. Z toho důvodu se používají při elektroforéze gely – agarózové či polyakrylamidové, vytvářející molekulární síto s kanálky, umožňujícími pohyb dělených molekul. Pomocí gelové elektroforézy je možné rozlišit fragmenty, které se od sebe liší o pouhá procenta své délky (Kuthan, 2009).

Gel je nejčastěji odlíván do připravené formy s hřebínkem, po kterém zůstávají jamky – do nichž jsou po vyjmutí nanášeny vzorky s nukleovými kyselinami, a po vyjmutí je umístěn do elektroforetické vany a zalit elektroforetickým pufrem.

Samotný gel se skládá z agarózy nebo polyakrylamidu. Každý z nich má specifické vlastnosti vhodné pro konkrétní úkoly. Častěji se můžeme setkat s elektroforézou na agarózovém gelu (Sambrook et Russell, 2001).

Agaróza je polysacharid extrahovaný z mořských řas. Koncentrace, ve které se obvykle používá, je 0,5 až 2% - čím vyšší je koncentrace agarózy, tím je gel tužší. Výhodou agarózových gelů je snadná příprava – smícháním agarózového prášku s pufrčním roztokem a roztavit zahříváním. Agarózové gely dokáží separovat široké spektrum nukleových kyselin, ale jejich nevýhodou je malá rozlišovací schopnost. Jednotlivé frakce se dají zobrazit pod UV světlem, pokud do agarózového gelu před skončením elektroforézy přidáme ethidium bromid (Sambrook et Russell, 2001).

Zatímco polyakrylamid je sesíťovaný polymer akrylamidu. Délka polymerních řetězců je dána koncentrací použitého akrylamidu, což je obvykle 3,5 až 20%. Příprava polyakrylamidových gelů je značně náročnějších než gelů agarózových, - polymerace musí probíhat bez přítomnosti vzdušného kyslíku, který jinak proces inhibuje. Další nevýhodou je toxicita akrylamidu, jež je silný neurotoxin. I přes to, že je polyakrylamidový gel považován za netoxický, měly by se používat rukavice z důvodu možné přítomnosti volného akrylamidu. Výhodou akrylamidových gelů je vysoká rozlišovací schopnost, i když na rozdíl od agarózových gelů dokáží separovat pouze malý rozsah nukleových kyselin (Sambrook et Russell, 2001). Po provedení elektroforézy lze detekovat konkrétní molekuly ribonukleové kyseliny northernovým přenosem.

Gelová elektroforéza byla použita k analýze RNA izolované z listů třešně ptačí, broskvoně obecné, hrušně obecné a jabloně obecné v protokolu Gambina et al. (2008) a následně také k northern blot analýze.

3.5.3 Northern blot

Analýza northern blot (neboli northernový přenos) patří mezi hybridizační metody, umožňuje analyzovat expresi genů, sledovat přítomnost či nepřítomnost vybraných transkriptů či studovat alternativní sestřih mRNA. Vychází z techniky Southern blot, kterou pro vyhledávání příbuzných sekvencí u DNA vyvinul Edward Southern v roce 1975, která byla modifikována pro přenos ribonukleových kyselin. Autoři metody northern blot ukryli do názvu špetku humoru – jak je popsáno výše, vychází tato metoda ze Southernova přenosu („jižní“ přenos), proto pojmenovali přenos pracující s RNA „severní“, tedy northern blot. Pro velký úspěch této slovní hříčky, se metoda pro přenos proteinů na membránu pojmenovala „západní“ - western blot (Kuthan, 2009).

Provádí se po agarózové elektroforéze, ale jedná se o alternativu detekce oproti barvení ethidium bromidem. Separovaná RNA je přenesena na membránu, například

nylonovou či nitrocelulózovou. Přenos se uskuteční běžným kapilárním způsobem – přiložením membrány na gel, využitím vakua nebo elektropřenosu. Na membránu je nutno ribonukleovou kyselinu ireverzibilně imobilizovat, toho docílíme vysušením či UV světlem. Následně probíhá hybridizace za použití hybridizačního roztoku s přidanými chemicky či radioaktivně značenými sondami, vše se přes noc inkubuje, po inkubaci se roztok zničí a je přidán promývací roztok. Díky promývacímu roztoku se z membrány odmyjí nespecificky navázané sondy. Zatímco sondy navázané na membráně vizualizujeme – tím že membránu exponujeme na rentgenový film. Tato detekce hybridizované sondy poskytne specifický vzor proužků, které odpovídají restričním fragmentům obsahujícím komplementární sekvenci k použité sondě (Trayhurn, 1996).

Northern blot použil Sasaki et al. (2011) při analýze listů infikovaných ALSV u jabloní a hrušní.

3.5.4 Dot-blot

Dot-blot metoda je v podstatě zjednodušená northern blot analýza. Na rozdíl od northern blot analýzy, se při dot-blotu neprovádí gelová elektroforéza - výhodou je tedy menší časová náročnost. Pro detekci je využívána specifická vazba mezi antigenem a protilátkou. Membrána s navázanými nukleovými kyselinami je ponořena do roztoku s protilátkami (Vlčnovská et al., 2014).

Dot blot analýza našla uplatnění například při S genotyping a S screening s využitím SFB genového polymorfismu u japonských švestek a třešní ptačích podle Kitashiba et al. (2008).

3.5.5 Microarray

Technologii microarrays poprvé představil Patrick Brown a jeho kolegové v roce 1995. První microarray neboli RNA čipy byly vytvořeny za použití cDNA odvozené od produktů polymerázové řetězové reakce PCR. Používáním termínu RNA mikročipy odkazujeme na použití při měření úrovně RNA, zatímco DNA mikročipy udávají sekvenci nebo úroveň DNA. RNA microarrays, využívající se při analýze genové exprese a kvantifikaci mRNA, jsou soubory mikroskopických políček se sondami navázanými na pevný povrch. Každý fragment cDNA, představující individuální gen, je imobilizován na podložní sklíčko, potažené DNA-vázající chemikálií jako je například aminosilan. Toto políčko může

být tisknuto jako celý genom mikročipů nebo se zaměřením na konkrétní sekci genů (Khademhosseini et al., 2011).

Microarray je klíčovou analýzou v protokolu Lee et al. (2007), kde je využita k vyhodnocení genové exprese u jabloní, konkrétně u odrůdy Fuji.

4 Hodnocení metod používaných k extrakci a analýze RNA

Fenol-chloroformová metoda patří mezi tradiční metody, je však časově náročná a velmi pracná. Nehodí se pro extrakci RNA ze vzorků v malém množství (například roztok o objemu 10 μ l), jelikož pro provedení této metody je spotřebováno velké množství vstupního materiálu. Často také dochází ke kontaminaci mezi jednotlivými vzorky, obávám se, že tím je snížena využitelnost této metody oproti ostatním metodám.

Metoda adsorpce na silikát nevyžaduje speciální vybavení laboratoře. Výhodou je také jednoduchost, rychlost a pohodlnost této metody. V dnešní době se na principu této metody zakládají komerční soupravy pro izolaci ribonukleové kyseliny.

Klasická extrakční metoda používající CTAB byla velice časově náročná a pracná, proto vzniklo mnoho modifikací, které extrakci významně urychlily. Popisovaná modifikace dle Gambina (2008) byla úspěšná. RNA, vyizolována za méně než tři hodiny, byla bez proteinů, polysacharidů a polyfenolů. Degradace RNA během extrakce byla pouze velmi malá nebo žádná.

Metoda, kterou vytvořili Chomczynski a Sacchi, využívající guanidium thiokyanát-fenol-chloroformu. Díky guanidium thiokyanátu je oproti tradiční chloroformové metodě užitečnější při izolaci RNA a není náročná na použití inhibitorů RNáz. Nevýhodou je používání organických rozpouštědel, na druhou stranu patří tato metoda k levnějším variantám. Také tato metoda je používána pro výrobu komerčních kitů, čímž se redukuje práce s nebezpečnými činidly. Metoda se osvědčila pro analýzy northern blot a dot-blot.

Magnetická separace je velice přesná metoda izolace RNA., u které je malé riziko vzájemné kontaminace vzorků. Také je základem pro komerční kity k izolaci RNA.

RT-PCR dokáže detekovat a kvantifikovat, na rozdíl od klasické PCR, mRNA. RT-PCR je nejcitlivější metoda, schopná detekovat mRNA z jedné buňky. RT-PCR byla použita při analýze dvouvláknové RNA *Prunus avium* s příznaky stem pitting viru v protokolu od Zhang et al. (1998).

Elektroforéza stanovuje integritu izolované RNA na agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Častěji je používán gel garózový, výhodu má ve snadné přípravě a schopnosti separace širokého spektra nukleových kyselin. Jeho nevýhodou je malá rozlišovací schopnost. Opačně je tomu u gelu polyakrylamidového, který je náročnější na přípravu. Nevýhody polyakrylamidového gelu jsou v toxicitě akrylamidu (silný neurotoxin) a

schopnosti separovat pouze malý rozsah nukleových kyselin. Výhodou akrylamidových gelů je však vysoká rozlišovací schopnost. Gelová elektroforéza byla úspěšně použita k analýze RNA izolované z listů třešně ptačí v protokolu Gambina et al. (2008) a následně také k northern blot analýze.

Northern blot patří mezi hybridizační analýzy a je používána k detekci a kvantifikaci mRNA stejně jako RT-PCR, ovšem není tak citlivá.

Dot-blot analýza je zjednodušený northern blot. Vynecháním elektroforézy je, dle mého názoru, analýza značně urychlena a výhodou dot-blot je tedy menší časová náročnost.

Microarray mohou být zaměřeny na celý genom či pouze na konkrétní sekci genů. Jejich výhodou je možnost provádět více analýz najednou. Microarray použil Lee et al. (2007) při hodnocení genové exprese u jabloní. Zdá se, že microarray budou mít v budoucnu velké zastoupení mezi analýzami RNA.

5 Závěr

Cílem mé práce bylo vypracovat literární rešerši, věnující se metodám izolace RNA a jejich následné analýzy s přihlédnutím k problematice použití u třešně ptačí.

Bylo zjištěno, že izolace RNA třešně je důležitá pro zachování a reprodukci genových zdrojů třešně ptačí, která je součástí tzv. ušlechtilých listnáčů. Výzkumy třešně ptačí se zabývají nedostatečným množstvím kvalitního sadebního materiálu, potřebného ke šlechtění nových odrůd.

Izolace RNA třešně je komplikována obsahem polyfenolů a polysacharidů, vyskytujících se u ovocných dřevin v hojné míře. Polyfenoly je možné odstranit přidáním PVP do extrakčního pufru, zatímco polysacharidy použitím CTAB. Při volbě metody izolace RNA by měla být tato skutečnost zohledněna.

Analýzy izolované RNA jsou popsány v samostatné kapitole. Ke každé analýze je stručně uvedeno, v jakých případech byla použita při analýze u čeledi *Rosaceae*.

V budoucnu by mohla být práce rozšířena o nové poznatky, týkajících se modifikací metod a analýz k izolaci RNA.

6 Seznam použité literatury

Ambion, The RNA Company. RNAlater™ Protocol [online]. [cit. 10. 4. 2016]. Dostupné z <http://www.inen.sld.pe/bttportal/archivos/RNA.pdf>.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P. 2008. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. Garland Science. ISBN: 978-0-8153-4106-2.

Bartůňková, J., Paulík, M. 2005. Vyšetřovací metody v imunologii. Grada. s. 92-94.

Bioline Ltd. The PCR Company. Product Catalog 2011/2012 [online]. [cit. 10. 3. 2016]. Dostupné z <http://www.labmark.cz/soubory/bioline-katalog-rmaguide.pdf>.

Bílek, K., Zrůstová, J., Knoll, A. 2008. Determination of RNA stability using reverse transcription real-time PCR. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. LVI (4). 219-222.

Burdychová, R., Sládková, P. 2007. Mikrobiologická analýza potravin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. s. 208. ISBN: 978-80-7375-116-6.

Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. J Mol Endocrinol. 34 (3). 597-601.

Červenka, M., Cigánová, K. 1989. Klíč k určování dřevin podle pupenů a větviček. Státní pedagogické nakladatelství Praha. s. 178.

Dzhangaliev, A. D., Salova, T. N., Turekhanova, P. M. 2003. The wild fruit and nuts plants of Kazachstan. Horticultural Reviews. 29, 305-371.

EUFORGEN. About EUFORGEN [online]. [cit. 8. 4. 2016]. Dostupné z <http://www.euforgen.org/about-euforgen/>.

Fér, F. 1994. Lesnická dendrologie 2. část, listnaté stromy. VŠZ – lesnická fakulta a Matice lesnická s.r.o, Písek. s. 162.

Ferkl, F. 1958. Třešně, višně a sladkovišně. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha. s. 259.

Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I. 2008. A rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. *Phytochemical Analysis*. 19, 520-525.

Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S. S. 2004. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22, 437a-437g.

Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry- *International Dairy Journal*. 12 (6). 541-553.

Gilbert, W. 1986. RNA world. *Nature*. 319, p. 6055.

Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., Gritsun, T. S., Holmes, E. C., Gould, E. A., de Lamballerie, X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. 361, 80-92.

Hejný, S., Slavík, B. 1997. Květena České republiky 3. Praha, Academia. s. 442-444.

Hu, C. G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T., Moriguchi, T. 2002. A Simple Protocol for RNA Isolation from Fruit Trees Containing High Levels of Polysaccharides and Polyphenol Compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20, 69a-69g.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11 (2). 113-116.

Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162, 156-159.

Chrtěk, J. 1992. Amygdalaceae D. Don. In: Hejný, S., Slavík, B. (eds.). 1992. Květena České republiky III. Academia, Praha.

Jašková, E. PRUNUS AVIUM (L.) L. – třešeň ptačí / čerešňa vtáčia [online]. Botany. 28. 4. 2008. [cit. 10. 3. 2016]. Dostupné z <http://botany.cz/cs/prunus-avium/>.

Jonák, J. 2007. RNA v proteosyntéze. Genetický kód a příprava aminoacyl-tRNA. Živa 2007 (5). 195.

Kitashiba, H., Zhang, S. L., Wu, J., Shirasawa, K., & Nishio, T. 2008. S genotyping and S screening utilizing SFB gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. Molecular Breeding. 21 (3). 339-349.

Khademhosseini, A., Suh, K. Y., Zourob, M. 2011. Biological Microarrays, Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press. ISBN: 9781597455510.

Kobliha, J., Janeček V. 2001a. Šlechtění třešně ptačí v Evropě [online]. Lesnická práce. 80 (6/01). [cit. 1. 4. 2016]. Dostupné z <http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-80-2001/lesnicka-prace-c-6-01/slechteni-tresne-ptaci-v-evrope>.

Kobliha, J., Janeček V. 2001b. Šlechtění třešně ptačí v České republice [online]. Lesnická práce. 80 (9/01). [cit. 1. 4. 2016]. Dostupné z <http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-80-2001/lesnicka-prace-c-9-01/slechteni-tresne-ptaci-v-ceske-republice>.

Kopec, K., 1998; Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny, ÚZPI Praha; ISBN 80-86153-64-9.

Kudrna, K. 1987. Naučný slovník zemědělský. Praha, Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Státní zemědělské nakladatelství: s. 683.

Kuthan, M. 2009. Hybridizační metody studia nukleových kyselin. Živa. 2009 (1). 44-45.

Lee, Y. P., Yu, G. H., Seo, Y. S., Han, S. E., Choi, Y. O., Mok, G., Kim, D., Kim, W. T., Sung, S. K. 2007. Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. *Plant cell reports*. 26 (7). 917-926.

Lilley, D. M. J. 2003. The origins of RNA catalysis in ribozymes. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 28 (9). 495-501.

Martinovský, J., Pozděna, M. 1987. Klíč k určování stromů a keřů. Státní pedagogické nakladatelství Praha. s. 82.

Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baezayates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Gonzalez, M., Orellana, A., Retamales, J., Silva, H. 2005. A rapid and Efficient Method for Purifying High Quality Total RNA from Peaches (*Prunus persica*) for Functional Genomics Analyses. *Biol Res*. 38. 83-88.

Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B., Haynes, C. A. 1996. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 181 (2). 635-644.

Morávková, A., Forstová, J. 2008. Ribonukleové kyseliny jako katalyzátory biochemických reakcí. *Živa*. 2008 (2). 53-56.

NanoDrop. NanoDrop Products [online]. [20. 3. 2016]. Dostupné z <http://www.nanodrop.com/Products.aspx>.

Novák, J., Skalický, M. 2012. Botanika – cytologie, histologie, organologie, systematika. 3. vydání. Powerprint. s. 241. ISBN: 978-80-87415-53-3.

Paule, L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Príroda a.s., Bratislava. s. 340.

Russel, K. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. p. 6. ISBN: 92-9043-572-0.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science, New Series*. 239. 487-491.

Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. 1999. An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17 (1). 11-17.

Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. p. 999. ISBN-10: 0879695765.

Sambrook, J., Russell, D. W. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006 (1). 4455.

Sasaki, S., Yamagishi, N., Yoshikawa, N. 2011. Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods*. 7 (1). 1.

Sedláčková, T., Knoll, A., Svobodová, K. 2009. Degradation of nucleic acids in various laboratorial conditions [online]. [cit. 20. 3. 2016].

Dostupné z https://mnet.mendelu.cz/mendelnet09agro/files/articles/bz_sedlackova.pdf.

Snustad, P., Simmons M. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno. s. 871. ISBN: 978-80-210-4852-2.

Staněk, D. 2015. RNA – temná hmota v našich buňkách [online]. Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR. [cit. 29. 3. 2016]. Dostupné z http://www.vedakolemnas.cz/miranda2/m2/sys/galerie-download/vkn_19web.pdf?0.5278496608656893.

Sus, J., Blažek, J. 2002. *Obrazový atlas peckovin 1. Odrůdy slivoní, třešní a višní*. Nakladatelství květ, Praha.

- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2005. Amplifikace nukleových kyselin, *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno – Kraví hora. s. 73-110.
- Tekewe, A., Abera, G., Berhamu, G. 2012. Ribozymes: Nucleic acid enzymes with potential pharmaceutical applications. *Pharmacophore* 2012. 3 (3). 164-178.
- Trayhurn, P. 1996. Northern blotting. *Proceedings of the Nutrition Society*. 55. 583-589.
- Vasanthaiyah, H. K. N., Katam, R., Sheikh M. B. 2008. Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysacharides for gene expression studies. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11 (3).
- Vávra, M. 1965. Pěstování a využití švestek a třešní. *Státní zemědělské nakladatelství*. s. 176.
- Vlčnovská, M., Šmerková, K., Vaculovičová, M., Křížková, S., Kizek, R. 2014. Detekce nukleových kyselin pomocí metody dot-blot. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014 (1). 55—58.
- Vlčnovská, M., Šmerková, K., Dostálová, S., Sochor, J., Kizek, R. 2012. Izolace DNA pomocí magnetizovatelných částic a jejich využití v diagnostice nádorových onemocnění [online]. [cit. 29. 3. 2016]. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/data/up/Kizek_BOD_2012.pdf.
- Vondráček, J. 1979. Třešně. Višně. In: Dvořák, A., Cvopa, J., Jašík, K., Kalásek, J., Lánská, D., Richter, M., Schubert, V., Vachůn, Z. (eds.). 1979. *Atlas odrůd ovoce*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Zdražil, S. 2007. Ribonukleové kyseliny. Věcně „druhé“ mezi nukleovými kyselinami. *Živa*. 2007 (3). 98-100.
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C. 1998. Analysis of double-stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. *Plant Disease* 82 (8). 871-874.

Zhu, Y., Li, Y., Xin, D., Chen, W., Shao, X., Wang, Y., Guo, W. 2015. RNA-Seq-based transcriptome analysis of dormant flower buds of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*). *Gene*. 555 (2). 362-376.

Zumbo P. Phenol-chloroform extraction [online]. Weil Cornell Medical College 3. 10. 2012. [cit. 29. 3. 2016].

Dostupné z <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>.

7 Seznam použitých zkratek

A	adenin
ALSV	apple latent spherical virus
AMV	virus ptačí myeloblastózy
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA / syntetická deoxyribonukleová kyselina
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanin
GITC	guanidin isothiokyanát
lncRNA	long non-coding RNA / dlouhá nekódující RNA
miRNA	mikro RNA
MLV	Molonyho virus myší leukemie
mRNA	mediátorová/messenger RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
pre-mRNA	pre-messenger RNA
PVP	polyvinylpyrrolidon
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RT-qPCR	reverzní transkripce následovaná kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí
SDS	dodecylsírán sodný
SFB	S-haplotype-specific F-box gene
siRNA	short interfering RNA / krátká interferující RNA
snoRNA	short nucleolar RNA / krátká jadéřková RNA
snRNA	short nuclear RNA / krátká jaderná RNA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIzol	guanidin thiokyanát-fenol-chloroformová metoda
tRNA	transferová RNA
U	uracil

8 Seznam obrázků

Obr. 1 Nukleotidy RNA – str. 16

Obr. 2 Centrální dogma – str. 17