

## Efficiency of real-time PCR for 18S rRNA amplification of *Sorbus domestica*, L.

Jana Žiarovská, Petronela Poláčeková

### ABSTRACT

Nowadays, the awareness is given more and more to underutilized and unusual fruits. One of them is *Sorbus domestica*, L. not only as an endangered species, but as well as a promising and economically usable crop. The work was aimed for finding a total genomic DNA isolating method from fresh plant material and confirmation of the optimized method by the detection of 18S rRNA gene using real-time PCR. Two commercial isolation kits were tested - Invisorb® SpinPlant Mini Kit and Wizard® Genomic DNA. Higher purity and yield of DNA isolation kit showed Invisorb kit. The effective and pure PCR amplification was confirmed for Invisorb, too when 20 ng undiluted DNA at annealing temperature of 64.5 °C.

**Keywords:** *Sorbus domestica*, L., real-time PCR, 18S rRNA

### ÚVOD

Menej využívané druhy rastlín predstavujú vo výžive človeka viaceré možnosti prechádzajúce od netradičného spštenia jedálneho lístka cez cenný zdroj fytotherapeutických látok až po kandidátov na veľkopestované druhy budúcnosti.

Jarabina oskorušová je druhom, ktorý odhliadnuc od poskytovania dreva vysokej kvality, je známy plodmi s významnými liečivými účinkami používanými ako v ľudovej medicíne pri črevných ochoreniach a chudokrvnosti, tak vo farmaceutickom priemysle, kde sa extrakt z plodov používa na zastavenie krvácania a tiež ako diuretikum (Velgošová a Velgoš, 1988; Pagan a Pagano, 2000). Na spštenie stravy sa môžu plody pridávať do ovocných mís a pudingov či už v čerstvom stave alebo konzervované. Využívajú sa na prípravu marmelád a muštov. Veľmi vhodné je aj sušenie, plody potom slúžia ako hrozienka so špecifickou a odlišnou chuťou. Jedia sa samotné alebo sa pridávajú do cereálií, pudingov a pod (Brindza et al., 2009).

Jednoznačné stanovenie prítomnosti konkrétnej zložky v zmeskových materiáloch a potravinách sa dnes využíva pri potvrdzovaní pravosti potravín (Zeľňáková et al., 2010; Bajzík et al., 2010), či analýzach prítomnosti alergénnych alebo zdraviu škodlivých látok (Škultéty, Jurčáková, 2011; Bajzík et al., 2011) pomocou ELISA, PCR a real-time PCR metód.

Real-time PCR je metodicky postavená na meraní nárastu signálu fluorescencie v závislosti na zvyšujúcom sa počte amplifikovaných kópií cieľového produktu umožňuje široký rozsah kvantifikácie rádovo 7-8 logaritmickej dekád, vysokú presnosť (< 2 % štandardná odchýlka) a vysokú senzitivitu (< 5 kópií), pričom vysoká špecifita je zaistená dvoma primermi a jednou sondou (Wong, Medrano, 2005).

Detekcia produktu reakcie využíva fluorescenčne značené molekuly, ktoré zodpovedajú množstvu amplifikovanej DNA v každom cykle. Florescenčne značené môžu byť sekvenčne špecifické primery či sondy alebo farbivá

viažuce sa na DNA. Pri absolútnej kvantifikácii počtu kópií amplifikovaného produktu sa ako štandard využívajú sekvencie metabolických génov alebo génov RNA. Gén 18S rRNA je jedným z najdôležitejších molekulárnych markerov, ktorý sa používa v rôznych aplikáciách ako molekulárne fylogenetické analýzy a sledovanie biodiverzity (Lin et al., 2000; Meyer et al., 2010; Benali et al., 2011).

Všeobecne platí, že sekvencie génu rRNA sú ľahko prístupné vďaka vysoko konzervovanými hraničným oblastiam umožňujúcim použitie univerzálnych prajmerov. Ich opakované usporiadanie v rámci genómu poskytuje dostatočné množstvo templátu pre PCR reakciu (Meyer et al., 2010).

Cieľom práce bola analýza efektivity zrnovania 18SrRNA v genóme *Sorbus domestica*, L. real-time PCR metódou vo vzťahu k použitej izolačnej súprave a vypracovanie metodického postupu pre 18S rRNA marker konštrukcie štandardnej krivky v real-time analýzach vyhodnocovania prítomnosti obsahu jarabiny oskorušovej v potravinách či liečivách.

### MATERIÁL A METÓDY

K identifikácii 18S rRNA génu bolo použitých 5 náhodne vybraných vzoriek odobraných z jedného stromu *Sorbus domestica*, L. Materiál na izoláciu DNA bol odobraný vo forme listov z jedinca rastúceho v Botanickej záhrade SPU. Následne bol sterilizovaný v 70 % etanole. Ako zmäčkovadlo bola použitá destilovaná voda. Materiál na izoláciu bol spracovaný podľa pokynov izolačnej súpravy Invisorb®SpinPlant Mini Kit, Invitrogen a Wizard® Genomic DNA podľa návodu výrobcu a kvalita a kvantita DNA bola stanovená prístrojom Qubit™ Fluorometer Invitrogen. Materiál z každej odobranej vzorky bol izolovaný oboma izolačnými súpravami.

Zmnoženie sekvencie bolo zabezpečené dvojicou prajmerov s nasledovným poradím nukleotidov: priamy prajmer 5'GGCCAAGGAAGTTTGAGGCAA 3' a spätný prajmer 5'TGGGGTTATTTAGCTGGTGTGTACA 3'.

Pre PCR reakciu detegujúcu intenzitu fluorescenčného signálu v reálnom čase bol pripravený roztok pozostávajúci z iQ™ SYBR® GreenSupermix (Biorad), 20 ng neriedenej celkovej genomickej DNA a 400 nmol prajmerov v termocykléri CFX96 Real-time detection systém.

Časový a teplotný profil PCR reakcie ako aj následnej analýzy teploty topenia amplifikovaného produktu bol nasledovný: 95 °C počas 3 minút nasledovných 95 °C - 15 s., 61 °C - 30 s., 72 °C - 40 s. Tento cyklus sa opakoval 45 krát. Odčítanie fluorescencie vznikajúceho produktu prebehlo po fáze predlžovania a analýzy teploty topenia boli odčítavané počas 0,5 sec v teplotných nárastoch 0,5 °C.

Pre výpočet  $T_m$  samotného produktu PCR reakcie bol softvér slúžiaci ako oligonukleotidová kalkulačka, ktorá slúži na získavanie vlastností jedno a dvojreťazcovej DNA alebo RNA sekvencie voľne dostupná na [www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html).

Postup PCR reakcie bol nasledovný: preinkubácia 95 °C na 4 min., 40 cyklov obsahujúcich denaturáciu pri 95 °C na 45 sekúnd, nasadenie pri 61 °C po dobu 45 sekúnd a predlžovanie pri 72 °C po dobu 1,5 min. záverečný predlžovací krok bol pri teplote 72 °C počas 7 min. a schladenie na teplotu 20 °C na čas 0,01 sekúnd.

Získané PCR fragmenty boli vizualizované na 1 % agarózovom géle pomocou ethidiumbromidu pri 125 V.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Invisorb® SpinPlant Mini Kit umožňuje rýchlu a efektívnu izoláciu genomovej DNA vo vysokej kvalite z najrôznejších druhov rastlín (čerstvého, mrazeného alebo sušeného rastlinného materiálu, napríklad listy, korene, plody alebo semená). Tento kit v sebe spája rozrušenie bunkových stien a cytoplazmatických membrán rastlinného materiálu s vysoko účinnou väzbou genomickej DNA na povrch rotačného filtra bez chaotropných iónov. Izolačný protokol poskytuje vysoký výnos a čistotu izolovanej genomovej DNA. Čas nevyhnutný pre celý postup je znížený na minimum, pričom až 100 mg čerstvého rastlinného materiálu je možné spracovať do 20 minútach po úvodnej inkubácii vzorky.

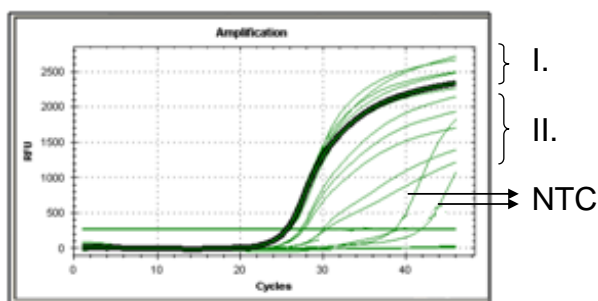
Wizard® Genomic DNA izolačný kit je určený na izoláciu DNA z bielych krviniek, tkanivových kultúr a živočíšnych tkanív, rastlinných tkanív, kvasníc a grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií. Je založený na štvorkrokovom - rozrušenie a rozklad buniek a jadier, degradácia proteínov zrážaním solí za súčasného zabezpečenia vysokej molekulovej hmotnosti genomickej DNA v roztoku. Nakoniec sa genomická DNA čistí zrážaním izopropanolom.

Obe izolačné súpravy poskytujú izolát celkovej genomickej DNA, ktorá, vzhľadom k vysokej čistote, je pripravená na použitie pre širokú škálu ďalších aplikácií ako sú analýzy molekulárnych markérov, enzymatické štiepenie, sekvenovanie a klonovanie.

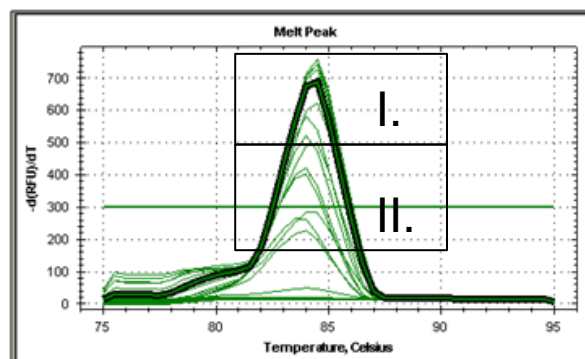
**Tabuľka 1** Porovnanie výťažnosti získaného množstva DNA oboma použitými izolačnými súpravami.

Vzorka číslo	Výrobca	Množstvo genomickej DNA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Výrobca	Priemer ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
J1B (B)	Wizard	3,863	Invisorb	19,7
J2B (B)		7,99		18,77
J3B (B)		5,904		17
J4B (B)		5,92		17,36
J6B (B)		15,94		21,33

Na vyhodnotenie efektivity reakcie v závislosti na izolačnej súprave bola použitá amplifikačná krivka, krivka topenia produktu a vrchol topenia produktu. Na to, aby reakcia prebehla štandardne, musí krivka dosiahnuť všetky tri fázy PCR- exponenciálnu, lineárnu aj fázu nasýtenia. Prahový cyklus  $C_t$  bol určený na hodnote 300 RFU.



**Obrázok 1** Priebeh nárastu fluorescencie počas real-time PCR. I. – vzorky izolované komerčnou súpravou Invisorb; II. – vzorky izolované komečnou súpravou Wizard; NTC – kontrola bez DNA



**Obrázok 2** Krivky teploty topenia produktu zmnoženého v real-time PCR. I. – vzorky izolované komerčnou súpravou Invisorb; II. – vzorky izolované komečnou súpravou Wizard

Vzorky izolované súpravou Invisorb (ilustrované zvýraznením vzorky J6B) pri použití 20ng DNA a 4  $\mu\text{M}$  prajmera dosiahli prahový cyklus na úrovni 25, pričom krivka zobrazujúca nárast fluorescencie prebiehala pri všetkých štandardne. Obrázok 1 ilustruje, že dosiahla fázu nasýtenia a konečný bod fluorescencie bol zaznamenaný pri hodnote 2295 RFU.

Aj ostatné vzorky, kde bola celková genomická DNA izolovaná súpravou Invisorb boli charakterizované krivkami, ktoré dosiahli fázu nasýtenia a mali štandardný priebeh.

Pri vzorkách pochádzajúcich z izolácie Wizardom bola zaznamenaná výrazná zmena v priebehu krivky nárastu fluorescencie oproti vzorkám izolovaným Wizardom. Amplifikačná krivka neprebíhala štandardne a nedosiahla ani lineárnu fázu. Reakcia začala prebiehať, no v dôsledku nevyhovujúcich podmienok – kvalita izolácie nevyhovujúca druhu *Sorbus domestica*, L. pre účely real-time PCR – nastala derivácia RFU a krivka sa ďalej nevyvíjala v dôsledku nízkej fluorescencie v PCR.

**Tabuľka 2** Hodnoty parametrov Real-Time PCR pre analyzované vzorky jarabiny

Vzorka	Izolačná súprava	Prah cyklu $c_t$	Koncový bod RFU
J1B (B)	Invisorb	25,29	2434
J2B (B)		27,48	1873
J3B (B)		25,60	2295
J4B (B)		26,09	2229
J6B (B)		25,79	2652
J1B (B)		Wizard	30,00
J2B (B)	27,70		1652
J3B (B)	30,37		1115
J4B (B)	25,43		2459
J6B (B)	34,16		589

Potvrdenie amplifikácie žiadaneho produktu bolo uskutočnené analýzou teploty topenia produktu vznikajúceho v reakcii a zhodne pre všetky vzorky dosahovala hodnotu 84 - 84,5 °C, pričom iba pri vzorkách izolovaných súpravou Invisorb bola krivka topenia dostatočne preukazne vypovedajúca o ako efektívite, tak aj dostatočnom množstve zmožneného 18S rRNA génu.

Z analýz vyplýva odporúčenie vhodnosti izolačného kitu Invisorb ako jednoznačne vhodnejšieho k primárnemu spracovaniu biologického materiálu jarabiny na účely izolácie celkovej genomickej DNA. Pri rôznych typoch rastlinného materiálu je však situácia odlišná, a v prípade napríklad ľanu siateho, je izolačný kit Wizard dostatočne citlivý a vhodný (Žiarovská et al., 2012).

## ZÁVER

Nutnosť testovania rôznych metodických prístupov je pri analýzach rastlinného, prípadne potravinárskeho materiálu v prípade real-time PCR analýz nevyhnutnosťou, keďže v dôsledku vysokej citlivosti a presnosti je táto metóda silne náchylná k detekcii rôznych nešpecifických produktov vznikajúcich počas reakcie. Predovšetkým pri použití nešpecifických farbív sa vyskytujú problémy s nešpecifickým signálom (Wittwer, et al., 1997).

V molekulárnej biológii existuje niekoľko metód na meranie množstva cieľových sekvencií nukleových kyselín. Tieto metódy sa však vyznačujú viacerými nedostatkami. Sú časovo náročné, prácne, nedostatočne citlivé, vyžadujú použitie rádioaktivity alebo sa vyznačujú možnou pravdepodobnosťou krížovej kontaminácie (Reischl et al., 2002). PCR techniky pri optimalizovanom systéme poskytujú efektívnu možnosť presného potvrdenia či vyvrátenia prítomnosti analyzovaných súčastí.

## LITERATÚRA

BAJZÍK, P., GOLIAN, J., ŽIDEK, R., ČAPLA, J., BELEJ, L., ONDREJKA, M., MRÁZOVÁ, L., MARŠÁLKOVÁ, L.

2010. Methods for fish species identification in foodproducts, In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 3, p. 1-5.

BAJZÍK, P., ŽIDEK, R., GOLIAN, J., BELEJ, L., ČAPLA, J., MARŠÁLKOVÁ, L., REVÁK, O. Optimisation of species identification of common carp (*Cyprinus carpio*) using SYBR® GREEN I real-time PCR method. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no. 3, p. 1-5.

BENALI, S., MOHAMED, B., EDDINE, H. J., NEEMA, C. 2011. Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. In *European Journal of Scientific Research*. vol. 50, 2011, no.1, p.110-123.

BRINDZA, J., ČERVENÁKOVÁ, J., TÓTH, D., BÍRO, D., ŠAJBIDOR, J. 2009. Unutilized potential of True Service Tree (*Sorbus domestica*, L.) In *Acta Hort.* (ISHS) vol. 806, 2009, p. 717-726.

LIN, J.J., FLEMING, R., KUO, J., MATTHEWS, B. F., SAUNDERS, J.A. 2000. Detection of Plant Genes Using a Rapid, Nonorganic DNA Purification Method. In *BioTechniques*, vol. 28, 2000, p. 346-350.

MEYER, A., TODT, CH., MIKKELSEN, N. T., LIEB, B. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (*Mollusca*) resist standard PCR amplification and give new insights into mollus substitution rate heterogeneity. In *BMC Evolutionary Biology*. 2010, vol. 10.

REISCHL, U., WITTEWER, C. T., COCKERILL, F. 2002. Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications; Microbiology and FoodAnalysis. New York Springer-Verlag, 2002.

ŠKULTÉTY, O., JURČÁKOVÁ, A. 2011. EVA GREEN real-time PCR used to detect cellery as an allergen in food, In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no. 2, p. 70-72.

WITTEWER, C. T., RIRIE, K. M., ANDREW, R. V. 1997. The Light Cycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. In *Biotechniques*, vol. 22, 1997, p. 176-181.

WONG, M. L., MEDRANO, J. F. 2005. Real-time PCR form RNA quantitation. In *BioTechniques*, vol. 39, 2005, p. 75-85

ZELEŇÁKOVÁ, L., ŽIDEK, R., ČANIGOVÁ, M., PAULOVA, J., GALLISOVÁ, T. 2010. Evaluation of ELISA method to detection of cowβ-lactoglobulin in sheepmilk and sheepmilk products, In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 4, p. 80-84.

ŽIAROVSKÁ, J., RAŽNÁ, K., SENKOVÁ, S., ŠTEFÚNOVÁ, V., BEŽO M. Variability of *Linum usitatissimum* L. based on molecular markers. In *ARP Journal of Agricultural and Biological Science*, vol. 7, 2012, p. 50-58.

## Acknowledgments:

Táto práca bola podporená grantom Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity - ECOVA, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Contact address:

Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Plant Genetics and Breeding, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: jana.ziarovska@uniag.sk

Ing. Petronela Poláčková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Plant Genetics and Breeding, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: Petronela.polacekova@uniag.sk