

- Spencer-Phillips, P.T.N., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.) 2002. - *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Thordal Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. 1997. - *Plant J.* **11**: 1187-1194.
- Vallélian-Bindschedler, L., Schweizer, P., Mössinger, E., Métraux, J.P. 1998. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 185.
- Whipps, J.M., Budge, S.P., Fenlon, J.S. 1998. - *Plant Pathol.* **47**: 36.

Poděkování. Výzkum byl podporován projektem MŠMT „Stresová a patologická biologie, biochemie a bioenergetika rostlin“ (MSM 153100010) a GAČR 522/02/D011.

Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*)

JOSEF PATZAK

Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, (tel.: 415 732 109, Fax: 415 732 150, e-mail: j.patzak@telecom.cz)

Úvod

Viroidy jsou nezávislou třídou rostlinných patogenů, autonomně se replikujících molekul RNA, bez proteinového pláště. Kružnicová, infekční RNA, vysoce stabilní, se sekundární strukturou podobnou tyčince o velikosti 246 až 401 nt, je plně závislá a adaptovaná na metabolismus hostitelské rostliny. Replikace probíhá mechanismem otáčející se kružnice. RNA polymerasa II syntetizuje (-) polymerní řetězce sloužící jako matrice (+) polymerům, jež jsou štěpeny na monomery a ligovány do kroužků. Syntéza je lokalizována v buněčném jádře a jadérku. U molekul viroidů podskupiny viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) můžeme rozlišit pět strukturních domén, charakteristických pro nativní stav: centrální konzervativní oblast (CCR), oblast patogenity, oblast s vysokou sekvenční variabilitou a dvě koncové domény. Do této podskupiny patří i chmelové viroidy (Diener 1999).

Chmel patří svou rozlohou, 80 tisíc hektarů ve světovém měřítku, k minoritním hospodářským plodinám, přesto náleží k plodinám s dlouholetou pěstitelskou minulostí. Jeho pěstování v České republice má nejméně tisíceletou historii a vždy znamenalo vysoký ekonomický podíl na celkovém hospodářství státu. Na chmelu parazitují dva viroidy: viroid zakrslosti chmele (HSVd), o velikosti 297 nukleotidů, a latentní viroid chmele (HLVd), o velikosti 256 nukleotidů. HSVd se na chmelu vyskytuje pouze v Japonsku a Jižní Korei, avšak jednotlivé kmeny HSVd parazitují celosvětově na dalších hostitelských rostlinách trvalých kultur, jako jsou ovocné stromy a réva vinná. HLVd parazituje pouze na chmelu a vyskytuje se celosvětově téměř na všech pěstitelských plochách.

Přestože je HLVd nazýván „latentním“ viroidem, byla u něj v posledních letech zjištěna hospodářská závažnost, projevující se změnou obsahu sekundárních metabolitů ve chmelové hlávce. Tento fakt vedl k experimentům o jeho eliminaci z rostlin chmele, když nejúčinnější bylo použití kultivace meristémů v podmínkách *in vitro* (Patzak *et al.* 2001). K detekci viroidů v rostlinném pletivu nelze využít imunoenzymových metod, proto jsou využívány molekulární metody na bázi nukleových kyselin: *Dot-blot* molekulární hybridizace (Matoušek *et al.* 1994) a RT-PCR (Matoušek a Patzak 2000). Pro obě tyto metody je nutné izolovat viroidní RNA z rostlinného pletiva chmele. Protože tato pletiva obsahují mnoho polyfenolických látek, polysacharidů a dalších sekundárních metabolitů (hořké kyseliny, silice) v hlávkách, kde je i koncentrace H-Vd nejvyšší, je velice problematické izolovat RNA ve vysoké kvalitě a množství. Pro sériovou diagnostiku je též důležitá časová a finanční náročnost použité metody. Hlavním cílem této práce tak bylo porovnat několik různých metod izolace RNA: 7 popsaných, 6 modifikovaných a 5 komerčních izolačních souprav, vhodných pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci a RT-PCR. Získané výsledky mohou být aplikovány i u jiných rostlinných druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů.

Metody izolace RNA

Výchozím materiálem pro objektivní porovnání RNA izolačních metod byla shodná množství (100 mg) homogenizovaného vzorku hlávek z 9 rostlin chmele světového sortimentu Chmelařského institutu s.r.o. v Žatci.

Pro porovnání bylo vybráno celkem 18 metod izolace RNA: 7 popsaných, 6 modifikovaných a 5 komerčních izolačních souprav. Ověření kvality izolované RNA bylo provedeno pomocí *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR.

1. metoda (A) izolace byla metoda podle Matouška *et al.* (1994). Rostlinný materiál (0,4 g) byl homogenizován v třecí misce, společně s pískem a 0,6 ml AMESS pufru (0,5 M octan sodný pH 6,0, 10 mM MgCl₂, 3 % SDS, 20 % ethanol, 1 M NaCl). K homogenizovanému vzorku bylo přidáno 0,8 ml chloroformu a řádně promíseno. Směs byla poté přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugována při 14 000 obr.min⁻¹ po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Pro molekulární hybridizaci bylo odebráno 100 µl supernatantu.

2. metoda (B) izolace byla metoda podle Farkase *et al.* (1999). Zmrazený rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován v třecí misce, společně s 0,4 ml extrakčního pufru (50 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,3 % 2-merkaptoethanol, pH 7,6) a 0,4 ml fenolu. Směs byla poté přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugována při 14 000 rpm po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl homogenizován se shodným množstvím směsi fenolu a chloroformu (1 : 1) a po centrifugaci bylo vše opakováno se shodným množstvím chloroformu. Supernatant byl srážen dvojnásobným objemem vychlazeného ethanolu (-20 °C). Sraženina byla po 20 minutách oddělena centrifugací při 14 000 obr.min⁻¹ po dobu 20 minut při 4 °C a rozpuštěna v 50 µl destilované vody zbavené ribonukleas.

3. metoda (C) izolace RNA byla metoda podle Kiefera *et al.* (2000). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 2 ml mikrozkuhavky obsahující 1 ml extrakčního pufru (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 2 % cetylmoniumbromid (CTAB), 2 % polyvinylpyrrolidon (PVP), 0,5 % spermidin, 2 % 2-merkaptoethanol) přehřátého na 65 °C. Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1) a 200 μ l *Nucleon PhytoPure DNA extraction resin* (Amersham Life Science, UK). Vzorek byl homogenizován vortexováním 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugován při 13 000 obr. min^{-1} po dobu 5 minut při 4 °C. Supernatant byl v nové mikrozkuhavce homogenizován ve 250 μ l směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1). Po další centrifugaci při 13 000 rpm po dobu 2 minut při 4 °C byl supernatant sražen s dvěma objemy chladného (4 °C) isopropanolu a sraženina RNA byla po 5 minutách na ledu opět oddělena centrifugací (13 000 obr. min^{-1} po dobu 5 minut při 4 °C) a rozpuštěna v 50 μ l destilované vody zbavené ribonukleas.

4. metoda (D) izolace RNA byla metoda podle Salzmana *et al.* (1999). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky obsahující 0,5 ml extrakčního pufru (4 M guanidiumthiokyanát, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM citronan sodný, 0,5 % N-laurylsarkosin, 1 % PVP, 2 % 2-merkaptoethanol). Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním 10 min při pokojové teplotě a pak centrifugován (14 000 obr. min^{-1} po dobu 10 minut při 4 °C). Supernatant byl sražen s dvojnásobným objemem ethanolu a 5 M NaCl (v poměru 9 : 1) a po 3 hod při -20 °C opět centrifugován. Sraženina byla rozpuštěna v 0,5 ml destilované vody zbavené ribonukleas. Poté bylo přidáno 0,5 ml směsi fenol (TE saturovaný, pH 8,0) chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním 5 min při pokojové teplotě a centrifugována (14 000 obr. min^{-1} po dobu 10 minut při pokojové teplotě). Supernatant byl znovu přesrážen za shora uvedených podmínek a sraženina rozpuštěna v 50 μ l destilované vody zbavené ribonukleas.

5. metoda (E) izolace RNA byla metoda podle Lala *et al.* (2001). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl ve 2 ml mikrozkuhavce s 1 ml extrakčního pufru (8 M guanidiumhydrochlorid, 20 mM EDTA, 20 mM morpholinethansulphonová kyselina (MES), 2 % 2-merkaptoethanol, pH 7,0) deproteinován 1 ml směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), a poté centrifugován při 10 000 obr. min^{-1} po dobu 20 minut při 7 °C. Supernatant byl homogenizován se shodným množstvím směsi chloroform-isoamylalkohol (24 : 1) a po centrifugaci (10 minut) byl přesrážen s 0,2 objemy 1 M kyseliny octové a 0,7 objemy isopropanolu. Po 3 hod při 20 °C a centrifugaci (10 000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C) byla sraženina dvakrát promyta 3 M octanem sodným a následně 70 % ethanol. Vysušená sraženina byla rozpuštěna v 50 μ l destilované vody zbavené ribonukleas.

6. metoda (F) izolace RNA byla metoda podle Chomczynskiho a Sacchiho (1987). Rostlinný materiál (0,1 g) byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky obsahující 0,5 ml extrakčního pufru (4 M guanidiumthiokyanát, 25 mM citronan sodný pH 7,0, 0,5 % N-laurylsarkosin, 0,1 M 2-merkaptoethanol). Poté bylo přidáno 0,1 ml 2 M octanu sodného a 0,9 ml směsi fe

nol-chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1), vzorek byl homogenizován vortexováním a ponechán 15 min na ledu. Po centrifugaci ($12\,000\text{ obr.min}^{-1}$ po dobu 10 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl supernatant přesrážen se shodným objemem vychlazeného isopropanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a získaná sraženina 20 minut centrifugována, vysušena a rozpuštěna v $50\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody zbavené ribonukleas.

7. metoda (G) izolace RNA byla metoda podle Malnoy *et al.* (2001). Rostlinný materiál ($0,1\text{ g}$) byl homogenizován s tekutým dusíkem a s 25 mg polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) v třecí misce. Vzorek byl poté přenesen do 2 ml mikrozkušavky obsahující $0,5\text{ ml}$ extrakčního pufru ($0,225\text{ M}$ Tris-borate, 5 mM EDTA, 4% dodecylsulfát sodný (SDS), $0,02\%$ 2-merkapt ethanol), bylo k němu přidáno $0,7\text{ ml}$ fenolu nasyceného TBE a po homogenizaci vortexováním byl ponechán 30 s při $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po té bylo ke vzorku přidáno $0,7\text{ ml}$ směsi chloroform-isoamylalkohol ($24 : 1$), ten ponechán 30 s na ledu a centrifugován při $14\,000\text{ obr.min}^{-1}$ po dobu 40 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl deproteinován se shodným množstvím směsi chloroform-isoamylalkohol ($24 : 1$) a po další centrifugaci (10 minut) přesrážen s $0,625$ objemy 8 M LiCl (2 hod na ledu). Centrifugovaná sraženina (30 minut) byla promyta 3 M LiCl a 70% ethanolom a rozpuštěna v $100\text{ }\mu\text{l}$ NET pufru ($0,1\text{ M}$ NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). K rozpuštěnému vzorku bylo přidáno $40\text{ }\mu\text{l}$ 2-butoxyethanolu a byl ponechán 20 minut na ledu. Supernatant byl precipitován s $0,625$ objemy 8 M LiCl přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaná sraženina (centrifugace 15 minut) byla promyta 3 M LiCl a následně 70% ethanolom a po vysušení rozpuštěna v $50\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody zbavené ribonukleas.

Při modifikacích bylo cílem zkrácení, zlevnění či zlepšení použité metody. První modifikovanou metodou byla metoda H, která vycházela z metody A. Místo extrakčního pufru však byla použita pouze voda s $0,1\%$ PEG 20000. Další metodou, modifikující metodu A, byla metoda I, kde opět do extrakčního pufru bylo přidáno $0,1\%$ PEG 20000. Modifikace metod B, C, D a CH spočívaly v homogenizaci rostlinného materiálu bez použití tekutého dusíku v extrakčním pufru s pískem. U těchto metod byly eliminovány i časově náročné precipitační kroky a RNA byla použita pro molekulární hybridizaci přímo ze supernatantu.

Z komerčně nabízených izolačních souprav RNA sestav bylo vybráno 5 určených i pro rostlinná pletiva. Tyto soupravy jednak využívaly speciálně připravené extrakční roztoky: *ConcertTM Plant RNA reagent* (Invitrogen, USA) – metoda CH, *Tri ReagentTM* (Sigma-Aldrich, USA) – metoda TS a *TriPureTM Isolation reagent* (Roche, SRN) – metoda TR, nebo RNA vazebné kolonky: *RNeasy[®] plant total RNA kit* (Qiagen, SRN) – metoda Q a *GeneEluteTM mammalian total RNA purification kit* (Sigma-Aldrich, USA) – metoda S. Izolace RNA byla prováděna podle instrukcí výrobce a uvedeného protokolu.

Dot-blot molekulární hybridizace

Pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci bylo ke každému vzorku přidáno stejné množství roztoku směsi 37% formaldehyd a $20\times\text{SSC}$ ($0,3\text{ M}$ citronan sodný, 3 M NaCl) v poměru $2 : 3$. Vzorky byly denaturovány při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut, zchlazeny na ledu a nanášeny na membrány v množství odpovídajícím 20 mg čerstvé rostlinné hmoty. Molekulární hybridizace vycházela z metodiky popsané Matouškem *et al.* (1994). Pro porov-

nání byly připraveny radioaktivní, značená [α - 32 P]dCTP (Amersham Life Science, UK), a neradioaktivní, značená pomocí *AlkPhos Direct* (Amersham Life Science, UK), sondy HLVD. Molekulární hybridizace s radioaktivní sondou byly prováděny v izotopové laboratoři ÚMBR AV ČR v Českých Budějovicích.

RT-PCR

RT-PCR vycházela z metodiky popsané Matouškem a Patzakem (2000). Pro reakci byl využit *Qiagen*[®] *OneStep RT-PCR kit* (Qiagen, SRN) a reakční směs byla připravena podle instrukcí výrobce a uvedeného protokolu. Pro detekci HLVD byly použity primery 5'-₂₀₀CCACCGGGTAGTTTCCAAC₁₈₁3' a 5'-₂₀₁ATACAACTCTTGAGCGCCGA₂₂₀3'. RT-PCR probíhala v termocykleru Genius (Techne, UK) s následujícím protokolem: reversní transkripce 30 min 50 °C, denaturace 15 min 95 °C, PCR - 35 cyklů: denaturace 30 s 94 °C, *annealing* (nasednutí primerů) 30 s 54 °C, *elongace* 1 min 72 °C, závěrečná *elongace* 10 min 72 °C.

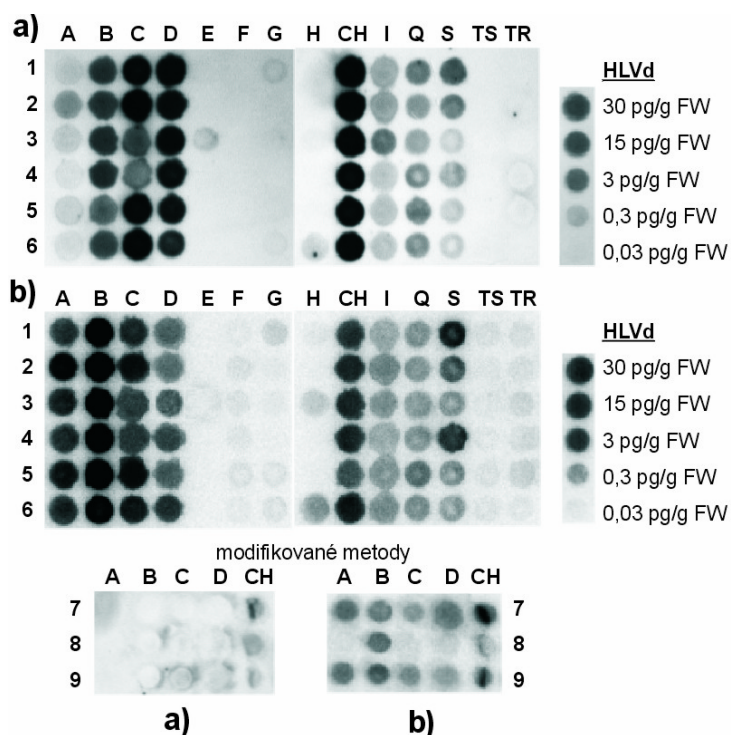
Výsledky

Vyhodnocení experimentálních dat

V našich experimentech jsme se pokusili porovnat několik různých metod izolace RNA vhodných k detekci viroidů v rostlinném pletivu chmele. Detekci viroidů lze provádět pomocí zvolených molekulárních metod: *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR. U *Dot-blot* molekulární hybridizace lze použít jak radioaktivně, tak neradioaktivně značené sondy. Výsledky *Dot-blot* molekulární hybridizace pro jednotlivé metody izolace RNA jsou patrné z obrázku č. 1. Při této analýze se potvrdilo, že námi používaná standardní metoda A je účinnou izolační metodou pro radioaktivní detekci HLVD. U neradioaktivního značení dochází k oslabení hybridizačního signálu vlivem sekundárních metabolitů ve vzorku. Tyto sekundární metabolity se podařilo částečně odstranit využitím PEG 20000 (modifikovaná metoda I), kdy však poklesla intenzita radioaktivních signálů (obr. 1). Shodných výsledků bylo dosaženo pro metody B, C, D a CH, jež byly nejvhodnější izolační metody RNA pro radioaktivní i neradioaktivní *Dot-blot* molekulární hybridizaci. Jejich modifikace, za účelem zkrácení a zlevnění, se výrazně projeví na kvalitě RNA, což značně ovlivnilo hybridizační signály, především s neradioaktivně značenou sondou (obr. 1). Kolonkové izolační metody (Q a S) sice poskytovaly též vhodnou RNA, bohužel při izolaci dochází k výrazným ztrátám RNA na vazebných kolonkách a tím i k oslabení hybridizačního signálu. Ostatní izolační metody (E, F, G, H, TS a TR) neposkytovaly RNA vhodnou pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci.

Odlišných výsledků pro jednotlivé metody izolace RNA bylo dosaženo v RT-PCR analýze, jak je patrné z obr. 2. U metod A a I nebyla prováděna RT-PCR, protože se jednalo o metody izolující celkové nukleové kyseliny a nejsou tak vhodné k enzymovým reakcím, shodně jako je tomu u metod B a H (obr. 2). Jelikož RT-PCR není kvantitativní metodou detekce HLVD v rostlinném pletivu, nelze přesně posoudit která z použitých RNA izolačních metod (C, D, G, CH, Q a S) je lepší (obr. 2). Metody E, F, TR a TS neposkytovaly požadující výsledky, a proto není jejich využití pro RT-PCR vhodné (obr. 2). Z našich předchozích experimentů (Matoušek a Patzak, 2000) vyplývá, že kvantita izolované RNA vnesené do RT-PCR neovlivňuje účinnost enzymové reakce, naopak menší

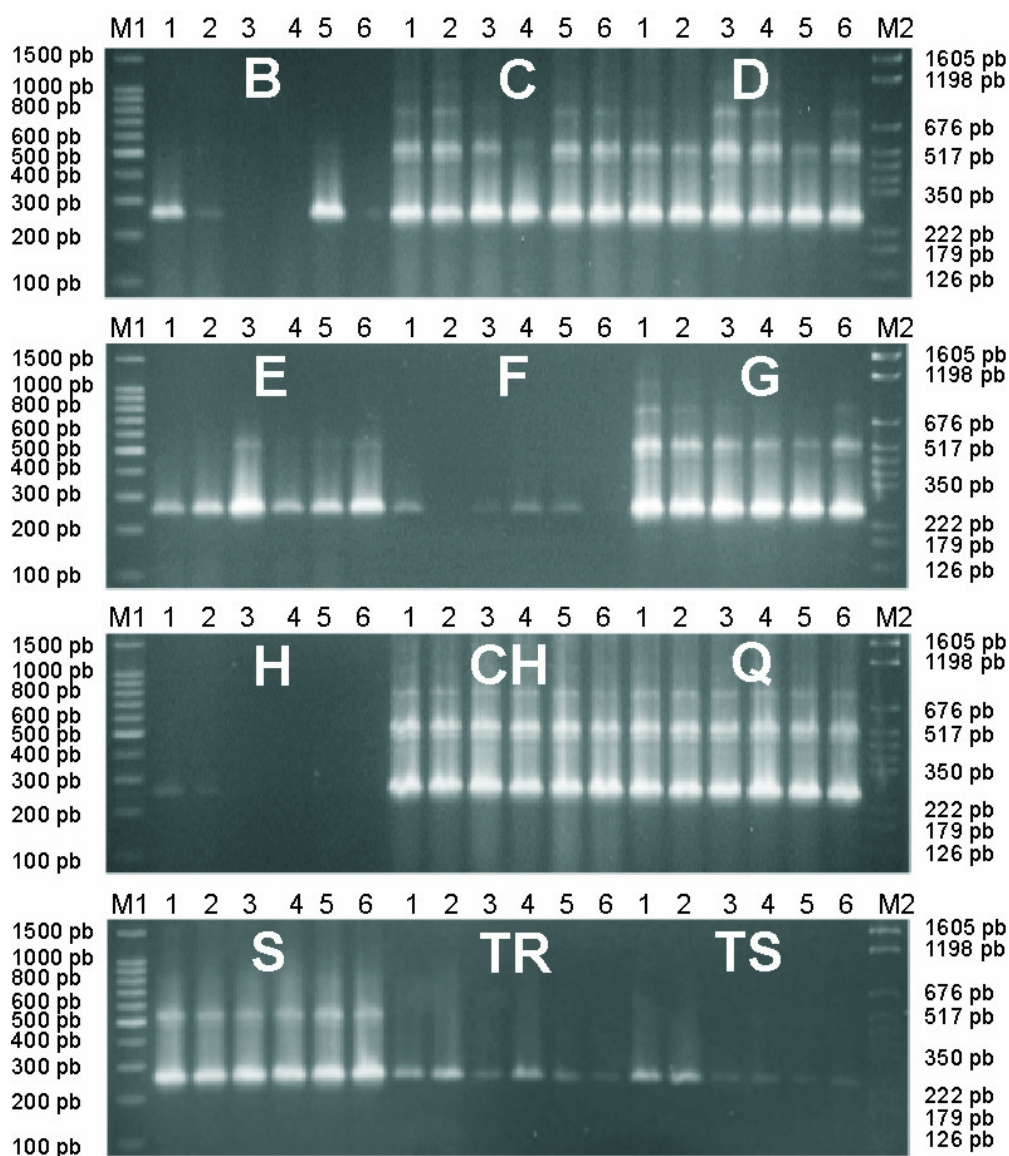
množství RNA poskytuje lepší výsledky u vzorků s vysokým obsahem polysacharidů. Všechny tyto výsledky jsou shrnuty i v tab. 1.



Obr. 1. *Dot-blot* molekulární hybridizace s neradioaktivní a) a radioaktivní b) HLVd sondou vzorků RNA izolovaných různými metodami. Označení vzorků: 1 - Osvaldův klon 72 VF, 2 - Osvaldův klon 31 VF, 3 - Osvaldův klon 72 VF, 4 - Osvaldův klon 72, 5 - Fuggle (UK), 6, 7 - Osvaldův klon 72, 8 - Galena (USA), 9 – Nugget (USA).

Zhodnocení finanční a časové náročnosti

Kvalita izolované RNA a její vhodnost pro *Dot-blot* molekulární hybridizace a RT-PCR je nesporně důležitým faktorem při porovnání různých metod izolace RNA. Neméně důležitým faktorem pro využití jednotlivých metod je jejich časová, finanční a přístrojová náročnost. Co se týče laboratorního vybavení a použitých chemikálií nevykávají se všechny použité metody nikterak z požadavků běžně zařízených molekulárních laboratoří (chlazená centrifuga, vodní lázeň, výhřevný blok, mrazicí box, lednice, atd.). Porovnání časové a finanční náročnosti je souhrnně uspořádáno v tabulce č. 1. Nejlevnější a nejméně časově náročná je metoda H, ta však je zcela nepoužitelná pro jakoukoliv další analýzu. Metody A a I patří též k nejlevnějším a nejméně časově náročným (tab. 1). Jejich použití je ovšem omezeno pouze na *Dot-blot* molekulární hybridizace, pro kterou jsou však nejvhodnější řešení. Podobně je na tom i metoda B, která je však výrazněji (5-krát) časově náročnější (tab. 1). Mezi nejméně časově náročné patří i kolonkové izolační kity (Q a S), jejich cena však patří k těm nejvyšším. Izolovaná RNA je sice kvalitní a vhodná pro obě metody, ale dochází na vazebných kolonkách ke značným ztrátám.



Obr. 2. Analýza produktů RT-PCR reakce na 2% agarózovém gelu. Označení vzorků je shodné s obrázkem č.1. M1 - 100 pb Ladder, M2 - pGEM DNA marker (Promega,USA).

Kompromisní metodou, vhodnou pro obě detekční techniky, je metoda CH s dvakrát větší časovou náročností, ale poloviční cenou (tab. 1). Oblíbená, rychlá, nenáročná a standardní izolační RNA metoda F pro většinu živých organismů nebyla vůbec vhodná pro rostlinná pletiva chmele. Naopak velice vhodné izolační metody C a D, byly naopak příliš finančně (C) nebo časově (D) náročné (tab. 1). Ostatní použité metody (E, G, TR a TS) nesplňovaly žádný ze sledovaných parametrů a jejich použití pro izolaci RNA z rostlinných pletiv chmele nedoporučujeme (tab. 1).

Tab. 1. Hodnocení vhodnosti použití, časové a finanční náročnosti jednotlivých použitých izolačních metod

Metoda izolace RNA	Ozna- čení	Vhodnost pro molekulární hybridizaci radioaktivní sonda	neradioaktivní sonda	RT-PCR	Časová náročnost [hod na vzorek]	Finanční náročnost [Kč za vzorek]
Matoušek <i>et al.</i> (1994)	A	ano	omezeně	ne	0,3	3,3
Farkas <i>et al.</i> (1999)	B	ano (omezeně)	ano (ne)*	ne	1,5 (0,7)*	9,5 (5,3)*
Kiefer <i>et al.</i> (2000)	C	ano (ne)*	ano (ne)*	ano	0,75 (0,5)*	99,0 (95,8)*
Salzman <i>et al.</i> (1999)	D	ano (omezeně)*	ano (ne)*	ano	7,5 (0,6)*	25,6 (9,5)*
Lal <i>et al.</i> (2001)	E	ne	ne	ano	4	24,3
Chomczynski a Sacchi (1987)	F	omezeně	ne	ne	0,8	14,2
Malnoy <i>et al.</i> (2001)	G	omezeně	ne	ano	20,3	23
voda + PEG 20000 + CHCl_3	H	ne	ne	ne	0,3	2,3
<i>Invitrogen Concert Plant RNA reagent</i>	CH	ano (ano)*	ano (ano)*	ano	0,75 (0,75)*	79,9 (78,5)*
Matoušek <i>et al.</i> (1994) + PEG 20000	I	ano	ano	ne	0,3	3,3
<i>Qiagen RNeasy Plant Mini kit</i>	Q	ano	ano	ano	0,35	163,5
<i>Sigma Mammalian RNA Kit</i>	S	ano	ano	ano	0,35	103,1
<i>Sigma TriReagent</i>	TS	omezeně	ne	omezeně 1		99
<i>Roche TriPure</i>	TR	omezeně	ne	omezeně 1		77,3

* modifikované metody

Závěr

Z našeho porovnání izolačních metod RNA, vycházejících s odlišných metodických postupů modifikovaných pro rostlinná pletiva, je patrné, že existují výrazné rozdíly mezi jednotlivými použitými izolačními technikami RNA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo izolační soupravou *ConcertTM Plant RNA reagent* (Invitrogen, USA). Tato metoda (CH) je dobrým kompromisem mezi cenou a časovou náročností. Metody (A a I) izolace nukleových kyselin podle Matouška *et al.* (1994) patřily k nejlevnějším, časově nenáročným a vhodným pro *Dot-blot* molekulární hybridizaci, ne však pro RT-PCR. Metody izolace RNA B, C a D byly též velice účinné, bohužel vždy s určitými nevýhodami: nevhodné pro RT-PCR (B), finanční (C) či časová (D) náročnost. Použití komerčních izolačních souprav u chmele ukázalo, že kolonkové izolační soupravy (Q a S) byly účinnější než použití speciálních roztoků (TR a TS), i když docházelo k výrazným ztrátám na kolonce. Zjištěné výsledky mohou účinně pomoci při izolaci RNA ke specifickým účelům i z jiných rostlinných druhů bohatých na polyfenolické látky, polysacharidy a další sekundární metabolity.

Literatura

- Farkas, E., Palkovics, L., Mikulás, J., Balázs, E. 1999. - Acta Phytopathol. Entomol. Hung. **34**: 7.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. - Anal. Biochem. **162**: 156.
- Kiefer, E. Heller, W., Ernst, D. 2000. - Plant Mol. Biol. Rep. **18**: 33.
- Lal, L., Sahoo, R., Gupta, R.K., Sharma, P., Kumar, S. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 181a.
- Malnoy, M. Reynoird, J.P., Mourgues, F., Chevreau, E., Simoneau, P. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 69a.
- Matoušek, J., Patzak, J. 2000. - Biol. Plant. **43**: 145.
- Matoušek, J., Trněná, L., Svoboda, P., Růžková, P. 1994. - Rostlinná Výroba **40**: 973.
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P. 2001. - Biol. Plant. **44**: 579.
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1999. - Plant Mol. Biol. Rep. **17**: 11.

Poděkování Na závěr bych rád poděkoval Aleně Henychové za její technickou asistenci při zpracování vzorků, laboratoři RNDr. Jaroslavova Matouška, CSc z Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích za provedení radioaktivních *Dot-blot* molekulárních hybridizací a Národní agentuře pro zemědělský výzkum při MZe ČR za finanční podporu vědeckého projektu QC1183 „Komplexní diagnostika a rozšíření viroidních patogenů chmele, brambor, révy vinné, ovocných a okrasných kultur v ČR“, v rámci jehož řešení byly experimenty provedeny.

Stanovení aktivit rostlinných fosfolipas *in situ* s využitím fluorescenčně značených substrátů

PŘEMYSL PEJCHAR^{1,2}, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6-Dejvice, ²Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Lysolaje, (tel.: 296 780 420, e-mail: pejchar@ueb.cas.cz)

Úvod

Podstatnou část biologických membrán tvoří fosfolipidy, jejichž funkce ve vyšších rostlinách zahrnují mimo jiné zakotvení membránových proteinů, modifikaci mastných kyselin, aktivaci enzymů a zprostředkování signálních kaskád (Chapman 1998).

Přenos signálu přes membránu spočívá obvykle v zachycení signálu receptorem na povrchu membrány. Transmembránová signalizace probíhá ovlivněním propustnosti iontových kanálů nebo pomocí kinasových receptorů a receptorů, jež aktivují efektorové enzymy, které následně produkují intracelulární druhé posly. Ti mohou být odvozeni např. od membránových komponent. Druzí poslové nesou informaci k dalším cílům, například ke kinasám, které aktivují další kaskádu reakcí (Munnik *et al.* 1999).

V případě fosfolipidové signální dráhy jsou membránovými komponentami fosfolipidy a efektorovými enzymy fosfolipasy, fosfatasy a kinasy. Tyto enzymy a produkty