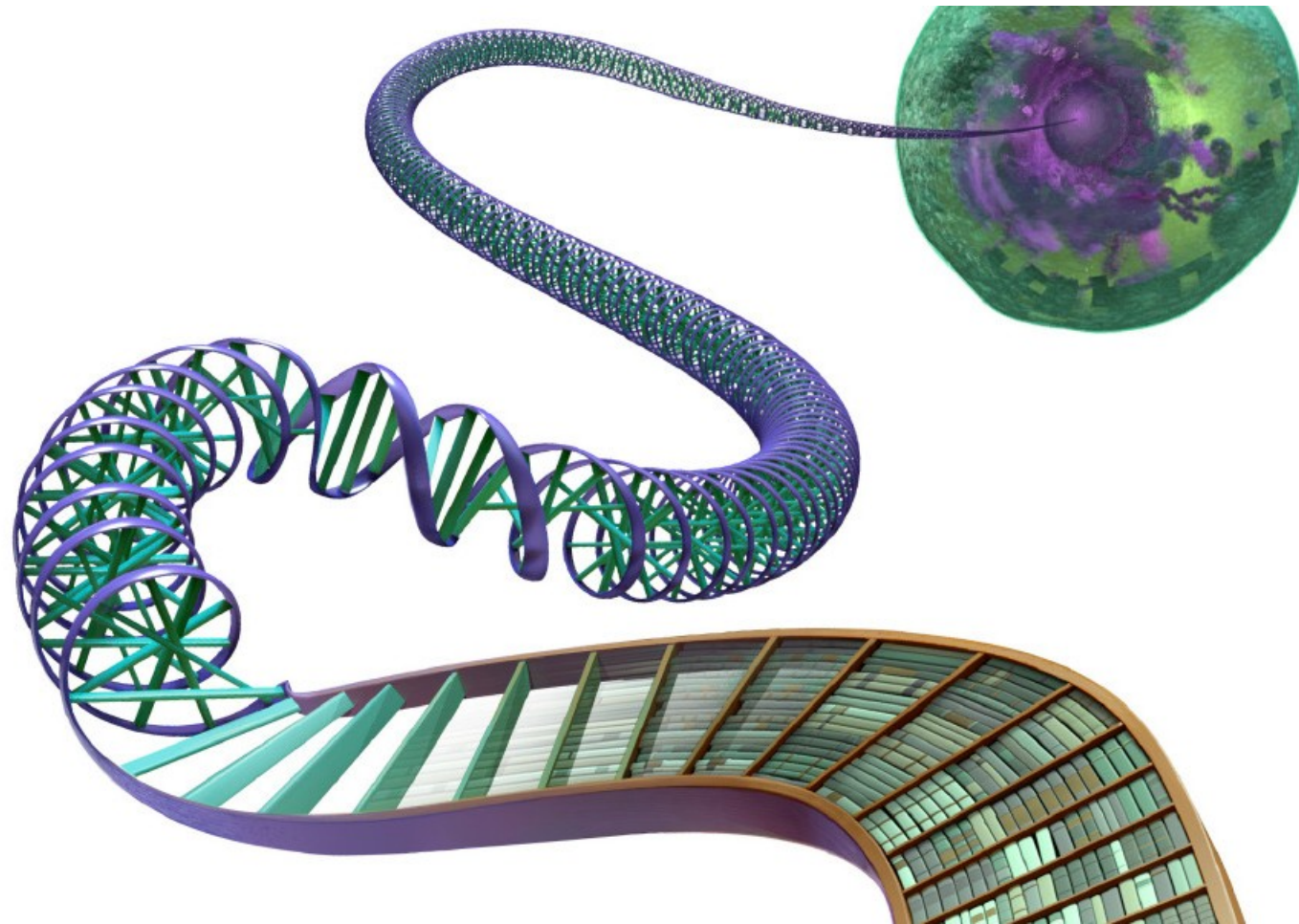




Bi6589

Laboratorní a bioinformatické metody rostlinné biosystematiky

Metody molekulární biologie

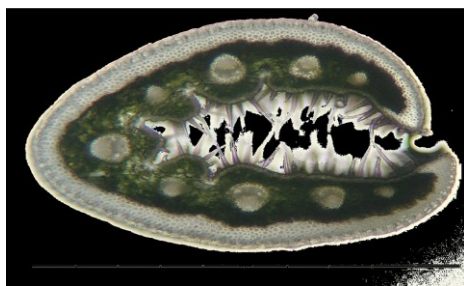


Standardní botanické přístupy

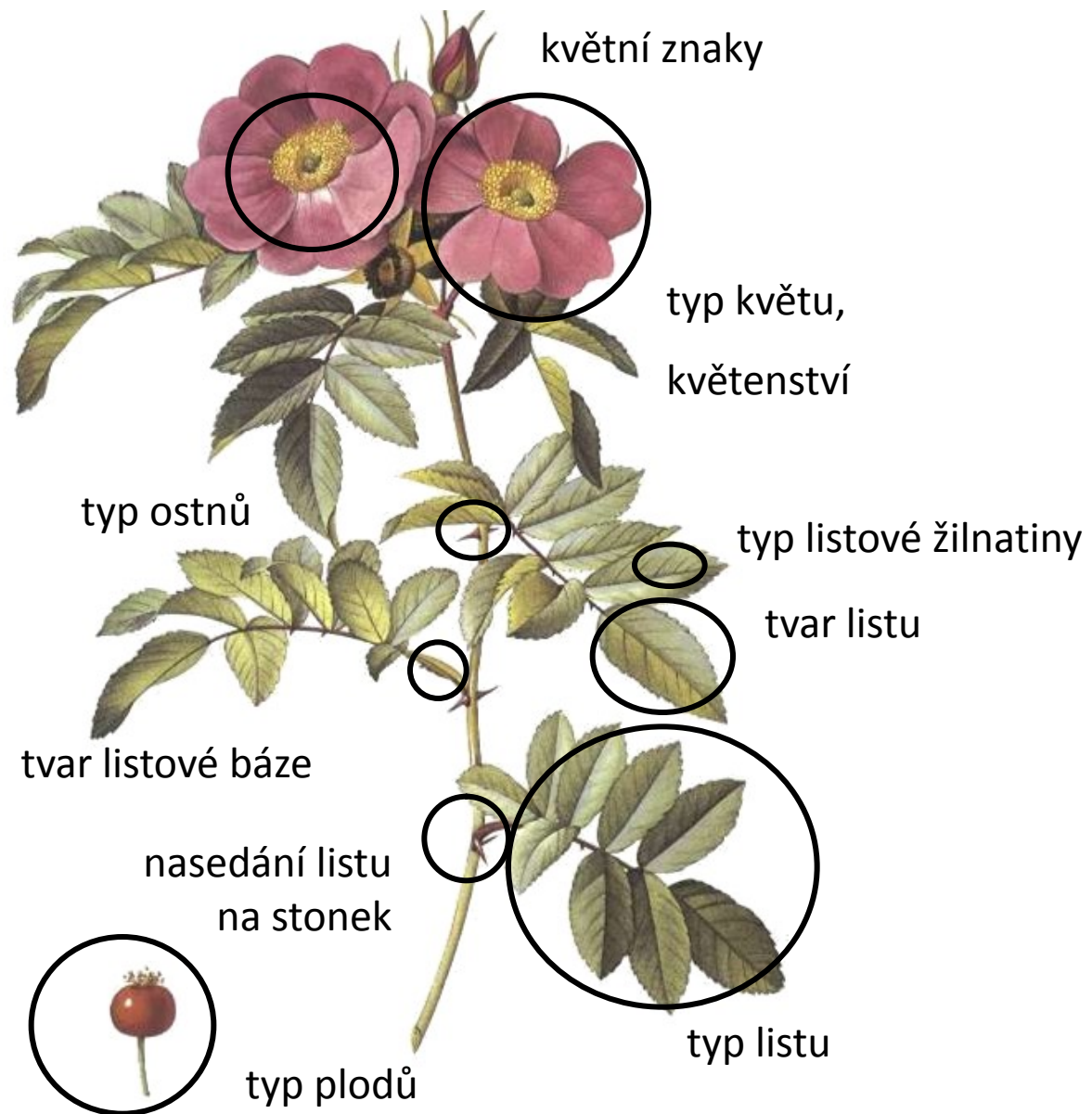
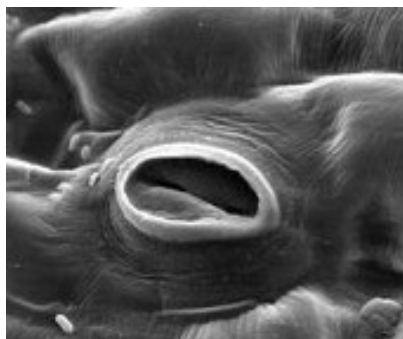
karyologické preparáty



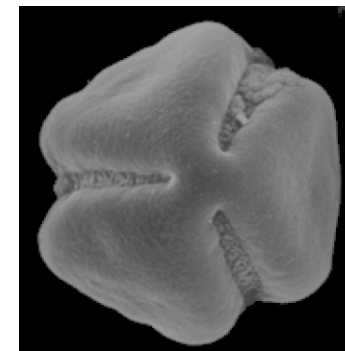
histologické preparáty



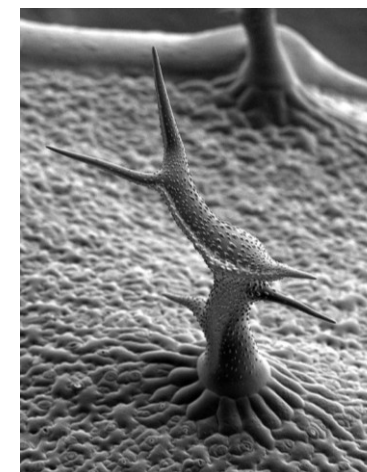
průduchy



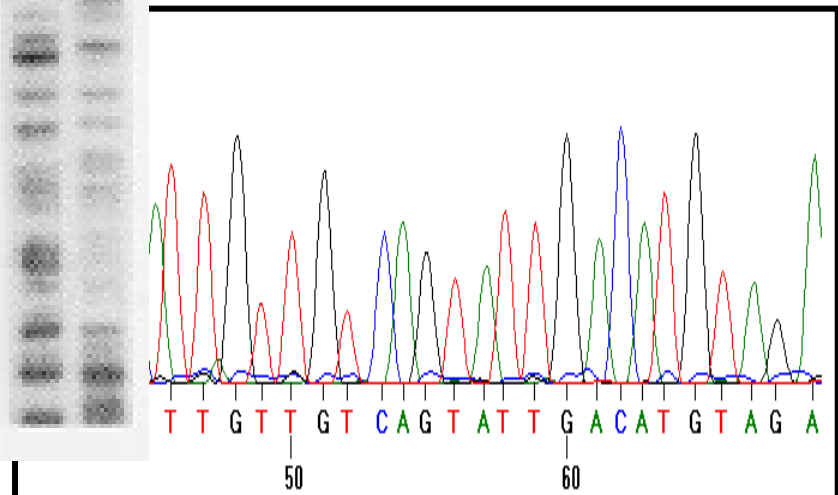
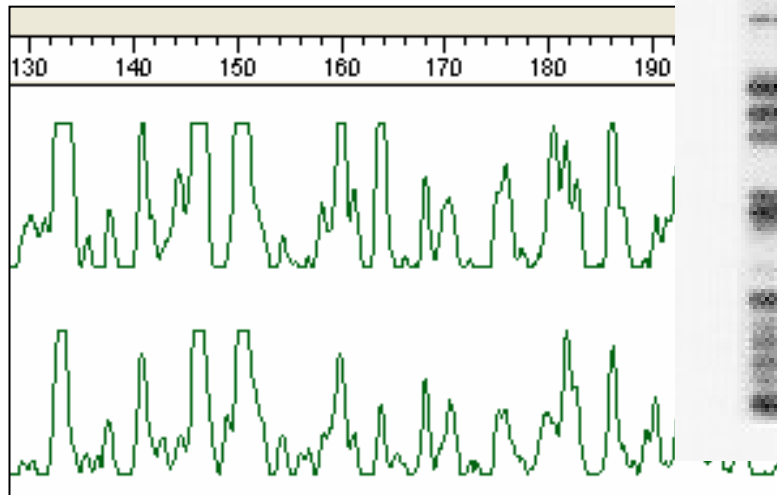
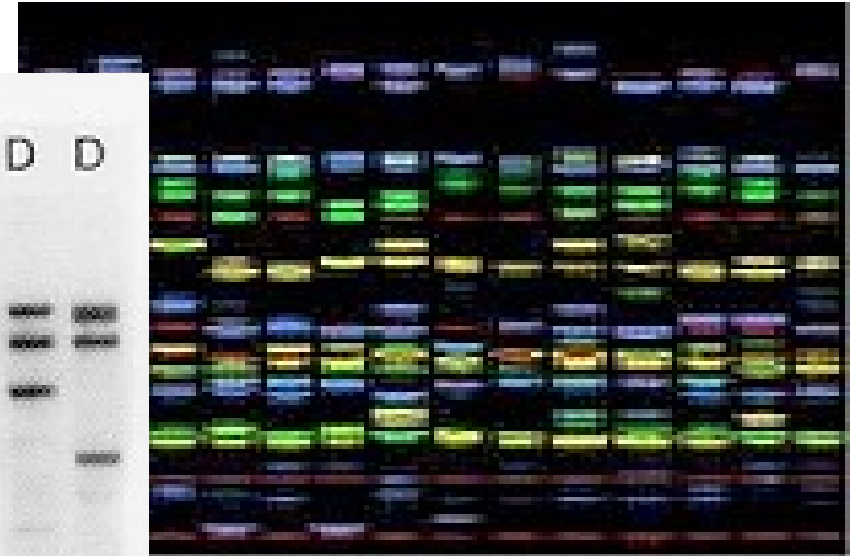
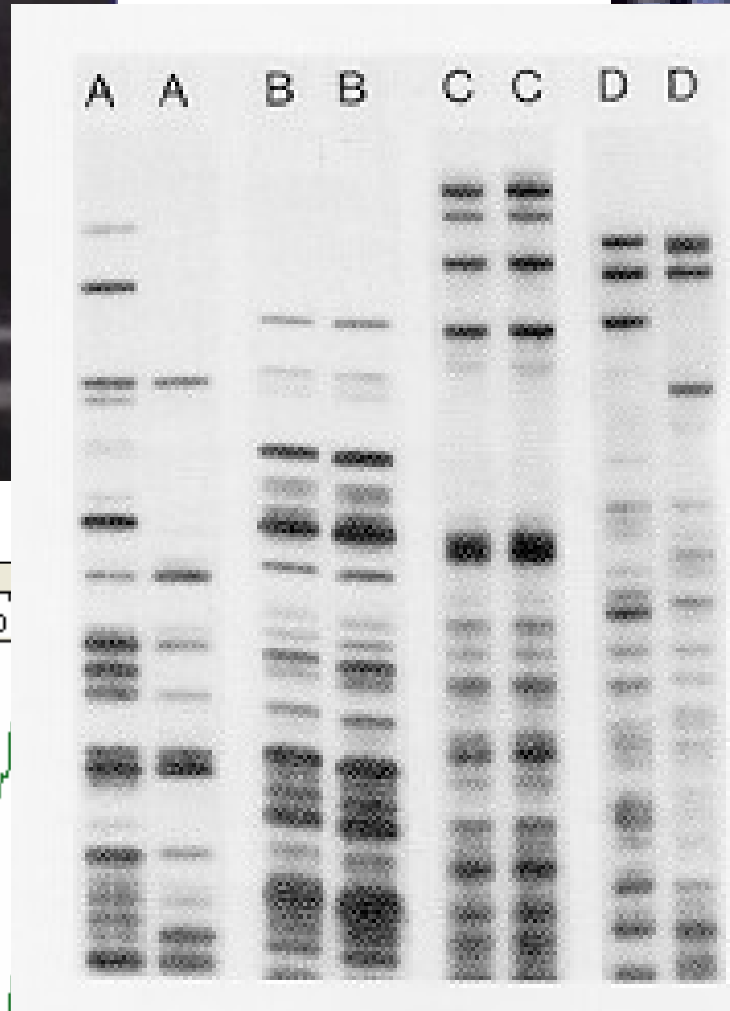
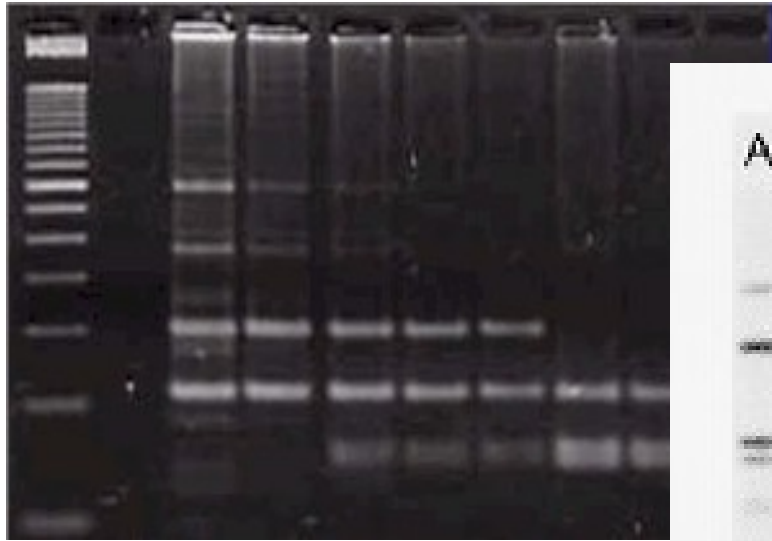
pylová zrna



trichomy



Botanika pro odvážné



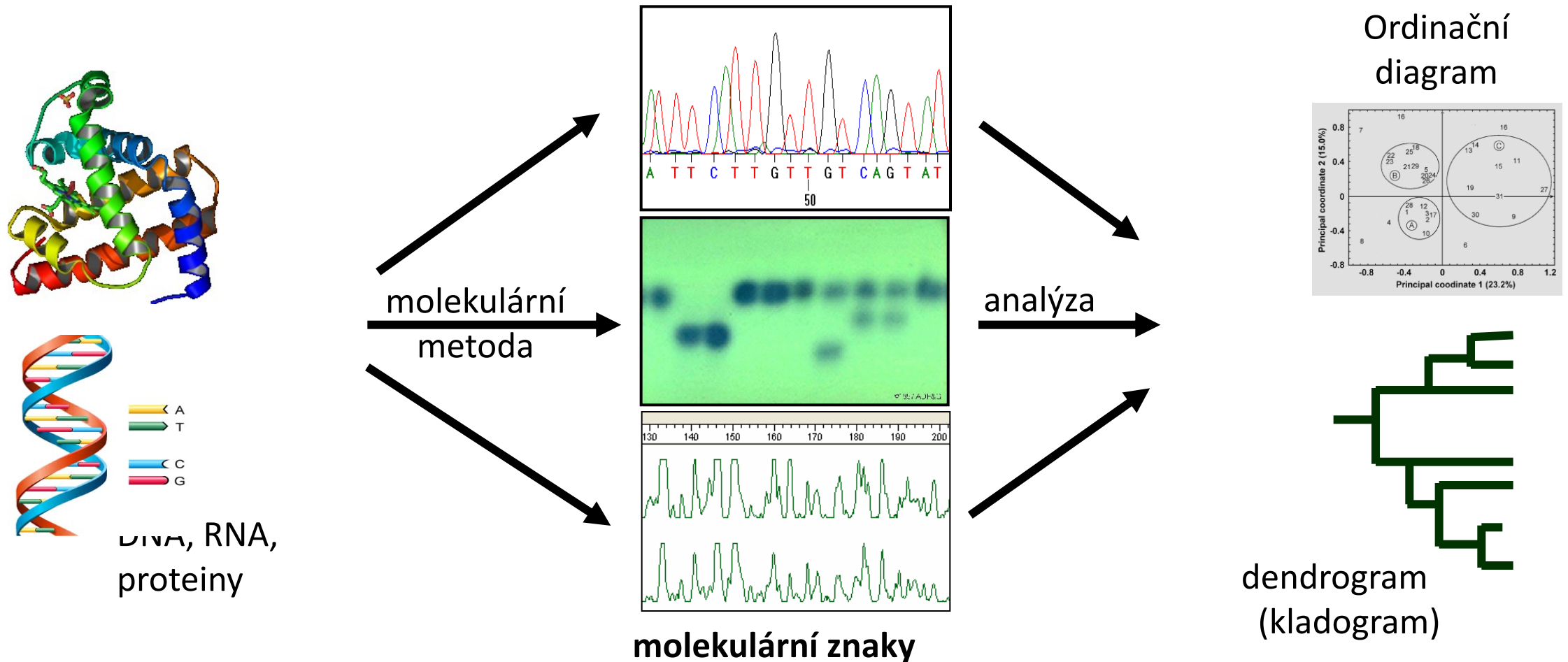
Proč metody molekulární biologie ?

fenotyp = genotyp x ekotyp

- stabilní a detekovatelné ve všech pletivech bez ohledu na stadium růstu, diferenciaci, vývoj (a obranný status buňky)
- oproštěné pleiotropického (gen kóduje více znaků) a epistatického (překrytí jiného znaku) efektu

Proč metody molekulární biologie ?

Metodami molekulární biologie odvozujeme, studujeme a porovnáváme znaky (markery) kódované v biomolekulách.



Jaké otázky mohou být řešeny?

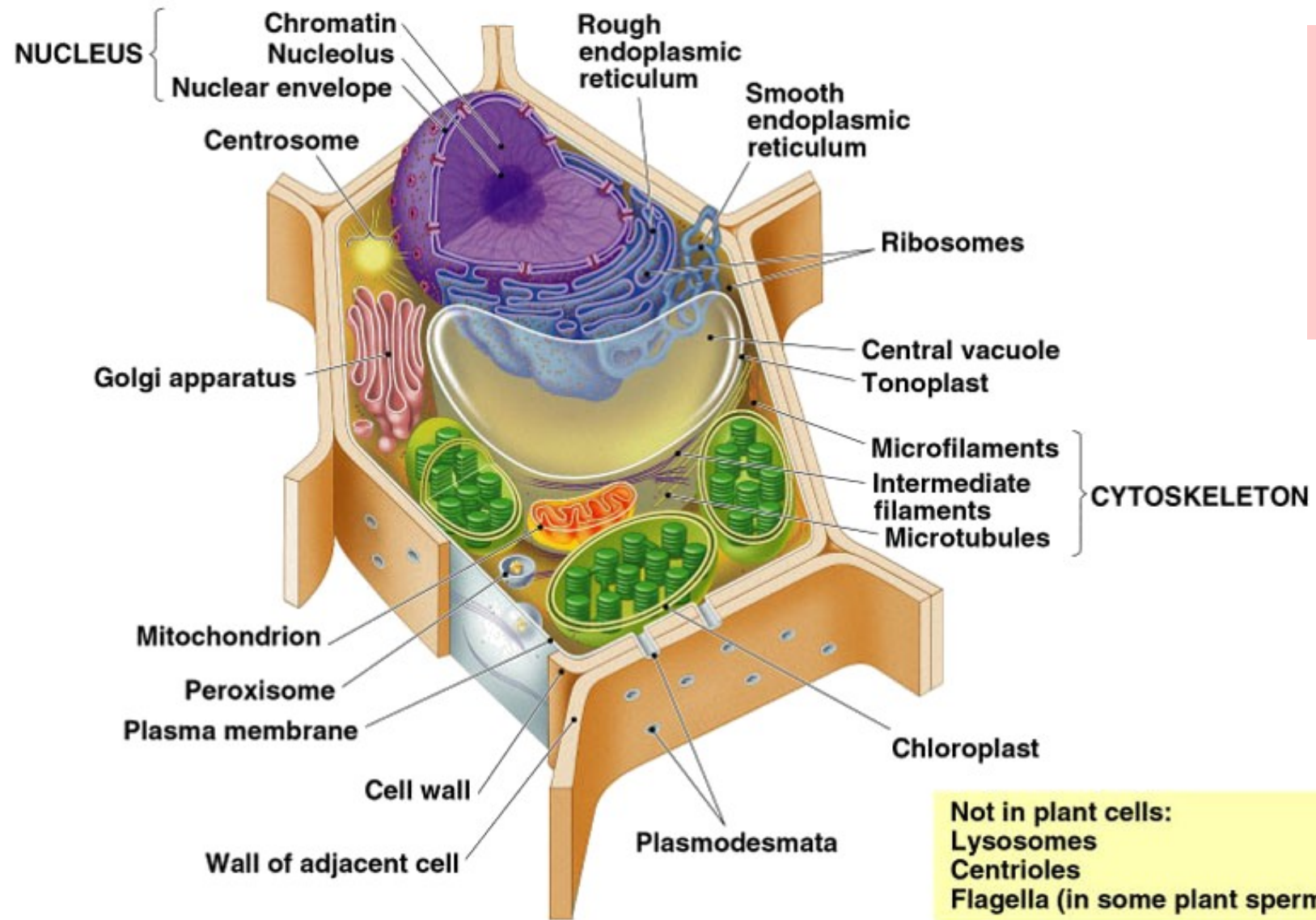
- **Genotypizace:** identifikace jedinců, druhů, hybridů;
- **Fylogeneze:** příbuzenská vztah, vzájemná podobnost;
- **Fylogeografie:** genetická historie šíření druhu v závislosti na klimatických a geografických podmínkách, identifikace glaciálních refugií; šíření druhů: tok genů, migrační směr, hybridní zóny;
- **Populační genetika:** genetická struktura;
- **Ochranářská genetika:** biodiverzita x izolované populace;
- **Párovací systémy:** sexuální x asexuální, zastoupení jedinců v potomstvu;
- **Polyploidizace:** vznik a rozšíření polyploidů;
- **Evoluce:** rodu, druhu, genomu; atd.
- **Diagnostika:** vztah DNA znaku a specifické vlastnosti;

Metody molekulární biologie

Izolace DNA



Izolace DNA



Organely s DNA

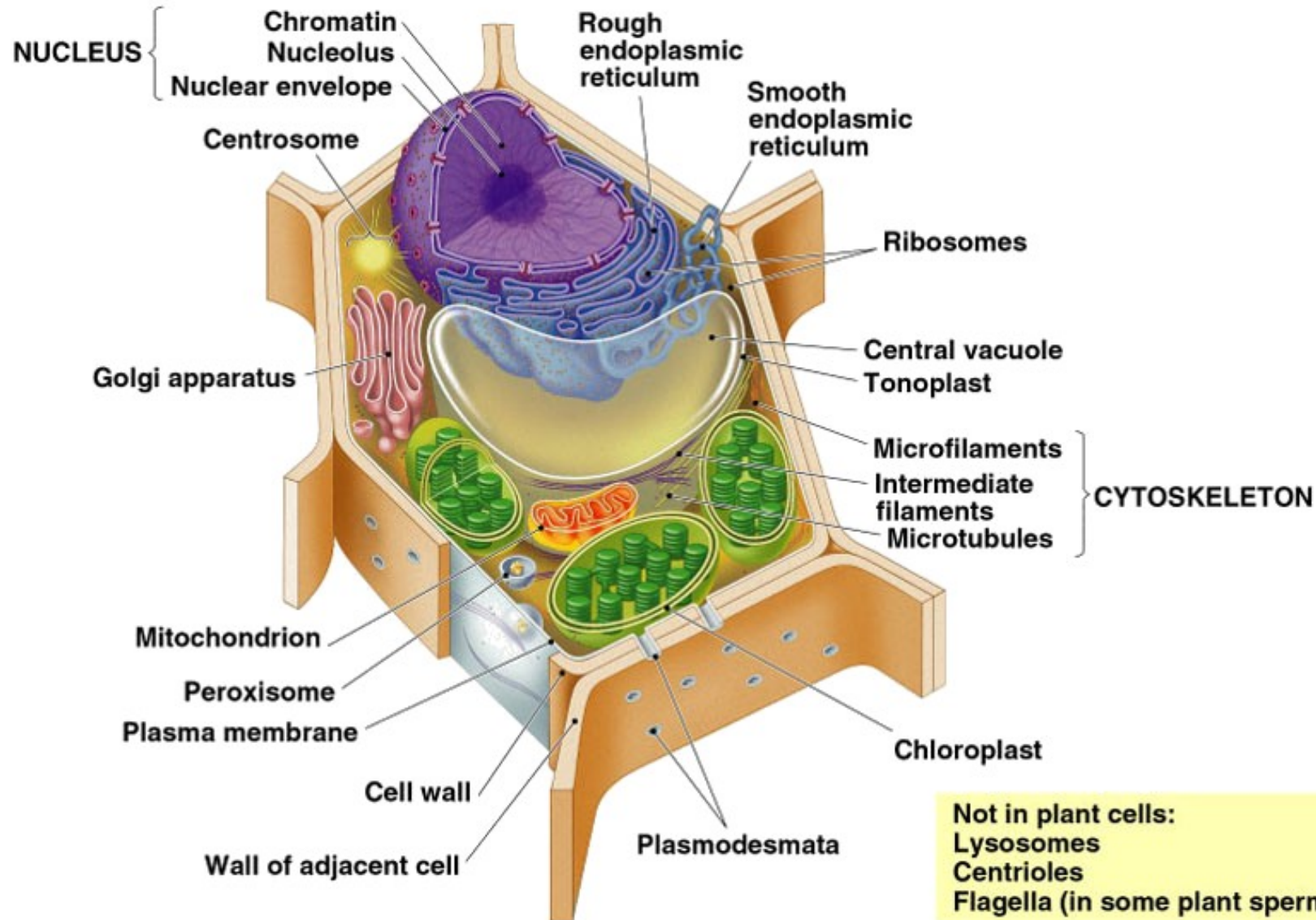
Chloroplasty (ctDNA)

Mitochondrie (mtDNA)

Jádro (nDNA)

Not in plant cells:
Lysosomes
Centrioles
Flagella (in some plant sperm)

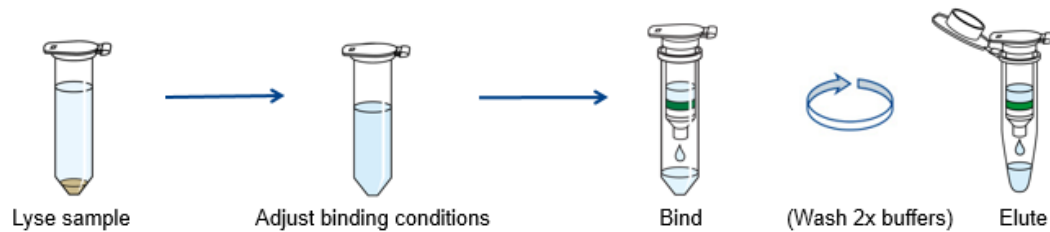
Izolace DNA



Princip:

překonání buněčné stěny
inhibice nukleáz
odstranění sekundárních
metabolitů
odstranění proteinů
odstranění RNA
odstranění volných
ukleotidů a nečistot

Izolace DNA



Komerční kit

vs.



„ruční“ izolace

Izolace DNA - upravená CTABová metoda (Doyle a Doyle 1987)

1. homogenizace 100 mg rostlinného materiálu v tekutém dusíku
2. přidat 0,2 ml extrakční pufr CTAB (suspenze by měla být právě tekutá)
3. inkubace 10 minut při 65°C

4. přidat fenol:chloroform (1:9) v poměru 1:1 k roztoku, dobře protřepat
5. centrifugace – max. otáčky, 5 min
6. odebrat supernatant (horní vrstva) do nové zkumavky; nenasát nečistoty nebo F:CH!!!

7. přidat vymražený etanol v poměru 2:1 (etanol:supernatant), vymrazit 5-10 min.
8. centrifugace – 4 000-10 000 RPM (dle množství DNA), 3 min;
9. odstranit roztok (dále pracuji s peletem!) a nechat pelet 10 minut oschnout při RT

10. rozpustit pelet ve 100 μ l octanu draselném (300 mM výsledná koncentrace)
11. přidat RNAsu (výsledná koncentrace 40ng/ μ l); inkubace 10 minut při RT

12. přidat vymražený etanol v poměru 2:1 (etanol:roztok DNA), vymrazit 5-10 min.
13. centrifugace – 4 000-10 000 RPM (dle množství DNA), 3 min;
14. odstranit roztok (dále pracuji s peletem!) a nechat pelet 10 minut oschnout při RT

15. rozpustit pelet v 50-100 μ l destilované vodě (dle velikosti peletu)

CTAB pufr	40ml
2% CTAB	0,8g
2% PVP	0,8g
100 mM 1M Tris-HCl (pH 8,0)	4ml
25 mM 0,5 M EDTA (pH 8,0)	2ml
2,0 M NaCl	4,67g
(0,5g/l spermidin	0,02g)
VODA	33,2ml