

VPLIV GLIVNIH IN RASTLINSKIH SEKUNDARNIH METABOLITOV NA VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

EFFECT OF FUNGAL AND PLANT SECONDARY METABOLITES ON POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Nejc THALER¹, Marko BAJC²

(1) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, nejc.thaler@bf.uni-lj.si

(2) Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za gozdno fiziologijo in genetiko, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, marko.bajc@gozdis.si

IZVLEČEK

Sekundarni metaboliti so organske spojine, ki jih najdemo pri glivah in rastlinah, kjer imajo vlogo obrambnih in signalnih molekul ali zagotavljajo druge selekcijske prednosti, niso pa neposredno vpleteni v rast, razvoj in razmnoževanje organizma. Pri delu s tehnikami DNA so pogosto ravno sekundarni metaboliti tisti, ki posredno ali neposredno vplivajo na uspešnost verižne reakcije s polimerazo (PCR) ali reverzno transkriptazo, in sicer tako, da otežujejo celično lizo, povzročajo razpad nukleinskih kislin ali neposredno ovirajo delovanje encima polimeraze pri pomnoževanju tarčne DNK. Glavna ovira pri aplikaciji tehnike PCR v rutinski diagnostiki je priprava visokokvalitetne DNA brez inhibitorjev. Še posebej to velja pri izolaciji DNA iz lesnatih rastlin (Minafra in sod., 1992) in vzorcev tal (Tsai in Olson, 1991). Večina standardnih postopkov izolacije nukleinskih kislin ne odstrani rastlinskih polisaharidov in polifenolnih komponent, ki imajo lahko neposreden vpliv na pomnoževanje s PCR (Demeke in Adams, 1992). Poskusi za premostitev tovrstnih ovir vključujejo bolj dovršene metode za izolacijo nukleinskih kislin in PCR, ki vključujejo uporabo pospeševalcev PCR za odstranitev ali zmanjšanje vpliva inhibitorjev PCR. Ta pregled je osredotočen na pristope za odstranitev ali zmanjšanje vplivov rastlinskih in glivnih sekundarnih metabolitov iz vzorcev tal, različnih rastlinskih tkiv in razkrojenega lesa zaradi pomena tovrstnih raziskav za gozdarstvo in lesarstvo.

Ključne besede: sekundarni metaboliti, izolacija DNA, pomnoževanje DNA, verižna reakcija s polimerazo (PCR), inhibicija PCR, pospeševalci PCR

ABSTRACT

Secondary metabolites are organic compounds that can be found in both fungi and plants, where they play an important role as defensive and signal molecules, or provide other kinds of advantage in natural selection, but are not directly involved in normal growth, development and reproduction of an organism. When working with DNA techniques, it is the secondary metabolites that most often affect the efficiency of polymerase chain reaction (PCR), either by hindering cell lysis, causing decomposition of nucleic acids or by direct inhibition of DNA-polymerase or reverse transcriptase amplification. The main limiting factor in the application of the PCR technique in routine diagnosis is the preparation of good quality nucleic acids isolates, free of PCR inhibitors. This is especially true in the case of woody plants (Minafra et al., 1992) and soil samples (Tsai and Olson, 1991). Most standard nucleic acids extraction procedures do not always remove contaminating plant polysaccharides or polyphenolic compounds, which can have direct inhibitory effects on subsequent PCR amplification (Demeke and Adams, 1992). Attempts to overcome these limitations included the development of more elaborate nucleic acids extraction methods and PCR, which employ PCR enhancers to eliminate or attenuate the effects of inhibitors. This review is concentrated on removal or attenuation of effects of plant and fungal secondary metabolites from soil, different plant tissues and decayed wood samples due to the significance of this type of research in forestry and wood science.

Key words: secondary metabolites, DNA isolation, DNA amplification, Polymerase Chain Reaction (PCR), PCR inhibition, PCR enhancers

GDK 844(045)=163.6

Prispelo / Received: 25. 10. 2012

Sprejeto / Accepted: 19. 03. 2013

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Sekundarni metaboliti so vse tiste organske spojine, ki niso neposredno vpletene v normalno rast, razvoj in razmnoževanje organizma (Fraenkel, 1959). Pogosto imajo izjemne fiziološke aktivnosti (Keller in

sod., 2005), nimajo pa splošno prepoznane neposredne vloge v procesih fotosinteze, dihanja, transporta raztopin, premestitev, sinteze beljakovin, asimilacije hranil, diferenciacije ali izgradnje ogljikovih hidratov in lipidov (Teiz in Zeiger, 2002). V rastlinah so večinoma v vlogi obrambnih (pred rastlinojedi, mikrobi,

virusi ali drugimi rastlinami) ali signalnih molekul (za privabljanje oprasovalcev in raznašalcev semen). Pomembni so za preživetje in razmnoževanje rastlin ter tako predstavljajo prilagoditvene značilnosti, ki so bile v teku evolucije izpostavljene naravni selekciji (Wink, 2003).

V nasprotju s primarnimi metaboliti izostanek sekundarnih metabolitov ne pomeni takojšnje smrti, marveč zgolj dolgoročno oslabitev preživetja, plodnosti in estetike, ali pa ta izostanek morda celo nima opaznega vpliva na organizem.

Ljudje rastlinske sekundarne metabolite uporabljajo kot zdravila, arome, začimbe in prehranske dodatke. Digoksin, morfij in kinin so rastlinski sekundarni metaboliti, β -laktami (penicilini, cefalosporini), makrolidi (curvularin, zearalenon) in statini (lovastatin, pravastatin) pa so enako dobro poznani glivni sekundarni metaboliti. Čeprav so kemijsko zelo raznoliki, nastanejo vsi sekundarni metaboliti po maloštevilnih biosintetskih poteh, pogosto sočasno z morfološkim razvojem.

1.1 Klasifikacija rastlinskih sekundarnih metabolitov

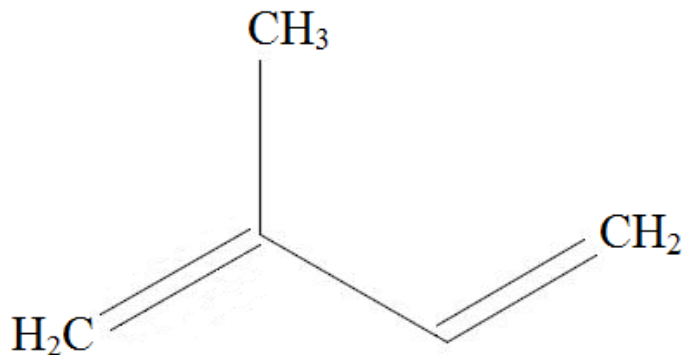
1.1 Classification of plant secondary metabolites

Rastlinske sekundarne metabolite delimo na tri glavne skupine glede na kemijsko sestavo, in sicer na terpenoide, fenolne spojine in dušik vsebujoče snovi (tudi t.i. alkaloidi).

1.1.1 Terpenoidi

1.1.1 Terpenoides

Terpenoidi so zelo pestra skupina sekundarnih metabolitov. Njihova sinteza se začne iz acetilkoencima A ali intermediatov glikolize, osnovni gradnik je 5C izoprenska enota (C_5H_8) (slika 1). Med terpenoide spadajo terpeni (pravimo jim tudi izopreni), ki v svoji kemijski formuli vsebujejo samo ogljik in vodik, ter pravi terpenoidi, ki lahko vsebujejo tudi kisik. Terpenoidi so



Slika 1: Izoprenska enota

občutljivi za svetlobo in toploto, topni so v nepolarnih topilih. Rastlinski sekundarni metaboliti, ki spadajo med terpenoide, so na primer abscizinska kislina (sekviterpen), retinol in giberelini (diterpeni), steroidi (triterpeni) ter karoteni in ksantofili (tetraterpeni).

Glede na število izoprenskih enot v posameznem terpenoidu poznamo hemiterpene (1 enota), monoterpene (2 enoti), seskviterpene (3 enote), diterpene (4 enote), triterpene (6 enot), tetraterpene (8 enot) in politerpene (10 in več enot).

1.1.2 Fenolne spojine

1.1.2 Phenolic compounds

Fenolne spojine so v rastlinah zelo razširjene, najdemo jih predvsem v epidermalnih tkivih in so eden ključnih mehanizmov za odpornost proti boleznim in škodljivcem. Na fenolnih spojinah temeljijo lignin, suberin in tanini. Z vidika kemije vsebujejo fenolne snovi vsaj en benzenov obroč z vsaj eno hidroksilno skupino. Tisti z enim obročem spadajo med ne-flavonoide, tisti z dvema obročema, povezanimi s heterocikličnim obročem, pa pravimo flavonoidi.

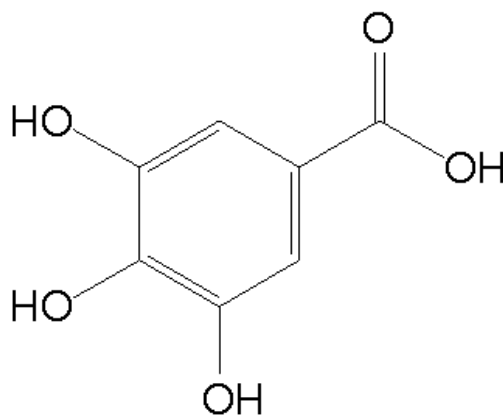
Tvorba velike večine fenolnih spojin se začne s potjo šikimske kisline, nekaterih pa tudi po poti jabolčne kisline. Glavna prekursorska molekula pri nastanku je aminokislina fenilalanin, s katere encim fenilalanin amonij liaza (PAL) odcepi amoniak. Ko analiziramo izvlečke rastlinskih tkiv, nas velikokrat zanima tudi vsebnost celokupnih fenolov, katerih rezultat se največkrat prikazuje v ekvivalentih galne kisline (GA) (slika 2).

1.1.3 Dušik vsebujoče snovi

1.1.3 Nitrogen containing compounds

Tudi sinteza dušik vsebujočih snovi (DVS) se začne z aminokislinskimi prekursorji, in sicer najpogosteje z alifatskimi in aromatskimi aminokislinami, kot sta tirozin in triptofan. DVS so manj pogoste molekule kot fenoli in terpenoidi, vendar so zaradi svoje aktivnosti zelo pomembni kot zdravila in toksini. V to skupino

Fig. 1: Isoprene unit



Slika 2: Galna kislina

Fig. 2: Gallic acid

spojin spadajo alkaloidi, cianogeni glikozidi, glukozinolati, neproteinske aminokisline in betalaini.

Za alkaloide so včasih mislili, da so zgolj odpadni produkti celičnega metabolizma, kasneje pa se je izkazalo, da verjetno ni tako. Lep primer so cianogeni glikozidi in glukozinolati, ki so ločeno spravljeni v vakuolah. Ko pa rastlinojeda žival poruši celično strukturo in predre vakuolo, pridejo v stik z glukozidazami iz citoplazme, ki pretvorijo glukozinolate in cianogene glikozide v aktivno obliko. Pri tem glukozinolati delujejo kot repelenti, iz cianogenih glikozidov pa se sprošča vodikov cianid (HCN), ki je toksičen za dihalno verigo herbivorov.

Večina DVS je v kristalinični obliki, topne so v alkoholu, slabše pa v vodi. Izjema je v vodi topni alkaloid kofein. DVS so občutljive za toploto, svetlobo in oksidacijo.

1.2 Klasifikacija glivnih sekundarnih metabolitov

1.2 Classification of fungal secondary metabolites

Sistematične raziskave glivnih sekundarnih metabolitov so se začele leta 1922 pod vodstvom Harolda Raistricka (Raistrick, 1950), vendar je trajalo vse do odkritja penicilina leta 1928, da so raziskovalci usmerili širšo pozornost tudi glivnim sekundarnim metabolitom. Farmacevtska podjetja so odtlej dajala pobudo za množične presejalne programe, in do leta 1950 so odkrili že obilico glivnih proizvodov s farmacevtskimi aplikacijami. Od takrat poteka iskanje glivnih metabolitov neprestano in odkritih je bilo že več tisoč spojin, ki zavirajo rast bakterij, gliv, enoceličarjev, parazitov, insektov, virusov in tudi človeških tumorskih celic. Odkritih je bilo tudi mnogo drugih molekul s citotoksičnimi, mutagenimi, karcinogenimi, teratogenimi, imunosupresivnimi, alelopatskimi ali drugimi biološkimi učinki (Pelaez, 2005).

Glede na poudarek, ki ga dajemo fiziološki aktivnosti, je en način klasifikacije prek definicije učinka posameznega sekundarnega metabolita. Tako lahko ločimo spojine, ki so strupene za rastline in živali, rastne hormone in farmacevtska sredstva. Drug, kemijsko bolj smiseln sistem klasifikacije, ki je prikazan v nadaljevanju, pa upošteva dejstvo, da kljub ogromni raznolikosti vsi sekundarni metaboliti izhajajo iz omejenega števila prekurzorjev iz primarnega metabolizma.

1.2.1 Poliketidi

1.2.1 Poliketides

Sinteza poliketidov poteka prek encimov poliketidsintaze tipa I. To so encimi z več podenotami (multi-domenski encimi) in so sorodni evkariontskim sintazam maščobnih kislin. Za te encime je značilna kondenzacija kratkih karboksilnih kislin (acetilkoencim A ali malonilkoencim A), ki vodi v nastanek ogljikovih verig različnih dolžin. Glavna razlika med poliketidi in maščobnimi kislinami je popolna redukcija β -ogljika pri maščobnih kislinah, kar ni nujen dogodek pri nastanku poliketidov. Poliketidi so kemijsko široka skupina glivnih sekundarnih metabolitov, med najboljše preučene poliketide na primer štejemo rumeni pigment naftopiron (Fujii in sod., 2001), karcinogene aflatoksine (Williams in sod., 2004) in komercialno izjemno pomembno učinkovino za zniževanje nivoja holesterola, lovastatin (Kennedy in sod., 1999). Raznolikost glivnih poliketidnih struktur izhaja iz števila ponavljajočih se reakcij, redukcij, pestrosti osnovnih enot in v primeru aromatskih poliketidov tudi iz sklenitve nastajajoče poliketidne verige. H kemijski pestrosti glivnih poliketidov dodatno prispevajo različni koraki sprememb po sintezi osnovne strukture (Brown in sod., 1996). Med poliketide spadajo makrolidi, polienski antibiotiki, tetraciklini, acetogenini in drugi (diskodermolid, aflatoksini ...).

1.2.2 Ne-ribosomalni peptidi

1.2.2 Nonribosomal peptides

Ne-ribosomalni peptidi nastajajo iz beljakovinskih aminokislin in iz nebeljakovinskih aminokislin s pomočjo več-domenskih, več-modulnih encimov ne-ribosomskih peptid-sintetaz (NRPS) (Finking in Marahiel, 2004). Vsak modul v NRPS vsebuje več domen, ki omogočajo prepoznavo, aktivacijo in nato kovalentno vezavo modulspecifičnih aminokislin. Posledično pride do nastanka peptidnih vezi med aminokislinami, ki se usedejo na prave domene, nastali peptid pa z encima sprosti tioesterazi podobna domena, ki se nahaja na C-koncu zadnjega modula. Prvi identificirani NRPS je encim, ki katalizira prvo reakcijo v sintezi β -laktamskih antibiotikov, npr. penicilina in cefalosporina (Smith in sod., 1990).

Med ne-ribosomalne peptide spada mnogo različnih vrst snovi, kot so antibiotiki (aktinomycin, bacitracin, vankomicin, gramicidin, in drugi), prekursorji antibiotikov (tripeptid ACV), citostatiki, imunosupresanti, siderofori, pigmenti, toksini, polimeri za shranjevanje dušika in fitotoksini.

1.2.3 Terpenoidi

1.2.3 Terpenoids

Tudi glive (poleg rastlin) proizvajajo celo množico pomembnih terpenoidov, kot so aristoloheni, kartenoidi, giberelini, indol-diterpeni in trihoteceni. Vsi terpenoidi so iz izoprenskih enot, lahko so linearni ali ciklični, nasičeni ali nenasičeni in tudi modificirani na različne načine. Pogosti razredi terpenoidov so že bili omenjeni v poglavju Klasifikacija rastlinskih sekundarnih metabolitov.

1.2.4 Indolni alkaloidi

1.2.4 Indole alkaloides

Raziskave indolnih alkaloidov so se začele, ko sta Pierre Joseph Pelletier in Joseph Bienaimé Caventou leta 1818 odkrila strihnin, sam indol pa je prvi izoliral Adolf von Baeyer leta 1866, ko je delal poskuse z razpadom modrega barvila indiga.

Indolni alkaloidi navadno nastanejo iz aminokisline triptofan in iz dimetilalil pirofosfata, čeprav se včasih pojavijo tudi drugi aminokislinski prekursorji. Najbolj podrobno je preučena sintezna pot ergotamina. Prvi korak sinteze predstavlja prenilacija triptofana, nato sledita metilacija dimetilalil triptofana in zaporedje oksidacijskih korakov (Tudzynski in sod., 1999).

Indolne alkaloidne delimo na ne-izoprenoidne in izoprenoidne. Med ne-izoprenoidne štejemo preproste derivate indola, preproste derivate β -karbolina in pirolindolne alkaloidne, med izoprenoidne pa hemiterpenoidne (ergot alkaloidi) in monoterpenoidne indolne alkaloidne.

2 VPLIV INHIBITORJEV NA PCR

2 EFFECT OF INHIBITORS ON PCR

Dejavniki, ki vplivajo na pomnoževanje nukleinskih kislin s PCR, po navadi delujejo na eno ali več od treh ključnih točk postopka od izolacije nukleinskih kislin do PCR na sledeče načine: lahko ovirajo celično lizo, ki je potrebna za sprostitve nukleinskih kislin, lahko povzročajo razpad nukleinskih kislin ali na druge načine, npr. koprecipitacijo nukleinskih kislin in inhibitorjev, otežujejo izolacijo, lahko pa ovirajo delovanje polimeraze pri pomnoževanju tarčnih nukleinskih kislin (Rossen in sod., 1992). Inhibitorji lahko vplivajo na kinetiko pomnoževanja, tako da vežejo ione Mg^{2+} , ki so pomemben kofaktor vseh DNA-polimeraz, lahko pa se vežejo na tarčne nukleinske kisline ali na DNA-polimerazo (Wilson 1997). Inhibitorji lahko izvirajo iz rastlinskega tkiva, glivnega tkiva, lahko pa tudi iz reagentov za izolacijo nukleinskih kislin (Peist in sod., 2001).

Pomembnejši tipi inhibitorjev so prikazani v preglednici 1. Čeprav so identiteta in splošne značilnosti mehanizma delovanja najpogostejših oz. pomembnejših tipov inhibitorjev PCR znane (preglednica 1), pa najverjetneje obstajajo tudi številni manj pogosti ali manj zastopani inhibitorji PCR, katerih natančna identiteta in način delovanja ostajata slabo raziskana (Wilson, 1997; Demeke in Jenkins, 2010). Med pogoste inhibitorje spadajo različne komponente telesnih tekočin (hemoglobin, sečnina, heparin...), tkiv različnih organizmov (polifenoli, polisaharidi, encimi in druge beljakovine idr.), prehranskih sestavin (organske in fenolne spojine, glikogen, škrob, maščobne kisline...) in okoljske komponente (huminske kisline in težke kovine...). Poleg teh v okolju obstajajo tudi drugi pogosti inhibitorji, kot so sestavine bakterijskih celic, ne-tarčna DNA, pelod, laboratorijski material (smukec, laboratorijska plastika, celuloza...) in drugi (Wilson, 1997).

Zaradi prisotnosti inhibitorjev lahko določimo lažno negativne rezultate, kar pomeni, da v vzorcu obstaja tarčna DNA, le da je ne moremo pomnožiti. V takih primerih je smiselno uporabiti notranje kontrole pomnoževanja, ki jih očistimo in pomnožimo skupaj s tarčno DNA. Tako lahko zaznamo inhibitorje in izgubo tarčne DNK med postopkom čiščenja (Pasloske in sod., 1998; Nolan in sod., 2006). Za odstranitev inhibitorjev je potrebno intenzivno čiščenje DNA, kar pa lahko poveča tveganje za kontaminacijo vzorcev zaradi povečanega števila korakov.

Tudi kisli rastlinski polisaharidi (dekstran sulfat, alginska kislina...) so znani inhibitorji PCR, nevtralni polisaharidi (škrob, arabinogalaktan...) pa navadno nimajo vpliva na uspešnost PCR (Demeke in Adams, 1992; Peist in sod., 2001; Holden in sod., 2003). Na

Preglednica 1: Inhibitorji PCR glede na vrsto izvora in tip inhibicije

| Skupine inhibitorjev | Izvor vzorca | | | | Tipi inhibicije | | | |
|----------------------|--|--|--|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------------|
| | Vzorci rastlinskih tkiv | Vzorci glivnih tkiv | Vzorci vode | Vzorci prsti | Ve-zava Mg ²⁺ | Vezava / razgraj-dnja DNA | Denatur. polimeraze | Vezava na akt. mesto polimeraze |
| Polifenoli | tanini ^{1, 2, 3} klorogenska kislina ^{4, 5} kavna kislina ⁵ | melanin in drugi glivni pigmenti ^{6, 7} | tanini, huminske kisline ^{8, 9} | | X | X | X | X |
| Polisaharidi | kisli rastlinski polisaharidi (dekstran sulfat, alginska kislina) ^{2, 10, 11, 12} | hitin, manani, glukani ¹³ | | | | X | | |
| Beljakovine | različne beljakovine rastlinskega in mikrobnege izvora, encimi ¹⁴ | | | | X | X | X | |
| Kovinski ioni | Ca ²⁺ ¹⁵ Fe ²⁺ ⁸ težke kovine ^{9, 16} | | | | | | X | X |

Table 1: PCR inhibitors sorted according to their source and inhibition type

¹ Do in Adams, 1991; ² Demeke in Adams, 1992; ³ Wilson, 1997; ⁴ Singh in sod., 1998; ⁵ Rohn in sod., 2002; ⁶ Harki in sod., 1997; ⁷ Séjalon-Delmas in sod., 2000; ⁸ Tsai in Olson, 1992; ⁹ Abbaszadegan in sod., 1993; ¹⁰ Peist in sod., 2001; ¹¹ Holden in sod., 2003; ¹² Demeke in Jenkins, 2010; ¹³ Rodrigues in sod., 2011; ¹⁴ Rossen in sod., 1992; ¹⁵ Bickley in sod., 1996; ¹⁶ Straub in sod., 1995.

primer, 0,001 % (w/v) dekstran sulfata že popolnoma zavira PCR, medtem ko 4 % (w/v) dekstrana, ki je nevtralen, v PCR mešanici nima vpliva na uspešnost pomnoževanja (Holden in sod., 2003).

Kot je že bilo omenjeno, lahko PCR inhibitorji izvirajo tudi iz procesa izolacije nukleinskih kislin. Med slednje spadajo fenol, etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA), natrijev klorid in litijev klorid. Fenol pri koncentracijah nad 0,2 % zavira PCR (Demeke in Adams, 1992; Peist in sod., 2001). Fenolne komponente iz vzorca ali tiste, ki so prenesene iz koraka čiščenja DNA, lahko inhibirajo PCR z vezavo ali denaturacijo polimeraze (Wilson, 1997). Splošno znane so reakcije rastlinskih fenolnih spojin (npr. klorogenske in kavne kisline) z beljakovinami in encimi, kar lahko spremeni različne lastnosti teh aktivnih biopolimerov (Rohn in sod., 2002). Pri vzorcih krompirja je 0,24 – 0,36 µg/µL klorogenske kisline inhibiralo PCR z reverzno transkriptazo (Singh in sod., 1998). Tudi EDTA koncentracija 0,5 mM ali več inhibira PCR (Rossen in sod., 1992; Peist in sod., 2001). Po ekstrakciji se DNA navadno resuspendira v 1-kratnem TE pufru (10 mM Tris-HCl in 1 mM EDTA), da bi se izognili težavam z inhibicijo, pa se lahko količina EDTA zmanjša (npr. 0,5-kratni ali 0,1-kratni TE pufer) ali popolnoma odstrani. V tem primeru se za resuspendiranje uporabi samo 10 mM Tris-HCl pufer (brez EDTA) ali zgolj sterilna destilirana voda, vendar je v primeru izostanka dodatkov za stabilnost obstojnost DNA omejena in ne more biti skladiščena za daljša časovna obdobja (Duncan in sod., 2003).

Beljakovine v visokih koncentracijah (npr. 1 % hidrolizat kazeina) lahko prav tako inhibirajo PCR (Terry in sod., 2002). Tudi ionski detergenti (npr. natrijev

dodecil sulfat - SDS) so znani kot bolj inhibitorni od ne-ionskih (Tween 20, Triton X-100) (Rossen in sod., 1992). SDS in cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), ki se pogosto uporabljata v zgodnjih fazah ekstrakcije DNA, v koncentracijah nad 0,005 % inhibirata PCR (Peist in sod., 2001). Med pogostimi inhibitorji PCR so tudi kontaminacije laboratorijskega izvora, kot je smukec z laboratorijskih rokavic. Spiranje rokavic ali uporaba rokavic brez smukca znatno zmanjša pogostost inhibicije iz tega vira (Wilson, 1997).

V naslednjih poglavjih so opisani nekateri postopki čiščenja in odpravljanja negativnih učinkov inhibitorjev na pomnoževanje s PCR, več sistemov je tudi komercialno dostopnih (Vanechoutte in Van Eldere, 1997).

2.1 Pregled pristopov k izločanju ali zmanjševanju vpliva inhibitorjev PCR

2.1 A review of approaches for elimination or attenuation of effects of PCR inhibitors

Za uspešno pomnoževanje tarčne DNA s PCR je izbira za tip vzorca najprimernejše metode izolacije DNA nedvomno ključna. Primerna metoda izolacije DNA je tista, ki omogoča, da iz vzorcev izoliramo DNA ustrezne integritete, čistosti in kvantitete za uspešno pomnoževanje s PCR. Izbira najprimernejše metode za izolacijo DNA je tako močno odvisna od tipa in narave samih vzorcev, saj se le-ti med seboj lahko močno razlikujejo glede na vsebnost tarčne DNA in tipa ter količin inhibitorjev. Metode izolacije DNA lahko delimo na tiste, pri katerih v laboratoriju sami pripravimo vse potrebne raztopine in sestavine za izvedbo postopka, in tiste, pri katerih uporabimo predpripravljene komercialne komplete, ki že vsebujejo vse potrebne raztopine in se-

stavine za izvedbo izolacije DNA. Večina metod iz prve skupine temelji bodisi na postopku izolacije DNA s CTAB, katerega osnovno izvedbo sta prva opisala Doyle J. J. in Doyle J. L. (1987), ali na postopku izolacije DNA z SDS, katerega osnovno izvedbo so opisali Dellaporta in sod. (1983). Obe osnovni metodi sta doživeli številne izboljšave in prilagoditve različnim tipom vzorcev, kar sta pregledala in povzela Demeke in Jenkins (2010).

Komercialni kompleti za izolacijo DNA so priročnejša alternativa tradicionalnim laboratorijskim metodam izolacije DNA. V splošnem velja, da je izolacija DNA s komercialnimi kompleti hitrejša, da ti ne vsebujejo nevarnih kemikalij, kot so npr. kloroform, fenol in β -merkaptoetanol, ter da zagotavljajo bolj ponovljive in med laboratoriji bolj primerljive rezultate, ker so odkloni v koncentracijah sestavin izolacijskih raztopin predvidoma manjši kot pri tistih, ki jih pripravimo sami v laboratoriju. Slaba stran komercialnih kompleto je njihova cena, ki je lahko tudi do 10-krat višja od cene postopka izolacije s CTAB ali SDS, in dejstvo, da so količine vzorca, iz katerega lahko izoliramo DNA, relativno omejene in jih tudi ne moremo enostavno prilagoditi večjim količinam vzorca (Demeke in Jenkins, 2010). Razvitih je bilo že veliko število različnih komercialnih kompleto, ki so specifično prilagojeni za učinkovito izolacijo nukleinskih kislin ustrezne kakovosti in količine za neposredno pomnoževanje s PCR iz najrazličnejših tipov vzorcev. Večina komercialnih kompleto za izolacijo DNA temelji na uporabi kolone, ki se vstavi v standardne mikrocentrifugirke, in vsebuje membrano iz silicijevega dioksida, na katero se veže DNA v razmerah visoke koncentracije soli. To omogoča, da pred končno elucijo DNA z vodo ali pufri na osnovi Tris izperemo sledove nečistoč in inhibitorjev, ki morebiti še niso bili odstranjeni v predhodnih korakih. Nekatere komercialne komplete za izolacijo DNA predstavljamo v poglavju o pristopih k odstranjevanju inhibitorjev iz posameznih tipov vzorcev.

V primeru, da s klasičnimi postopki izolacije DNA ali celo s komercialnimi kompleti za izolacijo DNA ne moremo odstraniti inhibitorjev PCR, lahko negativni vpliv inhibitorjev na PCR poskušamo rešiti s sledečimi pristopi. Z redčenjem izolirane DNA zmanjšamo koncentracijo inhibitorjev v PCR in posledično lahko dosežemo uspešno pomnoževanje tarčne DNA s PCR. Po drugi strani pa redčenje zmanjša tudi koncentracijo tarčne DNA, kar pomeni, da zmanjšamo občutljivost pomnoževanja le-te s PCR (Demeke in Jenkins, 2010). Inhibitorje lahko iz izolatov DNA odstranimo z uporabo komercialnih kompleto za čiščenje DNA po izolaciji. Primeri tovrstnih kompleto, katerih mehanizem delovanja je zelo podoben komercialnim kompletom za

izolacijo DNA, so: UltraClean® in PowerClean® DNA clean-up kit (Mo Bio Laboratories, ZDA) (Elshahed in sod., 2009); DNA clean & concentrator™ in OneStep™ PCR inhibitor removal kit (Zymo Research, ZDA). Zадnji izmed naštetih možnih pristopov pa vključuje uporabo t.i. pospeševalcev pomnoževanja s PCR, od katerih se nekateri lahko dodajajo neposredno v PCR-mešanice, drugi pa med samim postopkom izolacije DNA (Wilson, 1997; Demeke in Jenkins, 2010).

2.2 Pospeševalci pomnoževanja s PCR

2.2.1 PCR enhancers

Pospeševalce pomnoževanja s PCR najenostavneje opišemo kot spojine, ki izboljšajo uspešnost pomnoževanja tarčnih nukleinskih kislin s PCR. Njihov mehanizem delovanja lahko temelji na odstranjevanju oziroma zmanjševanju učinka inhibitorjev PCR ali splošnem izboljšanju učinkovitosti pomnoževanja tarčnih nukleinskih kislin, ki ni nujno neposredno povezano z inhibitorji. Nekatere dodajamo med postopkom izolacije DNA, druge neposredno v PCR-mešanice, nekatere pa celo v oboje. Namen tega poglavja je predstaviti nabor najpogostejše uporabljanih pospeševalcev pomnoževanja DNA ter njihovih splošnih lastnosti in učinkov.

2.2.1 Splošni pospeševalci pomnoževanja s PCR

2.2.1 General PCR enhancers

Najpogostejše uporabljani splošni pospeševalci pomnoževanja s PCR, ki primarno ne zmanjšujejo učinka inhibitorjev PCR in jih dodajamo neposredno v PCR mešanice, so dimetilsulfoksid (DMSO) (Varadaraj in Skinner, 1994; Bookstein in sod., 1990; Gelfand, 1989), formamid (Sarkar in sod., 1990; Gelfand, 1989) in betain (Rees in sod., 1993; Weissensteiner in Lanchbury, 1996; Baskaran in sod., 1996; Henke in sod., 1997; Hengen, 1997). Učinkujejo tako, da zmanjšajo energijo vodikovih vezi v dvoverižni DNA (dsDNA) in tako možnost nastajanja sekundarnih struktur DNA, ki lahko ovirajo delovanje DNA-polimeraze, ter nespecifičnega naleganja začetnih oligonukleotidov, kar pomeni, da se v PCR reagenti porabljajo učinkoviteje in izključno ali večinoma za pomnoževanje tarčnih nukleinskih kislin. Betain ima poleg DNA-denaturacijskih tudi izenačevalno-stabilizirajoči učinek na prispevek AT in GC baznih parov na stabilnost dsDNA (Rees in sod., 1993) in tudi poveča toplotno stabilnost polimeraze (Santoro in sod., 1992). Učinki DMSO in formamida na učinkovitost in specifičnost PCR pa niso vedno enaki. Sarkar in sod. (1990) so poročali, da v nasprotju s formamidom DMSO ni imel učinka na specifičnost PCR, nasprotno pa sta Varadaraj in Skinner (1994) poročala, da je imel DMSO bistveno močnejši učinek na specifičnost in izplen PCR

kot formamid. Razpon učinkovitih koncentracij DMSO v PCR mešanicah je od 1 % do 10 %, in od 1 % do 5 % za formamid, višje koncentracije pa naj bi delovale inhibitorno (Varadaj in Skinner, 1994; Chakrabarti in Schutt, 2001; Farell in Alexandre, 2012). Poleg splošnega izboljšanja učinkovitosti PCR za DMSO nekateri avtorji poročajo, da tudi zmanjšuje negativne učinke nekaterih inhibitorjev PCR, kot so DNA-vezavne beljakovine (Pomp in Medrano, 1991) ter kisli polisaharidi iz školjk (Jaykus in sod., 1996) in rastlinskih tkiv (Demeke in Adams, 1992). Betain se v PCR mešanice, odvisno od tipa DNA-polimeraze, dodaja v končnih koncentracijah od 0,7 M do 2,5 M in se pogosto uporablja skupaj z DMSO (Weissensteiner in Lanchbury, 1996; Baskaran in sod., 1996; Henke in sod., 1997; Hengen, 1997). Baskaran in sod. (1996) so poročali, da so koncentracije betaina, višje od 1,0 M, lahko inhibitorne za klasično *Taq* DNA-polimerazo. DMSO in betain naj bi pomembno prispevala k učinkovitosti pomnoževanja z GC-baznimi pari bogatih zaporedij DNA (Varadaraj in Skinner, 1994; Baskaran in sod., 1996; Henke in sod., 1997; Frackman in sod., 1998). Frackman in sod. (1998) so ugotovili, da je betain mnogo učinkovitejši pospeševalec pomnoževanja s PCR z GC-baznimi pari bogatih zaporedij DNA od DMSO, in z jedrsko magnetno resonanco (NMR) tudi dokazali, da so nekateri komercialni pospeševalci PCR, katerih sestava je poslovna skrivnost, pravzaprav preproste raztopine betaina.

2.2.2 Protiinhibitorni pospeševalci pomnoževanja s PCR

2.2.2 Anti-inhibitory PCR enhancers

Najpogostejše uporabljani pospeševalci pomnoževanja s PCR, katerih namen je odstranjevanje inhibitorjev ali zmanjševanje njihovega učinka, so natrijev sulfat (Na_2SO_4), askorbinska kislina, citronska kislina, β -merkaptetanol, polivinil pirolidon (PVP) in polivinil polipirrolidon (PVPP), posneto mleko, BLOTTO (10 % posneto mleko in 0,2 % natrijev azid (NaN_3)), goveji serumski albumin (BSA), beljakovina, ki jo kodira gen 32 bakteriofaga T4 (gp32) in DMSO, katerega protiinhibitorni učinki so že predstavljeni v sklopu splošnih pospeševalcev pomnoževanja s PCR (Wilson, 1997; Clark, 1997).

Natrijev sulfat (Na_2SO_4)

Sodium sulphate (Na_2SO_4)

Natrijev sulfat se uporablja kot dodatek pufrom v postopkih ekstrakcije DNA (Byrne in sod., 2001; Singh in sod., 2002; Baranwal in sod., 2003). Deluje kot reducent in inhibira aktivnost polifenol oksidaz in peroksidaz (Wu in sod., 1999). Mehanizem delovanja natrijevega sulfita temelji na preprečevanju oksidacije polifenolov

s strani polifenol oksidaz v kinonske oblike, ki tvorijo kovalentne vezi z beljakovinami in DNA (Young in sod., 1993). V literaturi navedene učinkovite koncentracije natrijevega sulfita kot edinega pospeševalca v DNA ekstrakcijskih pufrih se gibljejo od 0,6 % [w/v] do 2,0 % [w/v] (Byrne in sod., 2001; Singh in sod., 2002; Baranwal in sod., 2003). Singh in sod. (2002) ter Baranwal in sod. (2003) so ugotovili, da je optimalna koncentracija natrijevega sulfita v pufru za ekstrakcijo DNA iz rastlinskih tkiv 0,65 %, saj pri višjih koncentracijah niso zaznali izboljšanja rezultatov pa tudi negativnih učinkov na uspešnost PCR ne. Poleg zmanjševanja vpliva polifenolnih inhibitorjev na PCR in povečanje izplena pri izolaciji DNA, pa so Byrne in sod. (2001) poročali, da je dodatek natrijevega sulfita tudi povečal delež visokomolekularne DNA v končnem izolatu v primerjavi s postopkom brez dodanega natrijevega sulfita. Mehanizem tega učinka ostaja nepojasnen, očitno pa natrijev sulfat tudi neposredno ali posredno zavira delovanje nukleaz v ekstrakcijskih mešanicah med izolacijo DNA.

Askorbinska kislina in soli askorbinske kisline

Ascorbic acid and ascorbates

Askorbinska kislina ali njene soli se uporabljajo kot dodatek pufrom v postopkih ekstrakcije DNA za odpravljanje inhibitornih učinkov polifenolov (Bielski, 1982; Clark, 1997; Borse in sod., 2011). Askorbinska kislina deluje kot inhibitor polifenol oksidaz s sinergijskim učinkom antioksidativnega delovanja in znižanja pH ekstrakcijskega pufra nižje od optimalnega območja polifenol oksidaz (Inoue in sod., 2006; Borse in sod., 2011). Borse in sod. (2011) so ugotovili, da optimalen pufer za ekstrakcijo DNA iz rastlinskih tkiv, bogatih s polifenoli, vsebuje 0,40 mM koncentracijo askorbinske kisline in 0,2 % [v/v] β -merkaptetanola ter opozarjajo, da višje koncentracije askorbinske kisline negativno vplivajo na izplen DNA. Po drugi strani v literaturi zasledimo tudi mnogo višje koncentracije askorbinske kisline v pufrih za ekstrakcijo DNA iz rastlinskih tkiv, t.j. od 100 mM do 300 mM (Rowhani in sod., 1993; Leite in sod., 1995; Poussier in sod., 2002).

Citronska kislina

Citric acid

Širša uporaba citronske kisline kot dodatek pufrom za ekstrakcijo DNA ni zabeležena. Omenjamo jo predvsem, ker so Singh in sod. (1998) odkrili, da dodatek 1,2 % [w/v] citronske kisline v pufer za ekstrakcijo DNA iz krompirjevih gomoljev zelo učinkovito preprečuje inhibitorni učinek klorogenske kisline na PCR. Klorogenska kislina in njene polimerne oblike so polifenolne spojine, ki jih najdemo v večini rastlin (Bell,

1980; Friedman, 1997) in lahko sestavljajo do 90 % celokupnih fenolnih spojin v rastlinskih tkivih (Mondy in Gosselin, 1988). Predvidoma naj bi učinek citronske kisline temeljil na njenem kelacijskem delovanju za železove katione, ki se drugače vežejo s klorogensko kislino v rjavo obarvan kompleks, ki naj bi deloval inhibitorno na PCR (Singh in sod., 1998). Avtorja tega prispevka pa se sprašujeta, ali ni morda učinek citronske kisline bolj večplasten in sinergističen, saj podobno kot askorbinska kislina tudi citronska kislina deluje antioksidativno in znižuje pH.

β -merkaptetoetanol

β -mercaptoethanol

β -merkaptetoetanol je močan reducent, ki se dodaja v pufre za ekstrakcijo DNA z namenom preprečevanja oksidacije polifenolov, a je hkrati tudi splošen denaturant beljakovin zaradi zmožnosti denaturacije disulfidnih vezi med cisteinskimi ostanki. V literaturi zabeležene koncentracije v pufrih za ekstrakcijo DNA se gibljejo večinoma od 0,1 – 0,2 % (v/v) (Murray in Thompson 1980; Doyle J.J. in Doyle J.L., 1987; Rowhani in sod., 1993), izjemoma tudi do 5 % (v/v) (Puchooa, 2004). Pogosto ga med postopki ekstrakcije DNA dodajamo skupaj z drugimi pospeševalci, kot sta npr. PVP (Rowhani in sod., 1993; Wah in Symons, 1997; Puchooa, 2004) in askorbinska kislina (Borse in sod., 2011).

Polivinil pirolidon (PVP) in polivinil polipirrolidon (PVPP)

Polyvinylpyrrolidone (PVP) and Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

PVP in PVPP sta sorodni spojini, ki se uporabljata za odstranjevanje polifenolov iz rastlinskih ekstraktov tudi v postopkih izolacije nukleinskih kislin (Gustavson, 1954; Loomis in Battaile 1966; Holben in sod., 1988; Maliyakal, 1992; Young in sod., 1993). Njun učinek temelji na sposobnosti tvorbe vodikovih vezi s polifenolnimi spojinami, ki jih na ta način odvezemata iz raztopine (Gustavson, 1954). Poglavitna razlika med PVP in PVPP je ta, da je PVP vodotopen, PVPP pa ne. Ekstrakcijski pufri s PVPP tvorijo suspenzijo, iz katere lahko delce kompleksa PVPP-polifenoli enostavno odstranimo s centrifugiranjem (Evans in sod., 1972; Holben in sod., 1988). Dodatno lahko sloj PVPP natresemo na površino membrane v kolonah za vezavo DNA, ki so običajen del komercialnih kompletov za izolacijo DNA, in tako iz raztopine odstranimo preostale polifenole (Berthelet in sod., 1996; Cullen in Hirsch, 1998). PVP in PVPP se v pufre za ekstrakcijo DNA dodajata v koncentracijah od 0,1 % do 10 % (w/v) in se pogosto uporabljata skupaj z drugimi pospeševalci pomnoževanja

s PCR, zlasti antioksidanti in reducenti, kot so natrijev sulfit, β -merkaptetoetanol in askorbinska kislina pa tudi BSA (Minsavage in sod., 1994; Leite in sod., 1995; Aljanabi in sod., 1999; Holben in sod., 1988; Puchooa, 2004; Rowhani in sod., 1993; Pryor in Gilbertson, 2001; Poussier in sod., 2002). PVP lahko dodajamo tudi v PCR-mešanice, pri čemer v literaturi zasledimo koncentracije od 0,5 % do 2 % (w/v) (Fegan in sod., 1998; Konjool in sod., 1999; Pan in sod., 1998). Young in sod. (1993) so poročali, da so koncentracije PVP nad 0,5 % (w/v) inhibitorne za pomnoževanje s PCR, medtem ko npr. Konjool in sod. (1999) ugotavljajo, da je inhibitorna koncentracija PVP v PCR mešanicah šele nad 2 % (w/v). Možna razlaga za tovrstne odklone je, da PVP deluje inhibitorno na pomnoževanje nukleinskih kislin s PCR zgolj v prosti obliki, koncentracija le-te pa je med drugim odvisna od količine in razmerja polifenolov in PVP v PCR.

Posneto mleko in BLOTTO

Powdered milk and BLOTTO

Posneto mleko v prahu in BLOTTO (10 % (w/v) posneto mleko v prahu in 0,2 % (w/v) natrijev azid) se v literaturi omenjata kot pospeševalca pomnoževanja s PCR in naj bi predvsem zmanjševala inhibitorne vplive polifenolov, čeprav mehanizem njunega delovanja še ni razjasnjen (De Boer in sod., 1995; Garcia-Pedrajas in sod., 1999; Pryor in Gilbertson, 2001). Možen učinek je morda vezan na mlečne beljakovine, ki so lahko alternativna tarča za vezavo polifenolov in tudi za proteolitične encime. De Boer in sod. (1995) so poročali, da je dodatek 1 % do 5 % [v/v] BLOTTO neposredno v PCR-mešanice zmanjšal učinek rastlinskih inhibitorjev pri pomnoževanju DNA, izolirane iz krompirjevih gomoljev. Pri koncentracijah višjih od 5 % je BLOTTO (= 0,5 % [w/v] posnetega mleka v prahu) deloval inhibitorno na PCR. Podobno sta Pryor in Gilbertson (2001) ugotovila pozitivne učinke 0,2 % [w/v] posnetega mleka na uspešnost pomnoževanja DNA s PCR pri vzorcih DNA, izolirane iz semen korenja. Volossiuk in sod. (1995) in Garcia-Pedrajas in sod. (1999) pa so dokazali pozitivne učinke dodatka posnetega mleka v prahu v pufer za ekstrakcijo DNA iz različnih tipov tal, pri čemer so bile optimalne koncentracije mleka v prahu 0,4 % [w/v] (Volossiuk in sdo., 1995) in 3,2 % do 4,8 % [w/v] (Garcia-Pedrajas in sod., 1999). V nasprotju z raziskavami De Boer in sod. (1995) ter Pryor in Gilbertson (2001) pa so Garcia-Pedrajas in sod. (1999) poročali o inhibitornih učinkih posnetega mleka v prahu na PCR, če med izolacijo DNA niso izvedli koraka odstranjevanja beljakovin. Ker dejanskih koncentracij beljakovin iz posnetega mleka v prahu, ki so ostale v

izolatih DNA, niso ugotavljali, je možno, da so le-te bile nad 0,5 % oz 2,0 % [w/v], ki so se v raziskavah De Boer in sod. (1995) ter Pryor in Gilbertson (2001) izkazale za mejne.

Goveji serumski albumin (BSA) in beljakovina, ki jo kodira gen 32 bakteriofaga T4 (gp32)

Bovine Serum Albumine (BSA) and Bacteriophage T4 gene 32-encoded protein (gp32)

BSA in gp32 se večinoma uporabljata kot pospeševalca, ki se dodajata neposredno v PCR- mešanice. Raziskave učinkov obeh pospeševalcev na uspešnost pomnoževanja DNA s PCR v prisotnosti različnih tipičnih inhibitorjev PCR so pokazale, da sta zlasti uspešna pri zmanjševanju inhibicije s polifenoli in njihovimi oksidiranimi oblikami in tudi beljakovinami (Kreader, 1996; Powell in sod., 1994; Giambernardi in sod., 1998; Panaccio in Lew, 1991; Widjoatmodjo in sod., 1992). Mehanizem protinhibitornega delovanja BSA in gp32 naj bi vsaj deloma temeljil na dejstvu, da predstavljata alternativne tarče za polifenole in proteolitične encime (Loomis, 1974; Kreader, 1996) ter tako zmanjšata njihov inhibični pritisk na nukleinske kisline in DNA polimeraze. BSA naj bi bil poleg tega sposoben tudi vezati lipide s tvorbo hidrofobnih interakcij in anione zaradi visoke vsebnosti lizina (Loomis, 1974). Poleg tega naj bi imel BSA tudi splošno pospeševalno aktivnost, ki ni vezana na protiinhibitorno delovanje, in izboljšal učinkovitost oziroma izplen pomnoževanja tarčne DNA s PCR (Henegariu in sod., 1997; Farrell in Alexandre, 2012). Tudi za gp32 velja, da naj bi deloval kot splošni pospeševalec PCR, zlasti za dolge pomnožke (Schwartz in sod., 1990), domnevno zato, ker lahko veže enoverižno DNA (ssDNA) in zavira njeno ponovno renaturacijo v dsDNA ter tako stimulira delovanje *Taq* DNA-polimeraze (Chase in Williams, 1986). V primeru polifenolnih inhibitorjev (huminska kislina, fulvična kislina, taninska kislina, hemin) je Kreader (1996) ugotovila, da je optimalna koncentracija BSA v PCR mešanici 200–400 ng/μl in 100–150 ng/μl za gp32, ter da oba pospeševalca omogočata učinkovito pomnoževanje s PCR pri vsaj stokrat višji koncentraciji polifenolov kot pa pri kontrolnem PCR brez pospeševalcev. V PCR za pomnoževanje tarčnih nukleinskih kislin, izoliranih iz različnih naravnih vzorcev, se BSA dodaja v koncentracijah od 0,1 ng/μl do 10 μg/μl, običajnejše pa v obsegu od 200 do 800 ng/μl (Henegariu in sod., 1997; Heuer in sod., 1997; Giambernardi in sod., 1998; Krsek in Wellington, 1999; Poussier in sod., 2002; Jiang in sod., 2005; Farrell in Alexandre, 2012) in gp32 od 10 ng/μl do 500 ng/μl (Kreader, 1996; Poussier in sod., 2002; Jiang in sod., 2005; Brons in Van Elsas, 2008). Nekateri avtorji pa so

poročali tudi o pozitivnih učinkih dodatka BSA v pufre za ekstrakcijo DNA v koncentracijah od 1,5 mg/ml do 10 mg/ml (Rowhani in sod., 1993; Volossiuk in sod., 1995; Wah in Symons, 1997).

2.3 Pregled postopkov izločanja inhibitorjev PCR za izbrane izhodne materiale

2.3 A review of approaches for elimination of inhibitors from materials of different origin

2.3.1 Vzorci rastlinskih tkiv

2.3.1 Plant tissue samples

Za detekcijo fitopatogenih organizmov s PCR je izbira metode izolacije nukleinskih kislin močno odvisna od vzorca. Na primer, za identifikacijo patogenih gliv v rastlinskih kulturah je v večini primerov uporabna preprosta metoda s segrevanjem micelija ali spor. Z okuženega tkiva vzamemo vzorec glivnih spor ali micelija, ga prenesemo v centrifugirko skupaj z 20–100 μl 1M Tris-HCl (pH 8) pufru in dvema kapljicama mineralnega olja. Vzorec segrevamo 15 minut pri 98–100 °C, po segrevanju pa ga nemudoma položimo na led za 5 minut. Po kratkem centrifugiranju (10.000 g, 2 min) je vsebina pripravljena za pomnoževanje s PCR (navadno uporabimo 1–2 μl alikvot) (Ma in Michailides, 2002). Ta preprosti protokol navadno ne deluje pri vzorcih, kjer je veliko inhibitorjev PCR, zato moramo za učinkovito zaznavanje patogenov iz okuženih rastlinskih tkiv, prsti, zraka ali vode poznati primerno metodo ekstrakcije DNA, da se znebimo inhibitorjev PCR, ki se sprostijo iz vzorcev.

Zgoraj opisani postopek zaznavanja rastlinskih patogenov je po poročanju nekaterih avtorjev možen tudi v okuženih rastlinskih tkivih bora in vinske trte (Hamelin in sod., 2000; Lecomte in sod., 2000). Pogosteje pa se zgodi, da je treba DNA iz takih vzorcev izolirati, da lahko v njih zaznamo majhne količine DNA patogenov. Tudi uspešno izolirano DNA je zaradi vsebnosti inhibitorjev PCR včasih težko uporabiti kot tarčo za PCR. Zato moramo v kontrolnem poskusu uporabiti set začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje rastlinske DNA, da dokažemo, ali je posamezni vzorec sploh možno pomnožiti (Tooley in sod., 2006). V rastlinskih tkivih lahko različne snovi zavirajo reakcije PCR (vključno s polisaharidi in fenolnimi komponentami) na različne načine; nekateri inhibitorji lahko delujejo kot kelatorji ionov Mg^{2+} , ki jih *Taq* DNA-polimeraza potrebuje kot kofaktorje, drugi pa z vezavo bodisi na samo DNA ali na DNA-polimerazo zavirajo reakcijo med polimerazo in tarčno DNA (Wilson, 1997). Učinek kelatorjev ionov Mg^{2+} lahko izničimo s povečanjem količine ionov Mg^{2+} , da le-ta v ustrezni meri preseže celokupno vezavno

kapaciteto kelatorjev, kar pa moramo ugotoviti empirično.

Več študij je že pokazalo, da redčenje ekstraktov DNA zmanjša učinek inhibitorjev PCR, vendar pa ta postopek tudi zmanjša občutljivost reakcije, kar pomeni, da se meja detekcije v tem primeru poveča. V takem primeru bi bilo smiselno napraviti test inhibicije z notranjimi kontrolami ali oceno linearnosti umeritvenih krivulj za določitev primernosti izolirane DNA za kvantifikacijo s PCR v realnem času (Lipp in sod., 2005; Corbisier in sod., 2007). Komercialni kompleti za izolacijo DNA odstranijo večino inhibitorjev PCR, vendar v specifičnih primerih ne odstranijo vseh. Zaradi tega je včasih treba v ekstrakcijske pufre ali v PCR-mešanico dodati pospeševalce pomnoževanja, kot so citronska kislina, natrijev sulfit, PVP, PVPP, BLOTTO, DMSO, posneto mleko v prahu, BSA, idr (Wilson, 1997; Singh in sod., 1998; Garcia-Pedrajas in sod., 1999; Louws in sod., 1999; Singh in sod., 2002). Na ta način so Singh *et al.* (2002) z dodatkom 0,65 % – 0,70 % (w/v) natrijevega sulfita v DNA-ekstrakcijski pufer izboljšali učinkovitost zaznavanja patogenov s PCR pri gomo-lju krompirja ter na listih in lubju češnje. Dodatek 1,2 % (w/v) citronske kisline v DNA- ekstrakcijski pufer prepreči inhibicijo PCR-pomnoževanja s klorogensko kislino (Singh in sod., 1998). Poussier in sod. (2002) so poročali o izboljšanjem zaznavanju patogenov s PCR iz paradižnika, jajčevca in paprike ob dodatku 2 % (w/v) PVP ali PVPP v DNA-ekstrakcijski pufer. Najbolj uspešna pa je bila kombinacija s 5 % (w/v) PVPP v ekstrakcijskem puffru in 500 ng/μl BSA v PCR-reakciji.

Poleg vključevanja zgoraj omenjenih reagentov v DNA-ekstrakcijske pufre so različni raziskovalci poizkušali tudi z dodajanjem reagentov v same PCR-mešanice. Pryor in Gilbertson (2001) sta ugotovila, da 0,2 % (w/v) mleko v prahu v končni PCR-reakciji močno izboljša zaznavanje tarčne glivne DNA pri okuženih semenih korenja. Dodajanje 4 % (v/v) BLOTTO, 0,8 % (w/v) PVP in 0,8 % (w/v) razvejenega polisaharida (t.i. ficoll) lahko prepreči inhibitorne učinke polifenolnih komponent iz rastlinskih tkiv (De Boer in sod., 1995). Tudi DMSO in glicerol lahko pri koncentracijah od 5 do 10 % (v/v) povečata učinkovitost in specifičnost PCR-reakcij, Henegariu in sod. (1997) pa so ugotovili, da BSA pri koncentracijah do 0,8 mg/ml izboljša učinkovitost PCR, podobno kot DMSO ali glicerol.

Že dobrih deset let pa je poznan preprost postopek izolacije RNA iz rastlinskih tkiv z uporabo specifičnega komercialnega kompleta za izolacijo RNA (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen), ki se je v raziskavah obnesel veliko boljše kot drugi preizkušeni komercialni in laboratorijsko pripravljeni postopki, saj so na ta način

praktično izničili vpliv fenolnih spojin in drugih inhibitornih komponent brez uporabe organskih topil in fenola, poleg tega pa je metoda izjemno hitra. Za maksimalno uspešnost so avtorji te raziskave rahlo modificirali pufer za lizo celic, in sicer so mu dodali PVP ter umerili pH na 5,0 z uporabo 0,2 M natrijevega acetata (Mackenzie in sod., 1997). Enak rezultat so kasneje prikazali tudi Eikenes in sod. (2005), ki so na podoben način izolirali glivno DNA iz lesnih vzorcev z uporabo kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Težavam so se dodatno izognili s pomnoževanjem ITS-regij ribosomskega operona glivne DNA, saj veliko število kopij tega dela DNA omogoča zaznavanje tudi zelo visokih redčitev vzorcev. Tako jim je uspelo uspešno zaznati tudi samo 0,00001 ng DNA v več ponovitvah. Proizvajalec Mo Bio Laboratories, Inc. (ZDA) je v letu 2013 lansiral nov komplet PowerPlant® DNA isolation kit za izolacijo nukleinskih kislin iz rastlinskih tkiv, ki poleg patentiranega in preverjeno učinkovitega sistema odstranjevanja inhibitorjev uvaja še dodatno raztopino, ki naj bi povzročila cepitev vezi med polifenoli in DNA in tako preprečila koprecipitacijo DNA in polifenolov pri vzorcih z zelo visoko vsebnostjo polifenolov.

Kljub temu da se za eliminacijo učinkov inhibitorjev PCR uporablja cela vrsta različnih snovi, je nujno poudariti, da je treba uporabnost in koncentracije tovrstnih dodatkov preveriti za vsak posamezen primer uporabe, saj lahko nekateri v previsokih koncentracijah celo sami zavirajo reakcije PCR (Wilson, 1997; Koonjul in sod., 1999).

2.3.2 Vzorci zraka

2.3.2 Air samples

Za ugotavljanje gostote spor patogenov v zraku se navadno uporabljajo pasti za spore. Mikroskopska identifikacija spor na pasteh je časovno zelo potratna in zahtevna naloga, ki zahteva posebno urjenje. Dosedanje raziskave so pokazale, da lahko glivno DNA spor, ujetih na Burkardovih pasteh, izoliramo iz pobranih vzorcev in jo zaznamo ter identificiramo s pomočjo PCR. Za odstranitev spor s trakov lahko pasti razrežemo na manjše kose in jih namočimo v 1,5 ml neionskega nendenaturacijskega detergenta (npr. Nonidet P-40 (Shell Chemical Co.) ali IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich)) v 2 ml centrifugirkah. Centrifugirke nato inkubiramo 10 minut pri 55 °C, 10 minut pa jih stresamo. Sledi centrifugiranje pri 10.000 g za 10 minut, pri čemer se spore posedejo na dno centrifugirk, supernatant odlijemo. Spore lahko razbijemo s celičnim homogenizatorjem, DNA pa izoliramo s katerim izmed komercialnih kompletov. Pri manj čistih vzorcih je potrebno še vmesno čiščenje, s katerim izmed komerci-

alnih kompletov, da se znebimo ostankov inhibitorjev PCR iz prvega koraka ekstrakcije DNA. Na ta način sta Ma in Michailides (2007) uspešno zaznala tudi samo 30 ujetih spor na 48-milimetrskem traku.

2.3.3 Vzorci prsti

2.3.3 Soil samples

Vzorci prsti so eni najbolj zahtevnih vzorcev za izolacijo čiste DNA brez inhibitorjev. Največjo težavo pri tem povzročajo fenolne komponente (predvsem huminske spojine), ki nastajajo pri mikrobni razgradnji rastlinskega materiala (npr. lignina). Huminske in nasploh fenolne spojine inhibirajo PCR na več načinov; nekatere lahko delujejo kot kelatorji kovinskih ionov (Muller-Wegener, 1988; Abbaszadegan in sod., 1993), lahko se vežejo na nukleinske kisline, lahko pa tudi na beljakovine (DNA-polimerazo) (Muller-Wegener, 1988).

Za izolacijo DNA iz prsti sta bila razvita dva pristopa. Prvi je direktna ekstrakcija DNA iz prsti s celično lizo *in situ* in čiščenjem DNA (Torsvik, 1980; Holben in sod., 1988). Za celično lizo se uporabljajo trije načini; fizična, kemična in encimatska liza ter kombinacije med njimi. Fizično lizo dosežemo s ponavljajočim zamrzovanjem in odtajanjem, zamrzovanjem in kuhanjem ali z mehansko homogenizacijo. Te metode so učinkovite za razbitje glivnega micelija in spor, vendar pogosto povzročijo lome znotraj verig DNA, kar se kaže v krajših segmentih nukleinskih kislin. Kemična liza sama ali v povezavi s fizično lizo je zelo pogosto uporabljena metoda. Verjetno najpogostejša kemikalija za ta namen je SDS, ki raztaplja hidrofobne celične membrane. Z dodajanjem pospeševalcev pomnoževanja (PVP, PVPP, BLOTTO idr.) pa lahko zmanjšamo učinek huminskih kislin iz zemlje na inhibicijo PCR (Robe in sod., 2003). Za encimatsko lizo celic se najpogosteje uporabljata encima lizocim in proteinaza K.

Drugi pristop je ločitev mikrobnih celic od delcev prsti z diferencialnim centrifugiranjem. Pri tem postopku je ključno stresanje vzorca v pufru, ki vsebuje natrijev pirofosfat, ki sprosti mikrobne celice z delcev prsti (Balkwill in sod., 1977; Bakken 1985). Nato vzorec prsti najprej centrifugiramo pri nižjih obratih, da se posedejo večji delci prsti, supernatant shranimo in dalje centrifugiramo pri višjih hitrostih, da se posedejo tudi mikrobne celice. Sledi liza ločenih celic in čiščenje nukleinskih kislin. Po lizi moramo opraviti čiščenje nukleinskih kislin, saj huminske kisline v prsti inhibirajo PCR. V večini starejših raziskav so ta proces opravili z ekstrakcijo v organskih topilih (v fenolu ali kloroformu) in obarjanjem v etanolu ali izopropanolu. Trenutno se v raziskavah večinoma uporabljajo komercialni

kompleti različnih proizvajalcev, na primer FastDNA SPIN kit for Soil (MP Biomedicals), UltraClean® soil kit in PowerSoil® DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc.), QIAamp DNA stool mini kit in QIAamp DNA mini kit (QiaGen). Glede kakovosti in čistosti izolirane DNA so Mahmoudi in sod. (2011) ugotovili, da najboljše rezultate daje PowerSoil® DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, inc.), ki se je izkazal kot izredno učinkovit tudi pri izolaciji glivne DNA iz razkrojenega lesa (Piškur in sod., 2011). V nekaterih primerih pa je še vedno potreben dodaten korak čiščenja DNA, da se odstranijo tudi ostanki huminskih kislin.

2.3.4 Vzorci vode

2.3.4 Water samples

Ekstrakcija visokokvalitetne DNA je ključna za uspešno detekcijo patogenov v vodnih vzorcih. V splošnem velja, da je treba patogene v vodnih vzorcih skoncentrirati pred ekstrakcijo DNA. Vodne vzorce lahko koncentriramo na dva načina, s centrifugiranjem ali s filtracijo. Z 10-minutnim centrifugiranjem pri 10.000 g zberemo večino glivnih spor, nastali usede pa obdelamo s komercialnim kompletom za izolacijo DNA. Po drugi strani pa veliko metod priporoča filtracijo, saj tako odstranimo tudi veliko inhibitorjev PCR, ki se v vodi pojavljajo v obliki organskih in anorganskih snovi. Hong in sod., (2002) so ocenili devet hidrofilnih membran za zbiranje spor iz vodnih vzorcev. Izkazalo se je, da membrana Durapore5 (Millipore Corporation) izboljša občutljivost pri kvantifikaciji plesni iz družine *Pythiaceae*, poleg tega pa tudi prihrani čas pri filtraciji. Po filtraciji se lahko filter razreže na majhne kose in uporabi direktno za izolacijo DNA. Za izolacijo DNA iz vodnih vzorcev je na voljo tudi cela vrsta učinkovitih kompletov (RapidWater® DNA Isolation Kit in PowerWater® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, inc.), SurePrep™ Water RNA/DNA Purification Kit (Fisher Bioreagents), Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (Epicentre Biotechnologies)). Za dodatno odstranitev inhibitorjev PCR lahko pred samim pomnoževanjem DNA na PCR uporabimo tudi že prej omenjene pospeševalce pomnoževanja. Jiang in sod. (2005), npr., poročajo o pomembnem zmanjšanju učinka inhibitorjev PCR ob dodatku 400 ng/μl BSA ali 25 ng/μl gp32.

3 ZAKLJUČKI

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je preprosta in visoko občutljiva metoda za eksponentno pomnoževanje specifičnih zaporedij nukleinskih kislin s sintezo RNA ali DNA *in vitro* in je široko uporabna v bioloških znanostih, tudi gozdarstvu in lesarstvu. Ker gre pri PCR za eksponentno pomnoževanje, pri katerem se v

idealnih razmerah v vsakem krogu količina pomnožka podvoji, imajo tudi relativno majhne motnje, ki zmanjšujejo učinkovitost pomnoževanja, lahko na končni rezultat pomnoževanja velik vpliv. Zaradi prisotnosti različnih inhibitorjev pomnoževanja s PCR se lahko meja oziroma občutljivost zaznavanja tarčne DNA ali RNA v vzorcih močno poslabša ali pa je le-to celo povsem onemogočeno. Predstavljeni pregled pristopov k izločanju in zmanjševanju vpliva inhibitorjev pomnoževanja s PCR kaže, da je obstoj inhibitorjev v izolatih nukleinskih kislin zelo pogost problem in da so znanstveniki v odgovor razvili številne različne postopke za izolacijo nukleinskih kislin in izločanje ali zmanjševanje vpliva inhibitorjev PCR, kar je nedvomno neposreden odsev izredne raznolikosti vzorcev, s katerimi se srečujemo v gozdarstvu in lesarstvu, in tudi tipov inhibitorjev v njih.

Pri izbiri ustrezne metode izolacije nukleinskih kislin je kot prvi korak priporočljivo preučiti naravo vzorcev, iz katerih jih želimo izolirati, pregledati znanstveno literaturo in v njej poiskati najobetavnejše pristope za izolacijo nukleinskih kislin ustrezne kakovosti, čistosti in količine za pomnoževanje s PCR. Končna izbira metode je pogosto kompromis med včasih nasprotujočimi si kriteriji – ceno, hitrostjo postopka in kakovostjo, čistostjo ter količino izoliranih nukleinskih kislin. Če cena ni ključna pri izbiri metode, so komercialni kompleti za izolacijo nukleinskih kislin nedvomno najpriročajnejša, najhitrejša in najzanesljivejša izbira, praviloma pa so tudi bolj ponovljivi od postopkov izolacije nukleinskih kislin z laboratorijsko pripravljenimi pufri. Za izolacijo DNA, primerne za neposredno pomnoževanje s PCR iz rastlinskih in glivnih tkiv, tudi lesa, se je kot izredno učinkovit izkazal komplet DNeasy plant mini kit proizvajalca Qiagen (Eikenes in sod., 2005). Pri izolaciji celokupne DNA iz vzorcev prsti pa po kakovosti in ponovljivosti prednjači komplet PowerSoil DNA isolation kit proizvajalca Mo Bio Laboratories, inc. (Mahmoudi in sod., 2011), ki se je izkazal kot izredno učinkovit tudi pri izolaciji glivne DNA iz razkrojenega lesa (Piškur in sod., 2011).

Pri uporabi klasičnih laboratorijskih postopkov za izolacijo DNA na osnovi CTAB ali SDS je za vzorce rastlinskih tkiv in prsti priporočljivo v ekstrakcijske pufre vključiti pospeševalce pomnoževanja s PCR, kot sta PVP ali PVPP v kombinaciji z antioksidanti oz. reducenti, npr. natrijevim sulfitom, za učinkovitejše odstranjevanje polifenolov, ki se v pregledani literaturi omenjajo kot najpogostejši in najtežavnejši izmed inhibitorjev PCR iz tega tipa vzorcev. Če inhibitorjev ne moremo v celoti odstraniti med postopkom izolacije nukleinskih kislin, lahko njihov vpliv na PCR zmanjšamo ali odpravimo tudi z redčenjem izoliranih nukleinskih kislin, z

dodatnim čiščenjem po izolaciji ali z dodajanjem pospeševalcev neposredno v PCR-mešanice, za kar sta se kot posebej učinkovita izkazala goveji serumski albumin (BSA) in beljakovina, ki jo kodira gen 32 bakteriofaga T4 (gp32). Koncentracije pospeševalcev PCR, ki se v literaturi navajajo kot najučinkovitejše, se lahko razlikujejo tudi za več velikostnih razredov, kar je najverjetneje posledica različnih količin inhibitorjev, ki se pojavljajo v različnih vzorcih. Ker je večina pospeševalcev v prevelikih koncentracijah tudi inhibitorna, jih je treba uporabljati previdno in empirično ugotoviti optimalne koncentracije za posamezen tip vzorcev.

Iz predstavljenega pregleda je razvidno, da se v večini primerov lahko znebimo negativnih učinkov inhibitorjev PCR, vendar je iskanje optimalne rešitve za težave z inhibitorji PCR lahko ravno tako kompleksno, kot so kompleksni vzorci, s katerimi se srečujemo v gozdarstvu in lesarstvu. Namen tega prispevka je pomagati raziskovalcem, ki se v gozdarstvu in lesarstvu ukvarjajo z analizami na osnovi PCR, pri iskanju najboljših pristopov za odpravljanje ali blaženje negativnih učinkov inhibitorjev pomnoževanja s PCR.

3 CONCLUSIONS

Polymerase chain reaction (PCR) is a simple, yet highly sensitive method for exponential amplification of specific nucleic acids targets by *in vitro* synthesis of DNA or RNA and has a broad range of applications in biological sciences, including forestry and wood science. Because PCR amplification is an exponential process, with doubling of the product at ideal efficiency in each cycle, even relatively minor disturbances can have dramatic effects on the outcome of the process. PCR inhibitors can negatively affect the detection limit, e.g. sensitivity of the process for detecting target nucleic acids or even inhibit the process entirely. The review of approaches for elimination or attenuation of PCR inhibitors' effects presented in this paper suggests that the presence of PCR inhibitors in DNA isolates is a common problem and that researchers have devised many different procedures for countering their negative effects on PCR amplification, a fact that is undoubtedly a direct reflection of immense diversity of sample material and inhibitors therein encountered in forestry and wood science.

When choosing the most suitable method for isolation of nucleic acids, it is important to first search for the most successful isolation methods yielding in nucleic acids of sufficient quality, purity and quantity for direct PCR amplification reported in scientific literature for the sample type in question. The final choice of nucleic acids isolation method has to consider dif-

ferent, often conflicting criteria – the cost per sample, the time required for performing the isolation and quality, purity and quantity of the isolated nucleic acids. When cost of the process is not an issue, commercially available nucleic acids isolation kits are undoubtedly the most convenient, the fastest and the most reliable approach, and have also been reported as superior in terms of reproducibility when compared to traditional nucleic acids isolation protocols utilising in-house prepared extraction and purification solutions. For isolation of DNA from plant and fungal tissues, as well as wood samples, DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) was reported as extremely efficient in yielding inhibitor-free DNA of good integrity and quantity (Eikenes *et al.* 2005). When it comes to the isolation of total DNA from soil samples, PowerSoil® DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, inc.) had proven itself as superior in terms of DNA quality and isolation reproducibility (Mahmoudi *et al.*, 2011) and was also reported as very efficient in isolation of fungal DNA from decomposing wood samples (Piškur *et al.*, 2011).

If traditional CTAB or SDS based protocols are to be used for isolation of nucleic acids from plant tissue and soil samples, it is recommended to include PCR enhancers such as PVP or PVPP combined with antioxidants or reducing agents such as sodium sulphite in extraction buffers to improve the removal of polyphenolics, which according to the reviewed literature represent the most commonly encountered and most problematic of the PCR inhibitors present in these types of samples. If PCR inhibitors are not successfully removed during the process of isolation of nucleic acids, several approaches for elimination or attenuation of their effects on PCR can be tried — dilution of DNA isolates, additional post-isolation nucleic acids purification steps or adding PCR enhancers directly into PCR mix. Bovine serum albumin (BSA) and bacteriophage T4 gene 32 protein (gp32) have been reported as particularly potent PCR enhancers that are added directly to PCR mixes. Caution should be asserted when utilising PCR enhancers as the most effective concentrations of some of these chemicals reported in the reviewed literature varied several orders of magnitude, most likely due to different quantities of the targeted inhibitors present in different types of samples. Since most PCR enhancers can in turn become inhibitory themselves, when used in too high concentrations, they should not be used in excess and optimal effective concentrations should be determined empirically for each individual sample type.

Based on the information presented in this review, it can be concluded that effects of PCR inhibitors can

be eliminated or attenuated in most cases. Finding the optimal approach to solving issues associated with PCR inhibitors can, however, be as complex as the samples encountered in forestry and wood science. It is the purpose of this paper to provide the researcher dealing with PCR-based analyses in forestry and wood science with a solid starting point for finding the approach for eliminating or attenuating the negative effects of PCR inhibitors.

4 VIRI

4 REFERENCES

- Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 5: 1318–1324.
- Aljanabi S.M., Forget L., Dookun A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant molecular biology reporter*, 17: 1–8.
- Bakken L.R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 6: 1482–1487.
- Balkwill D.L., Rucinsky T.E., Casida L.E. 1977. Release of microorganisms from soil with respect to transmission electron microscopy viewing and plate counts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43, 1: 73–87.
- Baranwal V.K., Majumder S., Ahlawat Y.S., Singh R.P. 2003. Sodium sulphite yields improved DNA of higher stability for PCR detection of Citrus yellow mosaic virus from citrus leaves. *Journal of Virological Methods*, 112: 153–156.
- Baskaran N., Kandpal R.P., Bhargava A.K., Glynn M.W., Bale, A., Weissman S.M. 1996. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome research*, 6: 633–638.
- Bell A.A. 1980. The time sequence of defense. V: Plant disease, an advanced treatise. Horsfall J.G., Cowling E.B. (ur.). New York, Academic Press: 53–73.
- Berthelet M., Whyte L.G., Greer C.W. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidene spin columns. *FEMS Microbiology Letters*, 138: 17–22.
- Bickley J., Short J.K., McDowell D.G., Parkes H.C. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 2: 153–158.
- Bielski B.H.J. 1982. Ascorbic acid; Chemistry, metabolism and uses. V: Chemistry of ascorbate radicals. Seiob P.A., Tolbert B.M. (ur.). Washington DC, American Chemical Society: 81–100.
- Bookstein R., Lai C.C., Hoang T., Lee W.H. 1990. PCR-based detection of a polymorphic *Bam*HI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Research*, 18, 6: 1666.
- Borse T., Joshi P., Chaphalkar S. 2011. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *Journal of plant molecular biology and biotechnology*, 2, 2: 1–7.
- Brons J.K., Van Elsas J.D. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and environmental microbiology*, 74, 9: 2717–2727.
- Brown D.W., Yu J.H., Kelkar H.S., Fernandes M., Nesbitt T.C., Keller N.P., Adams T.H., Leonard T.J. 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 4: 1418–1422.

- Byrne M., MacDonald B., Francki M. 2001. Incorporation of sodium sulfite into extraction protocol minimizes degradation of *Acacia* DNA. *Biotechniques*, 30: 742–748.
- Chakrabarti R., Schutt C.E. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Research*, 29, 11: 2377–2381.
- Chase J. W., Williams K.R. 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 103–136.
- Clark M.S. (ur.). 1997. *Plant molecular biology: A laboratory manual*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: 529 s.
- Corbisier P., Broothaerts W., Gloria S., Schimmel H., Burns M., Baoutina A., Emslie K.R., Furui S., Kurosawa Y., Holden M.J., Kim H.H., Lee Y.M., Kawaharasaki M., Sin D., Wang J. 2007. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of *Bt176* corn by real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9: 3249–3257.
- Cullen D.W., Hirsch P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR.- *Soil biology and biochemistry* 30: 983–993.
- De Boer S.H., Ward L.J., Li X., Chittaranjan, S. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO.- *Nucleic Acids Research* 23, 13: 2567–2568.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant molecular biology reports*, 1: 19–21.
- Demeke T., Adams R.P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*, 12: 332–334.
- Demeke T., Jenkins G.R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 6: 1977–1990.
- Do N., Adams R.P. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*, 10, 2: 162–166.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Duncan E., Setzke E., Lehmann J. 2003. General considerations for purification of genomic DNA. *Qiagen News*.
- Eikenes M., Hietala A.M., Alfredsen G., Fossdal C.G., Solheim H. 2005. Comparison of quantitative real-time PCR, chitin and ergosterol assays for monitoring colonization of *Trametes versicolor* in birch wood. *Holzforschung*, 59, 5: 568–573.
- Elshahed M.S., Youssef N.H., Spain A.M., Sheik C., Najar F.Z., Sukharikov L.O., Roe B.A., Davis J.P., Schloss P.D., Bailey V.L., Krumholz L.R., 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 17: 5422–5428.
- Evans H. J., Koch B., Klucas R. 1972. Preparation of nitrogenase from nodules and separation into components. *Methods in enzymology*, 24: 470–476.
- Farell E.M., Alexandre G. 2012. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC research notes*, 5: 257–264.
- Fegan M., Croft B.J., Teakle D.S., Hayward A.C., Smith, G.R. 1998. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant pathology*, 47: 495–504.
- Finking R., Marahiel M. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology*, 58: 453–488.
- Frackman S., Kobs G., Simpson D., Storts D. 1998. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. *Promega Notes*, 65: 27–30.
- Fraenkel G.S. 1959. The Raison d'Être Substances of Secondary Plant. *Science*, 129, 3361: 1466–1470.
- Friedman M. 1997. Potato polyphenols - Role in the plant and in the diet. V. Antinutrients and phytochemicals in food. Shahidi F. (ur.). Washington DC, American Chemical Society, 61–93.
- Fujii I., Watanabe A., Sankawa U., Ebizuka Y. 2001. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry and Biology*, 8: 189–197.
- Garcia-Pedrajas M.D., Bainbridge B.W., Heale J.B., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R.M., 1999. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 251–259.
- Gelfand D.H. 1989. Taq DNA polymerase. V: PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Erlich H.A. (ur.). New York, Stockton Press, 17–22.
- Giambernardi T.A., Rodeck U., Klebe R.J. 1998. Bovine serum albumin reverses inhibition of RT-PCR by melanin. *Biotechniques*, 25: 564–566.
- Gustavson K. H. 1954. Note on the fixation of vegetable tannins by polyvinylpyrrolidone. *Svensk Kemisk Tidskrift*, 66: 359–362.
- Hamelin R.C., Bourassa M., Rail J., Dusabenyagasani M., Jacobi V., Laflamme G. 2000. PCR detection of *Gremmeniella abietina*, the causal agent of Scleroderris canker of pine. *Mycological Research*, 104, 5: 527–532.
- Harki E., Talou T., Dargent R. 1997. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 58, 1-2: 69–73.
- Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23, 3: 504–511.
- Hengen P.N. 1997. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. *Trends in biochemical sciences*, 22, 6: 225–226.
- Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research*, 25, 19: 3957–3958.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and environmental microbiology*, 63, 8: 3233–3241.
- Holben W.E., Jansson J.K., Chelm B.K., Tiedje J.M. 1988. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3: 703–711.
- Holden M.J., Blasic J.R., Bussjaeger L., Kao C., Shokere, L.A., Kendall, D.C., Freese, L., Jenkins, G.R. 2003. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 9: 2468–2474.
- Hong C., Richardson, P.A., Kong, P. 2002. Comparison of membrane filters as a tool for isolating pythiaceae species from irrigation water. *Phytopathology*, 92, 6: 610–616.
- Inoue, N., Akasaka K., Arimoto H., Ohru H. 2006. Effect of ascorbic acid on the chemiluminescence of polyphenols. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 70: 1517–1520.
- Jaykus L.A., De Leon R., Sobsey M.D. 1995. Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. *Journal of Food Protection*, 58: 1357–1362.
- Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 12: 937–947.
- Kennedy J., Auclair K., Kendrew S.G., Park C., Vederas J.C., Hutchinson C.R. 1999. Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis. *Science*, 284: 1368–1372.

- Koonjul P.K., Brandt W.F., Farrant J.M., Lindsey G.G. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic acids research*, 27, 3, . 915–916.
- Kreader C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3: 1102–1106.
- Krsek M., Wellington E.M.H. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of microbiological methods*, 39: 1–16.
- Lecomte P., Péros J., Blancard D., Bastien N., Délye C. 2000. PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4475–4480.
- Leite R.P. Jr., Jones J.B., Somodi G.C., Minsavage G.V., Stall R.E. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease*, 79: 917–922.
- Lipp M., Shillito R., Giroux R., Spiegelhalter F., Charlton S., Pinero D., Song P. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88, 1: 136–155.
- Loomis W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in enzymology*, 31: 528–545.
- Loomis W. D., Battaile J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 5: 423–428.
- Louws F., Rademaker J., De Bruijn F. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogens: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual review of phytopathology*, 37: 81–125.
- Ma Z., Michailides T.J. 2002. A PCR-based Technique for Identification of *Fusicoccum* sp. from Pistachio and Various Other Hosts in California. *Plant Disease*, 86, 5: 515–520.
- Ma Z., Michailides T.J. 2007. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 26, 2: 145–161.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M. 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 81, 2: 222–226.
- Mahmoudi N., Slater G.F., Fulthorpe R.R., 2011. Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 8: 623–628.
- Maliyakal J.D. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20: 2381–2386.
- Minafri A., Hadidi A., Martelli G.P. 1992. Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vitis* 31: 221–227.
- Minsavage G.V., Thompson C.M., Hopkins D.L., Leite R.M.V.B.C. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84: 456–461.
- Mondy N.L., Gosselin B. 1988. Effect of peeling on total phenols, total glycoalkaloids, discoloration and flavor of cooked potatoes. *Journal of Food Science*, 53: 756–759.
- Muller-Wegener U. 1988. Interaction of humic substances with biota. V: Humic substances and their role in the environment. Frimmel F.H., Christman R.F. (ur.). New York, John Wiley and Sons, 179–192.
- Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 9: 4321–4325.
- Nolan T., Hands R.E., Ogunkolade W., Bustin S.A. 2006. SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical biochemistry*, 351, 2: 308–310.
- Pan Y.B., Grisham M.P., Burner D.M., Damann K.E. Jr., Wei Q. 1998. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunt disease. *Plant disease*, 82: 285–290.
- Panaccio M., Lew L. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Research*, 19: 1151.
- Pasloske B.L., Walkerpeach C.R., Obermoeller R.D., Winkler M., Dubois D.B. 1998. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 12: 3590–3594.
- Peist R., Honsel D., Twieling G., Löffert D. 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *Qiagen News*, 3: 7–9.
- Pelaez F. 2005. Biological activities of fungal metabolites. V: Handbook of Industrial Mycology. Dekker M. (ur.). New York, Taylor and Francis: 49–92.
- Piškur B., Bajc M., Robek R., Humar M., Sinjur I., Kadunc A., Oven P., Rep G., Al Sayegh-Petkovšek S., Kraigher H., Jurc D., Pohleven F. 2011. Influence of *Pleurotus ostreatus* inoculation on wood degradation and fungal colonization. *Bioresource Technology*, 102, 22: 10611–10617.
- Pomp D., Medrano J. F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 10: 58–59.
- Poussier S., Chéron J.J., Couteau A., Luisetti J. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of microbiological methods*, 51, 3: 349–359.
- Pryor B.M., Gilbertson R.L. 2001. A PCR-based Assay for Detection of *Alternaria radicina* on Carrot Seed. *Plant Disease*, 85, 1: 18–23.
- Puchooa D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, 3, 4: 253–255.
- Qiagen. 2006. DNeasy Plant Handbook, 28 s.
- Raistrick H. 1950. A Region of Biosynthesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 136, 885: 481–508.
- Rees W.A., Yager T.D., Korte J., Von Hippel P.H. 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry*, 32: 137–144.
- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P. 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39, 4: 183–190.
- Rodrigues M.L., Nimrichter L., Cordero R.J.B., Casadevall A. 2011. Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. *Frontiers in Microbiology*, 2, 171: 1–4.
- Rohn S., Rawel H.M., Kroll J. 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 12: 3566–3571.
- Rossen L., Nørskov P., Holmstrøm K., Rasmussen O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 1: 37–45.
- Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique. *Phytopathology*, 83, 7: 749–753.
- Santoro M.M., Liu Y., Khan S.M.A., Hou X.-L., Bolen D.W. 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, 31: 5278–5283.
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic acids research*, 18, 24: 7465.
- Schwarz K., Hansen-Hagge T. Bartram C. 1990. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Research*, 18: 1079.

- Séjalon-Delmas N., Roux C., Martins M., Kulifaj M., Bécard G., Dargent R. 2000. Molecular tools for the identification of *Tuber melanosporum* in agroindustry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6: 2608–2613.
- Singh R.P., Nie X., Singh M., Coffin R., Duplessis P. 2002. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *Journal of virological methods*, 99, 1-2: 123–131.
- Singh R.P., Singh M., King R.R. 1998. Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. *Journal of virological methods*, 74, 2: 231–235.
- Smith D.J., Earl A.J., Turner G. 1990. The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *The EMBO journal*, 9, 9: 2743–2750.
- Straub T.M., Pepper I.L., Gerba C.P. 1995. Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. *Water Science and Technology*, 31, 5-6: 311–315.
- Teiz L., Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. 3rd edition. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc.: 690 str.
- Terry C.F., Harris N., Parkes H.C. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 768–774.
- Tooley P.W., Martin F.N., Carras M.M., Frederick R.D. 2006. Real-Time Fluorescent Polymerase Chain Reaction Detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* Using Mitochondrial Gene Regions. *Phytopathology*, 96, 4: 336–345.
- Torsvik V.L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 12, 1: 15–21.
- Tsai Y.L., Olson B.H. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2: 754–757.
- Tsai Y.L., Olson B.H. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 4: 1070–1074.
- Tudzynski P., Hölter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. 1999. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics*, 261, 1: 133–141.
- Vaneechoutte M., Van Eldere J. 1997. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *Journal of medical microbiology*, 46, 3: 188–194.
- Varadaraj K., Skinner D.M. 1994. Denaturants or co-solvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*, 140, 1: 1–5.
- Volossiuk T., Robb E.J., Nazar R.N. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 11: 3972–3976.
- Wah Y.F.W.C., Symons R.H. 1997. A high sensitivity TR-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. *Journal of virological methods*, 63: 57–69.
- Weissensteiner T., Lanchbury J.S. 1996. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *Biotechniques*, 21: 1102–1108.
- Widjoatmodjo M.N., Fluit A. C., Torensma R., Verdonk G.P.H.T., Verhoef J. 1992. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3195–3199.
- Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M., Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 80, 5: 1106–1122.
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 10: 3741–3751.
- Wu H.C., Chu H.L., Kuo J.M., Huang L.C., Shaw J.F. 1999. The biochemical characteristics of polyphenol oxidase from browning tissue-cultured bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*). *Food Science and Agricultural Chemistry*, 1: 244–249.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 1: 3–19.
- Young C., Burghoff R.L., Keim L.G., Minak-Bernero V., Lute J.R., Hinton S.M. 1993. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1972–1974.