



Molekulárne markery tolerancie sucha u rastlín

Metodická príručka s aplikáciou na jačmeň siaty

**Šarlota Kaňuková, Marcela Gubišová, Martina Hudcovicová,
Jozef Gubiš, Katarína Ondreičková**

ISBN 978-80-89417-82-7

NÁZOV	Molekulárne markery tolerancie sucha u rastlín Metodická príručka s aplikáciou na jačmeň siaty
AUTORI	RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD. Mgr. Marcela Gubišová, PhD. Mgr. Martina Hudcovicová, PhD. Ing. Jozef Gubiš, PhD. Mgr. Katarína Ondreičková, PhD.
VYDANIE	prvé
VYDAVATEĽ	Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum Sekcia vedy, výskumu a inovácií Odbor rastlinnej výroby Oddelenie aplikovanej biológie a genetiky Bratislavská cesta 122 921 68 Piešťany
ROK VYDANIA	2026
POČET STRÁN	65
ISBN	978-80-89417-82-7

Metodická príručka vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR a je výstupom riešenia úlohy odbornej pomoci č. 26 pre rok 2026 „Výskum tolerancie voči suchu vybraných druhov poľnohospodárskych plodín pre udržateľnosť a adaptáciu ku klimatickým zmenám“, v rámci kontraktu MPRV SR (1299/2025/MPRVSR-930) a NPPC (329/2025/NPPC).

Pri príprave tejto metodickéj príručky boli použité nástroje umelej inteligencie BioRender.com, Nano Banana Pro a Canva výhradne na tvorbu grafických ilustrácií a schém. Textová časť dokumentu nebola generovaná pomocou AI; autori ju spracovali na základe odborných poznatkov a experimentálnych dát.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Potrebný materiál a pomôcky	7
3. Chemikálie a prístrojové vybavenie	8
4. Metodika	9
4.1 Príprava rastlinného materiálu a odber vzoriek	9
4.1.1 Príprava rastlinného materiálu pre molekulárne analýzy	9
4.1.2 Aplikácia stresu suchom.....	10
4.2 Izolácia celkovej RNA	13
4.3 Kontrola kvality a kvantity RNA	19
4.4 Syntéza komplementárnej DNA.....	25
4.4.1 Príprava reakčnej zmesi a syntéza cDNA.....	26
4.4.2 Kontroly a najčastejšie problémy pri syntéze cDNA	27
4.5 Dizajn a validácia primerov.....	29
4.5.1 Overenie amplifikačnej efektivity a špecificity primerov	30
4.6 Kvantitatívna RT-PCR	33
4.6.1 Princíp fluorescenčnej detekcie pri qPCR – použitie SYBR Green I a hodnota Ct	33
4.6.2 Príprava reakčnej zmesi a teplotný program	34
4.6.3 Rozloženie vzoriek na qPCR platničke	36
4.6.4 Kontroly a opakovania	37
4.6.5 Najčastejšie problémy a ich riešenie	38
5. Spracovanie výsledkov RT-qPCR a výpočet násobnej zmeny expresie génov	40
5.1 Komparatívna Cq metóda podľa Livak a Schmittgen (2001)	40
5.1.1 Výpočet ΔCq	40
5.1.2 Výpočet $\Delta\Delta Cq$	41
5.1.3 Výpočet násobnej zmeny expresie génu.....	41
5.2 Alternatívny výpočet pri rozdielnych amplifikačných efektivitách.....	42
5.3 Ďalšie spracovanie výsledkov	43
6. Záver.....	45
7. Použitá literatúra.....	46
8. Prílohy	48

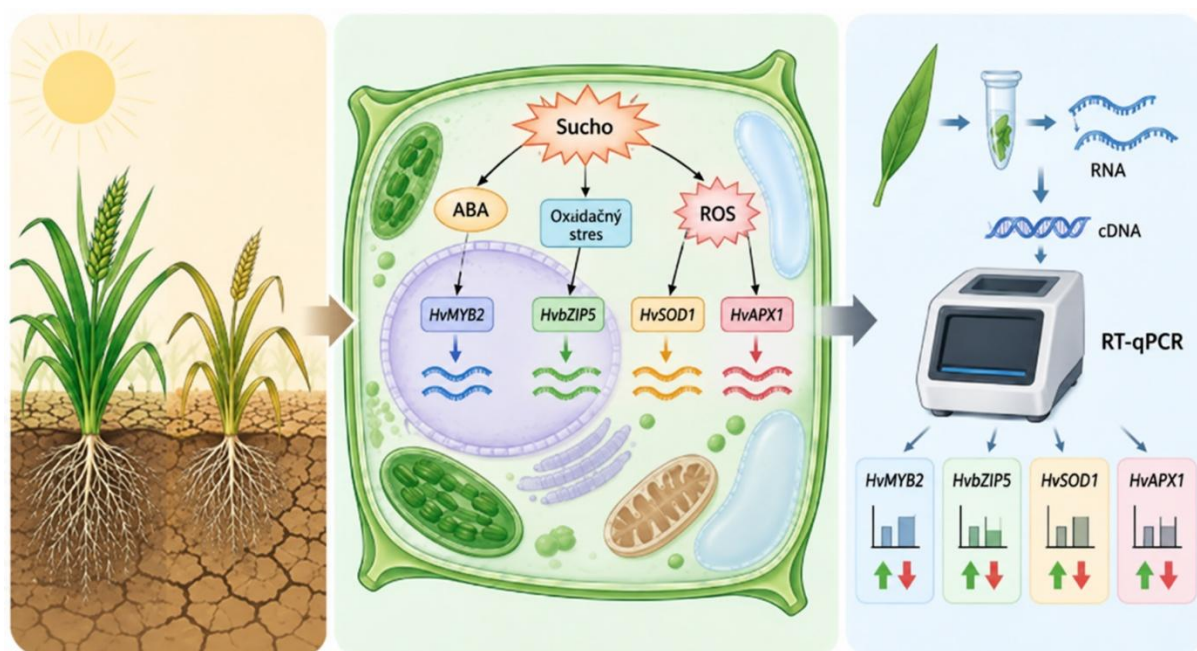
1. Úvod

Sucho predstavuje jeden z najvýznamnejších abiotických stresových faktorov obmedzujúcich rast, vývin a produkčný potenciál poľnohospodárskych plodín, pričom jeho dopady sa v európskom poľnohospodárstve v posledných prehlbujú. Podľa údajov Eurostatu sa desaťročný kľzavý priemer plochy územia Európskej únie zasiahnutej suchom medzi rokmi 2019 a 2024 zvýšil o 19,6 %, pričom v mimoriadne suchom roku 2022 bolo ovplyvnených 13,3 % územia EÚ, čo predstavovalo viac ako 558 000 km² (Eurostat, 2026). Najnovšie správy Európskej komisie poukazujú na zhoršovanie podmienok sucha v niektorých častiach Európy aj počas roka 2026 (European Drought Observatory, 2026).

Dôsledky vodného deficitu sa bezprostredne premietajú aj do poľnohospodárskej produkcie; Európska environmentálna agentúra uvádza, že v mimoriadne suchých rokoch môžu výnosy plodín klesnúť až o 22 % a sucho v súčasnosti predstavuje približne 54 % strát poľnohospodárskeho sektora spôsobených extrémnymi klimatickými javmi v EÚ (EEA, 2026). Závažnosť problému potvrdzuje aj vývoj na Slovensku. Podľa Slovenského hydrometeorologického ústavu začiatkom júla 2025 vyvrcholilo pôdne sucho, keď extrémne suché podmienky zasahovali až 87,5 % územia Slovenska; pre porovnanie, pri vrchole sucha v roku 2022 pokrývala kategória extrémneho sucha 59,7 % územia (Labudová a kol., 2025). Tieto údaje poukazujú na to, že vodný deficit už nepredstavuje iba projekciu budúceho klimatického vývoja, ale aktuálny faktor ovplyvňujúci stabilitu rastlinnej produkcie a zdôrazňujúci potrebu lepšieho poznania mechanizmov adaptácie plodín na nedostatok vody. Reakcia rastlín na sucho je komplexná a zahŕňa koordinované fyziologické, biochemické a molekulárne procesy, pričom ich rozsah a účinnosť sú výrazne ovplyvnené genotypom. Na molekulárnej úrovni dochádza k zmenám génovej expresie spojenými najmä so stresovou signalizáciou, osmotickou reguláciou a antioxidačnou ochranou buniek. Významné postavenie v regulácii odpovede na vodný deficit má kyselina abscisová (ABA) a ABA dependentné transkripčné faktory. Gén *HvABF2* u jačmeňa kóduje ABA dependentný transkripčný faktor, ktorého expresia je indukovaná stresom a ktorý sa podieľa na regulácii odpovede na nedostatok vody (Al-Sayaydeh a kol., 2024). Ďalšiu významnú zložku adaptačnej odpovede predstavuje osmotická regulácia. Gén *HvP5CS* kóduje Δ^1 -pyrolín-5-karboxylát syntetázu, kľúčový enzým biosyntézy prolínu; pri suchu bola u jačmeňa preukázaná jeho transkripčná aktivácia, ktorá predchádzala zvýšenej aktivite P5CS a akumulácii prolínu, pričom intenzita tejto reakcie sa medzi genotypmi líšila (Bandurska a kol., 2017). Vodný deficit je zároveň spojený s narušením redoxnej rovnováhy, preto sú významnou súčasťou stresovej odpovede antioxidačné mechanizmy. Gén *HvSOD1* kóduje superoxiddismutázu zapojenú do ochrany buniek pred oxidačným stresom a jeho expresia bola u jačmeňa preukázateľne indukovaná aj pôsobením sucha (Abu-Romman a Shatnawi, 2011), zatiaľ čo *HvAPX1* kóduje peroxizomálnu askorbátperoxidázu, ktorá predstavuje ďalšiu súčasť antioxidačného systému rastliny a reaguje na viaceré abiotické a hormonálne podnety vrátane ABA (Shi a kol., 2001). Zmeny expresie génov *HvABF2*, *HvP5CS*, *HvSOD1* a *HvAPX1* preto poskytujú komplementárne informácie o aktivácii regulačných, osmotických a antioxidačných zložiek molekulárnej odpovede na sucho. Samotná silná transkripčná indukcia jedného stresovo responzívneho génu však nepredstavuje jednoznačný ukazovateľ tolerance, pretože môže odrážať nielen účinnú adaptačnú reakciu, ale aj intenzitu stresového zaťaženia rastliny. Túto skutočnosť potvrdila aj štúdia na jačmeni siatom (*Hordeum*

vulgare L.), v ktorej analýza 12 genotypov preukázala výrazne genotypovo špecifické expresné profily sledovaných génov (Kaňuková a kol., 2025). Integrované hodnotenie viacerých funkčne odlišných génov preto poskytuje komplexnejší obraz molekulárnej odpovede rastlín na vodný deficit než posudzovanie jedného ukazovateľa génovej expresie a umožňuje presnejšie charakterizovať genotypovo špecifické reakčné profily využiteľné pri štúdiu mechanizmov adaptácie rastlín na suchu.

Cieľom tejto metodické príručky je poskytnúť jednotný, reprodukovateľný a experimentálne overený súbor laboratórnych a analytických postupov na hodnotenie génovej expresie rastlín vystavených stresu zo sucha, zahŕňajúci prípravu a odber rastlinného materiálu, izoláciu a kontrolu kvality RNA, syntézu cDNA, dizajn a validáciu primerov, kvantitatívnu RT-qPCR, výpočet násobnej zmeny expresie génov, návrh na štatistické spracovanie a biologickú interpretáciu výsledkov. Príručka vychádza z postupov aplikovaných na jačmeň siaty vo vedeckej práci Kaňuková a kol. (2025) a vytvára metodický rámec umožňujúci porovnávať transkripčné reakcie jednotlivých genotypov a podporovať výskum mechanizmov spojených s adaptáciou rastlín na podmienky sucha.



Obrázok 1: Molekulárna odpoveď rastliny na stres zo sucha a analýza génovej expresie pomocou RT-qPCR (vytvorené a upravené pomocou Nano Banana Pro a Canva).

2. Potrebný materiál a pomôcky

2.1 Spotrebný materiál

- 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky (Eppendorf; safe-lock), RNÁza-free
- 2 ml mikrocentrifugačné skúmavky, RNÁza-free
- RNÁza-free špičky s filtrom (aerosol-barrier) pre pipety 10 µL, 20 µL, 200 µL a 1000 µL
- 0,2 ml PCR skúmavky / stripy alebo 96 jamkové qPCR platne kompatibilné s termocyklerom (s optickými uzávermi/fóliou)
- homogenizačné guľôčky (nerezové alebo keramické), RNÁza-free
- stojan a nádoba na tekutý dusík, kryostojan na skúmavky
- jednorazové RNÁza-free rukavice
- NucleoSpin® spin-kolóny, filtre a zberné skúmavky (súčasť súpravy na izoláciu RNA)
- certifikovaná RNÁza-free voda (súčasť komerčného kitu) alebo DEPC voda
- nádoby na chemický a biologický odpad
- tekutý dusík
- homogénny pestovateľský substrát
- vegetačné nádoby

2.2 Osobné ochranné prostriedky

- laboratórny plášť
- ochranné rukavice
- ochranné okuliare
- ochranný štít / okuliare pri práci s UV transiluminátorom

3. Chemikálie a prístrojové vybavenie

3.1 Chemikálie a komerčne dostupné kity

- NucleoSpin® RNA Plant kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Nemecko)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems, USA)
- špecifické primery (F/R) - syntéza u komerčného dodávateľa
- 96 – 100 % (v/v) etanol a 70 % (v/v) etanol
- β -merkaptotanol
- agaróza pre molekulárnu biológiu
- elektroforetický tmivý roztok TAE alebo TBE (čerstvý, z RNáza-free vody)
- nanášací roztok (loading dye) a hmotnostný marker (DNA/RNA ladder)
- interkalačné farbivo na vizualizáciu (napr. etídumbromid, GelRed, atď.)

3.2 Prístrojové vybavenie

- TissueLyser (alebo ekvivalentný homogenizátor rastlinných pletív) alebo trecia miska + tlčik na drvenie v tekutom dusíku
- chladená centrifúga (4 °C)
- termoblok alebo vodný kúpeľ (do 95 °C)
- vortex
- analytické váhy (presnosť 0,1 mg)
- NanoDrop spektrofotometer
- termocyklér na reverznú transkripciu
- Real-Time PCR systém – ABI PRISM® 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
- horizontálna elektroforetická vaňa so zdrojom napätia
- UV transiluminátor alebo dokumentačný systém na gély
- mraznička –20 °C
- hlbokomraziaci box (–80 °C)
- chladnička (4 °C)
- automatické pipety s objemom 10 μ L; 200 μ L a 1000 μ L
- stojan na skúmavky do tekutého dusíka
- rastová komora/fytotróň a pôdny vlhkomer (napr. WET-2 Sensor, Delta T Devices)

4. Metodika

4.1 Príprava rastlinného materiálu a odber vzoriek

4.1.1 Príprava rastlinného materiálu pre molekulárne analýzy

1. Výsev semien

- Semená rastlín sa vysievajú do vegetačných nádob naplnených homogénnym pestovateľským substrátom s požadovanou vlhkosťou (optimálna vlhkosť pre klíčenie je 70 – 80 % poľnej kapacity (FC) daného substrátu). Do každej nádoby sa vysieva rovnaký počet semien, aby sa zabezpečila porovnateľná hustota porastu (Obrázok 2).

Poznámka:

- *Objem vegetačných nádob volíme v závislosti od rastlinného druhu, počtu rastlín a vývojového štádia, v ktorom budeme stres zo sucha študovať.*
- *Poľná kapacita, označovaná ako FC (field capacity) označuje maximálne množstvo vody, ktoré dokáže daná pôda/substrát zadržať vo svojich póroch po tom, čo prebytočná voda odtiekla pôsobením gravitačnej sily; je závislá od typu substrátu. Na zistenie FC alebo aktuálnej vlhkosti substrátu sa využíva gravimetrická metóda alebo meranie vlhkosti sondou.*
- *Pre každý experimentálny variant a analyzovanú skupinu rastlín sa pripravujú minimálne tri nezávislé biologické opakovania.*



Obrázok 2: Príprava vegetačných nádob a výsev semien ako úvodná fáza experimentu. *Vľavo* sú zobrazené nádoby naplnené homogénnym substrátom, *vpravo* je znázornený rovnomerný výsev semien (autor Š. Kaňuková).

2. Podmienky pestovania:

- Rastliny sa pestujú v kontrolovaných podmienkach rastovej komory (fytotrónu) (Obrázok 3):
 - fotoperiódá: 14 - 16 h svetlo / 8 - 10 h tma,
 - intenzita osvetlenia: 150 - 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktívneho žiarenia (PAR),
 - teplota: 20 - 25 °C počas dňa, 16 - 20 °C počas noci,
 - vlhkosť: 40 - 70 % RH podľa zariadenia.

Poznámka:

- Podmienky musia zostať počas celého experimentu stabilné, aby sa minimalizovala environmentálna variabilita, ktorá by mohla ovplyvniť molekulárne analýzy.
- Fotoperiódá a teplota musia byť upravené podľa požiadaviek konkrétneho rastlinného druhu (vyššie uvedené podmienky sú príkladom kultiváciu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) v juvenilnom štádiu.



Obrázok 3: Pestovanie rastlín v kontrolovaných podmienkach rastovej komory (autor Š. Kaňuková).

4.1.2 Aplikácia stresu suchom

1. Rozdelenie rastlín do experimentálnych variantov

- Rastliny sa po vzídení rozdelia do dvoch základných experimentálnych skupín:

- kontrola (well-watered, WW)
- stres suchom (drought stress, DS)
- Pre každý variant sa pripravujú minimálne tri biologické opakovania.

Poznámka:

- *Rovnaký počet experimentálnych členov v jednotlivých variantoch je nevyhnutný pre štatistickú porovnateľnosť.*

2. Aplikácia stresového faktora suchom

- Experiment sa začína vo vybranom rastovom štádiu rastliny (napr. štádium 1. listu).
- V kontrolnom variante sa udržiava rovnomerne vlhký, bez výkyvov, optimálna vlhkosť substrátu je 70 – 80 % FC.
- V stresovom variante sa zálievka obmedzí, aby došlo k postupnému zníženiu vlhkosti. Následne sa požadovaná vlhkosť udržiava v požadovanom rozsahu (napr. 25 – 30 % FC)

Poznámka:

- *Kategórie vodného stresu (podľa Brahmi a kol., 2023):*
 - *mierny stres: okolo 50 % FC (field capacity)*
 - *stredný stres: 30 - 35 % FC*
 - *silný stres: pod 20 % FC*

Výber úrovne stresu volíme podľa druhu rastliny, a experimentálnych požiadaviek.

3. Monitorovanie vlhkosti substrátu

- Vlhkosť sa monitoruje denne:
 - pomocou senzora so sondou na meranie pôdnej vlhkosti,
 - alebo gravimetrickou metódou (vážením nádob).
- Zálievka sa prispôsobuje tak, aby bola udržiavaná požadovaná vlhkosť v kontrolnom a stresovom variante
- Pri každom meraní sa zaznamená:
 - nameraná vlhkosť substrátu,
 - množstvo doplnenej vody (ak bolo potrebné),
 - čas merania.

Poznámka:

- *Gravimetrická metóda je lacná, ale menej presná (zvyšujúca sa hmotnosť rastlín skresľuje skutočnú hodnotu vlhkosti pôdy). Pri biochemických analýzach sa odporúča používať meranie senzorom s pôdnou sondou pre meranie vlhkosti.*

4. Doba trvania stresového podnetu

- Stres sa udržiava počas vopred definovaného obdobia podľa účelu experimentu.
- Rastliny v jednotlivých variantoch sú rozmiestnené v náhodnom usporiadaní, aby sa minimalizoval vplyv podmienok prostredia (napr. rozdiely v svetelných či teplotných pomeroch).

5. Ukončenie experimentu a odber rastlinného materiálu pre analýzy

- Odber rastlinného materiálu sa vykonáva vo vopred definovanom čase alebo, keď rastliny dosiahnu požadovaný stupeň stresovej odozvy (napr. viditeľný pokles turgoru), a to aj vo viacerých termínoch, aby bolo možné sledovať dynamiku zmien (Obrázok 4).
 - Odber listov sa vykonáva:
 - v rovnakom dennom čase,
 - z rovnakej pozície na rastline,
 - za porovnateľných svetelných podmienok.
- Odoberatý rastlinný materiál sa bezprostredne zmrazí v tekutom dusíku a až do izolácie RNA sa skladuje pri -80°C .

Poznámka:

- Na zabezpečenie porovnateľnosti vzoriek je preto potrebné štandardizovať čas a spôsob odberu a rastlinný materiál bezprostredne po odbere zmraziť v tekutom dusíku, čím sa minimalizuje degradácia RNA.

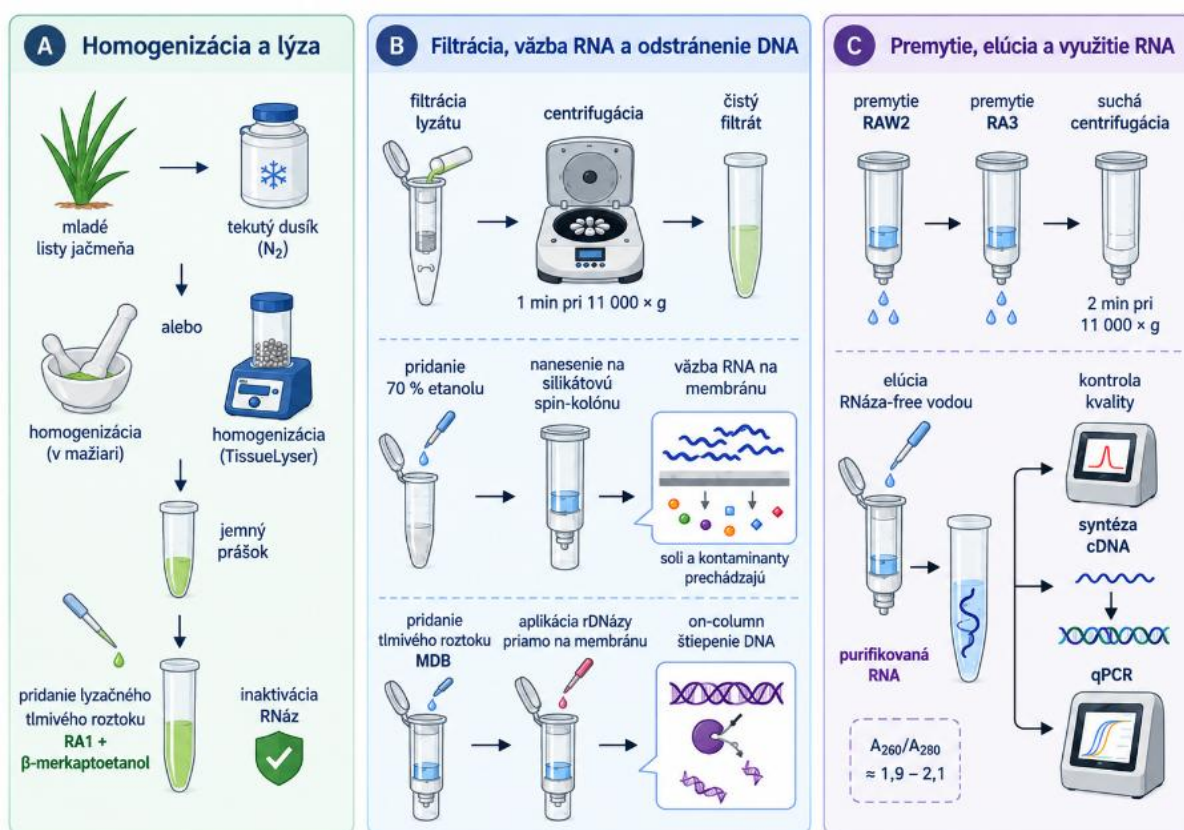


Obrázok 4: Morfológické rozdiely medzi rastlinami pestovanými pri dostatočnej dostupnosti vody a rastlinami vystavenými stresu zo sucha (autor Š. Kaňuková).

Popis: *Vľavo:* rastliny pestované pri obmedzenom prísune vody vykazujúce redukovaný rast. *Vpravo:* rastliny pestované pri pravidelnej a dostatočnej závlahovej dávke (kontrolný variant).

4.2 Izolácia celkovej RNA

Izolácia celkovej RNA je založená na selektívnej väzbe RNA na silikátovú membránu v prítomnosti chaotropných solí. Na izoláciu sa najčastejšie používajú komerčné kity. Táto metodika opisuje postup s použitím kitu NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) podľa protokolu výrobcu, vrátane odstránenia kontaminujúcej DNA enzymatickým štiepením rDNázou priamo na kolóne (on-column DNase digestion) (Obrázok 5).



Obrázok 5: Schematické znázornenie izolácie celkovej RNA z rastlinného materiálu pomocou silikátovej spin-kolóny (vytvorené a upravené pomocou Nano Banana Pro a Biorender.com).

- A. Homogenizácia a lýza rastlinného materiálu: Zmrazené rastlinné pletivo sa homogenizuje v tekutom dusíku a následne sa lyzuje v prítomnosti chaotropného lyzačného tlmivého roztoku a redukčného činidla, čím sa zabezpečí inaktivácia RNáz.
- B. Filtrácia, väzba RNA a odstránenie genómovej DNA: Po odstránení nerozpustných zložiek sa k lyzátu pridá etanol a RNA sa naviaže na silikátovú membránu spin-kolóny. Kontaminujúca genómová DNA sa odstráni enzymatickým štiepením rDNázou priamo na membráne.
- C. Premytie a elúcia RNA: Po odstránení kontaminujúcich látok sa premývacími krokmi purifikovaná RNA eluie RNáza-free vodou. Získaná RNA sa následne použije na kontrolu kvality, syntézu cDNA a analýzu génovej expresie pomocou RT-qPCR.

4.2.1 Príprava pracovných roztokov

Pred začatím izolácie RNA je potrebné pripraviť pracovné roztoky súpravy NucleoSpin® RNA Plant podľa pokynov výrobcu.

1. Príprava premývacieho tlmivého roztoku RA3

K zásobnému koncentrátu tlmivého roztoku RA3 sa pridá výrobcom stanovený objem 96 – 100 % (v/v) etanolu a roztok sa dôkladne premieša. Fľaša sa následne označí informáciou o pridaní etanolu.

Poznámka:

- *Pripravený premývací tlmivý roztok RA3 je stabilný minimálne 1 rok pri teplote 15 – 25 °C.*

2. Príprava roztoku rDNázy

Do vialky s lyofilizovanou rDNázou sa pridá výrobcom stanovený objem RNáza-free vody. Roztok sa nechá stáť počas 1 min pri laboratórnej teplote a následne sa rDNáza opatrne rozpustí jemným krúživým pohybom vialky.

Poznámka:

- *rDNáza je citlivá na mechanické namáhanie, preto sa roztok nesmie vortexovať ani intenzívne premiešavať.*
- *Po rozpustení sa roztok rDNázy rozdelí na menšie alikvoty a skladuje pri teplote –20 °C maximálne 6 mesiacov.*
- *Jednotlivé alikvoty sa nesmú opakovane zmrazovať a rozmrazovať viac ako trikrát.*

4.2.2 Homogenizácia a lýza rastlinného materiálu

1. Zo zmrazeného rastlinného materiálu sa naváži najviac 100 mg mladých listov a vzorka sa v prítomnosti tekutého dusíka dôkladne homogenizuje na jemný prášok.

Poznámka:

- *Počas homogenizácie a manipulácie so vzorkou nesmie dôjsť k rozmrazeniu rastlinného materiálu.*
 - *Pomôcky používané na homogenizáciu je potrebné vopred vychladiť a so vzorkami pracovať čo najrýchlejšie, aby sa minimalizovala degradácia RNA pôsobením RNáz.*
2. K homogenizovanému rastlinnému materiálu sa pridá 350 µL lyzačného tlmivého roztoku RA1 a 3,5 µL β-merkaptóetanolu. Vzorka sa následne dôkladne premieša intenzívnym vortexovaním.

Poznámka:

- *Ak lyzát po pridaní tlmivého roztoku RA1 stuhne v dôsledku prítomnosti špecifických metabolitov rastlinného pletiva, namiesto tlmivého roztoku RA1 sa použije 350 µL alternatívneho lyzačného tlmivého roztoku RAP.*
- *Ako alternatívu k β-merkaptóetanolu je možné použiť redukčné činidlo DTT alebo TCEP v konečnej koncentrácii 10 – 20 mM.*

Upozornenie na nebezpečenstvo pri práci:

- *Tlmivé roztoky RA1, RAW2, RAP a MDB obsahujú chaotropné soli. Pri manipulácii je potrebné používať ochranné rukavice a okuliare.*

- *Tlmivé roztoky obsahujúce guanidínové soli sa nesmú miešať s chlórnanom sodným ani s kyslými roztokmi, pretože môže dôjsť k tvorbe vysoko reaktívnych zlúčenín. Chlórnanové dezinfekčné prostriedky sa preto nesmú pridávať priamo do odpadu vznikajúceho počas izolácie RNA.*
- *β -merkaptetoetanol je toxická látka s intenzívnym zápachom, preto sa s ním manipuluje v digestore.*

4.2.3 Filtrácia lyzátu, väzba RNA a odsolenie membrány

1. Pripravený lyzát sa preniesie na NucleoSpin® Filter s fialovým krúžkom umiestnený v zbernej skúmavke a centrifuguje sa počas 1 min pri $11\,000 \times g$.
2. Po centrifugácii sa číry filtrát opatrne preniesie do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky (RNA-free).

Poznámka:

- *Ak sa po centrifugácii na dne zbernej skúmavky vytvorí sediment, pri prenose filtrátu je potrebné zabrániť jeho narušeniu a nasatiu.*
3. K získanému filtrátu sa pridá 350 μL 70 % (v/v) etanolu a vzorka sa dôkladne premieša päťnásobným pipetovaním (nasatím a vypustením).

Poznámka:

- *Etanolvý lyzát sa pred nanosením na kolónu necentrifuguje, pretože by mohlo dôjsť k sedimentácii vyzrážanej RNA.*
 - *Po pridaní etanolu sa môže v lyzáte vytvoriť vláknitý precipitát, ktorý neovplyvňuje následnú izoláciu. Celý obsah vzorky vrátane prípadného precipitátu sa nanesie na kolónu.*
4. Etanolvý lyzát sa nanesie na kolónu NucleoSpin® RNA Plant s modrým krúžkom umiestnenú v zbernej skúmavke a centrifuguje sa počas 30 s pri $11\,000 \times g$.

Poznámka:

- *Maximálny objem lyzátu, ktorý je možné naraz naniesť na kolónu, je 750 μL . V prípade väčšieho objemu sa vzorka nanáša postupne.*
5. Na silikátovú membránu kolóny sa pridá 350 μL odsol'ovacieho tlmivého roztoku MDB a kolóna sa centrifuguje počas 1 min pri $11\,000 \times g$.

Poznámka:

- *Odstránenie solí zo silikátovej membrány vytvára vhodné podmienky pre následné enzymatické štiepenie kontaminujúcej DNA pomocou rDNázy.*

4.2.4 Štiepenie DNA, premytie membrány a elúcia RNA

1. Príprava reakčnej zmesi rDNázy

Pre každú analyzovanú vzorku sa pripraví reakčná zmes pozostávajúca z:

- 10 μL roztoku rDNázy,
- 90 μL reakčného tlmivého roztoku pre rDNázu.

Celkový objem reakčnej zmesi pre jednu vzorku je 100 μ L. Pri spracovaní viacerých vzoriek sa odporúča pripraviť spoločnú reakčnú zmes pre všetky analyzované vzorky s rezervou približne 10 %.

Poznámka:

- *Vzor prepočtu pri príprave reakčnej zmesi pre 10 vzoriek s 10 % rezervou sa zmieša:*
 - 110 μ L rDNázy,
 - 990 μ L reakčného tlmivého roztoku pre rDNázu.

Celkový objem pripravenej reakčnej zmesi je 1100 μ L.

2. Na stred silikátovej membrány každej kolóny sa naniesie 95 μ L pripravenej reakčnej zmesi rDNázy a kolóna sa inkubuje 15 min pri laboratórnej teplote.

Poznámka:

- *Reakčná zmes rDNázy sa pripravuje bezprostredne pred použitím.*
 - *Roztok obsahujúci rDNázu sa **nesmie** vortexovať ani intenzívne premiešavať.*
 - *Reakčnú zmes je potrebné naniesť priamo na stred membrány tak, aby bola membrána rovnomerne pokrytá.*
3. Po ukončení inkubácie sa na membránu pridá 200 μ L premývacieho tlmivého roztoku RAW2 a kolóna sa centrifuguje počas 30 s pri 11 000 $\times$ g pri izbovej teplote.
 4. Následne sa na membránu pridá 600 μ L premývacieho tlmivého roztoku RA3 a kolóna sa centrifuguje počas 30 s pri 11 000 $\times$ g pri izbovej teplote.
 5. Pri poslednom premývacom kroku sa na membránu pridá 250 μ L premývacieho tlmivého roztoku RA3 a kolóna sa centrifuguje počas 2 min pri 11 000 $\times$ g pri izbovej teplote.

Poznámka:

- *Posledná centrifugácia zabezpečuje dôkladné vysušenie silikátovej membrány a odstránenie zvyškov premývacieho tlmivého roztoku obsahujúceho etanol. Zvyškový etanol v eluovanej RNA môže negatívne ovplyvniť následné enzymatické reakcie, predovšetkým reverznú transkripciu a qPCR.*
6. Po ukončení premývania sa kolóna preniesie do novej RNáza-free 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky.
 7. Na stred silikátovej membrány sa pridá 60 μ L RNáza-free vody a kolóna sa centrifuguje počas 1 min pri 11 000 $\times$ g.

Poznámka:

- *Ak je požadovaná vyššia koncentrácia RNA, elúciu je možné vykonať použitím 40 μ L RNáza-free vody.*
8. Získaný eluát obsahujúci purifikovanú RNA sa ihneď preniesie na ľad a následne sa skladuje pri teplote -80°C až do ďalšieho spracovania.

4.2.5 Najčastejšie problémy a ich riešenie

1. **Degradácia RNA alebo veľmi nízky výťažok** môže byť spôsobený kontamináciou vzoriek RNázami, nevhodnou manipuláciou s rastlinným materiálom, alebo jeho rozmrazením pred pridaním lyzačného tlmivého roztoku.

Poznámka:

- Počas celej izolácie je potrebné dodržiavať RNÁza-free pracovné podmienky a pravidelne meniť ochranné rukavice (z dôvodu eliminácie nežiadúcej kontaminácie).
 - Rastlinný materiál musí zostať zmrazený až do jeho homogenizácie a následného pridania lyzačného tlmivého roztoku.
 - Homogenizácia sa vykonáva v prítomnosti tekutého dusíka bez rozmrazenia vzorky.
2. **Nízky výťažok alebo nedostatočná kvalita izolovanej RNA** môžu byť spôsobené nepridaním etanolu, nedostatočným premiešaním lyzátu alebo nesprávnou prípravou pracovných roztokov.

Poznámka:

- Pred začatím izolácie je potrebné skontrolovať správnu prípravu tlmivého roztoku RA3 a roztoku rDNázy.
 - Po filtrácii lyzátu je potrebné pridať 350 μL 70 % (v/v) etanolu a vzorku dôkladne premiešať pred nanesením na kolónu.
3. **Nízky pomer absorbancií A_{260}/A_{230}** môže poukazovať na prítomnosť zvyškov chaotropných solí alebo ďalších kontaminujúcich látok v izolovanej RNA.

Poznámka:

- Pri nanášaní lyzátu je potrebné zabrániť kontaminácii horného okraja a uzáveru kolóny.
 - Všetky premývacie kroky je potrebné vykonať s predpísanými objemami tlmivých roztokov a pri stanovených centrifugačných podmienkach.
 - Pri veľmi nízkej koncentrácii RNA môže byť stanovenie pomeru A_{260}/A_{230} menej spoľahlivé.
4. **Upchatie kolóny** môže spôsobiť použitie príliš veľkého množstva rastlinného materiálu alebo jeho nedostatočná homogenizácia.

Poznámka:

- V prípade opakovaného upchávania kolóny je potrebné znížiť množstvo vstupného rastlinného materiálu.
 - Rastlinné pletivo musí byť pred lýzou dôkladne homogenizované na jemný prášok.
5. **Kontaminácia RNA genómovou DNA** môže byť spôsobená nedostatočným odstránením DNA počas pôsobenia rDNázy alebo použitím príliš veľkého množstva vstupného rastlinného materiálu.

Poznámka:

- Je potrebné dodržať správny spôsob rozpúšťania a skladovania rDNázy.
 - Reakčná zmes rDNázy sa nanáša priamo na stred silikátovej membrány a inkubuje sa počas celých 15 min pri laboratórnej teplote.
 - Pri aplikáciách citlivých na prítomnosť genómovej DNA je možné zaradiť dodatočné enzymatické odstránenie DNA z izolovanej RNA.
6. **Nízka účinnosť reverznej transkripcie alebo qPCR** môže byť spôsobená prítomnosťou zvyškov etanolu, solí alebo ďalších inhibičných látok v izolovanej RNA.

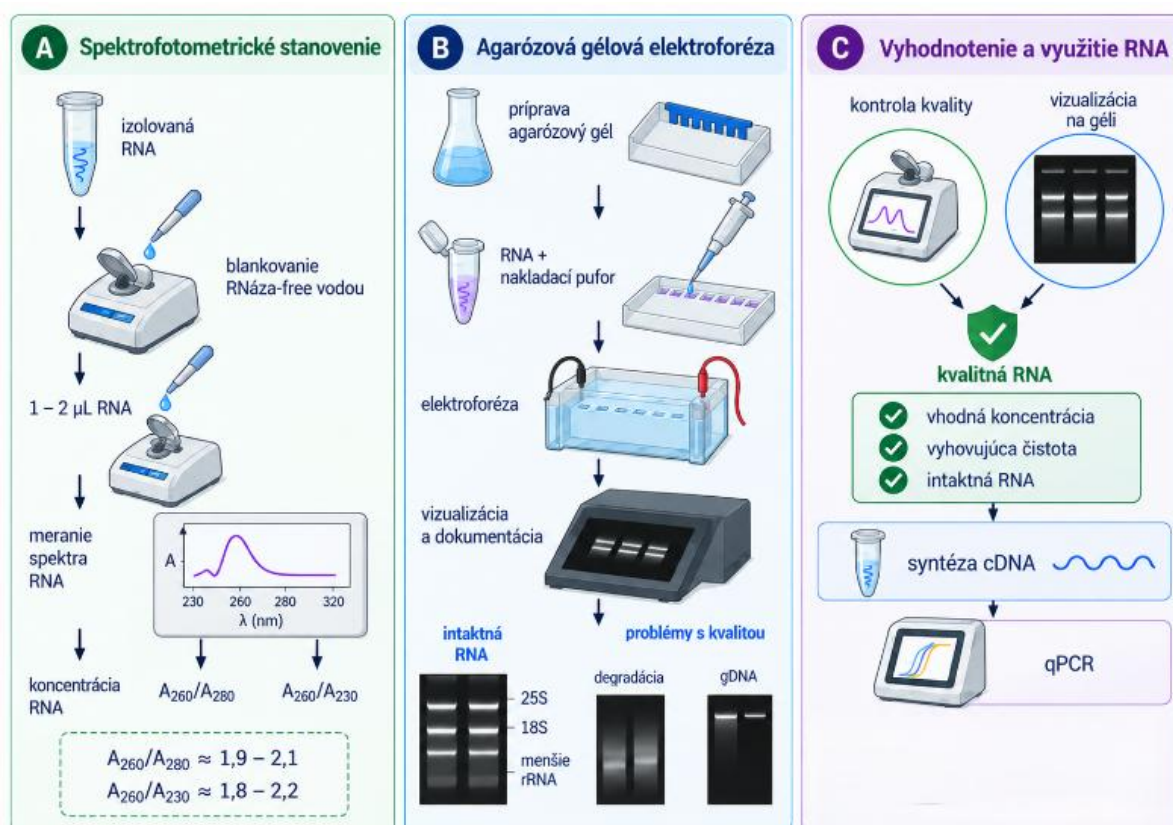
Poznámka:

- *Pri premývaní kolóny je potrebné dodržať predpísané objemy tlmivých roztokov, centrifugačné podmienky a časy jednotlivých krokov.*
- *Posledná centrifugácia počas 2 min pri 11 000 × g je dôležitá na úplné odstránenie zvyškov etanolu zo silikátovej membrány.*
- *Izolovaná RNA sa počas ďalšej manipulácie uchováva na ľade a na dlhodobé skladovanie sa zmrazí pri teplote –80 °C.*

4.3 Kontrola kvality a kvantity RNA

Pred použitím izolovanej RNA na syntézu cDNA je potrebné overiť jej koncentráciu, čistotu a integritu, pretože kvalita východiskovej RNA významne ovplyvňuje účinnosť reverznej transkripcie a spoľahlivosť následnej analýzy génovej expresie pomocou qPCR. Koncentrácia a čistota RNA sa stanovujú spektrofotometricky meraním absorbancie pri charakteristických vlnových dĺžkach, zatiaľ čo integrita RNA sa hodnotí pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Kombinácia oboch prístupov umožňuje posúdiť množstvo izolovanej RNA, prítomnosť možných kontaminujúcich látok a rozsah jej prípadnej degradácie (Obrázok 6).

Poznámka: Okrem spektrofotometrického stanovenia možno koncentráciu RNA určiť aj fluorometricky pomocou vhodnej RNA-špecifickej testovacej súpravy. Fluorometrické metódy poskytujú selektívnejšie stanovenie RNA a sú spravidla menej ovplyvnené prítomnosťou ďalších zložiek vzorky než spektrofotometrické meranie, najmä pri nízkych koncentráciách RNA. Avšak fluorometria neposkytuje určenie pomerov A_{260}/A_{280} ani A_{260}/A_{230} .



Obrázok 6: Schematické znázornenie kontroly kvantity, čistoty a integrity izolovanej RNA (vytvorené a upravené pomocou Nano Banana Pro a Biorender.com).

A. Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty RNA na základe absorbancie pri 260 nm a pomerov A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} .

B. Hodnotenie integrity RNA agarózovou gélovou elektroforézou a identifikácia prípadnej degradácie alebo kontaminácie genómovou DNA.

C. Súhrnné posúdenie kvality RNA pred jej použitím na syntézu cDNA a následnú analýzu génovej expresie pomocou RT-qPCR.

4.3.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty RNA

Spektrofotometrické stanovenie RNA je založené na absorpcii ultrafialového žiarenia nukleovými kyselinami s absorpčným maximom pri vlnovej dĺžke 260 nm (Obrázok 7). Absorbancia pri 260 nm sa používa na stanovenie koncentrácie RNA, zatiaľ čo pomery absorbancií A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} poskytujú orientačnú informáciu o čistote analyzovanej vzorky. Pomer A_{260}/A_{280} sa využíva predovšetkým na posúdenie prítomnosti proteínov, fenolu alebo ďalších látok absorbujúcich v oblasti 280 nm, zatiaľ čo znížený pomer A_{260}/A_{230} môže poukazovať na prítomnosť zvyškov chaotropných solí, fenolu, sacharidov alebo ďalších kontaminujúcich látok absorbujúcich v oblasti 230 nm.

Pracovný postup:

1. Pred začatím merania sa meracia plocha mikroobjemového spektrofotometra, napr. NanoDrop, dôkladne očistí a prístroj sa nastaví na meranie RNA.
2. Na meraciu plochu sa nanesie príslušný objem RNáza-free vody, ktorá bola použitá na elúciu RNA, a vykoná sa nulovanie prístroja pomocou referenčnej vzorky (blanku).

Poznámka:

- Referenčná vzorka musí mať rovnaké zloženie ako rozpúšťadlo, v ktorom sa nachádza analyzovaná RNA. Rozdiely v pH a iónovej sile medzi referenčnou a analyzovanou vzorkou môžu ovplyvniť stanovené pomery absorbancií.

3. Izolovaná RNA sa pred meraním opatrne premieša a na čistú meraciu plochu prístroja NanoDrop sa nanesie potrebný objem vzorky (väčšinou 1 – 2 μL).

Poznámka:

- Vzorka RNA sa počas manipulácie uchováva na ľade.
- Pri premiešavaní je potrebné postupovať šetrne a zabrániť vzniku vzduchových bublín, ktoré môžu ovplyvniť priebeh spektrofotometrického merania.

4. Pre každú analyzovanú vzorku sa zaznamená:
 - koncentrácia RNA vyjadrená v $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,
 - pomer absorbancií A_{260}/A_{280} ,
 - pomer absorbancií A_{260}/A_{230} .
5. Po každom meraní sa meracia plocha prístroja dôkladne očistí podľa odporúčania výrobcu a následne sa meria ďalšia vzorka.
6. Každá vzorka sa odporúča zmerať minimálne v dvoch technických opakovaniach. Z nameraných hodnôt sa vypočíta priemerná koncentrácia a priemerné hodnoty pomerov absorbancií.

Poznámka:

- Pre čistú RNA sa za typickú hodnotu pomeru A_{260}/A_{280} považuje približne 2,0; pri izolácii pomocou súpravy NucleoSpin® RNA Plant sa očakávajú hodnoty približne 1,9 – 2,1.
- Hodnoty A_{260}/A_{280} výrazne nižšie ako 1,8 môžu poukazovať na prítomnosť proteínov, fenolu alebo ďalších kontaminujúcich látok.

- Pre čistú RNA sa pomer A_{260}/A_{230} zvyčajne pohybuje v rozsahu 1,8 – 2,2. Znížené hodnoty môžu poukazovať najmä na prítomnosť zvyškov chaotropných solí, fenolu, sacharidov alebo ďalších látok absorbujúcich pri 230 nm.
- Pri veľmi nízkych koncentráciách RNA môže byť interpretácia pomerov A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} menej spoľahlivá.
- Hodnoty pomerov absorbancií predstavujú orientačné ukazovatele čistoty RNA a musia sa posudzovať spolu s koncentráciou, integritou RNA a jej použiteľnosťou v následných enzymatických reakciách.

7. Koncentráciu RNA je možné vyjadriť pomocou vzťahu:

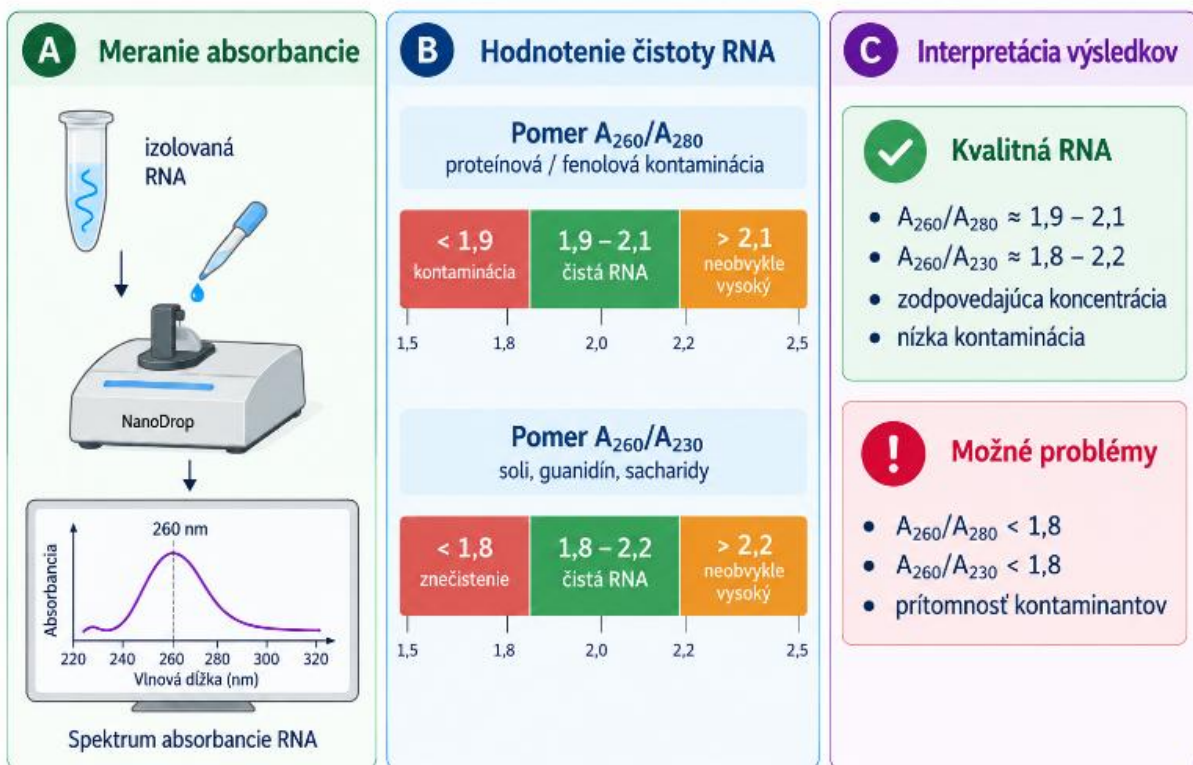
$$c = A_{260} \times 40 \times DF$$

kde:

- c – koncentrácia RNA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, numericky zhodná s $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),
- A_{260} – absorbancia RNA pri vlnovej dĺžke 260 nm,
- **40** – konverzný faktor pre RNA, pri ktorom absorbancia $A_{260} = 1$ zodpovedá koncentrácii približne $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNA pri optickej dráhe 1 cm,
- **DF** – riediaci faktor; pri meraní nezriedenej vzorky je $DF = 1$.

Poznámka:

- Pri meraní na mikroobjemových spektrofotometroch sa koncentrácia RNA vypočítava automaticky softvérom prístroja na základe absorbancie pri 260 nm a zvoleného faktora pre RNA.



Obrázok 7: Schematické znázornenie spektrofotometrickej kontroly koncentrácie a čistoty izolovanej RNA (vytvorené a upravené pomocou Nano Banana Pro a Canva).

4.3.2 Agarózová gélová elektroforéza – kontrola integrity RNA

Integrita izolovanej RNA sa hodnotí pomocou agarózovej gélovej elektroforézy, ktorá umožňuje vizuálne posúdiť stav ribozomálnej RNA a identifikovať prípadnú degradáciu alebo kontamináciu genómovou DNA (Obrázok 8). V intaktnej rastlinnej celkovej RNA sú charakteristické predovšetkým výrazné prúžky cytoplazmatických 25S a 18S rRNA. Vzhľadom na prítomnosť chloroplastov sa v rastlinných vzorkách môžu vyskytovať aj ďalšie prúžky zodpovedajúce plastidovým 23S a 16S rRNA, ktoré predstavujú prirodzenú súčasť rastlinnej celkovej RNA. Intaktná RNA sa prejavuje ostrými a dobre definovanými prúžkami, zatiaľ čo postupná degradácia vedie k vzniku rozmazaného signálu (smear) smerujúceho k fragmentom s nižšou molekulovou hmotnosťou. Prítomnosť vysokomolekulovej nukleovej kyseliny v oblasti jamky alebo nad hlavnými prúžkami rRNA môže poukazovať na kontamináciu genómovou DNA.

Pracovný postup

1. Pripraví sa 1 – 1,2 % (w/v) agarózový gél z agarózy určenej pre molekulárnu biológiu a príslušného čerstvo pripraveného elektroforetického tlmivého roztoku.
 - Potrebné množstvo agarózy sa naváži podľa požadovanej koncentrácie gélu a rozpustí sa v príslušnom objeme 1× TAE alebo 1× TBE tlmivého roztoku zahrievaním až do úplného rozpustenia agarózy. Roztok sa nechá ochladiť približne na 50 – 60 °C a následne sa podľa použitého spôsobu vizualizácie pridá vhodné interkalačné farbivo. Roztok sa naleje do pripravenej formy s vloženým hrebeňom a nechá sa stuhnúť pri laboratórnej teplote. Po stuhnutí sa gél prenesie do elektroforetickej vane a zaleje príslušným 1× elektroforetickým tlmivým roztokom.

Poznámka:

- Na prípravu 100 mL 1 % gélu sa naváži 1,0 g agarózy; na 1,2 % gél 1,2 g agarózy.
 - Pri príprave a manipulácii s gélom sa používajú čisté pomôcky a čerstvé elektroforetické roztoky, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie RNázami.
 - Elektroforetická vaňa používaná na analýzu RNA musí byť dôkladne vyčistená a nemala by obsahovať zvyšky RNáz z predchádzajúcich analýz.
2. Z každej vzorky sa odoberie približne 0,5 – 1 µg celkovej RNA a zmieša sa s príslušným nanášacím roztokom určeným na elektroforézu RNA.

Poznámka:

- Potrebné množstvo RNA závisí od použitého interkalačného farbiva a citlivosti dokumentačného systému. Pri použití citlivejších fluorescenčných farbív je možné použiť menšie množstvo RNA.
3. Ak sa používa denaturačný nanášací roztok, vzorky RNA sa inkubujú pri teplote zvyčajne 65 – 70 °C počas 5 – 10 min a následne sa bezprostredne ochladia na ľade.

Poznámka:

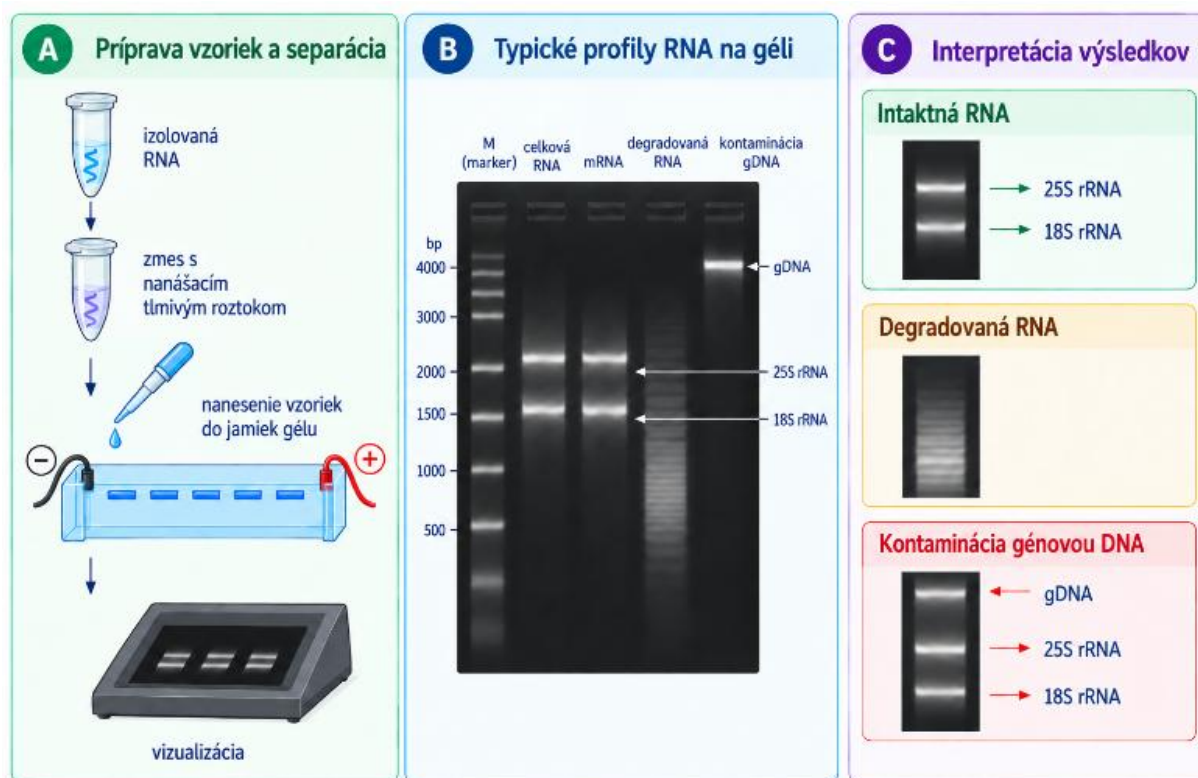
- *Denaturácia obmedzuje tvorbu sekundárnych štruktúr RNA a umožňuje presnejšie posúdenie integrity. Pri jednoduchej orientačnej kontrole celkovej RNA na natívnom agarózovom géli je možné tento krok vynechať.*
4. Pripravené vzorky sa nanesú do jamiek agarózového gélu. Súčasne sa môže do samostatnej jamky nanieť vhodný RNA veľkostný marker, avšak pri kontrole integrity celkovej RNA nie je potrebný a je skôr voliteľný.
 5. Elektroforéza sa vykonáva pri intenzite elektrického poľa približne $5 - 6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ až do dostatočného rozdelenia jednotlivých frakcií RNA.
 6. Po ukončení elektroforézy sa RNA vizualizuje pomocou vhodného interkalačného farbiva a dokumentačného systému alebo UV transiluminátora v závislosti od použitého farbiva.

Poznámka:

- *Pri použití etídiumbromidu a UV transiluminátora je potrebné dodržiavať príslušné bezpečnostné opatrenia, používať ochranné rukavice a ochranu očí alebo tváre.*
7. Integrita RNA sa vyhodnotí na základe vzhľadu a ostrosti ribozomálnych prúžkov a prítomnosti prípadného rozmazania alebo vysokomolekulového signálu.

Poznámka:

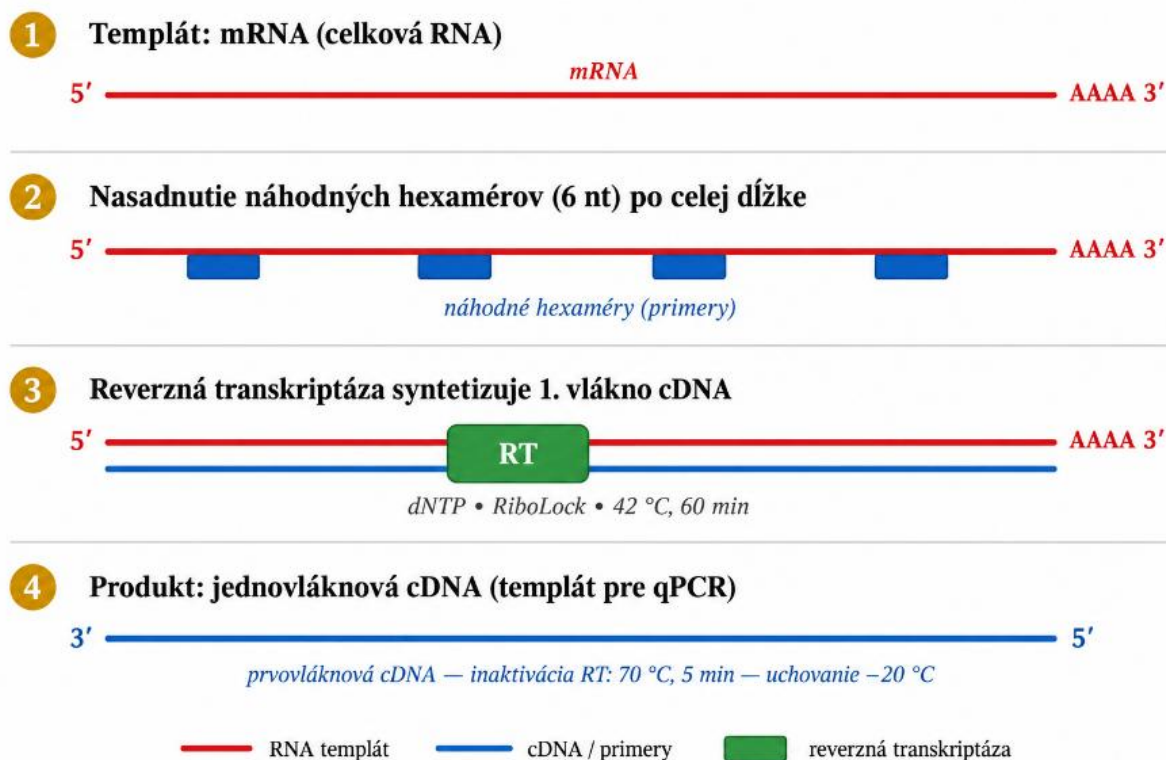
- *Intaktná rastlinná celková RNA vykazuje výrazné a dobre definované prúžky cytoplazmatických 25S a 18S rRNA.*
- *Prítomnosť ďalších prúžkov, najmä plastidových 23S a 16S rRNA, je v rastlinných vzorkách prirodzená a sama osebe neznamena degradáciu RNA.*
- *Rozmazaný signál smerujúci k fragmentom s nižšou molekulovou hmotnosťou poukazuje na degradáciu RNA.*
- *Výrazný vysokomolekulový signál v blízkosti nanášacej jamky alebo nad hlavnými prúžkami rRNA môže poukazovať na kontamináciu genómovou DNA.*
- *V prípade výraznej degradácie sa RNA neodporúča používať na následnú syntézu cDNA a qPCR a je vhodné izoláciu zopakovať z novej vzorky.*
- *Ak sa preukáže kontaminácia genómovou DNA, je potrebné dodatočné enzymatické odstránenie DNA pred reverznou transkripciou.*



Obrázok 8: Schematické znázornenie hodnotenia integrity celkovej RNA pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (vytvorené a upravené pomocou Nano Banana Pro a Canva).

4.4 Syntéza komplementárnej DNA

Syntéza komplementárnej DNA (cDNA) je založená na reverznej transkripcii RNA pomocou enzýmu reverznej transkriptázy. Na syntézu prvého vlákna cDNA sa používajú komerčné súpravy a táto metodika popisuje použitie RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) s použitím random hexamérových primerov podľa protokolu výrobcu (Obrázok 9). Reverzná transkriptáza RevertAid, rekombinantná M-MuLV reverzná transkriptáza, syntetizuje komplementárne vlákno DNA podľa RNA templátu. Random hexamérové primery sa viažu na rôznych miestach molekúl RNA a na rozdiel od oligo(dT) primerov nevyžadujú prítomnosť poly(A) chvosta, čím umožňujú syntézu cDNA z rôznych oblastí RNA. Súčasťou reakcie je RiboLock RNase Inhibitor, ktorý chráni RNA pred degradáciou pôsobením RNáz. Výsledná cDNA sa následne používa ako templát na analýzu génovej expresie pomocou qPCR.



Obrázok 9: Schematické znázornenie syntézy prvého vlákna cDNA pomocou náhodných hexamérových primerov (upravené pomocou Biorender.com).

1. RNA templát predstavuje východiskový materiál pre reverznú transkripciu.
2. Náhodné hexaméry sa viažu na rôzne miesta RNA templátu a poskytujú iniciačné miesta pre syntézu cDNA.
3. Reverzná transkriptáza predlžuje naviazané primery a syntetizuje komplementárne vlákno cDNA.
4. Výsledná jednovláknová cDNA sa používa ako templát na následnú analýzu génovej expresie pomocou RT-qPCR.

4.4.1 Príprava reakčnej zmesi a syntéza cDNA

Syntéza cDNA sa vykonáva v konečnom reakčnom objeme 20 μL s použitím 1 μg celkovej RNA. Reakčná zmes sa pripravuje na ľade v dvoch navzájom súvisiacich krokoch.

1. Pre každú analyzovanú vzorku sa do sterilnej RNáza-free PCR skúmavky pripraví zmes pozostávajúca z:
 - 1 μg celkovej RNA,
 - 1 μL random hexamérového primeru (100 μM),
 - vody bez nukleáz do celkového objemu 12 μL .

Poznámka:

- Objem RNA potrebný na získanie 1 μg celkovej RNA sa vypočíta individuálne pre každú vzorku na základe stanovenej koncentrácie.
2. V prípade RNA s vysokým obsahom GC alebo s výraznými sekundárnymi štruktúrami je možné pripravenú zmes jemne premiešať, krátko centrifugovať a inkubovať počas 5 min pri 65 °C. Po ukončení inkubácie sa vzorka ihneď ochladí na ľade a krátko centrifuguje.

Poznámka:

- Tento krok je voliteľný a používa sa najmä na obmedzenie sekundárnych štruktúr RNA, ktoré môžu znižovať dostupnosť templátu pre random hexamérové primery.
3. Pre každú reakciu sa následne pripraví enzymatická zmes pozostávajúca z:
 - 4 μL 5 $\times$ reakčného tlmivého roztoku,
 - 1 μL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μL),
 - 2 μL dNTP Mix (10 mM),
 - 1 μL RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ μL),

Celkový objem enzymatickej zmesi pre jednu reakciu je 8 μL .

Poznámka:

- Pri spracovaní viacerých vzoriek sa odporúča pripraviť spoločnú enzymatickú zmes (master mix) pre všetky analyzované vzorky s približne 10 % objemovou rezervou. Napríklad pri príprave enzymatickej zmesi pre 10 vzoriek s 10 % rezervou sa zmieša:
 - 44 μL 5 $\times$ reakčného tlmivého roztoku,
 - 11 μL RiboLock RNase Inhibitor,
 - 22 μL dNTP Mix,
 - 11 μL RevertAid Reverse Transcriptase.
- Celkový objem pripravenej enzymatickej zmesi je 88 μL .
- Enzymatická zmes sa pripravuje bezprostredne pred použitím a počas prípravy sa uchováva na ľade.
 - Reagencie sa po rozmrazení jemne premiešajú a krátko centrifugujú.
 - Príprava spoločnej enzymatickej zmesi znižuje pipetovaciú variabilitu medzi jednotlivými vzorkami.
4. K 12 μL zmesi RNA, random hexamérového primeru a vody sa pridá 8 μL pripravenej enzymatickej zmesi. Konečný objem reakcie je 20 μL .
 5. Reakčná zmes sa jemne premieša a krátko centrifuguje, aby sa celý objem sústredil na dne skúmavky.

6. Skúmavky sa vložia do termocykléra a syntéza cDNA s použitím random hexamérových primerov prebieha podľa nasledujúceho teplotného programu:
- 25 °C počas 5 min – naviazanie random hexamérových primerov,
 - 42 °C počas 60 min – syntéza prvého vlákna cDNA reverznou transkriptázou,
 - 70 °C počas 5 min – ukončenie reakcie a tepelná inaktivácia reverznej transkriptázy.

Poznámka:

- *Pri GC bohatých RNA templátoch alebo pri RNA s výraznými sekundárnymi štruktúrami je možné teplotu reverznej transkripcie zvýšiť maximálne na 45 °C.*
7. Po ukončení reakcie sa skúmavky krátko centrifugujú. Pripravená cDNA sa použije priamo na následnú qPCR alebo sa skladuje pri teplote –20 °C.

Poznámka:

- *Pri teplote –20 °C sa cDNA odporúča skladovať kratšie ako 1 týždeň.*
- *Na dlhodobšie skladovanie sa odporúča teplota –70 °C alebo nižšia.*
- *Opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu cDNA je vhodné predchádzať rozdelením vzoriek na alikvoty.*

4.4.2 Kontroly a najčastejšie problémy pri syntéze cDNA

Na overenie správnosti reverznej transkripcie a vylúčenie prítomnosti kontaminujúcej genómovej DNA sa spolu s analyzovanými vzorkami pripravujú príslušné kontrolné reakcie.

1. Kontrola bez reverznej transkriptázy (RT⁻)

Kontrola RT⁻ obsahuje rovnaké zložky ako analyzovaná vzorka vrátane RNA, avšak bez pridania RevertAid Reverse Transcriptase. Chýbajúci objem enzýmu sa nahradí rovnakým objemom vody bez nukleáz.

Poznámka:

- *RT⁻ kontrola slúži na detekciu prípadnej kontaminácie RNA genómovou DNA.*
- *Amplifikácia produktu z RT⁻ kontroly pri následnej qPCR poukazuje na prítomnosť DNA v pôvodnej RNA vzorke.*
- *Ak sa kontaminácia genómovou DNA potvrdí, je potrebné vykonať dodatočné enzymatické odstránenie DNA alebo optimalizovať predchádzajúci krok štiepenia rDNázou.*

2. Kontrola bez templátu

Kontrola bez templátu neobsahuje RNA, pričom jej objem sa nahradí vodou bez nukleáz.

Poznámka:

- *Táto kontrola môže poukázať na kontamináciu reagensí nukleovými kyselinami. Samostatná kontrola bez templátu (NTC – no-template control) sa zaraďuje aj pri následnej qPCR a je podrobnejšie opísaná v príslušnej kapitole.*

3. Nízky alebo chýbajúci výťažok cDNA

Nízky výťažok cDNA alebo neprítomnosť amplifikačného produktu pri následnej PCR môže byť spôsobená degradáciou RNA, nedostatočným množstvom vstupnej RNA alebo prítomnosťou inhibičných látok.

Poznámka:

- *Pred syntézou cDNA je potrebné overiť koncentráciu, čistotu a integritu RNA podľa postupov uvedených v kapitole 4.3.*
- *Zvyšky chaotropných solí, etanolu, fenolu alebo ďalších kontaminujúcich látok môžu inhibovať aktivitu reverznej transkriptázy.*
- *V prípade nedostatočnej kvality RNA je vhodné vzorku opätovne prečistiť alebo vykonať novú izoláciu RNA.*

4. Amplifikácia produktu v RT⁻ kontrole

Prítomnosť amplifikačného produktu v RT⁻ kontrole poukazuje na kontamináciu pôvodnej RNA genómovou DNA.

Poznámka:

- *Je potrebné overiť účinnosť predchádzajúceho štiepenia DNA pomocou rDNázy.*
- *V prípade potreby sa RNA pred reverznou transkripciou podrobí dodatočnému štiepeniu DNázou.*
- *Pri návrhu primerov pre následnú qPCR je vhodné, ak to štruktúra génu umožňuje, navrhovať primery tak, aby sa minimalizovala amplifikácia genómovej DNA, napríklad umiestnením jedného z primerov cez spojenie dvoch exónov.*

5. Nedostatočná účinnosť reverznej transkripcie pri GC-bohatých RNA templátoch

GC-bohaté RNA alebo RNA s výraznými sekundárnymi štruktúrami môžu znižovať dostupnosť templátu pre primery a reverznú transkriptázu.

Poznámka:

- *Pred pridaním enzymatickej zmesi je možné RNA s primerom inkubovať počas 5 min pri 65 °C a následne okamžite ochladiť na ľade.*
- *Teplotu reverznej transkripcie je možné pri takýchto templátoch zvýšiť až na 45 °C.*

4.5 Dizajn a validácia primerov

Správny návrh a validácia primerov predstavujú jeden zo základných predpokladov spoľahlivej analýzy génovej expresie pomocou qPCR. Primery musia zabezpečovať špecifickú amplifikáciu požadovaného úseku cDNA pri zachovaní vysokej a porovnateľnej amplifikačnej efektivity jednotlivých reakcií. Pri návrhu primerov sa zohľadňuje najmä ich teplota topenia (T_m), obsah GC, dĺžka výsledného amplikónu, možnosť tvorby sekundárnych štruktúr a dimérov primerov, ako aj špecifita väzby k cieľovej sekvencii (Obrázok 10). Pri RT-qPCR analýze je vhodné, ak to štruktúra analyzovaného génu umožňuje, navrhovať primery cez exón-exónový spoj alebo do rôznych exónov oddelených intrónom, čím sa znižuje riziko amplifikácie kontaminujúcej genómovej DNA. Táto metodika uvádza použitie štyroch konkrétnych cieľových génov (*HvABF2*, *HvP5CS*, *HvSOD1* a *HvAPX1*) spolu s jedným referenčným (*HvACT*) na analýzu génovej expresie jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Použité primerové páry a ich charakteristiky sú uvedené v Tabuľke 1.

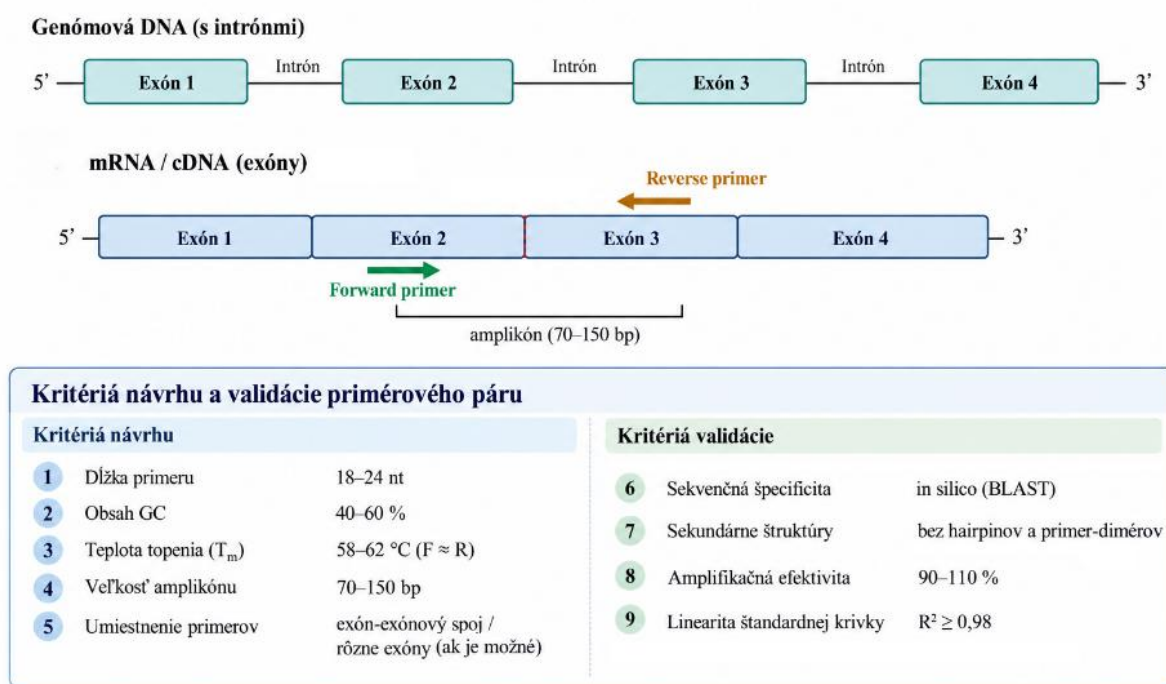
Tabuľka 1: Sekvencie a základné charakteristiky primerov použitých na RT-qPCR analýzu cieľových a referenčného génu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.).

Gén (GenBank ID)	Primery (5'–3')	Veľkosť produktu (bp)	T_a^* (°C)	GC (%) F/R	Referencia
<i>HvACT</i> (AY145451)	F: GCTGGAGATGATGCGCCAAGG R: GCGCCTCATCACCAACATAAGC	112	60	61,9 / 54,6	Bandurska 2017
<i>HvABF2</i> (AK363330)	F: AGAGGCGCATGATCAAGAAC R: AGTTTTGCTACCTCGGCTTC	94	60	50,0 / 50,0	Alexander 2019
<i>HvP5CS</i> (AK249154) *	F: GAGGTGATAATGGTCACGTCCGG R: GCACGCCTTCCATCCAGCTCC	126	60	56,5 / 63,6	Bandurska 2017
<i>HvSOD1</i> (AK363344.1)	F: CTTGAAGGACACCGACTTGC R: CTCAAAAAGCCAAATGACAGTG	141	60	55,0 / 40,9	Ferdous 2015
<i>HvAPX1</i> (AJ006358)	F: CGGAGCTTTTGAGTGGTGACA R: CCGCAGCATATTCTCCACAA	107	60	52,4 / 47,6	Alexander 2019

* T_a = annealing temperature, anelačná teplota nasadenia primerov

Poznámka:

- Pre qPCR sa vo všeobecnosti uprednostňujú krátke amplikóny približne 70 – 150 bp, ktoré umožňujú účinnú amplifikáciu počas krátkych reakčných cyklov.
- Teploty topenia forward a reverse primeru by mali byť podobné, pričom sa spravidla pohybujú približne v rozsahu 58 – 62 °C.
- Obsah GC primerov sa zvyčajne udržiava v rozsahu 40 – 60 %, pričom mierne odchýlky sú akceptovateľné pri experimentálne validovaných primeroch.



Obrázok 10: Základné princípy návrhu a validácie primerov pre RT-qPCR (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

4.5.1 Overenie amplifikačnej efektivity a špecificity primerov

Pred samotnou analýzou génovej expresie je potrebné pre každý primerový pár experimentálne overiť amplifikačnú efektivitu, linearitu reakcie a špecificitu vznikajúceho PCR produktu. Amplifikačná efektivita a linearita sa stanovujú pomocou štandardnej krivky pripravenej zo sériovo riedenej cDNA, zatiaľ čo špecificita reakcie sa pri použití interkalačného farbiva SYBR Green hodnotí pomocou analýzy krivky topenia (melt-curve analysis) (Obrázok 11).

Pracovný postup:

1. Z cDNA získanej z analyzovaných vzoriek sa pripraví spoločná zásobná vzorka (pooled cDNA), ktorá sa použije na prípravu štandardnej krivky.
2. Zo zásobnej cDNA sa pripraví minimálne päťbodový desaťnásobný riediaci rad v rozsahu napríklad 5 – 50 000 pg·μL⁻¹.

Jednotlivé koncentrácie riediaceho radu môžu byť:

- 50 000 pg·μL⁻¹,
- 5 000 pg·μL⁻¹,
- 500 pg·μL⁻¹,
- 50 pg·μL⁻¹,
- 5 pg·μL⁻¹.

Poznámka:

- Každý bod štandardnej krivky sa odporúča analyzovať minimálne v dvoch technických opakovaníach.

- *Pri príprave desaťnásobných riedení je potrebné používať presné pipetovanie a každé riedenie pred prípravou ďalšieho stupňa dôkladne premiešať.*
3. Pripravené riedenia cDNA sa analyzujú pomocou qPCR za rovnakých reakčných a teplotných podmienok, aké sa následne použijú pri analýze experimentálnych vzoriek.
 4. Z hodnôt Ct (threshold cycle) získaných pre jednotlivé riedenia sa zostrojí štandardná krivka závislosti Ct od logaritmu množstva alebo koncentrácie vstupnej cDNA.

Zo sklonu regresnej priamky štandardnej krivky sa vypočíta amplifikačná efektivita príslušného páru primerov podľa vzťahu (Pfaffl, 2001):

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

kde:

- ***E*** – amplifikačný faktor,
- ***slope*** – smernica regresnej priamky štandardnej krivky.

Amplifikačná efektivita vyjadrená v percentách sa vypočíta:

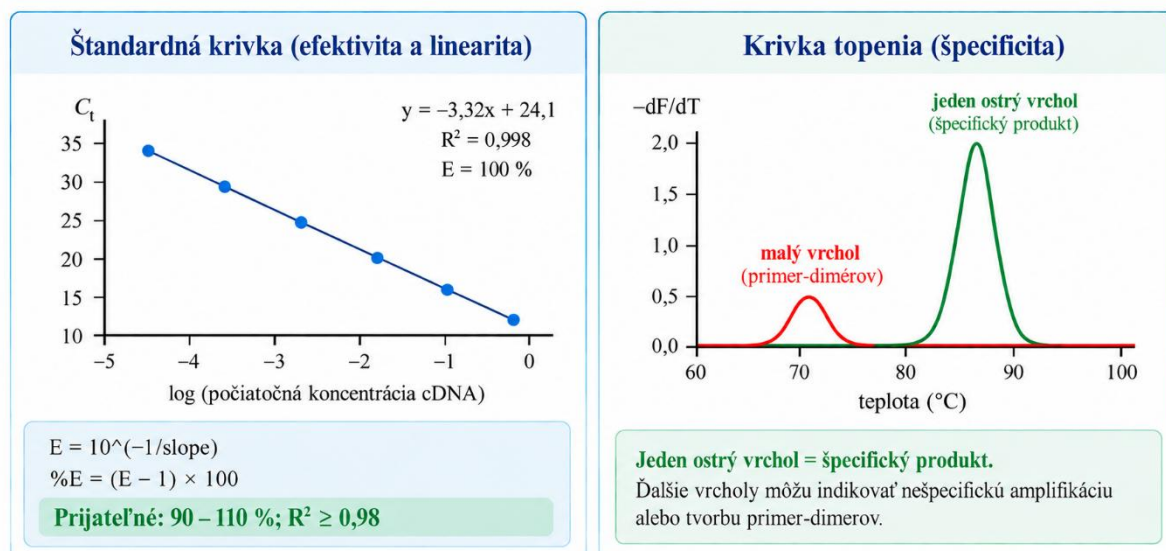
$$\text{Efektivita (\%)} = (E - 1) \times 100$$

Poznámka:

- *Za vhodnú amplifikačnú efektivitu sa spravidla považuje rozsah 90 – 110 %.*
 - *Hodnota 100 % zodpovedá približne dvojnásobnému zvýšeniu množstva PCR produktu počas každého amplifikačného cyklu.*
 - *Koeficient determinácie R^2 štandardnej krivky by mal dosahovať minimálne 0,98, pričom hodnoty blízke 1 poukazujú na vysokú linearitu reakcie v analyzovanom rozsahu koncentrácií.*
 - *Efektivita mimo odporúčaného rozsahu môže poukazovať na nevhodný návrh primerov, prítomnosť inhibítorov, nešpecifickú amplifikáciu, tvorbu dimérov primerov alebo nepresnosť pri príprave riediaceho radu.*
5. Po ukončení amplifikačných cyklov sa vykoná analýza krivky topenia PCR produktov.
 6. Špecificita primerového páru sa hodnotí podľa počtu a tvaru vrcholov na derivačnej krivke topenia.

Poznámka:

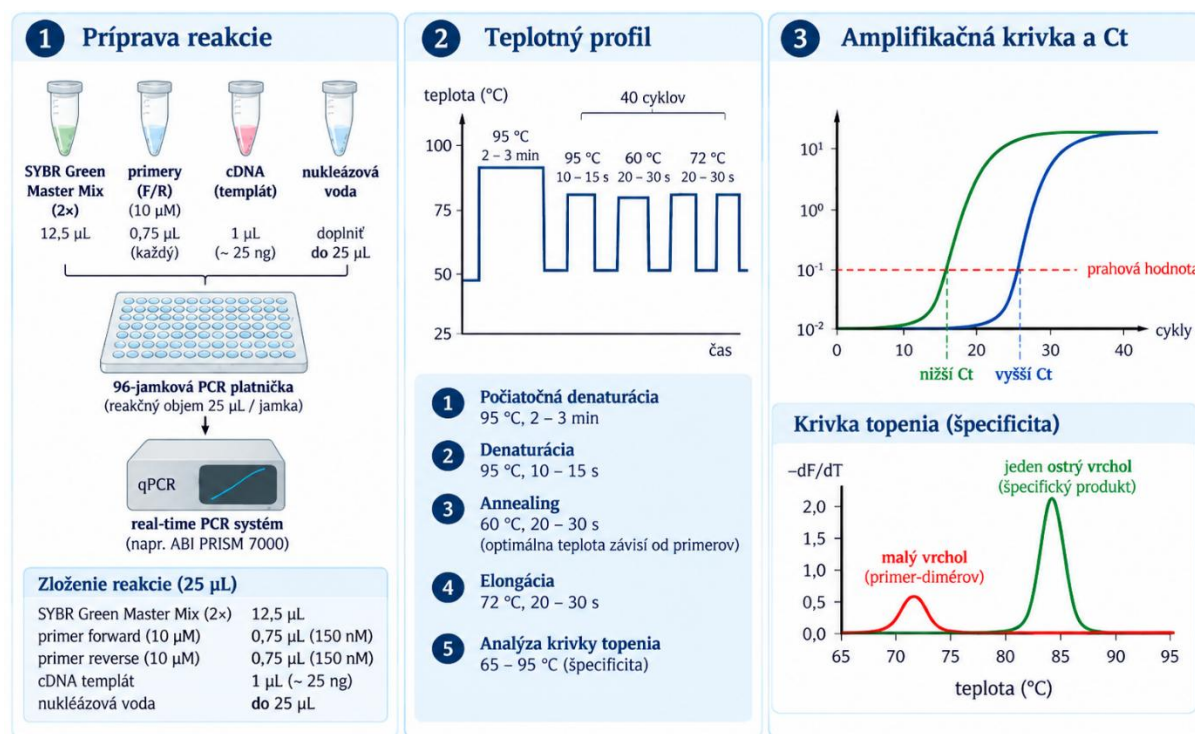
- *Jeden dominantný a úzky vrchol pri rovnakej teplote topenia vo všetkých analyzovaných vzorkách poukazuje na vznik jedného špecifického amplifikačného produktu.*
 - *Prítomnosť viacerých vrcholov môže poukazovať na vznik nešpecifických PCR produktov.*
 - *Menší vrchol pri nižšej teplote topenia môže poukazovať na tvorbu dimérov primerov alebo iných krátkych nešpecifických produktov.*
 - *Pri nejednoznačnej krivke topenia je vhodné veľkosť a počet amplifikačných produktov dodatočne overiť pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.*
7. Pár primerov sa použije na následnú kvantitatívnu analýzu génovej expresie iba v prípade, že vykazuje požadovanú amplifikačnú efektivitu, dostatočnú linearitu štandardnej krivky a špecifickú amplifikáciu jedného cieľového produktu.



Obrázok 11: Validácia primerov pre qPCR pomocou štandardnej krivky a analýzy krivky topenia (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

4.6 Kvantitatívna RT-PCR

Kvantitatívna PCR v reálnom čase (qPCR) umožňuje sledovať priebeh amplifikácie cieľovej sekvencie prostredníctvom merania fluorescenčného signálu počas jednotlivých reakčných cyklov. Na rozdiel od konvenčnej PCR, pri ktorej sa množstvo amplifikačného produktu hodnotí až po ukončení reakcie, qPCR umožňuje zaznamenávať nárast produktu priebežne a na základe získaných hodnôt stanoviť relatívne množstvo cieľovej cDNA. Pri analýze génovej expresie sa cDNA získaná reverznou transkripciou amplifikuje pomocou génovo špecifických primerov a výsledný signál sa normalizuje voči vhodnému referenčnému génu (Obrázok 12).



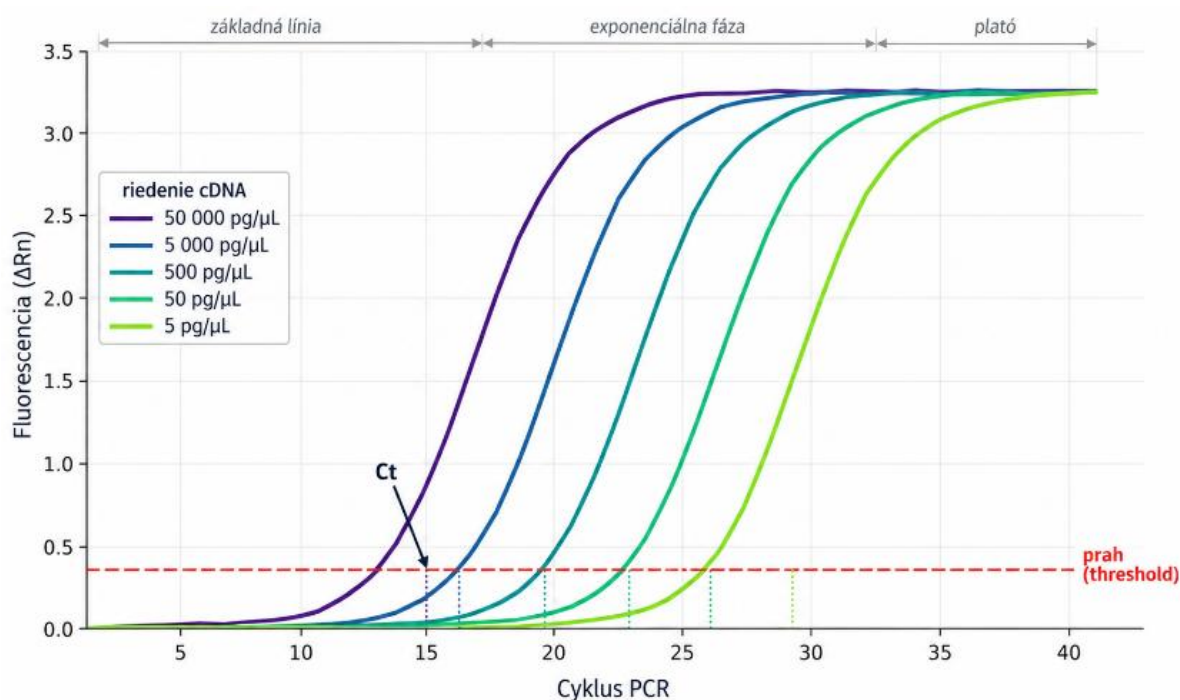
Obrázok 12: Schematické znázornenie kvantitatívnej RT-PCR (qPCR) so SYBR Green (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

Obrázok zobrazuje prípravu reakčnej zmesi, teplotný profil amplifikácie a vyhodnotenie amplifikačných kriviek vrátane hodnoty Ct a kontroly špecifity pomocou krivky topenia.

4.6.1 Princíp fluorescenčnej detekcie pri qPCR – použitie SYBR Green I a hodnota Ct

Detekciu amplifikačného produktu pri qPCR možno realizovať viacerými fluorescenčnými prístupmi. Používajú sa najmä interkalačné fluorescenčné farbivá viažuce sa na dvojvláknovú DNA alebo sekvenčne špecifické fluorescenčné sondy. Táto metodika opisuje postup s použitím interkalačného farbiva SYBR Green I. SYBR Green I sa viaže na dvojvláknovú DNA a s narastajúcim množstvom PCR produktu počas jednotlivých cyklov rastie aj intenzita fluorescenčného signálu zaznamenávaného real-time PCR systémom (Obrázok 13). Hodnota Ct (threshold cycle, novšie označený ako Cq, quantification cycle) predstavuje cyklus, v ktorom fluorescencia vzorky prekročí stanovenú prahovú hodnotu nad úrovňou pozadia, pričom nepriamo odráža počiatočné množstvo cieľovej cDNA; vyššie množstvo templátu vedie k nižšej hodnote Ct a naopak. Pri ideálnej amplifikačnej efektivite 100 % sa množstvo PCR produktu v

každom cykle približne zdvojnásobuje, takže rozdiel jedného Ct zodpovedá asi dvojnásobnému rozdielu v počiatočnom množstve cieľovej sekvencie. Hodnoty Ct sa pri analýze génovej expresie neinterpretujú samostatne, ale normalizujú sa voči referenčnému génu a následne voči zvolenému kontrolnému variantu. Výhodou SYBR Green je jednoduché reakčné usporiadanie bez potreby génovo špecifických fluorescenčných sond, farbivo však nerozlišuje medzi špecifickým amplikónom a inými dvojitými produktmi, napríklad nešpecifickými amplikónmi alebo primer-dimérmi. Z tohto dôvodu sa po ukončení amplifikácie vykonáva analýza krivky topenia (melt curve), pri ktorej jeden dominantný vrchol pri charakteristickej teplote topenia poukazuje na prítomnosť jedného špecifického PCR produktu, zatiaľ čo ďalšie vrcholy môžu signalizovať nešpecifickú amplifikáciu alebo tvorbu primer-dimérov.



Obrázok 13: Schematické znázornenie kvantitatívnej PCR v reálnom čase s použitím SYBR Green (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

4.6.2 Príprava reakčnej zmesi a teplotný program

qPCR reakcia sa pripravuje v konečnom objeme 25 μL . Zložky spoločné pre jednotlivé reakcie sa odporúča pripraviť vo forme spoločnej reakčnej zmesi (master mix), čím sa obmedzí pipetovacia variabilita medzi jednotlivými jamkami.

1. Pre každú qPCR reakciu sa pripraví reakčná zmes pozostávajúca z:

- 12,5 μL SYBR Green PCR Master Mix,
- 0,375 μL forward primeru zo zásobného roztoku s koncentráciou 10 μM ,
- 0,375 μL reverse primeru zo zásobného roztoku s koncentráciou 10 μM ,
- 10,75 μL vody bez nukleáz.

Celkový objem spoločnej reakčnej zmesi pre jednu reakciu je 24 μL .

Poznámka:

- Pri uvedených objemoch je konečná koncentrácia každého primeru v 25 μL reakcii 150 nM.
 - Ak sa používa iná koncentrácia zásobného roztoku primerov, potrebný objem sa musí zodpovedajúcim spôsobom prepočítať.
2. Pri spracovaní viacerých vzoriek sa pripraví spoločná reakčná zmes pre všetky plánované reakcie s približne 10 % objemovou rezervou. Napríklad pri príprave reakčnej zmesi pre 10 reakcií s 10 % rezervou sa zmieša:
- 137,5 μL SYBR Green PCR Master Mix,
 - 4,125 μL forward primeru (10 μM),
 - 4,125 μL reverse primeru (10 μM),
 - 118,25 μL vody bez nukleáz.

Celkový objem pripravenej spoločnej reakčnej zmesi je 264 μL .

Poznámka:

- Spoločná reakčná zmes sa pripravuje bezprostredne pred použitím.
 - SYBR Green PCR Master Mix sa počas manipulácie chráni pred dlhodobým pôsobením svetla.
 - Po premiešaní sa reakčná zmes krátko centrifuguje, aby sa celý objem sústredil na dne skúmavky.
3. Do každej jamky 96-jamkovej optickej platničky sa napipetuje 24 μL pripravenej spoločnej reakčnej zmesi.
4. Do príslušnej jamky sa následne pridá 1 μL cDNA obsahujúcej 25 ng templátu. Konečný objem jednej qPCR reakcie je 25 μL .

Poznámka:

- Koncentrácia cDNA sa pred prípravou reakcie upraví tak, aby 1 μL vzorky obsahoval 25 ng cDNA ekvivalentu použitého v experimentálnom protokole.
5. Po napipetovaní všetkých vzoriek sa platnička uzavrie optickou fóliou alebo kompatibilnými optickými uzávermi a krátko centrifuguje, aby sa odstránili prípadné vzduchové bubliny a celý reakčný objem sa sústredil na dne jamiek.
6. Platnička sa vloží do real-time PCR prístroja a amplifikácia sa vykoná podľa nasledujúceho teplotného programu:

50 °C počas 2 min – úvodná inkubácia,

95 °C počas 10 min – aktivácia DNA polymerázy a úvodná denaturácia,

40 cyklov:

95 °C počas 15 s – denaturácia DNA,

60 °C počas 1 min – nasadenie primerov a elongácia s meraním fluorescenčného signálu.

7. Po ukončení amplifikačných cyklov sa vykoná analýza krivky topenia podľa nastavenia použitého real-time PCR systému.

Poznámka:

- Presné nastavenie teplotného rozsahu a rýchlosti zvyšovania teploty počas analýzy krivky topenia sa prispôsobí použitému prístroju a softvéru.

4.6.3 Rozloženie vzoriek na qPCR platničke

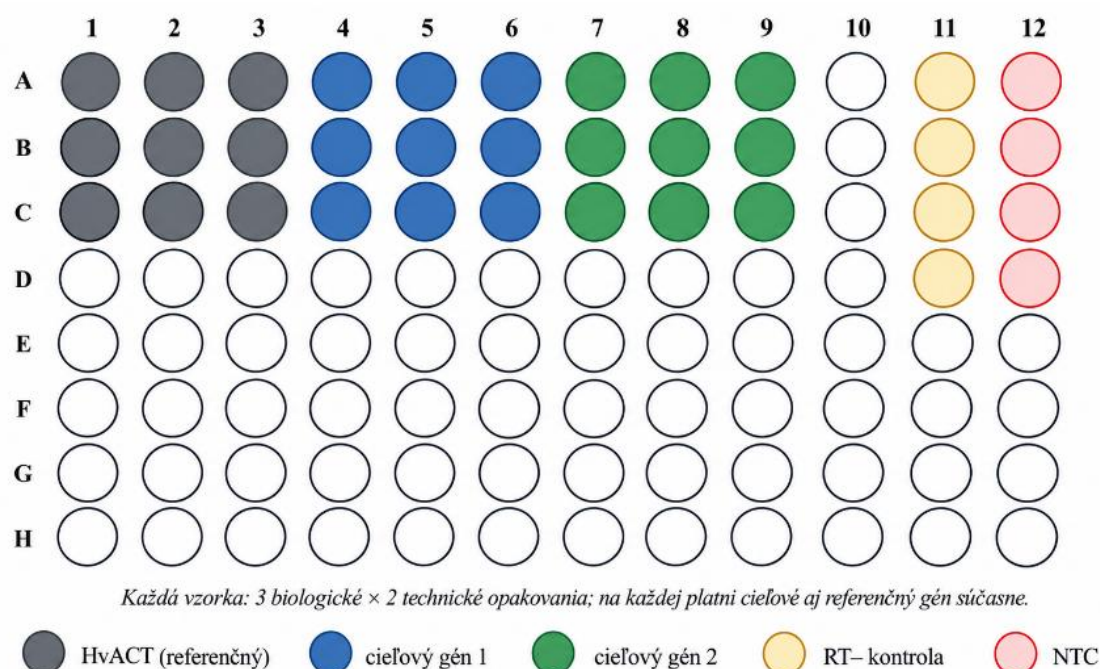
Vhodné rozloženie vzoriek na qPCR platničke je dôležité na zabezpečenie porovnateľnosti jednotlivých reakcií a minimalizáciu technickej variability. V rámci jedného experimentálneho porovnania je vhodné analyzovať vzorky za čo najviac zhodných reakčných a teplotných podmienok.

Pri príprave platničky (Obrázok 14) je potrebné zohľadniť:

- počet analyzovaných genotypov a experimentálnych variantov,
- počet biologických opakovaní,
- počet technických opakovaní,
- cieľový a referenčný gén,
- kontrolu bez templátu (NTC),
- kontrolu bez reverznej transkriptázy (RT⁻).

Poznámka:

- Každý biologický variant sa musí na platničke jednoznačne označiť tak, aby bolo možné spätne identifikovať genotyp, ošetrovanie, biologické opakovanie, analyzovaný gén a technické opakovanie.
- Ak celý experimentálny dizajn nie je možné umiestniť na jednu 96-jamkovú platničku, je potrebné jednotlivé platničky pripravovať za rovnakých reakčných podmienok a minimalizovať medziplatničkovú variabilitu.
- Pri experimentoch rozdelených medzi viac platničiek je vhodné zaradiť spoločnú referenčnú vzorku alebo inter-run calibrator umožňujúci kontrolu variability medzi jednotlivými qPCR behmi.



Obrázok 14: Príklad schematického rozloženia vzoriek na 96 jamkovej platničke pri qPCR analýze génovej expresie (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

Rozloženie vzoriek musí zohľadňovať jednotlivé genotypy, experimentálne varianty, cieľový a referenčný gén, biologické a technické opakovania a príslušné negatívne kontroly. Presné rozmiestnenie jamiek sa prispôsobuje počtu analyzovaných vzoriek a kapacite použitej qPCR platničky.

4.6.4 Kontroly a opakovania

Na zabezpečenie spoľahlivosti qPCR analýzy je potrebné do experimentu zaradiť príslušné negatívne kontroly a biologické a technické opakovania.

1. Kontrola bez templátu (NTC)

Kontrola NTC obsahuje všetky zložky qPCR reakcie okrem cDNA templátu, ktorý sa nahradí rovnakým objemom vody bez nukleáz.

Poznámka:

- *NTC slúži predovšetkým na detekciu prípadnej kontaminácie reagensí amplifikovateľnou DNA.*
- *Amplifikačný signál v NTC môže vzniknúť aj v dôsledku tvorby dimérov primerov, čo je potrebné overiť analýzou krivky topenia.*

2. Kontrola bez reverznej transkriptázy (RT⁻)

Ako templát pre RT⁻ kontrolu sa použije produkt kontrolnej reakcie pripravenej bez pridania reverznej transkriptázy.

Poznámka:

- *Amplifikačný signál v RT⁻ kontrole poukazuje na možnú prítomnosť kontaminujúcej genómovej DNA v pôvodnej RNA vzorke.*

3. Každá analyzovaná vzorka sa hodnotí minimálne v troch nezávislých biologických opakovaniach.
4. Každá biologická vzorka sa analyzuje v dvoch technických opakovaniach.

Poznámka:

- *Biologické opakovania predstavujú nezávislé biologické vzorky a zachytávajú prirodzenú biologickú variabilitu experimentu.*
 - *Technické opakovania predstavujú opakované qPCR merania tej istej cDNA a umožňujú posúdiť variabilitu súvisiacu s prípravou reakcie, pipetovaním a samotným meraním.*
5. Pred analýzou génovej expresie sa pre každý primerový pár overí amplifikačná efektivita, linearita a špecifita podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5.1.
 6. Po každom qPCR behu sa skontroluje priebeh amplifikačných kriviek, hodnoty Ct technických opakovaní, negatívne kontroly a krivky topenia.

Poznámka:

- Kritériá akceptácie qPCR cyklu: *Do vyhodnotenia sa zaraďujú iba reakcie s jednoznačnou amplifikáciou, špecifickým produktom potvrdeným krivkou topenia a vyhovujúcimi technickými opakovaniami. NTC a RT⁻ kontroly nesmú vykazovať špecifickú amplifikáciu cieľového produktu. Primery musia mať overenú amplifikačnú efektivitu a linearitu. Prípustný rozdiel medzi technickými opakovaniami sa stanoví vopred; orientačne možno použiť $\leq 0,5$ Ct (Cq). Nevyhovujúce reakcie sa preveria a podľa potreby zopakujú.*
7. Referenčný gén použitý na normalizáciu génovej expresie musí vykazovať dostatočne stabilnú expresiu v analyzovaných experimentálnych podmienkach.

Poznámka:

- *Stabilita referenčného génu sa musí overiť pre konkrétny biologický materiál a experimentálne podmienky. Pri zmene druhu, genotypu, pletiva alebo experimentálneho režimu je potrebná nová validácia. Ak sú dostupné viaceré stabilné referenčné gény, na normalizáciu možno použiť geometrický priemer ich relatívnych množstiev (Vandesompele a kol., 2002).*

4.6.5 Najčastejšie problémy a ich riešenie

1. Amplifikačný signál v NTC kontrole

Prítomnosť amplifikačného signálu v NTC môže byť spôsobená kontamináciou reagencií amplifikovateľnou DNA alebo tvorbou dimérov primerov.

Poznámka:

- *Je potrebné skontrolovať krivku topenia produktu.*
- *Pri kontaminácii sa pripravia nové alikvoty reagencií a vyčistí sa pracovný priestor určený na prípravu qPCR reakcií.*
- *Ak krivka topenia poukazuje na diméry primerov, je potrebné optimalizovať koncentráciu alebo dizajn primerov.*

2. Amplifikačný signál v RT⁻ kontrole

Amplifikácia v RT⁻ kontrole poukazuje na prítomnosť genómovej DNA v RNA použitej na syntézu cDNA.

Poznámka:

- *Je potrebné overiť účinnosť predchádzajúceho štiepenia DNA pomocou rDNázy.*
- *V prípade potreby sa vykoná dodatočné enzymatické odstránenie genómovej DNA.*
- *Pri návrhu primerov je vhodné, ak to štruktúra génu umožňuje, použiť primer pokrývajúci exón-exónový spoj alebo primerový pár umiestnený v rôznych exónoch.*

3. Viac vrcholov na krivke topenia

Prítomnosť viacerých vrcholov na krivke topenia môže poukazovať na nešpecifickú amplifikáciu alebo tvorbu viacerých PCR produktov (Obrázok 15).

Poznámka:

- *Je potrebné optimalizovať teplotu nasadenia primerov alebo ich koncentráciu.*
- *V prípade potreby sa preverí špecificita primerov a veľkosť vzniknutého produktu pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.*

4. Vysoká variabilita medzi technickými opakovaniami

Výrazné rozdiely medzi technickými opakovaniami môžu byť spôsobené nepresným pipetovaním, nedostatočným premiešaním spoločnej reakčnej zmesi alebo prítomnosťou vzduchových bublín.

Poznámka:

- *Na prípravu väčšieho počtu reakcií sa odporúča používať spoločnú reakčnú zmes.*
- *Pri pipetovaní malých objemov je potrebné používať vhodne kalibrované automatické pipety.*

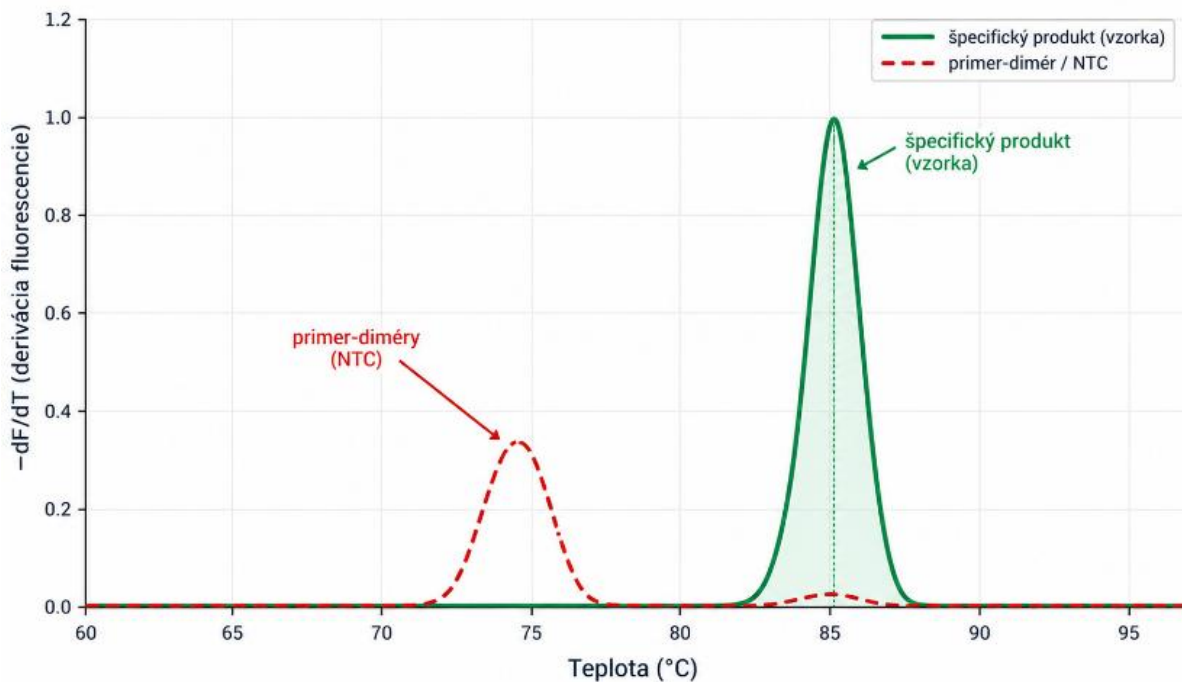
- Pred vložením platničky do prístroja je potrebné skontrolovať neprítomnosť vzduchových bublín a rovnomerné umiestnenie reakčných zmesí na dne jamiek.

5. Nízka amplifikačná efektivita alebo nedostatočná linearita

Nevyhovujúca amplifikačná efektivita alebo nízka linearita štandardnej krivky môžu byť spôsobené nevhodným dizajnom primerov, prítomnosťou inhibičných látok v cDNA alebo nepresnosťou pri príprave riediaceho radu.

Poznámka:

- Je potrebné overiť kvalitu a čistotu RNA a cDNA.
- V prípade prítomnosti inhibítorov je možné cDNA primerane zriediť a meranie zopakovať.
- Je potrebné skontrolovať špecificitu primerového páru pomocou krivky topenia a prípadne agarózovej gélovej elektroforézy.
- Pri nevyhovujúcich výsledkoch sa musí zopakovať príprava štandardnej krivky alebo optimalizovať primerový pár.



Obrázok 15: Schematické znázornenie analýzy krivky topenia (*melt curve*) na overenie špecificity amplifikácie (vytvorené a upravené pomocou Biorender.com).

5. Spracovanie výsledkov RT-qPCR a výpočet násobnej zmeny expresie génov

Údaje získané pomocou RT-qPCR sa kvantitatívne vyhodnocujú až po overení kvality jednotlivých reakcií a splnení kritérií definovaných v predchádzajúcich kapitolách. Do výpočtov sa zaraďujú iba reakcie s vyhovujúcou amplifikáciou, reprodukovateľnými technickými opakovaniami a špecifickým amplifikačným produktom. Hodnoty technických opakovaní tej istej biologickej vzorky sa po kontrole ich zhody spriemerujú; jednotlivé biologické opakovania sa následne spracúvajú samostatne. Takýto postup zodpovedá odporúčaniam Schmittgen a Livak (2008), podľa ktorého sa najskôr spriemerujú technické PCR opakovania príslušnej vzorky a až následne sa pracuje s jednotlivými biologickými vzorkami.

Poznámka:

- Na označenie kvantifikačného cyklu sa v novšej literatúre používa symbol **Cq** (**quantification cycle**). Ide o hodnotu pôvodne označovanú aj ako threshold cycle (Ct); oba pojmy vyjadrujú rovnakú veličinu. Označenie Cq je používané v súlade s odporúčaniami MIQE (Bustin a kol., 2009). Pri výstupe zo starších systémov Applied Biosystems môže byť táto hodnota v softvéri označená ako Ct.

Na stanovenie zmeny expresie cieľového génu medzi analyzovaným a kontrolným variantom sa použije komparatívna Cq metóda $2^{-\Delta\Delta Cq}$ podľa Livak a Schmittgen (2001), neskôr podrobnejšie spracovaná Schmittgen a Livak (2008). Metóda umožňuje vyjadriť expresiu cieľového génu po normalizácii voči stabilnému referenčnému génu ako násobnú zmenu vzhľadom na zvolený kontrolný variant. V štúdiu na jačmeni siatom bol ako referenčný gén použitý *HvACT*, ktorého stabilita bola overená v príslušných experimentálnych podmienkach (Kaňuková a kol., 2025).

Poznámka:

- V súlade s terminológiou MIQE sa používa označenie referenčný gén, nie „housekeeping gene“.

5.1 Komparatívna Cq metóda podľa Livak a Schmittgen (2001)

5.1.1 Výpočet ΔCq

Pre každé biologické opakovanie sa najskôr vypočíta rozdiel medzi priemernou hodnotou Cq cieľového génu a priemernou hodnotou Cq referenčného génu:

$$\Delta Cq = Cq_{\text{cieľový gén}} - Cq_{\text{referenčný gén}}$$

Hodnota ΔCq predstavuje normalizáciu cieľového génu voči referenčnému génu. Rovnaký princíp definujú Livak a Schmittgen ako rozdiel kvantifikačných cyklov cieľového a referenčného génu.

Poznámka:

- Pri viacerých technických opakovaniach sa pred výpočtom ΔCq samostatne spriemerujú Cq hodnoty cieľového a referenčného génu. Livak a Schmittgen výslovne

upozorňujú, že pri PCR opakovaní tej istej vzorky je vhodné C_q/C_t hodnoty spriemerovať ešte pred výpočtom $2^{-\Delta\Delta C_q}$.

5.1.2 Výpočet $\Delta\Delta C_q$

Následne sa normalizovaná hodnota analyzovanej vzorky porovná s príslušným kontrolným variantom, ktorý predstavuje referenčnú úroveň experimentálneho porovnania:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q_{\text{analyzovaná vzorka}}} - \Delta C_{q_{\text{kontrolný variant}}}$$

Ak kontrolný variant pozostáva z viacerých nezávislých biologických opakovaní, ako referenčná hodnota sa môže použiť ich priemerná ΔC_q :

$$\Delta\Delta C_{q_i} = \Delta C_{q_i} - \bar{\Delta C}_{q_{\text{kontrola}}}$$

Pri experimentoch zameraných na odpoveď rastlín na suchu predstavuje kontrolný variant rastliny pestované pri optimálnej dostupnosti vody (WW), zatiaľ čo analyzovaným variantom sú rastliny vystavené stresu suchom (DS). Livak a Schmittgen uvádzajú neošetrenú kontrolu ako najjednoduchšiu referenčnú úroveň porovnania; expresia ostatných vzoriek sa potom interpretuje vzhľadom na túto kontrolu.

5.1.3 Výpočet násobnej zmeny expsie génu

Konečná násobná zmena expsie génu (fold change) sa vypočíta podľa vzťahu:

$$\boxed{\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_q}}$$

Tento vzťah predstavuje konečnú formu komparatívnej C_q metódy. Výsledná hodnota vyjadruje zmenu expsie cieľového génu v analyzovanom variante po normalizácii voči referenčnému génu a vzhľadom na kontrolný variant.

Interpretácia je nasledujúca:

- *fold change* = 1 – expresia je na úrovni kontrolného variantu,
- *fold change* > 1 – expresia cieľového génu je zvýšená vzhľadom na kontrolný variant,
- *fold change* < 1 – expresia cieľového génu je znížená vzhľadom na kontrolný variant.

Pre kontrolný variant platí $\Delta\Delta C_q = 0$, a preto:

$$2^0 = 1$$

Referenčná úroveň kontrolného variantu je teda definovaná hodnotou 1. Livak a Schmittgen tento princíp používajú priamo pri interpretácii neošetrenej kontroly.

Poznámka:

- *Napríklad hodnota fold change = 3 znamená približne trojnásobné množstvo transkriptu cieľového génu v analyzovanom variante oproti kontrolnému variantu po*

normalizácii voči referenčnému génu. Hodnota *fold change* = 0,5 znamená približne 50 % úrovně kontrolného variantu.

Použitie metódy $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ predpokladá, že amplifikačné efektivity cieľového a referenčného génu sú približne rovnaké. Livak a Schmittgen túto podmienku uvádzajú ako základný predpoklad validity $\Delta\Delta Cq$ výpočtu. Amplifikačná efektivita a jej porovnateľnosť sa preto overujú v rámci validácie primerov podľa kapitoly 4.5.1. Ak sa efektivity cieľového a referenčného génu významnejšie odlišujú, jednoduchý výpočet $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ nie je vhodný a je potrebné použiť metódu, ktorá rozdielne amplifikačné efektivity explicitne zohľadňuje.

5.2 Alternatívny výpočet pri rozdielnych amplifikačných efektivitách

Ak amplifikačné efektivity cieľového a referenčného génu nie sú dostatočne porovnateľné, tak predpoklad komparatívnej metódy $2^{-\Delta\Delta Cq}$ nie je splnený. V takom prípade možno použiť model korigovaný na rozdielne amplifikačné efektivity podľa Pfaffl (2001), ktorý pri výpočte relatívneho expresného pomeru zohľadňuje individuálnu amplifikačnú efektivitu cieľového aj referenčného génu. Pfaffl tento pomer definuje ako funkciu amplifikačných efektív a rozdielov kvantifikačných cyklov medzi kontrolnou a analyzovanou vzorkou.

Relatívny pomer expresie sa vypočíta podľa vzťahu:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cq_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta Cq_{\text{reference}}(\text{control-sample})}}$$

kde:

$$\Delta Cq_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample}) = Cq_{\text{target,control}} - Cq_{\text{target,sample}}$$

a

$$\Delta Cq_{\text{reference}}(\text{control} - \text{sample}) = Cq_{\text{reference,control}} - Cq_{\text{reference,sample}}$$

pričom:

- **R** – relatívny pomer expresie cieľového génu v analyzovanej vzorke vzhľadom na kontrolný variant,
- **E_{target}** – amplifikačný faktor cieľového génu,
- **$E_{\text{reference}}$** – amplifikačný faktor referenčného génu,
- **$Cq_{\text{target,control}}$** – Cq cieľového génu v kontrolnom variante,
- **$Cq_{\text{target,sample}}$** – Cq cieľového génu v analyzovanej vzorke,
- **$Cq_{\text{reference,control}}$** – Cq referenčného génu v kontrolnom variante,
- **$Cq_{\text{reference,sample}}$** – Cq referenčného génu v analyzovanej vzorke.

Poznámka:

- Pfaffl (2001) používa vo svojej práci označenie CP (*crossing point*); v tejto metodike používame štandardizované označenie Cq (*quantification cycle*).

Amplifikačný faktor jednotlivého primerového páru sa stanoví zo smernice štandardnej krivky:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Pri ideálnej amplifikácii je $E = 2$, čo zodpovedá 100 % amplifikačnej efektivite. Pfaffl vo svojom modeli použil individuálne experimentálne stanovené hodnoty E pre cieľový aj referenčný gén.

Výsledok sa interpretuje obdobne ako násobná zmena expresie:

- $R = 1$ – bez zmeny vzhľadom na kontrolu,
- $R > 1$ – zvýšená expresia,
- $R < 1$ – znížená expresia.

5.3 Ďalšie spracovanie výsledkov

Vypočítané hodnoty násobnej zmeny expresie (fold change), resp. relatívneho pomeru expresie pri použití modelu korigovaného na amplifikačnú efektivitu, možno následne štatisticky vyhodnotiť podľa cieľa a experimentálneho dizajnu konkrétnej štúdie. Technické opakovania slúžia na kontrolu reprodukovateľnosti qPCR merania a po kontrole ich zhody sa spriemerujú; základnou jednotkou následnej inferenčnej analýzy sú nezávislé biologické opakovania.

- Pri porovnaní dvoch nezávislých experimentálnych skupín možno použiť parametrický test, napríklad nezávislý Studentov t-test, ak sú splnené jeho predpoklady, alebo vhodnú neparametrickú alternatívu, napríklad Mann-Whitney U test. Pri párovom experimentálnom usporiadaní, keď sú porovnávané hodnoty odvodené od tej istej biologickej jednotky, sa používajú párové testy.
- Pri experimentoch zahŕňajúcich viac úrovní jedného faktora možno použiť jednofaktorovú ANOVA alebo zodpovedajúci neparametrický prístup. Ak experiment zahŕňa viac faktorov, napríklad genotyp $\times$ ošetrovanie, je vhodné použiť viac faktorovú ANOVA alebo všeobecnejší lineárny model, ktorý umožňuje hodnotiť hlavné efekty jednotlivých faktorov aj ich interakciu. Pri hierarchickom alebo opakovanom experimentálnom dizajne možno použiť zmiešané modely s vhodne definovanými fixnými a náhodnými efektmi.
- Na hodnotenie vzťahov medzi expresiou jednotlivých génov alebo medzi génovou expresiou a fyziologickými či biochemickými parametrami možno použiť korelačnú alebo regresnú analýzu. Pri súčasnom hodnotení väčšieho počtu génov alebo genotypov možno expresné profily ďalej skúmať pomocou exploratívnych mnohorozmerných metód, napríklad PCA alebo hierarchickej klastrovej analýzy.
- Pri paralelnom testovaní väčšieho počtu génov alebo experimentálnych porovnaní je potrebné zohľadniť aj problém viacnásobného testovania a podľa potreby použiť korekciu hladiny významnosti, napríklad kontrolu false discovery rate (FDR).

Poznámka:

- *Násobná zmena expresie $2^{-\Delta\Delta C_q}$ je vhodná najmä na biologickú interpretáciu a grafickú prezentáciu výsledkov. Pri inferenčnom štatistickom testovaní je často vhodnejšie*

pracovať s normalizovanými hodnotami na logaritmickej škále, napríklad s ΔC_q , prípadne s $\log_2$ -transformovanými relatívnymi hodnotami, pretože fold-change údaje sú exponenciálne odvodené a ich distribúcia býva asymetrická. Konkrétna voľba však musí zodpovedať experimentálnemu dizajnu a použitému štatistickému modelu.

6. Záver

Metodické postupy uvedené v tejto príručke predstavujú ucelený a experimentálne overený rámec pre analýzu génovej expresie rastlín vystavených stresu zo sucha, pričom expresia génov *HvABF2*, *HvP5CS*, *HvSOD1* a *HvAPX1* u jačmeňa siateho tvorí komplementárny súbor molekulárnych ukazovateľov charakterizujúcich ABA-dependentnú reguláciu stresovej odpovede, osmotickú reguláciu a antioxidačné obranné mechanizmy. Jednotlivé protokoly boli formulované tak, aby zabezpečovali jednotné a kontrolované podmienky odberu a spracovania rastlinného materiálu, izolácie a kontroly kvality RNA, syntézy cDNA a RT-qPCR analýzy, čo v spojení s validáciou primerov, normalizáciou voči stabilnému referenčnému génu, presne definovanými výpočtovými postupmi a odporúčaniami pre štatistické spracovanie údajov umožňuje konzistentné a spoľahlivé hodnotenie transkripčnej odpovede rastlín. Integrované hodnotenie viacerých funkčne odlišných génov zároveň umožňuje lepšie charakterizovať genotypovo špecifické expresné profily, pričom samotná intenzita expresie jedného génu nepredstavuje jednoznačný ukazovateľ tolerance voči suchu. Takto vystavaný metodický rámec podporuje reprodukovateľnosť výsledkov naprieč experimentmi a uľahčuje ich interpretáciu v kontexte genotypovej variability, intenzity stresu a rozdielov medzi experimentálnymi podmienkami. Príručka zároveň vytvára priestor na prepojenie molekulárnych ukazovateľov s fyziologickými a biochemickými analýzami, čo umožňuje komplexnejšiu charakterizáciu mechanizmov spojených s toleranciou rastlín voči suchu a poskytuje využiteľný podklad pre experimentálny výskum a šľachtiteľské programy zamerané na adaptáciu plodín na meniace sa klimatické podmienky.

7. Použitá literatura

1. Abu-Romman S., Shatnawi M. (2011): Isolation and expression analysis of chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase gene in barley. *South African Journal of Botany*, 77: 328 - 334.
2. Alexander R.D., Wendelboe-Nelson C., Morris P.C. (2019): The barley transcription factor HvMYB1 is a positive regulator of drought tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142: 246 - 253.
3. Al-Sayaydeh R., Ayad J., Harwood W., Al-Abdallat A.M. (2024): Stress-inducible expression of HvABF2 transcription factor improves water deficit tolerance in transgenic barley plants. *Plants*, 13: 3113.
4. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64: 5245 - 5250.
5. Bandurska H., Niedziela J., Pietrowska-Borek M., Nuc K., Chadzinikolau T., Radzikowska D. (2017): Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 427 - 437.
6. Brahmi W., Ltifi A., Haouala F. (2023): Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 12: 1 - 5.
7. Bustin S.A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B., Kubista M., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Tran N., Rödiger S., Untergasser A., Mueller R., Nolan T., Milavec M., Burns M.J., Huggett J.F., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2025): MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*, 71: 634 - 651.
8. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
9. European Commission, Joint Research Centre (2026): Current drought situation in Europe. European Drought Observatory (EDO). Available at: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/european-and-global-drought-observatories/current-drought-situation-europe_en (accessed 21 September 2026).
10. European Environment Agency (EEA) (2026): Building climate-resilient agriculture in Europe: an economic perspective. EEA Briefing 03/2026. European Environment Agency, Copenhagen.
11. Eurostat (2026): Sustainable development in the European Union – Monitoring report on progress towards the SDGs in an EU context – 2026 edition. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
12. Ferdous J., Li Y., Reid N., Langridge P., Shi B.J., Tricker P.J. (2015): Identification of reference genes for quantitative expression analysis of microRNAs and mRNAs in barley under various stress conditions. *PLoS ONE*, 10: e0118503.

13. Kaňuková Š., Gubišová M., Hudcovicová M., Gubiš J., Ondreičková K. (2025): Genotypic variation in physiological, biochemical, and transcriptional responses to drought stress in spring barley at an early growth stage. *Plant, Soil and Environment*, 71(12): 905 - 922.
14. Labudová L., Holec J., Turňa M. (2025): Tlaková níž Gabriel neukončila sucho na celom Slovensku. *Aktuality SHMÚ*, Slovenský hydrometeorologický ústav, Bratislava, 15. 7. 2025.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
16. Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45.
17. Samarah N.H., Alqudah A.M., Amayreh J.A., McAndrews G.M. (2009): The effect of late-terminal drought stress on yield components of four barley cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195: 427 - 441.
18. Shi W.M., Muramoto Y., Ueda A., Takabe T. (2001): Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 273: 23 - 27.
19. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3 (6), 1101–1108.
20. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3: research0034.

8. Prílohy

Protokoly uvedené v tejto prílohe slúžia ako vzory na zaznamenávanie údajov počas jednotlivých etáp experimentálnej práce a nadväzujú na príslušné kapitoly metodickéj príručky. Umožňujú systematicky zaznamenávať podmienky založenia a pestovania experimentu, priebeh aplikácie stresu suchom a monitoring vlhkosti substrátu, odber a uskladnenie rastlinného materiálu, izoláciu a kontrolu kvality RNA, syntézu cDNA, validáciu primerov, prípravu a priebeh RT-qPCR analýzy, rozloženie vzoriek na 96-jamkovej platničke, hodnoty Ct, výpočet relatívnej génovej expresie a následné štatistické a biologické vyhodnotenie výsledkov. Súčasťou prílohy sú aj formuláre na evidenciu použitých chemikálií, komerčných súprav a prístrojov a na zaznamenanie prípadných odchýlok od metodického postupu a prijatých nápravných opatrení. Jednotlivé formuláre sú označené kódmi P-01 až P-13 a ich dôsledné vedenie zabezpečuje úplnú a spätne overiteľnú primárnu dokumentáciu experimentu, podporuje sledovateľnosť jednotlivých pracovných krokov, kontrolu kvality a reprodukovateľnosť získaných výsledkov.

Zoznam protokolov:

- **P-01** – Založenie experimentu a podmienky pestovania – kap. 4.1.1
- **P-02** – Aplikácia stresu suchom a denný monitoring vlhkosti substrátu – kap. 4.1.2
- **P-03** – Odber a uskladnenie rastlinného materiálu – kap. 4.1.2
- **P-04** – Izolácia celkovej RNA (NucleoSpin® RNA Plant) – kap. 4.2
- **P-05** – Kontrola kvantity a kvality izolovanej RNA – kap. 4.3
- **P-06** – Syntéza komplementárnej DNA (cDNA) – kap. 4.4
- **P-07** – Validácia primerov – kap. 4.5.1
- **P-08** – qPCR – príprava reakčnej zmesi a teplotný program – kap. 4.6.2
- **P-09** – Plán rozloženia vzoriek na 96-jamkovej qPCR platničke – kap. 4.6.3
- **P-10** – Záznam hodnôt Ct a výpočet relatívnej génovej expresie – kap. 5.1
- **P-11** – Súhrnné vyhodnotenie a štatistické spracovanie – kap. 5.2 a 5.3
- **P-12** – Evidencia chemikálií, súprav a prístrojov – kap. 2 a 3
- **P-13** – Záznam odchýlok od metodiky a nápravných opatrení – kap. 4 – 5

V protokoloch sa používajú nasledujúce skratky označujúce experimentálne varianty, parametre pestovateľských podmienok, kontroly a veličiny využívané pri analýze génovej expresie:

- **WW** – kontrolný variant s dostatočnou závlahou (*well-watered*)
- **DS** – variant vystavený stresu suchom (*drought stress*)
- **VWC** – objemová vlhkosť substrátu (*volumetric water content*)
- **FC** – poľná vodná kapacita (*field capacity*)
- **LN₂** – tekutý dusík
- **RH** – relatívna vlhkosť vzduchu
- **PAR** – fotosynteticky aktívne žiarenie
- **Ct / Cq** – prahový cyklus / kvantifikačný cyklus
- **NTC** – kontrola bez templátu (*no-template control*)
- **RT–** – kontrola bez reverznej transkriptázy

- **RQ** – relatívne množstvo transkriptu (*relative quantity*), resp. násobná zmena expresie (*fold change*)
- **log₂FC** – binárny logaritmus násobnej zmeny expresie
- **SD** – smerodajná odchýlka
- **n** – počet biologických opakovaní

P-01 ZALOŽENIE EXPERIMENTU A PODMIENKY PESTOVANIA		Metodika, kap. 4.1.1	
Kód / názov experimentu		Dátum výsevu	
Druh rastliny (lat. názov)		Zodpovedný riešiteľ	
Rastová komora / fytotrón č.		Substrát (typ, šarža)	
Objem vegetačnej nádoby (mL)		Počet semien na nádobu	

A. Zoznam genotypov a experimentálnych variantov							
P. č.	Genotyp / odroda	Variant (WW / DS)	Počet nádob	Rastlín / nádobu	Označenie nádob	Dátum vzídenia	Poznámka
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

B. Nastavené a overené podmienky pestovania				
Parameter	Odporúčaný rozsah	Nastavená hodnota	Dátum kontroly	Podpis
Fotoperiód (h svetlo / h tma)	14 – 16 / 8 – 10			
Intenzita osvetlenia PAR ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	150 – 250			
Teplota – deň (°C)	20 – 25			
Teplota – noc (°C)	16 – 20			
Relatívna vlhkosť vzduchu (%)	40 – 70			
Zálievka pred začiatkom stresu (mL/nádobu)				

Kontrolný zoznam	
☐ do každej nádoby vysiaty rovnaký počet semien	☐ použitý homogénny substrát z jednej šarže
☐ pripravené min. 3 nezávislé biologické opakovania	☐ nádoby náhodne rozmiestnené v rastovej komore
☐ nádoby jednoznačne a trvalo označené	☐ podmienky komory zaznamenané pred začiatkom pokusu
Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy	

P-02		APLIKÁCIA STRESU SUCHOM A DENNÝ MONITORING VLNKOSTI		Metodika, kap. 4.1.2
Kód experimentu		Genotyp / séria nádob		
Rastové štádium na začiatku stresu		Dátum začiatku stresu (deň 0)		
Metóda merania vlhkosti	☐ senzor ☐ gravimetricky	Typ senzora / váh		
Cieľové rozpätie VWC – kontrola WW (%)		Cieľové rozpätie VWC – stres DS (%)		

A. Denný záznam vlhkosti substrátu a zálievky

Deň	Dátum	Čas	VWC – WW (%)	Doplnená voda WW (mL)	VWC – DS (%)	Doplnená voda DS (mL)	T (°C)	RH (%)	Vizuálne symptómy stresu	Podpis
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										

Orientačné kategórie vodného stresu (podľa Brahmi a kol., 2023)

mierny stres: cca 50 % FC	stredný stres: 30 – 35 % FC	silný stres: < 20 % FC
---------------------------	-----------------------------	------------------------

Kontrolný zoznam

☐ zálievka kontroly udržiavaná bez výkyvov	☐ meranie vykonávané denne v rovnakom čase
☐ rozdiel medzi WW a DS zachovaný počas celého obdobia	☐ nádoby priebežne náhodne premiestňované
☐ dĺžka stresu rovnaká pre všetky varianty	☐ dosiahnutá cieľová hodnota VWC pred odberom

Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy

P-03		ODBER A USKLADNENIE RASTLINNÉHO MATERIÁLU		Metodika, kap. 4.1.2
Kód experimentu		Dátum odberu		
Termín odberu (T1 / T2 / ...)		Deň stresu pri odbere		
Čas začiatku – konca odberu		Odoberajúca osoba		
Odoberané pletivo a pozícia na rastline		Hlbokomraziaci box (č. / polica)		

A. Zoznam odobratých vzoriek									
P. č.	ID vzorky	Genotyp	Variant WW/DS	Biol. opak.	Čas odberu	Hmotnosť (mg)	LN ₂	Umiestenie v –80 °C	Poznámka
1							☐		
2							☐		
3							☐		
4							☐		
5							☐		
6							☐		
7							☐		
8							☐		
9							☐		
10							☐		
11							☐		
12							☐		
13							☐		
14							☐		
15							☐		
16							☐		
17							☐		
18							☐		

Kontrolný zoznam	
☐ odber v rovnakom dennom čase pre všetky varianty	☐ odber z rovnakej pozície na rastline
☐ porovnateľné svetelné podmienky počas odberu	☐ materiál zmrazený v LN ₂ bezprostredne po odbere
☐ skúmavky označené pred odberom, popis odolný voči LN ₂	☐ transport do –80 °C bez rozmrazenia
Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy	

P-04		IZOLÁCIA CELKOVEJ RNA (NUCLEOSPIN® RNA PLANT)		Metodika, kap. 4.2
Dátum izolácie		Vykonal		
Izolačná súprava – šarža / expirácia		Počet spracovaných vzoriek		
rDNÁza – dátum rekonštitúcie		RA3 – dátum prídania etanolu		
Homogenizátor / spôsob drvenia		Centrifúga (ev. č., teplota)		

A. Záznam vykonania jednotlivých krokov				
Krok	Úkon podľa metodiky	Otáčky	Čas	Vykonané / poznámka
1	Homogenizácia < 100 mg pletiva v tekutom dusíku na jemný prášok	—	—	☐
2	Prídanie 350 µL RA1 (☐ RA1 ☐ RAP) + 3,5 µL β-merkaptotanolu, vortex	—	—	☐
3	NucleoSpin® Filter (fialový krúžok), centrifugácia	11 000 × g	1 min	☐
4	Prenos filtrátu + 350 µL 70 % etanolu, 5× premiešanie pipetou	—	—	☐
5	Nanesenie na kolónu (modrý krúžok), centrifugácia	11 000 × g	30 s	☐
6	Odsolenie membrány – 350 µL MDB, centrifugácia	11 000 × g	1 min	☐
7	Nanesenie 95 µL reakčnej zmesi rDNÁzy na stred membrány	—	—	☐
8	Inkubácia pri laboratórnej teplote (čas štart – koniec: –)	lab. teplota	15 min	☐
9	Premýtie – 200 µL RAW2, centrifugácia	11 000 × g	30 s	☐
10	Premýtie – 600 µL RA3, centrifugácia	11 000 × g	30 s	☐
11	Premýtie – 250 µL RA3, centrifugácia (vysušenie membrány)	11 000 × g	2 min	☐
12	Elúcia RNÁza-free vodou (☐ 60 µL ☐ 40 µL), centrifugácia	11 000 × g	1 min	☐
13	Umiestnenie eluátu na ľad a uloženie pri –80 °C	—	—	☐

B. Reakčná zmes rDNÁzy (10 µL rDNÁza + 90 µL reakčného tlmivého roztoku na vzorku)				
Zložka	Na 1 vzorku (µL)	Počet vzoriek × 1,1	Potrebný objem (µL)	Šarža / poznámka
Rozpustená rDNÁza	10			
Reakčný tlmivý roztok pre rDNÁzu	90			
Spolu	100			

C. Spracované vzorky					
P. č.	ID vzorky	Navážka (mg)	Lyzačný pufor (RA1 / RAP)	Objem elúcie (µL)	Poznámka
1					
2					
3					
4					
5					
6					
Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy					

P-05		KONTROLA KVANTITY A KVALITY IZOLOVANEJ RNA		Metodika, kap. 4.3
Dátum merania		Vykonal		
Spektrofotometer (typ, ev. č.)		Blank (RNÁza-free voda, šarža)		

A. Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty RNA

P. č.	ID vzorky	Koncentrácia (ng·μL ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Objem pre 1 μg RNA (μL)	Hodnotenie / poznámka
1						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
2						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
3						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
4						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
5						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
6						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
7						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
8						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje
9						☐ vyhovuje ☐ nevyhovuje

B. Agarózová gélová elektroforéza – kontrola integrity RNA

Koncentrácia agarózy (% w/v)		Elektroforetický pufo	☐ TAE ☐ TBE
Napätie / intenzita poľa	 V (5 – 6 V·cm ⁻¹)	Doba elektroforézy	
Interkalačné farbivo		Veľkostný marker	
Množstvo nanasej RNA (μg)	0,5 – 1,0	Denaturácia vzoriek (65 – 70 °C)	☐ áno ☐ nie

Dráha č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vzorka / marker												
25S a 18S rRNA ostré	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Degradácia (smear)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Signál gDNA nad rRNA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

C. Miesto na vloženie fotografie separácie RNA v géli

Celkové hodnotenie RNA

☐ RNA vyhovuje – možno použiť na syntézu cDNA ☐ potrebné dodatočné štiepenie DNázou ☐ izoláciu opakovať z novej vzorky

Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy

P-06 SYNTÉZA KOMPLEMENTÁRNEJ DNA (REVERTAID FIRST STRAND)		Metodika, kap. 4.4	
Dátum syntézy		Vykonal	
Súprava – šarža / expirácia		Termocyklér (typ, ev. č.)	
Vstupné množstvo RNA na reakciu	1 µg / 20 µL reakcie	Typ primerov	random hexaméry (100 µM)

A. Príprava vzoriek – RNA, primer a voda do objemu 12 µL

P. č.	ID vzorky	c RNA (ng·µL ⁻¹)	Objem RNA pre 1 µg (µL)	Primer (µL)	Voda do 12 µL (µL)	Reakcia	Poznámka
1				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
2				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
3				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
4				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
5				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
6				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
7				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	
8				1,0		☐ RT+ ☐ RT–	

B. Enzymatická zmes (8 µL na reakciu) – výpočet spoločnej zmesi

Zložka	1 reakcia (µL)	Počet reakcií × 1,1 =	Potrebný objem (µL)	Šarža
5× reakčný tlmivý roztok	4,0			
RiboLock RNase Inhibitor (20 U·µL ⁻¹)	1,0			
dNTP Mix (10 mM)	2,0			
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U·µL ⁻¹)	1,0			
Spolu na 1 reakciu	8,0			

C. Teplotný program reverznej transkripcie

Krok	Teplota	Čas	Vykonané	Poznámka
Naviazanie random hexamérov	25 °C	5 min	☐	
Syntéza prvého vlákna cDNA	42 °C	60 min	☐	
Inaktivácia reverznej transkriptázy	70 °C	5 min	☐	
Čas začiatku / ukončenia programu			Uloženie cDNA	☐ –20 °C ☐ –80 °C

Kontrolný zoznam

☐ reagenty po rozmrazení premiešané a krátko centrifugované	☐ zmes pripravovaná na ľade bezprostredne pred použitím
☐ pripravená kontrola RT– (enzým nahradený vodou)	☐ pripravená kontrola bez templátu (RNA nahradená vodou)
☐ cDNA rozdelená na alikvoty a označená kódom vzorky	
Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy	

P-08		qPCR – PRÍPRAVA REAKČNEJ ZMESI A TEPLOTNÝ PROGRAM		Metodika, kap. 4.6.2
Kód qPCR behu (Run ID)		Dátum		
Real-time PCR systém (typ, ev. č.)		Vykonal		
SYBR Green Master Mix – šarža		Typ platničky / uzáveru		
Analýzovaný gén (gény)		Počet reakcií na platničke		

A. Reakčná zmes (konečný objem reakcie 25 µL = 24 µL zmesi + 1 µL cDNA s 25 ng)				
Zložka	1 reakcia (µL)	Počet reakcií × 1,1 =	Potrebný objem (µL)	Šarža
SYBR® Green PCR Master Mix	12,5			
Forward primer (10 µM)	0,375			
Reverse primer (10 µM)	0,375			
Voda bez nukleáz	10,75			
Spoločná reakčná zmes spolu	24,0			
cDNA (25 ng·µL ⁻¹) – pipetuje sa do jamky samostatne	1,0	—	—	

B. Teplotný program				
Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov	Vykonané / poznámka
Úvodná inkubácia	50 °C	2 min	1	☐
Aktivácia polymerázy a denaturácia	95 °C	10 min	1	☐
Denaturácia	95 °C	15 s	40	☐
Nasadenie primerov a elongácia (meranie fluorescence)	60 °C	1 min	40	☐
Analýza krivky topenia (melt curve)			1	☐
Čas začiatku behu			Čas ukončenia	

C. Kontroly zaradené do behu			
Kontrola	Zaradená	Jamky (pozície)	Výsledok (Ct / bez amplifikácie)
NTC – kontrola bez templátu	☐ áno ☐ nie		
RT– – kontrola bez reverznej transkriptázy	☐ áno ☐ nie		
Kontrola (kontrolný variant WW)	☐ áno ☐ nie		
Inter-run kontrola (pri viacerých platničkách)	☐ áno ☐ nie		
Kontrolný zoznam			
☐ spoločná reakčná zmes pripravená bezprostredne pred použitím		☐ Master Mix chránený pred svetlom	
☐ platnička uzavretá optickou fóliou / uzávermi		☐ platnička krátko centrifugovaná, bez vzduchových bublín	
☐ vyplnený plán platničky (P-09), primery overené (P-07)			
Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy			

P-09		PLÁN ROZLOŽENIA VZORIEK NA 96-JAMKOVEJ qPCR PLATNIČKE					Metodika, kap. 4.6.3
Kód behu (Run ID)		Dátum		Prístroj		Vykonal	
Analyzované gény		Referenčný gén		Platnička – šarža		Strana / z	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Označenie v jamke	Genotyp / odroda	Variant (WW/DS)	Biol. opak.	Gén	Techn. opak.	Jamky (pozície)	Poznámka

☐ NTC – jamky:
 ☐ RT – jamky:
 ☐ kontrola (WW) – jamky:
 ☐ inter-run kontrola – jamky:

P-10															ZÁZNAM HODNÔT CT A VÝPOČET NÁSOBNEJ ZMENY GÉNOVEJ EXPRESIE															Metodika, kap. 5.1				
Kód behu (Run ID)						Dátum vyhodnotenia						Referenčný gén																						
Kontrola (vzorka WW)						Metóda kvantifikácie			2 [^] (-ΔΔCt) podľa Livaka a Schmittgena (2001)			Vyhodnotil																						
P. č.	ID vzorky	Genotyp	Variant	Biol. op.	Gén	Ct 1	Ct 2	Rozdiel ≤ 0,5	Priemer Ct	Ct ref. gén	ΔCt	ΔΔCt	2 [^] (-ΔΔCt)	log ₂ FC																				
1																																		
2																																		
3																																		
4																																		
5																																		
6																																		
7																																		
8																																		
9																																		
10																																		
11																																		
12																																		
13																																		
14																																		
15																																		
Kontrola kvality behu		NTC		RT-		Krivka topenia		Technické opakovania			Záver																							
Výsledok		☐ bez amplifikácie		☐ bez amplifikácie		☐ jeden vrchol		☐ rozdiel ≤ 0,5 Cq			☐ beh akceptovaný ☐ opakovať																							
Poznámky k behu (vyraďené reakcie, dôvod vyradenia, opakované merania)																																		

P-11		SÚHRNNÉ VYHODNOTENIE A ŠTATISTICKÉ SPRACOVANIE		Metodika, kap. 5.2 a 5.3
Kód experimentu		Dátum spracovania		
Počet biologických opakovaní (n)		Použitý softvér / verzia		
Hladina významnosti	$p < 0,05$	Výhodnotil		

A. Overenie predpokladov štatistickej analýzy			
Test	Testovaná premenná	Hodnota P	Predpoklad splnený
Shapiro–Wilkov test (normalita)			☐ áno ☐ nie
Leveneho test (homogenita variancií)			☐ áno ☐ nie
Zvolený test	☐ Studentov t-test ☐ Mann–Whitneyho U test ☐ dvojfaktorová ANOVA ☐ iný:		

B. Súhrnné výsledky relatívnej expzie (priemer ± SD)						
Genotyp	Gén	n	RQ (priemer)	SD	Hodnota P	Významnosť
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
						ns / * / ** / ***
Označenie významnosti: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns – štatisticky nevýznamné. RQ > 1 = zvýšená expresia (up-regulácia), RQ < 1 = znížená expresia (down-regulácia).						

C. Doplnkové analýzy a interpretácia	
☐ Pearsonov korelačný koeficient ☐ z-score transformácia ☐ PCA ☐ hierarchická klastrová analýza (HCA) ☐ log ₂ FC transformácia	
Stručná interpretácia výsledkov (smer a intenzita odpovede, variabilita, genotypové rozdiely)	

Kód experimentu		Obdobie riešenia	
-----------------	--	------------------	--

A. Chemikálie, súpravy a spotrebný materiál

P. č.	Reagencia / súprava	Výrobca	Katalógové č.	Šarža (lot)	Expirácia	Otvorené dňa
1	NucleoSpin® RNA Plant kit					
2	rDNÁza (súčasť súpravy)					
3	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit					
4	SYBR® Green PCR Master Mix					
5	Random hexamérové primery					
6	Primery – cieľový gén					
7	Primery – referenčný gén					
8	β-merkaptoetanol					
9	Etanol 96 – 100 %					
10	RNÁza-free voda					
11	Agaróza					
12	Interkalačné farbivo					
13						
14						

B. Použité prístroje

P. č.	Prístroj	Typ / model	Evidenčné č.	Posledná kalibrácia / servis	Poznámka
1	Homogenizátor (TissueLyser / trecia miska)				
2	Chladená centrifúga				
3	Analytické váhy				
4	Spektrofotometer NanoDrop				
5	Termocyklér				
6	Real-time PCR systém				
7	Elektroforetická vaňa a zdroj napätia				
8	Dokumentačný systém / UV transiluminátor				
9	Rastová komora / fytotrón				
10	Pôdny vlhkomer				
11	Hlbokomraziaci box –80 °C				

Poznámky, odchýlky od metodiky, riešené problémy

--

Kód experimentu		Zodpovedný riešiteľ	
-----------------	--	---------------------	--

Zaznamenajte každú odchýlku od postupu uvedeného v metodической príručke (zmena objemov, časov, teplôt, opakované merania, vyradené vzorky, technické poruchy). Záznam sa vyplňa bezprostredne po zistení odchýlky.

P. č.	Dátum	Protokol / krok	Popis odchýlky a jej príčina	Prijaté opatrenie	Vplyv na výsledky	Podpis
1					☐ áno ☐ nie	
2					☐ áno ☐ nie	
3					☐ áno ☐ nie	
4					☐ áno ☐ nie	
5					☐ áno ☐ nie	
6					☐ áno ☐ nie	
7					☐ áno ☐ nie	
8					☐ áno ☐ nie	
9					☐ áno ☐ nie	
10					☐ áno ☐ nie	
11					☐ áno ☐ nie	
12					☐ áno ☐ nie	
13					☐ áno ☐ nie	
14					☐ áno ☐ nie	

Poznámky:

Názov: Molekulárne markery tolerancie sucha u rastlín - Metodická príručka s aplikáciou na jačmeň siaty

Autori metodiky: RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.; Mgr. Marcela Gubišová, PhD.; Mgr. Martina Hudcovicová, PhD.; Ing. Jozef Gubiš, PhD.; Mgr. Katarína Ondreičková, PhD.

Autori fotografií: RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.

Obrázky vytvorené a upravené pomocou: BioRender.com, Nano Banana Pro a Canva

Vydal: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Sekcia vedy, výskumu a inovácií, Odbor rastlinnej výroby, Oddelenie aplikovanej biológie a genetiky, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Rok vydania: 2026

Počet strán: 65

Formát: A4

ISBN 978-80-89417-82-7

Publikácia neprešla jazykovou úpravou

Metodika je nepredajná

Kontakt na autora: sarlota.kanukova@nppc.sk



NPPC
NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM

ISBN 978-80-89417-82-7



9 788089 417827