

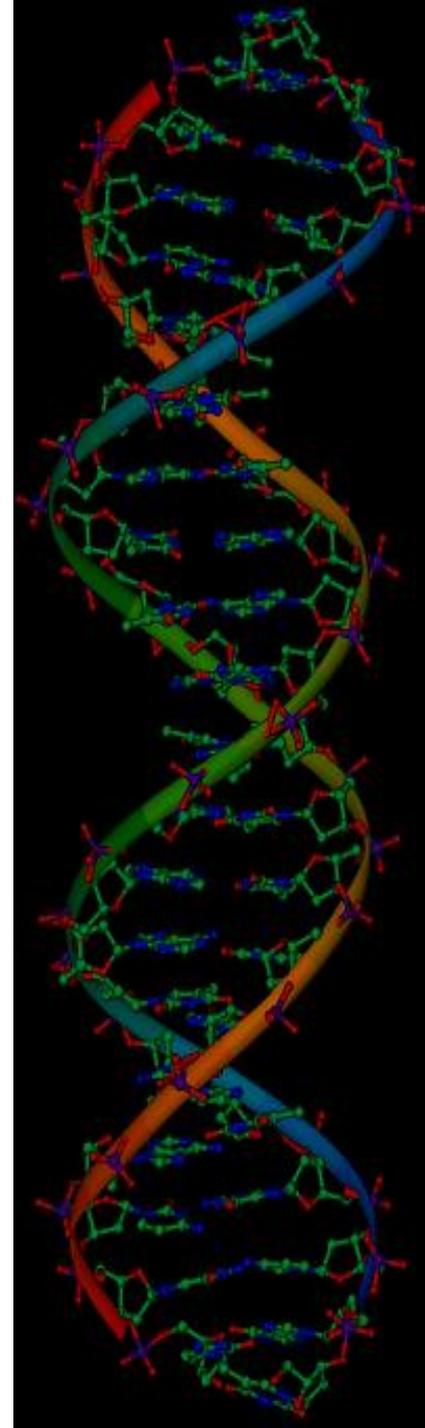


Hrvatski šumarski  
institut

# DNA sekvenciranje i mogućnost njegove uporabe u procesu certifikacije

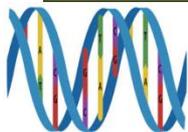
Nevenka Čelepirović

Varaždin, 12. prosinca, 2019.



# Sadržaj

- Laboratorij za molekularno-genetička ispitivanja (LMGI) Hrvatskog šumarskog instituta i akreditacija
- DNA analiza (izolacija, PCR i sekvenciranje)
- Certifikacija biljaka pomoću DNA markera
- DNA barkodiranje
- Primjeri certifikacije biljaka DNA barkodiranjem
- Zaključak



# Laboratorij za molekularno-genetička ispitivanja

**1998**

- Diplomirani inženjer molekularne biologije
- Zavod za genetiku, oplemenjivanje šumskog drveća i sjemenarstvo

**1998 –  
2003**

- Opremanje laboratorija
- Laboratorijski namještaj, uređaji i kemikalije
- Edukacija osoblja

**2003**

- Uvođenje metoda DNA analize
- DNA izolacija iz obične jele (*Abies alba* Mill.) u svrhu utvrđivanja varijabilnosti mitohondrijske DNA

**2005**

- Odjela za laboratorijska ispitivanja
- ISO standard HRN EN ISO/IEC 17025 bez akreditirane metode
- Laboratorij za molekularno-genetička ispitivanja





**ODJEL ZA  
LABORATORIJSKA  
ISPITIVANJA**

**VODITELJ KVALITETE**

**LABORATORIJ ZA ISPITIVANJE  
SJEMENA**

**LABORATORIJ ZA FIZIKALNO – KEMIJSKA  
ISPITIVANJA**

**LABORATORIJ ZA MOLEKULARNO-GENETIČKA  
ISPITIVANJA**

**LABORATORIJ ZA ENTOMOLOŠKA  
ISPITIVANJA**

**LABORATORIJ ZA FITOPATOLOŠKA  
ISPITIVANJA**



# Akreditacija prema HRN EN ISO/IEC 17025

- Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija, HRN EN ISO/IEC 17025:2017

**(General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, EN ISO/IEC 17025:2017)**

- Postupak kojim se potvrđuje osposobljeno za obavljanje određenih aktivnosti prema Normi.
- Odjel za laboratorijska ispitivanja (OLI) Hrvatskog šumarskog instituta ima uspostavljenu, primijenjenu i održavanu akreditaciju i sustav upravljanja kvalitetom temeljen na zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025
- **Hrvatska akreditacijska agencija (HAA)**, koja temeljem Zakona o akreditaciji obavlja poslove nacionalnog akreditacijskog tijela, provela je akreditacije u OLI-ju.



# Akreditacije u OLI-ju

2008.

- Ispitivanja odabranih svojstva šumskog sjemena i biljnog materijala

2013.

- Ispitivanja odabranih svojstva šumskog sjemena i biljnog materijala

2018.

- Ispitivanje kvalitete šumskog sjemena



# Potvrde o akreditaciji



2008.



2013.



2018.

Varaždin, 12. prosinaca, 2019.



# Dobrobit od akreditacije:

- Postizanje konkurentnosti na globalnom tržištu
- Podizanje razine organizacijske i tehničke osposobljenosti laboratorija
- Osiguravanje povjerenja u sigurnost i kvalitetu pružene usluge
- Osiguranje povjerenja u rad institucije kojoj je državna uprava dala ovlasti za ispitivanje





# Analyze DNA

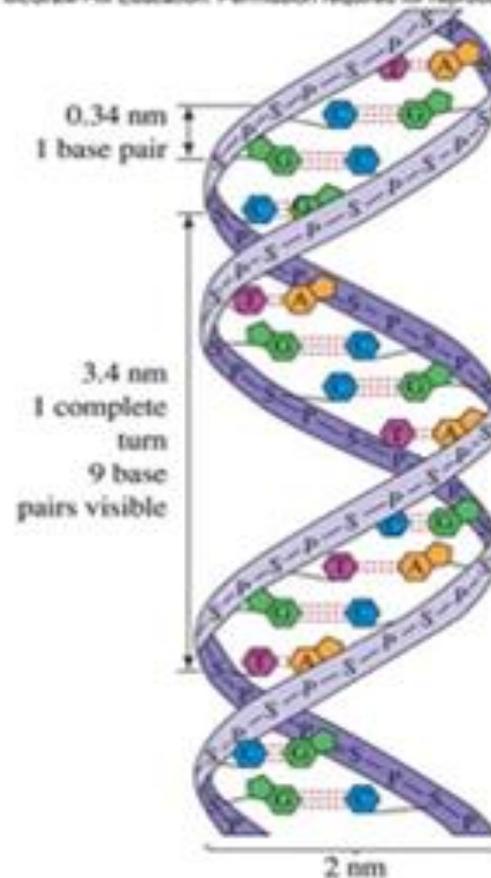
## The Double Helix of DNA

Using Rosalind Franklin's X-ray diffraction data, Watson and Crick proposed a molecular model for DNA.

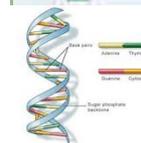
This model had a double strand of repeating nucleotides. Complementary base pairing (AT, CG) is held in place by hydrogen bonds (shown in red).

The nature of the base pairing required that the two strands be coiled in the shape of a **double helix**.

Copyright © McGraw-Hill Education. Permission required for reproduction or display.



# Izolacija sveukupne DNA



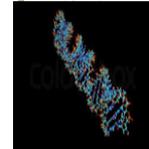
# Komplet za izolaciju DNA



# Rotina 35R centrifuga



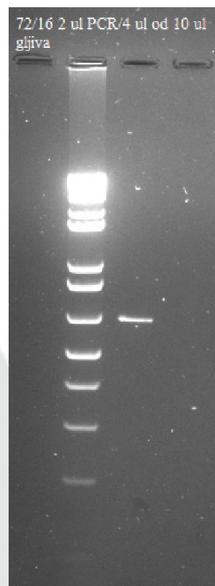
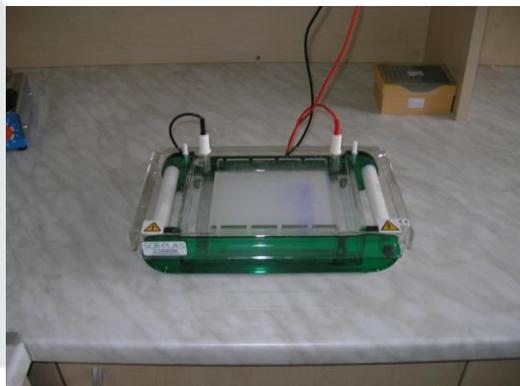
Varaždin, 12. prosinacá, 2019.



DNA



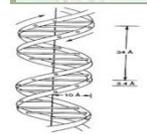
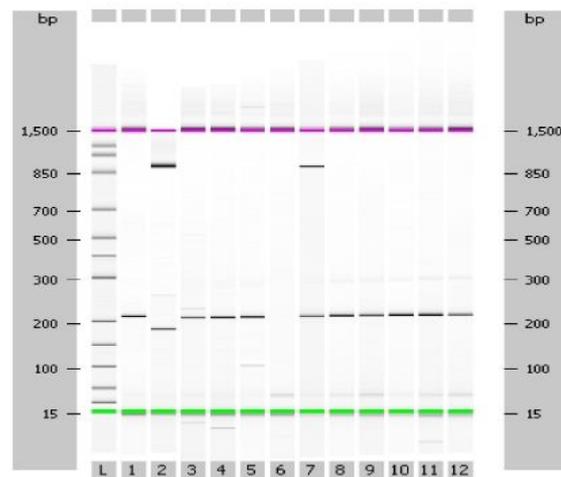
# Elektroforeza



# Agilent 2100 bioanalizator



Electrophoresis File Run Summary



# BioSpec-nano spektrofotometar

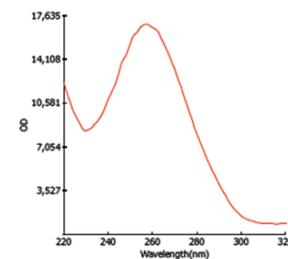
No. : 1  
Sample Name : 35/11  
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.  
Analyte : dsDNA  
DateTime : 17.04.06 09:49:45

Nucleic Acid Conc : 788,20 ng/ $\mu$ L

OD260/280 : 2,17

OD260/230 : 2,12

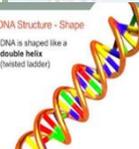
Item	Result
OD260	16,654
OD280	8,139
OD230	8,318
OD320	0,890
Pathlength (mm)	0,188
Dilution	1,000



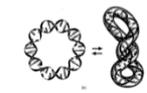
Varaždin, 12. prosinaca, 2019.



DNA Structure - Shape  
- DNA is shaped like a double helix (twisted ladder)



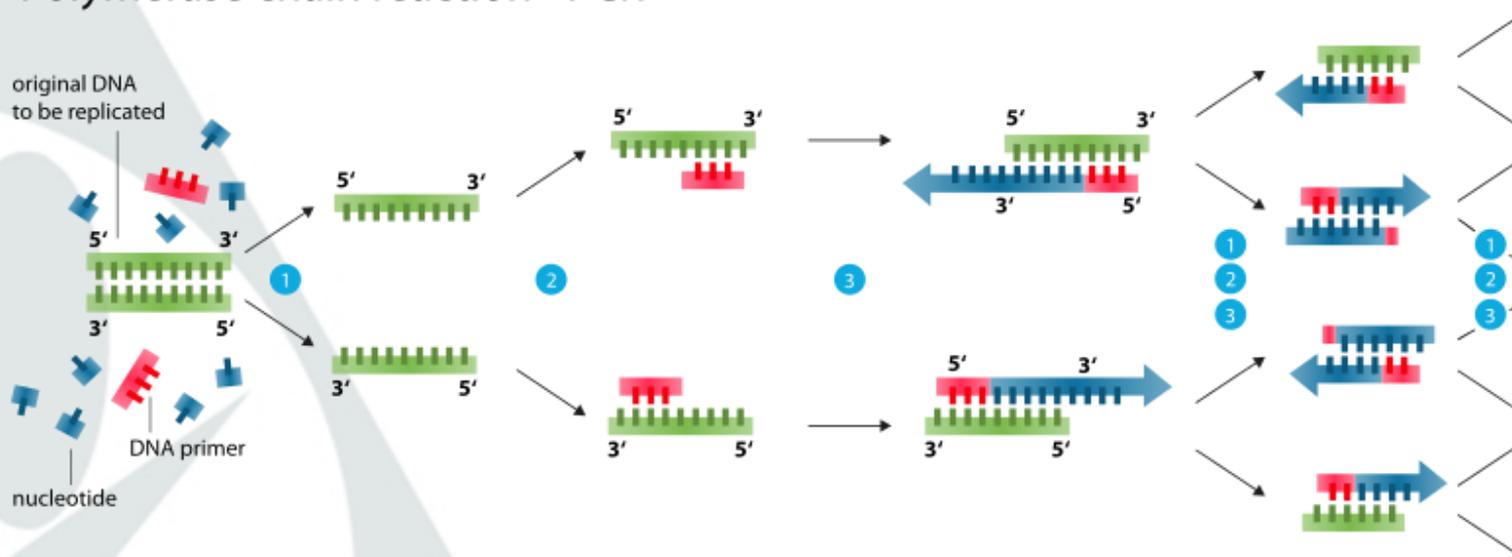
# Sterilna komora za rad



# Lančana reakcija polimerazom

## PCR - Polymerase Chain Reaction

### Polymerase chain reaction - PCR

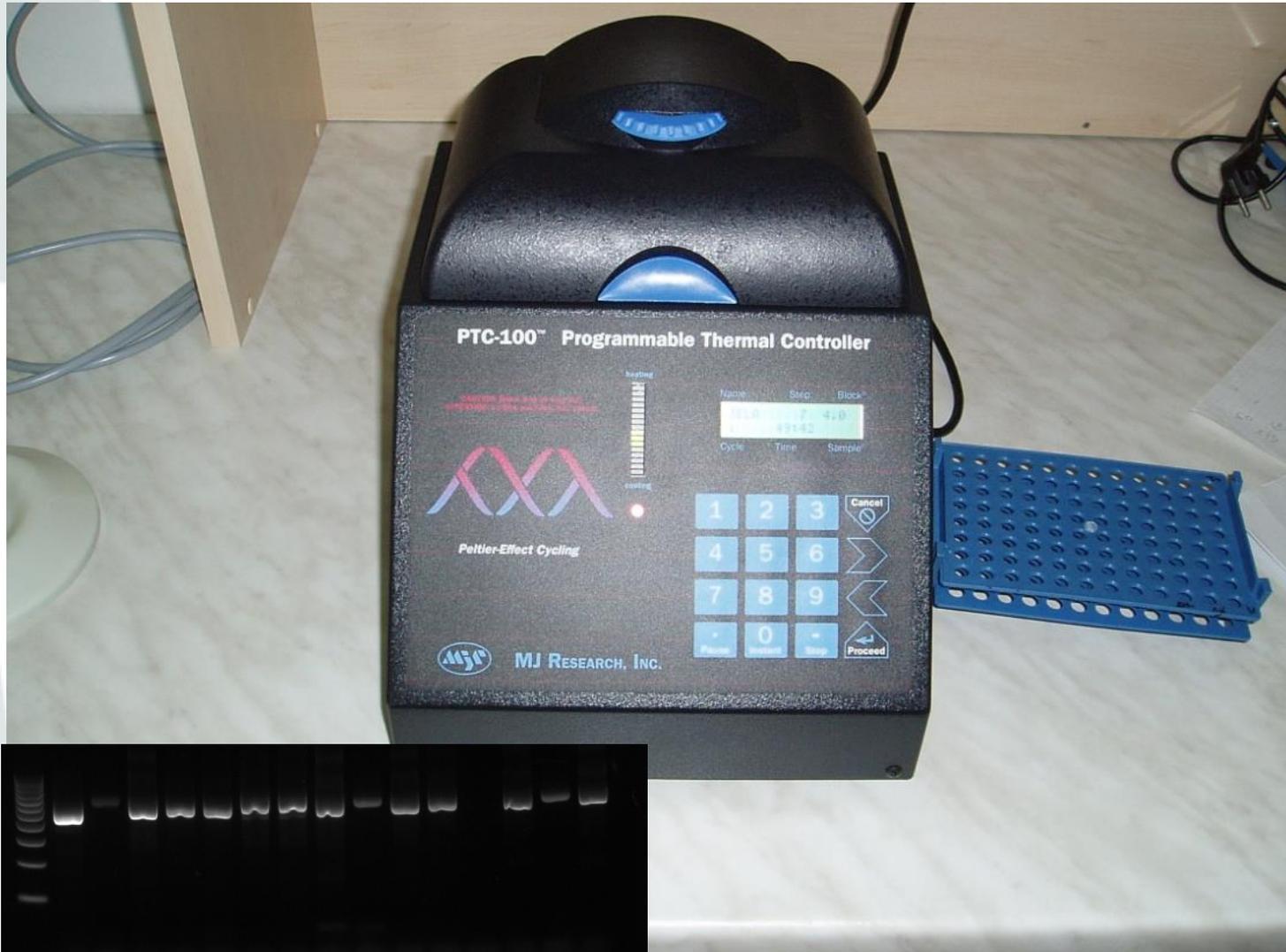


- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

<http://akademija.inovagen.hr/optimizacija-pcr-reakcije-uvjeti-reakcije-temperature-i-trajanje-faza-pcr-reakcije/>



# PTC-100 uređaj za lančanu reakciju polimerizom



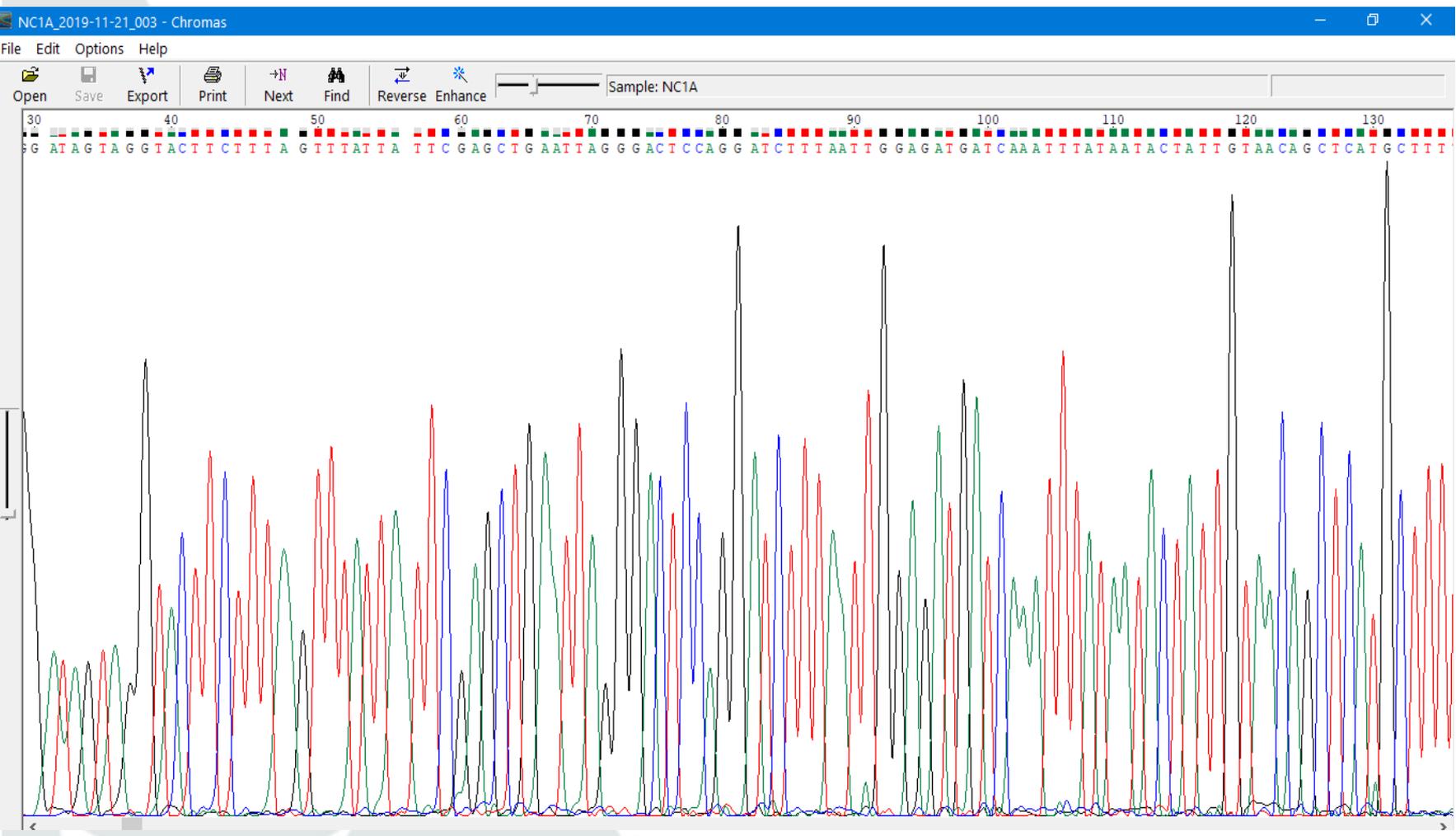
# DNA sekvenciranje

**Sekvenciranje DNA** je proces određivanja točnog poretka (sekvencije, niza) nukleotida u molekuli DNA.

**DNA sekvenator Laboratorij za molekularnu genetiku, FVA, Freiburg**



# Elektroferogram DNA sekvenci



# Certifikacija biljaka pomoću DNA markera

- Genetski marker može se definirati kao gen ili nukleotidni slijed na kromosomu koji može razlikovati jedinke ili vrste
- Različite vrste DNA markera
- Svaka od tehnika usmjerena je prema određenoj komponenti genoma, s jedinstvenim metodološkim, tehničkim i materijalnim izazovima
- Niti jedan marker DNA ne može smatrati idealnim
- Upotreba određenog markera ovisi o ciljevima istraživača



# Vrste DNA markera

Kratica	DNA marker
1. <b>RFLPs</b>	Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphisms )
2. <b>AFLPs</b>	Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (Amplified Fragment Length Polymorphisms )
3. <b>RAPD</b>	Nasumično umnožena polimorfna DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
4. <b>SSRs</b>	Jednostavne ponavljajuće sekvence (Simple Sequence Repeats)
5. <b>ISSR</b>	Inter-jednostavne sekvence ponavljanja (Inter Simple Sequence Repeats)
6. <b>SCAR</b>	Karakterizacija sekvenci umnoženih regija (Sequence Characterized Amplified Regions)
7. <b>LAMP</b>	Petljom posredovano izotermalno umnažanje (Loop Mediated Isothermal Amplification)
8. <b>SNPs</b>	Pojedinačni nukleotidni polimorfizam (Single Nucleotide Polymorphisms )
9.	<b>DNA barkodiranje (DNA barcoding)</b>
10.	Markeri bazirani na mikromreži (Microarrays based markers)
11.	Markeri bazirani na slijedećoj generaciji sekvenciranja (Next Generation Sequencing based markers)

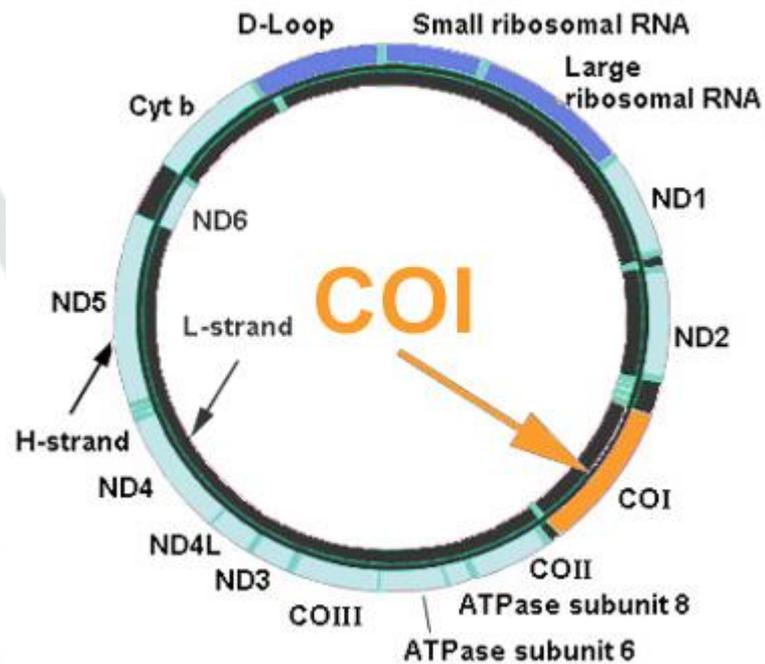


# Certifikacija koja se temelji na DNA barkodiranju

- DNA barkodiranje je dijagnostička metoda koja koristi kratke standardizirane genetske markere u DNA (kratke DNA sekvence jezgrine ili organele) za identifikaciju organizama.
- DNA barkodiranje ima cilj identificirati nepoznati uzorak pomoću prethodno postojeće klasifikacije.
- Idealan DNK barkod trebao bi osiguravati visoku sposobnost razlikovanja među vrstama.



Prvi genetski marker opisan kao "barkod" bio je mitohondrijski citokrom c oksidaza I (COI) gen koji se koristi za identifikaciju vrsta u životinjskom carstvu.



# Barkod za biljke

- Kloroplastni genom
- Nekoliko regija genoma (**trnH**, **psbA**, **rpoCl**, **rpoB**, **atpF**, **atpH**, **psbK** i **psbI**) označene su kao kandidatski markeri s različitim uspjehom diskriminacije.
- Najčešće se koriste:
  - ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza- RUBISCO (**rbcl**)
  - maturaza K (**matK**) za filogenetske analize ili identifikaciju vrsta



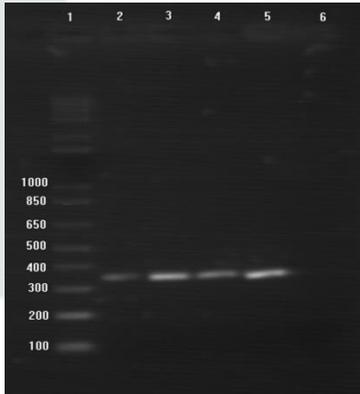
# Barkod za biljke

- Unutarnja transkripcijska regija ribosoma (ITS)



# DNA sekvenca

## *Eutypella parasitica*/ ITS2



1 tgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga

61 tcacgaaac ttgaaacgca cattgcgccc attagtattc tagtgggcat gcctgttca

121 gcgtcatttc aacccttaag ccctagtgc ttagtgttgg gaacctacc tgtaggtagt

181 tccttaaata tatcggcgga gtcgtgatga ccctaagcgt agtaattctt tctcgctca

241 gtgggtgcag cgctgacgtt tagccgtaa acccctatt ttctagtggg tgacctcga

301 tcaggtagga ataccgcta act



# Genske banke- elektroničke baze podataka

- **Nacionalni centar za biotehnoške informacije (NCBI)** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pruža pristup biomedicinskim i genomskim informacijama.
- **Europski arhiv nukleotida (ENA)** pri Europskom institutu za bioinformatiku (EBI).
- **Japanska banka podataka (DDBJ)**, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) javna je baza nukleotidnih sekvenci uspostavljena u Nacionalnom institutu za genetiku.

Suradnja

- **Međunarodna baza podataka o nukleotidnoj sekvenci (INSDC, <http://www.insdc.org/>)**



# Banka gena (NCBI)/ Pristupni broj: KP868619

NCBI Resources  How To  Sign in to NCBI

PopSet   [Limits](#) [Advanced](#) [Help](#)

GenBank

## Eutypella parasitica 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

PopSet: 917548175  
[PopSet](#) [FASTA](#)

Sequences

### Study Details

**Eutypella parasitic davidson & lorenz seven years after the first tests in Croatia**  
Novak Agbaba, S.

[Go to:](#)

LOCUS	KP868619	323 bp	DNA	linear	PLN 22-AUG-2015
DEFINITION	Eutypella parasitica 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	KP868619				
VERSION	KP868619.1				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Eutypella parasitica				
ORGANISM	<a href="#">Eutypella parasitica</a> Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Xylariomycetidae; Xylariales; Diatrypaceae;				

### Analyze this data set

Run BLAST alignment

### Related information

Taxonomy  
Nucleotide

### Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

- Eutypella parasitica 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; PopSet
- PopSet Links for Nucleotide (Select 917548175) (1) PopSet
- Eutypella parasitica 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; Nucleotide
- Eutypella AND parasitica (36) Nucleotide
- Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood See more...



# *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz SEDAM GODINA NAKON PRVOG NALAZA U HRVATSKOJ

*Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz  
SEVEN YEARS AFTER THE FIRST FINDINGS IN CROATIA

Sanja NOVAK AGBABA<sup>1</sup>, Nevenka ĆELEPIROVIĆ<sup>1</sup>, Monika KARIJA VLAHOVIĆ<sup>3</sup>, Boris LOVIĆ<sup>1</sup>

## Sažetak

Gljiva *Eutypella parasitica* uzročnik je bolesti raka kore javora. Ta bolest umanjuje ekonomsku i estetsku vrijednost javora. Na zaraženim dijelovima stabala dolazi do truljenja drvca, što oslabljuje statiku stabla i predstavlja opasnost od loma.



# Primjeri certifikacije biljaka DNA barkodiranjem

## *Crocus sativus*, šafran

- jedan od svjetski najdragocjenijih, najkvalitetnijih i najskupljih začina u svijetu.
- zbog svoje visoke tržišne vrijednosti ova biljka je često zamijenjena drugim lažnim materijalima:  
*Carthamus tinctorius L.*, *Calendula officinalis L.*,  
*Hemerocallis L.*, *Daucuscarota L.*, *Curcuma longa L.*,  
*Zea mays L.* i *Nelumbo nucifera Gaertn.*



## ***Ginkgo biloba* L.**

- Biljni dodaci prehrani, pripremljeni od lišća *G. biloba*, konzumiraju se za jačanje kognitivnih sposobnosti poboljšanom perfuzijom krvi i funkcijama mitohondrija.
- DNA barkodiranje je korišteno za procjenu učestalosti pogrešno označenih biljnih dodataka ginka na tržištu u Sjedinjenim Američkim Državama (Little, 2014)



## ***Piper nigrum*, papar**

- 1200 vrsta
- plodovi crnog papra-najrašireniji začina na svijetu
- oštar začin za okus hranu
- koristi se u tradicionalnoj medicini, osobito za probavne tegobe
- koriste se u nekoliko oblika, koji uključuju biljne dijelove, pripravke u prahu, formulacije kapsula i druge pripravke, njihovu se autentičnost treba provjeriti pomoću barkodova DNA kako bi se utvrdila vrijednost ovih proizvoda za lijekove, kozmetiku i kućanstvo (Chaveerach i sur. 2016)



# Zaključak

DNA molekularna certifikacija:

- Početni podaci: DNA molekularni podaci
- Sredstva: Molekularne tehnike i bioinformatika
- Ograničenja: uređaji, varijabilitet DNA lokusa, intenzivan rad u laboratoriju
- Jakost: mala količina uzoraka, objektivna, brza, ne ovise o morfologiji, ponovljivost kroz javne baze podataka

**Certifikacija biljaka utemeljena na DNA može biti korisna kao sredstvo za kontrolu kvalitete i sigurnost praćenja biljnih lijekova i hrane te može značajno poboljšati potencijal i komercijalnu profitabilnost biljnih proizvoda.**



# Hvala na pažnji

