

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY S.R.O.

Česká zemědělská univerzita v Praze

METODIKA HODNOCENÍ GENOVÉ EXPRESE ISOFOREM ALERGENU MAL D 1 V JABLKÁCH

Ivona Žďárská a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2018



©VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Autorský kolektiv:**VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY S.R.O.**

Ing. Ivona Žďárská, Ing. Radek Vávra, Ph.D., Ing. Veronika Nekvindová, Ph.D., RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

ČZU v Praze

Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl, Mgr. Martina Melounová, Ph.D., Ing. Daniela Čílová, Ing. Jakub Vašek, Ph.D., Ing. Petr Sedlák, Ph.D., Ing. Tereza Zunová, Ing. Anna Táborská

Název: Metodika hodnocení genové exprese isoforem alergenu Mal d 1 v jablkách**Vydal:** VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy

129, 508 01 Hořice

Vydáno v roce 2018

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: zdarska@vsuo.cz

Foto: Radek Vávra

Oponenti:

Odborný oponent z oboru: Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, VÚRV Praha Ruzyně

Oponent ze státní správy: Ing. Jitka Mašková, MZe ČR

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum a je výstupem řešení projektu QJ1510354 - Tvorba a selekce odrůd jabloní s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a prodlouženou skladovatelností plodů. Při zpracování metodiky byla rovněž využita infrastruktura projektu LO1608.

Ministerstvo zemědělství ČR schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 4070/2019-MZE-17222 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

©VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2018

ISBN 978-80-87030-67-7

OBSAH

ANOTACE.....	4
ANNOTATION	4
1 ÚVOD.....	5
2 CÍL METODIKY	6
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	6
3.1 STANOVENÍ RELATIVNÍ GENOVÉ EXPRESE JABLEČNÝCH ALERGENŮ MAL D 1 S VYUŽITÍM LIGHTCYCLER NANO (ROCHE).....	7
3.2 STANOVENÍ RELATIVNÍ GENOVÉ EXPRESE JABLEČNÝCH ALERGENŮ MAL D 1 S VYUŽITÍM ROTOR-GENE Q (QIAGEN).....	18
4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	33
5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	33
6 EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	33
7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	34
8 OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	37

ANOTACE

Jabloně patří mezi nejpěstovanější ovocný druh mírného klimatického pásma. Jablka jsou všeobecně považována za dieteticky zdravou a významnou složku lidského jídelníčku. Existence alergických reakcí však u citlivých jedinců znemožňuje jejich konzumaci. Proto jsou poznatky o alergenicitě jednotlivých odrůd a šlechtění nových hypoalergenních odrůd jabloní velice aktuální. Předkládaná metodika zahrnuje podrobné informace o stanovení genové exprese hlavních alergenů v jablkách, přípravě vzorků pro analýzy a vlastní popis analýz. Popsány jsou jednotlivé analyzované odrůdy z hlediska genové exprese alergenů v čerstvě sklizených plodech a změny v expresi v průběhu skladování. Metodika je doplněna o poznatky související s metodami analýz exprese genů pro hlavní jablečné alergeny a jejich změny při skladování ovoce vyplývající též z literární rešerše a z poznatků získaných v průběhu řešení projektu NAZV QJ1510354. Tato metodika je určena pěstitelům jabloní, skladovatelům, zpracovatelům a distributorům jablek a rovněž univerzitám a výzkumným ústavům, které se touto problematikou zabývají.

ANNOTATION

Apple trees are one of the most cultivated fruit species in temperate region. Apples are generally considered to be dietetically healthy and an important component of the human diet. However, the presence of allergic reactions prevents their consumption in sensitive individuals. Therefore, the knowledge of allergenicity of individual cultivars and breeding of new hypoallergenic apple cultivars is very desirable. The present publication includes detailed information on gene expression determination of major allergens in apples, preparation of samples for analyses, and description of analyses. Gene expression of allergens in freshly harvested fruits and changes in expression during storage is assessed in individual cultivars. The publication also describes methods for gene expression analysis of the main apple allergens and their changes during the storage of fruits, based on a literature review and results obtained during the NAZV QJ1510354 project handling. This publication is intended for apple growers, apple warehouses, apple processors and apple sellers as well as universities and research institutes that deal with this issue.

1. ÚVOD

Jablka jsou velmi důležitou součástí zdravé výživy. Jsou pro nás dostupná celoročně a jsou zdrojem mnoha vitamínů, minerálů, vlákniny a dalších zdraví prospěšných látek (Boyer and Liu 2004). Avšak přibližně 2 % populace severní a střední Evropy trpí po konzumaci čerstvých jablek alergickou reakcí, která vzniká především u lidí alergických na pyl břízy jako zkřížená alergie (Bolhaar *et al.* 2005, Kootstra *et al.* 2007). Pro tuto část Evropy je za nejvýznamnější jablečný alergen považován Mal d 1 (Vanek-Krebitz *et al.* 1995), který patří do skupiny proteinů PR-10 (pathogenesisrelated protein), stejně jako alergen Bet v 1 nacházející se v pylových zrnech břízy (Breiteneder and Radauer 2004). Z genetického hlediska je gen *Mal d 1* kódován 31 různými lokusy a každý z těchto lokusů kóduje jinou isoformu alergenu, přičemž isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* jsou majoritní a mají 10 až 10 000krát vyšší expresi než ostatní (Pagliarani *et al.* 2012, Pagliarani *et al.* 2013). Kromě toho existují pro jednotlivé isoformy celé série alel, které se nepatrně odlišují na sekvenční úrovni a i tato nepatrná sekvenční změna může na proteinové úrovni způsobovat rozsáhlé změny ve schopnosti vyvolávat alergické reakce u lidské populace (Gao *et al.* 2005, Gao *et al.* 2008). Exprese alergenů jabloní probíhá zejména v plodech a výrazné rozdíly v expresi jsou nejen mezi jednotlivými odrůdami (Bolhaar *et al.* 2005, Vlieg-Boerstra *et al.* 2011), ale také v rámci jednoho plodu mezi slupkou a dužninou, kdy v dužnině může být exprese nižší (Fernández-Rivas and Cuevas 1999, Pagliarani *et al.* 2013). Genetická determinace těchto rozdílů zatím nebyla plně objasněna (Pagliarani *et al.* 2013) a kromě genetických faktorů mají na expresi *Mal d 1* výrazný vliv rovněž další negenetické faktory, jako je například skladování, lokalita nebo zralost v době sklizně (Botton *et al.* 2008).

V současné době neexistuje nealergenní odrůda. Můžeme jen říct, že některé odrůdy mají nižší obsah alergenů a kupříkladu v Nizozemsku byly vyšlechtěny odrůdy 'Santana' a 'Elise', které jsou deklarovány jako hypoalergenní. Tyto odrůdy jsou vhodné pro lidi, kterým konzumace čerstvých běžně dostupných odrůd způsobuje jen mírné alergické projevy jako svědění nebo škrábání v ústní dutině (Maas and Schenk 2007, Vlieg-Boerstra *et al.* 2011), ačkoliv i tady může hrozit zhoršení alergie (Bolhaar *et al.* 2005). Pro lidi s těžší formou alergické reakce je jedinou možností úplně se vyhnout konzumaci čerstvých jablek (Bolhaar *et al.* 2005), eventuálně konzumovat jen tepelně zpracované potraviny vyrobené z jablek, protože skupina proteinů PR-10, do které alergen Mal d 1 patří, je varem snadno rozložitelná (Bohle *et al.* 2006). Bylo rovněž získáno geneticky modifikované hypoalergenní jablko pomocí metody RNA interference (Gilissen *et al.* 2005) jehož vlastnosti jsou dále zkoumány (Dubois *et al.* 2015).

2. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je hodnocení genové exprese isoformy jablečného alergenu Mal d 1, a to především isoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02, které jsou majoritní ve srovnání s ostatními isoformami bez ohledu na odrůdu, zemi původu, podmínky pěstování, skladování a prodej plodů. Dalším cílem je vyhodnotit rozdíly v expresi mezi jednotlivými vybranými odrůdami. V dostupné literatuře jsou odrůdy Golden Delicious a Jonagold uváděny s vysokou expresí alergenu. Dále se uvádí, že slupka má větší expresi alergenu než dužnina. Cílem metodiky je rovněž posouzení vlivu dalších faktorů na expresi alergenu, jakými je doba a způsob skladování, případně ročník sklizně.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Alergenicitu jablek lze určit pomocí různých metod, záleží, na jaké úrovni je sledována. Nejčastěji se provádějí *in vivo* testy přímo u pacientů trpících různou formou alergické reakce. K tomu se využívají tzv. skin prick testy, test aktivace basofilů (BAT) nebo přímá konzumace plodů (Bolhaar *et al.* 2005, Vlieg-Boerstra *et al.* 2011, Prošková *et al.* 2013, Vegro *et al.* 2016, Wagner *et al.* 2016). Na úrovni bílkovin se využívá například SDS-PAGE elektroforéza, Western blot, ELISA a další imunologické testy (Marzban *et al.* 2005, Bohle *et al.* 2006, Kiewning, Schmitz- Eiberger 2013, Prošková *et al.* 2013, Vegro *et al.* 2016). Na úrovni RNA se využívá především metody kvantitativní real-time PCR.

Metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce je založena na principu klasické PCR, avšak na rozdíl od ní umožňuje kvantifikaci syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj. z kalibrační křivky DNA o známém množství. Každý cyklus je zaznamenáván v reálném čase. Tento záznam je založen na principu stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Při hodnocení platí, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Jako zdroj fluorescence se využívá barvivo interkalující s dvouřetězcovou DNA (např. SYBR Green) nebo specifické fluorescenční sondy komplementární k cílové sekvenci (např. hydrolyzační sondy TaqMan nebo hybridizační sondy FRET).

Technika kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) představuje velice citlivou a rychlou metodu, která je vhodná pro studium exprese genů. Tato technika je vhodná rovněž pro podchycení rozdílů exprese pletivově specifických genů. Tato situace se týká právě isoalergenů Mal d 1, jak uvádějí například Beuning *et al.* (2004) a Pagliarani *et al.* (2009). Exprese genů pro isoalergeny Mal d 1 může být ovlivněna podmínkami vnějšího prostředí, jako je například zralost plodu nebo podmínky a doba skladování.

Pro charakterizaci genové exprese isoalergenů *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* byla použita metoda relativní kvantifikace, metoda qRT-PCT $\Delta\Delta Cq$ (Livak and Schmittgen, 2001). Jako housekeeping (referenční) gen byl použit gen pro aktin a jako kalibrátor byla zvolena odrůda 'Golden

Delicious'. Pro názornější srovnání rozdílů v expresi mezi isoformami *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* byly hodnoty relativní genové exprese jednotlivých isoform normalizovány ke genu *Aktin*. Tyto hodnoty se můžou udávat v jednotkách A.U. (Arbitrary Units), což je relativní měrná jednotka popisující poměr množství látky, intenzity nebo jiných veličin k předem stanovenému referenčnímu měření.

Pro hodnocení alergenicity byla vybrána kolekce odrůd, která obsahuje jak odrůdy běžně pěstované, případně dostupné v České republice a to konkrétně 'Jonagold' (a jeho klony Marnika a Supra), 'Golden Delicious', 'Gala', 'Idared', 'Braeburn', 'Rubín', 'Topaz', 'Opal', 'Bohemia Gold' a odrůda 'Santana', která je deklarovaná jako hypoalergenní, tak odrůdy, které jsou vyšlechtěny ve VŠÚO Holovousy, jsou poměrně nové a mají tendenci uplatnění na českém trhu a to konkrétně odrůdy 'Meteor', 'Rubinstep', 'Lady Silvia', 'Rucla', 'Nikoleta', 'Frosta', 'Reluga', 'Artiga', 'Andera', 'Rosabel', 'Fragrance' nebo sloupcové odrůdy 'Cumulus' a 'Herald'. Vzorky pro analýzy byly zpracovávány buď jako čerstvé ihned po sklizni (září až říjen) anebo byly uskladněny dvěma způsoby a to v chlazeném skladu bez řízené atmosféry a v řízené atmosféře ULO (ultra low oxygen; podmínky: 2 % O₂, 1 % CO₂, teplota 1,5–2 °C, vlhkost 99 %). Skladování bylo ukončeno po třech případně po čtyřech měsících a hned poté byly vzorky zpracovány pro další analýzy.

Fakt, že úroveň genové exprese alergenu *Mal d 1* může být silně ovlivněna různými negenetickými faktory, komplikuje výsledné hodnocení alergenicity odrůd jablek z hlediska genové exprese a je dosti obtížné jednoznačně určit odrůdu se stabilně nízkou mírou exprese genu *Mal d 1*. Pro detailní hodnocení alergenicity jednotlivých odrůd je proto vhodné doplnit hodnocení na úrovni RNA i o další metody, které jsou zmiňovány v úvodu této kapitoly.

3.1. Stanovení relativní genové exprese jablečných alergenů *Mal d 1* s využitím LightCycler Nano (Roche)

A. Příprava materiálu a směsného vzorku

Pro extrakci RNA je nezbytné používat pouze laboratorní plast kategorie RNase free, který je následně sterilizován pomocí autoklávu. Rovněž špičky s filtry, pipety, třecí misky, tloučky, skalpely a pinzety musí být sterilizovány. Vlastní extrakce RNA provádět v laboratoři, kde jsou pracovní plochy ošetřeny přípravkem RNaseZAP™ (Sigma), případně podobným. Při analýzách je nutné pracovat v rukavicích ošetřených shodným přípravkem.

Analyzované plody je nezbytné rovněž ošetřit přípravkem RNaseZAP™ (Sigma) a ponechat je oschnout. Směsný vzorek je vhodné připravovat minimálně ze tří plodů. Z každého plodu odebrat do připravené sterilní centrifugační zkoumavky vzorek slupky o hmotnosti přibližně 100 mg z 6 rovnoměrně rozmístěných oblastí, ze tří plodů je tudíž získáno přibližně 1800 mg biologického materiálu. Připravený vzorek je nutné okamžitě zamrazit v polypropylenové centrifugační zkoumavce v kapalném dusíku a následně použít pro extrakci RNA. Zamražené vzorky je možné rovněž skladovat při teplotě -80 °C.

B. Izolace celkové RNA

1. Veškerý obsah zkumavky se zamraženým vzorkem přenést do kapalným dusíkem předem vychlazené sterilní třecí misky. Homogenizovat do práškovité struktury za neustálého chlazení kapalným dusíkem. Z homogenizovaného materiálu odvážit 100 mg a navážku přenést asepticky do sterilní 2ml zkumavky. Vzorky ponechat do vlastní analýzy ponořené v kapalném dusíku.
2. Vlastní izolaci provést s využitím kitu Spectrum TM Plant Total RNA Kit (Sigma). K homogenizovanému materiálu přidat 500 μ l lyzačního roztoku obsahujícího 2-merkptoethanol. Každý vzorek ponechat 30 sekund homogenizovat pomocí vibrační třepačky a následně inkubovat při teplotě 56 °C po dobu 5 minut.
3. Pro odstranění zbytků buněk použít centrifugaci při 16 000xg po dobu 3 minut při teplotě 20 °C. Supernatant bez flotujících rostlinných zbytků přenést sterilní špičkou do filtrační kolonky. Provést centrifugaci po dobu 4 minut při 20 000xg při teplotě 20 °C.
4. K získanému filtrátu přidat 750 μ l vázacího roztoku. Směs ponechat krátce vortexovat. 700 μ l této směsi přenést na kolonku určenou k navázání RNA a následně centrifugovat při 20 000xg po dobu 1 min při teplotě 20 °C. Stejný proces zopakovat i se zbývající částí filtrátu tak, aby veškerý získaný filtrát byl aplikován na jednu vázací kolonku.
5. Vázací kolonku přenést do nové 2ml centrifugační zkumavky. Do kolonky přidat 300 μ l promývacího roztoku 1. Zkumavky centrifugovat při 20 000xg při teplotě 20 °C po dobu 1 min. Filtrát odlít, 2ml zkumavky osušit sterilní buničinou a vázací kolonky vrátit zpět do této zkumavky. Pro odstranění genomické DNA použít kit On-Column DNaseI Digestion Set (Sigma). Pro jeden izolovaný vzorek smíchat 10 μ l DNázy I a 70 μ l digesčního pufru, které jsou součástí výše uvedeného kitu. Připravenou směs o objemu 80 μ l přenést pipetou na vázací kolonku. Ponechat inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
6. Do kolonky přidat 500 μ l promývacího roztoku 1. Zkumavky centrifugovat při 20 000xg při teplotě 20 °C po dobu 1 min. Filtrát odlít, 2ml zkumavky osušit sterilní buničinou a vázací kolonky vrátit zpět do této zkumavky.
7. Následně provést dvě opakování promývání vázací kolonky vždy pomocí 500 μ l promývacího roztoku 2. Podmínky centrifugace použít jako v předchozím metodickém kroku. Vázací kolonky následně zbavit zbytků promývacího roztoku pomocí centrifugace po dobu 30 s za shodných podmínek jako v předcházejícím kroku.
8. Výše uvedeným způsobem vysušené vázací kolonky přenést do nových 2ml centrifugačních zkumavek a na povrch jejich filtru přidat 50 μ l elučního pufru. Takto ošetřené kolonky ponechat inkubovat po dobu 5 min při teplotě 20 °C a následně centrifugovat při 20 000xg po dobu 1 min při teplotě 20 °C. Kvantifikovat RNA spektrofotometricky (Nanospektrofotometr, Implen). Izolovanou celkovou mRNA použít okamžitě pro přepis do cDNA.

C. Příprava cDNA

1. Pro syntézu prvního vlákna cDNA použít Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), který využívá oligo(dT)₁₈ primeru.
2. Připravit směs templátové RNA a primeru, tak aby směs obsahovala celkové RNA v maximálním množství 1 µg. Koncentrace oligo(dT)₁₈ primeru je 2,5 µM. Směs doplnit do celkového objemu 13 µl PCR H₂O (Roche).
3. Provést denaturaci směsi templátové RNA a primeru. Směs získanou ve výše uvedeném kroku zahřát v termocykleru na teplotu 60 °C a následně ochladit na ledu. Tímto krokem je eliminována přítomnost teoreticky možných sekundárních struktur molekul RNA.
4. Připravit vlastní reakční směs o celkovém objemu 20 µl. K denaturované a ochlazené směsi uvedené v kroku 3 přidat reakční pufr Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (Roche) tak, aby jeho finální koncentrace byla 1x. Následně přidat Protector RNase Inhibitor (Roche) tak, aby ve 20 µl bylo 20 U tohoto inhibitoru. Směs doplnit o deoxynukleotidy tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Do směsi přidat Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) tak, aby v reakční směsi o objemu 20 µl bylo 10 U tohoto enzymu. Reakční směs opatrně promíchat pipetou.
5. Provést inkubaci reakční směsi v termocykleru při teplotě 50 °C po dobu 60 minut. Získanou cDNA uchovávat při teplotě -80 °C. Pro vlastní kvantitativní PCR naředit připravenou cDNA tak, aby v 1 µl roztoku bylo takové množství cDNA, které odpovídá produktu reverzní transkripce vzniklého z 0,25 ng celkové RNA.

D. Ověření úspěšné degradace genomické DNA

1. Pro zjištění úspěšné degradace genomické DNA použít PCR test pomocí námi navržených primerových párů lokalizovaných do exonů před a po intronu 2 a před a po intronu 3 genu pro jablečný aktin 7. Následující primerové páry byly navrženy na základě NCBI sekvence NC_024251.1:

Actin7-intron2-CZU-F: 5'-TCAATGTGCCTGCCATGTAT-3'

Actin7-intron2-CZU-R: 5'-ATGAGGGAGGGCATAACCTT-3'

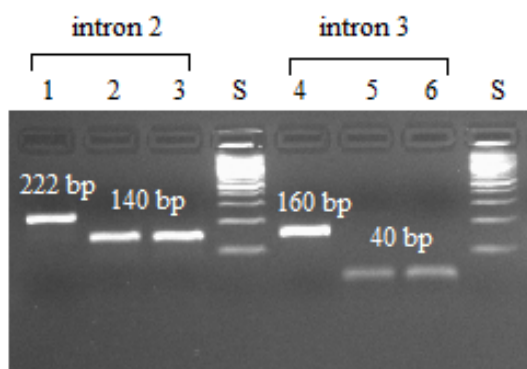
Actin7-intron3-CZU-F: 5'-TGCATCCCTCAGTACCTTCC-3'

Actin7-intron3-CZU-R: 5'-TCACCCTTGAAATCCACAT-3'

2. Provést amplifikaci za shodných podmínek jako při amplifikaci alergenů, které budou popsány v další části metodického postupu. Testovat všechny získané cDNA. Jako pozitivní kontrolu použít genomickou DNA testované odrůdy naředěnou na koncentraci 5ng . 1 µl⁻¹.
3. Po amplifikaci vyhodnotit výsledky pomocí T_m analýzy a následně elektroforetickou separací v 4% agarózovém pufru v 1X TBE.

4. Očekávaná velikost ampliconů intronu 2 z genomické DNA je 222 bp a z nekontaminované cDNA je 140 bp. Očekávaná velikost ampliconů intronu 3 z genomické DNA je 160 bp a z nekontaminované cDNA je 40 bp.

Obrázek 1: Elektroforeogram markerů použitých pro vyloučení kontaminace cDNA genomickou DNA u odrůdy Golden Delicious



1, 4 - genomická DNA

2, 3, 5, 6 - cDNA

S - hmotnostní standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

E. Kvantitativní PCR – příprava reakční směsi

1. Pro amplifikaci použít primerové páry publikované Pagliarani et al. (2013):

Označení primeru podle Pagliarani et al. (2013)	Sekvence primeru 5'-3'
qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
qMd1.01R	GTAATGACTGATGCTCTTGATGG
qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
qMd1.02R	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA
qMd1.03AF	ATCTGAGTTCACCTCCGTCATT
qMd1.03AR	ACTGCTTGTGGTGAATCTTT
qMd1.03CF	CTCCGAAACAATTGAGAAAATCTG
qMd1.03CR	GCTGGTGCTCTTGATGATGC
qMd1.03D/EF	ATACGAATCCGAGTTCACCTCT
qMd1.03DR	ATCTTCTTAATGGTTCCAACCTCT
qMd1.03D/EF	ATACGAATCCGAGTTCACCTCT
qMd1.03ER	TTCACCGAAGTTGATCTTCTTAATA
qMd1.03FF	CACAGAATTGACGGGGTG

qMd1.03FR	CCGGAAGCGACCAACTTA
qMd1.03GF	ATTATCAAGAGCACCAGTCACTACT
qMd1.03GR	TCCAAGAGGTAGTTCTCAATCAA
qMd1.03KF	CATCAGCCACTACCACACAAA
qMd1.03KR	TGTATGCATCCTGGTGCTCT
qMd1.06AF	CTATAGCTATAGCTTGATTGAAGGG
qMd1.06AR	TTCCAACCTTAACATGTTCTTCT
qMd1.06BF	AAACCGAATACGCATCCATT
qMd1.06BR	ACAGTTTTGACTGCTTGTGGAG
qMd1.06CF	GCTCCACAAGCAGTCAAAACT
qMd1.06CR	TCAACCTTGTGCTTACATAACTA
qMd1.07F	CAACTTTGTGTACCAGTACAGTGTC
qMd1.07R	TAGTGGCTGATGCTCTTGATAAC
qMd1.08F	TCTTCGGTGAAGGTAGCACAA
qMd1.08R	ACCCTTAGTGTGGTAGTGGCAT
qMd1.11AF	GGAGGATGCATCTGTCATTTG
qMd1.11AR	CCATGAGATAGGCTTCCAAAACT
qMd1.11BF	CAGCACATACAAAGCCAAAGAC
qMd1.11BR	TTTATGCGCGAGGGTGTG
qMd1.13AF	GTGTTGGAACCATCAAGAAGATTAG
qMd1.13AR	ACATCTCCTTCAATCAAAGTGAAT
qMd1.13BF	CGAAGATAACTTTGTCTACAACCAT
qMd1.13BR	GCTCTCCTTGATCTCAACATCTT
qMd1.13DF	TGTTGGAACCATCAAGAAGATAAGT
qMd1.13DR	GACATCTCCTTCAATCAAAGTGTAG
actin F	CTATGTTCCCTGGTATTGCAGACC
actin R	GCCACAACCTTGTTTTTCATGC

2. Pro analýzu použít termocykler LightCycler Nano (Roche) a kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Objem amplifikační reakce je 10 μ l. Připravit premix na adekvátní počet reakcí tak, aby jedna reakce obsahovala 5 μ l 2x mastermixu, 0,5 μ l F primeru (koncentrace 10 μ M) a 0,5 μ l R primeru (koncentrace 10 μ M). Připravit stripy pro amplifikaci housekeepingového genu (aktin) a pro amplifikaci hodnoceného genu Mal d 1.

3. Do jednotlivých jamek stripu rozpipetovat 6 μ l premixu a následně přidat 4 μ l analyzované cDNA naředěné na koncentraci uvedené v bodě D5 tohoto návodu. Jako kalibrátor použít cDNA odrůdy Golden Delicious. Jako negativní kontrolu použít místo cDNA shodný objem PCR H₂O. Po uzavření víčky centrifugovat po dobu 30 sekund a přenést do termocyklu LightCycler Nano (Roche).

4. Schéma jednoho experimentu:

	Jamka 1	Jamka 2	Jamka 3	Jamka 4	Jamka 5	Jamka 6	Jamka 7	Jamka 8
Strip A	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 2	Aktin 7 Odrůda 2
Strip B	Aktin 7 Odrůda 2	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola
Strip C	Mal d Kalibrátor	Mal d Kalibrátor	Mal d Kalibrátor	Mal d Odrůda 1	Mal d Odrůda 1	Mal d Odrůda 1	Mal d Odrůda 2	Mal d Odrůda 2
Strip D	Mal d Odrůda 2	Mal d Odrůda 3	Mal d Odrůda 3	Mal d Odrůda 3	Mal d Negativní kontrola	Mal d Negativní kontrola	Mal d Negativní kontrola	Mal d Negativní kontrola

F. Teplotní a časový profil amplifikace

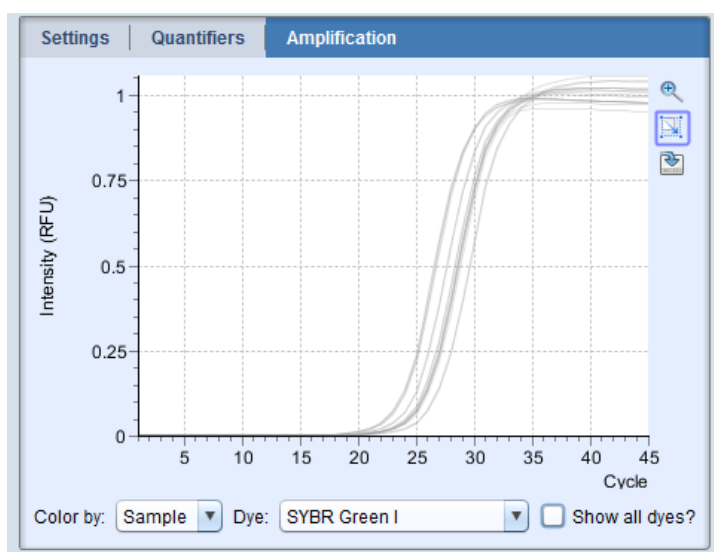
1. Pomocí ovládacího programu termocyklieru LightCycler Nano (Roche) nastavit následující parametry amplifikace:

- aktivace polymerázy: teplota 95 °C (rychlost změny teploty 4 °C/s), 10 minut.
- tříkroková amplifikace se 45 cykly: 95 °C (rychlost změny teploty 5 °C/s) 20 s; 61 °C pro všechny primerové páry (rychlost změny teploty 4 °C/s), 20 s; 72 °C (rychlost změny teploty 4 °C/s), 20 s.

G. Relativní kvantifikace

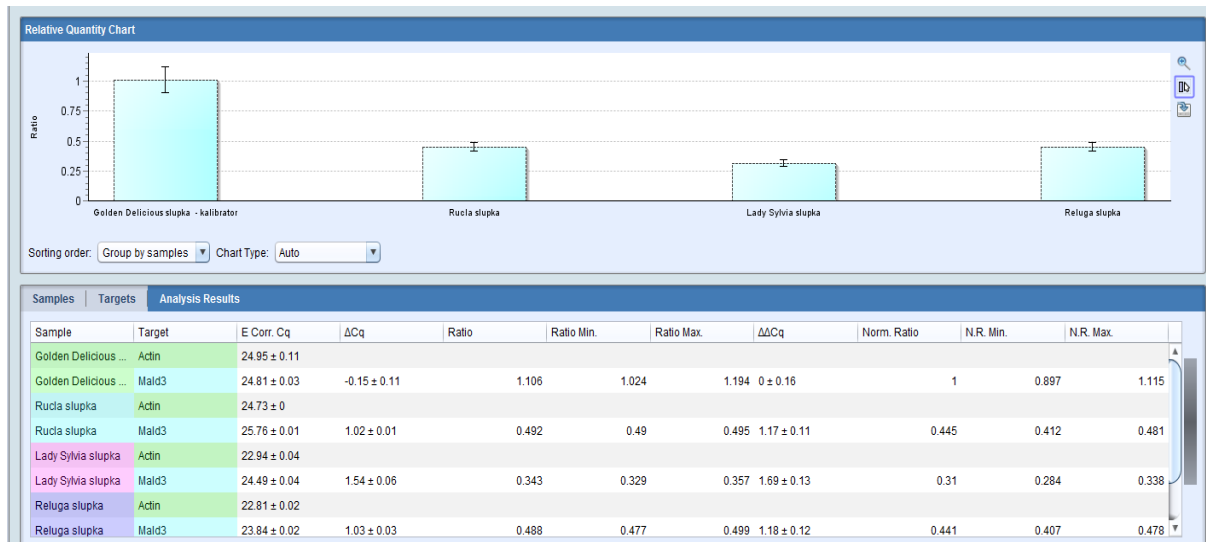
1. Pro analýzu použít ovládací program termocyklieru LightCycler Nano (Roche). Pomocí volby Absolutní kvantifikace zvolit minimální relativní amplifikaci 0,1 a minimální kvalitu amplifikace 5. Do analýzy nezahrnovat první 3 cykly amplifikace. Pomocí shodné nabídky programu ověřit reprodukovatelnost jednotlivých opakování.

Obrázek 2: Optimální průběh amplifikačních křivek



2. Pro vlastní relativní kvantifikaci zvolit jako referenční gen aktin 7 a jako kalibrátor odrůdu Golden Delicious. Pro porovnání meziodrůdových rozdílů lze použít metodu $\Delta\Delta Cq$, kde parametr Ratio vyjadřuje podíl mezi expresí studovaného genu a expresí housekeepingového genu (aktin) a parametr Norm. Ratio vyjadřuje normalizovanou expresi daného genu k expresi téhož genu u odrůdy kalibrátor (Golden Delicious).

Obrázek 3: Výstup relativní kvantifikace exprese



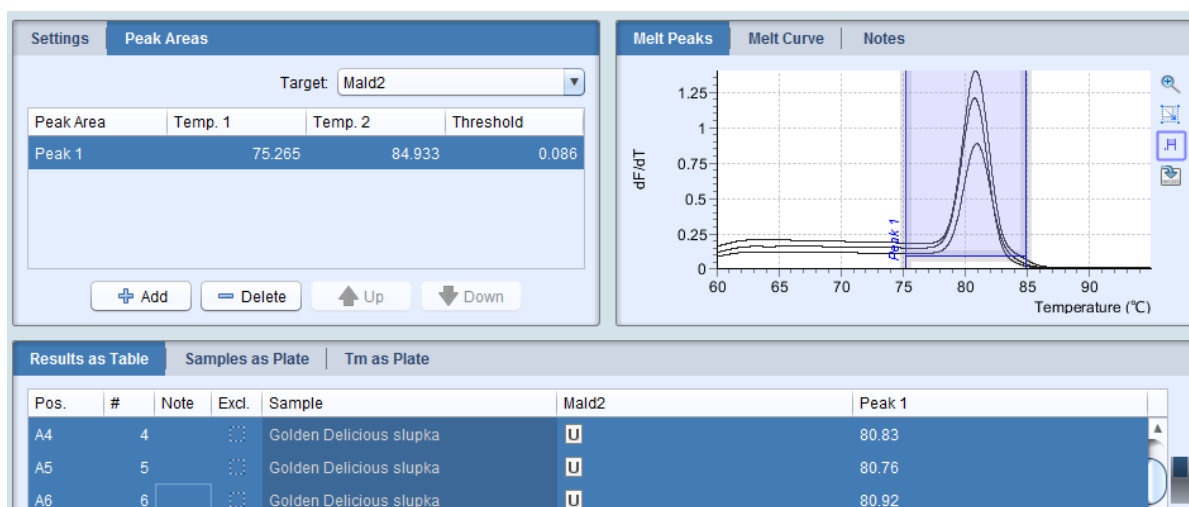
H. Postamplifikační analýza – stanovení teploty tání (T_m) produktů PCR

1. Po vlastní amplifikaci a relativní kvantifikaci exprese provést u všech jamek stripů (krok E3) vyhodnocení T_m s cílem posoudit specifičnost amplifikace.

2. Prostřednictvím ovládacího programu termocyklieru LightCycler Nano (Roche) zvolit denaturační program, který je tvořen následujícími kroky:

- zahřátí na teplotu 65 °C (rychlost změny teploty 4 °C/s) po dobu 60 s
- postupná denaturace na finální teplotu 95 °C (rychlost změny teploty 0,1 °C/s)
- koncové zahřátí denaturovaného amplikonu po dobu 20 s.

Obrázek 4: Výstup Tm analýzy odpovídající specifické amplifikaci alergenu Mal d 1.02

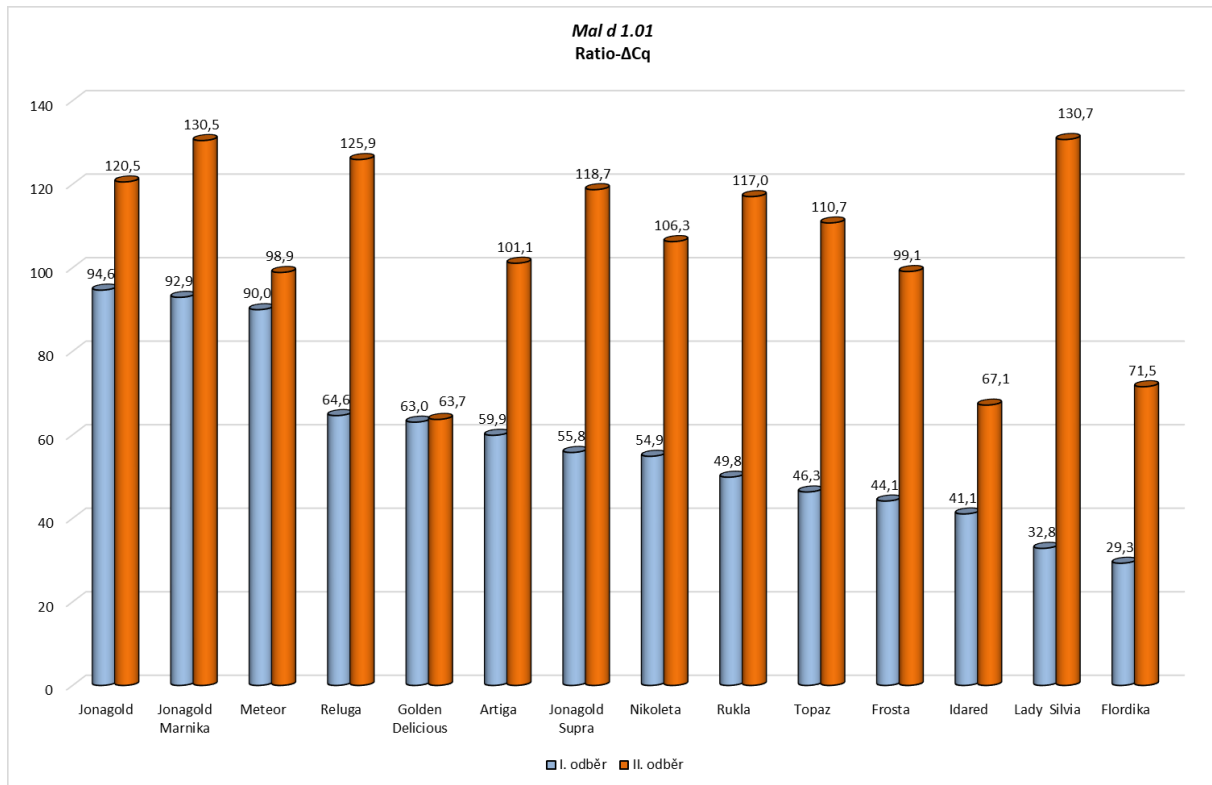


I. Výsledky:

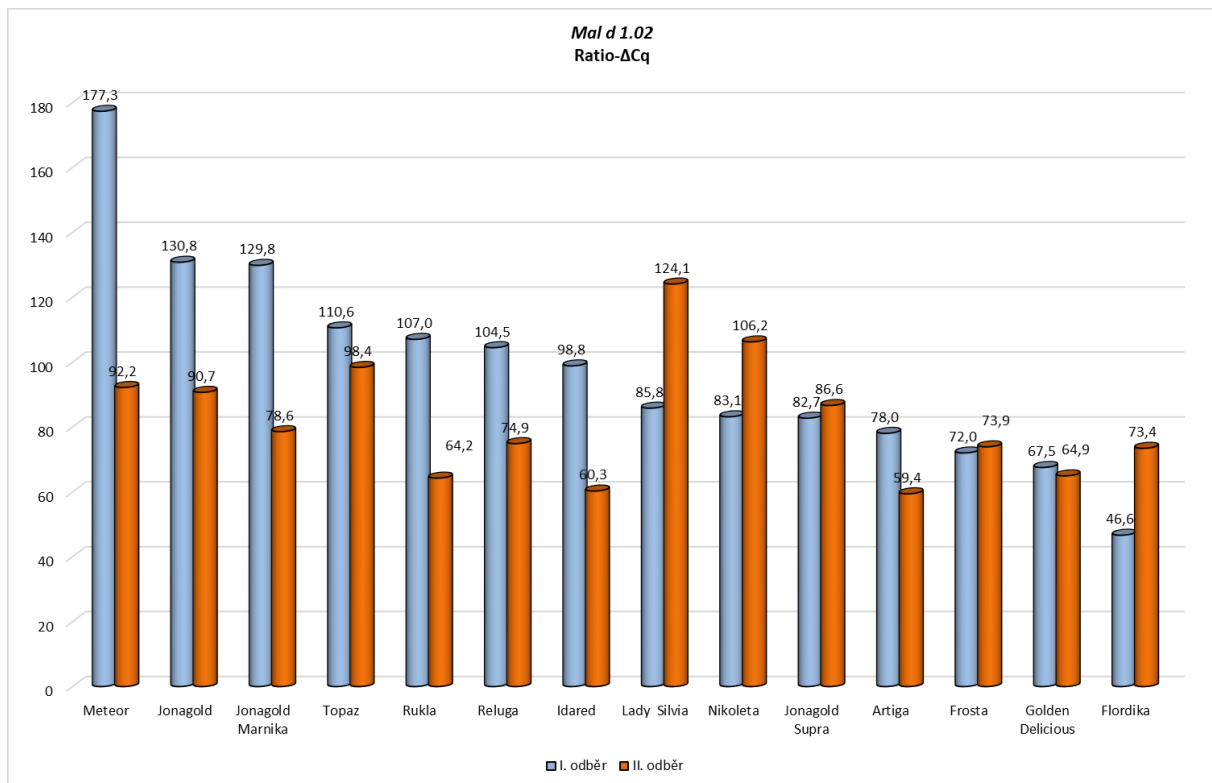
Byla vybrána kolekce 14 odrůd, respektive plodů pocházejících z experimentální výsadby VŠÚO Holovousy s.r.o. U těchto genotypů bylo provedeno hodnocení exprese isoform Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A, Mal d 1.06B a Mal d 1.06D. Pro přípravu cDNA byla použita slupka plodů odebraná bezprostředně po sklizni (říjen). Druhou variantou byla slupka odebraná po 12týdenním skladování plodů v chladicím boxu bez řízené atmosféry. V následujících grafech je znázorněn přehled vybraných výsledků. Hodnocení bylo provedeno vždy na základě parametru Ratio ΔCq , který vyjadřuje procentické porovnání exprese studované isoformy ve srovnání s expresí housekeeping genu pro aktin.

Experimentálně bylo ověřeno, že úroveň exprese jablečných alergenů je pozitivně stimulována skladováním plodů. V kolekci hodnocených odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o. byly odrůdy s různým obdobím konzumní zralosti. Bylo prokázáno, že odrůdy, u kterých došlo během skladování k změknutí dužniny související s procesem zrání, výrazně zvýšily expresi studovaných genů. Pod pojmem změknutí dužniny není míněna kontaminace plodů a jejich znehodnocení skládkovými chorobami. Z níže uvedených grafů je patrné, že ke zvýšení exprese způsobené skladováním došlo u isoformy Mal d 1.01 u všech hodnocených odrůd, zatímco u isoformy Mal d 1.02 k průkaznému zvýšení exprese došlo pouze u některých odrůd. Výše exprese minoritních isoform je jak před skladováním, tak i po skladování silně závislá na odrůdové příslušnosti. U všech hodnocených vzorků bez ohledu na jejich původ bylo potvrzeno, že hodnoty jejich ΔCq jsou výrazně nižší oproti Mal d 1.01 a Mal d 1.02. Z grafů 6 a 7 vyplývá, že výše uvedené dvě isoformy se nejvíce podílí na celkové expresi. Z minoritních forem se nejvíce exprimuje Mal d 1.06A. Podíl exprese u této isoformy dosahuje u některých odrůd až 13 %. Z toho plyne doporučení charakterizovat odrůdy zejména úrovní exprese isoform Mal d 1.01, Mal d 1.02 a Mal d 1.06A.

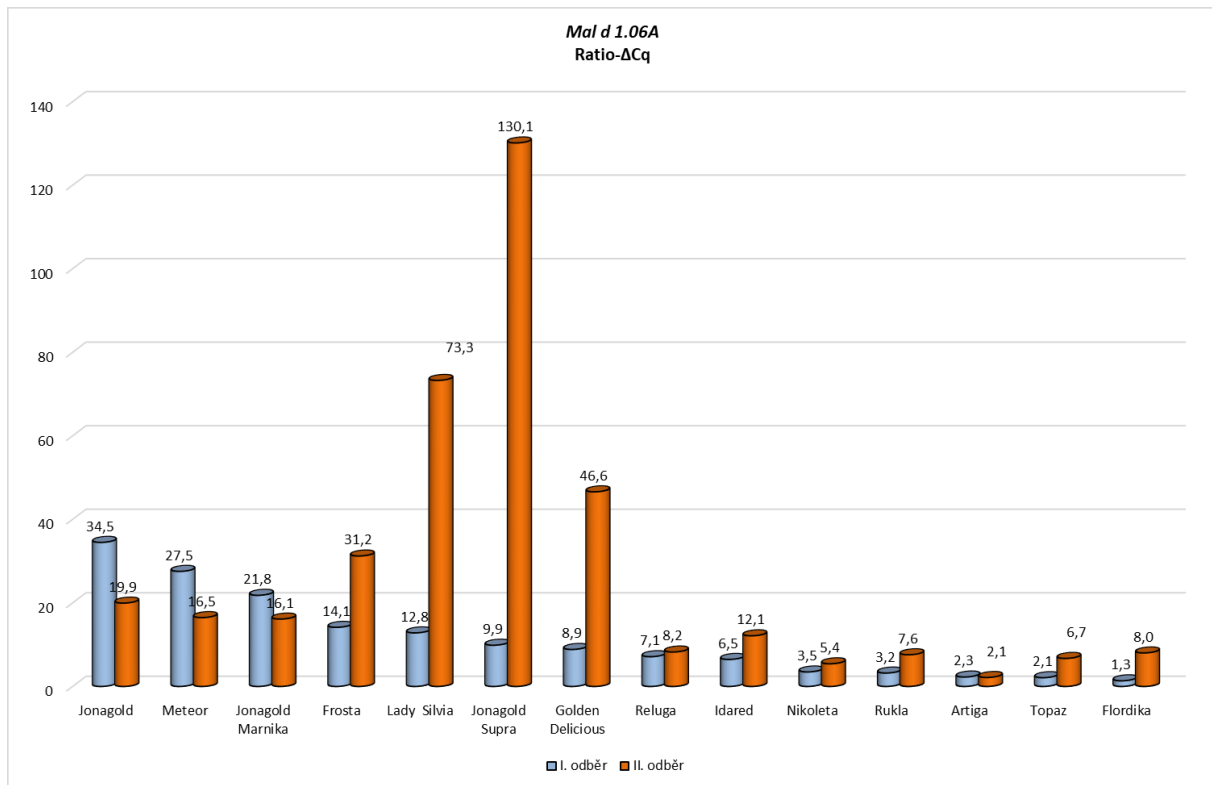
Graf 1: Isoalergen Mal d 1.01 - hodnoty parametru Ratio ΔCq u exprese ve slupce plodů u kolekce odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o.



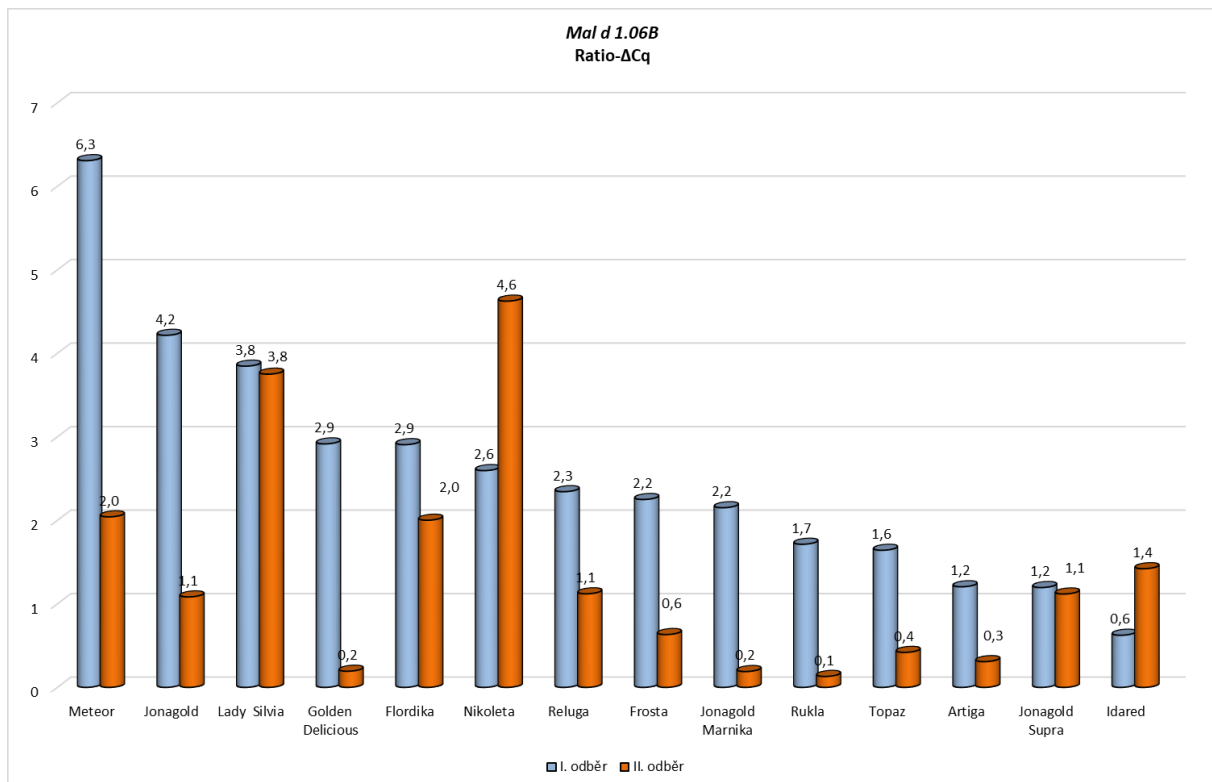
Graf 2: Isoalergen Mal d 1.02 - hodnoty parametru Ratio ΔCq u exprese ve slupce plodů u kolekce odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o.



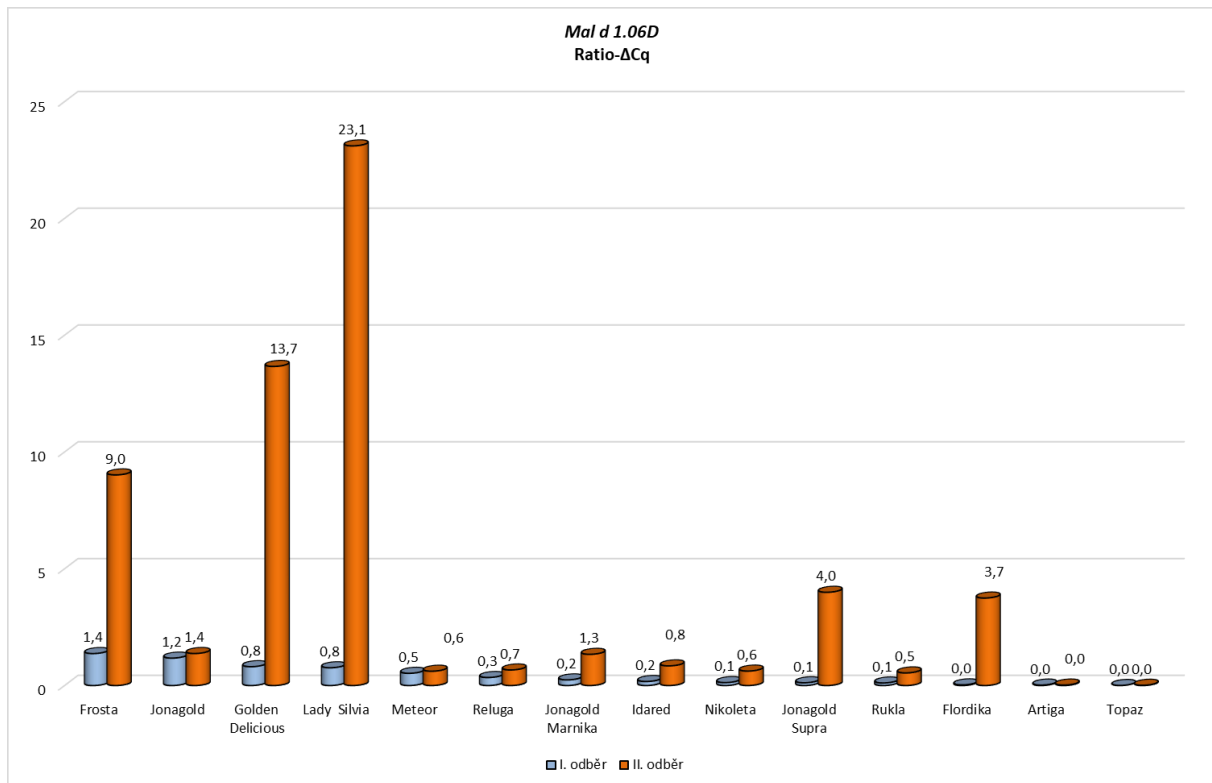
Graf 3: Isoalergen *Mal d 1.06A* - hodnoty parametru Ratio ΔCq u exprese ve slupce plodů u kolekce odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o.



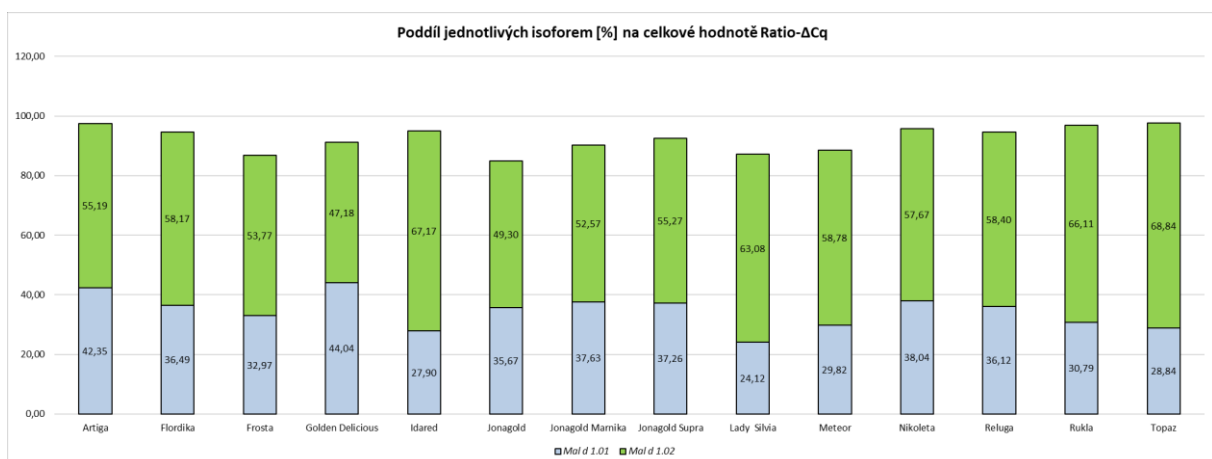
Graf 4: Isoalergen *Mal d 1.06B* - hodnoty parametru Ratio ΔCq u exprese ve slupce plodů u kolekce odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o.



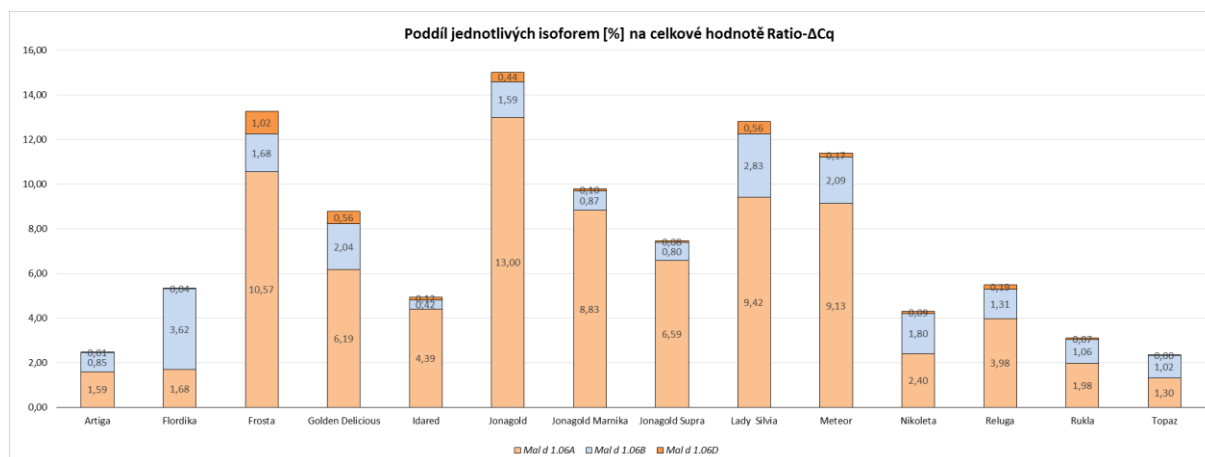
Graf 5: Isoalergen *Mal d 1.06D* - hodnoty parametru Ratio ΔCq u exprese ve slupce plodů u kolekce odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o.



Graf 6: Podíl jednotlivých isoformů [%] na celkové hodnotě Ratio ΔCq při studiu exprese ve slupce plodů z VŠÚO Holovousy s.r.o. – 1. část



Graf 7: Podíl jednotlivých isoformů [%] na celkové hodnotě Ratio ΔCq při studiu exprese ve slupce plodů z VŠÚO Holovousy s.r.o. – 2. část



3.2. Stanovení relativní genové exprese jablečných alergenů Mal d 1 s využitím Rotor - Gene Q (Qiagen)

A. Příprava materiálu a směšného vzorku

Pro extrakci RNA je nezbytné používat pouze laboratorní plast kategorie RNase free, který je sterilizován pomocí horkovzdušného sterilizátoru. Rovněž třecí misky, tloučky, skalpely a pinzety musí být sterilizovány. Vlastní extrakce RNA provádět v prostředí sterilní laboratoře, jejíž povrchové plochy jsou ošetřeny například prostředkem ROTI® Nucleic Acid-free (Carl Roth), případně prostředkem Desprej (Bochemie). Při analýzách je nutné pracovat v rukavicích ošetřených shodným přípravkem.

Analyzované plody je nezbytné rovněž ošetřit výše zmíněným přípravkem a ponechat je oschnout. Směšný vzorek je vhodné připravovat minimálně ze tří plodů. Ze všech tří plodů do sterilní 2ml zkumavky rovnoměrně odebrat vzorek slupky o celkové hmotnosti cca 400 mg. Zkumavku ihned zamrazit v kapalném dusíku. Takto zamražené vzorky je možné skladovat při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby dalšího zpracování. Pro izolaci celkové RNA je použit metodický postup popsáný v následujícím bodě.

B. Izolace celkové RNA

Byl optimalizován následující metodický postup využívající Ribospin™ Plant kit (GeneAll) doplněný o DNA-free kit (Invitrogen):

1. Veškerý obsah zkumavky se zamraženým vzorkem přenést do sterilní třecí misky, která je předem vychlazená kapalným dusíkem. Homogenizovat do práškovité struktury za neustálého chlazení kapalným dusíkem. Z homogenizovaného materiálu odvážit 50 mg a navážku přenést asepticky do sterilní 2ml zkumavky. K homogenátu ihned přidat 450 μl lyzačního RPL pufru, důkladně promíchat pomocí vortexu a inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě.

2. Lyzát přenést na EzPure™ kolonku a centrifugovat 2 minuty při otáčkách 14 000 RPM. Proteklý lyzát opatrně bez narušení pelety přenést do nové 1,5ml zkumavky a zpravidla k 350 µl lyzátu přidat 1 objem 70% EtOH. Vše je nezbytné okamžitě promíchat. Poté směs přenést na kolonku typu W (max. 700 µl) a provést centrifugaci 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Proteklou tekutinu vylít, okraj sběrné zkumavky otřít buničitou vatou a kolonku vrátit zpátky do sběrné zkumavky.

3. Na kolonku přidat 500 µl vazebného pufru RBW a opět centrifugovat 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Proteklou tekutinu vylít a na kolonku přidat 70 µl premixu reakční směsi DNase I a pufru DRB. Nechat inkubovat minimálně 10 minut při pokojové teplotě. Poté provést inaktivaci DNase I přidáním 500 µl vazebného pufru RBW a po 2 minutách působení provést centrifugaci 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Proteklou tekutinu vylít, okraj sběrné zkumavky otřít buničitou vatou a kolonku vrátit zpátky do sběrné zkumavky.

4. Kolonky promýt přidáním 500 µl vymývacího pufru RNW a centrifugovat 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Proteklou tekutinu vylít, okraj sběrné zkumavky otřít buničitou vatou a kolonku vrátit zpátky do sběrné zkumavky. Tento krok provést dvakrát. Na závěr ještě provést centrifugaci prázdné kolonky, aby se vymývací pufr zcela odstranil.

5. W kolonku opatrně vsunout do čisté 1,5ml zkumavky, do středu kolonky nanést 50 µl RNase free water a nechat působit 1 minutu při pokojové teplotě. Poté provést centrifugaci 2 minuty při otáčkách 14 000 RPM.

6. Z důvodu kompletního odstranění kontaminující genomové DNA je nutno provést ještě jednu inkubaci s DNase I. Pro tento účel byl použit DNA-free kit (Invitrogen). K výslednému eluátu 50 µl RNA přidat 0,1 objem 10X DNase I Buffer a 1 µl DNase I. Vše jemně smíchat a inkubovat 25 minut při teplotě 37°C. Poté provést inaktivaci DNase I ve směsi přidáním 0,1 objemu DNase Inactivation Reagent, promícháním a inkubací po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Tuto směs centrifugovat 2 minuty při otáčkách 14 000 RPM a výsledný supernatant opatrně přepipetovat do nové sterilní zkumavky.

7. Koncentraci purifikované RNA změřit spektrofotometricky (NanoDrop Lite, Thermo Scientific). Izolovanou celkovou RNA použít okamžitě pro přepis do cDNA.

C. Příprava cDNA

Příprava cDNA probíhala podle následujícího postupu (postup je optimalizován pro použití celkové RNA do koncentrace 1 µg/reakci):

1. Do jednotlivých zkumavek pipetovat:

- a. 4 µl náhodných primerů Primer Random p(dN6) (Roche) o koncentraci 50 ng/µl
- b. 1 µl 10 mM dNTPs (Genaxxon)

- c. 5 µl celkové RNA (je možno pipetovat 1 – 5 µl celkové RNA tak, že celkové množství RNA v reakci by nemělo překročit 1 µg)
 - d. 3 µl RNase free vody (do celkového objemu 13 µl)
- Pro kroky a) + b) + d) lze předmíchat premix.
Směs promíchat.

2. Směs zahřát v termocykleru na 65 °C / 5 minut. Po uplynutí inkubační doby zkumavky prudce zchladit ve vymražené kovové destičce. Poté krátce centrifugovat.

3. Do jednotlivých zkumavek pipetovat:

- a. 4 µl 5x First-Strand Buffer
 - b. 2 µl 0,1 M DTT
 - c. 1 µl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy (vše Invitrogen)
- Směs dobře promíchat.
Pro kroky a) + b) + c) lze připravit jako premix.

4. Vzorky dát do termocykleru s nastavenými následujícími teplotními fázemi:

- a. Inkubace při 37 °C po dobu 2 minuty.
- b. Inkubace při 25 °C po dobu 10 minut.
- c. Inkubace při 37 °C po dobu 50 minut.
- d. Závěrečná denaturace při 70 °C po dobu 10 minut.
- e. Finální zchlazení na 4 °C.

5. Takto připravenou cDNA lze přímo použít jako templát (zpravidla 2 µl) pro další PCR analýzy. cDNA lze uchovávat v mrazničce při teplotě -20 °C.

D. Ověření úspěšné degradace kontaminující genomové DNA

1. Pro zjištění úspěšné degradace kontaminující genomové DNA byly vytvořeny 2 sondy lokalizované v genu pro jablečný aktin:

MaActin(DNA)_Pr01: 5'-6-Fam-ATTTTCCTGTGCAAAGTCTCTGTAA-BHQ-1-3' (detekuje pouze genomovou DNA)

MaActin(RNA)_Pr01: 5'-Hex-CCATCTTAGCTTCCCTCAGTACATTCCA-BHQ-1-3' (detekuje cDNA i genomovou DNA)

2. Pro analýzu používat zařízení real-time PCR cykler Rotor-Gene Q (Qiagen).

Pro amplifikační reakci byly použity následující komponenty:

- Combi Taq DNA polymeráza, 1U/µl (Top-Bio)
- dNTP Mix, 10 mM každý (Genaxxon)

3. Podle počtu vzorků ve stojánku připravit potřebný počet 0,1ml stripů včetně zkumavek pro pozitivní a negativní kontrolu. Do 1,5ml zkumavky připravit adekvátní množství PCR premixu:

Složky premixu:	Na 1 vzorek
10x TopBio Blue pufr complete	2 μ l
dNTPs (10 mM každý)	0,4 μ l
Specifický PmxII	1 μ l
CombiTaq (1U/ μ l)	1 μ l
PCR voda	13,6 μ l
Celkem	18 μl

MaActin PmxII (2x sonda):	Na 1 vzorek	Finální konc.
MaActin-F (100 μ M)	0,1 μ l	0,5 μ M
MaActin-R (100 μ M)	0,1 μ l	0,5 μ M
MaActin (sonda cDNA) (100 μ M)	0,04 μ l	0,2 μ M
MaActin (sonda gDNA) (100 μ M)	0,04 μ l	0,2 μ M
PCR voda	0,72 μ l	
Celkem	1 μl	

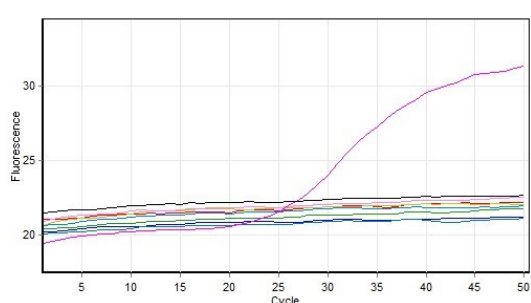
Do stripů pipetovat 18 μ l PCR premixu, k premixu postupně pipetovat 2 μ l vzorku RNA (kromě negativní kontroly).

4. Teplotní a časový profil amplifikační reakce:

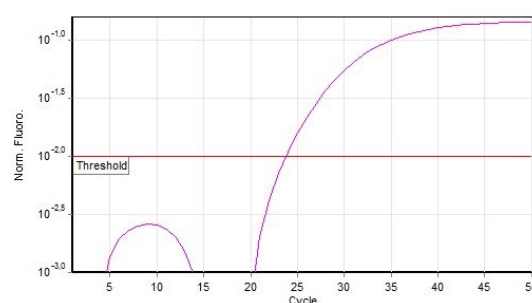
- aktivace polymerázy: teplota 94 °C, 5 minut.
- tříkroková amplifikace s 50 cykly: 94 °C 20 s; 58 °C pro všechny primerové páry 20 s; 72 °C 20 s.
- na závěr držet teplotu 50 °C po dobu 5 s.

5. Výsledek kontroly čistoty při úspěšném odstranění kontaminující DNA:

Raw data:



Quantification data:



Výslední tabulka odečítání hodnot Ct z výše uvedených grafů:

	Barva	Název	Ct
1		Vzorek 1	NEG
2		Vzorek 2	NEG
3		Vzorek 3	NEG
4		Vzorek 4	NEG
5		Vzorek 5	NEG
6		Vzorek 6	NEG
7		Vzorek 7	NEG
8		Pozitivní kontrola (DNA)	23,78
9		Negativní kontrola	NEG

E. Kvantitativní PCR – příprava reakční směsi

1. Pro amplifikaci použít primerové páry dvou nejvíce exprimovaných isoformů alergenu Mal d 1 publikované Pagliarini et al. (2013):

qMd1.01/02F: 5'-GATTGAAGGAGATGCTTTGACA-3'

qMd1.01R: 5'-GTAATGACTGATGCTCTTGATGG-3'

qMd1.01/02F: 5'-GATTGAAGGAGATGCTTTGACA-3'

Pro housekeeping gen aktin použít následující sekvence primerů:

MaActin F: 5'-TGACAGAATGAGCAAGGAAATTACT-3'

MaActin R: 5'-TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC-3'

2. Pro analýzu používat zařízení real-time PCR cyklier Rotor-Gene Q (Qiagen).

Pro amplifikační reakci použít následující komponenty:

- Combi Taq DNA polymeráza, 1U/μl (Top-Bio)
- dNTP Mix, 10 mM každý (Genaxxon)
- 20x EvaGreen (Biotium)

3. Podle počtu vzorků ve stojánku připravit potřebný počet 0,1ml stripů včetně zkumavek pro pozitivní a negativní kontrolu. Do 1,5ml zkumavky připravit adekvátní množství PCR premixu:

Složky premixu	Na 1 vzorek
10x TopBio Blue pufr complete	2 μl
dNTPs (10 mM každý)	0,4 μl
primer F (5μM)	1 μl
primer R (5μM)	1 μl
EvaGreen 20x	1 μl
CombiTaq (1U/μl)	1 μl
PCR voda	11,6 μl
Celkem	18 μl

Do stripů pipetovat 18 µl PCR premixu, k premixu postupně pipetovat 2 µl vzorku cDNA (kromě negativní kontroly). Jako pozitivní kontrolu a zároveň kalibrátor real-time PCR reakce použít celkovou jablečnou DNA (používat stále tu samou).

4. Schéma jednoho experimentu

Pozice	Vzorky
1	Odrůda 1 Aktin
2	Odrůda 1 Aktin
3	Odrůda 1 Aktin
4	Odrůda 2 Aktin
5	Odrůda 2 Aktin
6	Odrůda 2 Aktin
7	Odrůda 3 Aktin
8	Odrůda 3 Aktin
9	Odrůda 3 Aktin
10	Odrůda 4 Aktin
11	Odrůda 4 Aktin
12	Odrůda 4 Aktin
13	Odrůda 5 Aktin
14	Odrůda 5 Aktin
15	Odrůda 5 Aktin
16	Odrůda 6 Aktin
17	Odrůda 6 Aktin
18	Odrůda 6 Aktin
19	Odrůda 7 Aktin
20	Odrůda 7 Aktin
21	Odrůda 7 Aktin
22	Pozitivní kontrola
23	Negativní kontrola
24	
25	Odrůda 1 Mal d 1.01
26	Odrůda 1 Mal d 1.01
27	Odrůda 1 Mal d 1.01
28	Odrůda 2 Mal d 1.01
29	Odrůda 2 Mal d 1.01
30	Odrůda 2 Mal d 1.01
31	Odrůda 3 Mal d 1.01
32	Odrůda 3 Mal d 1.01
33	Odrůda 3 Mal d 1.01
34	Odrůda 4 Mal d 1.01
35	Odrůda 4 Mal d 1.01
36	Odrůda 4 Mal d 1.01
37	Odrůda 5 Mal d 1.01
38	Odrůda 5 Mal d 1.01
39	Odrůda 5 Mal d 1.01

40	Odrůda 6 Mal d 1.01
41	Odrůda 6 Mal d 1.01
42	Odrůda 6 Mal d 1.01
43	Odrůda 7 Mal d 1.01
44	Odrůda 7 Mal d 1.01
45	Odrůda 7 Mal d 1.01
46	Pozitivní kontrola
47	Negativní kontrola
48	
49	Odrůda 1 Mal d 1.02
50	Odrůda 1 Mal d 1.02
51	Odrůda 1 Mal d 1.02
52	Odrůda 2 Mal d 1.02
53	Odrůda 2 Mal d 1.02
54	Odrůda 2 Mal d 1.02
55	Odrůda 3 Mal d 1.02
56	Odrůda 3 Mal d 1.02
57	Odrůda 3 Mal d 1.02
58	Odrůda 4 Mal d 1.02
59	Odrůda 4 Mal d 1.02
60	Odrůda 4 Mal d 1.02
61	Odrůda 5 Mal d 1.02
62	Odrůda 5 Mal d 1.02
63	Odrůda 5 Mal d 1.02
64	Odrůda 6 Mal d 1.02
65	Odrůda 6 Mal d 1.02
66	Odrůda 6 Mal d 1.02
67	Odrůda 7 Mal d 1.02
68	Odrůda 7 Mal d 1.02
69	Odrůda 7 Mal d 1.02
70	Pozitivní kontrola
71	Negativní kontrola
72	

F. Teplotní a časový profil amplifikace

1. Pomocí ovládacího programu termocyklieru Rotor-Gene Q (Qiagen) nastavit následující parametry amplifikace:

- aktivace polymerázy: teplota 94 °C, 5 minut.
- tříkroková amplifikace s 50 cykly: 94 °C 20 s; 55 °C pro všechny primerové páry 20 s; 72 °C 10 s.
- HRM analýza: zvyšování teploty od 76 °C do 88 °C a to o 0,2 °C v každém kroku, první krok držet po dobu 90 s, každý další krok držet po dobu 2 s.
- Na závěr držet teplotu 50 °C po dobu 5 s.

G. Relativní kvantifikace

Analýzy mohou být prováděny přímo pomocí ovládacího programu termocyklieru Rotor-Gene Q (Qiagen) nebo v Excelu. Pro charakterizaci exprese alergenů *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* byla vybrána metoda relativní kvantifikace, tzv. metoda $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001). Tato metoda nevyžaduje vytvoření standardní křivky. Pro tuto metodu je potřeba znát hodnoty C_t referenčního genu (housekeeping gen - exprese tohoto genu by měla být za všech podmínek stejná) a hodnoty C_t studovaného genu. Je potřeba určit kalibrátor (např. kontrolní vzorek), který bude mít hodnotu 1, a ostatní hodnoty se budou k němu vztahovat. Výsledek $\Delta\Delta C_t$ metody je relativní a vyjadřuje, jak se liší exprese studovaného genu v testovaném vzorku ve srovnání s kalibrátorem.

Výpočet je prováděn podle níže uvedeného vzorce:

$$\Delta C_t = C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HG})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{vzorek}) - \Delta C_t(\text{kalibrátor})$$

$$\text{Výsledná hodnota} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

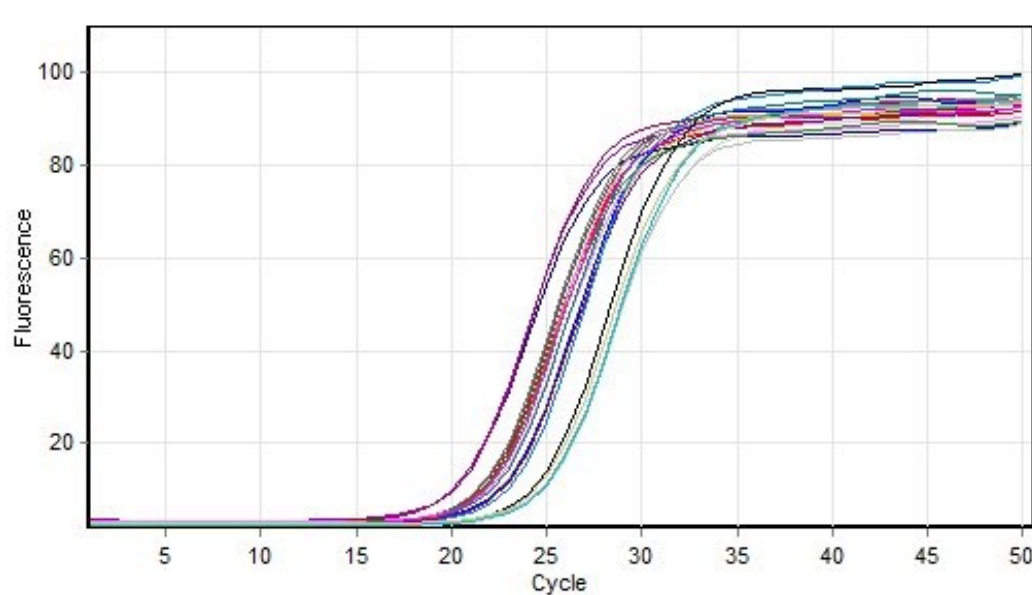
GOI – gene of interest (gen zájmu)

HG – housekeeping gene (provozní gen)

Pro porovnání mezidruhových rozdílů i v rámci jednotlivých isoform společně lze použít metodu $\Delta\Delta C_t$ bez normalizace ke kalibrátoru, kdy se relativní kvantifikace exprese zájmového genu vztahuje pouze k housekeeping genu (aktin).

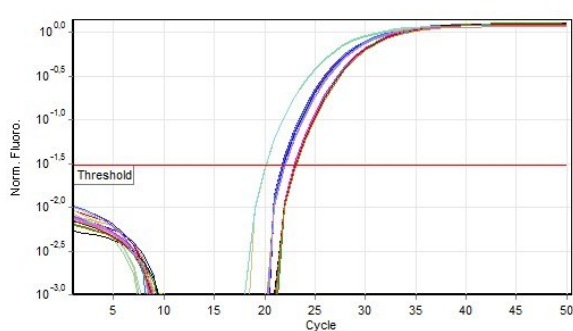
Provádíme pomocí následujícího výpočtu: Výsledná hodnota = $2^{(C_t(\text{HG}) - C_t(\text{GOI}))}$

Obrázek 5: Příklad průběhu amplifikačních křivek

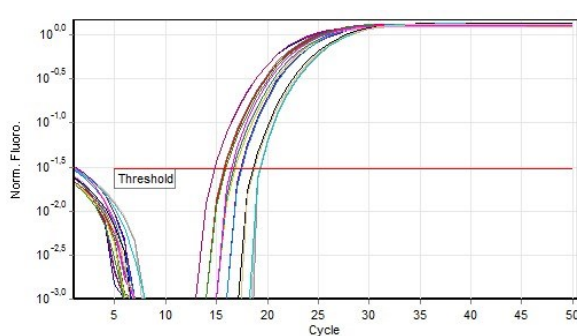


Obrázek 6: Příklad odpočtu C_t pro relativní kvantifikaci exprese

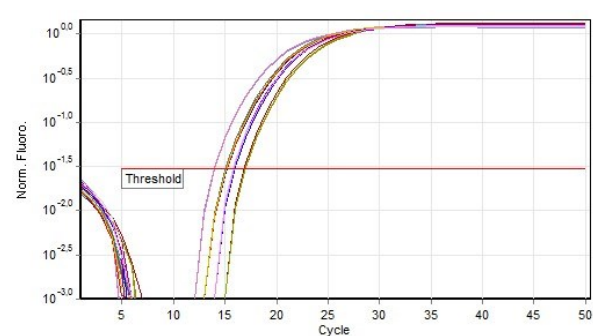
Aktin



Mal d 1.01



Mal d 1.02



Příklad výpočtu relativní genové exprese:

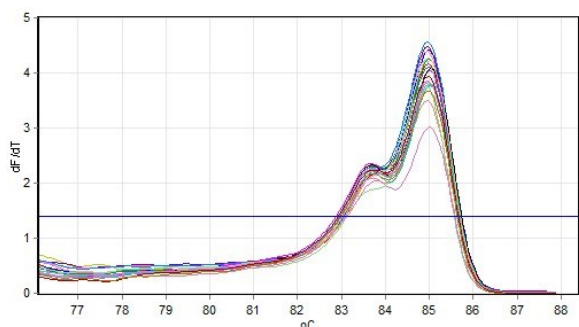
Vzorek	Ct (HG)	Ct (HG) _{prům.}	Sm. odchyl.	Ct (GOI)	Ct (GOI) _{prům.}	Sm. odchyl.	Ku aktinu $2^{(HG_{prům.} - GOI)}$	Ku aktinu _{prům.}	Sm. odchyl.
MAL 28	22,29	22,28	0,014	17,33	17,32	0,022	30,91	30,8	0,11
MAL 28	22,26			17,29			31,78		
MAL 28	22,29			17,34			30,7		
MAL 29	24,44	24,47	0,025	20,23	20,26	0,029	18,94	18,55	0,38
MAL 29	24,48			20,3			18,04		
MAL 29	24,5			20,25			18,68		
MAL 30	20,75	20,75	0,013	14,08	14,09	0,009	102,06	101,6	0,66
MAL 30	20,77			14,08			102,06		
MAL 30	20,74			14,1			100,66		

H. Melting analýza – stanovení teploty tání (T_m) produktů PCR

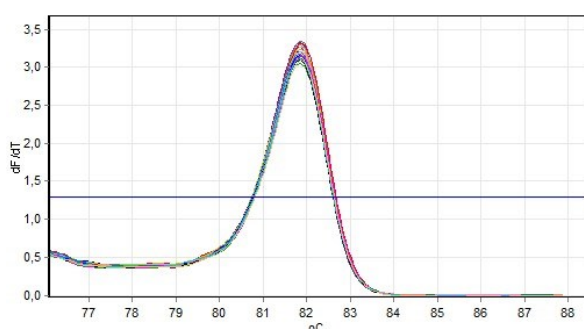
Pro posouzení specifčnosti amplifikace provádíme melting analýzu pomocí kanálu HRM.

Obrázek 7: Příklad hodnocení melt HRM analýzy

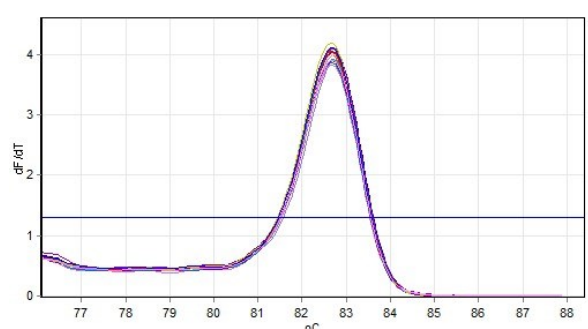
Aktin: 83,7 °C a 85 °C (vzhledem k tomu, že námi vybrané primery nasedají na dvě různé formy genu pro aktin, jsou na grafu vidět dvě různé teploty tání)



Mal d 1.01: 81,9 °C



Mal d 1.02: 82,7 °C



I. Výsledky:

Byla vybrána kolekce různých odrůd pocházejících z experimentální výsadby VŠÚO Holovousy s.r.o. U těchto genotypů bylo provedeno hodnocení genové exprese dvou nejvíce exprimovaných isoform genů *Mal d 1*, a to *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*. Pro přípravu cDNA byla použita slupka plodů odebraná bezprostředně po sklizni (říjen). Druhou variantou byla slupka odebraná po čtyřech měsících skladování plodů v chlazeném skladu bez řízené atmosféry a v řízené atmosféře ULO (ultra low oxygen).

V hodnocení celkové exprese genu *Mal d 1* čerstvých vzorků, dosahovaly v roce 2016 nejnižší hodnoty odrůdy 'Lady Silvia', 'Zuzana', 'Braeburn' a ze sloupcových odrůd 'Cumulus', nejvyšší hodnoty vykazovaly odrůdy 'Topaz', 'Gala' a 'Golden Delicious' (tabulka 1, graf 1). V roce 2017 dosáhly nejnižších hodnot odrůdy 'Opal', 'Jonagold', 'Lady Silvia' a rovněž odrůda 'Braeburn' a sloupcová odrůda 'Cumulus', nejvyšší hodnoty dosáhly odrůdy 'Gala', 'Rubín', 'Gold Bohemia' a sloupcová odrůda 'Herald' (tabulka 1, graf 8). Celkově lze říct, že exprese genu *Mal d 1* byla u většiny odrůd vyšší v roce 2016 než v roce 2017, na to má zřejmě větší vliv prostředí než genetické faktory.

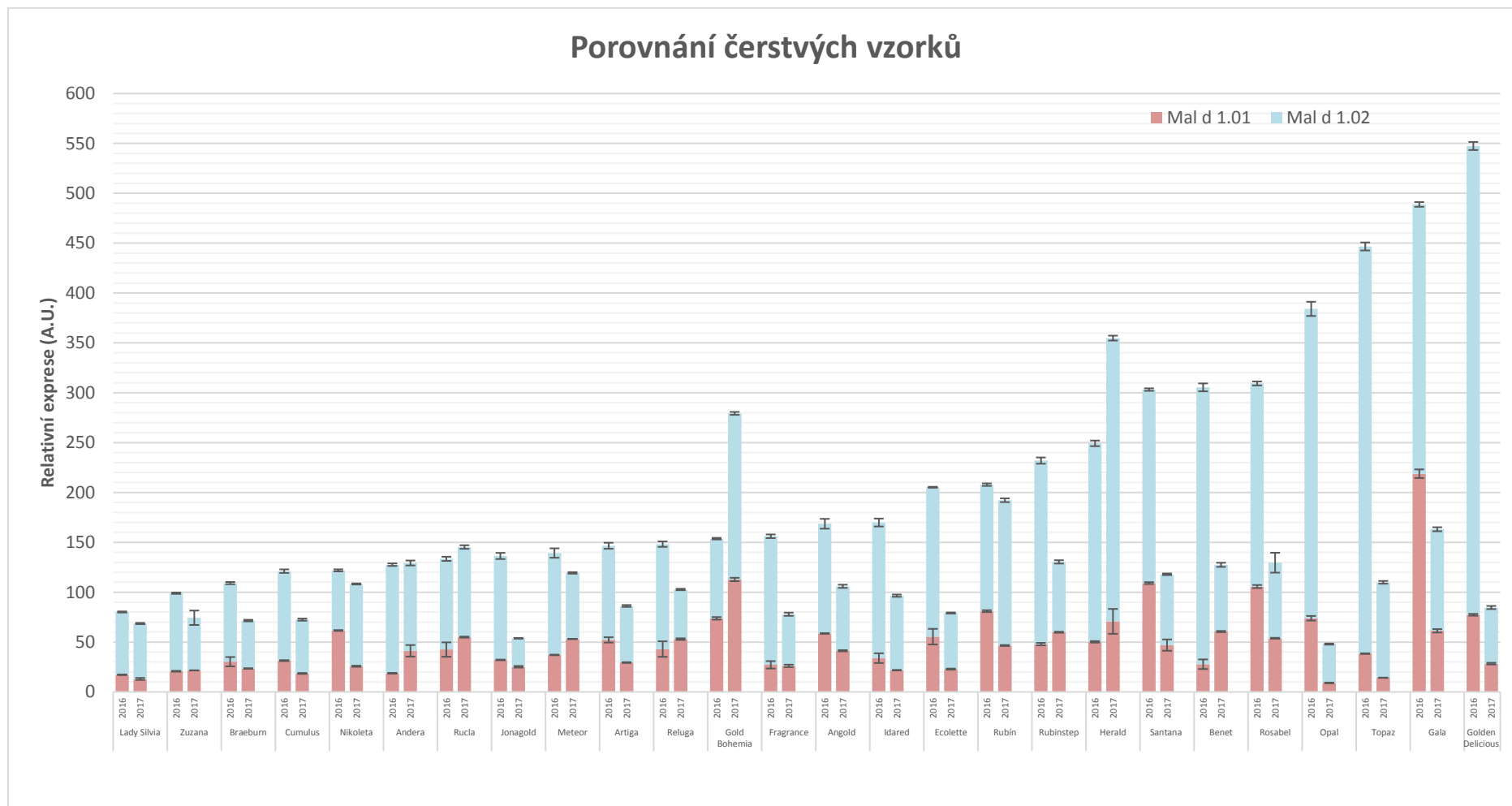
Vlivem skladování došlo téměř u všech odrůd k nárůstu celkové genové exprese alergenu *Mal d 1*, výjimkou je v roce 2016 odrůda 'Topaz' v obou typech skladování a odrůda 'Rubín' v podmínkách ULO. V průběhu skladování v chlazeném skladě nejvíce vzrostla celková exprese *Mal d 1* v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd 'Meteor' a 'Jonagold' a to v roce 2016 i 2017. V případě skladování v podmínkách ULO nejvíce vzrostla celková exprese *Mal d 1* v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd 'Jonagold' a 'Idared' v roce 2016 a u odrůd 'Jonagold' a 'Braeburn' v roce 2017.

Co se týče jednotlivých isoform alergenu *Mal d 1*, v případě čerstvých vzorků i vzorků skladovaných v chlazeném skladu byla exprese vyšší u isoformy *Mal d 1.02* a to v poměru 2:1 až 10:1 k isoformě *Mal d 1.01*. Avšak v případě skladování v podmínkách ULO došlo především k růstu exprese isoformy *Mal d 1.01* a u více než poloviny odrůd byla tato exprese dokonce vyšší než v případě isoformy *Mal d 1.02*. Při porovnání obou způsobů skladování v roce 2016 byla celková genová exprese vyšší u 9 vzorků skladovaných v chlazeném skladu v porovnání se vzorky skladovanými v podmínkách ULO, u třech vzorků tomu bylo naopak. V roce 2017 byla při vzájemném porovnání genová exprese vyšší u 6 vzorků z chlazeného skladu a rovněž u 6 vzorků z podmínek ULO. Stejný poměr si zachovaly odrůdy 'Cumulus', 'Meteor', 'Ecolette', 'Golden Delicious' (genová exprese je vyšší u vzorků z chlazeného skladu) a odrůdy 'Angold', 'Idared' (genová exprese je vyšší u vzorků z řízené atmosféry ULO). Všechny výše popsané výsledky jsou znázorněny v následujících tabulkách a grafech.

Tabulka 1: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v letech 2016 a 2017

Odrůda	Rok	Mal d 1.01	Sm. Odch.	Mal d 1.02	Sm. Odch.
Lady Silvia	2016	17,19	0,36	62,98	0,55
	2017	13,00	1,00	55,59	0,63
Zuzana	2016	20,73	0,45	78,25	0,68
	2017	21,61	0,14	52,76	7,24
Braeburn	2016	30,32	4,69	78,80	1,12
	2017	23,48	0,28	48,06	0,82
Cumulus	2016	31,42	0,45	89,69	1,78
	2017	18,54	0,48	53,95	1,07
Nikoleta	2016	61,61	0,43	60,28	1,02
	2017	25,76	0,56	82,52	0,54
Andera	2016	18,73	0,40	108,89	1,29
	2017	41,22	5,79	88,07	2,48
Rucla	2016	42,51	7,22	90,95	2,10
	2017	54,95	0,54	90,32	1,79
Jonagold	2016	32,08	0,36	104,26	3,09
	2017	25,24	0,80	28,51	0,19
Meteor	2016	37,10	0,32	102,17	4,70
	2017	53,08	0,17	66,26	0,78
Artiga	2016	52,17	2,65	94,40	2,99
	2017	29,45	0,42	56,76	0,92
Reluga	2016	42,98	7,79	105,21	2,72
	2017	52,96	0,79	49,76	0,74
Bohemia Gold	2016	73,78	1,28	79,90	0,79
	2017	112,74	1,70	166,58	1,44
Fragrance	2016	27,19	3,74	128,90	1,83
	2017	26,13	1,24	51,77	1,61
Angold	2016	58,62	0,38	110,00	4,93
	2017	41,31	0,63	64,61	1,58
Idared	2016	33,89	4,88	135,98	3,96
	2017	21,81	0,29	74,72	1,12
Ecolette	2016	55,44	7,83	149,78	0,49
	2017	22,90	0,52	56,24	0,55
Rubín	2016	81,01	0,95	126,83	1,24
	2017	46,53	0,53	145,69	1,90
Rubinstep	2016	47,96	1,24	184,00	3,12
	2017	59,85	0,52	70,54	1,65
Herald	2016	50,22	0,76	199,03	2,83
	2017	70,74	12,49	284,06	2,45
Santana	2016	109,14	0,94	194,02	1,27
	2017	46,96	5,68	71,02	0,80
Benet	2016	27,80	4,82	277,59	3,96
	2017	60,55	0,60	66,90	2,06
Rosabel	2016	105,67	1,51	203,67	1,99
	2017	53,82	0,47	75,76	9,96
Opal	2016	73,89	2,30	310,20	7,12
	2017	9,03	0,37	38,95	0,56
Topaz	2016	38,41	0,38	408,28	4,02
	2017	14,22	0,12	95,68	1,37
Gala	2016	218,82	4,32	269,98	2,34
	2017	61,27	1,69	101,85	2,01
Golden Delicious	2016	77,36	0,91	470,07	4,06
	2017	28,39	0,86	56,25	1,56

Graf 8: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v letech 2016 a 2017



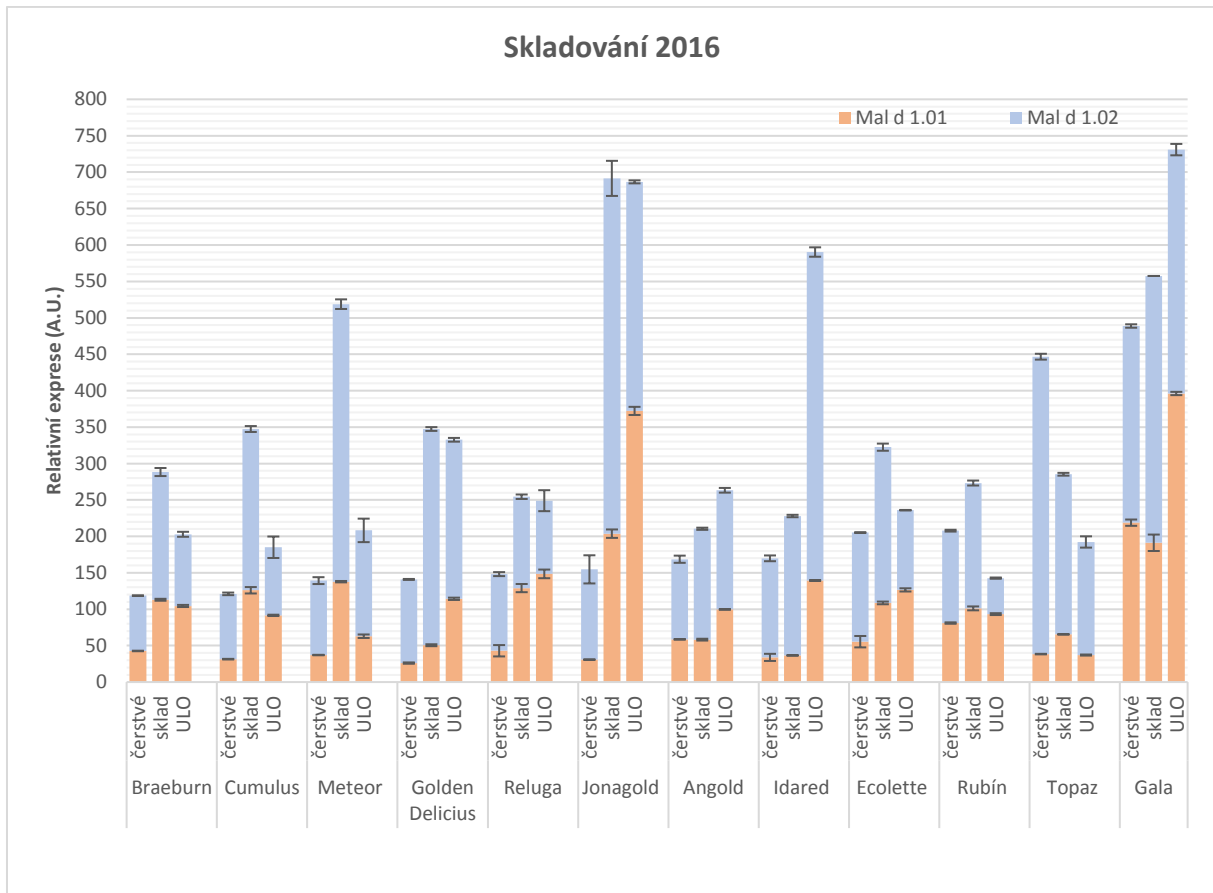
Tabulka 2: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých a skladovaných plodů odrůd sklizených v roce 2016

Odrůdy 2016		Mal d 1.01	Sm.odch.	Mal d 1.02	Sm.odch.
Braeburn	čerstvé	42,72	0,37	75,94	0,50
	sklad	112,99	1,33	175,34	5,52
	ULO	104,46	1,45	98,42	3,42
Cumulus	čerstvé	31,42	0,45	89,69	1,78
	sklad	126,02	4,41	221,36	4,05
	ULO	91,57	0,89	93,50	14,74
Meteor	čerstvé	37,10	0,32	102,17	4,70
	sklad	137,83	0,96	380,97	6,61
	ULO	62,95	2,40	145,28	16,13
Golden Delicious	čerstvé	26,07	0,91	114,83	0,65
	sklad	50,58	1,32	296,81	2,57
	ULO	114,31	1,58	218,29	2,56
Reluga	čerstvé	42,98	7,79	105,21	2,72
	sklad	129,02	5,61	125,40	3,07
	ULO	148,52	5,92	100,47	14,39
Jonagold	čerstvé	30,80	0,11	123,92	19,33
	sklad	203,74	5,78	487,75	24,10
	ULO	372,26	5,60	314,45	2,06
Angold	čerstvé	58,62	0,38	110,00	4,93
	sklad	58,23	1,24	152,23	1,49
	ULO	99,73	0,33	163,55	3,23
Idared	čerstvé	33,89	4,88	135,98	3,96
	sklad	36,59	0,36	191,35	1,65
	ULO	139,42	0,00	450,95	6,43
Ecolette	čerstvé	55,44	7,83	149,78	0,49
	sklad	108,65	1,84	213,84	4,91
	ULO	126,55	2,20	109,39	0,36
Rubín	čerstvé	81,01	0,95	126,83	1,24
	sklad	101,16	2,68	172,08	3,40
	ULO	93,28	1,29	49,42	0,85
Topaz	čerstvé	38,41	0,38	408,28	4,02
	sklad	65,50	0,37	219,80	1,90
	ULO	37,11	0,72	155,23	7,75
Gala	čerstvé	218,82	4,32	269,98	2,34
	sklad	191,23	11,28	366,25	0
	ULO	396,18	2,24	334,78	7,84

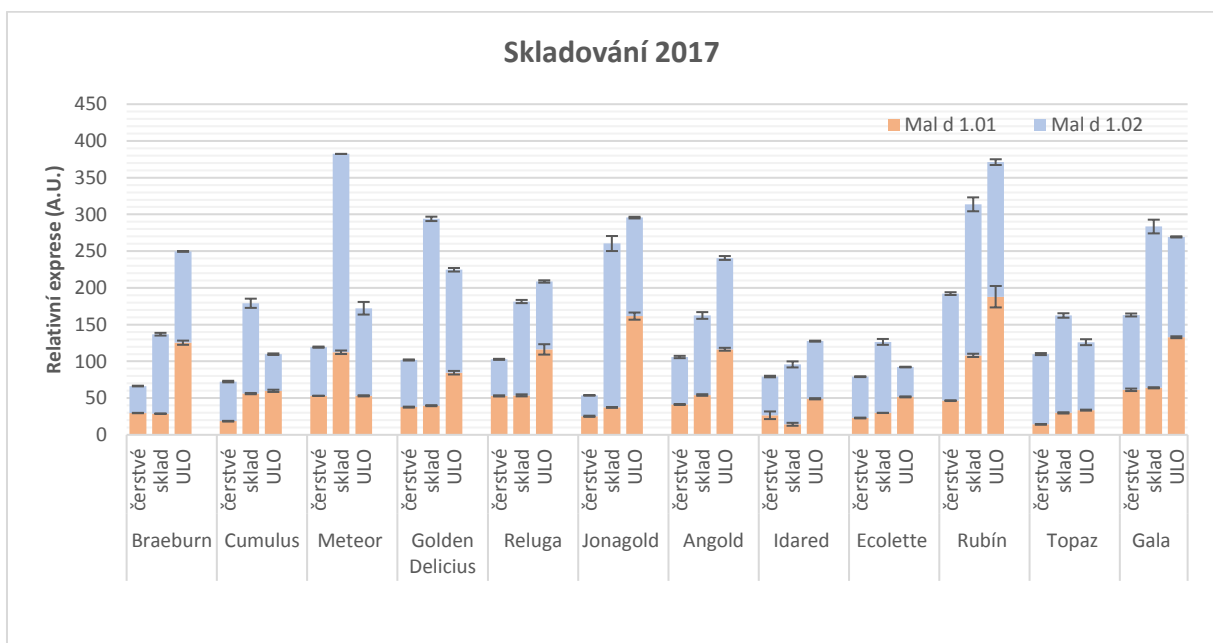
Tabulka 3: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých a skladovaných plodů odrůd sklizených v roce 2017

Odrůdy 2017		Mal d 1.01	Sm.odch.	Mal d 1.02	Sm.odch.
Braeburn	čerstvé	29,65	0,26	36,76	0,48
	sklad	28,78	0,38	108,15	1,84
	ULO	125,40	2,84	124,21	0,41
Cumulus	čerstvé	18,54	0,48	53,95	1,07
	sklad	56,11	0,84	122,93	6,26
	ULO	59,87	1,53	49,88	1,06
Meteor	čerstvé	53,08	0,17	66,26	0,78
	sklad	112,37	2,40	269,97	0,00
	ULO	53,08	0,75	119,20	8,59
Golden Delicious	čerstvé	37,71	0,68	64,15	0,75
	sklad	39,68	0,68	254,25	2,99
	ULO	84,56	2,43	140,09	2,41
Reluga	čerstvé	52,96	0,79	49,76	0,74
	sklad	53,71	1,40	127,72	2,17
	ULO	116,27	7,07	92,43	1,60
Jonagold	čerstvé	25,24	0,80	28,51	0,19
	sklad	37,27	0,42	223,10	10,23
	ULO	161,58	4,86	134,06	1,16
Angold	čerstvé	41,31	0,63	64,61	1,58
	sklad	54,20	1,10	108,23	4,57
	ULO	116,46	1,98	124,24	2,64
Idared	čerstvé	26,62	5,19	52,72	1,04
	sklad	14,34	2,01	81,49	4,12
	ULO	49,07	0,83	78,43	0,68
Ecolette	čerstvé	22,90	0,52	56,24	0,55
	sklad	29,86	0,17	96,64	3,98
	ULO	51,63	0,67	40,60	0,46
Rubín	čerstvé	46,53	0,53	145,69	1,90
	sklad	108,16	2,22	205,57	9,45
	ULO	187,98	14,58	183,16	3,90
Topaz	čerstvé	14,22	0,12	95,68	1,37
	sklad	29,87	0,85	132,55	3,02
	ULO	33,60	0,66	92,50	4,02
Gala	čerstvé	61,27	1,69	101,85	2,01
	sklad	64,00	0,75	219,49	9,33
	ULO	132,83	1,30	136,56	0,77

Graf 9: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých a skladovaných plodů odrůd sklizených v roce 2016



Graf 10: Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých a skladovaných plodů odrůd sklizených v roce 2017



4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika komplexně zpracovává podrobné informace o expresi genů pro hlavní isoformy alergenu Mal d 1 v jablkách, přípravě vzorků pro analýzy a vlastních analýzách. Popsány jsou jednotlivé analyzované odrůdy z hlediska exprese genů pro alergeny v čerstvě sklizených plodech a změny v expresi v průběhu skladování. Publikace v takovém rozsahu nebyla dosud pěstitelům v ČR poskytnuta, zpracovává dosud málo prostudovanou oblast genové exprese hlavních jablečných alergenů včetně vlivu několika faktorů. Poznatky jsou přímo uplatnitelné v praktickém skladování ovoce a jejich distribuci. Výsledky jsou využitelné zejména organizacemi zabývajícími se skladováním ovoce a následným prodejem jablek. Znalosti o průběhu změn exprese genů pro alergeny v jablkách mohou být využity pro marketing ovoce, kdy je možnost nabídnout zákazníkovi jablka v optimální fázi skladování s nízkou expresí genů pro jablečné alergeny.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena pěstitelům, skladovatelům a distributorům jablek. Byly hodnoceny rozdíly v genové expresi jednotlivých isoform alergenu Mal d 1 vzhledem k odrůdě. Dále byly hodnoceny rozdíly mezi expresí genů pro alergeny v čerstvých a skladovaných plodech. Metodika je vítaným zdrojem informací pro pěstitele, skladovatele, zpracovatele a obchodníky. Pěstování a uchování jablek s nízkou genovou expresí alergenů je v současné době požadavkem skupiny spotřebitelů s alergií na konzumaci jablek, což přispívá k obohacení jídelníčku a posílení zdraví dětí, dospělých i starších osob. Důležité pro snížení genové exprese alergenů v plodech je také čas sklizně a posklizňové zacházení s plody, související s manipulací, balením a podmínkami skladování. Jablka s vyšší zralostí byly hodnoceny jako plody s vysokou mírou genové exprese studovaných alergenů. Odrůdy, u kterých došlo během skladování k změknutí dužniny související s procesem zrání, výrazně zvýšily expresi studovaných genů. Exprese genů pro alergen Mal d 1 je závislá na odrůdě, je tedy podmíněna geneticky a lze předpokládat, že poměr mezi expresí genů pro alergen Mal d 1 ve slupce a dužině je stabilní.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Jablka jsou velmi důležitou součástí zdravé výživy. Jsou pro nás dostupná celoročně a jsou zdrojem mnoha vitamínů, minerálů, vlákniny a dalších zdraví prospěšných látek, avšak přibližně 2 % populace severní a střední Evropy trpí po konzumaci čerstvých jablek alergickou reakcí. Podle vývoje trhu s jablky a situace v okolních zemích lze očekávat, že podíl produkce jablek mírně vzroste. Celková výměra plodných produkčních výsadeb jabloní činí v ČR necelých 7 000 ha, s průměrným výnosem 13,78–20,41 t/ha v pětiletém období (Buchtová, MZe ČR, 2017). To vytváří ročně produkci 110 - 140 tisíc tun jablek při realizační ceně kolem 10 Kč/kg v

hodnotě 1,1–1,4 mld. Kč ročně. Spotřeba jablek činí v ČR přibližně 24 Kg na osobu ročně. Předpokladem je, že u dvou procent obyvatel se zvýší spotřeba hypoalergenních odrůd jabloní a zvýší se prodej jablek s nízkou expresí genů pro alergeny. Realizační cena hypoalergenních odrůd se předpokládá o cca 3 Kč / kg vyšší, což představuje přibližně ekonomický přínos pro pěstitele ve výši 14,4 mil. Kč ročně.

Nepřímým ekonomickým přínosem je zlepšení zdraví současné populace konzumací hypoalergenních odrůd a produkce jablek uchovaná v podmínkách a nízkou expresí genů pro alergen Mal d 1.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Publikace předcházející metodice

TÁBORSKÁ A. Vliv odrůdy a skladování plodů na expresi izoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek. Diplomová práce, 2018. ČZU v Praze, 87 s.

ZUNOVÁ T. Expresie isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice. Diplomová práce, 2018. ČZU v Praze, 107 s.

ŽĎÁRSKÁ, I., V. KADLECOVÁ, R. ČMEJLA, R. VÁVRA, P. VEJL, M. MELOUNOVÁ. Hodnocení exprese alergenu Mal d 1 u vybraných odrůd jabloní. *Vědecké práce ovocnářské*. 2017, **25**:33-44. ISSN 0231-6900.

ŽĎÁRSKÁ, I., V. NEKVINDOVÁ, R. ČMEJLA, R. VÁVRA. Vliv skladování na změny genové exprese alergenu Mal d 1 v jablkách. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, s. 461-464.

Seznam použité literatury

BALLMER-WEBER, B.K. Food allergy in adolescence and adulthood. *Chemical immunology and allergy*. 2015, **101**:51–58.

BOHLE, B., B. ZWÖLFER, A. HERATIZADEH, B. JAHN-SCHMID, Y.D. ANTONIA, M. ALTER, W. KELLER, L. ZUIDMEER, R. van REE, T. WERFEL and C. EBNER. Cooking birch pollenrelated food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006, **118**:242–249.

BOLHAAR, S.T., W.E. van de WEG, R. van REE, E. GONZALEZ-MANCEBO, L. ZUIDMEER, C.A. BRUIJNZEEL-KOOMEN, M. FERNANDEZ-RIVAS, J. JANSEN, K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER, A.C. KNULST and L.J. GILISSEN. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005, **116**:1080–1086.

BOTTON, A., P. LEZZER, A. DORIGONI, G. BARCACCIA, B. RUPERTI and A. RAMINA. Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**:6707–6716.

- BOYER, J. and R.H. LIU. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 2004, **3**:5.
- BREITENEDER, H. and C. RADAUER. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004, **113**: 821–830.
- BUCHTOVÁ I. 2017. Situační a výhledová zpráva ovoce. MZe ČR.
- DUBOIS, A.E.J., G. PAGLIARANI, R.M. BROUWER, B.J. KOLLEN, L.O. DRAGSTED, F.D. ERIKSEN, O. CALLESEN, L.J. GILISSEN, F.A. KRENS, R.G.F. VISSER, M.J.M. SMULDERS, B.J. Vlieg-Boerstra, B.J. FLOKSTRA-de BLOK and W.E. van de WEG. First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: *Mal d 1*-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy*. 2015, **70**: 1416–1412.
- FERNÁNDEZ-RIVAS, M. and M. CUEVAS. Peels of rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and Experimental Allergy*. 1999, **29**:1239–1247.
- GAO, Z.S., W.E. van de WEG, C.I. MATOS, P. ARENS, S.T. BOLHAAR, A.C. KNULST, Y. LI, K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER and L.J. GILISSEN. Assessment of allelic diversity in intron-containing *Mal d 1* genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology*. 2008, **13**:116.
- GAO, Z.S., W.E. van de WEG, J.G. SCHAART, H.J. SCHOUTEN, D.H. TRAN, L.P. KODDE, I.M. van der MEER, A.H. van der GEEST, J. KODDE, H. BREITENEDER, K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER, D. BOSCH and L.J. GILISSEN. Genomic cloning and linkage mapping of the *Mal d 1* (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005, **111**:171–183.
- GEROLDINGER-SIMIC, M., T. ZELNIKER, W. ABERER, C. EBNER, C. EGGER, A. GREIDERER, N. PREM, J. LIDHOLM, B.K. BALLMER-WEBER, S. VIETHS, B. BOHLE. Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011, **127**: 616–622.
- GILISSEN, L.J., S.T. BOLHAAR, C.I. MATOS, G.J. ROUWENDAL, M.J. BOONE, F.A. KRENS, L. ZUIDMEER, A. VAN LEEUWEN, J. AKKERDAAS, K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER, A.C. KNULST, D. BOSCH, W.E. van de WEG and R. van REE. Silencing the major apple allergen *Mal d 1* by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005, **115**:354-369.
- KIEWNING, D. and M. SCHMITZ-EIBERGER. Effects of long-term storage on *Mal d 1* content of four apple cultivars with initial low *Mal d 1* content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **94**: 798–802.
- KOOTSTRA, H.S., B.J. Vlieg-Boerstra and A.E.J. DUBOIS. Assessment of the reduced properties of the Santana apple. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2007, **99**:522–525.

- LIVAK, K.J. and T.D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001, **25**(4): 402–408.
- van der MAAS, M.P. and M.F. SCHENK. Development of a protocol that allows safe consumption of the hypoallergenic apple cultivar Santana. *Acta Horticulturae*. 2009, **841**: 549-552.
- MARZBAN G., A. MANSFELD, W. HEMMER, E. STOYANOVA, H. KATINGER and M.L. da CÂMARA MACHADO. Fruit cross-reactive allergens: a theme of uprising interest for consumers' health. *Biofactors*. 2005, **23**:235–341.
- Matthes, A., M. Schmitz-Eiberger. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**: 10548–10553.
- PAGLIARANI, G., R. PARIS, A.R. IORIO, S. TARTARINI, S. del DUCA, P. ARENS, S. PETERS and W.E. van de WEG. Genomic organisation of the *Mal d 1* gene cluster on linkage group 16 in apple. *Molecular Breeding*. 2012, **29**(3): 759–778.
- PAGLIARANI, G., R. PARIS, P. ARENS, S. TARTARINI, G. RICCI, M.M. SMULDERS and W.E. van de WEG. A qRT-PCR assay for the expression of all *Mal d 1* isoallergen genes. *BMC Plant Biology*. 2013, **13**: 51.
- PROŠKOVÁ, A., F. PAPRŠTEIN, S. ŠTĚPÁNOVÁ HONZOVÁ, M. KMÍNKOVÁ a I. ŠETINOVÁ. Vliv skladování na výskyt alergenu Mal d1 u odrůd jabloně. *Vědecké práce ovocnářské*. 2013, **23**: 99-108.
- ȘESTACOVA, T., S. CLAPCO, A. PORT and M. DUCA. Studies concerning the allergenicity of different apple varieties cultivated in republic of Moldova. *Lucrari Stiintifice Seria Agronomie*. 2016, **59** (2): 389-392.
- VANEK-KREBITZ, M., K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER, M. LAIMER da CAMARA MACHADO, M. SUSANI, C. EBNER , D. KRAFT, O. SCHEINER and H. BREITENEDER. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995, **214**:538–551.
- VEGRO M., G. ECCHER, F. POPULIN, C. SORGATO, F. SAVAZZINI, G. PAGLIARANI, S. TARTARINI, G. PASINI, A. CURIONI, A. ANTICO and A. BOTTON. Old Apple (*Malus domestica* L. Borkh) Varieties with Hypoallergenic Properties: An Integrated Approach for Studying Apple Allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64** (48): 9224–9236.
- VLIEG-BOERSTRA, B.J., W.E. van de WEG, S. van der HEIDE, M. KERKHOF, P. ARENS, G. HEIJERMAN-PEPPELMAN and A.E. DUBOIS. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy*. 2011, **66**:491–498.
- WAGNER A., A. SZWED, K. BUCZYŁKO and W. WAGNER. Allergy to apple cultivars among patients with birch pollinosis and oral allergy syndrome. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2016, **117**: 399-404.

8. Obrazová příloha















Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor rostlinných komodit, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

4070/2019-MZE-17222

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika hodnocení genové exprese isoform alergenu Mal d 1 v jablkách**

Autor / autoři: **Ing. Ivona Žďárská a kol.**

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOČNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., ČZU Praha**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2018**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu NAZV č. **QJ1510354**.

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolov“, je výsledek typu N_{net} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: **www.vsuo.cz**

V Praze dne 23/1/2019

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdeněk Trnka

ředitel odboru rostlinných komodit

.....
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 14.1.2019

.....
Ing. Pávlína Adam, Ph.D.