



národní
úložiště
šedé
literatury

Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji

Ovesná, Jaroslava; Hodek, Jan
2010

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-113907>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 28.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .

Jaroslava Ovesná, Jan Hodek



METODY EXTRAKCE DNA Z ČERSTVÉHO PLODU PAPÁJI A Z KANDOVANÉ PAPÁJI

METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav
rostlinné výroby, v.v.i.

Metodika byla vypracována pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO díky finančnímu příspěví MZe ČR na VZ: 0002700604.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010

ISBN: 978-80-7427-063-5

Autoři: RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Mgr. Jan Hodek

Název: Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z
kandované papáji

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 8 ks

Vyšlo v roce 2010

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: ovesna@vurv.cz

hodek@vurv.cz

Autor fotografií: Jan Hodek

Jaroslava Ovesná, Jan Hodek

**METODY EXTRAKCE DNA
Z ČERSTVÉHO PLODU PAPÁJI A
Z KANDOVANÉ PAPÁJI**

METODIKA PRO PRAXI

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2010

Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji

Tento dokument byl vypracován pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a je určen kontrolním laboratořím, které se zabývají analýzou DNA pro určení obsahu GMO v rostlinách a z rostlin odvozených maticí.

Metodika poskytuje pracovní postup pro extrakci amplifikovatelné DNA z plodu papáji melounové (*Carica papaya*). Metody extrakce byly optimalizovány pro izolaci DNA z dužiny a semen plodů papáji a izolaci DNA z kandované papáji. Tyto typy produktů papáji se na trhu vyskytují nejčastěji.

Plod papáji nepatří mezi bohaté zdroje DNA- extrakce nukleových kyselin z něj proto vyžaduje upravené extrakční metody. Extrahovaná DNA musí být navíc dostatečné kvality pro další zpracování metodou PCR- musí být amplifikovatelná. Kontrola amplifikovatelnosti extrahované DNA probíhá s pomocí PCR vnitřního genu papáji – *papainu*.

Amplifikovatelná DNA získaná z papáji pak následně slouží jako templát pro PCR, například k odhalení výskytu v EU nepovolených genetických modifikací papáji linií 55-1 a 63-1 podle dostupné certifikované metodiky pro praxi s názvem Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1.

Methods of DNA extraction from the fresh papaya fruit and from the candied papaya

This document was prepared by the members of National Reference laboratory for identification of GMO. It is intended for control laboratories which practise GMO analyses from different plant matrixes.

This methodology describes methods of the amplifiable DNA extraction from the fresh papaya fruit and from the candied papaya. These methods of DNA extraction were optimized for the flesh and stones from the fresh papaya fruit and for the candied papaya. These are the most often papaya products in the market.

Papaya fruit is a poor source of DNA- therefore the DNA extraction methods must be optimized. The extracted DNA must satisfy requirement of amplification. Control of amplify ability of extracted DNA is realized via PCR of specific DNA sequence of papaya endogenous *papain*.

Extracted amplifiable DNA could be used for the detection of GM papaya 55-1/63-1, which is not allowed in EU. The analysis could be done according the methodology Methodics for Detection of GM papaya 55-1 and 63-1.

Oponenti:

Ing. Hana Jiráková, Ph.D., MŽP ČR, Oddělení geneticky modifikovaných organismů

Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie

Úsek potravinářských výrob – Úřad pro potraviny, Odbor bezpečnosti potravin, MZe ČR, vydal dne 27.12.2010 osvědčení č. 2/2010 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků a vývoje“.

Obsah:

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 7 |
| 1.1. Cíl metodiky a dedikace | 7 |
| 1.2. Termíny a definice | 7 |
| 1.3. Princip DNA extrakčních metod | 8 |
| 1.4. Rušivé vlivy – inhibitory | 9 |
| 2. Materiál a metody | 10 |
| 2.1. Přístrojové vybavení a materiál | 10 |
| 2.2. Chemikálie a roztoky | 10 |
| 2.3. Optimalizovaná CTAB metoda izolace DNA z plodu papáji a semen | 11 |
| 2.4. Optimalizovaná GeneSpin metoda pro izolaci DNA z kandované papáji | 12 |
| 2.5. Kontrola kvality izolované DNA | 12 |
| 2.5.1. Elektroforetické separace na agarózovém gelu | 12 |
| 2.5.1.1. Příprava 0,8% agarózového gelu | 13 |
| 2.5.2. Vizualizace DNA po elektroforetické separaci | 14 |
| 2.5.3. Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA | 14 |
| 2.6. Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci vnitřního genu papáji | 15 |
| 2.6.1. Příprava a pracovní postup PCR | 16 |
| 2.6.1.1. Příprava pracovního prostoru | 16 |
| 2.6.1.2. Příprava chemikálií | 17 |
| 2.6.1.3. Pracovní postup | 17 |
| 2.6.2. Kontrola PCR produktů | 17 |
| 2.6.2.1. Příprava 2% agarózového gelu | 17 |
| 2.6.3. Elektroforetická separace PCR produktů | 18 |
| 2.6.3.1. Pracovní postup | 18 |
| 2.7.4. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci | 18 |
| 3. Závěr | 20 |
| 4. Literatura | 20 |
| 5. Seznam činností a publikací RL-GMO | 20 |
| Příloha Příprava roztoků | 21 |

1. Úvod

1.2. Cíl metodiky a dedikace

Papája melounová (*Carica papaya*) pochází z tropických oblastí Střední Ameriky a v současnosti patří mezi populární ovoce pěstované v řadě tropických i subtropických oblastí světa (Filipíny, Brazílie, jižní Afrika, Indie, Vietnam a další).

Produkce papáji melounové je ohrožena především nákazou, kterou způsobuje virus kroužkovitosti papáji (Papaya Ringspot Virus – PRSV) (Gonsalves & Ishii, 1980), který patří do rodu potyvirů, neobalených rostlinných RNA virů. K nákaze dochází během mechanického poškození rostliny (např. při prořezávání) nebo s pomocí vektorového přenosu (např. různými druhy mšic).

Virus způsobuje malformaci listů a kroužkovitost, napadená rostlina je zakrslá a produkuje méně ovoce.

Z důvodu ochrany rostlin papáji před PRSV byla vyvinuta ve spolupráci Havajské Cornell University se společností Upjohn geneticky modifikovaná papája 55-1. Tato GM papája, s jejímž pěstováním se na Havaji začalo od roku 1998, měla za úkol zvýšit rezistenci rostlin vůči PRSV. O kontaminaci konvenční papáji GM papájou 55-1 informovala v roce 2006 organizace Hawaii SEED, která začala s testováním papáji jejího pěstitele už v roce 2003. Kontaminace GM papájou zasáhla podle jejich zprávy 30-50% konvenční papáji. Z oblasti Havaje se však GM papája rozšířila ještě dále, Thajská vláda informovala o kontaminaci GM papájou v roce 2004 (Ohmori a kol., 2007).

Dovoz ani pěstování GM papáji 55-1 (a jejího obdoby 63-1) není v Evropské Unii povoleno, její výskyt však již byl podle zprávy Komise o naplňování nařízení 1829/2003 zaznamenán během kontroly dovozu produktů do země EU z USA.

Kontrolní laboratoře nejvíce využívají metodu PCR pro detekci GMO, která vede přes analýzu DNA. Oproti metodám, založeným na proteinové analýze, jako např. ELISA, které požadují pro detekci přítomnosti nativního proteinu ve vzorku, umožňuje PCR analýzu GMO i v poměrně výrazně průmyslově zpracovaných maticích. Pro amplifikaci kontrolního vnitřního genu i transgenních elementů jsou obvykle využívány krátké úseky DNA (do velikosti cca. 200 bp). I částečně degradovaná DNA tak často umožní úspěšný průběh analýzy.

Plody papáji melounové jsou chudým zdrojem nukleových kyselin. Cílem uplatnění metodiky je poskytnutí vhodných pracovních postupů pro extrakci amplifikovatelné DNA z plodu papáji melounové (*Carica papaya*). Metody extrakce byly optimalizovány pro izolaci DNA z dužiny a semen plodů papáji a izolaci DNA z kandované papáji.

Právě plody čerstvé papáji a kandovaná papája byly vytipovány jako vhodné komodity pro eventuální skrínig GM papáji na trhu ČR.

Metodou PCR je poté zkontrolována amplifikovatelnost extrahované DNA. S extrahovanou DNA je možno dále pracovat podle potřeb uživatele.

Pro potřeby GMO analýzy papáji na přítomnost v EU nepovolených GM linií papáji 55-1 a 63-1 je možno dále postupovat podle volně dostupné certifikované Metodiky detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1 (<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-96-6.pdf>).

Metodika je dedikována MZe ČR smlouvou na výzkumný záměr č. 0002700604.

1.2. Termíny a definice

AFLP – (Amplified Fragment Length Polymorphism = délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) metoda, která využívá odlišnosti v DNA sekvenci mezi skupinami příbuzných organismů (např. odrůd nebo klonů) nebo mezi jedinci, kterou je možné detekovat pomocí restrikčních enzymů a následnou amplifikací určité populace restrikčních fragmentů

Amplifikace – zesílení, v případě DNA zmnožení

Amplikon – ohraničený amplifikovaný úsek DNA

Analyt – konkrétní látka, která je ve vzorku analyzována z hlediska své přítomnosti či množství. Zbytek vzorku se nazývá matrice.

Carica papaya – papája melounová. Kulturní plodina původem ze Střední Ameriky. V současnosti je pěstována v řadě tropických i subtropických oblastí (Filipíny, Brazílie, jižní Afrika, Indie, Vietnam a další)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GM – genetická modifikace

PCR (Polymerase Chain Reaction) – řetězová polymerázová reakce je in vitro technika používaná pro enzymatickou amplifikaci specifického regionu DNA, ohraničeného párem primerů. Reakční směs (MasterMix) se tvoří z:

- DNA (templát)
- sNTPs – stavební kameny DNA (dATP = deoxyadenosin trifosfát, dGTP = deoxyguanosin trifosfát, dTTP = deoxythymidin trifosfát, dCTP = deoxycytidin trifosfát)
- specifické primery (forward a reverse) – oligonukleotidy o délce cca. 20 bází nesoucí sekvenci komplementární k části templátové DNA
- pracovní pufr
- roztok $MgCl_2$
- DNA polymeráza

Cyklus PCR se skládá ze tří základních kroků. V prvním kroku je templát (dvoušroubovicová DNA, slouží polymeráze jako vzor pro kopírování) rozdělen v zahřáté reakční směsi na dvě samostatná vlákna (denaturace 90 – 95°C).

V druhém kroku se reakční směs mírně ochladí v závislosti na možnostech primerů, které začnou na uvolněná vlákna templátu nasedat (annealing 50 – 65°C).

Ve třetím kroku termostabilní Taq polymeráza umožní prodlužováním primerů vytvoření kopie požadované sekvence DNA (extense 60 – 72°).

Cyklus se opakuje v závislosti na množství přítomné DNA a délce amplikonu, vzniklé DNA produkty pak slouží jako templáty pro nový reakční cyklus.

Výsledný počet kopií c po amplifikaci je dán vztahem $c=2^n$, kde n je počet cyklů

Real-time PCR – metoda PCR umožňující kvantifikaci sledovaného úseku DNA

Templát – jednořetězcový poly(deoxy)ribonukleotid, využívaný jako zdroj informace při řízené biologické polymeraci. Při replikaci a transkripci je templátem jeden z řetězců DNA

Transgen – cizorodý gen o známém složení a funkci, nesoucí určitou požadovanou vlastnost

1.3. Princip DNA extrakčních metod

DNA je díky svým vlastnostem využívána jako analyt v celé řadě molekulárně-biologických postupů. Molekula DNA je poměrně stabilní, molekula DNA je přítomna v každé buňce daného organismu, ve vhodném prostředí (např. vodný nebo TE roztok, -20°C) ji lze dlouhodobě uchovávat a především je nositelem jedinečné genetické informace zdrojového organismu a tím umožňuje její využití pro specifický důkaz přítomnosti daného organismu v analyzovaném vzorku.

Nejpoužívanější metodou, která využívá pro průkaz přítomnosti daného organismu v analyzovaném vzorku molekulu DNA jako svůj analyt, patří PCR a její variace, jako např. real-time PCR.

Prvním krokem v analýze DNA je její extrakce. Dostupných metod pro extrakci DNA je celá řada a jejich výběr závisí především na matici vzorku, ze kterého má být DNA izolována.

Obecně lze ale extrakci DNA shrnout do několika univerzálních kroků:

- Rozbití buněk (obvykle rozetřením v porcelánové misce v tekutém dusíku)
- Porušení buněčných membrán za použití detergentů (např. SDS, CTAB)

- Inaktivace endogenních nukleáz přidavkem detergentů nebo EDTA, které chelatují dvojmocné soli (Mg^{2+} , Mn^{2+}) a tím dochází k inaktivaci celé řady buněčných enzymů
- Přídavek proteinázy K pro inaktivaci a degradaci proteinů
- Separace polysacharidů z DNA s využitím jejich rozdílné rozpustnosti v roztocích obsahujících CTAB
- Separace hydrofobních buněčných zbytků od DNA (např. lipidů, polyfenolů) extrakcí organickým rozpouštědlem jako např. chloroformem
- Separace DNA a detergentů a zkoncentrování DNA přesrážením DNA ze směsi alkohol/sůl

Běžně jsou pro extrakci DNA využívány tři přístupy- jeden založený na vazbě DNA na kolonku potaženou DNA-vazebným povrchem (silikátové kolonky) s následným promýváním DNA uchycené na kolonce a konečným vymytím DNA z kolonky a druhý na protřepávání DNA přenosu DNA z roztoku do roztoku a finálním přesrážením DNA, vysušením a rozpouštěním ve vhodném rozpouštědle. Třetí přístup je kombinací obou předchozích.

Před vlastní PCR potřeba ověřit množství a kvalita izolované DNA. Kvalita izolované DNA se nejlépe ověří elektroforetickou separací DNA na agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu, kdy je vysokomolekulární nedegradovaná DNA vizualizovaná pod UV světlem jako ostrý proužek svítící na gelu v pozici podle své velikosti. Množství izolované DNA je možno ověřit např. pomocí fluorimetrie, UV spektroskopie nebo odečtením intenzity proužku DNA z agarózového gelu.

Dále je důležité ověřit amplifikovatelnost DNA, tzn. schopnost být templátem pro PCR.

1.4. Rušivé vlivy – inhibitory

Inhibitory PCR jsou látky různé chemické povahy. Jejich přítomnost může být dána povahou matrice vzorku, ze kterého byla DNA extrahována nebo do vzorků vniknou během manipulace s nimi či s používanými chemikáliemi. Tyto látky jsou schopné výrazně omezit, případně zcela zastavit aktivitu Taq DNA polymerázy a tím znemožnit amplifikaci DNA během probíhající PCR. Prokázanými inhibitory PCR jsou prostředky používané na vysypávání ochranných gumových rukavic – talek, škrobový pudr – a zbytky fosfátů z mycích prostředků na laboratorním skle.

V potravinářských maticích mohou mít inhibiční účinek například kationty Ca^{2+} , Fe^{2+} , těžké kovy a dále pak další látky uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1. Vybrané inhibitory PCR.

| Inhibitor | Koncentrace inhibitoru |
|---------------------------|-------------------------------|
| EDTA | > 0,5 mM |
| Ethanol | > 1% (v/v) |
| Fenol | > 0,2% (v/v) |
| CH ₃ COONa | > 5 mM |
| Isopropanol | > 1% (v/v) |
| NaCl | > 25 mM |
| Dodecylsulfát sodný (SDS) | > 0,005% (w/v) |

2. Materiál a metody

2.1. Přístrojové vybavení a materiál

0,2 ml sterilní zkumavky
1,5 ml sterilní zkumavky
Analytická váha AAA 300L
Dokumentační zařízení BioImager UL BIO-12-IC
Elektroforéza WIDE FORMAT MIDI HORIZONTAL GEL UNIT HU 13
Elektroforéza MINI-PLUS FORMAT HORIZONTAL GEL UNIT HU 10
Elektromagnetické míchadlo
Eppendorf Thermomixer®
Erlenmayerova baňka, 500 ml
Hřebínek do elektroforetické vany
Chladnička
Laboratorní parní sterilizátor NÜVE OT 032
Magnetická míchačka Variomag monotherm
Mikropipety
Mikrovlnná trouba Daewoo DMR-603
Mrazicí box (-20°C)
Odměrný válec, 500 ml
Ochranné gumové rukavice bez pudru
pH-metr Cyberscan_Ion 510
Stolní minicentrifuga Hermle Z252MK, D-7209
Termocycler pro PCR Biocycler Gradient 96T-3-2, MJ200-2/2 Thermoblock MJTB-96, MJTB-48/48
Vortex HEIDOLPH REAX top
Zdroj k elektroforézám CONSORT POWER SUPPLY E 122

2.2. Chemikálie a roztoky

100 x TE pufr Concentrate, Fluka
6 x Loading Dye Solution, Fermentas
Agaróza, Serva
Deionizovaná voda, sterilní
Délková standard DNA Ladder HIND III, Fermentas
Délková standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas
EDTA, Serva
Ethanol (98%), Analytika
Ethidium bromid, Sigma
Ethidium bromid, Sigma
Ethylendiamintetraacetát disodný (Na₂-EDTA), Sigma
GeneSpin DNA Extraction Kit, Eurofins
Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromid (CTAB), Sigma
Chlorid sodný, Merk
Chloroform multisolvent, Sigma
Isoamylalkohol p.a., Serva
Kyselina chlorovodíková p.a. 37%, Analytika
Ledová kyselina octová, Lachema
NaOH, Sigma
Plasmid č. 5/08 (insert specifické sekvence pro vnitřní gen papáji *papain* o velikosti 211 bp)
Propan-2-ol, Scharlau
Proteináza K, Merck
RNáza A, Sigma
Savo, 20%
Syntetické oligonukleotidy, Applera:

Papain – forward: Ggg CAT TCT Cag CTg TTg TA (Goda a kol. 2001)
Papain – reverse: CgA CAA TAA CgT TgC ACT CC (Goda a kol. 2001)
TRIS (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS), Serva
Ultra Pure H₂O pro PCR, TOP-Bio

Roztoky:

| | |
|------------------------------|-----------------------------|
| 50 x TAE | předpis č. 1, Příloha č. 1 |
| CTAB extrakční pufr | předpis č. 2, Příloha č. 1 |
| CTAB precipitační pufr | předpis č. 3, Příloha č. 1 |
| Délkový standard DNA HINDIII | předpis č. 4, Příloha č. 1 |
| Délkový standard DNA 100bp | předpis č. 5, Příloha č. 1 |
| EDTA 0,5M | předpis č. 6, Příloha č. 1 |
| Ethanol 70% | předpis č. 7, Příloha č. 1 |
| Nanášecí pufr s indikátory | předpis č. 8, Příloha č. 1 |
| Proteináza K | předpis č. 9, Příloha č. 1 |
| RNáza A | předpis č. 10, Příloha č. 1 |
| TE pufr | předpis č. 11, Příloha č. 1 |
| TRIS-HCl, 1M | předpis č. 12, Příloha č. 1 |
| NaOH, 1M | předpis č. 13, Příloha č. 1 |

2.3. Optimalizovaná CTAB metoda izolace DNA z plodu papáji a semen

Oloupaný plod papáji byl nakrájen na kousky o tloušťce cca. 1-1,5 cm, semena byla separována od dužiny, dužina byla vysušena v sušárně při 37°C po dobu 12h. Tím se redukuje obsah vody a hmota dužiny se zahustí. Vzorky je možné skladovat při -20°C, izolace DNA probíhá metodou CTAB podle níže uvedeného protokolu.

- vzorek se homogenizuje rozetřením ve sterilní třecí misce pod tekutým dusíkem
- naváží se 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml mikrozkušavky
- přidá se 400 µl sterilované deionizované vody, ihned po přidání se jednotlivé vzorky jemně promíchají sterilní kličkou a ponechají 5 min. rehydratovat
- přidá se 1,3 ml CTAB extrakčního pufru předehřátého na 65°C a vzorky se vortexují
- přidá se 10 µl RNázy A a vzorky se opatrně promíchají. Probíhá inkubace 30 min. při teplotě 65°C, každých 10 min. se vzorky promíchají převrácením mikrozkušavky
- přidá se 10 µl roztoku proteinázy K, vzorky se jemně promíchají a nechají se inkubovat 30 min. při teplotě 65°C, každých 10 min. se vzorky promíchají převrácením mikrozkušavky
- centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.
- do 2 nových 2 ml mikrozkušavek se přenesou po cca 600µl supernatantu, přidá se stejný objem směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a 1 minutu se vzorky v ruce silně protřepávají
- centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min
- do nové 2ml mikrozkušavky se přenesou horní (vodní) fáze
- přidají se 2 objemy CTAB precipitačního pufru
- inkubace 60 min. při laboratorní teplotě bez jakéhokoli míchání
- centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.
- pipetou se odstraní supernatant (popř. se opatrně vylíje)- pelet nemusí být viditelný
- vysrážená DNA se rozpustí přidáním 450 µl roztoku 1,2 M NaCl a roztok se opatrně pipetou (nebo převrácením mikrozkušavky) promíchá
- přidá se 450 µl směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a 1 min. se důkladně protřepává rukou
- centrifugace v odstředivce 20 min. při 12000 ot./min.
- horní vodní fáze se přenesou do nové 1,5 ml mikrozkušavky
- přidá se 0,6 objemu 99,8% isopropan-2-olu, jemně se promíchá převrácením mikrozkušavky a nechá se inkubovat 20 min. při laboratorní teplotě
- centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.
- vylitím nebo pipetováním se odstraní supernatant

- přidá se 500 µl roztoku 70% ethanolu a několikrát se převrácením mikrozkuřavky promířhá (toto je nejdůležitější krok dokončující kompletní odstranění CTAB)
- centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.
- vylitím nebo pipetováním se odstraní supernatant
- pelet DNA se vysuší při laboratorní teplotě (cca. 30 min.) a znovu se nechá rozpustit v 60 µl TE pufru při teplotě 4⁰C podobu min. 12h

2.4. Optimalizovaná GeneSpin metoda pro izolaci DNA z kandované papáji

Extrakce amplifikovatelné DNA z kandované papáji byla úspěšně provedena s použitím GeneSpin DNA Extrakčního Kitu (Eurofins) po úpravě postupu uvedeného výrobcem.

Dužina plodu papáji je sama o sobě chudým zdrojem DNA (Wall a kol. 2004; Ohmori a kol. 2007), během kandování dochází navíc k odstranění vody z ovocného plodu a jejímu nahrazení cukernatým roztokem. V řadě publikací bylo popsáno, že cukry mohou inhibovat PCR (Oguchi a kol. 2009; Ricaut a kol. 2005).

Kolonková metoda GeneSpin na rozdíl od jinak poměrně robustní CTAB metody extrakce DNA, po malé optimalizaci návodu výrobce, vedla k izolaci amplifikovatelné DNA z kandované papájové dužiny. Kousky kandované papáji byly nejprve promyty ve sterilní deionizované vodě od viditelné vrstvy cukru, poté byla izolace DNA provedena podle níže uvedeného protokolu.

- vzorek se homogenizuje rozetřením ve sterilní třecí misce pod tekutým dusíkem
- naváží se 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml mikrozkuřavky
- ke vzorku se přidá 700 µl předeřřátého lytického pufru CF na 65°C, vzorek byl mírně promířhán na vortexu a k roztoku bylo přidáno 10 µl proteinázy K. Poté byl vzorek promířhán 5x převrácením mikrozkuřavky
- vzorek byl inkubován při 65°C po dobu 1 h, během inkubace byl každých 10 min promířhán převrácením mikrozkuřavky
- centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.
- do nové 1,5 ml mikrozkuřavky se přenese 300 µl supernatantu
- k roztoku se přidá 300 µl pufru C4 a 200 µl 99,8% etanolu, roztok se promířhává na vortexu po dobu 30s
- na novou 2 ml mikrozkuřavku se nasadí GENE*Spin* kolonka, na kterou se nanese pipetou 750 µl směsi
- centrifugace v odstředivce 1 min. při 10000 ot./min, DNA zůstane zachycena na kolonce, roztok, který kolonkou proteče se vylije
- na kolonku se pipetou nanese 400 µl pufru CQW
- centrifugace v odstředivce 1 min. při 10000 ot./min, roztok, který kolonkou proteče se vylije
- na kolonku se pipetou nanese 700 µl pufru C5
- centrifugace v odstředivce 1 min. při 10000 ot./min, roztok, který kolonkou proteče se vylije
- na kolonku se pipetou nanese 200 µl pufru C5
- centrifugace v odstředivce 2 min. při 12000 ot./min, roztok, který kolonkou proteče se vylije
- GENE*Spin* kolonka se nasadí na novou 1,5 ml mikrozkuřavku, na kolonku se nanese 100 µl elučního pufru CE, předeřřátého na 70°C, nechá se 5 min. inkubovat
- centrifugace v odstředivce 1 min. při 12000 ot./min, roztok, který kolonkou proteče obsahuje DNA

2.5. Kontrola kvality izolované DNA

2.5.1. Elektroforetické separace na agarózovém gelu

Kontrola kvality DNA probíhá pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu. DNA se separuje elektroforeticky na základě svého náboje a molekulární hmotnosti. Délka doby elektroforetické separace je závislá na požadované délce dráhy migrace, protékajícím elektrickým proudem, použitém elektroforetickém pufru a na koncentraci agarózy v gelu.

Ethidium bromid se naváže na DNA a při excitaci UV zářením vyzařuje oranžové fluorescenční záření. Pro kontrolu velikosti migrujících PCR produktů se používá délkový standard DNA.

2.5.1.1. Příprava 0,8% agarózového gelu

Potřebné množství TAE pufru se naředí na pracovní koncentraci (zásobní roztok 50 x TAE se naředí deionizovanou vodou v poměru 1:50). Takto naředěný pufr lze uchovávat maximálně 14 dní. Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Objem pufru, navážka agarózy a objem ethidia bromidu v závislosti na velikosti formy pro gel podle počtu vzorků je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků.

| Pufr 1xTAE [ml] | Koncentrace gelu [w/v] | Agaróza [g] | Ethidium bromid [μ l] | Počet vzorků |
|--------------------|------------------------|-------------|----------------------------|--------------|
| 70 | 0,8% | 0,56 | 0,7 | 1 – 36 |
| 240 | 0,8% | 1,92 | 2,4 | více než 36 |

0,8% agarózový gel se připraví podle následujícího postupu:

- na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy
- navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru
- baňka s pufrem a agarózou se umístí na otočný talíř mikrovlnné trouby, nastaví se stupeň ohřevu (nejvyšší pro 240 ml gelu, střední pro 70 ml gelu) a čas 2 – 3 minuty. V průběhu zahřívání agarózy je třeba roztok několikrát krouživým pohybem promíchat. Je třeba dbát na to, aby var nebyl skrytý a agaróza nevzkypěla a nevystříkla mimo baňku
- ohřev se ukončí po cca 1 minutě varu, baňka se vyjme z mikrovlnné trouby a opatrně se její obsah krouživým pohybem ještě jednou promíchá
- baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku v digestoři a vloží se do ní míchadélko
- během míchání agarózového gelu se připraví forma na gel s hřebínkem pro vytvoření nanášecích jamek v gelu
- když teplota roztoku v baňce klesne na cca 60°C (baňku lze udržet v ruce), přidá se k roztoku agarózy požadovaný objem ethidia bromidu a roztok se nechá ještě cca 1 minutu míchat
- míchadélko se z baňky vyjme pomocí magnetu a ještě horký tekutý roztok agarózy se nalije do formy na gel a nechá se vychladnout, takže dojde ke gelifikaci (cca 30 – 45 min). Je třeba dbát na to, aby po nalití do formy nezůstaly v gelu bublinky vzduchu
- po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků

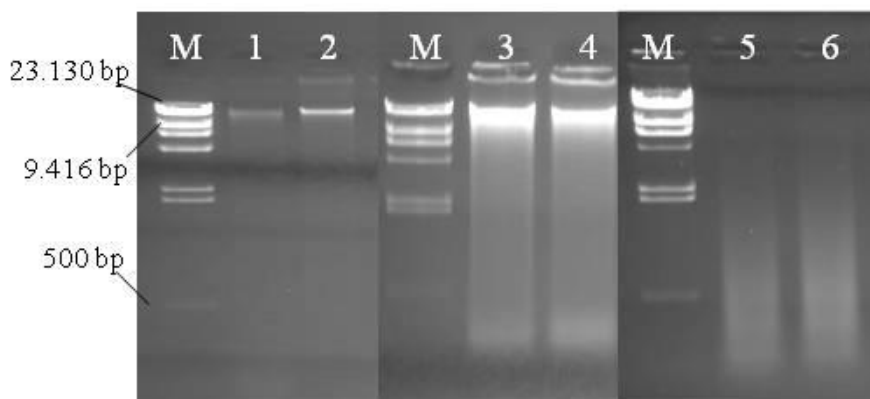
Vzorky se na připravený gel nanášou podle následujícího pracovního postupu:

- z roztoku izolované DNA se odeberou 3 μ l, k nim se přidá 7 μ l sterilní deionizované vody a 3 μ l 6 x Loading Dye Solution, každý vzorek se promíchá 2 x protažením špičkou pipety
- připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE pufrem
- do první a poslední dráhy se nanese 6 μ l délkového standardu DNA Ladder HIND III.
- do dalších drah se nanáší vždy 13 μ l každého vzorku
- po ukončení nanášení vzorků se elektroforetická vana uzavře víkem a nastaví se hodnota elektrického napětí pro 0,8% agarózový gel – 30V
- elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut
- po ukončení elektroforézy se gel vyjme i s formou z vany a přenesení se k fotodokumentačnímu zařízení se zdrojem UV záření

2.5.2. Vizualizace DNA po elektroforetické separaci

Vizualizace DNA po elektroforetické separaci probíhá s pomocí UV záření. Hledaný produkt se v UV světle vizualizuje v podobě svítícího proužku, podle srovnání pozice tohoto proužku s pozicí DNA fragmentů délkového standardu je pak určena délka produktu a stupeň jeho degradace.

Na Obrázku 1 je ukázka signálu nedegradované vysokomolekulární DNA, částečně degradované DNA a degradované DNA.

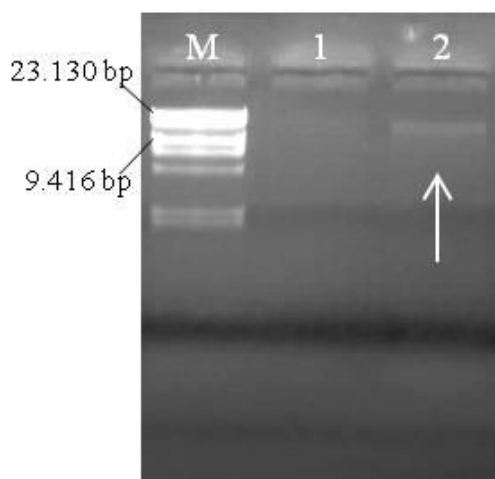


Obrázek 1. Obrázek 0,8% agarózového gelu po elektroforetické separaci DNA. M = délkový standard DNA Ladder HIND III; 1,2 = nedegradovaná vysokomolekulární DNA; 3,4 = částečně degradovaná DNA; 5,6 = degradovaná DNA.

Na Obrázku 2 je znázorněna DNA po elektroforetické separaci na 0,8% agarózovém gelu, extrahovaná z dužiny a semena čerstvého plodu papáji metodou CTAB.

Z obrázku je patrné, že viditelný signál poskytla pouze DNA extrahovaná ze semen papáji. Signál DNA extrahované z dužiny je okem nerozpoznatelný.

Signál DNA extrahované z kandované papáji optimalizovanou metodou GeneSpin poskytl stejný výsledek jako DNA extrahovaná z dužiny čerstvého plodu papáji, obrázek proto není uveden.



Obrázek 2. Obrázek 0,8% gelu s DNA extrahované z plodu papáji metodou CTAB. M = délkový standard DNA Ladder HIND III; 1 = DNA extrahovaná z dužiny; 2 = DNA extrahovaná z pecky

2.5.3. Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA

Při spektrofotometrickém měření koncentrace a čistoty extrahované DNA se využívá toho, že DNA v roztoku absorbuje UV světlo v rozmezí od 210 do 500 nm, s absorpčním maximem 260 nm. Protože DNA, RNA a nukleotidy mají stejné absorpční maximum, tj. 260 nm, nemůže být v roztoku DNA určena koncentrace RNA

a nukleotidových kontaminantů. Pro tento případ je RNA během extrakce enzymaticky odstraňována, stejně tak případné oligonukleotidy a nukleotidy, získané během hydrolýzy RNA. Pokud nedojde k jejich odstranění, může to vést ke špatnému vyhodnocení koncentrace DNA.

Optimální koncentrace pro další analýzu DNA je 20 ng/μl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE pufrém.

Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280}), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.

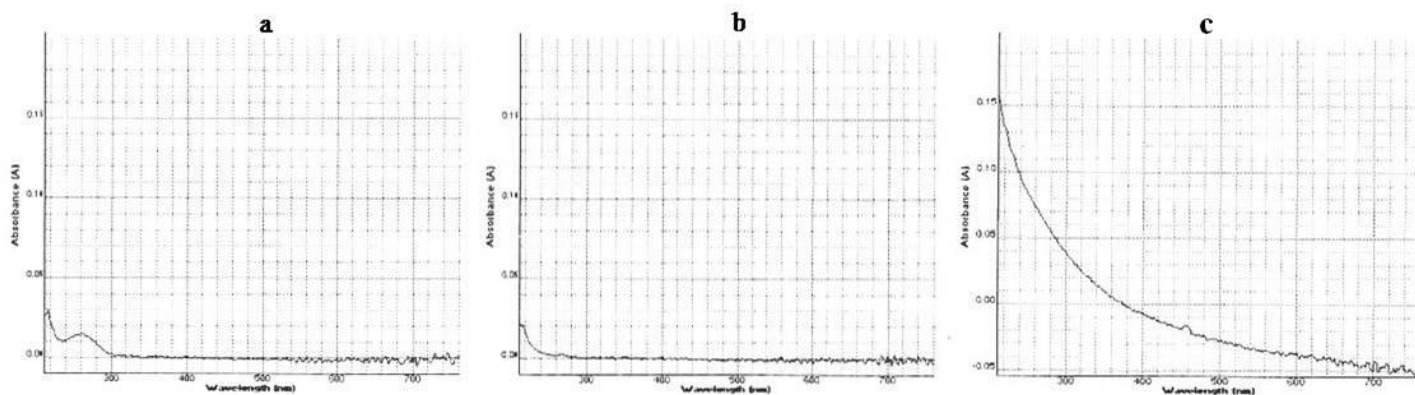
Kontaminace nízkomolekulárními látkami je kontrolována poměrem absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 (A_{260}/A_{230}), při které mají absorpční maximum nízkomolekulární látky jako např. fenol, polysacharidy a EDTA. Optimální hodnota tohoto poměru je vyšší než 2,0.

Výsledky spektrofotometrického měření koncentrace DNA extrahované z dužiny a semen plodu papáji metodou CTAB a DNA extrahované z kandované papáji optimalizovanou kolonkovou metodou GeneSpin jsou uvedeny v Tabulce 3. Hodnoty absorbancí při 230, 260 a 280 nm byly příliš nízké pro možnost výpočtu poměrů A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} .

Tabulka 3. Výsledky spektrofotometrického měření koncentrace DNA extrahované z papáji

| Vzorek | Metoda extrakce DNA | Koncentrace [ng/μl] |
|------------------|---------------------|---------------------|
| dužina | CTAB | 1 |
| semena | CTAB | 7 |
| kandování papája | GeneSpin | - |

U jednotlivých spektrofotometrických měření byla odečtena data průběhu křivky absorpčního maxima absorbance vzorku při vlnových délkách od 210 nm do 760 nm. Ze spekter je u vzorků DNA extrahovaných z dužiny a semen plodu papáji metodou CTAB patrný vrchol absorpčního maxima DNA při 260 nm, průběh absorpčního spektra DNA extrahované z kandované papáji metodou GeneSpin naznačuje přítomnost mnoha DNA kontaminujících látek. Na Obrázku 3 je uveden průběh absorpčních spekter jednotlivých vzorků.



Obrázek 3. Průběh absorpčního spektra extrahované DNA- a = semena papáji; b = dužina papáji; c = kandovaná papája.

2.6. Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci vnitřního genu papáji

Rozhodujícím faktorem pro vyhodnocení kvality extrahované DNA a pro umožnění její další analýzy metodou PCR je potvrzení její amplifikovatelnosti. V případě papáji je to amplifikace vnitřního genu *papainu*.

Podstatou zkoušky je PCR amplifikace specifické cílové DNA sekvence genu *papain* a její elektroforetické dělení na agarózovém gelu, kdy se identifikuje produkt o velikosti 211 bp.

Pracovní postup pro PCR amplifikaci specifické sekvence *papainu* uvedený níže a další protokoly pro analýzu přítomnosti GM modifikované papáji 55-1/63-1 jsou uvedené v metodice pro praxi Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1.

V Tabulce 4. je uvedeno složení reakční směsi pro amplifikaci specifické DNA sekvence *papainu* a v Tabulce 5. teplotní profil PCR.

Kontrola chemikálií:

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. 10xTaqMan® Gold Buffer
3. MgCl₂ solution
4. dNTP Mix
5. AmpliTaq Gold Polymerase
6. Pozitivní plasmidová kontrola (5/08)
7. Templátová DNA o koncentraci 20ng/μl
8. Primery Papain-F (10μM), Papain-R (10μM)

Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4. Složení reakční směsi pro amplifikaci specifického úseku genu *papainu*.

| Složka | Výsledná koncentrace | μl/reakci |
|--------------------------------------|----------------------|-----------|
| Ultra Pure H ₂ O pro PCR | | 12,3 |
| 10xTaqMan® Gold Buffer | 1 x | 2,5 |
| MgCl ₂ solution | 150 nM | 1,5 |
| dNTP Mix | 400 nM | 0,5 |
| Papain – forward, 10 μM | 600 nM | 1,5 |
| Papain – reverse, 10μM | 600 nM | 1,5 |
| AmpliTaq Gold polymerase | 1U | 0,2 |
| Templátová DNA (optimálně 100 ng) | | 5 |
| Celkový objem reakce | | 25 |

Tabulka 5. Parametry pro PCR amplifikaci sekvence specifické pro *papain*.

| Krok | Teplota [C°] | Čas [s] | Počet cyklů |
|----------------------|-----------------|---------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 720 | 1 |
| Denaturace | 95 | 30 | 39 |
| Annealing | 60 | 30 | |
| Extense | 72 | 30 | |
| Konečná extense | 72 | 600 | 1 |

Otřít pracovní plochy čerstvě připraveným 20% roztokem SAVA, otřít pracovní plochy 70% roztokem etanolu. Je vhodné vystavit pracovní plochu germicidnímu záření UV lampy po dobu minimálně 15 minut.

2.6.1.2. Příprava chemikálií

Všechny roztoky, uchovávané v mrazáku, se předem musí rozmrazit – (a) buď při laboratorní teplotě, v tomto případě se musí ukončit rozmrazování ihned po rozpuštění posledního tuhého kusu nebo (b) v lednici/na ledu. Obsah zkumavky se promíchá jejím převrácením a krátkým vortexováním a krátce se všechny položky centrifugují na stolní minicentrifuze.

2.6.1.3. Pracovní postup

1. Požadované množství komponent potřebné pro PCR se nechá roztát, jemně se promíchá a krátce centrifuguje. Chemikálie se udržují na ledu při teplotě **1-4°C**.
2. Pro každý vzorek se připraví jedna sterilní 0,2 ml zkumavka. Jedna zkumavka je určena pro kontrolu MasterMixovou – místo templátové DNA se k MasterMixu přidá odpovídající objem Ultra Pure H₂O pro PCR, jedna zkumavka je určena pro pozitivní plasmidovou kontrolu.
3. Do 1,5 ml reakční zkumavky na ledu se přidají komponenty MasterMixu (Tabulka č.1) v daném pořadí. MasterMix se připravuje s výjimkou DNA. Celkový připravený objem MasterMixu je $V = V_l \cdot (n + 1)$, kde V_l je objem MasterMixu potřebný pro 1 vzorek, n je počet všech vzorků, včetně kontrol a jeden vzorek navíc se přidá na chybu při pipetování.
4. MasterMix se důkladně, ale jemně promíchává po dobu minimálně 10 s (vortex, obracení zkumavky).
5. MasterMix se rozdělí po 20 μ l do každé připravené 0,2 ml zkumavky. Nejprve se do MasterMixové kontroly přidá 5 μ l Ultra Pure H₂O pro PCR, do každé další zkumavky pak 5 μ l templátové DNA jednotlivých vzorků. Pozitivní plasmidová kontrola se k roztoku MasterMixu přidává jako poslední.
6. Zkumavky se krátce stočí na stolní minicentrifuze.
7. Vzorky se vloží do cykleru a zahájí se PCR amplifikace podle parametrů v Tabulce 5.

2.6.2. Kontrola PCR produktů

Elektroforetická separace PCR produktů na agarózovém gelu poskytuje možnost porovnat velikost očekávaných ampliconů s délkovým standardem DNA. Přidáním ethidia bromidu do agarózového gelu je umožněno po ukončení elektroforézy proužky rozdělené DNA vizualizovat pod UV světlem.

2.6.2.1. Příprava 2% agarózového gelu

Potřebné množství TAE pufru se naředí na pracovní koncentraci (zásobní roztok 50 x TAE se naředí deionizovanou vodou v poměru 1:50). Takto naředěný pufr lze uchovávat maximálně 14 dní. Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Objem pufru, navážka agarózy a objem ethidia bromidu v závislosti na velikosti formy pro gel podle počtu vzorků je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků.

| Pufr 1xTAE [ml] | Koncentrace gelu [w/v] | Agaróza [g] | Ethidium bromid [μ l] | Počet vzorků |
|-----------------|------------------------|-------------|----------------------------|--------------|
| 70 | 2% | 1,4 | 0,7 | 1 – 16 |
| 240 | 2% | 4,8 | 2,4 | více než 16 |

Pracovní postup je obdobný jako při přípravě 0,8% agarózového gelu, který je uvedený v kapitole 2.5.1.1.

2.6.3. Elektroforetická separace PCR produktů

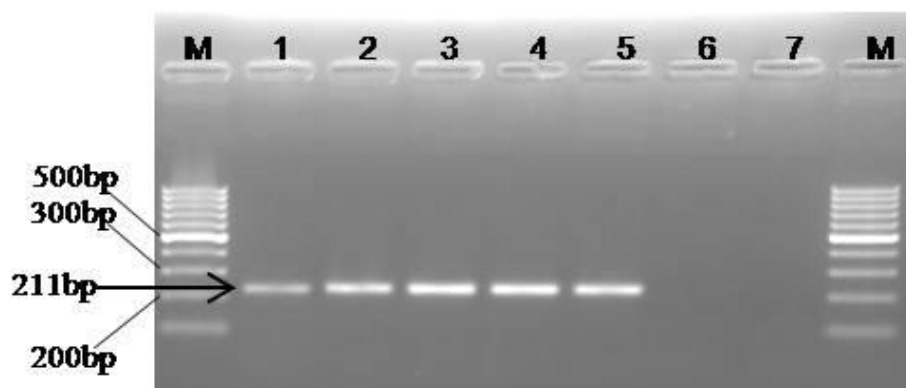
2.6.3.1. Pracovní postup

1. Po proběhlé PCR reakci se do každé mikrozkušavky přidají 3 μ l pufru pro nanášení vzorků, nejprve do MasterMixové kontroly, poté ke vzorkům a nakonec do pozitivní PCR kontroly.
2. Připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE puftrem.
3. Do první a poslední dráhy se nanese 4 μ l délkového standardu 100bp GeneRuler™.
4. Do dalších drah se nanáší vždy 25 μ l z každého vzorku v pořadí od MasterMixové kontroly po pozitivní PCR kontrolu. Před nanesením do jamky se každý vzorek promíchá 2 x protažením špičkou pipety.
5. Po ukončení nanášení vzorků se elektroforetická vana uzavře víkem a nastaví se hodnota elektrického napětí pro 2% agarózový gel – 60V.
6. Elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut.
7. Po ukončení elektroforézy se gel vyjme i s formou z vany a přenesení se k fotodokumentačnímu zařízení se zdrojem UV záření.

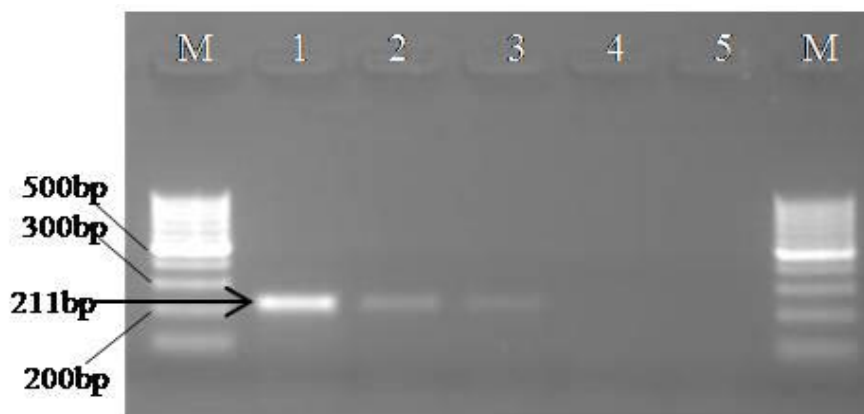
2.7.4. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci probíhá s pomocí UV záření. Hledaný produkt se v UV světle vizualizuje v podobě svítícího proužku, podle srovnání pozice tohoto proužku s pozicí DNA fragmentů délkového standardu je pak určena délka produktu. Délka PCR amplikonu pro specifický fragment vnitřního genu papáji *papainu* je 211 bp.

Na Obrázku 4 je uveden výsledný elektroforeogram amplifikace specifické DNA sekvence vnitřního genu papáji *papainu* s templátem DNA extrahované z dužiny a semen čerstvého plodu papáji metodou uvedenou CTAB a na Obrázku 5 s templátem DNA extrahované z kandované papáji uvedenou optimalizovanou metodou GeneSpin.



Obr. 4. Elektroforeogram amplifikace specifické DNA sekvence *papainu*- DNA extrakce metodou CTAB z dužiny a semen plodu papáji. M = délkový standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; 1 = pozitivní kontrola (plasmid 5/08); 2 = dužina plodu papáji (izolace A); 3 = dužina plodu papáji (izolace B); 4 = semena papáji (izolace A); 5 = semena papáji (izolace B); 6 = negativní extrakční kontrola izolace DNA; 7 = negativní kontrola reakční směsi PCR.



Obr. 5. Elektroforeogram amplifikace specifické DNA sekvence *papainu*- DNA extrakce metodou GeneSpin z kandované papáji. M = délkový standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; 1 = pozitivní kontrola (plasmid 5/08); 2 = kandovaná papája (izolace A); 3 = kandovaná papája (izolace B); 4 = negativní extrakční kontrola izolace DNA; 5 = negativní kontrola reakční směsi PCR.

3. Závěr

Metodou PCR bylo ověřeno, že návod pro extrakci DNA z dužiny a semen čerstvého plodu papáji metodou CTAB a extrakci DNA z výrobku kandované papáji optimalizovanou metodou GeneSpin poskytuje amplifikovatelnou DNA, která je vhodným templátem např. pro následné PCR zkoušky, vyšetřující přítomnost GM papáji v analyzovaném vzorku.

Pro postup těchto analýz je možno využít volně dostupnou metodiku pro praxi s názvem Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1.

Informace o konkrétním přístrojovém a materiálním vybavení se podává pouze jako služba uživateli této metodiky, je možné využít i materiál jiných dodavatelů za předpokladu, že se dosáhne shodných výsledků. V případě neshody je třeba metodu pro dané přístrojové a materiální vybavení optimalizovat.

4. Literatura

Anonym (2003): EC Regulation 1829/2003: on genetically modified (GM) food and feed

Goda Y., Asano T., Shibuya M., Hino A., Toyoda M.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J Food Hyg Soc Jap)* 42, 231 (2001).

Gonsalves D., Ishii M.: *Phytopathology* 70, 1028 (1980).

<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-96-6.pdf> (staženo 6.8.2010).

Oguchi T., Onishi M., Chikagawa Y., Kodama T., Suzuki E., Kasahara M., Akiyama H., Teshima R., Futo S., Hino A., Furui S., Kitta K.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J Food Hyg Soc Jap)* 50, 41 (2009).

Ohmori K., Tsuchiya H., Watanabe T., Akiyama H., Maitani T., Yamada T., Hirayama K., Satoh S.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J Food Hyg Soc Jap)* 49, 63 (2007).

Ricaut F.X., Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Ludes B.: *Forensic Science International* 151, 31 (2005).

Wall E. M., Lawrence T. S., Green M. J., Rott M. E.: *Eur. Food Technol.* 219, 90 (2004).

5. Seznam činností a publikací RL-GMO

Metodika byla připravena jako jeden z výstupů činnosti NRL-GMO v rámci optimalizace řešení situací spojených s výskytem příměsí nepovolených GMO v potravinách a krmivech.

Dále jsou uvedeny publikace NRL-GMO, které s danou problematikou souvisí:

1. Hodek J., Ovesná J.: Detekce vnitřního genu rýže fosfolipázy D pomocí PCR, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2007, ISBN: 978-80-87011-35-5 (<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-35-5.pdf>).
2. Hodek J., Ovesná J.: Detekce rýžového transgenu LL601 pomocí PCR, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2007, ISBN: 978-80-87011-40-9 (<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-40-9.pdf>).
3. Ovesná J., Hodek J.: Detection of Transgenic Papaya Lines: Extraction Protocol Optimisation and Verification of DNA Quality by PCR Assay, *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (Special Issue 2), 75 (2009).
4. Hodek J., Ovesná J., Kučera L.: Interferences of PCR Effectivity: Importance for Quantitative Analyses, *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (Special Issue 2), 42 (2009).
5. Hodek J., Ovesná J., Pavlátová L.: Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2008, ISBN: 978-80-87011-96-6 (<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-96-6.pdf>).
6. Ovesná J., Hodek J., Pavlátová L.: Kvalitativní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 metodou PCR, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2009, ISBN: 978-80-7427-035-2 (<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-035-2.pdf>).

Příloha č. 1

Příprava roztoků

Roztok č. 1

50 x TAE

Příprava: 242 g TRIS base se rozpustí v 300 ml deionizované vody, přidá se 100 ml roztoku č. 3 (EDTA 0,5M) a 57,1 ml ledové kyseliny octové, doplní se do 1000 ml deionizovanou vodou a upraví pH = 8,5. Autoklávuje se při 121°C po dobu 15 minut. Roztok je použitelný 6 měsíců, uchovává se v chladničce, po 3 měsících se autoklávuje.

Roztok č. 2

CTAB Extrakční pufr

Příprava: 10 g CTAB k.č.Sigma 52365, 41,0 g NaCl, 7,875 g TRIS-HCl a 3,75 g Na₂EDTA se rozpustí v 250 ml sterilní deionizované vody, 1M roztokem NaOH nebo HCl se upraví pH roztoku na pH = 8, doplní se do 500 ml a autoklávuje při 121°C. Roztok se uchovává v chladničce při 4°C maximálně 6 měsíců.

Roztok č. 3

CTAB Precipitační pufr

Příprava: 2,5 g CTAB a 1,25 g NaCl se rozpustí v sterilní 250 ml deionizované vody, doplní se do 500ml a autoklávuje se při 121°C. Roztok se uchovává v chladničce při 4°C maximálně 6 měsíců.

Roztok č. 4

Délkový standard DNA Ladder HIND III

Příprava: v mikrozkuhavce se smísí 100μl Ladder HIND III, 100μl 6x Loading Dye Solution a 400 μl vody PCR Ultra H₂O. Promícháme špičkou mikropipety. Mikrozkuhavku umístíme v místnosti do termobloku a zahříváme při teplotě 60⁰C po dobu 5 min.

Roztok č. 5

Délkový standard DNA Gene Ruler 100bp

Příprava: v mikrozkuhavce se smísí 100μl délkového standardu GeneRuler 100bp, 100μl 6x Loading Dye Solution a 400μl vody PCR Ultra H₂O. Po promíchání vortexem se délkový standard uchovává v chladničce při 4°C.

Roztok č. 6

EDTA 0,5M

Příprava: 93,05 g Na₂-EDTA.2H₂O se rozpustí v 300 ml deionizované vody na magnetické míchačce, přidá se cca 10 g NaOH. Měří se pH roztoku, pokud se jeho hodnota neblíží pH = 8, sůl se nerozpustí. Autoklávuje se při 121°C po dobu 15 minut. Roztok je použitelný 6 měsíců, uchovává se v chladničce, po 3 měsících se autoklávuje.

Roztok č. 7

Ethanol cca 70%

Příprava: 70 ml absolut ethanolu (98%) se smíchá s 30 ml deionizované sterilní vody. Roztok je použitelný 12 měsíců.

Roztok č. 8

Nanášecí pufr s indikátory

Příprava: 1 díl nanášecího pufru 6 x Loading Dye Solution se smíchá se 2 díly PCR Ultra H₂O. Uchovává se v chladničce při 4°C.

Roztok č. 9**Proteináza K (20mg/ml)**

Příprava: 20 mg Proteinasy K se rozpustí v 1 ml sterilní vody a rozpipetuje do alikvotů po 200 μ l. Uchovává se v mrazáku při -20°C po dobu 6 měsíců.

Roztok č. 10**RNáza(10mg/ml)**

Příprava: 10 mg RNAsy A se rozpustí v 1 ml neionizované sterilní vody. Rozpipetuje se do alikvotů po 200 μ l. Zbytky RNA se odstraní zahřátím roztoku v termobloku při 95°C po dobu 60min. Uchovává se v mrazáku při -20°C po dobu 6 měsíců.

Roztok č. 11**TE pufr**

Příprava: zásobní roztok 100 x TE pufru se naředí s PCR Ultra H₂O v poměru 1:99, alikvoty se uchovávají v mikrozkuvkách v mrazáku při -20°C.

Roztok č. 12**TRIS-HCl, 1M**

Příprava: 60,55 g TRIS- base se rozpustí v 350 ml neionizované vody, přidá se 21 ml HCl, aby pH roztoku = 8 a doplní se sterilní deionizovanou vodou do 500ml. Autoklávuje se při 121°C. Roztok je použitelný min.6 měsíců. Po 3 měsících se autoklávuje.

Roztok č. 13**NaOH, 1M**

Příprava: 4 g NaOH se rozpustí v 100 ml neionizované sterilní vody a autoklávuje se při 121°C. Roztok je použitelný 12 měsíců. Po 3 měsících se autoklávuje.

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

ISBN: 978-80-7427-063-5

2010