



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

### **Kvalitní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 metodou PCR**

Ovesná, Jaroslava; Hodek, Jan; Pavlátová, Lucie  
2009

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-123891>

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

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

Datum stažení: 15.05.2024

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

Jaroslava Ovesná, Jan Hodek, Lucie Pavlátová



## **KVALITATIVNÍ STANOVENÍ TRANSGENNÍ LINIE RÝŽE Bt 63 METODOU PCR**

**METODIKA PRO PRAXI**



Výzkumný ústav  
rostlinné výroby, v.v.i.

2009

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., 2009

**ISBN 978-80-7427-035-2**

Autoři: RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Mgr. Jan Hodek

Mgr. Lucie Pavlátová

Název: Kvalitativní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 metodou PCR

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

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce 2009

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: [ovesna@vurv.cz](mailto:ovesna@vurv.cz)

[hodek@vurv.cz](mailto:hodek@vurv.cz)

[pavlatova@vurv.cz](mailto:pavlatova@vurv.cz)

Autor fotografií: Jan Hodek

Jaroslava Ovesná, Jan Hodek, Lucie Pavlátová

# **KVALITATIVNÍ STANOVENÍ TRANSGENNÍ LINIE RÝŽE Bt 63 METODOU PCR**

## **METODIKA PRO PRAXI**

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2009

# Kvalitativní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 metodou PCR

Tento dokument byl vypracován pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a je určen kontrolním laboratořím, které provádějí analýzy DNA z různých rostlinných maticí z hlediska přítomnosti GMO.

Metodika popisuje kvalitativní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 na základě PCR analýzy vzorku DNA. Čínská transgenní rýže Bt 63 (Shanyou 63) není v EU povolena a již došlo na území států EU k jejímu záchytu. Doporučená metoda pro analýzu transgenní rýže Bt63 je založena na fluorescenční detekci produktu metodou real-time PCR, naše metodika uvádí méně finančně náročný způsob vizualizace PCR produktu pomocí gelové elektroforézy.

Podstatou zkoušky je zjistit ve vzorku DNA přítomnost nukleotidové sekvence specifické transgenní konstrukt Bt 63 pomocí amplifikace 83bp dlouhého úseku DNA na hranici Bt genu a NOS terminátoru.

Po amplifikaci cílové DNA následuje elektroforetické dělení PCR produktů v agarózovém gelu. V transiluminátoru se poté v UV světle vizualizuje hledaný PCR produkt o velikosti 83bp v podobě proužku svítícího na gelu.

## Qualitative analysis of transgenic rice line Bt 63 using PCR

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 matrices.

This methodology describes qualitative analysis of GM rice Bt63 by way of PCR. Chinese transgenic rice Bt 63 (Shanyou 63) is not allowed in EC and there was already captured in territory of several EC members. Official recommended method for Bt 63 analysis is based on detection of fluorescent signal using real-time PCR. Our methodology presents a less financially demanding way of analysis using visualization by the gel electrophoresis.

Principle of the assay is to discover in the sample of DNA 83bp length specific nucleotide sequence of transgenic construct of Bt 63 rice in the border of Bt gene and the NOS terminator.

After amplification of target DNA, the PCR products are separated by way of electrophoresis in agarose gel. The final 83bp length PCR product is visualized in UV light as a shining strip on gel in certain position.

Oponenti:

Ing. Petr Beneš, MZe ČR, odbor bezpečnosti potravin, env. rozvoje a prevence znečištění

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

Úsek potravinářských výrob – Úřad pro potraviny MZe ČR vydal dne 22.12.2009 osvědčení č. 6/2009 o uznání uplatněné certifikované metodiky.

Metodika byla Odborem výzkumu a vývoje MZe ČR schválena doporučena pro využití v praxi dne 18.1.2010.

## Obsah:

<b>1.</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
1.1.	Cíl metodiky a dedikace	7
1.2.	Termíny a definice	7
1.3.	Princip metody	8
1.4.	Rušivé vlivy – inhibitory	9
<b>2.</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>9</b>
2.1.	Přístrojové vybavení a materiál	9
2.2.	Chemikálie a roztoky	10
2.3.	Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci konstrukt specifické sekvence GM rýže Bt 63	10
2.4.	Příprava a pracovní postup	11
2.4.1.	Příprava pracovního prostoru	11
2.4.2.	Příprava chemikálií	11
2.4.3.	Pracovní postup	11
2.5.	Kontrola PCR produktů	12
2.5.1.	Princip elektroforetické separace na agarózovém gelu	12
2.5.2.	Příprava 2% agarózového gelu	12
2.5.2.1.	Pracovní postup	12
2.5.3.	Elektroforetická separace DNA	13
2.5.3.1.	Pracovní postup	13
2.5.4.	Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci	13
<b>3.</b>	<b>Závěr</b>	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b>Literatura</b>	<b>16</b>
<b>5.</b>	<b>Seznam činností a publikací RL-GMO</b>	<b>16</b>
Příloha č. 1	Příprava roztoků	17

# 1. Úvod

## 1.1. Cíl metodiky a dedikace

Cílem uplatnění metodiky je poskytnutí návodu pro kvalitativní analýzy linie transgenní rýže Bt63. Tato transgenní linie pochází z Číny a v zemích Evropského společenství není její dovoz a používání povoleno.

Přesto došlo ve státech EU v letech 2006 a 2007 k opakovanému záchytu rýže Bt63. Výsledkem byla reakce Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF – alert system for food and feed) a následné rozhodnutí Evropské komise ze dne 3. dubna 2008<sup>1</sup>. Ze zprávy vyplývá požadavek, že by zásilky určitých produktů pocházejících z Číny mohly uvedeny na trh pouze tehdy, pokud by k nim byla přiložena analytická zpráva dokazující, že produkty nejsou kontaminovány geneticky modifikovanou rýží Bt 63.

Rozhodnutí dále uvádí, že z důvodu neexistence validované metody detekce a kontrolních vzorků odpovídající kvality a kvantity a v zájmu zjednodušení kontrol je třeba, aby analytická zpráva byla vypracována za použití metody specifické pro genetický konstrukt vyvinuté D. Mädem *et al.* (2006)<sup>2</sup>.

Referenční laboratoř společenství pro geneticky modifikované potraviny a krmiva (CRL-GMFF) v rámci Společného výzkumného střediska pak tuto metodu označila za v současné době nejvhodnější.

K cíleným kontrolám Čínských potravinářských výrobků z rýže stále dochází a v odborné literatuře již vyšla zpráva o validaci citované metoda pro kvalitativní a kvantitativní stanovení GM rýže Bt63 autorů Lutze Grohmann a Dietricha Mädeho (2009)<sup>3</sup>.

Metodika pro detekci GM rýže Bt63 by měla sloužit pro potřeby laboratoří, které se zabývají analýzou GMO a kontrolou GM v potravinářských produktech.

Kvalitativní stanovení GM rýže Bt63, uvedené v metodice, je založeno na metodě D. Mädeho *et al.* (2006)<sup>2</sup>. Originální metoda byla vyvinuta pro kvantitativní či semi-quantitativní vyhodnocení na základě signálu specifické fluorescenční sondy. Provedení analýzy tak vyžaduje zařízení pro real-time PCR.

Námi uvedená metoda je optimalizována pro klasickou PCR analýzu s použitím REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Co., USA) a s následným elektroforetickým vyhodnocením PCR produktů na agarózovém gelu. Celkově to významně sníží náklady na analýzu a analýza se stane dostupnou i pro laboratoře, které nejsou vybaveny zařízením pro real-time PCR.

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

## 1.2. Termíny a definice

Amplifikace – zesílení, v případě DNA zmnožení

Amplikon – ohraničený amplifikovaný úsek DNA

Bt63 – čínská GM rýže (ozn. GM Shanyou 63) s odolností vůči hmyzím škůdcům, v současné době v EU bez povolení k dovozu

Bt protein – insekticidní protein, produkt Bt genu původem z půdní bakterie (*Bacillus thuringiensis*). Po průchodu trvavicím traktem hmyzu je protein aktivován a vyvolá poškození střevní stěny. Daný typ toxinu je účinný jen na hmyz s určitým typem receptorů. Bez vazby na tuto molekulu je Bt-protein neúčinný. Bt-plodiny jsou díky tomu odolné k vybrané skupině hmyzích škůdců.

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GM – genetická modifikace



NOS terminátor – terminátor genu nopalín syntáza z půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, patří mezi nejčastěji používané regulační sekvence při GM rostlinných buněk

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 prodloužením 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

Plasmid – malá molekula kruhové DNA. Přirozeně se vyskytuje v některých bakteriálních buňkách. Obsahuje genetickou informaci, která není nutná pro běžný život hostitelské bakterie, ale může být užitečná v určitých životních situacích

Shanyou 63 – viz Bt63

Templát – jednořetězový 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

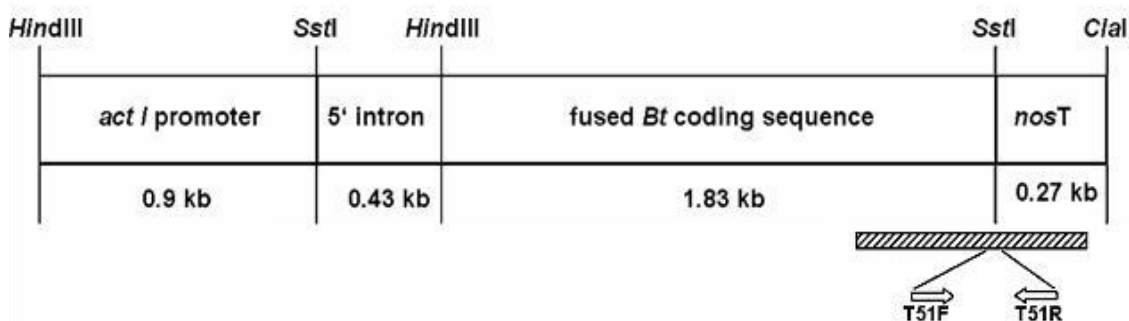
### 1.3. Princip metody

Vstupním analytem pro kvalitativní analýzu GM rýže Bt63 je DNA extrahovaná z vyšetřovaného vzorku rostliny či odvozeného produktu. Metody extrakce DNA nejsou předmětem této metodiky, doporučit lze však metody uvedené v ISO normě 21571. Vhodnost metod extrakce DNA uvedených v ISO 21571 či dalších metod je třeba ověřit. Pro jednotlivé matrice vzorku se může úspěšnost extrakce lišit. Dalším krokem je kontrola amplifikovatelnosti extrahované DNA- průkaz se provádí amplifikací vnitřního genu rýže (např. fosfolipáza D) nebo obecného rostlinného genu (např. plasticidový gen).

Vlastní metodika popisuje kvalitativní analýzu GM rýže Bt63 pomocí PCR. Podstatou zkoušky je zjistit ve vzorku DNA přítomnost nukleotidové sekvence transgenního konstruktů GM rýže Bt63 pomocí amplifikace specifického úseku konstruktů mezi Bt-genem a NOS terminátorem. Velikost amplifikovaného úseku je 83bp.

Transgenní konstrukt GM rýže Bt63 je uveden na Obrázku 1.

**Obr. 1. Transgenní konstrukt GM rýže Bt63. Upraveno podle lit<sup>2</sup>. Amplifikovaný úsek je mezi primery T51F a T51R je uvozen šipkami.**



Jako pozitivní referenční materiál pro kvalitativní PCR detekci GM rýže Bt63 byly použity plasmidy pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, USA) s vloženým insertem 83bp dlouhého amplikonu specifického úseku Bt63 konstrukt. Po amplifikaci cílové DNA metodou PCR následuje elektroforetické dělení PCR produktů v agarózovém gelu. V transiluminátoru se poté v UV světle vizualizuje hledaný PCR produkt v podobě proužku svítícího na gelu o dané velikosti 83bp.

#### 1.4. Rušivé vlivy – inhibitory

Inhibitory PCR jsou látky různé chemické povahy. Mohou být přítomné přímo v analyzovaných vzorcích nebo do nich vniknou během manipulace se vzorky či reagensii. 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , 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)
$\text{CH}_3\text{COONa}$	> 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, Biotech

1,5 ml sterilní zkumavky, Biogen

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

Erlenmayerova baňka, 500 ml  
Hřebínek do elektroforetické vany  
Chladnička  
Laboratorní parní sterilizátor NÜVE OT 032  
Magnetická míchačka Variomag, monotherm  
Mikrovltná 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

6 x Loading Dye Solution, Fermentas  
100 bp GeneRuler™, Fermentas  
100 x TE pufr Concentrate, Fluka  
Agaróza, Serva  
Deionizovaná voda, sterilní  
EDTA, Serva  
Ethanol (98%), Analytika  
Ethidium bromid, Sigma  
Ethyldiamintetraacetát disodný (Na<sub>2</sub>-EDTA), Sigma-Aldrich  
Ledová kyselina octová, Lachema  
Mikropipety  
NaOH, Sigma  
Plasmid č. 6/09 (s insertem konstrukt specifické sekvence GM rýže Bt63)  
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, Sigma-Aldrich  
Savo, 20%  
Syntetické oligonukleotidy, Applera:  
T51F – forward: gAC TgC Tgg AgT gAT TAT CgA CAg A<sup>2</sup>  
T51R – reverse: AgC TCg gTA CCT CgA CTT ATT CAg<sup>2</sup>  
TOPO TA Cloning kit®, Invitrogen  
TRIS – base, Serva  
Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR, TOP-Bio  
Roztoky:  
50 x TAE předpis č. 1, Příloha č. 1  
Délkový standard DNA předpis č. 2, Příloha č. 1  
EDTA 0,5M předpis č. 3, Příloha č. 1  
Ethanol 70% předpis č. 4, Příloha č. 1  
Nanášecí pufr s indikátory předpis č. 5, Příloha č. 1  
TE pufr předpis č. 6, Příloha č. 1

## 2.3. Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci konstrukt specifické sekvence GM rýže Bt63

Kontrola chemikálií:

1. Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR
2. REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix
3. Pozitivní plasmidová kontrola (6/09)
4. Templátová DNA o koncentraci 20ng/μl
5. Primery T51F (10μM), T51R (10μM)

Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 2.

**Tabulka 2. Složení reakční směsi.**

Složka	Výsledná koncentrace	μl/reakci
Ultra Pure H <sub>2</sub> O pro PCR		6,5 μl
REDTaq <sup>®</sup> ReadyMix <sup>™</sup> PCR Reaction Mix	1 x	12,5 μl
Primer T51F, 10 μM	200 nM	0,5 μl
Primer T51R, 10 μM	200 nM	0,5 μl
Templátová DNA (100 ng)		5 μl
Celkový objem reakce:		25 μl

**Tabulka 3. Parametry pro PCR amplifikaci sekvence specifické pro GM rýži Bt63.**

Krok	Teplota [C°]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	180	1
Denaturace	94	30	35x
Annealing	60	60	
Extense	72	60	
Konečná extense	72	600	1

## 2.6. Příprava a pracovní postup

### 2.6.1. Příprava pracovního prostoru

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.

### 2.6.2. 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.

### 2.6.3. Pracovní postup

- 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.
- Pro každý vzorek se připraví jedna sterilní 0,2 ml zkumavka. Jedna zkumavka je určená pro kontrolu MasterMixovou – místo templátové DNA se k MasterMixu přidá odpovídající objem Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR, jedna zkumavka je určena pro pozitivní plasmidovou kontrolu.
- 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  $\mu$ l do každé připravené 0,2 ml zkumavky. Nejprve se do MasterMixové kontroly přidá 5  $\mu$ l Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR, do každé další zkumavky pak 5  $\mu$ 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 3.

## 2.7. 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 proběhlé elektroforéze proužky rozdělené DNA vizualizovat pod UV světlem.

### 2.7.1. Princip elektroforetické separace na agarózovém gelu

Kontrola PCR produktů probíhá pomocí jejich elektroforetické separace na agarózovém gelu s ethidiem 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.

### 2.7.2. 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 8.

**Tabulka 4. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků.**

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

#### 2.7.2.1. Pracovní postup

1. Na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy.
2. Navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru.
3. Baňka s pufrům 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.
4. Ohřev se ukončí po cca 1 minutě varu, baňka se vyjme z mikrovlnné trouby a opatrně se její obsah krouživým pohybem ještě jednou promíchá.
5. Baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku v digestoři a vloží se do ní míchadélko.

6. Během míchání agarózového gelu se připraví forma na gel s hřebínkem pro vytvoření nanášecích jamek v gelu.
7. 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.
8. 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.
9. Po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků.

### **2.7.3. Elektroforetická separace DNA**

#### **2.7.3.1. Pracovní postup**

1. Po proběhlé PCR reakci se do každé mikrokumavky přidají 3 µl 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 µl délkového standardu 100bp GeneRuler™.
4. Do dalších drah se nanáší vždy 25 µl 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**

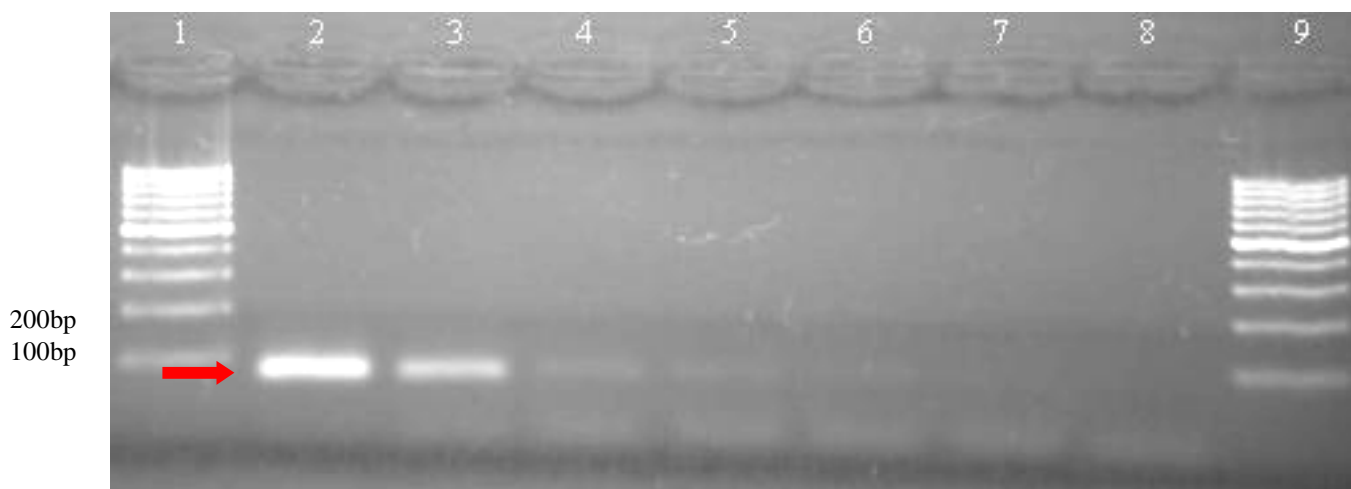
Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci probíhá s pomocí UV záření. Hledaný produkt se v UV světle vizualizuje v podobě svítícího proužku, podle srovnání pozice tohoto proužku s pozicí DNA fragmentů délkového standardu je pak určena délka produktu. Délka PCR ampliconu pro GM rýži Bt63 je 83bp.

### 3. Závěr

Metoda kvalitativní detekce GM rýže Bt63 podle lit<sup>2</sup> byla ověřována z hlediska své specifity a u plasmidového referenčního materiálu z hlediska meze detekce. Mez detekce byla stanovena metodou ředící řady ředěním plasmidové kontroly TE pufrem a dále metodou ředící řady ředěním plasmidové kontroly rýžovou genomickou DNA.

Obrázek č. 2 ukazuje mez detekce pozitivní plasmidové kontroly 6/2009 pro kvalitativní stanovení GM rýže Bt63 ředěné TE pufrem. Šipkou je označena pozice specifického PCR amplikonu o velikosti 83bp po elektroforetickém dělení PCR produktů na 2% agarózovém gelu.

**Obrázek č. 2. Fotografie 2% agarózového gelu, PCR reakce pro kvalitativní analýzu GM rýže Bt63. Mez detekce ředěním TE pufrem.**

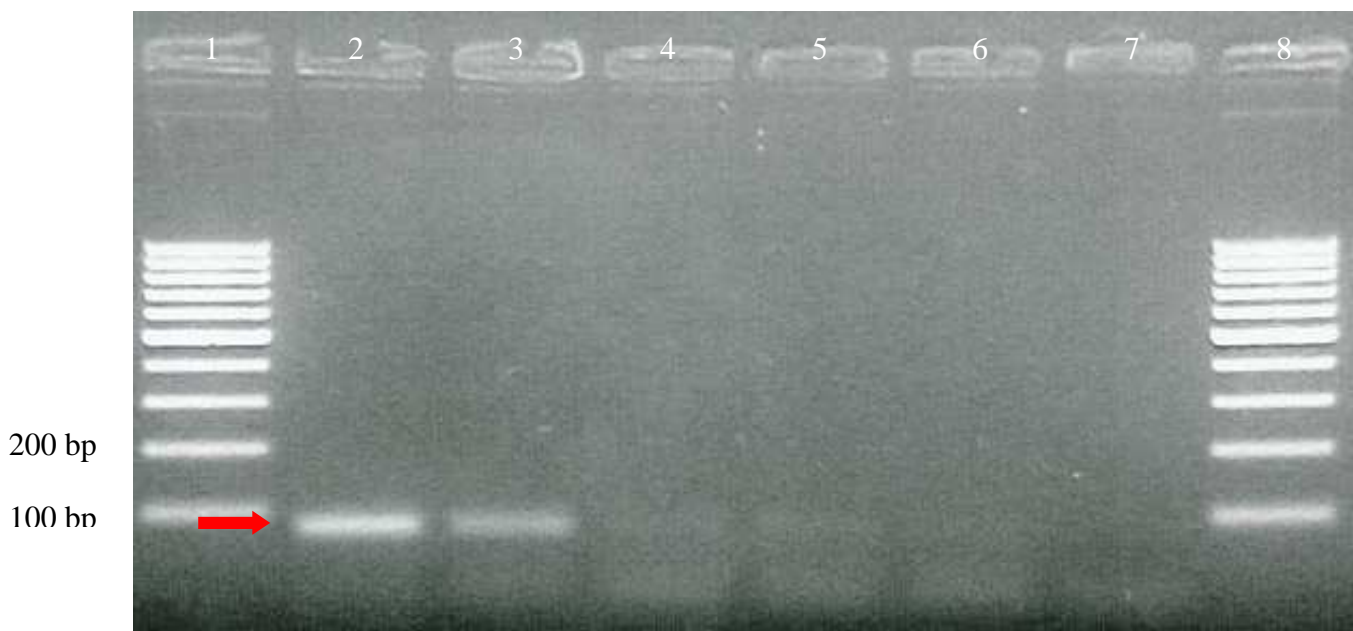


1,9 = délkový standard 100bp; 2 = poz. plasmidová kontrola 6/09 (0,2 ng/μl); 3 = 6/09 (0,02 ng/μl); 4 = 6/09 (0,002 ng/μl); 5 = 6/09 (0,001 ng/μl), 6 = (0,0005 ng/μl), 7 = (0,00025 ng/μl), 8 = kontrola MasterMixu.

Jako mez detekce pozitivní plasmidové kontroly GM rýže Bt63 6/2009 byla stanovena metodou ředící řady s použitím TE pufru hodnota 0,001 ng/μl (jamka č. 5), což odpovídá 0,005 ng plasmidové kontroly v reakci.

Obrázek č. 3 ukazuje mez detekce pozitivní plasmidové kontroly 6/2009 pro kvalitativní stanovení GM rýže Bt63 ředěné netransgenní rýžovou genomickou DNATE pufrem. Šipkou je označena pozice specifického PCR amplikonu o velikosti 83bp po elektroforetickém dělení PCR produktů na 2% agarózovém gelu.

**Obrázek č. 3. Fotografie 2% agarózového gelu, PCR reakce pro kvalitativní analýzu GM rýže Bt63. Mez detekce ředím netransgenní rýžovou genomickou DNA.**

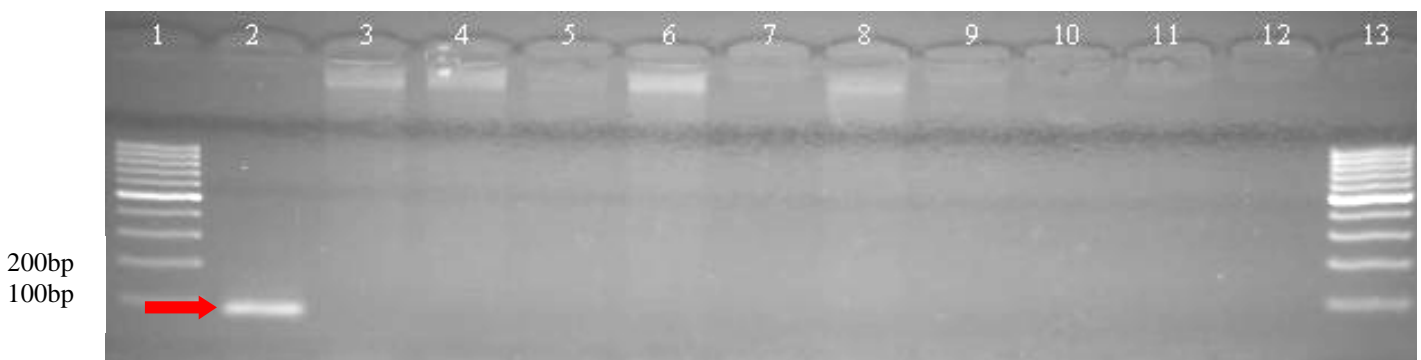


1,8 = délkový standard 100bp; 2 = poz. plasmidová kontrola 6/09 (0,2 ng/μl); 3 = 6/09 (0,02 ng/μl); 4 = 6/09 (0,002 ng/μl); 5 = 6/09 (0,001 ng/μl), 6 = (0,0005 ng/μl), 7 = kontrola MasterMixu.

Jako mez detekce pozitivní plasmidové kontroly GM rýže Bt63 6/2009 byla stanovena metodou ředící řady s použitím netransgenní genomické DNA rýže hodnota 0,001 ng/μl (jamka č. 5), což odpovídá 0,005 ng plasmidové kontroly v reakci.

Na Obrázku č. 4 je ukázána specifita PCR zkoušky pro kvalitativní analýzu GM rýže Bt63. Šipka označuje pozici specifického PCR amplikonu o velikosti 83bp po elektroforetickém dělení PCR produktů na 2% agarózovém gelu. Reakce byla provedena u vybraných GM v kukuřici (GA21 – tolerance k herbicidu glufosinate ammonium, MON810 – odolnost vůči hmyzu (*Ostrinia nubilalis*), MON863 – odolnost vůči hmyzu (Coleopteran, *Diabrotica sp.*), MIR604 – odolnost vůči hmyzu (Coleopteran, *Diabrotica sp.*), NK603 – tolerance k herbicidu glufosinate ammonium), v sóje (RoundUp Ready sója – tolerance k herbicidu glufosinate ammonium) a dále u netransgenních DNA pšenice a ječmene, které jsou častou součástí krmných směsí.

**Obrázek č. 4. Fotografie 2% agarózového gelu, specifita PCR reakce pro kvalitativní analýzu GM rýže Bt63.**



1,13 = délkový standard 100bp; 2 = poz. plasmidová kontrola 6/09 (0,2 ng/μl); 3 = 1% GA21 4 = 1% MON810; 5 = 1% MON863, 6 = 1% Bt176; 7 = 1% MIR604; 8 = 1% NK603; 9 = 1% RR; 10 = pšenice; 11 = ječmen; 12 = kontrola MasterMixu.

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

1. [http://www.mzp.cz/ris/ais-risdb-ec-table.nsf/3F4AD2EA528FD210C125743B00227B22/\\$file/32008D0289.pdf](http://www.mzp.cz/ris/ais-risdb-ec-table.nsf/3F4AD2EA528FD210C125743B00227B22/$file/32008D0289.pdf)
2. Mäde D, Degner C, Grohmann L (2006) Eur Food Res Technol 224:271–278
3. Grohmann L, Mäde D (2009) Eur Food Res Technol 228:497–500

## 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 problematikou stanovení GMO také 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): 75–81.

# 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

#### Délkový standard DNA

**Příprava:** 100 µl délkového standardu 50bp GeneRuler™ se smíchá se 100 µl 6 x Loading Dye Solution a se 400 µl PCR Ultra H<sub>2</sub>O. Po promíchání vortexem se délkový standard rozpipetuje do alikvotů v mikrozkuvkách po 100 µl. Uchovává se v chladničce při 4°C.

### Roztok č. 3

#### EDTA 0,5M

**Příprava:** 93,05 g Na<sub>2</sub>-EDTA.2H<sub>2</sub>O 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. 4

#### Ethanol cca 70%

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

### Roztok č. 5

#### Nanášecí pufr s indikátory

**Příprava:** 1 díl nanášecího pufru 6 x Loading Dye Solution se smíchá se 2 díly PCR Ultra H<sub>2</sub>O. Uchovává se v chladničce při 4°C.

### Roztok č. 6

#### TE pufr

**Příprava:** Zásobní roztok 100 x TE pufru se naředí s PCR Ultra H<sub>2</sub>O v poměru 1:99, alikvoty se uchovávají v mikrozkuvkách v mrazáku při -20°C.



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

**2009**