



národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR

Vráblík, Aleš; Hodek, Jan; Ovesná, Jaroslava
2012

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-124033>

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

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

Datum stažení: 01.06.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Aleš Vráblík, Jan Hodek, Jaroslava Ovesná

Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR



METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2012

Metodika byla vypracována pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting díky finančnímu příspěví NAZV, projekt číslo: QI101B267

Autoři: Ing. Aleš Vráblík
Mgr. Jan Hodek
RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Název: Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR

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

Náklad: 50 ks

Vyšlo v roce: 2012

Kontakt na autory: vrablik@vurv.cz
hodek@vurv.cz
ovesna@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2012
ISBN 978-80-7427-096-3

Aleš Vráblik, Jan Hodek, Jaroslava Ovesná

Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR

METODIKA PRO PRAXI

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2012

Detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR

Tato metodika byla vypracována pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting a je určena kontrolním laboratořím státní správy a privátním laboratořím, které provádějí analýzy potravin či krmiv z různých rostlinných matric. Metoda může být rovněž využita jako výchozí bod pro kvantifikaci GM hrachu v analyzovaném vzorku.

Metodika popisuje detekci vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR a real-time PCR s využitím nově vyvinutých specifických primerů. Podstatou zkoušky je zjistit ve vzorku přítomnost nukleotidové sekvence specifické pro lektin, vnitřní gen hrachu setého. Vzhledem k tomu, že v řadě matric je DNA poškozena výrobními postupy, využívá se amplifikace krátkého úseku DNA.

Po amplifikaci cílové DNA metodou PCR následuje elektroforetická separace PCR produktů v agarózovém gelu. V transiluminátoru se poté v UV světle vizualizuje hledaný PCR produkt v podobě proužku svítícího na gelu v předem určené pozici.

Nově vyvinuté primery byly rovněž verifikovány pro metodu real-time PCR s využitím SYBR[®] Green detekce. U dané metody byla ověřena specificita a rovněž byl stanoven detekční a kvantifikační limit.

PCR based assay for detection garden pea *lec* gene

The method was developed and verified by staff of National reference laboratory for GMO identification and DNA fingerprinting suited for governmental control laboratories and private laboratories that analyze food and feed derived from various plant matrices. Method can be applied for quantification of GM pea in a sample, when reference gene is used as a standard.

The method describe internal garden pea specific gene, lektin in this case, detection using PCR and real-time PCR. The general principle of the assay relies on lektin specific sequence presence that represents a species specific gene of garden pea. In many matrices DNA is damaged so amplification of short stretches of DNA is used.

After amplification of target exploiting newly developer species specific gene primers PCR products are separated by electrophoresis in agarose gel. Resulting band is visualized by UV light and its position is compare with size standard.

Alternatively, real-time PCR and ABI platform in combination with SYBR[®] Green can be used. Reaction parameters are described and specificity of reaction was verified. LOD as well as LOQ was defined.

Oponenti:

Prof. RNDr. Jaroslav Drobník, CSc. – PšF UK – Katedra genetiky a mikrobiologie

MVDr. Kateřina Staňková - ÚKZÚZ

Metodika byla schválena Úsekem potravinářských výrob – Úřadem pro potraviny Ministerstva zemědělství ČR dne 24. 04. 2012, Osvědčení č. 2/2012.

OBSAH

1. Cíl metodiky	7
2. Vlastní popis metodiky	7
2.1. Termíny a definice	7
2.2. Princip metody	8
2.3. Rušivé vlivy – inhibitory	8
2.4. Přístrojové vybavení a materiál	9
2.5. Chemikálie a roztoky	10
2.6. Příprava plazmidové kontroly	10
2.6.1. Příprava PCR produktu pro klonování	11
2.6.2. Klonování plazmidové kontroly	12
2.7. Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci specifické sekvence vnitřního genu hrachu setého (lektinu)	13
2.7.1. Příprava pracovního prostoru	13
2.7.2. Příprava chemikálií	13
2.7.3. Pracovní postup pro PCR	14
2.7.4. Pracovní postup pro r-tPCR	15
2.8. Kontrola PCR produktů	16
2.8.1. Princip elektroforetické separace na agarózovém gelu	16
2.8.2. Příprava 2 % agarózového gelu	16
2.8.3. Elektroforetická separace DNA	17
2.8.4. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci	17
2.9. Závěr	18
2.9.1. Detekce metodou PCR	18
2.9.2. Detekce metodou real-time PCR	19
3. Srovnání novosti postupů	22
4. Popis uplatnění certifikované metodiky	23
5. Ekonomické aspekty	23
6. Seznam použité související literatury	23
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	24

Příloha 1 – příprava roztoků

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout metodický základ pro provedení PCR analýzy vzorků z různých potravinářských či krmivářských matric na přítomnost vnitřního genu hrachu setého lektinu, a tím potvrdit či vyvrátit přítomnost hrachu setého v analyzované směsi.

Metodiku detekce vnitřního genu hrachu setého lze využít jako metodu pro detekci hrachu setého ve výrobcích, které jsou určeny pro osoby s diagnostikovanou alergií na hrách setý. Četnost výskytu alergie na hrách je sice méně zastoupena než např. alergie na podzemnici olejnou či sóju (KVASNIČKOVÁ 1998; ŠPIČÁK & PANZNER 2004), nicméně hrách setý může být alergenem zejména u dětí a může způsobovat atopickou dermatitidu, astma, alergickou rýmu, dušnost, angioedém, průjem, kontaktní dermatitidu, křeče v břiše či zvracení (KOHOUT 1994; KVASNIČKOVÁ 1998).

Metodiku detekce vnitřního genu hrachu setého lze také využít jako výchozí bod pro kvantifikaci GM hrachu v potravinářských či krmivářských produktech (RAKOUSKY *et al.* 2004; SVABOVA *et al.* 2005).

Metodika je dedikována Národní agentuře pro zemědělský výzkum, projekt číslo: QI101B267

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Termíny a definice

Amplifikace – zesílení, v případě DNA zmnožení.

Amplikon – ohraničený amplifikovaný úsek DNA.

DNA – deoxyribonukleová kyselina.

Lektin – vnitřní gen rostlin čeledě bobovitých (*Fabaceae*), v případě této metodiky vnitřní gen hrachu setého (*Pisum sativum*).

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

- DNA (templát)
- dNTPs – 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 MgCl₂
- DNA polymeráza

Cyklus PCR se skládá ze tří základních kroků. V prvním kroku je templát (dvoušroubovicová DNA sloužící 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 (extenze 60 – 72 °C).

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.

Plazmid – 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.

r-tPCR – (real-time Polymerase Chain Reaction) – řetězová polymerázová reakce sledovaná v reálném čase.

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

Termocykler – je přístroj umožňující programované změny teplot v mikrozkušnicích či platech (pro r-tPCR), které obsahují reakční směs pro PCR.

2.2. Princip metody

Metoda popisuje detekci vnitřního genu hrachu setého (lektinu) pomocí PCR. Podstatou zkoušky je zjistit ve vzorku přítomnost nukleotidové sekvence specifické pro lektin, vnitřní gen hrachu setého. Vzhledem k tomu, že v řadě matric je DNA poškozená výrobními postupy, využívá se amplifikace krátkého úseku DNA (101 bp).

Po amplifikaci cílové DNA následuje elektroforetické dělení PCR produktů na agarózovém gelu.

V transiluminátoru se poté v UV světle vizualizuje hledaný PCR produkt v podobě proužku svítícího na gelu v předem určené pozici – v tomto konkrétním případě v pozici odpovídající 101 bp.

Metoda detekce vnitřního genu hrachu setého (lektinu) byla rovněž aplikována pomocí r-tPCR s využitím SYBR[®] Green detekce.

2.3. 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* 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 matricích 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)

2.4. Přístrojové vybavení a materiál

7900 Fast Real-Time PCR system	Applied Biosystems, USA
autokláv OT 032	Nüve, Turecko
centrifuga Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Universal 32R	Boeco, Německo
fotodokumentační zařízení	BioTech, Česká republika
hlubokomrazicí box (- 80 °C)	New Brunswick Scientific, Anglie
horizontální DNA elektroforézy SCIE-PLAS	Labnet, Česká republika
horkovzdušný laboratorní sterilizátor FN 120	Nüve, Turecko
lednice (4 °C)	Whirlpool, USA
mikropipety	Nichiryo, Japonsko
mikrovlnná trouba	Daewoo, Jižní Korea
mini centrifuga SPECTRAFUGE	Labnet, Česká republika
mrazicí box (- 20 °C)	Liebherr, Německo
nanophotometer	Implen GmbH, Německo
pH metr	Hamilton, USA
předvážky Navigátor	Ohaus corporation, Švýcarsko
termocykler pro PCR MJTB – 96	Bio – Rad, USA
thermomixer confort	Eppendorf, Německo
vodní lázeň LWB	Labtech, Česká republika
vortex mixer VX-200	Labnet, Česká republika
zdroj k elektroforézám	Consort, Belgie

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.

2.5. Chemikálie a roztoky

Agarose Serva	SERVA, Německo
AmpliTaq Gold [®] with GeneAmp [®]	Applied Biosystems, USA
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
dNTP mix 10 mM	MBI Fermentas, Kanada
Ethanol	Analytika, Česká republika
ethidium bromid	SIGMA-ALDRICH, USA
H ₂ O pro PCR (DNase and Rnase free)	SIGMA-ALDRICH, USA
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Applied Science, Německo
použité oligonukleotidové sekvence	Generi Biotech, Česká republika
Power SYBR [®] GREEN	Applied Biosystems, USA
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, USA
TRIS – HCl	SERVA, Německo
TRIS base	SERVA, Německo
λ DNA/100 bp marker	MBI Fermentas, Kanada
λ DNA/Hind III marker	MBI Fermentas, Kanada

Tabulka 2. Použité primery

název primeru	nukleotidová sekvence (5' - 3')	velikost produktu (bp)
Lec658 F	CCGAACAACCTCGAAGAAATAC	658
Lec658 R	ACTCTGCGCTATTGAAAACCTCC	
Lec101 F	CCCGACCAACAAAACCTAAT	101
Lec101 R	TAGAGGGCTCTGCCAACAGT	

Příprava jednotlivých roztoků je uvedena v Příloze 1 – příprava roztoků

2.6. Příprava plazmidové kontroly

Jako pozitivní kontrola pro PCR nebo r-tPCR se použije plazmidová kontrola získaná pomocí PCR produktu primerů Lec658 (Tabulka 2.), kde jako templát slouží DNA hrachu setého.

2.6.1. Příprava PCR produktu pro klonování

2.6.1.1. Příprava pracovního prostoru

Otřou se pracovní plochy a pipety čerstvě připraveným 20 % roztokem SAVA, otřou se pracovní plochy a pipety 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.

Kontrola chemikálií pro PCR:

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. Pufr AmpliTaq 10x
3. Mg²⁺ o koncentraci 25 mM
4. dNTP o koncentraci 10 mM
5. Templátová DNA o koncentraci 20ng·μl⁻¹
6. Primery Lec658 F (10μM), Lec658 R (10μM) (Tabulka 2.)
7. AmpliTaq GOLD[®] polymeráza 5 U · μl⁻¹

Složení reakční směsi pro PCR s primery Lec658 je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3. Složení reakční směsi pro PCR

složka	koncentrace zásobního roztoku	objem do jedné reakce [μl]	finální koncentrace v reakční směsi
H ₂ O pro PCR	-	12,8	-
pufr AmpliTaq	10x	2,5	1x
Mg ²⁺	25 mM	1,5	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,5	0,2 mM
Lec658 F	10 μM	1,25	0,5 μM
Lec658 R	10 μM	1,25	0,5 μM
AmpliTaq GOLD [®]	5 U · μl ⁻¹	0,2	1 U · μl ⁻¹

2.6.1.3. Pracovní postup pro PCR

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 určená pro kontrolu MasterMixovou – místo templátové DNA se k MasterMixu přidá odpovídající objem Ultra Pure H₂O pro PCR.

- Do 1,5 ml reakční zkumavky na ledu se přidají komponenty MasterMixu (Tabulka č. 3) v daném pořadí. MasterMix se připravuje s výjimkou DNA. Celkový připravený objem MasterMixu je $V = V_1 \cdot (n + 1)$, kde V_1 je objem MasterMixu potřebný pro 1 vzorek, n je počet všech vzorků, včetně kontrol a jeden vzorek navíc se přidá na chybu při pipetování.
- MasterMix se důkladně, ale jemně promíchává po dobu minimálně 10 s (vortex, obracení zkumavky).
- 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 (jako templát zde slouží DNA hrachu setého).
- Zkumavky se krátce stočí na stolní minicentrifuze.
- Vzorky se vloží do cykleru a zahájí se PCR amplifikace podle parametrů v Tabulce 4.

Tabulka 4. Teplotní profil PCR s primery Lec658

Aktivace AmpliTaq Gold polymerázy	95 °C – 12 min	} Amplifikace 40 cyklů
Denaturace	95 °C – 30 s	
Annealing	60 °C – 30 s	
Extenze	72 °C – 30 s	
Konečná extenze	72 °C – 10 min	

2.6.2. Klonování plazmidové kontroly

Pro přípravu plazmidové kontroly se použije klonovací kit TOPO TA Cloning[®], Invitrogen <www.invitrogen.com>. Tento kit využívá pro vkládání DNA do vektoru lepivých konců a umožňuje modro – bílou selekci transformovaných bakterií. Jako templát pro klonování se použije PCR produkt primerů Lec658.

Do 0,5 ml mikrozkušavky se napipetuje 4 μ l PCR produktu, 1 μ l solného roztoku (finální koncentrace 1,2 M NaCl a 0,06 M MgCl₂) a 1 μ l TOPO[®] vektoru. Směs se jemně promíchá a inkubuje 30 min při laboratorní teplotě. Následně se přidá 2 μ l TOPO[®] klonovací směsi, mikrozkušavka se jemně promíchá proklepáním a inkubuje se 30 minut na ledě.

Po uplynutí inkubace se mikrozkušavka umístí do vodní lázně o teplotě 42 °C po dobu 30 s a následně se ponechá 2 minuty na ledu. Po inkubaci se přidá 250 μ l S.O.C. média (2 % Trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza) a ponechá se třepat v termobloku (200 rpm) při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Po jedné hodině se přenesou 150 μ l roztoku na předem připravenou Petriho misku s LB agarem. Takto připravené misky se následně ponechají přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C.

Druhý den se přeočkují narostlé bílé kolonie (bakterie s vektorem obsahujícím vloženou DNA) sterilním párátkem na novou Petriho misku s LB agarem, a takto přeočkované bakterie se opět ponechají v inkubátoru při teplotě 37 °C přes noc.

Z důvodu nevhodnosti plazmidů v cirkulární formě jako templátů do PCR a r-tPCR (HOU *et al.*, 2010), se plazmidy pro tyto účely linearizují. Pro linearizaci plazmidu se použije restriční enzym *Hind III*, jehož právě jedno štěpné místo použité plazmidy obsahují.

2.7. Řetězová polymerázová reakce (PCR) pro amplifikaci specifické sekvence vnitřního genu hrachu setého (lektinu)

2.7.1. Příprava pracovního prostoru

Otřou se pracovní plochy a pipety čerstvě připraveným 20 % roztokem SAVA, otřou se pracovní plochy a pipety 70 % roztokem etanolu. Je vhodné vystavit pracovní plochu germicidnímu záření UV lampy po dobu minimálně 15 minut.

2.7.2. 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.

Kontrola chemikálií pro PCR:

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. Pufr AmpliTaq 10x
3. Mg²⁺ o koncentraci 25 mM
4. dNTP o koncentraci 10 mM
5. Templátová DNA o koncentraci 20ng·μl⁻¹
6. Primery Lec101 F (10μM), Lec101 R (10μM) (Tabulka 2.)
7. AmpliTaq GOLD[®] polymeráza 5 U · μl⁻¹

Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Složení reakční směsi pro PCR

složka	koncentrace zásobního roztoku	objem do jedné reakce [μl]	finální koncentrace v reakční směsi
H ₂ O pro PCR	-	14,1	-
pufr AmpliTaq	10x	2,5	1x
Mg ²⁺	25 mM	1,5	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,5	0,2 mM
Lec101 F	10 μM	0,6	0,24 μM
Lec101 R	10 μM	0,6	0,24 μM
AmpliTaq GOLD [®]	5 U · μl ⁻¹	0,2	1 U · μl ⁻¹

Kontrola chemikálií pro r-tPCR

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. SYBR[®] Green MasterMix
3. Primery Lec101 F (10μM), Lec101 R (10μM) (Tabulka 2.)

Složení reakční směsi pro r-tPCR je uvedeno v Tabulce 6

Tabulka 6. Složení reakční směsi pro r-tPCR

složka	koncentrace zásobního roztoku	objem do jedné reakce [μl]	finální koncentrace v reakční směsi
H ₂ O	-	19,5	-
Lec101 F	10 μM	0,25	0,05 μM
Lec101 R	10 μM	0,25	0,05 μM
SYBR [®] Green	2x	25	1x

2.7.3. Pracovní postup pro PCR

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 určená pro kontrolu MasterMixovou – místo templátové DNA se k MasterMixu přidá odpovídající objem Ultra Pure H₂O pro PCR, jedna zkumavka je určena pro pozitivní plazmidovou kontrolu.
3. Do 1,5 ml reakční zkumavky na ledu se přidají komponenty MasterMixu (Tabulka č. 5) v daném pořadí. MasterMix se připravuje s výjimkou DNA. Celkový připravený objem MasterMixu je $V = V_I \cdot (n + 1)$, kde V_I 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 μl do každé připravené 0,2 ml zkumavky. Nejprve se do MasterMixové kontroly přidá 5 μl Ultra Pure H₂O pro PCR, do každé další zkumavky pak 5 μl templátové DNA jednotlivých vzorků. Pozitivní (plazmidová) 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 7.

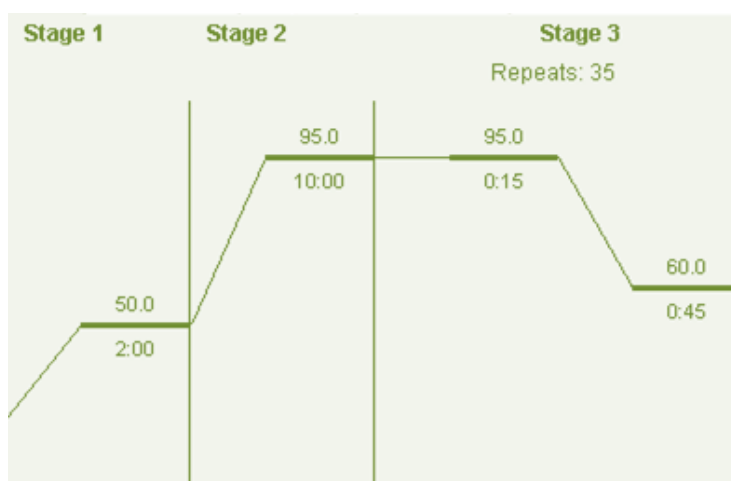
Tabulka 7. Teplotní profil PCR

Aktivace AmpliTaq Gold polymerázy	95 °C – 12 min	} Amplifikace 40 cyklů
Denaturace	95 °C – 30 s	
Annealing	65 °C – 30 s	
Extenze	72 °C – 30 s	
Konečná extenze	72 °C – 10 min	

2.7.4. Pracovní postup pro r-tPCR

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. Do 1,5 ml mikrozkuřavky pro MasterMix se pipetují jednotlivé složky MasterMixu dle Tabulky 6.
3. Připravený MasterMix se důkladně, ale jemně promíchá pomocí vortexu a pipetuje se do 96 jamkové destičky.
4. Do 96 jamkové destičky se k 20μl MasterMixu přidá 5 μl templátové DNA. Pozitivní (plazmidová) kontrola se přidává jako poslední.
5. Destička se stočí na centrifuze po dobu 1 min.
6. Destička se vzorky se vloží do r-tPCR cyklieru a po nastavení termálního profilu podle Tabulky 8 se spustí PCR amplifikace.

Tabulka 8. Teplotní profil r-tPCR.



2.8. Kontrola PCR produktů

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

Při použití r-tPCR lze signál reakce odečíst přímo z monitoru PC (Obr. 3 a Obr. 4). Produkty vzniklé r-tPCR se tak mohou, ale nemusejí kontrolovat elektroforetickou separací.

2.8.1. 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, použitým elektroforetickým 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.

2.8.2. 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, navážky agarózy a objem ethidia bromidu podle počtu vzorků je uveden v Tabulce 9.

Tabulka 9. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků

pufr 1x TAE [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	17 a více

2.8.2.1. 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.

2.8.3. Elektroforetická separace DNA

2.8.3.1. 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 pufrem.
3. Do první a poslední dráhy se nanese 4 μ l délkového standardu 100bp marker.
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 – 60 V.
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.

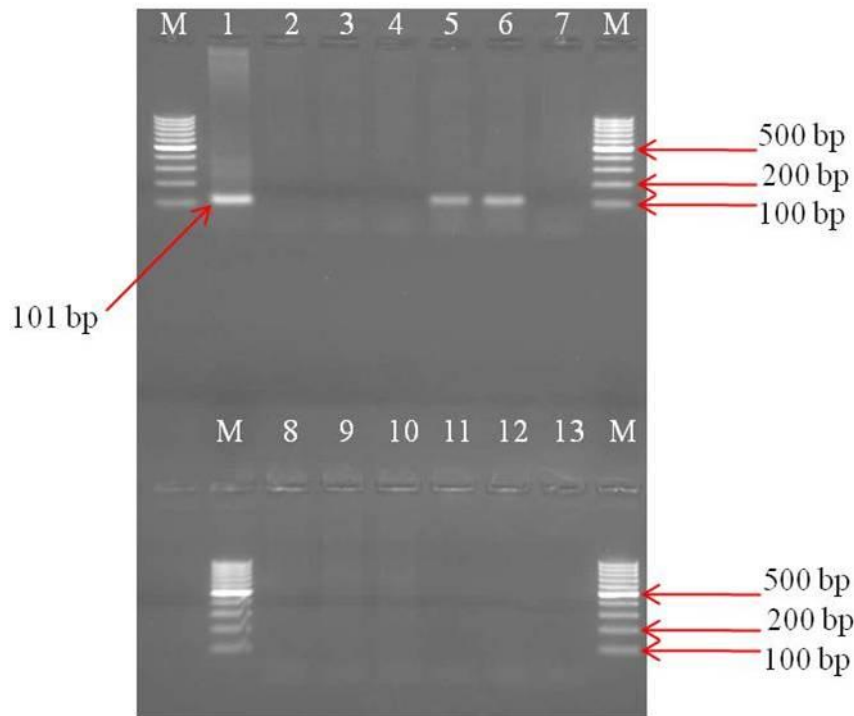
2.8.4. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

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 ampliconů hrachového lektinu je při použití této detekční metody rovna 101 bp.

2.9. Závěr

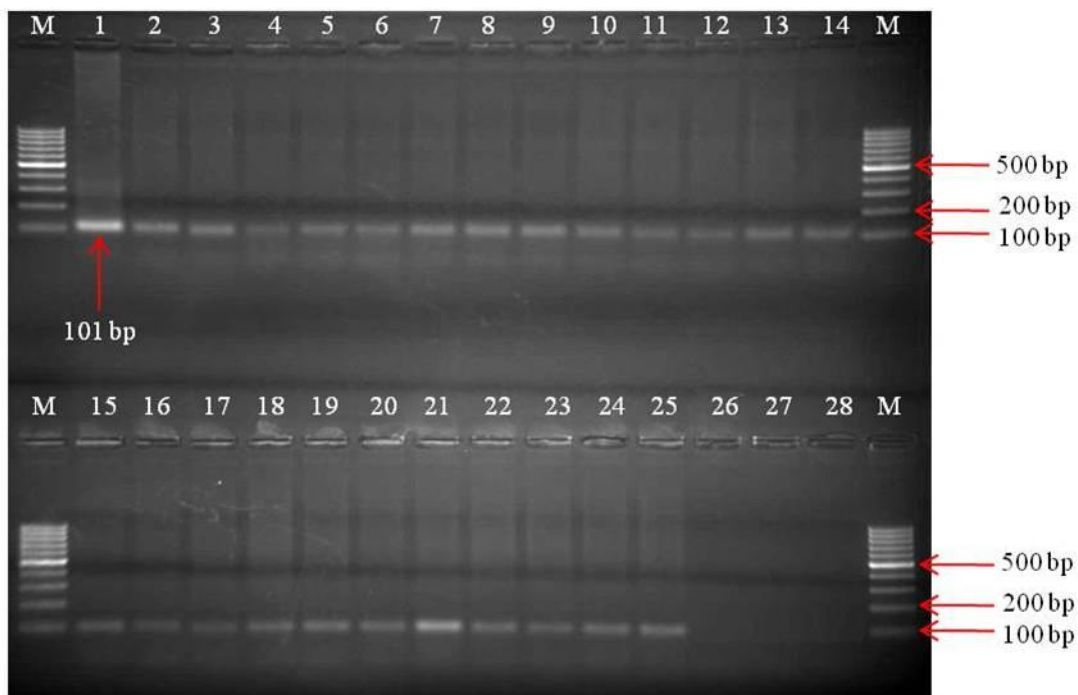
2.9.1. Detekce metodou PCR

Na Obr. 1 je znázorněn test specifčnosti primerů Lec101 pomocí PCR po elektroforetické separaci. Jako templát byla použita DNA vybraných druhů rostlin z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Velikost očekávaného produktu byla 101 párů bazí. CTRL na následujících obrázcích značí zařazené negativní kontroly (CTRL EX – extrakční kontrola, CTRL MM – kontrola MasterMixu a CTRL MM ot – kontrola MasterMixu otevřená).



Obr. 1: Ověření specifcitivity primerů 101 na DNA izolované ze suchých plodů rostlin čeledi bobovitých: M – délkový standard 100bp, 1 – plasmidová kontrola, 2 – vikev, 3 – sója A, 4 – sója B, 5 – hrách A, 6 – hrách B, 7 – čočka A, 8 – čočka B, 9 – fazol A, 10 – fazol B, 11 – CTRL EX, 12 – CTRL MM, 13 – CTRL MM – otevřená, M – délkový standard 100bp.

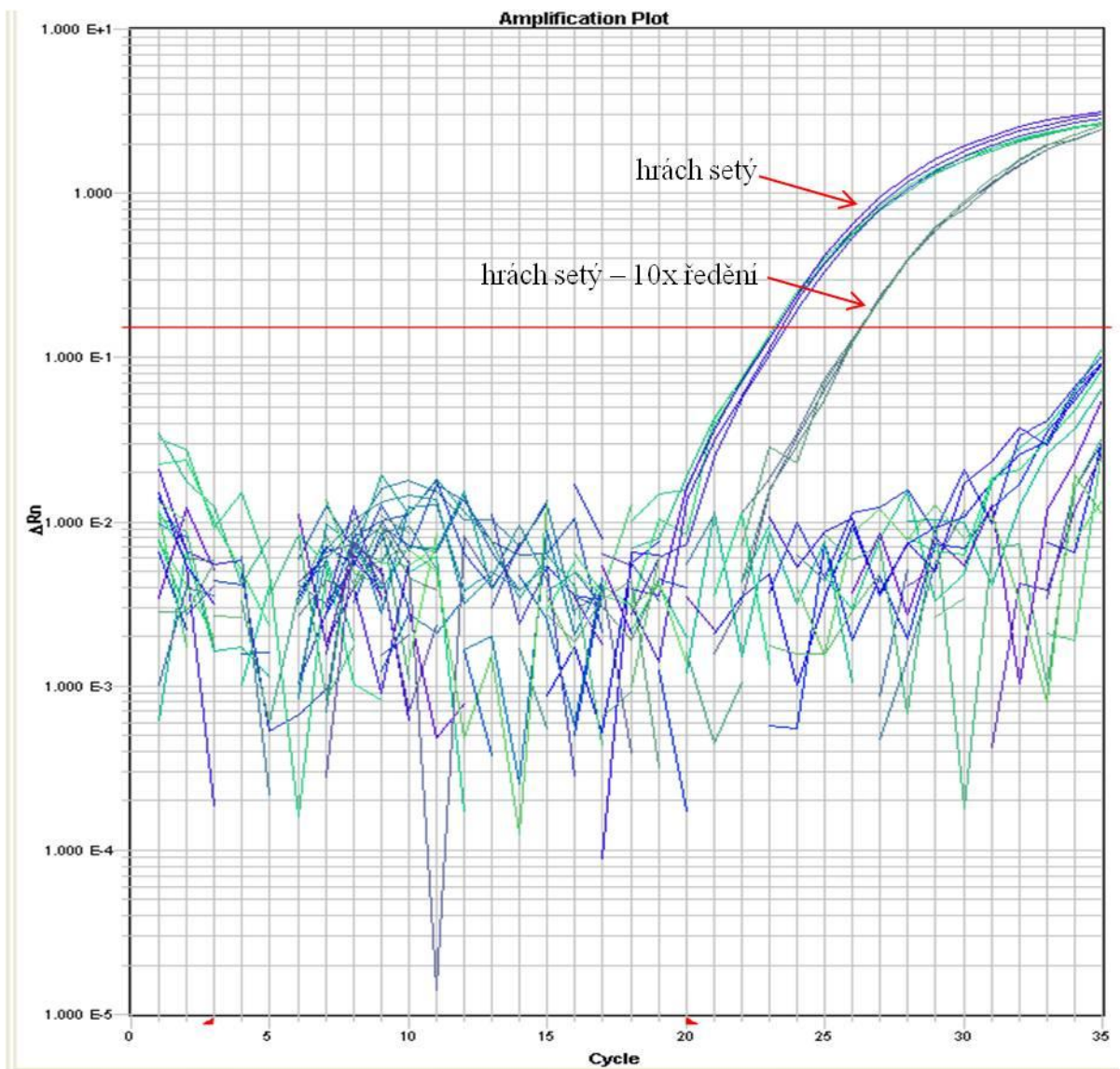
Obr. 2 znázorňuje test odrůdové specifčnosti primerů Lec101 pomocí PCR po elektroforetické separaci, kde jako templát sloužila DNA vybraných komerčně dostupných kultivarů hrachu setého. Velikost očekávaného produktu byla rovněž 101 párů bazí.



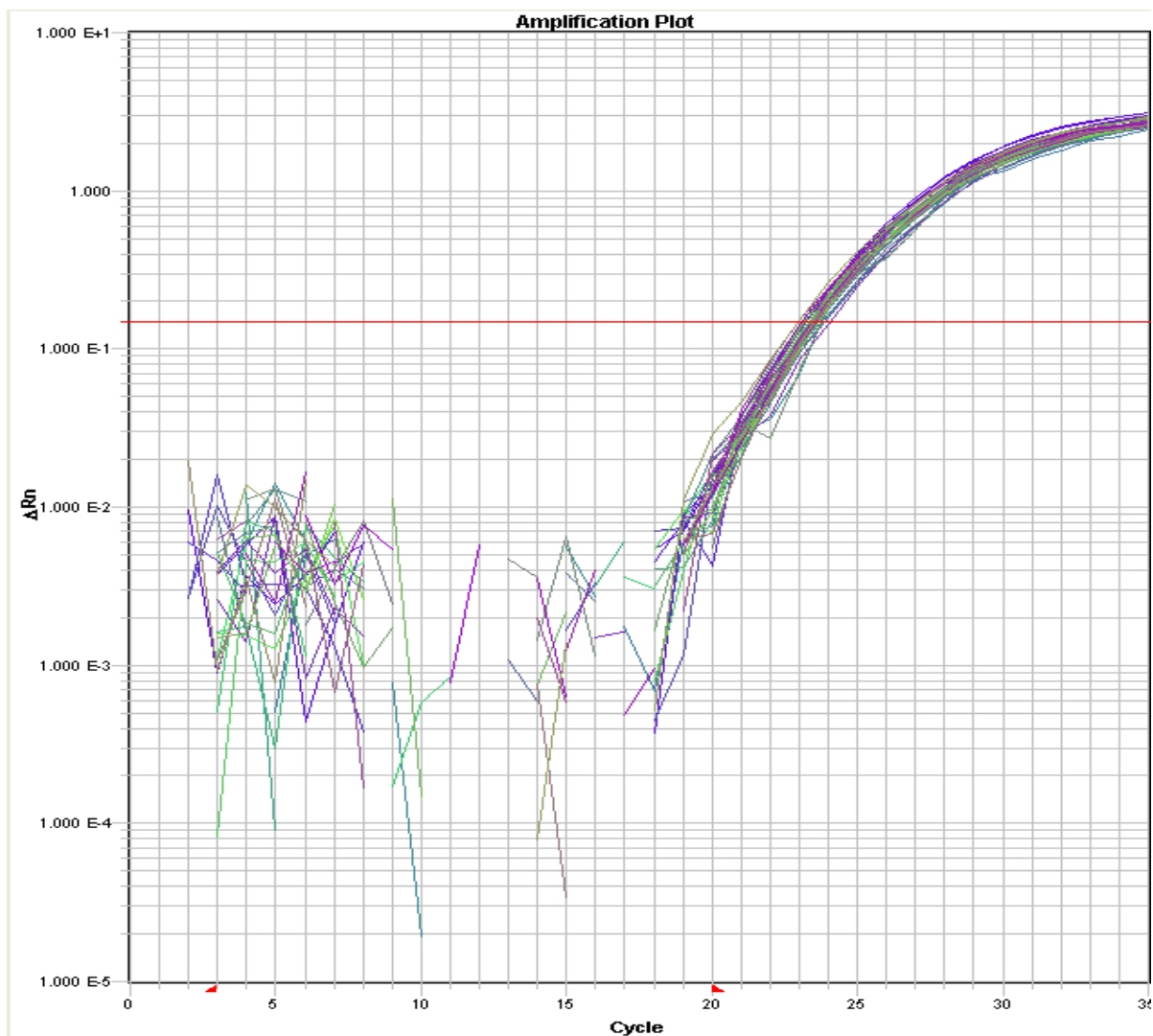
Obr. 2: Ověření specifity primerů 101 u vybraných odrůd hrachu setého: M – délkový standard 100bp, 1 – plasmidová kontrola, 2 – Alderman A, 3 – Alderman B, 4 – Arvika A, 5 – Arvika B, 6 – Bajka A, 7 – Bajka B, 8 – Bohatyr A, 9 – Bohatyr B, 10 – Dalila A, 11 – Dalila B, 12 – Havel A, 13 – Havel B, 14 – Oskar A, 15 – Oskar B, 16 – Pegaz A, 17 – Pegaz B, 18 – Rondo A, 19 – Rondo B, 20 – Zázrak z Kelvedonu A, 21 – Zázrak z Kelvedonu B, 22 – Ambrosia A, 23 – Ambrosia B, 24 – Delikata A, 25 – Delikata B, 26 – CTRL EX, 27 – CTRL MM, 28 – CTRL MM – otevřená, M – délkový standard 100bp.

2.9.2. Detekce metodou real-time PCR

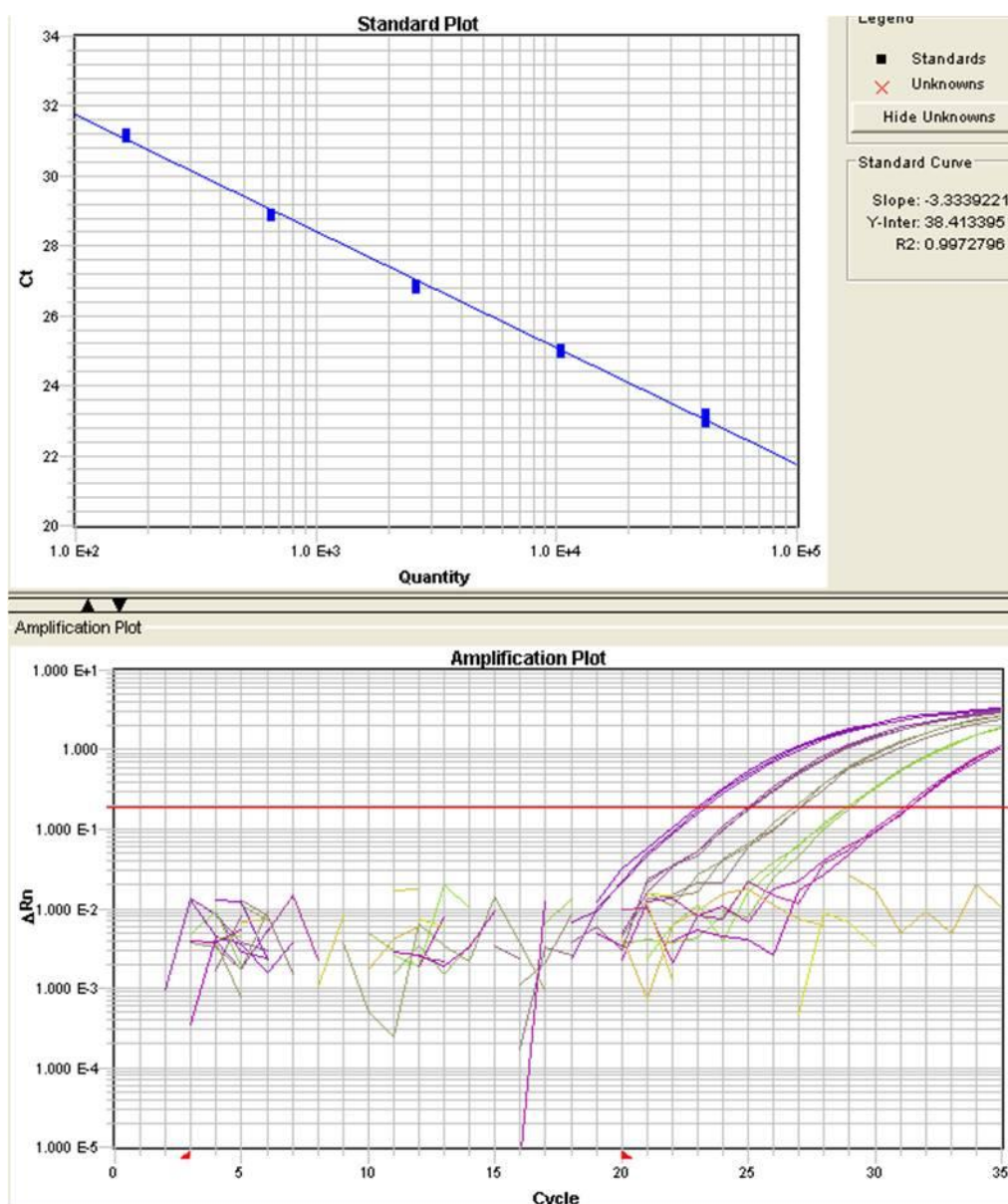
Test druhové a odrůdové specifčnosti proběhl rovněž pomocí r-tPCR při použití SYBR[®] Green detekce (Obr. 3 a Obr. 4). Dále byl stanoven limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) dané reakce. Detekční limit byl stanoven na 40 kopiích DNA hrachu setého a kvantifikační limit na 160 kopiích DNA hrachu setého. Detekční i kvantifikační limit byl stanoven pomocí ředící řady genomické DNA hrachu setého, kde výchozí bod kalibrační přímky obsahoval 41000 kopií DNA a ředil se ultra čistou vodou pro PCR v poměru 1 : 3 až do bodu 7 (10 kopií DNA). Efektivita dané reakce byla 99 % (Obr. 5).



Obr. 3: Průběh real-time PCR s DNA izolovanou z bobovitých rostlin.



Obr. 4: Průběh real-time PCR s různými odrůdami hrachu setého, logaritmický tvar křivky.



Obr. 5: Stanovení LOD, LOQ a efektivty r-tPCR reakce s primery Lec101

3. Srovnání novosti postupů

Tato metodika vychází z PCR a real – time PCR. Dané metody jsou běžně používané v laboratořích, zabývajících se molekulární biologií. Předkládaná metodika popisuje možnost detekce a kvantifikace vnitřního genu hrachu setého zcela novým přístupem, za použití vlastních oligonukleotidových sekvencí.

Do této doby nebyla publikována metodika zabývající se detekcí a kvantifikací hrachu setého metodou PCR a real – time PCR.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodiku detekce vnitřního genu hrachu setého lze využít jako metodu pro detekci hrachu setého ve výrobcích, které jsou určené pro osoby s diagnostikovanou alergií na hrách setý. Četnost výskytu alergie na hrách je sice méně zastoupena než např. alergie na podzemnici olejnou či sóju (KVASNIČKOVÁ 1998; ŠPIČÁK & PANZNER 2004), nicméně hrách setý může být alergenem zejména u dětí a může způsobovat atopickou dermatitidu, astma, alergickou rýmu, dušnost, angioedém, průjem, kontaktní dermatitidu, křeče v břiše či zvracení (KOHOUT 1994; KVASNIČKOVÁ 1998).

Metodiku detekce vnitřního genu hrachu setého lze také využít jako výchozí bod pro kvantifikaci GM hrachu v potravinářských či krmivářských produktech (RAKOUSKY *et al.* 2004; SVABOVA *et al.* 2005).

Tato metodika byla vypracována pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting a je určena kontrolním laboratořím státní správy a privátním laboratořím, které provádějí analýzy potravin či krmiv z různých rostlinných matric.

5. Ekonomické aspekty

Pro zavedení metodiky do portfolia analytické laboratoře využívající techniky molekulární biologie je třeba počítat s cenou potřebných chemikálií a s nutností verifikačních běhů. Náklady na zavedení metody se tedy pohybují v rozmezí 15 – 20 tis. Kč. Předpokládá se, že zisk z každé provedené analýzy bude 500 Kč. Za současné situace je cena jedné analýzy 5000 Kč, přičemž cena zahrnuje náklady na spotřební materiál, osobní náklady, režijní náklady, údržbu a opravu zařízení.

6. Seznam použité související literatury

HOU Y., ZHANG H., MIRANDA L., LIN S. (2010): Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal *pcna* as the model gene. *PLoS One*, **5**: 1 – 7.

KOHOUT P. (1994): Potravinová alergie, *Výživa*, Praha, **5**: 147 - 148.

KVASNIČKOVÁ A. (1998): Alergie z potravin, 1. vyd., Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 60 s.

RAKOUSKY S., ONDREJ M., SEHNAL F., HABUSTOVA O., HUSSEIN H.M., OVESNA J., KUCERA L., KOCOUREK F., RIHA K., DOSTALOVA R., SEIDENGLANZ M., TEJKLOVA E., GRIGA M. (2004): Transgenic plant products and their introduction into the environment and crop protection systems, a risk assessment. *Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology*, Book Series: NATO SCIENCE SERIES, **359**: 173 – 184.

SVABOVA L., SMYKAL P., GRIGA M., ONDREJ V. (2005): Agrobacterium-mediated transformation of *Pisum sativum* in vitro and in vivo. *Biologia Plantarum*, **49**: 361 – 370.

ŠPIČÁK V., PANZNER P. (2004): Alergologie, 1. vyd., Karolinum, Galén, Praha, 348 s.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

VRÁBLÍK A., HODEK J., SOUKUP J., DEMNEROVÁ K., OVESNÁ J. (2012): Development and verification of PCR based assay to detect and quantify garden pea *lec* gene, Czech J. Food Sci., **30**: 247–257.

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. CZ0002700604 and No. QI101B267, by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Projects No. OC09031 and No. MEB091010.

Příloha 1 – příprava roztoků

EDTA 0,5M

Příprava: 93,05 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve 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. Roztok je použitelný 12 měsíců.

Ethanol cca 70 %

Příprava: 70 ml absolutního ethanolu se smíchá s 30 ml deionizované sterilní vody. Roztok je použitelný 12 měsíců.

TAE 50x

Příprava: 242 g TRIS báze se rozpustí ve 300 ml deionizované vody, přidá se 100 ml 0,5M roztoku EDTA a 57,1 ml ledové kyseliny octové. Doplní se do 1000 ml deionizovanou vodou a upraví pH = 8,5. Autoklávuje se při 121 °C. Roztok je použitelný min. 6 měsíců.

LB agar

Příprava: 5 g NaCl, 5 g Tryptonu, 2,5 g Yeast extractu a 7,5 g agaru se rozpustí v 0,5 l destilované vody a směs se ponechá resuspendovat na laboratorní míchačce. Po rozpuštění se roztok sterilizuje pomocí autoklávu. Po vychladnutí cca na 60 °C se k roztoku přidá 2,5 ml 24 % roztoku IPTG, 2 ml 2 % roztoku xgal dimethylformamidu a 5 ml 25 % roztoku ampicilinu. Směs se promíchá na laboratorní míchačce a přenese se do několika Petriho misek. Po ztuhnutí agarů jsou misky uchovávány při 4 °C k následnému použití.

LB medium

Příprava: 5 g NaCl, 5 g Tryptonu, 2,5 g Yeast extractu se rozpustí v 0,5 l destilované vody. Po resuspendaci se roztok sterilizuje pomocí autoklávu a po vychladnutí na cca 60 °C se k roztoku přidá 5 ml 25 % roztoku ampicilinu.



Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2012
ISBN 978-80-7427-096-3