



národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji

Tesařová, Zuzana; Šídová, Dana; Vráblík, Aleš; Hodek, Jan; Ovesná, Jaroslava
2013

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-187440>

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

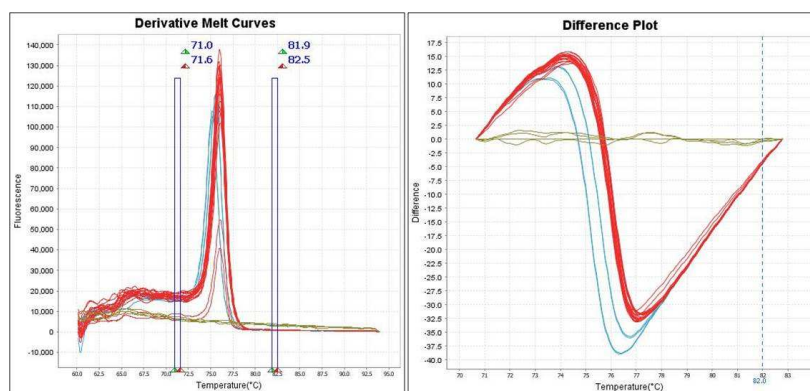
Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 18.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Zuzana Tesařová, Dana Šídová, Aleš Vráblík, Jan Hodek,
Jaroslava Ovesná

Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji



METODIKA PRO PRAXI

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.



Metodika byla vypracována pracovníky Národní Referenční laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting díky finančnímu příspěví NAZV, projekt číslo: QI101B267 a výzkumného záměru MZE0002700604

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2013

ISBN 978-80-7427-134-2

Autoři: Ing. Zuzana Tesařová
 Mgr. Dana Šídová
 Ing. Aleš Vráblík
 Mgr. Jan Hodek
 RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Název: Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na
 přítomnost RoundUp Ready sóji

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

Náklad: 50 ks

Vyšlo v roce: 2013

Kontakt na autory: tesarova@vurv.cz
 sidova@vurv.cz
 ovesna@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2013

ISBN 978-80-7427-134-2

OBSAH :

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | Cíl metodiky | 5 |
| 2. | Vlastní popis metodiky | 7 |
| 2.1 | Termíny a definice | 7 |
| 2.2 | Princip metody | 8 |
| 2.3 | Rušivé vlivy – inhibitory | 9 |
| 2.4 | Přístrojové vybavení | 10 |
| 2.5 | Chemikálie a roztoky | 10 |
| 2.6 | Extrakce DNA pomocí CTAB metody | 11 |
| 2.7 | Kontrola kvality izolované DNA | 13 |
| 2.7.1 | Princip elektroforetické separace na agarózovém gelu | 13 |
| 2.7.2 | Příprava 0,8% agarózového gelu | 13 |
| 2.7.3 | Vizualizace DNA po elektroforetické separaci | 15 |
| 2.8 | High resolution melting (HRM) | 16 |
| 2.8.1 | Příprava pracovního prostoru | 16 |
| 2.8.2 | Příprava chemikálií | 16 |
| 2.8.3 | Pracovní postup pro HRM | 17 |
| 2.8.3.1. | Krok amplifikace | 18 |
| 2.8.3.2. | Krok HRM analýzy | 19 |
| 2.8.4. | Vyhodnocení HRM | 20 |
| 2.9 | Analýza přítomnosti RoundUp Ready sóji MON-40-3-2 | 20 |
| 2.9.1 | Příprava pracovního prostoru | 20 |
| 2.9.2 | Příprava chemikálií | 20 |
| 2.9.3 | Pracovní postup pro detekci GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR | 21 |
| 2.9.4. | Vyhodnocení detekce GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR | 23 |
| 2.9.4.1 | Příprava 2% agarózového gelu | 23 |
| 2.9.4.2 | Vizualizace DNA po elektroforetické separaci | 25 |
| 2.10 | Příklad HRM analýzy | 25 |
| 2.11 | Příklad detekce GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR | 30 |
| 2.12 | Závěr | 31 |
| 3 | Srovnání novosti postupů | 31 |
| 4 | Popis uplatnění certifikované metodiky | 32 |
| 5 | Ekonomické aspekty | 32 |
| 6 | Literatura | 33 |
| 7 | Seznam publikací, které předcházejí metodice | 33 |
| | Příloha č. 1 | 35 |

1. Cíl metodiky

Mléčné výrobky bývají často předmětem falšování. Při falšování mléčných výrobků bývá nahrazována smetana (mléčný tuk) jakožto drahá surovina např. přidavkem rostlinných tuků¹. Výrobky označované jako smetanové tak mohou obsahovat nižší podíl smetany, než je deklarováno na obale či nařízeno vyhláškou 77/2003 Sb.², kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Mléko obecně může být ve výrobku nahrazeno např. výluhem ze sójových bobů nebo přidavkem nejružnějších aditiv (barviv, stabilizátorů, emulgátorů, plnidel) k zajištění požadovaných technologických a organoleptických vlastností.

Nahrazování živočišných produktů v mléčných výrobcích sójou nedochází jen ke klamání spotřebitele, ale také k jeho potenciálnímu ohrožení vzhledem k tomu, že sója patří mezi nejsilnější alergeny. Alergie na sóju navíc patří mezi ty s nejčastějším výskytem³. Nevědomá konzumace falšovaných potravin, kdy je ve výrobku nahrazena dražší surovina sójou nebo sójovým produktem, může být proto zdrojem nežádoucích alergických reakcí, ke kterým u alergiků dochází i při konzumaci potravin s jen nepatrnou příměsí sóji⁴.

Podle vyhlášky 113/2005 Sb.⁵ o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, musí být rovněž výrobek, který obsahuje alergenní složku řádně označen.

Cílem metodiky je poskytnutí postupu pro diagnostické analýzy mléčných výrobků vzhledem k záchytu jejich sójových analogů. Metodika je současně rozšířena o optimalizovanou metodu analýzy geneticky modifikované RoundUp Ready sóji MON-40-3-2, která patří mezi světově nejvíce používané GM plodiny.

Metodika je dedikována Národní agentuře pro zemědělský výzkum, projekt číslo QI101B267 a výzkumnému záměru MZE0002700604.

Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji

Mléčné výrobky mohou být předmětem falšování. Dražší suroviny (např. smetana) jsou v těchto případech nahrazovány přídavkem rostlinných tuků. Mléko obecně pak může být ve výrobcích nahrazeno např. výluhem ze sójových bobů. Jelikož se sója řadí mezi silné alergeny a alergie na sóju je poměrně častá, kromě klamání spotřebitele hrozí také v případě falšování mléčných výrobků sójou alergické reakce. Je tedy důležité disponovat vhodnou metodou pro její detekci. Tato práce uvádí metodiku pro detekci sóji v mléčných výrobcích a analýzu, zda se jedná o geneticky modifikovanou RoundUp Ready sóju. Detekce sóji v mléčných výrobcích je založena na analýze profilu teploty tání amplifikačních produktů metodou High Resolution Melting (HRM). Analýza, zda se jedná o geneticky modifikovanou RoundUp Ready sóju, probíhá detekcí specifických úseků DNA metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR).

Methodology for Analysis of dairy products and their soy analogues for the presence of RoundUp Ready soybean

Dairy products may be subject to adulteration, where there is a relatively expensive raw material (e.g. cream) replaced by the addition of vegetable fats. Milk can be replaced in dairy products for example by soybean extract. Because soy belongs among strong allergens and the incidence of allergy is rather high. Therefore it is necessary to have a method for its detection. This work introduces the method for detection of soy, including analysis of genetic modified RoundUp Ready soybean. Detection of soybean in dairy products is based on analysis of amplification products melting profiles by High Resolution Melting (HRM) method. Analysis of genetically modified RoundUp Ready soybean is based on DNA detection via Polymerase Chain Reaction (PCR).

Oponenti:

Ing. Přemysl Landa, PhD. – Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř biotechnologie rostlin, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje
MVDr. Kateřina Staňková – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno

2. Vlastní popis metodiky

2.1 Termíny a definice

Amplifikace – zesílení, v případě DNA zmnožení

Amplikon – ohraničený amplifikovaný úsek DNA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HRM (High Resolution Melting) – post-PCR metoda používaná k identifikaci změn v sekvencích DNA. Je založena na detekci malých rozdílů v disociačních křivkách (křivkách tání) DNA. Nejprve dochází k navázání fluorescenčního barviva na dsDNA. Během postupného zahřívání dochází k tavení dvoušroubovice DNA, čímž se z ní barvivo uvolňuje a dochází k poklesu fluorescence. Výsledkem je graf – křivka tání, který znázorňuje pokles fluorescence při zvyšování teploty.

PCR (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová 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 $MgCl_2$
- 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 templát pro nový reakční cyklus.

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

2.2 Princip metody

Metoda zahrnuje postup extrakce DNA z potravinářského mléčného produktu CTAB metodou. Přítomnost sóji v analyzovaném mléčném produktu je vyšetřena metodou High Resolution Melting (HRM). S použitím specifických primerových párů dojde nejprve k amplifikaci úseku DNA, který je pro sóju specifický. V reakční směsi je přítom obsaženo fluorescenční interkalační barvivo MeltDoctor (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Produkty amplifikace jsou pak vyšetřeny metodou HRM, kdy dochází k pozvolnému zahřívání vzorku ze 60 °C na 95 °C s rychlostí nárůstu teploty 0,3% se současným odečtem fluorescenčního signálu. V případě, že vyšetřovaný vzorek obsahoval DNA sóji, je ve výsledném grafu vidět křivka teploty tání analyzovaného amplifikačního produktu s charakteristickým profilem i hodnotou teploty tání.

Obsahoval-li vyšetřovaný mléčný výrobek DNA sóji, proběhne klasickou metodou PCR analýza na přítomnost geneticky modifikované RoundUp Ready sóji MON-40-3-2.

Vhodnost vybrané CTAB metody pro extrakci DNA i celý postup vyšetření přítomnosti sóji byl ověřen na řadě mléčných výrobků (viz Tabulka 1) a celý postup analýzy na nich bude demonstrován.

Tabulka 1. Testované mléčné výrobky.

| Označení výrobku | Popis výrobku |
|------------------|----------------------------|
| A | sójový kysaný nápoj |
| B | sójový dezert – vanilka |
| C | Krajanka – vaječný likér |
| D | pribináček kakaový |
| E | tvarohový jogurtový dezert |
| F | Pacholík |
| G | Cottage sýr |
| H | jogurt bílý |
| I | Cavalier |
| J | jogurt s jahodovou složkou |
| K | Florián |
| L | kefír |
| M | dětská kaše |

2.3 Rušivé vlivy – inhibitory

Výchozí metodou analýzy přítomnosti sóji v mléčných výrobcích je PCR. V případě, že reakce neproběhne, není umožněna ani následná HRM analýza. 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 maticích mohou mít inhibiční účinek například kationty Ca^{2+} , Fe^{2+} , těžké kovy a dále pak další látky uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2. Vybrané inhibitory PCR

| inhibitor | koncentrace |
|---------------------------|----------------|
| 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

autokláv OT 032

centrifuga Rotina 420R

centrifuga Universal 32R

fotodokumentační zařízení

hlubokomrazicí box (- 80 °C)

horizontální DNA elektroforézy SCIE-PLAS

horkovzdušný laboratorní sterilizátor FN 120

lednice (4 °C)

Mastercycler® Nexus gradient

Nüve, Turecko

Hettich Zentrifugen,

Německo

Boeco, Německo

BioTech, Česká republika

New Brunswick Scientific,

Anglie

Labnet, Česká republika

Nüve, Turecko

Whirlpool, USA

Eppendorf, Německo

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 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 |
| StepOnePlus Real-Time PCR systems | Applied Biosystems, USA |
| thermomixer confort | Eppendorf, Německo |
| vodní lázeň LWB | Labtech, Česká republika |
| vortex mixer VX-200 | Labnet, Česká republika |
| zdroj k elektroforézám | Consort, Belgie |

2.5 Chemikálie a roztoky

| | |
|---|------------------------------------|
| Agarose Serva | SERVA, Německo |
| Ethanol | Analytika, Česká republika |
| ethidium bromid | SIGMA-ALDRICH, USA |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder | MBI Fermentas, Kanada |
| H ₂ O pro PCR (DNase and RNase free) | SIGMA-ALDRICH, USA |
| MeltDoctor™ | Applied Biosystems, USA |
| Syntetické oligonukleotidy (primery) | Generi Biotech, Česká republika |
| TRIS – HCl | SERVA, Německo |
| TRIS base | SERVA, Německo |
| λ DNA/Hind III marker | MBI Fermentas, Kanada |

2.6 Extrakce DNA pomocí CTAB metody

- naváží se 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml sterilní mikrokumavky
- přidá se 400 µl sterilní neionizované vody, ihned po přidání se jednotlivé vzorky jemně promíchají kličkou tak, aby vznikla homogenní suspenze a ponechají se 5 minut 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 minut při teplotě 65°C, každých 10 minut se vzorky promíchají převrácením mikrozku mavy
- přidá se 10 µl proteinázy K, vzorky se jemně promíchají obracením zkumavky a nechají se inkubovat 30 minut při teplotě 65°C, každých 10 minut se vzorky promíchají převrácením mikrozku mavy
- centrifugace v odstředivce 10 minut při 12000 ot./min.
- do dvou nových 2 ml mikrozku mavek přenést 600 µl supernatan tu, přidat stejný objem směsi chloroform : isoamylalkohol (24 : 1) a důkladně v ruce třepat cca 1 minutu
- centrifugace v odstředivce 15 minut při 12000 ot./min.
- do nové 2 ml mikrozku mavy se přenese horní (vodní) fáze
- přidají se 2 objemy CTAB precipitačního pufru
- inkubace 60 minut při laboratorní teplotě bez jakéhokoli míchání
- centrifugace v odstředivce 15 minut při 12000 ot./min.
- pipetou se odstraní supernatant (popřípadě opatrně vylít) – pelet nemusí být viditelný
- vysrážená DNA se rozpustí přidáním 450 µl roztoku 1,2 M NaCl a roztok se opatrně promíchá
- přidá se 450 µl směsi chloroform : isoamylalkohol (24 : 1) a 1 minutu se důkladně protřepává rukou
- centrifugace v odstředivce 20 minut při 12000 ot./min.
- horní vodní fáze se přenese do nové 1,5 ml mikrozku mavy
- přidat 0,6 objemu 99,8% isopropan-2-olu, jemně promíchat převrácením mikrozku mavy a nechat inkubovat 20 minut při laboratorní teplotě
- centrifugace v odstředivce 15 minut při 12000 ot./min.
- vylitím nebo pipetováním se odstraní supernatant
- přidá se 500 µl 70% etanolu a několikrát převrácením mikrozku mavy promíchá (toto je nejdůležitější krok dokončující kompletní odstranění CTAB)
- centrifugace v odstředivce 10 minut při 12000 ot./min.

- vylitím nebo pipetováním se odstraní supernatant
- vysuší se pelet DNA při laboratorní teplotě (cca 30 minut) a znovu se nechá rozpustit v 60 μ l vody při teplotě 4°C po dobu min. 12 hodin

2.7 Kontrola kvality izolované DNA

2.7.1 Princip elektroforetické separace na agarózovém gelu

Kontrola kvality DNA probíhá pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu s přídavkem 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.

2.7.2 Příprava 0,8% agarózového gelu

Potřebné množství TAE pufru se naředí na pracovní koncentraci (zásobní roztok 50x TAE se naředí neionizovanou 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 3.

Tabulka 3. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků

| pufr 1x TAE | koncentrace gelu [w/v] | agaróza [g] | ethidium bromid [μ l] | počet vzor- ků |
|----------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------|
| 70 | 0,8% | 0,56 | 0,7 | 1 – 36 |
| 240 | 0,8% | 1,92 | 2,4 | více než 36 |

Postup přípravy gelu:

- na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy
- navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1x TAE pufru
- baňka s pufrům a agarózou se umístí na otočný talíř mikro vlnné 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 minut); 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

Postup nanášení vzorků na gel:

- z roztoku izolované DNA se odeberou 3 μ l, k nim se přidá 7 μ l sterilní deionizované vody a 3 μ l 6x Loading Dye Solution, každý vzorek se promíchá 2x 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

2.7.3 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.

2.8 High resolution melting (HRM)

2.8.1 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.

2.8.2 Příprava chemikálií

Všechny roztoky, uchovávané v mrazáku, se předem musí rozmrazit – buď při laboratorní teplotě (v tomto případě se musí ukončit rozmrazování ihned po rozpuštění posledního tuhého kusu) nebo 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 HRM:

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. MeltDoctor™ MasterMix
3. Syntetické oligonukleotidy (Tabulka 4)

Tabulka 4. Použité oligonukleotidové sekvence (primery)

| název primeru | nukleotidová sekvence (5'-3') | velikost produktu (bp) |
|--------------------|----------------------------------|------------------------|
| COI-F ⁶ | GAACTCTGCTCGGAGAC-GAC | 134 bp |
| COI-R ⁶ | AGCACCAATTATTAGGG-GAAC | |
| lec118-F | GTGACCTCCTCGGGAA-AGTT | 118 bp |
| lec118-R | CGGTTTCTTTGTCCCAAATG | |

2.8.3 Pracovní postup pro HRM

Analýzy HRM probíhá ve dvou krocích. Nejprve musí dojít amplifikaci cílových sekvencí DNA. V tomto prvním kroku nedochází k měření fluorescence, ale je nezbytně nutný pro možnost HRM analýzy. V druhém kroku (vlastní měření HRM) dochází k záznamu změn fluorescenčního signálu během zahřívání produktů amplifikační reakce, připravených v předchozím kroku. Oba kroky jsou od sebe oddělené a předpřipravené amplifikační produkty lze po kratší dobu (ideálně maximálně 24h) uchovávat při cca +4 °C, případně po delší dobu (měsíce) při cca -20 °C, v obou případech je nutné uchovávat vzorky v temnu.

Pro analýzu přítomnosti sóji v mléčných výrobcích jsou v této metodice uvedeny 2 primerové páry.

První primerový pár pro amplifikaci úseku DNA hovězího genu pro podjednotku 1 cytochrom oxidázy (primery COI) slouží jako kontrola přítomnosti DNA v analyzovaném vzorku a také pro ověření její funkčnosti při PCR. Je očekávaný pozitivní výsledek amplifikace s použitím tohoto primerového páru v případě, že analyzovaná DNA byla extrahována z potravinářského produktu, který obsahuje alespoň 0,5% kravského mléka či jiného produktu (smetana, sýr apod.), který je z tohoto mléka vyroben.

Druhý primerový pár slouží k amplifikaci úseku DNA, který je specifický pro sóju. Pozitivní výsledek značí, že analyzovaný vzorek obsahuje DNA sóji, negativní výsledek znamená, že vzorek DNA sóji neobsahuje. Z důvodu spolehlivého vyhodnocení je požadováno, aby HRM analýza byla provedena minimálně ve 3 opakováních pro každý vzorek.

2.8.3.1. Krok amplifikace

- 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
- do 1,5 ml mikrokumavky pro MasterMix se pipetují jednotlivé složky MasterMixu (Tabulka 5)
- připravený MasterMix se důkladně, ale jemně promíchá pomocí vortexu a pipetuje se do 96 jamkové destičky
- do 96 jamkové destičky se k 15 µl MasterMixu přidá 5 µl templátové DNA
- destička se stočí na centrifuze po dobu 1 min
- destička se vzorky se vloží do přístroje StepOnePlus Real-Time PCR System a po nastavení teplotního profilu (Tabulka 6) se přístroj spustí

Tabulka 5. Složení reakční směsi pro amplifikaci DNA pro HRM analýzu

| složka | koncentrace zásobního roztoku | objem do jedné reakce [µl] | finální koncentrace v reakční směsi |
|------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| H ₂ O | - | 3,8 | - |
| primer F | 10 µM | 0,6 | 300 nM |
| primer R | 10 µM | 0,6 | 300 nM |
| Melt Doctor™ | 2x | 10,0 | 1x |
| roztok DNA | maximálně 40 ng/µl | 5,0 | - |

Tabulka 6. Teplotní profil amplifikace DNA pro HRM analýzu

| Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|--------------|---------|-------------|
| 95 | 600 | 1 |
| 95 | 15 | 40 |
| 60 | 60 | |

2.8.3.2. Krok HRM analýzy

- po proběhnutí amplifikační části analýzy se destička z přístroje vyndá a stočí se na centrifuze po dobu 1 min
- destička se vloží zpět do přístroje StepOnePlus Real-Time

PCR System, nastaví se typ experimentu „Melt Curve“, detekce cílové sekvence „Melt Doctor“, zruší se měření pasivní referencie (označení „None“) a po nastavení teplotního profilu (Tabulka 7) se přístroj spustí

| Teplota [°C] | Čas [s] | Rychlost změny teploty | Měření fluorescence |
|--------------|---------|------------------------|---------------------|
| 95 | 15 | 100% | - |
| 60 | 60 | 0,3% | ano |
| 95 | 15 | 100% | - |
| 60 | 15 | - | - |

Tabulka 7. Teplotní profil HRM

2.8.4. Vyhodnocení HRM

HRM analýza se provádí s použitím počítačového programu High Resolution Melt Software (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). V uvedeném programu se otevře soubor s výsledky měření HRM a nechá se proběhnout HRM analýza. Program vyhodnotí teplotní profily křivek tání a rozřadí je do klastrů na základě jejich podobnosti/rozdílnosti. Pro analýzu je vhodné mít k sadě vzorků přiřazeny také

referenční vzorky – v tomto případě nějaký vzorek DNA sóji a ověřeného mléčného výrobku, který sóju neobsahuje.

2.9 Analýza přítomnost RoundUp Ready sóji MON-40-3-2

2.9.1 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.

2.9.2 Příprava chemikálií

Všechny roztoky, uchovávané v mrazáku, se předem musí rozmrazit – buď při laboratorní teplotě (v tomto případě se musí ukončit rozmrazování ihned po rozpuštění posledního tuhého kusu) nebo 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 detekci GM sóji MON-40-3-2:

1. Ultra Pure H₂O pro PCR
2. Syntetické oligonukleotidy (Tabulka 8)

3. 10x PCR Gold pufr – vyjmout z mrazáku, rozmrazit, umístit do ledu, před použitím promíchat vortexem a ihned lehce stočit na centrifuze
4. MgCl₂ pro ApliTaqGold – vyjmout z mrazáku, rozmrazit, umístit do ledu, před použitím promíchat vortexem a ihned lehce stočit na centrifuze
5. Směs 10mM dNTP – vyjmout z mrazáku, rozmrazit, umístit do ledu, před použitím promíchat vortexem a ihned lehce stočit na centrifuze
6. AmpliTaqGold Polymeráza – vyjmout z mrazáku těšně před použitím, lehce stočit na centrifuze, umístit do ledu

Tabulka 8. Použité oligonukleotidové sekvence (primery)

| název primery | nukleotidová sekvence (5'-3') | velikost produktu (bp) |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------|
| MON-40-3-2-F ⁷ | TGATGTGATATCTC-CACTGAC | 172 bp |
| MON-40-3-2-R ⁷ | TGTATCCCTTGAGCCAT-GTTGT | |

2.9.3 Pracovní postup pro detekci GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR

Detekce GM sóji MON-40-3-2 probíhá metodou klasické PCR s detekcí očekávaného produktu na 2% agarózovém gelu. Pozitivní reakce poskytne produkt o délce 172 bp. Pro ověření správné funkčnosti PCR je nezbytné k analyzovaným vzorkům zařadit vhodný pozitivní referenční materiál, např. certifikované referenční materiály IRMM-410S-0 (0% RR sója), IRMM-410S-1 (0,1% RR sója) a IRMM-410S-3 (1% RR sója).

Pro zajištění dostatečné spolehlivosti je vhodné provést analýzu ve dvou nezávislých opakováních pro každý vzorek.

- 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
- do 1,5 ml mikrokumavky pro MasterMix se pipetují jednotlivé složky MasterMixu (Tabulka 9)
- připravený MasterMix se důkladně, ale jemně promíchá pomocí vortexu a pipetuje se do 0,2 ml tenkostěnných mikrokumavek pro PCR
- k 20 µl MasterMixu se přidá 5 µl templátové DNA
- mikrokumavky se stočí na stolní centrifuze
- mikrokumavky se vloží do přístroje Mastercycler® nexus gradient a po nastavení teplotního profilu (Tabulka 10) se přístroj spustí

Tabulka 9. Složení reakční směsi pro amplifikaci MON-40-3-2 metodou PCR

| složka | koncentrace zásobního roztoku | objem do jedné reakce [µl] | finální koncentrace v reakční směsi |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| H ₂ O | - | 12,8 | - |
| 10x PCR Gold pufr | 10x | 2,5 | 1x |
| MgCl ₂ | 25 mM | 3 | 3 mM |
| dNTP | 10 mM | 0,5 | 0,2 mM |
| primer F | 10 µM | 0,5 | 200 nM |
| primer R | 10 µM | 0,5 | 200 nM |
| AmpliTaqGold Polymeráza | 5U/ µl | 0,2 | - |
| roztok DNA | maximálně 20 ng/ µl | 5,0 | - |

Tabulka 10. Teplotní profil pro amplifikaci MON-40-3-2 metodou PCR

| Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|--------------|---------|-------------|
| 95 | 720 | 1 |
| 95 | 30 | 40 |
| 60 | 60 | |
| 72 | 25 | |
| 72 | 180 | 1 |

2.9.4. Vyhodnocení detekce GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR

2.9.4.1 Příprava 2% agarózového gelu

Potřebné množství TAE pufru se naředí na pracovní koncentraci (zásobní roztok 50x TAE se naředí neionizovanou 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 11.

Tabulka 11. Množství komponent agarózového gelu podle počtu vzorků

| pufr 1x TAE [ml] | koncentrace gelu [w/v] | agaróza [g] | ethidium bromid [μl] | počet vzor- ků |
|------------------------|---------------------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| 70 | 2% | 1,4 | 0,7 | 1 – 36 |
| 240 | 2% | 4,8 | 2,4 | více než 36 |

Postup přípravy gelu:

- na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy
- navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1x 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 minut); 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

Postup nanášení vzorků na gel:

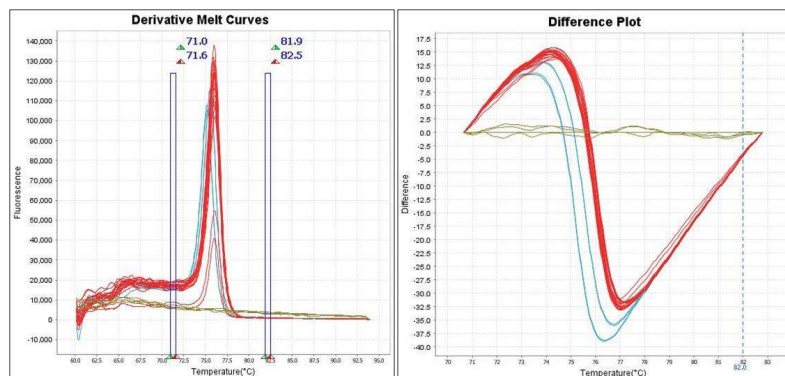
- Do mikrozkušavky s reakční směsí se přidají 3 μ l 6x Loading Dye Solution, vzorek se promíchá (např. 2x pro

- (tažením 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 4 μ l délkového standardu GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- do dalších drah se nanáší vždy 25 μ l každého vzorku
- po ukončení nanášení vzorků se elektroforetická vana uzavře víkem a nastaví se hodnota elektrického napětí pro 2 % agarózový gel – 60V
- elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut
- po ukončení elektroforézy se gel vyjme i s formou z vany a přenesou se k fotodokumentárnímu zařízení se zdrojem UV záření

2.9.4.2 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 o délce 172 bp podle srovnání s použitým délkovým standardem.

2.10 Příklad HRM analýzy



Obrázek 1. Teplotní profily amplifikačních produktů s použitím COI primerů

Podle této metodiky byla analyzována DNA vzorků, uvedených v Tabulce 1. Prvním krokem byla amplifikace a HRM analýza s použitím primerů COI. Grafy teplotních profilů amplifikačních produktů s použitím primerů COI jsou uvedeny na Obrázku 1.

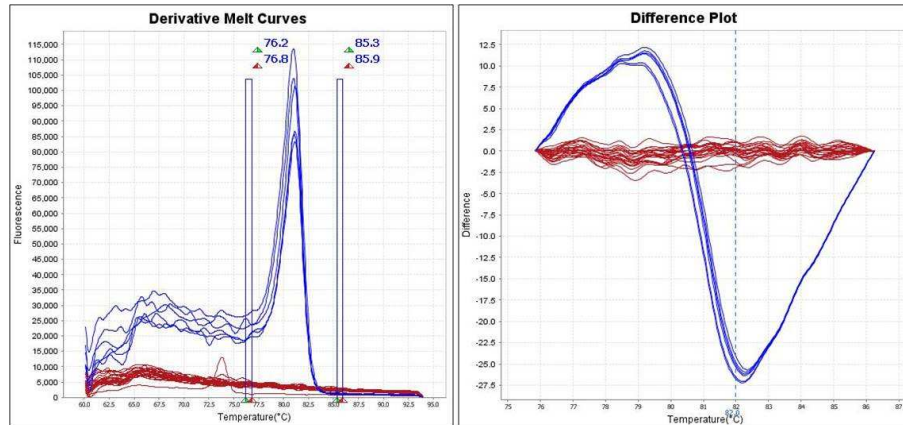
Z obrázku je patrné rozdělení vzorků do 2 skupin (viz barevné odlišení – modrá a červená-fialová) podle charakteristiky křivky teploty tání jejich amplifikačních produktů. Třetí skupinu tvořily vzorky bez amplifikačního produktu (na obrázku označeno hnědou barvou).

V Tabulce 12 jsou uvedeny teploty tání amplifikačních produktů a přiřazení vzorku do dané skupiny na základě HRM analýzy. Jako pozitivní a negativní referenční materiál (očekávaný výsledek podle použitých primerů) byla ke vzorkům zařazena DNA sóji a kukuřice, pro kontrolu kontaminace reakční směsi byla ke vzorkům zařazena MasterMixová kontrola (CTRL NEG).

Tabulka 12. Teploty tání amplifikačních produktů s použitím primerů COI, zařazení do skupin dle HRM analýzy

| Označení výrobku | Popis výrobku | Teplota tání – HRM [°C] | Skupina dle HRM analýzy |
|------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| kukuřice | - | - | 3 |
| sója | - | - | 3 |
| A | sójový kysaný nápoj | 76,1 | 1 |
| B | sójový dezert – vanilka | 76,1 | 1 |
| C | Krajanka – vaječný likér | 76,0 | 1 |
| D | pribináček kakaový | 75,9 | 1 |
| E | tvarohový jogurtový dezert | 76,1 | 1 |
| F | Pacholík | 76,0 | 1 |
| G | Cottage sýr | 76,0 | 1 |
| H | jogurt bílý | 76,0 | 1 |
| I | Cavalier | 75,2 | 2 |
| J | jogurt s jahodovou složkou | 75,9 | 1 |
| K | Florián | 75,5 | 2 |
| L | kefír | 76,1 | 1 |
| M | dětská kaše | 76,0 | 1 |
| CTRL NEG | - | - | 3 |

Obrázek 2. Teplotní profily amplifikačních produktů s použitím Lec118 primerů



Metoda HRM s použitím primerů Lec118 rozdělila na základě profilů teplot tání amplifikačních produktů analyzované vzorky do dvou skupin (viz barevné odlišení – modrá a červená). Skupina označená modře obsahovala amplifikační produkt, který mohl být analyzován metodou HRM, skupina označená červeně neobsahovala žádný amplifikační produkt.

Touto analýzou bylo ověřeno, že analyzované vzorky jsou vyrobeny z kravského mléka (či odvozených produktů) a že DNA, která z nich byla extrahovaná uvedenou metodou CTAB, je vhodná k vyšetření na přítomnost sóji v testovaných výrobcích.

Byla tedy provedena druhá část analýzy vzorků podle této metodiky, amplifikace úseku DNA, která je specifická pro sóju a následná HRM analýza amplifikačních produktů s použitím primerů Lec118. Grafy teplotních profilů amplifikačních produktů s použitím primerů Lec118 jsou uvedeny na Obrázku 2.

V Tabulce 13 jsou uvedeny teploty tání amplifikačních produktů a přiřazení vzorku do dané skupiny na základě HRM analýzy. Jako pozitivní a negativní referenční materiál (očekávaný výsledek podle použitých primerů) byla ke vzorkům opět zařazena DNA sóji a kukuřice, pro kontrolu kontaminace reakční směsi byla ke vzorkům zařazena MasterMixová kontrola (CTRL NEG).

Tabulka 13. Teploty tání amplifikačních produktů s použitím primerů Lec118, zařazení do skupin dle HRM analýzy

| Označení výrobku | Popis výrobku | Teplota tání – HRM [°C] | Skupina dle HRM analýzy |
|------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| kukuřice | - | - | 2 |
| sója | - | 81,1 | 1 |
| A | sójový kysaný nápoj | 81,0 | 1 |
| B | sójový dezert – vanilka | 81,0 | 1 |
| C | Krajanka – vaječný likér | - | 2 |
| D | pribináček kakaový | - | 2 |
| E | tvarohový jogurtový dezert | - | 2 |
| F | Pacholík | - | 2 |
| G | Cottage sýr | - | 2 |
| H | jogurt bílý | - | 2 |
| I | Cavalier | - | 2 |
| J | jogurt s jahodovou složkou | - | 2 |
| K | Florián | - | 2 |
| L | kefír | - | 2 |
| M | dětská kaše | - | 2 |
| CTRL NEG | - | - | 2 |

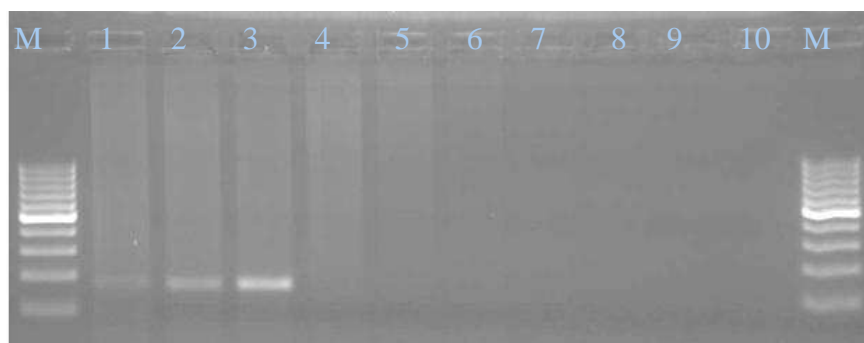
Výsledky této HRM analýzy prokázaly přítomnost DNA sóji pouze v pozitivním referenčním materiálu a ve vzorcích A a B, které ovšem sóju ve svém složení deklarovaly na obalu výrobku. Analýzou bylo tedy prokázáno, že žádný z vyšetřovaných vzorků neobsahoval sóju, a z tohoto hlediska je složení výrobku, uvedené na obalu, v souladu s laboratorními výsledky.

2.11 Příklad detekce GM sóji MON-40-3-2 metodou PCR

Podle výsledků HRM analýzy byla sója zachycena ve dvou testovaných výrobcích – ve vzorku A (sójový kysaný nápoj) a ve vzorku B (sójový dezert – vanilka). Proto bylo u těchto vzorků provedeno vyšetření na přítomnost GM sóji MON-40-3-2 podle uváděné metodiky.

Podle uvedeného předpisu byla připravena a provedena PCR reakce, jako referenční materiál byly použity certifikované IRMM standardy IRMM-410S-0 (0% RR sója, deklarovaný obsah GMO <0,03%), IRMM-410S-1 (0,1% RR sója) a IRMM-410S-3 (1% RR sója).

Na Obrázku 3 je uvedena vizualizace 2% agarózového gelu. Z obrázku je patrné, že pozitivní signál byl ve formě svítícího proužku DNA o délce 172 bp zaznamenán pouze u pozitivních referenčních materiálů, výsledek zkoušky byl pro analyzované vzorky negativní.



Obrázek 3. Vizualizace 2% agarózového gelu po amplifikaci specifického DNA fragmentu GM sóji MON-40-3-2.

M=délkový standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder; 1=0%RR; 2=0,1%RR; 3=1% RR; 4=vz. A-1; 5=vz. A-2; 6=vz. B-1; 7=vz. B-2; 8=extrakční kontrola; 9=kontrola MasterMixu; 10=kontrola MasterMixu-otevřená po celou dobu pipetování

2.12 Závěr

Byla představena metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost sóji metodou HRM a detekce GM sóji RoundUp Ready (MON-40-3-2) v mléčných výrobcích metodou klasické PCR. Na příkladu byl přehledně demonstrován postup analýzy a její vyhodnocení.

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.

3 Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika poprvé představuje ověřený postup extrakce DNA z různých druhů mléčných výrobků.

Cílem metodiky je pak analýza přítomnosti sóji v těchto mléčných výrobcích. Za tímto účelem poprvé představuje metodu HRM. Pro využití HRM analýzy zavádí dvojí kombinaci primerů- primery COI, které byly publikovány ve vědeckém tisku (použití pro SYBR Green real-time PCR detekci kravského mléka v pravé mozzarella, která má být vyrobena z mléka vodních buvolů) a primery Lec118, které byly vyvinuty pro tuto metodiku a které amplifikují krátký úsek cílové DNA, což umožňuje jejich použití v potravinových výrobcích, které prošly procesem významného technologického zpracování (např. výrazné změny teploty, tlaku, pH), a obsahují ve větší míře degradovanou DNA. Současně byla u primerů ověřena jejich specifita pro cílovou DNA, aby přes krátký úsek amplifikované DNA nedocházelo k falešně pozitivním výsledkům.

Dále je v metodice uveden optimalizovaný postup detekce GM sóji MON-40-3-2 metodou klasické PCR. Do této doby nebyla publikována žádná metodika zabývající se vyšetřením přítomnosti sóji v mléčných výrobcích uvedenými molekulárně-biologickými metodami.

4 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji poskytuje postup - diagnostickou analýzu přítomnosti sóji v mléčných výrobcích, kde není deklarovaná.

Nedeklarované použití sóji v mléčných výrobcích zvyhodňuje nepoctivého výrobce a navíc může na zdraví ohrozit konzumenty s alergií na sóju. Metodiku mohou využívat státní útvary, zabývající se kontrolou pravosti potravin a jejich falšování, dále je vhodná pro producenty a výrobce mléčných výrobků, pro mlékárenské provozy a podob., kde může být využita pro kontrolu dodávaných surovin nebo jako součást kvalitativní výstupní kontroly. Dále je metodika určena všem kontrolním laboratořím státní správy a privátním laboratořím, které provádějí analýzy potravin (vč. mléčných výrobků) na přítomnost GMO.

5 Ekonomické aspekty

Pro zavedení metodiky do portfolia analytické laboratoře využívající techniky molekulární biologie je třeba počítat s cenou potřebných chemikálií a pořízením referenčních materiálů. Přístrojové vybavení není do dalšího propočtu nákladů na zavedení metodiky zahrnuto.

Náklady na zavedení metody jsou cca 20 tis. Kč. V případě použití metodiky pro komerční účely by mohl být zisk z každé analýzy cca 600 Kč

(při nastavené ceně 800 Kč/analýzu a nákladech na chemikálie a energie cca 200 Kč). V kalkulaci nejsou zahrnuty osobní náklady a náklady na údržbu a opravu zařízení.

6 Literatura

- 1 <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1018192&docType=ART&nid=11342>
- 2 Vyhláška č. 77/2003 Sb. ze dne 6. 3. 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In Sběrka zákonů České republiky. 2003. Částka 32/2003.
- 3 Savage, J., Kaeding, A., Matsui, E., Wood, R. (2009): The Natural History of Soy Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (2): 180.
- 4 Gryson N. (2010): Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6): 2003 – 2022.
- 5 Vyhláška č. 113/2005 Sb. ze dne 4. 3. 2005, o způsobu označování potravin a tabákových výrobků. In Sběrka zákonů České republiky. 2005. Částka 37/2005.
- 6 Feligini, M., Alim, N., Bonizzi, I., Enne, G., Aleandri, R. (2007): Detection of Cow Milk in Water Buffalo Cheese by SYBR Green Real-Time PCR: Sensitivity Test on Governing Liquid Samples. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6 (1): 94-98.
- 7 EN ISO 21571 (2005): Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. ISO Copyright Office, Geneva.

7 Seznam publikací, které předcházely metodice

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.

Podíl na vzniku metodiky byl v rámci autorského týmu rovnoměrný, stejně tak byla rovnoměrná podpora obou dedikovaných projektů.

Dále jsou uvedeny vybrané publikace NRL-GMO, které s uvedenou problematikou souvisí a tato metodika vznikla v návaznosti na ně:

1. Tesařová, Z., Vráblík, A., Hodek, J., Šídová, D., Ovesná, J. Detekce přítomnosti sóji v mléčných výrobcích. Sborník příspěvků ze semináře Výzkum, vývoj a aplikace nových postupů zaměřených na kontrolu a minimalizaci vlivu činitelů s negativním dopadem na zdravotní bezpečnost zemědělských surovin, produktů a potravin. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2012., pp. 110-117, ISBN 978-80-7427-117-5.
2. Vráblík, A., Hodek, J., Ovesná, J. Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2012, 24 pp., ISBN 978-80-7427-096-3.
3. Ovesná, J., Hodek, J. Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010, 22 pp., ISBN: 978-80-7427-063-5.

Příloha č. 1

Příprava roztoků

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.

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.

CTAB Precipitační pufr

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

Délkový standard DNA Ladder HIND III

Příprava: v mikrozkušavce se smísí 100μl Ladder HIND III, 100 μl 6x Loading Dye Solution a 400 μl vody PCR Ultra H₂O. Promícháme špičkou mikropipety. Mikrozkušavku umístíme v místnosti do termbloku a zahříváme při teplotě 60 °C po dobu 5 min.

Délkový standard DNA Gene Ruler 100bp

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

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.

Ethanol cca 70%

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

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.

Proteináza K (20mg/ml)

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

RNáza(10mg/ml)

Příprava: 10 mg RNasy A se rozpustí v 1 ml deionizované sterilní vody. Rozpipetuje se do alikvotů po 200 μl. 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.

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.

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.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2013

ISBN 978-80-7427-134-2

38

