	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy –          zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10254.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu REDEExtract pro stanovení GMO	Revize	0

## PROVEDENÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) POMOCÍ KITU REDEXTRACT PRO STANOVENÍ GMO

### 1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání amplifikačních fragmentů DNA, které se využijí k stanovení přítomnosti genetických modifikací/geneticky modifikovaných organismů v analyzovaných vzorcích.

### 2 Princip

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA. Množený (amplifikovaný) úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 20 – 25 nukleotidech, které si díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (její rozvolnění na jednořetězce), přisedání primerů a syntézu DNA. Kit lze využít pro jednoduchou i duplexní PCR.

### 3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

#### **REDEExtract–N–Amp™ Plant PCR Kits, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální kit pro PCR (dále REDEx)**

- 1 Extraction solution.
- 2 Dilution solution.
- 3 REDEExtract–N–Amp PCR Ready Mix.

#### **Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů**

- 4 Voda vhodná pro PCR.
- 5 Amplifikační primery.
- 6 Dekontaminační roztok pro ošetření ploch vhodný pro práci s DNA.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10254.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu REDEExtract pro stanovení GMO	Revize	0

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 PCR box.
- 2 Minishaker nebo Vortex
- 3 Termální cykler.
- 4 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ l a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.
- 5 Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 6 Výrobník ledu.
- 7 Lednice.
- 8 Mrazicí box a hlubokomrazicí box.
- 9 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

#### 5 Postup

##### 5.1 Příprava amplifikačních primerů

###### 5.1.1 Zásobní roztok primeru o koncentraci 100 $\mu$ M

Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, který nemusí být viditelný, se přidá voda (4) v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok primeru, který se rozpipetuje po 50  $\mu$ l do zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uveďte se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu.


###### 5.1.2 Pracovní roztok primeru o koncentraci 20 $\mu$ M

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody (4). Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se do zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml po 15  $\mu$ l a zamrazí se v mrazicím boxu. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

##### 5.2 Polymerázová řetězová reakce

Připraví se PCR box: Dekontaminují se předměty i prostory od jakýchkoli molekul DNA – vše se otře dekontaminačním roztokem (6) a použije se UV záření (po dobu 30 min), které je součástí PCR boxu.

Připraví se pipety, sterilní špičky a zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál a stojánky. Amplifikační kit REDEx se používá pro jednoduchou i pro duplexní (případně multiplexní) PCR reakci .

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10254.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu REDEExtract pro stanovení GMO	Revize	0

Stanoví se počet reakcí (počet vzorků; kontroly: GM-pozitivní a beztemplátová, kontrola izolace; jedna reakce navíc (rezerva pro pipetovací chybu); případně další kontrolní a srovnávací vzorky). Podle tabulek reakčních směsí (tabulka 1, tabulka 2) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. PCR směs se připravuje na ledu.

Celková reakční směs se sterilně smíchá podle pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce. Zamíchá se jemným vortexováním a rozdělí se po daném počtu  $\mu\text{l}$  do označených zkumavek.

Je-li koncentrace vyizolované DNA nad  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , zředí se vodou vhodnou pro PCR na požadovanou koncentraci. Poté se do každé zkumavky přidá daný počet  $\mu\text{l}$  templátové DNA. Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola (místo templátové DNA se použije voda vhodná pro PCR), vzorky a pozitivní kontrola. Zkumavky s templátovou DNA se otvírají a s templátovou DNase manipuluje až poté, kdy jsou všechny zkumavky s reagensy pro PCR uzavřeny a reakční směs je rozpipetována do PCR zkumavek. Zkumavky s templáty se otvírají pokud možno v tomto pořadí: vzorky – pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během PCR. Zkumavky se vloží do termálního cykleru, zvolí se vhodný amplifikační program a přístroj se spustí podle návodu. Po skončení práce se opět dekontaminují PCR box i pracovní pomůcky dekontaminačním roztokem (6).


### Příprava templátů pro PCR

Jeden díl Extraction Solution (1) se smíchá s jedním dílem Dilution Solution (2). Jeden díl této směsi se smíchá s jedním dílem izolátu DNA.

Požadovaný objem  $4 \mu\text{l}$  roztoku templátu vkládaný do 1 PCR reakce tedy tvoří  $2 \mu\text{l}$  izolátu DNA a  $2 \mu\text{l}$  směsi pufrů (1) a (2) na  $20 \mu\text{l}$  celkové reakční směsi v 1 PCR.

**Tabulka 1. Příprava PCR pomocí kitu REDEExtract - N - Amp™ Plant PCR Kit – jednoduchá PCR.**

Složka	1 reakce ( $\mu\text{l}$ )
Voda vhodná pro PCR (4)	5,2
REDEExtract (3)	10
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Bez templátu	16
Templát (DNA izolát)	4
Včetně templátu	20

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10254.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu REDEExtract pro stanovení GMO	Revize	0

**Tabulka 2. Příprava PCR pomocí kitu REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits – duplexní PCR (množství vody je sníženo o součet objemů druhého páru primerů).**

Složka	1 reakce (μl)
Voda vhodná pro PCR (4)	4,4
REDEExtract (3)	10
1. pár primerů, primer F	0,4
1. pár primerů, primer R	0,4
2. pár primerů, primer F	0,4
2. pár primerů, primer R	0,4
Bez templátu	16
Templát (DNA izolát)	4
Včetně templátu	20

Produkty amplifikace se následně vyhodnotí pomocí elektroforézy.

## 6 Literatura

- 1 Manuál kitu REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits firmy Sigma-Aldrich, univerzální kit pro PCR.