	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10255.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO	Revize	0

PROVEDENÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) POMOCÍ KITU REDTAQ 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.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq)

1 REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

2 PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

3 Voda vhodná pro PCR.


4 Amplifikační primery.

5 Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

4 Přístroje a pomůcky

1 PCR box.

2 Minishaker.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10255.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO	Revize	0

- 3 Termální cykler.
- 4 Vortex.
- 5 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.
- 6 Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 7 Výrobník ledu.
- 8 Lednice.
- 9 Mrazicí box a hlubokomrazicí box.
- 10 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 μ M

Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, který nemusí být viditelný, se přidá voda (3) v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok primeru, který se rozpipetuje po 50 μ l do zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu.

5.2.2 Pracovní roztok primeru o koncentraci 20 μ M


Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody (3). Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se do zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml po 15 μ 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 otre dekontaminačním roztokem (5) 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 REDTaq (1) se používá pro jednoduchou PCR reakci.

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 tabulky reakční směsi (tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. PCR směs se připravuje na ledu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10255.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO	Revize	0

Celková reakční směs se sterilně smíchá podle pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce příslušné k danému amplifikačnímu kitu. Zamíchá se jemným vortexováním a rozdělí se po daném počtu μl do označených zkumavek.

Je-li koncentrace vyizolované DNA vyšší než $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$, zředí se vodou vhodnou pro PCR na požadovanou koncentraci. Poté se do každé zkumavky přidá daný počet μl 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 DNA se manipuluje až poté, kdy jsou všechny zkumavky s reagensii 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 (5).

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma – Aldrich)

Pro amplifikaci kitem se použijí izoláty DNA přímo bez úprav, pouze se ředí na výše uvedenou koncentraci vodou vhodnou pro PCR.

Tabulka 1. Příprava PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR).

Složka	1 reakce (μl)
Voda vhodná pro PCR (1.2)	5,5 – 6,5
REDTaq (3.1)	12,5
Primer F	0,5 – 1,0
Primer R	0,5 – 1,0
Bez templátu	20
Templát (DNA izolát)	5,0
Včetně templátu	25

Pro dosažení optimálního průběhu PCR reakce lze měnit objemy templátu, primerů a vody vhodné pro PCR, přičemž voda pouze doplňuje reakci na požadovaný objem $25 \mu\text{l}$. Pouze objem amplifikačního kitu REDTaq je neměnný.

Produkty amplifikace se následně vyhodnotí pomocí elektroforézy.

6 Literatura

- 1 Manuál kitu REDTaq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl_2 , Sigma-Aldrich, univerzální kit pro PCR.