	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10258.1 – Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA PRO STANOVENÍ GMO METODOU PCR

1 Účel a rozsah

Postup slouží k vyhodnocení amplifikovaných fragmentů DNA získaných metodou PCR pomocí kapilární elektroforézy (přístroj Fragment Analyzer, Advanced Analytical, USA).

2 Princip

Elektroforéza patří mezi separační metody izolující molekuly o rozdílné hmotnosti, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli. V případě kapilární elektroforézy probíhá separace molekul v kapilárách, které jsou naplněné gelem.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.1 ds DNA Reagent Kit pro kapilární elektroforézu (Advanced Analytical)

- 1 FA ds DNA Gel, 35 -500 bp. Skladuje se v lednici.
- 2 Interkalační barvivo. Skladuje se v mrazicím boxu.
- 3 5 × koncentrovaný dsDNA Inlet Buffer. Skladuje se v lednici.
- 4 5 × koncentrovaný Capillary Conditioning Solution.
- 5 35/500 bp marker. Skladuje se v mrazicím boxu.
- 6 (75 – 400) bp DNA Ladder. Skladuje se v mrazicím boxu.
- 7 Minerální olej.
- 8 1× ředící TE pufr.

3.2 Další chemikálie potřebné pro kapilární elektroforézu

- 9 Capillary storage buffer.
- 10 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10258.1 – Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Fragmentační analyzátor se softwarem, např. Fragment Analyzer, Advanced Analytical.
- 2 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a špičky bez filtru.
- 3 96jamková PCR destička.
- 4 Hlubokojamková destička.
- 5 Samolepicí fólie.
- 6 Centrifuga pro 96jamkové destičky.
- 7 Lednice.
- 8 Mrazicí a box.
- 9 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, parafilm, plastové zkumavky 50ml.

5 Postup


5.1 Příprava reagensů pro kapilární elektroforézu

5.1.1 Příprava gelu

Gel (1) a interkalační barvivo (2) se před použitím vytemperují na laboratorní teplotu. Smíchají se příslušné objemy gelu (1) a interkalačního barviva (2) v množství podle počtu analyzovaných vzorků viz Tabulka 1. Mírným poklepem o dlaň se v gelu rozmíchá interkalační barvivo. Při míchání se dbá na to, aby nedocházelo ke vzniku bublin. Zkumavka s gelem se umístí do přístroje

Tabulka 1. Tabulka znázorňující potřebné množství gelu a interkalačního barviva pro uvedený počet analyzovaných vzorků (jamek).

Počet analyzovaných vzorků	Objem interkalačního barviva (µl)	Objem gelu (ml)
12	0,5	10
24	0,75	15
36	1,0	20
48	1,25	25
96	2,25	45

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10258.1 – Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

5.1.2 Příprava 1 × Inlet buffer

5 × Inlet buffer (1.3) se před ředěním vytemperuje na laboratorní teplotu.

Do 50ml kónické zkumavky se nalije 10 ml 5 × Inlet buffer (3) a doplní se vodou (10) do objemu 50 ml. Třepáním se promíchá. Takto připravený roztok se napipetuje v množství 1 µl do každé jamky řady A hlubokojamkové destičky. Destička se umístí do fragmentového analyzátoru. Zbýlý naředěný roztok se skladuje v lednici.

5.1.3 Příprava 1 × Capillary conditional solution

Do 50ml kónické zkumavky se nalije 10 ml 5 × Capillary conditional solution (4) a doplní se vodou (10) do objemu 50 ml. Třepáním se promíchá. Zkumavka s capillary conditional solution se umístí do fragmentového analyzátoru. Naředěný roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

5.1.4 Příprava 35bp/500 bp markeru

35/500 bp marker (5) se před použitím vytemperuje na laboratorní teplotu. Poté se roztok protřepe a zcentrifuguje na minicentrifuze. Do každé jamky řady A 96jamkové PCR destičky se pipetuje 30 µl markeru (5). Každá jamka se překryje 20 µl minerálního oleje (7), aby se zajistila možnost opětovného použití. Deska se umístí do fragmentového analyzátoru. Takto připravená deska se může použít pro 30 aplikací.

5.1.5 Příprava DNA Ladderu 75-400 bp

DNA Ladder 75-400 bp (6) se před použitím vytemperuje na laboratorní teplotu. Po rozpuštění se roztok protřepe a zcentrifuguje na minicentrifuze.

5.2 Kapilární elektroforéza

Do každé z jamek 1 – 11 PCR destičky (3), které budou obsahovat vzorek, se napipetuje 22 µl 1 × ředícího TE pufru (8). K 22 µl ředícího TE pufru (8) se napipetují 2 µl vzorku. Do 12. jamky se napipetuje 24 µl DNA Ladderu (6). Směs v jamkách se promíchá opakovaným nasáváním pipetou nebo vortexem. Pokud je vzorků více, překryje se každá jamka 20 µl minerálního oleje (7), aby se zabránilo vypařování vzorku. Po promíchání se deska překryje samolepicí fólií a centrifuguje 2 min při 2500 rpm. Takto připravená deska se umístí do fragmentového analyzátoru a spustí se elektroforéza.

Po ukončení kapilární elektroforézy se zpracují získaná data pomocí vyhodnocovacího software přístroje.

6 Literatura

- 1 Manuál kitu dsDNA Reagent Kit