	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10262.1 – Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize	0

KVALITATIVNÍ STANOVENÍ SCREENINGOVÝCH ELEMENTŮ A GENETICKÝCH MODIFIKACÍ METODOU qPCR POMOCÍ ROTOR-GENE PROBE PCR KITU

1 Účel a rozsah

Postup slouží ke kvalitativní detekci přítomnosti screeningových elementů a genetických modifikací ve vzorcích osiv, krmiv a kompletních krmných směsí molekulárně biologickou metodou qPCR. Cílem zkoušek je zjistit, zda zkoumaný vzorek obsahuje screeningový element či genetickou modifikaci.

2 Princip

Kvalitativní i kvantitativní stanovení genetických modifikací pomocí qPCR je založeno na principu polymerázové řetězové reakce, která umožňuje detekci a kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase prostřednictvím fluorescenčně značené sondy, která po navázání na cílový úsek DNA emituje světlo zachycené detektorem. Kvalitativní qPCR má díky sondě vyšší specifitu než konvenční PCR. Při kvalitativní qPCR se porovnává amplifikace specifického úseku DNA s pozitivní kontrolou certifikovaného referenčního materiálu.

Poznámky


- 1 Seznam použitých zkratk
qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce, real-time PCR
GM – genetická modifikace
DNA – deoxyribonukleová kyselina, z anglického deoxyribonucleic acid
CRM – certifikovaný referenční materiál
primer R – primer reverse
primer F – primer forward
EURL – European Union Reference Laboratories
ENV – kontrola čistoty prostředí
BT – beztemplátová kontrola
N – negativní kontrola
P – pozitivní kontrola

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.1 Rotor-Gene Probe PCR kit (QIAGEN)

- 1 Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (dále Rotor-Gene Mix).
- 2 PCR voda.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10262.1 – Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize	0

3.2 Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitu

- 3 Voda (deonizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Amplifikační primery.
- 5 Sonda (proba) vhodná pro daný typ termálního cykleru.
- 6 Tris-EDTA pufr 100 × (TE pufr).
- 7 (0,5 – 1) % roztok chlornanu sodného.
- 8 Dekontaminační roztok.
- 9 Ethanol 70%.
- 10 Certifikovaný referenční materiál.


4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vortex nebo minishaker.
- 2 Centrifuga.
- 3 PCR box.
- 4 Termální cykler Rotor-Gene (QIAGEN).
- 5 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.
- 6 Plastové zkumavky o objemu 2 ml, 0,6 ml, 0,2 ml.
- 7 Optické qPCR zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,1 ml (stripy).
- 8 Výrobník ledu.
- 9 Lednice.
- 10 Mrazicí box.
- 11 Latexové rukavice bezpudrové, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

5 Postup

5.1 Příprava pufru 1×TE pufru

Do odměrné baňky o objemu 100 ml se napipetuje 1 ml 100×TE pufru (6) a doplní se vodou (3) po značku. Toto množství se pak rozdělí do 2ml plastových zkumavek, které se uzavřou víčkem. Zkumavky se uchovávají v lednici do vypořebování.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10262.1 – Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize	0

5.2 Příprava amplifikačních primerů

5.2.1 Zásobní roztok amplifikačních primerů o koncentraci 100 μM

Do zkumavky s primerem (4) v podobě prášku (lyofilizátu) na dně (nemusí být viditelný) se přidá $1 \times$ TE pufr (5.1) nebo voda (2) v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μl do zkumavek o objemu 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 amplifikačních primerů o koncentraci 10 μM

K 1 dílu zásobního roztoku amplifikačního primeru (5.2.1) se přidá 9 dílů $1 \times$ TE pufru (5.1) nebo vody (2). Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15 μl a zamrazí se v mrazicím boxu. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

5.3 Příprava sond

5.3.1 Zásobní roztok sondy o koncentraci 100 μM

Do zkumavky se sondou (5) v podobě lyofilizátu na dně (nemusí být viditelný) se přidá $1 \times$ TE pufr (5.1) nebo voda (2) v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μl do zkumavek o objemu 0,2 ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky se sondou se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu. Sondy je třeba chránit před světlem.

5.3.2 Pracovní roztok sondy o koncentraci 10 μM

K 1 dílu zásobního roztoku sondy (5.3.1) se přidá 9 dílů $1 \times$ TE pufru (5.1) nebo vody (2). Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15 μl a zamrazí se v mrazicím boxu. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky sond. Sondy je třeba chránit před světlem.


5.4 Polymerázová řetězová reakce

Připraví se PCR box: Dekontaminují se předměty i prostory od jakýchkoli molekul DNA – použije se UV záření (30 min) a dekontaminační roztok (8).

Připraví se pipety, sterilní špičky, zkumavky, optické qPCR zkumavky, sondy (5.3.2), primery (5.2.2), Rotor-Gene Mix (1), voda (2), odpadní nádoba, nádoba na uchování ledu a stojánky na zkumavky.

Stanoví se počet reakcí tj.: počet vzorků, pozitivní kontrola (P), negativní kontrola (N) – vše v duplexech; beztemplátová kontrola (BT) a kontrola čistoty prostředí (ENV) – v jednom provedení. Je nutné počítat s jednou až dvěma reakcemi navíc jako rezervou.

Podle tabulky 1 se vypočítají celkové objemy všech složek reakční směsi, které se pipetují v daném pořadí. Směs se připravuje na ledu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10262.1 – Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize	0

Při přípravě nesmí dojít k záměně primerů a sond. Po celou dobu přípravy je třeba chránit sondy před světlem.

Směs se zamíchá jemným vortexováním a rozdělí se po (20 – 22,5) μ l do označených optických zkumavek.

Tabulka 1 Příprava qPCR reakční směsi.

Složky	1 reakce (μ l)
PCR voda	* variabilní
Rotor-Gene Mix	12,5
Primer F	* variabilní
Primer R	* variabilní
Sonda	* variabilní
Objem směsi bez templátu	20 – 22,5
Templátová DNA (izolát)	2,5 – 5
Objem směsi včetně templátu	25

* objemy komponentů reakční směsi jsou variabilní dle detekované GM, hodnoty vycházejí z validačních metod (EURL) ověřených v rámci validace metody.


Koncentrace DNA vzorků a kontrol se naředí vodou (2) na stejné hodnoty (10 – 40) ng/ μ l (max. 100 ng/reakci pro cycler Rotor-Gene). Poté se do každé optické zkumavky s (20 – 22,5) μ l reakční směsi přidá (2,5 – 5) μ l templátové DNA. Jednotlivé složky se těsně před pipetováním důkladně promíchají na vortexu a poté se pipetuje v tomto pořadí:

ENV (místo templátu se použije voda (2), tato zkumavka zůstává otevřená po celou dobu pipetování všech vzorků, uzavírá se jako poslední); BT (místo templátu se použije voda); N; vzorky a P.

Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během PCR a vloží se do rotoru cykleru (36 nebo 72 jamek). Poté se zvolí amplifikační program a cykler Rotor-Gene se spustí dle návodu. Po skončení práce se opět dekontaminuje PCR box i pracovní pomůcky.

6 Literatura

- 1 Rotor-Gene Probe Handbook, Qiagen, 2009.
- 2 Rotor-Gene Q MDx Uživatelský manuál, Qiagen, 2010.
- 3 Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10262.1 – Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize	0

- 4 Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, ENGL, 2011.
- 5 ČSN EN ISO 21570 Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů - Metody založené na kvantitativním stanovení kyseliny nukleové.
- 6 ČSN EN ISO 24276 Metody pro detekci modifikovaných organismů a odvozených produktů, Všeobecné požadavky a definice.