 <p>Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001</p>	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<p>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</p> <p>10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu</p>	Vydání	1
		Revize	1

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ GENETICKÝCH MODIFIKACÍ METODOU qPCR POMOCÍ ROTOR-GENE PROBE PCR KITU

1 Účel a rozsah

Postup slouží ke kvantitativnímu stanovení genetických modifikací ve vzorcích osiv, krmiv a kompletních krmných směsí molekulárně biologickou metodou qPCR. Cílem zkoušek je zjistit procentuální obsah genetické modifikace ve zkoumaném vzorku.

2 Princip

Kvantitativní i kvalitativní stanovení GM pomocí qPCR je založeno na principu polymerázové řetězové reakce, která umožňuje detekci a kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase prostřednictvím fluorescenčně značené sondy. Kvantitativní qPCR má díky sondě vyšší specifitu než konvenční PCR. Při kvantitativní qPCR se porovnává koncentrace DNA s GM (s cílovým genem) ku koncentraci DNA s vnitřním genem (s referenčním genem) dané plodiny.

Poznámky


- 1 *Seznam použitých zkratk*
 - GM – genetická modifikace*
 - qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce, real-time PCR*
 - PCR – polymerázová řetězová reakce*
 - CRM – certifikovaný referenční materiál*
 - JRC – Joint Research Centre*
 - VG – vnitřní gen*
 - EURL – European Union Reference Laboratories*
 - ENV – kontrola čistoty prostředí*
 - BT – beztemplátová kontrola*
 - N – negativní kontrola*
 - P – pozitivní kontrola*
 - primer R – primer reverse*
 - primer F – primer forward*

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.


 <p>Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001</p>	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<p>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</p> <p>10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu</p>	Vydání	1
		Revize	1

3.2 Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitu - číslování

- 3 Voda (deonizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Amplifikační primery.
- 5 Sonda (proba) vhodná pro daný typ termálního cyklu.
- 6 Tris-EDTA pufr 100 × (TE pufr).
- 7 (0,5 – 1) % roztok chlornanu sodného.
- 8 Dekontaminační roztok.
- 9 Ethanol 70%.
- 10 CRM ve formě extraktu DNA zkoumané GM.
- 11 CRM ve formě extraktu DNA bez obsahu GM zkoumané plodiny.
- 12 CRM ve formě extraktu DNA jiné plodiny než je zkoumaná GM.

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.

 <p>Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001</p>	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<p>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</p> <p>10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu</p>	Vydání	1
		Revize	1

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 (2) po značku. Toto množství se pak rozdělí do 2ml plastových zkumavek, které se uzavřou víčkem. Uchovává se v ledničce do vypotřebování.

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 × 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 1dílu zásobního roztoku amplifikačního primeru (5.2.1) se přidá 9 dílů 1 × 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 × 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 1dílu zásobního roztoku sondy (5.3.1) se přidá 9 dílů 1 × 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 Příprava kalibrační řady GM a vnitřního genu (VG) dané plodiny

Před přípravou qPCR reakční směsi je nutné vytvořit dvě kalibrační řady. První pro zkoumanou GM (cílový gen) a druhou pro vnitřní gen (referenční gen) dané plodiny. Tyto kalibrační řady slouží pro zhotovení kalibrační křivky a následný výpočet obsahu GM ve vzorku. Rozsah kalibrační řady se stanovuje podle metodiky JRC, přičemž se může lišit

 <p>Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001</p>	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<p>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</p> <p>10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu</p>	Vydání	1
		Revize	1

v závislosti na druhu GM. Počet kalibračních bodů je v rozmezí 4 až 5. Výchozí koncentrace DNA všech použitých CRM a koncentrace vzorků musí být stejná a to v rozmezí (10 – 40) ng/μl (max. 100 ng/reakci pro cycler Rotor-Gene). Na požadovanou koncentraci se ředí vodou (2).

5.4.1 Příprava kalibrační řady GM (cílového genu)

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, voda (2), CRM (10), zkumavky, nádoba na uchování ledu, stojánky na zkumavky a odpadní nádoba.


CRM se těsně před pipetováním důkladně promíchají na vortexu a poté se připraví postupným ředěním od nejvyšší koncentrace DNA po nejnižší koncentraci DNA. Ředí se vodou (2). Potřebný objem roztoků naředěné DNA pro kalibrační řadu je závislý na počtu požadovaných amplifikačních křivek pro analýzu (triplet, kvartet, kvintet). Příprava kalibrační řady probíhá na ledu. Přehled pipetovaných roztoků udává tabulka 1.

5.4.2 Příprava kalibrační řady vnitřního genu (referenčního genu) dané plodiny

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, voda (2), CRM (10/11), zkumavky, nádoba na uchování ledu, stojánky na zkumavky a odpadní nádoba.

CRM se těsně před pipetováním důkladně promíchá na vortexu, a poté se připraví postupným ředěním od nejvyšší koncentrace DNA po nejnižší koncentraci DNA – rozsah kalibrační řady musí být stejný jako u zkoumané GM. Vyextrahovaná DNA z CRM zkoumané GM (cílový gen) se ředí vodou (2). Potřebný objem roztoků naředěné DNA pro kalibrační řadu je závislý na počtu požadovaných amplifikačních křivek pro analýzu (triplet, kvartet, kvintet). Příprava kalibrační řady probíhá na ledu. Přehled pipetovaných roztoků udává tabulka 2.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 1. Souhrn jednotlivých položek pro GM.

	ENV (GM)	BT (GM)	N (GM)	P (GM)	Kalibrační řada (GM)
Voda (2)	+	+			+
CRM (10)				+	+
CRM (11/12)			+		
qPCR reakční směs pro GM	+	+	+	+	+

Tabulka 2. Souhrn jednotlivých položek pro vnitřní gen dané plodiny.

	ENV (VG)	BT (VG)	N (VG)	P (VG)	Kalibrační řada (VG)
Voda (2)	+	+			+
CRM (10/11)				+	+
CRM (12)			+		
qPCR reakční směs pro VG	+	+	+	+	+


5.5 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, kalibrační řada GM, kalibrační řada vnitřního genu dané plodiny, pozitivní kontroly (P) – vše ve třech opakováních; negativní kontroly (N) – ve dvou opakováních; beztemplátová kontrola (BT) a kontrola čistoty prostředí (ENV) – v jednom opakování pro GM a vnitřní gen dané plodiny. Nutno počítat s jednou až dvěma reakcemi navíc jako rezervou. Přehled pipetovaných roztoků udávají tabulky 1 a 2.

Podle tabulky 3 se vypočítají celkové objemy všech složek reakčních směsí, které se pipetují v daném pořadí. Směs se připravuje na ledu.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
		10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Revize

Tabulka 3. Příprava qPCR reakčních směsí pro GM a vnitřní gen dané plodiny.

GM		Vnitřní gen dané plodiny	
Složky	1 reakce (μl)	Složky	1 reakce (μl)
PCR voda	* variabilní	PCR voda	* variabilní
Master Mix	12,5	Master Mix	12,5
Primer (GM) F	* variabilní	Primer (VG) F	* variabilní
Primer (GM) R	* variabilní	Primer (VG) R	* variabilní
Sonda (GM)	* variabilní	Sonda (VG)	* variabilní
Objem směsi bez templátu	(20 – 22,5)	Objem směsi bez templátu	(20 – 22,5)
Templátová DNA (izolát)	(2,5 – 5)	Templátová DNA (izolát)	(2,5 – 5)
Objem směsi včetně templátu	25	Objem směsi včetně templátu	25

* objemy komponentů reakční směsi jsou variabilní podle detekované GM, hodnoty vycházejí z validovaných metod (EURL) ověřených v rámci verifikace metody.


Připraví se dvě reakční směsi (viz tabulka 3): jedna pro zkoumanou GM (cílový gen) a druhá pro vnitřní gen (referenční gen) dané plodiny. 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) μl do označených optických zkumavek. Poté se do každé optické zkumavky přidá k (20 – 22,5) μl reakční směsi a (2,5 – 5) μl templátové DNA. Jednotlivé složky se těsně před pipetováním důkladně promíchají na vortexu a poté se pipetuje v tomto pořadí:

ENV – kontrola čistoty prostředí (místo templátu se použije voda (2), tato zkumavka zůstává otevřená po celou dobu pipetování všech vzorků, uzavírá se jako poslední); BT – beztemplátová kontrola (místo templátu se použije rovněž voda); N – negativní kontrola. Kalibrační řady (pro GM a pro vnitřní gen dané plodiny) se pipetují od nejnižší koncentrace DNA k nejvyšší. Dále pak vzorky a P – pozitivní kontrola.

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 podle návodu. Důležité je vložit do software hodnoty koncentrace DNA pro kalibrační řadu cílového genu a kalibrační řadu referenčního genu.

Po skončení práce se opět dekontaminuje PCR box i pracovní pomůcky.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Držitel certifikátu ISO 9001	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10264.1 – Kvantitativní stanovení genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu	Vydání	1
		Revize	1

6 Literatura

- 1 Rotor-Gene Probe Handbook, Qiagen, 2009.
- 2 Rotor-Gene Q MDx Uživatelský manuál, Qiagen, 2010.
- 3 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR. JPP ÚKZUZ 10220.2, Brno 2015.
- 4 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.
- 5 Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, ENGL, 2011.
- 6 ČSN EN ISO 21570 Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Metody založené na kvantitativním stanovení kyseliny nukleové.
- 7 ČSN EN ISO 24276 Metody pro detekci modifikovaných organismů a odvozených produktů, Všeobecné požadavky a definice.