	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy –          zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10710.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu Type-it Microsatellite PCR	Revize	0

## PROVEDENÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) POMOCÍ KITU TYPE-IT MICROSATELLITE PCR

### 1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání amplifikačních fragmentů DNA, které se využijí k identifikaci odrůd zemědělských plodin pomocí analýzy mikrosatelitů.

### 2 Princip

Polymerázová řetězová reakce (dále PCR) je metoda, pomocí které dochází k mnohonásobnému namnožení (amplifikaci) vybraného úseku DNA. Úseky DNA, které se mají namnožit, musejí být na začátku i na konci označeny oligonukleotidy, tzv. primery. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA, přisedání primerů a syntézu DNA.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

#### Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

- 1 Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2× (dále Type – it).
- 2 RNase-Free voda.


#### Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

- 3 Voda vhodná pro PCR.
- 4 Amplifikační primery F a R.
- 5 1 × TE pufr.

Příprava: Do 50 ml zkumavky se napipetuje 1 ml 100× Tris - EDTA buffer solution TE a přidá se 99 ml vody (6). Toto množství se pak rozdělí do plastových 2ml zkumavek. Uchovává se v lednici.

- 6 Voda (deonizovaná, demineralizovaná nebo (re)destilovaná).
- 7 Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.
- 8 (0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

Příprava: Do 1000ml odměrného válce se nalije 200 ml 5% roztoku chlornanu sodného (dodává se komerčně od ověřeného výrobce) a doplní se vodou na objem 1000 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy –          zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10710.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu Type-it Microsatellite PCR	Revize	0

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 PCR box.
- 2 Minishaker.
- 3 Vortex.
- 4 Termální cyklér.
- 5 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ 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, buničitá vata, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

Sterilizace a dekontaminace se provádí podle charakteru materiálu buď tepelně v sušárně 1 h při (115 – 120) °C nebo chemicky (např. dekontaminačním roztokem, (0,5-1)% chlornanem sodným, apod.).

#### 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 se přidá 1  $\times$  TE (5) pufru nebo vody (3) v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 30  $\mu$ l do zkumavek o objemu 0,5 ml. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu.


###### 5.1.2 Pracovní roztok primeru o koncentraci 10 $\mu$ M

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá devítinásobný objem pracovního roztoku 1  $\times$  TE (5) pufru nebo vody (3). Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15  $\mu$ l a zamrazí se a uchovává v mrazicím boxu.

Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

##### 5.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR box se vysvítí UV zářením po dobu 30 min. Předměty v něm umístěné a jeho prostory se dekontaminují dekontaminačním roztokem (7). Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem, stojánky, apod.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy –          zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10710.1 – Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu Type-it Microsatellite PCR	Revize	0

Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová kontrola – Bt a kontrola prostředí - ENV). Podle tabulky reakčních směsí (Tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Je třeba počítat s 1 – 2 reakcemi na 10 reakcí navíc jako rezervou pro pipetovací chybu. Jednotlivé reagenty se uchovávají v mrazícím boxu, proto se musí předem rozmrazit, buď při laboratorní teplotě nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají jejím převrácením nebo krátkým a jemným vortexováním a zcentrifugují se na minicentrifuze.

PCR směs se připravuje na ledu.

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Reakční směs se opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 20 µl do předem označených sterilních 0,1ml PCR zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 5 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly a kontroly prostředí se přidá voda vhodná pro PCR. Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola (Bt), vzorky a kontrola prostředí (ENV). Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce v termální cyklu. Zkumavka s kontrolou prostředí se nechá otevřená po celou dobu pipetování. Zkumavky se promíchají mírným poklepem, zcentrifugují se na minicentrifuze, vloží do termálního cyklu a zahájí se příslušná PCR amplifikace. Po skončení práce se opět dekontaminují PCR box i pracovní pomůcky dekontaminačním roztokem (7) a vysvítí se UV zářením po dobu 30 min.

**Tabulka 1. Složení reakční směsi.**

Složka	1 reakce (µl)
PCR voda (2 nebo 3)	5,5
Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2× (1)	12,5
Primer F (4)	1
Primer R (4)	1
Templát	5

Objem amplifikačního kitu Type – it (1) je neměnný, tj. 12,5 µl. Objemy templátové DNA, primerů (4) a vody (2 nebo 3) se mohou měnit za účelem dosažení optimálního průběhu reakce, přičemž voda (2 nebo 3) pouze doplňuje reakci na celkový objem reakční směsi 25 µl. Produkty amplifikace se následně vyhodnotí pomocí fragmentové analýzy. viz postup 10258.1 Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR.

## 6 Literatura

- 1 Manuál kitu Type-it® Microsatellite PCR Handbook, Qiagen 2011.
- 2 Suchomelová M.: Stanovení přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR, JPP ÚKZÚZ, Brno, 2007.