	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60071.1 – Úprava a homogenizace vzorků krmiv pro stanovení přítomnosti GMO metodou PCR	Revize	0

ÚPRAVA A HOMOGENIZACE VZORKŮ KRMIV PRO STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI GMO METODOU PCR

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání reprezentativního podílu vzorku krmiva, který je vhodný pro analýzu GMO metodou PCR.

2 Princip

Postup zpracování vzorků krmiv zahrnuje veškeré potřebné kroky, které umožní získat reprezentativní podílu vzorku. Upravený vzorek je vhodný pro analýzu GMO metodou PCR.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Etanol denaturovaný 70%, pro čištění povrchů.
- 3 Dekontaminační roztok na čištění mlýnu (např. Instruzyme, Steridine).
- 4 Chlornan sodný, (0,5 – 1)% roztok.

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

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní mlýn nebo laboratorní šrotovník.
- 2 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Horkovzdušná sušárna.
- 4 Vysavač.
- 5 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, sterilní zkumavky (přibližně 50ml), sterilní krabičky na vzorky přibližně 1000ml, plastová miska vhodné velikosti pro promíchání vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60071.1 – Úprava a homogenizace vzorků krmiv pro stanovení přítomnosti GMO metodou PCR	Revize	0

5 Postup

Příprava mlýnku: Nádoby a nože se omyjí vodou (1) a ponoří se do dekontaminačního roztoku (3). Potom se opět opláchnou vodou (1) a vysuší 20 min v horkovzdušné sušárně při 100 °C. Poté se nechají vychladnout na laboratorní teplotu.

Celý vzorek krmiva (šrot, granule, pokrutiny apod.) se mele ve vhodném typu mlýnku (laboratorní drtič, nožový mlýn). Doba mletí a rychlost rotace se uzpůsobí množství a povaze vzorku. Je nutné dbát na to, aby se vzorek při mletí nezahřál nad 40 °C, aby nedošlo ke znehodnocení DNA. Velice tvrdý vzorek (např. rýže) se mele opakovaně, je však nutné mezi jednotlivými mletími nechat vzorek asi 30 min v nádobě vychladnout.

Po ukončení mletí se nádoby a nože omyjí vodou (1) a ponoří se do dekontaminačního roztoku (3). Potom se opět opláchnou vodou (1) a vysuší 20 min v horkovzdušné sušárně při 100 °C. Poté se nechají vychladnout na laboratorní teplotu.

Jestliže množství vzorku mnohonásobně překračuje kapacitu sběrné misky mlýnku, vzorek se v plastové misce důkladně promíchá a nakvartuje se.

Z takto zhomogenizovaného vzorku se do sterilních 2ml zkumavek naváží dva paralelní vzorky v množství, které odpovídá zvolenému extrakčnímu kitu. Současně se odebere asi 10 g zhomogenizovaného vzorku do sterilní 50ml zkumavky, která se uchovává pro případ opakování analýzy při laboratorní teplotě nebo jinak podle charakteru vzorku. Zbytek zhomogenizovaného vzorku se uchovává po dobu potřeby ve sterilních uzavíratelných krabičkách při laboratorní teplotě nebo jinak podle charakteru vzorku.

Takto upravený vzorek se použije k izolaci DNA.

6 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 21571 Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny. ÚNMZ 2007.
- 2 Uživatelský manuál k přístroji Maxi Grinder Solo.