	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60075.1 – Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA	Revize	0

ÚPRAVA A HOMOGENIZACE VZORKŮ OSIV PRO EXTRAKCI DNA

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání reprezentativního podílu vzorku osiva, který je vhodný extrakci DNA.

2 Princip

Základem je mechanické rozrušení rostlinného pletiva na menší částice.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

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

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Rotorový rychlomlýnek.
- 2 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Horkovzdušná sušárna.
- 4 Vysavač.
- 5 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, kvalitativní filtrační papír, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, sterilní zkumavky (2ml, 50ml).

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.).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60075.1 – Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA	Revize	0

5 Postup

Celý vzorek osiva se mele v rotorovém rychlomlýnku. Doba mletí a rychlost rotace se uzpůsobí množství vzorku. Je nutné dbát na to, aby se vzorek při mletí nezahřál nad 40 °C, aby nedošlo ke znehodnocení DNA. Po ukončení mletí se veškeré součásti mlýnku omyjí vodou s detergentem, opláchnou a ořou dekontaminačním roztokem. Z takto zhomogenizovaného vzorku se do předem označených sterilních 2ml zkumavek naváží dva paralelní vzorky v množství, které odpovídá zvolenému extračnímu kitu. Zbytek takto zhomogenizovaného vzorku se uchovává ve sterilních 50ml zkumavkách 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 rotorovému rychlomlýnku Pulverisette 14.