	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60076.1 – Úprava a homogenizace vzorků čerstvého materiálu pro extrakci DNA	Revize	0

ÚPRAVA A HOMOGENIZACE VZORKŮ ČERSTVÉHO MATERIÁLU PRO EXTRAKCI DNA

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání reprezentativního podílu vzorku čerstvého rostlinného materiálu, který je vhodný pro 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 (re)destilovaná).
- 2 Tekutý dusík.
- 3 Hydrogenfosforečnan draselný, trihydrát.
- 4 Dihydrogenfosforečnan draselný.
- 5 Sacharóza.
- 6 Bovine serum albumin frakce V.
- 7 Polyvinylpyrrolidon.
- 8 Kyselina askorbová.
- 9 Dekontaminační roztok.
- 10 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 (1).

- 11 Hydroxid sodný, c (NaOH) = 1 mol/l.

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60076.1 – Úprava a homogenizace vzorků čerstvého materiálu pro extrakci DNA	Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Sterilní, vychlazené třecí misky s tloučky.
- 2 Homogenizátor.
- 3 Ponorný mixér.
- 4 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 5 Mrazicí a hlubokomrazicí box.
- 6 Nádoba na tekutý dusík.
- 7 2ml a 50 ml sterilní zkumavky.
- 8 Sterilní plastové Petriho misky a Pasteurovy pipety.
- 9 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování tekutého dusíku.

Sterilizace a dekontaminace se provádí dle 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 pufru Dellaporta


43,4 g hydrogenfosforečnanu draselného (3), 8,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (4), 200 g sacharózy (5), 3 g séra (6) a 40 g polyvinylpyrolidonu (7) se rozpustí ve sterilní vodě (1) a doplní do objemu 2 l. Takto připravený roztok se uchovává v mrazicím boxu. Před použitím k homogenizaci rostlinného materiálu se rozmrazí a přidá se kyselina askorbová (8) v množství 1,06 g/200 ml pufru. Pomocí NaOH (11) se upraví pH na 7,6. Do druhého dne se spotřebuje. Pufr se používá vytemperovaný na teplotu 4 °C.

5.2 Úprava a homogenizace vzorku

5.2.1 Homogenizace listů pomocí tekutého dusíku

U zelených rostlin se čerstvý rostlinný materiál po dodání do laboratoře zamrazí v hlubokomrazicím boxu minimálně na 3 dny.

Nejdříve se tekutým dusíkem vychladí třecí misky i tloučky tak, že se tekutý dusík (2) nalije do misky a postupně se přilévá až do řádného zchlazení misky, při kterém již nedochází k výraznému odpařování dusíku. K dusíku (2) v misce se přidá tkáň a pomocí tloučku se rozmělní na jemný prášek. 100 mg získaného prášku se vychlazenou kopistkou či lžičkou

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	1
	60076.1 – Úprava a homogenizace vzorků čerstvého materiálu pro extrakci DNA	Revize	0

přeneso do zkumavky s lyzačním pufrém. Aby se zamezilo nukleolytickému štěpení DNA, musí se s rozmělněným materiálem pracovat rychle. Nenechává se roztát, co nejdříve se přeneso do lyzačního pufru. Po započeti lyze vzorku se s roztokem manipuluje velmi jemně a opatrně, protože vlákna DNA, která se do roztoku uvolňují, jsou velmi náchylná na mechanické poškození. Opatrným zacházením se zajistí co nejlepší celistvost vyextrahované DNA. Takto upravený vzorek se použije k izolaci DNA.

Po skončení práce se všechny povrchy otrou roztokem chlornanu sodného (10). Třecí misky s tloučky se umyjí vodou (1) a etanolem (9), vysuší se zabalené v alobalu v horkovzdušné sušárně 1 h při (115 – 120) °C. Nechají se vychladnout na laboratorní teplotu a umístí do mrazicího boxu.

5.2.2 Homogenizace hroznu pomocí ponorného mixéru

Ponorným mixérem se rozmixuje celý hrozen, tj. třapina i bobule. Do lyzačního pufru se přidá polyvinylpyrrolidon (7) v množství 100 mg na 500 µl pufru a důkladně se rozpustí. Přibližně 500 µl rozmixované směsi se napipetuje do sterilních 2ml zkumavek a přidá se lyzační pufr a dále se postupuje podle JPP 10700.1 Izolace DNA kit DNeasy Plant Mini.

5.2.3 Homogenizace réví (dřeva) pomocí homogenizátoru Roller

Do Petriho misky se naškrábe lýko z réví (asi 2 g). Přelije se 5 ml vychlazeného pufru Dellaporta (5.1). Materiál se potom vloží do homogenizátoru Roller. Během homogenizace se přelije dalšími asi 15 ml uvedeného pufru a ten se sbírá do 50ml zkumavky. Inkubuje se 10 min na ledu nebo v lednici. Pak se vzorek centrifuguje 4 min při 1000 ot/min. Supernatant se slije do nové 50ml zkumavky. Centrifugací se odstraní hrubý balast. Dále se centrifuguje 25 min při 10000 ot/min. Supernatant se vylíje a získaný pelet se použije pro extrakci DNA. Do 50ml zkumavky s peletem z rostlinného materiálu se napipetuje 1000 µl lyzačního pufru a řádně se promíchá. Poté se přeneso Pasteurovou pipetou 2 × 500 µl této suspenze do dvou čistých 2ml zkumavek. Tímto se získají z jednoho homogenizovaného vzorku dva vzorky paralelní. Dále se postupuje podle JPP 10700.1 Izolace DNA kit DNeasy Plant Mini.

6 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 21571 Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny. ÚNMZ, 2007.
- 2 JPP 40300.1 Stanovení přítomnosti fytoplazem metodou PCR.
- 3 Manuál kitu DNeasy®Plant Handbook, Qiagen, 2015.