

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2017**

**Ročník XXI, číslo 3/2017**

**Brno 2017**

## Obsah

- 1 Stanovení obsahu taurinu v krmivech metodou ionexové chromatografie**  
Hana Nováková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Praha,  
Za Opravnou 4, 150 00 Praha 5 - Motol 1
  
- 2 Zavedení detekce FG72, MON87705 a MON87708 u sóji**  
Kateřina Staňková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 14

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

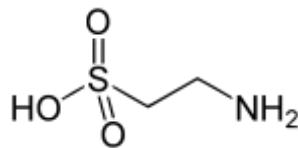
# Stanovení obsahu taurinu v krmivech metodou ionexové chromatografie

*Hana Nováková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL, Za Opravnou 4, 150 00 Praha 5 - Motol  
hana.novakova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Taurin ( $C_2H_7NO_3S$ ) patří po chemické stránce mezi organické kyseliny - je derivátem aminokyseliny cysteinu. Taurin je řazen k aminokyselinám, přestože postrádá karboxylovou skupinu, a bylo by tedy přesnější označení 2 - aminoethansulfonová kyselina. V organismu se vyskytuje ve vazbě na kyselinu cholinovou a účastní se při trávení tuků.



**Obrázek č. 1. Strukturní vzorec taurinu.**

Taurin je přirozenou složkou krmiv živočišného původu, v rostlinných krmivech se nevyskytuje. Pro možnost doplnění koncentrace taurinu v krmivech se používá synteticky připravený taurin registrovaný jako doplňková látka z kategorie 3(a) "Nutriční doplňkové látky"/"vitamíny, provitamíny a chemicky přesně definované látky se srovnatelným účinkem" a je určená pro všechny druhy a kategorie zvířat<sup>1</sup>. Taurin je zcela esenciální látkou pro kočky, které si ho neumějí samy syntetizovat. Nedostatek taurinu u nich může vést k degeneraci fotoreceptorů v očích a tím ke slepotě. Dále se jeho deficiencie může projevit srdečními poruchami (kardiomyopatie).

Vzhledem ke vzrůstajícímu množství krmiv vyráběných pro domácí zvířata a zájmu nakupujících o kvalitu krmiva, je kontrola této doplňkové látky důležitá. V této práci byla odzkoušena metoda stanovení na analyzátoru aminokyselin, doporučená EURL-FA<sup>2</sup>

pro kontrolu obsahu taurinu přítomného v kompletním krmivu a premixech pro přípravu krmných směsí.

## 2 Účel, princip a rozsah metody

Taurin je povolen k používání jako doplňková látka nařízením (ES) č. 722/2015<sup>1</sup>. Pro tuto doplňkovou látku nejsou stanoveny povolené maximální nebo minimální limity obsahu taurinu v krmivu, jsou však uvedeny doporučené hodnoty maximálního obsahu taurinu v krmivech pro jednotlivé druhy zvířat.

**Tabulka č. 1. Doporučené maximální obsahy taurinu v krmivu.**

Druh zvířat	mg taurinu v 1 kg kompletního krmiva o obsahu vlhkosti 12 %
Psovití a Lasicovití (Canidae a Mustelidae)	2 000
Kočkovití (Felidae)	2 500
Masožravé ryby	25 000

Z těchto hodnot laboratoř vycházela při výběru materiálů k validaci metody stanovení taurinu v krmných směsích a premixech pro přípravu krmných směsí.

Pro stanovení taurinu byla ověřena metoda ionexové chromatografie. Taurin se ze zkoušených vzorků extrahuje kyselinou chlorovodíkovou a následně se stanoví po derivatizaci ninhydrinem podle metody uvedeného v příloze III nařízení 152/2009 (EC), postup F.

## 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok,  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

3.2 Dusík (čistoty 5.0).

3.3 Citronan sodný, dihydrát.

3.4 Kyselina citronová, monohydrát.

3.5 Chlorid sodný.

- 3.6 Azid sodný.
- 3.7 Hydroxid sodný.
  - 3.7.1 Hydroxid sodný, roztok o koncentraci 0,5 g/ml.
- 3.8 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) odpovídající stupni 1 podle EN ISO 3696.
- 3.9 Thiodiglykol, koncentrovaný.
- 3.10 Ninhydrin.
  - 3.10.1 Ninhydrin, roztok.

Příprava: Naváží se 20 g ninhydrinu, který se převede do tmavé zásobní lahve a rozpustí v 750 ml methylcellosolvu (3.12). Rozpouštění probíhá za probublávání dusíkem (3.2) pod dvoucestným kohoutem. Po rozpouštění se přidá 250 ml acetátového tlumivého roztoku (3.13) a dále 1 g hydrindantinu (3.11) rozpuštěného v malém množství metylcellosolvu (3.12). Po uzavření se roztok nechá ještě asi 10 min probublávat plynem (3.2) a pak se výstup ze zásobní lahve připojí na zásobní měch inertního plynu v přístroji.
- 3.11 Hydrindantin.
- 3.12 Methylcellosolv.
- 3.13 Acetátový tlumivý roztok, pH = 5,5.
- 3.14 Taurin, standardní látka,  $\geq 99,5 \%$ , Sigma Aldrich,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ,  $M_r = 125,15$ .
  - 3.14.1 Taurin, standardní roztok taurinu – 2,5  $\mu\text{mol/ml}$ , ředěný tlumivým roztokem (3.20).
  - 3.14.2 Taurin, pracovní standardní roztok taurinu – 0,25  $\mu\text{mol/ml}$ , ředěný tlumivým roztokem (3.20).
- 3.15 Ionex pro hlavní kolonu: Poly 8.
- 3.16 Ionex pro předkolonu: Ostion KS 0804.
- 3.17 Ethanol, čistý, 96%.

- 3.18 Tlumivý roztok pro taurin, pH = 2,6. V programu (tab. č. 2) je označován jako tlumivý roztok č. 1. Pro přípravu jednoho litru tohoto roztoku se naváží 11,54 g kyseliny citronové (3.4), 3,45 g citronanu sodného (3.3), 9,65 g chloridu sodného (3.5), 0,1 g azidu sodného (3.6) a pipetou se odměří 2,5 ml thiodiglykolu (3.9). Navážky se převedou do litrové odměrné baňky a doplní po značku vodou (3.8).
- 3.19 Regenerační tlumivý roztok.  
V programu (tab. č. 2) je označována jako tlumivý roztok č. 6. Pro jeho přípravu se naváží 8 g hydroxidu sodného (3.7) a nechá se za stálého míchání rozpustit ve 100 ml vody (3.8). Připravený roztok se převede do baňky o objemu jednoho litru a doplní se po značku vodou (3.8).
- 3.20 Tlumivý roztok, pH = 2,2.  
Příprava: Naváží se 28 g kyseliny citronové (3.4), 23 g chloridu sodného (3.5) a 0,2 g azidu sodného (3.6) do dvoulitrové odměrné baňky. Přidá se 10 ml thiodiglykolu (3.11), 500 ml vody (3.8) a obsah se nechá rozpustit. Poté se doplní po značku vodou (3.8).
- 3.21 Tlumivý roztok, pH = 7,9. V programu (tab. č. 2) je označován jako tlumivý roztok č. 4. Pro přípravu 0,5 l tohoto roztoku se naváží se 9,8 g citronanu sodného (3.3), 26,3 g chloridu sodného (3.5) 0,05 g azidu sodného (3.6), 1,025 g kyseliny borité (3.22), přidá se 300 ml vody (3.8) a pipetou se odměří 0,75 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 g/ml (3.7.1), obsah se nechá se rozpustit. Poté se doplní po značku vodou (3.8).
- 3.22 Kyselina boritá.

## **4 Přístroje a pomůcky**

- 4.1 Automatický analyzátor aminokyselin, AAA 400.
- 4.2 Váhy analytické s přesností na 0,0001 g.
- 4.3 Váhy analytické s přesností na 0,01 g.
- 4.4 Filtrační papír, filtrační rychlost velmi vysoká, KA 1 – M, průměr 150 mm.
- 4.5 Filtrační papír, filtrační rychlost střední, KA 5, průměr 150 mm.

- 4.6 Filtrační nálevka se skleněnou fritou S3.
- 4.7 Laboratorní mlýn.
- 4.8 Erlenmayerova baňka s NZ 29/32, 250 ml.
- 4.9 Třepačka horizontální.

## **5 Pracovní postup**

### **5.1 Úprava vzorku**

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace. Do Erlenmayerovy baňky se naváží přiměřené množství vzorku s přesností na 0,0001 g s ohledem na předpokládané množství taurinu ve vzorku. Pro obsahy do 1000 mg/kg se navažují 3 g vzorku, pro obsahy mezi 1000 mg/kg a 5000 mg/kg se navažují (1 – 2) g a pro obsahy nad 5000 mg/kg se navažuje 0,25 g až 0,5 g vzorku. Vzorek se extrahuje 100 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) na třepačce (4.9) (30 – 60) min. Suspenze se zfiltruje nejprve přes řídký filtrační papír (4.4) a pak znovu přes filtr střední hustoty (4.5). Výrazně se tak urychlí rychlost filtrace. Po případném naředění tlumivým roztokem (3.20) se obsah taurinu stanoví na analyzátoru aminokyselin (4.1).

### **5.2 Příprava kalibrační křivky taurinu**

#### **Pracovní standardní roztok taurinu (3.14.2)**

Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 5 ml standardního roztoku taurinu (3.14.1) o koncentraci  $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$  a doplní se po značku stáčecím roztokem (3.20) o pH 2,2.

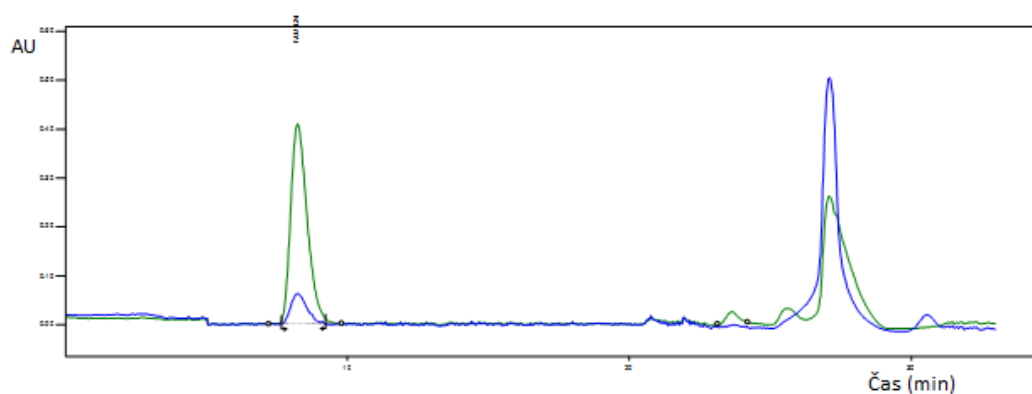
Do sady 50ml odměrných baněk se napipetuje postupně (0; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0) ml standardního roztoku (3.14.1), doplní se tlumivým roztokem o pH 2,2 a promíchá. Takto připravená sada odpovídá koncentracím (0; 0,01; 0,05; 0,10; 0,20)  $\mu\text{mol/ml}$ . Poslední koncentrace připravené sady je 0,25  $\mu\text{mol/ml}$ , což je pracovní standardní roztok taurinu (3.14.2).

### **5.3 Chromatografické stanovení taurinu**

Obsah taurinu se stanoví metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a fotometrickým detektorem na analyzátoru aminokyselin (4.1). Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 2. Objem nástřiku do analyzátoru je 100  $\mu\text{l}$ .

**Tabulka č. 2. Program pro stanovení taurinu.**

Čas	Teplota kolony	Tlumivý roztok	Příkaz	Poznámka
0,00	57	1	Inject	pH = 2,6
5,00	57	1	Zero	
6,00	57	4	StartEquil	
10,00	74	No Change	None	
11,00	74	6	None	0,2M NaOH
18,00	74	1	None	pH = 2,6
22,00	74	1	H <sub>2</sub> O	
27,00	57	1	Load	
29,00	57	1	NHD	
33,00	57	1	AcqStop	
35,00	57	1	None	



**Obrázek č. 2. Ukázka chromatogramu pro stanovení taurinu.**



## 5.4 Výpočet

Obsah taurinu ( $X$ ) vyjádřený v g/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{A \times c \times V \times M \times R}{B \times m_a \times 1000}$$

kde

$A$  je plocha píku taurinu v extraktu,

$B$  plocha píku kalibračního standardu,

$c$  koncentrace standardu taurinu v  $\mu\text{mol/ml}$ ,

$V$  objem extraktu v ml,

$M$  molární hmotnost taurinu ( $M_{\text{taurin}} = 125,15 \text{ g/mol}$ ),

$m_a$  hmotnost zkušebního vzorku v g,

$R$  ředění.

## 6 Experimentální výsledky a diskuse

### 6.1 Materiál

Validace metody byla provedena na dvou vzorcích krmných směsí a jednom vzorku premixu. Deklarované obsahy taurinu jsou uvedeny v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3. Deklarované obsahy taurinu v jednotlivých krmivech.**

Materiál	Deklarovaný obsah taurinu
Kompletní krmivo pro dospělé kočky s rybou a zeleninou	1000 mg/kg
Doplňkové krmivo pro psy a kočky ORB 6	2750 mg/kg
Doplňkové krmivo pro psy a kočky TKS 5	8000 mg/kg

### 6.2 Linearita a pracovní rozsah metody

Linearita byla určena z hodnot naměřených v kalibrační přímce uvedených v tabulce č. 4. Linearita kalibrační křivky byla ověřena v rozsahu koncentrací (0,01 - 0,25)  $\mu\text{mol/ml}$  na pěti kalibračních hladinách (0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,25)  $\mu\text{mol/ml}$  a každý kalibrační bod

byl připraven čtyřikrát (viz. tabulka č. 4). Požadavek na linearitu křivky je dán korelačním koeficientem s hodnotou od 0,99 do 1,0 a vyhodnocením kalibrační křivky pomocí QC testu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 5a a 5b.

**Tabulka č. 4. Linearita kalibrační křivky stanovení taurinu.**

<b>Popis</b>	<b>Koncentrace standardu (μmol/ml)</b>	<b>Plocha-1</b>	<b>Plocha-2</b>	<b>Plocha-3</b>	<b>Plocha-4</b>	<b>Průměr ploch</b>
<b>Hladina 1</b>	0,01	0,5473	0,60565	0,52698	0,51677	0,5492
<b>Hladina 2</b>	0,05	3,0000	3,0619	2,7622	3,1061	2,9825
<b>Hladina 3</b>	0,10	6,1569	6,2195	6,6321	6,4770	6,3714
<b>Hladina 4</b>	0,20	13,0848	12,5364	12,7860	12,7328	12,7850
<b>Hladina 5</b>	0,25	15,9126	15,6560	15,7957	15,9365	15,8252

Vyhodnocení statistických parametrů bylo provedeno pomocí programu EffiValidation 3.0<sup>3</sup>.

**Tabulka č. 5a. Linearita: korelační QC koeficient.**

<b>Vypočtený korelační koeficient</b>	<b>Testovaný korelační koeficient</b>	<b>Vypočtený QC</b>	<b>Testovaný QC</b>	<b>Hypotéza</b>
0,99991	0,9900	1,15	5,00	Přijata

Závěr: Na základě hodnot korelačního a QC koeficientu byla prokázána linearita metody.

**Tabulka č. 5b. Linearita: ANOVA na těsnost proložení.**

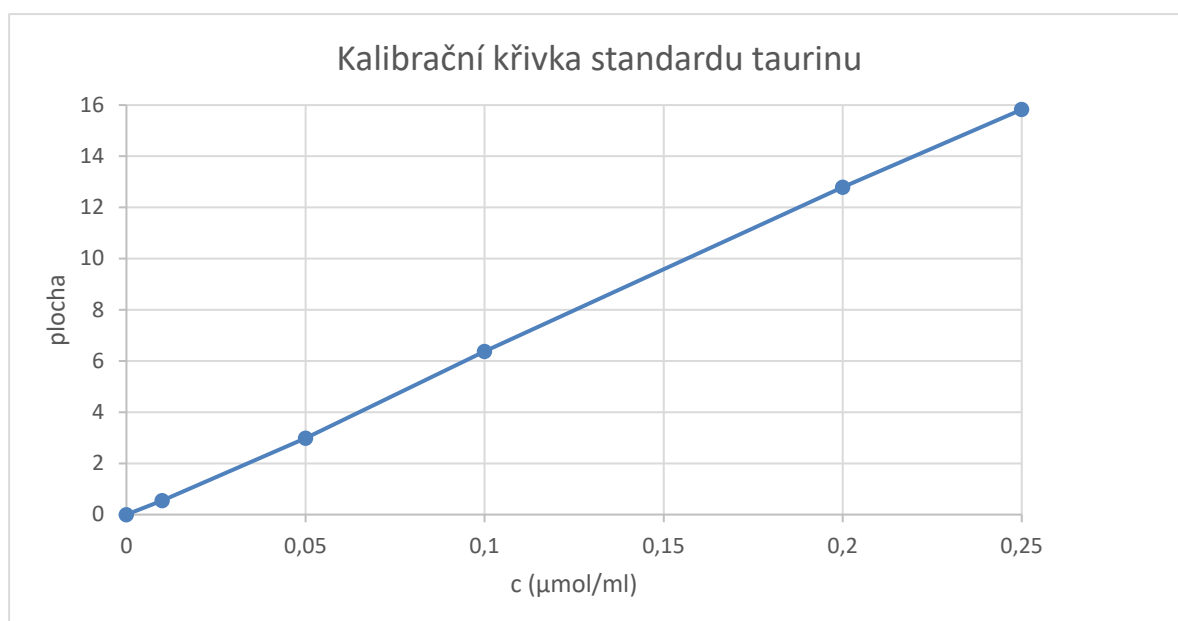
<b>Zdroj</b>	<b>Suma čtverců</b>	<b>Počet stupňů volnosti</b>	<b>Průměrná suma čtverců</b>	<b>F</b>	<b>F - krit</b>	<b>Hypotéza</b>
Proložení	0,12577	3	0,0419239	1,47	8,69	Přijata
Opakování	0,42729	15	0,0284861	-	-	-

Závěr: Linearita byla statisticky potvrzena na základě metody ANOVA.

### 6.3 Citlivost

Citlivost metody je definována jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být detekován při odezvě instrumentace metody. Matematicky se jedná o směrnici kalibrační přímky. V tabulce č. 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty kalibrační přímky. Kalibrační přímka je uvedena na obr. 3.

Závěr: Citlivost analytické metody je dána směrnici kalibrační křivky a odpovídá hodnotě 64,07157 pro taurin.



Obrázek č. 3. Kalibrační křivka taurinu.

### 6.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní vyhodnocení. Tyto hodnoty byly vypočteny z hodnot uvedených v tabulce č. 4 a jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Mez detekce a mez stanovitelnosti.

Parametr	Hodnota (mg/kg)	Hodnota (%)
Mez detekce	91,8	0,009
Mez stanovitelnosti	144,3	0,014

## 6.5 Opakovatelnost – přesnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno z deseti navážek jednoho vzorku krmiva. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 7. Vyhodnocení statistických parametrů bylo provedeno pomocí programu EffiValidation 3.0 je uvedeno v tabulce č. 8.

**Tabulka č. 7. Stanovení opakovatelnosti.**

### Kompletní krmivo pro dospělé kočky s rybou a zeleninou

Navážka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Obsah (%)	0,1050	0,1002	0,1014	0,0982	0,1007	0,1008	0,1088	0,1061	0,1096	0,1072

### Doplňkové krmivo pro psy a kočky ORB 6

Navážka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Obsah (%)	0,2729	0,2678	0,2675	0,2600	0,2776	0,2690	0,2698	0,2562	0,2629	0,2559

### Doplňkové krmivo pro psy a kočky TKS 5

Navážka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Obsah (%)	0,6256	0,6477	0,6261	0,6333	0,6567	0,6516	0,6401	0,6383	0,6386	0,6549

Závěr: Pro všechny výsledky byla potvrzena hypotéza o normalitě dat (Kolmogorov-Smirnov test) a použití Grubbsova, Dixonova, Cochranova a Grubbsova párového testu nepotvrdilo přítomnost odlehlých bodů.

**Tabulka č. 8. Statistické parametry.**

Materiál	Průměr měření (mg/kg)	Rel. opakovatelnost (%)
Kompletní krmivo pro dospělé kočky s rybou a zeleninou	0,1038	3,88
Doplňkové krmivo pro psy a kočky ORB 6	0,2660	2,67
Doplňkové krmivo pro psy a kočky TKS 5	0,6413	1,75

Závěr: Průměrná opakovatelnost analytické metody z EffiValidation je 0,008 jednotek, tj. 2,90 % rel.

## 6.6 Správnost

Správnost byla zjištěna testem výtěžnosti přidáním známého množství stanovované látky ke vzorku se známým obsahem. Výtěžnost byla vypočtena podle vztahu

$$\text{Re } c(\%) = \frac{c_{\text{exp}}}{c_{\text{teor}}} \times 100 \quad (2)$$

kde  $c_{\text{exp}}$  je výsledná hodnota obsahu analytu získaná experimentem,  $c_{\text{teor}}$  je teoretická hodnota obsahu analytu přidaného do testovacího vzorku.

K přesně známé navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky bylo postupně přidáno stanovené množství čistého standardu taurinu (3.14) v množství 0,5 g/kg, 1,0 g/kg, 8,0 g/kg a 25,0 g/kg obsahu taurinu. Na každé úrovni bylo provedeno 5 měření (viz. tabulka č. 9). Mírou správnosti je odchylka průměru nalezeného množství od teoretického množství přídavku vyjádřená v procentech (výtěžnost). Ke statistickému vyhodnocení správnosti se použije t-test (viz. tabulka č. 10), příp. interval spolehlivosti (viz. tabulka č. 11).

**Tabulka č. 9. Správnost – přídavek ke vzorku se zjištěným obsahem určované látky – hladina 0, přídavky - hladiny 1 až 4.**

Popis	Předloženo (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Nalezeno (g/kg)
Hladina 0	0,0	0,4929	0,4899	0,4853	0,4767	0,4976
Hladina 1	0,9885	0,9964	1,0928	1,0517	1,0020	0,9830
Hladina 2	1,4885	1,4847	1,4752	1,5260	1,5176	1,5139
Hladina 3	8,4885	8,4949	8,5389	8,5267	8,4797	8,5408
Hladina 4	25,4885	25,4637	25,5093	25,5569	25,4920	25,5162

**Tabulka č. 10. Vyhodnocení z programu EffiValidation: Správnost: Omezený koncentrační rozsah – rekonstituce možná.**

Popis	Předloženo (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Výtěžnost	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
<b>Hladina 1</b>	0,9885	1,02518	103,71	0,04588	5	1,78762	2,776	přijata
<b>Hladina 2</b>	1,4885	1,50348	101,01	0,02218	5	1,5103	2,776	přijata
<b>Hladina 3</b>	8,4885	8,5162	100,33	0,02746	5	2,25545	2,776	přijata
<b>Hladina 4</b>	25,4885	25,50762	100,08	0,0342	5	1,25019	2,776	přijata

**Tabulka č. 11. Vyhodnocení z programu EffiValidation: Správnost: Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici: t-test.**

Popis	Přídavek (g/kg)	Nalezeno (g/kg)	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
<b>Hladina 0</b>	0	0	0	0,00796	-0,01161-0,01161	přijata
<b>Hladina 1</b>	0,5	0,5367	107,34	0,04588	0,48868-0,58472	přijata
<b>Hladina 2</b>	1,0	1,015	101,5	0,02218	0,9907-1,0393	přijata
<b>Hladina 3</b>	8,0	8,0277	100,3465	0,02746	7,99823-8,05721	přijata
<b>Hladina 4</b>	25,0	25,0191	100,0765	0,0342	24,9893-25,05535	přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

## Souhrn statistických údajů metody

Validační parametr	Validační hodnota
Opakovatelnost	2,90 % relativních
Správnost	Správnost metody prokázána
Linearita	Linearita metody prokázána
Pracovní rozsah	(500 – 25000) mg/kg
Mez detekce	0,009 %
Mez stanovitelnosti	0,014 %
Citlivost	64,07157

## 7 Závěr

V rámci práce byl sestaven pracovní postup a stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, pracovní rozsah, mez detekce, mez stanovitelnosti a citlivost.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci laboratorního zkoušení.

## 8 Literatura

1. PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2015/722, o povolení taurinu jako doplňkové látky pro psovitě (*Canidae*), kočkovitě (*Felidae*), lasicovitě (*Mustelidae*) a pro masožravé ryby, 2015.
2. EURL Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the Application for the Authorisation of Feed Additives according to Regulation (EC) No 1831/2003, FAD-2010-0215, Dijana Mitič, 2012.
3. Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999-2007.

# Zavedení detekce FG72, MON87705 a MON87708 u sóji

*Kateřina Staňková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno

katerina.stankova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Geneticky modifikované neboli transgenní rostliny (dále GM) jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál pomocí genových technologií. Jedná se o změny cílené, tedy získané tak, že do rostliny vneseme nebo v ní cíleně deaktivujeme nějaké konkrétní geny.

Typy GM plodin:

- Plodiny zlepšených vlastností (tolerance k herbicidům, rezistence vůči hmyzím škůdcům, rezistence k dalším biotickým a abiotickým stresům).
- Plodiny s přidanou hodnotou produktů (vyšší a kvalitativně zlepšen obsah olejů – řepka, sója, vyšší obsah lysinu – kukuřice aj.).
- Plodiny, které produkují proteiny (využitelné ve farmacii, speciální enzymy pro průmyslové využití, produkty, které jsou základem bioplastů a biopaliv).

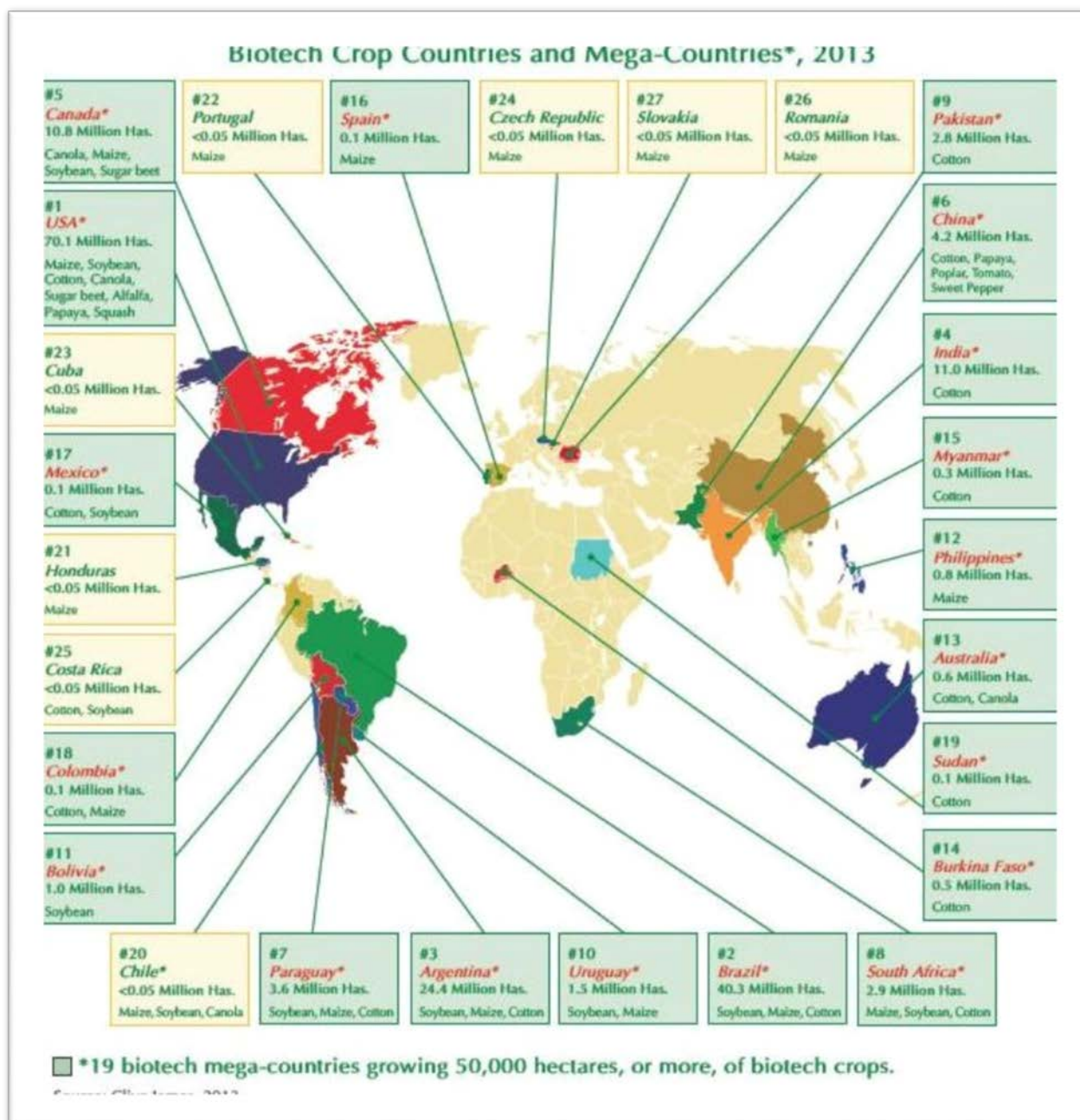
V roce 2013 pěstovalo GM plodiny 18 milionů zemědělců ve 27 zemích světa. Plocha GM plodin zaujímala celkem 175,2 milionů hektarů. Ve srovnání s rokem 2012 došlo k 3% nárůstu plochy.

V posledních třech letech se na růstu využívané plochy podílejí především rozvojové země, zatímco v průmyslově vyspělých zemích se využívaná plocha nemění. Ve využití GM plodin vede Severní Amerika, následují Jižní Amerika a Asie. Na ostatních kontinentech jsou využívány GM plodiny méně (viz obr. 1). Evropa je známá svým odmítavým postojem ke GM zemědělským plodinám. Pro pěstování jsou povolena pouze GM kukuřice MON810.

Z hlediska oseté plochy kukuřicí MON810 v Evropě stojí za zmínku pouze Španělsko. Česká republika, Slovensko, Portugalsko a Rumunsko pěstují GM kukuřici MON810 v zanedbatelné míře.



Co se týče GM plodin povolených pro dovoz do EU a následné použití jako potraviny a krmiva, je jejich počet větší. Důvodem je skutečnost, že Evropa není soběstačná v produkci krmiv, takže musí značnou část potřebných komodit dovážet ze třetích zemí. Pro dovoz a použití na výrobu potravin a krmiv je povoleno celkem 58 GM plodin, a to: 7 typů sóji, 37 typů kukuřice, 8 typů bavlníku, 3 typy řepky, 2 typy bakteriální biomasy a 1 typ cukrovky.



Obr 1. Přehled zemí z celého světa, ve kterých se v roce 2013 pěstovaly GM plodiny.

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1	USA*	70.1	Maize, soybean, cotton, canola, sugar beet, alfalfa, papaya, squash
2	Brazil*	40.3	Soybean, maize, cotton
3	Argentina*	24.4	Soybean, maize, cotton
4	India*	11.0	Cotton
5	Canada*	10.8	Canola, maize, soybean, sugar beet
6	China*	4.2	Cotton, papaya, poplar, tomato, sweet pepper
7	Paraguay*	3.6	Soybean, maize, cotton
8	South Africa*	2.9	Maize, soybean, cotton
9	Pakistan*	2.8	Cotton
10	Uruguay*	1.5	Soybean, maize
11	Bolivia*	1.0	Soybean
12	Philippines*	0.8	Maize
13	Australia*	0.6	Cotton, canola
14	Burkina Faso*	0.5	Cotton
15	Myanmar*	0.3	Cotton
16	Spain*	0.1	Maize
17	Mexico*	0.1	Cotton, soybean
18	Colombia*	0.1	Cotton, maize
19	Sudan*	0.1	Cotton
20	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
21	Honduras	<0.1	Maize
22	Portugal	<0.1	Maize
23	Cuba	<0.1	Maize
24	Czech Republic	<0.1	Maize
25	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
26	Romania	<0.1	Maize
27	Slovakia	<0.1	Maize
<b>Total</b>		<b>175.2</b>	

<sup>1</sup> 19 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops  
\* Rounded off to the nearest hundred thousand

**Obr. 2. Tabulka zobrazující přehled druhů pěstovaných GM plodin a výměru osetých ploch v jednotlivých zemích světa.**

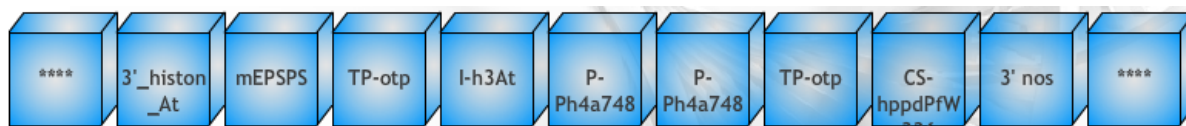
Cílem vývojového úkolu je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u sóji. Nově zaváděnými transgeny jsou FG72, MON87705 a MON87708.

## FG72

Geneticky modifikovaná sója FG72 byla vytvořena za účelem získání odrůdy tolerantní k herbicidům na bázi glyfosátu a/nebo isoxaflutole (IFT - 5-cyclopropyl- 1,2-isoxazol-4-yl  $\alpha\alpha$ -trifluoro-2-mesyloxy-p-tolyl keton).

Genom transgenní sóji obsahuje kopie genů 2mepsps and hppdPfw336. První gen kóduje mEPSPS enzym (modifikovaná 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate syntáza), který propůjčuje toleranci ke glyfosátu. Druhý gen kóduje modifikovanou verzi HPPD enzymu, který je zodpovědný za toleranci k herbicidu IFT (isoxaflutole). Z elementů, které lze v laboratoři stanovit v rámci screeningu, obsahuje tato genetická modifikace terminátor NOS.

Schéma genového konstruktů:



**Obr 3. Schéma genového konstruktů genetické modifikace sóji FG72.**

3'\_histon\_At Terminační sekvence z H.4 genu z *Arabidopsis thaliana*.

mEPSPS Sekvence kódující modifikovaný EPSP enzym (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) z kukuřice.

TP-otp Chloroplastový tranzitní peptid obsahující sekvenci RuBisCO z kukuřice a slunečnice.

I-h3At Intron z H.3 genu z *Arabidopsis thaliana*.

P-Ph4a748 Sekvence zahrnující promotorovou oblast histonu H4 gene z *Arabidopsis thaliana*.

P-Ph4a748 Sekvence zahrnující promotorovou oblast histonu H4 gene z *Arabidopsis thaliana*.

TP-otp Chloroplastový tranzitní peptid obsahující sekvenci RuBisCO z kukuřice a slunečnice.

CS-hppdPfw336 Modifikovaná kódující sekvence 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenázy z *Pseudomonas fluorescens*.

3' nos 3' terminační sekvence genu nopalin syntázy z *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA.

Geneticky modifikovaná sója FG72 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

### MON87705

Geneticky modifikovaná sója MON87705 byla vytvořena za účelem získání odrůdy se změněným složením mastných kyselin (geny FAD2 a FATB1) a zároveň i tolerantní k herbicidům na bázi glyfosátu (gen cp4epsps).

Z elementů, které lze v laboratoři stanovit v rámci screeningu, obsahuje tato genetická modifikace promotor FMV a element cp4epsps.

Schéma genového konstruktů:



**Obr 4. Schéma genového konstruktů genetické modifikace sóji MON87705.**

- LB Levá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.
- P-FMV/Tsf1 Chimérický konstitutivní promotor genu Tsf1 z *Arabidopsis thaliana* spojený se zesilovací sekvencí promotoru 35S z FMV.
- ctp2 Vedoucí sekvence kódující chloroplastový tranzitní peptid z *Arabidopsis thaliana*.
- cp4epsps Sekvence kódující EPSPS enzym (5-enolpiruvilshikimate- 3-phosphate synthase) z bakterie *Agrobacterium sp. Strain*.
- 3'E9 Terminační sekvence z genu hrachu rbcS E9 (*Pisum sativum*).
- P-7S Promotor odvozený od Sphas1 genu sóji.
- Fatb2-A Částečná sekvence fad2-1A genu, který potlačuje endogenní hladinu stejnojmenného enzymu.

- fatb1-A Částečná sekvence fatb1-A genu, který potlačuje endogenní hladinu stejnojmenného enzymu.
- RB Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.
- RB Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.
- fatb1-A Částečná sekvence fatb1-A genu, který potlačuje endogenní hladinu stejnojmenného enzymu.
- fad2-1A Částečná sekvence fad2-1A genu, který potlačuje endogenní hladinu stejnojmenného enzymu.
- LB Levá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

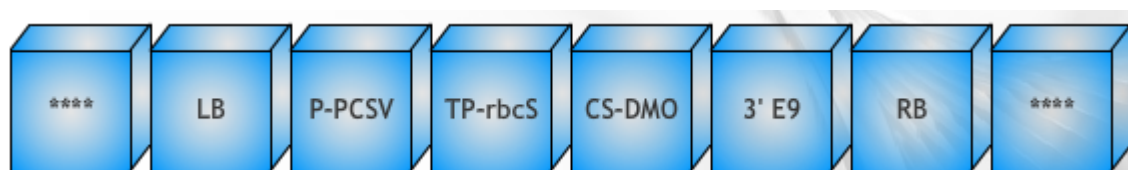
Geneticky modifikovaná sója MON87705 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

### MON87708

Geneticky modifikovaná sója MON87708 byla vytvořena za účelem získání odrůdy tolerantní k herbicidům na bázi dikamby (3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina).

Genom transgenní sóji MON87708 obsahuje kopii genu dmo z bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Tento gen kóduje DMO enzym (dikamba monooxygenáza) odpovědný za toleranci k herbicidům obsahující výše uvedenou účinnou látku.

Schéma genového konstruktů:



**Obr 5. Schéma genového konstruktů genetické modifikace sóji MON87708.**

- LB Levá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.
- P-PCSV Promotor z viru peanut chlorotic streak caulimovirus.
- TP-rbcS Sekvence z rbcS tranzitního peptidu z hrachu.
- CS-DMO Dikambo monooxygenázový gen z bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*.
- 3' E9 Terminační sekvence z hrachu (*Pisum sativum*) rbcS E9 gen.
- RB Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Geneticky modifikovaná sója MON87708 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

## **2 Princip**

Základem metod detekce výše uvedených genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o hojně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení určitého úseku DNA.

PCR se provádí automatizovaně v termálním cykleru. Před vlastní PCR je důležité provést úplnou počáteční denaturaci DNA. Tím se zajistí, že při prvním kroku cyklu nedojde pouze k částečnému oddělení komplementárních řetězců, ale všechny molekuly původní DNA budou jednořetězcové a přístupné primerům. Následuje denaturační krok prvního cyklu. Během druhého kroku, tzv. annealingu, přisedají primery ke specifickým sekvencím matricové DNA. Primery jsou navrženy tak, že se vážou k protilehlým řetězcům dvoušroubovice 3'-konci směrem k sobě a vymezují délku amplifikovaného úseku. Ve třetím kroku cyklu tzv. extenzi jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou ve směru od 5'-konce ke 3'-konci. Následující cyklus začíná opět denurací dvouvláknové DNA a vše se opakuje. Vzhledem ke specifické sekvenci primerů je amplifikovaný úsek mezi nimi stále stejný. Celkový produkt PCR se nazývá amplikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po tisíce párů bazí (bp), která se stanoví pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Přístroje a pomůcky**

- 1 Analytické váhy.
- 2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Vortex.
- 4 Centrifuga.
- 5 Vodní lázeň.
- 6 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230, 260, 280 nm).
- 7 Minitřepačka.

- 8 Laminární box.
- 9 Termální cykler.
- 10 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 11 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 12 Transiluminátor.
- 13 Fotodokumentační zařízení se softwarem.
- 14 pH metr.
- 15 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.
- 16 Plastové zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 17 Výrobník ledu.
- 18 Přenosná UV lampa.
- 19 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí podle charakteru materiálu buď tepelně (v sušárně 1 h při (115 – 120) °C) nebo chemicky např. 70% etanolem, (0,5 – 1)% chlornanem sodným, apod.

### **3.2 Chemikálie**

- 1 NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv
- 2 Lysis Buffer CF.
- 3 Buffer C2.
- 4 Buffer C3.
- 5 Wash buffer CQW.
- 6 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 7 Elution buffer CE.
- 8 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 9 Proteinase K (lyofilizát).
- 10 Proteinase buffer PB.

- 11 REDTaq®ReadyMix™PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich.
- 12 REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (dále REDTaq).
- 13 Voda vhodná pro PCR.
- 14 Amplifikační primery
- GM03: GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C.
- GM04: GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG.
- FMV-1: AAG CCT CAA CAA GGT CAG.
- FMV-2: CTG CTC GAT GTT GAC AAG.
- NOS-1: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG.
- NOS-3: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA.
- GT73\_TmF: GGG ATG ACG TTA ATT GGC TCT G.
- GT73\_TmR: GGC TGC TTG CAC CGT GAA G.
- MAE071: AGA TTT GAT CGG GCT GCA GG.
- SHA097: GCA CGT ATT GAT GAC CGC ATT A.
- MON 87705 primer 1: TTC CCG GAC ATG AAG CCA TTT AC.
- MON 87705 primer 2: ACA ACG GTG CCT TGG CCC AAA G.
- MON87708 primer 1: TCA TAC TCA TTG CTG ATC CAT GTA G.
- MON87708 primer 2: AGA ACA AAT TAA CGA AAA GAC AGA ACG.
- 15 Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE.
- 16 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na<sub>2</sub>EDTA.
- 17 Trizma base.
- 18 Ledová kyselina octová.
- 19 Hydroxid sodný, c(NaOH) = 1 mol/l, 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.



## **Příprava TAE pufu**

Příprava zásobního roztoku  $50 \times$  TAE

1. Příprava 0,5M zásobního roztoku EDTA:

186,1 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  se vmíchá do (750 – 800) ml (re)destilované vody.  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes hustý filtrační papír. Roztok se skladuje neomezeně při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris:

Náváží se 242 g Trizma base a rozpustí v 650 ml (re)destilované vody. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml předem připraveného 0,5M zásobního roztoku EDTA (pH 8,5). Doplní se (re)destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě.

## **Příprava pracovního roztoku $1 \times$ TAE pro elektroforézu**

Odměří se 20 ml zásobního roztoku  $50 \times$  TAE a doplní se (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

## **Příprava agarózového gelu**

Používá se 0,8% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA (0,64 g agarózy) a 2% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů (1,6 g agarózy nebo agarózy High Resolution). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního  $1 \times$  TAE pufu. Vaří se při teplotě (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle (15 – 20) min do doby, až se vyčeří roztok a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Mezitím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se přidá 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadélko a agar se nalije do vany s hřebínkem. Asi po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem  $1 \times$  TAE pufu.

## **Další chemikálie**

- 20 Ribonuklease A 10 mg/ml (DNase and protease free) – RNáza A.
- 21 (re)destilovaná voda.
- 22 Agaróza.

- 23 Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × (re) destilovanou vodou.
- 24 Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. GeneRuler™50bp DNA Ladder).
- 25 6 × Loading Dye Solution.
- 26 Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).
- 27 (0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.
- 28 70% etanol.
- 29 Dekontaminační roztok.

### **Testovaný materiál**

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku. Negativní kontroly se používají pro prokázání specifity reakce, a to jen v případě nově zaváděných genetických modifikací.

#### **FG72**

AOCS 0610-A (naše označení CRM 26/2012) obsahující nad 99,9 % GM sóji FG72 z AOCS (American Oil Chemists' Society).

Tato pozitivní kontrola je ve formě izolátu DNA.

#### **MON87705**

AOCS 0210-A (naše označení CRM 13/2014) obsahující kukuřici MON87460 z AOCS (American Oil Chemists' Society).

#### **MON87708**

AOCS 0311-A (naše označení CRM 14/2014) obsahující kukuřici MON87708 z AOCS (American Oil Chemists' Society).

Pozitivní kontroly CRM 13/2014 a 14/2014 jsou ve formě sójového prášku a musí se z nich nejprve vyizolovat DNA.

## 4 Pracovní postup

### Izolace DNA

Před začátkem vlastní izolace DNA je nutno připravit tyto roztoky:

**Pufir C4:** převede se kvantitativně celý obsah tuby obsahující pufir C2 do tuby s obsahem pufiru C3 a dobře se promíchá. Výsledný pufir C4 uskladněný při laboratorní teplotě je stabilní 1 rok. Pro dokonalejší rozpuštění obou komponent se doporučuje inkubace 5 min při teplotě 45 °C.

**Pufir C5:** ke koncentrátu pufiru C5 se přidá (95 – 100)% etanol, a to v množství uvedeném na lahvičce pufiru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufir lze uchovávat při laboratorní teplotě po dobu 1 roku.

**Proteináza K:** k lyofilizované Proteináze K se přidá množství proteinázového pufiru uvedené na obalu. Roztok proteinázy K je stabilní při teplotě –20 °C po dobu 6 měsíců.

Vlastní izolace DNA probíhá v několika krocích. Nejdřív se musí připravit pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem a působením UV záření po dobu 30 min. Vodní lázeň se přehřeje na teplotu 65 °C a dá se přehřát lyzační pufir CF na teplotu 65 °C. Do 2ml zkumavky se naváží 200 mg zhomogenizovaného vzorku (pozitivní kontroly). Prvním krokem izolace DNA je buněčná lyze, kdy se ke vzorku přidá 550 µl lyzačního pufiru CF, dobře se promíchá (15 s), přidá se 10 µl proteinázy K a 10 µl RNázy A a opět se promíchá (2 – 3) s. Inkubuje se 30 min při teplotě 65 °C. Poté se směs 10 min centrifuguje (>10000 g), až se buněčné zbytky usadí. Připraví se podmínky pro vázání DNA na silikagel, a to tak, že se převede 300 µl čistého supernatantu z kroku 3 do nové 2 ml zkumavky. Přidá se 300 µl pufiru C4 a 200 µl etanolu (96 – 100)% a vortexuje se 30 s. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2 ml centrifugační zkumavky a přidá se 750 µl směsi z předchozího kroku. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Následuje promývání DNA, které probíhá ve třech po sobě následujících krocích. V prvním promytí se napipetuje 400 µl pufiru CQW do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve druhém promytí se napipetuje 700 µl pufiru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve třetím promytí se napipetuje dalších 200 µl pufiru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufir C5 (rezidua etanolu v promývacím pufiru C5 mohou inhibovat enzymatickou reakci). Posledním krokem izolace DNA je eluce. Přehřeje se eluční pufir CE na 70 °C. Tuba NucleoSpin se umístí do nové

centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Na membránu v NucleoSpin tubě se napipetuje 100  $\mu$ l předeřátého elučního pufru CE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě, a poté se centrifuguje 1 min při 11000 g, aby se shromáždila DNA.

Eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává při teplotě (2 – 8) °C, pro dlouhodobé při minus 20 °C.

### **Měření koncentrace a určení kvality vyizolované DNA**

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu.

### **Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA**

Měření při vlnových délkách (230, 260 a 280) nm umožňuje kromě stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při (260 a 280) nm a (260 a 230) nm.

Hodnoty poměru 260/280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Ideální hodnoty jsou (1,7 až 1,8). Jestliže je naměřená hodnota pod 1,7, je DNA znečištěná proteiny nebo jinými organickými látkami. Pokud je naměřená hodnota nad 1,9, je DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami.

Hodnoty poměru 260/230 musí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2). Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5, je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

### **Vlastní měření**

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná (v našem případě se jedná o eluční roztok z kitu NucleoSpin® Food). Použijí se 2  $\mu$ l vzorku. Každý vzorek se měří 2  $\times$ . Naměřené hodnoty se zprůměrují. Pro následnou PCR zpravidla vyhovují koncentrace v rozmezí (5 – 10) ng/ $\mu$ l templátové DNA. Pokud je koncentrace DNA vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR.

Pro vývojový úkol byly vzorky vyextrahované DNA certifikovaných referenčních materiálů naředěny na koncentrace 5 ng/  $\mu$ l a 10 ng/  $\mu$ l.

### Určení kvality vyizolované DNA

Pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyizolované DNA (zda je celistvá nebo degradovaná), přítomnost RNA a proteinů.

Vzorky se smíchají s barvivem 6 × Loading Dye Solution v množství 2 µl barviva a 3 µl vyizolované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanosou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

### Polymerázová řetězová reakce

Pro zavedení detekce nových genetických modifikací byly využity již zavedený postup Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR (JPP ZK č. 10250.1) a metody validované European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL GMFF).

Pro určení konkrétních transgenů se používají metody druhově specifické neboli event-specific, které se zaměřují na amplifikaci úseku mezi vložených konstruktem a vlastní genomovou DNA. Pomocí této metody lze rozlišit druhy transgenních organismů, které obsahují stejný genový konstrukt.

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů a amplifikační programy byly převzaty z metod validovaných EURL GMFF. Při zavádění nových PCR detekcí se provedlo z důvodu opakovatelnosti pět na sobě nezávislých PCR reakcí (amplifikací).

### Vnitřní gen sóji

Primery: GM03, GM04

Amplifikační program

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	94	600	1
<b>Denaturace</b>	94	45	35
<b>Annealing</b>	57	50	
<b>Extenze</b>	72	115	
<b>Závěrečná extenze</b>	72	355	1

Délka ampliconu: 118 bp.

### Promotor FMV

Primery: FMV-1, FMV-2

Amplifikační program

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	180	1
Denaturace	94	30	1
Annealing	54	30	40
Extenze	72	105	
Závěrečná extenze	72	180	1

Délka amplikonu: 196 bp.

### Terminátor NOS

Primery: NOS-1, NOS-3

Amplifikační program

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	58	40
Annealing	57,5	120	
Extenze	72	105	
Závěrečná extenze	72	180	1

Délka amplikonu: 180 bp.

### CP4 epsps

Primery: GT73\_TmF, GT73\_TmR

Amplifikační program

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

Délka amplikonu: 88bp.

**FG72**

Amplifikační primery: DAS-40278-9\_5'-f1, DAS-40278-9\_5'-r3

Amplifikační program

	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Dekontaminace</b>	50	120	1
<b>Počáteční denaturace</b>	95	600	1
<b>Denaturace</b>	95	15	45
<b>Annealing a extenze</b>	60	60	

Délka amplikonu: 70bp.

**MON87705**

Amplifikační primery: MON 87705 primer 1, MON 87705 primer 2

Amplifikační program

	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Dekontaminace</b>	50	120	1
<b>Počáteční denaturace</b>	95	600	1
<b>Denaturace</b>	95	15	45
<b>Annealing a extenze</b>	60	60	

Délka amplikonu: 86 bp.

**MON87708**

Amplifikační primery: MON 87708 primer 1, MON 87708 primer 2

Amplifikační program

	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Dekontaminace</b>	50	120	1
<b>Počáteční denaturace</b>	95	600	1
<b>Denaturace</b>	95	15	45
<b>Annealing a extenze</b>	60	60	

Délka amplikonu: 91 bp

## Provedení PCR reakce

Laminární box se (20 – 30) min vysvítí UV zářením. Předměty v něm umístěné a jeho prostor se dekontaminují dekontaminačním roztokem. Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky, apod.

Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová, negativní kontrola, použije-li se a pozitivní kontrola). Podle tabulek reakčních směsí (Tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Jednotlivé reagenty se uchovávají v mrazáku, proto se musí předem rozmrazit, buď při laboratorní teplotě, nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají jejím převrácením nebo krátkým vortexováním a zcentrifugují se na minicentrifuze.

PCR směs se připravuje na ledu.

### REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 22,5 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 2,5 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola a nakonec pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Zkumavky se promíchají mírným poklepem, zcentrifugují se na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

**Tabulka 1. Složení reakční směsi REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>.**

Složka	1 reakce (µl)
PCR voda	9
REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl <sub>2</sub>	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Templát	2,5

### Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrem několik mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola, elektroforetický marker, vzorky, elektroforetický marker a pozitivní



kontrola. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku a jeho potřebném množství. Amplifikáty získané pomocí kitu REDTaq se nanášejí přímo z PCR zkumavek, protože obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení kontrol a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza. Doporučuje se nastavení zdroje (100 – 140) V, maximum mA, (30 – 60) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit podle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje. Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje prosvícením na transiluminátoru, vyfotografování a přenesením do počítače.

## 4.1 Výsledky a diskuze

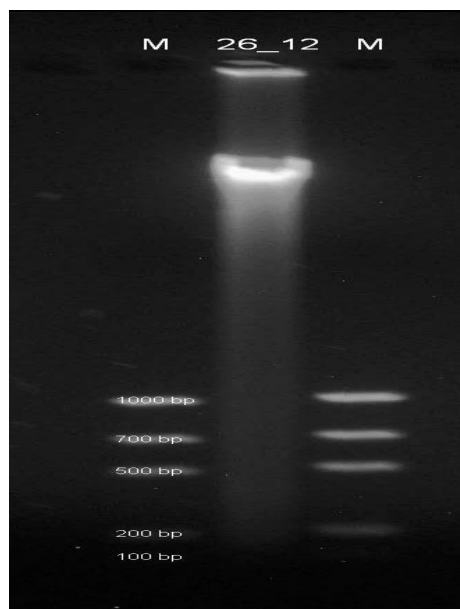
### FG72

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

**Tabulka 2. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

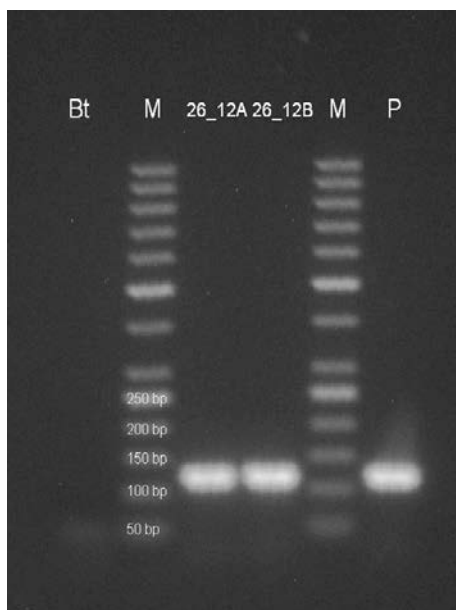
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 26/2012	146,9	1,78	1,84
CRM 26/2012	147,4	1,79	1,85

Určení kvality vyizolované DNA



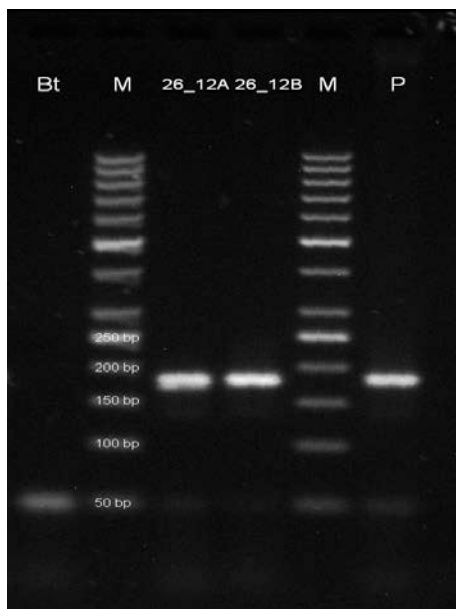
**Obr 6. Určení kvality DNA pozitivní kontroly CRM 26/2012 (26\_12), M – hmotnostní standard.**

### Stanovení vnitřního genu sóji



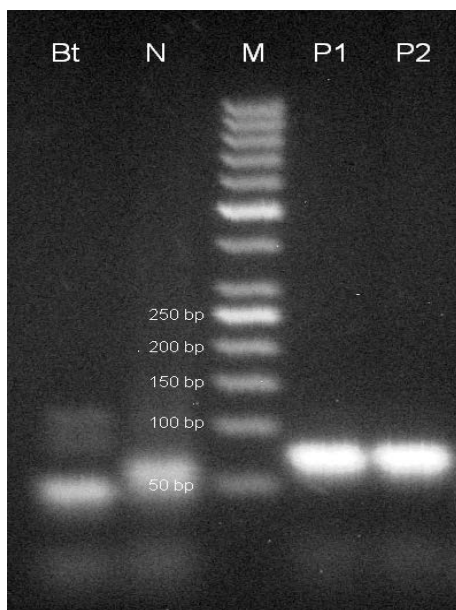
**Obr 7. Stanovení vnitřního genu sóji (118 bp) u pozitivní kontroly CRM 26/2012 (26\_12A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 26\_12 B koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 3/2002. Amplifikační kit REDTaq.**

### Stanovení screeningového elementu NOS

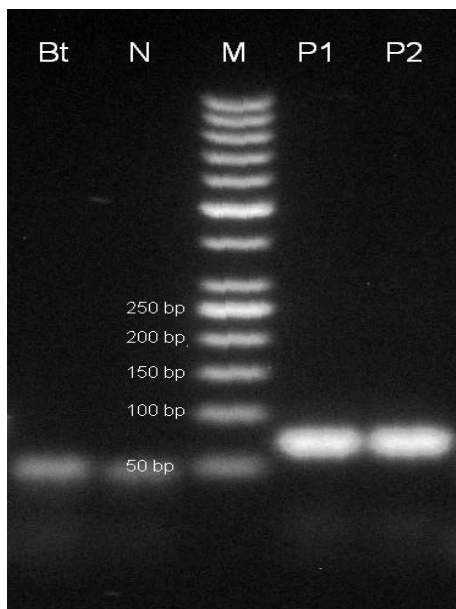


**Obr 8. Stanovení screeningového elementu terminátoru NOS (180bp), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, 26\_12A – CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl (26\_12A), 26\_12B – testovaný materiál CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl (26\_12B), P – pozitivní kontrola CRM16/2014. Amplifikační kit REDTaq.**

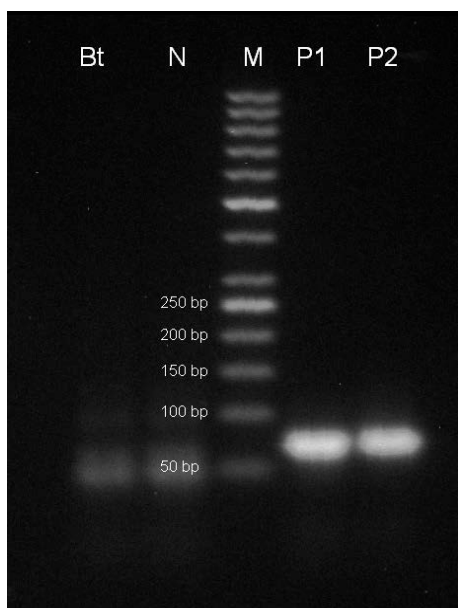
### Stanovení transgenu FG72



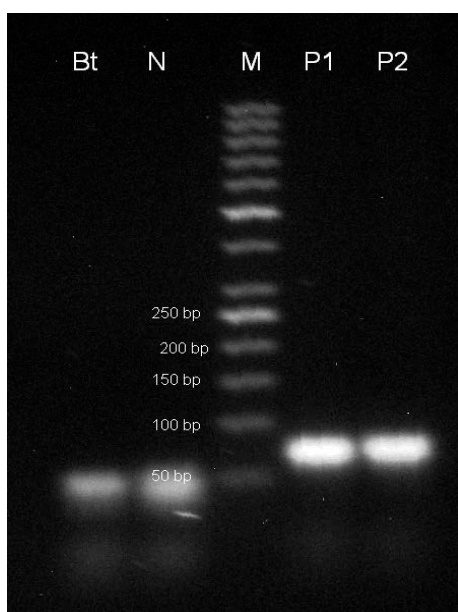
**Obr 9. Stanovení transgenu FG72 (70 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



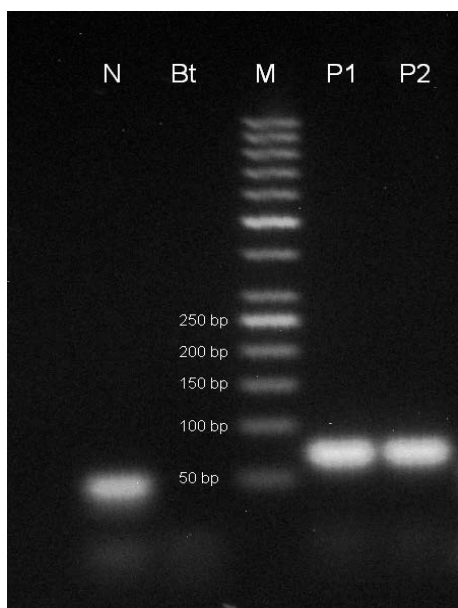
**Obr 10. Stanovení transgenu FG72 (70 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 11. Stanovení transgenu FG72 (70 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 12. Stanovení transgenu FG72 (70 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 13. Stanovení transgenu FG72 (70 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 26/2012 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**

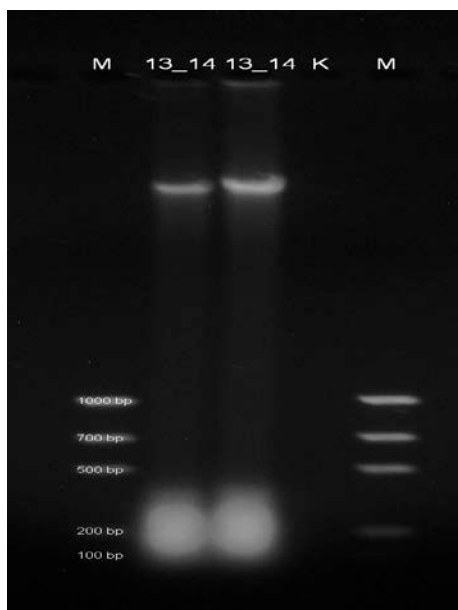
### **MON87705**

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

**Tabulka 3. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

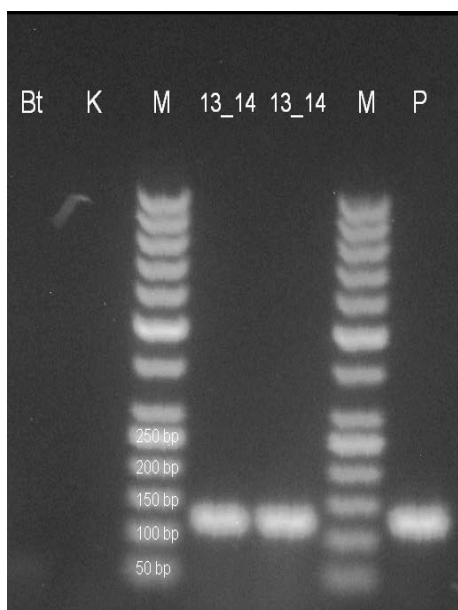
<b>Vzorky</b>	<b>Koncentrace (ng/μl)</b>	<b>A 260/A 280</b>	<b>A 260/A 230</b>
CRM 13/2014	168,2	1,84	2,1
CRM 13/2014	168,3	1,81	2,08

### Určení kvality vyizolované DNA



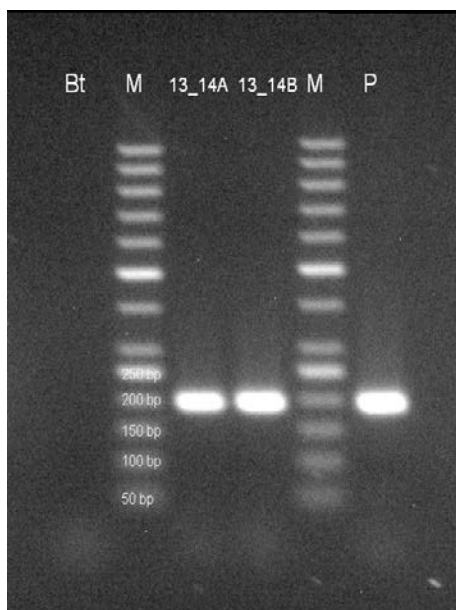
**Obr 14. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 13/2014 (13\_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.**

### Stanovení vnitřního genu sóji



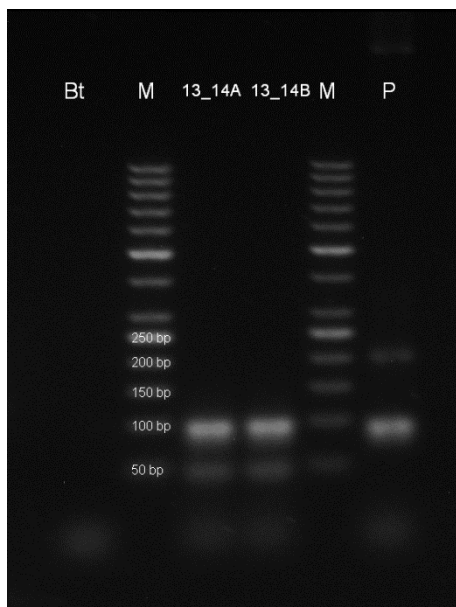
**Obr 15. Stanovení vnitřního genu sóji (118 bp) u pozitivní kontroly CRM 13/2014 (13\_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 13\_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, K – kontrola izolace, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 3/2002. Amplifikační kit REDTaq.**

### Stanovení screeningového elementu promotoru FMV



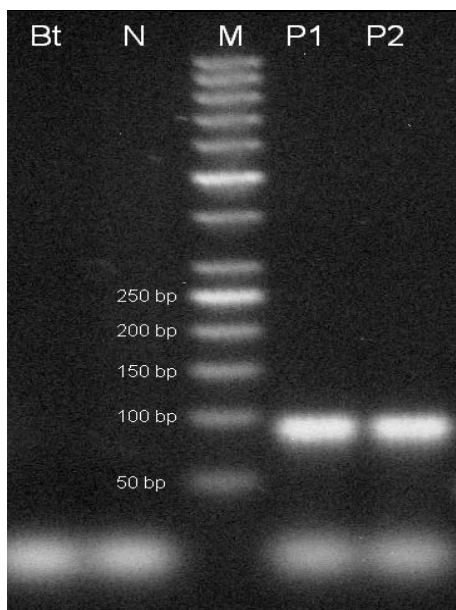
**Obr 16. Stanovení screeningového elementu promotoru FMV (196 bp) u pozitivní kontroly CRM 13/2014 (13\_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 13\_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 32/2012. Amplifikační kit REDTaq.**

### Stanovení screeningového elementu CP4epsps

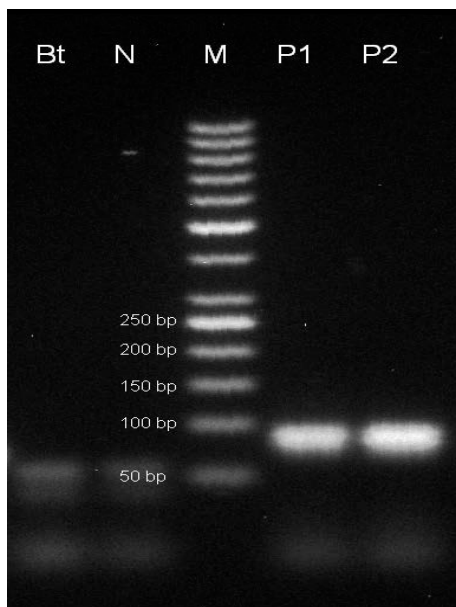


**Obr 17. Stanovení screeningového elementu cp4epsps (88 bp) u pozitivní kontroly CRM 13/2014 (13\_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 13\_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2008. Amplifikační kit REDTaq.**

### Stanovení transgenu MON87705

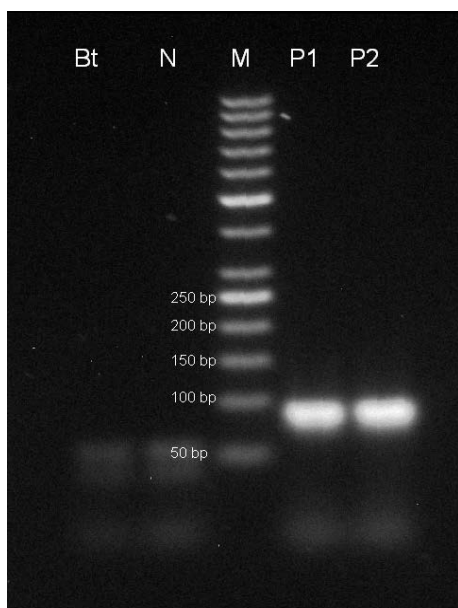


**Obr 18. Stanovení transgenu MON87705 (86 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**

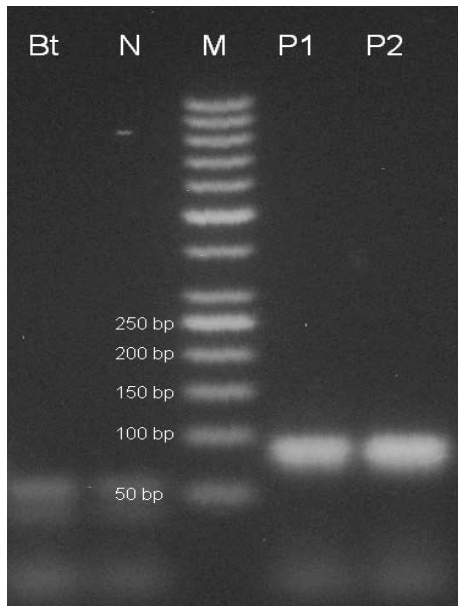


**Obr 19. Stanovení transgenu MON87705 (86 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**

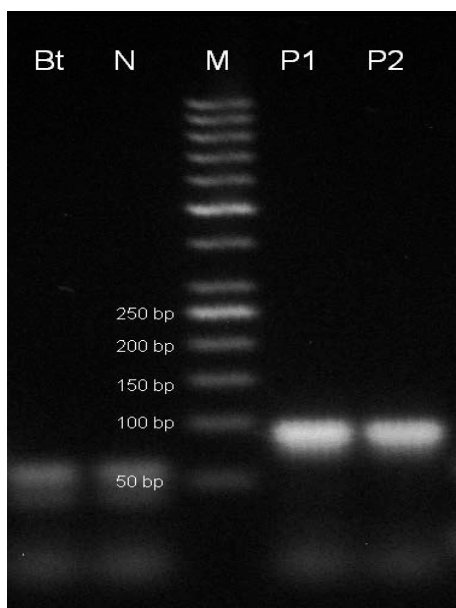




**Obr 20. Stanovení transgenu MON87705 (86 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 21. Stanovení transgenu MON87705 (86 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 22. Stanovení transgenu MON87705 (86 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 13/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**

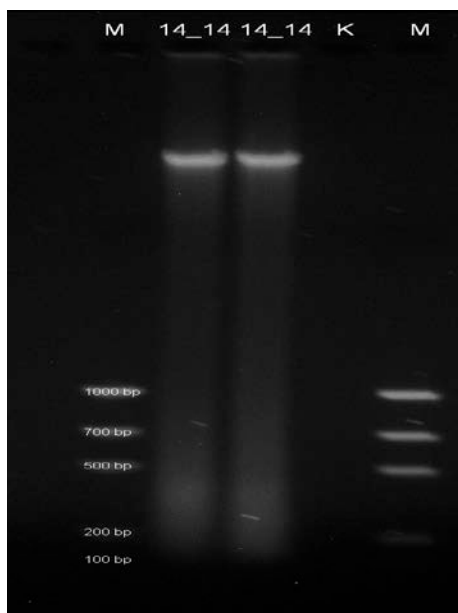
### **MON87708**

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

**Tabulka 3. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

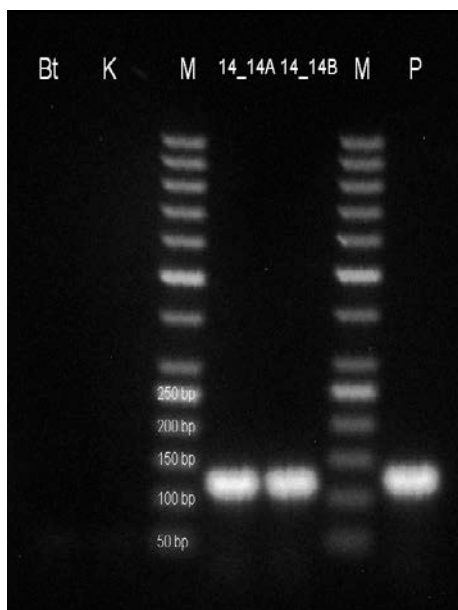
<b>Vzorky</b>	<b>Koncentrace (ng/μl)</b>	<b>A 260/A 280</b>	<b>A 260/A 230</b>
CRM 14/2014	53,4	1,96	1,96
CRM 14/2014	53,4	2,02	1,98

### Určení kvality vyizolované DNA



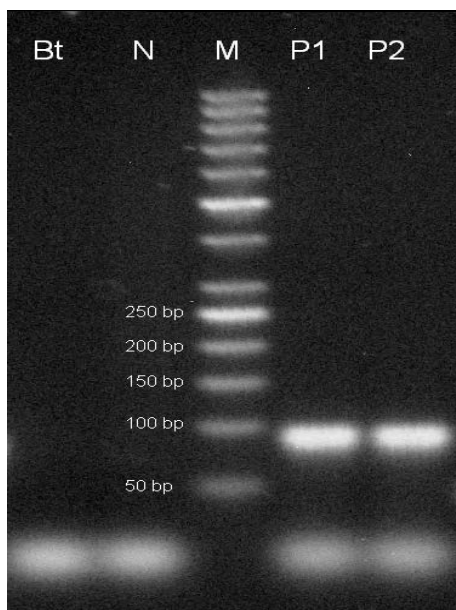
**Obr 23. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 14/2014 (14\_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.**

### Stanovení vnitřního genu sóji



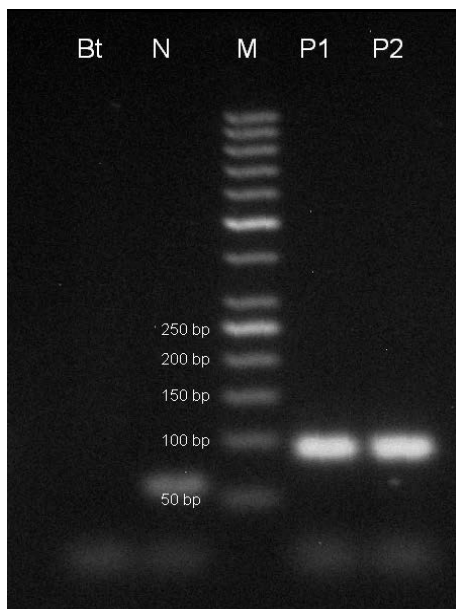
**Obr 24. Stanovení vnitřního genu sóji (118 bp) u pozitivní kontroly CRM 14/2014 (14\_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 14\_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, K – kontrola izolace, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 3/2002. Amplifikační kit REDTaq.**

## Stanovení transgenu MON87708

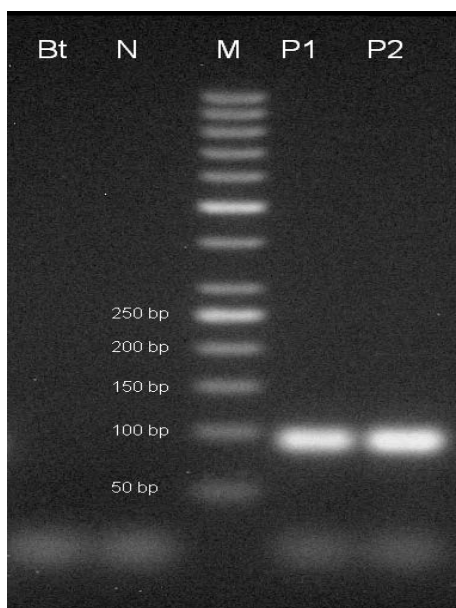


**Obr 25. Stanovení transgenu MON87708 (91 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl.**

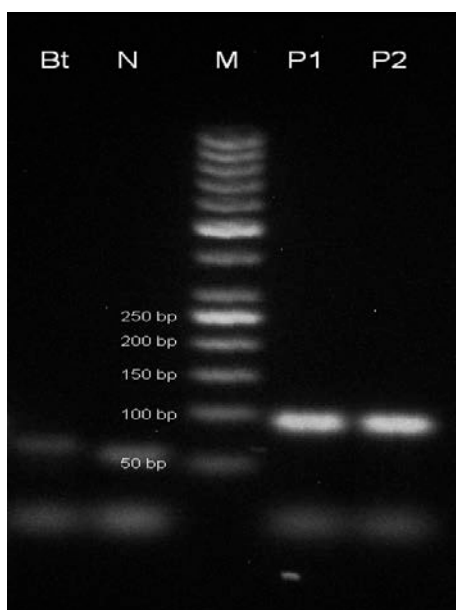
Amplifikační kit REDTaq.



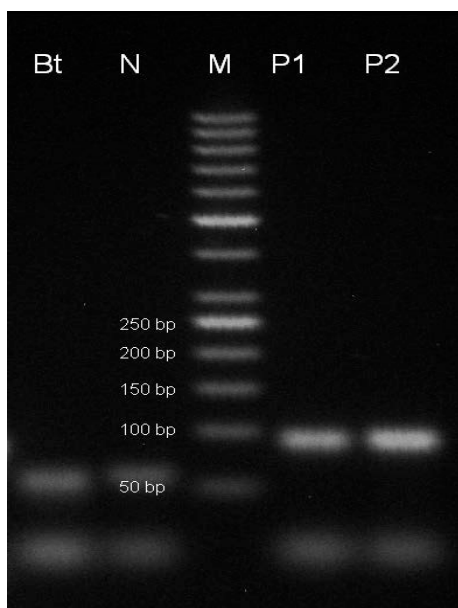
**Obr 26. Stanovení transgenu MON87708 (91 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 27. Stanovení transgenu MON87708 (91 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 28. Stanovení transgenu MON87708 (91 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**



**Obr 29. Stanovení transgenu MON87708 (91 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 3/2002, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl, P2 – pozitivní kontrola CRM 14/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl. Amplifikační kit REDTaq.**

Během verifikace se postupovalo podle JPP ÚKZÚZ, postup č. 10250.1 a metod validovaných EURL GMFF. Ve všech případech se zachovaly jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruhy v příslušných místech, jak u screeningu, tak při stanovení konkrétního transgenu. Některé z těchto pruhů mohou být na hranici viditelnosti (zejména v tištěné verzi, která má poněkud horší kvalitu oproti původním snímkům uloženým v počítači).

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá na těchto faktorech:

- Koncentraci templátové DNA.
- Kvalitě templátové DNA, která závisí jak na způsobu izolace, tak na opakované rozmrazování a zmrazování alikvotů ve zkumavkách.
- Kvalitě amplifikačních primerů. Jejich kvalita je závislá na jejich ředění a opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

## 5 Závěr

Cílem práce bylo zavést metody pro detekci nových genetických modifikací u sóji, a to transgenů FG72, MON87705 a MON87708 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OMB.

Tento úkol se podařilo splnit a laboratoř je k datu psaní této zprávy schopna stanovit 11 geneticky modifikovaných odrůd sóji.

Tyto metody se zařadí do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv.

## 6 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup č. 10250.1.
2. 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.
3. Event-Specific Method for the Quantification of Soybean MON87708 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2013.
4. Event-Specific Method for the Quantification of Soybean MON87705 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012.
5. Event-Specific Method for the Quantification of Soybean FG72 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012.
6. <http://en.biosafetyscanner.org>.
7. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013, by Clive James, Chair, ISAAA International Service For the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2014

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXI 2017/3**

Ročník: XXI, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2017

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 45

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196