

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2014

Ročník XVIII, číslo 3/2014

Brno 2014

Obsah

1. **Stanovení kvartérních amóniových pesticidů metodou UPLC-MS/MS**
Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Martina Bolechová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
2. **Zavedení detekce MON863, MIR604, DAS1507 a vybraných kombinací transgenů u kukuřice**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 13

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení kvartérních amóniových pesticidů metodou UPLC-MS/MS

Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Martina Bolechová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

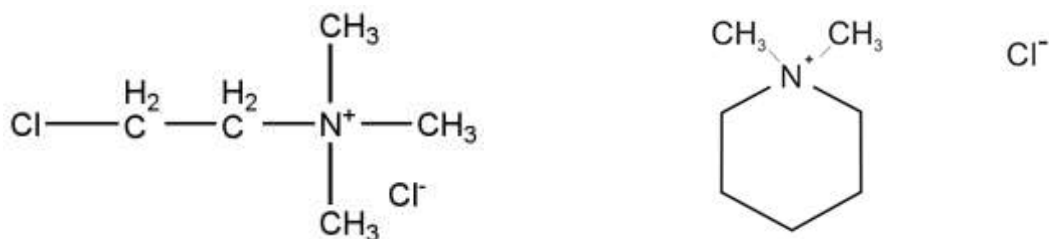
1 Souhrn

Skupinu kvartérních amóniových solí představují chlormekvát s mepikvát, které patří mezi nejčastěji aplikované látky určené pro ochranu rostlin. Z toho vyplývá potřeba zpětné kontroly ošetřených plodin určených pro potravinářské či krmivářské účely, aby obsahy těchto látek ve sledovaných komoditách vyhovovaly legislativním limitům. Pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu byla optimalizována metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Optimalizovaná metoda byla validována pro analýzu obilovin a olejnin. Zkouška byla akreditována a využita pro sledování chlormekvátu a mepikvátu ve vzorcích krmiv odebraných v rámci programu cílených kontrol ÚKZÚZ.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Chlormekvát a mepikvát jsou představitelé skupiny kvartérních amóniových solí, které se používají jako růstové regulátory. Tyto látky způsobují zkracování a zesílení stonků a stébel rostlin, což vede k tvorbě robustnější struktury rostliny. Dále podporují kvetení, tvorbu chlorofylu a vývoj kořenového systému rostliny. Látky se aplikují při pěstování obilovin pro zvýšení odolnosti proti polehání a dále ke zvýšení větvení a kvetení u okrasných rostlin (1).



Obrázek 1. Struktura chlormekvát chloridu a mepikvát chloridu.

Chlormekvát je z hlediska celkové spotřeby přípravků pro ochranu rostlin druhou nejčastěji používanou účinnou látkou. Z víceletého národního kontrolního plánu pro rezidua pesticidů pro období 2012 - 2014 navíc vyplývá povinnost obě zmiňované látky sledovat v obilovinách a vybraných druzích ovoce a zeleniny (2). Stanovení chlormekvátu a mepikvátu je popsáno ve dvou ČSN EN normách určených pro LC-MS (15054:2006) (3) nebo LC-MS/MS (15055:2006) (4) analýzu. Referenční laboratoř Evropské unie pro jednoúčelové metody (EURL-SRM) navrhuje pro tuto skupinu látek další 3 alternativní metody stanovení, založené stejně jako standardizované metody na extrakci do vodného roztoku methanolu a na následné LC-MS(/MS) analýze surového extraktu (5). Vzhledem k polaritě chlormekvátu a mepikvátu se k chromatografické separaci využívá přístup HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). HILIC separace je chromatografie na normálních fázích vhodná pro polární a iontové sloučeniny, kde separace probíhá za podmínek vhodných pro chromatografii na reverzních fázích. Principiálně se jedná o rozdělovací chromatografii v systému kapalina-kapalina, tj. separaci mezi vodnou vrstvou na povrchu stacionární fáze a mobilní fází s nižším obsahem vody, kde se navíc uplatňují slabé elektrostatické interakce (6). K detekci se využívá hmotnostní spektrometrie (MS). Vzhledem ke složitosti surových extraktů je vhodné zvýšit selektivitu detekce použitím tandemové MS, tj. sledovat sekundární fragmenty analytů, a tím eliminovat interference koextraktů, které při ionizaci produkují molekulové ionty o stejném m/z . Detekce v MRM (multi reaction monitoring) módu je v současnosti rutinně využívanou technikou při reziduální analýze kontaminantů v potravinách a krmivech.

Cílem práce bylo zavést metodu pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu v obilovinách a olejninách založenou na methanolové extrakci a následné detekci pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou MS (UPLC-MS/MS) s využitím systému

Xevo TQ MS Waters. Zavedená metoda byla akreditována a využita pro analýzu vzorků krmiv odebraných v rámci cílených kontrol konvenční produkce a úředních kontrol ekologické produkce krmiv.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

Seznam použitých chemikálií a činidel je uveden v JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 605 (7). Kontrola čistoty a vhodnosti použitých chemikálií a činidel byla provedena analýzou laboratorních slepých pokusů. Příprava vzorků k analýze a koncové stanovení jsou popsány v JPP ÚKZÚZ (7). Podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky pro UPLC stanovení.

Kolona	ACQUITY UPLC BEH HILIC (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřík	2 μl s přeplněním smyčky
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/acetonitril (50/50)
Silný promývací roztok	Acetonitril
Mobilní fáze A	2 mM vodný roztok HCOONH ₄ upravený HCOOH na pH 3
Mobilní fáze B	Acetonitril
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (95%B) – 0,5 min (95%B) – 2,5 min (5%B) – 4,5 min (5%B) – 4,6 min (95%B) – 6 min (95%B)

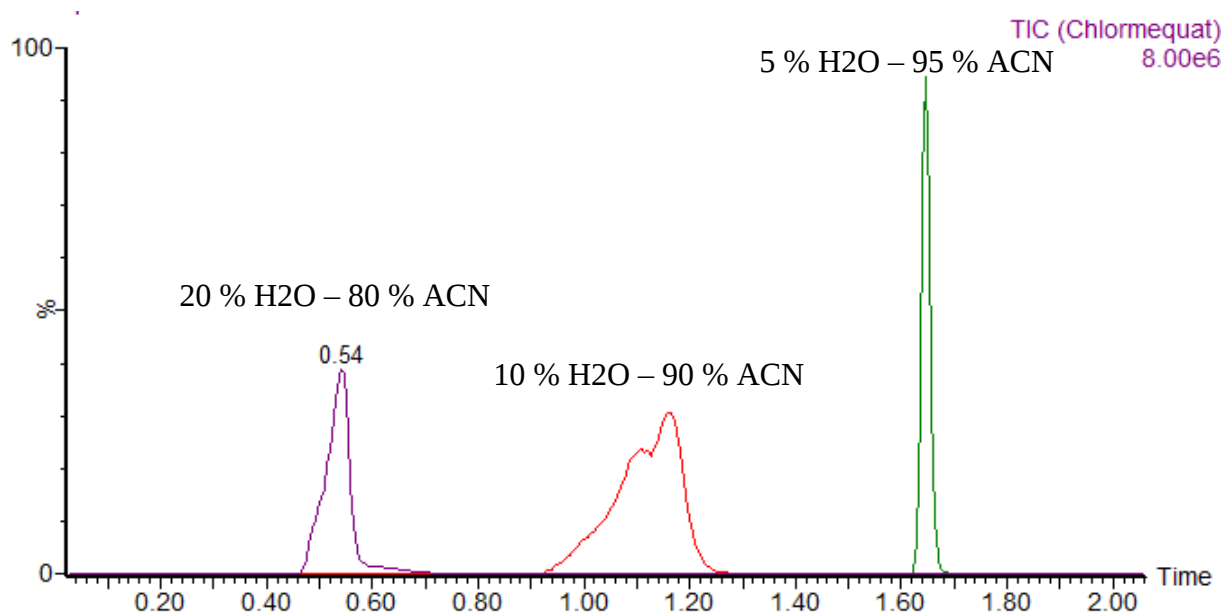
Tabulka 2. MS podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

	RT (min)	Prekursor 1 (m/z)	Produkt 1 (m/z)	CV/CE (V)	Prekursor 2 (m/z)	Produkt 2 (m/z)	CV/CE (V)
Mepikvát	1,32	114	98	40/27	114	58	40/25
Mepikvát-D3	1,32	117	101	40/27	-	-	-
Chlormekvát	1,29	122	58	35/30	122	63	35/20
Chlormekvát-D4	1,29	126	58	35/30	-	-	-
CV – napětí na konusu, CE – kolizní energie, teplota iontového zdroje – 150 °C, teplota desolvatačního plynu – 450 °C, průtok desolvatačního plynu – 700 l/h, průtok „cone gas“ – 45 l/h, průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min, napětí na kapiláře – 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním módu							

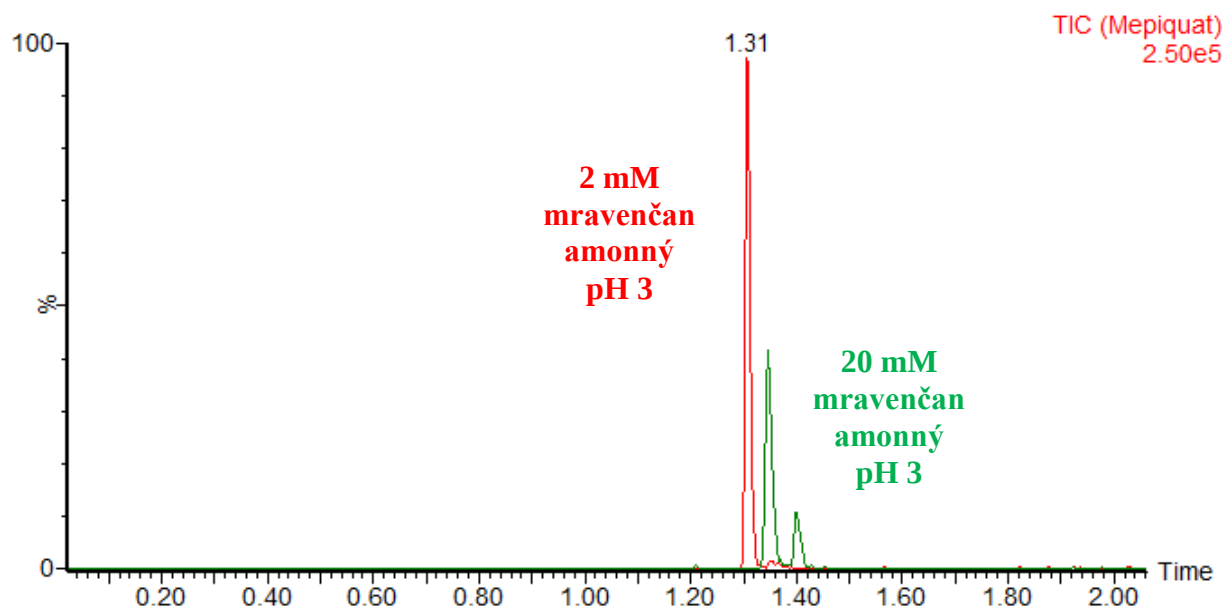
3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Optimalizace HILIC separace

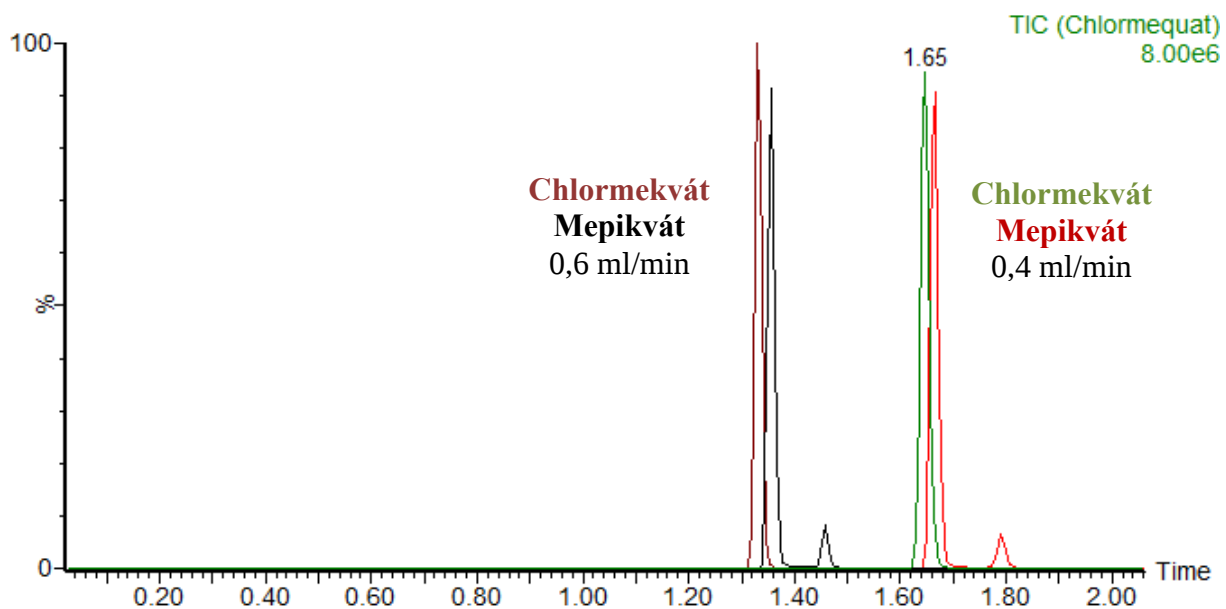
Při optimalizaci HILIC separace je nutné především správně zvolit fázi, typ a koncentraci organického modifikátoru a pH pufru. Toto jsou hlavní parametry ovlivňující chromatografickou separaci a selektivitu při použití HILIC (8). Pro počáteční testování byla zvolena kolona Waters BEH HILIC, která obsahuje hybridní sorbent se sníženým počtem volných hydroxylových skupin použitelný v širokém rozsahu pH 1-9. Vzhledem k použití UPLC Waters doporučuje začít optimalizaci s mravenčanovými nebo octovými pufrů, které jsou zároveň kompatibilní s MS detektory, s počáteční koncentrací mravenčanu nebo octanu amonného (1 – 10) mmol/l a koncentrací kyseliny mravenčí nebo octové (0,1 – 1) % (9). Tyto hodnoty pufování také doporučuje EURL-SRM metodika QuPpe (5). Výchozí podmínky při optimalizaci chromatografické separace chlormekvátu a mepikvátu byly nastaveny dle QuPpe (5). Chromatografické profily nejvýrazněji ovlivnilo počáteční složení mobilní fáze (obr. 2) a koncentrace mravenčanu amonného (obr. 3). Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na separaci chlormekvátu a mepikvátu byl zanedbatelný (obr. 4).



Obrázek 2. Vliv počátečních chromatografických podmínek na profil chlormekvátu.



Obrázek 3. Vliv pufování na chromatografický profil mepikvátu.



Obrázek 4. Vliv rychlosti průtoku na separaci chlormekvátu a mepikvátu.

3.2.2 Validace stanovení chlormekvátu a mepikvátu

Stanovení chlormekvátu a mepikvátu bylo validováno analýzou obohacených vzorků obilovin a olejnin a analýzou interních referenčních materiálů (IRM). Přesnost a správnost byly stanoveny opakovanou analýzou (minimálně 5 opakování) obohacených vzorků pšenice a řepky na hladinách 0,008 a 0,100 mg/kg odpovídající „reporting“ limitu (RL) a maximálnímu limitu reziduí (MLR). Všechny vzorky byly zároveň obohaceny vnitřními standardy (IS), deuterovanými analogy chlormekvátu a mepikvátu (chlormekvát-D4 a mepikvát-D3), na hladině 0,040 mg/kg. U všech látek byla splněna kritéria pro správnost a přesnost dle SANCO/12495/2011 (10), tj. výtěžnost byla v rozmezí (70 – 120) % a opakovatelnost ≤ 20 % na zvolených hladinách (tabulky 3 a 4). Vzhledem k hodnotám výtěžností blízkých se hodnotě 100 %, jak v případě nativních látek, tak jejich deuterovaných analogů, je možný přídavek IS až před finální analýzou, čímž dojde k výraznému snížení spotřeby IS. V případě nízké výtěžnosti by bylo nutné obohatit vzorky IS již před extrakcí. Vzhledem k metodice přípravy by byla pro finální analýzu a následnou kvantifikaci využita pouze 1/20 množství IS a zbylých 95 % použitého IS by bylo zlikvidováno s extraktem vzorku. Správnost metody byla na závěr potvrzena analýzou IRM, tj. vzorků pšenice, ovsa a žita získaných v rámci účasti v testech způsobilosti pořádaných EURL. Pro posouzení správnosti byly ze stanovených obsahů chlormekvátu a mepikvátu vypočteny hodnoty z-skóre, které se nacházely v povoleném rozmezí -2 až 2 (tabulka 5).

Tabulka 3. Výtěžnost a opakovatelnost stanovená v pšenici.

	Předložená hodnota (mg/kg)	Naměřená hodnota (mg/kg)	Stanovená výtěžnost (%)	Stanovená opakovatelnost (%)
Mepikvát	0,008	0,0075	95	9,4
Mepikvát	0,100	0,101	101	9,7
Chlormekvát	0,008	0,0081	103	8,1
Chlormekvát	0,100	0,100	100	3,6
Mepikvát-D3	0,040	0,0379	95	7,6
Chlormekvát-D4	0,040	0,0400	100	7,4

Tabulka 4. Výtěžnost a opakovatelnost stanovená v řepce.

	Předložená hodnota (mg/kg)	Naměřená hodnota (mg/kg)	Stanovená výtěžnost (%)	Stanovená opakovatelnost (%)
Mepikvát	0,008	0,0087	109	10,3
Mepikvát	0,100	0,106	106	12,4
Chlormekvát	0,008	0,0073	91	9,4
Chlormekvát	0,100	0,105	105	7,9
Mepikvát-D3	0,040	0,0356	89	6,8
Chlormekvát-D4	0,040	0,0392	98	3,7

Tabulka 5. Ověření správnosti metody analýzou IRM.

IRM (EUPC-C)	Matrice	Analyt	Referenční obsah (mg/kg)	Stanovený obsah (mg/kg)	z-skóre
1/2007	Pšenice	Chlormekvát	1,01	1,13	0,5
2/2008	Pšenice	Chlormekvát	0,214	0,239	0,5
3/2009	Oves	Chlormekvát	0,479	0,464	-0,1
4/2010	Žito	Mepikvát	0,089	0,106	0,8

Rozšířená nejistota metody, tj. parametr odpovídající směrodatné odchylce dat stanovených pro hodnocení přesnosti vynásobené faktorem pokrytí 2, byla stanovena z vícenásobných měření obohacených matric na různých hladinách. Relativní rozšířená nejistota metody pro stanovení mepikvátu je 29 % a chlormekvátu 16 %. Pro účely vydání úředního výsledku a hodnocení krmiv byla pro obě látky zavedena rozšířená nejistota 30 %. Všechny hodnoty splňují požadavek dokumentu SANCO/12495/2011 na maximální rozšířenou nejistotu 50 % (10).

Tabulka 6. Rozšířená nejistota stanovení (%).

Matrice – hladina (µg/kg)	Mepikvát	Mepikvát-D3	Chlormekvát	Chlormekvát-D4
Pšenice – 8	19	-	16	-
Pšenice – 40	-	15	-	15
Pšenice – 100	19	-	7,1	-
Řepka – 8	21	-	19	-
Řepka – 40	-	14	-	7,3
Řepka – 100	25	-	16	-
Krmiva/rostliny - Effi SW	29	-	16	-
Krmiva/rostliny - LIMS	30	-	30	-

Dalším nezbytným validačním parametrem pro kvantitativní stanovení je mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Existuje řada přístupů pro jejich odvození. V případě chromatografických metod se často využívá výpočet mezí z poměru signálu k šumu (S/N). Avšak v případě MS detekce tento přístup často poskytuje nadhodnocené LOD a LOQ, které neodpovídají situaci v různých komplexních matricích (tabulka 7). Vhodnější přístup pro výpočet LOQ je definován v dokumentu SANCO/12495/2011 (10), kde mez stanovitelnosti odpovídá hladině, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení a označuje se jako reporting limit (RL). Nejnížší validovaná hladina pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu v krmivech byla 8,0 µg/kg, neboli 0,008 mg/kg, a tato hodnota RL byla nastavená pro zápis výsledků a jejich vydání na protokolu. Stanovený RL je pětikrát nižší než nejnížší hodnota maximálního limitu reziduí (MLR) pro tyto látky, tj. 0,05 mg/kg (11). Avšak MLR těchto pesticidů v obilovinách a olejnin se běžně nacházejí v rozmezí (2 – 10) mg/kg (tabulka 8).

Tabulka 7. Meze detekce a stanovitelnosti ($\mu\text{g/kg}$).

	Mepikvát	Chlormekvát
LOD (solvent) ($\mu\text{g/kg}$)	0,01	0,005
LOQ (solvent) ($\mu\text{g/kg}$)	0,04	0,016
LOD (pšenice) ($\mu\text{g/kg}$)	0,03	0,02
LOQ (pšenice) ($\mu\text{g/kg}$)	0,10	0,06
LOD (řepka) ($\mu\text{g/kg}$)	0,1	0,1
LOQ (řepka) ($\mu\text{g/kg}$)	0,3	0,4
Nejnižší kalibrační hladina ($\mu\text{g/kg}$)	4,0	4,0
Nejnižší validovaná hladina ($\mu\text{g/kg}$)	8,0	8,0

Tabulka 8. MLR (mg/kg) v obilovinách a olejninách [11].

	Chlormekvát	Mepikvát
Ječmen, žito	2	3
Kukuřice, rýže	0,05	2
Oves	5	2
Pšenice	2	2
Len	7	0,05
Mák, dýně, hořčice	0,1	0,05
Slunečnice	0,1	10
Řepka	7	3
Bavlna	0,1	5

Linearita kalibračních závislostí obou látek byla prokázána v testovaném rozsahu (4 – 6000) $\mu\text{g/kg}$. Pro všechny kalibrační závislosti byly splněny podmínky pro korelační koeficient $R^2 > 0,995$ a $QC < 20 \%$ (12).

Tabulka 9. Charakteristiky kalibračních závislostí.

	Mepikvát			Chlormekvát		
	Směrnice	QC (%)	R ²	Směrnice	QC (%)	R ²
Solvent	0,412	12,5	1,000	0,244	5,8	0,999
Pšenice	0,402	4,7	0,998	0,230	6,5	0,999
Řepka	0,437	20,0	0,997	0,245	16,4	0,998

Dalším z důležitých validačních parametrů je selektivita stanovení. Selektivita je definována jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě GC-MS a LC-MS analýz se hovoří o matricových efektech (ME), které vyčíslují změnu signálu analytu v přítomnosti matrice. ME byly stanoveny v extraktech pšenice a řepky. Významnější potlačení signálu bylo pozorováno v řepkové matrici, avšak ME pro nativní analyt a jeho značený analog byly v obou typech extraktů porovnatelné (tabulka 10). Dále byla zhodnocena selektivita porovnáním kalibračních přímk t-testem a u obou matric byla potvrzena hypotéza, že metoda poskytuje porovnatelné výsledky bez ohledu na typ použité kalibrace (Tab. 11). Praktický dopad tohoto zjištění je možnost kvantifikace chlormekvátu a mepikvátu v surových extraktech pomocí kalibračních řad připravených v rozpouštědle, tzn. odpadá příprava matricových kalibrací, které díky přítomnosti matrice vykazují často nestabilitu a je nutná jejich častá opakovaná příprava.

Tabulka 10. Matricové efekty stanovené při analýze pšenice a řepky.

	Mepikvát	Mepikvát-D3	Chlormekvát	Chlormekvát-D4
ME – směrnice – pšenice (%)	37	-	34	-
ME – RF – pšenice (%)	42	37	30	32
ME – směrnice – řepka (%)	13	-	6	-
ME – RF – řepka (%)	13	13	5	5

Tabulka 11. Hodnocení selektivity srovnáním kalibračních přímek regresně.

Pesticid	Matrice	Směrnice	t	t-kritický	Hypotéza
Mepikvát	Solvent	0,4117	-	-	-
Mepikvát	Pšenice	0,3998	0,993	2,306	Přijata
Mepikvát	Řepka	0,4234	2,263	2,306	Přijata
Chlormekvát	Solvent	0,2382	-	-	-
Chlormekvát	Pšenice	0,2426	0,988	2,306	Přijata
Chlormekvát	Řepka	0,2727	1,717	2,306	Přijata

Vedle parametrů charakterizujících kvantifikaci je nutné v rámci validace také specifikovat kvalitativní neboli identifikační ukazatele. Pro účely stanovení pesticidů jsou tyto parametry opět definovány v dokumentu SANCO/12495/2011 (10). Jedná se o relativní retenční čas (RRT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RRT pro GC stanovení je $\pm 0,5 \%$ a pro LC $\pm 2,5 \%$. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů závisí na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanovenému ve standardu (tabulka 12).

Tabulka 12. Identifikační parametry.

	Mepikvát	Mepikvát-D3	Chlormekvát	Chlormekvát-D4
RT (min) (rozpouštědlo)	1,32 +/- 0,03	1,32 +/- 0,03	1,29 +/- 0,03	1,29 +/- 0,03
RT (min) (pšenice)	1,34	1,34	1,30	1,30
RT (min) (řepka)	1,37	1,37	1,31	1,31
MRM1-kvantifikační	114 > 98	117 > 101	122 > 58	126 > 58
MRM2-konfirmační	114 > 58	-	122 > 63	-
Poměr iontů (solvent)	45 % +/- 11 %	-	36 % +/- 9 %	-
Poměr iontů (pšenice)	82 % +/- 16 %	-	98 % +/- 20 %	-
Poměr iontů (řepka)	89 % +/- 18 %	-	72 % +/- 14 %	-

3.2.3 Aplikace metody při kontrole krmiv v roce 2012

Zavedená metoda byla využita pro sledování chlormekvátu a mepikvátu ve vzorcích obilovin a olejnin odebraných v rámci programu cílených kontrol krmiv ÚKZÚZ jak z konvenční, tak ekologické produkce. Častější výskyt byl zjištěn u chlormekvátu, který byl stanoven v 64 % vzorků obilnin a ve všech deseti vzorcích olejnin z konvenční produkce. Nejvyšší obsah

chlormekvátu (18,0 mg/kg) byl stanoven ve slunečnici. V tomto případě se jednalo o vysoce nadlimitní nález, neboť MLR pro chlormekvát ve slunečnici je 0,1 mg/kg (tabulka 8). Nález byl následně potvrzen analýzou duplicitního vzorku odebraného v rámci dodatečné úřední kontroly. Mepikvát byl stanoven u 60 % vzorků olejnin a pouze v jednom vzorku obilovin, konkrétně v žitných otrubách. Na rozdíl od situace v krmivech z konvenční produkce, všechny vzorky z ekologické produkce všechny byly vyhovující, tzn. všechny nálezy byly nižší než RL. Stanovené obsahy a četnost nálezů potvrdily rozšířené použití těchto látek při pěstování obilovin a olejnin v konvenční produkci. Naopak nulové nálezy ve vzorcích z ekologické produkce představují důkaz o dodržení pravidel EZ při pěstování vyšetřených plodin z hlediska aplikace růstových regulátorů.

V rámci analýz úředních vzorků krmiv byla průběžně prováděna kontrola kvalita práce pomocí analýzy IRM (tabulky 14). Z výsledků analýz IRM je veden regulační diagram.

Tabulka 13. Výskyt růstových regulátorů v krmivech.

Počet vzorků	Matrice	Mepikvát		Chlormekvát		Produkce
		Počet nálezů	Maximální obsah (mg/kg)	Počet nálezů	Maximální obsah (mg/kg)	
53	Obilniny	1	0,011	34	2,6	Konvenční
10	Olejniny	6	0,56	10	18,0	Konvenční
9	Obilniny	0	< 0,008	0	< 0,008	Ekologická

Tabulka 14. Průběžná kontrola způsobilosti metody.

IRM (EUPC-C)	Matrice	Analyt	Referenční obsah (mg/kg)	Stanovený obsah (mg/kg)	z-skóre
2/2008	Pšenice	Chlormekvát	0,214	0,200	-0,3
3/2009	Oves	Chlormekvát	0,479	0,519	0,3
3/2009	Oves	Chlormekvát	0,479	0,464	-0,1
3/2009	Oves	Chlormekvát	0,479	0,530	0,4

4 Závěr

V rámci VÚ byla zavedena metoda pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu v krmivech a rostlinném materiálu dle požadavků specifikovaných v dokumentu SANCO/12495/2011 (10). Zavedená metoda byla akreditována a následně využita pro analýzu 72 vzorků obilovin a olejnin odebraných pro účely úřední kontroly konvenčních a ekologicky pěstovaných krmiv.

5 Literatura

1. MacBean, C. (Ed.). The Pesticide Manual, 16th Ed., BCPC, UK, 2012.
2. MZČR: Víceletý kontrolní plán pro rezidua pesticidů, 2012 – 2014, ČR, 2012.
3. ČSN EN 15054: Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení chlormequatu a mepiquatu - Metoda LC-MS, 2006.
4. ČSN EN 15055: Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení chlormequatu a mepiquatu - Metoda LC-MS/MS, 2006.
5. Anastassiades, M., et al: Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination (QuPPE-Method), verze 7, EURL-SRM, CVUA Stuttgart, 2012.
6. <http://www.mn-net.com/HPLCStart/NUCLEODURphases/NUCLEODURHILIC/HILICBasics/tabid/11124/language/en-US/Default.aspx>
7. JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 605.
8. Sanchez, A.C. a Kansal M. Structured Approach to Method Development for Bioanalytical HILIC–MS-MS, Applications, Current Trends in Mass Spectrometry, May 2009.
9. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/WA40001.pdf>
10. Document N° SANCO/12495/2011 – Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
11. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS.
12. Příručka kvality NRL, ÚKZÚZ, 2012.

Zavedení detekce MON863, MIR604, DAS1507 a vybraných kombinací transgenů u kukuřice

Kateřina Staňková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
katerina.stankova@ukzuz.cz

1 Úvod

Geneticky modifikované (GM) neboli transgenní plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií. Jedná se o šlechtitelské metody z oblasti biotechnologií, které mimo jiné umožňují mezidruhový přenos genů. Nejedná se však o tvorbu a vnášení uměle vytvořených genů.

GM plodiny lze rozdělit do pěti skupin (generací). První generaci tvoří rostliny odolné vůči chorobám, škůdcům a plevelům. Do druhé generace patří rostliny odolné k abiotickým stresům (sucho, chlad, zasolení půdy, nedostatek světla). Třetí generace zahrnuje rostliny s vyšší nutriční hodnotou (výhodné složení mastných kyselin, upravený obsah vitaminů). Čtvrtá generace je tvořena ekologicky výhodnými rostlinami. Pátou generací jsou plodiny vyvíjené pro nahrazení fosilních paliv, suroviny pro průmysl (výroba bioetanolu, bionafty, škrobu).

V současné době se ve světě pěstují různé druhy GM rostlin (geneticky modifikované rostliny patřící do první generace) na ploše cca 160 mil. ha. Mezi nejčastěji vysazované rostliny ve světě patří sója, kukuřice, bavlník, řepka, dýně, papája, cukrovka, rajče, paprika, brambor, ale také například topol. Evropa je známá svým odmítavým postojem ke GM zemědělským plodinám. Existuje jediná modifikace kukuřice, která se pěstuje v EU, a to pouze v několika členských státech a s výjimkou Španělska na minimálních plochách. 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.

Závislost EU na dovozu se nejvíce projevuje u sóji, důležité složky krmiv především pro prasata a drůbež. Sója je zároveň plodinou, u které v celosvětovém měřítku zcela převládá pěstování GM odrůd nad konvenčními. Dosud úspěšně prošlo schvalovacím procesem v EU sedm typů GM sóji s tolerancí k herbicidům a jeden transgen pro odolnost k hmyzím škůdcům. Všechny v EU povolené modifikace jsou schváleny nebo posuzovány pouze pro dovoz a zpracování. Žádná GM sója se v EU nesmí pěstovat.

Pro dovoz a použití na výrobu potravin a krmiv bylo v EU povoleno ke konci října 2012 celkem 27 typů GM kukuřice. V tomto vysokém počtu jsou obsaženy různé kombinace dvou základních vlastností, a to tolerance k herbicidům a odolnosti ke hmyzím škůdcům (geny odolnosti vůči *Lepidoptera* nebo *Coleoptera*). Tyto vlastnosti jsou různě kombinovány, novější typy kukuřice obsahují čtyři i více transgenů. Pro pěstování je v EU povolena pouze kukuřice MON810, a to již od roku 1998.

U bavlníku bylo povoleno pro použití na potraviny, krmiva a aditiva osm typů. Další jsou ve schvalovacím procesu. Opět se jedná o dvě základní modifikace, a to odolnost vůči herbicidům, hmyzu a jejich kombinace.

V minulosti bylo schváleno použití několika modifikací řepky s tolerancí k herbicidům. Některé z nich se již nepěstují, nicméně se mohou v dovozech vyskytovat v nepatrných příměsích. Registr GMO v současné době uvádí tři typy řepky povolené pro zpracování na potraviny a krmiva. Pro pěstování nebyla v EU schválena žádná řepka.

Z dalších GM je v EU povolena jedna modifikace u cukrovky a jedna modifikace u brambor. V případě brambor se jedná o GM Amflora, která byla v EU v roce 2010 povolena pro pěstování.

2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u kukuřice. Nově zaváděnými transgeny jsou MON863, MIR604 a DAS1507, proto je snaha o detekci hybridních kukuřic obsahujících výše uvedené transgeny a transgeny, jejichž stanovení je již v laboratoři zavedeno, multiplexní PCR metodou pomocí kitu REDExtract–N–Amp™ Plant PCR Kits, výrobce Sigma – Aldrich.

Geneticky modifikované kukuřice MON863, MIR604 a DAS1507 patří mezi tzv. Bt-plodiny. Jsou to plodiny, které mají do genetické informace vložen gen pro tzv. Cry-protein z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Cry-protein sám o sobě není jedovatý.

V toxickou látku se mění až ve chvíli, kdy se dostane do střeva hmyzu, kde způsobuje díru ve střevní stěně. Hmyz pak hyne obvykle během dvou až pěti dní. Příčinou smrti je buď těžké porušení střeva a následné hladovění nebo průnik bakterií narušenou střevní sliznicí dále do těla, kde vyvolají sepsi. Proteiny produkované průmyslově množenými bakteriemi *Bacillus thuringiensis* se v řadě zemí používají jako ekologický insekticid. Bt-plodiny syntetizují tyto proteiny ve svých pletivech podle genů, které jsou bakteriálního původu. Velkou výhodou těchto tzv. Bt-toxinů je selektivita účinku. Některé jsou toxické např. jen housenkám motýlů, jiné působí jen na brouky a jejich larvy.

MON863

Kukuřice MON 863 je vybavena genem *cry3Bb1* bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis*. Protein Cry3Bb1, který se podle tohoto genu v kukuřici MON 863 syntetizuje, je účinný především proti larvám brouků. Díky tomu je tato kukuřice rezistentní k bázlivci kukuřičnému *Diabrotica virgifera*. Kromě genu *cry3Bb1* obsahuje tato kukuřice gen *nptII* (neomycin fosfotransferase II z *E. coli*), *promotor 35S* a *terminátor NOS*. Tyto tři elementy lze stanovit v rámci screeningu.

Kukuřice MON863 je v EU povolena v krmivech, které ji obsahují, sestávají se z ní nebo jsou z ní vyrobeny.

MIR604

Kukuřice MIR604 je vybavena genem *mcry3A* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis*. Protein Cry3A, který se podle tohoto genu v kukuřici syntetizuje, zajišťuje ochranu proti některým škůdcům z řádu Coleoptera *Diabrotica* spp.

Dále je v této kukuřici obsažen gen *pmi* z *E.coli*, který byl použit jako selekční marker v procesu genetické modifikace a umožňuje buňkám modifikované kukuřice využívat manózy jako jediného zdroje uhlíku. Kromě výše uvedených genů obsahuje tato kukuřice *terminátor NOS*, který lze stanovit v rámci screeningu.

Kukuřice MIR604 je v EU povolena v krmivech, které ji obsahují, sestávají se z ní nebo jsou z ní vyrobeny.

DAS1507

Kukuřice DAS1507 (TC1507) je vybavena genem *cry1Fa2* z bakterie *Bacillus thuringiensis subs. Aizawai*. Protein Cry1F, který se podle tohoto genu syntetizuje, zajišťuje rezistenci vůči zavíječi kukuřičnému *Ostrinia nubilalis* a určitým dalším škůdcům z řádu Lepidoptera. Kromě

genu *cry1F* obsahuje vložená kazeta také gen *pat* odvozený ze *Streptomyces viridochromogenes* a zajišťující toleranci k herbicidům na bázi glufosinátu amonného. Gen *pat* je řízen *promotorem* 35S. Oba elementy lze stanovit v rámci screeningu.

Kukuřice DAS1507 je v EU povolena v krmivech.

Hybridní geneticky modifikované kukuřice byly vytvořeny konvenčním šlechtitelským křížením geneticky modifikovaných kukuřic za účelem zvýšení rezistence vůči hmyzu a tolerance k herbicidům.

MON863xMON810xNK603

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice MON863xMON810xNK603 je vybavena geny: *cry3Bb1* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Coleoptera; *cry1Ab* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Lepidoptera; *cp4 epsps* z bakterie *Agrobacterium tumefaciens strain CP4* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům a gen *nptII* vložený jako selekční marker.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

MON863xMON810

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice MON863xMON810 je vybavena geny: *cry3Bb1* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Coleoptera; *cry1Ab* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Lepidoptera a gen *nptII* vložený jako selekční marker.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

MON863xNK603

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice MON863xNK603 je vybavena geny: *cry3Bb1* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Coleoptera; *cp4 epsps* z bakterie *Agrobacterium tumefaciens strain CP4* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům a gen *nptII* vložený jako selekční marker.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

MIR604xGA21

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice MIR604xGA21 je vybavena geny: *mcry3A* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis* nesoucí odolnost proti některým škůdcům z řádu Coleoptera; *epsps* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům a gen *pmi* z *E.coli*, který byl použit jako selekční marker. Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

Bt11xMIR604

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice Bt11xMIR604 je vybavena geny: *mcry3A* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis* nesoucí odolnost proti některým škůdcům z řádu Coleoptera; *cry1Ab* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Lepidoptera; *pat* z bakterie *Streptomyces viridochromogenes* nesoucí odolnost vůči fosfinotricinovým herbicidům a gen *pmi* z *E.coli*, který byl použit jako selekční marker.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

Bt11xMIR604xGA21

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice Bt11xMIR604xGA21 je vybavena geny: *mcry3A* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis* nesoucí odolnost proti některým škůdcům z řádu Coleoptera; *cry1Ab* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* nesoucí odolnost vůči hmyzím škůdcům z řádu Lepidoptera; *pat* odvozený ze *Streptomyces viridochromogenes* a zajišťující toleranci k herbicidům na bázi glufosinátu amonného; *epsps* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům a gen *pmi* z *E.coli*, který byl použit jako selekční marker.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

DAS1507xNK603

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice DAS1507xNK603 je vybavena geny: *cry1Fa2* z bakterie *Bacillus thuringiensis subs. Aizawai* nesoucí rezistenci vůči zavíječi kukuřičnému *Ostrinia nubilalis* a určitým dalším škůdcům z řádu Lepidoptera; gen *pat* odvozený ze *Streptomyces viridochromogenes* zajišťující toleranci k herbicidům na bázi glufosinátu amonného a gen *cp4 epsps* z bakterie *Agrobacterium tumefaciens strain CP4* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

DAS1507xDAS59122

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice DAS1507xDAS59122 je vybavena geny: *cry1Fa2* z bakterie *Bacillus thuringiensis subs. Aizawai* nesoucí rezistenci vůči zavíječi kukuřičnému *Ostrinia nubilalis* a určitým dalším škůdcům z řádu Lepidoptera; gen *pat* odvozený ze *Streptomyces viridochromogenes* zajišťující toleranci k herbicidům na bázi glufosinátu amonného a geny *cry34Ab1/cry35Ab1* z bakterie *Bacillus thuringiensis strain PS149B1* nesoucí odolnost proti některým škůdcům z řádu Coleoptera.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

DAS59122xDAS1507xNK603

Hybridní geneticky modifikovaná kukuřice DAS59122xDAS1507xNK603 je vybavena geny: *cry1Fa2* z bakterie *Bacillus thuringiensis subs. Aizawai* nesoucí rezistenci vůči zavíječi kukuřičnému *Ostrinia nubilalis* a určitým dalším škůdcům z řádu Lepidoptera; gen *pat* odvozený ze *Streptomyces viridochromogenes* zajišťující toleranci k herbicidům na bázi glufosinátu amonného; *cry34Ab1/cry35Ab1* z bakterie *Bacillus thuringiensis* strain PS149B1 nesoucí odolnost proti některým škůdcům z řádu Coleoptera a gen *cp4 epsps* z bakterie *Agrobacterium tumefaciens strain CP4* nesoucí odolnost vůči glyfosátovým herbicidům.

Tato hybridní kukuřice je v EU povolena v krmivech.

3 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 jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou ve směru od 5'-konce ke 3'-konci, tzv. extenze. 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.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje a pomůcky

4.1.1 Analytické váhy.

4.1.2 Váhy s přesností 0,01 g.

- 4.1.3 Vortex.
- 4.1.4 Centrifuga.
- 4.1.5 Vodní lázeň.
- 4.1.6 Nízkoobjemový spektrofotometr (230 nm, 260 nm, 280 nm).
- 4.1.7 Minitřepačka.
- 4.1.8 Laminární box.
- 4.1.9 Termální cykler.
- 4.1.10 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 4.1.11 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 4.1.12 Transiluminátor.
- 4.1.13 Fotodokumentační zařízení a software.
- 4.1.14 pH metr.
- 4.1.15 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.
- 4.1.16 Plastové zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 4.1.17 Výrobník ledu.
- 4.1.18 Přenosná UV lampa.
- 4.1.19 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

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

4.2 Chemikálie

4.2.1 NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv

- 4.2.1.1 Lysis Buffer CF.
- 4.2.1.2 Buffer C2.
- 4.2.1.3 Buffer C3.
- 4.2.1.4 Wash buffer CQW.
- 4.2.1.5 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 4.2.1.6 Elution buffer CE.
- 4.2.1.7 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

4.2.1.8 Proteinase K (lyofilizát).

4.2.1.9 Proteinase buffer PB.

4.2.2 REDTaq[®]ReadyMix[™]PCR Reaction Mix with MgCl₂, Sigma-Aldrich

4.2.1.1 REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (dále REDTaq).

4.2.1.2 PCR voda.

4.2.3 REDExtract–N–Amp[™] Plant PCR Kits, výrobce Sigma – Aldrich, univerzální kit pro PCR

4.2.3.1 Extraction solution.

4.2.1.2 Dilution solution.

4.2.3.3. REDExtract–N–Amp PCR Ready Mix (dále REDEx).

4.2.4 Amplifikační primery

4.2.4.1 IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC.

4.2.4.2 IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT.

4.2.4.3 35s-cf3: CCA CGT CTT CEE AGC AAG TGG.

4.2.4.4 35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C.

4.2.4.5 NOS-1: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG.

4.2.4.6 NOS-3: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA.

4.2.4.7 APH2 F: CTC ACC TTG CTC CTG CCG AGA.

4.2.4.8 APH2 R: CGC CTT GAG CCT GGC GAA CAG.

4.2.4.9 pat_16-L: GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT.

4.2.4.10 pat_16-R: TTC CAG GGC CCA GCG TAA G.

4.2.4.11 Bt11-ev-F1: TGT GTG GCC ATT TAT CAT CGA.

4.2.4.12 Bt11-ev-r5: CGC TCA GTG GAA CGA AAA CTC.

4.2.4.13 MaiY-F1: TAG TCT TCG GCC AGA ATG G.

4.2.4.14 MaiY-R3: CTT TGC CAA GAT CAA GCG.

4.2.4.15 DAS-59122-7-rb1f: GGG ATA AGC AAG TAA AAG CGC TC.

4.2.4.16 DAS-59122-7-rb1r: CCT TAA TTC TCC GCT CAT GAT CAG.

4.2.4.17 GA21-5'f/: CGT TAT GCT ATT TGC AAC TTT AGA ACA.

4.2.4.18 GA21-5'r: GCG ATC CTC CTC GCG TT.

4.2.4.19 MIR604 primer F: GCG CAC GCA ATT CAA CAG.

4.2.4.20 MIR604 primer R: GGT CAT AAC GTG ACT CCC TTA ATT CT.

- 4.2.4.21 Mail-F1: TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT.
4.2.4.22 Mail-R1: GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT.
4.2.4.23 MON863F: GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C.
4.2.4.24 MON863R: TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT.
4.2.4.25 NK603-1: ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA.
4.2.4.26 NK603-2: : AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T.

Příprava amplifikačních primerů

Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství takto.

Zásobní roztok o koncentraci 100 μ M:

Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, který nemusí být viditelný, se přidá voda vhodná pro PCR v množství uvedeném výrobcem. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se po 50 μ l pipetuje do 0,5ml sterilních zkumavek. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Pracovní roztok o koncentraci 20 μ M:

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody vhodné pro PCR. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po (20 – 25) μ l a zamrazí na $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

4.2.5 Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

- 4.2.5.1 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na_2EDTA .
4.2.5.2 Trizma base.
4.2.5.3 Ledová kyselina octová.
4.2.5.4 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.

Příprava TAE pufru:

Příprava zásobního roztoku 50 $\times$ TAE

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA:

186,1 g Na_2EDTA se vmíchá do (750 – 800) ml (re)destilované vody. Na_2EDTA 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 fritu předem ošetřenou 30 min až 1 h při (115 – 120) $^\circ\text{C}$. 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 0,5 M 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 × TAE pro elektroforézu

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

4.2.6 Ostatní

4.2.6.1 Voda vhodná pro PCR.

4.2.6.2 Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free) – RNáza A.

4.2.6.3 (re)destilovaná voda.

4.2.6.4 Agaróza.

4.2.6.5 Agaróza High Resolution.

4.2.6.6 Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × (re)destilovanou vodou.

4.2.6.7 Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. GeneRuler™50bp DNA Ladder).

4.2.6.8 6 × Loading Dye Solution.

4.2.6.9 Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).

4.2.6.10 (0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

4.2.6.11 70% etanol.

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 × TAE pufru. Vaří se (15 – 20) min při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle 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 µl 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 pufru.

4.3 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.

DAS1507

ERM[®]-BF418b (označení CRM 5/2012) obsahující 0,1 % kukuřice DAS1507 a ERM[®]-BF418c (označení CRM 6/2012) obsahující 0,99 % kukuřice DAS1507 z IRMM Institute for reference Material and Measurements. Tyto pozitivní kontroly jsou ve formě sojového prášku, proto se z nich musí vyizolovat DNA.

MIR604

ERM[®]-BF423b (označení CRM 9/2012) obsahující 0,1 % kukuřice MIR604 a ERM[®]-BF423c (označení CRM 10/2012) obsahující 0,98 % kukuřice MIR604 z IRMM Institute for reference Material and Measurements. Tyto pozitivní kontroly jsou ve formě sojového prášku, proto se z nich musí vyizolovat DNA.

MON863

ERM[®]-BF416b (označení CRM 1/2012) obsahující 0,1 % kukuřice MON863 a ERM[®]-BF416c (označení CRM 2/2012) obsahující 0,98 % kukuřice MON863 z IRMM Institute for reference Material and Measurements. Tyto pozitivní kontroly jsou ve formě kukuřičného prášku, proto se z nich musí vyizolovat DNA.

Bt11

ERM[®]-BF412c (označení CRM 7/2009) obsahující 0,98 % kukuřice Bt11 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

DAS59122

ERM[®]-BF414c (označení CRM 4/2009) obsahující 0,99 % kukuřice DAS59122 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

GA21

ERM[®]-BF414d (označení CRM 9/2009) obsahující 0,99 % kukuřice GA21 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

MON810

ERM[®]-BF413d (označení CRM 8/2009) obsahující 1 % kukuřice MON810 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

NK603

ERM[®]-BF413d (označení CRM 10/2009) obsahující 0,98 % kukuřice MON810 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

Testovaný materiál kombinací genetických modifikací byl vytvořen smísením jednotlivých 1% pozitivních kontrol v poměru (1 : 1).

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Izolace DNA

Před začátkem vlastní izolace DNA je nutno připravit tyto roztoky:

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

Pufr C5: ke koncentráту pufru C5 se přidá (95 – 100)% etanol v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufr lze uchovávat při laboratorní teplotě 1 rok.

Proteináza K: K lyofilizované Proteináze K se přidá množství proteinázového pufru uvedené na jejím obalu. Roztok proteinázy K je stabilní 6 měsíců při –20 °C.

Vlastní izolace DNA probíhá v několika krocích. Nejprve se připraví pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů 70% etanolem a 30min působením UV záření.

Vodní lázeň se spolu s lyzačním pufrem CF předejde 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 pufru CF, dobře 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 65 °C. Poté se směs 10 min centrifuguje při >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 do nové 2 ml zkumavky. Přidá se 300 µl pufru C4 a 200 µl etanolu (96 – 100)% a vortexuje se 30 s. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2ml 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 μ l pufru CQW do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve druhém promytí se napipetuje 700 μ l pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve třetím promytí se pipetuje dalších 200 μ l pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufr C5 (rezidua etanolu v promývacím pufru C5 mohou inhibovat enzymatickou reakci). Posledním krokem izolace DNA je eluce. Předehřeje se eluční pufr 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 μ l přehřátého elučního pufru CE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě, a poté se centrifuguje se 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 -20 °C.

4.4.2 Měření koncentrace a určení kvality vyizolované DNA

Důležitým krokem po izolování 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 nm, 260 nm a 280 nm umožní vedle stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorpance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorpance při 260 nm 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 – 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 (jedná se o eluční roztok z kitu NucleoSpin® Food). Použijí se 2 μ l vzorku. Každý

vzorek se měří 2 ×, z naměřených hodnot se vypočítá průměr. Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace 5 ng/μl templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR.

Určení kvality vyizolované DNA

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

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 nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

4.4.3 Polymerázová řetězová reakce

Pro zavedení detekce nových genetických modifikací byly využity již zavedený JPP postup Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR (postup č. 10250.1) a event – specific metody validované EURL.

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

Vnitřní gen kukuřice

Primery: IVRI-F, IVRI-R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	
Annealing	68	110	35
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

Délka amplikonu: 226 bp

Screeningový element promotor 35S

Primery: 35s-cf3, 35s-cf4

Amplifikační program:

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

Délka amplikonu: 123 bp

Screeningový element terminátor NOS

Primery: NOS-1, NOS-3

Amplifikační program:

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

Délka amplikonu: 180 bp

Screeningový element nptII

Primery: APH2 F, APH2 R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	25	
Annealing	60	30	35
Extenze	72	45	

Délka amplikonu: 215 bp

Screeningový element pat

Primery: pat_16-L, pat_16-R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

Délka amplikonu: 186 bp

Transgen DAS1507

Primery: MaiY-F1, MaiY-R3

Amplifikační program:

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

Délka amplikonu: 58bp

Transgen MIR604

Primery: MIR604 primerF, MIR604 primer R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing	60	60	

Délka amplikonu: 76 bp

Transgen MON863

Primery: MON863F, MON863R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

Délka amplikonu: 84 bp

Hybridní kukuřice NK603xMON863

Primery: MON863F, MON863R, NK603-1, NK603-2

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

Délky amplikonů: 84, 108 bp

Hybridní kukuřice MON863xMON810xNK603

Primery: MON863F, MON863R, Mail-F1, Mail-R1, NK603-1, NK603-2

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

Délky amplikonů: 84, 92, 108 bp

Hybridní kukuřice MON863xMON810

Primery: MON863F, MON863R, Mail-F1, Mail-R1

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 84, 92 bp

Hybridní kukuřice Bt11xMIR604

Primery: Bt11-ev-F1, Bt11-ev-r5, MIR604 primerF, MIR604 primer R

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 68, 76 bp

Hybridní kukuřice Bt11xMIR604xGA21

Primery: Bt11-ev-F1, Bt11-ev-r5, MIR604 primerF, MIR604 primer R, GA21-5'f, GA21-5'r

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 68, 76, 101 bp

Hybridní kukuřice MIR604xGA21

Primery: MIR604 primerF, MIR604 primer R, GA21-5'f, GA21-5'r

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 76, 101 bp

Hybridní kukuřice DAS1507xNK603

Primery: MaiY-F1, MaiY-R3, NK603-1, NK603-2

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 58, 108 bp

Hybridní kukuřice DAS59122xDAS1507xNK603

Primery: DAS-59122-7rb1f, DAS-59122-7-rb1r, MaiY-F1, MaiY-R3, NK603-1, NK603-2

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	50
Annealing	60	60	

Délky ampliconů: 86, 58, 108 bp

Hybridní kukuřice DAS59122xDAS1507

Primery: DAS-59122-7rb1f, DAS-59122-7-rb1r, MaiY-F1, MaiY-R3

Amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	50
Annealing	60	60	

Délky amplikonů: 86, 58 bp

Provedení vlastní PCR reakce

Používané amplifikační kity REDTaq a REDEx nejsou zcela zaměnitelné. REDEx se používá pro duplexní a multiplexní PCR, pro ostatní jednoduché reakce postačující REDTaq (v případě potřeby mohou být provedeny i kitem REDEx, neboť specifita je dána amplifikačními primery).

Laminární box se (20 – 30) min vysvítí UV zářením. Předměty v něm umístěné a jeho prostor se dekontaminují 70% etanolem. 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). Dle tabulek reakčních směsí (Tabulka 1, Tabulka 2 a Tabulka 3) 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 na minicentrifuze.

PCR směs se připravuje na ledu.

REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce 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.

Mírným poklepáním se promíchají, zcentrifugují na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits

Izoláty DNA získané pomocí výše uvedených izolačních kitů se musejí pro amplifikaci tímto kitem upravit tak, že se smíchají v poměru 1 : 1 se směsí Extraction Buffer : Dilution Buffer (1 : 1). Požadovaný objem 4 µl roztoku templátu vkládaný do 1 PCR reakce tedy tvoří 2 µl izolátu DNA a 2 µl této směsi pufrů na 20 µl celkové reakční směsi v 1 PCR. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce 2 a tabulce 3. Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 16 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidají 4 µl templátové DNA. V případě multiplexní PCR reakce se reakční směs rozdělí po 21 µl do označených zkumavek, poté se přidají 4 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

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

Tabulka 1. Složení reakční směsi REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

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

Tabulka 2. Složení reakční směsi REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits -duplexní PCR.

Složka	1 reakce (μl)
PCR voda	4,4
REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits	10
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Templát	4

Tabulka 3. Složení reakční směsi REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits- multiplexní PCR.

Složka	1 reakce (μl)
PCR voda	3,6
REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits	15
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Templát	4

Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrém 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 obou kitů 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 dle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje.

Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje prosvícením na transiluminátoru, vyfotografováním a přenesením do počítače.

5 Výsledky a diskuze

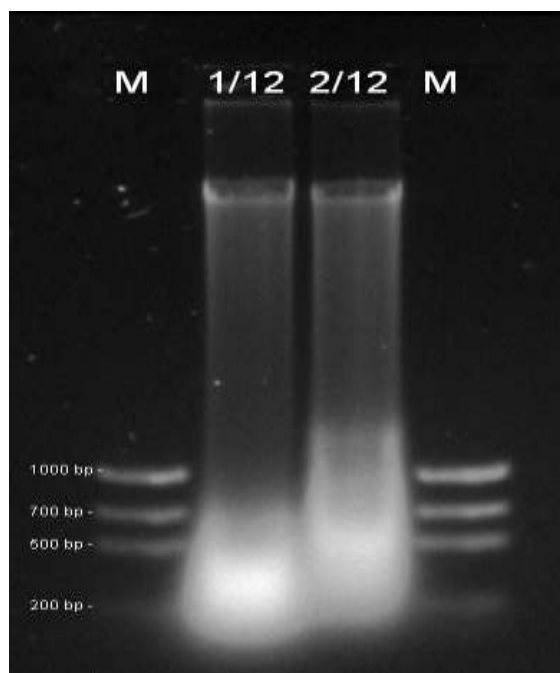
MON863

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 4. Naměřené koncentrace a hodnoty určujících čistotu vyextrahované DNA.

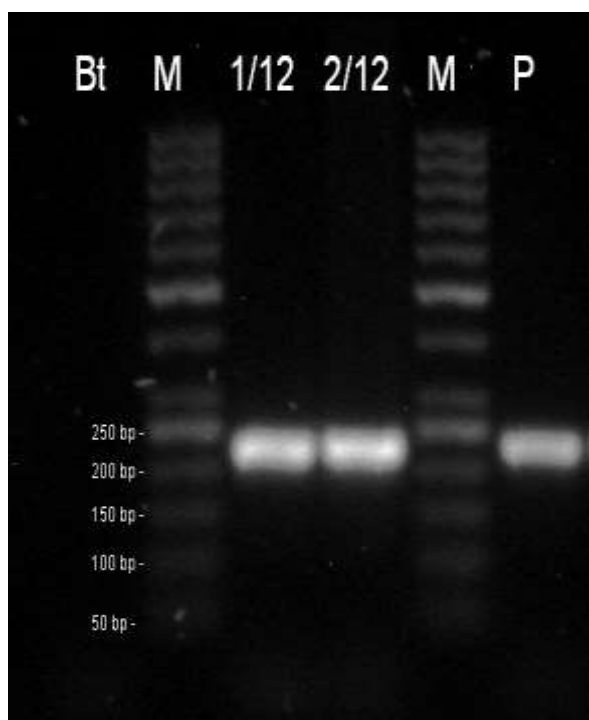
vzorky	koncentrace (ng/μl)	A 260 / A 280	A 260 / A 230
CRM 1/2012	723,70	2,14	2,32
CRM 1/2012	724,90	2,15	2,33
CRM 2/2012	261,10	2,42	2,16
CRM 2/2012	263,70	2,43	2,17

Určení kvality vyizolované DNA



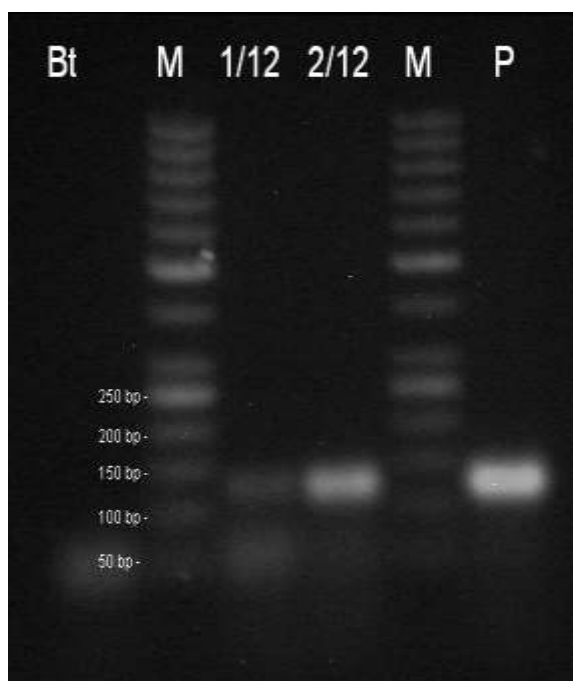
Obr 1. Určení kvality vyizolované DNA pozitivních kontrol CRM 1/2012 (1/12) a CRM 2/2012 (2/12), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu kukuřice



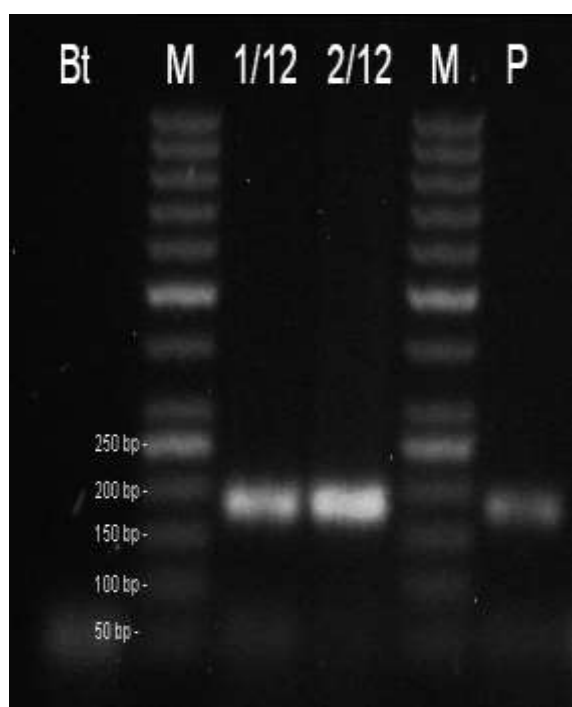
Obr 2. Stanovení vnitřního genu kukuřice (226 bp) u pozitivních kontrol CRM 1/2012 (1/12) a CRM 2/2012 (2/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 2/2009. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení promotoru 35S



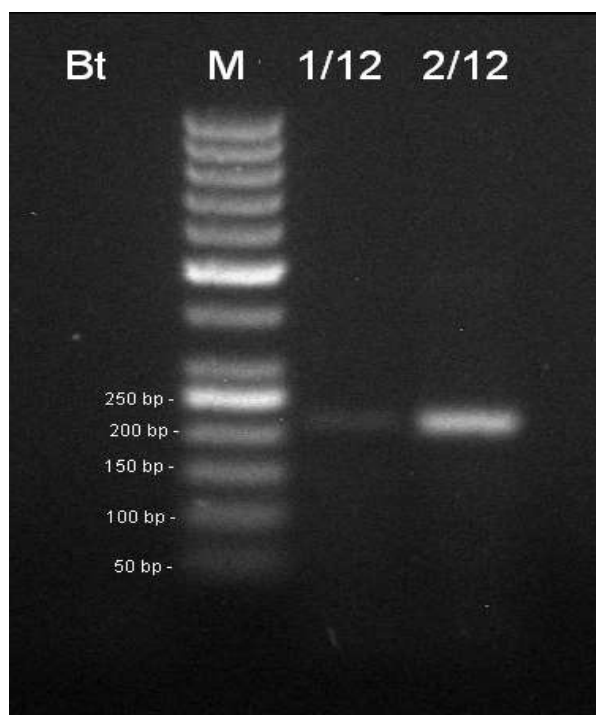
Obr 3. Stanovení promotoru 35S (123 bp) u CRM 1/2012 (1/12) a CRM 2/2012 (2/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola IRM 1/2007. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení terminátoru NOS



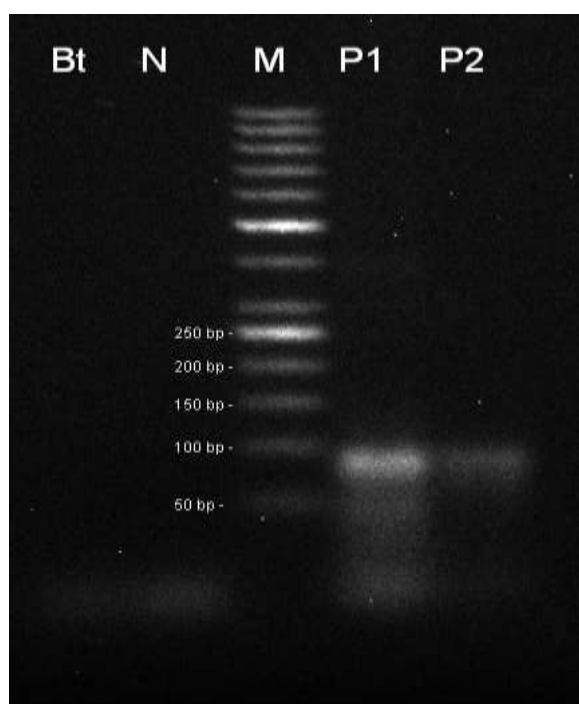
Obr 4. Stanovení terminátoru NOS (180bp) u CRM 1/2012 (1/12) a CRM 2/2012 (2/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu nptII

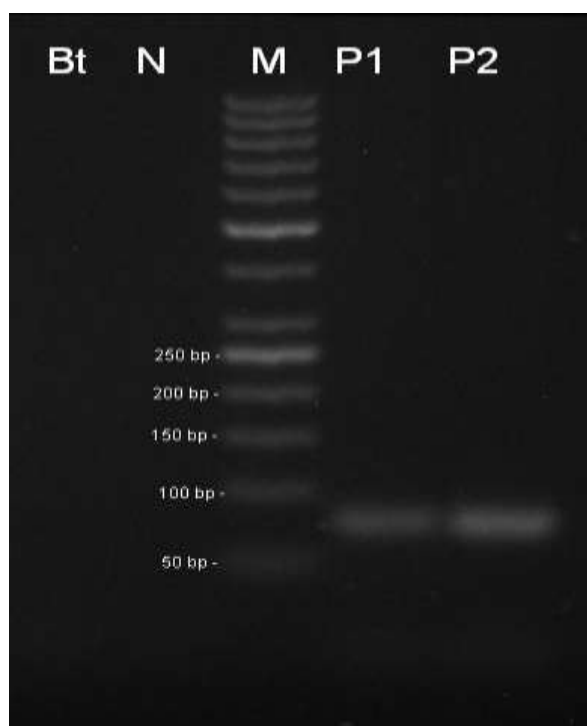


Obr 5. Stanovení screeningového elementu nptII (215 bp) u CRM 1/2012 (1/12) a CRM 2/2012 (2/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp. Amplifikační kit REDTaq.

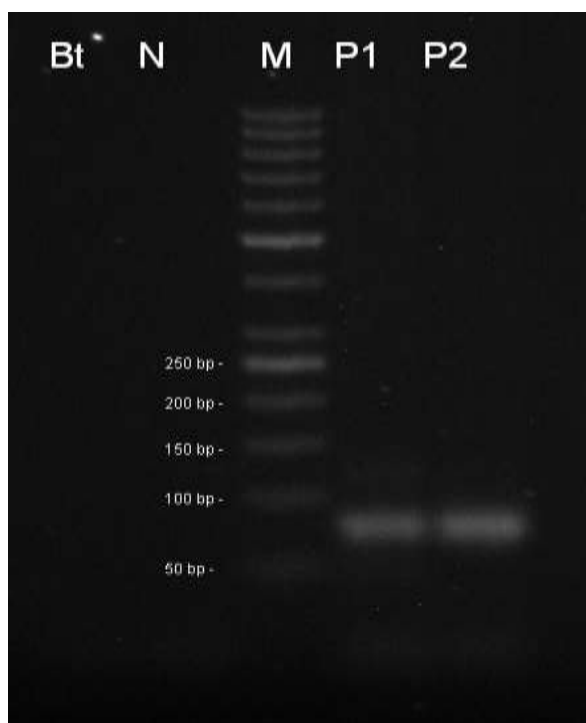
Stanovení transgenu MON863



Obr 6. Stanovení transgenu MON863 (84 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012. Amplifikační kit REDTaq.



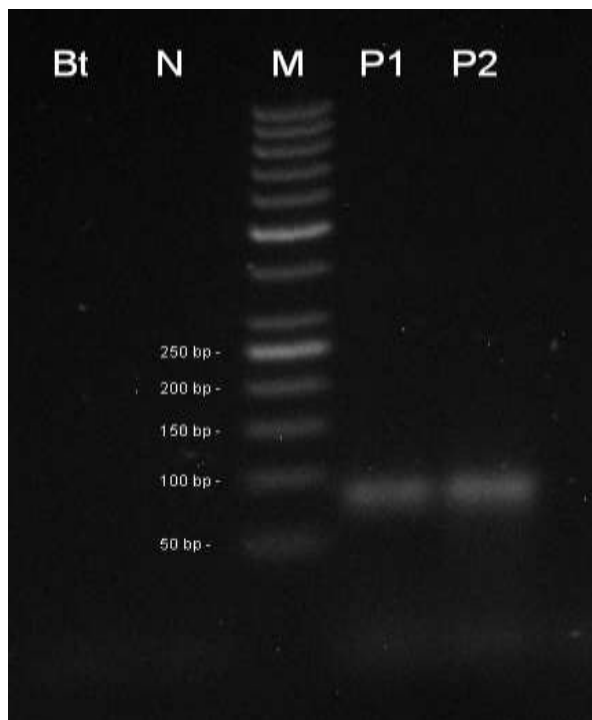
Obr 7. Stanovení transgenu MON863 (84 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 8. Stanovení transgenu MON863 (84 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 9. Stanovení transgenu MON863 (84 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 10. Stanovení transgenu MON863 (84 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012. Amplifikační kit REDTaq.

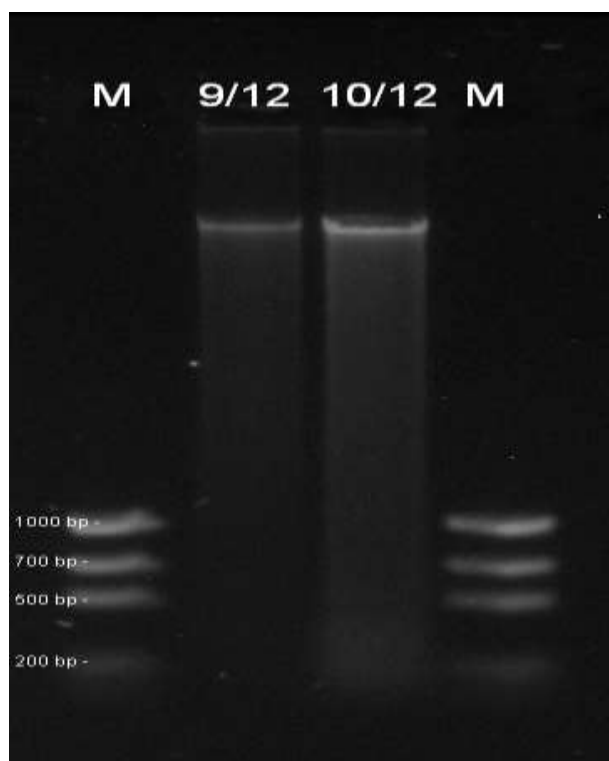
MIR604

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 5. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

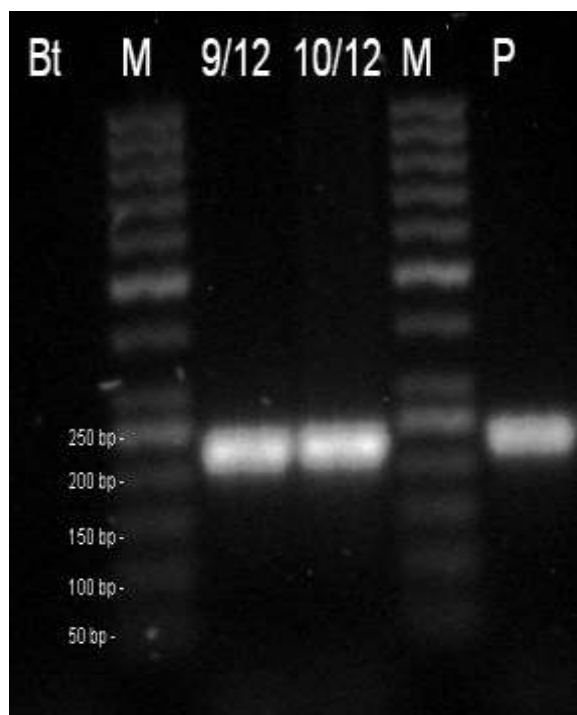
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 9/2012	39,60	1,82	2,25
CRM 9/2012	40,90	1,90	2,25
CRM 10/2012	60,70	1,74	1,73
CRM 10/2012	60,00	1,75	1,73

Určení kvality vyizolované DNA



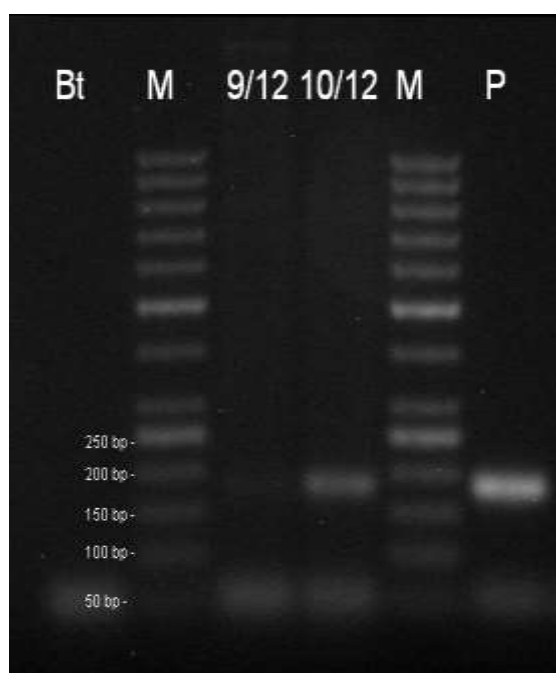
Obr 11. Určení kvality vyizolované DNA pozitivních kontrol CRM 9/2012 (9/12) a CRM 10/2012 (10/12), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu kukuřice



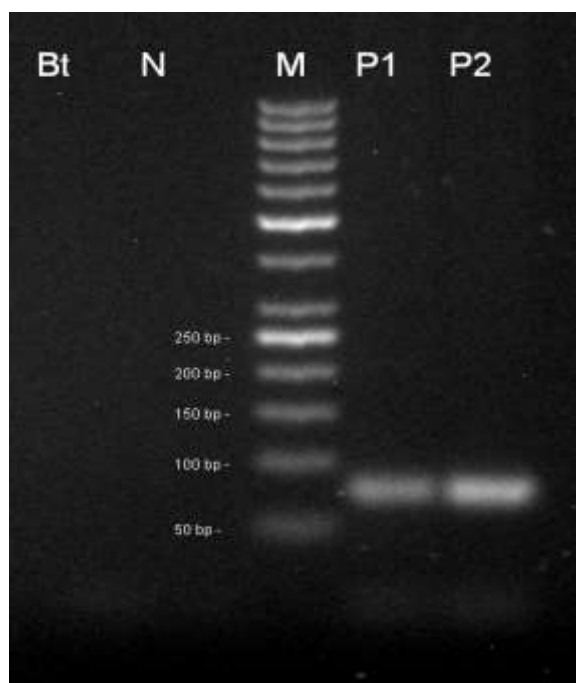
Obr 12. Stanovení vnitřního genu kukuřice (226 bp) u pozitivních kontrol CRM 9/2012 (9/12) a CRM 10/2012 (10/12), Bt – beztemplátová kontrola, , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 2/2009. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení terminátoru NOS

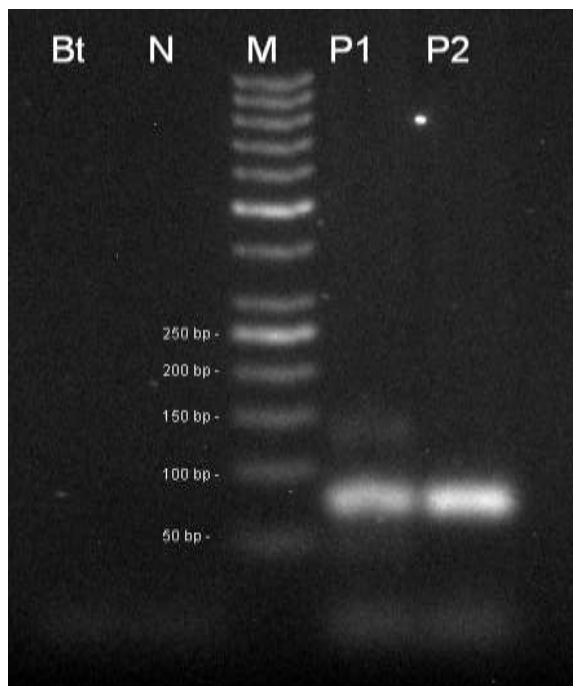


Obr 13. Stanovení terminátoru NOS (180 bp) u CRM 9/2012 (9/12) a CRM 10/2012 (10/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

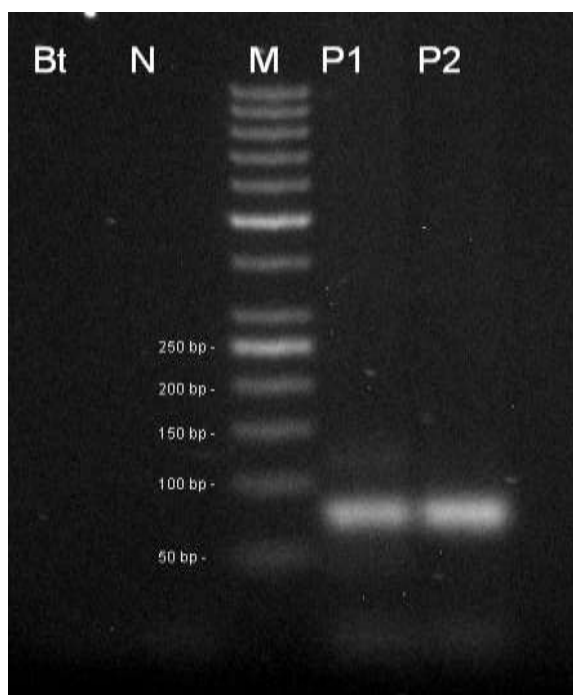
Stanovení transgenu MIR604



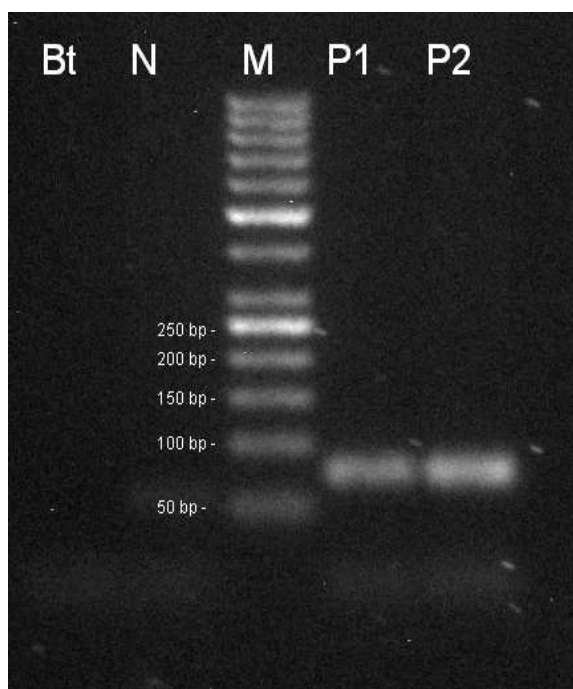
Obr 14. Stanovení transgenu MON863 (76 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 9/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2012. Amplifikační kit REDTaq.



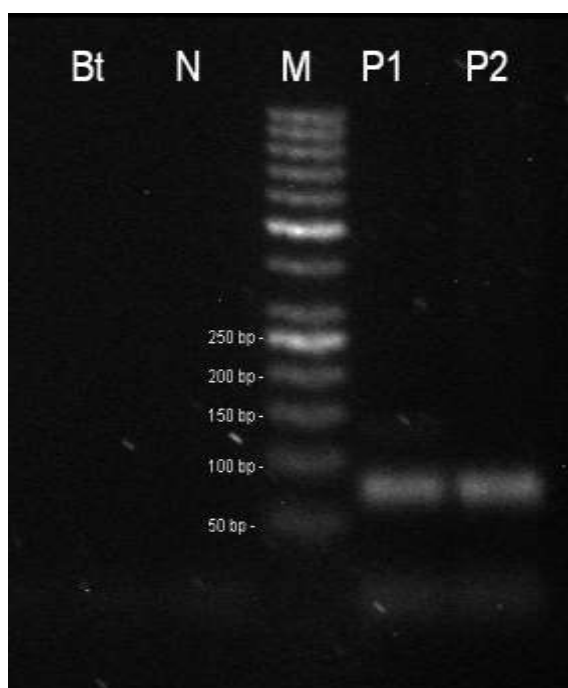
Obr 15. Stanovení transgenu MON863 (76 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 9/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 16. Stanovení transgenu MON863 (76bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 9/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 17. Stanovení transgenu MON863 (76 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 9/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 18. Stanovení transgenu MON863 (76 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 9/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2012. Amplifikační kit REDTaq.

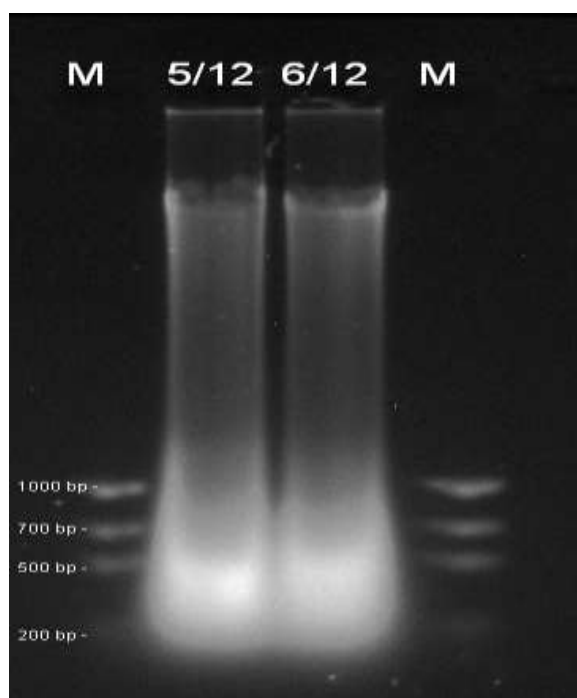
Stanovení transgenu DAS1507

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 6. Naměřené koncentrace a hodnoty určujících čistotu vyextrahované DNA.

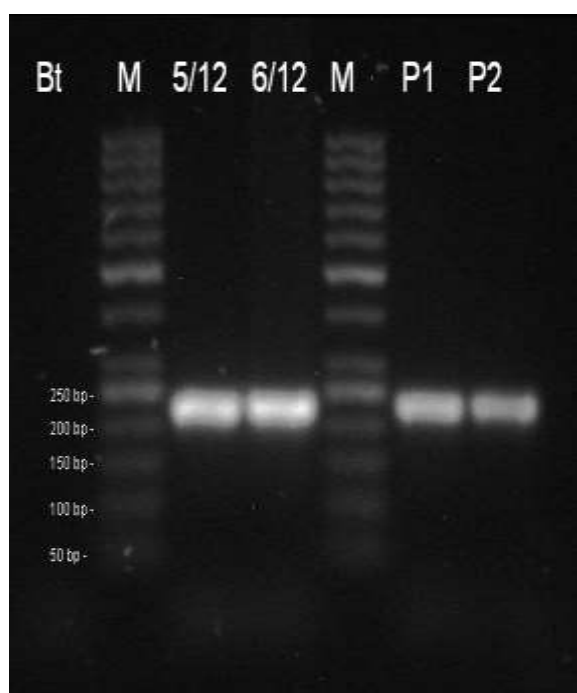
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 5/2012	309,70	2,14	2,26
CRM 5/2012	307,60	2,14	2,27
CRM 6/2012	363,40	2,15	2,29
CRM 6/2012	363,80	2,15	2,29

Určení kvality vyizolované DNA



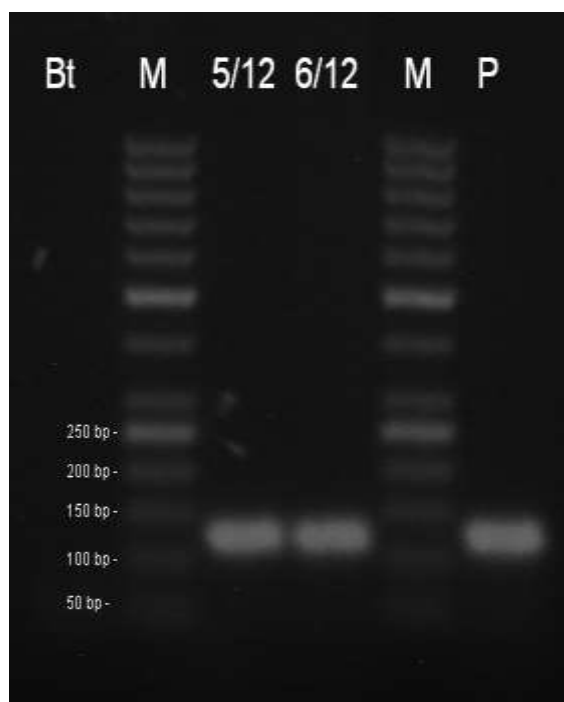
Obr 19. Určení kvality vyizolované DNA pozitivních kontrol CRM 5/2012 (5/12) a CRM 6/2012 (6/12), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu kukuřice



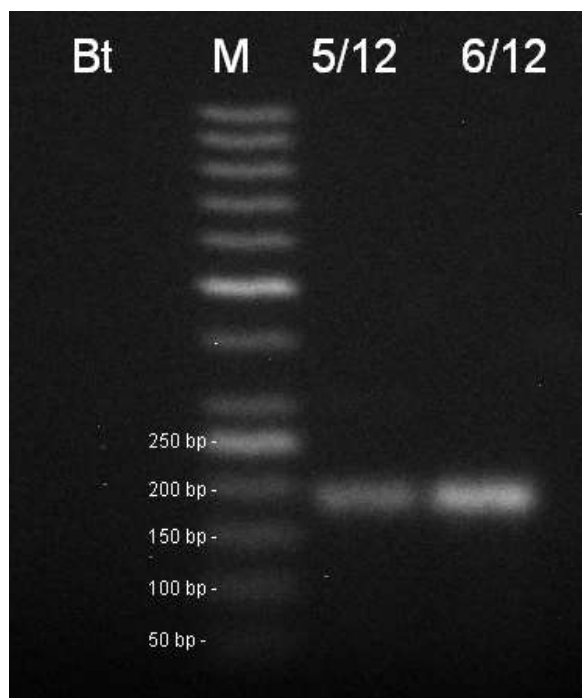
Obr 20. Stanovení vnitřního genu kukuřice (226 bp) u pozitivních kontrol CRM 9/2012 (5/12) a CRM 10/2012 (6/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola IRM1/2007, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2009. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení promotoru 35S



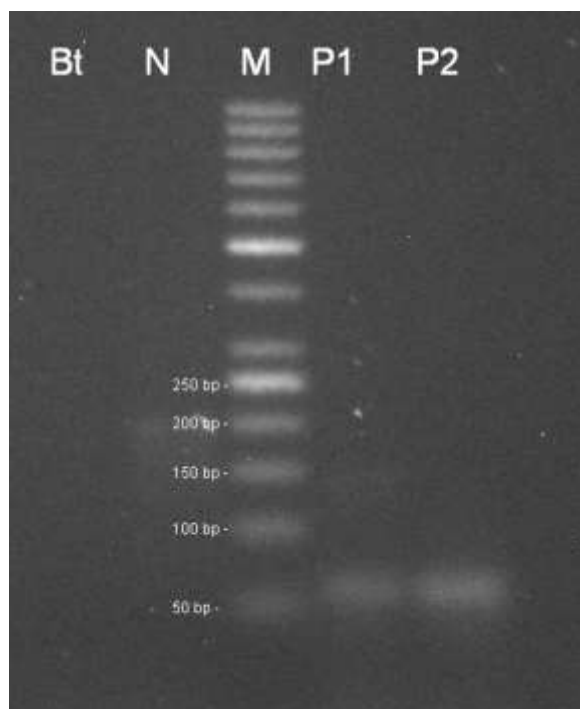
Obr 21. Stanovení promotoru 35S (123 bp) u CRM 5/2012 (5/12) a CRM 6/2012 (6/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola IRM 1/2007. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu pat

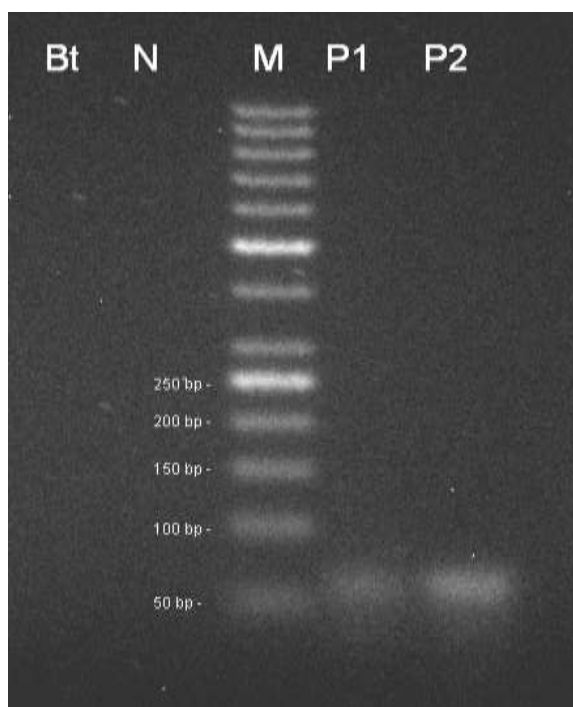


Obr 22. Stanovení elementu pat (186 bp) u CRM 5/2012 (5/12) a CRM 6/2012 (6/12)–pat: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp. Amplifikační kit REDTaq.

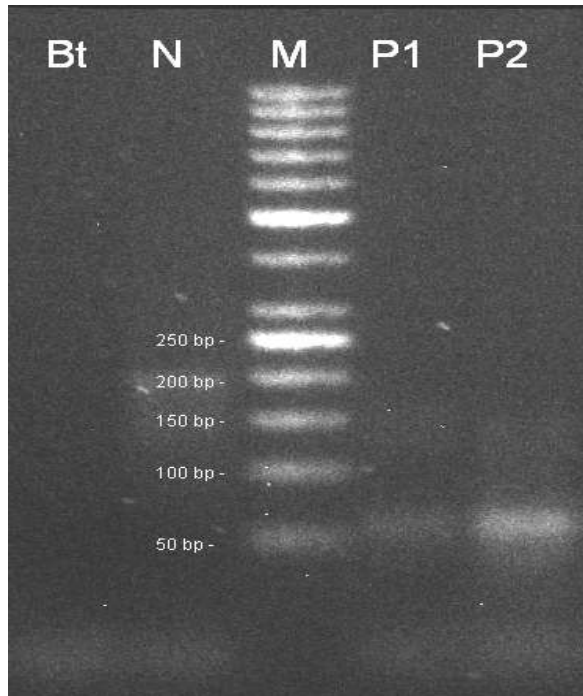
Stanovení transgenu DAS1507



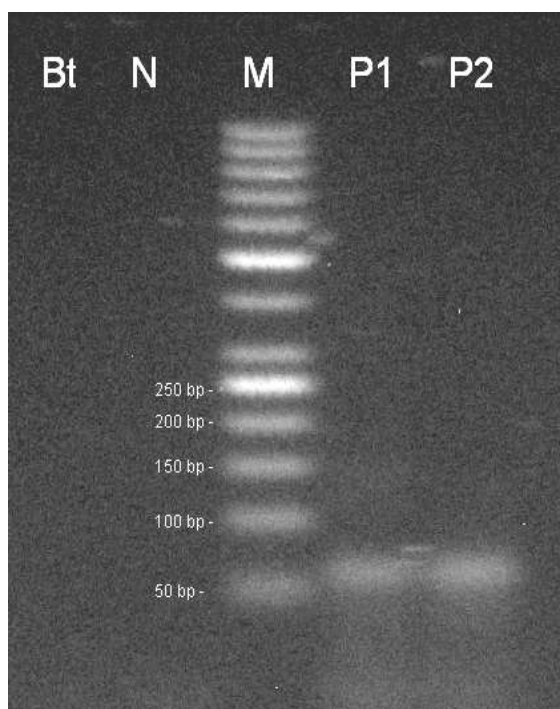
Obr 23. Stanovení transgenu DAS1507 (58 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012. Amplifikační kit REDTaq.



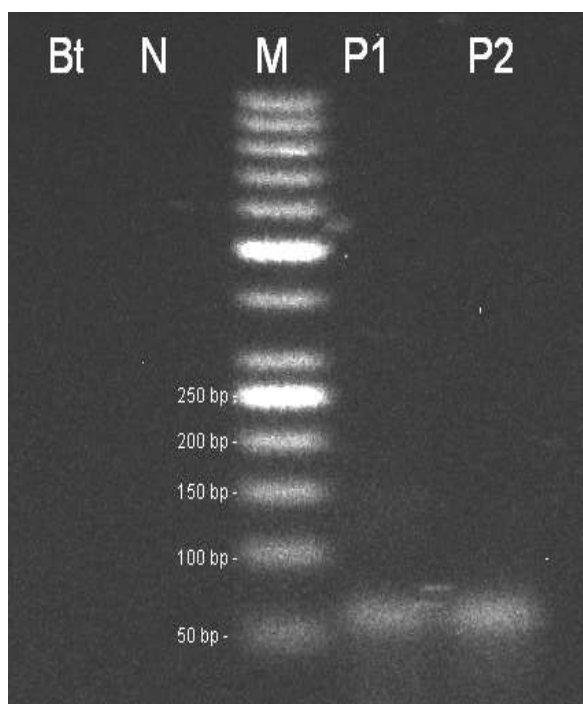
Obr 24. Stanovení transgenu DAS1507 (58 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 25. Stanovení transgenu DAS1507 (58 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 26. Stanovení transgenu DAS1507 (58bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012. Amplifikační kit REDTaq.



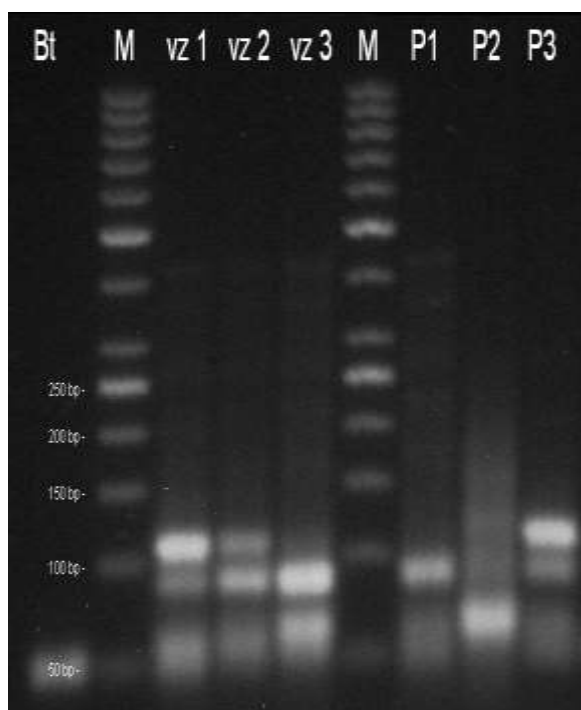
Obr 27. Stanovení transgenu DAS1507 (58 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012. Amplifikační kit REDTaq.

Během zavádění transgenů MON863, MIR604 a DAS1507 se postupovalo dle metody JPP (postup č. 10250.1) a event-specific metod validovaných EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

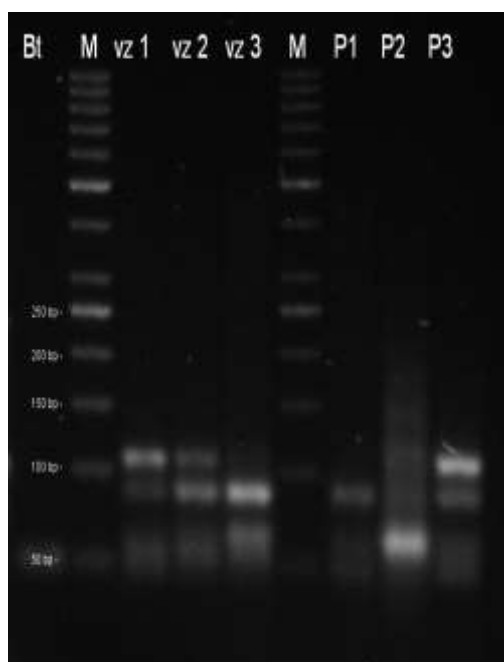
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě. Některé z těchto pruhů (hlavně u nižší koncentrace DNA) jsou však na hranici viditelnosti (zejména v tištěné verzi, která má poněkud horší kvalitu oproti původním snímkům uloženým v počítači).

Duplexní a multiplexní PCR

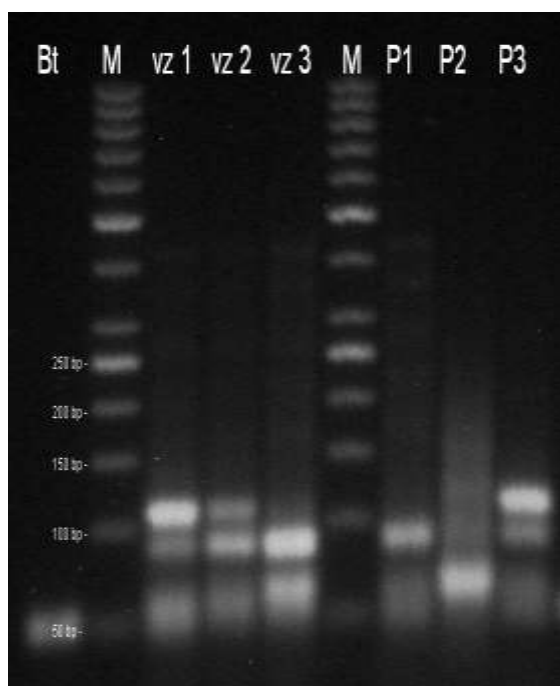
DAS1507xNK603, DAS59122xDAS1507xNK603, DAS59122xDAS1507



Obr 28. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz1 – CRM6/2012xCRM10/2009(DAS1507xNK603), vz2 – CRM 4/2009xCRM6/2012xCRM10/2009(DAS59122xDAS1507xNK603), vz3 – CRM 4/2009xCRM6/2012(DAS59122xDAS1507), P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2012 (58 bp), P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P3 – pozitivní kontrola CRM 4/2009 (86 bp). Amplifikační kit REDEx.

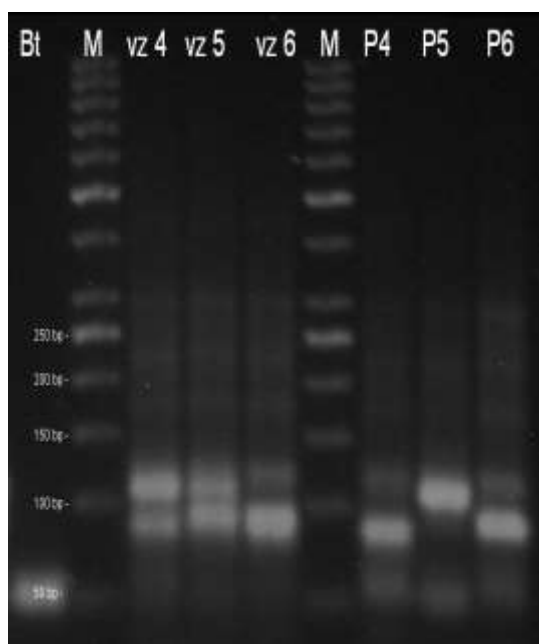


Obr 29. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz1 – CRM6/2012xCRM10/2009(DAS1507xNK603), vz2 – CRM 4/2009xCRM6/2012xCRM10/2009(DAS59122xDAS1507xNK603), vz3 – CRM 4/2009xCRM6/2012(DAS59122xDAS1507), P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2012 (58 bp), P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P3 – pozitivní kontrola CRM 4/2009 (86 bp). Amplifikační kit REDEx.

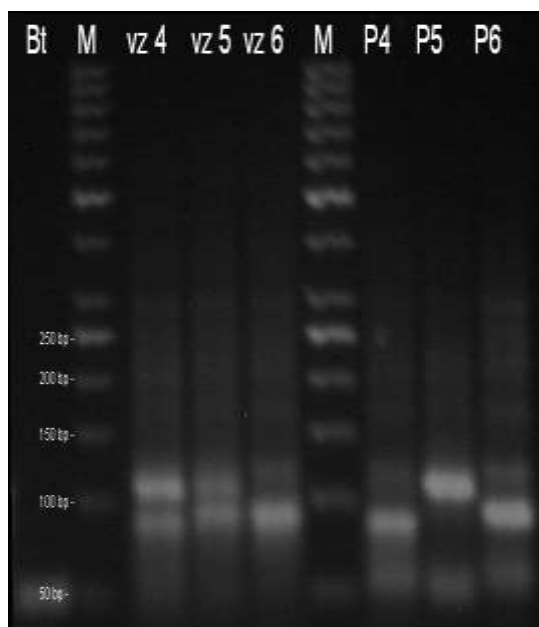


Obr 30. 30. 1. 2013 multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz1 – CRM6/2012xCRM10/2009(DAS1507xNK603), vz2 – CRM 4/2009xCRM6/2012xCRM10/2009(DAS59122xDAS1507xNK603), vz3 – CRM 4/2009xCRM6/2012(DAS59122xDAS1507), P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2012 (58 bp), P2 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P3 – pozitivní kontrola CRM 4/2009 (86 bp). Amplifikační kit REDEx.

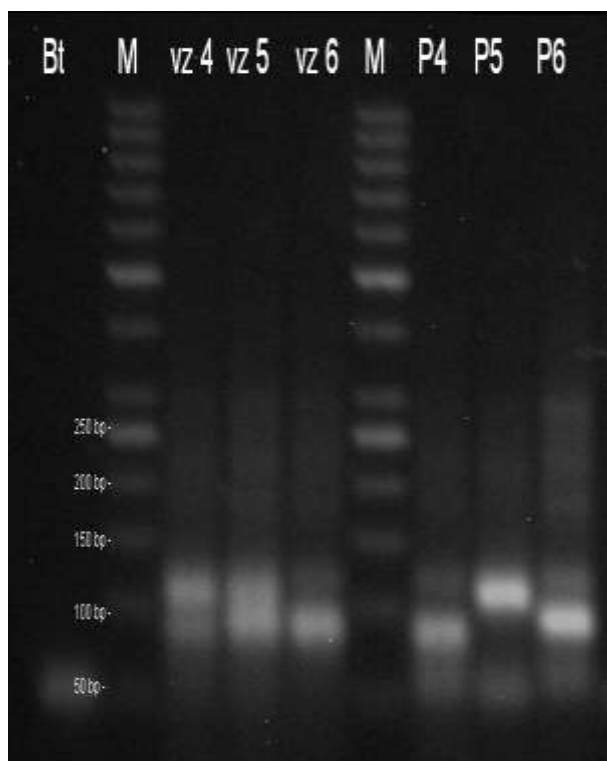
NK603xMON863, MON863xMON810xNK603, MON863xMON810



Obr 31. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz4 – CRM10/2009xCRM12/2012 (NK603xMON863), vz5 – CRM 2/2012xCRM8/2009xCRM10/2009 (MON863xMON810xNK603), vz6 – CRM 2/2012 xCRM8/2009 (MON863xMON810), P4 – pozitivní kontrola CRM 2/2012 (84 bp), P5 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P6 – pozitivní kontrola CRM 8/2009 (92bp). Amplifikační kit REDEx.

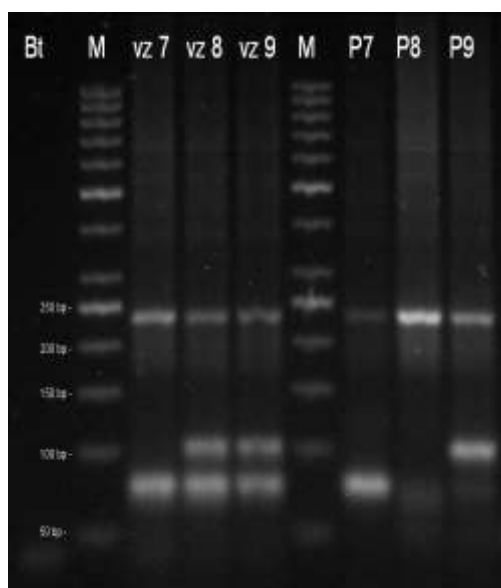


Obr 32. 29. 1. 2013 multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz4 – CRM10/2009xCRM12/2012 (NK603xMON863), vz5 – CRM 2/2012xCRM8/2009xCRM10/2009 (MON863xMON810xNK603), vz6 – CRM 2/2012 xCRM8/2009 (MON863xMON810), P4 – pozitivní kontrola CRM 2/2012 (84 bp), P5 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P6 – pozitivní kontrola CRM 8/2009 (92bp). Amplifikační kit REDEx.

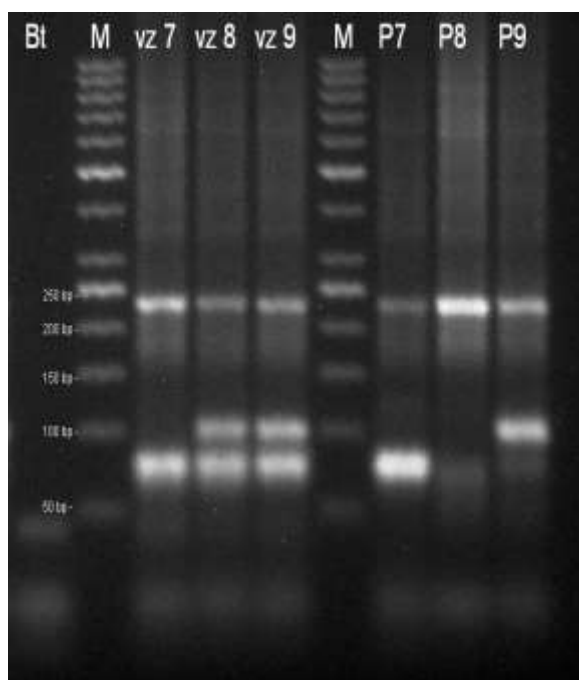


Obr 33. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz4 – CRM10/2009xCRM12/2012 (NK603xMON863), vz5 – CRM 2/2012xCRM8/2009xCRM10/2009 (MON863xMON810xNK603), vz6 – CRM 2/2012 xCRM8/2009 (MON863xMON810), P4 – pozitivní kontrola CRM 2/2012 (84 bp), P5 – pozitivní kontrola CRM 10/2009 (108 bp), P6 – pozitivní kontrola CRM 8/2009 (92bp). Amplifikační kit REDEx.

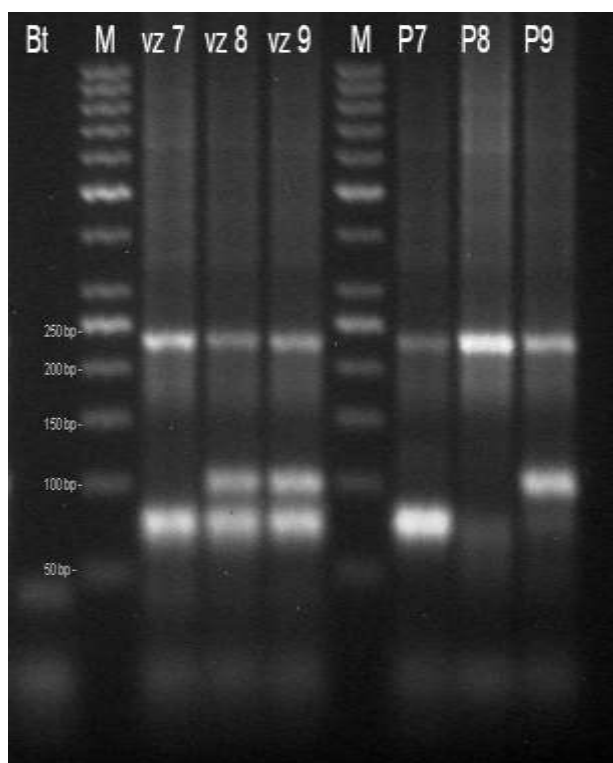
Bt11xMIR604, Bt11xMIR604xGA21, MIR604xGA21



Obr 34. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz7 – CRM7/2009xCRM10/2012 (Bt11xMIR604), vz8 – CRM7/2009xCRM10/2012xCRM9/2009 (Bt11xMIR604xGA21), vz9 – CRM 10/2012xCRM9/2009 (MIR604xGA21), P7 – pozitivní kontrola CRM 10/2012 (76 bp), P8 – pozitivní kontrola CRM 7/2009 (68 bp), P9 – pozitivní kontrola CRM 9/2009 (101 bp). Amplifikační kit REDEx.



Obr 35. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz7 – CRM7/2009xCRM10/2012 (Bt11xMIR604), vz8 – CRM7/2009xCRM10/2012xCRM9/2009 (Bt11xMIR604xGA21), vz9 – CRM 10/2012xCRM9/2009 (MIR604xGA21), P7 – pozitivní kontrola CRM 10/2012 (76 bp), P8 – pozitivní kontrola CRM 7/2009 (68 bp), P9 – pozitivní kontrola CRM 9/2009 (101 bp). Amplifikační kit REDEx.



Obr 35. Multiplexní PCR reakce: Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, vz7 – CRM7/2009xCRM10/2012 (Bt11xMIR604), vz8 – CRM7/2009xCRM10/2012xCRM9/2009 (Bt11xMIR604xGA21), vz9 – CRM 10/2012xCRM9/2009 (MIR604xGA21), P7 – pozitivní kontrola CRM 10/2012 (76 bp), P8 – pozitivní kontrola CRM 7/2009 (68 bp), P9 – pozitivní kontrola CRM 9/2009 (101 bp). Amplifikační kit REDEx.

Při provádění duplexní a multiplexní PCR se postupovalo dle metody JPP (postup č. 10250.1) a event-specific metod validovaných EURL. U multiplexní PCR se provedlo navýšení jednotlivých složek reakční směsi. Elektroforéza byla provedena na agaróze High Resolution pro lepší rozlišení PCR produktů.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že amplikony testovaných vzorků jsou od sebe těžko odlišitelné, a to z toho důvodu, že jejich počty párů bazí (bp) jsou si podobné a v některých případech spolu splývají. Nejsou od sebe odlišitelné ani na High Resolution agarózovém gelu. Některé z těchto pruhů jsou 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 opakovaném rozmrazování a zmrazování alikvotů ve zkumavkách.

- Kvalitě amplifikačních primerů. Jejich kvalita je také závislá na opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metody pro detekci nových genetických modifikací, a to transgenů MON863, MIR604 a DAS1507 u kukuřice, a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných transgenů v laboratoři OMB.

Tento úkol se podařilo splnit a laboratoř je schopna k datu psaní této práce stanovit 11 genetických modifikací u kukuřice. Tyto metody se zařadí do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

Současně bylo cílem vývojového úkolu vyzkoušení multiplexní PCR reakce u vybraných kombinací transgenů obsahujících zaváděné genetické modifikace a genetické modifikace v laboratoři již zavedé. V tomto případě se úkol splnit nepodařilo a laboratoř bude nadále stanovovat každý transgen zvlášť pomocí jednoduché PCR.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 250.
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. Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti, Roudná M. (Ed.) et al., **2011**, Ministerstvo životního prostředí, Praha.
4. GMO bez obalu, **2012**, Ministerstvo zemědělství, Praha.
5. Svět biotechnologií, říjen **2012**, Sdružení BIOTRIN.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVIII 2014/3

Ročník: XVIII, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2014

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 57

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196