

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2006**

**Ročník X, číslo 2/ 2006**

**Brno 2006**

## Obsah

1. **Optimalizace elektroforetické metody pro charakterizaci bramborových odrůd pomocí bílkovinných genetických markerů s ohledem na kvalitu elektroforegramu (rozlišení a kontrast) a vytvoření jejich databáze pomocí software BIO-GENE** 1

Iva Bartušková, Pavel Ryšavý  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,  
Oddělení speciálních analýz rostlin a krmiv, Lípa

2. **Částečná validace dalších detekčních metod GMO** 24

Judita Kopotová, Miroslava Suchomelová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,  
Oddělení mikrobiologie a biochemie, Brno

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

# **Optimalizace elektroforetické metody pro charakterizaci bramborových odrůd pomocí bílkovinných genetických markerů s ohledem na kvalitu elektroforegramu (rozlišení a kontrast) a vytvoření jejich databáze pomocí software BIO-GENE**

*Iva Bartušková, Pavel Ryšavý*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř –  
Oddělení speciálních analýz rostlin a krmiv Lípa, Lípa u Havlíčkova Brodu  
[iva.bartuskova@ukzuz.cz](mailto:iva.bartuskova@ukzuz.cz), [pavel.rysavý@ukzuz.cz](mailto:pavel.rysavý@ukzuz.cz)

## **1 Úvod**

Nutnost kontroly, identifikace a verifikace odrůdové pravosti u brambor je v České republice dána zákonem č. 408/2000 Sb. o ochraně práv k novým odrůdám rostlin a plemenům zvířat. Zákon upravuje práva a povinnosti, které vznikají při vytvoření nových odrůd a při jejich obchodním využívání. Celý systém ochrany odrůd popsany v tomto zákonu odpovídá zásadám Mezinárodní unie na ochranu nových odrůd rostlin (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, dále jen UPOV), ke které počátkem 90. let 20. století přistoupila i Česká republika.

Metoda identifikace založená pouze na morfologických znacích rostlin a hlíz není příliš objektivní pro závislost těchto znaků na podmínkách prostředí. Jako nejvhodnější pro identifikace odrůd jsou pokládány stabilní znaky hlízy. Mezi tyto znaky, které byly úspěšně využity jako genetické markery, patří rozpustné bílkoviny a enzymy hlíz. Pro jejich stanovení je vhodná a účinná technika zónové elektroforézy na polyakrylamidovém nosiči. Cílem práce bylo takové nastavení experimentálních podmínek elektroforetické metody na polyakrylamidovém gelu pro identifikaci odrůd brambor pomocí bílkovinných markerů (metoda „INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS“ - UPOV, TG/23/6- Polyacrylamide gel electrophoresis methods for the analysis of patanins in potatoes), které povede k dobré reprodukovatelnosti a optimální kvalitě elektroforetického záznamu z hlediska

rozlišení a kontrastu. Získané elektroforetické spektrum hlízových bílkovin je odrůdově specifické, nemění se ani v hlízách skladovaných po několik měsíců v chladu, pěstovaných na různých lokalitách, v různých ročnících, jakož i v různých pěstebních systémech (konvenčně nebo biofarmy). Metoda je dostatečně operativní - poskytuje výsledky do 48 hodin. Elektroforegramy jednotlivých odrůd byly zdigitalizovány a uloženy do elektronické databáze programu BIO-GENE.

## **2 Teoretická část**

### **2.1 Bílkoviny v bramborách**

Obvykle uváděná střední hodnota obsahu tzv. hrubých bílkovin (dusíkaté látky, obsah N  $\times$  6,25) v čerstvé hmotě bramborových hlíz je cca 2 %; v sušině pak kolem 10 %. Z dusíkatých látek v bramborové hlíze tvoří bílkoviny přibližně 50 %; 15 % volné aminokyseliny; 23 % amidy (asparagin a glutamin) a 12 % ostatní dusíkaté látky (glykoalkaloidy chaconin a solanin; sekundární metabolity acetylcholin, adenin, kadaverin, guanin, hypoxanthin, narkotin, trigonelin, xanthin atd.). Podíl bílkovin může ovšem kolísat ve značném rozpětí od 34 % do 70 % (3).

Co se týká frakcionace bílkoviny z hlediska rozpustnosti, existuje shoda, že většina hlízových bílkovin patří mezi snadno rozpustné, kdy albuminová frakce zaujímá 60 % a globulinová frakce 20 %.

Mezi bílkovinami bramborových hlíz převažuje několik bílkovinných skupin, nejčastěji jsou uváděny následující tři hlavní skupiny (3):

1. Patatin, neboli patatinový komplex,
2. Proteázové inhibitory, které představují (20 – 30) % extrahovatelných bílkovin hlíz brambor,
3. Bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností účastníci se syntézy škrobu, např. fosforyláza s Mr 80 kDa.

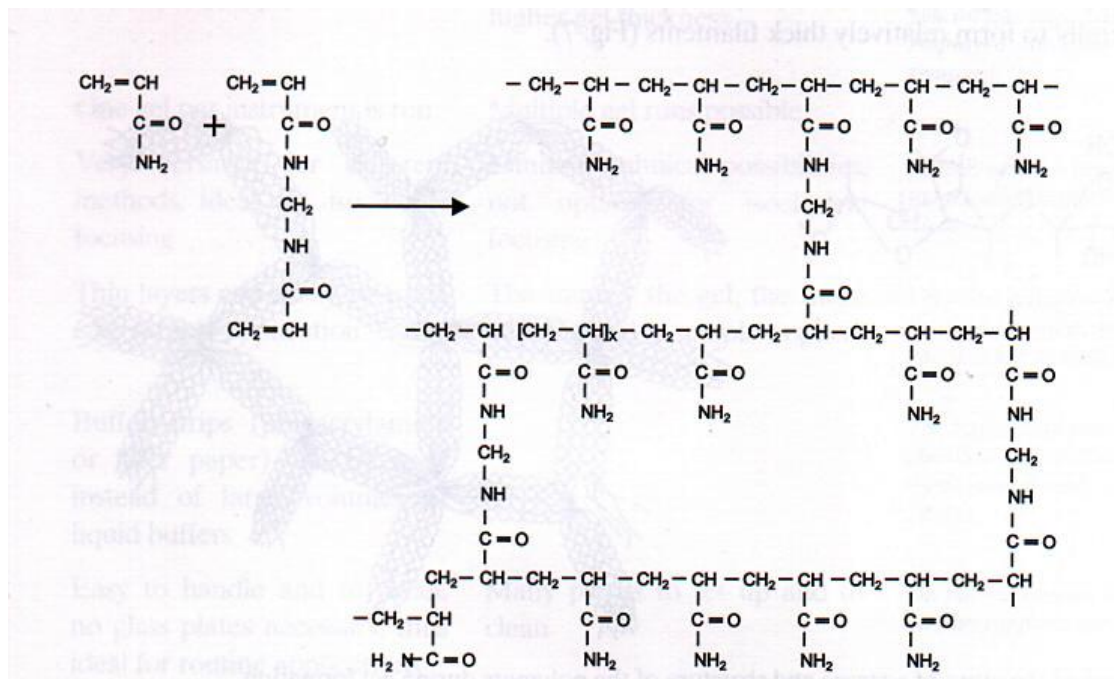
Patatinový komplex (patatin) představuje skupinu imunologicky identických glykoproteinů s molekulovou hmotností (40 – 43) kDa. Tvoří (20 – 40) % rozpustných bílkovin bramborových hlíz a za běžných podmínek se vyskytuje ve významných množstvích jen v hlízách. Studium jeho vlastností bylo zjištěno, že se jedná o dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa.

Monomer je složen z 366 aminokyselin. Jednotlivé patatinové bílkoviny (izoformy) jsou sice imunologicky identické, ale na odrůdové úrovni mezi nimi byla zjištěna rozdílná nábojová heterogenita. Při elektroforetické separaci tak může být zjišťován rozdílný počet pruhů (reprezentující jednotlivé izoformy) v patatinové oblasti elektroforegramu. Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových izoform s podobnou hodnotou pI v rozmezí (4,6 – 5,2) a přibližnou molekulovou hmotností monomeru (40 – 43) kDa. (3)

Patatin je v hlízách považován za zásobní bílkovinu s enzymatickou aktivitou. Konkrétně jde o nespecifickou aktivitu lipid acyl hydrolázy (esterázová aktivita), jak pro tvorbu voskových esterů, tak i pro deacylaci lipidů a také o aktivitu acyl transferázy. Později byla zjištěna homologie mezi patatinem a cytosolovou fosfolipázou A2 a zcela nedávno byla patatinu připsána aktivita  $\beta$ -1,3-glukanázy. Jeho další funkcí je zřejmě i zapojení do obranných mechanismů rostliny, což potvrzuje inhibiční efekt patatinu na růst larev, které jím byly krmené. Patatin má také významné antioxidační schopnosti, mezi antioxidačními látkami brambor je významem řazen na druhé místo za kyselinu L-askorbovou (1) a (3).

## 2.2 Elektroforetická metoda

Pro separaci bílkovinných markerů v bramborové hlíze se využívá metoda zónové vertikální elektroforézy na gelovém nosiči. Jedná se o chemicky inertní a mechanicky stabilní polyakrylamidový gel (PAGE), který vzniká polymerací (viz obr.1) 40% roztoku monomerního akrylamidu a 2% roztoku bis-akrylamidu jako tzv. cross-linkeru. Jeho úloha je vytvářet 3D mřížkovou strukturu s určitou velikostí pórů. Velikost pórů je dána hmotnostními procenty monomeru a cross-linkeru v roztoku v g/100ml (%T) a poměrem hmotnosti cross-linkeru a sumy hmotností monomeru a cross-linkeru (%C). Jestliže se zvyšuje %T a %C je konstantní, velikost pórů se zmenšuje. V případě konstantního %T a měnícího se %C bylo zjištěno, že velikost pórů je minimální v případě 5%C, při nižších a vyšších hodnotách %C se velikost pórů zvětšuje. Tato mřížková struktura gelu s definovanou velikostí pórů omezuje pohyb migrujících bílkovinných molekul a jejich schopnost projít těmito póry závisí na jejich velikosti a struktuře (7) a (5).



**Obr.1: Polymerizační reakce akrylamidu a bis-akrylamidu**

### 2.2.1 Pufry

Bílkoviny jsou amfoterní sloučeniny schopné nést jak kladný tak i záporný náboj. Většina jejich náboje pochází z ionizace karboxylových a aminových skupin a je závislá na pH okolního média (pufru) a na počtu a typu aminokyselin nesoucích tyto skupiny. Pro každou bílkovinu existuje určitá hodnota pH zvaná isoelektrický bod neboli pI, kdy její molekula nemá žádný náboj a je elektricky neutrální. Tato hodnota pI je pro každou bílkovinu specifická. V případě vyššího pH pufru než pI konkrétní bílkoviny platí, že tato bílkovina má záporný náboj a v elektrickém poli migruje ke kladné elektrodě (anodě) a u pH nižšího než pI bílkovinné molekuly dochází k jevu přesně opačnému. Při elektroforetické separaci bílkovin založené na jejich mobilitě je nutné udržovat konstantní pH roztoku a tím i jejich mobilitu. Jelikož se při elektrolýze vody generují  $H^+$  a  $OH^-$ , musí být roztok pufrován (4).

Elektrolytový pufr významně ovlivňuje průběh elektroforézy z hlediska nastavení elektrických podmínek, separace a rozlišení. Jeho výběr více závisí na druhu bílkoviny, kterou analyzujeme, než na konkrétních požadavcích elektroforézy.

Z hlediska složení gelového a elektrodového pufru jsou využívány v zásadě dva systémy

- tzv. **kontinuální pufrový systém**, používající stejný gelový i elektrodový pufr při konstantním pH. Obvykle je využíván pro koncentrace bílkovin 1 mg/ml a vyšší. Pro tento systém lze použít jakýkoli pufr od pH 3 do pH 10. Jako výhodné se jeví použití pufrů o nízké iontové síle kvůli minimalizaci produkce tepla. Příliš nízká iontová síla zase může způsobit určité shlukování bílkovin a nedostatečnou separaci. Obecně se koncentrace elektroforetických pufrů pohybuje od 0,01 M do 0,1 M. Mezi typické kontinuální pufrové systémy patří tris-glycin pH (8,3 – 9,5), tris- borát pH (8,3 – 9,3) a tris-octan pH (7,2 – 8,5).

Vzorky jsou aplikovány přímo na gel, na kterém probíhá frakcionace podle jejich mobility. Šířka pásů reprezentující jednotlivé bílkoviny je určena hlavně výškou aplikovaného objemu vzorku, což limituje rozlišení, kterého lze při kontinuální elektroforéze dosáhnout. Ředěné vzorky proto kvůli detekci vyžadují velké objemy, což má za následek relativně široké pásy a nízké rozlišení. Kontinuální systém je tedy spíše vymezen pro vysoce koncentrované vzorky a příliš se nehodí pro separaci bílkovin bramborové hlízy pro jejich nízkou koncentraci (4).

- široce rozšířený a oblíbený tzv. **diskontinuální pufrový systém**, vyvinutý v roce 1964 Ornsteinem a Davisem. Obecně byl navržen pro separaci s vysokým rozlišením a dobrou ostrotí jednotlivých bílkovinných pásů. Od kontinuálního systému se liší používáním různého gelového a elektrodového pufru. Pufry se liší složením a odlišným pH; gelový má složení tris-HCl a elektrodový tris-glycin s pH 8,3. Gel se skládá ze dvou částí- úzkého pásu tzv. zaostřovacího gelu (stacking gel) a širšího pásu, tzv. separačního gelu (separation nebo resolving gel). Zaostřovací gel má velké póry, pH gelového pufru je (6,7 – 6,8) a koncentrace iontů v tomto pufru je 0,125 M trisu. Separační gel má malé póry, pH pufru je (8,8 – 8,9) a koncentrace iontů 0,375 M trisu (4).

Vzorky jsou nejprve aplikovány na úzký pás tzv. zaostřovacího gelu s velkými póry, které způsobí to, že mobilita bílkovin je závislá na jejich výsledném náboji a ne na velikosti jejich molekul. Na tomto zaostřovacím gelu se bílkoviny, jejichž pI je menší než pH gelového pufru (6,7 – 6,8), koncentrují a zároveň rovnají (stack) do extrémně úzkých zón podle jejich klesající mobility a bez ohledu na množství dávkovaného vzorku. Zóna těchto bílkovin je

sevřena mezi vedoucí zónu chloridových iontů gelového pufru a koncovou zónu glycinových iontů elektrodového pufru. Tyto tři zóny pomalu migrují konstantní rychlostí k anodě a k rozhraní zaostřovacího a separačního gelu. Bílkoviny, jejichž pI je vyšší než pH gelového pufru, migrují ke katodě a pro analýzu jsou ztraceny. Při vstupu těchto tří zón na separační gel dojde k významnému zpomalení pohybu zóny bílkovin v důsledku malých pórů tohoto gelu. V ten okamžik dochází k ostrému nárůstu pH až na 9,5 následkem náhrady pufru tris-HCl za tris-glycin. Malé chloridové a glycinové ionty nejsou limitovány velikostí pórů, přičemž mobilita glycinových iontů se při pH 9,5 zvýší natolik, že se posunou za vedoucí zónu chloridových iontů, před zpomalující ionty bílkovin. Ty se začínají postupně separovat podle své individuální mobility závislé na jejich rostoucím náboji a velikosti molekuly, přičemž se původně velmi úzké pásy bílkovin ze zaostřujícího gelu pozvolna rozšiřují až na několik mm vlivem difúze a naředění (4).

### 2.2.2 Elektrické veličiny

Elektrické veličiny, které se uplatňují v elektroforéze, jsou elektrický proud  $I$  [A], napětí  $V$  [V], odpor  $R$  [ $\Sigma$ ] a výkon  $P$  [W]. Jejich vzájemný vztah je dán dvěma základními rovnicemi:

$$\mathbf{V} = \mathbf{I} \times \mathbf{R} \text{ (Ohmův zákon)}$$

a

$$\mathbf{P} = \mathbf{I} \times \mathbf{V} \text{ neboli } \mathbf{I}^2 \times \mathbf{R}$$

Hlavní hnací silou elektroforézy je síla elektrického pole, které je ustanoveno po aplikaci napětí v systému, přičemž rychlost molekuly je přímo úměrná okolnímu napěťovému gradientu. Platí, že čím vyšší je napětí, tím větší je síla elektrického pole vyjádřeného ve V/cm a rychlejší průběh elektroforézy. Toho lze využít v aplikacích s intenzivním působením difúze. Nevýhodou je velká produkce elektrické energie, která se mění v teplo. Aby nedošlo k destrukci analyzovaných bílkovin, je proto doporučováno používat chlazení elektroforetické komory. Chlazení také redukuje tzv. smiling efekt (zakřivení, prohnutí okrajů pásů jednotlivých bílkovin na elektroforegramu), který vzniká v důsledku různé mobility v gelu zapříčiněné špatným odvodem tepla. Efektivita chlazení ovšem není nekonečná, a proto by měl být výkon pomocí napěťového zdroje limitován. Na napěťovém zdroji lze nastavovat limity pro napětí, proud nebo



výkon. Během elektroforézy může být limitní a zároveň konstantní pouze jeden z těchto parametrů, který zároveň určuje hodnoty zbylých dvou parametrů. Vzájemné závislosti mezi těmito parametry jsou obsaženy ve výše uvedených dvou základních rovnicích. Výběr limitního parametru záleží na mnoha faktorech, hlavně ale na typu elektroforézy (kontinuální versus diskontinuální), na požadované době trvání běhu analýzy, na potřebě minimalizovat difuzi bílkovin atd. Pro dosažení co nejlepších výsledků s dobrou reprodukovatelností je výběr limitního parametru velmi důležitý (4) a (5).

Pro elektroforézu v **kontinuálním** a tudíž homogenním pufrovém systému (stejný gelový i elektrodový pufr) platí konstantní vodivost i odpor po celou dobu analýzy. Je-li vodivost (odpor) konstantní, pak podle výše uvedených rovnic bude napětí úměrné proudu a výkon se bude rovnat druhé mocnině proudu. Z toho vyplývá, že výsledek elektroforézy bude stejný bez ohledu na to, který z parametrů je zvolen konstantním. Z historických a praktických důvodů je k regulaci elektroforézy v homogenním pufru ve většině případů používáno napětí (4) a (5).

Pro systém tzv. **diskontinuální** elektroforézy obecně platí, že během analýzy stoupá odpor, ať již je nastaven konstantní proud nebo napětí. U vertikální elektroforézy používané při analýze bílkovin se síla elektrického pole pohybuje v rozmezí (10 – 20) V/cm nebo (15 – 25) mA/mm tloušťky gelu.

Při konstantním napětí klesá během analýzy proud, výkon a produkce tepla se zvyšujícím se odporem. To má ale za následek zpomalování separace a zhoršování náležitého rozlišení kvůli vzrůstu času a zvětšování difuze.

Limitní nastavení proudu jako konstanty se na první pohled jeví jako problematické hlavně kvůli vzrůstajícímu napětí, výkonu a následně i produkci tepla. Nicméně během diskontinuální elektroforézy není napětí rovnoměrně rozloženo po celém gelu, kde jsou oblasti s nízkou iontovou silou, která způsobuje intenzivní a silné elektrické pole. Prakticky to znamená, že napětí je rozprostřeno přes zvyšující se vzdálenost a tím je tolerován zvyšující se výkon. Toto je také důvod, proč je konstantní proud možné použít pro diskontinuální elektroforézu, nejlépe ovšem s účinným chlazením. Výhodou tohoto nastavení je krátký čas analýzy a eliminace působení difuze, což má za následek lepší rozlišení záznamu (4) a (5).

### **2.2.3 Zpracování a vyhodnocení elektroforegramů**

Poloha jednotlivých příčných pásů na elektroforegramu reprezentující jednotlivé bílkoviny nebo skupiny bílkovin je definována tzv. REM (relative mobility) jako poměr vzdálenosti pásu od startu k celkové vzdálenosti od startu do cíle analýzy. Každý pás má tedy svoji charakteristickou REM, která ho identifikuje (4).

V praxi ovšem dochází k posunu identických pásů a tím i samozřejmě ke změně jejich REM dokonce i v rámci jedné analýzy, kdy na jedné gelové desce probíhá současně analýza jedné odrůdy v několika opakováních, přičemž každý podélný sloupec na záznamu reprezentuje jedno opakování. Tyto změny REM identických pásů mohou způsobovat problémy v jejich jednoznačné identifikaci, zvláště v tom případě, kdy je několik pásů umístěno těsně vedle sebe. Z tohoto důvodu je problematická i identifikace jednotlivých odrůd, jejichž elektroforegramy jsou s příslušnými REM jednotlivých charakteristických pásů uloženy v elektronické databázi BIO-GENE.

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Metoda UPOV pro identifikaci bramborových odrůd pomocí bílkovinných markerů (6)**

#### **3.1.1 Princip metody**

Z hlíz se pomocí extrakčního pufru a odstředivky získá bílkovinný extrakt, který se přímo aplikuje na elektroforetický gel ve vertikální komoře zónové elektroforézy.

#### **3.1.2 Chemikálie**

Pokud není uvedeno jinak, jsou chemikálie elektroforetické čistoty nebo čistoty pro molekulární biologii.

#### **Pro přípravu bílkovinného extraktu**

- Amidočern 10 B,
- Siřičitan sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) p.a.,
- Disiřičitan sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) p.a.,
- Sacharoza p.a.

### **Pro elektroforézu**

- 40% roztok akrylamidu (toxická chemikálie s karcinogenním účinkem),
- 2% roztok bisakrylamidu,
- Peroxodisíran amonný  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (APS),
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS),
- Tetramethylethylenediamine (TEMED),
- Glycin,
- Sacharoza p.a.,
- Bromfenolová modř,
- Ethanol,
- Kyselina chlorovodíková p.a. HCl,
- Deionizovaná voda.

### **Pro vybarvování patatinu**

- Coomassie modř G 250,
- Coomassie modř R 250,
- Kyselina trichloroctová (TCA),
- Kyselina octová p.a.,
- Methanol p.a.,
- Glycerin p.a.,
- Deionizovaná voda.

### **3.1.3 Pístroje a pomůcky**

#### **Pro přípravu vzorku**

- Mrazák s nastavitelnou teplotou – 21 °C a nižší,
- Chlazená centrifuga (3000 otáček, 10 °C),
- Centrifugační zkumavky,
- Zkumavky Eppendorf,
- Pipety, špičky, odměrné baňky, kádinky, zkumavky.

### **Pro elektroforézu**

- Elektroforetická komora pro dva gely, vertikální systém, (OWL, model P9DS),
- Zařízení pro nalévání gelů, (OWL, model P9DS),
- Napěťový zdroj – EPS 610 (Amersham Pharmacia Biotech),
- Termostat s vnější cirkulací pro chlazení elektroforetické komory CTB06C (Labio),
- pH metr OP – 208/1 (Radelkis), elektroda, pufry,
- Analytické váhy,
- Lednice,
- Elektroforetická skla, sáčky na nalévání gelů,
- Mikropipeta na dávkování vzorků (10 µl),
- Pipety, špičky, kádinky, odměrné baňky,
- Spacery - tloušťka 1,5 mm; metoda UPOV uvádí tloušťku 1 mm až 1,5 mm,
- Hřebínky -15-ti jamkové, tloušťka 1,5 mm; metoda UPOV uvádí tloušťku 1 mm až 1,5 mm.

### **Pro vybarvování patatinu**

- Třepačka- kývačka Assistent,
- Misky na vybarvování gelů, misky na promývání gelů,
- Celofán, skla na sušení vzorků,
- Plastová lopatka na sundávání gelů.

### **Pro vyhodnocení vzorků**

- Fotodokumentační systém VILBER LOURMAT, model DP – 001.FDC,
- Počítač s programem BIO GENE,
- Diskety.

### 3.1.4 Příprava vzorku

#### Extrakční roztok A

- Siřičitan sodný  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  5,00 g;
- Disiřičitan sodný  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  3,75 g;
- Voda deionizovaná 100 ml.

Připravuje se denně čerstvý.

#### Extrakční roztok B

- Sacharoza 500 g;
- Amidočern 10 B 0,3 g;
- Voda deionizovaná doplnit do 1000 ml.

Uchovává se v chladničce při 6 °C .

#### Extrakční roztok C

- Extrakční roztok A 10 ml;
- Extrakční roztok B 100 ml.

Připravuje se denně čerstvý.

Jeden vzorek (tj. jedna odrůda) představuje 10 hlíz.

Omyté a osušené hlízy se nechají zmrazit na minus 20 °C. Po rozmrazení při pokojové teplotě se z nich do zkumavky vymačká 3,0 ml šťávy, přidá 0,8 ml extrakčního roztoku C, promíchá a dá odstředit do chlazené odstředivky (3000 otáček; 15 minut; 10 °C). Čistý připravený extrakt se přelije do zkumavek Eppendorf 1,5 ml a dá zamrazit minimálně na minus 21 °C nebo nižší.

### 3.1.5 Příprava pufrů, roztoků a gelů

Pro práci se používá dvouvrstvý gel (horní tzv. zaostřovací gel a dolní tzv. separační gel).

#### Zaostřovací gelový pufr

- TRIS 16,0 g;
- Bromfenolová modř 100 mg.

Rozpustí se v deionizované vodě, doplní na objem 1000 ml a upraví pH na 6,7 (HCl). Pufr se uchovává v lednici.

#### **Roztok pro přípravu zaostřovacího gelu**

- Zaostřovací pufr 280 ml;
- 40% roztok akrylamidu 45 ml;
- 2% roztok bisakrylamidu 73 ml;
- Deionizovaná voda 150 ml;
- Sacharoza 80 g.

Roztok se uchovává v lednici.

#### **Seperační gelový pufr**

- TRIS 75,4 g

Rozpustí se v deionizované vodě, doplní na 1000 ml a upraví pH na 8,9 (HCl). Pufr se uchovává v lednici.

#### **Elektrodový pufr**

- TRIS 5,2 g;
- Glycin 3,5 g.

Rozpustí se v deionizované vodě, doplní na objem 1000 ml, nechá vychladit v lednici. Pufr se připravuje denně čerstvý, dále se neředí. Metoda podle UPOV uvádí další 20ti násobné ředění.

#### **2% roztok peroxodisíranu amonného (APS)**

- APS 0,4 g

Rozpustí se v deionizované vodě, doplní na objem 20 ml. Roztok se připravuje denně čerstvý.

#### **Příprava separačního gelu (množství chemikálií odpovídá přípravě 2 gelů)**

V kádince nebo jiné vhodné nádobě se smíchají

- Separační gelový pufr 30 ml;
- 40% roztok akrylamidu 7 ml;
- 2% roztok bisakrylamidu 6,5 ml;

- Deionizovaná voda 7 ml.

Pak pomalu promícháme a přidáme

- TEMED 50  $\mu$ l;

- 2% roztok APS 3 ml.

Přídavek těchto chemikálií iniciuje polymerační reakci.

Mezi rovné a vykrojené sklo vložíme po stranách spacersy a celou sestavu vložíme do sáčku. V zařízení na odlévání gelů (caster) lze najednou připravit 1 až 4 gely o rozměrech cca 14 cm (šířka) a 1,5 cm (tloušťka).

Gel se opatrně nalije mezi skla asi 3 cm od horního okraje skla, přelije se 10% roztokem ethanolu. Doba polymerace je (15 – 25) minut při pokojové teplotě. V gelu se nesmí utvořit vzduchové bubliny. Potom se skla vyndají ze sáčku, očistí, slije se ethanol a povrch se opláchne deionizovanou vodou, osuší a upevní do elektroforetické komory.

### **Příprava zaostřovacího gelu (množství chemikálií odpovídá přípravě 2 gelů)**

V kádince nebo jiné vhodné nádobě se smíchají

- Roztok pro přípravu zaostřovacího gelu 15 ml;

- TEMED 60  $\mu$ l;

- 2% roztok APS 375  $\mu$ l.

Opatrně se zamíchá, nalije se na separační gel a velmi opatrně se zasune hřebínek. Mezi hřebínkem a separačním gelem musí zůstat asi 1,5 cm vrstva zaostřovacího gelu. Doba polymerace je (15 – 25) minut při laboratorní teplotě. Pak se hřebínek opatrně vyjme, jamky se naplní elektrodoým pufrem.

#### **3.1.6 Nanášení vzorků**

10  $\mu$ l rozmraženého extraktu vzorku se nanese mikropipetou do středu jamky naplněné elektrodoým pufrem. Množství vzorku závisí na šířce zubu hřebínku, která je přímo úměrná velikosti jamky vytvořené jeho otiskem v gelu. Metoda UPOV udává množství dávkovaného extraktu vzorku (3 – 6)  $\mu$ l v závislosti na velikosti hřebínkové jamky. Elektroforetická komora se naplní elektrodoým pufrem a uzavře.

### 3.1.7 Elektroforéza

Parametry nastavení vhodné pro tento typ elektroforézy

#### **Proud**

80 mA při zaostření; 160 mA pro rozdělení v separačním gelu pro 2 gely;

40 mA při zaostření; 80 mA pro rozdělení v separačním gelu pro 1 gel.

Platí pro gel o šířce 13,5 cm a tloušťce 1,5 mm.

Metoda UPOV uvádí 40 mA při zaostření; 80 mA pro rozdělení v separačním gelu pro 1 gel o šířce 11 cm a tloušťce 1 mm.

#### **Napětí**

300 V.

#### **Teplota**

(5 – 10) °C.

#### **Migrační pohyb**

Od katody (-) k anodě (+).

#### **Migrační vzdálenost**

Je 6 cm od rozhraní zaostřovacího a separačního gelu po směru migračního pohybu. Pro indikaci čela zóny a tím i pro sledování migračního pohybu používáme bromfenolovou modř přidávanou do zaostřovacího gelu.

### 3.1.8 Vybarvování patatinu

#### **Zásobní vybarvovací roztok**

- Coomassie modř G 250                    0,25 g;

- Coomassie modř R 250                    0,75 g.

Rozpusť se v deionizované vodě, doplní na objem 100 ml a hodinu třepe. Před použitím se dobře promíchá.



### **Vybarvovací roztok**

Ve vhodné nádobě (kádinka, erlenmyerova baňka atd.) se smíchají

- TCA 120 g;
- Kyselina octová 140 ml;
- Methanol 300 ml;
- Deionizovaná voda 1650 ml;
- Zásobní vybarvovací roztok 50 ml.

Gely se přenesou pomocí plastové lopatky do vybarvovacího roztoku (asi 300 ml), označí různým seříznutím rohu a nechají se 3 hodiny kývat na kývačce. Potom se nechají přes noc ve vybarvovacím roztoku bez kývání.

Pak se promývají na kývačce 2 × 30 minut ve vodě, potom 1 × 30 minut v 2% roztoku glycerinu. Nakonec se elektroforegramy vloží mezi celofán navlhčený 2% roztokem glycerinu a nechají se vyschnout na skleněné desce. Takto připravené jsou vhodné pro uskladnění a zdigitalizování pomocí dokumentačního systému.

### **3.1.9 Zpracování a vyhodnocení elektroforegramů**

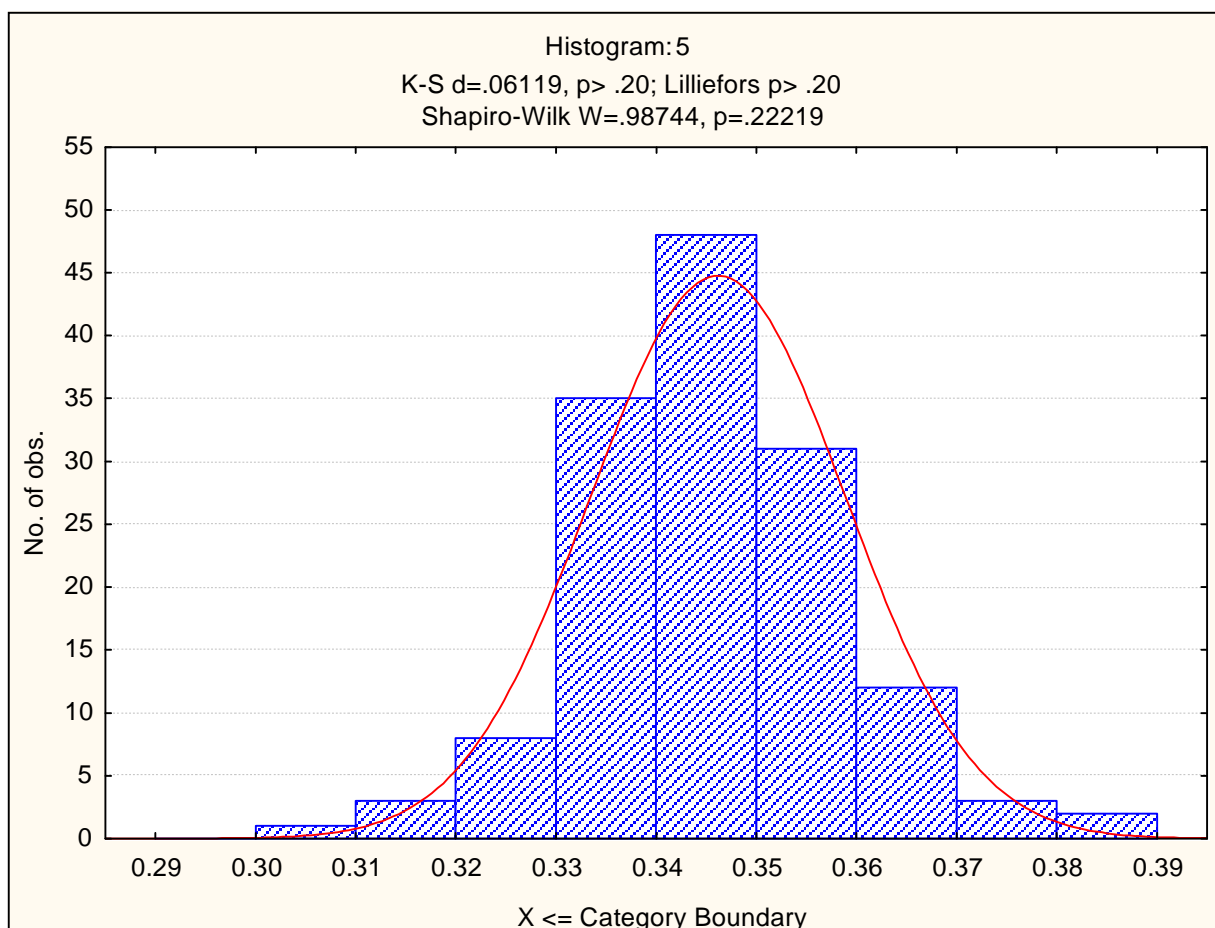
Optimalizovanou tzv. UPOV metodou byly získány elektroforegramy 143 odrůd brambor. Ke každé odrůdě byl přiřazen jeden sloupec (jedno opakování) odrůdy Solara, jako referenční vzorek, jehož získané a statisticky zpracované hodnoty REM 10 identifikovaných pásů se používají jako srovnávací pro výpočet hodnot REM reálných vzorků. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí software STATISTICA (NRL-OMB Brno), viz tab.1 a 2, obr. 2 a 3.

Z uvedených obrázků a tabulek vyplývá, že se jedná o normální a symetrická rozdělení, kde jako referenční hodnoty REM všech charakteristických pásů odrůdy Solara byly vzaty průměry jejich datových souborů (8).

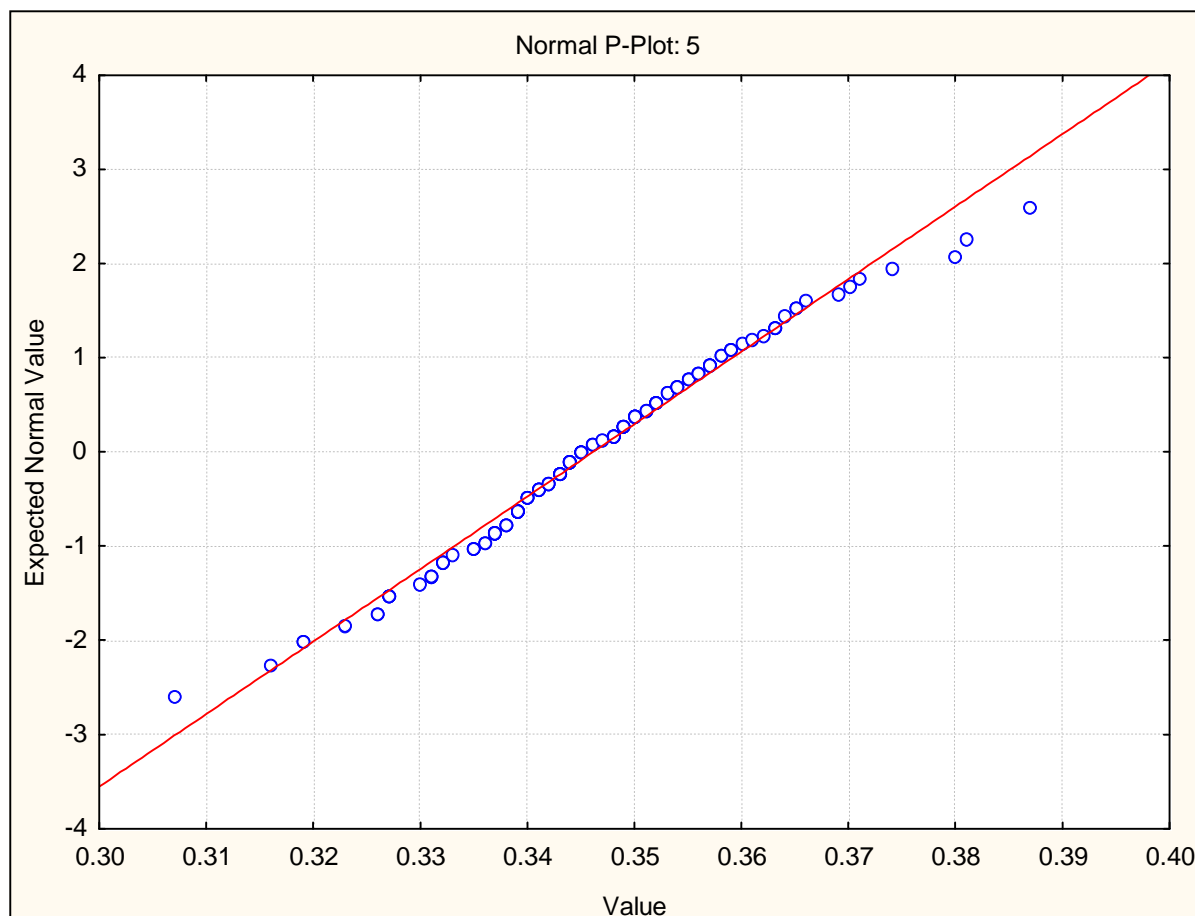
Extrakty vzorků odrůdy Solara ze sklizně 2004 byly zamraženy při – 25 °C a pak zpracovány přibližně v průběhu jednoho roku. Během této doby nebyly zaznamenány žádné změny v počtu, vzájemné poloze a šířce jednotlivých, charakteristických bílkovinných pásů.

0,371	0,342	0,35	0,338	0,333	0,35	0,343	0,338	0,352	0,344	0,342	0,344	0,343
0,346	0,354	0,344	0,343	0,35	0,356	0,331	0,34	0,339	0,332	0,357	0,364	0,357
0,349	0,345	0,355	0,352	0,339	0,344	0,348	0,327	0,316	0,332	0,327	0,348	0,332
0,354	0,357	0,34	0,366	0,369	0,343	0,35	0,353	0,335	0,327	0,348	0,331	0,38
0,345	0,348	0,339	0,326	0,354	0,337	0,332	0,343	0,336	0,351	0,343	0,353	0,335
0,358	0,349	0,336	0,337	0,345	0,359	0,356	0,36	0,344	0,339	0,363	0,348	0,327
0,339	0,354	0,356	0,343	0,339	0,352	0,374	0,349	0,341	0,351	0,338	0,381	0,34
0,341	0,363	0,355	0,33	0,339	0,355	0,363	0,352	0,352	0,337	0,359	0,365	0,337
0,319	0,341	0,34	0,337	0,331	0,357	0,359	0,349	0,307	0,339	0,387	0,362	0,342
0,339	0,352	0,363	0,345	0,347	0,370	0,344	0,323	0,346	0,352	0,365	0,319	0,339
0,349	0,341	0,35	0,361	0,345	0,326	0,345	0,346	0,335	0,349	0,358	0,343	0,343

**Tab.1: Hodnoty REM charakteristického pásu č. 5 referenčního vzorku (Solara) u 143 odrůd**



**Obr. 2: Průzkumová analýza hodnot REM pásu č. 5 - histogram**



**Obr. 3: Průzkumová analýza hodnot REM pásu č. 5 – Q-Q graf**

<b>Mean</b>	<b>0,346175</b>	Sum	49,50300	Range	0,080000
<b>Median</b>	<b>0,345000</b>	Minimum	0,307000	Quartile	0,015000
Geometric	0,345942	Maximum	0,387000	Variance	0,000162
Harmonic	0,345710	Lower	0,339000	Std.Dev.	0,012747
Confidence	0,344068	Upper	0,354000	Standard	0,001066
Mode	0,339000	Percentile	0,327000	Skewness	0,208355

**Tab. 2: Základní statistické charakteristiky souboru hodnot REM pásu č. 5**

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Změna koncentrace elektrodového pufru

Podle původní metody UPOV trvala analýza nestandardních čtyři a půl hodiny. Analýzou příčin tohoto problému byla jako kritický faktor vyhodnocena nízká iontová síla elektrodového pufru. V původní metodě je uvedeno jeho 20- ti násobné ředění. Ředění bylo postupně snižováno na 10 ×; 4 ×; 2 × a bez ředění. S vyšší koncentrací elektrodového pufru se zkracovala doba analýzy až na přijatelných cca 50 minut. Tohoto výsledku bylo dosaženo s neředěným puftrem.

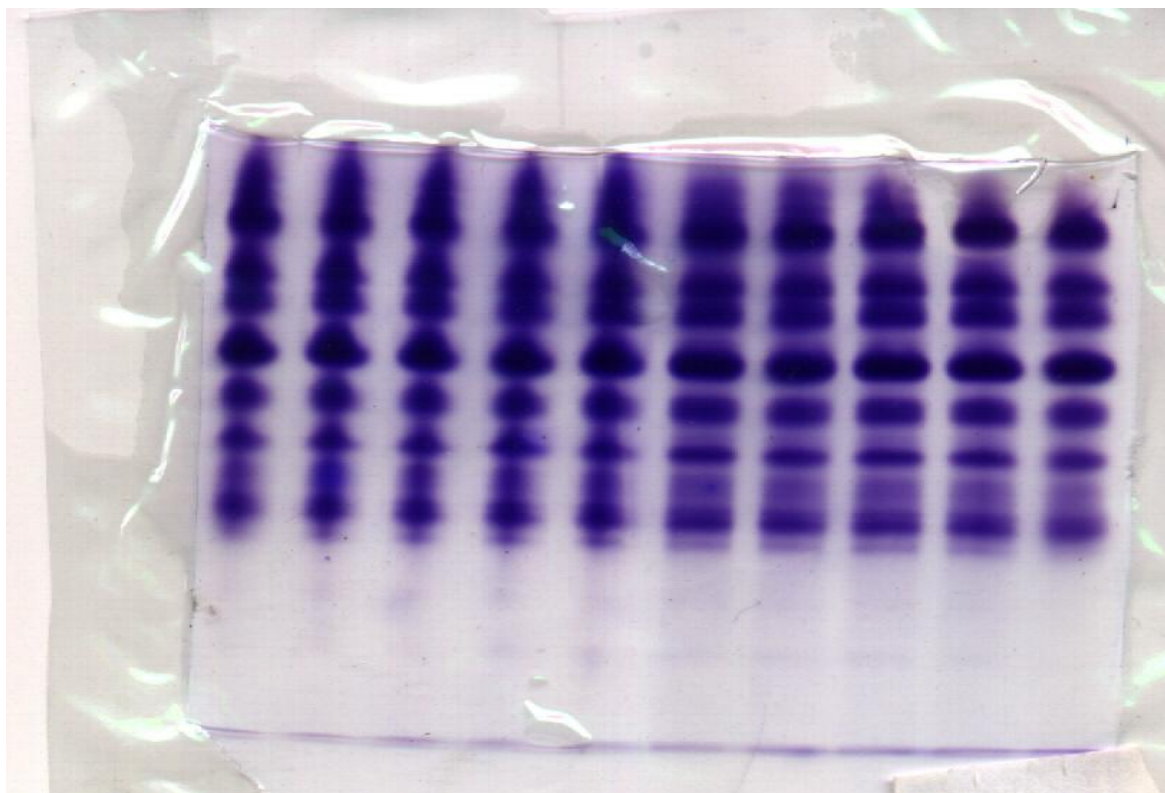
Úroveň ředění neměla žádný podstatný vliv na kvalitu záznamů, které se z hlediska rozdělení a rozlišení jednotlivých pásů jevily jako identické.

Nevýhodou ředěných pufrů s menší iontovou silou je i pokles proudu během analýzy v tzv. zaostřovacím pufru pod nastavenou limitní hodnotu při současném vzrůstu napětí až na nastavený limit, který se pak stává konstantním. Je proto nutné snižovat limitní hodnoty nastaveného proudu, což má za následek neúměrné prodlužování doby analýzy.

### 4.2 Nanášení vzorků

Předchozím optimalizačním krokem, kdy elektrodový pufr nebyl ředěn, bylo sice dosaženo přijatelné doby analýzy, ale nezměnila se kvalita záznamu. Dále měl špatné rozlišení, okraje pásů byly neostré, rozpité a mnohdy nikoli ve tvaru pásu, ale kapky. Pásky spolu v některých případech splývaly (viz. obr. 4) a byly proto velmi obtížně vyhodnotitelné.

Za hlavní příčinu tohoto problému byl určen nevhodný způsob dávkování. Původně byl vzorek špičkou pipety nanesen do horní části tzv. jamky vytvořené v gelu hřebínkem a naplněn elektrodovým puftrem. Nedochovalo tak k dokonalému a rovnoměrnému rozptýlení vzorku v celém prostoru jamky (zejména u dna) a jeho následné snadné penetraci gelu, ale spíše jen v horní části jamky. Dávkování bylo proto pozměněno tak, že špička mikropipety byla zasunuta až ke středu dna jamky a pak vzorek vypuštěn. Ten se pak podstatně lépe a rovnoměrněji rozptýlil v celém prostoru jamky. Kvalita záznamů, především rozlišení jednotlivých pásů, se výrazně zlepšila. Takto dávkované vzorky již tvořily čárové popř. obdélníkové pásy (podle množství bílkovin) – viz. obr. 4.



**Obr. 4: Prvních 5 sloupců zleva – původní způsob dávkování vzorku**

**6 – 10 sloupec zleva – optimalizovaný způsob dávkování vzorku**

Dalším optimalizačním krokem při nanášení vzorků bylo jejich dávkované množství v podobě extraktu. Množství dávkovaného extraktu závisí na velikosti jamky, jejíž velikost určuje šířka zubu hřebínku a jeho tloušťka. V naší aplikaci byl použit 15 jamkový (zubový) hřebínek o tloušťce 1,5 mm a šířce zubu 6 mm.

Nejdříve bylo vyzkoušeno nanášení malých množství extraktu dle metody UPOV, tj. (3; 4; 5)  $\mu\text{l}$ . Docházelo k tomu, že bílkovinné pásy na elektroforegamu u jednotlivých opakování vzorku nepokrývaly celou šířku sloupce danou šířkou zubu hřebínku (6 mm). Při nanášení větších množství extraktu- postupně (6; 8; 10; 12; 14)  $\mu\text{l}$ , bylo ze záznamů vizuálně zjištěno, že optimální objem extraktu pro velikost naší jamky byl (8 – 10)  $\mu\text{l}$ . Při objemech vyšších než 10  $\mu\text{l}$  byly pásy příliš široké, některé se dokonce překrývaly a záznam byl hůře čitelný. Bylo tzv. předávkováno.

Metoda UPOV uvádí používat gel o tloušťce (1 – 1,5) mm. Tento rozměr je určen tloušťkou tzv. spaceru, který se vkládá mezi dvě elektroforetická skla v zařízení na odlévání gelů (caster).

Byly vyzkoušeny dvě varianty síly gelu, tj. 1 mm a 1,5 mm. Jednomilimetrové gely se při jakékoli manipulaci velice snadno trhaly a tím se staly prakticky nevyhodnotitelnými. U gelů síly 1,5 mm se problémy s jejich poškozením při manipulaci vyskytly jen ojediněle.

### 4.3 Elektrické veličiny

Metoda UPOV udává tyto elektrické podmínky platné pro jeden gel o šířce 11 cm a tloušťce 1 mm

- Konstantní proud 40 mA pro zaostřovací gel;
- 80 mA pro separační gel;
- Nastavení napětí na 300 V;
- Nastavení výkonu na 100 W.

Za těchto podmínek dochází ve fázi zaostřovacího gelu k nárůstu výkonu, vyšší produkci tepla a zvyšování napětí. Se vzrůstajícím napětím stoupá i intenzita elektrického pole a tím i rychlost pohybu molekul. Analýza má rychlejší průběh a je eliminován vliv případné difuze. Ve fázi separačního gelu dochází zvýšením hodnoty proudu na dvojnásobek (80 mA) k tomu, že limitní konstantou je napětí a naopak proměnnou proud. Za těchto podmínek dochází k poklesu proudu a poklesu výkonu. Následkem je zpomalování pohybu molekul a tím i separace jednotlivých bílkovin. Zvětšuje se vliv difuze a zároveň i zhoršuje rozlišení jednotlivých bílkovinných pásů.

Bylo potřeba ověřit nastavení elektrických podmínek zejména z důvodu používání elektroforetické desky s většími rozměry gelu- šířka 13,5 cm a tloušťka 1,5 cm. Větší rozměry gelu by logicky vyžadovaly nastavení vyšších hodnot elektrických veličin tak, aby byly dostatečné na generaci elektrického pole v rozmezí (10 – 20) V/cm šířky gelu nebo (15 -25) mA/mm tloušťky gelu tak, jak je uvedeno v kapitole 2.2.2. (Teoretická část, Elektrické veličiny). Dále bylo potřeba ověřit, zda při použití doporučených hodnot elektrických veličin v metodě UPOV nedochází na tomto větším gelu k přílišnému zpomalování separace, zvětšování vlivu difuze a tím nedostatečnému rozlišení v separačním gelu.

V práci bylo vyzkoušeno nastavení limitních hodnot proudu v zaostřovacím gelu na (35; 40; 45; 50) mA, přičemž pro separační gel byly použity dvojnásobné hodnoty (70; 80; 90; 100) mA. V druhé fázi, na separačním gelu, je konstantním faktorem napětí a nastavených hodnot el. proudu (70; 80; 90; 100) mA se nedosáhne. Docházelo shodně ve všech případech k jeho poklesu

na hodnoty (30 – 40) mA. Bylo zjištěno, že nastavené hodnoty elektrického proudu v zaostřovacím gelu i separačním gelu neměly podstatný vliv na kvalitu záznamu (rozlišení, tvar a ostrost okrajů pásů), separace se nijak významně nezpomalovala a nezvětšoval se vliv difuze. Doporučené hodnoty UPOV metody platné pro 11 cm široký a 1 mm silný gel byly tedy akceptovatelné i pro námi používaný gel o rozměrech 13,5 cm šířky a 1,5 mm tloušťky.

#### **4.4 Tvorba databáze**

Při tvorbě databáze se ukázaly dva zásadní problémy. Prvním byla neexistence komerčně dostupného referenčního materiálu s deklarovanými hodnotami REM pásů bílkovinných markerů odrůd brambor. Druhým problémem byla velká variabilita (viz. Teoretická část, 2.2.3 Zpracování a vyhodnocení elektroforegramů) těchto hodnot, ať už za podmínek opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti, která prakticky znemožňovala jejich jednoznačnou identifikaci pomocí databáze.

Tato variabilita REM hodnot je dána mnoha faktory, ať už se jedná o podmínky v rámci jedné analýzy, kdy jsou paralelně analyzovány dva gely v elektroforetické komoře nebo analýzy za podmínek reprodukovatelnosti s větším časovým odstupem. Některé lze identifikovat (např. ne zcela shodná výška separačního gelu při nalévání v každé analýze; nestejná výška zaostřovacího gelu po zasunutí hřebínku – pouze vizuální kontrola; přepínání chodu elektroforézy z elektr. parametrů pro zaostřovací gel na parametry pro separační gel; konec analýzy – ne přesně stejná doba pro přepnutí resp. vypnutí obou gelů; nezřetelně ohraničený začátek analýzy při odstraňování zaostřovacího gelu před vybarvováním záznamu; možnost různého zasíťování čerstvě připravovaných gelů a z toho vyplývající i určitá variabilita elektrických parametrů atd.). Tyto faktory nelze zásadně eliminovat. Jsou dány podstatou a způsobem provedení metody zónové elektroforézy. Jejich vliv na variabilitu REM hodnot lze jen redukovat rutinním prováděním analýz s vysokou precizností.

Bylo potřeba docílit konstantních hodnot REM bílkovinných pásů pro zanesení do databáze. Podstata řešení spočívala v paralelní analýze tzv. kontrolního nebo referenčního vzorku, který byl nanesen v jednom nebo několika opakováních na gelovou desku s reálným vzorkem jedné odrůdy. Při velkém počtu odrůd se získá i dostatečný počet REM hodnot každého pásu referenčního vzorku pro statistické zpracování, jehož výsledkem je referenční vzorek s pevně

danými hodnotami REM pro každý pás. Celkem byly provedeny 143 analýzy referenčního vzorku, které byly statisticky zpracovány (viz. Experimentální část, 3.1.9 Zpracování a vyhodnocení elektroforegramů). Při vyhodnocování reálných vzorků jsou tyto hodnoty REM referenčního vzorku brány jako srovnávací, podle nichž software vypočte hodnoty REM reálného vzorku, přičemž nezáleží na tom, jakou hodnotu má REM každého pásu odrůdy v této nebo jiné následné analýze. Je tak zajištěna neměnnost těchto dat v databázi pro každý pás každé odrůdy a vyloučen vliv jejich špatné opakovatelnosti i reprodukovatelnosti. Uložení takovýchto REM hodnot do databáze umožňuje identifikaci odrůd.

Pro správné a reprodukovatelné vyhodnocení elektroforegramu je důležité určení startu a konce analýzy. Jak již bylo řečeno, z poměru vzdálenosti (pás – start) : (start – konec) analýzy je pomocí software vypočtena hodnota REM každého pásu. Podle určení startu a cíle byla vypočítána hodnota REM.

Jako dostatečně reprodukovatelný a vhodný způsob určení startu a konce analýzy bylo zvoleno hodnocení podle první a poslední barevné stopy, kterou vzorek zanechal na záznamu a která je viditelná až po vybarvení vzorku ve vybarvovacím roztoku.

## **5 Závěr**

Pro optimalizaci původní UPOV metody vzhledem ke kvalitě elektroforegramu byla změněna koncentrace elektrodového pufru a byl změněn způsob dávkování vzorku. Byla optimalizována velikost (tloušťka) gelu a množství nanášeného vzorku vzhledem k používanému zařízení. Nakonec byl ověřen vliv různého nastavení elektrických veličin na průběh analýzy a kvalitu záznamu vzhledem k rozměrům gelu.

Statistickým zpracováním dostatečného množství analýz byly získány hodnoty REM bílkovinných pásů u vybrané referenční odrůdy Solara. Tyto její neměnné hodnoty slouží k přiřazování a výpočtu REM pásů reálných vzorků odrůd brambor pomocí software BIO-GENE. Za těchto podmínek byla vytvořena elektronická databáze v tuzemsku registrovaných odrůd brambor pro jejich identifikaci.



Původní výchozí metoda UPOV byla optimalizována na podmínky naší laboratoře a přístrojové vybavení s cílem maximalizace kvality elektroforetického záznamu. Z takto vytvořených záznamů jednotlivých odrůd brambor byla vytvořena databáze pomocí software BIO-GENE.

## **6 Literatura**

1. Bradová J., Sýkorová M., Šašek A: Charakterizace vybraných registrovaných odrůd obilovin a brambor pomocí bílkovinných genetických markerů; seminář „Kvalita rostlinné produkce: současnost a perspektivy směrem k EU; VÚRV Praha, únor **2003**.
2. Sýkorová S.: Kontrola odrůdové deklarace - nástroj pro ochranu spotřebitele, Úroda 2/**2002**.
3. Bárta J., Čurn V.: Bílkoviny bramborových hlíz – jejich význam a využití, seminář Kvalita rostlinné produkce: současnost a perspektivy směrem k EU, VÚRV, Praha, únor **2003**.
4. Garfin D.E: Electrophoretic Methods, firemní literatura firmy BIO-RAD, Academic Press and Hartcourt Science and Technology Company, **2000**.
5. Protein Electrophoresis – application guide of Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA.
6. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability-document TG/23/6 (proj.1), Technical Working Party for Agricultural Crops of UPOV, Rio de Janeiro, Brazil, September 23 – 27, **2002**.
7. Westermeier R.: Electrophoresis in Practice – A guide to methods and applications of DNA and protein separations, third edition, WILEY-VCH Verlag GmbH, FRG, **2001**.
8. Meloun M., Militký J.: Kompendium statistického zpracování dat, Academia, **2002**.

# Částečná validace dalších detekčních metod geneticky modifikovaných organismů (GMO)

*Judita Kopotová, Miroslava Suchomelová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř - Oddělení mikrobiologie a biochemie, Brno  
[judita.kopotova@ukzuz.cz](mailto:judita.kopotova@ukzuz.cz)

## 1 Cíl práce

1. Pomocí zavedeného způsobu detekce GMO, který je popsán v Jednotném pracovním postupu „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“ - dále JPP, validovat detekce dalších modifikací, zavedených v roce 2005.
2. Doplnit již validované stanovení přítomnosti vira CaMV ve vzorcích řepky a ověření, zda tato reakce skutečně rozlišuje mezi promotorem CaMV řepky transgenní a promotorem CaMV infikované tímto virem.

## 2 Úvod

V roce 2004 a 2005 byla nově zavedena detekce Roundup-Ready kukuřic (modifikace NK603 a GA21), kukuřice Liberty (modifikace T25) a Roundup-Ready řepky (modifikace GT73). U těchto nových detekcí bylo třeba stanovit limit detekce (LOD), nebo spíše – s ohledem na používané referenční materiály – ověřit schopnost zavedené metody a používaných PCR primerů pozitivně detekovat 0,1 % geneticky modifikovaného materiálu v 99,9 % materiálu nemodifikovaného. S použitím certifikovaného referenčního materiálu byla vyzkoušena amplifikace DNA pomocí univerzálního PCR kitu a v něm popsaného protokolu v kombinaci s primery známými z materiálů CRL EU (Centrální kontrolní laboratoř Evropské unie). Primery vybrané z těchto materiálů již prošly validačními studii v laboratořích členských zemí EU a dosáhly požadovaného LOD 0,1 %. Bylo tedy ověřeno jeho dosažení i v laboratoři ÚKZÚZ u modifikací NK603, GA21 a GT73. V případě kukuřice Liberty T25, kde z důvodu dostupnosti CRM byl použit plazmid s naklonovanou sekvencí specifickou pro tuto modifikaci, nebylo

možno ověřit LOD tímto způsobem. Byla však zjištěna co nejmenší koncentrace tohoto plazmidu použitelná pro PCR v našich podmínkách.

Stanovení přítomnosti vira CaMV ve vzorcích řepky bylo převzato v roce 2003 z odborné literatury (5); jeho limit detekce byl ověřen v r. 2004. Toto stanovení se běžně provádí u vzorků řepky, u nichž byla detekována přítomnost promotoru 35 S CaMV, pro rozlišení původu tohoto promotoru (infekcí nebo transgenozí). U používaných IRM, které jsou z hlediska genetických modifikací (GM) buď negativní nebo pozitivní, se ale při zkouškách- po elektroforetickém zpracování produktů PCR v gelu- objevovaly slabší pruhy nasvědčující pozitivitě na vir CaMV. Proto bylo třeba přezkoumat tyto referenční materiály a zjistit, zda je tato slabá pozitivita důsledkem jejich přirozené infekce virem CaMV, nebo zda tato PCR (zvláště používané primery) není pro rozlišení původu promotoru 35 S zcela spolehlivá.

### **3 Materiál a metody**

Základem těchto molekulárně diagnostických metod je

1. izolace DNA ze vzorku,
2. amplifikace DNA pomocí PCR,
3. vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Výsledky se vyhodnocují za použití systému kontrol CRM, IRM.

#### **3.1 Přístroje a zařízení**

Jedná se o zařízení potřebná k provedení izolace DNA, k PCR a k elektroforetickému vyhodnocení produktů PCR. Jsou podrobně popsána v JPP ÚKZÚZ - „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“. Používaný termální cykler je gradientový PCR Express firmy Hybaid (UK).

#### **3.2 Chemikálie a roztoky**

Používá se jeden kit pro izolaci DNA z rostlinného materiálu: GenElute<sup>TM</sup> Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) a dva univerzální kity pro PCR:

REDTaq<sup>TM</sup> ReadyMix<sup>TM</sup> PCR Reaction Mix

a

REDExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich). Přesné chemické složení jednotlivých

reagencií nejsou výrobcem kitů uvedeny. Kity jsou dále popsány v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“. Dále budou uvedené kity označeny zkratkami GenElut“, REDTaq a REDEx.

Pro 1. část – ověření LOD u nově zavedených detekcí – byl použit kit GenElute k izolaci DNA a kit REDTaq pro PCR.

Pro 2. část – přezkoumání stanovení CaMV – byl pro PCR použit kit REDEx. Pro izolaci DNA, kromě kitu GenElute, byla použita i extrakční část kitu REDEx (pufry Extraction Solution a Dilution Solution), která se pro běžné akreditované zkoušky nepoužívá. Tj. byly použity i starší extrakty DNA, tzv. Leaf Extracts (LE), které byly vyizolovány extrakční částí kitu REDEx.

### 3.2.1 Směs pro PCR

Přípravu reakční směsi pro PCR udávají následující dvě tabulky zpracované dle pokynů výrobce k použití kitu.

**Tabulka č. 1: Příprava PCR, kit REDTaq**

Složka	1 reakce [μl]	5 reakcí [μl]	10 reakcí [μl]	20 reakcí [μl]
H <sub>2</sub> O	18	90	180	360
REDTaq	25	125	250	500
Specifický amplifikační primer F	1	5	10	20
Specifický amplifikační primer R	1	5	10	20
Reakční směs bez templátu	45	225	450	900
Templát (izolát DNA)	1×5	5×5	10×5	20×5
Reakční směs včetně templátu	50	250	500	1000

**Tabulka č. 2: Příprava PCR, kit REDEx**

Složka	1 reakce [μl]	5 reakcí [μl]	10 reakcí [μl]	20 reakcí [μl]
H <sub>2</sub> O	4,4	22	44	88
REDEx	10	50	100	200
1. pár primerů, primer CRT F	0,4	2	4	8
1. pár primerů, primer CRT R	0,4	2	4	8
2. pár primerů, primer CaMV 1	0,4	2	4	8

Složka	1 reakce [μl]	5 reakcí [μl]	10 reakcí [μl]	20 reakcí [μl]
<b>2. pár primerů, primer CaMV 2</b>	0,4	2	4	8
<b>Reakční směs bez templátu</b>	16	80	160	320
<b>Templát LE nebo DE</b>	1×4	5×4	10×4	20×4
<b>Rreakční směs včetně templátu</b>	20	100	200	400

Legenda k tabulce č. 2

LE je DNA rozpuštěná v pufru, který je součástí extrakční části kitu REDEx.

DE je DNA izolovaná pomocí GenElute a dále zředěná 1 : 1 ve směsi dvou pufrů.

### 3.2.2 Charakteristika specifických amplifikačních primerů

Názvy a sekvence použitých primerů a specifikaci amplifikovaných oblastí udávají následující tabulky č. 3 a 4. Číslo v tabulce ve sloupci „amplikon“ odkazuje na citaci z literatury nebo internetové stránky, na konci této práce, odkud byly přejaty použité sekvence primerů.

### 3.2.3 Pozitivní a negativní standardy (referenční materiály - RM)

1. část - ověření LOD u nově zavedených detekcí

Jako negativní kontrola (s nulovým obsahem dané genetické modifikace nebo pod limitem detekce) byla použita kukuřičná DNA izolovaná z tzv. „Maize Internal Control“ (referenční materiál z kitu firmy Biotools Madrid).

Jako pozitivní kontroly byly použity CRM, jak udává tabulka č. 5.

2. část - přezkoumání stanovení CaMV

Jako negativní kontrola byla použita řepková DNA izolovaná ze semen nebo listů odrůd PAU C 911 (IRM 2/2001), EGG 051 (IRM 3/2001), DS 29 206 (IRM 4/2001) a SG-C 105 (IRM 5/2001). Dále byla použita DNA izolovaná ze semen nebo listů odrůd GM řepky PHW-01-429 (IRM 6/2001), PHW-01-439 (IRM 7/2001) a PHW-01-440 (IRM 8/2001) – a to jako 0,1% nebo 1% příměs v DNA řepky nemodifikované.

*Poznámka 1: Je žádoucí, aby všechny zde uvedené nemodifikované řepky byly při PCR identifikaci vira CaMV detekovány negativně, aby mohly i v této reakci sloužit jako negativní kontrola. Dále se předpokládalo, že uvedené geneticky modifikované řepky by měly být v PCR identifikaci vira CaMV detekovány také negativně – jinak by tato zkouška principiálně neměla smysl.*

Jako pozitivní kontrola byl použit referenční materiál „CaMV Positive Control“ č. 07086 z kitu od Loewe Biochemica GmbH na stanovení přítomnosti tohoto viru metodou ELISA. Tento RM byl zakoupen v podobě lyofilizátu nemodifikované řepky infikované virem CaMV. Z tohoto lyofilizátu byla izolována DNA, která obsahuje i DNA uvedeného vira. Již v roce 2004 bylo ověřeno, že takto získaná DNA je dobrou pozitivní kontrolou pro PCR detekci vira CaMV i zředěná až  $10^{-6}$ , případně i více.

#### **3.2.4. Chemikálie (nedodávané v rámci uvedených kitů)**

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo označené „pro molekulární biologii“.

1. Agaróza pro molekulární biologii (A-5093 Sigma, pro rutinní použití) – pro elektroforézu,
2. Denaturovaný ethanol – pouze do stříček pro čištění povrchů,
3. 95 % ethanol pro ředění „Wash Solution“ při izolaci DNA,
4. Ethidiumbromid – zásobní a pracovní roztok (Merck, 1%) – pro elektroforézu,
5. Elektroforetický marker pro amplifikáty (GeneRuler 50bp DNA Ladder SMO373 Fermentas, uchovává se ve zkumavkách po cca 20 $\mu$ l),
6. Ribonukleáza A (ENO 531 Fermentas)
7. Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE (Sigma)
  - Na<sub>2</sub>EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové)
  - Trizma base [tris-(hydroxymethyl)aminomethan]
  - Ledová kyselina octová

**Tabulka č. 3: Používané primery (pro 1. část, kit REDTaq)**

Amplikon	Délka [bp]	Název primerů	Sekvence primerů	Specifikace amplikonu	LOD
<b>Specifický pro Roundup Ready kukuřici NK603 (1)</b>	108	NK603 primer1 NK603 primer2	5'- CCATATTGACCATCA TACTCATTGCT-3'	Přesah z 3' konce GM inzeru do rostlinné DNA	0,1%
			5'- GCTTATACGAAGGCA AGAAAAGGA-3'		
<b>Specifický pro Roundup Ready kukuřici GA21 (2)</b>	270	GA21 1-5' GA21 1-3'	5'- ACGGTGGAAGAGTTC AATGTATG-3'	Přesah z OTP (enhancer) do m-epsps (modifikovaný epsps)	0,1%
			5'- TCTCCTTGATGGGCT GCA-3'		
<b>Specifický pro kukuřici T25 (3)</b>	149	T25 1-5' T25 1-3'	5'- GCCAGTTAGGCCAGT TACCCA-3'	Přesah ze sekvence transgenu pat do 35S terminátoru	500×
			5'- TGAGCGAAACCCTAT AAGAACCCT-3'		
<b>Specifický pro Roundup Ready řepku GT73 (4)</b>	108	GT73 primer1 GT73 primer2	5'- CCATATTGACCATCA TACTCATTGCT-3'	Přesah z 3' konce GM inzeru do rostlinné DNA	≤0,1%
			5'- GCTTATACGAAGGCA AGAAAAGGA-3'		

**Tabulka č. 4: Používané primery (pro 2. část, kit REDEX)**

Amplikon	Délka [bp]	Název primerů	Sekvence primerů	Specifikace amplikonu	LOD
Specifický pro vira CaMV (5)	191	CRT F CRT R	5'- CCAGAAGAACATTG GGTCAATGC-3'	Překryv sekvence promotoru 35 S a ORF V (reverse transcriptase gene)	10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-7</sup> ředění pozitivní kontroly CaMV
			5'- ATAGCTGACAGAAG TTGTTGCCG-3'		
Specifický pro vira CaMV (5)	383	CaMV 1 CaMV 2	5'- GCGTAYACAACAA GTCAGCAAACA-3'	Překryv sekvence promotoru 35 S a ORF VI (inclusion body matrix protein)	
			5'- TCCTGGAGATTATT ACTCGGGTAG-3'		

**Tabulka č. 5: Pozitivní kontroly pro ověření LOD**

Ověření LOD dané PCR u GM plodiny	CRM	Obsah GM	Původ CRM
<b>Kukuřice NK603</b>	Kukuřičná mouka ERM BF415b (IRMM 415-1) - z ní byla izolována DNA	0,1%	IRMM Geel, Belgie
<b>Kukuřice GA21</b>	Kukuřičná mouka ERM BF414b (IRMM 414-1) - z ní byla izolována DNA	0,1%	IRMM Geel, Belgie
<b>Kukuřice T25</b>	Plazmid Mu15 s naklonovanou sekvencí specifickou pro GM kukuřici T25, kódové číslo 314-04811	Koncentrace plazmidu 0,3 pg/2,5 µl; 1 kopie T25 specifické sekvence na 1 molekulu plazmidu	Nippon Gene Co., Ltd., Japonsko; distributor pro Evropu: firma Diagenode, Belgie
<b>Řepka GT73</b>	DNA řepky GT73 ze setu: GMO Standard Set for Rape-seed, IRMM 55231-1KT-F	1% - použito ředění 10 ×	IRMM Geel, Belgie



### **3.3 Vzorky**

Detekce byly ověřovány s použitím uvedených CRM - neboť mají deklarovaný obsah GM – a uvedených IRM. Zavedené detekce jsou aplikovány na tyto analyzované vzorky

1. vzorky kukuřice, u nichž byla detekována přítomnost p-35 S a t-NOS,
2. všechny vzorky řepky, u nichž byla detekována přítomnost promotoru 35 S.

### **3.4 Pracovní postupy**

#### **3.4.1 Izolace rostlinné DNA**

Navážka mletého vzorku (mouky) jako výchozího materiálu pro izolaci DNA u CRM kukuřic NK603 a GA21 byla dvakrát po 60 mg. DNA byla izolována kitem GenElute, jak je popsáno v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“ a v manuálu kitu.

U kukuřice T25 byl vzorkem uvedený plazmid, u řepky GT73 izolovaná genomová DNA.

Pro ověření detekce CaMV byly použity rovněž izoláty DNA dle JPP (kit GenElute), nebo extrakty DNA získané extrakční částí kitu REDEx. Tato extrakce zahrnuje vnesení 0,5 cm-0,7 cm kroužku z listu nebo 1 klíčící rostlinky do 100 µl Extraction Solution, promíchání, inkubaci 10 min při 95 °C, přidání 100 µl Dilution Solution a opětné promíchání. Extrakt – tzv. „Leaf Extract“ - lze dále použít pro PCR amplifikační částí tohoto kitu bez další purifikace DNA.

#### **3.4.2 Polymerázová řetězová reakce PCR**

Příprava reakční směsi je přesně popsána v manuálech uvedených kitů a v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“.

##### **1. Ověření LOD u GM kukuřic NK603 a GA21**

DNA byla podrobena PCR druhově specifického genu (ověření amplifikovatelnosti PCR), dále screeningu na přítomnost promotoru 35 S CaMV a terminátoru NOS *Agrobacterium tumefaciens* a poté identifikací konkrétních modifikací NK603 a GA21.

##### **2. Ověření LOD u GM kukuřice T25**

DNA uvedeného kontrolního plazmidu byla použita jen k PCR identifikaci modifikace T25. Další

sekvence, vyskytující se u kukuřice T25, tento plazmid neobsahuje. Místo 5  $\mu$ l izolátu genomové DNA zde bylo použito 5  $\mu$ l plazmidové DNA v různých zkoumaných ředěních.

### 3. Ověření LOD u GM řepky GT73

DNA této řepky - certifikovaný referenční materiál (IRMM 55231-1KT-F ) s certifikovaným obsahem 1 % GT73 - byla dále ředěna v PCR vodě nebo v DNA izolované z uvedené nemodifikované řepky (viz kap. 3.2.3., 2. část).

### 4. Přezkoumání stanovení CaMV

DNA pro PCR kitem REDEx byla buď získána jako Leaf Extract - LE, nebo vyizolována kitem GenElute a pak zředěna ve směsi pufrů (Extraction Solution : Dilution Solution) (1 : 1), jak je popsáno v JPP, – zde je označena ED.

Amplifikační programy vytvořené pro termální cykler PCR Express a pro uvedené amplifikační kity udává tabulka č. 6.

**Tabulka č. 6: Amplifikační programy použité pro validace**

Název programu	Délka amplikonu [bp]	Amplifikační kit	Teplota	Čas	Počet cyklů	Poznámky
<b>C:14 NK603</b>	108	REDTaq	94	1 min 0 s	1	Identifikace modifikace Roundup-Ready kukuřice NK603
			94	0 min 58 s		
			60	2 min 0 s	40	
			72	1 min 5 s		
			72	3 min 0 s	1	
<b>C:21 GA21</b>	270	REDTaq	94	1 min 0 s	1	Identifikace modifikace Roundup-Ready kukuřice GA21
			94	0 min 55 s		
			56	2 min 0 s	40	
			72	2 min 0 s		
			72	3 min 0 s	1	
<b>C:25 T25</b>	149	REDTaq	94	1 min 0 s	1	Identifikace modifikace Liberty kukuřice T25
			94	1 min 0 s		
			58	2 min 0 s	40	
			72	1 min 30 s		
			72	3 min 0 s	1	
<b>C:20 GT73</b>	108	REDTaq	94	1 min 0 s	1	Identifikace modifikace Roundup-Ready řepky GT73
			94	0 min 58 s		
			59,9	2 min 0 s	40	
			72	1 min 30 s		
			72	3 min 0 s	1	
<b>B:05 CaMV</b>	191 a 383	REDEx	94	3 min 0 s	1	Detekce – screening infekce virem CaMV
			94	0 min 45 s		
			57	0 min 40 s		
			72	2 min 0 s	40	
			72	10 min 0 s	1	

### 3.4.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

Je standardní metodou pro tzv. end-point vyhodnocení PCR, tj. vyhodnocení po ukončení celé amplifikace, vhodnou pro kvalitativní detekce GMO. Byla prováděna podle JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“.

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Ověření limitu detekce 0,1% dané PCR u GM kukuřic NK603 a GA21 (Roundup-Ready)

Výsledky stanovení PCR uvádí tabulka č.7.

**Tabulka č.7: Výsledky stanovení pro 0,1% NK603 a GA21**

Vzorek		Datum provedení	Amplikon/primery	Výsledek	Obr.	
Č.	Specifikac					
1	<b>Kukuřice NK603 -</b>	26.8. 2005	Promotor 35S CaMV (123 bp) Primery 35s-cf3/35s-cr4	1	1	
		30.8. 2005		1	2	
		2.9.2005 <sup>2)</sup>		1	3	
	<b>ERM BF415b (CRM 1/2005)</b>	30.8. 2005	Terminátor NOS A. tumefaciens (180 bp) Primery NOS-1/NOS-3	0	4	
		31.8. 2005 <sup>2)</sup>		1/0	5	
		2.9. 2005 <sup>3)</sup>		1	6	
		11.8. 2005		Identifikace modifikace NK603 (108 bp)	1	7
		8.9. 2005		NK603 primer1/NK603 primer2	1	8
2	<b>Kukuřice GA21 -</b>	26.8. 2005	Promotor 35S CaMV (123 bp) Primery 35s-cf3/35s-cr4	1/0 <sup>4)</sup>	1	
		30.8. 2005		0 <sup>4)</sup>	2	
		2.9. 2005		0 <sup>4)</sup>	3	
	<b>ERM BF414b (CRM 2/2005)</b>	30.8. 2005	Terminátor NOS A. tumefaciens (180 bp) Primery NOS-1/NOS-3	0	4	
		31.8. 2005 <sup>2)</sup>		1	5	
		2.9. 2005 <sup>3)</sup>		1	6	
		22.8. 2005		identifikace modifikace GA21 (270 bp)	1	9
		9.9. 2005		primery GA21 1-5'/GA21 1-3'	1	10

Legenda k tabulce č. 7:

1. Správný výsledek je označen 1; nesprávný 0; nejasný 1/0. Za správný výsledek se považuje detekování 0,1% standardu jako pozitivního.

2. Teplota hybridizace primerů zvýšena o 1 °C (na 58 °C) a počet cyklů zvýšen na 40, v tabulce označeno <sup>2)</sup>.

3. Teplota hybridizace primerů 57,5 °C a počet cyklů 40, v tabulce označeno <sup>3)</sup>.

4. Modifikace GA21 nemá obsahovat promotor 35 S; provedené PCR však daly v příslušné oblasti (123 bp) slabý pruh v gelu.

Z výsledků vyplývá, že všechny 0,1% standardy vykazují hledaný pruh v příslušném místě. Některé z těchto pruhů jsou však na hranici viditelnosti zejména v tištěné verzi, která má poněkud zhoršenou kvalitu oproti původnímu snímku na monitoru počítače. Z tohoto hlediska nejhůře detekovatelným amplikonem se jeví terminátor NOS *Agrobacteria tumefaciens*.

U obsahu GMO blízkého LOD je detekovatelnost závislá na těchto faktorech

1. Kvalita templátové DNA standardu, zejména zhoršení v důsledku opakovaného tání/zmrazení. Nebezpečí zhoršené kvality templátu je větší u standardů, které se používají vícekrát, než u samotných analyzovaných vzorků, které podléhají jen omezenému počtu analýz. Proto se roztoky DNA standardů uchovávají rozdělené do více zkumavek po max. 20 µl na zkumavku (omezení počtu odběrů).

2. Kvalita amplifikačních primerů. Problém i řešení jsou podobné jako v předcházejícím případě.

3. Množství DNA v roztoku, které závisí na původní navážce standardu nebo vzorku pro izolaci DNA a na provedení izolace. Je stanovena empiricky a uvedena v JPP (pro kukuřici 60 mg na předepsané množství lyzačních pufrů).

4. Kvalita gelu a provedení elektroforézy -mají vliv na viditelnost pruhu v gelu.

Vzhledem ke stále stejnému způsobu práce i typů vzorků lze další případné ovlivňující faktory považovat za konstantní. Pokud by laboratoř přijala nový typ vzorků/plodin nebo nové kity či změnila způsob práce, musí znovu ověřit detekovatelnost 0,1% GMO materiálu.

Během validace byla zvýšena teplota hybridizace primerů k templátu u programu pro screening (tentýž pro p-35 S i t-NOS) na 57,5 °C a počet cyklů byl zvýšen na 40 kvůli detekovatelnosti terminátoru NOS u obou modifikací.

Vzhledem k výsledkům validace se doporučuje

1. Vkládat příslušný 0,1% standard do každého běhu PCR používaného pro analýzu vzorků buď souběžně s vhodnou pozitivní kontrolou obsahující vyšší procento GM DNA, nebo místo ní. Používat pokud možno standard získaný z téže plodiny, jako je analyzovaný vzorek.

2. Tzv. stálá interní validace bude vždy pro každou analýzu vzorku nejspolehlivějším kritériem.

3. Počítat se zhoršenou viditelností pruhů odpovídajících standardům 0,1% GMO. V případě, že se při analýze vzorku objeví v gelu v odpovídajícím místě pruh sporné viditelnosti, posuzovat pozitivitu/negativitu vzorku vzhledem k pruhu souběžně detekovaného 0,1% standardu.
4. U modifikace GA21 počítat s faktem, že při screeningu na přítomnost promotoru 35 S CaMV se může objevit slabší pruh napodobující pozitivní výsledek. Prakticky to znamená, že zdánlivá 35S-pozitivita zkoumaného vzorku při screeningu nevyloučí obsah modifikace GA21 ve vzorku!
5. Při další izolaci DNA z tohoto CRM pro GA21 bude vhodné znovu ověřit negativitu screeningu na p-35S.

## 4.2 Ověření limitu detekce dané PCR u plazmidu Mu15, použitého jako pozitivní kontrola pro identifikaci genetické modifikace T25

Po zavedení detekce modifikace T25 bylo odzkoušeno pětinašobné a desetinásobné ředění tohoto plazmidu, vzhledem k tomu, že u obou teplot byl pruh značící 149 bp v místě pozitivní kontroly velmi silný. Dále byla postupně zkoušena nižší ředění. Výsledky uvádí tabulka č. 8, charakterizaci plazmidu viz obrázek č. 11.

**Tabulka č. 8: Výsledky stanovení pro různá ředění plazmidu T25**

Ředění	Datum provedení	Amplikon/primery	Výsledek	Obrázek
5 ×	7.7. 2005	Specifický pro kukuřici T25 Liberty, umístěný na plazmidu Mu15; Primery T25 1-5' a T25 1-3'	1	12
10 ×	7.7. 2005		1	12
50 ×	27.9. 2005		1	13 vlevo
100 ×	27.9. 2005		1	13 vlevo
500 ×	30.9. 2005		1	13 vpravo
1000 ×	30.9. 2005		0	13 vpravo
500 ×	11.11.2005		1	14

Legenda k tabulce č.8

Správný výsledek je označen 1; nesprávný 0. Za správný výsledek se považuje detekování použitého ředění daného plazmidu jako pozitivní.

Bylo tedy zjištěno, že kontrolní plazmid Mul5 je možno použít jako pozitivní kontrolu v dané PCR detekci modifikace T25 až v 500 násobném ředění. Přestože byl vytvořen jako pozitivní kontrola pro kvantitativní PCR, dává zřetelně identifikovatelné výsledky i při kvalitativní PCR. Za limit detekce tohoto stanovení tedy lze považovat koncentraci plazmidu 0,12 pg/μl.

### 4.3 Ověření limitu detekce 0,1% dané PCR u GM řepky GT73 (Roundup-Ready)

Validace byla provedena pouze pro identifikaci uvedené genetické modifikace. Pro screening na přítomnost promotoru 35 S CaMV a terminátoru NOS *Agrobacteria tumefaciens* provedena nebyla, protože GM řepka GT73 tyto sekvence neobsahuje. Výsledky stanovení PCR uvádí tabulka č.9.

Tabulka č. 9: Výsledky stanovení pro 0,1% GT73

Vzorek, ředění v H <sub>2</sub> O, není-li uvedeno jinak	Datum provedení	Amplikon / primery	Výsledek	Obr.
GT73, 10×	23.9.2005	Přesah z 3' konce geneticky modifikovaného inzertu do rostlinné DNA; GT73 primer1/ GT73 primer2	1	15 vlevo
GT73, 10×	23.9.2005		1	15 vpravo
GT73, 10×	14.10. 2005		1	16 vpravo
GT73, 10× v DNA nemodifikované řepky	14.10. 2005		1	16 vpravo
GT73, 10×	23.11. 2005		1	17
GT73, 20×	23.9. 2005		Délka amplikonu 108 bp	1

Legenda k tabulce č. 9

Správný výsledek je označen 1. Za správný výsledek se považuje detekování použitého ředění DNA řepky GT73 jako pozitivní.

Z výsledků vyplývá, že použitý CRM s obsahem 1 % modifikace GT73, desetinásobně zředěný a použitý jako templát v PCR, vykazuje po provedení elektroforézy hledaný pruh v příslušném místě gelu. Lze tedy tento CRM 10× ředit a používat jako 0,1% pozitivní kontrolu, kterou zavedená identifikace GT73 detekuje jako pozitivní. V jednom případě bylo vyzkoušeno i 20-tinásobné ředění s pozitivním výsledkem, ale pro účely detekce GMO postačuje detekovatelnost na úrovni 0,1 %.

#### **4.4. Přezkoumání negativity detekce virové infekce CaMV (amplifikace promotoru 35S s přílehlými virovými sekvencemi) u transgenních odrůd řepek sloužících v laboratoři jako IRM**

Tento protokol se netýká zavádění nové PCR detekce. Výsledky stanovení pomocí duplexní PCR tj. dva páry primerů v 1 amplifikační zkumavce uvádí tabulka č.10.



**Tabulka č.10: Výsledky duplexní PCR pro extrakty a izoláty DNA řepky**

Č.	Vzorek DNA	Výsledek (přítomnost vira CaMV)	Shoda s žadáním stavem	Obrázek/ označení na obrázku
	Specifikace vzorku (IRM)			
1	0% GMO (směs IRM 2,3,4 a5 /2001), LE	detekována	0	18 / N
2	1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), LE	nedetekována	1	18 / p 1%
3	PHW-01-440 (IRM 8/2001), LE	nedetekována	1	18 / p 44
4	0% GMO (směs IRM 2,3,4 a5 /2001), LE	detekována	0	19 / N
5	PHW-01-429 (IRM 6/2001), LE	nedetekována	1	19 / LE 429
6	PHW-01-439 (IRM 7/2001), LE	nedetekována	1	19 / LE 439
7	PHW-01-440 (IRM 8/2001), LE	nedetekována	1	19 / LE 440
8	1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), LE	detekována	0	19 / bar 1%
9a	0% GMO (směs IRM 2,3,4 a5 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 0
9b	0% GMO (směs IRM 2,3,4 a5 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 0
9c	0% GMO (směs IRM 2,3,4 a5 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 0
10a	0,1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 0,1
10b	0,1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 0,1
11a	1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 1
11b	1% GMO (směs IRM 6,7 a 8 /2001), ED	nedetekována	1	20 / 1

Legenda k tabulce č. 10

1. Shodný výsledek s žádaným je označen 1; neshodný 0. Žádaný výsledek pro uvedené IRM byl ve všech případech negativní, tj. „nedetekována“.
2. ED je izolát DNA získaný kitem GenElute<sup>TM</sup> Plant Genomic DNA Miniprep Kit používaným při akreditovaných zkouškách k izolaci DNA; pro PCR prováděnou kitem „REDEx“ ředěný jeho extrakčními pufrů „Extraction Solution“ a „Dilution Solution“.
3. LE je tzv. Leaf Extract - DNA extrahovaná pomocí kitu REDEx (jeho extrakčními pufrů).
4. Pozitivní kontrola na přítomnost vira CaMV není v tabulce uvedena, neboť byla vždy správně detekována jako pozitivní.

Výsledky analýz prokázaly, že kit REDTaq je pro naši práci vhodnější než kit REDEx. Neshody mezi žádaným a získaným výsledkem vykazovala zejména geneticky nemodifikovaná řepka (tj. 0 % GMO). IRM s obsahem 0,1 % nebo 1 % GMO (směs DNA modifikované a nemodifikované řepky) ve většině případů dala výsledky ve shodě s žádanými, v jednom případě v neshodě.

Izoláty DNA z RM, označené jako ED získané v roce 2004 s použitím kitu GenElute, daly výsledky shodné s očekávanými. Že se tyto izoláty - na rozdíl od původních - ukázaly v pořádku, není však důsledkem pufrů nebo postupů použitých pro extrakci či izolaci DNA, neboť virus CaMV napadá řepky. To znamená, že buď je nebo není přítomen v použitém výchozím materiálu pro izolaci (v semenech). Proto je třeba dát pozor na výběr semen pro extrakci či izolaci DNA.

## **5 Závěr**

Byly zvalidovány PCR detekce dalších modifikací, zavedených v roce 2005. Jednalo se o modifikace kukuřice NK603 a GA21 a řepky GT73. Validace byla částečná, šlo o již validované primery v kontrolních a jiných laboratořích EU. Bylo ověřeno, že metoda používaná v ÚKZÚZ jako Jednotný pracovní postup „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“, dosahuje v kombinaci s těmito primery detekčního limitu 0,1 % geneticky modifikovaného materiálu v nemodifikovaném, což vyhovuje potřebám legislativy.

Podobně byla zvalidována identifikace modifikace kukuřice T25, jako referenční materiál byl však použit kontrolní plazmid Mul5 a limit detekce byl pro něj stanoven na 0,12 pg/μl.

Dříve validované stanovení přítomnosti vira CaMV ve vzorcích řepky bylo doplněno o ověření, že tato reakce opravdu rozlišuje mezi promotorem 35S CaMV řepky transgenní a promotorem 35S CaMV řepky infikované tímto virem.

Na základě výsledků byly doporučeny konkrétní izoláty DNA, které se při použití v této PCR chovají jako CaMV negativní, ať jsou z hlediska GMO negativní či pozitivní.

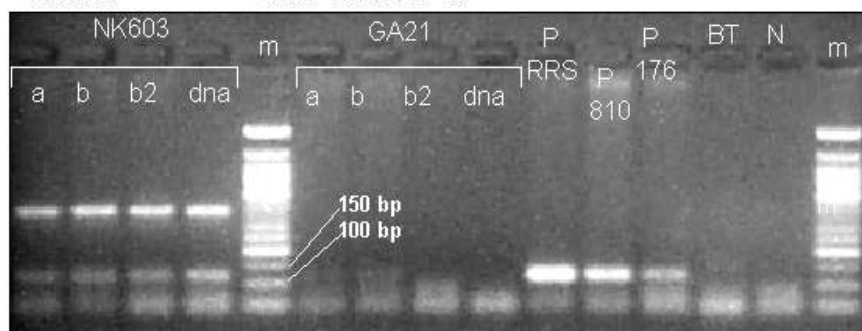
Vždy platí již dříve uvedené zásady pro stálé ověřování dostatečné citlivosti zkoušky

1. Vkládat jako pozitivní kontrolu 0,1% standard CRM, IRM do každého běhu PCR používaného pro zkoušku přítomnosti dané modifikace ve zkoumaných vzorcích.
2. Není-li pro danou modifikaci k dispozici vhodný 0,1% standard, použít jako pozitivní kontrolu jiný vhodný RM s obsahem GM složky těsně nad limitem detekce.
3. V případě, že se při analýze vzorku objeví v gelu v odpovídajícím místě pruh sporné viditelnosti, je doporučeno posuzovat pozitivitu a negativitu vzorku vzhledem k pruhu souběžně detekovaného 0,1% standardu.

## 6 Literatura

1. CRL - Detection methods submitted under the provision of Art. 47 of Regulation EC 1829/2003 - A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Corn NK603; <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MON-Art47-pcrNK603maize.pdf>
2. Lih-Ching Chiueh, Yen-Ling Chen and Daniel Yang-Chih Shih: *Study on the Detection Method of Six Varieties of Genetically Modified Maize and Processed Foods*, Journal of Food and Drug Analysis, Vol.10, No.1, 2002, p. 25-33
3. Kuribara-H; Shindo-Y; Matsuoka-T; Takubo-K; Futo-S; Aoki-N; Hirao-T; Akiyama-H; Goda-Y; Toyoda-M; Hino-A; Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, Journal-of-AOAC-International, 2002, 85 (5) 1077-1089
4. CRL - Detection methods submitted under the provision of Art. 47 of Regulation EC 1829/2003 - A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Canola RT73, <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MON-Art47-pcrGT73rapeseed.pdf>
5. Christian Wolf, Margitta Scherzinger, Andreas Wurz, Urs Pauli, Phillip Hübner, Jürg Lüthy: Detection of Cauliflower Mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results, Eur Food Res Technol (2000) 210:367-372, Springer-Verlag 2000
6. Kopotová, Suchomelová: Zprávy z vývojových úkolů a validační zprávy/ protokoly

**Amplifikace promotoru 35S (123 bp, REDTaq)**  
**26.8.05 B:04 NO35TAQ**



- m..... marker 50 bp
- NK603, GA21... modifikace kukurice
- a,b..... paralelní izoláty - 0,1% GM (IRMM)
- b2..... 2. eluce jedné paralely
- dna..... DNA cca 1% (IRMM)
- P ..... pozitivní kontroly 0,1% GM:
- RRS ..... Roundup-Ready sója (IRMM)
- 810 ..... MON810 (IRMM)
- 176..... Bt-176 (IRMM)
- N..... negativní kontrola (MIC)
- BT..... beztemplátová kontrola

**Obrázek č. 1: Promotor 35 S CaMV u GM kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 57 °C, PCR 37 cyklů.**

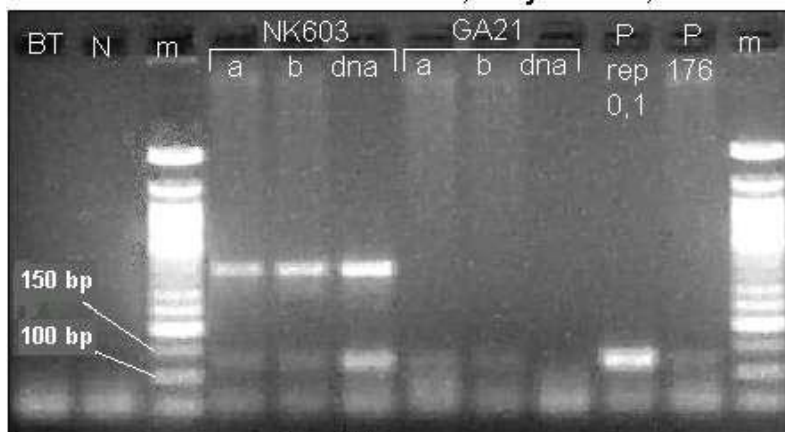
**Amplifikace promotoru 35S (123 bp, REDTaq)**  
**30.8.2005 B:04 NO35TAQ**



m..... marker 50 bp  
 NK603, GA21... modifikace kukurice  
 a,b..... izoláty DNA z 0,1% standardu IRMM (ERM)  
 a2,b2..... izoláty DNA z 0,1% standardu IRMM (ERM), 2. eluce  
 dna..... 1% DNA (NK603 a GA21) - standard IRMM  
 P RRS, P repka 0,1%... pozitivní kontroly 0,1% GMO (IRMM a IRM)  
 MON810, Bt-176..... kontroly 0,1% GMO (IRMM)

**Obrázek č. 2: Promotor 35 S CaMV u GM kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 57 °C PCR 37 cyklů.**

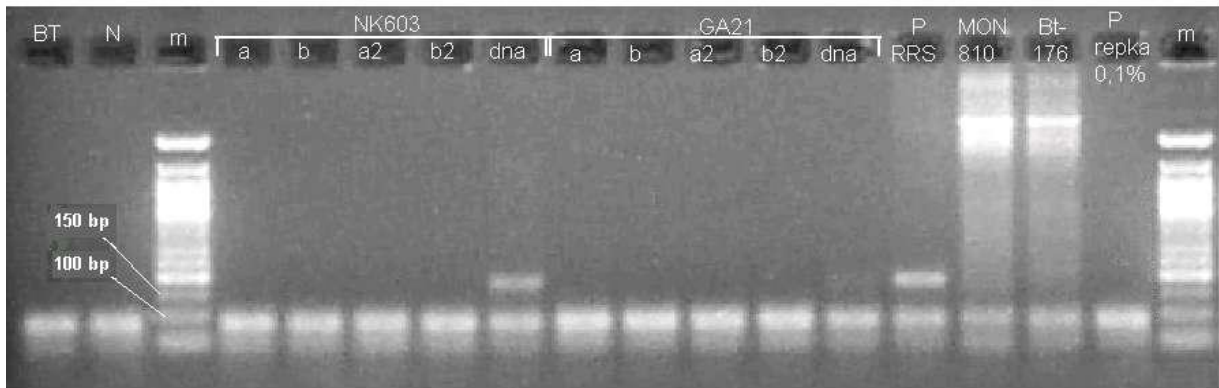
Amplifikace promotoru 35S (123 bp, REDTaq)  
 1/2.9.05 B:04 NO35TAQ, t hyb. = 57,5°C



m..... marker 50 bp  
 NK603, GA21... modifikace kukurice  
 a, b..... izoláty z 0,1% stand. IRMM  
 dna..... zakoupená izolovaná DNA 1% (IRMM)  
 P RRS..... pozit. kontrola RRS (IRMM)  
 P rep 0,1%..... pozit. kontrola repka 0,1% (IRM)  
 P 176..... pozit. kontrola Bt-176 (IRMM)

**Obrázek č. 3: Promotor 35 S CaMV u GM kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 57,5 °C, PCR 40 cyklů.**

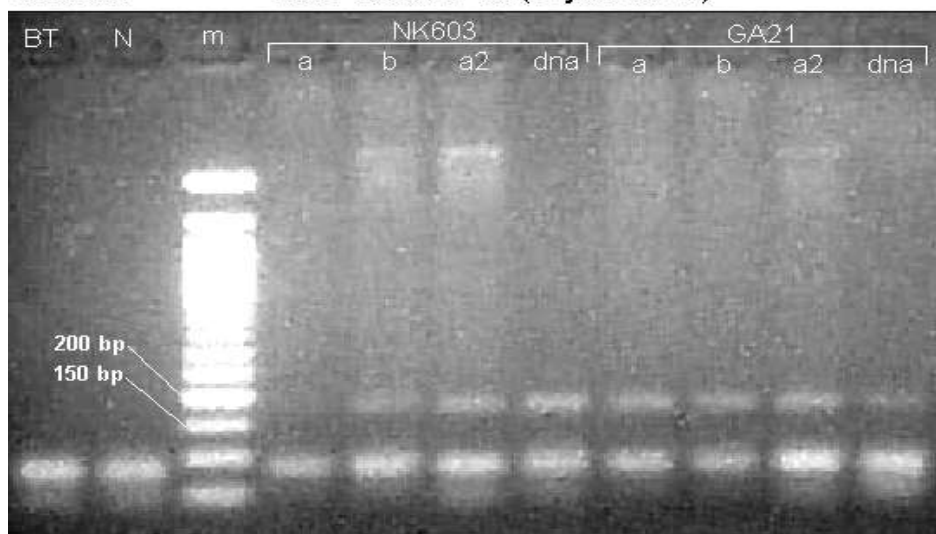
Amplifikace terminátoru NOS (180 bp, REDTaq)  
 30.8.2005 B:04 NO35TAQ



m..... marker 50 bp  
 NK603, GA21.. modifikace kukurice  
 a,b..... izoláty DNA z 0,1% standardu IRMM (ERM)  
 a2,b2..... izoláty DNA z 0,1% standardu IRMM (ERM), 2. eluce  
 dna..... 1% DNA (NK603 a GA21) standard IRMM  
 P RRS, P repka 0,1%... pozitivní kontroly 0,1% GMO (IRMM a IRM)  
 MON810, Bt-176..... kontroly 0,1% GMO (IRMM)

**Obrázek č. 4: Terminátor NOS *Agrobacteria tumefaciens* u kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 57 °C, PCR 37 cyklů. Na obrázku je vidět, že amplifikace terminátoru NOS u obou modifikací neprobíhá dostatečně, odpovídající pruh je kromě pozitivní kontroly RRS pouze ve stopě „NK603 dna“.**

**Amplifikace terminátoru NOS (180 bp, kit REDTaq)**  
**31.8.05 B:04 NO35TAQ (t hybr. 58°C)**

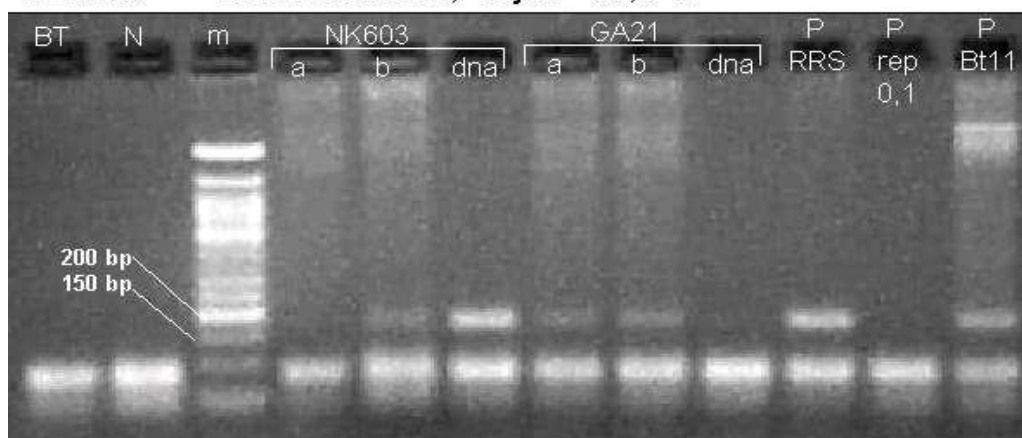


m..... marker 50 bp  
 NK603, GA21... modifikace kukurice  
 a, b..... izoláty z 0,1% stand. IRMM  
 a2, b2..... izoláty z 0,1% standardu IRMM, 2. eluce  
 dna..... zakoupená izolovaná DNA 1% (IRMM)  
 P RRS..... pozit. kont. RRS  
 P repka 0,1%... pozit. kont. repka 0,1%

**Obrázek č. 5: Terminátor NOS *Agrobacteria tumefaciens* u kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 58 °C, PCR 40 cyklů.**



Amplifikace terminátoru NOS (180 bp, REDTaq)  
 1/2.9.05 B:04 NO35TAQ, t hyb. = 57,5°C



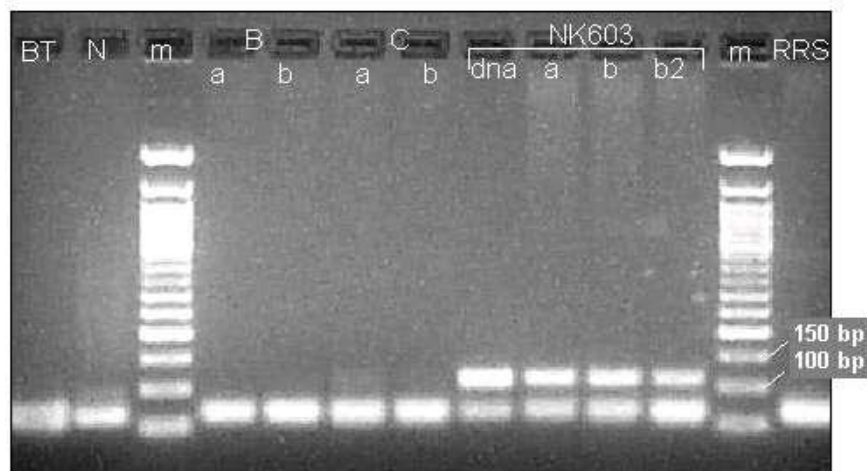
m..... marker 50 bp  
 NK603, GA21... modifikace kukurice  
 a, b..... izoláty z 0,1% stand. IRMM  
 dna..... zakoupená izolovaná DNA 1% (IRMM)  
 P RRS..... pozit. kontrola RRS (IRMM)  
 P rep 0,1%..... pozit. kontrola repka 0,1% (IRM)  
 P Bt11..... pozit. kontrola Bt-11 (IRMM)

**Obrázek č. 6: Terminátor NOS *Agrobacterium tumefaciens* u kukuřic NK603 a GA21, teplota hybridizace primerů 57,5°C, PCR 40 cyklů. Identifikace genetických modifikací NK603 a GA21 - CRM 0,1% GM materiálu.**

**Amplifikace NK603 (108 bp, kit REDTaq)**

11.8.05

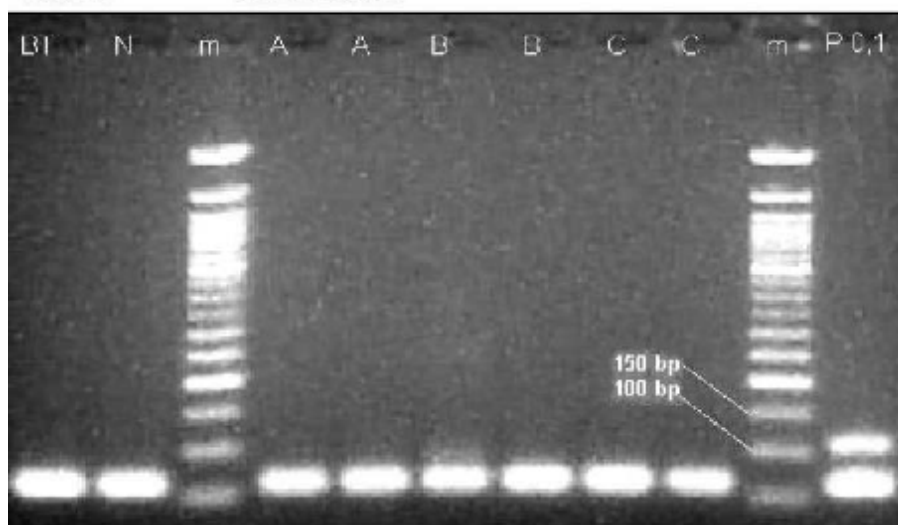
C:14 NK603



m..... marker 50 bp  
NK603dna... 1% GM DNA (IRMM)  
NK603 a, b, b2... 0,1% NK603 (IRMM) v paral. a,b  
b2 je 2. eluce paralely b  
RRS..... 0,1% RRS (IRMM)  
BT, N..... beztemplátová a negativní k. (MIC)  
B,C..... vzorky GeM C2 v paralelách a,b

**Obrázek č.7: Identifikace přítomnosti genetické modifikace kukuřice NK603.**

Amplifikace NK 603 (108 bp)  
8.9.05 C:14 NK603



BT..... beztemplátová kontrola  
N..... negativní kontr.MIC  
m..... marker 50bp  
A-C..... vzorky GEMMA  
P 0,1... pozitivní kontr.0,1%  
N..... negativní kont. (MIC)  
BT..... beztemplátová k.

**Obrázek č. 8: Identifikace přítomnosti genetické modifikace kukuřice NK603, jiné stanovení.**

**Amplifikace GA21 (270 bp, REDTaq)**  
 22.8.05 prog. C:21 GA21



m..... marker 50 bp  
 GA21 a,b.... standard IRMM 0,1% GA21  
 v paralelách a,b  
 a2,b2..... 2. eluce 0,1% GA21  
 GA21dna.... cca1% standard IRMM  
 N..... negativní kont. (MIC)  
 BT..... beztemplátová k.

**Obrázek č. 9: Identifikace přítomnosti genetické modifikace u kukuřice GA21.**

Amplifikace GA21 (270 bp)  
9.9.05 C:21 GA21

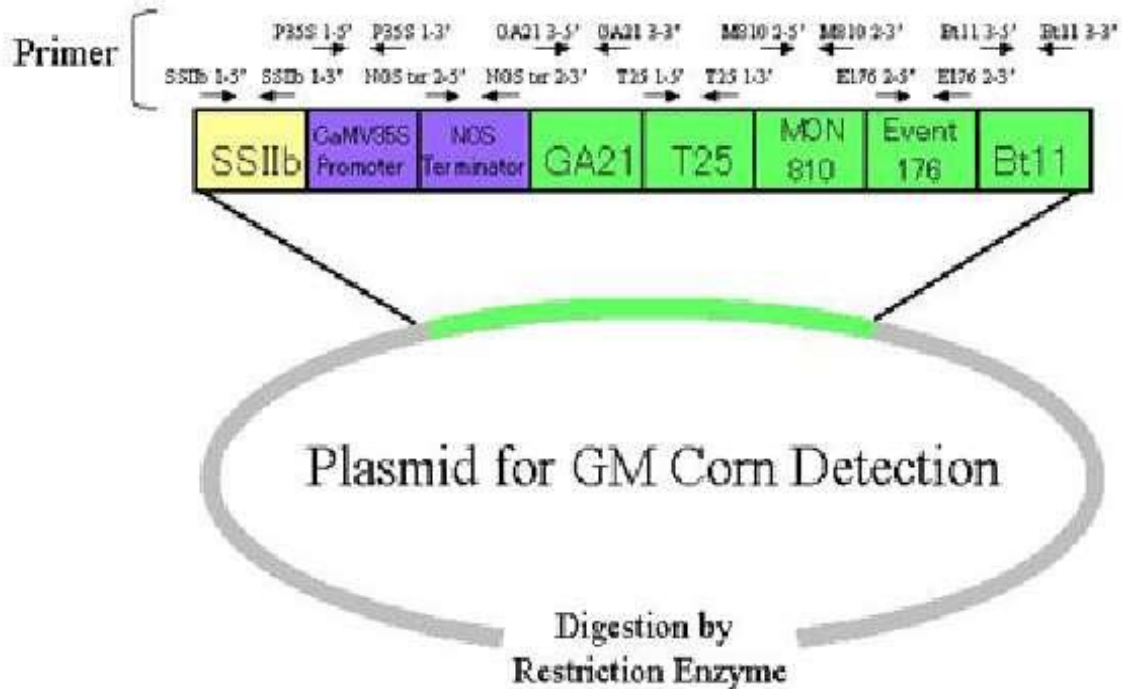


BT.....beztemplátová kontrola  
N.....negativní kontr. MIC  
M.....marker 50 bp  
A-C.....vzorky GEM C2  
P0,1...pozitivní kontr.0,1%

**Obrázek č. 10: Identifikace přítomnosti genetické modifikace u kukuřice GA21, jiné stanovení.**

Code No. 319-04981

Structure of plasmid for GM maize detection



This product is linearized DNA digested by restriction enzyme and diluted with Salmon Sperm DNA Solution.

You can't detect CBH351 line of GM maize using this plasmid.

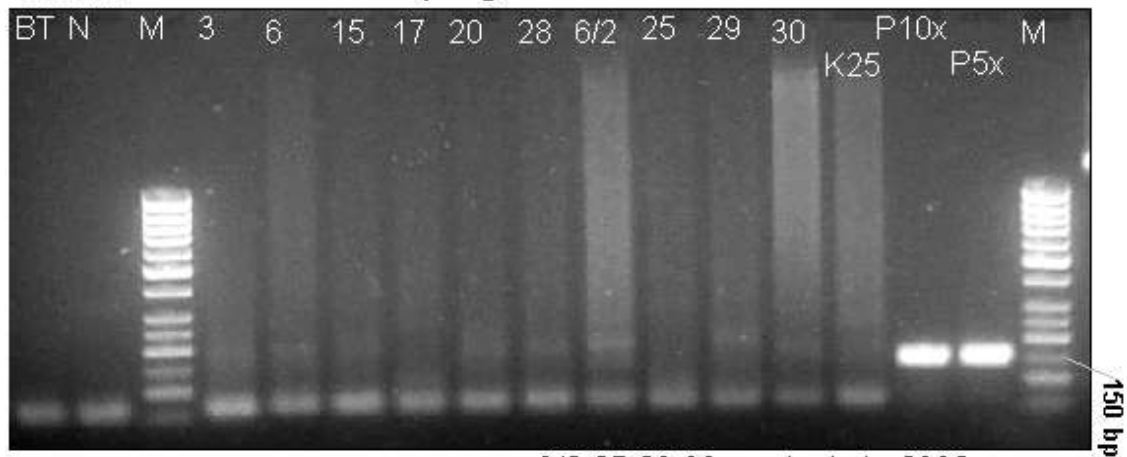
**Obrázek č.11: Plazmid Mu5 používaný jako pozitivní kontrola k identifikaci modifikace T25.**

Převzato z článku japonských autorů (3). Uvedené sekvence specifické pro jiné GM lze pomocí tohoto plazmidu detekovat jen za použití primerů uvedených v článku.

Amplifikace T 25 (149 bp), kit REDTaq

7.7.05

prog. D 23T25



BT... beztemplátová kontrola

N..... negativní kontrola MIC

M..... marker 50 bp

3,6,15,17,20,28 vzorky kuk.2003

6/2,25,29,30 vzorky kuk. 2002

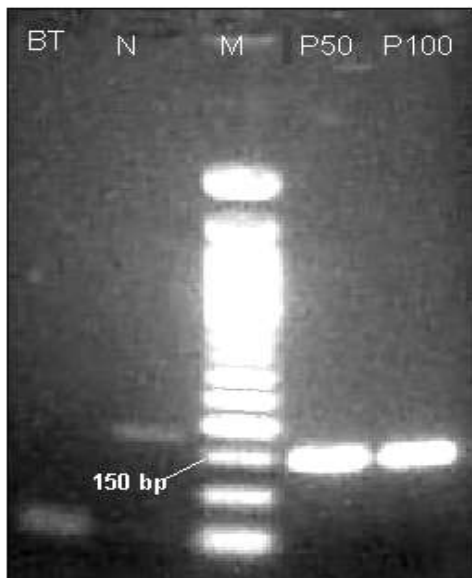
K 25 kuk. 2005

P10x... pozitivní kontrola 10x redeno

P5x... pozitivní kontrola 5x redeno

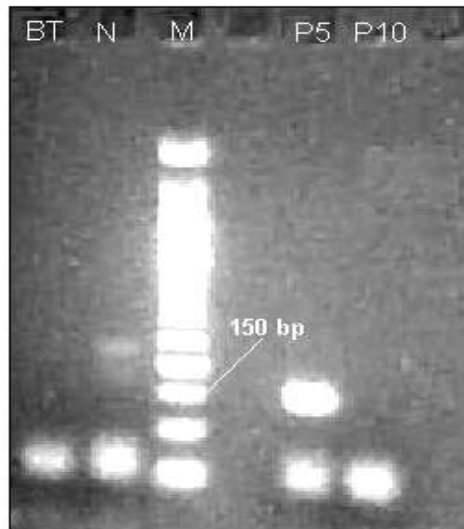
**Obrázek č.12: Amplifikace specifického úseku T25 – ředění plazmidu Mul5 5× a 10×.**

**Amplifikace T25 (149 bp)**  
C:25 T25 27.9.05



BT...beztemplátová kontrola  
N...negativní kontrola MIC  
M...marker 50 bp  
P50...pozitivní kontrola redeno 1:50  
P100...pozitivní kontrola redeno 1:100

**Amplifikace T25 (149bp)**  
C:25 T25 30.9.05

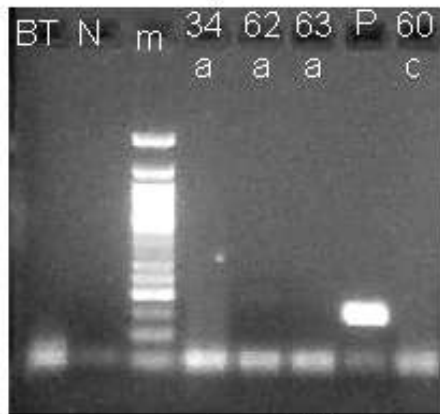


BT...beztemplátová kontrola  
N...negativní kontrola MIC  
M...marker 50 bp  
P5...poz. kontr. plazmid redený 500x  
P10...poz. kontr. plazmid redený 1000x

**Obrázek č. 13: Amplifikace T25, ředění 50× a 100× (vlevo), 500× a 1000× (vpravo).**



**Amplifikace modifikace T25 (149 bp,  
kit REDTaq) 11.11.05 C:25 T25**



m..... marker 50 bp

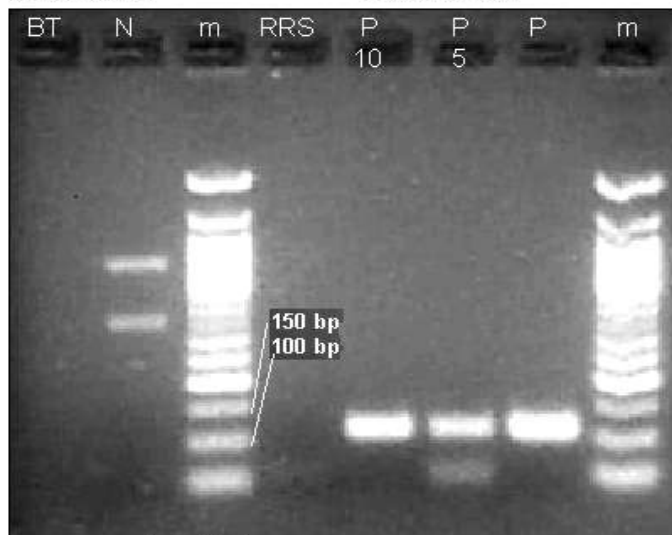
N, BT.... kontroly negativní (MIC) a beztemplátová

P..... pozitivní kontrola plazmid Mul5, ředění 500x

34,60,62,63... vzorky kukuricného lepku OK/05

**Obrázek č. 14: Amplifikace T25, ředění 500 ×.**

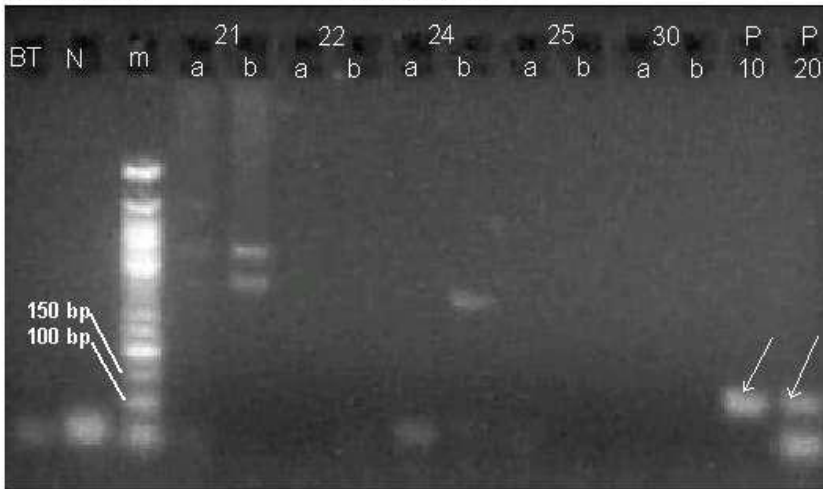
Amplifikace úseku 108 bp modif. GT73, kit REDTaq  
23.9.2005 C:20 GT73



m..... marker 50 bp  
RRS... Roundup-Ready sója  
N..... negativní kont. repka 0% GMO (IRM)  
BT..... beztemplátová kont.  
P, P5, P10... pozitivní kontrola repka GT73 1% IRMM -  
neredená, redená 5x a 10x

**Obrázek č. 15a: Identifikace GT73 při 5-násobném a 10-násobném ředění 1% standardu v H<sub>2</sub>O.**

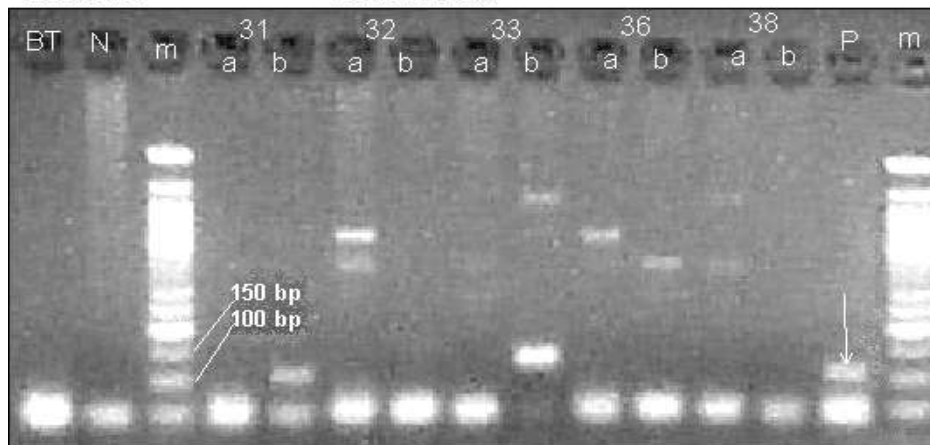
Amplifikace modif. GT73 (108 bp, kit REDTaq  
23.9.2005 C:20 GT73



m..... marker 50 bp  
21,22,23,24,25,30... vzorky repky OK v paralelách a, b  
N..... negativní kont. repka 0% GMO (IRM 2-5/2001)  
BT..... beztemplát. kont.  
P10, P20... pozitivní kontrola repka GT73 1% IRMM redená 10x a 20x

**Obrázek č. 15b: Identifikace GT73 při 10-násobném a 20-násobném ředění 1% standardu v H<sub>2</sub>O.**

Amplifikace GT73 (108 bp, kit REDTaq)  
11.10.05 C:20 GT73



m..... marker 50 bp

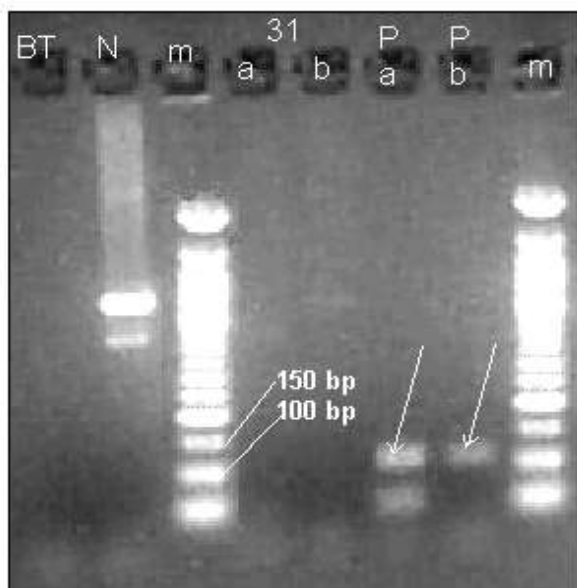
BT, N.... kontroly beztemplátová a negativní (repka 0% GMO)

P..... pozitivní kontrola GT73 (IRMM,1%)

31, 32, 33, 36, 38... vzorky repky OK/05

**Obrázek č. 16a: Identifikace GT73 při použití neředěného 1% standardu.**

Amplifikace GT73 (108 bp, kit REDTaq)  
14.10.05 C:20 GT73



m..... marker 50 bp

BT, N... kont. beztempl. a negat. (MIC)

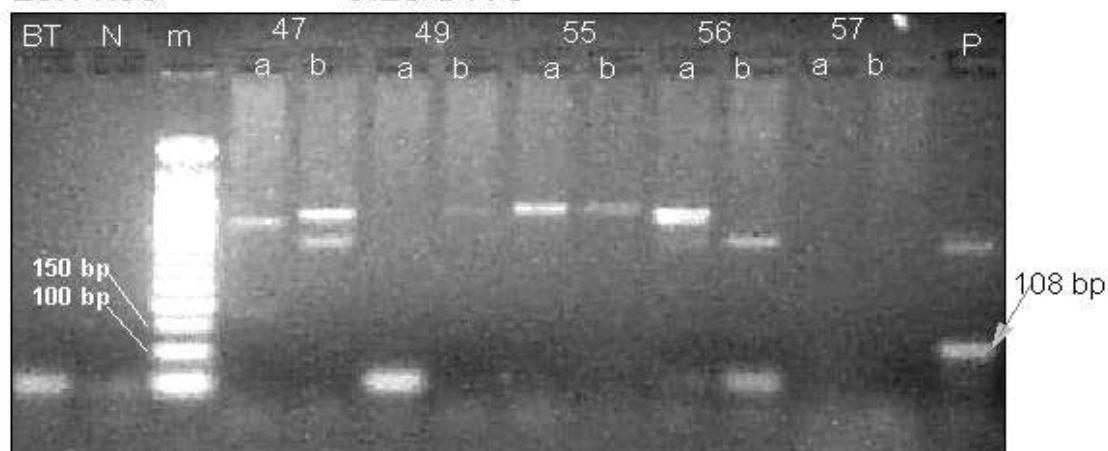
31.... vzorek repky OK/05

Pa... GT73 (IRMM, 1%) redena 10x v H<sub>2</sub>O

Pb... GT73 (IRMM, 1%) red. 10x v DNA repky 0% GMO

**Obrázek č. 16b: Identifikace GT73 při 10-násobném ředění 1% standardu (ředění provedeno ve vodě (označeno Pa) a v DNA nemonifikované řepky (označeno Pb).**

**Amplifikace úseku 108 bp modifikace repky GT73 (kit REDTaq)**  
**23.11.05 C:20 GT73**



m..... marker 50 bp

N, BT... kontroly: negat. (repka 0% GMO /IRM2-5/2001) a beztempl.

47,49,55,56,57... vzorky repky OK/05

P..... pozitivní kont. GT73 (CRM 3/2005), 10x redená v H<sub>2</sub>O

**Obrázek č.17: Identifikace GT73 při 10-násobném ředění 1% standardu v H<sub>2</sub>O.**

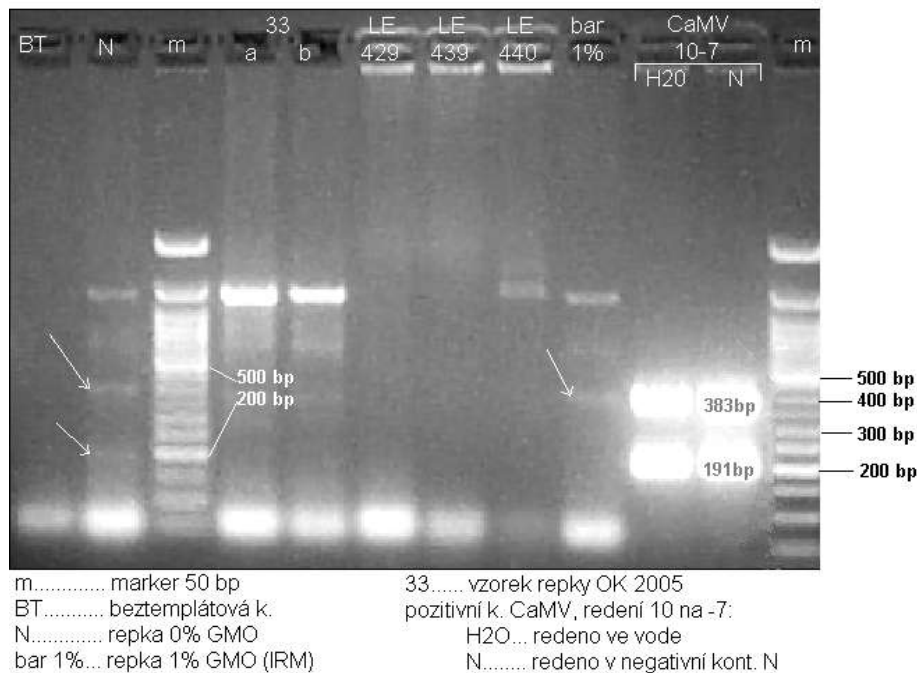
Amplifikace CaMV (doplňkový screening, kit REDEX)  
 primery CRT F/CRT R: 191 bp, primery CaMV 1/ CaMV 2: 383 bp  
 22.9.05 B:05 CAMV



m..... marker 50 bp  
 BT..... beztemplát. kont.  
 N..... negativní kont. (repka 0% GMO)  
 21, 22, 24, 25, 30... vzorky OK  
 P CaMV... pozitivní kont. CaMV  
 (netransg. repka infikovaná virem - IRM)  
 p 1%..... repka 1% GMO (IRM, LE)  
 p 44..... repka PHW-01-440 (IRM, LE)

**Obrázek č.18: Identifikace přítomnosti vira CaMV v IRM, vzorky č. 1, 2, 3. Pozitivní kontrola CaMV označena jako P CaMV, šipky označují nežádoucí pruhy.**

Amplifikace CaMV (doplňkový screening, kit REDEX)  
 primery CRT F/CRT R: 191 bp, primery CaMV 1/ CaMV 2: 383 bp  
 17.10.05 B:05 CAMV



**Obrázek č.19: Identifikace přítomnosti vira CaMV v IRM, vzorky č. 4, 5, 6, 7, 8. Pozitivní kontrola CaMV označena jako CaMV 10-7, tj. ředění původního izolátu  $10^{-7}$ , a to v H<sub>2</sub>O nebo v DNA řepky 0% GMO, šipky označují nežádoucí slabé pruhy.**



Duplexní amplifikace - "doplňkový screening" CaMV, kit REDEx  
 úseky: 191 bp (primery CRT F/R) a 383 bp (primery CaMV1/2)  
 23/24.1.2006 B:05 CAMV



m..... marker 50 bp, BT.... beztemplátová kont.  
 0..... repka 0%GMO (IRM 2-5/2001)  
 0,1.... repka 0,1%GMO (IRM 6-8/2001 v IRM2-5/2001)  
 1..... repka 1 %GMO (IRM 6-8/2001 v IRM2-5/2001)  
 P -7... pozitivní kont. CaMV+ (redení 10-7; 2 a 12 ul /jamku)

**Obrázek č. 20: Identifikace přítomnosti vira CaMV v IRM, vzorky č. 9A, 9b ,9c, 10a, 10b, 11a, 11b. Pozitivní kontrola CaMV označena jako P -7, tj. ředění původního izolátu 10-7, a to v H<sub>2</sub>O. Čísla 2 a 12 udávají počet µl produktu PCR v jamce gelu.**

*Pozn. 3: Při používání uvedených kitů se běžně v oblasti (50 – 100) bp objevují primery a primer-dimery.*

*Pozn. 4: Z důvodu heterogenity zkoumaných vzorků (případně i IRM standardů, neboť jsou namíchány z více odrůd) se mohou vyskytovat nespecifické pruhy. Pokud nejsou v oblasti, kde se očekává sledovaný pruh, nebrání vyhodnocení.*

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře X 2006/ 2**

Ročník: X, č. 2  
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2006  
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.  
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová  
Náklad: 140 výtisků  
Počet stran: 63  
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111  
e-mail: [ukzuz@ukzuz.cz](mailto:ukzuz@ukzuz.cz)

Texty neprošly jazykovou úpravou

**ISSN 1212- 5466**