

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2020

Ročník XXIV, číslo 2/2020

Brno 2020

Obsah

- 1 Optimalizace postupu pro stanovení obsahu arsenu ve vzorcích krmných fosfátů**
Eva Čižmárová, Kateřina Švecová, Eva Fojtlová, *Radmila Tůmová, *Jaroslava Petrová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
*Oddělení NRL Praha, Za Opravnou 4, 150 00 Praha 5 - Motol 1

- 2 Zavedení extrakce DNA z rostlinného materiálu založené na CTAB podle ČSN EN ISO 21571**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 28

- 3 Zavedení kvalitativního stanovení geneticky modifikované kukuřice 98140 pomocí qPCR**
Kristýna Tomečková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 49

Za obsah příspěvků odpovídají autoři

Optimalizace postupu pro stanovení obsahu arsenu ve vzorcích krmných fosfátů

*Eva Čížmárová, Kateřina Švecová, Eva Fojtlová, *Radmila Tůmová, *Jaroslava Petrová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

*OdNRL, Za Opravnou 4, 150 00 Praha 5 - Motol

eva.cizmarova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Celkový obsah arsenu (As) v krmivech minerálního původu se rutinně stanovuje v Odboru NRL Brno postupem mineralizace vzorků ve směsi koncentrované kyseliny dusičné a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3 : 1) – v tzv. obrácené lučavce královské (též Lefortově lučavce), s následným stanovením metodou ICP-MS. V rámci úřední kontroly krmiv na stanovení obsahu rizikových prvků se vyskytl vzorek defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého (dále jen DFP), který i po opakovaných analýzách mineralizace v obrácené lučavce královské a měření metodou ICP-MS vykazoval nadlimitní hodnotu obsahu arsenu.

Obsahy rizikových prvků (As, Cd, Pb, Hg) se v krmivech kontrolují a vyhodnocují podle požadavků evropské legislativy. ÚKZÚZ pravidelně sleduje obsahy rizikových prvků v krmivech v rámci cílené a úřední kontroly. Maximální limity obsahů rizikových prvků jsou zakotveny ve Směrnici Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech. Tato směrnice byla několikrát novelizována prostřednictvím dalších legislativních dokumentů, které vydala Komise EU. Po přezkoumání DG SANTE v nich došlo obvykle k úpravě maximálních limitů pro některé rizikové prvky nebo k zahrnutí nových matric krmiv a krmných surovin. Podle uvedené směrnice je maximální limit obsahu celkového arsenu pro krmiva na bázi fosfátové matrice a samotné anorganické fosfáty stanoven na 10 mg/kg v krmivu s 12% obsahem vlhkosti.

V první části práce byla podrobněji studována problematika významných interferencí stanovení obsahu As metodou ICP-MS, které byly diagnostikovány v nečekané souvislosti s velmi komplikovanou maticí vzorku DFP. Tyto interference byly zjišťovány v průběhu ověřování experimentu a na základě širšího studia publikací a instrumentální ICP-MS aplikační literatury.

V druhé části práce byly provedeny tři způsoby mineralizací krmných fosfátů:

- 1) mineralizace v obrácené lučavce královské,
- 2) mineralizace v 10 M HNO₃,
- 3) mikrovlnný způsob mineralizace za zvýšeného tlaku v koncentrované HNO₃.

Výběr mineralizačních postupů byl směřován k postupům, které NRL ÚKZÚZ Brno pro stanovení obsahu rizikových prvků v minerálních krmivech rutinně využívá. Tlakový mikrovlnný postup mineralizace s kyselinou dusičnou je součástí ČSN EN 17053 na stanovení vybraných stopových prvků metodou (multimetodou) ICP-MS v krmivech. Na přípravě této normy se NRL ÚKZÚZ podílela.

Ve třetí části práce byl kvantifikován obsah celkového As ve všech připravených mineralizátech optickými analytickými instrumentálními metodami stanovení ICP-MS, ICP-OES a HG-AAS. Metoda HG-AAS je vysoce citlivá selektivní metoda, která je ovšem časově náročná z hlediska předúpravy mineralizátů pro stanovení As vyredukováním do formy hydridotvorného AsH₃. Metody měření ICP-OES a ICP-MS nevyžadují další úpravu mineralizátu vzorku, s výjimkou ředění vzorku u metody ICP-MS. Obě tyto metody jsou simultánní a rychlé. Pro účely stanovení obsahu As v minerálních krmivech je citlivost metody ICP-MS významně vyšší pro stanovení nízkých koncentrací As, ale metoda ICP-OES vykazuje citlivost pro rizikové prvky v minerálních krmivech obvykle ještě dostatečnou.

Pro ověření bylo vybráno pět vzorků minerálních fosfátových krmiv (krmných surovin) z odběrů vzorků provedených v rámci úřední kontroly krmiv. Jednalo se o vzorky dihydrogenfosforečnanu vápenatého, fosforečnanu hořečnatého a defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého (DFP). Matrice minerálních krmiv byla doplněna o vzorek certifikovaného referenčního materiálu na bázi minerální horniny-moroccan phosphate rock.

V rámci spolupráce na tomto vývojovém úkolu byly obsahy As metodou HG-AAS stanoveny na pracovišti Oddělení NRL ÚKZÚZ Praha, která tuto metodu rutinně používá v rámci

stanovení v rozsahu akreditace. Všechny mineralizace vzorků a měření metodami ICP-OES a ICP-MS byly provedeny na pracovišti Odbor NRL ÚKZÚZ Brno.

Cílem práce bylo porovnat vybrané mineralizační postupy pro stanovení celkového obsahu As v krmivech na bázi fosfátové matrice. Dalším cílem bylo porovnání výsledků, které byly získány různými instrumentálními optickými metodami ICP-MS, ICP-OES a HG-AAS.

Správnost postupu stanovení byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu (CRM) na bázi geologické matrice. Jedná se o vzorek BCR-032, natural moroccan phosphate rock (phosphorite), v němž je obsah As vyjádřen formou indikativní hodnoty celkového obsahu As.

2 Experimentální část

Mineralizáty minerálních krmiv byly připraveny a analyzovány podle metodik JPP ÚKZÚZ Zkoušení krmiv. Připravené mineralizáty byly měřeny na obsah As třemi spektrálními analytickými metodami:

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem,

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem,

HG-AAS – plamenová atomová absorpční spektrometrie ve spojení s hydridovou technikou.

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Mikrovlnné rozkladné zařízení Discover SP-D 10/35 (CEM, Austrálie).

2.1.2 Mineralizační zařízení dvacetimístné se zpětnými vodními chladiči a programátorem teploty Gerhardt (Gerhardt, Německo).

2.1.3 Podvarové destilační zařízení celoteflonové BSB-939-IR (Berghof, Německo).

2.1.4 Zařízení na přípravu vysoce čisté demineralizované vody MilliQ Advantage A10 (Millipore, Francie).

2.1.5 ICP-OES optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem SPECTRO BLUE (Spectro, Německo).

2.1.6 ICP-MS hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7500ce vybavený kolizní/reakční celou (Agilent, Japonsko).

2.1.7 HG-AAS plamenový atomový absorpční spektrometr AA 240FS (Varian) s dutokatodovou výbojkou pro As, zařízení pro generování a termický rozklad hydridů VGA 77 (Varian) s kontinuálním dávkováním, křemenná kyveta vyhřívaná plamenem acetylen-vzduch.

2.2 Mineralizace vzorků

Mineralizace krmiv minerálního původu v obrácené lučavce královské (JPP ÚKZÚZ, Zkoušení krmiv, postup č. 10440.1)

Do mineralizační trubice se naváží 3 g upraveného vzorku. Dávkočepem se přidá 7 ml kyseliny chlorovodíkové koncentrované a 21 ml kyseliny dusičné koncentrované. Trubice se umístí do mineralizačního bloku a nasadí se zpětné chladiče. Zahřívá se 1 h při teplotě varu směsi. Po vychladnutí se obsah trubice převede kvantitativně do 100ml odměrné baňky a doplní se vysoce čistou demineralizovanou vodou po značku. Zfiltruje se přes filtrační papír střední hustoty do plastových nádobek. Stejným způsobem se provede slepé stanovení.

Mineralizace krmiv minerálního původu v 10M HNO₃, (JPP ÚKZÚZ, Zkoušení krmiv, postup č. 10470.1)

Do 250ml kádinky se naváží 2 g upraveného vzorku s přesností 0,0001 g. Po stěních kádinky se opatrně pomalu přidá 20 ml roztoku kyseliny dusičné ($c = 10 \text{ mol/l}$), přikryje se hodinovým sklíčkem a ponechá stát tak dlouho, až ustane šumění. Poté se kádinka umístí na topnou desku a 1 min povaří. Po sejmutí z topné desky se nechá stát do druhého dne. Během této doby se několikrát opatrně krouživými pohyby promíchá.

Druhý den se obsah kádinky včetně sedimentu kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky, doplní se po značku vysoce čistou demineralizovanou vodou a obsah se promíchá. Mineralizáty se následně převedou do plastových uzavíratelných centrifugačních zkumavek a odstředí se 20 min při 4000 ot/min. Po odstředění se čiré roztoky vzorků převedou do plastových lahvíček k uchování před měřením. Stejným způsobem se provede slepé stanovení.

Mikrovlnný tlakový rozklad krmiv v koncentrované HNO₃, (JPP ÚKZÚZ, Zkoušení krmiv, postup č. 10440.1)

Do rozkladné vysokotlaké teflonové nádoby se naváží 0,5 g upraveného vzorku s přesností 0,0001 g. Ke vzorku se přidá 8 ml koncentrované kyseliny dusičné. Nádoba se uzavře a ponechá stát asi 20 min. Po uplynutí této doby se nádoba vloží do mikrovlnného rozkladného zařízení. Rozklad probíhá ve čtyřech stupních podle teplotního programu s pozvolným nárůstem teploty až do 190 °C, která se udržuje asi 6 min. Po uplynutí doby mineralizace se nádoba vyjme z mineralizačního zařízení a nechá na vzduchu zchladit. Obsah nádoby se kvantitativně převede do 25ml odměrné baňky, po vytemperování se doplní po značku vysoce čistou demineralizovanou vodou a promíchá. Čirý mineralizát se převede do plastové lahvičky k uchování. Paralelně se provádí slepé stanovení.

Tabulka č. 1. Použité metody mineralizace krmiv minerálního původu v závislosti na poměru navažovaného vzorku a výsledného objemu roztoku.

Metoda mineralizace	Obrácená lučavka	10M HNO₃	MW rozklad v HNO₃
Navážka vzorku (g)	3 ± 0,0001	2 ± 0,0001	0,5 ± 0,0001
Doba mineralizace (min)	60	1	4 až 10 ramp-hold
Krmivo : celkový objem roztoku po mineralizaci (g : ml)	3 : 100	2 : 100	0,5 : 25
Teplota při mineralizaci (°C)	var	var	150 až 190 ramp-hold

2.3 Instrumentální stanovení obsahu celkového As v mineralizátech minerálních fosfátových krmiv

ICP-OES

Vzorky získané třemi vybranými způsoby mineralizací byly měřeny na ICP-OES spektrometru formou externí kalibrační křivky o koncentraci As (0; 0,1; 0,2; 2; 10) mg/l na vlnové délce na atomové čáře As 189,6 nm s nastavenou korekcí spektrálního pozadí. Mineralizáty byly měřeny bez předchozího ředění vzorku.

Tabulka č. 2. Pracovní podmínky měření na přístroji ICP-OES SpectroBlue.

Typ zmlžovače	Crossflow
Výkon plazmatu	1650 W
Chladicí plyn Ar	14,5 l/min
Pomocný plyn Ar	1 l/min
Průtok Ar ve zmlžovači	1 l/min
Otáčky peristaltické pumpy	30 ot/min (rychlý mód 63 ot/min)
Promývací čas vzorku	40 s celkem: rychlý mód 10 s, normální mód 30 s
Strategie integrace signálu	standard mode 3 × 36 s

ICP-MS

Vzorky získané třemi vybranými způsoby mineralizací byly měřeny na ICP-MS spektrometru v heliovém kolizním módu na izotopu As (75). Mineralizáty minerálních krmiv byly těsně před měřením ředěny 20 × vysoce čistou demineralizovanou vodou do plastových zkumavek. Jako vnitřní porovnávací prvek byl použit roztok Ge (72), případně Te (125) o koncentraci 1000 µg/l. Měření bylo prováděno formou externí kalibrace s rozsahem kalibrační křivky o koncentraci As (0; 1; 5; 10; 20; 100) µg/l.

Tabulka č. 3. Pracovní podmínky měření na přístroji ICP-MS Agilent 7500ce.

Výkon plazmatu RF power	1500 W
Vzorkovací délka	8 mm
Nosný plyn Ar	0,87 l/min
Pomocný plyn Ar	0,35 l/min
Otáčky peristaltické pumpy	0,1 rps
Peltier chlazení mlžné komory	2 °C
Extract 1	1V až 5V
Extract 2	-150 V až -120 V
Omega Bias-ce	-18 V až -26 V
Omega Lens-ce	0,4 V až 2 V
Cell Entrance	-22 V
Kolizní plyn (He)	5,2 až 5,5 ml/min
QP Focus	-10 V
Cell Exit	-46 V
OctP RF	160 V
OctP Bias	-19 V
QP Bias	-15 V
Detector analog	1680 V
Detector pulse	1360 V
Discriminator	8 mV

HG-AAS

Vzorky získané třemi vybranými způsoby mineralizací byly měřeny na plamenovém atomovém absorpčním spektrometru Varian AA 240FS (Varian) s připojeným zařízením pro generování a termický rozklad hydridů VGA 77 (Varian). Měření As probíhá při vlnové délce 193,7 nm vymezené štěrbinou o optické šířce 0,5nm. Atomizace probíhá v křemenné trubici délky 15 cm vyhřívané plamenem acetylen-vzduch na teplotu (900 – 1000) °C, výbojka s dutou katodou se žhaví proudem 10 mA. Integrace signálu probíhá asi 5 s po programové prodlevě

55 s od začátku nasávání vzorku. Odečítá se integrovaná výška signálu a měření se vyhodnocuje metodou externí kalibrační křivky.

V připravených mineralizátech vzorků po vhodném naředění se vzorky předupraví pro vlastní měření, As (V) se redukuje jodidem na As (III), nadbytek jodidu se odstraní přidavkem kyseliny askorbové. Peristaltickou pumpou se dává vzorek nebo roztok kalibrační křivky rychlostí (6 – 8) ml/min, roztok tetrahydridoboritanu sodného rychlostí (0,8 – 1,2) ml/min. Jako nosný plyn se používá argon nastavený na průtok asi 90 ml/min. Rozsah kalibrační křivky byl připraven v koncentracích (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10) µg/l, mineralizované vzorky byly ředěny podle předpokládané očekávané koncentrace v rozmezí (5 – 50) × demineralizovanou vodou, koncentrace As v mineralizátech se nacházela v rozmezí (0,8 – 3,9) µg/l.

Tabulka č. 4. Reálné meze stanovitelnosti (LOQ) použitých instrumentálních optických analytických metod (hodnoty uvedeny v mg/kg).

Prvek	ICP-OES	ICP-MS	HG-AAS
As	1,0	0,02	0,2

3 Souhrnné výsledky

3.1 Vliv matrice vzorku fosfátu sodno-vápenatého (DFP)

Jako matrice vzorků krmiv byly pro účely tohoto vývojového úkolu vybrány vzorky na bázi anorganických fosfátových krmiv.

Prioritní pozornost byla věnována vzorku defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého (dále DFP), který vykazoval nadlimitní a vysoce „falešně“ pozitivní obsah As. DFP lze charakterizovat jako nový typ krmné suroviny, která se používá pro suplementaci krmiv především pro obsah P. Je využíván zejména jako krmivo pro drůbež a z hlediska stravitelnosti a vysoké biodostupnosti představuje pro hospodářská zvířata významně vhodnější formu než ostatní anorganické fosfáty. Tento typ DFP fosfátu je získáván těžbou a tepelným zpracováním horniny fluoroapatitu, s jeho rozsáhlými nalezišti v Rusku (např. poloostrov Kola). Podrobnějším hledáním informací o této matrici vzorku a zejména v souvislosti s jeho původem

z Ruska, se ukázalo, že vzorek může obsahovat nepředpokládané matriční analyty. Podrobným studiem literatury o zpracování fosfátů z geologických rud, které pocházejí z Ruska, bylo zjištěno, že tento vzorek je matričně bohatý na obsah prvků vzácných zemin (dále REEs). Uvedený předpoklad byl později prokázán provedením externí analýzy vzorku DFP v Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži u Prahy. Analýza byla provedena metodou instrumentální neutronové aktivační analýzy (INAA), která umožňuje simultánní stanovení řady prvků.

Obsahy hlavních nutričních komponent a limitovaných nežádoucích látek obsažených ve vzorku DFP, který deklaruje výrobce, jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5. Matriční složení vzorku defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého (DFP).

Celkový P	18 %
Ca	30,0 %
Na	5,3 %
F	max. 0,2 %
As	max. 0,0002 %
Pb	max. 0,002 %
Hg	max. 0,00001 %
Cd	max. 0,00004 %

3.2 Spektrální interference při stanovení obsahu prvků (As) metodou ICP-MS

Při stanovení analytů metodou ICP-MS lze předpokládat významné spektrální interference, které mohou být způsobeny izobarickým překryvem, tvorbou polyatomických iontů, tvorbou oxidových a hydroxidových iontů a tvorbou dvojnásobně nabitých iontů.

Mezi nejběžnější interference v ICP-MS spektrální technice patří zejména polyatomické interference. Mezi klasické polyatomy, které lze pozorovat v hmotnostních spektrech, patří sloučeniny argonu, vodíku a kyslíku. Vznikají zejména z použitých minerálních kyselin, z demineralizované vody pro ředění vzorků, z plynů v atmosféře a plazmového plynu Ar, např. ArAr^+ , ArC^+ , ArO^+ , ArOH^+ , ArH^+ a mnohé další. Mezi další časté polyatomické ionty lze řadit také sloučeniny dusíku, fosforu, chloridů, síry, např. ArN^+ , ArCl^+ , ClO^+ , PO^+ , SO^+ a mnohé

další. Přehled polyatomických interferencí je běžně dostupný v literatuře a lze je většinou dobře předpokládat.

Vybavení ICP-MS spektrometru kolizní/reakční celou je výhodou pro celou řadu rutinně prováděných analýz, zejména v tak komplikovaných matricích, jako jsou právě krmiva.

S využitím cely je možné efektivně odstraňovat oxidové a polyatomické ionty. Izobarický překryv (tzn. dva izotopy různých prvků mají téměř stejnou hmotnost) se řeší obvykle výběrem jiného vhodného izotopu prvku nebo matematickou korekcí.

Při stanovení As na izotopu 75 je nejběžnější polyatomickou interferencí molekula ArCl^+ , kterou lze velmi dobře odstranit s použitím He jako kolizní plynu, který mění na základě srážek s polyatomickými ionty jejich kinetickou energii a tím způsobuje jejich eliminaci. Tento postup se rutinně používá při stanovení As v krmivech metodou ICP-MS v NRL ÚKZÚZ Brno.

3.2.1 Interference způsobené dvojnásobně nabitými ionty

Tento typ spektrálních interferencí nepatří mezi zcela běžné nežádoucí vlivy při stanovení prvků metodou ICP-MS. Ionizace v ICP-MS probíhá převážně do prvního stupně, částečně mohou však vznikat i dvojnásobně nabití ionty. Tyto interference tvoří např. všechny kovy vzácných zemin: Neodym (Nd), Samarium (Sm), Gadolinium (Gd), Dysprosium (Dy), Europium (Eu) a Erbium (Er).

Při ladění přístroje ICP-MS se přístroj optimalizuje na přítomnost dvojnásobně nabitých iontů např. z roztoku Ce o koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$ na poměr signálů $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^+$ (140/70). Tento poměr by měl být při správném nastavení u přístroje Agilent 7500ce nižší než 3 %, výsledky optimalizace jsou součástí ladicího reportu při každodenním nastavení přístroje. Interference dvojnásobně nabitými ionty mohou být eliminovány dodržením podmínek při ladění přístroje a stabilizací plazmatu.

Pokud mineralizát vzorku obsahuje prvky vzácných zemin ve vysokých koncentracích, ani při dokonalé optimalizaci a dodržení podmínek zachování poměru signálu iontů Ce nelze zabezpečit, že budou tyto interference během měření potlačeny.

3.2.2 Interference způsobené dvojnásobně nabitými ionty Nd a Sm při stanovení As na izotopu As (75)

As se měří metodou ICP-MS pouze jako monoizotopický prvek As (75). V případě As mohou být potenciálními interferenty izotopy prvků vzácných zemin Nd (146), Sm (147) a společný izotop Nd, Sm (150). Dvojnásobně nabitě ionty Nd^{2+} a Sm^{2+} se v hmotnostním spektru projeví jako interferent na hmotě As (150/75). Relativní abundance interferujících prvků na hmotě 150 je pro Sm 7,38 % a pro Nd 5,6 %, v případě vysokého obsahu Eu by mohlo dojít i k rušení ze sousední hmoty $^{151}\text{Eu}^{2+}$ (abundance 47,81 %).

Vzorky defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého 1306 a 1309 obsahují oba významné interferenty Nd a Sm ve vysokých koncentracích, obsahy Eu jsou naopak velmi nízké (v $\mu\text{g/kg}$). Obsahy těchto prvků vzácných zemin byly zjištěny externě nedestruktivní analytickou metodou INAA.

Dále byly výsledky ověřeny i v NRL ÚKZÚZ Brno měřením na přístroji ICP-MS Agilent 7500ce. Pro měření byly použity mineralizáty v 10M HNO_3 po 20násobném zředění vysoce čistou demineralizovanou vodou. Měřilo se na izotopech Nd (146) a Sm (147), jako vnitřní standard ISTD bylo použito Ge (72), které má blízký první ionizační potenciál.

Výsledky stanovení metodou INAA uvádí tabulka č. 6, v tabulce číslo č. 7 jsou pak uvedeny obsahy těchto prvků měřených na přístroji ICP-MS Agilent 7500ce.

Tabulka č. 6. Obsah Nd, Sm a Eu ve vzorku 1307 (DFP) stanovený metodou INAA.

Metoda INAA	Nd (v mg/kg)	Sm (v mg/kg)	Eu (v $\mu\text{g/kg}$)
1307	260 ± 3	$42,0 \pm 0,6$	$11,4 \pm 0,2$

Tabulka č. 7. Obsah Nd a Sm ve vzorcích krmných fosfátů stanovený na přístroji ICP-MS Agilent 7500ce.

Metoda ICP-MS	Nd (146) (mg/kg)	Sm (147) (mg/kg)	Matrice krmiva
IRM 1302	32,010	5,197	Minerální krmivo MK A2 super
1306	0,329	0,087	Dihydrogenfosforečnan vápenatý
1307	262,958	40,092	Fosforečnan sodno-vápenatý defluorizovaný (DFP)
1308	5,568	1,622	Fosforečnan hořečnatý
1309	289,142	43,597	Fosforečnan sodno-vápenatý defluorizovaný (DFP)
1310	16,199	5,259	Dihydrogenfosforečnan vápenatý
CRM 1311	70,981	14,031	Natural moroccan phosphate rock (phosphorite)

Vliv interferencí na izotopu As (75) způsobený přítomností dvojnásobně nabitých iontů Nd^{2+} a Sm^{2+} byl ověřen proměřením čistých roztoků standardu As v matrici 2% $\text{HNO}_3(\text{v/v})$ o koncentraci 5 $\mu\text{g/l}$ se vzrůstajícími koncentračními přídávky prvků Nd a Sm. Koncentrační přídávky obou interferentů byly stanoveny tak, aby dosahovaly svého maximálního obsahu, který byl stanoven ve 20 $\times$ ředěných mineralizátech vzorků DFP. Reálný vzorek DFP po mineralizaci v obrácené lučavce královské, ředěný před měřením ICP-MS 20 $\times$ demineralizovanou vodou, obsahuje asi 390 $\mu\text{g/l}$ Nd a asi 60 $\mu\text{g/l}$ Sm. Výsledky měření standardního roztoku As s přídávky Sm a Nd o různých koncentracích v He kolizním módu jsou uvedeny v tabulkách č. 8. a č. 9.

Tabulka č. 8. Ověření vlivu Nd na obsah As v čistém roztoku standardu.

As 5 µg/l + přídavek Nd	ICP-MS He mód
	As (µg/l)
0 µg/l Nd	5,041
1 µg/l Nd	4,944
5 µg/l Nd	5,614
10 µg/l Nd	5,572
20 µg/l Nd	6,018
50 µg/l Nd	7,407
100 µg/l Nd	9,863
200 µg/l Nd	13,989
400 µg/l Nd	21,939

Tabulka č. 9. Ověření vlivu Sm na obsah As v čistém roztoku standardu.

As 5 µg/l + přídavek Sm	ICP-MS He mód
	As (µg/l)
0 µg/l Sm	5,097
1 µg/l Sm	5,191
5 µg/l Sm	5,332
10 µg/l Sm	5,378
20 µg/l Sm	6,004
50 µg/l Sm	7,226
100 µg/l Sm	9,964

3.2.3 Využití možnosti korekční rovnice při řešení interferencí dvojnásobně nabitých iontů na izotopu As (75)

Jedním z možných způsobů řešení spektrální interference dvojnásobně nabitými ionty na izotopu As (75) je zavedení korekční rovnice na As, která se následně vloží do měřicí metody ovládacího software přístroje. Matematická korekční rovnice se stanovuje s čistými jednoprvkovými roztoky významných interferentů.

Připraví se sada asi tří čistých roztoků neodymu Nd a sada tří čistých roztoků samaria Sm v 2% HNO₃ (v/v) o koncentracích (0; 10; 100; 500) µg/l. Tyto roztoky se proměří v optimalizované metodě a pro každý roztok se zjistí odezva signálu na hmotě 75. Z poměru signálů v jednotkách cps (counts) na hmotách 75/150 se vypočítá pro každý čistý standard na dané koncentrační hladině faktor. Tyto tři stanovené faktory se zprůměrují a vloží ve tvaru interferenční rovnice do měřicí metody. Pokud v rovnici mají být zahrnuty oba interferenty, je nutné uvažovat jejich společný příspěvek na izotopu 150. Stanoví se samostatně faktor např. pro Nd (150) a samostatně pro Sm (150). Příspěvek Sm se pak dopočítá z izotopového poměru přírodního zastoupení $\text{Sm}(150)/\text{Sm}(147) = 0,49$ (7,38 %/14,99 %), ve výsledku tj. faktor $\text{Sm}(150) \times 0,49$. Vliv Sm bývá obvykle podstatně nižší a není nezbytně nutné jej vždy do korekční rovnice zahrnovat.

Příklad interferenční rovnice pro měření As metodou ICP-MS lze uvádět ve tvaru:

75: $[75] \times 1 - [150] \times \text{faktor pro Nd} - [147] \times \text{faktor pro příspěvek Sm}$ (viz výše).

Výsledky stanovení obsahu As v He kolizním módu s využitím matematické korekční rovnice jsou uvedeny pro čisté roztoky As v tabulce č. 10 a pro mineralizáty vzorků krmných fosfátů v tabulce č. 11.

Tabulka č. 10. Ověření možnosti korekční rovnice vlivu Nd²⁺ (150) na izotopu As (75) pro čisté roztoky As v 2% HNO₃ (v/v) o koncentraci 5 µg/l.

Standardní roztok As (µg/l)	As (75)	Korekční rovnice
	c (µg/l)	$\text{As } 75 = (75) \times 1 - (150) \times 0,01545$
As 5 + Nd 0	5,038	vyhovuje
As 5 + Nd 1	5,135	vyhovuje
As 5 + Nd 5	5,160	vyhovuje
As 5 + Nd 10	5,025	vyhovuje
As 5 + Nd 20	5,019	vyhovuje
As 5 + Nd 50	5,012	vyhovuje
As 5 + Nd 100	4,566	rovnice selhává
As 5 + Nd 200	3,949	rovnice selhává
As 5 + Nd 400	3,429	rovnice selhává

Tabulka č. 11. Porovnání měření obsahu As v He kolizním módu s využitím a bez využití korekční rovnice na izotopu As (75) v závislosti na obsahu Nd a Sm.

Mineralizace 10M HNO ₃ 2 g/100 ml	75 As He mód interferenční rovnice: 75: $(75) \times 1 - (150) \times 0,01545$ (mg/kg)	75 As He mód bez korekce (mg/kg)	146 Nd He mód (mg/kg)	147 Sm He mód (mg/kg)
IRM 1302	1,801	3,941	32,010	5,197
1306	7,473	7,539	0,329	0,087
1307	rovnice selhává	13,914	262,958	40,092
1308	2,824	3,281	5,568	1,622
1309	rovnice selhává	15,518	289,142	43,597
1310	0,928	2,266	16,199	5,259
1311 CRM indicative value 9,5 ± 0,5 (mg/kg)	9,957	14,648	70,981	14,031

3.3 Porovnání stanovení obsahu celkového As vybranými způsoby mineralizace vzorku a vybranými optickými metodami

Celkový obsah As ve vzorcích krmných fosfátů byl stanoven třemi vybranými způsoby mineralizace vzorků (obrácená lučavka královská, 10M HNO₃, mikrovlnný tlakový rozklad v HNO₃) a třemi dostupnými optickými analytickými metodami (ICP-MS, ICP-OES, HG-AAS). Uvedenými mineralizačními postupy byl každý vzorek mineralizován vždy ve třech paralelních stanoveních, ze kterých byl stanoven průměrný výsledek.

V tabulce č. 12 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu celkového As po mineralizaci vzorků krmných fosfátů v 10M HNO₃, v tabulce č. 13 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu

celkového As po mineralizaci v obrácené lučavce královské a v tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu celkového As mikrovlnným rozkladem v HNO₃ za zvýšeného tlaku.

Tabulka č. 12. Mineralizace vzorků krmných fosfátů v 10M HNO₃.

10M HNO₃ 2 g/100 ml	As	As	As	As
Vzorek	ICP-MS s celou He mód (mg/kg)	ICP-MS bez kolizní cely (mg/kg)	ICP-OES (mg/kg)	HG-AAS (mg/kg)
IRM 1302	3,941	2,680	2,395	2,007
1306	7,539	7,843	7,190	6,899
1307	13,914	2,527	4,390	0,610
1308	3,281	3,080	2,993	2,975
1309	15,499	2,713	4,908	0,634
1310	2,266	1,289	1,087	1,056
1311 CRM	14,896	11,814	11,940	8,745
CRM indicative value	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5

Tabulka č. 13. Mineralizace vzorků krmných fosfátů v obrácené lučavce královské.

Obrácená lučavka 3 g/100 ml	As	As	As
Vzorek	ICP-MS He mód (mg/kg)	ICP-OES (mg/kg)	HG-AAS (mg/kg)
IRM 1302	4,799	3,032	2,759
1306	7,408	6,843	6,964
1307	13,850	4,037	0,607
1308	3,117	2,878	2,959
1309	14,554	4,619	0,543
1310	2,158	1,065	0,927
1311 CRM	14,889	11,539	8,824
CRM indicative value	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5

Tabulka č. 14. Mikrovlnná mineralizace vzorků krmných fosfátů v HNO₃ za zvýšeného tlaku.

MW rozklad v HNO ₃ 0,5 g/25ml	As	As	As
	ICP-MS He mód (mg/kg)	ICP-OES (mg/kg)	HG-AAS (mg/kg)
Vzorek			
IRM 1302	4,480	2,908	2,478
1306	7,012	6,593	6,873
1307	13,231	3,702	0,530
1308	2,185	1,777	1,806
1309	13,414	4,388	0,479
1310	2,120	1,105	1,051
1311 CRM	14,427	10,877	9,347
CRM indicative value	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5

3.4 Porovnání mineralizačních postupů pro stanovení obsahu celkového As metodami ICP-OES a HG-AAS

Metody ICP-OES a HG-AAS nejsou tak významně zatíženy vlivem obtížných interferencí pozorovatelných u metody ICP-MS. Obě optické instrumentální metody lze využít pro stanovení obsahu As ve vzorcích krmných fosfátů.

Tabulka č. 15. Porovnání mineralizačních postupů pro stanovení obsahu As metodou ICP-OES.

Vzorek krmiva	Obrácená lučavka	10M HNO ₃	MW rozklad HNO ₃
	ICP-OES (mg/kg)	ICP-OES (mg/kg)	ICP-OES (mg/kg)
IRM 1302	3,032	2,395	2,908
1306	6,843	7,190	6,593
1307	4,037	4,390	3,702
1308	2,878	2,993	1,777
1309	4,619	4,908	4,388
1310	1,065	1,087	1,105
1311 CRM	11,539	11,940	10,877

Tabulka č. 16. Porovnání mineralizačních postupů pro stanovení obsahu As metodou HG-AAS.

Vzorek krmiva	Obrácená lučavka	10M HNO ₃	MW rozklad HNO ₃
	HG-AAS (mg/kg)	HG-AAS (mg/kg)	HG-AAS (mg/kg)
IRM 1302	2,759	2,007	2,478
1306	6,964	6,899	6,873
1307	0,607	0,610	0,530
1308	2,959	2,975	1,806
1309	0,543	0,634	0,479
1310	0,927	1,056	1,051
1311 CRM	8,824	8,745	9,347

3.5 Porovnání vybraných mineralizačních postupů pro stanovení obsahu celkového As metodou ICP-MS (single quadrupole)

Pro stanovení obsahu rizikových prvků v krmivech se v laboratoři Odboru NRL Brno rutinně využívá instrumentace ICP-MS. V tabulce č. 17 je uvedeno porovnání výsledků stanovení obsahu As třemi použitými mineralizačními postupy měřenými metodou ICP-MS v He kolizním módu.

Tabulka č. 17. Porovnání mineralizačních postupů pro stanovení obsahu As metodou ICP-MS.

Vzorek krmiva	Obrácená lučavka	10M HNO ₃	MW rozklad HNO ₃
	ICP-MS He mód (mg/kg)	ICP-MS He mód (mg/kg)	ICP-MS He mód (mg/kg)
IRM 1302	4,799	3,941	4,643
1306	7,408	7,539	7,198
1307	13,850	13,914	13,291
1308	3,117	3,281	2,443
1309	14,554	15,499	14,261
1310	2,158	2,266	2,120
1311 CRM	14,889	14,648	14,427

3.6 Stanovení obsahu As ve vzorcích defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého (DFP) metodou ICP-MS/MS (triple quadrupole)

Výskyt matrice vzorku defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého přispěl k odhalení výskytu velmi významné falešně pozitivní interference při stanovení As, způsobené přítomností prvků vzácných zemin v matrici vzorku, která se projeví zejména v He kolizním módu při měření metodou ICP-MS. Z tohoto důvodu laboratoř využila možnost porovnat získané výsledky z přístroje ICP-MS 7500ce (Agilent) s jednoduchým kvadrupólem na přístroji s vysokou citlivostí s trojitým kvadrupólem ICP-MS/MS. Na pracovišti RNDr. Jitky Hegrové v Centru Dopravního Výzkumu (CDV) Brno se uskutečnilo měření na přístroji ICP-QQQ 8800 (Agilent).

Výsledky stanovení obsahu As ve vzorcích defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého, které obsahují vysoké koncentrace prvků vzácných zemin, jsou uvedeny v tabulce č. 18 pro oba typy instrumentace: ICP-MS a ICP-MS/MS. Pro účely demo měření byly použity mineralizáty této matrice vzorku připravené v obrácené lučavce královské a v 10M HNO₃. Pro doplňující informaci o matrici vzorku DFP jsou v tabulkách č. 19 a č. 20 uvedeny i výsledky porovnání měření obsahu dalších sledovaných rizikových prvků (Cd, Pb) na obou typech ICP-MS instrumentace, měřené v různých módech oktapólové kolizní/reakční cely. Je nutné poznamenat, že i když jsou oba přístroje vybaveny stejným typem kolizní/reakční cely, její funkce může být rozdílná vzhledem ke stupni technického vývoje cely.

Tabulka č. 18. Porovnání měření obsahu As ve vzorcích DFP instrumentací ICP-MS (Agilent 7500ce) a ICP-MS/MS (Agilent QQQ 8800) v různých módech.

As mineralizát	CDV Brno ICP-MS/MS 75 As	CDV Brno ICP-MS/MS 75 As	CDV Brno ICP-MS/MS 75 As	CDV Brno ICP-MS/MS 75 As	CDV Brno ICPMS/MS 75 > 91 As	NRL ÚKZÚZ Brno ICP-MS 75 As
	no gas mód	He mód	high energy He mód	H ₂ mód	mass shift O ₂ mód	He mód
10M HNO₃	c(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	2,437	3,061	2,727	11,966	2,091	3,889
1307	1,623	6,778	5,720	5,612	0,586	13,618
1309	1,749	7,531	6,605	6,426	0,610	15,348
1311 CRM	9,638	12,500	10,984	8,479	9,585	14,167
CRM indicative value	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5
Obrácená lučavka	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	3,217	3,817	3,487	15,406	2,834	4,919
1307	1,917	6,534	5,555	6,583	0,631	13,488
1309	2,178	7,350	6,110	7,321	0,623	14,254
1311 CRM	11,150	12,785	11,057	11,340	10,220	14,862
CRM indicative value	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5

Tabulka č. 19. Porovnání měření obsahu Cd ve vzorcích DFP instrumentací ICP-MS (Agilent 7500ce) a ICP-MS/MS (Agilent QQQ 8800) v různých módech.

Cd mineralizát	CDV Brno ICP-MS/MS 111 Cd	CDV Brno ICP-MS/MS 111 Cd	CDV Brno ICP-MS/MS 111 Cd	NRL ÚKZÚZ Brno ICP-MS 111 Cd
	no gas mód	He mód	H ₂ mód	He mód
10M HNO₃	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	0,143	0,137	0,210	0,139
1307	0,028	0,041	0,167	0,035
1309	0,017	0,023	0,144	0,015
1311 CRM	19,313	20,655	16,946	20,244
CRM indicative value	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7
Obrácená lučavka	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	0,132	0,150	0,263	0,120
1307	0,012	0,013	0,436	0,038
1309	0,012	0,010	0,582	0,008
1311 CRM	20,153	19,887	16,746	20,387
CRM indicative value	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7	20,8 ± 0,7

Tabulka č. 20. Porovnání měření obsahu Pb ve vzorcích DFP instrumentací ICP-MS (Agilent 7500ce) a ICP-MS/MS (Agilent QQQ 8800) v různých módech.

Pb mineralizát	CDV Brno ICP-MS/MS 208 Pb	CDV Brno ICP-MS/MS 208 Pb	CDV Brno ICP-MS/MS 208 Pb	NRL ÚKZÚZ Brno ICP-MS 208 Pb
	no gas mód	He mód	H ₂ mód	He mód
10M HNO₃	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	3,462	3,518	3,074	3,624
1307	1,125	1,166	1,028	1,213
1309	0,498	0,520	0,468	0,541
1311 CRM	4,421	4,612	4,045	4,372
CRM additional value	5,4	5,4	5,4	5,4
Obrácená lučavka	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
IRM 1302	3,688	3,830	3,358	3,872
1307	0,222	0,243	0,227	0,255
1309	0,241	0,265	0,241	0,268
1311 CRM	14,478	14,669	12,845	15,064

4 Závěr

Byly porovnány vybrané mineralizační postupy, které lze využít pro stanovení obsahu celkového As ve vzorcích minerálních krmiv na bázi fosfátové matrice. Pro ověření bylo vybráno celkem 5 vzorků fosfátových krmných surovin odebraných při úřední kontrole krmiv. Výsledky byly ověřeny analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR-032 na bázi fosfátové horniny. V souboru analyzovaných vzorků byla zvýšená pozornost věnována vzorku defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého DFP, který vykazoval velké rozdíly v naměřených hodnotách obsahu celkového As různými optickými analytickými metodami.

Ukázalo se, že problém stanovení obsahu As ve vzorcích krmných fosfátů nespočívá ve způsobu mineralizace vzorků, ale především ve spektrálních interferencích, kterými jsou jednotlivé optické analytické metody zatíženy, a to zejména u matričně komplikovaných vzorků.

4.1 Vliv mineralizace vzorků

Z výsledků lze vyvodit, že všechny ověřené způsoby mineralizace vzorků za atmosférického tlaku při zvýšené teplotě (10M HNO₃, obrácená lučavka královská) jsou pro mineralizaci As ve fosfátové matici možné. Výsledky získané oběma mineralizačními postupy jsou podle míry extrahovatelnosti As srovnatelné. To bylo prokázáno všemi optickými instrumentálními metodami (ICP-OES, ICP-MS, HG-AAS) měření.

Lze také použít mineralizaci vzorků minerálních krmiv mikrovlnným rozkladem za zvýšeného tlaku v HNO₃. Problém však představuje zejména malá navážka vzorku minerálních krmiv (obvykle 0,25 g až 0,5 g vzorku). Ze všech výsledků měření vykazoval tento způsob mineralizace celkově největší rozdíly ve třech paralelních stanoveních z jednotlivých navážek. Proto je možné jej využít jako alternativní možnost mineralizace minerálních krmiv při důsledném zabezpečení podmínek homogenity vzorku. Pro rutinní použití pro účely úřední a cílené kontroly krmiv by bylo nutné provádět stanovení obsahu As v minerálních krmivech (a současně dalších rizikových prvků) vždy nejméně ve třech paralelních stanoveních, což by pro laboratorň bylo časově náročné. V neposlední řadě je nutné přihlídnout i ke skutečnosti, že mikrovlnným rozkladem se rutinně mineralizují vzorky krmných směsí s koncentračně velmi nízkými obsahy rizikových prvků. Z tohoto pohledu je nutné zabránit možné křížové kontaminaci křemenných (nebo obecně teflonových nádobek) u různých MW systémů, které by měly být vyčleněny pro krmné směsi na bázi organické matrice a pro minerální krmiva s vyššími nebo vysokými obsahy rizikových prvků. Je nutné důrazně dbát na postupy čištění laboratorního skla a rozkladných nádobek.

4.2 Vliv instrumentálního měření

Při ověření instrumentálních metod měření obsahu As v mineralizátech fosfátových krmiv byly patrné výrazné rozdíly v získaných výsledcích. Obecně metody ICP-OES a HG-AAS vykazovaly srovnatelnější výsledky, metoda ICP-MS vykazuje výsledky měření obsahu As obecně poněkud vyšší, viz tabulky č. 12, 13 a 14.

Z výsledků dále vyplývá, že metoda ICP-MS s použitím kolizní cely s He jako kolizním plynem může být zdrojem falešně pozitivního nadhodnocení výsledků. Princip funkce kolizní cely je velmi spolehlivý při odstranění běžných polyatomických interferencí, ale nemusí být zcela spolehlivý pro jiné spektrální interference v rámci ICP-MS měření.

Největší rozdíly ve výsledcích obsahu As byly pozorovány u vzorku matrice defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého DFP. Vzorky 1307 a 1309 se ukázaly jako nová neznámá matrice krmné suroviny, jež se přidává do krmiv z důvodu biodostupné suplementace fosforem. Rozdíly ve výsledcích byly zřejmé u všech použitých optických analytických metod (ICP-MS, ICP-OES, HG-AAS).

Původ obou vzorků však prokázal výskyt velmi nestandardní matrice, která se projevila přítomností masivní interference při měření obsahu As metodou ICP-MS, resp. u této instrumentální metody byl její negativní vliv pozorován nejvíce. Jedná se o interferenci způsobenou přítomností dvojnásobně nabitých iontů pocházejících z prvků vzácných zemin (především Nd a Sm) obsažených v matrici vzorku ve vysokých koncentracích. Z výsledků dále vyplývá, že i při dokonalém ladění přístroje ICP-MS na co nejnižší poměr dvojnásobně nabitých iontů při jeho optimalizaci, není možné této spektrální interferenci zabránit, pokud se vyskytnou prvky vzácných zemin ve vysokých koncentracích, tj. v koncentracích (10 – 100) mg/kg. U vzorků, ve kterých byl obsah prvků vzácných zemin nízký, řádově v jednotkách mg/kg (1306, 1308, 1310) byly výsledky u všech optických metod srovnatelné nebo byly z hlediska citlivosti jednotlivých metod velmi blízké (viz tabulky č. 12, 13 a 14). Zajímavé je zjištění, že i vzorek interního referenčního materiálu IRM 1302 na bázi minerálního krmiva (obchodní název MK A2 super) obsahuje prvky vzácných zemin, tzn. obsah As stanovený metodou ICP-MS v He módu je vyšší ve srovnání s metodou ICP-OES, příp. HG-AAS. A samozřejmě i vzorek CRM rock phosphate (BCR-032) obsahuje významný podíl prvků vzácných zemin, které způsobují tyto spektrální interference, což potvrdily výsledky ze všech mineralizačních postupů měřených metodou ICP-MS. Přítomnost prvků vzácných zemin tedy nelze obecně v matrici krmiv jak minerálního, tak organického původu podceňovat. Výsledky ukázaly, že tyto prvky jsou poměrně často přítomné a mohou potenciálně interferovat již ve velmi nízkých koncentracích. Čím však je jejich obsah ve vzorku vyšší, tím jejich negativní spektrální vliv zcela neúměrně narůstá. To názorně dokazují výsledky viz tabulky č. 8 a 9, které zobrazují

falešně pozitivní nárůst koncentrace As u čistých standardních roztoků vlivem vzrůstající koncentrace Nd a Sm.

Překvapivé výsledky byly u metody ICP-MS pozorovány při měření v tzv. no gas módu, tedy způsobem bez využití kolizní/reakční cely pro odstranění interferencí, viz tabulka č. 12. Tento fakt zatím není zcela jednoznačně objasněn, nicméně výsledky měření bez kolizní cely lze interpretovat jako „správnější“. Jako možné vysvětlení se jeví skutečnost, že v kolizní cele s kolizním plynem He dochází k určitým neznámým reakcím a vzniku nových reakčních produktů, které poruší iontovou rovnováhu a v případě přítomnosti dvojnásobně nabitých iontů způsobí falešně pozitivní nadhodnocení signálu na izotopu As (75). Způsob měření bez kolizní cely v no gas modu je však možný pouze v případě, že matrice vzorku neobsahuje další interferenty způsobující tvorbu polyatomů a zejména neobsahuje chloridové ionty z mineralizační směsi (nutný rozklad v 10M HNO₃ nebo MW) nebo z matrice vzorku.

Jako možné spolehlivé řešení interferencí na izotopu As(75) se jeví zavedení interferenční rovnice, která zahrnuje korekci na dvojnásobně nabité ionty, viz tabulka č. 11. Měřit lze jak s kolizní celou, tak bez kolizní cely v no gas modu. Platnost korekční rovnice je nutné ověřit nejlépe vždy pro dané instrumentální nastavení při každém měření. Výsledky stanovení obsahu As jsou z hlediska výtěžnosti CRM správné a je zde pozorovatelný rozdíl oproti měření bez využití korekční rovnice. Nicméně výsledky opět prokázaly, že u vysokých obsahů prvků vzácných zemin není ani tento způsob řešení ideální, protože korekční rovnice selhává a stanovení obsahu As v koncentracích řádu jednotek µg/l v matrici vzácných zemin řádu stovek µg/l není možné.

Jako doplňující a velmi užitečné se ukázalo stanovení obsahu As metodou ICP-MS/MS, které bylo provedeno jako demo měření na pracovišti Centra Dopravního Výzkumu Brno, viz tabulka č. 18. Měření As v různých módech poskytlo také na tomto vysoce citlivém přístroji velmi odlišné výsledky. Opět byl potvrzen předpoklad vlivu velmi silných interferencí dvojnásobně nabitými ionty prvků vzácných zemin Sm a Nd, které mají společný izotop 150. Z tohoto ověření jednoznačně vyplývá, že jediným spolehlivým způsobem k účinnému odstranění interferencí na izotopu As (75) je vhodný reakční kyslíkový mód s posunem na produktový iont reakce As (75)O⁺(16), tedy jako molekulový iont AsO⁺(91), měření v tzv. „mass shift“ módu. Měření v reakčním modu s reakčním plynem O₂ využívá vysoké reaktivity As s kyslíkem

a naopak velmi nízké reaktivity Sm a Nd. Měření v MS/MS módu zajistí dokonalé odstranění jiných interferujících iontů na hmotě 91 (např. Zr⁺).

Výsledky stanovení As byly doplněny také o další sledované rizikové prvky (Cd, Pb) z hlediska splnitelnosti maximálních limitů legislativy EU. Z tohoto pohledu poskytly oba přístroje ICP-MS (Agilent ICP-MS 7500ce) a ICP-MS/MS (Agilent ICP-QQQ 8800) zcela srovnatelné výsledky, viz tabulky č. 19 a 20.

Jako překvapivé se ukázalo, že pravděpodobná skutečná hodnota obsahu As ve vzorcích defluorizovaného fosfátu sodno-vápenatého DFP (vzorky 1307 a 1309) se nachází v koncentraci asi 0,6 mg/kg, viz tabulka č. 18. Tento výsledek byl dosažen jak v mineralizátu v 10 M HNO₃, tak v mineralizátu obrácené lučavky královské měřením metodou ICP-MS/MS v kyslíkovém reakčním módu. Z dostupné instrumentace v NRL ÚKZÚZ byla nejlepší shoda nalezena s metodou HG-AAS (viz výsledky tabulky č. 12, 13 a 14), kterou lze tedy považovat za jednak velmi citlivou metodu z hlediska dosažitelných nízkých mezí stanovitelnosti, ale i z hlediska selektivity potlačení vlivu interferencí. Z tohoto pohledu jsou obě metody ICP-MS i ICP-OES zatíženy vlivem spektrálních interferencí významněji. U metody ICP-OES nebyl vliv případných interferencí předmětem řešení této práce.

Je důležité zdůraznit, že předmětem této práce byla výhradně minerální krmiva na bázi fosfátové matrice, celkem pouze pět typů vzorků krmných fosfátů. Pro širokou škálu matic minerálních krmiv (krmných surovin) je nutné výsledky stanovení As a případně dalších rizikových prvků (Cd, Pb, Cr, Ni) ověřit v jiné samostatné práci.

Z hlediska splnitelnosti maximálních limitů pro obsah celkového As podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech, lze konstatovat, že všechny vzorky fosfátových krmiv analyzované v této práci vyhovují maximálnímu limitu 10 mg/kg v krmivu s 12% vlhkostí pro kategorii fosfáty.

Vliv interferencí dvojnásobně nabitými ionty prvků vzácných zemin nelze ve složitých maticích krmiv podceňovat. Při rutinním stanovení obsahu celkového As metodou ICP-MS, zejména ve vzorcích minerálních krmiv, je nezbytné monitorovat ve zmineralizovaných vzorcích také obsah prvků vzácných zemin. Pokud bude obsah těchto prvků přítomen ve vyšších koncentracích, tj. (10 – 100) mg/kg, doporučuje se provést kontrolní měření s využitím interferenční rovnice na izotopu As (75), případně měřením bez kolizní cely v tzv. no gas modu. Jako jediné zcela spolehlivé řešení pro stanovení obsahu As v komplikovaných

krmných matricích lze doporučit využití instrumentace ICP-MS/MS v kyslíkovém reakčním módu, která je však velmi ekonomicky náročná. Jako alternativní instrumentální techniku lze použít vysoce selektivní metodu HG-AAS s možností stanovení velmi nízkých koncentrací As nebo metodu ICP-OES, pokud je však při ní dosaženo požadované citlivosti u vzorků s velmi nízkým obsahem As (kolem 1 mg/kg).

V NRL ÚKZÚZ lze jako vhodný postup stanovení As při výskytu komplikované matrice fosfátových krmiv doporučit postup dosavadního používaného způsobu mineralizace vzorků v obrácené lučavce královské a měření metodou ICP-MS se single quadrupelem za současného monitorování obsahu Nd a Sm. Pokud bude obsah těchto prvků v mineralizátech do 10 mg/kg, lze výsledek stanovení As metodou ICP-MS považovat za správný. Pokud bude obsah těchto prvků v mineralizátech v rozsahu (10 – 100) mg/kg, použije se korekční rovnice na hmotě As (75) se zahrnutým vlivem Nd a Sm. Pokud bude obsah těchto prvků v mineralizátech v koncentracích nad 100 mg/kg a korekční rovnice na hmotě As (75) nebude poskytovat měřitelné hodnoty, použijí se pro stanovení obsahu As metody ICP-OES nebo HG-AAS, které nejsou vlivem interferencí těmito prvky zatíženy.

5 Literatura

1. Kolektiv specialistů NRL: JPP ÚKZÚZ Zkoušení krmiv, postupy 10430.1, 10440.1, 10470.1.
2. Ernest Walton, Terri White: Rare Earth Element Interferences in Collision Cell and Standard Mode ICP-MS Analyses of Arsenic and Selenium, Environmental Protection Agency, USA, web prezentace, 2015.
3. Koen Binnemans, Peter Tom Jones, Bart Blanpain, Tom Van Gerven, Yiannis Pontikes: Towards zero-waste valorisation of rare-earth-containing industrial process residues: a critical review, Journal of Cleaner Production, 99 (2015), 17-38.
4. Krzysztof Kozłowski, Jörg Senf: Availability of calcium sodium phosphate (DFP) for poultry, Feed Magazine/Kraftfutter 9-10, 2016.
5. Brian Jackson, Amir Liba, Jenny Nelson: Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2014.
6. Ivo Novotný, Martin Juříček, HPST: Tandemová hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS/MS) – analýza bez interferencí, ChromAtoMol č. 3, 2016.
7. Agilent Technologies, ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A primer, 2005.
8. Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech, Úřední věstník Evropské unie, Příloha I, 2002.

Zavedení extrakce DNA z rostlinného materiálu založené na CTAB podle ČSN EN ISO 21571

Jana Stehlíková

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

jana.stehlikova@ukzuz.cz

1 Úvod

Cílem této práce bylo zavedení extrakce rostlinné DNA podle ČSN EN ISO 21571 Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny, bod A.3 Příprava DNA v kvalitě pro PCR s využitím metody extrakce DNA založené na CTAB.

Koncentrace, kvalita a amplifikovatelnost DNA byla ověřena podle platných JPP ÚKZÚZ, postup č. 10250.1 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR.

Tato metoda bude využívána pro extrakci DNA z certifikovaných referenčních materiálů (CRM) a vzorků jako další možný postup vedle již zavedených JPP pro extrakci DNA pomocí komerčních kitů.

Za dobu provádění stanovení GMO na pracovišti OdMB se potvrdilo, že extrakce DNA pomocí zavedených kitů je pro potřeby kvalitativního stanovení GMO klasickou PCR vyhovující, a to z hlediska čistoty, koncentrace i časové náročnosti provedení. V rámci zavádění kvalitativního a kvantitativního stanovení GMO pomocí RT-PCR (qPCR) se ale ukázala potřeba vyšších koncentrací DNA, a to zejména u CRM, které se používají pro přípravu kalibračních křivek. Z některých CRM je výtěžek DNA dostatečně vysoký i při použití již zavedených postupů (minimálně 40 ng/μl, v ideálním případě nad 100 ng/μl). U některých CRM je ale získání dostatečné koncentrace problematické. Jedná se zejména o sóju, rýži a řepku. Nově zaváděná metodika extrakce pomocí CTAB (hexadecyl-trimethylamonium bromidu) je běžně používaná

metoda v oblasti analýz GMO a umožňuje získání vyšší koncentrace DNA s dostatečnou čistotou pro analýzy GMO pomocí PCR.

Pro zavedení byly využity referenční materiály.

2 Materiál a metody

Základem této metody je extrakce DNA z rostlinného materiálu, založená na teplotní lyzi v přítomnosti CTAB, která je následována několika extrakčními kroky, které odstraňují kontaminanty jako jsou polysacharidy a fenolické látky. Koncentrace a čistota získané DNA se vyhodnocuje pomocí spektrofotometru, kvalita se určuje gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu, amplifikovatelnost se ověřuje pomocí PCR reakce (vnitřní – referenční gen, případně screeningové elementy a deklarovaný transgen).

Pro zavedení byly použity certifikované referenční materiály, které byly již dříve v laboratoři izolovány pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL), byla otestována jejich kvalita, koncentrace i amplifikovatelnost. Tyto izoláty DNA byly použity při jednotlivých amplifikacích jako pozitivní kontroly (PK).

2.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pH metr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem, (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230; 260; 280) nm.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pH metr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem, (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky (0,2; 0,5; 2) ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

2.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA

Etanol, (96 – 100)% pro UV.

Etanol, denaturovaný.

Voda vhodná pro PCR.

RNáza A, bez DNáza proteáz, cca 50 jednotek/mg lyofilizátu.

α -amyláza (volitelná), typ IIa z *Bacillus spp.* (1500 – 3000) jednotek/mg bílkovin.

Chloroform.

Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotertraoctové (Na_2EDTA).

Hexadecyl-trimethylamonium bromid (CTAB).

Kyselina chlorovodíková, 37%.

Isopropanol.

Proteináza K, asi 20 jednotek/mg lyofilizátu.

Chlorid sodný.

Hydroxid sodný.

Tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris).

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok $1 \times \text{TAE}$ pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

$6 \times \text{Loading Dye Solution}$.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ LoadTM Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq[®] ReadyMix[™] PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Screening promotor 35S: 35s-cf3/35s-cf4

F: CCA CGT CTT CEE AGC AAG TGG

R: TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C

Screening terminátor NOS : NOS-1/NOS-3

F: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG

R: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA

Screening gen CP4 epsps : GT73TmF/ GT73-TmR

F: GGG ATG ACG TTA ATT GGC TCT G

R: GGC TGC TTG CAC CGT GAA G

VG rýže: KVM159/KVM160

F: TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT

R: CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C

VG řepka: MDB510F, MDB511 R

F: GGC CAG GGT TTC CGT GAT

R: CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG

VG kukuřice: IVRI-F/IVRI-R

F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC

R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C

MON88017: MON 88017 AF/ MON 88017 AR

F: GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT

R: TCC GGA GTT GAC CAT CCA

VG sója: GMO-3/GMO-4

F: GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC G

R: GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG

MON40-3-2: 35s-f2/petu-rl

F: TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G

R: TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T

2.3 Vzorky

Pro extrakci DNA byly použity certifikované referenční materiály rýže, řepky, kukuřice a sóji od JOINT RESEARCH CENTRE, Intitute for Reference Materials and Measurements (ERM) a American Oil Chemist's Society (AOCS).

Rýže: IRM 1/2010 (non modified)

Řepka: CRM 5/2006 (AOCS 0304A, non modified)

Kukuřice: CRM 15/2014 (AOCS 0406A, non modified), CRM 31/2012 (AOCS 0406D MON87017, 100 %)

Sója: CRM 19/2014 (AOCS 0906A, non modified), CRM 5/2015 (ERM-BF 410bk, MON40-3-2, 0,1%), CRM 6/2015 (ERM-BF 410dk, MON40-3-2, 1%).

2.4 Pracovní postup

2.4.1 Extrakce DNA

Příprava pufrů a roztoků

CTAB – extrakční pufr

Postupně se naváží 20 g hexadecyl-trimethylamonium bromidu (CTAB), 82 g NaCl, 7,44 g Na₂EDTA a 12,1 g Tris(hydroxymethyl) aminomethanu a za stálého míchání a mírného zahřátí se rozpustí v asi 800 ml destilované vody. Po vychladnutí na laboratorní teplotu se upraví pH na hodnotu 8,0 pomocí 1M HCl. V odměrné baňce se roztok doplní do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

CTAB – precipitační pufr

Postupně se naváží 5 g hexadecyl-trimethylamonium bromidu (CTAB) a 2,34 g NaCl a za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml destilované vody. V odměrné baňce se roztok

doplní do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

Roztok α -amylázy

Používá se roztok o koncentraci 10 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se rozpipetuje do zkumavek po asi 30 μ l a uchovává při -20 °C do použití. Je třeba zabránit opakovanému rozmrazování.

Roztok ribonukleázy A

Používá se roztok o koncentraci 10 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se uchovává při -20 °C (podle pokynů výrobce).

Roztok proteinázy K

Používá se roztok o koncentraci 20 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se rozpipetuje do zkumavek po asi 30 μ l a uchovává při -20 °C do použití. Je třeba zabránit opakovanému rozmrazování.

Roztok 1,2 M NaCl

Naváží se 70,13 g NaCl a za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml destilované vody. V odměrné baňce se roztok doplní do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

TE pufr

Naváží se 1,21 g Tris(hydroxymethyl) aminomethanu a 0,34 g Na₂EDTA za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml destilované vody. Hodnota pH se upraví 8,0 pomocí 1M HCl nebo 1M NaOH. V odměrné baňce se roztok doplní do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

Roztok 1M HCl

83,3 ml 37% HCl se převede do 1000 ml odměrné baňky částečně naplněné destilovanou vodou a následně se doplní destilovanou vodou po značku.

Roztok 1M NaOH

40 g NaOH se rozpustí v destilované vodě a v 1000 ml odměrné baňce se doplní destilovanou vodou po značku.

Vlastní CTAB metoda

Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zamezilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikropipetkami DNA, které se mohou uvolnit při pipetování a otvírání zkumavek dotekem víček zkumavek jedné po druhé apod. Proto je třeba přizpůsobit veškeré operace prevenci kontaminace.

Do každého běhu izolace DNA je nutno zařadit tzv. kontrolu izolace (dále KI), tj. slepý vzorek bez rostlinného materiálu. KI slouží k ověření čistoty reagentů během izolace a vyloučení kontaminace vzorků během izolace.

Při manipulaci s organickými rozpouštědly je nutné použít digestoř.

Extrakce vzorku

Do zkumavky (2 ml) se naváží 0,2 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,01 g.

Přidá se 1500 μ l CTAB extrakčního pufru předeřátého na 65 °C a promíchá se jemně na vortexu.

Ke vzorku se přidá 10 μ l ribonukleázy A o koncentraci 10 mg/ml, v případě vysokého obsahu škrobu se přidá 10 μ l α -amylázy o koncentraci 10 mg/ml, volitelné – nebylo použito) a promíchá se jemně na vortexu. Vzorek se inkubuje 30 min za stálého míchání při 65 °C v termobloku.

Ke vzorku se přidá 10 μ l proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml, jemně se promíchá. Vzorek se inkubuje 30 min za stálého míchání při 65 °C v termobloku.

Vzorek se centrifuguje 10 min. při (12000 – 14000) g.

Do nové zkumavky (2 ml) se napipetuje 850 μ l chloroformu a přidá se (1150 – 850) μ l supernatantu [s : ch = 1 : (0,7 – 1)]. Zkumavka se důkladně protřepe (mléčné zbarvení).

Vzorek se centrifuguje 15 min. při (12000 – 14000) g.

Precipitace CTAB

Do nové zkumavky se napipetuje 1300 μ l CTAB precipitačního roztoku vytemperovaného na laboratorní teplotu a přidá se 650 μ l supernatantu (horní, vodné fáze po centrifugaci z předešlého kroku). 1 objem supernatantu: 2 objemy precipitačního roztoku.

Inkubuje se 60 min při laboratorní teplotě bez míchání.

Centrifuguje se 15 min při (12000 – 14000) g.

Supernatant se opatrně odstraní vylitím, je-li třeba, odsaje se zbytek pipetou.

Precipitát DNA se rozpustí v 350 µl 1,2M NaCl.

Přidá se 350 µl chloroformu a důkladně se protřepe (mléčné zbarvení).

Centrifuguje se 10 min při asi 12000 g.

Do nové zkumavky se převede 350 µl vodné fáze (obsahuje nukleové kyseliny).

Precipitace DNA

Do zkumavky s vodnou fází se přidá 420 µl isopropanolu (0,6 objemu vzorku) a opatrně se promíchá převrácením zkumavky.

Inkubuje se bez pohybu 20 min při pokojové teplotě.

Centrifuguje se 15 min při asi 12000 g.

Supernatant se opatrně odstraní vylitím.

Do zkumavky se přidá 500 µl 70% etanolu, zkumavka se několikrát převrátí pro odstranění zbytků CTAB. Je důležité peletu uvolnit, aby se volně pohybovala.

Vzorek se centrifuguje 10 min při asi 12000 g.

Opatrně se vylije supernatant, případně se odsaje zbytek etanolu pipetou.

Pelet DNA se krátce vysuší a resuspenduje se ve 100 µl destilované vody nebo ve vhodném pufru, například TE pufru (bylo použito).

2.4.2 Měření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky podle JPP č. 10250.1

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

Vlastní měření

Koncentrace DNA se měřila proti blanku, ve kterém byla DNA rozpuštěna. Byl použit TE pufr. Použily se 2 μ l vzorku. Každý vzorek se měřil 2 $\times$. Tolerovaný rozdíl pro koncentrace do 100 ng/ μ l je 1 ng/ μ l, pro vyšší koncentrace jsou to 3 ng/ μ l. Naměřené hodnoty se zprůměrovaly.

2.4.3 PCR reakce podle JPP č. 10250.1

Příprava amplifikačních primerů

Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství následujícím způsobem. Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, se přidá PCR voda v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok o koncentraci 100 μ M, který se rozpipetuje po 50 μ l do zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu. Do reakční směsi se zásobní roztok dále ředí na pracovní roztok o koncentraci 20 μ M. Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem PCR vody. Rozdělí se po 15 μ l do zkumavek a zamrazí se v mrazicím boxu.

Polymerázová řetězová reakce

Připraví se PCR box: Dekontaminují se předměty i prostory od jakýchkoli molekul DNA – použije se UV záření po dobu 30 min a dekontaminační roztok.

Připraví se pipety, sterilní špičky a zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky a vybere se vhodný amplifikační kit. Pro jednoduchou PCR reakci se používá Amplifikační kit REDTaq. Stanoví se počet reakcí, tj. počet vzorků; kontroly: GM-pozitivní a beztemplátová, kontrola izolace (u amplifikace vnitřního genu); jedna reakce navíc (rezerva pro pipetovací chybu), případně další kontrolní a srovnávací vzorky. Podle tabulky 1 se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. PCR směs se připravuje na ledu.

Celková reakční směs se sterilně smíchá podle pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce 1. Zamíchá se jemným vortexováním a rozdělí se po daném počtu μ l do označených zkumavek.

Tabulka 1. Příprava PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR).

Složka	1 reakce (μl)
Voda vhodná pro PCR	5,5 – 6,5
REDTaq	12,5
Primer F	0,5 – 1,0
Primer R	0,5 – 1,0
Objem směsi bez templátu	20
Templátová DNA (izolát)	5,0
Objem směsi včetně templátu	25

Objem amplifikačního kitu REDTaq je neměnný. Objemy templátu, primerů a vody vhodné pro PCR se mohou měnit za účelem dosažení optimálního průběhu PCR reakce, přičemž voda pouze doplňuje reakci na požadovaný objem 25 μl.

Je-li koncentrace vyizolované DNA nad 10 ng/μl, ředí se na tuto koncentraci. Poté se do každé zkumavky přidá daný počet μl templátové DNA. Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola (místo templátové DNA se použije voda vhodná pro PCR), vzorky a pozitivní kontrola. Zkumavky s templátovou DNA se otvírají a s templátovou DNA se manipuluje až poté, kdy jsou všechny zkumavky s reagensy pro PCR uzavřeny a reakční směs je rozpipetována do PCR zkumavek. Zkumavky s templáty se otevírají pokud možno v tomto pořadí: vzorky – pozitivní kontrola.

Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během PCR. Zkumavky se vloží do termálního cykleru, zvolí se vhodný amplifikační program a přístroj se spustí dle návodu.

Po skončení práce se opět dekontaminují PCR box i pracovní pomůcky.

2.4.4 Elektroforéza v agarózovém gelu podle JPP č. 10250.1

Kvalita DNA

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

Příprava 0,8% agarózového gelu

Do Erlenmayerovy baňky se naváží 0,4 g množství práškové agarózy s přesností na 0,1 g a přidá 50 ml pracovního 1 × TAE pufru. Vaří se při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle asi (15 – 20) min až se roztok úplně vyčeří a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Zatím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek. Zuby hřebínku vytváří v tuhnoucím gelu jamky konstantní velikosti.

Po mírném zchladnutí se přidá 6,5 µl 1% pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadélko a agaróza se nalije do vany s hřebínkem. Po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, se opatrně vyjme hřebínek a přenesení gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem TAE pufru.

Vzorky se smíchají s barvivem 6 × Loading Dye Solution v množství 1 µl barviva a 5 µl vyizolované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek a spustí se elektroforéza (75 V, 85 min).

Po ukončení elektroforézy proběhne vizualizace výsledků elektroforézy pomocí transiluminátoru a fotodokumentačního zařízení.

Hodnocení amplifikačních fragmentů

Pro hodnocení amplifikačních fragmentů se používá 2% agarózový gel pro produkty velikosti nad 100 bp, 3% agarózový gel pro produkty velikosti do 100 bp.

Příprava 2 (3)% agarózového gelu: Do Erlenmayerovy baňky se naváží 1 (1,5) g množství práškové agarózy s přesností na 0,1 g a přidá 50 ml pracovního 1 × TAE pufru. Dále je příprava gelu stejná jako příprava 0,8% gelu.

Beztemplátová kontrola, vzorky, elektroforetický marker a pozitivní kontrola se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí v množství 5 µl a spustí se elektroforéza (75 V, 85 min).

Po ukončení elektroforézy proběhne vizualizace výsledků elektroforézy pomocí transiluminátoru a fotodokumentačního zařízení.

2.5 Výsledky a diskuse

Kvalita DNA

Pro zavádění metody extrakce DNA pomocí CTAB byly vybrány rostlinné druhy, které se v laboratoři běžně testují, a to rýže, řepka, kukuřice a sója. Veškeré použité referenční materiály byly již dříve v laboratoři izolovány pomocí zavedených komerčních kitů, byla otestována jejich kvalita, koncentrace i amplifikovatelnost. Tyto izoláty DNA byly použity při jednotlivých amplifikacích jako pozitivní kontroly (PK).

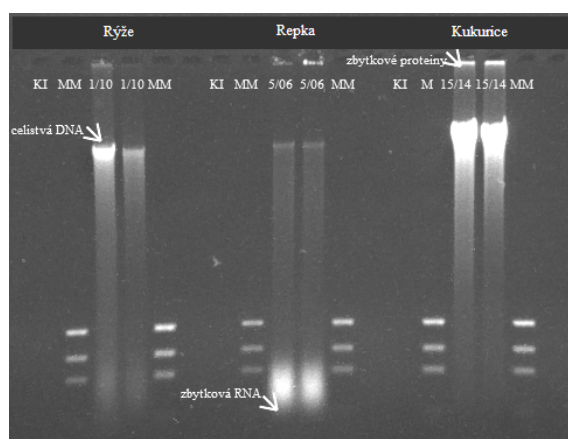
Z dlouhodobých zkušeností s izolací reálných vzorků i CRM pomocí kitů vyplývá, že nižší výtěžky bývají u rýže asi (20 – 40) ng/μl, řepky (semeno) asi (30 – 80) ng/μl, proměnlivé u sóji asi (20 – 200) ng/μl a u kukuřice většinou vyšší než 100 ng/μl. Kvalita bývá vždy vyhovující pro PCR, i když izolát vždy nesplňuje optimální poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230.

U izolátů CRM získaných extrakcí pomocí CTAB se koncentrace DNA u rýže a řepky pohybovaly mezi 65 ng/μl až 120 ng/μl, u sóji od 90 ng/μl do 250 ng/μl a u kukuřice 380 ng/μl až 420 ng/μl.

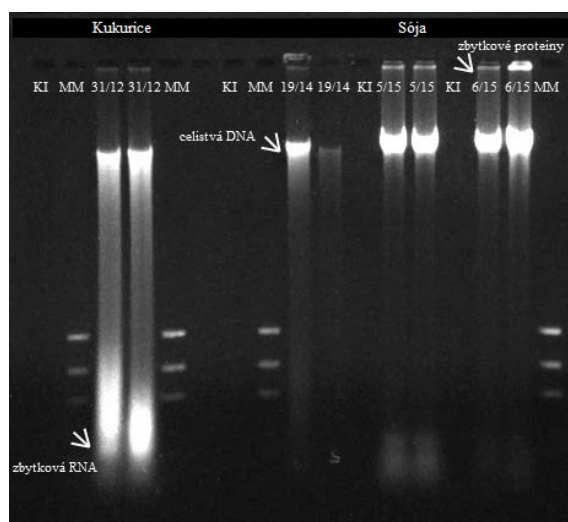
Obecně lze říci, že pro výsledek izolace není rozhodující pouze plodina, jako taková, ale i konkrétní odrůda a její předchozí zpracování. Například sója ve formě semene a sója ve formě toastovaného extrahovaného šrotu atd. Dále je důležitý i způsob homogenizace vzorku – velikost částic a jeho bobtnavost při teplotní lyzi.

Rozdíly mezi jednotlivými vzorky i v rámci jedné plodiny bývají poměrně značné, a to i mezi paralelami, podobně tomu bylo i v případě extrakcí CTAB (Tabulka 1).

Níže jsou uvedeny fotografie elektroforetických gelů s vizualizací kvality získané DNA pro jednotlivé plodiny.



Obr. 1. Kvalita vyizolované DNA, CRM 1/2010 (izolace 12. 1. 2017), CRM 5/2006 (izolace 12. 1. 2017), CRM 15/2014 (izolace 28. 3. 2017). MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



Obr. 2: Kvalita vyizolované DNA, CRM 31/2012 (izolace 14. 4. 2017), CRM 19/2014 (izolace 20. 2. 2017), CRM 5/2015 (izolace 28. 3. 2017), CRM 6/2015 (izolace 4. 4. 2017). MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.

Pro každý izolát DNA bylo provedeno spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty. V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty koncentrací a poměrů absorbancí pro vybrané izoláty získané CTAB.

Tabulka 1. Výběr naměřených koncentrací a hodnot určujících čistotu vyextrahované DNA pro jednotlivé CRM, zahrnující průřez získanými hodnotami koncentrací a stupni čistoty.

CRM	Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/A 230
Rýže IRM 1/2010	113,9	1,84	2,98
	65,7	1,78	2,63
Řepka CRM 5/2006	87,2	1,93	2,72
	81,1	2,03	2,70
Kukuřice CRM 15/2014	113,9	1,84	2,91
	85,1	1,81	3,32
Kukuřice CRM 31/2012	384,4	2,12	2,52
	417,5	2,08	2,18
Sója CRM 19/2014	93,6	1,84	1,61
	89,3	1,78	2,74
Sója CRM 5/2015	250,1	1,96	1,92
Sója CRM 6/2015 (0,1g)	137,9	1,95	2,98
Sója CRM 6/2015	182,8	1,79	1,29

Pro následující analýzu získané DNA jsou klíčové její koncentrace, kvalita a čistota. Nízká koncentrace, poškozená nebo znečištěná DNA mohou vést k amplifikaci nežádoucích fragmentů, k nízké amplifikaci nebo k úplné inhibici amplifikace. Zároveň ale s vyšší koncentrací získané DNA dojde pravděpodobně při jejím ředění na koncentrace vhodné pro PCR k současnému odředění případných inhibičních faktorů.

Pro klasickou PCR se používá koncentrace 10 ng/μl, pro kvantitativní stanovení pomocí qPCR je požadována většinou koncentrace (10 – 40) ng/μl.

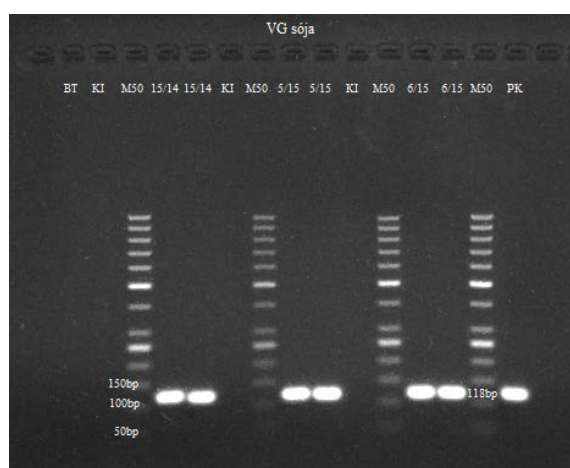
Čistota DNA daná poměrem A 260/A 280 se pohybuje v rozmezí 1,78 – 2,12. Optimální poměr se pohybuje v rozmezí hodnot 1,7 – 2,0. Hodnoty pod 1,7 značí znečištění proteiny. Hodnoty pohybující se okolo 2,0 a vyšší dokazují přítomnost RNA (viz obr. 1 a 2). V případě nízké účinnosti amplifikace nebo její inhibici, je nutno provést přečištění izolátu nebo provést novou izolaci s vyšším množstvím RNázy A nebo Proteinázy K.

Hodnoty poměru A 260/A 230 byly naměřeny v rozmezí 1,61 – 3,32, což splňuje podmínku pro hodnotu poměru A 260/A 230 nad 1,5. Ideální hodnoty jsou v rozmezí 2,0 – 2,2. Pokud je naměřená hodnota pod 1,5, je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

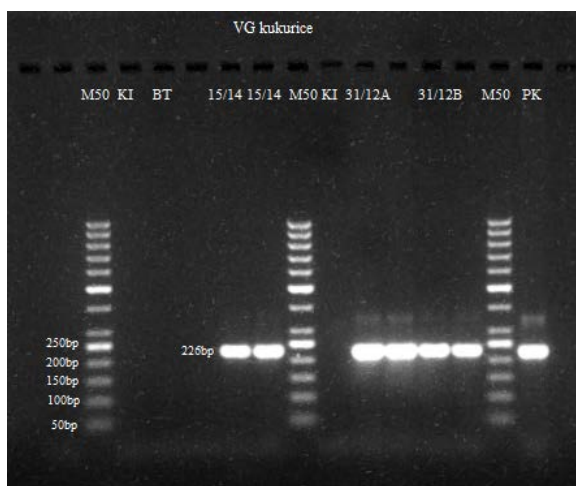
Ověření amplifikovatelnosti izolátů

Amplifikovatelnost vyizolované DNA se ověřuje pomocí PCR reakce – amplifikace tzv. referenčního (vnitřního) genu pro danou plodinu.

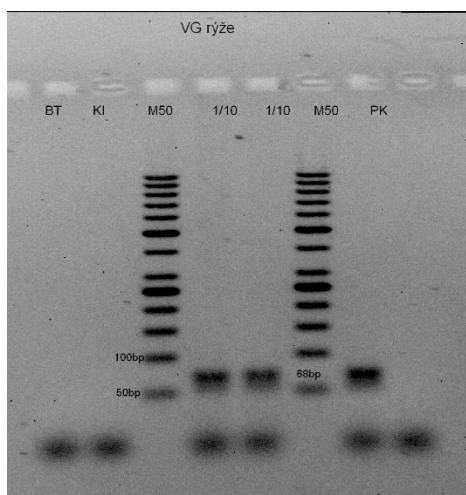
Na obrázcích 3 až 6 jsou uvedeny fotografie elektroforetických gelů s vizualizací produktů jednotlivých amplifikací vnitřních genů, pro izoláty získané CTAB ve srovnání i izoláty získanými pomocí komerčního kitu (PK).



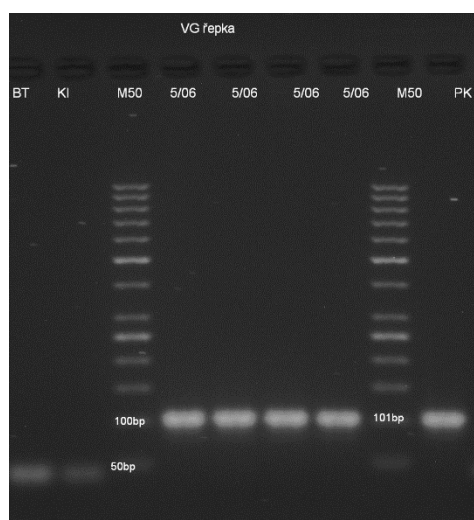
Obr. 3. Vnitřní gen sóji, CRM 15/2014, CRM 5/2012, CRM 6/2015, CRM 6/2015. M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK - CRM 3/2003 (izolováno kitem Nucleospin food).



Obr. 4. Vnitřní gen kukuřice, CRM 15/2014, CRM 31/2012. M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK – CRM 31/2012 (izolováno kitem Nucleospin food).

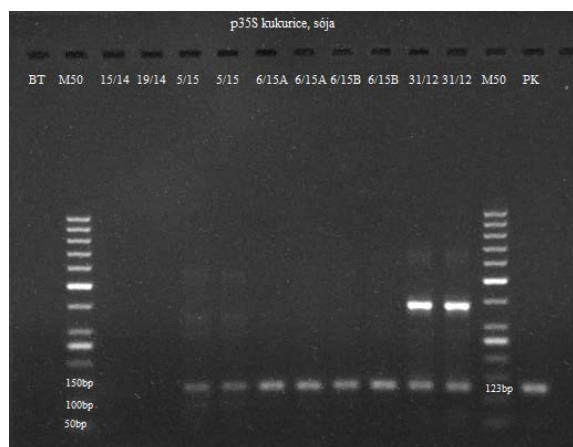


Obr. 5: Vnitřní gen rýže, CRM 1/2010, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK – CRM 1/2010 (izolováno kitem Nucleospin food).

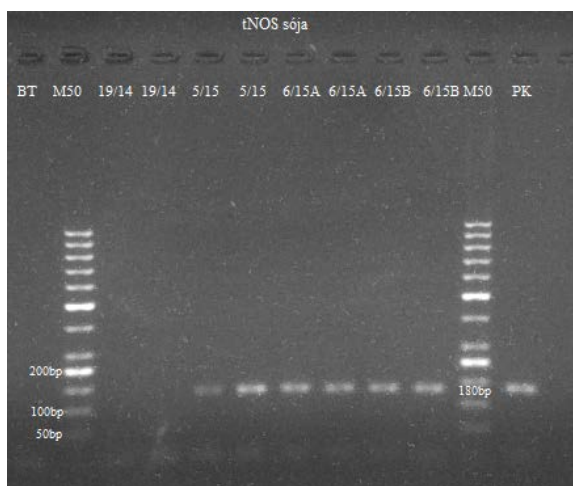


Obr. 6. Vnitřní gen řepky – Cruciferin A, CRM 5/2006, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK – CRM 6/2006 (izolováno kitem Nucleospin food).

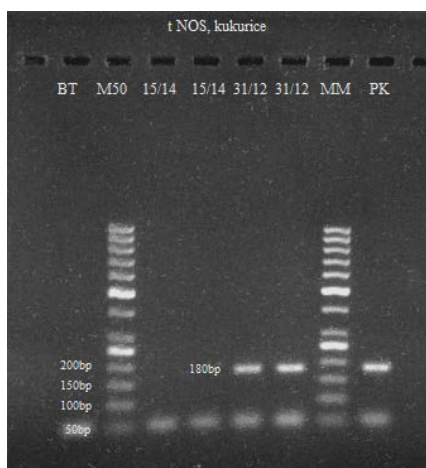
Na obrázcích 7 až 12 jsou fotografie elektroforetických gelů s vizualizací produktů jednotlivých amplifikací screeningových elementů p35S, tNOS a cpt2-cp4epsps u izolátů, ve kterých jsou deklarovány. Dále jsou uvedeny jednotlivé GM, opět ve srovnání s izoláty získanými pomocí komerčního kitu (PK).



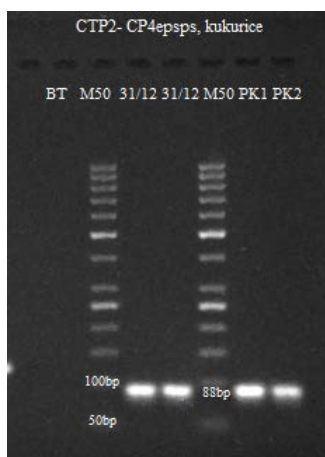
Obr. 7. Screening p35S, CRM 15/2014, CRM 19/2014, CRM 5/2015, CRM 6/2015, CRM 31/2012. M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK – CRM 3/2003 (izolováno kitem Nucleospin food).



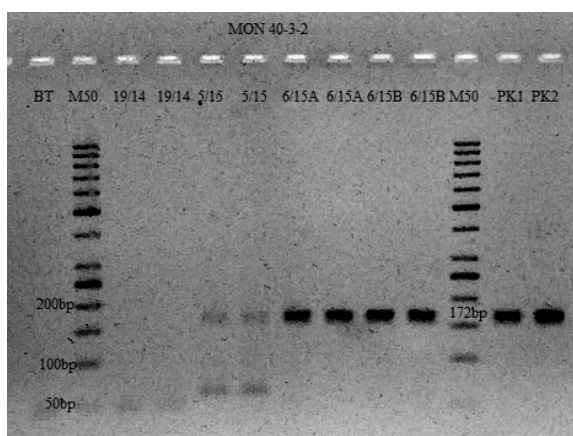
Obr. 8. Screening tNOS, CRM 19/2014, CRM 5/2015, CRM 6/2015. M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK – CRM 3/2003 (izolováno kitem Nucleospin food).



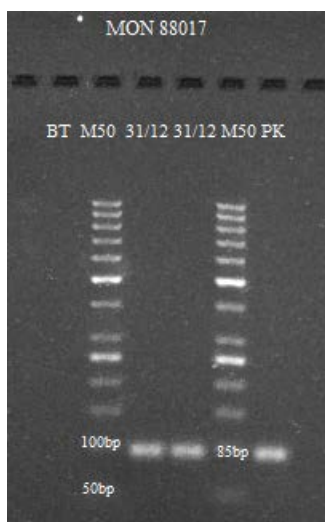
Obr. 9. Screening tNOS, CRM 15/2014, CRM 31/2012. M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK – CRM 3/2003 (izolováno kitem Nucleospin food).



Obr. 10. Screening cpt2-cp4epsps, CRM 31/2012. M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK1 – CRM 3/2003, PK2 – CRM 34/12 (izolováno kitem Nucleospin food).



Obr. 11. MON 40-3-2, CRM 19/2014, CRM 5/2015 (koncentrace 0,1% GM odpovídá LOD pro MON 40-3-2), CRM 6/2015. M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK1 – CRM 10/2015, PK2 – CRM 11/2015 (izolováno kitem Nucleospin food).



Obr. 12. MON88017, CRM 21/2012, M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, PK – CRM 31/2012 (izolováno kitem Nucleospin food).

3 Závěr

Byla provedena extrakce rostlinné DNA čtyř druhů plodin, které se vyskytují nejčastěji v rámci běžných analýz. Byla určena kvalita, koncentrace a čistota získané DNA.

Ve všech případech byl výtěžek vyšší než 40 ng/μl, které jsou požadovány pro qPCR. Následně bylo ověřeno stanovením vnitřního genu, screeningových elementů a genetické modifikace, že získaná DNA je vhodná pro analýzu GMO pomocí PCR.

4 Literatura

1. ČSN ISO 21571 (56 9902) Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny, 2007 ČNI.
2. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, JPP ÚKZÚZ 10250.1, Brno.

Zavedení kvalitativního stanovení geneticky modifikované kukuřice 98140 pomocí qPCR

Kristýna Tomečková

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

1 Úvod

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je založena na principu klasické PCR. V každém cyklu se opakují tři fáze: denaturace dvouřetězcové DNA, annealing a extenze, přičemž existuje i dvoukroková real-time PCR, kde annealing a extenze probíhají v jednom kroku. V druhé fázi cyklu dochází kromě nasednutí primerů i k hybridizaci specifických sond s fluorofory. Složení reakční směsi je také velmi podobné klasické PCR, kromě specifických hydrolyzačních sond nebo interkalačních barviv.

Oproti tradiční PCR, kdy se konečný produkt (amplikon) detekuje až po ukončení reakce, PCR v reálném čase umožňuje stanovit tvorbu produktu v průběhu reakce, a to i v raných fázích, kdy přírůstek intenzity fluorescence je úměrný množství stanovovaného templátu. Právě měření kinetiky v brzkých fázích reakce představuje zásadní výhodu v porovnání s tradiční PCR. Postup tradiční PCR včetně jejího vyhodnocení je v porovnání s kvantitativní PCR časově náročnější a vyznačuje se nižší citlivostí detekce, amplifikované produkty jsou rozlišovány především na základě velikosti a poskytují tak výsledky především kvalitativního charakteru.

Cílem práce bylo zavedení kvalitativního stanovení geneticky modifikované kukuřice 98140 metodou real-time PCR.

Poznámky

1. *Threshold je práh detekce vznikající fluorescence.*
2. *Ct je počet cyklů, který vznikající fluorescence potřebuje k překročení prahu detekce.*
3. *LOD, tedy limit detekce, je definován jako minimální množství nebo koncentrace analytu ve zkušebním vzorku, které může být spolehlivě detekováno.*
4. *Seznam použitých zkratk*

5. *BT – beztemplátová kontrola*
6. *CRM – certifikovaný referenční materiál*
7. *DNA – deoxyribonukleová kyselina, z anglického deoxyribonucleic acid*
8. *ENV – kontrola čistoty prostředí*
9. *EURL – European Union Reference Laboratories*
10. *GM – genetická modifikace (cílový gen)*
11. *VG – vnitřní gen*
12. *JPP – jednotný pracovní postup*
13. *P – pozitivní kontrola*
14. *PCR – polymerázová řetězová reakce*
15. *primer F – primer forward*
16. *primer R – primer reverse*
17. *qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce, real-time PCR*

2 Materiál a metody

2.1 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Mrazicí box.

Lednice.

Výrobník ledu.

Optické qPCR zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,1 ml (stripy).

Plastové zkumavky o objemu 2 ml, 0,6 ml, 0,2 ml.

Termocykler Rotor-Gene Q 5plex (QIAGEN).

PCR box.

Centrifuga.

UV lampa.

Vortex nebo minishaker.

NanoDrop 2000 spektrofotometr, vlnové délky (230; 260; 280) nm.

Vodní lázeň.

2.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Chemikálie pro extrakci DNA metodou CTAB (podle ČSN EN ISO 21571)

α -amyláza (volitelná), typ IIa z *Bacillus spp.* (1500 – 3000) jednotek/mg bílkovin.

Voda vhodná pro PCR.

Tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris).

RNáza A, bez DNáz a proteáz, asi 50 jednotek/mg lyofilizátu.

Proteináza K, asi 20 jednotek/mg lyofilizátu.

Kyselina chlorovodíková, 37%.

Isopropanol.

Chloroform.

Chlorid sodný.

Hydroxid sodný.

Hexadecyl-trimethylamonium bromid (CTAB).

Etanol pro UV spektroskopii (96–100 %).

Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotertraoctové (Na₂EDTA).

Denaturovaný etanol, 70%.

Dekontaminační roztok.

Extrakční kit NucleoSpin® Food (Macherey–Nagel)

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Collection Tubes (2 ml).

Další chemikálie potřebné pro izolaci DNA

Dekontaminační roztok.

Etanol pro UV spektroskopii (95 –100) %.

Etanol denaturovaný, 70%, pro čištění povrchů.

Chlornan sodný, roztok, c = (0,5 – 1)%.

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

Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)

PCR voda.

Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (dále Rotor-Gene Mix).

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitu

Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Chlornan sodný, roztok, c = (0,5 – 1)%.

Tris-EDTA pufr 100 × (TE pufr).

Amplifikační primery

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech. Sekvenkce primerů byl převzaty z protokolu validační metody „Event-specific Method for the Quantification of Maize 98140 Using Real-time PCR“.

ZM1-F: TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA.

ZM1-R: GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT.

DP098-f6: GTGTGTATGTCTCTTTGCTTGCTT.

DP098-r2: GATTGTCGTTTCCCGCCTTC.

Sondy

Princip TaqMan sond

Hydrolyzační sondy jsou založené na systému duálně značených sond a označují se jako TaqMan® sondy. TaqMan® sondy využívají 5'→3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy, tedy schopnost odštěpit z templátového řetězce sondu. Navržená sonda je komplementární k templátové sekvenci DNA a k hybridizaci dochází společně se specifickými primery ve druhé fázi PCR cyklu. TaqMan sonda® je oligonukleotid, který má na 3' konci zhášec (tzv. quencher) a na 5' konci reportér. Jako fluorescenční barviva reportéru se používají FAM (6-carboxyfluorescein), TET (tetrachlorofluorescein) nebo barvivo VIC.

Každý z těchto reportérů se rozkládá např. barvivem BHQ1, TAMRA (tetramethylrhodamine), který je připojen na 3'konci TaqMan sondy®. Pokud se quencher nachází v těsné blízkosti reportéru, má za úkol absorbovat jeho záření a tím ho „zhášet“. Tato vazba mezi quencherem a reportérem je nezávislá na hybridizaci sondy. Při elongaci řetězce se uplatní exonukleázová aktivita Taq DNA polymerázy a TaqMan® sonda je postupně od 5'konce štěpena. Reportér se uvolní do reakční směsi, tím se fyzicky oddálí od zhášec, a začne emitovat záření. Každé nové vlákno PCR produktu do reakční směsi uvolní emitující reportéry a tyto signály jsou zachyceny přístrojem a analyzovány softwarem.

Laboratoř použila hydrolyzační sondy TaqMan se značením FAM-BHQ1 od firmy Elisabeth Pharmacon. Tyto sondy jsou čteny v zeleném kanálu (Green), který má rozsah vlnových délek (470 – 510) ±10 nm.

Sekvenkce sond byl převzaty z protokolu validační metody „Event-specific Method for the Quantification of Maize 98140 Using Real-time PCR“.

ZM1: FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ1.

DP098-p5: FAM-CTCTATCGATCCCCCTCTTTGATAGTTTAAACT-BHQ1.

Použité certifikované referenční materiály

98140 (GAT)

Geneticky modifikovaná kukuřice 98140 (GAT) **obsahuje geny GAT4621 a ZM-HRA**. Enzym GAT4621 způsobuje toleranci vůči herbicidům na bázi glyfosátu. Enzym ZM-HRA zajišťuje toleranci vůči herbicidům, které způsobují inhibici *acetolaktát syntázy* (ALS).

Tato genetická modifikace neobsahuje žádný ze screeningových elementů, které lze v laboratoři stanovit.

98140 – ERM[®]-BF427d

Interní označení CRM 1/2017, obsahuje 10 % modifikované kukuřice 98140 od IRMM (Institute for Reference Material and Measurements). CRM je dodáván ve formě sójového šrotu, ze kterého se musí vyextrahovat DNA.

Blank kukuřice – AOCS 0709-A

Interní označení CRM 15/2014, nemodifikovaná kukuřice (non modified soybean – 0 %) od The American Oil Chemists' Society (AOCS). CRM je dodáván ve formě sójového šrotu, ze kterého se musí vyextrahovat DNA.

3 Pracovní postup

Extrakce DNA

Extrakce DNA byla provedena exktrakčním kitem NucleoSpin[®] Food (výrobce Macherey – Nagel) postupem podle JPP č.10252.1 a metodou CTAB postupem dle JPP č. 10253.1.

Měření koncentrace a čistoty DNA

Podle JPP č. 10250.1.

Určení kvality vyextrahované DNA – test inhibice DNA

Určení kvality DNA spočívá ve vytvoření kalibrační řady vyextrahované DNA. Získaná DNA se naředí na 4-bodovou kalibrační řadu (v paralelách), nejlépe 4-násobným sériovým ředěním (1 : 4; 1 : 16; 1 : 64; 1 : 256). Následně se nasadí PCR reakce s primery a sondou pro vnitřní gen kukuřice (high-mobility-group (hmg) gene).

Pro stanovení inhibice DNA se Ct hodnoty (osa y) ze čtyř sériových ředění vynesou oproti logaritmu ředícího faktoru (osa x) a získá se rovnice vypočítaná lineární regresí. Ct hodnota neředěného (pracovního) vzorku extrapolovaná lineární regresí se porovná s Ct hodnotou naměřenou u vzorku. Pro akceptování DNA extraktu musí být splněny 3 kritéria: směrnice regresní přímky musí být mezi -3,6 a -3,1; koeficient determinace (R^2) je rovný nebo větší než 0,98; rozdíl mezi naměřenou Ct a extrapolovanou Ct hodnotou je menší jak 0,5.

Příprava pufru 1×TE pufru

Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 1 ml 100×TE pufru a doplní se destilovanou vodou po značku. Toto množství se pak rozdělí do 2ml plastových zkumavek. Uchovává se v ledničce.

Příprava amplifikačních primerů

Zásobní roztok amplifikačních primerů o koncentraci 100 μ M

Do zkumavky s primerem v podobě prášku (lyofilizátu) na dně (nemusí být viditelný) se přidá 1 × TE pufr nebo voda v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μ l do 0,6ml zkumavek. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu.

Pracovní roztok amplifikačních primerů o koncentraci 10 μ M

K 1 dílu zásobního roztoku amplifikačního primeru se přidá 9 dílů 1 × TE pufru nebo vody. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15 μ l a zamrazí se v mrazicím boxu. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

Příprava sond

Zásobní roztok sondy o koncentraci 100 μ M

Do zkumavky se sondou v podobě lyofilizátu na dně (nemusí být viditelný) se přidá 1 $\times$ TE pufr nebo voda v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μ l do 0,2ml zkumavek. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky se sondou se zamrazí a uchovávají v mrazicím boxu. Sondy je třeba chránit před světlem.

Pracovní roztok sondy o koncentraci 10 μ M

K 1dílu zásobního roztoku sondy se přidá 9 dílů 1 $\times$ TE pufru nebo vody. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15 μ l a zamrazí se v mrazicím boxu. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky sond. Sondy je třeba chránit před světlem.

LOD 98140

Limit detekce genetické modifikace kukuřice 98140 (CRM 1/2017) se stanoví metodou sériového ředění s použitím nemodifikované genomické DNA kukuřice (CRM 15/2014). Jedná se o šest po sobě jdoucích nezávislých amplifikací (běhů).

Navržená kalibrační řada pro ověření limitu detekce vychází z LOD stanoveného v rámci validační metody podle JRC (LOD 0,04 %) pro GM kukuřice 98140 a potřeb laboratoře.

Pro laboratoř byl navržen limit detekce na hladině 0,05 %.

Výchozí izolát CRM 1/2017 o obsahu 10 % 98140 se dále naředil izolátem nemodifikované kukuřice (CRM 15/2014) na koncentrace 0,4 %; 0,2 %; 0,1 % a 0,05 %.

Polymerázová řetězová reakce

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů, sond, programy a koncentrace PCR směsí vycházejí z validované metody EURL a požadavků přístroje Rotor-Gene.

U genetické modifikace 98140 (CRM 1/2017) provedena jedna amplifikace pro ověření amplifikovatelnosti vnitřního genu kukuřice (hmg genu).

Vnitřní gen kukuřice (high-mobility-group (hmg) gene)

Primery: ZM1-F, ZM1-R

Sonda: ZM1

Délka amplikonu: 79 bp

98140 (GAT)

Primery: DP098-f6, DP098-r2

Sonda: DP098-p5

Délka amplikonu: 80 bp

Amplifikační program je shodný pro vnitřní gen kukuřice i GM 98140, viz tabulka 1.

Tabulka 1. Amplifikační program vnitřního genu kukuřice a GM 98140.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Akvizice dat fluorescence (zelený kanál)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	ne	1
Denaturace	95	15	ne	40
Annealing	60	60	ano	
Extenze			ano	

Vlastní provedení PCR

Dekontaminují se předměty i prostory od jakýchkoli molekul DNA. Použije se UV záření (30 min) a dekontaminační roztok. Připraví se pipety, sterilní špičky, zkumavky, optické qPCR zkumavky, sondy, primery, Rotor-Gene Mix, voda, odpadní nádoba, nádoba na uchování ledu a stojánky na zkumavky.

Stanoví se počet reakcí, tj. počet vzorků: pozitivní kontrola (P); beztemplátová kontrola (BT) a kontrola čistoty prostředí (ENV) – v jednom provedení. Nutno počítat s 1 až 2 reakcemi navíc jako rezervu. Podle tabulky 2 se vypočítají celkové objemy všech složek reakční směsi, které se pipetují v daném pořadí. Směs se připravuje na ledu.

Při přípravě nesmí dojít k záměně primerů a sond. Po celou dobu přípravy je třeba chránit sondy před světlem.

Tabulka 2. Příprava qPCR reakční směsi vnitřního genu kukuřice a GM 98140.

Vnitřní gen kukuřice		98140 (GAT)	
Složky	1 reakce (μl)	Složky	1 reakce (μl)
PCR voda	7,5	PCR voda	7,5
Rotor-Gene Mix	12,5	Rotor-Gene Mix	12,5
Primer ZM1-F	1	Primer DP098-f6	1
Primer ZM-R	1	Primer DP098-r2	1
Sonda ZM1	0,5	Sonda DP098-p5	0,5
Objem směsi bez templátu	22,5	Objem směsi bez templátu	22,5
Templátová DNA (izolát)	2,5	Templátová DNA (izolát)	2,5
Objem směsi včetně templátu	25	Objem směsi včetně templátu	25

Směs se zamíchá jemným vortexováním a rozdělí se po 22,5 μl do označených optických zkumavek. Koncentrace DNA vzorků a kontrol se naředí vodou na stejné hodnoty 40 ng/μl, tedy 100 ng/reakci.

Poté se do každé optické zkumavky s 22,5 μl reakční směsi přidá 2,5 μl templátové DNA. Jednotlivé složky se těsně před pipetováním důkladně promíchají na vortexu a poté se pipetuje v tomto pořadí: ENV (místo templátu se použije voda, tato zkumavka zůstává otevřená po celou dobu pipetování všech vzorků, uzavírá se jako poslední); BT (místo templátu se použije voda); vzorky a P. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během PCR a vloží se rotoru cykleru (36 nebo 72 jamek). Poté se zvolí amplifikační program a cykler Rotor-Gene se spustí dle návodu.

Po skončení práce se opět dekontaminuje PCR box i pracovní pomůcky.

Po ukončení amplifikace qPCR v Rotor-Genu se vyhodnotí naměřené amplifikační křivky.

4 Výsledky a diskuse

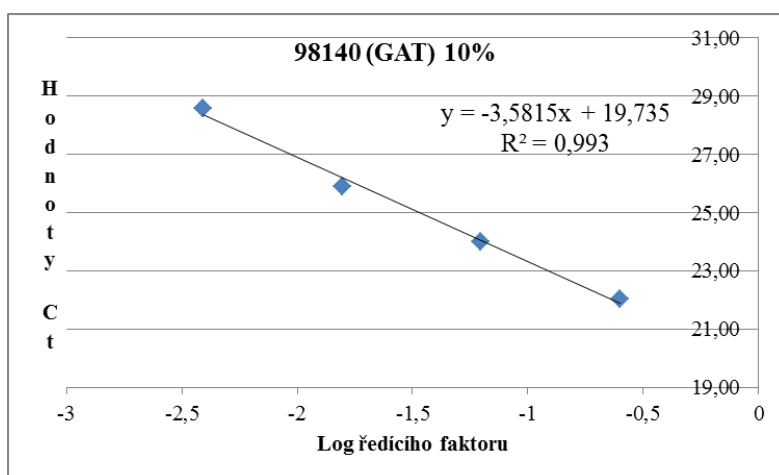
Určení kvality vyextrahované DNA – test inhibice DNA

Vyextrahovaná DNA použitých referenčních materiálů (CRM 1/2017, CRM 15/2014) pro tuto práci byla prověřena před stanovením LOD testem inhibice DNA. Izoláty obou referenčních materiálů splnily všechny tři kritéria testu a mohly tak být použity pro další analýzy. Výsledky analýz testu inhibice byly tabulkově i graficky zpracovány (tabulka 3, 4; obr. 1, 2) a jsou uvedeny v textu.

98140 – CRM 1/2017

Tabulka 3. Ředění a výpočet kvality vyextrahované DNA 98140.

Ředění	log ředícího faktoru	ø Ct naměřené	Ct extrapolované	ø Ct naměřené - Ct extrapolované
	log 1/ředění			
Pracovní	×	19,63	19,74	0,11
4	-0,602	22,03		
16	-1,204	23,99		
64	-1,806	25,90		
256	-2,408	28,58		



Obr. 1. Lineární regrese CRM 1/2017.

Vyextrahovaná DNA certifikovaného referenčního materiálu genetické modifikace 98140 (10 %), splňuje všechny tři parametry testu inhibice DNA.

směrnice regresní přímky = -3,5815

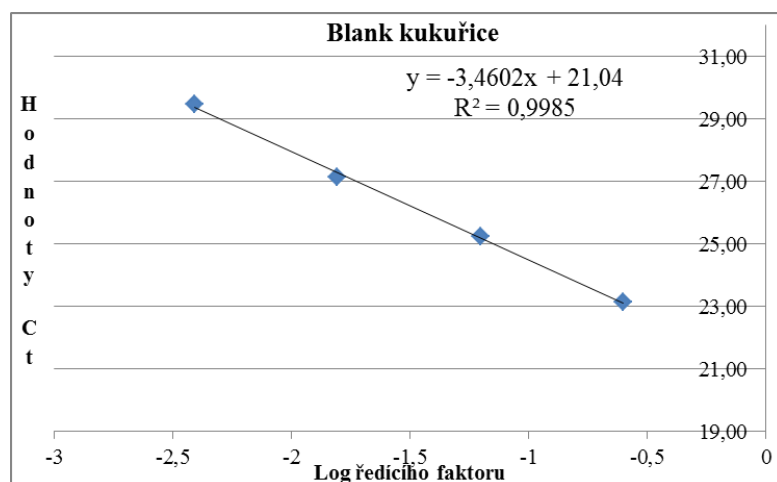
$R^2 = 0,993$

rozdíl mezi naměřenou Ct a extrapolovanou Ct hodnotou = 0,11

Blank kukuřice CRM 15/2014

Tabulka 4. Ředění a výpočet kvality vyextrahované DNA blanku kukuřice.

Ředění	log	Ø Ct naměřené	Ct extrapolované	Ø Ct naměřené - Ct extrapolované
Pracovní	x	21,17	21,04	0,13
4	-0,602	23,15		
16	-1,2041	25,24		
64	-1,806	27,14		
256	-2,408	29,46		



Obr. 2. Lineární regrese CRM 15/2014.

Vyextrahovaná DNA certifikovaného referenčního materiálu blanku kukuřice, rovněž splnila všechny tři kritéria testu inhibice DNA.

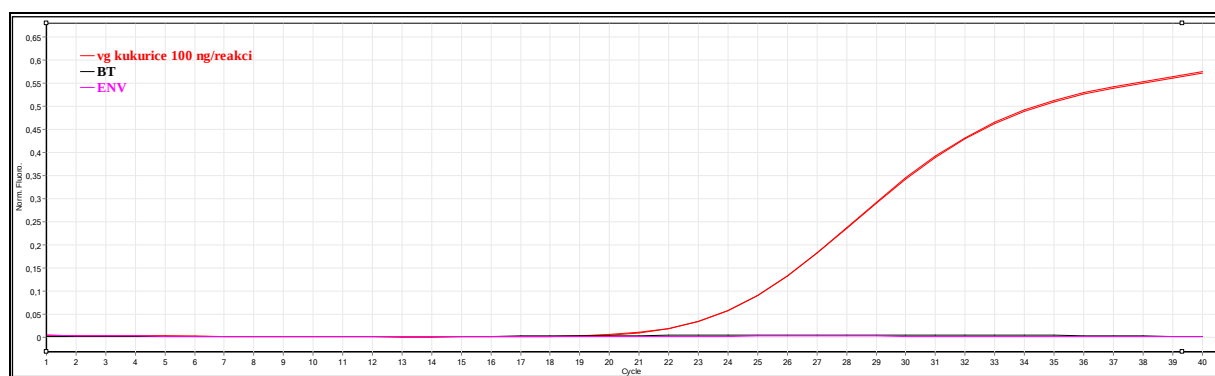
směrnice regresní přímky = -3,4602

$$R^2 = 0,9985$$

rozdíl mezi naměřenou Ct a extrapolovanou Ct hodnotou = 0,13

Ověření amplifikovatelnosti vnitřního genu kukuřice 98140

Pro ověření přítomnosti vnitřního genu kukuřice izolátu CRM 1/2017 (10%, 98140) byla provedena jedna amplifikace s použitím primerů a sondy pro vnitřní gen kukuřice (hmg gene). Na obr. 3 je graficky zachycen průběh amplifikační křivky VG kukuřice. Byla ověřena přítomnost vnitřního genu kukuřice při 100 ng v reakci, což je maximální koncentrace, kterou akceptuje přístroj cycler Rotor-Gene.

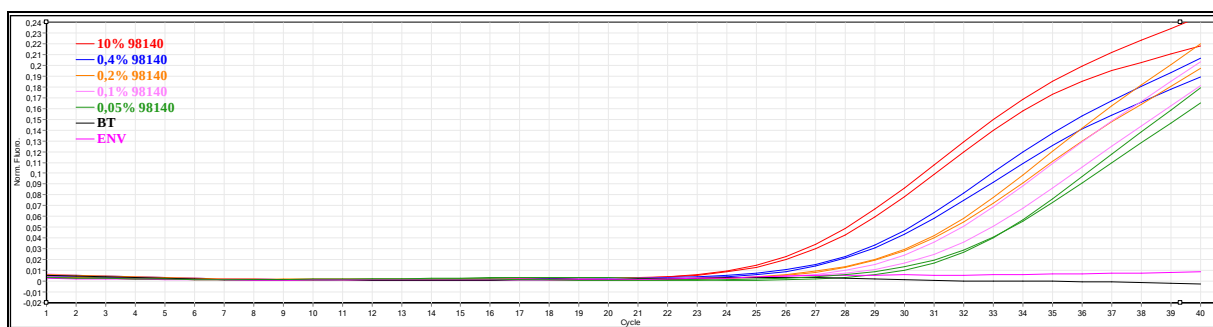


Obr. 3. Vnitřní gen kukuřice (27. 4. 2017), izolát CRM 1/2017 – 10 % 98140, objem DNA v reakci – 100 ng, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.

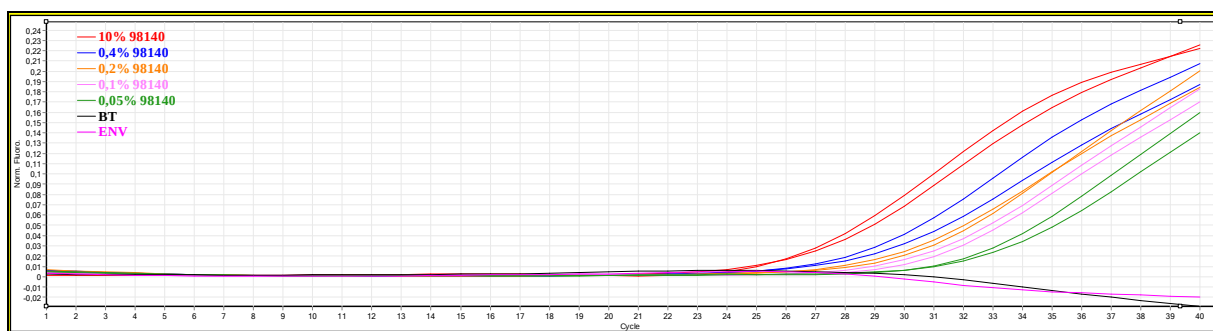
Stanovení limitu detekce kukuřice 98140

V rámci stanovení validačních parametrů byl ověřen LOD genetické modifikace kukuřice 98140.

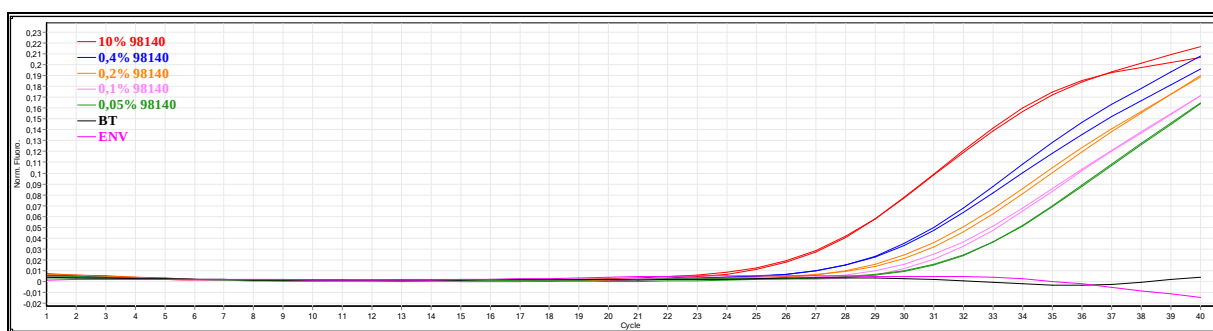
Výsledky analýz byly graficky zpracovány a jsou uvedeny na obr. 4. až 9. Ve všech šesti nezávislých měřeních byla nalezena pozitivní odpověď i při nejnižší testované koncentraci 0,05 %.



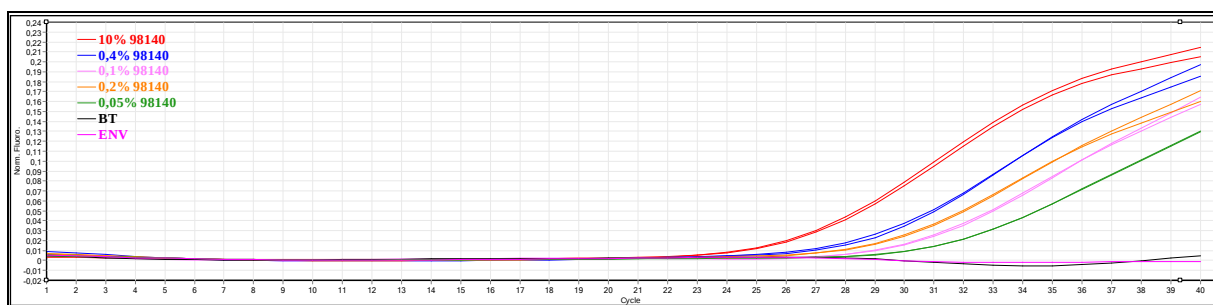
Obr. 4. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (12. 5. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.



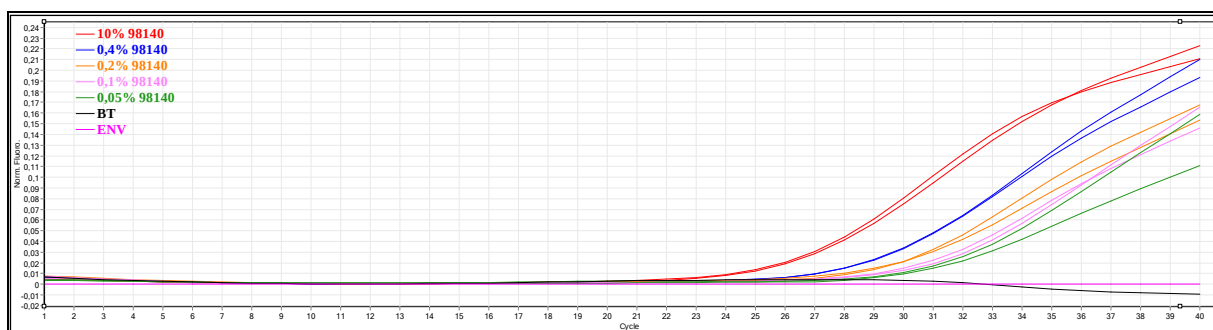
Obr. 5. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (22. 5. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.



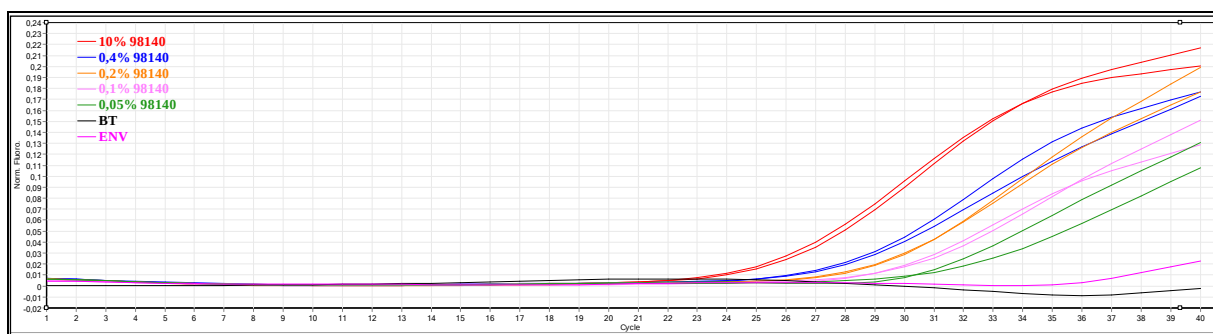
Obr. 6. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (23. 5. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.



Obr. 7. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (24. 5. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.



Obr. 8. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (31. 5. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.



Obr. 9. Stanovení LOD genetické modifikace 98140 (6. 6. 2017), výchozí izolát CRM 1/2017 – 10% 98140, ředění pomocí izolátu CRM 15/2014 na koncentrace 0,4%; 0,2%; 0,1; 0,05% 98140, BT – beztemplátová kontrola, ENV – kontrola čistoty prostředí.

5 Závěr

Byla úspěšně zavedena metoda pro kvalitativní detekci genetické modifikace 98140 (GAT) pomocí qPCR. Stanovená hodnota LOD činila 0,05 %. Uvedená metoda se zařadí do postupů zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv, krmných směsí a osiv.

6 Literatura

1. Rotor-Gene Probe Handbook, Qiagen, 2009.
2. Rotor-Gene Q MDx Uživatelský manuál, Qiagen, 2010.
3. 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.
4. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, ENGL, 2011.
5. Event-specific Method for the Quantification of Maize 98140 by Real-time PCR. Validation Report and Validated Method. EURL-GMFF. 2011.
6. ČSN EN ISO 21570 Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů - Metody založené na kvantitativním stanovení kyseliny nukleové.
7. ČSN EN ISO 24276 Metody pro detekci modifikovaných organismů a odvozených produktů, Všeobecné požadavky a definice.
8. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup č. 10250.1.
9. Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR – kit Nucleospin Food, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup č. 10252.1.
10. Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup č. 10253.1.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIV, 2020/2

Ročník: XXIV, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2020

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 64

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196