



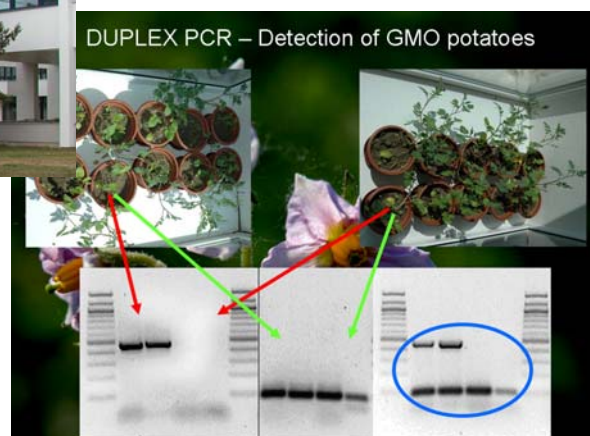
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta



BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM
JU ZF ČESKÉ BUDĚJOVICE

Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Alena Nováková,
Ing. Kateřina Šimáčková

České Budějovice, 2011

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta**

Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Alena Nováková
Ing. Kateřina Šimáčková**

České Budějovice, 2011

Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Vladislav Čurn a kol.

vcurn@seznam.cz

Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

www.zf.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz/>

Vypracováno za podpory výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“.

Text: ©2011 Čurn V., Nováková A., Šimáčková K.

Foto: ©2011 Čurn V., Nováková A.

Grafická úprava: ©2010 Šimáčková K.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-248-9

Obsah:

I. Cíl metodiky	1
II. Vlastní popis metodiky	2
II.1. Úvod.....	2
II.2. Metodika izolace DNA	3
Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor.....	3
Izolace DNA pomocí CTAB-PVP	4
II.3. Metodika detekce GMO	7
Multiplex PCR.....	7
qRT-PCR	9
II.4. Metodika elektroforézy DNA	11
Elektroforéza v agarózovém gelu	11
Elektroforéza v SYNERGELu.....	13
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:.....	14
III. Srovnání novosti postupů	15
IV. Popis uplatnění metodiky	16
V. Seznam použité související literatury	17
VI. Seznam publikací, které předcházely metodice	19
VII. Příklady výstupů detekce a kvantifikace GMO u brambor	21

I. Cíl metodiky

V posledním desetiletí dochází ve světě ke stálému navyšování ploch geneticky modifikovaných plodin (GMP). Většinu pěstebních ploch zaujmají čtyři hlavní plodiny: sója, kukuřice, bavlník a řepka olejná. Techniky genových manipulací jsou ale dobře zavedeny i u bramboru a brambor je jednou z plodin, které patří k tzv. „Biotech Crops“. Ve světě jsou transgenní (geneticky modifikované - GM) brambory pěstované již od roku 1996, kdy začalo komerční pěstování transgenních plodin. V České republice lze pěstovat pouze geneticky modifikované plodiny (GMP), které byly uvolněny do oběhu na základě evropských předpisů postihujících proces schvalování nových GM organismů. Pro běžné komerční využití lze pěstovat pouze GM odrůdy polních plodin zapsané ve Státní odrůdové knize (úřední seznam odrůd rostlin, které jsou v ČR zaregistrovány) nebo ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin, popř. zeleniny (seznam odrůd rostlin, sestavený příslušným orgánem ES na základě národních seznamů odrůd členských států). Na národní úrovni nejsou k současnému datu ve Státní odrůdové knize zapsány žádné odrůdy GM plodin. Na úrovni evropské Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin již ale obsahuje transgenní (geneticky modifikované) odrůdy. Tato skutečnost vyústila v potřebu vypracování metodiky pro rychlou a spolehlivou detekci GM brambor. Předkládaná metodika zahrnuje postupy izolace DNA z listů i hlíz a metody detekce a kvantifikace přítomnosti záměrně vnesené cizorodé DNA - transgenu - u brambor. Vypracování a optimalizace postupů pro detekci transgenu umožní monitoring GM brambor na všech úrovních pěstování, skladování a manipulace s rostlinným materiálem.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Úvod

Kulturní brambor, *Solanum tuberosum* L., je jednou ze čtyř nejvýznamnějších plodin světa spolu s pšenicí, rýží a kukuřicí a využívá se jak ve výživě lidí, tak i ve výživě hospodářských zvířat. Významné je i jeho využití pro účely průmyslového zpracování.

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou žijící organismy, jejichž genetická informace byla změněna pomocí technik genové manipulace, tzv. technik rekombinantní DNA. Touto genetickou manipulací je obvykle vnesení sekvence cizorodé DNA (insertu) do recipientního modifikovaného organismu. Tento proces se nazývá transformace (Holst-Jensen, 2001).

Detekce GMO je uskutečňována pomocí polymerázové řetězové reakce (z angl. polymerase chain reaction – PCR) a to především na úrovni DNA nebo pomocí imunologických metod jako je například ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), na úrovni proteinu (Bonfini a kol., 2001). DNA je relativně stabilní molekula a proto je preferovaným materiálem pro většinu analýz. Nespornou výhodou analýz založených na PCR je potřeba malého množství výchozího materiálu potřebného pro izolaci DNA a to v rozmezí 100 mg (Pietsche a kol., 1997, Waiblinger a kol. 1997) – 350 mg (Zimmermann a kol., 1998). Pro rutinní skríníng mohou být použity primery (krátké úseky komplementární DNA) odvozené od charakteristických sekvencí jako je 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (P-35S) a nos (nos3') terminátor bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, které se běžně vyskytují u mnoha GMO plodin dostupných na trhu (Hemmer, 1997), či primery odvozené ze sekvencí DNA dalších vnesených genů. První GMO screeningové metody byly použity německými a švýcarskými vědci (Pietsche a kol., 1997) a byly založeny na detekci přítomnosti sekvencí P-35S a nos3' a následné separaci PCR amplifikované DNA pomocí gelové elektroforézy (Meyer, 1999; Pietsche a kol., 1997). Určitou nevýhodu PCR reakce představuje možnost nespecifické vazby mezi primerem a templátem DNA. Proto Hupfer a kol. (1997) zvolil pro detekci přítomnosti cizorodé DNA metodu Southern blotu, založenou na hybridizaci DNA na membráně se specifickou, značenou, sondou. Jednou z modifikací standardní PCR, zvyšující dále její specifitu či přesnost, je metoda tzv. „nested PCR“ (Meyer a Jaccaud, 1997; Köppel a kol., 1997). Nejspolehlivější metodou ověření autenticity produktu PCR je jeho sekvenování, ale tento postup se rutinně nepoužívá (Ehlers a kol., 1997; Hupfer a kol., 1997).

II.2. Metodika izolace DNA

Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor

DNA izolujeme dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného v laboratoři nebo v polních podmínkách a uchovávaného do doby izolace na ledu po dobu 2–4 hod) nebo z materiálu zamraženého (po odebrání materiál zamrazíme v tekutém dusíku a uchováváme při teplotě -80°C). V případě izolace DNA z hlíz je možné využít i lyofilizovaného materiálu (z hlízy ukrojíme tenký plátek z celého profilu hlízy, tento plátek zamrazíme při -80°C a následně lyofilizujeme. Po lyofilizaci plátek homogenizujeme a získaný prášek uchováváme při teplotě -20°C).

- hlízová šťáva

Hlízovou šťávu získáváme dle metodiky UPOV (UPOV 2002) z hlíz, které omyjeme, zmrazíme při -20°C a po jejich rozmražení z nich vymačkáme hlízovou šťávu. Z takto získané hlízové šťávy izolujeme DNA dle příslušného protokolu.

- lyofilizovaný materiál

Jedná se o materiál, který získáváme ze všech předchozích typů vzorků (pravé listy, hlízy, hlízová šťáva) po jejich lyofilizaci (šetrné vysušení při nízké teplotě ve vakuu). Lyofilizovaný materiál uchováváme v uzavřených mikrocentrifugačních zkumavkách v mrazáku při -20°C .

Izolace templátové DNA z hlíz a listů pro účely PCR analýzy

Pro izolaci DNA lze použít celou škálu metod. Ne všechny ale poskytují vhodný DNA templát (z pohledu kvality a kvantity) a ne všechny techniky jsou vhodné pro izolaci DNA ze zelených částí rostliny a hlíz. Na základě rozsáhlého skríningu a optimalizací extrakčních technik, provedených v laboratoři Biotechnologického centra JU ZF České Budějovice, byla jako nejvhodnější metoda izolace DNA zvolena technika CTAB-PVP. Izolace DNA byla provedena pomocí pufru cetyltrimetylamoniumbromidu (CTAB), dle modifikovaného protokolu podle Williamse a Rogerse (Nováková et al., 2008). Modifikace spočívala v přidavku PVP (polyvinylpyrrolidon 40000) k extrakčnímu CTAB pufru. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 100 μl sterilní H_2O a byla uchovávána při -20°C .

Izolace DNA pomocí CTAB-PVP

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analýzy. Přidáním PVP lze dosáhnout účinnějšího odstranění kontaminujících látek a tím i získu dostatečně čisté a kvalitní DNA.

Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze tyto složky komplexu od sebe oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku. Připravený pufr předehejeme na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
 - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l předeřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme. Poté vzorky stočíme na centrifuze (centrifugujeme) při 12000 rpm po dobu 10 min.
4. Po centrifugaci převedeme supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 500 μ l chloroformu s IAA. Směs 10 min. promícháváme a následně centrifugujeme 5 min. při 12000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5% CTAB a směs promícháme. Znovu přidáme 500 μ l směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 μ l) a 2–3x lehce promícháme převrácením. Poté ponecháme cca 30 min. (popř.přes noc) v mrazáku (při -20°C). Následně centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 300 μ l 1x TE (Tris – EDTA) a 30–60 min. inkubujeme při 37°C.
8. Přidáme 2 objemy (600 μ l) ledového (-20°C) 100% ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky ponecháme minimálně 20 min., maximálně pak 12 hodin (větší výtěžnost DNA) v mrazáku (-20°C).
9. Vzorky vyjmeme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.

10. Přidáme 1 ml ledového (-20°C) 70% ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Ihned odstraníme všechnen supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpusť 40 min. při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 µl Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol, nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkapt ethanol, 1% PVP–40000)
- 2-merkapt ethanol
- 5% CTAB
- chloroform–IAA (isoamylalkohol) (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací vyhřívaný blok (dry-blok), termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

II.3. Metodika detekce GMO

Multiplex PCR

Metodika – stávající doporučené metodiky pro detekci transgenů u brambor (Validation Report EH92-527-1 potato) se ukázaly jako ne zcela vyhovující (detekce pomocí RT-PCR, detekce jiných transgenů než jaký byl k dispozici, použití fluorescenčně značených primerů a specifických sond). Z tohoto důvodu byla vypracována originální metodika detekce transgenů v geneticky modifikované odrůdě Desiree za využití tzv. multiplexové PCR, s použitím dvou sad primerů. Jeden primerový pár (GNA_1/ GNA_2) byl navržen pro amplifikaci úseku 140 bp transgenů pro lektin sněženky (GNA- Galantus nivalis aglutinin) a druhý primerový pár (UGP-af7/ UGP-ar8) byl navržen jako „interní standard“ pro amplifikaci 88 bp úseku genu UDP-glucose pyrophosphorylase (Borokov et al. 1997). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.1.

Tab. 1: Sekvence primerů použitých pro multiplex PCR

Primer	Sekvence
UGP-af7	5'- GGA CAT GTG AAG AGA CCG AGC – 3'
UGP-ar8	5'- CCT ACC TCT ACC CCT CCG C – 3'
GNA_1	5'- ATG GCT AAG GCA GTC TCC TC – 3'
GNA_2	5'- TCA TTA CTT TGC CGT CAC AAG – 3'

Navržený metodický postup umožňuje specifickou detekci přítomnosti transgenů v DNA obsažené v hlízách i v listech brambor. U GM brambor jsou při multiplexové PCR získány 2 produkty – amplifikovaný úsek odpovídající detekovanému transgenů GNA a amplifikovaný úsek genu UDP signalizující „správný“ průběh PCR reakce. U netransgenů je pak získán pouze úsek odpovídající genu UDP. Detekční limit reakce je 10% kontaminace transgenů (2,5 ng DNA transgenního organismu) ve vzorku.

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pM primer (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer UGP-af7
- 0,5 µl primer UGP-ar8
- 0,5 µl primer GNA_1
- 0,5 µl primer GNA_2
- 9,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Biometra T1 Cyclor při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 30 cyklů:

50 s	94°C
50 s	62°C
50 s	72°C
- konečná elongace 7 min. 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se separují v 1,5% agarózovém gelu v 0,5x TBE (Tris, kyselina boritá, EDTA) pufru. Jako marker molekulových vah DNA se používá 100 bp DNA ladder (výrobce NEB) a DNA fragmenty se vizualizují obarvením ethidium bromidem nebo barvivem SYBR Green a následným ozářením UV světlem. Profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System či jakýkoliv jiný obrazový záznam.

Chemikálie:

- PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

qRT-PCR

Pro potřebu detekce a kvantifikace GMO, jako nástroje kontroly míry kontaminace GMO byla optimalizována metodika Real-Time PCR (PCR v reálném čase) s detekčním systémem SYBR Green I. Analýza probíhá jako dvě uniplexové PCR reakce na jednom přístroji během jednoho experimentu. Primerové páry byly navrženy pro amplifikaci úseku 140 bp transgenů pro GNA sněženky (*Galanthus nivalis* aglutinin) a druhý primerový pár (UGP-af7/ UGP-ar8) byl navržen jako „interní standard“ pro amplifikaci 88 bp úseku genu UDP-glucose pyrophosphorylase (Borokov et al. 1997)

Navržený metodický postup umožňuje kvantifikaci přítomného transgenů ve vzorcích. Přístroj MiniOpticon (BioRad) nabízí funkci vyhodnocení kvantifikace neznámého vzorku (qRT-PCR). Tato hrubá data však musí být dále statisticky zpracována. Během našich pokusů byly zjištěny následující limity reakce: detekční limit = 0,01% a kvantifikační limit = 0,05%. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

Tab. 2: Sekvence primerů použitých pro qRT-PCR

Primer	Sekvence
UGP-af7	5'- GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC – 3'
UGP-ar8	5'- CCT ACC TCT ACC CCT CCG C – 3'
GNA_1	5'- ATG GCT AAG GCA GTC TCC TC – 3'
GNA_2	5'- TCA TTA CTT TGC CGT CAC AAG – 3'

PCR reakce probíhá v objemu 20 µl, v 1x master mix DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, 1x ROX, 0,5 µM primerů (Qiagen), a 10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit:

- 10 µl master mix DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primeru
- 0,5 µl primeru
- 0,3 µl ROX reference dye
- 7,7 µl dH₂O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na Cycleru MiniOpticon (výrobce BIORAD) při následujícím teplotním profilu:

- počáteční inkubace 2 min 50°C
- počáteční denaturace 3 min 95°C
- 45 cyklů:
 - 50 s 95°C
 - 50 s 62°C
 - 50 s 72°C
- detekce melting křivky je v rozmezí 55°C – 90°C

Chemikálie:

- DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (výrobce Finnzymes)
- ROX reference dye
- templátová DNA
- primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

PCR thermocykler se systémem detekce vyzařovaného signálu, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

II.4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k dělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporně nabitě elektrody směrem ke kladně nabitě. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji horizontálně uložený agarózový gel. Fragmenty o stejné velikosti-molekulové váze- postupují stejně rychle a vytvoří shluk, po obarvení pak proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se mezi báze nukleových kyselin a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

Elektroforéza v agarózovém gelu

Příprava gelu:

1. Agaróza smícháme s vodou a pufrům v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaříme v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agarózu musíme dokonale rozpustit, během rozváření musíme s Erlenmayerovou baňkou několikrát míchat.
2. Roztok agarózy zchladíme na cca 55°C, poté přidáme odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promícháme a nalijeme do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu naléváme opatrně a plynule, snažíme se zamezit tvorbě bublin- případné bubliny odstraníme.
3. Po nalití agarózy do vaničky umístíme hřebínek a gel se necháme 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je ponoříme do elektroforetické vany a pod hladinu pufru do jamek po hřebínku vkládáme vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky naplníme dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (cca 2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 µl) přidáme 4 µl nanášecího pufru (LB), promícháme špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně můžeme nanést vzorky na gel a poté opatrně vložíme gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB (loading buffer):

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocetrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (výrobce NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 23 V po dobu 30 min. a poté 90 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel fotografujeme na UV transiluminátoru pod UV světlem

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 3: Složení 1,5% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 4: Příprava pracovních roztoků TBE (Tris, kyselina boritá, EDTA) pufru.

1x pufr TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 5: Složení zásobních roztoků TBE pufru

	5x TBE
Tris (Trizma)	54
0,5 M EDTA	20 ml
kys. boritá	27,5
dH ₂ O	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker molekulových vah
- Produkty PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba (pro rozvaření agarózy v příslušném pufru) , sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Elektroforéza v SYNERGELu

Synergel je přípravek, jehož přídavek k agaróze vytváří gel s výrazně vyšší separační možností v porovnání se standardním agarózovým gelem . Po vizualizaci separované fragmenty DNA vytváří ostřejší pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE (polyakrylamidový gel) se vyznačuje jednoduchostí přípravy a snadnou separací fragmentů DNA. Není toxický.

Výpočet množství Synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci Synergelu vypočítáme na základě následující ho vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku Synergelu, který chceme převést na Synergel/ agarózový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

např. v případě, kdy standardní 3% agarózový gel nahradíme gelem s přídavkem Synergelu, je složení gelu následující:

A = 3%

množství Synergelu ve směsi: $(3 - 0,7) / 2 = 1,15\%$

1,15% Synergelu přidáme k 0,7% agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a Synergelu .
- Přidáme takové množství 100% ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
- Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufru.
- Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
- Přidáme 5 µl roztoku ethidium bromidu.
- Důkladně promícháme.
- Nalijeme do vany / formy na gel.
- Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel (výrobce Roth)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker molekulových vah
- Produkty PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:

V případě použití barviva SYBR GREEN (výhodou je nižší toxicita, lepší vizualizace DNA na gelu a nižší pozadí při vizualizaci) nepoužíváme ethidium bromid. Po ukončení PCR k reakční směsi přidáme nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky nanese na gel a spustíme elektroforézu. Po ukončení elektroforézy na UV transiluminátoru vizualizujeme DNA fragmentů/ PCR produktů. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu použijeme zelený filtru namísto červeného filtru, který používáme u gelů barveným ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN: 0,025 g Bromphenol Blue
 0,025 g Xylene Cyanol FF
 3 ml glycerol
 20 µl SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)
 doplnit dH₂O do 10 ml

LB rozpipetujeme do alikvot a skladojeme v temnu při teplotě -20°C, krátkodobě můžeme skladovat i při +4°C

III. Srovnání novosti postupů

Předkládanou „Metodiku izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není v ČR k dispozici ucelená metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA, analýzu molekulárních markerů, detekci a kvantifikaci GMO u brambor. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědecké literatuře, která se problematikou molekulárního markerování a detekce GMO pro tento účel zabývá. Komplexní vyhodnocení vhodnosti jednotlivých postupů a použitelnosti jednotlivých markerů pak dostupné není. Detekce GMO na úrovni analýzy DNA představuje ve srovnání s fenotypovou či fyziologickou detekcí GMO kvalitativně jiný přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, na straně druhé pak má i své limity. Pro nekontroverzní použití molekulárních markerů pro účely detekce a kvantifikace je naprosto nezbytné použít odpovídající postupy izolace DNA, které poskytují kvalitní DNA použitelnou pro reprodukovatelné analýzy. Rovněž v oblasti vývoje a použití jednotlivých markerů dochází k vývoji a značnému posunu a každý z markerovacích systémů má svá specifika. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Přednosti a limity jednotlivých postupů pro detekci a kvantifikaci GMO jsou předmětem předkládané metodiky.

IV. Popis uplatnění metodiky

Předkládaná metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.) uvádí optimalizovaný postup pro izolaci DNA a následné metody detekce/ kvantifikace GMO. Vzhledem k tomu, že metod izolace DNA je celá řada, význam této metodiky je v tom, že uvádí optimalizovanou a komplexní metodiku izolace DNA bramboru právě pro účely detekce a kvantifikace GMO. Metoda CTAB-PVP poskytuje standardní kvalitu DNA, zaručuje reprodukovatelné výsledky v případě následných analýz. Optimalizovaná metodika byla vybrána na základě rozsáhlého testování a ověřování 8 metod izolace DNA a celé škály jejich modifikací, provedených v laboratoři Biotechnologického centra JU ZF České Budějovice.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy detekce a kvantifikace GMO u brambor. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů, které umožní zhodnocení přítomnosti/nepřítomnosti GMO ve vzorku a dále míru kontaminace vzorku, za současné kontroly správného provedení analýzy. Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a šlechtitelská, pracoviště kontrolních orgánů, která mohou s výhodou využít předností analýzy – detekce a kvantifikace GMO pomocí metod molekulární biologie. Metodika bude uplatněna prostřednictvím biotechnologické firmy Fubatech, s.r.o., Raduň. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

V. Seznam použité související literatury

- Bonfini, L., Heinze, P., Kay, S., Van den Eede, G. (2001). Review of GMO detection and quantification techniques, European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- Borokov, A.Y. 1997. Role of the leader intron in regulation of the expression of the potato sucrose synthase gene. *Plant Physiol.* 114 (Suppl.), 64-71.
- Ehlers, B., Strauh, E., Goltz, M., Kubsch, H., Wagner, H., Maidhof, J., Bendiek, B., Buhk, H.J. (1997). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 4, 118-121.
- Hemmer, W. (1997). Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland.
- Holst-Jensen, A., Holck, A., Lillehaug, D., Løvseth, A., Berdal, K.G., Knutsen, A.K., Shahbaz, S. (2001). Development of analytical methods and detection of genetically modified maize- and soybean-derived materials in selected foods on the Norwegian market in the year 2000. Joint report from the National Veterinary Institute (Veterinærinstituttet) and the Norwegian Food Control Authority (Statens næringsmiddeltilsyn, SNT).
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1997). Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 205, 442-445.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hubner, P. (1997). Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean Roundup Ready. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88, 164-175.
- Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10, 391-399.
- Meyer, R., Jaccaud, E. (1997) Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. In: Proceedings of the EURO FOOD CHEM. (IX, 8th -10th September, 1997, Interlaken, Switzerland), p. 23-28.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, Vol. 8, No. 19 4321-4326
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B., Čurn, V. (2008). Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Pietsche, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P., Wurz, A. (1997). Screeningverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensm. Rundsch.* 93, 35-38.
- Waiblinger, H.U., Pietsche, K., Brodmann, P., Wurz, A. (1997). A screening method for the identification of 'genetically modified' food of plant origin. in: Foods produced by means of genetic engineering. 2nd Status Report. Schreiber, G.A., Bögl, K.W. (eds.) Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. BgVV-Heft 1/1997, pp. 118-122.

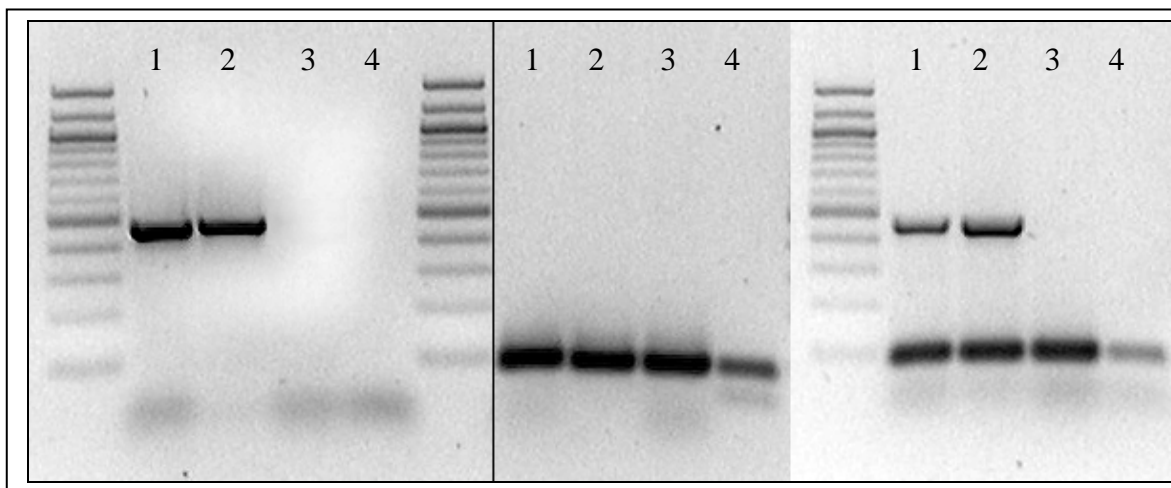
Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soybean food samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 207, 81-90.

VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

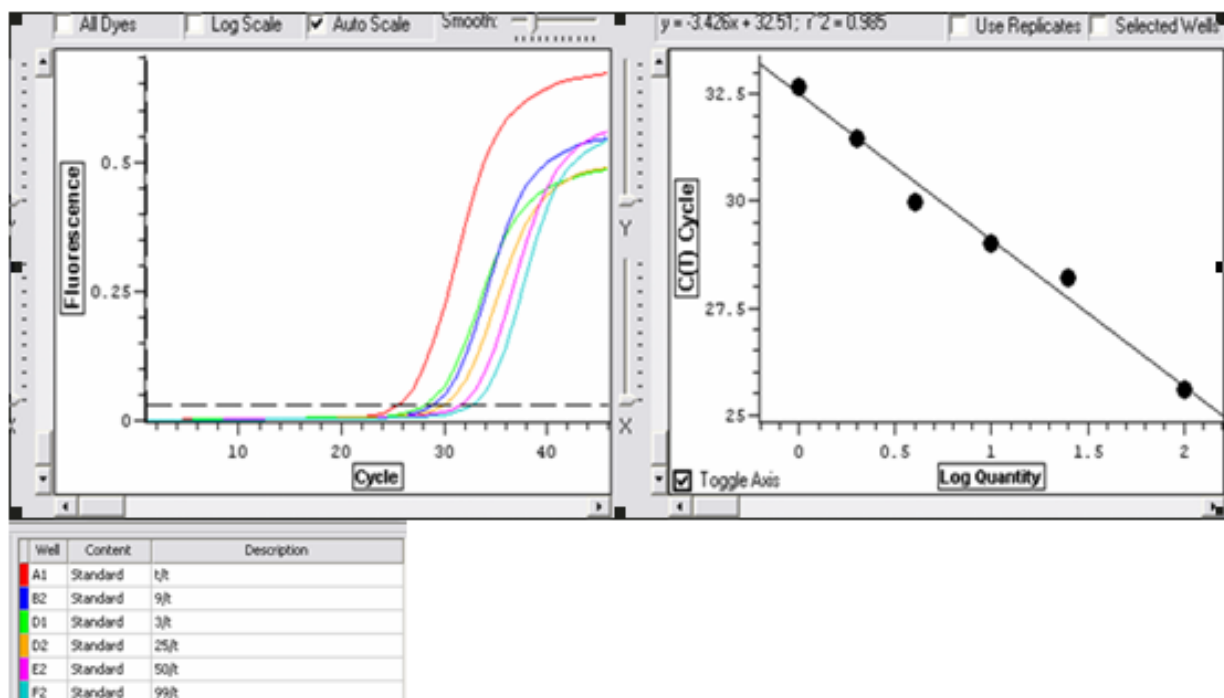
- Čurn V. (2005).** Molekulární markery - protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Kubátová B., Čurn V. (2005).** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.
- Nováková A., Čurn V. (2008).** Molecular markers in potato variety identification. Potato Research (*submitted*).
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006).** Molecular markers as a tool for potato varieties identification. 5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006, p. 215.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Detection of GMO potatoes based on PCR. 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 811.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** PCR based detection of GMO potatoes. 7th int. Symp. Recent Advances in Plant Biotechnology, Plant Biotechnology, Impact on High Quality Plant Production, Stará Lesná, June 10-16, 2007, Slovak Rep., p. 68.
- Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B., Čurn V. (2008).** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. Potato Res. (*submitted*).
- Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000).** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci. 17, 83-91.

VII. Příklady výstupů detekce a kvantifikace GMO u brambor

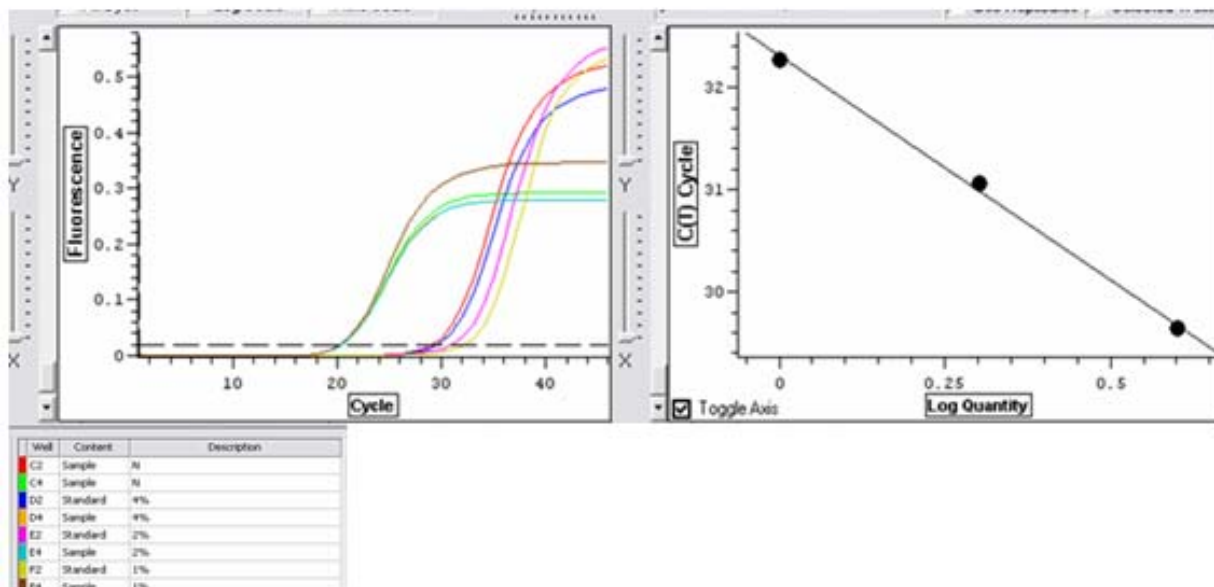
Ukázka výsledků detekce transgenů u brambor



Obr. 1: A-amplifikace lectinového genu (primery GNA), B-amplifikace bramborového genu UDP-glucose pyrophosphorylase (primery UGP), C-multiplex primerů GNA a UGP), 1A-C DNA izolovaná z transenní hlízy, 2A-C DNA izolovaná z listu transgenní rostliny, 3A-C DNA izolovaná z kontrolní hlízy, 4A-D DNA izolovaná z listu kontrolní rostliny.



Obr. 2: Standardní křivka, procento transgenu (A1) 100%, (B2) 10%, (D1) 25%, (E2) 2%, (F2) 1%.



Obr. 3: Kvantifikace neznámého vzorku, procento transgenu (D2, D4) 4%, (E2, E4) 2%, (F2, F4) 1%, (C2, C4) neznámý vzorek.

Well	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	%
C2	SBG1	Sample	N	72.04%	29.14	5.276

Obr. 4: Kvantifikace neznámého vzorku, vyhodnocení MiniOpticon (BIORAD)

Tab. 1: Kvantifikace neznámého vzorku, statistické vyhodnocení

sample	log	ct	%GMO
4	0,602059991	9,26	4,006851251
2	0,301029996	10,61	1,993115019
1	0	11,94	1,001738592
N		8,81	5,057006434

Název: Čurn V. a kol. (2011): Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.).

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Alena Nováková
Ing. Kateřina Šimáčková

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 13
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 28.11.2011 (č.j. 215694/2011-MZE-17011), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: VCurn@seznam.cz

ISBN: 978-80-7394-248-9