

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2014

Ročník XVIII, číslo 1/2014

Brno 2014

Obsah

1. **Stanovení živočišných tkání v krmivech metodou RT-PCR pro přežvýkavce**
Michaela Růžková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Za Opravnou 4, 150 06 Praha 1
2. **Izolace a stanovení počtu probiotických kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) podle ČSN EN 15789**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno 9
3. **Zavedení detekce screeningových sekvencí nptII, bar, P-FMV, cryIA(b), pat**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno 18

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení živočišných tkání v krmivech metodou RT-PCR pro přežvýkavce

Michaela Růžková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Za Opravnou 4, 150 06 Praha
michaela.ruzkova@ukzuz.cz

1 Úvod a cíl práce

Na základě žádosti Evropského parlamentu začala Evropská komise revidovat Nařízení Komise (ES) č. 999/2001, přílohu IV, kterým se uvažuje o povolení zkrmovat živočišný protein farmovým zvířatům s výjimkou přežvýkavých. Vzhledem k dosavadnímu omezení zkrmování živočišných proteinů byla zavedena mikroskopická metoda jako jediná referenční metoda. Ta však nedokáže stanovit druhovou specifikaci původu kontaminace. Pro povolení zkrmování živočišných proteinů je nutné zavést metodu, která umožní specifikovat původ proteinu do druhů. Evropská referenční laboratoř pro živočišné proteiny (EURL-AP) zvolila jako novou metodu Real Time-PCR (RT-PCR). Na základě žádosti DG SANCO se metoda RT-PCR zkoušela formou mezinárodního kruhového testu, který vypsal EURL-AP. Evropská Komise zároveň reviduje nařízení Komise (ES) 152/2006, přílohu VI, kde je metoda popsána.

Cílem této práce bylo zavést a otestovat metodu RT-PCR pro rutinní kontrolu krmiv na přítomnost živočišných proteinů a jejich konkrétní identifikaci v souladu s postupem EURL-AP.

2 Teoretická část

DNA v sobě nese genetickou informaci pro syntézu všech enzymů řídících jakoukoli biologickou aktivitu. Díky studiu sekvencí DNA mnohými molekulárně-biologickými přístupy je možné celkem zřetelně rozlišit a identifikovat nejen jednotlivé živočichy, ale i jejich příbuznost v návaznosti na zdraví i patogenitu či invazivitu (Doeda et al. 2010).

Řada laboratoří se v minulosti zabývala možnostmi aplikace metody RT-PCR pro rutinní kontrolu krmiv na obsah zakázaného živočišného proteinu v krmivech (Bottero et al., 2003).

Avšak jejich výsledky byly velmi nejednotné. Někteří poukazovali na to, že metoda není aplikovatelná vzhledem k podmínkám při výrobě živočišných mouček (130 °C; 300 kPa; 20 min), kdy je třeba uvedené teplotní a tlakové podmínky dodržet, čímž se DNA natolik rozštěpí, že se poruší její aktivní část a zbytek řetězce, i když bude dostatečně dlouhý, bude inaktivní (Raney et al. 2009).

Avšak jiná výzkumná centra velmi intenzivně v této oblasti publikovala se zajímavými poznatky (Saunders et al., 2009 a), že metoda je funkční, ale málo senzitivní a limit detekce je v případě RT-PCR na úrovni (3 – 5) %. Tyto závěry působily problematicky vzhledem k tomu, že zkrmování živočišného proteinu bylo na základě nařízení Komise (ES) č. 999/2001 přílohou IV. striktně zakázáno u farmových zvířat s výjimkou kožešinových zvířat. Mikroskopická metoda, která se při detekci užívala, měla limit detekce pod 0,1 %.

Tato metoda specifikuje podmínky pro zjišťování složek živočišného původu v krmivech. Metoda je použitelná pro jakoukoli přítomnost živočišných tkání ve všech druzích krmiv. Lze rozlišit přítomnost tkání zvířat na základě specifických částí DNA (primerů), které jsou řádně zmapované a je u nich známa jejich specifická sekvence nukleotidů (Raney et al. 2009). Jedná se tedy o metodu přísně specifickou, která je schopna rozlišit živočišnou kontaminaci až do druhu živočicha. Podle druhu složek živočišného původu lze v krmivech prokázat i malá množství (limit detekce 0,1 %).

Identifikace však musí být provedena na dokonale homogenním materiálu, který je umletý na částice o velikosti 0,5 mm. Velký význam pro správnou identifikaci a následnou interpretaci výsledků má i uspořádání laboratoře (Saunders et al., 2009 b), dodržování metodického postupu a analýza kritických bodů standardního operačního postupu, zejména kontaminace z prostředí laboratoře. EURL-AP navrhuje ve svém standardním operačním postupu (Berben et al., 2011) čištění pracovních ploch pravidelným otíráním 0,1M HCl a užívání UV sterilace místností společně s využitím PCR boxů. Naproti tomu Raney et al. (2009) udávají jako lepší variantu sterilace kombinaci denaturovaného ethanolu a UV záření s ohledem na to, že ošetření povrchu některých pracovních ploch 0,1M HCl tyto plochy neúměrně namáhá a výrazně se zkracuje jejich životnost.

3 Praktická část – testování metody RT-PCR v podmínkách NRL-RO Praha

3.1 Rozsah použití

Metoda umožní rutinní kontrolu krmiv a eventuálně hnojiv na přítomnost živočišného proteinu a jeho konkrétní specifikaci. Vychází z JPP ZK 10652.1 Detekce živočišných proteinů RT-PCR metodou.

3.2 Princip

Postup extrakce DNA ze vzorků krmiv se skládá ze tří základních kroků: lyze buněk, vysrážení proteinů a vysrážení a promývání extrahovaných nukleových kyselin.

PCR (polymerázová řetězová reakce) je biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu ke kopírování DNA. Amplifikace (zmnožení) DNA pomocí PCR je zajištěno použitím dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denurací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci. Tímto vznikne ohraničení žádaného ampliconu (PCR produktu) o určité délce nukleotidové sekvence, např. cílového genu.

3.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Umělohmotné mikrozkušavky 2 ml.
- 2 Umělohmotné mikrozkušavky (2 ml) se šroubovacím uzávěrem a gumovým těsněním.
- 3 PCR box.
- 4 Vortex.
- 5 Stolní centrifuga s rotorem pro mikrozkušavky (2 ml), s nastavitelnou hodnotou 14000 g a pracovní teplotou 4 °C.
- 6 Mrazák s pracovní teplotou -20 °C.
- 7 Purifikátor KingFisher mL.
- 8 ROCHE Lightcycler 2.0 se skleněnými kapilárami.

3.4 Chemikálie

Všechny chemikálie musejí být v čistotě pro molekulárně-biologické analýzy.

- 1 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/l}$.
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$.
- 3 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, roztok, $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$.
- 4 Komerčně dodávaný Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega) kit pro izolaci a purifikaci.
- 5 Isopropanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHOH}$.
- 6 Primery a proby syntetizovány subdodavatelsky u firmy ROCHE podle sekvence ze standardního operačního postupu EURL-AP.
- 7 MasterMix IQ od firmy BIORAD.
- 8 Voda ve vysoké čistotě pro molekulární biologii, H_2O (rezistivita $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$).

3.5 Příprava vzorku

3.5.1 Navážka vzorku

Navažuje se ($0,1000 \pm 0,0001$) g (Wang et Rossman, 1994), vždy paralelně pro snížení zatížení chybou (Ausubel, 1989). Stanovení se provádí za stejných podmínek, paralelní stanovení vždy z unikátní navážky totožného vzorku. Navažovaný materiál (vzorek) se vkládá do předem UV ozářených 2ml centrifugačních mikrozkušavek.

3.5.2 Izolace a purifikace DNA

Na základě standardního operačního postupu EURL-AP byla v NRL pro detekci živočišných proteinů zavedena metoda izolace založená na extrakci z komerčně dodávaného kitu (Promega) Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. Nevýhodou této metody je fakticky neznámé přesné chemické složení jednotlivých komponent kitu. Laboratoř využívá možnosti semiautomatického postupu izolace a purifikace.

Do centrifugační mikrozkušavky se vzorkem se přidá 500 μl lyzačního pufru A a 5 μl RNA pufru (20 mg/ml) a směs ve zkumavce se promíchá vortexem 15 s. Ke směsi se přidá 250 μl lyzačního pufru B a směs ve zkumavce se opět promíchá vortexem 15 s. Zkumavka se vzorkem a roztoky se inkubuje 10 min při laboratorní teplotě ($22 - 25$) $^\circ\text{C}$. Poté se do zkumavky přidá 750 μl precipitačního roztoku a směs ve zkumavce se promíchá vortexem 15 s. Zkumavky se centrifugují 10 min při 13000 ot/min.

Do purifikačních nádob do automatického purifikátoru se připraví:

- Do první pozice 50 μl magnetických kuliček. K nim se přidá 1000 μl supernatantu z centrifugační zkumavky a 800 μl isopropanolu.
- Do druhé pozice se napipetuje 250 μl lyzačního pufru B.
- Do třetí a do čtvrté pozice se napipetuje 1000 μl ethanolu.
- Do páté pozice 300 μl DNA čisté vody.

Purifikace probíhá 20 min v přístroji KingFisher ml pomocí naprogramované sekvence kroků.

Po ukončení purifikace zůstává v páté pozici přístroje izolovaná čistá DNA.

3.5.3 RT-PCR

Předem připravená reakční směs obsahuje 5 μl PCR vody, 1,10 μl primeru přímého, 1,10 μl primeru zpětného (konc. 10 μM), 0,73 μl proby (konc. 5 μM) a 12,02 μl MasterMixu.

Do kapiláry pro light cycler se nejprve pipetuje 5 μl vyčištěné DNA (DNA templátu) a poté se přidá 20 μl mixu. Kapilára se zazátkuje a vkládá do karuselu light cycleru. Každé stanovení probíhá s tzv. pozitivní a negativní kontrolou, kde je vždy do sady se vzorky nebo kontrolovaným materiálem dávána i kapilára s PCR vodou a mixem (jako negativní kontrola) a izolátem definované hledané DNA a mixem (jako pozitivní kontrola).

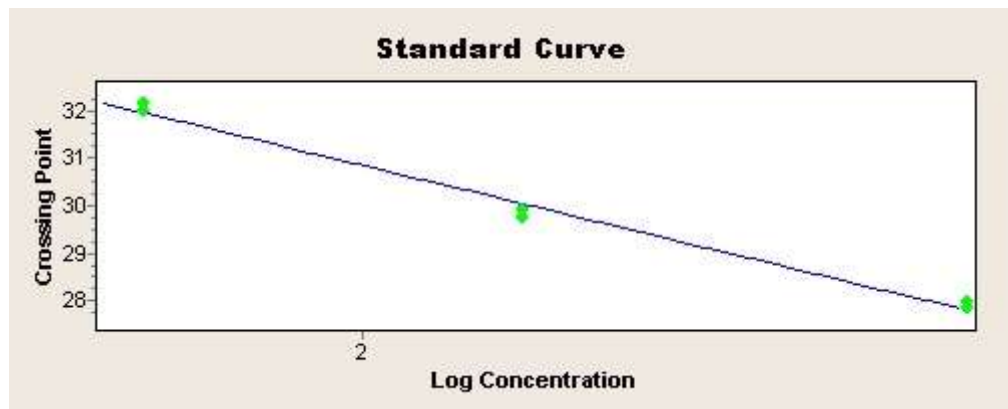
3.6 Vlastní zavedení metody RT-PCR

Samotnému zavedení metody předcházela validační studie, kterou se EURL-AP snažila ověřit a upřesnit limit detekce pro metodiku, vyloučit chyby přístrojového vybavení a upřesnit použití chemikálií pro následné testování v jednotlivých národních referenčních laboratořích.

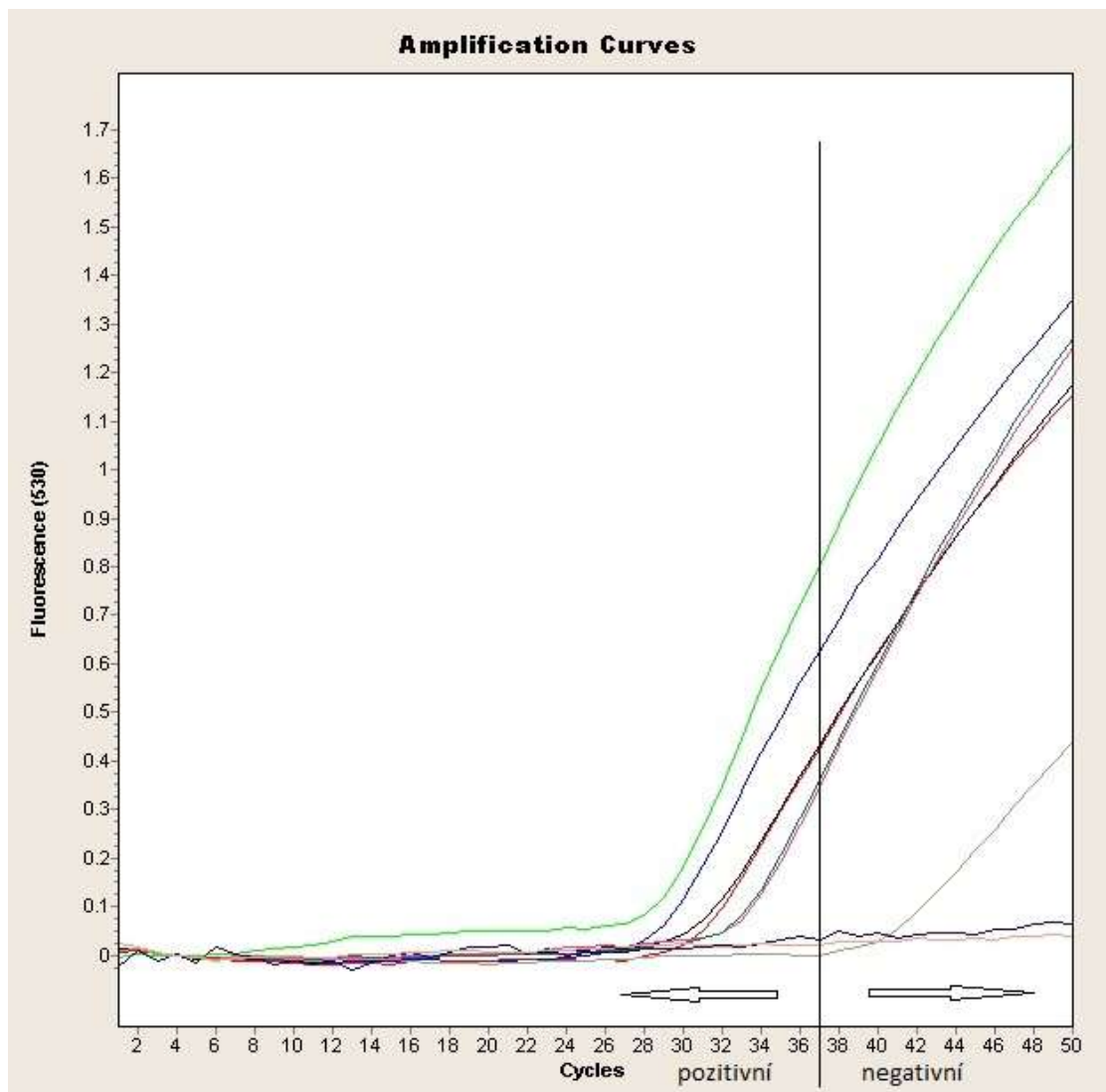
3.6.1 Příprava kalibrační křivky a test způsobilosti (Proficiency Test PCR 2012)

3.6.1.1 Příprava kalibrační křivky

Před testem způsobilosti obdržely NRL EU kalibrační roztoky (680 kopií DNA, 177 kopií DNA, 46 kopií DNA), jejichž pomocí si měly připravit kalibraci přístroje a vyhodnotit limit detekce resp. cyklus (C_t), odpovídající limitu detekce (obr. 1 a obr. 2), což je 15 kopií v roztoku, což odpovídá cca 0,025 % původní kontaminace krmiva živočišným proteinem (obr. 2). Vzhledem k validační studii, ze které vyplývá, že kritickými body pro RT-PCR jsou především typ přístroje, ale také MasterMix, v jehož složení nesmí být bovinní extrakt, byla každá z laboratoří vystavena zásadnímu testování, a to především vyhledáním vhodného MasterMixu, neboť jejich složení podléhá firemnímu tajemství a není publikováno.

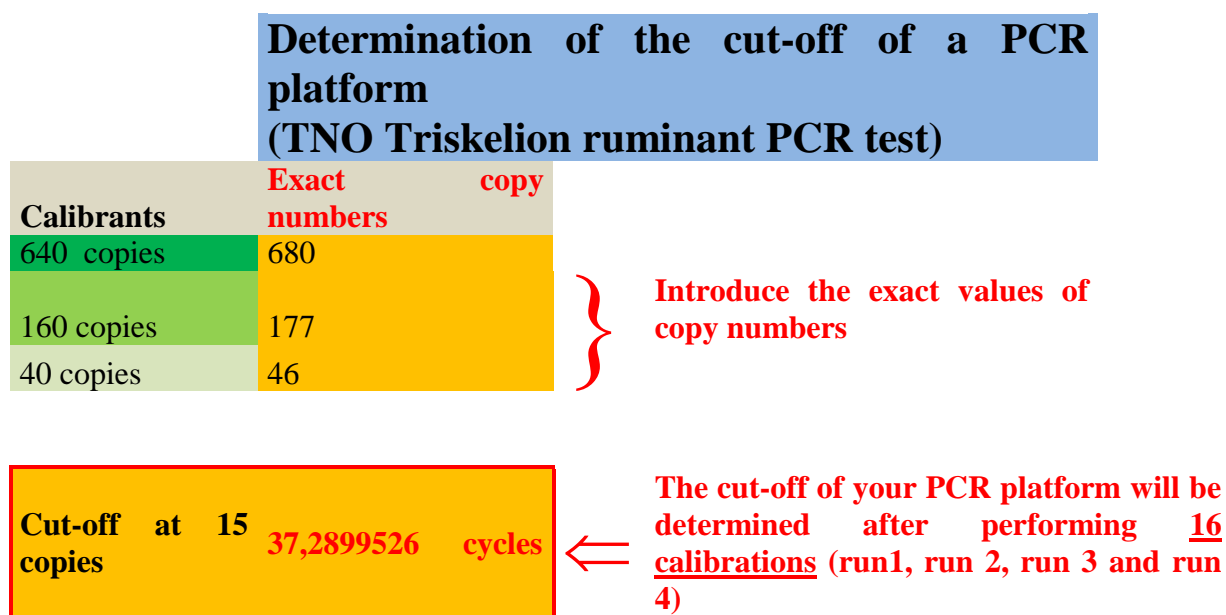


Obr. 1. Standardní křivka vyhodnocená programem ROCHE LightCycler 2.0.



Obr. 2. Křivka amplifikace při měření standardních roztoků (680 kopií DNA, 177 kopií DNA, 46 kopií DNA).

Národní referenční laboratoř pro detekci živočišných proteinů v krmivech připravila kalibrační křivku a vyhodnotila dle výpočtu limit detekce odpovídající 15 kopím DNA v 37,29 cyklu (viz obr. 2 a obr. 3). Pro naši laboratoř tedy vzorky, které se budou projevovat jako pozitivní po tomto cyklu, jsou fakticky pod limitem detekce a tudíž vyhodnoceny jako negativní.



Obr. 3. Vyhodnocení limitu detekce.

3.6.1.2 Test způsobilosti (PCR Proficiency Test 2012)

Po přípravě kalibrace a úpravě standardního operačního postupu na podmínky laboratoře byl vytvořen jednotný pracovní postup, který zahrnuje nejen identifikaci vhodného MasterMixu, ale i nastavení limitu detekce pro LightCycler firmy ROCHE, kterým je laboratoř vybavena. Z EURL-AP obdržela laboratoř celkem 10 kontrolních vzorků pro provedení PCR Proficiency testu 2012. Laboratoř vzorky analyzovala ve shodě s připraveným jednotným pracovním postupem a vyhodnotila.

3.6.2 Výsledky

NRL pro detekci živočišných proteinů v krmivech na základě vyhodnocení RT-PCR Proficiency testu EURL-AP úspěšně zavedla metodu detekce živočišného proteinu v krmivech.

Hodnocení EURL-AP pro NRL ČR

Laboratoř bezchybně absolvovala test způsobilosti. Také v případě kalibrační křivky se NRL ČR shodla s laboratořemi, které se původně účastnily pouze validační studie.

4 Závěr

Metoda RT-PCR pro detekci živočišných proteinů v krmivech byla úspěšně zavedena, kalibrována i vyhodnocena na základě mezinárodního testu způsobilosti (RT-PCR Proficiency test) jako metoda prověřená. Metoda bude akreditovaná během dozorového auditu ČIA.

5 Literatura

1. Ausubel F.M. (1989): *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley and Sons, NY.
2. Berben G., Fumiére O., Marien A., Hulin J. (2011) Detection of PAPs using PCR methods. CRL – AP training. Gembloux, 38 s.
3. Bottero M. T., Dalmasso I. A., Nucera D., Turi R. M., Rosati S., Squadrone S., Goria M., Civera T. (2003): Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J Food Prot.*,66 (12):2307-12.
4. Douda O., Zouhar M., Nováková E., Mazáková J., Ryšánek P. (2010): Variability of D2/D3 segment sequences of several populations and pathotypes of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*). *Plant Protection Science (Ochrana rostlin)*, 46, (4): 171 - 180.
5. Raney S., Martin T. C., Sawyer J. P. (2009): Detection assay for meat and bone meal in feed. *J Food Prot.*, (12):2109-12.
6. Saunders G.C., Martin T.C., Sawyer J., Windl O., Reaney S.D. (2009 a): Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J Food Prot.*, 72 (5):1055-62.
7. Saunders G.C., Lantier I., Cawthraw S., Berthon P., Moore S.J., Arnold M., Windl O., Simmons M., Andréoletti O., Bellworthy S., Lantier F. (2009 b): Protective effect of the T112 PrP variant in sheep challenged with BSE. *J Gen Virol.* 75 (8): 122-131.
8. Wang, Z. and Rossman, T.G. (1994): Isolation of DNA fragments from agarose gel by centrifugation. *Nucl. Acids Res.* 22, 2862–3.

Izolace a stanovení počtu probiotických kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) podle ČSN EN 15789

Kateřina Staňková

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

1 Úvod a cíl práce

Probiotika jsou definovaná jako „živé mikroorganismy, které, jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele“. Jako probiotické kultury se používají bakterie, kvasinky a plísňe, které přirozeně obývají trávicí trakt. U hospodářských zvířat mají příznivý vliv na užitkové vlastnosti (dojivost, snáška vajec, přírůstky hmotnosti) i na zdravotní stav.

Nejčastěji používané probiotické kvasinky jsou *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se o fakultativně anaerobní mikroorganismy elipsoidního nebo kulovitého tvaru, které vytvářejí kolonie na selektivním agaru s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem.

Na oddělení mikrobiologie a biochemie ÚKZÚZ se pro stanovení kvasinek rodu *Saccharomyces* v rámci kontroly označování krmiv dosud používala metoda Stanovení obsahu kvasinek rodu *Saccharomyces* – obecný postup (postup JPP ZK 10120.1). Cílem práce bylo zavést metodu dle ČSN EN 15789 Krmiva – Izolace a stanovení počtu probiotických kvasinek. Tato metoda byla vyvinuta pro stanovení počtu probiotických kvasinek v doplňkových látkách, premixech a krmivech.

2 Princip

Základem metody je homogenizace vzorku, příprava výchozí suspenze, ředící řady a inokulace zalitím médiem. Plotny se inkubují v aerobních podmínkách 2 dny při (35 ± 1) °C. Narostlé kolonie se spočítají, kvasinky se ověří podle mikroskopické morfologie a vyjádří se jako kolonie tvořící jednotky (CFU) v g nebo kg krmiva.

3 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy.
- 2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 3 pH metr.
- 4 Magnetické míchadlo.
- 5 Přístroj ke sterilizaci teplem – autokláv, sušárna nebo tlakový hrnec.
- 6 Termostat s teplotou udržovanou na (35 ± 1) °C.
- 7 Vodní lázeň.
- 8 Vortex.
- 9 Mikroskop s imerzním objektivem (zvětšení 100 ×).
- 10 Sterilní laboratorní sklo – lahve s uzávěrem, Erlenmeyerovy baňky, kádinky, zkumavky, Petriho misky, podložní a krycí sklíčka.
- 11 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (100 – 1000) µl a sterilní špičky bez filtru.
- 12 Jednorázové plastové nebo sterilní skleněné hokejky.
- 13 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Podle charakteru materiálu se sterilizuje a dekontaminuje buď tepelně v sušárně 1 h při $(115 - 120)$ °C, nebo 15 min v autoklávu při (121 ± 1) °C nebo chemicky např. 70% ethanolem, Savem, apod.

4 Chemikálie

Používají se chemikálie čistoty p. a., pokud není uvedeno jinak.

Základní ředící roztok pro přípravu výchozí suspenze

Ředící roztok pro přípravu výchozí suspenze

Chlorid sodný NaCl	8 g
Chlorid draselný KCl	0,2 g
Hydrogenfosforečnan sodný Na ₂ HPO ₄	1,15 g
Dihydrogenfosforečnan draselný KH ₂ PO ₄	0,2 g
(re)destilovaná voda	

Chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě a doplní do objemu 1 l. Upraví se pH na hodnotu $(7,3 \pm 0,2)$. Takto připravený roztok se sterilizuje v autoklávu 15 min při $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu.

Ředící roztok pro přípravu série ředění

Bakteriologický pepton	1 g
Chlorid sodný NaCl	8,5 g
(re)destilovaná voda	

Chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě a doplní do objemu 1 l. Upraví se pH na hodnotu $(7,0 \pm 0,2)$. Takto připravený roztok se sterilizuje 15 min v autoklávu při $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu.

Kultivační půda

Agar s kvasničním extraktem, glukózou a chloramfenikolem.

Kvasniční extrakt	5 g
Glukóza	20 g
Chloramfenikol	0,1 g
Agar	(12 – 15) g
(re)destilovaná voda	1000 ml.

Chemikálie se rozpustí v (re)destilované vodě za varu. Upraví se pH na hodnotu $(6,6 \pm 0,4)$. Doplní se do objemu 1 l. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím k zalévání inokula se půda uchovává při $(48 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Lze využít komerčně vyráběný agar (např. chromogenní agar), který se připravuje podle návodu výrobce.

Plotny lze uchovávat v chladničce 7 dnů. Před použitím se plotny nechají vytemperovat na laboratorní teplotu.

Fyziologický roztok

Chlorid sodný NaCl	0,85 g
(re)destilovaná voda	100 ml.

Chlorid sodný se rozpustí v (re)destilované vodě a doplní do objemu 100 ml. Upraví se pH na hodnotu $(7,4 \pm 0,2)$ roztokem hydroxidu sodného (1 mol/l, viz níže). Takto připravený roztok se sterilizuje 15 min v autoklávu při (121 ± 1) °C nebo 30 min v tlakovém hrnci. Před použitím se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu.

Ostatní potřebné chemikálie

Hydroxid sodný c (NaOH) = 1 mol/l, 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

(re)destilovaná voda.

Denaturovaný 70% ethanol.

Imerzní olej.

5 Testovaný materiál

Pro zavedení nové metody se použil vzorek č. 1123/2012 – Minerální krmivo pro skot – dojnice dodaný do laboratoře ke stanovení množství *Saccharomyces cerevisiae* v rámci cílené kontroly přítomnosti doplňkových látek v krmivech metodou č. 10120.1 s deklarovaným množstvím min. 670×10^9 CFU (jednotek tvořících kolonie) v 1 kg krmiva.

Současně byl použit kontrolní kmen *Saccharomyces cerevisie* na želatinovém disku pro testování médií z České sbírky mikroorganismů.

6 Pracovní postup

Uvaří se a vysterilizuje se agar s kvasničním extraktem, glukózou a chloramfenikolem. Naváží se $(20 \pm 0,1)$ g vzorku ve třech paralelních navážkách a přidá se k němu $(180 \pm 0,1)$ ml základního ředícího roztoku pro přípravu výchozí suspenze. Takto připravené vzorky se míchají 5 min na míchadle nastaveném na vysokou rychlost. Poté se nechají 30 min stát a nakonec se opět míchají 2 min na míchadle nastaveném na vysokou rychlost. Tímto postupem se získá základní ředění 10^{-1} . Podle předpokládaného obsahu kvasinek

Saccharomyces cerevisiae ve vzorku se připraví ředící řada – série zkumavek s 9 ml ředícího roztoku pro přípravu série ředění (dále pepton). 1 ml výchozí suspenze 10^{-1} se přenese do zkumavky s peptonem. Vzniklé ředění je 10^{-2} . Tato směs se řádně promíchá na vortexu a přenese se do další zkumavky obsahující pepton. Postup se opakuje, dokud se nezískají dvě po sobě jdoucí ředění vhodná pro inokulaci a inkubaci. Z každé vybrané zkumavky se odebere 1 ml vzorku a přenese se na Petriho misku. Inokulum se zalije asi 15 ml agaru, pečlivě se krouživými pohyby promíchá a nechá se utuhnout. Naočkované misky se převrátí dnem vzhůru a umístí se do termostatu. Misky se inkubují 48 h při (35 ± 1) °C. Po uplynutí této doby se narostlé kolonie spočítají.

7 Počítání kolonií

Pro výpočet se použijí misky, které obsahují ne více než 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních.

Kolonie narostlé na miskách jsou smetanově zbarvené, vypouklé, neprůhledné, nepravidelného tvaru. Jejich velikost kolísá od 1 mm do 6 mm. Ve spodní vrstvě agaru mohou narůst i kolonie *Saccharomyces cerevisiae* ze spodního kvašení, které jsou smetanově zbarvené, neprůsvitné a mají nepravidelný tvar i okraje.

U vybraných kolonií se provede tzv. fenotypová charakteristika, tzn. kontrola mikroskopické morfologie za použití olejové imerze. Kvasinky jsou tvořeny buňkami kulovitého nebo elipsoidního tvaru, mnohdy s projevy pučení.

Celkový počet mikroorganismů N na g vzorku se vypočte podle vztahu

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$\sum C$ součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách,

V objem inokula aplikovaného na misku v ml,

n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,

d faktor prvního pro výpočet použitého ředění,

Výsledek se vyjádří jako celkový počet mikroorganismů na g nebo kg vzorku jako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x , kde x je mocnina 10.

8 Výsledky a diskuse

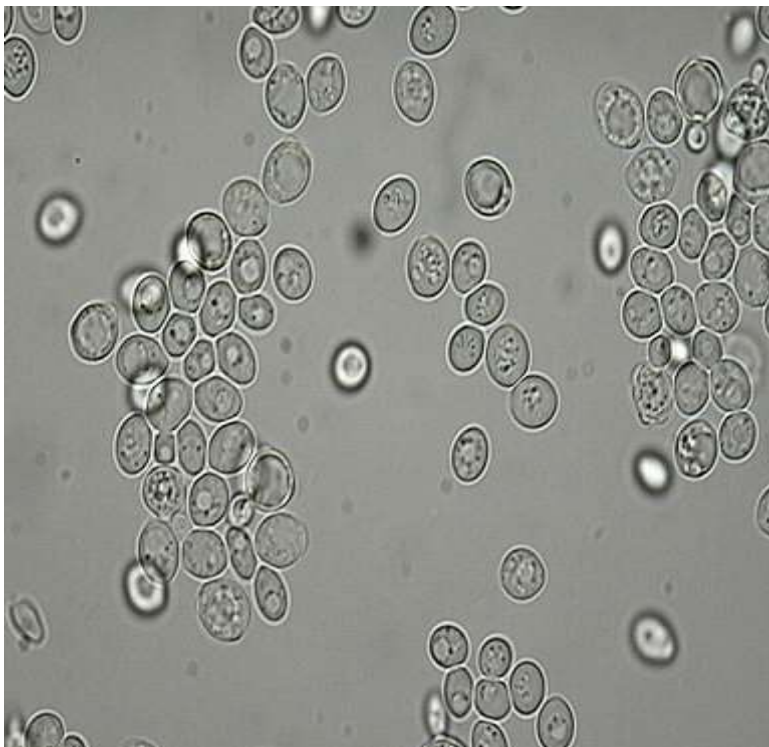
Provedly se tři na sobě nezávislé analýzy stejného vzorku. Vzorek se vždy stanovil ve třech paralelních navážkách. Podle předpokládaného množství kvasinek rodu *Saccharomyces* ve vzorku se pro inokulaci a inkubaci zvolila ředění 10^{-7} a 10^{-8} . Současně se provedla kontrola média kmenem z České sbírky mikroorganismů (obr. 1). Po 48h inkubaci ploten se provedla fenotypová charakteristika vybraných kolonií jak z kontrolního kmene (obr. 3), tak i vybraných kolonií analyzovaného vzorku (obr. 4) a spočítaly narostlé kolonie na miskách analyzovaného vzorku (obr. 2). Počty narostlých kolonií a z nich vypočítané celkové počty mikroorganismů *N* na kilogram vzorku jsou uvedeny v tabulce 1.



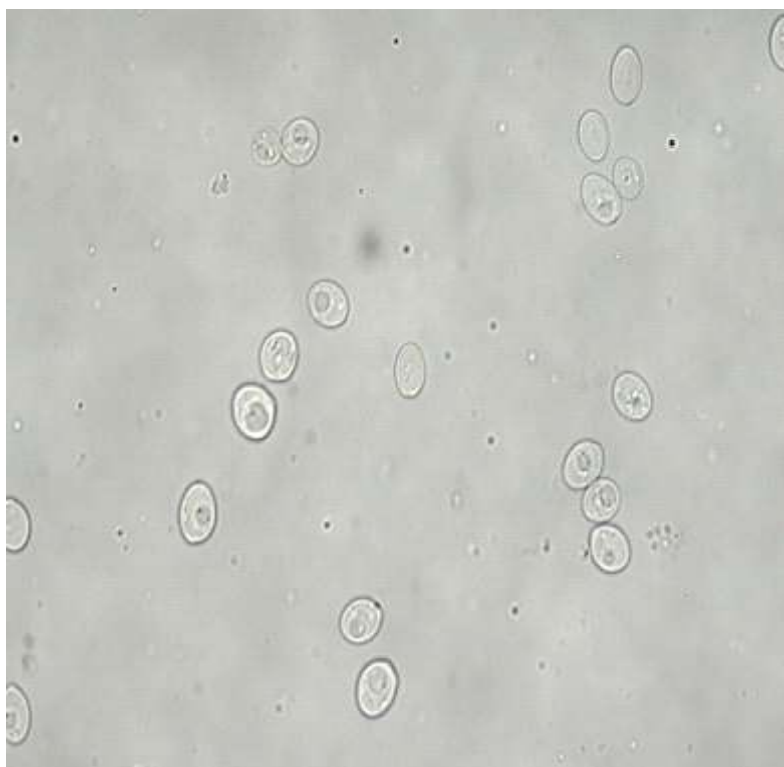
Obr. 1 Petriho miska s kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* z České sbírky mikroorganismů.



Obr. 2 Petriho miska s koloniemi kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* z analyzovaného vzorku č. 1123/2012.



Obr. 3 Fenotypová charakteristika kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* z České sbírky mikroorganismů.



Obr. 4 Fenotypová charakteristika vybrané kolonie kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* z analyzovaného vzorku č. 1123/2012.

Tabulka 1. Výsledky tří na sobě nezávislých analýz vzorku 1123/2012 (35 °C, inkubace 48 h).

	Počet kolonií Ředění 10^{-7}	Počet kolonií Ředění 10^{-8}	<i>N</i> (CFU v 1 kg)
23. 8. 2012	70	7	$7,0 \times 10^{11}$
	62	6	$6,18 \times 10^{11}$
	59	7	$6,0 \times 10^{11}$
29. 8. 2012	66	8	$6,73 \times 10^{11}$
	60	7	$6,09 \times 10^{11}$
	65	6	$6,45 \times 10^{11}$
13. 9. 2012	65	5	$6,36 \times 10^{11}$
	64	7	$6,45 \times 10^{11}$
	68	8	$6,91 \times 10^{11}$

Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že ačkoli proběhly tři na sobě nezávislé analýzy, počet kolonií narostlých na miskách v obou dvou ředěních a celkový počet mikroorganismů N z nich určený jsou přibližně shodné. Výsledky odpovídají deklarované hodnotě.

Pro mikrobiologické analýzy je důležité, aby se paralelní stanovení shodovala v řádu, což odpovídá ve všech případech výsledků analýzy vzorku 1123/2012.

9 Statistika

Variabilita v rámci jednotlivých stanovení vypočtená jako variační koeficient činila 8,34 %; 4,99 % a 4,49 %. Nebyl nalezen rozdíl mezi průměry jednotlivých měření (anova).

10 Závěr

Cílem práce bylo přejít od dosud používané metody pro stanovení počtu probiotických kvasinek rodu *Saccharomyces* (postup č. 10120.1) v krmivech k postupu dle ČSN EN 15789 Krmiva – Izolace a stanovení počtu probiotických kvasinek. Vzhledem k tomu, že jsou v dané normě uvedeny veškeré podmínky pro zpracování vzorku, přípravu výchozí suspenze, ředění, kultivační půdy, inokulaci a inkubaci, byla tato metoda pouze otestována a adaptována na podmínky laboratoře OMB.

11 Literatura

- 1 prEN 15789, Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of yeast probiotic strains, CEN, 2008.
- 2 ČSN EN 15789, *Krmiva – Izolace a stanovení počtu probiotických kvasinek*, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.

Zavedení detekce screeningových sekvencí nptII, bar, P-FMV, cryIA(b), pat

Kateřina Staňková

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

1 Úvod a cíl práce

Geneticky modifikované plodiny byly vyvinuty ve snaze zlepšit kvalitu potravin a vyřešit některé problémy spojené s jejich pěstováním, např. odolnost vůči chorobám, hmyzím škůdcům, herbicidům aj. Pěstitelské plochy, druhy geneticky modifikovaných rostlin a typy genetických modifikací ve světě postupně narůstají. Mezi nejvíce pěstované modifikované rostliny patří sója, kukuřice, bavlna a řepka. V EU a tedy i České republice je povoleno pěstování geneticky modifikované kukuřice MON810 a brambor Amflora. Pro dovoz a zpracování jsou v EU povoleny některé genetické modifikace bavlny, cukrové řepy, kukuřice, řepky a sóji. Většina z nich se do České republiky nedováží, přesto nelze vyloučit jejich přítomnost v krmných surovinách. Podle předpisů EU musejí být krmiva, která obsahují geneticky modifikované organismy (dále GMO), nebo která jsou z GMO vyrobená, označena slovy „geneticky modifikovaný ...“ nebo „vyrobena z geneticky modifikovaného ...“. Výjimku z označování mají produkty, u kterých tvoří obsah geneticky modifikovaného materiálu neúmyslné a technicky nevyhnutelné příměsi v EU povolených GMO v množství nepřesahujícím 0,9 %.

V České republice se každoročně monitorují zemědělské produkty – krmiva a osiva. Monitoring je zaměřen jednak na ověření přítomnosti GMO, které v EU nebyly povoleny k uvedení do oběhu, tak na kontrolu správného označování produktů z GMO, které již povolení k uvedení do oběhu v EU získaly.

Geneticky modifikovaný organismus je podle zákona č. 78/2004 Sb. definován jako takový organismus (kromě člověka), jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací, tj. cílenou změnou genetického materiálu způsobem, kterého se nedosáhne přirozeně.

V případě geneticky modifikovaných rostlin je ve většině případů touto cílenou změnou vnesení genového konstrukt do rostlinné DNA. Genový konstrukt je laboratorně připravený úsek dědičné informace ve formě deoxyribonukleové kyseliny a skládá se ze sekvence strukturního genu a z regulační sekvence. Strukturní gen určuje, co se bude podle genového konstrukt v rostlině produkovat. Volba strukturního genu proto závisí na požadavku na nově získanou vlastnost transgenní rostliny. Volba regulační sekvence je také velmi důležitá, protože určuje kde, kdy a za jakých podmínek se přenášený gen uplatní.

Stanovení jednotlivých součástí genového konstrukt, a to regulačních sekvencí (promotoru, terminátoru), ale i sekvencí zodpovědných za některé požadované vlastnosti transgenní rostliny, jsou předmětem tzv. screeningu. Jedná se o první krok detekce GMO, jehož výsledkem je orientační zjištění, zda analyzovaný vzorek obsahuje nebo neobsahuje genetickou modifikaci.

Pozitivní výsledek screeningu vede k dalšímu kroku detekce, a to identifikaci konkrétní genetické modifikace. Protože existují i genetické modifikace, které elementy stanovované screeningem neobsahují, musí se u nich provést přímá identifikace GMO bez provedení screeningu.

Správný výběr screeningových metod vede nejen ke snížení počtu zkoušek a tím doby trvání analýzy, ale i ke snížení nákladů na analýzu.

Metody používané k detekci GMO jsou validovány laboratoří EURL (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed).

Cílem práce bylo rozšířit dosud používané screeningové metody o dalších pět známých screeningových sekvencí společných pro více genetických modifikací a tím urychlit analýzu vzorku a snížit náklady na analýzu. Mezi nově zaváděné screeningové prvky patří: nptII, bar, P-FMV, cry1A(b) a pat.

Neomycin phosphotransferase gen (**nptII**) je selekční gen z *E. coli*, který zajišťuje rezistenci vůči kanamycinu (aminoglykosidové antibiotikum).

Phosphinotricin N-acetyltransferase gen (**bar**) je gen z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* kódující fosfinotricinacetyl transferasu, která zajišťuje odolnost vůči herbicidu s účinnou látkou fosfinotricinem.

Promotor z modifikovaného viru krtičníku (Figworth Mosaic Virus) (**P-FMV**) se používá jako tzv. regulační sekvence (část molekuly DNA) nutná pro spuštění transkripce genu.

Gen mikroba *Bacillus thuringiensis*, který kóduje protein **cry1A(b)**, zajišťuje rostlinám produkci bílkoviny s insekticidním účinkem.

Phosphinotricin N-acetyltransferaze gen (**pat**) je gen odvozený z bakterie *Streptomyces viridichromogenes* kódující fosfinotricinacetyltransferázu, která zajišťuje odolnost vůči herbicidu s účinnou složkou glufosinátem.

2 Princip

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

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

3 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy.
- 2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Vortex.
- 4 Minitřepačka.
- 5 Laminární box.
- 6 Termální cykler.
- 7 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 8 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 9 Transiluminátor.

- 10 Fotodokumentační zařízení a software.
- 11 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l a sterilní špičky s filtrem.
- 12 Plastové zkumavky o objemu 0,20 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 13 Výrobník ledu.
- 14 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál na odpad, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

Podle charakteru materiálu se sterilizuje a dekontaminuje buď tepelně v sušárně 1 h při (115 – 120) °C, nebo 15 min v autoklávu při (121 \pm 1) °C nebo chemicky např. 70% ethanolem, Savem, apod.

4 Chemikálie

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

REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Amplifikační primery, kupují se od ověřeného dodavatele, např. Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové

APH2 F: CTC ACC TTG CTC CTG CCG AGA

APH2 R: CGC CTT GAG CCT GGC GAA CAG

RapB-F1: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C

RapB-R1: GAG GTC GTC CGT CCA CTC

FMV1: AAG CCT CAA CAA GGT CAG

FMV2: CTG CTC GAT GTT GAC AAG

CRY2-F: CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC

CRY2-R: CAG GAA GGC GTC CCA CTG GC

pat_16-L (F): GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT

pat_16-R (R): TTC CAG GGC CCA GCG TAA G

Příprava amplifikačních primerů: Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství následujícím způsobem.

Zásobní roztok o koncentraci 100 μ M: Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, který nemusí být viditelný, se přidá voda vhodná pro PCR, v množství uvedeném výrobcem.

Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μ l do sterilních zkumavek o objemu (0,5 – 0,6) ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při teplotě $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Pracovní roztok o koncentraci 20 μM : Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody vhodné pro PCR. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po (20 – 25) μ l a zamrazí na teplotu $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na_2EDTA .

Trizma base.

Ledová kyselina octová.

Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

Příprava TAE pufru

Příprava zásobního roztoku $50 \times \text{TAE}$

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA: 186,1 g Na_2EDTA se vmíchá do 750 – 800 ml (re)destilované vody. Na_2EDTA se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes fritu předem ošetřenou (30 – 60) min při $(115 - 120)^\circ\text{C}$. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris: Naváží se 242 g Trizma base a rozpustí v 650 ml (re)destilované vody. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml předem připraveného 0,5 M zásobního roztoku EDTA (pH 8,5). Doplní se (re)destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě.

Příprava pracovního roztoku $1 \times \text{TAE}$ pro elektroforézu a přípravu gelu

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

Ostatní

Voda vhodná pro PCR.

(re)destilovaná voda.

Ethidium bromid, zásobní roztok. Dodává se komerčně.

Ethidium bromid, pracovní roztok. Získá se zředěním zásobního roztoku 10 × (re) destilovanou vodou.

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

(0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

70% etanol.

Testovaný materiál

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku. Negativní kontroly se používají pro prokázání specifity reakce.

nptII

ERM[®]BF416b (naše označení CRM 1/2012) obsahující 0,1 % kukuřice MON 863 a ERM[®]-BF416c (naše označení CRM 2/2012) obsahující 0,98% kukuřice MON 863, IRMM Institute for reference Material and Measurements.

bar

pozitivní kontrola MS8xRf3 s naším označením CRM 12/2009 ze setu Rapeseed GMO Standard Set for Rapeseed GT73, GS40/90,MS8xRf3 and Oxy235 obsahující 1% geneticky modifikované DNA, Sigma-Aldrich.

P-FMV

AOCS 0304-B – naše označení CRM 6/2006, jedná se o pozitivní kontrolu genetické modifikace řepky GT73 s obsahem 99,19 % genetické modifikace, AOCS (American Oil Chemists' Society).

Cry1A(b)

ERM[®]BF411b (naše označení CRM 2/2008) obsahující 0,1 % kukuřice Bt176 a ERM[®]BF411d (naše označení CRM 6/2009) obsahující 1% kukuřice Bt176, IRMM Institute for reference Material and Measurements.

pat

ERM[®]BF418b (naše označení CRM 5/2012) obsahující 0,1 % kukuřice 1507 a ERM[®]BF418c (naše označení CRM 6/2012) obsahující 0,99 % kukuřice 1507, IRMM Institute for reference Material and Measurements.

5 Pracovní postup

Pro zavedení detekce nových screeningových sekvencí byly využity již zavedený JPP postup Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR (postup č. 10250.1) a metody validované EURL.

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů a amplifikační programy byly převzaty z metod validovaných EURL.

nptII

amplifikační program:

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	25	
annealing	60	30	35
extenze	72	45	
finální extenze	72	420	1

délka amplikonu: 215 bp

bar

amplifikační program:

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	900	1
denaturace	95	10	
annealing	60	15	45

délka amplikonu: 60bp

P-FMV

amplifikační program:

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	94	180	1
denaturace	94	30	
annealing	54	30	40

extenze	72	40	
finální extenze	72	180	1

délka amplikonu: 196bp

Cry1A(b)

amplifikační program:

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
dekontaminace	50	120	1
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	45
annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 129 bp

pat

amplifikační program:

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	40
annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 186 bp

5.1 Polymerázová řetězová reakce

Laminární box se (20 – 30) min vysvítí UV zářením. Laminární box a v něm umístěné předměty se dekontaminují 70% etanolem. Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky, apod.

Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová, negativní a pozitivní kontrola). Podle tabulky reakční směsi (Tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Jelikož se reagentie uchovávají v mrazáku, musejí se předem rozmrazit buď při laboratorní

teplotě, nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají převrácením nebo krátkým vortexováním a zcentrifugují na minicentrifuze.

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

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

Tabulka 1. Složení reakční směsi.

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

5.2 Příprava agarózového gelu

Pro hodnocení amplifikovaných fragmentů se používá 2% agarózový gel. Do Erlenmeyerovy baňky se naváží ($1,6 \pm 0,1$) g práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního $1 \times$ TAE pufu. Vaří se (15 – 20) min při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle do doby, až se vyčeří roztok a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Mezitím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

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

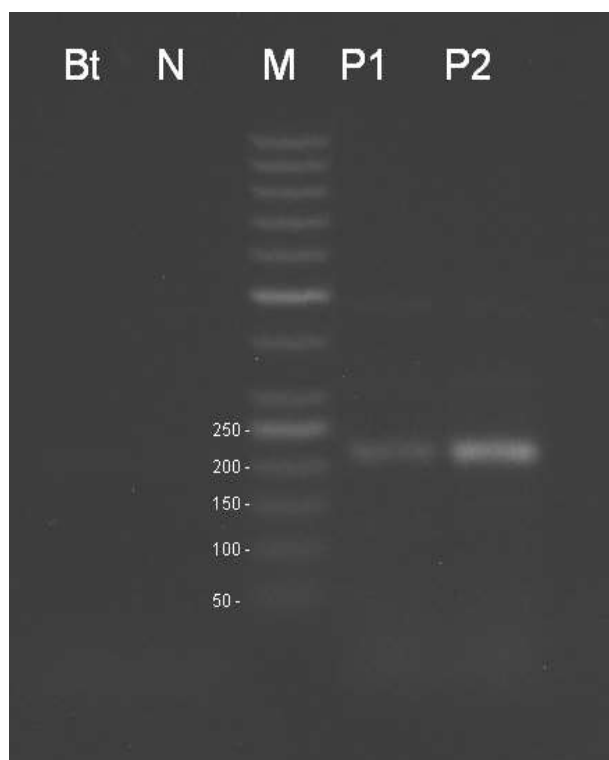
5.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním $1 \times$ TAE pufrem několik mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola, elektroforetický marker a pozitivní kontrola. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku a jeho potřebném množství. Amplifikáty získané pomocí kitu REDTaq[®] Ready Mix[™] PCR Reaction Mix se nanášejí přímo z PCR zkumavek, protože obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení kontrol a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza. Doporučuje se nastavení zdroje (100 – 140) V, maximum mA, (30 – 60) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit dle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje.

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

6 Výsledky a diskuze

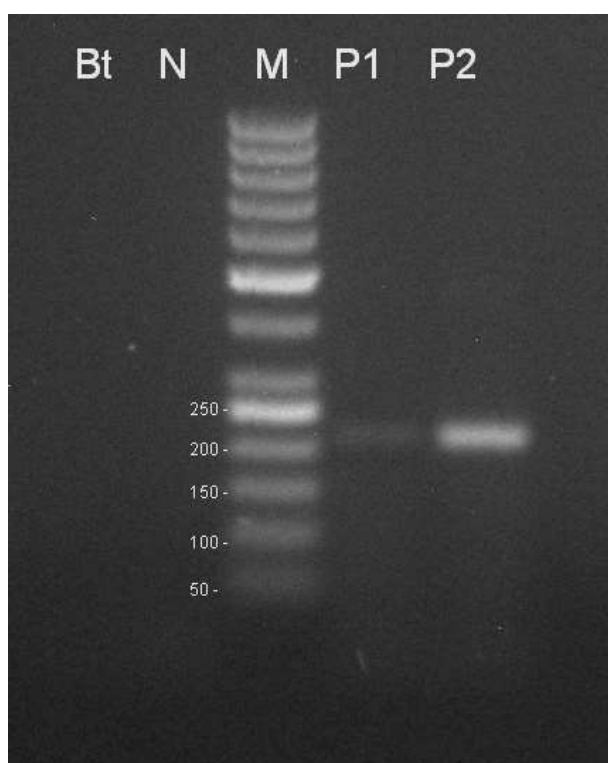
nptII



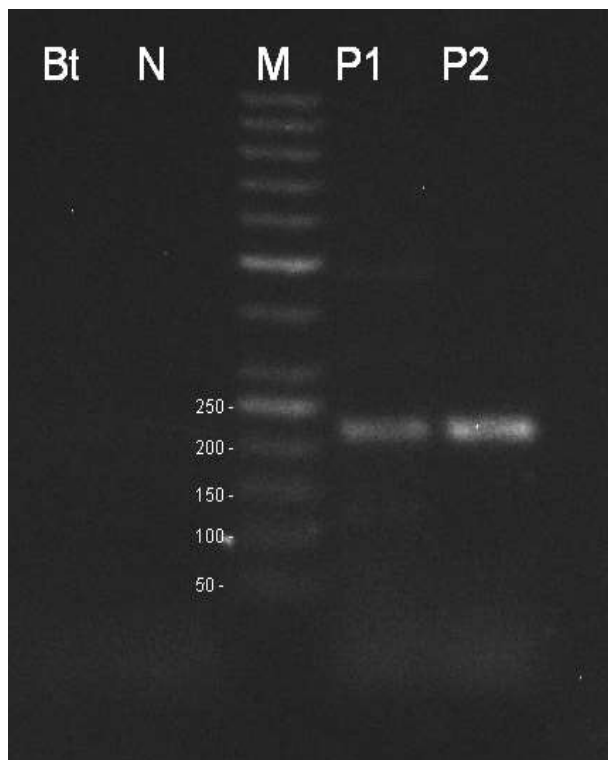
Obr 1. 12. 9. 2012 amplifikace úseku 215 bp – nptII: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012.



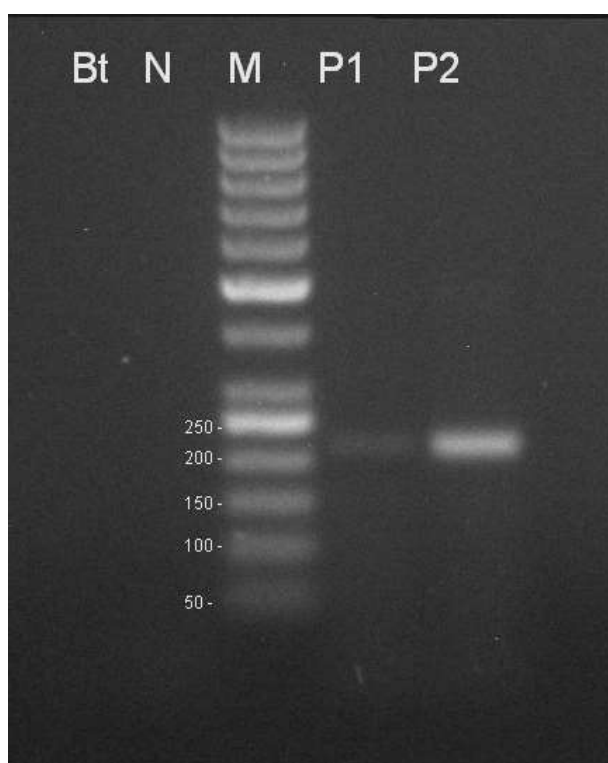
Obr 2. 13. 9. 2012 amplifikace úseku 215 bp – nptII: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012.



Obr 3. 14. 9. 2012 amplifikace úseku 215 bp – nptII: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012.

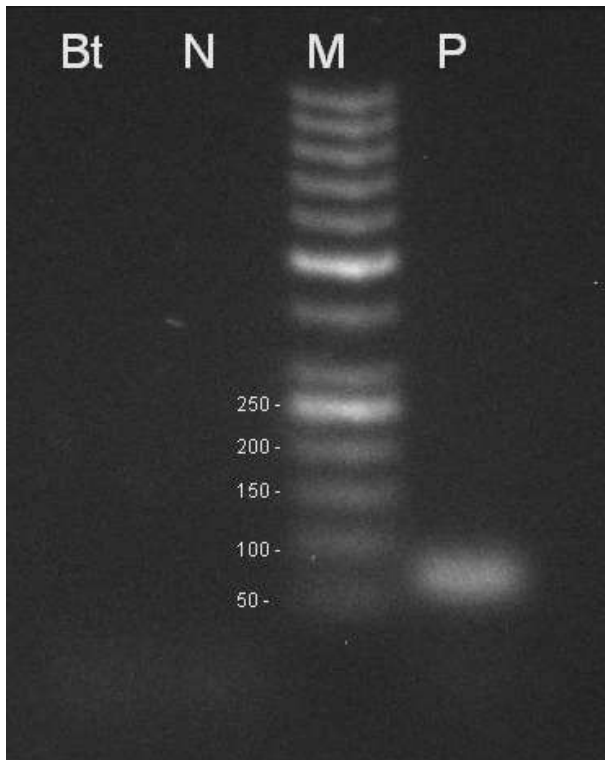


Obr 4. 26. 9. 2012 amplifikace úseku 215 bp – nptII: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012.

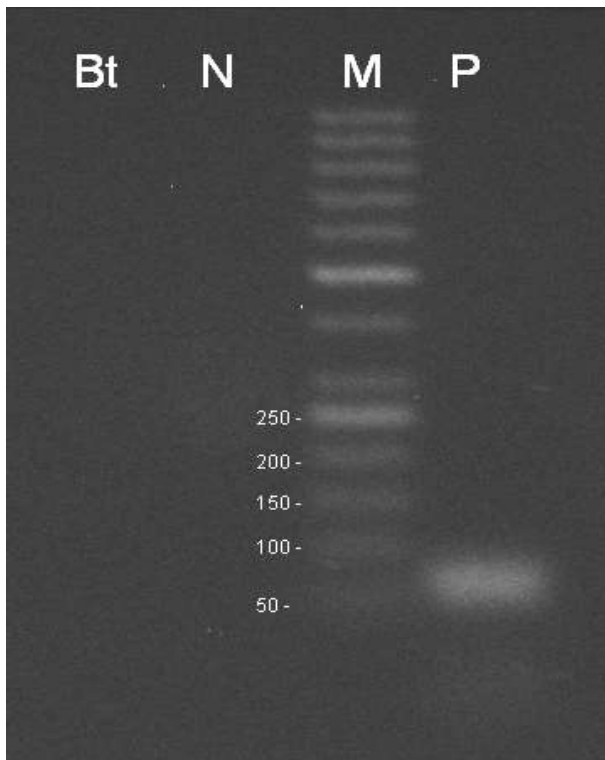


Obr 5. 27. 9. 2012 amplifikace úseku 215 bp – nptII: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 1/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 2/2012.

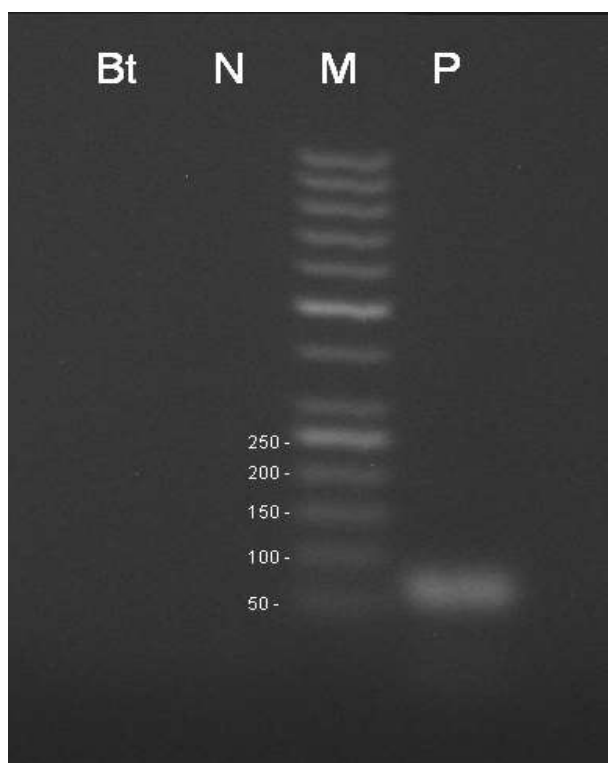
bar



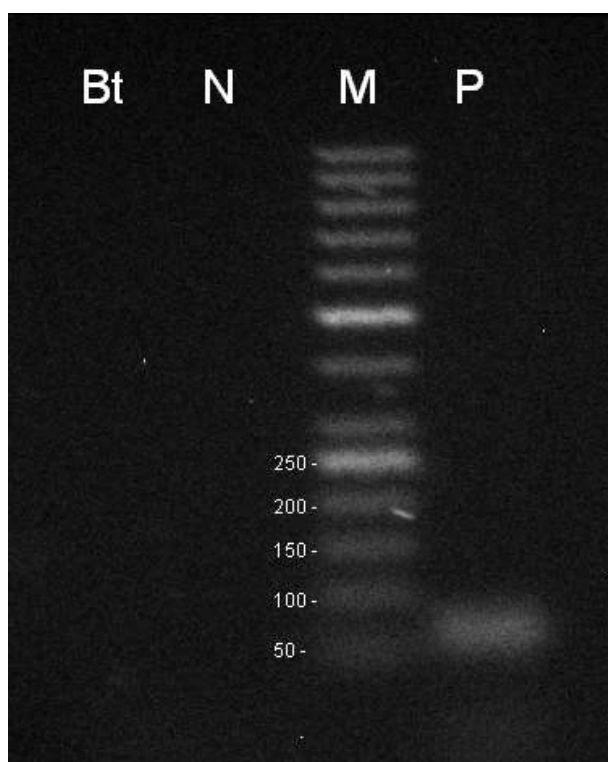
Obr. 6. 6. 9. 2012 amplifikace úseku 60 bp – bar: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 12/2009.



Obr. 7. 12. 9. 2012 amplifikace úseku 60 bp – bar: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 12/2009.



Obr 8. 13. 9. 2012 amplifikace úseku 60 bp – bar: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 12/2009.

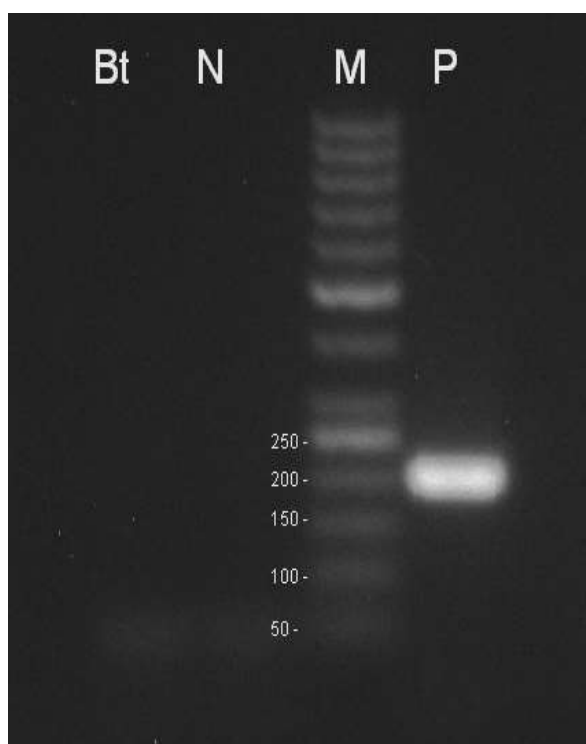


Obr 9. 14. 9. 2012 amplifikace úseku 60 bp – bar: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 12/2009.

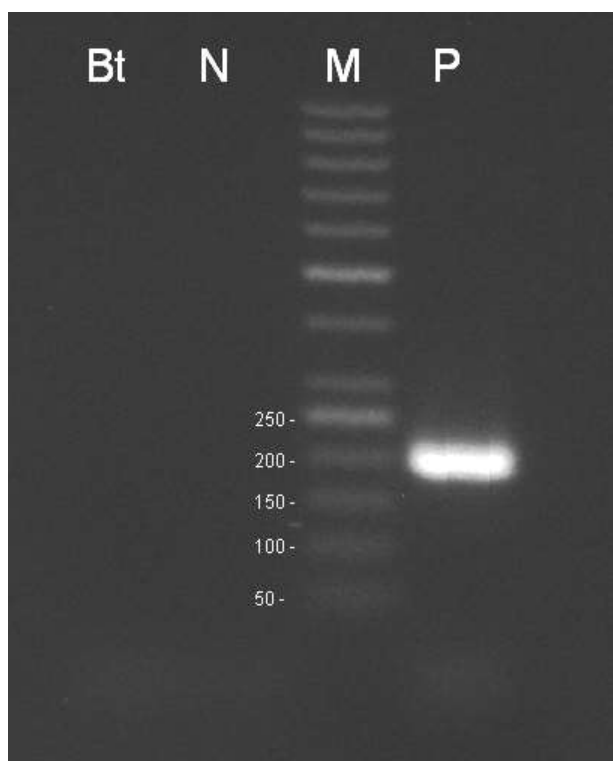


Obr 10. 26. 9. 2012 amplifikace úseku 60 bp – bar: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 12/2009.

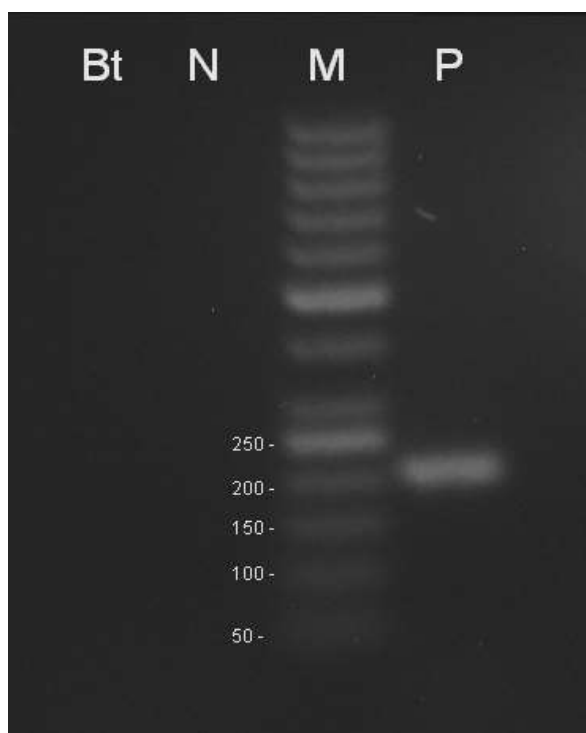
P-FMV



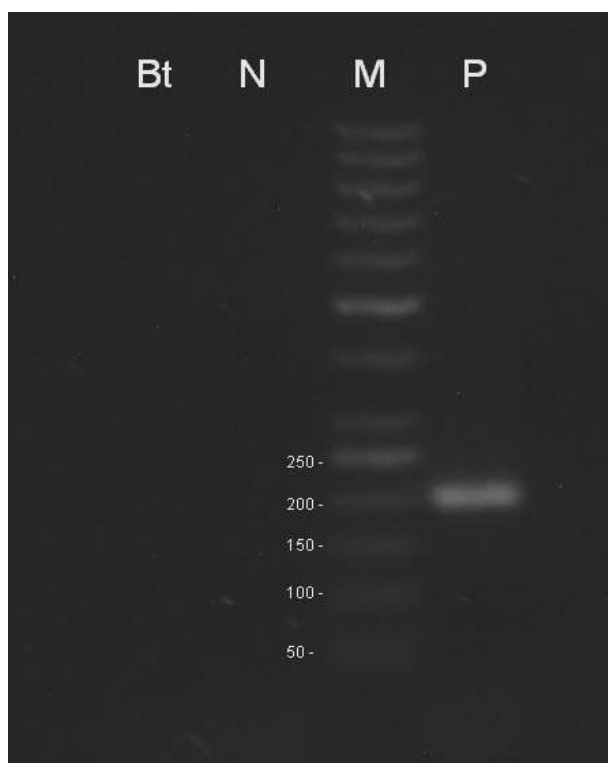
Obr 11. 6. 9. 2012 amplifikace úseku 196 bp – P-FMV: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2006.



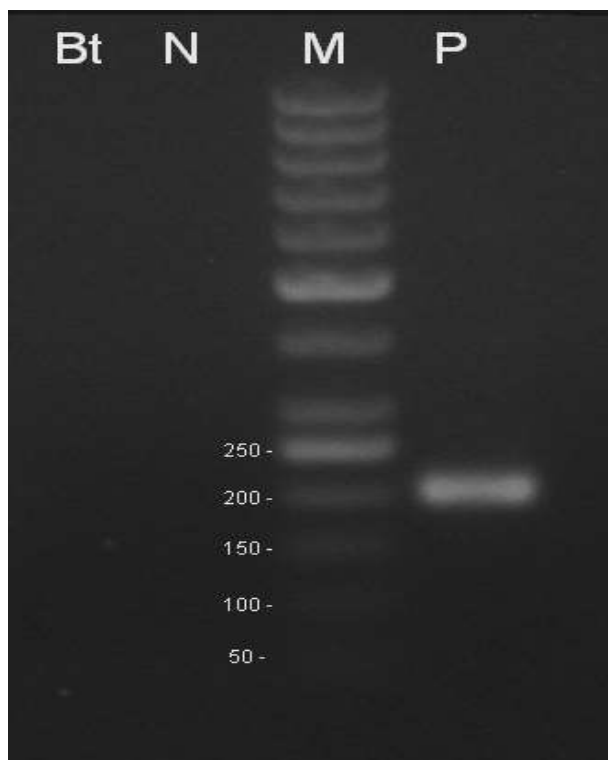
Obr 12. 12. 9. 2012 amplifikace úseku 196 bp – P-FMV: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2006.



Obr 13. 13. 9. 2012 amplifikace úseku 196 bp – P-FMV: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2006.

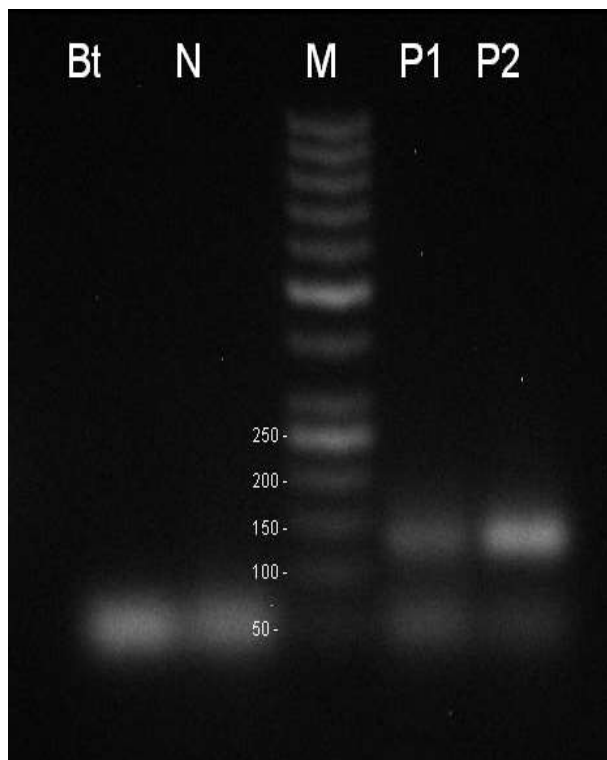


Obr 14. 14. 9. 2012 amplifikace úseku 196 bp – P-FMV: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2006.

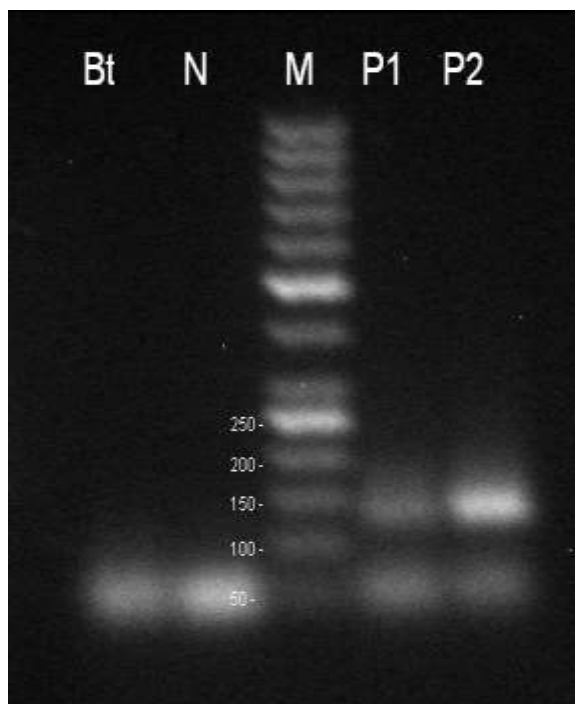


Obr 15. 26. 9. 2012 amplifikace úseku 196 bp – P-FMV: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2006.

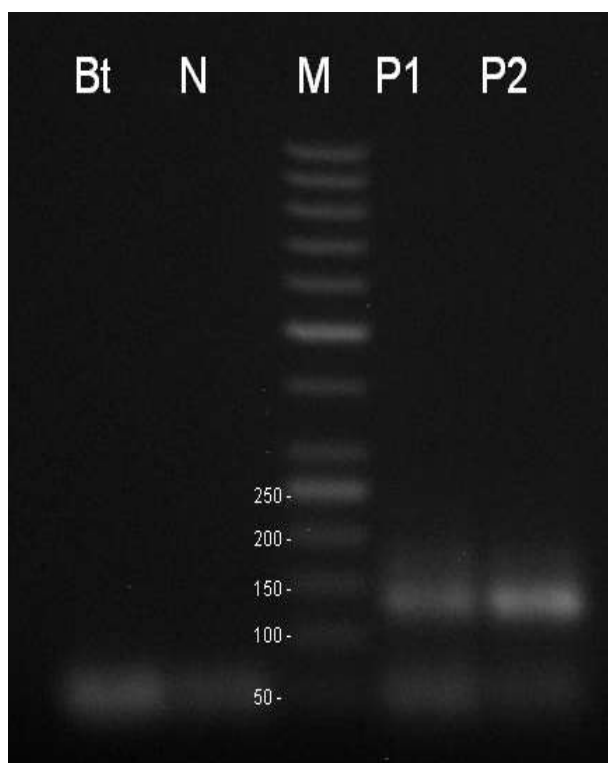
Cry1A(b)



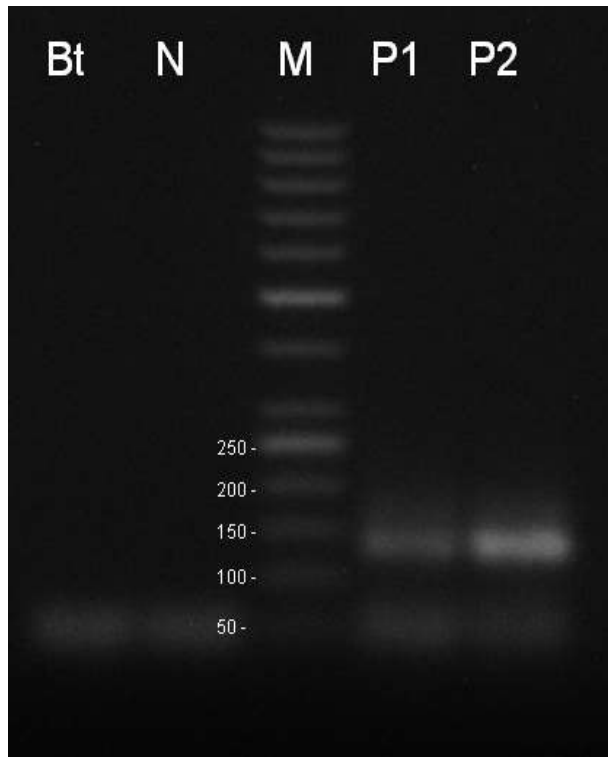
Obr 16. 6. 9. 2012 amplifikace úseku 129 bp – cry1A(b): Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 2/2008, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2009.



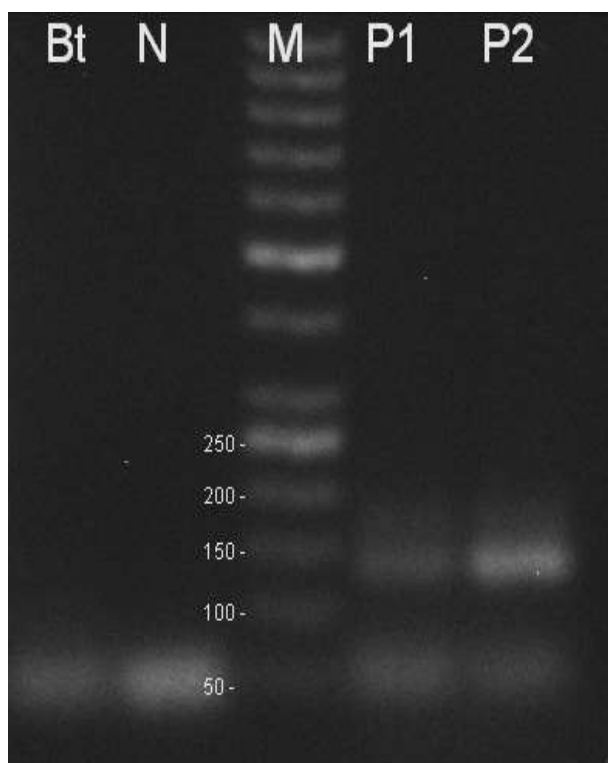
Obr 17. 12. 9. 2012 amplifikace úseku 129 bp – cry1A(b): Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 2/2008, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2009.



Obr 18. 13. 9. 2012 amplifikace úseku 129 bp – cry1A(b): Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 2/2008, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2009.

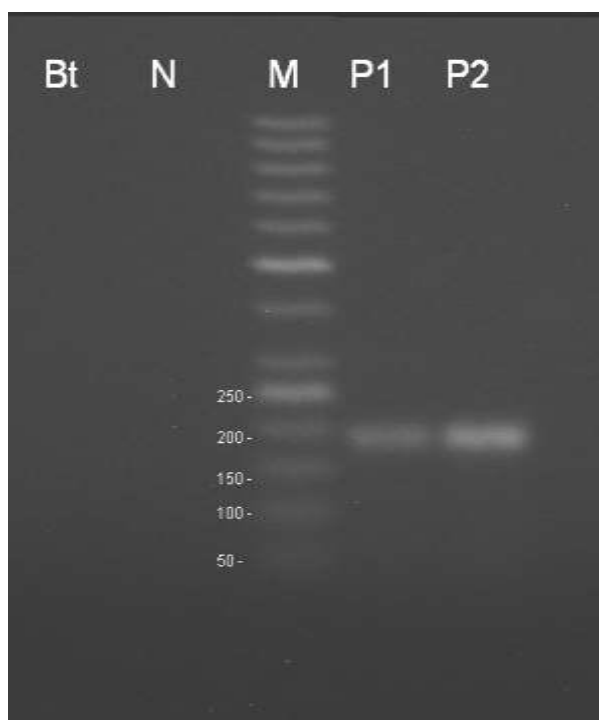


Obr 19. 14. 9. 2012 amplifikace úseku 129 bp – cry1A(b): Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 2/2008, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2009.

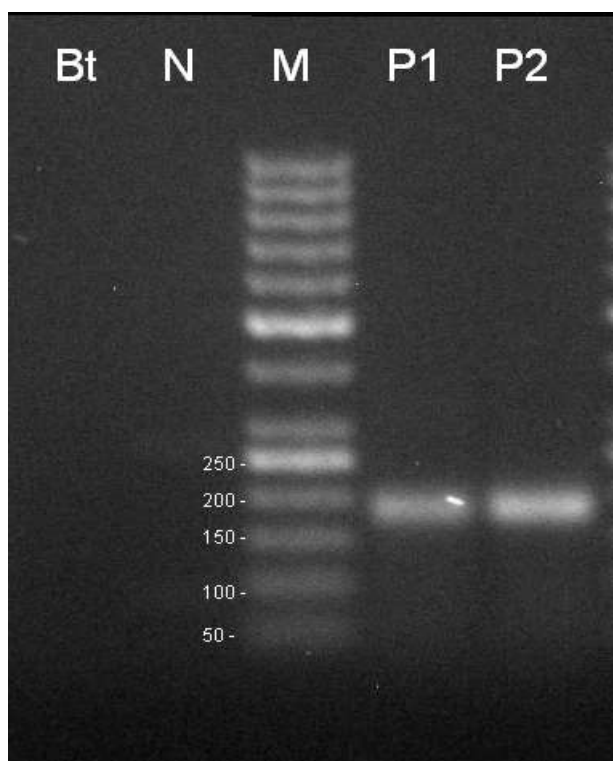


Obr 20. 26. 9. 2012 amplifikace úseku 129 bp – cry1A(b): Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 2/2008, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2009.

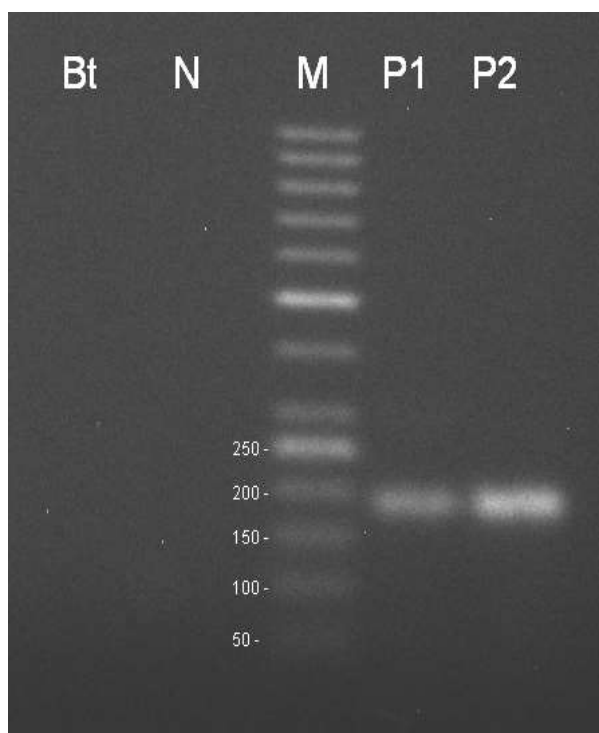
Pat



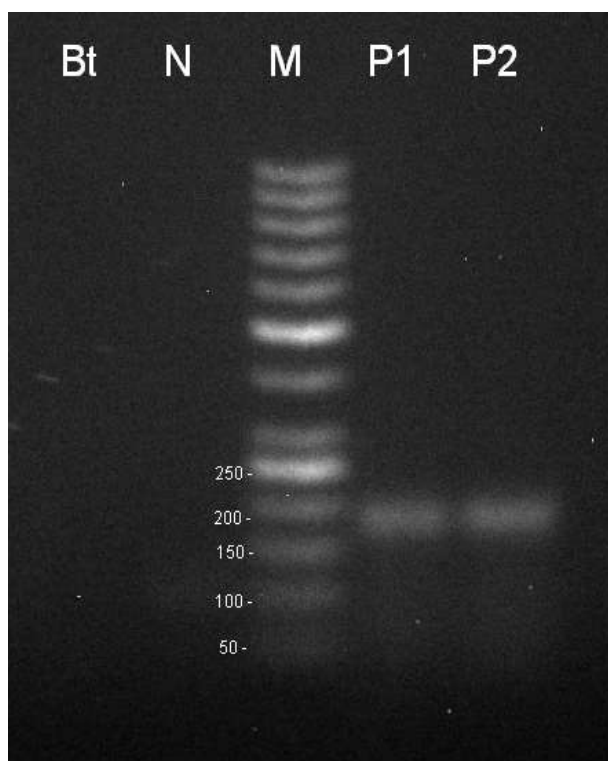
Obr 21. 12. 9. 2012 amplifikace úseku 186 bp – pat: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012.



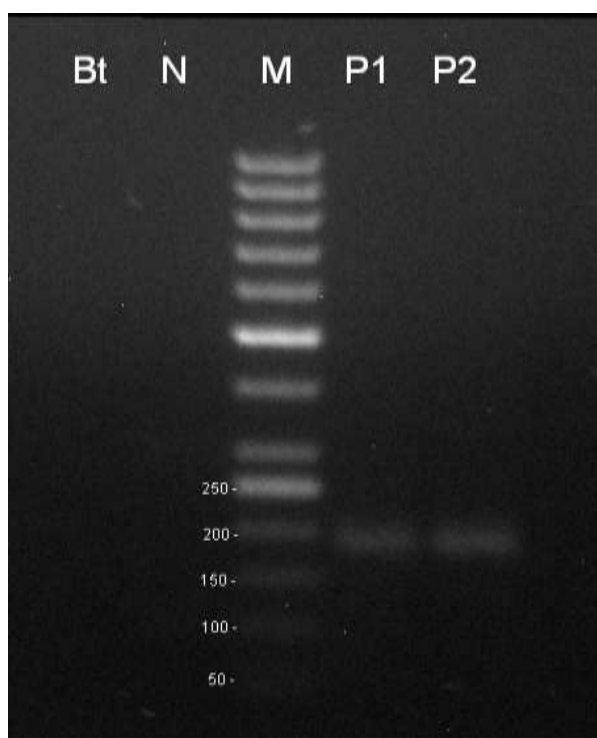
Obr 22. 13. 9. 2012 amplifikace úseku 186 bp – pat: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012.



Obr 23. 14. 9. 2012 amplifikace úseku 186 bp – pat: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012.



Obr 24. 26. 9. 2012 amplifikace úseku 186 bp – pat: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012.



Obr 25. 27. 9. 2012 amplifikace úseku 186 bp – pat: Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 5/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2012.

Během verifikace se postupovalo dle metody JPP (postup č. 10250.1) a metod validovaných EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

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

Detekovatelnost pruhů DNA závisí na těchto faktorech:

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

7 Závěr

Cílem práce bylo zavést pět screeningových elementů a rozšířit tak spektrum screeningových metod prováděných v laboratoři OMB.

Úkol se podařilo splnit a laboratoř je schopna v současné době stanovit sedm screeningových prvků a tím zkrátit dobu trvání analýzy geneticky modifikovaných organismů v krmivech a osivech.

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

8 Literatura

- 1 How to Reliably Test for GMOs, Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., Van den Eede, G., Gruden, K., SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition - 1st Edition., **2012**, X, 100 p. - Softcover, ISBN 978-1-4614-1389-9.
- 2 Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), **2011**.
- 3 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 250.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVIII 2014/1

Ročník: XVIII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2014

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 40

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196