

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10257.1 – Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Vydání	2
		Revize	0

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA PRO STANOVENÍ GMO METODOU PCR

1 Účel a rozsah

Gelová elektroforéza slouží ke kontrole celistvosti a velikosti vyextrahované DNA (kvalita DNA). Dále je potřebná k vyhodnocení amplifikovaných fragmentů (produktů PCR reakce).

2 Princip

Elektroforéza patří mezi separační metody, která izoluje molekuly o rozdílné hmotnosti a využívá jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli. Při gelové elektroforéze probíhá separace molekul v agarózovém gelu.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Agaróza pro molekulární biologii.
- 3 Ledová kyselina octová, CH_3COOH .
- 4 Na_2EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové.
- 5 Trizma base.
- 6 Hydroxid sodný, NaOH , roztok, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.
Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě (1), po vytemperování se doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.
- 7 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.
Příprava: 88,3 ml 35% HCl se převede do 1000 ml odměrné baňky částečně naplněné vodou (1). Po vytemperování se doplní po značku.
- 8 Etanol denaturovaný, 70%, pro čištění povrchů.
- 9 Interkalační barvivo, používá se komerčně dodávaný roztok od ověřeného výrobce, dle návodu výrobce (např. Ethidiumbromid, 10% zásobní roztok).
- 10 Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR, Biorad).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10257.1 – Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Vydání	2
		Revize	0

- 11 Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).
- 12 Bromfenolová modř, nanášecí barvivo.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 2 Vortex.
- 3 pH metr.
- 4 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 5 Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.
- 6 Fotodokumentační zařízení se softwarem.
- 7 Transiluminátor.
- 8 Lednice.
- 9 Mrazicí box.
- 10 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a špičky s filtrem i bez filtru.
- 11 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, parafilm, filtrační papír vysoké hustoty.

5 Postup

5.1 Příprava reagensů pro gelovou elektroforézu

5.1.1 Příprava 0,5M zásobního roztoku EDTA

Naváží se 186,1 g Na₂EDTA (4) a rozpustí v (750 – 800) ml vody (1). pH roztoku se upraví na hodnotu 8,5 přidáním roztoku NaOH (6). Roztok se převede do odměrné baňky a doplní vodou (1) do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes filtrační papír vysoké hustoty a skladuje se do spotřebování při laboratorní teplotě.

5.1.2 Příprava zásobního roztoku 50 × TAE

Naváží se 242 g Trizma base (5) a rozpustí v 650 ml vody (1). Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové (3) a 100 ml předem připraveného 0,5M zásobního roztoku EDTA (viz 5.1.1). Doplní se vodou (1) do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10257.1 – Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Vydání	2
		Revize	0

5.1.3 Příprava pracovního roztoku 1 × TAE pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku 50 × TAE (viz 5.1.2), nalije do odměrného válce o objemu 1000 ml a doplní se vodou (1) do objemu 1000 ml.

5.1.4 Příprava pracovního roztoku ethidiumbromidu

Zásobní roztok ethidiumbromidu (9) se dodává komerčně. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × vodou (1). Uchovává se v temnu a chladu.

5.2 Příprava agarózového gelu

Pro stanovení kvality vyizolované DNA se používá 0,8% gel a pro hodnocení amplifikačních fragmentů se používá 2% agarózový gel. Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy (2) s přesností na 0,1 g a přidá se pracovní roztok 1 × TAE pufru (viz 5.1.3). Množství práškové agarózy (2) a 1 × TAE pufru závisí na velikosti nalévací vany. 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. Dále se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se do gelu přidá interkalační barvivo, které slouží ke zviditelnění DNA (např. pracovní roztok ethidiumbromidu, viz 5.1.4), míchá se 1 min. Objem interkalačního barviva závisí na objemu připravovaného gelu (u ethidiumbromidu je jeho finální koncentrace asi 0,013 %). Poté se vyjme míchadélko a agaróza se nalije do vany s hřebínkem. Nechá se přibližně 15 min zchladnout při laboratorní teplotě. Pro dokonalé ztuhnutí se gel umístí na 30 min do lednice. Poté lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem TAE pufru. Je možné do nalévací vany vložit 2 hřebínky tak, aby se po rozkrojení získaly dva menší gely.

5.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

5.3.1 Nanášení vzorků na gel

0,8% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním TAE pufrům (viz 5.1.3) (1 – 2) mm nad jeho povrch. Vzorky vyizolované DNA se smíchají v poměru 4 : 1 s nanášecí barvou (12) a nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: kontrola izolace, hmotnostní marker (11), vzorky, hmotnostní marker (11). Nejdříve se nanesou vzorky, kontrola izolace a nakonec markery. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku. Po nanesení vzorků a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza.

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním TAE pufrům (viz 5.1.3) (1 – 2) mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, elektroforetický marker, vzorky, marker a pozitivní kontrola. Nejdříve se nanesou vzorky a potom vhodné markery. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku. Amplifikáty (produkty PCR) získané pomocí kitů REDTaq

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10257.1 – Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR	Vydání	2
		Revize	0

a REDEx se nanáší přímo z PCR zkumavek, neboť již obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení vzorků a markeru (10) do jamek v gelu se spustí elektroforéza.

5.3.2 Spuštění a běh elektroforézy

Elektroforetický zdroj se nastaví na hodnoty (75 – 100) V, maximum mA a (75 – 90) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit dle potřeby a pokynů v návodu pro použití zdroje. Přesná doba chodu sleduje potřebu rozdělení fragmentů v gelu. Postup čela elektroforézy se může orientačně sledovat podle nanášecího barviva. Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje při prosvícení na transiluminátoru. Gel se vyfotografuje a snímek se přenesení do počítače pro vyhodnocení.

6 Literatura

- 1 Suchomelová M.: Stanovení přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR, JPP ÚKZÚZ, Brno, 2007.