

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

IZOLACE DNA POMOCÍ CTAB PRO STANOVENÍ GMO METODOU PCR

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání deoxyribonukleové kyseliny (DNA) ze vzorků krmiv a surovin na jejich výrobu, osiv a rostlinného materiálu pomocí hexadecyl-trimethylamonium bromidu (dále jen CTAB). Metodika extrakce pomocí CTAB podle ČSN EN ISO 21571 je běžně používaný postup, který umožňuje získat izolát DNA s dostatečnou čistotou pro analýzy pomocí PCR. Součástí metodiky je i měření koncentrace a stanovení čistoty DNA.

2 Princip

Proces izolace (extrakce) nukleových kyselin je získávání DNA či RNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního postupu. Základem této metody je extrakce DNA ze vzorku, založená na teplotní lýzi v přítomnosti CTAB, která je následována několika extrakčními kroky, které odstraňují kontaminanty, jako jsou polysacharidy a fenolické látky.

Stanovení koncentrace, případně čistoty izolátu DNA, se provádí pomocí spektrofotometrického nebo fluorescenčního měření.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 (96 – 100)% etanol pro UV.
- 2 Denaturovaný etanol.
- 3 Voda vhodná pro PCR.
- 4 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 5 RNáza A, bez DNáz a proteáz, asi 50 jednotek/mg lyofilizátu.
- 6 α -amyláza (volitelná), typ IIa z *Bacillus* spp. (1500 – 3000) jednotek/mg bílkovin.
- 7 Chloroform, CHCl_3 .
- 8 Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotertraoctové, Na_2EDTA .
- 9 Hexadecyl-trimethylamonium bromid, CTAB.
- 10 Kyselina chlorovodíková 37%, HCl .
- 11 Propan-2-ol, isopropanol, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

- 12 Proteináza K, asi 20 jednotek/mg lyofilizátu.
- 13 Chlorid sodný, NaCl.
- 14 Hydroxid sodný, NaOH.
- 15 Tris(hydroxymethyl) aminomethan, Tris, (HOCH₂)₃CNH₂.
- 16 Nekorozivní dekontaminační roztok pro ošetření ploch, vhodný pro práci s DNA. Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 17 Octan sodný trihydrát, CH₃COONa.3H₂O.
- 18 Ledová kyselina octová, CH₃COOH.
- 19 Chlornan sodný, 5% roztok, NaClO, dekontaminační roztok pro ošetření ploch. Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.

Další chemikálie potřebné pro fluorescenční měření koncentrace DNA

- 20 Kit vhodný pro fluorescenční měření koncentrace DNA, např. Qubit 1X dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Váhy s přesností 0,01 g.
- 2 Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.
- 3 Centrifuga.
- 4 Minishaker, vortex.
- 5 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 6 Přenosná UV lampa.
- 7 Digestoř.
- 8 pHmetr.
- 9 Lednice.
- 10 Tlakový hrnec
- 11 Mrazicí box.
- 12 Automatické pipety s nastavitelným objemem (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem, špičky bez filtru.
- 13 Plastové zkumavky s víčkem, (2 – 2,5) ml.
- 14 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

- 15 Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230 nm, 260 nm, 280 nm), např. NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer, výrobce Thermo Fisher Scientific.
- 16 Fluorometr, např. Fluorometer Qubit™ 4, výrobce Thermo Fisher Scientific.
- 17 Optické zkušavky vhodné pro fluorescenční měření koncentrace DNA, např. 0,5 ml pro Qubit™ 4, výrobce Thermo Fisher Scientific

5 Postup

5.1 Příprava pufrů a roztoků

5.1.1 3M octan sodný

Naváží se 40,81 g trihydrátu octanu sodného (17). Navážka se vmíchá do 80 ml vody (4). Ledovou kyselinou octovou (18) se upraví pH na 5,2. Potom se doplní vodou (4) do 100 ml. Sterilizuje se 30 min v tlakovém hrnci.

5.1.2 CTAB – extrakční pufr

Postupně se naváží 20 g hexadecyl-trimethylamonium bromidu (9), 82 g NaCl (13), 7,44 g Na₂EDTA (8) a 12,1 g Tris(hydroxymethyl) aminomethanu (15) a za stálého míchání a mírného zahřátí se rozpustí v asi 800 ml vody (4). Po vychladnutí na laboratorní teplotu se upraví se pH na hodnotu 8,0 pomocí 1M HCl (5.1.9). V odměrné baňce se roztok doplní vodou (4) do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené lahvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

5.1.3 CTAB – precipitační pufr

Postupně se naváží 5 g hexadecyl-trimethylamonium bromidu (9) a 2,34 g NaCl (13) a za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml vody (4). V odměrné baňce se roztok doplní vodou (4) do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené lahvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

5.1.4 Roztok α -amylázy

Používá se roztok o koncentraci 10 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát (6) naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se rozpipetuje do zkumavek po asi 30 μ l a uchovává v mrazicím boxu do spotřebování. Je třeba zabránit opakovanému rozmrazování roztoku α -amylázy.

5.1.5 Roztok ribonukleázy A

Používá se roztok o koncentraci 10 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát (5), naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se uchovává v mrazicím boxu nebo podle pokynů výrobce.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

5.1.6 Roztok proteinázy K

Používá se roztok o koncentraci 20 mg/ml. Pokud je k dispozici lyofilizát (12), naředí se na tuto koncentraci podle pokynů výrobce. Roztok se rozpipetuje do zkumavek po asi 30 µl a uchovává v mrazicím boxu do spotřebování. Je třeba zabránit opakovanému rozmrazování.

5.1.7 Roztok 1,2 M NaCl

Naváží se 70,13 g NaCl (13) a za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml vody (4). V odměrné baňce se roztok doplní vodou (4) do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené lahvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

5.1.8 TE pufr

Naváží se 1,21 g Tris(hydroxymethyl) aminomethanu (15) a 0,34 g Na₂EDTA (8) a za stálého míchání se rozpustí v asi 900 ml vody (4). Hodnota pH se upraví na 8,0 pomocí 1M HCl (5.1.9) nebo 1M NaOH (5.1.10). V odměrné baňce se roztok doplní vodou (4) do celkového objemu 1000 ml. Uchovává se v uzavřené láhvi při laboratorní teplotě do spotřebování.

5.1.9 Roztok 1M HCl pro úpravu pH

83,3 ml 37% HCl (10) se převede do 1000 ml odměrné baňky částečně naplněné vodou (4). Po vytemperování se doplní vodou (4) po značku.

5.1.10 Roztok 1M NaOH pro úpravu pH

40 g NaOH (14) se rozpustí ve vodě (4) v kádince. Po vytemperování se převede do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (4) po značku.

5.1.11 Roztok 1% NaClO pro dekontaminaci povrchů

V odměrném válci se odměří 100 ml 5% roztoku NaClO a přidá k 400 ml vody (4). Roztok se použije k dekontaminaci povrchů a ploch tam, kde není nutné použít šetrnější, komerčně vyráběný dekontaminační roztok, vhodný pro práci s DNA.

5.1.12 Roztok 70% etanolu

V odměrném válci se odměří 70 ml 100% roztoku etanolu (1) a přidá k 30 ml vody (4).

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

5.2 Izolace DNA

5.2.1 Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je naprosto nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zabránilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikropipetkami DNA, které se mohou uvolnit při pipetování, otvírání zkumavek apod. Používá se výhradně sterilní materiál.

Je nezbytné vyhnout se nevhodným pohybům a dotekům, všechny operace vykonávat v rukavicích a rukavice po každém kroku nebo kdykoli je třeba i uvnitř kroků vyměnit, nebo alespoň dekontaminovat opláchnutím dekontaminačním roztokem (16) nebo chlornanem sodným (19) a vodou (4).

Dojde-li k ukápnutí tekutiny, která obsahuje nebo by mohla obsahovat DNA, je nutno ji okamžitě vysát vatou a potřísněný povrch otřít vatou s dekontaminačním roztokem (16), nebo roztokem chlornanu sodného (19). Vata se vhodí do sáčku s DNA odpadem.

Izolace DNA se provádí ve dvou paralelních stanoveních jednoho vzorku.

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

Při manipulaci s organickými rozpouštědly je nutné pracovat v digestoři.

5.2.2 Extrakce DNA

Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem (16) nebo (19) a UV zářením po dobu 30 min. Vodní lázeň nebo termoblok se předehřeje na teplotu 65 °C. CTAB extrakční pufr (5.1.2) se předehřeje na 65 °C ve vodní lázni nebo termobloku.

Do dvou 2ml zkumavek se naváží 0,2 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,01 g. Ke vzorku se přidá 1500 µl CTAB extrakčního pufru (5.1.2) předehřátého na 65 °C a promíchá se jemně na vortexu. Ke vzorku se přidá 10 µl ribonukleázy A o koncentraci 10 mg/ml (5.1.5). V případě vysokého obsahu škrobu ve vzorku se přidá 10 µl α-amylázy o koncentraci 10 mg/ml (5.1.4) a promíchá se jemně na vortexu. Vzorek se inkubuje 30 min za stálého míchání při 65 °C v termobloku. Po vyjmutí z termobloku se ke vzorku přidá 10 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml (5.1.6), jemně se promíchá. Vzorek se inkubuje 30 min za stálého míchání při 65 °C v termobloku. Poté se vzorek centrifuguje 10 min při asi (12000 – 14000) g. Do nové 5ml zkumavky se napipetuje 850 µl chloroformu (7) a přidá se (1150 – 850) µl supernatantu. Je důležité zachovat poměr 1 objem supernatantu ku (0,7 – 1) objemu chloroformu tak, aby postačoval objem zkumavky. Zkumavka se důkladně protřepe do mléčného zbarvení. Vzorek se centrifuguje 15 min při (12000 – 14000) g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

5.2.3 Precipitace CTAB

Do nové zkumavky se napipetuje 1300 µl CTAB precipitačního roztoku (5.1.3) vytemperovaného na laboratorní teplotu a přidá se 650 µl supernatantu (tj. horní, vodné fáze po centrifugaci z předešlého kroku). Tj. 1 objem supernatantu ku 2 objemům precipitačního roztoku. Inkubuje se 60 min. při laboratorní teplotě bez míchání. Poté se centrifuguje 15 min při asi (12000 – 14000) g. Supernatant se opatrně odstraní vylitím a je-li třeba, zbytek se odsaje pipetou. Precipitát DNA se rozpustí v 350 µl 1,2 M NaCl (5.1.7). Přidá se 350 µl chloroformu (7) a důkladně se protřepe do mléčného zbarvení. Následně se centrifuguje 10 min. při asi 12000 g. Do nové zkumavky se převede 350 µl vodné fáze (obsahuje nukleové kyseliny).

5.2.4 Precipitace DNA

Do zkumavky s vodnou fází se přidá 420 µl isopropanolu (11), tj. 0,6 objemu vzorku a opatrně se promíchá převrácením zkumavky. Inkubuje se bez míchání 20 min. při laboratorní teplotě. Poté se centrifuguje 15 min. při asi 12000 g. Supernatant se opatrně odstraní vylíje. Do zkumavky se přidá 500 µl 70% etanolu (5.1.12), zkumavka se několikrát převrátí pro odstranění zbytků CTAB. Je důležité peletu uvolnit, aby se volně pohybovala. Vzorek se centrifuguje 10 min. při asi 12000 g. Opatrně se vylíje supernatant, případně se zbytek etanolu odsaje pipetou. Pelet DNA se krátce vysuší a resuspenduje se ve 100 µl PCR vody (3) nebo ve vhodném pufru, například TE pufru (5.1.8).

5.2.5 Dodatečná precipitace DNA

Pokud je vyizolovaná DNA znečištěna (viz bod 5.3), provádí se ze získaného izolátu etanolová precipitace DNA.

Do roztoku DNA se přidá 1/10 objemu octanu sodného (5.1.1). Poklepáním na zkumavku se promísí. Etanol (1) se nechá vychladit v mrazicím boxu. Do roztoku DNA s octanem sodným se přidá trojnásobné množství vychlazeného etanolu (1). Zkumavka se nechá v mrazicím boxu přes noc (teplota asi -20°C), nebo 30 min v hlubokomrazicím boxu (teplota asi -80°C). Centrifuguje se 20 min při 12000 ot/min. Tekutina se ze zkumavky opatrně vylíje. K peletu se přidá 500 µl etanolu (1) na promytí, kývavým pohybem se pelet odlepí. Poté se centrifuguje 10 min při 12000 ot/min. Supernatant se opatrně vylíje. Pelet DNA se krátce vysuší a resuspenduje se v (50 – 100) µl PCR vody (3) nebo ve vhodném pufru, například TE pufru.

5.3 Měření koncentrace vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické nebo fluorescenční stanovení její koncentrace (případně výskytu dalších příměsí).

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

5.3.1 Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty vyizolovaného vzorku

Koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku se stanoví měřením při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. Koncentrace nukleových kyselin se počítá na základě absorbance vzorku při 260 nm. Předpokladem pro správné určení koncentrace DNA je čistota izolátu. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbancí naměřených při 260 nm a 280 nm; 260 nm a 230 nm. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm.

5.3.2 Fluorometrické měření koncentrace vyizolovaného vzorku

Ke stanovení koncentrace DNA v izolátu se využije měření fluorescence. Podle obvyklých očekávaných hodnot koncentrace ve vybere vhodný kit obsahující 2 standardy pro kalibrační křivku a pracovní roztok obsahující selektivní barvivo pro dsDNA. Vzorky i standardy se měří ve vhodných optických zkumavkách.

5.4 Vlastní měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA pomocí Nanodropu se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná. Ve většině případů se tedy jedná o TE pufr nebo PCR vodu (3). K měření na spektrofotometru NanoDrop se použijí 2 µl vzorku. Každý vzorek se měří dvakrát. Z naměřených hodnot se vypočítá průměr.

Koncentrace DNA pomocí přístroje Qubit 4 se měří za použití optických zkumavek Qubit a vhodného Qubit kitu. K měření se použijí 2 µl vzorku

5.5 Úprava koncentrace vzorku

Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje určitá koncentrace templátové DNA (ng/µl). Pokud je koncentrace DNA v získaného izolátu vyšší, je třeba ho na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR (3) podle níže uvedeného vztahu. Snížením koncentrace DNA se sníží i koncentrace případných inhibitorů reakce, které mohou být ve vzorku přítomny.

$$d = (x \times y)/z \qquad v = x - d$$

- x konečný objem naředěného izolátu DNA (µl),
- y požadovaná koncentrace izolátu DNA (ng/µl),
- z změřená koncentrace izolátu DNA (ng/µl),
- d objem izolátu potřebný pro přípravu x µl roztoku o koncentraci DNA z (µl),
- v objem PCR vody potřebný pro naředění na požadovanou koncentraci y (µl).

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10253.1 – Izolace DNA pomocí CTAB pro stanovení GMO metodou PCR	Revize	0

6 Literatura

1. ČSN EN ISO 21571 (56 9902) Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny, bod A.3. Příprava DNA v kvalitě pro PCR s využitím metody extrakce DNA založené na CTAB, 2007 ČNI.
2. Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer.
3. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, JPP ÚKZÚZ 10250.1, Brno.
4. Uživatelský manuál k přístroji Qubit™ 4 Fluorometer