



Fakulta zemědělská a technologická
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi



Autoři: Ing. Eva Jozová, Ph.D., Ing. Václav Zahradník, Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.,
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2022

Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Ing. Václav Zahradník

Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

České Budějovice, 2022

Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Eva Jozová a kol., 2022

jozovae@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice
2022

www.fzt.jcu.cz,

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi.

Recenzenty metodiky byli:

prof. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani

Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze

Ing. Petr Zehnálek

ÚKZUZ, Hradec nad Svitavou

Text: ©2022 Jozová E. a kol.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-960-0



Obsah

Cíl metodiky	5
Vlastní popis metodiky.....	7
Úvod.....	7
Materiál	9
Metody izolace DNA	9
Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991)	9
Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991) – zkrácený protokol.	11
Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel	12
Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel.....	13
Izolace DNA pomocí přístroje MagCore® Genomic DNA Tissue Kit – Feed-soil sample	15
Kontrola izolace	16
Agarosový gel.....	16
Spektrofotometrické měření	17
Ověření vhodnosti izolačních metod	18
Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991)	18
Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991) – zkrácený protokol.	19
Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel	20
Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel.....	21
Izolace DNA pomocí přístroje MagCore® Genomic DNA Tissue Kit – Feed-soil sample	22
Souhrn izolačních metod.....	23
Porovnání izolací.....	24
Srovnání novosti postupů	25
Popis uplatnění metodiky.....	25
Ekonomické aspekty	26
Seznam použité literatury	27
Seznam publikací předcházející metodice	28
Příloha.....	29
Použité roztoky	29

Jozová E. a kol. (2022) Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Cíl metodiky

S problematikou falšování či nepovolenou úpravou potravin se lze setkat od nepaměti. Jejich odhalení a identifikace ovšem není jednoduchá. V současnosti už si nacházejí své místo i molekulární metody, které mohou být využívány pro identifikaci jednotlivých odrůd včetně máku (Stará a kol., 2020). Jednou z plodin, u které velmi často dochází k falšování, či přimíchávání nežádoucích odrůd je právě mák setý. Velmi často dochází v potravinářství k záchytu semen máku, která by měla být využívány pouze k technickým účelům. Je proto více než žádoucí zavést takové metody, které dokáží tyto nežádoucí praktiky odhalit. Díky aktivitám sdružení Český modrý mák z.s. byly máku vyrobenému v České republice uděleny Chráněné zeměpisné označení a České cechovní normy „Modrý mák“, „Mletý mák“ a „Bělosemenný mák“. Výrobky s logem “Vyrobena podle České cechovní normy” musí spotřebiteli garantovat 100% český původ a potravinářskou kvalitu (www.ceskymodrymak.cz). Představovaná metodika je více než vhodným nástrojem pro kontrolu těchto výrobků.

Cílem této metodiky je ověřit vhodnost různých izolačních postupů na několika různých vzorcích máku setého a makových produktech, za účelem zhodnocení kvality a kvantity vyizolované DNA. Záměrem bude vybrat takové metody, které nejvíce vyhovují testovaným typům vzorků. Díky tomu bude možné získat čistou a kvalitní DNA z jakéhokoliv materiálu, ať se jedná o čistě rostlinný materiál a nebo hotový pekařský, či cukrářský výrobek. V kombinaci s molekulárními analýzami bude možné identifikovat ty odrůdy máku s vysokým obsahem alkaloidů, které nenesou označení český modrý nebo bílý mák a jsou do produktů přidávány pouze pro svoji nízkou cenu, nikoliv pro svou kvalitu semene.

Jozová E. a kol. (2022) Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Vlastní popis metodiky

Úvod

V Evropě, potažmo v České republice, je mák pěstován a využíván již od nepaměti. Nejstarší nálezy na našem území jsou z oblasti severní Moravy. V současnosti je mák vzhledem ke svému užitku, ale zároveň i ke svému zneužívání považován za rozporuplnou rostlinu. V některých zemích je jeho pěstování zakázané, v jiných se pěstuje nelegálně a v některých zemích (mimo jiné i ČR) je jeho pěstování regulováno zákonem. V České republice je to zákon č. 167/1998 Sb. a vyhláška č. 151/2005 Sb. (Novák J., 2007), podle kterých má soukromý pěstitel, který mák pěstuje na ploše větší než je 100 metrů čtverečních ohlašovací povinnost, a je povinen předat hlášení místně příslušnému celnímu orgánu v místě pěstování (Celní správa, 2022). V převážné většině je ve světě pěstován zejména mák s vysokým podílem alkaloidů. Mezi nejvýznamnější legální pěstitelé opiového máku se řadí zejména Turecko a Indie, mezi nelegálními pěstiteli dominují Pákistán, Barma, Thajsko a Afghánistán (Baranyk a kol, 2010).

Po roce 2008 došlo k výraznému poklesu ceny máku v důsledku importu semen máku z Francie, Španělska a z Tasmánie, kde je mák pěstován pouze k farmaceutickým účelům. Tyto odrůdy mají vysoký obsah morfinu, semena mají horší chuťové parametry, ale vzhledem k nízké ceně se stala výhodným obchodním artiklem. Tento nekvalitní mák začal být dovážen i do České republiky, kde je přimícháván ke kvalitnímu českému máku (Bečka a kol., 2014).

Počátky cíleného šlechtění máku v České republice můžeme datovat do 30. let 20. stol. V té době byly pěstovány zejména krajové odrůdy s různou barvou semen. Na přelomu 50. a 60. let byly pro šlechtění vybírány nejen domácí odrůdy, ale také odrůdy zahraniční, tím došlo k rozšíření genetické základny. V roce 1959 byla registrována první hybridní odrůda, u které byl výnos semen až o 20 % vyšší než u odrůd klasických. Bohužel další uplatnění tato odrůda nenašla z důvodu vysokých nákladů na výrobu osiva. Ke znovuobnovení šlechtění máku setého u nás došlo v 90. letech 20. stol. Na pracovišti OSEVA PRO v Keřkově a na Výzkumném ústavu olejnin v Opavě (Vašák a kol., 2010). V dnešní době dbá na dobrou pověst a prosazování hospodářských zájmů spolek Český modrý mák. Šlechtění se věnuje společnost OSEVA PRO s.r.o v Opavě.

Problémem posledních let, který se objevuje vesměs u všech významných zemědělských plodin, je jejich identifikace. Díky vysokému počtu odrůd již nejsou dostačující hodnocení založená pouze morfologických markerech, tedy hodnocení fenotypových vlastností. Proto začínají být zaváděny do šlechtění, ale i hodnocení čistoty či pravosti odrůd molekulární markery, které dokáží spolu s daty fenotypovými pomoci rozlišit jednotlivé odrůdy. Bohužel tyto metody zatím nejsou oficiálním nástrojem pro identifikaci. V případě hotových výrobků není možné v podstatě zjistit čistotu odrůdy ani fenotypovým hodnocením, popř. hodnocením senzorickým. I v tomto případě je ale možné využití metod molekulární biologie.

Nejvhodnější jsou v současné době mikrosatelitové markery, které lze navrhnout jako specifické pouze pro druh *Papaver somniferum* a proto je možné odrůdu máku identifikovat i z hotového výrobku či polotovaru, kde se mohou vyskytovat i další kontaminující DNA, např. pšenice, kur domácí, kvasinky druhu *Sacharomyces* apod. (Stará a kol., 2020).

Molekulární markery jsou velmi užitečný nástroj, ale pro získání přesných výsledků je potřeba velmi kvalitní a čistý vstupní materiál, tedy v případě této metodiky maková DNA. Každý vstupní materiál má ovšem svá specifika a v podstatě neexistuje jednotný postup izolace pro všechny typy materiálů.

Ať jsou pro izolaci používány komerčně dodávané kity, robotické stanice anebo tzv. ruční izolace, vždy se izolační postup skládá z několika základních kroků a to: příprava materiálu, lyze buněk, denaturace a vysrážení kontaminujících proteinů a přečištění a rozpouštění NK.

Pro účely metodiky byly použity 4 různé vstupní materiály a 5 různých izolačních metod, které jsou popsány na následujících stránkách. Pro ověření izolace makové DNA byl použit mikrosatelitový marker specifický pro druh *Papaver somniferum* Psom17 (Ondreičková, 2017), PCR byla provedena podle metodiky Jozová a kol. (2020).

Záměrem této metodiky je popsat možnosti izolace DNA i z méně standardních vzorků, jako jsou např. hotové výrobky či polotovary a zjednodušit tak uživatelům výběr izolační metody podle technických možností a schopností obsluhy laboratoře.

Materiál

K optimalizaci izolačních metod byly testovány dvě odrůdy máku setého s odlišnou barvou semene a odlišnými chuťovými parametry. Jednalo se o odrůdu ONYX, která má modrou barvu semene a je využívána pro zpracování u pekařských a cukrářských výrobků. Druhá testovaná odrůda byla OREL, která se vyznačuje bílou barvou semene a charakteristickou oříškovou chutí. Obě odrůdy byly vyšlechtěny organizací OSEVA PRO s.r.o.

U každé odrůdy byly testovány 4 typy vzorků pro izolaci

- a) Listy** – mladé pravé listy ve fázi listové růžice
- b) Semena** – nemletý mák k potravinářskému využití
- c) Výrobek** – makové buchty vyrobené podle klasické receptury, za použití standardních surovin
- d) Nádivka** – připravena podle receptury běžně používané pro pekařské a cukrářské výrobky

Metody izolace DNA

Pro všechny typy materiálu u obou odrůd bylo testováno 5 různých izolačních metod s využitím komerčních kitů, nebo metod založených na chloroformové izolaci.

Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991)

Tato izolační metoda je vhodná pro izolaci DNA z většího množství rostlinného materiálu. Získaná DNA je velmi kvalitní a čistá, při dlouhodobém skladování nedegraduje. Ověřená doba použití DNA je až 4 roky. Takto čistá DNA je velmi vhodná při využití metod jako je např. AFLP, SSR a ISSR.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) 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 oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Použité přístroje a vybavení:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok nebo vodní lázeň, analytické váhy, pH metr, mrazicí box, digestoř, plastové homogenizátory, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie:

- ethanol (96%, 70%)
- 2x CTAB-PVP extrakční pufr (2% CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4mM NaCl, 1% PVP-40000)
- β-merkapt ethanol
- 5% CTAB
- chloroform : IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)
- isopropanol

Pracovní postup:

Příprava vzorků a lýze buněk

- odvážit 100 mg vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky
- zhomogenizovat pomocí homogenizační tyčinky, v případě náročnější homogenizace lze přidat křemičitý písek
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 500 µl extrakčního pufru předehřátého na 65°C (495 µl 2x CTAB-PVP + 5 µl β-merkapt ethanolu), materiál promíchat s pufrům – práce probíhá v digestoři
- nechat 45-60 min inkubovat při 65°C ve vodní lázni nebo termobloku, promíchat každých 15 minut
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut při laboratorní teplotě

Denaturace a vysrážení kontaminujících látek

- převést supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 500 µl chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 min nechat protřepávat
- centrifugovat 5 min na maximum při laboratorní teplotě
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1/5 (cca 150 µl) 5% CTAB a promíchat
- přidat 500 µl chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 minut protřepávat
- centrifugovat 5 min na maximum při laboratorní teplotě
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek

Precipitace DNA

- přidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20°C přes noc
- centrifugovat 5 minut na max při 4°C
- odstranit supernatant

Přečištění a rozpouštění DNA

- přidat 300 µl TE pufru a nechat 30-60 minut rozpouštět v termobloku při 37°C
- přidat 2 objemy (600 µl) 96% ethanolu vychlazeného na -20 °C, 2-3x promíchat otočením
- nechat v -20°C 2-12 hod
- centrifugovat 10 minut na maximum při 4°C

- odstranit supernatant
- přidat 1000 μ l 70% studeného etanolu vychlazeného na -20°C a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- odstranit supernatant
- přidat 1000 μ l 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum při 4°C
- přebytečnou tekutinu odpipetovat a nechat sušit při 37°C po dobu 15-20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 100-200 μ l TE pufru (podle velikosti peletu) a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37°C
- skladovat v -20°C

Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991) – zkrácený protokol

Použité přístroje a vybavení:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok nebo vodní lázeň, analytické váhy, pH metr, mrazicí box, digestoř, plastové homogenizátory, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie:

- ethanol (70%)
- 2x CTAB-PVP extrakční pufr (2% CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4mM NaCl, 1% PVP-40000)
- β -merkapt ethanol
- chloroform : IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)
- isopropanol

Pracovní postup:

Příprava vzorků a lýze buněk

- odvážit 100 mg vzorku do 1,5 ml mikrozukavky
- zhomogenizovat pomocí homogenizační tyčinky, v případě náročnější homogenizace lze přidat křemičitý písek
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 500 μ l extrakčního pufru předehřátého na 65°C (495 μ l 2x CTAB-PVP + 5 μ l β -merkapt ethanolu), materiál promíchat s pufrem – práce probíhá v digestoři
- inkubovat 5 minut při 65°C ve vodní lázni nebo termobloku, během inkubace jednou zvortexovat

Denaturace a vysrážení kontaminujících látek

- přidat 500 μ l směsi chloroform : IAA, nechat 5 min protřepávat

Jozová E. a kol. (2022) Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

- centrifugovat 5 minut na max (14 000 otáček) při laboratorní teplotě
- přepipetovat vodnou fázi do nových 1,5 ml mikrozkušavek

Precipitace DNA

- přidat 2/3 objemu izopropanolu (cca 250 µl), 2-3x lehce promíchat
- vložit na 2 min do mrazícího boxu (-20°C)
- centrifugovat 5 minut při 4°C maximální rychlostí
- po centrifugaci odstranit supernatant

Přečištění a rozpouštění DNA

- přidat 1 ml 70% ethanolu vychlazeného v -20°C
- centrifugovat 5 min na maximum
- ethanol odpipetovat a nechat sušit při 37°C po dobu 15-20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 30-200 µl TE pufru (podle velikosti peletu) a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37°C
- skladovat v -20°C

Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel

Kolonkové izolace jsou založeny na využití odstředivé síly, kdy dochází k průtoku kapaliny skrz membránu při vysokých otáčkách. Vesměs všechny kolonkové kity jsou připraveny komerčně a jejich součástí jsou jak spotřební plasty, tak i chemikálie, u kterých není vždy přesně známé jejich složení. Membrány jsou vyrobené na bázi oxidu křemičitého. V první fázi je potřeba zlyzovat buňky, stejně jako u všech ostatních izolací. Následně je vzorek převeden do kolonky s křemíkovou membránou, na kterou se naváže DNA. Ostatní kontaminanty a zbytky buňky jsou odplaveny pryč a zachyceny ve sběrné mikrozkušavce. V dalších krocích dochází k promývání membrány s navázanou DNA. Finálním krokem je eluce, čili vymytí čisté DNA pomocí vody nebo elučního pufru z membrány do finální mikrozkušavky.

Použité přístroje a vybavení:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok nebo vodní lázeň, analytické váhy, mrazící box, plastové homogenizátory, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie a plasty:

- souprava NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D) - eluční pufr PE, PL1 pufr, PC pufr, PW2 pufr, sběrné zkumavky, NucleoSpin® Filter - fialové a NucleoSpin® Plant II Column - zelené filtrační kolonky
- RNáza A

Pracovní postup:

Příprava vzorků a lýze buněk

- odvážit 100 mg vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky
- přidat 400 µl PL1 a 10 µl RNázy A a zhomogenizovat pomocí homogenizační tyčinky, v případě náročnější homogenizace lze přidat křemičitý písek
- inkubovat 30-60 min v termobloku nebo vodní lázni při 65°C
- přemístit lyzát na NucleoSpin® Filter umístěného v Collection Tube
- centrifugovat 2 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě

Navázání DNA na membránu

- odstranit filtr a k supernatantu přidat 450 µl PC pufru, důkladně propipetovat
- připravit nové Collection Tube s NucleoSpin® Plant II Column a napipetovat supernatant, ne víc jak 700 µl. V případě většího objemu je tento krok nutné opakovat.
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání

- přidat 400 µl Buffer PW1 na filtr NucleoSpin® Plant II Column
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- přidat 700 µl Buffer PW2 na filtr NucleoSpin® Plant II Column
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- přidat 200 µl Buffer PW2 na filtr NucleoSpin® Plant II Column
- centrifugovat 2 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo

Eluce

- vložit NucleoSpin® Plant II do nových 1,5 ml mikrozkušavek (nejsou součástí kitu) a napipetovat 50 µl Buffer PE předeřátého na 65°C
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- skladovat v -20°C

Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel

Použité přístroje a vybavení:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok nebo vodní lázeň, analytické váhy, mrazicí box, plastové homogenizátory, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie a plasty:

- souprava NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) - pufr C4, promývací pufr CQW, promývací pufr C5, eluční pufr CE, pufr CF, Nucleospin® Food filtrační kolonky se sběrnou zkumavkou,
- Proteináza K
- absolutní ethanol p.a.

Pracovní postup:

Příprava vzorků a lýze buněk

- odvážit 200 mg vzorku do 1,5 ml mikrozskumavky
- přidat 550 µl CF pufru a 10 µl Proteinázy K a zhomogenizovat pomocí homogenizační tyčinky, v případě náročnější homogenizace lze přidat křemičitý písek
- inkubovat 30 min v termobloku nebo vodní lázni při 65°C
- centrifugovat 10 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě
- přemístit 300 µl supernatantu do nových 1,5 ml mikrozskumavek a přidat 300 µl absolutního ethanolu a 300 µl pufru C4, vše 30 s vortexovat
- centrifugovat 2 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě

Navázání DNA na membránu

- připravit nové Collection Tube s NucleoSpin® Food Column a napipetovat supernatant, ne víc jak 700 µl.
- odstranit to, co proteklo a tento krok opakovat se zbylým objemem
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání

- přidat 400 µl Buffer CQW na filtr NucleoSpin® Food Column
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- přidat 700 µl Buffer C5 na filtr NucleoSpin® Food Column
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- přidat 200 µl Buffer C5 na filtr NucleoSpin® Food Column
- centrifugovat 2 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo

Eluce

- vložit NucleoSpin® Food Column do nových 1,5 ml mikrozskumavek (nejsou součástí kitu) a napipetovat 100 µl Buffer CE předeřátého na 70°C
- inkubovat 5 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 1 min na 11 000 otáček při laboratorní teplotě a odstranit to co proteklo
- skladovat v -20°C

Izolace DNA pomocí přístroje MagCore® Genomic DNA Tissue Kit – Feed-soil sample

Izolace pomocí magnetických kuliček se používá hlavně k izolaci DNA. Metoda je založena na principu elektrostatické interakci DNA s povrchem částic. Zpravidla sestává ze tří základních kroků. Prvním krokem je lyze buněk, při které dochází k navázání DNA na magnetické mikro a nano částice o velikosti v rozmezí 5 – 450 nm. Ostatní kontaminanty a proteiny jsou vyloučeny do roztoku. V dalším kroku dochází k promývání DNA a poslední krok je eluce čisté DNA. Tato metoda může být také zcela automatizována. Je již mnoho výrobců, kteří vyrábějí sestavené kity a samotná izolace probíhá v robotickém izolátoru.

Použité přístroje a vybavení:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok nebo vodní lázeň, analytické váhy, mrazicí box, plastové homogenizátory, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, automatický izolátor MagCore®

Chemikálie a plasty:

- souprava MagCore® Genomic DNA Tissue Kit - testovací a eluční zkumavky typu eppendorf, GT pufr, PK Storage pufr, Filter Column Set, předplněná cartridge (kód 401), sada pipetovacích špiček MagCore
- proteináza K

Pracovní postup:

Příprava vzorků a lyze buněk

- odvážit 30-40 mg vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky
- přidat 500 µl GT pufru a 20 µl Proteinázy K a zhomogenizovat pomocí homogenizační tyčinky, v případě náročnější homogenizace lze přidat křemičitý písek
- zvortexovat a inkubovat 15 min v termobloku nebo vodní lázni při 56°C
- každé 3 min opatrně promíchat
- centrifugovat 3 min na 14 000 otáček při laboratorní teplotě

Příprava vzorků do automatického izolátoru

- 400 µl supernatantu přepipetovat do eluční zkumavky
- všechny potřebné plasty umístit do stojanu dle návodu
- nastavit program 401, objem vzorku 400 µl, eluční pufr Tris a objem eluátu 60 µl
- po ukončení programu umístit zkumavky s DNA do -20°C

Kontrola izolace

Nukleové kyseliny, které získáme díky izolaci je před samotnou analýzou nutné upravit na určitou koncentraci. Zároveň je třeba ověřit i čistotu vzorků. Tyto parametry lze ověřit třemi různými způsoby. Pokud není čistota vzorků dostatečná, je nutné vzorky přečistit.

Agarosový gel

Agarosový gel vhodný pro kontrolu čistoty by měl mít nízkou koncentraci. Nejčastěji 0,8% agarosa. Hodnocení izolace NK na gelu je sice starší metoda, ale má jednoznačné vypovídající vlastnosti. Z agarosového gelu lze vyčíst, zda vůbec došlo k vyizolování NK, identifikovat příměsi, jako např. RNA, a nebo zda nebyla NK během izolace nafragmentována. Při použití velikostního markeru lze nejen určit velikost cílového organismu, ale také přibližná koncentrace. Ta se odvíjí od intenzity produktu, která je porovnána s intenzitou fragmentů u velikostního markeru.

Pracovní postup:

- do Erlenmeyerovy baňky navážit 0,4 g agarózy
 - přidat 50 ml 1x TBE
 - rozvařit roztok agarózy a TBE v mikrovlnné troubě tak, aby nebyla zřetelná žádná vlákna, přidat 4 μ l Ethidium bromidu (nebo Stain G)
 - zchladit a nalít rozvařenou agarózu do připravené vany s „hřebínkem“, který vytvoří oddělené jamky, nalitá agaróza nesmí obsahovat žádné vzduchové bubliny
 - nechat agarosu úplně zatuhnout (cca 20 - 30 min), vyjmout hřebínek
 - vložit agarosový gel do elektroforetické vany, ve které je roztok 1x TBE
 - na parafilmu smíchat vzorky DNA s barvičkou (bromophenol blue)
 - napipetovat 2 μ l barvičky
 - k barvičce přidat 5 μ l templátové DNA a propipetovat
 - napipetovat 5 μ l obarvené DNA do jednotlivých jamek – do první a poslední jamky hned za vzorky napipetovat 100bp ladder
 - připojit k napájecímu zařízení a napětí nastavit na 40 V, cca po 5-ti minutách (po vyjetí vzorků ze slotů), zvýšit napětí na 70 V
 - doba průběhu elektroforézy trvá cca 1 hodinu
 - po uplynutí této doby vyjmout gel z pufru a vyfotografovat pod UV světlem v dokumentačním zařízení
-
- ✓ pokud je barvena agaróza Ethidium bromidem, nadměru dodržujte bezpečnost práce
 - ✓ při používání UV světla je třeba chránit zrak a fotografie pořizovat jen v přístroji k tomu určeném

Spektrofotometrické měření

Koncentrace a čistota je měřena na základě hodnot absorbance při různých vlnových délkách xenonové výbojky. Pro měření absorbance lze využít jakékoli molekuly, které absorbují světlo o specifické vlnové délce. Všechny nukleotidy NK jako jsou RNA, ssDNA a dsDNA absorbují při vlnové délce 260 nm, což může být v případě této metody i nevýhodou. U proteinů je absorpční maximum 280 nm. Roztoky nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocují při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Při vlnové délce 260 nm je vyhodnocena koncentrace vyizolované NK a při 280 nm je hodnocena čistota vzorku, protože tato hodnota odráží přítomnost proteinů.

Hodnocení poměru 260/280

Poměr absorbance při 260 nm a 280 nm se používá pro posouzení čistoty DNA a RNA. Poměr ~ 1,8 je všeobecně přijímán jako čistý pro DNA; poměr 2,0 ~ je obecně přijímán jako čistý pro RNA. Pokud je poměr znatelně nižší, může to znamenat přítomnost proteinů nebo jiné nečistoty, které silně absorbují na/nebo v blízkosti vlnové délky 280 nm.

- $A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) \sim 1,7; 1,8$ čistá DNA
- $A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) < 1,7$ znečištěná DNA (proteiny nebo organické látky)
- $A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) > 1,9$ DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

Hodnocení poměru 260/230

Tento poměr se používá jako druhotné měření čistoty nukleové kyseliny. Poměr hodnoty 260/230 pro čisté nukleové kyseliny je často vyšší než příslušné hodnoty 260/280. Očekávané 260/230 hodnoty jsou obvykle v rozmezí 2,0 až 2,2. Je-li tento poměr výrazně nižší, může to znamenat přítomnost kontaminujících látek, které absorbují při vlnové délce 230 nm (například EDTA, sacharidy, fenoly, guanidiny HCl).

Pracovní postup:

- napipetovat 1,5 μ l slepého vzorku dle pufru, ve kterém je DNA rozpuštěna (1x TE pufr, milliQ voda nebo chelex)
- postupně nanášet 1,5 μ l každého vyizolovaného vzorku (před nanášením je potřeba lehce promíchat, před samotným měřením v programu vzorek popsat)
- výstupem je tabulka dat (koncentrací DNA a parametrů čistoty) ve formátu pdf nebo xls

Ověření vhodnosti izolačních metod

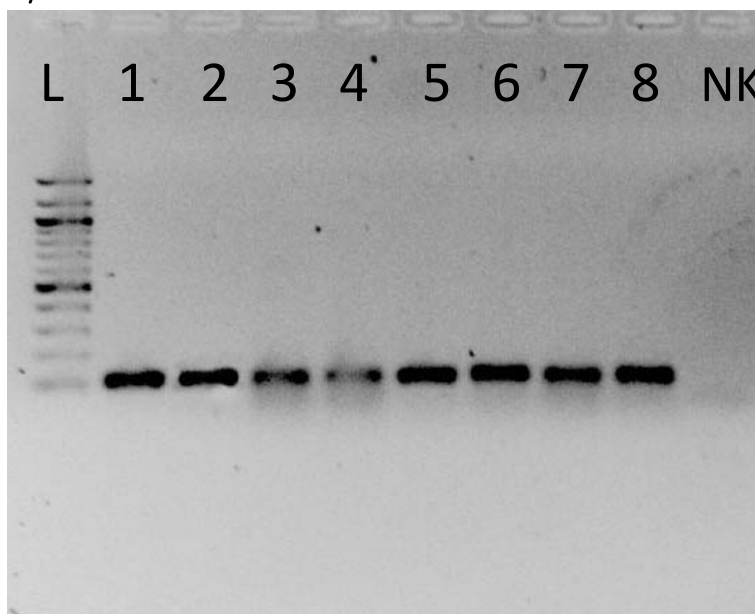
Výsledky ze všech izolačních metod byly ověřeny pomocí měření koncentrace na spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu, Německo). Ověření, zda byla vyizolovaná DNA máku setého, bylo provedeno pomocí mikrosatelitového markeru specifického pouze pro mák. Výsledky byly vizualizovány na 2% agarózovém gelu, který byl obarven pomocí ethidium bromidu. Zobrazení probíhalo pod UV zářením.

Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991)

Výsledky z BioSpec-nano

Č. vzorku	Druh vzorku	Koncentra DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1	ONYX listy	26,93	2,70	2,98
2	OREL listy	84,02	2,07	1,89
3	ONYX semena	348,59	2,13	1,78
4	OREL semena	381,39	2,12	1,61
5	ONYX výrobek	175,99	2,02	1,20
6	OREL výrobek	257,64	2,00	1,25
7	ONYX nádivka	303,57	2,05	1,46
8	OREL nádivka	196,62	1,98	1,26

Výsledky po PCR analýze



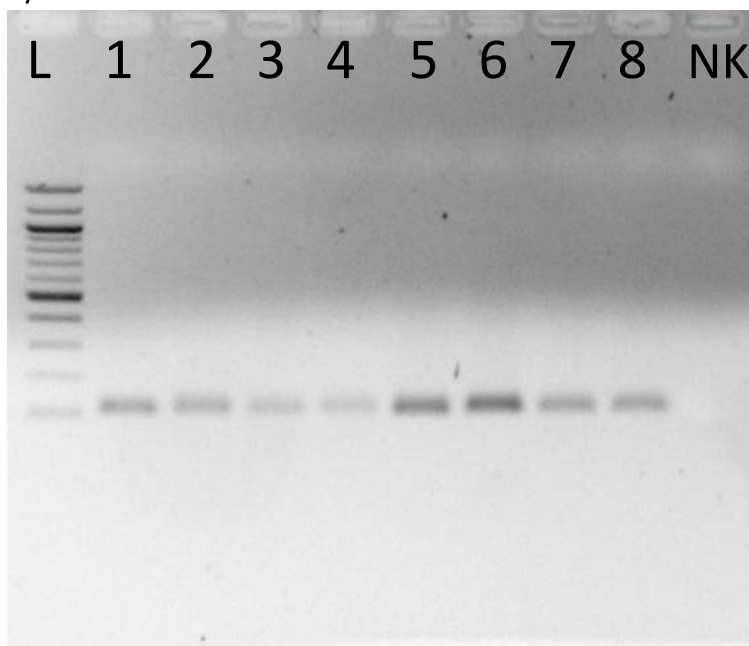
Tato metoda je dle výsledků jak ze spektrofotometrického měření, tak i po PCR analýze nejvhodnější pro izolaci DNA se semen. Nejméně vhodná je tato metoda pro izolaci DNA z listů. Vysoký obsah oleje v makových produktech způsobuje horší hodnoty u poměru 260/230, i přesto došlo k amplifikaci fragmentu u všech testovaných vzorků.

Modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny (Doyle, 1991) – zkrácený protokol

Výsledky z BioSpec-nano

Č. vzorku	Druh vzorku	Koncentra DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1	ONYX listy	59,54	2,31	1,98
2	OREL listy	21,53	2,43	1,96
3	ONYX semena	133,87	2,06	1,25
4	OREL semena	117,79	2,17	1,60
5	ONYX výrobek	88,30	2,12	2,68
6	OREL výrobek	27,37	2,33	1,51
7	ONYX nádivka	132,29	1,98	1,26
8	OREL nádivka	64,09	2,04	1,21

Výsledky po PCR analýze



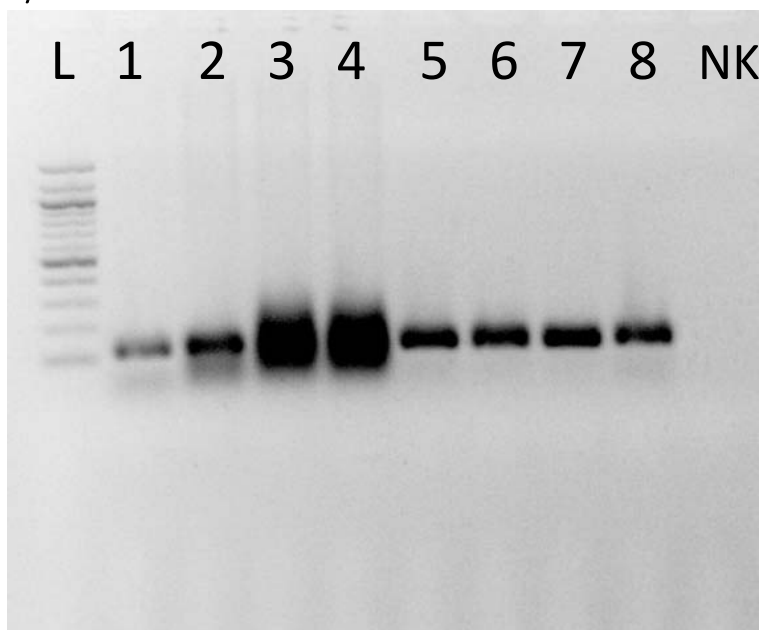
V případě této metody došlo i podle očekávání k nižšímu výtěžku DNA. Poměr hodnot určující čistotu DNA měl stejný charakter jako u delší verze tohoto typu izolace. Ačkoliv byl výtěžek nižší, i tak došlo k amplifikaci všech fragmentů. Nejvhodnější pro izolaci DNA je tato metoda u semen. U ostatních vzorků byly výsledky velmi podobné.

Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel

Výsledky z BioSpec-nano

Č. vzorku	Druh vzorku	Koncentra DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1	ONYX listy	333,26	2,24	2,29
2	OREL listy	566,74	2,20	2,36
3	ONYX semena	1176,32	2,21	2,23
4	OREL semena	1216,87	2,19	2,13
5	ONYX výrobek	146,18	2,18	1,55
6	OREL výrobek	70,81	2,32	1,75
7	ONYX nádivka	152,87	2,20	1,50
8	OREL nádivka	225,9	2,17	1,70

Výsledky po PCR analýze



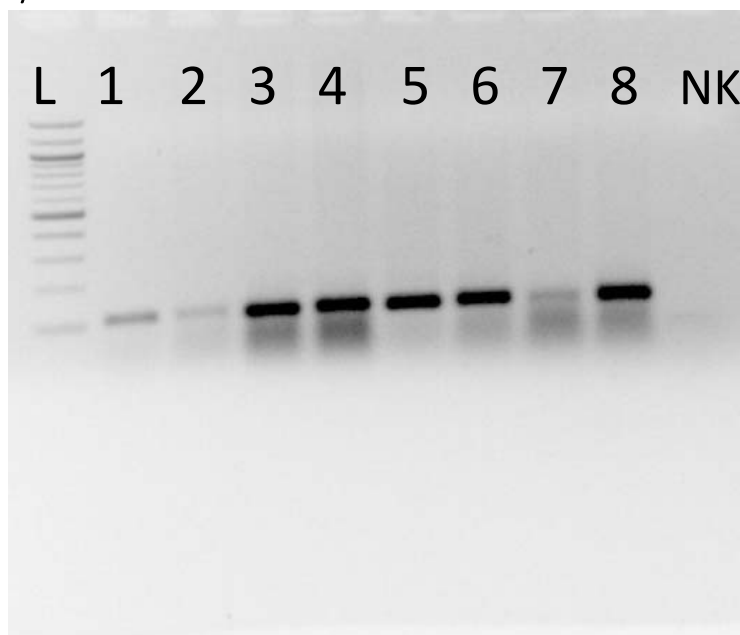
U izolace pomocí izolačního kolonkového kitu je podle výsledků ze spektrofotometrického měření dostatečná výtěžnost u všech typů vzorků. Nejvyšší výtěžnost je ovšem u vzorků ze semen, což je patrné i po amplifikaci fragmentů. U vzorků typu list a semena jsou i téměř ideální hodnoty ukazující na čistotu vyizolované DNA. U typu vzorků výrobek a nádivka jsou nižší hodnoty u ukazatele 260/230, ale i přesto došlo k úspěšné amplifikaci.

Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel

Výsledky z BioSpec-nano

Č. vzorku	Druh vzorku	Koncentra DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1	ONYX listy	59,32	2,12	3,27
2	OREL listy	160,67	2,18	2,49
3	ONYX semena	655,12	2,19	2,42
4	OREL semena	638,21	2,16	2,27
5	ONYX výrobek	162,47	2,13	2,50
6	OREL výrobek	258,04	2,15	2,44
7	ONYX nádivka	407,88	2,18	2,42
8	OREL nádivka	334,15	2,18	2,41

Výsledky po PCR analýze



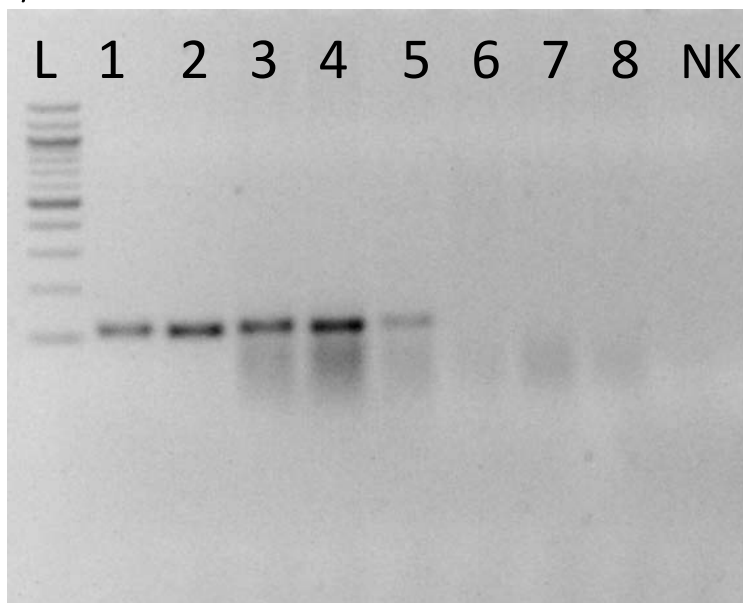
Tento izolační kolonkový kit určený pro izolaci DNA z potravin vykazuje nižší hodnoty koncentrace DNA než izolační kit pro izolaci DNA z rostlinného materiálu. Nejvyšších hodnot bylo dosahováno u vzorků typu semena. Jako vhodný se osvědčil i pro tepelně upravené produkty typu výrobek a nádivka. Nejméně vhodný je tento způsob izolace pro vzorky typu list.

Izolace DNA pomocí přístroje MagCore® Genomic DNA Tissue Kit – Feed-soil sample

Výsledky z BioSpec-nano

Č. vzorku	Druh vzorku	Koncentra DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1	ONYX listy	117,79	2,31	1,99
2	OREL listy	93,99	2,47	2,01
3	ONYX semena	456,92	2,12	1,86
4	OREL semena	656,65	2,15	2,07
5	ONYX výrobek	268,81	1,97	1,41
6	OREL výrobek	234,76	1,99	1,27
7	ONYX nádivka	267,00	1,88	1,20
8	OREL nádivka	234,23	1,77	0,93

Výsledky po PCR analýze



Vyizolovaná DNA pomocí izolačního robota a využitím magnetických kuliček, měla podle změřené koncentrace poměrně vysoké hodnoty u všech typů vzorků, ale po PCR došlo k amplifikaci pouze vzorků typu list a semena, částečně pro vzorek z výrobku. Tento výsledek přesně koresponduje s výsledky hodnot 260/230. Tzn., že robotická izolace nedokáže odstranit všechny kontaminanty, které jsou u produktů podléhajícím tepelné úpravě.

Souhrn izolačních metod

TYP VZORKU	NEJVHODNĚJŠÍ METODA	DALŠÍ MOŽNÉ METODY	NEVHODNÁ METODA
LIST	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny CTAB-PVP zkrácená verze	NucleoSpin® Plant II MagCore Tissue Kit	NucleoSpin® Food
SEMENA	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny	MagCore Tissue Kit NucleoSpin® Food CTAB-PVP zkrácená verze	NucleoSpin® Plant II
VÝROBEK	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny	NucleoSpin® Food CTAB-PVP zkrácená verze	MagCore Tissue Kit
NÁDIVKA	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny NucleoSpin® Plant II	CTAB-PVP zkrácená verze	MagCore Tissue Kit NucleoSpin® Food

Porovnání izolací

TYP IZOLACE	POČET VZORKŮ V KITU	CENA/1 VZOREK	ČASOVÁ NÁROČNOST	BEZPEČNOST	POUŽITÍ DIGESTOŘE
CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny	---	cca 40 Kč	2-3 DNY	NEBEZPEČNÉ**	ANO
CTAB-PVP zkrácená verze	---	cca 35 Kč	4 hod	NEBEZPEČNÉ**	ANO
NucleoSpin® Plant II	10/ 50/250	cca 140/107/95 Kč*	2 hod	BEZPEČNÉ	NE
NucleoSpin® Food	10/50/250	cca 105/115/139 Kč*	2 hod	BEZPEČNÉ	NE
MagCore Tissue Kit	96	cca 185 Kč*	2 hod	BEZPEČNÉ	NE

**Ceny vzorků izolovaných z kitů jsou orientační, mohou se měnit podle kurzů Eura a slevách poskytnutých prodejci.*

***Při izolaci se používá β -merkaptoethanol a chloroform*

Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika „Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů“ lze hodnotit jako novou, protože doposud nebyl zohledněn ucelený přístup k izolacím DNA z různých typů vstupních materiálů. Jelikož cílem této metodiky je dopomoci odhalit přimíchávání nekvalitních odrůd k odrůdám s označením Český modrý mák, je tato metodika vhodným nástrojem. V doposud vydaných metodikách a publikacích jsou informace zaměřené pouze na identifikaci odrůd při použití DNA izolované z listů, či ze semen. Doposud ale nebyl brán ohled na izolaci DNA z již hotového výrobku či polotovaru. Tento fakt hraje významnou roli právě při získávání čisté a kvalitní DNA, která je pro metody molekulární biologie zcela zásadní. Vzhledem k tomu, že na trhu je nepřehledné množství komerčních kitů, ale také velké množství různých izolačních postupů nabízí tato metodika přehled pro uživatele, kteří již nebudou muset zdoluhavým způsobem optimalizovat vhodné izolační metody a extrakce DNA může probíhat v podstatě rutinně.

Izolační metody jsou optimalizovány a přesně popsány takovým způsobem, aby si uživatel mohl vybrat postup izolace vzhledem k typu materiálu a dle svých technických možností a vybavení laboratoře.

Popis uplatnění metodiky

V úvodní, teoretické části metodiky je popsán stručný popis problematiky. V praktické části jsou podrobně popsány protokoly pěti izolačních metod včetně popisu izolovaného materiálu, dále metody pro ověření čistoty a koncentrace získané DNA a způsob ověření DNA z konkrétního rostlinného druhu. Tyto postupy vycházejí ze zvyklostí a zkušeností na pracovišti Katedry genetiky a biotechnologií, Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích. V závěru metodiky je zobrazen přehled použitých izolačních metod a jejich využití podle typu materiálu, dále finanční a časová náročnost a bezpečné zacházení.

Tato metodika byla vyvinuta pro potřeby ověřování pravosti a čistoty osiva a semen máku setého, ale také výrobků a polotovarů z něj. Izolace materiálu je sice jen částečným krokem, ale velmi významným. Pokud nebudeme mít dostatečné množství kvalitní DNA, nemůže být dosaženo ani kvalitních výsledků při hodnocení molekulárních markerů, proto je výběr a způsob extrakce DNA zásadním krokem pro získání žádaných výsledků.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, šlechtitelské stanice, orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI, Celní správa apod.), kontrolní, soukromé i akreditované laboratoře, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy molekulárních markerů. Na základě této metodiky lze vyizolovat dostatečně čistou a kvalitní DNA jak z makových semen, či listů, tak i z makových výrobků.

Ekonomické aspekty

Metody popisované v této metodice mají značný ekonomický význam pro semenářské či obchodní firmy a šlechtitelská pracoviště (hodnocení pravosti a čistoty osiva, odrůdové deklarace produktu – semen, selekce genotypů při šlechtění).

Výhodou je možnost výběru extrakční metody. Ceny izolací u jednoho vzorku se pohybují v částkách od 35 Kč (pro metodu CTAB-PVP) do 185 Kč (pro metodu izolace pomocí magnetických kuliček). Tyto značné rozdíly v cenách za vstupní chemikálie a plasty mohou být na druhou stranu vyváženy dobou izolace a práce s bezpečnějšími chemikáliemi. Výběr izolační metody je také závislý na vybavení laboratoře. U metody CTAB-PVP je pro práci nutná z nákladnějšího vybavení digestoř a centrifuga. Pro metodu s využitím magnetických kuliček je nutný izolační robot, jehož cena se pohybuje v rozmezí 600 - 1500 tis. Kč, což je sice poměrně vysoká pořizovací cena, ale na druhou stranu se jedná o univerzálního izolačního robota, díky němuž je možné extrahovat velké spektrum DNA z různých typů a druhů materiálů (rostlinný, živočišný, bakterie, viry, vzorky stolice, bukální stěry, krev apod.) za velmi krátkou dobu. Pokud laboratoř již toto zařízení vlastní, náklady jsou spojené pouze s nákupem vhodného izolačního kitu. Na laboratorní vybavení je nejméně náročná metoda založená na principu filtračních kolonek, pro kterou je nutná laboratorní centrifuga.

Nevýhodou kitů může být omezený počet vzorků a s tím spojená preciznost při samotné práci. Ve většině případů není možné dokupovat pouze některé komponenty kitů, a pokud ano, pak je jejich cena velmi vysoká. Pokud by byl např. nedopatřením kontaminován jeden z roztoků v kitu, bylo by nutné zakoupit kit celý. Tento problém odpadá u izolace DNA pomocí metody CTAB-PVP, kde může být namíchán roztok nový, jehož hodnota je v řádech desetikorun.

Uživatel metodiky má možnost výběru také u kontroly čistoty DNA, která může být provedená buď spektrofotometricky, popř. na agarózovém gelu. V případě spektrofotometrického měření je opět nutné přístrojové vybavení. Při hodnocení na agarózovém gelu stačí základní vybavení molekulární laboratoře.

Pro využití popsaných metod není nutné náročné zaškolení osoby provádějící tyto úkony. Při znalosti problematiky v molekulární laboratoři by se mělo jednat o rutinně prováděné úkony.

Seznam použité literatury

- Baranyk, P. a kol., (2010). Olejny. 1. vyd. Praha: Profi Press. 206 s. ISBN: 978-80-86726-38-0
- CONN, Michael P., 2012. Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture: Methods in Cell Biology – Svazek 112. New York: Academic Press. ISBN 0124055494.
- Doyle J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg
- Jozová, E., Stará, M., Horáček, J., Ludvíková, M., Čurn, V., 2020. Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.
- Kang K, Choi J, Nam JH, Lee SC, Kim KJ, Lee SW, Chang JH: Preparation and Characterization of Chemically Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator. *J Phys Chem B* 2009, 113(2):536-543.
- McKiernan H.E., Danielson P.B. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science (2017) Third Edition
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Novák, J., 2007. Jedovaté rostliny kolem nás. Grada, Praha. Svět rostlin. ISBN: 978-802-4715-490.
- Ohlašovací povinnost pěstitelů máku setého a rostlin technického konopí dle §§ 29, 29b zákona č. 167/1998 Sb., o návykových látkách dostupné z: www.celnisprava.cz [online 15.8.2022]
- ONDREIČKOVÁ, K., MIČIANOVÁ, V., MUCHOVÁ, D., KLČOVÁ, L., HUDCOVICOVÁ, M., HAVRENTOVÁ, M., MIHÁLIK, D., KRAIC, J., 2017. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia.* 72(6): 587-594.
- Stará, M., Jozová, E., Čurn, V., 2020. Molekulární charakterizace a hodnocení genetické diverzity genetických zdrojů máku. *Úroda – vědecká příloha*, 2020: (12): 157-162
- Vašák, J. a kol., (2010). Mák. Praha: Semafor. ISBN: 978-80-904011-8-1. 352 s.
- BEČKA, D., L. BEČKOVÁ, I. CAPOUCHOVÁ, P. DVOŘÁK, J. HABERLE, K. HAMOUZ, M. HÁJKOVÁ, H. HONSOVÁ, M. HÝBL, D. JANOVSÁ, M. KÁŠ, P. KONVALINA, P. KUČTOVÁ, J. MOUDRÝ, Z. ŠTĚRBA, J. TOMÁŠEK, J. URBAN. Pěstování vybraných plodin v ekologickém zemědělství. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, 2014, 229–266. ISBN 978-80-87510-32-2.

Foto na přebalu:

<https://www.ceskestavby.cz/rostliny/mak-papaver.html>

<https://www.nejrecept.cz/recept/kynute-makove-kvety-s-drobenkou-r6781>

Seznam publikací předcházející metodice

- Jozová, E., Stará, M., Horáček, J., Ludvíková, M., Čurn, V., 2020. Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.
- Jozová, E., Stará, M., Rychlá A., Čurn V. DNA barcoding a traceability novošlechtění máku. Úroda – vědecká příloha, 2021: (12): 149-155
- Stará, M., Jozová, E., Čurn, V., 2020. Molekulární charakterizace a hodnocení genetické diverzity genetických zdrojů máku. Úroda – vědecká příloha, 2020: (12): 157-162

Příloha

Použité roztoky

roztoky pro izolaci DNA

2x CTAB-PVP

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	2%	2 g	10 g	20 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
Tris	100 mM	1,21 g	6,05 g	12,114 g	+HCl = pH 8-8,2
EDTA	20 mM	0,75 g	3,723 g	7,446 g	+NaOH = pH 7,8-8
NaCl	1,4 M	8,2 g	40,915 g	81,83 g	
PVP	1%	1 g	5 g	10 g	
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

5% CTAB

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	5%	5 g	25 g	50 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
NaCl	0,35 M	2,04 g	10,27 g	20,4 g	
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

1x TE pufr

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	10 mM	0,121 g	0,605 g	1,2114 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C +HCl = pH 8-8,2
EDTA	1 mM	0,03723 g	0,1865 g	0,3723 g	+NaOH = pH 7,8-8
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

pufr pro elektroforézu

5x TBE

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	0,445 M	5,4 g	27 g	54 g	
kys. boritá	0,445 M	2,75 g	13,75	27,5 g	
EDTA	0,5 mM	2 ml	10 ml	20 ml	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

příprava agarózového gelu

0,8% v 1x TBE

objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	0,4	40	10	5
100	0,8	80	20	8
150	1,2	120	30	8-10
200	1,6	160	40	12-13

2% v 1x TBE

objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1	40	10	5
100	2	80	20	8
150	3	120	30	8-10
200	4	160	40	12-13

Název: Jozová E. a kol. (2022): Optimalizované postupy pro izolaci DNA z máku setého a makových produktů

Autorský kolektiv: Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Ing. Václav Zahradník

Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta zemědělská a technologická

Studentská 1668

370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je dostupná na:

http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Metodiky-mak_izol-2fa87accf8.pdf

Osvědčení o certifikaci UKZUZ 006952/2023.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 31.1.2023 (č.j. MZE-4478/2023-13132), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: jozovae@zf.jcu.cz

ISBN: 978-80-7394-960-0



