

# Ćwiczenie numer 6

## Analiza próbek spożywczych na obecność markerów GMO

1. Informacje wstępne
  - screening GMO
  - metoda CTAB
  - qPCR
2. Izolacja DNA z soi metodą CTAB
3. Oznaczenie ilościowe i jakościowe DNA
4. Detekcja genu lektyna 6 metodą qPCR
5. Omówienie wyników
6. Charakterystyka odczynników szkodliwych

### 1. Informacje wstępne

#### Screening GMO

Analiza produktu żywnościowego polega na oszacowaniu, czy ich zawartość jest zgodna z prawem (Regulacja EC 1829/2003, Regulacja EC 1830/2003). Regulacja zakłada, że wszystkie produkty składające się lub produkowane przez GMO muszą zostać oznaczone. Znakowanie nie jest wymagane dla produktów, w których rozważane składniki zawierają mniej niż 1% (obecnie 0,9%) GMO, gdyż taka ilość może być przypadkowa i wynika z błędów technicznych. Jeśli dany produkt zawiera dwie odmiany tego samego składnika np. soja wówczas uzyskany wynik sumuje się i sumaryczny udział procentowy decyduje o konieczności znakowania.

#### Metoda CTAB-izolacja roślinnego DNA

Metoda oparta jest na wykorzystaniu bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB). Została opracowana przez Murray'a i Thompsona w 1980 roku (Murray i Thompson, 1980) i opisana przez Wagnera i współpracowników w 1987 roku (Wagner i in., 1987). Metoda ta jest wykorzystywana do izolacji i oczyszczania DNA z materiału roślinnego i produktów pochodzenia roślinnego. Procedura CTAB jest szeroko wykorzystywana w technikach biologii molekularnej roślin i była sprawdzana w testach walidacyjnych dotyczących detekcji GMO (Lipp i in., 1999; 2001). Istnieje kilka wariantów tej metody opracowanych dla szerokiego zakresu materiałów spożywczych nisko i wysoko przetworzonych (Hupfer i in., 1998; Hotzel i in., 1999; Mayer i in., 1997; Poms i in., 2001). Komórki roślinne mogą być poddane lizie przy użyciu detergentu jonowego bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB), który tworzy nierozpuszczalny kompleks z kwasami nukleinowymi w środowisku o niskim zasoleniu. W tych warunkach polisacharydy, fenole i inne zanieczyszczenia pozostają w supernatancie i mogą być usunięte. Kompleks DNA jest rozpuszczany w roztworze o zwiększonym stężeniu soli i wytrącany etanolem lub izopropanolem.

#### qPCR

Dokładniejszą i obecnie szerzej stosowaną metodą do ilościowego oznaczania DNA jest PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). W przeciwieństwie klasycznego PCR, gdzie oznaczenie zachodziło w końcowym punkcie reakcji, system ten pozwala na monitorowanie reakcji w czasie, w którym ona rzeczywiście zachodzi. W tego rodzaju systemie reakcja PCR jest związana z emisją sygnału fluorescencyjnego proporcjonalnego do ilości produktu generowanego w każdym cyklu reakcji. Poprzez pomiar fluorescencji w każdym cyklu reakcji, jest możliwe śledzenie reakcji w fazie eksponentalnej. Pierwszy znaczący wzrost fluorescencji jest skorelowany z początkową ilością matrycy (Ahmed, 2002).

Specyficzność metody PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) zależy zarówno od chemicznego sposobu generowania i monitorowania reakcji powielania, jak i od instrumentu stosowanego do śledzenia sygnału. Do metody tej opracowano różne inerkalujące barwniki (bromek etydyny, SYBR Green I) i hybrydujące sondy (TaqMan, Fluorescence Resonance Energy Transfer, Molecular Beacons, Scorpions, TaqMan Minor Groove Binder).

## 2. Izolacja DNA z soi metodą CTAB

**Tabela.1** Lista odczynników

Odczynnik	Skład
<b>Bufor lizujący Carlson'a</b>	100 mM Tris, pH 9,5 20 mM EDTA 1,4 M NaCl 2% CTAB 1% PEG 2-β-merkaptioetanol*
<b>Chloroform:alkohol izoamyłowy 24:1</b>	96 ml chloroform 4 ml alkoholu izoamyłowego
<b>Alkohol etylowy 70%</b>	
<b>Izopropanol</b>	
<b>Bufor TE</b>	10 mM Tris HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
<b>RNaza</b>	1,0 mg/ml

\*dodać na świeżo pod dygestorium. 2 µl na 1 ml buforu

**Tabela.2** Lista wymaganego sprzętu

<b>Pipeta 1 ml, 20-100 ml</b>
<b>Tipsy 1 ml, 20-100 ml</b>
<b>Moździerz</b>
<b>Probówki typu eppendorf 1,5 ml x2</b>
<b>Blok grzewczy 74°C</b>
<b>Wirówka 10 000 rpm</b>

## Etapy izolacji DNA

1. Homogenizacja materiału w ciekłym azocie z użyciem moździerza (100 mg). **Czynność należy wykonywać w okularach ochronnych.**
2. Zhomogenizowany materiał przenieść do probówki 1,5 ml i dodać 750 µl buforu lizującego Carlsona . Mieszać zawartość przez odwracanie 6-10 razy aż do momentu uzyskania jednolitej konsystencji.
3. Probówkę wraz z zawartością umieścić w bloku grzewczym na 30 min w temperaturze 74°C pamiętając o mieszaniu zawartości probówki przez worteksowanie co 10 min.
4. Wirowanie prób w temperaturze pokojowej (10 000 rpm, 10 min).
5. Po zakończonym procesie wirowania przenieść supernatant do nowej probówki (1,5 ml).
6. Do supernatantu należy dodać 1 objętość mieszaniny chloroform: alkohol izoamylowy\* a następnie delikatnie wymieszać zawartość przez odwracanie 6-7 razy.
- \* jeśli zawartość probówki jest ciepła należy wstrzymać się z dodaniem mieszaniny zawierającej chloroform do czasu spadku temperatury
7. Probówkę wirujemy przez 10 min w temperaturze pokojowej (10 000 rpm)
8. Przenieść górną fazę do nowej probówki a następnie zmierzyć objętość cieczy.
9. Należy dodać 1 objętość izopropanolu a następnie wymieszać zawartość przez odwracanie probówki 6-7 razy.
10. Probę wirujemy przez 10 min w temperaturze pokojowej (10 000 rpm).
11. Po zakończonym wirowaniu usuwamy supernatant a do uzyskanego osadu (DNA) dodajemy 500 µl zimnego alkoholu 70%.
12. Wirowanie 4°C, 10 000 rpm, 10 min.
13. Usunąć supernatant a uzyskany osad suszymy na powietrzu przez 5 min.
14. W zależności od wielkości uzyskanego osadu dodać od 20-100 µl buforu TE. Rozpuścić osad przez pipetowanie a następnie dodać 2 µl RNasy. Inkubacja T= 37 °C, t= 10 min.

## 3. Oznaczenie ilościowe i jakościowe DNA

- a. pomiar spektrofotometryczny (NanoDrop ND-1000)
- b. analiza produktu na 1% żelu agarozowym

## 4. Detekcja genu lektyny 6 metodą qPCR

Identyfikacja DNA soi z użyciem techniki qPCR jest przeprowadzana poprzez znalezienie genu lektyny 6 (startery GMO3/GMO4), która jest genem referencyjnym wykorzystywanym do oznaczenia procentowej zawartości GMO w produktach żywnościowych.

Kontrole

W każdej analizie bardzo ważne jest przeprowadzanie eksperymentów kontrolnych.

**Kontrole negatywne** są zaprojektowane w celu sprawdzenia czy odczynniki użyte do reakcji PCR nie są zanieczyszczone przez DNA.

**Kontrole pozytywne** zawierające scharakteryzowane próbki są również konieczne w celu sprawdzenia efektywności i specyficzności reakcji PCR.

### Przygotowanie reakcji qPCR

Odczynniki potrzebne do serii 6 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 4.

**Tabela 3. Charakterystyka badania**

<b>KIERUNEK BADANIA</b>	soja	amplifikowana sekwencja	Glycine max lectin-like (LOC100818710) XM_003518752.2	wielkość produktu	117 bp
metoda	REAL-TIME PCR	aparat	LIGHT CYCLER 2.0	odczynniki	LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I
starter	<b>GMO_1</b>	sekwencja	5' GCCCTCTACTCCACCCCATCC 3'	długość	22nt
starter	<b>GMO_2</b>	sekwencja	5' GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG 3'	długość	23nt

**Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej**

SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ					
substraty	stężenie końcowe w reakcji		stężenie odczynnika	objętość na pojedynczą reakcję	
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	1x		10x	1 µl	
Mix starterów <b>GMO_1+ GMO_2</b>	0,5 pmol/µl		5 pmol/µl	1 µl	
Mg <sup>2+</sup>	15 mmol/µl		25 mmol/µl	0,6 µl	
DNA	-		-	1,5 µl	
woda	-		-	5,9 µl	
objętość reakcji	10 µl	kontrola pozytywna reakcji	materiał referencyjny dla soi GTS40-3-2	kontrola negatywna reakcji	premix +woda

**Tabela 5. Program reakcji**

WARUNKI REAKCJI						
etap	temperatura	czas	liczba cykli	szybkość nagrzewania	tryb pomiaru	tryb analizy
<b>INKUBACJA</b>	95°C	10'	1	20 °C/s	none	none
<b>AMPLIFIKACJA (45 X)</b>						
denaturacja	95°C	10"	45	20 °C/s	none	quantification
hybrydyzacja starterów	63°C	5"		20 °C/s	none	
elongacja	72°C	6"		20 °C/s	single	
<b>KRZYWA TOPNIENIA (1 X)</b>						
denaturacja	95°C	0"	1	20 °C/s	none	melting curves
hybrydyzacja starterów	65°C	15"		20 °C/s	none	
denaturacja z pomiarem fluorescencyjnym	95°C	0"		0,2 °C/s	continuous	
<b>CHŁODZENIE (1x)</b>						
	40°C	30"	1	20 °C/s	none	
wielkość kapilar	20 µl	kompensacja koloru		off	metoda liczenia	-

**5.Omówienie wyników**

## 6. Charakterystyka odczynników szkodliwych

### Chloroform



#### Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia (H):

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.  
H315 Działa drażniąco na skórę.  
H351 Podejrzewa się, że powoduje raka.  
H373 Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub narażenie powtarzane.

#### Zwroty wskazujące środki ostrożności:

P201 Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.  
P260 Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.  
P264 Dokładnie umyć ... po użyciu.  
P281 Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.  
P301+312 W PRZYPADKU POŁKNIECIA: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ZATRUC lub z lekarzem.  
P302+352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.

Źródło: [http://www.zpb-innowacje.pl/files/karty\\_charakterystyk/Chloroform.pdf](http://www.zpb-innowacje.pl/files/karty_charakterystyk/Chloroform.pdf)

### 2-merkaptoetanol



#### Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia

H301 Działa toksycznie po połknięciu.  
H310 + H330 Powoduje śmierć w kontakcie ze skórą lub w przypadku wdychania.  
H315 Działa drażniąco na skórę.  
H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.  
H410 Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

#### Zwroty wskazujące środki ostrożności

P280 Stosować rękawice ochronne/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.  
P273 Unikać uwolnienia do środowiska.  
P302 + P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.  
P304 + P340 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.  
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.  
P309 + P310 W PRZYPADKU narażenia lub złego samopoczucia: Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub lekarzem.

Źródło: <http://www.google.pl/url?sa=t&crct=j&q=&esrc=s&source=web&c>

### Izoamylowy alkohol



#### Zwroty wskazujące środki ostrożności

: Przed użyciem przeczytać etykietę. Chronić przed dziećmi. W razie konieczności zasięgnięcia porady lekarza należy pokazać pojemnik lub etykietę. Stosować rękawice ochronne. Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy. Chronić przed źródłami ciepła, urządzeniami iskrzącymi, otwartym ogniem i gorącymi powierzchniami. Nie palić. Używać sprzętu elektrycznego, wentylacyjnego, oświetleniowego i służącego do operowania materiałem w wersji przeciwwybuchowej. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Splukać skórę wodą albo pod prysznice. Przechowywać w chłodnym miejscu. Zawartość pojemnika jak i pojemnik utylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, narodowymi oraz międzynarodowymi przepisami.

Źródło: [http://www.poch.com.pl/1/wysw/msds\\_clp.php?A=4e1ab2745b315f510001](http://www.poch.com.pl/1/wysw/msds_clp.php?A=4e1ab2745b315f510001)

## Izopropanol



### Zwroty wskazujące środki ostrożności

: Przed użyciem przeczytać etykietę. Chronić przed dziećmi. W razie konieczności zasięgnięcia porady lekarza należy pokazać pojemnik lub etykietę. Stosować rękawice ochronne. Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy. Zalecane: okulary chroniące przed rozpryskiem. Chronić przed źródłami ciepła, urządzeniami iskrzącymi, otwartym ogniem i gorącymi powierzchniami. Nie palić. Używać sprzętu elektrycznego, wentylacyjnego, oświetleniowego i służącego do operowania materiałem w wersji przeciwwybuchowej. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Splukać skórę wodą albo pod prysznicem. Przechowywać w chłodnym miejscu. Zawartość pojemnika jak i pojemnik utylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, narodowymi oraz międzynarodowymi przepisami.

Źródło: [http://www.bold.gliwice.pl/BHP/Inne/POCH\\_MSDS\\_Izopropanol.pdf](http://www.bold.gliwice.pl/BHP/Inne/POCH_MSDS_Izopropanol.pdf)