 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50350.1 – Elektroforéza hlízových proteinů brambor – pravost odrůdy	Vydání	1
		Revize	1

ELEKTROFORÉZA HLÍZOVÝCH PROTEINŮ BRAMBOR – PRAVOST ODRŮDY

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro separaci bílkovin hlíz brambor jako genetických markerů za účelem identifikace a prokázání pravosti odrůdy.

2 Princip

Bílkoviny se extrahují z bramborových hlíz a v extraktu se separují zónovou vertikální dvourozměrnou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu na základě mobility, která je definována velikostí a strukturou jednotlivých bílkovinných molekul. Složení a poloha bílkovinného komplexu ve formě příčných pruhů (bandů) na elektroforetickém záznamu je přitom charakteristická pro každou odrůdu. Pravost odrůdy lze určit porovnáním záznamu reálného vzorku se záznamem referenčního vzorku.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie čistoty vhodné pro elektroforézu nebo molekulární biologii, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná.
- 2 Amidočern 10B.
- 3 Siřičitan sodný p.a., Na₂SO₃.
- 4 Disiřičitan sodný p.a., Na₂S₂O₅.
- 5 Sacharóza p.a.
- 6 Extrakční roztoky.

Extrakční roztok A.


Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se ve vodě (1) rozpustí 5,0 g siřičitanu sodného (3) a 3,75 g disiřičitanu sodného (4), promíchá a doplní po značku vodou (1). Roztok lze skladovat při 6 °C.

Extrakční roztok B.


Příprava: Ve 1000ml odměrné baňce se v odpovídajícím množství vody (1) rozpustí 500 g sacharózy (5) a 0,3 g amidočerni 10B (2), promíchá se a doplní po značku vodou (1). Roztok lze skladovat při 6 °C.

Extrakční roztok C.

Příprava: 10 ml extrakčního roztoku A se smíchá se 100 ml extrakčního roztoku B. Extrakční roztok C se připravuje denně čerstvý.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50350.1 – Elektroforéza hlízových proteinů brambor -pravost odrůdy	Vydání	1
		Revize	1

- 7 Akrylamid, roztok 40%. Je vysoce toxický, dodává se komerčně.
- 8 Bisakrylamid, roztok 2%. Je vysoce toxický, dodává se komerčně.
- 9 Persíran amonný, APS, roztok 2%.
Příprava: 0,2 g persíranu amonného se rozpustí v 10 ml vody (1). Roztok se připravuje denně čerstvý.
- 10 TRIS, C₄H₁₁NO₃.
- 11 Bromfenolová modř.
- 12 Sacharóza.
- 13 Glycin.
- 14 Pufr na dělicí gel.
Příprava: V 1000ml baňce se ve vodě (1) rozpustí 75,4 g TRIS (10), promíchá a doplní vodou (1) po značku. Pomocí HCl se pH upraví na 8,9.
- 15 Pufr na zaostřovací gel.
Příprava: V 1000ml baňce se ve vodě (1) rozpustí 16 g TRIS (10), 100 mg bromfenolové modři (11), promíchá se a doplní vodou (10) po značku. Pomocí HCl se pH upraví na 6,7.
- 16 Zaostřovací gel.
Příprava: V baňce se smíchá 280 ml pufru na zaostřovací gel (15), 45 ml akrylamidu (7), 73 ml bisakrylamidu (8), 150 ml vody (1), 80 g sacharózy (12).
- 17 Ethanol, roztok 10%.
Příprava: Do 100ml baňky se odměří 10 ml ethanolu a doplní vodou (1) po značku.
- 18 Elektrodotový pufr.
Příprava: V 1000ml baňce se ve vodě (1) rozpustí 5,2 g TRIS (10), 3,5 g glycinu (13), promíchá se a doplní po značku vodou (1).
- 19 TEMED, C₆H₁₆N₂.
- 20 Coomassie Br. Blue G 250, AppliChem, Darmstadt.
- 21 Coomassie Br. Blue R 250, AppliChem, Darmstadt.
- 22 Ledová kyselina octová, CH₃COOH.
- 23 Methanol p.a.
- 24 Trichloroctová kyselina, TCA, C₃HCl₃O₂.
- 25 Glycerin, roztok 2%.
Příprava: Do 1000ml baňky se odměří 20 ml glycerinu a doplní vodou (1) po značku.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50350.1 – Elektroforéza hlízových proteinů brambor -pravost odrůdy	Vydání	1
		Revize	1

26 Zásobní barvicí roztok.

Příprava: Ve 100ml baňce se ve vodě (1) rozpustí 0,25 g Coomassie Br. Blue G 250 (20) a 0,75 g Coomassie Br. Blue R 250 (21), míchá se alespoň 1 h a pak se doplní vodou (1) po značku. Před použitím se roztok důkladně protřepe.

27 Barvicí roztok pro patatiny.

Příprava: 240 g TCA (24) se rozpustí v 280 ml ledové kyseliny octové (22), 3300 ml vody (1), 600 ml methanolu (23), 100 ml zásobního barvicího roztoku (26).

4 Přístroje a pomůcky


- 1 Vertikální elektroforetický přístroj pro 2 gely s chladicím termostatem (kryostat) a příslušenstvím
- 2 Odstředivka laboratorní, 3000 ot/min.
- 3 Mraznička s dosažitelnými teplotami $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a níže.
- 4 Napěťový zdroj s kapacitou minimálně 400 V a 150 mV.
- 5 Kývací třepačka s platformou.
- 6 Zařízení na odlévání gelů.
- 7 Analytické váhy.

5 Pracovní postup

Analyzují se buď čerstvé hlízy nebo hlízy uchovávané nejdéle půl roku v chladu, lépe ale zamražené na teplotu nižší než $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Také je možné vyextrahovat z hlíz hlízovou šťávu a zamrazit ji při teplotě $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší. Zamraženou hlízovou šťávu lze uchovat nejdéle 1 rok.

5.1 Příprava extraktů proteinů

Hlízy brambor i se slupkou se omyjí, opláchnou destilovanou vodou a osuší. Poté se nechají minimálně při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ promrazit (nejméně 16 h) a pak při pokojové teplotě roztát. Hlízy se rozkrojí a (4 – 5) ml hlízové šťávy se tlakem vymačká do zkumavek, přičemž šťáva z jedné hlízy se separuje v jedné zkumavce. Ze zkumavky se do centrifugační zkumavky odeberou 3,0 ml hlízové šťávy, které se smíchají s 0,8 ml extrakčního roztoku C (6). Centrifuguje se 15 min při 3000 ot/min při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pak se supernatant rozdělí do dvou mikrozkuavek se šroubovacím uzávěrem, označí, zamrazí a uchovává při $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ a níže nejdéle 1 rok. Před počátkem vlastní elektroforetického stanovení se extrakty rozmrazí při laboratorní teplotě.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50350.1 – Elektroforéza hlízových proteinů brambor -pravost odrůdy	Vydání	1
		Revize	1

5.2 Příprava gelů pro PAGE pH 8,9 pro patatiny

V zařízení na odlévání gelů se sestaví suché a čisté gelové kazety. Pro lepší separaci bílkovinných molekul a dobrou ostrost jednotlivých bílkovinných pruhů je vhodnější použít diskontinuální pufrový systém s odlišným gelovým a elektrodovým pufrem, kdy je gel rozdělen na úzký pás tzv. zaostřovacího (stacking) gelu a širší pás tzv. separačního (resolving) gelu.

Příprava dělicího gelu

Do zařízení na odlévání gelů se postupně za pomalého míchání přidává 30 ml pufru na dělicí gel (14), 7 ml vody (1), 7 ml akrylamidu (7) a 6,5 ml bisakrylamidu (8). Pak se přidá 50 μ l TEMED (19) a 3 ml APS (9), čímž se nastartuje polymerace.

Gely se pečlivě odlévají tak, aby se netvořily bublinky vzduchu a polymerace probíhala alespoň 15 min při laboratorní teplotě. Gelové kazety nesmějí být zcela naplněny, aby byl prostor pro 14mm vrstvu zaostřovacího gelu. Povrch gelu se opatrně převrství roztokem ethanolu (17) pomocí injekční stříkačky. Po skončení polymerace (asi po 30 min) se povrch gelu omyje vodou (1) a osuší filtračním papírem.

Příprava zaostřovacího gelu

Do zařízení na odlévání gelů se postupně za pomalého míchání přidává roztok – 15 ml zaostřovacího gelu (16), 60 μ l TEMED (19) a 375 μ l APS (9).

Gely se pečlivě nalijí tak, aby se netvořily vzduchové bublinky, vloží se hřebeny pro tvorbu jamek. Polymerace probíhá alespoň 15 min. Potom se hřebeny opatrně vyjmou a jamky v gelu se promyjí a naplní elektrodovým pufrem (18).

5.3 Elektroforetická separace


Pro elektroforézu patatinů se do každé jamky nanáší asi 6 μ l extraktu. Současně se nanese kontrolní vzorek o známém počtu a poloze jednotlivých bandů reprezentujících charakteristické odrůdové bílkovinné komplexy.

Podmínky pro PAGE pH 8,9 pro patatiny: Elektroforéza probíhá v prostředí elektrodového pufru (18) při teplotě (5 – 15) °C při proudu pro 2 gely 80 mA (přechod zaostřovacím gelem) asi 20 min a poté při proudu 160 mA asi 50 min. Napětí dosahuje max. 300 V. Migrační vzdálenost je 6 cm od rozhraní gelů.

5.4 Barvení gelů

Gely z PAGE pH 8,9 se označí, např. odříznutím růžku gelu, u každého se oddělí zaostřovací gel a přenesou se do barvicí misky naplněné 300 ml barvicího roztoku pro patatiny (27). Inkubují se 3 h na kývací třepačce. Gely se ponechají v barvicí lázni přes noc bez třepání.

Pro odbarvení se gely přenesou do misky s pitnou vodou a inkubují se na kývací třepačce 2 \times 30 min. Dále se inkubují 30 min na třepačce v roztoku glycerinu (25). Poté se gely suší mezi dvěma vrstvami celofánu namočeného v roztoku glycerinu (25).

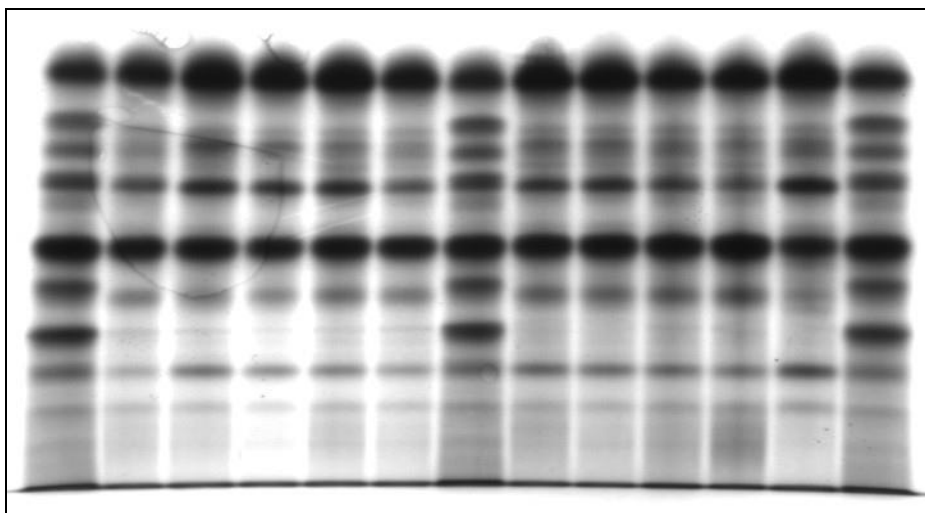
	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50350.1 – Elektroforéza hlízových proteinů brambor -pravost odrůdy	Vydání	1
		Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Výsledkem analýzy je záznam charakteristický pro každou odrůdu, tzv. elektroforegram. Na elektroforegramu jsou sloupce s příčnými, různě širokými pruhy (bandy), které odpovídají bílkovinným komplexům charakteristickým pro danou odrůdu. Každý sloupec reprezentuje jednu hlízu vzorku dané odrůdy.

Poloha jednotlivých příčných pruhů (bandů) na jednotlivých sloupcích elektroforegramu se definuje tzv. REM (relative mobility) jako poměr vzdálenosti pásu od startu k celkové vzdálenosti od startu do cíle analýzy. Každý band má tedy svoji charakteristickou REM, která ho identifikuje. Poloha a počet těchto bandů jsou specifické pro každou odrůdu (viz. elektroforegram, obr. 1).

Elektroforegram se po digitalizaci dokumentačním zařízením (CCD kamera) přenesl do elektroforetického vyhodnocovacího software, kde se zpracuje. S využitím kontrolního vzorku s pevně danými hodnotami REM se identifikují jednotlivé bandy a jejich poloha. Elektroforegram každé odrůdy má tak k jednotlivým bandům přiřazeny příslušné hodnoty REM určující jejich polohu. Z takto zpracovaných elektroforetických záznamů se vytvoří databáze, která umožňuje porovnání s elektroforegramem reálného vzorku. Tím se určí pravost odrůdy nebo, je-li vzorek neznámý, odrůda se identifikuje.



Obr. 1. Ukázka elektroforegramu. Postranní a prostřední sloupce jsou referenční vzorek (kalibrátor). Je patrná odlišnost v počtu a umístění příčných pruhů na zbývajících sloupcích reálného vzorku.

7 Literatura

1. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS“ - UPOV, TG/23/6-Polyacrylamide gel electrophoresis methods for the analysis of patanins in potatoes.