 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	2
		60072.1 – Úprava a homogenizace vzorků osiv pro stanovení přítomnosti GMO metodou PCR	Revize

ÚPRAVA A HOMOGENIZACE VZORKŮ OSIV PRO STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI GMO METODOU PCR

1 Účel a rozsah

Postup slouží k získání reprezentativního podílu vzorku osiva, který je vhodný pro analýzu GMO metodou PCR.

2 Princip

Postup zpracování vzorků osiv zahrnuje veškeré potřebné kroky, které umožní získat reprezentativní podíl vzorku. Upravený vzorek je vhodný pro analýzu GMO metodou PCR.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Etanol denaturovaný, 70%, pro čištění povrchů.
- 3 Dekontaminační roztok na čištění mlýnu, např. Instruzyme, Steridine. Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 4 Chlornan sodný, (0,5 – 1)% roztok, pro čištění povrchů.
Příprava: Do 1000ml odměrného válce se nalije 200 ml 5% roztoku chlornanu sodného (dodává se komerčně od ověřeného výrobce) a doplní se vodou na objem 1000 ml.
- 5 Detergent, např. Tween, Jar.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní mlýn nebo laboratorní šrotovník.
- 2 Počítačka semen, není podmínkou
- 3 Laboratorní váhy s přesností 0,01 g.
- 4 Horkovzdušná sušárna.
- 5 Vysavač.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu	Vydání	2
		60072.1 – Úprava a homogenizace vzorků osiv pro stanovení přítomnosti GMO metodou PCR	Revize

- 6 Latexové rukavice bezpudrové, alobal, buničitá vata, filtrační papír, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, sterilní zkumavky (přibližně 50ml), sterilní dózy na vzorky přibližně 1000ml, plastová miska vhodné velikosti pro homogenizaci vzorků.

5 Postup

Příprava mlýnku: Nádoby a nože se omyjí vodou (1) a ponoří se do dekontaminačního roztoku (3) podle návodu. Potom se opět opláchnou vodou (1) a vysuší 20 min v horkovzdušné sušárně při 100 °C. Poté se nechají vychladnout na laboratorní teplotu.

Mořené i nemořené osivo se před mletím důkladně promyje vlažnou vodou (1) s přídavkem detergentu (5). Poté se nechá uschnout na archu filtračního papíru na vzduchu nebo v sušárně při teplotě pod 40 °C tak, aby se zabránilo případné kontaminaci vzorku. Pokud jsou ve vzorku přítomna cizí semena, odstraní se.

Pro analýzu se použije zkušební vzorek o velikosti 3000 semen. Pokud se použije jiná velikost vzorku, je to uvedeno v poznámce na protokolu. Zkušební vzorek se vydělí buď za použití počítačky semen, nebo jiným vhodným způsobem. Například se odpočítá do vhodné sterilní nádoby 100 semen, ta se zváží s přesností na 0,01 g. Tato hmotnost se vynásobí 30 × a takto velký zkušební vzorek se odebere a použije pro analýzu.

Pokud dodaný vzorek výrazně (násobně) převyšuje požadovanou velikost zkušební vzorku pro analýzu, dodaný vzorek se v plastové misce důkladně promíchá a kvartací se zmenší. Ze získaného podílu původního vzorku se následně odpočítá do vhodné sterilní nádoby 100 semen a ta se zváží s přesností na 0,01 g. Tato hmotnost se vynásobí 30 × a takto velký zkušební vzorek se odebere a použije pro analýzu.


Zbytek původního dodaného vzorku se uchovává ve sterilních uzavíratelných dózách při laboratorní teplotě nebo jinak podle charakteru vzorku.

Zkušební vzorek osiva (3000 semen) se mele ve vhodném typu mlýnku (laboratorní drtič, nožový mlýn). Doba mletí a rychlost rotace se uzpůsobí množství a povaze vzorku. Je nutné dbát na to, aby se vzorek při mletí nezahřál nad 40 °C a nedošlo ke znehodnocení DNA.

Z takto zhomogenizovaného zkušební vzorku se odebere část do sterilní 50ml zkumavky. Odebírá se asi do poloviny objemu zkumavky, aby bylo možné vzorek promíchat a bezpečně s ním manipulovat. Z této 50ml zkumavky se odebírají části vzorku do sterilních 2ml zkumavek. Naváží se dvě paralelní navážky v množství, které odpovídá zvolenému extrakčnímu postupu. Tyto paralelní navážky se použijí k izolaci DNA.

Zbytek vzorku v 50ml zkumavce se uchovává pro případ opakování analýzy při laboratorní teplotě nebo jinak podle charakteru vzorku.

Zbývá větší část zkušební vzorku se uchovává ve sterilních uzavíratelných dózách při laboratorní teplotě nebo jinak podle charakteru vzorku.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu 60072.1 – Úprava a homogenizace vzorků osiv pro stanovení přítomnosti GMO metodou PCR	Vydání	2
		Revize	0

Po ukončení mletí se nádoby a nože omyjí vodou (1) a ponoří se do dekontaminačního roztoku (3). Potom se opět opláchnou vodou (1) a vysuší 20 min v horkovzdušné sušárně při 100 °C. Poté se nechají vychladnout na laboratorní teplotu.

6 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 21571, Potraviny – Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny. ÚNMZ, 2007.
- 2 Uživatelský manuál k přístroji Maxi Grinder Solo.
- 3 Seed testing convergence, Výstup z Regulatory Committee of Directive 2001/18/EC held on 4 June 2020.