

# VÝVOJ DNA ČIPŮ PRO DETEKCI GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ

*Lucie Vištejnová<sup>2</sup>, Jan Hodek<sup>1</sup>, Patrik Sekerka<sup>2</sup>, Jaroslava Ovesná<sup>1</sup>, Kateřina Demnerová<sup>2</sup>*

1. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
2. Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

E-mail: [eroc@centrum.cz](mailto:eroc@centrum.cz)

## Úvod

DNA čipy představují v dnešní době nový analytický nástroj v oblasti molekulární biologie a genetiky<sup>1</sup>. Jejich hlavním přínosem je možnost detekovat velké množství různých DNA sekvencí v jednom pokusu. Současné běžně používané metody detekce DNA (polymerázová řetězová reakce (PCR)) umožňují stanovení jedné nebo několika DNA sekvencí v jednom experimentu, což může činit problémy v rutinních laboratorních provozech, kde se klade důraz na rychlé získání výsledků.

Pěstování geneticky modifikovaných organismů (GMOs) se stává nedílnou součástí zemědělství mnoha států světa a s tím rostou i požadavky na rychlou a spolehlivou metodu, která by umožňovala snadné a levné sledování výskytu GMOs v rostlinách a rostlinných produktech. Současnou používanou detekční metodou je PCR<sup>2</sup>. Tato metoda nachází uplatnění ve většině referenčních laboratoří, ale její nevýhodou je nutnost provádět jednu reakci na jeden hledaný gen.

DNA čip je malá pevná podložka, na níž jsou imobilizovány různé DNA sekvence. Každá DNA sekvence odpovídá jednomu hledanému genu. Funkce DNA čipu je založena na hybridizaci imobilizované DNA s DNA z analyzovaného vzorku na základě komplementarity. Analyzovaná DNA musí být předem naznačena (fluorescenční barvy, biotin, radioaktivní značky). Po hybridizaci následuje získávání dat, jejich vyhodnocování a interpretace.

Cílem naší práce je vyzkoušet funkci připravených DNA čipů. Najít vhodné hybridizační podmínky a navrhnout tuto metodu jako vhodnou pro detekci geneticky modifikovaných organismů.

## Experimentální část

Detekce genetických modifikací v rostlinách je založena průkazu vneseného cizího genu, tzv. transgenu<sup>3</sup>. Tab.1 představuje seznam všech genů, které jsou zahrnuty do našeho

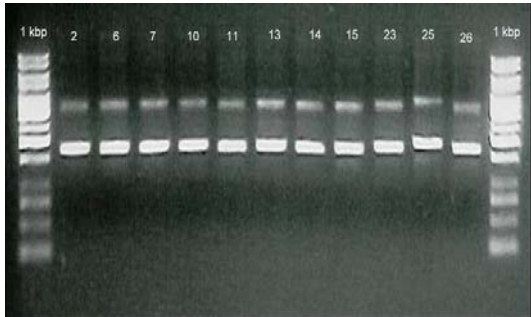
detekčního systému. Jsou mezi nimi vnitřní geny rostlin kukuřice, sóji, řepky a brambor, dále konkrétní transgeny a jejich promotory a terminátory. Geny byly izolovány z rostlinného materiálu pomocí PCR se specifickými primery a byly vloženy do plasmidového vektoru pUC18. Každému genu odpovídal jeden vektor. Vektor byl následně vnesen do kompetentních buněk *Escherichia coli*. Buněčné kultury jsou uchovávány v mrazáku v -80°C a slouží jako zásobárna hledaných genů.

**Tab.1:** Seznam hledaných genů

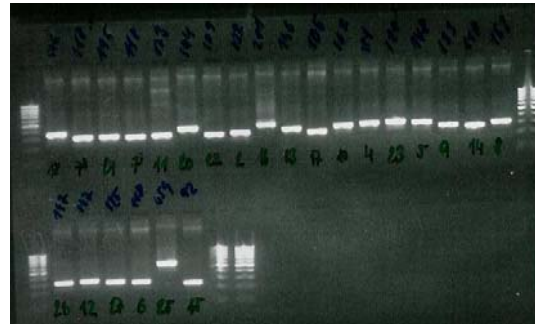
Vnitřní geny	Promotory,terminátory	Transgeny
Invertáza	35S_inhouse	MON 810_3
Lektin_inhouse	35S_1	Bt_176_3
Lektin_1	35S_2	Bt_11_3
Lektin_2	NOS_inhouse	Liberty Link_3
Lektin_3	NOS_1	MON 810_inhouse
Patatin		RounupReady_inhouse
Napin		RoundupReady_3
		NPT II
		PBS BAR
		CRY
		PAT BAR

Pro výrobu DNA čipu byly použity křemenná skla s amino skupinou na povrchu, která slouží k navázání DNA sekvence. DNA sekvence byly připraveny následujícím způsobem. Z narostlé buněčné kultury (LB médium, 16 hod, 37°C) byly pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit od firmy Roche vyizolovány plasmidy nesoucí hledané geny. Kontrola vyizolované plasmidové DNA byla provedena pomocí gelové elektroforézy (obr.1). Plasmidová DNA byla použita do PCR reakce, jejímž produktem byly DNA sekvence dlouhé přibližně 300 párů bází, které obsahovaly sekvence hledaných genů. PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu High Pure PCR Purification Kit od firmy Roche. Kontrola získaných PCR produktů byla provedena opět pomocí gelové elektroforézy (obr. 2). PCR produkty byly společně s plasmidovou DNA nanášeny na sklo. Koncentrace nanášených PCR produktů byla 350 – 550 ng/μl, koncentrace nanášené plasmidové DNA byla 0,8 – 1,2 μg/μl. Tisk DNA sekvencí na sklo probíhal ve stanici *MicroGrid Compact*, *Biorobotics*. Kovalentní vazby mezi

DNA sekvencí a amino skupinou byly posíleny sonikací o energii 250 mJ a volné reaktivní skupiny na povrchu skla byly vysyceny prehybridizačním roztokem o složení - 5x SSC, 0,1% SDS, 10 mg/ml BSA.



**Obr.1:** Gelová elektroforéza izolovaných plasmidů  
(0,8% agarózový gel, 55 V, 50 min, 1  $\mu$ l DNA)



**Obr.2:** Gelová elektroforéza PCR produktů  
(2% agarózový gel, 60 V, 50 min, 4  $\mu$ l DNA)

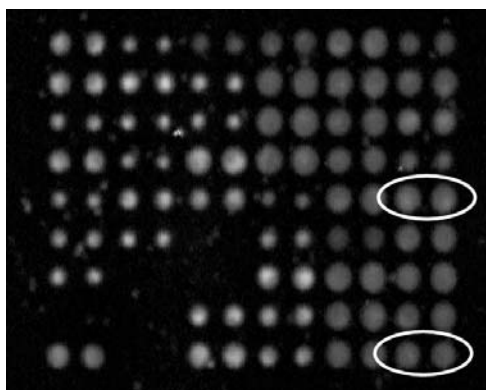
V prvních experimentech byla ověřována správná funkce DNA čipů. K hybridizaci byly vybrány dvě DNA sekvence, gen pro lektin\_inhouse a gen pro promotor 35S\_inhouse, stejné, jako byly imobilizovány na skle. Geny byly získány z bakteriální kultury stejným postupem jako při přípravě na tisk skla. Gen pro lektin byl naznačen fluorescenční barvou cyanin-5 a gen pro 35S promotor byl naznačen fluorescenční barvou cyanin-3 (ASAP RNA Labeling Kit, Micromax). Obě značené DNA sekvence byly zakoncentrovány na objem 2  $\mu$ l, smíchány a bylo přidáno 16  $\mu$ l hybridizačního pufru. Směs byla nanášena na sklo a hybridizace byly provedeny v hybridizační komůrce (Takara) ve vodní lázni po dobu 16 hodin při teplotách 42, 55 a 65°C. Po proběhnutí hybridizace se povrch čipů snímal laserovým skenerem GeneTAC UC 4x4 Genomic Solution s excitací při 550 nm (Cy-3) a 650 nm (Cy-5). Nasnímané obrazy skel byly zpracovány programem GeneTAC Integrator.

## Výsledky a diskuse

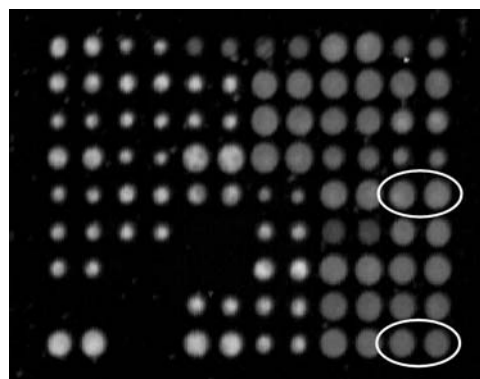
Naším cílem bylo vyzkoušet funkci připravených DNA čipů a najít vhodné hybridizační podmínky. Hlavní parametry ovlivňující průběh hybridizace jsou teplota hybridizace, složení hybridizačního pufru, čas hybridizace a množství DNA v analyzovaném vzorku.

Hybridizace byly prováděny za různých podmínek. Požadované teploty byly zajišťovány vodní lázní, reakce probíhaly při 42, 55 a 65°C. Bylo vyzkoušeno pět druhů hybridizačních pufrů – jeden od firmy ArrayIT a čtyři od firmy Ambion. Doba hybridizace byla vždy stejná, 16 hodin. Koncentrace DNA v analyzovaném vzorku byla 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

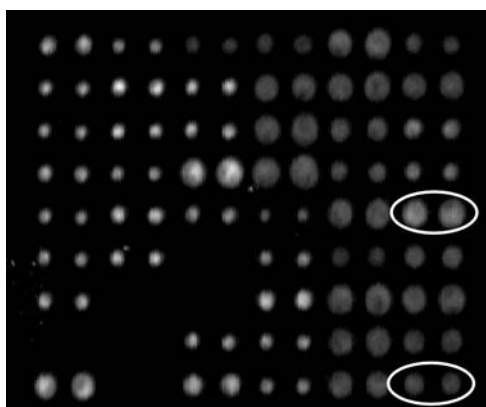
První výsledky (obr.3-8) ukazují, že hybridizace neproběhla podle předpokladů. V analyzovaném vzorku byly přítomny pouze dvě různé DNA sekvence, které by měly poskytovat signály v pozicích, kde byly imobilizovány geny pro lektin a 35S promotor (bíle označeno). V ostatních bodech jsou imobilizovány jiné DNA sekvence a na ně by se DNA ze vzorku neměla vázat vůbec a nebo s mnohem menší intenzitou.



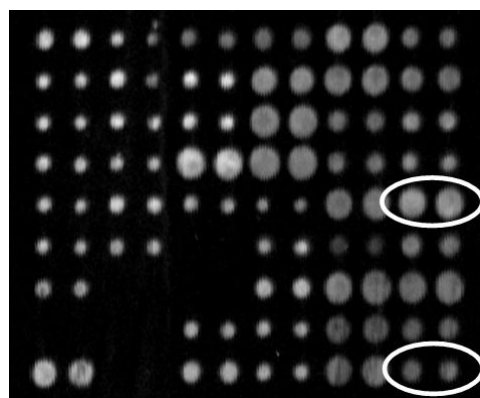
**Obr.3:** Ambion\_1, 55°C



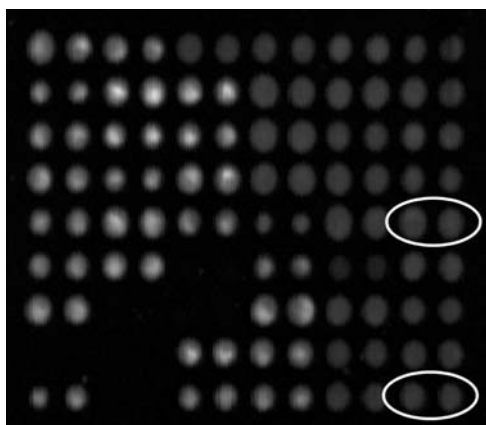
**Obr.4:** Ambion\_2, 55°C



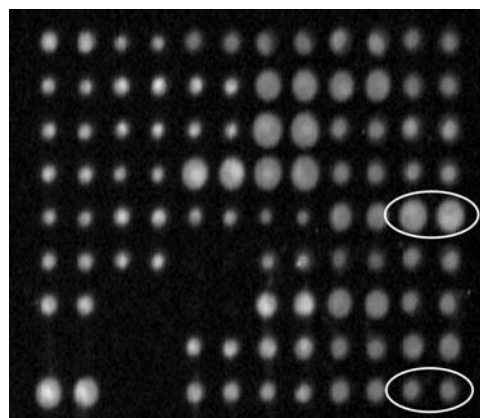
**Obr.5:** Ambion\_3\_55°C



**Obr.6:** Ambion\_4\_55°C



**Obr.7:** ArrayIT\_65°C



**Obr.8:** ArrayIT\_42°C

Ze současných obrazových analýz skel jsme vybrali jako vhodný hybridizační pufr číslo 2 od firmy Ambion a teplotu hybridizace 55°C. Tato teplota byla použita při hybridizaci PCR produktů i v jiné studii<sup>4</sup>. Při těchto podmínkách byly minimální nespecifické vazby v pozadí a plochy s DNA měly nejlepší kvalitu.

Vazby DNA na všechny pozice na skle jsou pravděpodobně zapříčiněny vysokou koncentrací DNA v analyzovaném vzorku a dlouhou dobou hybridizace. Další možnou příčinou můžou být samotné DNA sekvence, se kterou jsou pokusy prováděny. Všechny PCR produkty i plasmidová DNA nanesené na skle, obsahují dva úseky, které jsou přítomny i v DNA z analyzovaného vzorku. Jsou to úseky dohromady dlouhé 170 párů bází, které slouží jako místa pro nasednutí primerů v PCR reakci.

### **Závěr**

Zatím se nám podařilo najít vhodný hybridizační pufr a hybridizační teplotu. Další experimenty budou zaměřeny na odstranění nespecifického vázání DNA na čipy. Kromě hledání vhodné koncentrace DNA v analyzovaném vzorku se bude zkoušet nová forma DNA, která bude nanášena na sklo. Jednalo by se o produkty PCR, kde by se použily jiné primery, které by nasedaly přímo na vložené geny. Další možností budou syntetizované oligonukleotidy, DNA sekvence dlouhé 20 párů bází, které jsou specifické pro každý hledaný gen zvlášť. Pozornost bude zaměřena i na nové způsoby značení DNA.

*Tento výzkum je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.*

*IP05O54 COST*

### **Literatura**

1. Lamartine J.: Mater. Sci. Eng., C. 354-359, 26 (2006).
2. Deisingh A.K., Badrie N.: Food Res. Int. 639-649, 38 (2005).
3. Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E.J., Marvin H.J.P., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J.P.P.F., Zagon J.: Food Chem. Toxicol. 1157-1180, 42 (2004).
4. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., Wen J, Zhu S., Li Y.: Biosens. Bioelectron. 71-77, 22 (2006).