



Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.

Agrotest fyto, s.r.o.

CHARAKTERIZACE GENOTYPŮ OVSA S VYUŽITÍM ELEKTROFORÉZY AVENINŮ V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (A-PAGE)

Metodika



Kroměříž, 2010

I. Poliřenská, L. Nedomová, S. Cupák

CHARAKTERIZACE GENOTYPŮ OVSA S VYUŽITÍM ELEKTROFORÉZY AVENINŮ V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (A-PAGE)

Dedikace

Metodika vznikla jako výsledek řešení projektu MZe 1G46065 “Zvýšení uživatelské hodnoty a efektivity práce s kolekcemi genetických zdrojů jarní pšenice, ovsa a ozimého ječmene“. V návaznosti na uvedený projekt byly při ověřování metodiky zpracovávány vzorky z řešení „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiverzity“.

© I. Poliřenská, L. Nedomová, S. Cupák

ISBN 978-80-904594-2-7 (Agrotest fyto, s.r.o.)

ISBN 978-80-86888-08-8 (Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.)

1 Cíl metodiky

Rostoucí význam genetických zdrojů v mezinárodním i národním měřítku klade stále vyšší požadavky na kvalitu vedení a hodnocení kolekcí. Vedle popisu hospodářsky důležitých znaků jednotlivých genotypů se stále častěji objevují požadavky na jejich charakterizaci, tedy na podchycení vlastností a znaků, které mohou posloužit k jednoznačné identifikaci jednotlivých položek. Elektroforéza zásobních bílkovin představuje jednu z možností této charakterizace. Podstata metodického přístupu vychází ze skutečnosti, že zásobní proteiny zrna jsou geneticky determinovány určitými lokusy, a tedy že nejsou závislé na vnějších podmínkách – ročníku, výživě a lokalitě. Vzhledem k tomu, že jsou polymorfní, mohou sloužit jako genetické bílkovinné markery pro identifikaci genotypů i pro stanovení jejich homogenity. Metoda A-PAGE využívá možnosti rozdělit zásobní bílkoviny podle molekulové hmotnosti a podle povahy povrchového náboje. Tím jsou vytvářeny jednotlivé zóny ve výsledném elektroforeogramu. Poloha a intenzita proteinových zón odpovídá genetické konstituci materiálu a je pro něj charakteristická. Získané výsledky jsou nezávislé na podmínkách pěstování vzorků. Tím se metoda stává ideálním nástrojem pro oblast verifikace odrůdy při kontrole produkce, šlechtění i výzkumu včetně genetických zdrojů.

V průběhu řešení projektu 1G46065 (Zvýšení uživatelské hodnoty a efektivity práce s kolekcemi genetických zdrojů jarní pšenice, ovsa a ozimého ječmene) byla otestována možnost využití elektroforézy aveninů (prolaminové frakce proteinů ovesného zrna) i globulinů. Na základě výsledků byla pro další hodnocení zvolena právě analýza aveninů, která u většiny v rámci v projektu analyzovaných genotypů ovsa vzorků poskytla jednoznačné rozlišení. Jde o metodu relativně jednoduchou a nenáročnou, která je proveditelná v řadě laboratoří, výsledky lze jednoduše uchovávat a archivovat v závislosti na vybavení konkrétního pracoviště.

Cílem zpracování této metodiky bylo vypracovat a popsat pracovní postup provedení elektroforézy zásobních bílkovin ovsa a možnosti jejího využití k charakterizaci genotypů, k ověření pravosti materiálů a jejich čistoty. V průběhu vypracovávání metodiky byly uvedené postupy využívány jednak k získání charakteristik vybraných materiálů z kolekce genetických zdrojů, ale také k informativnímu ověření pravosti a čistoty vzorků získaných z praxe a využívaných při řešení dalších výzkumných projektů.

Metodika zpřístupňuje ověřený pracovní postup dalším laboratořím a pracovištím, pro které je důležité znát originalnost a čistotu zpracovávaného nebo hodnoceného materiálu.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Podstata postupu

Metodika určuje postup elektroforetického stanovení prolaminových bílkovin (aveninů) ovsa metodou vertikální elektroforézy v deskách polyakrylamidového gelu. Část zásobních bílkovin rozpustných v 25 % vodném roztoku 2-chlorethanolu se po extrakci z endospermu zrna podrobí elektroforetické separaci při pH 3,2 při stabilizovaném napětí a tomu odpovídajícímu stejnosměrnému proudu, který během dělení klesá od dvou do asi jednoho mA.cm⁻². Tím se zásobní bílkoviny rozdělí podle molekulové hmotnosti a podle povahy povrchového náboje. Poloha a intenzita proteinových zón v elektroforeogramu odpovídá genetické konstituci materiálu a je pro něj charakteristická. Metoda vychází ze standardní referenční metody doporučené organizací ISTA (International Seed Testing Association) (ISTA, Draper 1987) pro identifikaci odrůd pšenice a ječmene pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Tato metoda je předmětem ČSN 461085-2. Pšenice obecná a ječmen – Stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty – Část 2: Elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE).

2.2 Vzorčky

Popsanou metodou mohou být hodnoceny vzorky z pěstitelské praxe, získané v polních pokusech i z kolekce genetických zdrojů. Pro charakterizaci genotypů z kolekce genetických zdrojů a pro ověření homogenity materiálu je obvykle analyzováno minimálně 100 zrn. Pro ověření pravosti materiálu (odrůdy) může postačovat menší počet zrn (15-20). Spektra zrn testovaného materiálu jsou v takovém případě vizuálně porovnávána s etalonovým spektrem dané odrůdy, analyzované společně s testovaným vzorkem nebo s etalonovými spektry uloženými v databázi (katalogu).

Při tvorbě databáze etalonových spekter (referenčních elektroforeogramů) nebo zajišťování vzorku odrůdy pro ověření pravosti testovaného materiálu je nutno vycházet ze vzorků se zajištěnou originalitou – původní vzorky od šlechtitele nebo originální obdržené vzorky z kolekce genetických zdrojů. Výhodou je možnost využití i vzorků neklíčivých ze zásoby originálních osiv.

2.3 Přístroje a pomůcky

Nástroj pro drcení zrna – kladívko nebo mlýnek, na kterém je možno pomlet jednotlivá zrna
Zařízení pro vertikální deskovou elektroforézu se zdrojem napájení (možnost nastavení konstantního napětí v rozsahu min. 100 – 300V) a možností chlazení.

Magnetické míchadlo

Frigostat s vnějším okruhem chlazení

Třepačka Vortex

Laboratorní odstředivka s odstředivým zrychlením 4500 g s velkokapacitním rotorem pro polypropylenové zkumavky na 1,5 až 2,0 ml

Mikrostříkačka Hamilton pro dávkování vzorků, pipety pro odměřování chemikálií, chladnička, laboratorní odměrné sklo, laboratorní váhy, běžné laboratorní vybavení, osobní ochranné pracovní prostředky (rouška, rukavice).

2.4 Chemikálie a roztoky

Všechny chemikálie stupně p.a. nebo vyšší, pokud není uvedeno jinak.

Zásobní roztok polyakrylamidu pro přípravu gelu:

Na přípravu 500 ml zásobního roztoku:

- 50 g akrylamidu,
- 2 g bisakrylamidu,
- 30 g močoviny,
- 0,5 g kyseliny askorbové,
- 0,5 g glycinu,
- 10 ml kyseliny octové ledové.

K naváženým chemikáliím se přidá cca 400 ml destilované vody, zamíchá magnetickým míchadlem, přefiltruje a doplní destilovanou vodou do objemu 500 ml. Takto připravený roztok se skladuje v chladničce, kde je při teplotě 4 až 8°C stabilní min. 1 měsíc.

Roztok síranu železnatého:

Naváží se 0,5 g síranu železnatého a doplní se do objemu 40 ml destilovanou vodou, přidá se 5 kapek kyseliny sírové.

Roztok peroxodisíranu amonného (APS):

Připravuje se 10% roztok: 0,25 g peroxodisíranu amonného se rozpustí ve vodě a doplní vodou do 2,5 ml (voda čistoty pro HPLC).

Extrakční roztok:

K 25 ml chloretanolu se přidá 50 ml vody a 50 mg pyroninu G (nebo pyroninu Y), po rozpuštění za stálého míchání se doplní vodou do 100 ml.

Elektrodový pufr:

2,4 g glycinu a 24 ml kyseliny ledové octové se doplní do celkového objemu 6 l destilovanou vodou, množství se volí podle typu zařízení pro elektroforézu.

Barvicí roztoky:

Barvicí roztok A: 100 g kyseliny trichloroctové (TCA) se doplní destilovanou vodou do objemu 1000 ml

Barvicí roztok B: 1 g Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 a G-250 v poměru 1:1 ve 100 ml etanolu se míchá do rozpuštění barviva, cca 60 minut.

Fixační roztok:

2% glycerol: 20 ml glycerolu se doplní do objemu 1000 ml destilovanou vodou.

2.5 Pracovní postup

2.5.1 Příprava gelu

Připraví se suchá a čistá skla, sestavená na základě návodu podle typu zařízení. Doporučená tloušťka gelu je 1 mm.

Uváděná množství roztoků jsou vypočtena pro zařízení FISCHER MAXI 20-DUAL COOLED s rozměry skel 200x200mm a šířce mezerníků 2 cm při tloušťce gelu 1mm.

Pro přípravu gelu použijeme: 50 ml zásobního roztoku polyakrylamidu,

300 μ l roztoku síranu železnatého

120 μ l roztoku APS,

150 μ l TEMEDu (NNN'N' tetramethylethyldiamin).

Za průběžného míchání se do 50 ml zásobního roztoku polyakrylamidu přidá 300 μ l roztoku síranu železnatého, následně se přidá 120 μ l roztoku APS a rychle, s co nejmenší časovou prodlevou (protože gel snadno polymeruje) 150 μ l TEMEDu (katalyzátor reakce). Takto připravený roztok se nalije mezi sestavená skla, vloží hřeben pro vytvoření jamek (k uvedenému typu aparatury 24 jamkový) a gel se nechá minimálně 10 minut polymerovat. Je možno připravit gel předcházející den a nechat jej do upotřebení následujícího dne v chladničce.

2.5.2 Příprava vzorku, extrakce aveninů

Pro analýzu se použijí náhodně vybraná zrna z analyzovaného vzorku ovsa. Analyzují se jednotlivá zrna, tj. jedno zrno=jedna elektroforetická dráha). Pluchatá zrna se oloupou, bezpluchá použijí bez úpravy. Zrno se zváží, pomele nebo podrtí (např. kladívkem mezi listy hladkého papíru), drť se jednotlivě přemístí do malých polypropylenových kyvet o objemu 1,5 až 2,0 ml a přidá se příslušné množství extrakčního roztoku. Extrakční roztok je dávkován na základě hmotnosti jednotlivých zrn, na 40 mg vzorku 1 ml extrakčního činidla. Vzorek se důkladně promíchá na třepače Vortex po dobu 2 hodin a nechá v uzavřené kyvetě přes noc v chladničce při teplotě 4-8°C. Následně se směs odstředí při 1500 ot/min po dobu 5 minut a supernatant se použije k elektroforéze.

2.5.3 Elektroforéza

Po zpolymerování gelu mezi skly se hřeben vytáhne a vytvořené prohlubně se promyjí elektrodoým pufrem, jeho přebytky se odsají pipetou. Dolní nádoba aparatury se naplní elektrodoým pufrem v množství, které odpovídá danému typu aparatury. Zapne se chlazení.

Vzorky se nanášejí mikropipetou v množství 15 až 25 µl opatrným podvrstvením, přičemž je vhodné označit výchozí stranu. Vzhledem ke kyselému prostředí se polarita nastaví obráceně, tedy anoda na katodu a katoda na anodu. Vlastní elektroforéza probíhá nejprve při napětí 100 V po dobu 1 hodiny, dále pak při 300 V. Doba trvání elektroforézy se rovná době běhu barevného markeru Pyronin G plus 25 minut. Teplota elektrodového pufru se udržuje pomocí chladicí jednotky na 8 °C.

2.5.4 Fixace, barvení, sušení

Do skleněné misky se naleje 10 ml barvicího roztoku B a doplní do 200 ml barvicím roztokem A . Sklo s gelem se vyjme z elektroforetické aparatury a gel se přenese do misky s barvicí lázní. Barvení probíhá do druhého dne, cca 20 hodin. Pak se gel promyje v destilované vodě (cca 10 minut) a na 1 hodinu se ponoří do 2% roztoku glycerolu. Roztokem glycerolu je vhodné nechat nasáknout i celofán. Po vyjmutí z glycerolu se gel vloží mezi dva celofánové přířezy vhodné velikosti a napne na skleněné desky. Suší se pomalu při laboratorní teplotě, doba sušení je přibližně dva, ale i více dní.

2.6 Hodnocení

Hodnocení se provádí na základě polohy jednotlivých zón (proužků) v elektroforeogramu a intenzity zbarvení těchto zón. Poloha zón je charakterizována relativní elektroforetickou mobilitou (REM), která udává poměr vzdálenosti dané zóny od začátku gelu k celkové délce gelu, a relativní intenzitou zbarvení (RIB) (stupnice 1 – 5). Hodnocení je možno provádět vizuálně nebo pomocí počítačové denzitometrie. Vzájemné porovnání jednotlivých gelů např. při hodnocení sérií genotypů umožňuje zařazení vhodně zvoleného referenčního genotypu do určitého počtu drah každého gelu. Jsou tak eliminovány rozdíly vzniklé případnými rozdíly v podmínkách při provádění jednotlivých analýz.

Při základní charakterizaci materiálu je hodnocena shodnost jednotlivých elektroforeogramů a počet přítomných linií. U moderních odrůd je ve většině případů zjištěna jedna linie, u starších materiálů je možno nalézt dvě i více linií s různým podílem zastoupení. Jedná se např. krajové odrůdy nebo sběrové materiály. V jednotlivých skupinách s identickými spektry se sečtou obilky a dále se sečte celkový počet hodnocených obilek. Je vyhodnocen počet zrn genotypu příslušné linie a zastoupení linie je vyjádřeno v procentech. U elektroforeogramů jednotlivých linií pak sledujeme počet jednotlivých zón, jejich REM a RIB. Pro hodnocení stupně podobnosti mezi jednotlivými spektry je možné využít např. index identity nebo Diceho podobnostní koeficient, v závislosti na dostupném programovém vybavení pracoviště.

Při využití elektroforezy pro ověření odrůdové pravosti jsou získaná spektra zrn analyzovaného vzorku porovnávána s etalonovým spektrem dané odrůdy, analyzované společně s testovaným vzorkem nebo s etalonovými spektry uloženými v databázi (katalogu). Postup vyhodnocení je v tomto případě u ovesa shodný jako u jiných obilovin a je možno použít např. postup uvedený v ČSN 46 1085-2.

2.7 Uložení výsledků

Získané gely s elektroforeogramy lze usušené poměrně dobře skladovat a v případě potřeby využít ke srovnání. Gely lze počítačově zpracovat a uchovávat také v elektronické podobě, např. skenované.

2.8 Bezpečnost práce

Při práci se všemi chemickými látkami je nutno dodržovat pokyny stanovené v bezpečnostních listech a používat předepsané ochranné osobní pracovní pomůcky.

Níže uvedené chemické látky používané při stanovení mají tyto symboly nebezpečí:

Akrylamid – bílá krystalická látka rozpustná ve vodě, symbol nebezpečí **T**

N,N'-Methylenbisakrylamid – látka bílé barvy rozpustná ve vodě, symbol nebezpečí **Xn**

Peroxodisíran amonný – látka bílé barvy rozpustná ve vodě, symboly nebezpečí **Xn, O**

TEMED – bezbarvá kapalina, symboly nebezpečí **Xn, N**

Kyselina trichloroctová - bílá krystalická látka rozpustná ve vodě, symboly nebezpečí **N, C**

Kyselina octová – bezbarvá kapalina, symbol nebezpečí **C**

2-Merkaptoethanol – bezbarvá kapalina, symboly nebezpečí **T,N**

2-Chlorethanol – bezbarvá kapalina, symbol nebezpečí **T+**

T+	vysoce toxický
T	toxický
Xn	zdraví škodlivý
C	žíravý
O	oxidující
N	nebezpečný pro životní prostředí

3. Srovnání „novosti postupů“

Při vypracovávání předkládaného metodického postupu řešitelé vycházeli z normy ČSN 461085-2 a další uvedené literatury. Norma popisuje stanovení odrůdové pravosti a čistoty u pšenice a ječmene. Vzhledem k odlišnosti zásobních bílkovin ovsa bylo nutno metodu modifikovat tak, aby postup byl využitelný pro elektroforetické dělení aveninů. Dosud nebyla metodika vhodná pro elektroforetickou separaci aveninů k dispozici.

V průběhu řešení projektu a v návaznosti na něj vznikla databáze elektroforeogramů odrůd ovsa pěstovaných v současné době v České republice, která je využívána při ověřování pravosti odrůd ve vzorcích z pěstitelské praxe.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Tato metodika vznikla na pracovišti Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. ve spolupráci s laboratoří Agrotestu fyto, s.r.o. a její zpracování vyšlo z potřeby zhodnotit stav vybraných položek domácího původu v kolekci ovsa. Vypracovaný postup ale může být využíván vedle charakterizace položek ovsa z kolekce genetických zdrojů, také velmi dobře ke stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty ovsa. Aplikací metodiky je např. možno určit, zda odrůda ovsa odpovídá deklarované odrůdě, je možno řešit podezření na záměnu dvou nebo více odrůd nebo určit čistotu/homogenitu osiva. Metodiku mohou využívat šlechtitelé ovsa, množitelé, pěstitelé i zpracovatelé.

5. Seznam použité související literatury

ČSN 46 1085-2 Pšenice obecná a ječmen - Stanovení odrůdové pravosti a odrůdové čistoty - Část 2: Elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Praha, ČNI 1998: 12 s.

Draper, S.R.: ISTA variety committee report of the working group for biochemical test for cultivar identification 1983-1986. *Seed Sci. & Technol.*, 15, 1987 (2): 431-434.

Dvořáček, V. Čurn, V. Moudrý, J.: Suitability of oat-seed storage-protein markers for identification of cultivars in braun and mixed flour simplex. *Plant Soil Environ.*, 49, 2003 (11): 486-491.

Třeřová, E. Longauer, I. Žák, I. Kraic, J.: Electrophoretic Distinguishing of Cultivated Oats (*Avena sativa* L.) by Seed Storage Proteins. *Rostlinná výroba*, 42, 1996 (4): 169-172.

6. Seznam publikací a výstupů, které předcházely metodice

Polišenská, I. Gregová, E. Nedomová, L.: Charakterizace odrůd ovsa registrovaných v České republice elektroforetickou separací zásobních proteinů. Hodnotenie genetických zdrojov rastlín. Zborník zo 4. odborného seminára s medzinárodnou účasťou 25. - 26. máj 2005. Piešťany, VÚRV, 2005: 201-202.

Databáze charakteristik bílkovinných markerů u vybraných genotypů ovsa – k dispozici na řešitelském pracovišti.

7. Autoři

RNDr. Ivana Polišínská, Ph.D., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

Ing. Lenka Nedomová, Ph.D., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

Stanislav Cupák, DiS., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

8. Oponenti

1) Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno.

2) Ing. Ivan Branžovský, CSc., MZe, odbor rostlinných komodit, Těšnov 17, 117 05 Praha 1