



FUNKČNÍ VZOREK

**Technické řešení: Postup přípravy nukleové kyseliny
v kvalitě vhodné pro stanovení přítomnosti a kvantity
virů v chovech hmyzu**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

5111
2025

Funkční vzorek

5111/2025

**Technické řešení: Postup přípravy nukleové kyseliny v kvalitě vhodné pro
stanovení přítomnosti a kvantity virů v chovech hmyzu**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

2025

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QL24010336 Nové poznatky pro snižování rizik chovu hmyzu pro lidskou spotřebu z pohledu ekosystému, chovatele i konzumenta.

ISBN 978-80-7672-067-7

OBSAH

1.	Úvod	3
2.	Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3.	Popis funkčního vzorku	3
4.	Seznam použití literatury	7
5.	Srovnání novosti postupů	7
6.	Popis uplatnění funkčního vzorku	7
7.	Ekonomické aspekty	7
8.	Dedikace	8
9.	Příloha 1 (SOP)	9

1. Úvod

Chov hmyzu pro lidskou výživu či krmivářské účely je jedním ze slibných nástrojů pro alternativní produkci bílkovin. Oproti tradičním druhům hospodářských zvířat však nemáme dostatek informací o chorobách chovaných druhů hmyzu, zejména virového původu. Hmyz je stejně jako ostatní druhy zvířat napadán virovými patogeny, což vede ke vzniku značných ekonomických ztrát. V chovech jedlého hmyzu totiž dochází k přesunu z původního životního prostředí hmyzu do prostředí nového, uměle vytvořeného; a zároveň dochází k přesunu patogenních virů. Ve velkochovech následně dochází k přenosu a propuknutí virózy mnohem snadněji než v přirozeném životním prostředí hmyzu. To je podmíněno mnoha faktory, jako jsou teplota a relativní vlhkost, koncentrace oxidu uhličitého, výživa, hustota populace, přítomnost pesticidů, toxinů a těžkých kovů, případně koinfekce více potenciálními patogeny. Pro diagnostiku virových patogenů jedlého hmyzu je metodou volby využití polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje rychlou detekci cílových genů nebo jejich částí v genomu virů.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku je technické řešení izolace virové ribonukleové (RNA) a deoxyribonukleové (DNA) kyseliny z celého hmyzu v případě podezření z nákazy. DNA a RNA je získána ideálně z celých těl hmyzu; a v kvalitě vhodné pro provedení PCR, v případě RNA virů reverzní transkripce a následné PCR.

Tento protokol je používán jako standardní operační postup (SOP, viz Příloha č. 1) pro zpracování vzorků hmyzu a izolaci RNA a DNA v Laboratoři molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL.

3. Popis funkčního vzorku

Sběr a skladování vzorků

Pro izolaci nukleových kyselin z hmyzu lze využít živé i uhynulé jedince. Hmyz lze před zpracováním usmrtit zamrazením; nicméně transportovat je potřeba hmyz nejlépe živý ve vhodném obalu, v případě hmyzu uhynulého je potřeba použít prodyšný papírový obal, aby se předešlo rozvoji plísní. Pro uchování nezpracovaných vzorků je nutné použít hlubokomrazicí box (-80 °C).

Příprava homogenátu hmyzu

Pro homogenizaci se používá kuličkový homogenizátor umožňující homogenizaci v 50 ml zkumavkách se šroubovacím uzávěrem (např. *Omni Bead Ruptor Elite s rotorem pro 50 ml zkumavky*). Jako rozbíjecí částice jsou vhodné keramické kuličky o průměru 2,8 mm ve zkumavkách dodávaných výrobcem (např. *Hard Tissue Homogenizing Mix 2.8 mm Ceramic, 50 ml Tubes, Omni, kat. č. 19-6508-3*).

Homogenizace se provádí ve fyziologickém roztoku (např. *DPBS, Biosera, kat. č. LM-S2041/500*). Na 5 g hmotnosti hmyzu se přidává 30 ml DPBS. Hmotnost hmyzu závisí na druhu a vývojovém stádiu. Orientační údaje o hmotnosti nejběžnějších druhů jedlého hmyzu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Vlastní homogenizace probíhá dle návodu k daného homogenizátoru. V případě *Omni Elite* jsou použity následující parametry: rychlost 5 m/s, celkem 3 homogenizační cykly, délka trvání cyklu 30 s, pauza mezi cykly 20s.

Připravený homogenát lze rozdělit do alikvotů a dlouhodobě skladovat v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

Tabulka 1: Přibližná hmotnost jedlého hmyzu

Hmyz	Hmotnost
Saranče stěhovavá - dospělec	1,5-2 g
Cvrček domácí - dospělec	1-1,5 g
Potemník (moučný, stájový) - larva	0,1 g

Získaný homogenát hmyzu se použije pro extrakci nukleových kyselin. Vzhledem k univerzálnosti a vysoké kvalitě izolovaných nukleových kyselin se používá *TRI REAGENT® - DNA/RNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT* (Kat. č. *TR118, Molecular Research Center, Inc.*). Jedná se o červeně zbarvený roztok na bázi fenolu a guanidinium isothiokyanátu. Jeho výhodou je rychlá a efektivní inaktivace RNáz. Po smíchání se vzorkem a přidání bromochloropropanu a centrifugaci dojde k oddělení fází (horní bezbarvá vodná fáze obsahuje RNA, spodní červená organická fáze DNA, bílý proužek uprostřed obsahuje proteiny).

Při práci s TRI REAGENT® je potřeba používat ochranné pomůcky, zejména rukavice a ochranné brýle!

Extrakce RNA

- k 1 ml TRI REAGENT® přidat 100 µl homogenátu a promíchat na třepačce;
- inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k oddělení nukleoproteinového komplexu (pokud vzorek obsahuje hodně tuku, vytvoří se na hladině vrstva, kterou je nutno odstranit, v takovém případě čirý supernatant přepipetovat do nové mikrozkušavky);
- přidat 0,1 ml bromochloropropanu (*1-bromo-1-chloropropan*, např. *Sigma-Aldrich*, kat. č. *B9673*); promíchat po dobu 15 s na třepačce a nechat inkubovat 2 – 15 minut při pokojové teplotě;
- odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C; dojde k rozdělení směsi do tří barevně odlišených vrstev; RNA se nachází v horní bezbarvé (tj. vodné fázi); objemově se jedná zhruba o 60 % původně použitého objemu TRI REAGENT®;
- přemístit oddělenou vodnou fázi do čisté zkumavky; zbylou organickou (červenou) fázi a mezifázi uložit při +4 °C do dalšího zpracování;
- srážení RNA – k vodné fázi přidat 0,5 ml isopropanolu alespoň v kvalitě p.a. (např. *Isopropylalkohol pro molekulární biologii*, min 99,5 %, *P-Lab*, kat. č. *R.1HPK.1*); promíchat překlopením a nechat inkubovat 5 – 10 minut při pokojové teplotě;
- odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C; vytvoří se pelet vysrážené RNA na dně zkumavky;
- odstranit supernatant; k peletě přidat 1 ml 75 % ethanolu (např. *PCR Ethanol 75 %*, *Top-Bio*, kat.č. *P044*), promíchat krátkým protřepáním a odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C;
- opatrně odstranit supernatant překlopením, zbylé kapky otřít ze stěn zkumavky pomocí sterilního bavlněného tamponu (např. *Odběrový tampon bavlněný, plastová tyčinka, sterilní*, *Dispolab*, kat. č. *1673*) a vzorek sušit vzduchem 5 minut;
- k peletě přidat 100 µl vody pro PCR (např. *Ultra PCR H₂O*, *Top-Bio*, kat.č. *P240*), promíchat nasáváním špičkou a inkubovat 10 - 15 minut při 55 °C; následně krátce promíchat na třepačce, krátce odstředit a rozpuštěnou RNA uchovávat v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

Extrakce DNA

- nejprve je potřeba připravit **promývací roztok** (0,1 M citronan trisodný dihydrát, 10 % ethanol) smícháním 100 ml ultračisté vody (*např. Water, BPC Grade, Sigma-Aldrich, kat. č. W3513*), 2,941 g dihydrátu citronanu trisodného, (*např. Citric Acid Trisodium Salt Dihydrate, Amresco, Reagent Grade*) a 11,1 ml absolutního etanolu (*např. ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, P-Lab kat. č. E03501*). Roztok se sterilizuje filtrací přes 0,22 µm filtr a uchovává při +4 °C;
- postup extrakce DNA navazuje na protokol extrakce RNA v bodě, kdy po přidání bromochloropropanu dojde k rozdělení směsi do tří barevně odlišených fází a horní bezbarvá fáze je použita k izolaci RNA;
- je nutné zcela odstranit horní bezbarvou fázi, protože její zbytky mají negativní vliv na kvalitu DNA;
- k červené organické fázi (na ni se nachází bílá vrstvička proteinů, pokud je plánováno izolovat i celkový protein, tato vrstva se nesmí odstranit) přidat 300 µl absolutního etanolu (*např. ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, P-Lab, kat. č. E03501*), promíchat překlopením a inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě;
- odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C;
- odstranit supernatant, který lze použít v případě požadavku na izolaci proteinů;
- k peletě přidat 1 ml promývacího roztoku; inkubovat 30 minut při pokojové teplotě za občasného opatrného promíchání překlopením; odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C; a odstranit supernatant. **Tento krok opakovat celkem 3x**;
- přidat 1,5 ml 75 % etanolu (*např. PCR Ethanol 75 %, Top-Bio, kat.č. P044*), promíchat a inkubovat 15 minut při pokojové teplotě; v tomto kroku lze izolaci DNA přerušit a vzorky skladovat při +4 °C;
- odstředit po dobu 5 minut při 8 000 g a teplotě +4 °C;
- opatrně odstranit supernatant překlopením, zbylé kapky otřít ze stěn zkumavky pomocí sterilního bavlněného tamponu (*např. Odběrový tampon bavlněný, plastová tyčinka, sterilní, Dispolab, kat. č. 1673*) a vzorek sušit vzduchem 5 minut;
- pelet rozpustit v 200 µl TE pufru (*např. Tris-EDTA buffer solution, BioUltra, for molecular biology, pH 8, Fluka, kat. č. 93283-100ML*) a uchovávat při -20 °C.

4. Seznam použité literatury

Maciel-Vergara, G., and Ros, V.I.D. Viruses of insects reared for food and feed. J Invertebr Pathol 2017;147,60-75.

Prodělalová, J., Moutelíková, R., Straková, P., Čukanová, E. Infekční onemocnění hmyzu chovaného pro lidskou spotřebu. Veterinářství 2024;75(12), 684-688.

5. Srovnání novosti postupů

Postup izolace nukleových kyselin z druhů hmyzu určených pro lidskou spotřebu (tj. v současnosti se jedná o larvy potměníka moučného a stájového, saranče stěhovavé a cvrčka domácího) byl v Laboratoři molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL vyvinut na základě zkušeností v oblasti molekulární diagnostiky virových chorob včely medonosné. Využití extrakčního činidla TRI REAGENT® se u komplexních vzorků, jako je hmyz, velmi osvědčilo; kvalita izolovaných nukleových kyselin je vysoká a vhodná pro provedení PCR metod. Velkou výhodou je souběžná izolace DNA, RNA a případně i proteinů. Oproti izolaci nukleových kyselin ze včely medonosné není v případě jedlého hmyzu nutné je dále purifikovat.

6. Popis uplatnění funkčního vzorku

Technické řešení popsané ve funkčním vzorku může nalézt uplatnění v laboratořích zaměřených na detekci virů hmyzu.

Postup je v současnosti používán jako standardní operační postup (SOP) pro zpracování vzorků hmyzu a izolaci RNA a DNA v Laboratoři molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL.

7. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty funkčního vzorku nelze v danou chvíli hodnotit vzhledem k novosti tématu. Na postup extrakce nukleových kyselin z hmyzu nutně navazuje diagnostická PCR, která by mohla být využita chovateli v případě problémů v chovu hmyzu způsobených virovou infekcí.

8. Dedikace

Funkční vzorek je dedikován projektu QL24010336 „Nové poznatky pro snižování rizik chovu hmyzu pro lidskou spotřebu z pohledu ekosystému, chovatele i konzumenta“ v rámci programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ZEMĚ II.

Příloha č. 1

Standardní operační postup – izolace nukleových kyselin z jedlého a krmného hmyzu

1. K 1 ml TRI REAGENT® přidat 100 µl homogenátu, promíchat, inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
2. Přidat 100 µl bromochloropropanu, 15 s míchat na třepačce a inkubovat 2 – 15 minut při pokojové teplotě.
3. Odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při teplotě +4 °C. Dojde k rozdělení směsi do tří barevně odlišených vrstev. Horní bezbarvou (vodnou) fázi přemístit do nové mikrozkušavky; zbylou červenou (organickou) fázi i s bílou mezifází uložit při +4 °C k dalšímu zpracování.
4. Izolace RNA:
 - a. K vodné fázi přidat 500 µl isopropanolu, promíchat překlopením a inkubovat 5-10 minut při pokojové teplotě a odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C.
 - b. Opatrně slít supernatant, k peletě na dně zkumavky přidat 1 ml 75 % etanolu, promíchat krátkým protřepáním a odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C.
 - c. Opatrně slít supernatant, vysušit zbylé kapky na stěnách a sušit v otevřené zkumavce 5 minut. K peletě přidat 100 µl vody pro PCR, promíchat nasáváním špičkou a inkubovat 10 – 15 minut při 55 °C. Krátce promíchat na třepačce, krátce odstředit. Uchovávat v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.
5. Izolace DNA:
 - a. Z červené (organické) fáze odpipetovat veškeré zbytky bezbarvé (vodné) fáze. Přidat 300 µl absolutního etanolu, promíchat překlopením, inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě a odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C.
 - b. Odstranit supernatant, který lze zamrazit při -20 °C a použít pro izolaci proteinů.
 - c. Tento krok opakovat celkem **tříkrát**: K peletě přidat 1 ml promývacího roztoku, inkubovat 30 minut při pokojové teplotě za občasného promíchání překlopením, odstředit po dobu 5 minut při 2 000 g a teplotě +4 °C. Odstranit supernatant.
 - d. Přidat 1,5 ml 75 % etanolu, promíchat, inkubovat 15 minut při pokojové teplotě, odstředit po dobu 5 minut při 8 000 g a teplotě +4 °C.

- e. Opatrně slít supernatant, vysušit zbylé kapky na stěnách a sušit v otevřené zkumavce 5 minut. K peletě přidat 200 μ l TE pufru, rozpustit a uchovávat při -20 °C.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz