



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Lidská infekční onemocnění a genově manipulované organizmy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Tereza Koblihová

Vedoucí práce: RNDr. Štěpánka Šebestiánová Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Lidská infekční onemocnění a genově manipulované organizmy“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou Univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to, se zachováním autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným stanovení zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. 8. 2020

.....
Tereza Koblihová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Štěpánce Šebestiánové Ph.D. za věnovaný čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu molekulární biologie rostlin, především jeho ochotným zaměstnancům paní Ing. Janě Jehlíkové a panu Ing. Tomášovi Kocábkovi Ph.D. za poskytnutí materiálů a vzorků pro mou praktickou část, za odborné rady a za pomoc při analýze vzorků. Velké poděkování patří především mé rodině, která mě po celou dobu mého studia podporovala.

Lidská infekční onemocnění a genově manipulované organizmy

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zaměřuje na detekci transgenů v DNA geneticky modifikovaných plodin, a to především na detekci transgenů *nptII*, a dále na zjištění štěpného poměru (počtu kopií) vnesených transgenů do další generace.

Teoretická část této bakalářské práce obsahuje informace o bakteriích, neboť některé druhy jsou příčinou lidských infekčních onemocnění a přitom některé bakterie se využívají v genetickém inženýrství k transformaci rostlin. Onemocnění, které bakterie způsobují, se léčí antibiotiky, což jsou antimikrobní látky používané k zastavení růstu nebo usmrcení těchto mikroorganismů. Teoretická část zahrnuje především poznatky o antibiotikách a geneticky manipulovaných organizmech (GMO), s nimiž jsou spjaté obavy o použití selekčního genu *nptII* v konstruktu těchto organismů. Neboť tento markerový gen kóduje enzym *neomycin fosfotransferázu II*, který inaktivuje antibiotikum zvané kanamycin. Organismus obsahující tento gen je tak vůči tomuto antibiotiku rezistentní.

Cílem metodické části této práce bylo vypěstování vlastních geneticky modifikovaných rostlin nesoucích uměle vložené geny pro rezistenci vůči kanamycinu (*nptII*) a signální gen *GUS*, a následné stanovení přítomnosti genu *nptII* ve vzorcích z těchto rostlin. Ke stanovení genu *nptII* v transgenních rostlinách bylo nejdříve zapotřebí namnožení DNA úseku obsahující tento gen, což bylo provedeno pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a poté byla provedena jeho detekce ve vzorku pomocí gelové elektroforézy. Pro detekci přítomnosti genu *nptII* v rostlinných vzorcích a k potvrzení transformace byl použit také histochemický test. Jako modelový organizmus byl zvolen tabák virginský (*Nicotiana tabacum*), který byl transformován pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.

Klíčová slova

GMO; *nptII*; kanamycin; PCR; elektroforéza; histochemický test; *Agrobacterium tumefaciens*

Human infectious diseases and gene manipulated organisms

Abstract

This bachelor thesis is focused on the detection of the transgenes in DNA of the genetically modified plants, especially on the detection of the transgene *nptII*. Moreover, it will discuss the determinations of the fission ratio (the amount of copies) of the injected transgenes into the next generation.

The theoretical part of this bachelor thesis includes information about bacteria because some of their kinds are the reasons of human infection diseases, however, couple of them are used in genetic engineering for plant transformation at the same time. The diseases which are caused by bacteria are cured by antibiotics. Antibiotics are antimicrobial substances which are used to stop the growth of or exterminate these microorganisms. The theoretical part is especially focused on findings related to antibiotics and gene manipulated organisms (GMO). They are related to the concerns about using the selective gene *nptII* in the construct of these organisms, because this gene codes enzyme *neomycin phosphotransferase II*, which deactivates the effects of the Antibiotic called kanamycin. Organisms, where this gene is included are getting resistant to these antibiotics.

The aim of the methodical part was the cultivation of own genetic modified plants carrying artificially injected genes for the resistance to kanamycin (*nptII*) and the signal gene GUS. Furthermore, we were looking for the subsequent determination of presence of the gene *nptII* in the samples from these plants. The first necessary step to the determination of the gene *nptII* in the transgenic plants was multiplying of the DNA section containing this gene. That was accomplished by Polymerase Chain Reaction (PCR). After PCR was adapted, the detection of *nptII* gene in samples was made by gel electrophoresis. A histochemical test was used for the detection of the presence of the gene *nptII* in the plant samples and the confirmation of the transformation. As a model organism, the *Nicotiana tabacum* was chosen, which was transformed by *Agrobacterium tumefaciens*.

Key words

GMO; *nptII*; kanamycin; PCR; electrophoresis; histochemical detection;

Agrobacterium tumefaciens

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Lidská infekční onemocnění	10
2.1.1 Charakteristika	10
2.1.2 Průběh a příznaky bakteriální nákazy	10
2.1.3 Šíření infekce	12
2.1.4 Cesty přenosu	13
2.1.5 Tuberkulóza	13
2.2 Bakterie	15
2.2.1 Charakteristika	15
2.2.2 Výskyt bakterií	15
2.2.3 Velikost a tvar bakteriální buňky	18
2.2.4 Stavba bakteriální buňky	19
2.2.5 Agrobacterium tumefaciens	21
2.3 Antibiotika	21
2.3.1 Charakteristika	21
2.3.2 Historie	22
2.3.3 Rozdělení antibiotik podle účinku	24
2.3.4 Rozdělení antibiotik podle spektra účinnosti	24
2.3.5 Mechanismus účinku antibiotik	24
2.3.6 Testy citlivosti na antibiotika	25
2.3.7 Kanamycin	25
2.3.8 Timentin	26
2.4 Rezistence bakterií k antibiotikům	26
2.4.1 Typy rezistencí	27

2.4.2	Vznik a mechanismus bakteriální rezistence	27
2.4.3	Přenos rezistence	28
2.5	Transgenoze	28
2.5.1	Charakteristika	28
2.5.2	Markerové geny- GUS, nptII.....	29
2.5.3	Ti-plazmid.....	31
2.5.4	Transformace pomocí bakterie Agrobacterium tumefaciens	32
2.5.5	Tabák virginský.....	33
2.6	Geneticky modifikované organizmy.....	34
2.6.1	Charakteristika	34
2.6.2	Využití GMO	34
2.6.3	Značení a detekce GMO	35
2.6.4	Rozdělení transgenních rostlin.....	36
2.6.5	GM brambory Amflora	37
2.7	Metody analýzy	39
2.7.1	PCR	39
2.7.2	Gelová elektroforéza.....	40
3.	Cíle práce a výzkumné otázky	42
4.	Materiál a metody.....	43
4.1	Charakteristika	43
4.2	Kultivační média	43
4.2.1	MS médium	43
4.2.2	MS.R médium.....	44
4.2.3	LK médium.....	46
4.3	Příprava bakterií použitých k transformaci	47
4.4	Izolace plazmidové DNA metodou minipreps.....	48
4.5	Gelová elektroforéza z bakterií A. tumefaciens a E. coli.....	50

4.6	Transformace listových segmentů <i>Nicotiana tabacum</i>	51
4.7	Kultivace a přesazování segmentů tabáku.....	53
4.8	Izolace rostlinné DNA.....	57
4.9	Amplifikace DNA z GM tabáku pomocí PCR.....	58
4.10	Gelová elektroforéza z rostlinných vzorků.....	59
4.11	Histochemický test.....	60
4.12	Výsev semen <i>Nicotiana tabacum</i>	62
4.13	Štěpné poměry.....	63
5.	Výsledky a diskuze.....	65
5.1	Gelová elektroforéza z bakterií <i>A. tumefaciens</i> a <i>E. coli</i>	66
5.2	Gelová elektroforéza z rostlinných vzorků.....	68
5.3	Ověření transformace histochemickým testem.....	70
5.4	Štěpné poměry.....	71
6.	Závěr.....	73
7.	Seznam literatury.....	74
8.	Seznam obrázků.....	82
9.	Seznam tabulek.....	83
10.	Seznam zkratk.....	84

1. Úvod

Na počátku objevení antibiotik byla pouhá pětina bakteriálních kmenů, způsobujících lidská bakteriální infekční onemocnění, vůči antibiotikům přirozeně rezistentní. V dnešní době vznikl díky nezodpovědnému chování člověka při zacházení s antibiotiky poměr opačný. Pouhá pětina bakterií je na antibiotika citlivá. Rostoucí antibiotická rezistence je celosvětovou hrozbou pro lidstvo, neboť rezistentní mikroorganismy na antibiotika jsou příčinou mnoha lidských i zvířecích úmrtí na bakteriální infekční onemocnění, na které dříve antimikrobiální látky působily a nyní již nezabírají. Z tohoto důvodu zemře v Evropě každoročně 33 000 lidí. V důsledku těchto rezistentních infekcí podlehadne za rok v Česku odhadem 500 lidí.

Rezistentním k antibiotikům se však nestává člověk nebo zvíře, ale bakterie vyskytující se v těle a na povrchu těchto organismů (Koubová, 2019).

Geny pro rezistenci na antibiotika jsou však jedny z nejčastěji používaných selekčních markerů při konstrukci geneticky modifikovaných organismů. Jedním z těchto antibiotik je i kanamycin, původně vyhrazený na léčbu tuberkulózy.

Se současným trendem používat geneticky modifikované organismy, které se nejčastěji využívají v zemědělství, vznikají obavy, zda některé geny, při těchto procesech používané, neovlivní po konzumaci modifikovaných potravin, či při použití GMO v zemědělství nebo průmyslu, naši vlastní schopnost odpovídat na předepisované antibiotické léčivo. Lidé mají strach z horizontálního přenosu a šíření těchto genů z GMO do vlastního organismu a životního prostředí, ačkoli zřejmě netuší, že běžně přijímají denně mnoho cizí genetické informace z potravy a okolí, neboť každý organismus má vlastní genetickou výbavu. V půdě se běžně vyskytují také bakterie, které jsou přirozeně rezistentní vůči antibiotikům (Ondřej, Drobník, 2002).

Jednou z geneticky modifikovaných plodin obsahující selekční marker pro rezistenci na antibiotika jsou modifikované brambory Amflora, které se využívají v průmyslu a i jako krmivo pro hospodářská zvířata (Drobník, Klimovičová, 2010). Aby mohly být geneticky modifikované organismy a jejich produkty uvedeny na trh, musejí být označeny a podrobně otestovány, že nepůsobí negativně na zdraví člověka, zvířat a na životní prostředí. Nejspolehlivější a nejúčinnější využívanou metodou k detekci transgenů v GM produktech je polymerázová řetězová reakce (Ondřej, Drobník, 2002).

2. Teoretická část

2.1 Lidská infekční onemocnění

2.1.1 Charakteristika

Infekční onemocnění je výsledkem boje mezi infekčním agens a hostitelem. Infekce vznikají průnikem choroboplodných (patogenních) mikrobů do těla hostitele, kde se množí a vyrůstají, čímž narušují vnitřní prostředí hostitele produkcí toxických látek, nebo trávením jeho buněčné struktury. Bakteriální infekce mohou způsobovat zánětlivé procesy v orgánech nebo v orgánových soustavách, kde jsou optimální podmínky pro přežití a množení mikroorganismů (Bicom, ©2020).

Bakteriální infekce způsobují patogenní bakterie, které se mohou označovat také jako patogeny. Patogeny lze rozdělit dle vnímavosti hostitele na obligátní patogeny a oportunní patogeny. Obligátní patogeny mají schopnost vyvolat bakteriální infekci u zdravých osob. Mezi tuto skupinu patogenů patří například *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, či *Bordetella pertussis*. Těchto druhů obligátních bakterií existuje malé množství a v dnešní době je možné se proti nim nechat očkovat (Votava, 2005). Jako oportunní patogeny se označují bakterie, které nejsou za normálních podmínek patogenní a jsou schopny vyvolat onemocnění pouze tehdy, když jsou obranné mechanismy hostitele poškozeny a hostitel má sníženou imunitu. Příkladem oportunní bakterie je *Escherichia coli*. Za normálních podmínek žije tato bakterie v symbiotickém vztahu s člověkem a je součástí jeho běžné střevní mikroflóry, avšak pokud se dostane mimo střeva, například do urogenitálního traktu, může zde vyvolat infekci (Ryšková, 2000).

Bakteriální infekční onemocnění provázejí lidstvo od samého počátku. Mnoho lidí v řádech milionů tímto onemocněním podléhalo téměř až do 19. století. S objevením antibiotik, která se používají pro léčbu bakteriálních infekcí dodnes, došlo k obrovskému poklesu úmrtí na tyto infekce (Ryšková, 2000).

2.1.2 Průběh a příznaky bakteriální nákazy

Zda onemocnění vznikne, jak vážný bude jeho průběh a jaký bude výsledek infekce, ovlivňuje řada faktorů. Faktory lze rozdělit na ty, které jsou závislé na mikroorganismu a na faktory, které závisí na hostiteli (Votava, 2005). Jestli jsou bakterie schopné

vyvolat infekční onemocnění, závisí na jejich vlastnostech, jako jsou patogenita, virulence, invazivita a toxigenita. Patogenita je schopnost infekčních agens vyvolat onemocnění. Virulence vyjadřuje míru patogenity určitého kmene mikroba. Invazivita je schopnost infekčního agens proniknout do hostitele a množit se v něm. Toxigenitou se rozumí schopnost poškozovat hostitele produkcí jedů (Sedlák, Tomšíčková, 2006). Ze strany hostitele se uplatňují zejména faktory, jako jsou specifická a nespecifická imunita, stres, výživa a věk (Votava, 2005).

Základem vzniku bakteriální infekce je průnik patogenních bakterií do hostitelského organismu přes povrchové bariéry, jimiž jsou kůže nebo sliznice. Místo průniku je označováno jako vstupní brána infekce. Prvním krokem při průniku je kolonizace. Při tomto procesu dochází k přilnutí mikrobů ke kožnímu nebo slizničnímu povrchu pomocí adhezních struktur na povrchu mikrobů, což zabraňuje odplavení mikrobů močí, střevním obsahem nebo bronchiálním sekretem (Beneš, 2009). Dalším krokem v rozvoji infekce je tzv. infekční dávka. Tento termín označuje množství infekčního agens, které se musí dostat do organismu, aby způsobilo infekci (Sedlák, Tomšíčková, 2006).

Časový interval od proniknutí původce nemoci do organismu a propuknutí prvních příznaků onemocnění se označuje jako inkubační doba. Délka inkubační doby je různá, od několika hodin přes týdny a to v závislosti na onemocnění.

Další fází nákazy je období prvních necharakteristických příznaků nemoci, které je označováno jako prodromální stádium. To může trvat hodiny až dny. Příznaky nemoci se mohou projevit jako horečka, nevolnost, bolesti hlavy, únava, bolest svalů a kloubů a snížená chuť k jídlu. Po této fázi nastává stádium typických příznaků, které je specifické pro každou nemoc. Toto stádium u akutně probíhajících nemocí trvá od několika dnů až týdnů (Beneš, 2009).

Léčba bakteriálních onemocnění spočívá v podání antibiotik a to ve formě tabletek nebo u těžších stavů injekční aplikací do žíly pacienta (Januzsová, 2012). Pokud léčba zabírá a nenastanou žádné komplikace, tělo se dostává do fáze zotavování a uzdravení z nemoci. Toto stádium se nazývá rekonvalescence. Doba této fáze odpovídá hojení a postupnému návratu k fyziologickému stavu, což může trvat několik dnů až měsíců. Pokud není obranný systém jedince v dobrém stavu, nereaguje na antibiotickou léčbu a nastanou vážné komplikace, může být bakteriální nákaza pro jedince smrtelná (Beneš, 2009).

2.1.3 Šíření infekce

Infekční onemocnění jsou přenosná a nakažlivá. Mohou být přenášena z člověka na člověka, takové infekce se nazývají antroponózy. Ale také je mohou přenášet zvířata, nebo hmyz. Pokud člověk při kontaktu se zvířetem získá nemoc, hovoří se o infekci nazývané zoonóza. Původci zoonóz mohou být viry, bakterie, houby, cizopasní červi, prvoci a členovci (Sedlák, Tomšíčková, 2006).

Proces šíření nákazy je tak založen na třech článcích. Hlavním článkem je zdroj neboli původce nákazy, čímž může být například člověk, který je nemocný nebo je nosič infekčních agens. Od původců se mohou nakazit jiní jedinci, dalším článkem jsou tedy cesty přenosu původce od zdroje k vnímavému jedinci. Posledním článkem tohoto procesu je vnímavý organizmus (Rozsypal, 2015).

Šíření infekcí závisí také na přírodních faktorech, jako jsou vlhkost vzduchu, nadmořská výška, podnebí a počasí. Na společenských a ekonomických faktorech, mezi něž patří například hygiena a zdravotnická péče. Jako příklad přírodního faktoru lze uvést prašný suchý horký vzduch, který vysušuje respirační sliznice a usnadňuje přenos meningokoků a jejich průnik z nosohltanu do krve. U horníků, kteří pracují ve vysoce prašném prostředí, dochází k zaprášení plic a tím ke snížení jejich odolnosti vůči tuberkulóze. Epidemiologové popisují u mnoha chorob charakteristické sezónní výkyvy v jejich výskytu. V zimním období bývají častější respirační infekce, zatímco v létě jsou častější průjemová onemocnění (Votava, 2005).

Důležitým faktorem v šíření infekce je také vstupní brána patogenních mikroorganismů. Některé infekce mohou zůstat lokalizovány v místě vstupu, jiné se po překonání obranných bariér šíří dál v těle hostitele, kde mohou také tvořit abscesy. Absces je dutina v těle vyplněná hnisem způsobená bakteriální infekcí. Nejčastějším místem průniku mikroorganismů do těla hostitele je trávicí trakt, odtud mohou mikroorganismy pronikat do celého těla. Do respiračního traktu pronikají mikroorganismy prostřednictvím vdechovaných prachových částic nebo kapénkami a jejich cesta do krevního řečiště vede skrze sliznici dutiny nosní nebo lícními alveoly. Největší bariéru pro patogenní mikroorganismy představuje kůže, která pokrývá celé tělo člověka a její úkol spočívá v ochraně a oddělení vnitřního prostředí organismu od vnějšího. Pokud je však narušena, může dojít k volnému vstupu infekčních mikroorganismů. Další vstupní bránou může být oční spojivka či urogenitální trakt (Sedlák, Tomšíčková, 2006).

2.1.4 Cesty přenosu

U mnoho infekcí může docházet k přenosu více druhy cest. Avšak většina infekcí má některý z přenosů typický a převažující, což je dáno lokalizací původce ve zdroji, vlastnostmi původce, především odolností k zevním vlivům, a vstupní branou infekce (Rozsypal, 2015).

Přenos nákazy může probíhat přímým kontaktem nebo nepřímo prostřednictvím infikovaných materiálů (Sedlák, Tomšíčková, 2006). Mezi přímý přenos patří především kontakt s infekčním mikroorganizmem, krví, pohlavní styk, kousnutí nebo přímým dotykem. Nepřímý přenos se uskutečňuje polknutím kontaminované vody nebo potravin, vdechnutím původce v aerosolu (kapánek), prostřednictvím krev sajících členovců, zraněním či zdravotnickou manipulací s kontaminovanými předměty a kontaminací z infikovaných předmětů přicházejících do styku s povrchem těla (Rozsypal, 2015).

2.1.5 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené chronické zánětlivé onemocnění, u člověka způsobené obligátními patogenními bakteriemi komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Postihuje především plíce, ale také ledviny, či lymfatické uzliny (Adámková, 2010). Mezi příznaky plicní TBC patří suchý dráždivý kašel, který se mění v mukopurulentní, zvýšená teplota, pocení, bolest na hrudníku, únava a neurotické potíže. Zdrojem nákazy je nemocný člověk, který vylučuje bakterie zpravidla kašláním. Minimální infekční dávka *Mycobacterium tuberculosis* pro člověka je méně než 10 bacilů. *Mycobacterium tuberculosis* je acidorezistentní tyčinka, kterou lze barvit podle Ziehla-Neelsena (Beneš, 2009). Růst bakterie je pomalý, buňka se dělí každých 15-20 hodin a vyžaduje velké množství kyslíku (Pharma-reports, 2012).

Tuberkulóza patří k onemocněním, které provázely lidstvo odedávna. V Evropě v 17. a 18. století došlo zejména s rozvojem industrializace a rozrůstáním měst k četnému rozšíření této nemoci. V městech se nacházela mohutná populace lidí, kteří zde žili ve zcela nevyhovujících hygienických podmínkách a mnohdy trpěli podvýživou. Není tedy překvapující, že na tuberkulózu umírala v Evropě tehdy čtvrtina dospělé populace. Až v roce 1882 objevil Robert Koch původce tohoto onemocnění. Po více než desetiletém

výzkumu v roce 1921 byl použit vakcinační kmen s názvem BCG (Bacillus Calmette-Guérin) na očkování proti tuberkulóze.

Dalším významným bodem v boji proti tuberkulóze bylo objevení antibiotik působící na původce *Mycobacterium tuberculosis*. Dříve se léčila tuberkulóza antibiotikem zvaným kanamycin, v dnešní době je toto antibiotikum vyhrazeno pro rezervní léčbu (antibiotikum druhé linie), kdyby došlo k selhání léčby antibiotiky z první linie z příčiny rezistentních forem TBC (Beneš, 2009).

Od 90. let byly zaznamenány i takové formy TBC, které byly způsobené bakteriálními kmeny rezistentními vůči nejméně dvěma nejúčinnějším antibiotikům (Sotgiu et al., 2013). V roce 2009 byly bohužel izolovány i kmeny bakterií způsobující TBC, které vykazovaly *in vitro* rezistenci na všechna testovaná antibiotická léčiva první i druhé linie. Tento jev byl způsoben léčbou nevhodnými antibiotiky proti TBC. TDR-TB (totally drug-resistant tuberculosis) byla nalezena v Itálii, Íránu, Indii a v Jižní Africe. Studie o těchto nebezpečných formách bakterií ukázaly na morfologické změny ve tvaru a velikosti bakteriální buňky (silnější buněčná stěna, pili na povrchu buňky). Centra pro kontrolu a prevenci nemocí ohlásily, že nemoc způsobená těmito zcela rezistentními kmeny bakterií je prakticky neléčitelná (Velayati et al., 2013).

Pokud by tedy v léčbě neúčinkoval ani kanamycin v důsledku rozvoje antibiotické rezistence, mohlo by dojít opět k masivním úmrtím na tuto infekci (Beneš, 2009).

Ve světě podlehne ročně TBC až tři miliony lidí (Sedlák, Tomšíčková, 2006). V roce 2018 bylo v české republice hlášeno 444 onemocnění tuberkulózou a 26 úmrtí na tuto nemoc (ÚZIS, 2019). I přes tato poměrně vysoká čísla bylo v České republice od listopadu 2010 zrušeno plošné očkování proti této nemoci (Tichý, ©2020).

2.2 *Bakterie*

2.2.1 *Charakteristika*

Asi před 4,5 miliardami let vznikla planeta země, na které začal vývoj organických a anorganických molekul, z kterých se mohly dále rozvíjet živé organizmy. Přibližně 2 miliardy let trval vývoj prokaryontních organizmů, které byly první formou života na planetě (Bednář et al., 1996). Bakterie se tak řadí k nejstarším organizmům na Zemi.

Bakterie patří mezi jednobuněčné prokaryotické organizmy, které jsou pro nás pouhým okem neviditelné (Schindler, 2014). Poprvé byly viděny a popsány přírodovědcem Antoni van Leeuwenhoekem v roce 1676, jeho vlastnoručně vyrobeným mikroskopem (Porter, ©1976). Dosud je nalezeno a popsáno přibližně 3000 druhů bakterií, které se vyskytují v těle člověka i mimo něj, je to však pouhá část z celkového množství vyskytujících se bakterií na Zemi, jejichž celkový počet je odhadován k 1 milionu druhů (Schindler, 2008).

Bakterie mohou žít s člověkem v prospěšném vztahu, například určitý kmen bakterie *Escherichia coli* vyskytující se ve střevě člověka, existují také ale patogenní bakterie, jejichž vlastností je vyvolávat bakteriální onemocnění (Pharma-reports, 2012).

Člověk se může dostat do kontaktu s bakteriemi nacházejícími se v půdě, ve vodě, ve vzduchu, ale také přenosem od jiné osoby. Některé bakterie mohou růst a přežívat pouze v těle hostitele, či přímo uvnitř jeho buněk. Většina bakterií však může žít a růst mimo tělo hostitele a tak mohou být kultivovány na umělých mediích (Göpfertová et al., 2002).

2.2.2 *Výskyt bakterií*

Bakterie se v přírodě vyskytují jako jednotlivé izolované buňky nebo ve shlucích (Pharma-reports, 2012). Jejich přirozeným prostředím je půda, voda i vzduch, ve kterém jsou unášeny větrem na částech prachu, a také jsou součástí těl mnoha organizmů (Schindler, 2008).

Bakterie v půdě

V tomto prostředí se vyskytuje mnoho bakterií, kdy v 1 gramu půdy se odhaduje množství v řádech několika miliard bakterií. Důležitý význam mají bakterie žijící

v půdě, jejichž schopností je rozklad odumřelých zbytků, odpadních látek těl živočichů a rostlin (Göpfertová et al., 2002). Tento proces se nazývá mineralizace, přičemž v něm dochází k rozkladu organických látek na látky anorganické (Dobiáš, 2003). Tím ovlivňují úrodnost půdy a kořenovou výživu rostlin (Rosypal, 2003).

Půdní bakterie se takto podílejí na koloběhu dusíku, který se do půdy dostává v odumřelých tkáních živočichů a pletivech rostlin. Bakterie, které se tímto způsobem živí, nazýváme jako saprofytické (Rosypal, 2003). Při procesu rozkladu pomocí těchto bakterií se uvolňuje amoniak, který jsou schopné nitrifikační bakterie přeměnit svou činností na dusičnany. Dusičnany jsou dále schopné redukovat denitrifikační bakterie na plynný dusík, který využívají rostliny jako zdroj dusíkaté výživy (Jelínek, Zicháček, 2007).

Bakterie ve vodě

Další hojný výskyt bakterií můžeme spatřit ve vodě různého prostředí a s různými vlastnostmi. Mohou se nacházet v sladkém nebo slaném prostředí, ale také v tekoucích nebo stojatých vodách (Šilhánková, 2008). Míra osídlení vod bakteriemi závisí na obsahu živin, zejména organických látek. (Dobiáš, 2003). Pramenité a horské vody neobsahují organické látky, z tohoto důvodu jsou velmi málo osídleny bakteriemi (Rosypal, 2003).

Složení vodních zdrojů a množství bakterií v něm, je ovlivněno také okolím vodního prostředí (Dobiáš, 2003). Vodou se tedy mohou přenášet některá infekční onemocnění způsobená bakteriemi, což je dáno znečištěním vod splašky z kanalizace nebo různými zdravotně závadnými odpady z průmyslu (Rosypal, 2003).

Bakterie vyskytující se ve vodě mají také schopnost rozkládat látky. Díky této vlastnosti se využívají v městských i průmyslových čistírnách odpadních vod (Šilhánková, 2008).

Bakterie ve vzduchu

Hlavním zdrojem bakterií v tomto prostředí je přenos větrem těchto mikroorganizmů z půdy do ovzduší, což je hlavní příčinou většího množství osídlení vzduchu bakteriemi nad pevninou než nad mořem. Přežívání a výskyt bakterií je závislý na různých faktorech ovlivňující prostředí. Jedním z faktorů je vlhkost vzduchu, čím vlhčí vzduch, tím méně bakterií se v něm nachází, neboť jsou deštěm sráženy k zemi. Další rozdíl

množství bakterií ve vzduchu je dán hustotou obydlí, zalesněnými oblastmi, množstvím vodní plochy, kamenitými oblastmi, či prašnými průmyslovými zónami. Výskyt bakterií je téměř nulový nad povrchem pokrytým sněhem. Vysoký počet lidí vyskytujících se pohromadě v uzavřených prostorech víří více prachu s bakteriemi do ovzduší (Rosypal, 2003).

Mezi hlavní zdroje patří nemocní lidé, kteří vylučují bakterie do prostředí, kašláním, mluvením a kýčáním v podobě kapének slin a hlenu. Infekčním prachem, který tvoří zaschlé kapénky, může být kontaminováno ovzduší jeho vířením, což při vdechnutí kapének dává možnost vzniku infekce u dalších lidí (Rosypal, 2003). Rizikovým prostředím pro šíření bakteriální infekce mohou být školy, nákupní centra, nemocnice, velká shromáždění nebo městské hromadné dopravy (Schindler, 2008).

Bakterie v lidském těle

Osídlování lidského těla bakteriemi a ostatními mikroorganismy probíhá v průběhu celého života. K první kolonizaci dochází již při narození průchodem porodních cest. Bakterie a další mikroorganismy vytváří mikroflóru těla, a pokud jsou v biologické rovnováze s hostitelským organismem, nemají na lidské tělo patogenní vliv (Dobiáš, 2003).

Většinou lidské tělo obsahuje přes 100 druhů bakterií, avšak ne každý člověk má ve svém těle všechny druhy, což je dáno individualitou každého hostitele, tudíž každý člověk má rozdílné zastoupení bakteriální flóry (Schindler, 2014).

Jako první a hlavní bariéra oddělující vnitřní prostředí od vnějšího slouží kůže a sliznice člověka. Pokud je tato vrstva neporušena, vytváří systém pro zachování integrity organismu a dovede odolávat většině běžných infekcí (Ryšková, 2000). Neboť povrch kůže není stále vlhký a vysychá, čímž toto prostředí není vhodné pro růst a množení bakterií. Mezi vhodné prostředí pro rozvoj bakterií jsou stále udržující se vlhké oblasti obsahující množství živin, mezi něž patří místa s vývody potních, mazových a slinných žláz (Rosypal, 2003). Mezi hlavní druhy bakterií nalézající se na kůži patří stafylokoky a nepatogenní korynebakteria (Schindler, 2014).

V dutině ústní převažují streptokoky a laktobacily, jejichž zdrojem výživy jsou sliny obsahující proteiny a ostatní látky (Schindler, 2014). Důsledkem nečištění zubů vzniká zubní plak, který je tvořen slizovými pouzdry bakterií, převážně *Streptococcus mutans*.

Ty snižují pH v dutině ústní tvorbou kyselin z cukrů a tím dochází k poškození skloviny zubů a vzniku zubního kazu (Ryšková, 2000).

Vdechnutím dostává člověk do svého těla prachové částičky, na nichž se nachází bakterie, které se usazují v dýchacích cestách. Velká část patogenních i nepatogenních bakterií se vyskytuje v dutině ústí, nosní a nosohltanu a to zejména stafylokoky, streptokoky a korynebakteria (Schindler, 2014). Další část bakterií se zachycuje v hlenu vylučovaném sliznicí a tím jim není umožněno putovat dále, z tohoto důvodu se nevyskytují v plicích zdravého člověka (Rosypal, 2003).

Ve střevech se nachází velké množství a rozmanité druhy bakterií, kdy mezi nejvýznamnější patří *Escherichia coli*. Jednou z funkcí této bakterie je tvorba vitamínu K, jež je potřebný pro srážlivost krve a tvorba vitamínu B12, sloužící pro krvetvorbu (Schindler, 2014). Na množství a druhovém zastoupení bakterií ve střevní mikroflóře má podíl strava, zdravotní stav člověka a jeho věk. Velký vliv na přirozenou střevní mikroflóru má také podávání antibiotik, které ničí i tělu prospěšné bakterie, tím narušují střevní rovnováhu a umožňují růst nežádoucích bakterií (Rosypal, 2003).

2.2.3 Velikost a tvar bakteriální buňky

Bakteriální buňky mají různorodou velikost a tvar, kdy tvar buňky ovlivňuje její velikost (Rosypal, 1994). Bakterie můžeme podle tvaru rozdělit na kulovité (koky), tyčinkovité a spirálovité (Votava, 2005).

Velikost kulovitých bakterií může být 0,5 až 5 μm , tyčinky mohou být dlouhé až 7 μm a tlusté 0,3 až 2 μm . Spirálovité buňky neboli spirochety dosahují délky až 500 μm a jejich tloušťka se pohybuje kolem 0,2 až 0,75 μm (Rosypal, 1994).

Při dělení buněk může dojít k přichycení jedné bakterie na druhou, čímž vznikají nová uspořádání buněk, která závisí na rovině buněčného dělení. Koky dělicí se ve stejné rovině vytvářejí řetízky z 3 až 20 koků. Diplokoky jsou z dvojice koků, streptokoky tvoří řetízky ze 4 a více koků. Koky dělicí se v neuspořádaných rovinách nazýváme stafylokoky, které vytvářejí hrozinky.

Tyčinky vytvářejí krátké řetízky (streptobacily), dvojice (diplobacily), nebo při podélném dělení palisádové uspořádání. Nejčastěji jsou však uspořádány jednotlivě.

Spirochety jsou spirálovitou formou tyčinek (Votava, 2005).

2.2.4 Stavba bakteriální buňky

Nukleoid neboli prokaryotické jádro je tvořeno deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), která představuje jediný chromozom buňky, kdy DNA má uzavřenou strukturu ve formě kružnice (Šilhánková, 2008). Nukleoid se nachází v cytoplazmě a není obklopen jadernou membránou (Votava, 2005). Při vzniku nové bakteriální buňky dochází k replikaci DNA, tedy k zdvojení molekuly DNA a poté k rozdělení buňky ve dvě (Šilhánková, 2008).

Kromě chromozomální DNA obsahuje bakteriální buňka plasmidy, což jsou samostatné molekuly DNA o nízké molekulové hmotnosti (Šilhánková, 2008). Plasmidy obsahují různé skupiny faktorů, které mohou být konjugativní neboli spájecí, nebo nekonjugativní. V konjugativních plazmidech se nachází transferové geny řídící konjugaci a přenos konjugativního plazmidu z jedné bakteriální buňky do druhé (Brown, 2007). Schopností jednoho z konjugativních plazmidů je přenos rezistence k různým antibiotikům z buňky do buňky (Šilhánková, 2008). Díky těmto vlastnostem se používají plasmidy jako vektory při klonování genů do nově vzniklých buněk. Rezistence k antibiotikům se využívá v laboratořích jako selekční marker, jenž slouží k prokázání obsahu daného plazmidu v bakteriální kultuře. Dalším typem plazmidu v bakteriální buňce je tak zvaný virulentní plazmid, propůjčující hostitelské bakterii schopnost vyvolat infekci nebo nádor. K tomuto typu se řadí plasmidy Ti vyskytující se v *Agrobacterii tumefaciens*, jež způsobují tvorbu nádorů u dvouděložných rostlin (Brown, 2007).

Cytoplazma je koncentrovaný roztok vyplňující prostor buňky. Je tvořena převážně bílkovinami a nalezneme zde také rozpuštěné ribonukleové kyseliny, vitamíny, soli organických kyselin, aminokyseliny, meziproducty metabolismu a enzymy potřebné pro biosyntetické a rozkladné procesy v buňce (Rosypal, 2003).

Prokaryotické ribozomy jsou velikostně menší než eukaryotické. Jejich hlavní funkcí je syntéza bílkovin (Šilhánková, 2008). Ribozomy jsou volně přítomny v cytoplazmě a jejich počet závisí na syntetické aktivitě buňky (Dobiáš, 2003).

Cytoplazmatická membrána je tenká asi 7 nm a můžeme ji zobrazit pouze v elektronovém mikroskopu (Šilhánková, 2008). Membrána ohraničuje cytoplazmu a její hlavní úlohou je fungovat jako osmotická bariéra (Rosypal, 2003). Složkami

membrány jsou proteiny a fosfolipidy (Šilhánková, 2008). Fosfolipidy tvoří dvojvrstvu a v té jsou přítomny různé bílkoviny. Tyto bílkoviny se uplatňují k transportu živin do buňky, v respiračních pochodech, v syntéze složek a v sekreci látek z cytoplasmy do zevního prostředí (Votava, 2005). U fototrofních bakterií se nachází bakteriochlorofyl, který je potřebný k přeměně světelné energie na energii chemickou (Šilhánková, 2008).

Další možnou strukturou je buněčná stěna, která je pevná a neohebná vrstva buňky bakterií, jejíž vlastnost je dána peptidoglykany neboli mukopeptidy též mureiny, které se v této vrstvě nacházejí (Šilhánková, 2008). Mukopeptidy se skládají z dvou vrstev polysacharidů obsahující střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukosamin. Tato stěna chrání obsah celé buňky, odolává vysokému nitrobuněčnému osmotickému tlaku a díky své pevnosti udržuje tvar bakterie (Votava, 2005). Podle složení buněčné stěny jsou bakterie rozděleny na grampozitivní a gramnegativní. Grampozitivní bakterie mají silnou peptidoglykanovou vrstvu vyplněnou teichoovou kyselinou a polysacharidy a gramnegativní bakterie neobsahují teichoovou kyselinu, mají tenkou peptidoglykanovou vrstvu nad kterou se nachází vnější membrána (Šilhánková, 2008).

Nad buněčnou stěnou některých bakterií se může nacházet další vrstva vytvářející pouzdro, která se skládá z polysacharidů, nebo polypeptidů. Díky této struktuře bakteriální buňka lépe odolává pohlcením fagocytů. Polysacharidové vrstvy mohou tvořit také slizovou vrstvu, která vytváří mukózní vzhled bakterií. Úkolem slizové vrstvy je chránit buňku proti nepříznivým podmínkám a vysychání (Šilhánková, 2008). Kmeny bakterií s mukózní vlastností mívají větší rezistenci na určitá antibiotika (Votava, 2005).

K pohybu některých bakteriálních buněk slouží bičíky, které jsou asi 20-30 nm silné a přibližně 20 μm dlouhé (Votava, 2005). Skládají se z bílkoviny zvané flagelin a jsou zakotveny do cytoplazmatické membrány pomocí háčků a dvojice kotoučků nacházející se na dolní části bičíků (Šilhánková, 2008). Podle umístění bičíku a jejich počtu rozdělujeme bakterie na monotricha, lofotricha a peritricha. Monotricha mají pouze jeden bičík, lofotricha nesou více bičíků na jednom pólu buňky a peritricha, jejichž bičíky pokrývají celý povrch buňky. Bakterie, které bičíky nemají, se nazývají atricha (Votava, 2005).

Dalšími útvary vyskytujícími se na povrchu některých bakterií mohou být fimbrie, které umožňují bakterii přichytit se na povrch buněk (Votava, 2005).

2.2.5 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je rostlinná patogenní bakterie, běžně se vyskytující v půdě. Tato bakterie je řazena dle svého tvaru a stavby buňky mezi tyčinkovité gramnegativní bakterie. Jedná se o alfaproteobakterie z čeledi Rhizobiaceae (Pharma-reports, 2012).

Díky své schopnosti přenášet svou genetickou informaci do rostlinných buněk je tato bakterie používána jako modelový organizmus v lékařském výzkumu a v genetickém inženýrství (Pharma-reports, 2012). Tento organizmus vyvolává u dvouděložných rostlin onemocnění zvané „crown gall“. Prvním krokem pro vznik onemocnění je proniknutí bakterií z půdy do rostliny v poraněném místě, tím se dostávají bakterie do rostlinného pletiva, kde vyvolávají nádorovou proliferaci. Aby mohlo toto onemocnění proběhnout, je nutná přítomnost tumor indukujícího plazmidu zvaného Ti v bakteriální buňce, který obsahuje geny účastníci se infekčního procesu. Dalším krokem po infekci je zabudování části molekuly Ti plazmidu, která se nazývá T-DNA, do rostlinné chromozomální DNA. Vědci tedy zjistili, že pomocí použití Ti plazmidu mohou přenášet nové geny do rostlinné buňky (Brown, 2007).

2.3 *Antibiotika*

2.3.1 *Charakteristika*

Jako antibiotika jsou označovány antimikrobiální látky používané k předcházení a léčbě bakteriálních infekčních onemocnění (Votava, 2005). Jednou z podmínek pro účinnou léčbu je citlivost původce onemocnění k použitému antibiotiku. Antimikrobiální látky působí specificky na určité struktury bakteriální buňky, především na buněčnou stěnu (Rosypal, 2003).

Antibiotika lze také definovat jako látky produkované mikroorganismy, které v malých koncentracích zastavují růst nebo usmrcují jiné mikroorganismy (Rosypal, 2003). Mezi časté producenty antibiotik jsou udávány plísně a bakterie. Antimikrobiální látky jsou však vyráběny i chemicky (Votava, 2005).

Antibiotika patří do skupiny léků, které není možné zakoupit bez receptu od lékaře. Tím dochází k regulaci vzniku antibiotické rezistence a zachování účinnosti antibiotik.

Neboť kdyby si je lidé mohli samovolně zakoupit dle svého uvážení a nesprávně je užívat na jakékoliv onemocnění bez předešlého vyšetření lékařem, určení správné diagnózy a léčby příslušnými antibiotiky, mohlo by dojít k velkému a rychlému rozvoji zmíněné antibiotické rezistence (Sandoz, ©2020). Proto při léčbě těmito léky je nutné dodržovat pravidla pro správné užívání, to znamená dobrat celou předepsanou dávku a nepřerušovat léčbu, dodržovat časový režim podávání, brát správný typ antibiotik k příslušnému onemocnění, při jejich častém užívání střídat různé druhy a prošlé léky nevyhazovat volně do odpadů, ale odevzdat je do lékárny (Grigoryan et al., 2006).

Podávání těchto léků je možné v různých formách, především jako tabletky, roztoky k nitrožilnímu podání, masti nebo oční kapky (Vilímovský, 2019). Nejsou určeny k léčbě infekcí virového původu, je tedy důležité správné vyšetření pacienta a určení druhu infekčního onemocnění (Sandoz, ©2020).

2.3.2 Historie

Historie antibiotik vede do mnohem dřívější doby, než si většina lidí myslí. V historických materiálech je možné se dočíst o prvních pokusech léčby antibiotiky pocházejících od starověkých vyspělých civilizací, jako byli Číňané, Egypťané, Mayové, ale také národy střední a jihovýchodní Evropy. Tyto první zmínky vědci datují již 2500 let před naším letopočtem. Číňané používali obklady napuštěné plesnivým sójovým mlékem k léčbě hnisavých ran a lokálních infekcí. Ke stejnému cíli léčby používali mexičtí Mayové plesnivou kukuřici a Ukrajinci plesnivý chléb. Léčba nebyla prováděna na základě poznatku antimikrobiálních látek, nýbrž na poznaných zkušenostech, které získali časem při těchto pokusech. Velkou zajímavostí je nalezení tetracyklinových antibiotik v kostech starých Egypťanů, která se do jejich těl dostala nejspíše požitím kvasných výrobků. Jedním z možných vysvětlení je, že Egypťané místo použití droždí nechávali těsto kynout volně na vzduchu, kde se na něj mohly dostat mikroorganismy z okolí, později zahájit kvasný proces a poté produkci antibiotických látek. Primitivní antibiotickou léčbu pomocí starého vína obsahující kvasinky využíval dokonce i Hippokrates.

V druhé polovině 19. století prokázali vědci přítomnost a vliv patogenních mikroorganismů u nemocí, a tak využili svých nových znalostí chemie a fyziologie k hledání prostředků ničících tyto mikroby (Beneš, 2018).

Jedním z nich byl německý imunolog a chemik Paul Ehrlich, který na konci 19. století vycházel z toho, že některá barviva se váží na určitý druh mikrobů. Doufal, že objeví takovou molekulu barviva, která se bude vázat specificky pouze na patogenní mikroorganismy a usmrtí je (Votava, 2005). V roce 1891 se pokusil o léčbu malárie metylénovou modří. V dalších letech, přesněji roku 1904, se pokusil o léčbu pomocí trypanové červeně, která měla působit na původce spavé nemoci, trypanosomy. Tento pokus byl však také neúspěšný. První velký úspěch nastal roku 1909 (Beneš, 2018). Ve spolupráci s japonskem Hatou zjistil účinnost zkoumané látky arsfenaminu proti bakterii *Treponema pallidum*, která způsobuje nemoc syfilis. Rok poté začala výroba léku obsahující tuto molekulu pod názvem Salvarsan (Votava, 2005).

Další objev, navazující na výzkum Ehrlicha, nastal roku 1935 lékařem německého původu Gerhardem Domagkem (Votava, 2005). Objevený přípravek, který pojmenoval Prontosil působí jako prodrug. To znamená, že získává antibakteriální účinnost až poté, co metabolizuje na aktivní formu, která má jednodušší strukturu. Tento přípravek se řadí mezi sulfonamidy a byl používán k léčbě stafylokokové a streptokokové infekce (Beneš, 2018).

První velký krok v nástupu pravých antibiotik do dějin lékařství, kterým došlo k záchraně mnoho lidských životů, nastal v roce 1928, kdy byl Alexandrem Flemingem objeven penicilin (Sandoz, ©2020). K tomuto objevu došlo pouhou náhodou. Fleming pracoval s kmeny mikroba *Staphylococcus aureus*, které rostly v Petriho miskách. Do jedné misky, kterou nejspíše zapomněl vyhodit, se však z okolí dostaly jiné mikroorganismy, čímž došlo k její kontaminaci. Narostla zde plíseň *Penicillium notatum*, čímž se dostal k penicilinu. Nebyl ho však schopen získat ve velkém množství a stabilní formě ke klinické léčbě (Votava, 2005). K vyřešení tohoto problému došlo začátkem druhé světové války, kdy nastala velká potřeba antibiotické léčby pro zraněné vojáky (Schindler, 2008). Roku 1940 pomohli Flemingovi dva kolegové, Florey a Chain, nalézt metodu k izolaci penicilinu.

Od té doby jsou antibiotika využívána k léčbě bakteriálních infekcí (Schindler, 2008). Mezitím však dochází k velkému rozvoji antibiotické rezistence u některých druhů patogenních bakterií. Pro účinnou léčbu antibiotiky je nutné hledat a vyvíjet stále nové antimikrobiální látky. V současnosti se ve farmaceutickém průmyslu synteticky vyrábí kolem 150 druhů antimikrobiálních látek. Ve vývoji je více než 100 perspektivních

látek a u 9 z nich se předpokládá schválení již v několika letech. Některé z těchto zkoumaných látek by mohly mít i nový mechanismus účinku, tedy nový přístup k cílovým místům (Schindler, 2014).

2.3.3 Rozdělení antibiotik podle účinku

Z hlediska typu účinku jsou antibiotika dělena na baktericidní a bakteriostatické látky (Martínková, 2007). Význam baktericidních látek je v usmrcování mikrobiální buňky a jejich klinický účinek se pohybuje v časovém rozmezí 48 hodin od aplikace. Používají se především u vážných stavů pacienta a nemocných se sníženou obranyschopností (Votava, 2005). Do této skupiny látek jsou řazeny beta-laktamy, aminoglykosidy, polypeptidy a glykopeptidy (Lüllmann et al., 2004).

Funkcí bakteriostatických látek je zastavení růstu a množení mikrobů, jejich klinický účinek se dostavuje až za 3-4 dny (Votava, 2005). U této skupiny látek může dojít k reverzibilnímu účinku, což znamená, že po jejich vysazení může dojít k opětovnému množení mikrobů. Mezi tyto látky patří tetracykliny, makrolidy a linkosamidy (Lüllmann et al., 2004).

2.3.4 Rozdělení antibiotik podle spektra účinnosti

Rozdělení antibiotik dle spektra účinnosti se udává do 3 skupin (Votava, 2005). Antibiotika s úzkým spektrem, která působí jen na malý okruh bakterií a na antibiotika se širokým spektrem účinnosti, která působí na mnoho různých rodů a druhů bakterií (Ryšková, 2000). Další skupinou jsou antibiotika středního spektra účinkující na grampozitivní koky a tyčinky i gramnegativní koky a mikroby spirálovitého tvaru, zástupcem tohoto spektra je především známý penicilin (Votava, 2010).

2.3.5 Mechanismus účinku antibiotik

Funkcí antibiotik je zneškodnění bakterií, ke kterému dochází ovlivněním metabolismu a změnou v struktuře bakteriální buňky. Strukturu bakteriální buňky poškozují antibiotika různými způsoby a v různých místech (Ryšková, 2000). Mezi první mechanismy patří potlačování tvorby buněčné stěny bakterií (Kramář, 2007). To je na této úrovni zajišťováno baktericidními antibiotiky, především beta-laktamy, glykopeptidy a antituberkulotiky. Druhým mechanismem je zásah do syntézy nukleových kyselin. To uskutečňují taktéž baktericidní látky. Další mechanismus

spočívá v poškození cytoplazmatické membrány, čímž dojde k potlačení její funkce (Lincová, Farghali, 2007). K posledním dvěma cílům antibakteriálního účinku patří syntéza bílkovin a kompetitivní inhibice (Votava, 2005).

2.3.6 Testy citlivosti na antibiotika

Důležitou součástí při léčbě antibiotiky bakteriální infekce je stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky. Výsledky těchto testů slouží k indikaci správného typu antibiotik proti bakteriálnímu kmeni způsobujícímu onemocnění (Göpfertová et al., 2002).

Testy jsou děleny do dvou skupin. První test je kvalitativní, udává, zda je vyšetřovaný vzorek bakterií citlivý, nebo rezistentní. Ke kvalitativnímu průkazu se v praxi nejvíce používá diskový difúzní test. Jeho princip spočívá v rovnoměrném naočkování bakteriální suspenze na agarovou plotnu, na to se rozloží antibiotické disky a to se inkubuje 18-24 hodin při 37°C (Schindler, 2014). Poté se vytvoří zóna inhibice růstu, která se měří a podle její velikosti se hodnotí citlivost a rezistence mikroba. Pokud je mikrob na antibiotikum citlivý, kolem disku nevyroste (Votava, 2005).

Druhý test je kvantitativní, používá se ke zjištění míry citlivosti, nebo rezistence. K tomuto průkazu se používá diluční metoda. Ta se provádí v mikrotitračních destičkách s jamkami, ve kterých je pro každé vyšetřované antibiotikum řada rovnoměrně klesajících koncentrací, do těch se naočkují bakterie a po inkubaci se měří míra zákalu (Schindler, 2014). Výsledkem je stanovení minimální inhibiční koncentrace, která zabrání růstu bakterií. (Göpfertová et al., 2002)

2.3.7 Kanamycin

Kanamycin je antibiotikum spadající do skupiny aminoglykosidů. Účinkuje baktericidně v krátkém časovém úseku vůči většině gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Göpfertová et al., 2002). Mechanismus účinku je založen na potlačení syntézy bílkovin a vyvolání chybného kódování vazbou na 30S podjednotku bakteriálního chromozomu. (Katzung, 2006) Tento druh antibiotika je získáván z rodu *Streptomyces* (Lüllmann et al., 2012).

Kanamycin se používal především k léčbě tuberkulózy, avšak v dnešní době se omezuje jeho použití na lokální nebo perorální aplikaci (Katzung, 2006). Neboť užíváním

vysokých dávek působí tato antimikrobiální látka toxicky na organismus, hlavně na ledviny a orgán sluchu (Ryšková, 2000). V současnosti se používá již jen k lokální terapii očních infekcí ve formě očních kapek nebo masti (Lüllmann et al., 2004).

V genetickém inženýrství se využívá kanamycin k identifikaci transformovaných rostlin, do kterých byl vnesen gen pro rezistenci vůči kanamycinu (Brown, 2007). Je tedy možnost ho zakoupit ve formě bílého prášku, který je dobře rozpustný ve vodě a aplikovat ho do agarového média (Phytotechlab, ©2019).

2.3.8 Timentin

Timentin patří do skupiny kombinovaných antibiotik s inhibitory beta-laktamas, které díky své kombinaci působí i na původně rezistentní kmeny bakterií produkujících β -laktamasy. Tento typ antibiotik se podává v případech s potvrzenou nebo vysokou pravděpodobností přítomnosti původců infekce produkující beta-laktamasy, v jiném případě se dává přednost podání samostatného účinného antibiotika (Lincová, Farghali, 2007). Timentin je využíván v regeneračním médiu k eliminaci agrobacteria při genetické transformaci cizí DNA do rostlinných buněk (Phytotechlab, ©2019).

Timentin se skládá ze dvou látek, kyseliny klavulanové v množství 200 mg a tikarcilinu v množství 3 g. Kyselina klavulanová je beta-laktamázový kompetitivní inhibitor se slabou antibakteriální účinností (Lincová, Farghali, 2007). Je produkována bakterií *Streptomyces clavuligerus* (GlaxoSmithKline, ©2008). Významným účinkem draselné soli kyseliny klavulanové je inaktivace beta-laktamas. Tikarcilin je širokospektrální polysyntetické antibiotikum, které účinkuje proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Směs těchto látek působí i na kmeny rezistentní na ticarcilin, jako jsou stafylokoky, *Escherichia coli* a *Klebsiella penumoniae* (Lincová, Farghali, 2007).

Timentin je ve formě bílého prášku, který se rozpouští ve vodě. Může být uchováván jako zásobní roztok při teplotě -20°C (GlaxoSmithKline, ©2008).

2.4 Rezistence bakterií k antibiotikům

Rezistenci lze definovat jako schopnost bakterií odolávat účinku antimikrobních látek (Hynie, 2003).

2.4.1 Typy rezistencí

Některé druhy bakterií mají primární rezistenci, jsou tedy přirozeně rezistentní, což je dáno strukturou jejich buňky (Votava, 2005). Taková bakteriální přirozeně rezistentní buňka neobsahuje cílové místo, na které antibiotikum účinkuje, nebo nemá transportní systém, který by dopravil antibiotikum do buňky, nebo například je pro ně buněčná stěna nepropustná (Schindler, 2014). Přirozeně rezistentní bakterie se vyskytují všude kolem nás, například gramnegativní střevní tyčinky jsou přirozeně rezistentní vůči penicilinu, makrolidům a linkosamidům, protože mají složení buněčné stěny takové, které tyto látky nepoškozují (Votava, 2010).

Stále větší hrozbou pro lidstvo představuje však sekundární rezistence, neboli rezistence získaná, vznikající až při léčbě antibiotiky (Votava, 2010). Již Alexandr Fleming varoval svět před nadměrným a špatným používáním antibiotik, které by mohlo vést k selekci a pomnožení rezistentně mutovaných bakterií a tím vzniku sekundární antibiotické rezistence. Tuto informaci vydal na základě svých vlastních pokusů v laboratoři (Levy, 2007). Penicilin, který objevil, účinkoval na infekce způsobené rodem *Staphylococcus aureus*. Postupem času se vyvinula rezistence, a tak je v dnešní době více než 90 % kmenů této bakterie vůči penicilinu rezistentní. Rezistence se rozvíjí především v místech častého používání antibiotik, tedy v nemocnicích a v některých případech v zemědělství (Votava, 2005). Po čase došlo bohužel k rozvoji rezistence u každých nově zavedených antibiotik (Spížek, 1999). K regulaci vzniku sekundární rezistence je tedy nutné dodržovat pravidla správného zacházení s antibiotiky, jak zmiňuji již výše v této práci.

2.4.2 Vznik a mechanismus bakteriální rezistence

Ke vzniku bakteriální rezistence je nutná přítomnost dvou hlavních faktorů v bakterii. V buňce musí být mikrobiální gen pro vznik rezistence a na bakterii musí působit selekční tlak antimikrobních látek. Stoupající rezistence je výsledkem rychlého vývojového procesu a rozmnožování bakterií a také nadměrného používání antibiotik, k čemuž dochází zvýšením selekčního tlaku z prostředí a tím k přizpůsobení bakterií na nepříznivé podmínky (Schindler, 2014). Při evoluci si tak bakterie vyvinuly mechanismy k odolávání proti antibiotikům (Levy, 2007).

Mezi tyto mechanismy patří změna vazebného místa pro antibiotika, zhoršený průnik antibiotika do buňky změnou propustnosti bakteriální stěny, aktivní vyčerpávání antibiotika z buňky a inaktivace antibiotika vlivem bakteriálních enzymů (Votava, 2010).

2.4.3 Přenos rezistence

Jednou z možností přenosu rezistence, je přenos genetické informace na přímé potomstvo, neboli přenos z generace na generaci, tento způsob se označuje jako vertikální přenos (Schindler, 2014). Princip tohoto přenosu je založen na vzniku několika generací dceřiných buněk nesoucích identickou genetickou informaci, jako má mateřská buňka, ze které vznikly (Spížek, 1999).

Druhou možností je horizontální přenos, při němž dochází k přenosu genů rezistence z jednoho organismu v jedné generaci na další jedince, i když nejsou jeho potomkem. Jedná se tedy o přímou výměnu genetického materiálu přes druhové bariéry. Bakterie tím získává nové vlastnosti (Beneš, 2018).

Tento proces přenosu je umožněn nejčastěji pomocí plazmidů, které jsou v buňce v mnoha kopiích (Schindler, 2014). Ty často nesou geny kódující produkci enzymů inaktivujících nebo rozbíjejících antimikrobiální látky. Přenos těchto tak zvaných R-plazmidů je možný nejen mezi jedním bakteriálním druhem, ale i mezidruhově (Göpfertová et al., 2002). Tento způsob přenosu je nejčastějším vznikem získané rezistence (Ho, 2000).

V genetickém inženýrství se využívaly ke konstrukci některých geneticky modifikovaných organismů selekční markery, které by mohly vést k získané rezistenci na antibiotika a to především na kanamycin, který slouží jako rezervní antibiotikum k léčbě tuberkulózy. Jedním z těchto geneticky modifikovaných organismů je GM brambor odrůdy Amflora, u které jsou využity selekční markery, které by mohly vést k rezistenci na neomycin a kanamycin (Enviweb, 2010).

2.5 Transgenoze

2.5.1 Charakteristika

Jednou z používaných metod v genovém inženýrství je transgenoze rostlin. Principem této metody je vnášení jednotlivých požadovaných genů do rostlinného genomu. Do

rostlinného genového základu se přenesou přesně definované sekvence DNA, které se poté exprimují v pořadí aminokyselin v konečném translačním produktu s definovanou úlohou v biosyntetických drahách. Plánovanou cílenou změnou získá rostlina novou požadovanou vlastnost (Bednář, 2000).

Tato metoda je používána od roku 1977, kdy bylo jednoznačně prokázáno, že půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnáší svou DNA do rostlinného genomu. Bakteriální transformace však byly známy již mnohem dříve a to ve čtyřicátých letech, předpokládalo se, že podobný proces musí být i u eukaryontních buněk. Byla zkoušena řada pokusů s exogenní DNA, ale pro nedostatečnou metodickou výbavu nebyla možná jednoznačná interpretace. Získat jednoznačný důkaz přenosu a zapojení cizorodé DNA do dědičné výbavy rostlinných buněk bylo umožněno až pomocí metod genového inženýrství.

Transgenoze se tak stala další metodou využívající se k modernímu šlechtění. Tato metoda je přirozeným pokračováním šlechtitelských metod, které zahrnují například vzdálenou hybridizaci, mutagenезi, využití *in vitro* tkáňových a buněčných kultur a molekulárních sond DNA (Ondřej, Drobník, 2002).

Rostliny, do jejichž dědičného základu byl vnesen jeden nebo několik klonovaných genů se nazývají transgenní rostliny. Transgenní rostliny, u kterých byl úmyslně změněn původní genetický materiál metodou genového inženýrství, se řadí mezi geneticky modifikované organizmy (GMO). Vkládané geny mohou být původem z dědičného základu samotné rostliny, nebo z libovolně systematicky vzdáleného organismu (Bednář, 2000).

2.5.2 Markerové geny- *GUS*, *nptII*

Při transformaci geneticky modifikovaných rostlin se používají tak zvané markerové geny, které slouží jako indikátor přítomnosti požadovaného vkládaného genu v transgenních rostlinách. Tyto geny jsou obvykle kombinovány ve stejném úseku DNA bakteriální buňky, jako požadovaný vkládaný gen, takže jsou do rostlinných buněk přenášeny všechny geny společně.

Průkaz markerových genů se provádí pomocí různých metod, mezi nejčastější a nejpřesnější patří metody polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza (Çiftçi, 2012).

Markerové geny se rozdělují na dva druhy. Jednou skupinou jsou tzv. selektovatelné transgeny, které ve velké populaci buněk slouží ke snadné selekci transgenních buněk a pletiv exprimujících klonovanou DNA, od buněk netransformovaných (Miki, McHugh, 2004). K tomu účelu jsou vhodné geny pro rezistenci vůči selektivnímu činidlu (antibiotiku), které je přidáváno do agarového média, na němž se buňky vyvíjejí. Při selekci pomocí pozitivních selekčních markerových genů transformované buňky obsahující gen pro rezistenci k příslušnému antibiotiku na takovém selekčním médiu přežívají a mohou dále růst, zatímco netransformované buňky hynou (Breyer a kol., 2014).

V molekulární biologii je nejběžněji využívaným selekčním markerem gen pro rezistenci ke kanamycinu, zvaný *nptII* z bakterie *Escherichie coli* (*E.coli*), který kóduje enzym *aminoglykosid 3'fosfotransferázu II*, známý také jako neomycin *fosfotransferáza II* (*nptII*). Tento enzym inaktivuje kanamycin a také antibiotika jemu strukturně podobná, například *neomycin* (Çiftçi, 2012). S tímto transgenem je spjata řada obav. Někteří lidé mají obavy již ze zmiňovaného horizontálního přenosu tohoto genu z transgenních rostlin do lidských organismů, neboť se obávají, že by při použití aminoglykosidových antibiotik došlo k selhání léčby bakteriálních infekcí. V roce 1993 však Světová zdravotnická organizace prohlásila, že použití markového genu *nptII* v transgenních plodinách nepředstavuje rizika pro lidské zdraví (Miki, McHugh, 2004). Neexistují vědecké důkazy spojené s přenosem markerových genů použitých v geneticky modifikovaných (GM) rostlinách a jejich vlivem na rozvoj antibiotické rezistence. I přes tato prohlášení uvažuje několik správních a regulačních orgánů, i na základě obav lidské populace, zda by se měly geny pro antibiotickou rezistenci dále v GM rostlinách používat. V souladu s komunitní strategií proti antimikrobiální rezistenci Evropská unie stanovila právní předpisy, a to identifikovat GMO, které obsahují geny rezistence vůči antibiotikům používaným pro lékařské ošetření a brát v úvahu hodnocení jejich potenciálních rizik na lidské zdraví a životní prostředí (Breyer a kol., 2014).

Projev genu *nptII* v transgenních rostlinných buňkách a pletivech je možný identifikovat různými metodami. Jednou možností je nepřímá metoda, jejíž princip je založen na vizuální detekci. Hodnotí se, zda vypěstované výhony rostlin přenesené na médium s kanamycinem, jsou schopné vytvořit kalusy a regenerovat se. Pokud ano, jedná se o

transformované buňky nesoucí gen *nptII*. Pokud ne, buňky neobsahují gen *nptII*, nejsou schopny vytvořit kalusy, nezakoření, zežloutnou a odumřou (Ondřej, Drobník, 2002).

Další možností je objektivní důkaz, k němuž se používá metoda, založená na elektroforetickém rozdělení v agarózovém gelu extrahovaných proteinů z rostlinných pletiv. Výsledkem tohoto testu je vznik charakteristických pruhů (bandy) pro gen *nptII*, jejichž lokalizace a velikost se porovnává s DNA žebříčkem (DNA ladder) (Ondřej, Drobník, 2002).

Druhým typem markerových genů jsou tak zvané reportérové (signální) transgeny, jejichž expresi lze detekovat vizuálně po histochemické analýze, čímž také pomáhají identifikovat transformované buňky (Breyer a kol., 2014). Tyto geny jsou důležitými partnery pro selekční markery. Jejich úkolem je sloužit jako měřítko stupně exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypech, v různých pletivech a za různých podmínek (Ondřej, Drobník, 2002). Nejpoužívanějším reportérovým markerem v molekulární biologii rostlin se stal gen *uidA* z bakterie *Escherie coli*, který kóduje enzym β -glukuronidázu (Karcher, 2002). Tento enzym je kyselá hydroláza, která štěpí glukuronidy (Ondřej, (Drobník, 2002). Aktivitu β -glukuronidázy je možné detekovat v segmentech rostliny histochemickou metodou. Principem této metody je použití chromogenního substrátu X-gluc (*5-brom-4-chlor-3-indolylglukuronid*), který je po rozštěpení v místě enzymatické aktivity (β -glukuronidázy), viděn jako modrá nerozpustná krystalická sloučenina (OĞRAŞ, GÖZÜKIRMIZI, 1999). Histochemický test je relativně levný, snadno proveditelný a výhodou je možné vizuální pozorování. Má však velkou nevýhodu, při testu dochází k ničení rostlinných buněk (Karcher, 2002).

2.5.3 *Ti-plazmid*

Ti (tumour inducing) plazmid pochází z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Plazmid přesahuje velikostí zhruba 200 kb a nese řadu genů účastnících se infekčního procesu (Brown, 2007). Aby mohlo docházet k indukci tumorů u rostlin, musí být geny Ti plazmidu v interakci s chromozomálními lokusy.

Část molekuly Ti plazmidu se po infekci integruje do rostlinné chromozomální DNA. K tomu jsou nepostradatelné jeho dva úseky (Ondřej, 1992). Úsek, jenž je přenášen do rostlinného genomu se nazývá T-DNA a jeho velikost je závislá na kmenu

Agrobacterium, obvykle je dlouhý od 15 do 30 kb (Brown, 2007). Úsek virulence obsahuje geny nutné pro funkce podmiňující přenos T-DNA do rostlinných buněk a její integraci v rostlinném genomu. Další úseky jsou potřebné pro funkci plazmidu v bakteriálních buňkách a pro interakci mezi bakteriemi a rostlinnými buňkami (Ondřej, 1992).

Díky těmto vlastnostem je Ti plazmid často používán v genetickém inženýrství jako Ti vektor k přenosu nových genů do rostlinné buňky. Vědci však musí úsek T-DNA upravit, neboť obsahuje nádorové geny. Nádorové geny nejsou k infekčnímu procesu zapotřebí, takže Ti vektor jich může být zbaven. Infekčního procesu se účastní pouze dvě opakující se sekvence o délce 25 kb, které jsou lokalizovány na levé a pravé hranici oblasti integrované do rostlinné DNA. Mezi tyto opakující se sekvence lze místo nádorových genů vložit geny nové a jejich přenesení bude uskutečněno stejným způsobem, jako by se jednalo o původní T-DNA, takže infekční proces nebude narušen. Mezi hraniční sekvence T-DNA se obvykle vkládají geny, jež dávají rostlině novou specifickou vlastnost a dále geny selekční a reportérové, které umožňují rozpoznat transformované buňky (Brown, 2007).

2.5.4 Transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

Jak je již zmíněno v předchozím textu, k transformaci rostlin je nutná bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a její Ti plazmid obsahující upravený úsek T-DNA a úsek virulence. Úsek virulence se skládá ze šesti operonů: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* a *virG*. Tyto operony podmiňují přenos T-DNA do rostlinných buněk. Přenos T-DNA do rostlinných buněk indukují fenolické látky typu acetosyringon, k nimž patří např. acetovanilon, hydroxyacetofenon nebo kyselina galová. Úsek *vir* je částečně indukován flavonoidy a kyselinou skořicovou. V interakci s acetosyringonem geny úseku virulence aktivují i specifické nízkomolekulární látky rostlinných nádorů, indukovaných bakteriemi *Agrobacterium*, nazývaných opiny. Na buněčných stěnách bakterií *Agrobacterium tumefaciens* jsou specifické proteinové receptory, které všechny tyto látky rozeznávají, čímž způsobují přiblížení bakterií k rostlinným pletivům chemotaxí, nasedání bakterií na buněčné stěny rostlinných buněk a aktivaci genů úseku virulence. Fenolické látky jsou produkovány poraněnými buňkami většiny dvouděložných rostlin.

T-DNA se do genomu zabudovává převážně v genových sekvencích. Celý sled dějů vedoucích k zabudování T-DNA do rostlinných buněk lze vyjádřit v několika bodech.

1. Rozpoznání citlivých poraněných buněk bakteriemi *Agrobacterium*.
2. Sekrece fenolických a dalších látek poraněnými rostlinnými buňkami, které působí jako signály pro aktivaci genů *vir*-oblasti plazmidů Ti.
3. Pozitivní chemotaxe bakterií k rostlinným buňkám.
4. Připojení bakterií k rostlinným buňkám zprostředkované geny *chvA*, *chvB* a *pcsA* chromozomální DNA bakterií *A.tumefaciens*, Následná vazba signálních molekul na receptorové proteiny buněčných stěn produkované *virA*.
5. Přenos signálů přes bakteriální buněčnou stěnu a následuje aktivace transkripce genů *virB*, *virC*, *virD*, *virE*.
6. Uvolnění jednovláknových kopií T-DNA, které mohou být do rostlinných buněk.
7. Vznik jednovláknových zlomů na specifických místech. Zlomy jsou indukovány endonukleázou kódovanou geny *virD1* a *virD2*.
8. Odkrucování jednovláknové T-DNA zprostředkované proteiny, které jsou kódovány geny *virD1*, *virD2* a *virE2*.
9. Vytvoření přenosového komplexu T-DNA a polypeptidů kódovaných geny *virD1*, *virD2* a *virE2* a je možné že i některými *virB*.
10. Přenos tohoto komplexu přes bakteriální a rostlinné buněčné stěny.
11. Vnesení T-DNA do buněčného jádra a následuje poslední krok, čímž je zabudování T-DNA do jaderné DNA rostlinné buňky (Ondřej, Drobník, 2002).

2.5.5 Tabák virginský

Tabák virginský (*Nicotiana tabacum*) je jednoletá rostlina z čeledi *Solanaceae* dorůstající se výšky až 2 metrů. Má žlaznaté trichomy, kopinaté podlouhlé široké listy a nálevkovité květy růžovo-bílé barvy. Plody jsou dvoupouzdré tobolky, obklopené vytrvávajícím kalichem, které za zralosti pukají dvěma chlopněmi. Tobolka obsahuje četná drobná semena, z kterých lze vypěstovat další rostliny.

Tento druh pochází z Jižní a Střední Ameriky. V Evropě se dříve pěstoval jako léčivá a okrasná rostlina, až později pro alkaloidy, které jsou obsaženy v listech. V současné době je používán hlavně k výrobě cigaret a doutníků (Atlas Rostlin, ©2020).

Tabák je také vhodný jako modelová rostlina pro genetické manipulace. Dobře reaguje na bakteriální infekci, lze dobře transformovat, je vhodný ke studii exprese genů po infiltraci *Agrobacteria* do listů a má dobrou schopnost regenerace v tkáňových kulturách. Další výhodou je výborný růst v *in vitro* podmínkách a nenáročnost na substrát (Goodin et al., 2008).

2.6 Geneticky modifikované organizmy

2.6.1 Charakteristika

Geneticky modifikované organizmy (GMO) lze definovat jako organizmy (s výjimkou lidského organismu), ve kterých byl změněn genetický materiál způsobem, kterého nelze dosáhnout přirozenou rekombinací. Jedná se tedy o cíleně navozenou změnu v sekvencích DNA provedenou vložením nového cizího genu (transgenu) nebo utlumením nežádoucího genu v organismu pomocí genetického inženýrství (Verma et al., 2011). Tento proces se označuje jako transgenóza a vzniklé organizmy charakteristické vlastnostmi, které by v přírodě evolucí sami nevytvořili, se označují jako transgenní (Rosypal, 2003). Do genomu těchto transgenních organismů je začleněna rekombinantní DNA, která se skládá z promotoru (sekvence DNA, která má schopnost vázat RNA-polymerázu a tím zahajovat přepis genu), vlastní kódující sekvence daného organismu (vkládané transgeny) a terminátoru (struktura DNA k ukončení transkripce). Takovýto konstrukt by měl být stabilně integrován do genomu transformovaného organismu a přenášen do dalších generací (Ovesná, Demnerová, 2014). Genový přenos je tedy využíván k úpravě fyzického a chemického složení organismů a nutričních hodnot potravin (Verma et al., 2011).

2.6.2 Využití GMO

GMO mají široké uplatnění, neboť se používají v biologickém a lékařském výzkumu, výrobě farmaceutických léčiv, experimentální medicíně a především v zemědělství.

Hlavními důvody a cíli vedoucí k výrobě a používání GMO jsou zvýšit výnosy a nutriční hodnotu zemědělských potravin, produkci hospodářských zvířat a omezit

chemizaci v zemědělské výrobě, zlepšit chuť, kvalitu a trvanlivost potravin, připravit enzymy s novými vlastnostmi a nové typy léčiv a biopreparátů, vyznačující se vyšší účinností bez nežádoucích účinků, využít mikroorganismy pro ekologické čištění půdy a vody a připravit transgenní rostliny a zvířata produkující farmakologicky aktivní látky (Rosypal, 2003).

První přenos genů a velký přínos pro zdravotnictví nastal v roce 1982, kdy byl připraven v bakteriích metodami genového inženýrství lidský inzulin, používající se k léčbě pacientů trpících cukrovkou (Yount, 2008). Dále následovala příprava růstového hormonu a u kvasinek se podařilo zavedením genu pro tvorbu povrchového antigenu viru hepatitidy B připravit první očkovací látku proti této nemoci (Rosypal, 2003).

Použitím biotechnologie v zemědělství bylo vytvořeno množství komerčně dostupných geneticky modifikovaných odrůd, zejména řepka, brambora, bavlna, kukuřice a sója (Verma et al., 2011). První geneticky modifikovanou plodinou využívající se v praxi bylo rajče, u něhož byla utlumena činnost enzymu *polygalakturonázy*, který štěpí pektin ve slupce a rajče tak měkne. Toto transgenní rajče tak bylo možné sbírat ve zralém stavu a přesto zůstalo tvrdé, voňavé a dlouho čerstvé (Yount, 2008). Genové inženýrství v zemědělství umožňuje zvýšení produkce plodin, jakož i zvýšení odolnosti např. vůči škůdcům, virům, mrazu, suchu.

V současné době jsou často používané GM plodiny s vlastnostmi tolerance vůči herbicidům (nejčastěji ke glyfozátu) nebo škůdcům, někdy jsou dokonce používány obě tyto vlastnosti v jedné GM plodině (Verma et al., 2011). V české republice je povoleno komerčně pěstovat pouze GM Bt kukuřici, která produkuje Bt toxin, což jí umožňuje ochranu proti zavíječi kukuřičnému, jehož housenky jinak žírem závažně poškozují rostliny kukuřice a následně se zvyšuje napadení zrn v palici houbovými chorobami, což má za následek pokles množství i kvality sklizeného produktu (Holec, Soukup, 2006).

2.6.3 Značení a detekce GMO

Každý spotřebitel má mít právo možnosti výběru a svobodné volby, zda si GM potraviny koupí či nikoliv. V evropské unii vznikla velmi přísná pravidla a požadavky pro povolování nových GMO a hodnocení rizika při jejich uvádění na trh a do životního prostředí a pro označení GMO a jejich produktů, které se dostanou do oběhu mezi

spotřebitele. Tyto požadavky jsou uvedeny v nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1830/2003, o zpětné sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a o sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z GMO a o změně směrnice 2001/18/ ES, nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. Dle těchto nařízení se musí označovat nejen samotné GMO, ale i produkty obsahující či vyrobené z GMO mající podíl jednotlivých geneticky modifikovaných složek nebo složky v produktu vyšší než 0,9 %. V tomto případě se jedná o výrobky s náhodnou příměsí GMO, jejíž přítomnosti nelze technicky zabránit (Čeřovská et al., 2006).

Pravidla a požadavky pro činnosti s GMO jsou v České republice stanovena zákonem č. 78/2004 Sbírka, o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Podrobnosti upřesňuje prováděcí vyhláška č. 209/2004 Sbírka, o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty (Doubková, 2006).

Aby mohly být geneticky modifikované organismy a jejich produkty uvedeny na trh, musejí být podrobně otestovány, že nepůsobí negativně na zdraví člověka, zvířat a na životní prostředí. Zároveň musejí být viditelně označovány, že se jedná o transgenní organismy. Aby však mohla být přítomnost GMO v označených potravinářských produktech kontrolována, bylo nutné zavedení spolehlivých a přesných metod k detekci transgenů v těchto produktech. K detekci GMO mohou být použity metody jako je hmotnostní či infračervená spektrometrie, histochemický test nebo chromatografie. Nejspolehlivější a nejúčinnější využívanou metodou k detekci transgenů v GM produktech je PCR (polymerázová řetězová reakce) (Ondřej, Drobník, 2002).

2.6.4 Rozdělení transgenních rostlin

Transgenní plodiny nesou velkou řadu odlišných vlastností, díky nimž mohou být výhodné pro pěstitelé, spotřebitele nebo různá odvětví průmyslu. Dle jejich specifických vlastností je lze rozdělit do 5 skupin (generací).

1. Generace plodin zahrnuje plodiny vyznačujícími se přínosy zejména pro pěstitelé. Transgenní odrůdy patřící do této skupiny usnadňují ochranu proti chorobám, plevelům a škůdcům.

2. Generace plodin zahrnuje transgenní plodiny odolné vůči abiotickým stresům, čímž mohou být například rezistence nebo tolerance k chladu, suchu, zasolení půdy či nedostatku světla. Transgenní plodiny s těmito vlastnostmi přináší výhody primárně zemědělcům.

3. Generace plodin zahrnují transgenní plodiny s vyšší nutriční hodnotou, s antikancerogenními a jinými zdravotně působícími a léčivými účinky. Tato skupina plodin přináší výhody spotřebitelům.

4. Generace plodin zahrnuje plodiny pěstované jako ekologické výhodně suroviny pro některá průmyslová odvětví.

5. Generace plodin zahrnuje transgenní rostliny používané jako náhradu fosilních paliv.

V současnosti jsou pěstovány především plodiny první generace. Ty obsahují transgeny pro toleranci k neselektivním herbicidům, umožňující snadnější ochranu porostů před zaplevelením. Dále jsou využívány plodiny s vnesenou rezistencí k hmyzím škůdcům (Bednář, 2000).

2.6.5 GM brambory Amflora

V roce 2010 povolila evropská komise pěstovat v evropské unii geneticky modifikované brambory odrůdy Amflora firmy BASF, které mají sloužit k průmyslovému využití a je možné s nimi krmit i hospodářská zvířata. Běžné brambory obsahují přibližně 80 % amylopektinu (škrob) a 20 % amylózy (škrob). V průmyslu se využívá k výrobě papíru, textilu a lepidel bramborový škrob, především amylopektin, neboť amyláza gelovatí a tím způsobuje při zpracování problémy. Průmysl by proto rád pracoval s brambory obsahující pouze amylopektin.

Firma BASF tak vyšla poprvé vstříc. Genetičtí inženýři vnesli do brambor pomocí *Agrobacterium tumefaciens* tzv. antisens RNA. V modifikovaných rostlinách se tak kromě původní RNA syntetizuje také antisens RNA (zrcadlová kopie původní RNA), která je k ní komplementární a může s ní vytvářet dvouřetězcovou RNA, čímž zabrání správnému fungování genu, jenž je nezbytný k syntéze amylózy. Produkce amylózy v takto upravené rostlině je téměř nulová, brambora Amflora obsahuje tedy pouze užitečný amylopektin.

Aby bylo možné v těchto geneticky modifikovaných bramborách pozměněné buňky odlišit, k označení modifikované DNA byly použity selekční markery. Konkrétně gen způsobující rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu a neomycinu (Vondrejs, 2010). Kvůli tomuto použitému selekčnímu markeru organizace Greenpeace zpochybňuje nezávadnost brambor Amflora k lidskému zdraví a životnímu prostředí. Greenpeace patří mezi silné odpůrce GMO a vyzývá jednotlivé členské státy Unie, aby vůči GM odrůdě Amflora uplatnily národní zákaz (Drobník, Klimovičová, 2010).

Greenpeace organizace také prohlašuje, že tyto modifikované GM brambory firmy BASF obsahující gen způsobující rezistenci vůči kanamycinu a neomycinu by mohly zvýšit rezistenci vůči těmto antibiotikům tím, že gen *nptII* by mohl přejít z bramboru na choroboplodné bakterie, ty by se staly odolnými vůči těmto antibiotikům a mohlo by docházet k selhání léčby u bakteriálních infekcí. Někteří lidé tak mají strach z použití těchto GM plodin a z konzumace GM potravin obsahujících gen *nptII*, které by mohly být potenciální hrozbou pro jejich zdraví (Ho, 2000). Obávají se, že by při procesu rozkládání a trávení těchto plodin došlo k rozštěpení DNA z modifikovaného organismu a byla by přijata do genetické výbavy bakterií vyskytujících se ve střevech nebo v životním prostředí (Nazeleno, 2008). Což by mohlo vést již ke zmiňované neúspěšné léčbě lidských infekčních bakteriálních onemocnění, na které se tyto léky používají (Osel, 2008). Gen rezistence na kanamycin je však obsažen přirozeně v pěti až deseti ze sta bakteriích žijících v půdě, odkud se dostávají na plodiny, do vody, do vzduchu a my je běžně konzumujeme. Hygienické normy povolují až deset milionů různých půdních bakterií v jednom gramu naší potravy. Z těchto počtů vyplývá, že denně zkonzumujeme v bakteriích kolem sta milionů genů určujících necitlivost na kanamycin. Dosud nebyl zaznamenán ani žádný přenos kanamycin rezistentního genu z rostliny do bakterie (Drobník, Klimovičová, 2010).

Světová zdravotnická organizace a Evropská agentura pro léčiva potvrdily, že kanamycin i neomycin jsou klinicky důležitými antibakteriálními preparáty. Evropská unie přitom po roce 2004 využití selekčních markerů, které mohou vést k rezistenci na antibiotika, zakázala. GM brambory firmy BASF by tak potenciálně mohly přispět ke zvýšení bakteriální rezistence vůči významným lékům na závažné choroby, včetně prostředků pro léčbu tuberkulózy (SZIF, 2010).

Další obava v pěstování těchto modifikovaných brambor spočívá z nebezpečí úniku modifikačního genu a tím k nekontrolovatelnému šíření modifikovaného organismu. Koexistence modifikovaných a nemodifikovaných brambor by mohla nastat pouze tehdy, kdyby nějaké hlízy modifikované odrůdy zůstaly po sklizni v zemi a pole by bylo v následující sezóně oseto nemodifikovanými bramborami. Problém nekontrolovatelného šíření pohlavním rozmnožováním nehrozí, neboť brambory se většinou množí vegetativně hlízami nebo jejich částmi (Vondrejs, 2010).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin již dvakrát potvrdil, že brambory Amflora nepředstavují rizika pro lidské zdraví a životní prostředí. Rozhodnutí o pěstování brambor Amflora nyní záleží na lidech a úřadech, zda se nechají ovlivnit nepodloženými informacemi hlášenými organizací Greenpeace, či budou věřit mnoha vědcům a úřadům zkoumajícím bezpečnost těchto plodin a následným prohlášením o jejich bezpečnosti (Havel, 2010).

Vyvolané obavy z konzumace a použití geneticky modifikovaných organismů jsou způsobeny tedy u některých lidí především nedostatkem informací, nebo získáním negativních informací od zdrojů bojujících proti těmto geneticky modifikovaným organismům (Drobník, 2010).

2.7 Metody analýzy

2.7.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) patří mezi nejvýznamnější a nejvyužívanější techniky studie genů a je tak velkým přínosem pro molekulární biologii (Brown, 2007). Princip PCR spočívá v enzymatické amplifikaci DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (Bartůňková, Paulík, 2005). Amplifikovat lze libovolný úsek molekuly DNA, ale pouze za předpokladu, že jsou známy okrajové sekvence tohoto úseku (Brown, 2007). Požadovaný úsek nukleotidové sekvence k namnožení je vymezen pomocí dvou specifických primerů (oligonukleotidů), které se vážou na protilehlé řetězce DNA. Tyto primery jsou tvořeny 18 až 25 nukleotidy a označují počátek syntézy nového vlákna (Šmarda et al., 2005). K amplifikaci DNA se používá termostabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, nejčastěji tzv. Taq polymeráza, která je odolná proti denaturaci. Syntéza probíhá ve směru od 5'konce ke 3'konci (Brown, 2007). PCR se

provádí v zařízení nazývaném termocyklér, který umožňuje automatické specifické střídání teploty. Výsledným produktem PCR jsou amplikony (úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp), jejichž přítomnost se prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou (Šmarda et al., 2005).

Princip PCR

Při procesu PCR se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje se specifickými nároky pro danou teplotu. (Šmarda et al., 2005). Během každého cyklu PCR se teplota reakční směsi změní třikrát. V prvním kroku dochází k denaturaci dvouřetězcové DNA (obvykle při teplotě 94°C), čímž se od sebe uvolní jednotlivá vlákna DNA, která poté slouží jako templáty v dalších cyklech syntézy. Poté se směs zchladí na tzv. annealing teplotu a dochází k hybridizaci primerů na komplementární 3' a 5' konce templátů (Brown, 2007). Annealingová teplota se pohybuje v rozmezí 50-60°C. Hybridizované primery slouží jako základ pro syntézu nových vláken, a aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v reakční směsi velké množství deoxynukleotidtrifosfátů. Tato syntéza je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (Bartůňková, Paulík, 2005). Pro její správnou funkci se do reakční směsi přidává pufr obsahující Mg^{2+} . V posledním kroku dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA prostřednictvím DNA polymerázy obvykle při extenzní teplotě 65-74°C (Šmarda et al., 2005). Po dokončení syntézy obou vláken je směs opět ohřata na 94°C, aby došlo k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů, a celý cyklus začíná znovu. Po každém cyklu dochází k zdvojnásobení počtu kopií úseku mezi nasedlými primery, sekvence DNA tedy roste logaritmicky (Bartůňková, Paulík, 2005). Počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a obvykle se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů (Šmarda et al., 2005).

2.7.2 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin, díky níž si lze ověřit výsledky většiny PCR experimentů (Brown, 2007). Princip elektroforetické separace spočívá v rozdělení molekul ve stejnosměrném elektrickém poli na základě jejich povrchového náboje. Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny se záporným nábojem, a proto se v elektrickém poli pohybují k anodě (opačně nabitě elektrodě).

Jako nosič se u gelové elektroforézy používá agaróza, která vytváří složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Tento agarózový gel je vhodný pro separaci molekul o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kb. Molekuly DNA a její fragmenty o neznámé velikosti se stanovují srovnáním s velikostními standardy, tzv. DNA ladder.

Ke zviditelnění a identifikaci polohy separovaných molekul je potřeba použít ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení ultrafialovou lampou emituje světlo. Poté lze molekuly DNA o stejné velikosti zpozorovat na gelu jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA.

Gelovou elektroforézu lze také použít pro separaci a studium molekul DNA nacházejících se v různých molekulárních typech. Je tak možné odlišit kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od molekul lineárních nebo od otevřených kružnic, neboť každá tato forma se pohybuje v agarózovém gelu odlišnou rychlostí (Šmarda et al., 2005).

3. Cíle práce a výzkumné otázky

Cíle práce:

- Vypracování literární rešerše týkající se GMO a jejich vlivu na zdraví člověka a lidská infekční onemocnění, konkrétně bakteriální léčená antibiotiky.
- Cílem praktické části je vypěstování geneticky modifikovaného tabáku nesoucího uměle vložený gen pro rezistenci vůči kanamycinu, pomocí agrobakteriální transformace.
- Ověření přítomnosti genu *nptII* v GM tabáku pomocí metod PCR amplifikace, elektroforetickým testem a histochemicky.
- Zjištění počtu kopií vneseného genu pomocí sledování chování následující generace na selekčním médiu obohaceném kanamycinem.

Výzkumné otázky:

- Je pro ověření přítomnosti genu pro rezistenci na kanamycinovou rezistenci v GMO rostlinách vhodnější konkrétní režim PCR amplifikace a elektroforetický test, nebo histochemický test?
- Kolik kopií vneseného genu se přenesou do další generace rostlin?

4. Materiál a metody

4.1 Charakteristika

Praktická část mé bakalářské práce je zaměřena na vypěstování geneticky modifikovaného tabáku transformovaného bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* nesoucími selekční marker zajišťující rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu a reportérový marker *GUS*, izolaci rostlinné DNA z 3 vzorků vypěstovaného GM tabáku, dále na detekci transgenů v GM tabácích pomocí amplifikace specifického úseku DNA metodou PCR a vizualizaci výsledků gelovou elektroforézou a histochemickou metodou. Pomocí agrobakteriální transformace jsem přenášela gen *nptII* a *GUS* do tabáku. Poté co GM tabák dorostl do fáze květenství a bylo možné odebrat semena, byla semena vyseta na selekční médium obohacené kanamycinem za účelem zjištění počtu kopií vnesených transgenů v následující generaci.

Praktickou část své bakalářské práce jsem prováděla v laboratořích Ústavu molekulární biologie rostlin AV v Českých Budějovicích. Vzorky potřebné k vypracování mé praktické části mi byly poskytnuty Ústavem molekulární biologie rostlin AV. Konkrétně byly použity vzorky bakterií *Agrobacterium tumefaciens* značené v tomto ústavu jako kmen 4490, které nesou Ti plazmid obsahující vnesené transgeny *nptII* a *GUS* a dále mi byly poskytnuty 3 listy nemodifikované rostliny *Nicotiana tabacum*.

Veškerá práce s rostlinami a kulturami bakterií probíhala se sterilizovanými pomůckami v sterilizovaném laminárním boxu.

4.2 Kultivační média

K pěstování a kultivaci rostlin a bakterií jsou zapotřebí média obsahující živiny. K selekci transgenních rostlin jsou zapotřebí selekční média obsahující příslušné antibiotikum k použitému transgenu. Pro mou práci bylo zapotřebí vyrobit MS média, MS.R média a LK média.

4.2.1 MS médium

MS médium s vitamíny (Murashige and Skoog media) slouží jako kultivační výživové agarové médium pro rostlinné části tabáku. Toto médium musí mít pH přesně 5,8.

Tabulka 1. Chemikálie na výrobu 500 ml MS média

Chemikálie	Množství
MS médium s vitamíny	2,2 g
Sacharóza	15 g
Plant agar	2,5 g
Destilovaná voda	500 ml

Zdroj: vlastní

Pracovní postup

1. Na analytických vahách jsem navážila 2,2 g MS média obsahující vitamíny, 15 g sacharózy a 2,5 g plant agaru. MS médium a sacharózu jsem rozpustila s 250 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchačce. Plant agar jsem vsypala do 200 ml vody a tuto směs jsem nechala rozvařit v mikrovlnné troubě po dobu 5 minut.

2. Poté jsem obě směsi smíchala dohromady.

3. Takto připravené médium jsem potřebovala upravit na přesné pH 5,8. Toho jsem docílila postupným přidáváním KOH (1 M) po kapkách za stálého míchání na magnetickém míchadle, dokud směs neměla správnou hodnotu pH. Poté jsem destilovanou vodou doplnila objem na 500 ml.

4. Tuto směs jsem nechala po dobu 20 minut a při 121°C sterilizovat v autoklávu v uzavřené láhvi označenou sterilizační páskou, která indikuje, že byl roztok správně vysterilizován.

5. Poté jsem nechala směs vychladnout na 60°C. Vychladlou směs jsem ve sterilním boxu rozlila do sterilních Petriho misek.

4.2.2 MS.R médium

MS.R médium (Murashige and Skoog media) je kultivační agarové médium obohacené antibiotiky a hormony, které slouží k regeneraci tabákových transformantů. Přidaná antibiotika slouží k selekci transgenních rostlin od netransgenních a přidané hormony pro podporu tvorby kalusu. Toto médium musí mít pH přesně 5,8.

Tabulka 2. Chemikálie na výrobu 1 l MS.R média

Chemikálie	Množství
MS médium	4,4 g
Sacharóza	30 g
BAP zásobní roztok	1 ml
NAA zásobní roztok	1 ml
Plant agar	6 g
Kanamycin	100 mg
Timentin	250 mg
Destilovaná voda	1000 ml

Zdroj: vlastní

Pracovní postup

1. Na analytických vahách jsem navážila 4,4 g MS média, 30 g sacharózy, 6 g plant agaru. Chemikálie jsem vsypala do 950 ml vody. K tomu jsem přidala 1 ml zásobního roztoku BAP a 1 ml zásobního roztoku NAA.
2. Takto připravenou směs jsem nechala důkladně promíchat magnetickým míchadlem.
3. Změřila jsem pH směsi pomocí pH metru, postupným přidáváním KOH (1 M) jsem ji upravila na přesné pH 5,8 a objem doplnila destilovanou vodou na 1000 ml.
4. Takto připravené médium jsem nechala po dobu 30 minut a při teplotě 120 °C sterilizovat v autoklávu ve skleněné lahvi označenou sterilizační páskou, která indikuje, že byl roztok správně vysterilizován.
5. Médium jsem nechala vychladnout. Poté jsem ve sterilním boxu přidala sterilní špičkou do média 250 mg timentinu (antibiotikum) a 100 mg kanamycinu (antibiotikum). Krouživými pohyby láhvi jsem znovu promíchala směs.
6. Připravené MS.R médium jsem rozlila ve sterilním boxu do sterilních Petriho misek.



Obrázek 1. Připravená MS.R média ve flow boxu

4.2.3 LK médium

Tekuté LK médium slouží ke kultivaci bakterií používaných k transgenozí. Toto médium musí mít pH přesně 6,5.

Tabulka 3. Chemikálie na přípravu 1 l LK média

Chemikálie	Množství
Sacharóza	10 g
Kasein hydrolyzát	8 g
Kvasničný extrakt	4 g
KH_2PO_4	2 g
MgSO_4	0,3 g
Destilovaná voda	1000 ml

Zdroj: vlastní

Pracovní postup

1. Na analytických vahách jsem navážila 10 g sacharózy, 8 g kasein hydrolyzátu, 4 g kvasničného extraktu, 2 g KH_2PO_4 a 0,3 g MgSO_4 .

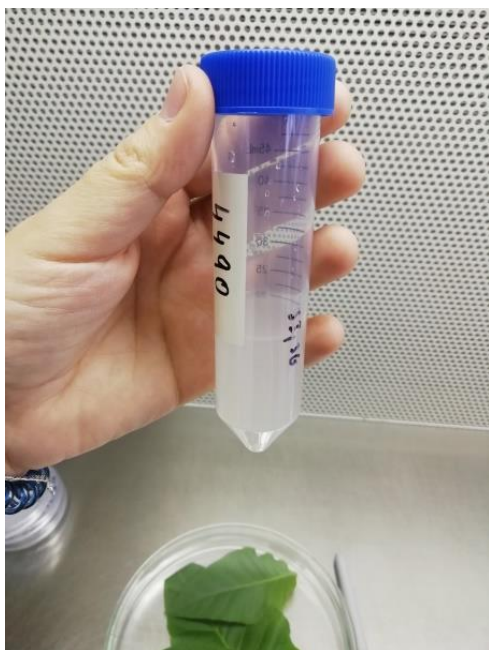
2. Navážené chemikálie jsem vsypala do 800 ml destilované vody a směs nechala promíchat na magnetickém míchadle.
3. Poté jsem změřila pH směsi pomocí pH metru a upravila jej přesně na pH 6,5 pomocí postupným přidáváním NaOH (1 M). Destilovanou vodou jsem doplnila celkový objem na 1000 ml.
4. Připravené médium jsem nechala po dobu 30 minut a při 120 °C autoklávovat v lahvi označenou sterilizační páskou, která indikuje, že byl roztok správně vysterilizován.
5. Poté jsem nechala médium vychladnout. Do vychladlého média bylo možné naočkovat bakterie.

4.3 Příprava bakterií použitých k transformaci

Pro mou bakalářskou práci jsem použila bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které mi byly poskytnuty Ústavem molekulární biologie rostlin (UMBR) AV. Bakterie jsou ve sbírce tohoto ústavu vedeny jako kmen 4490 a uchovávány v mrazicím boxu při -80°C. Tento kmen bakterií nese Ti plazmid obsahující technikami rekombinantní DNA vložené transgeny v úseku T-DNA, selekční gen pro kanamycinovou rezistenci *nptII* a reportérový gen *GUS*. Bakterie byly nejdříve napěstovány na pevném LK médiu obsahujícím kanamycin (50 mg/l).

Pracovní postup

1. Do 20 ml tekutého LK média jsem sterilní kličkou naočkovala Agrobacterie a nechala jsem je kultivovat 16 hodin na třepačce při teplotě 28°C, aby narostl dostatečný počet bakterií pro infiltraci.
2. Poté jsem bakterie zcentrifugovala při 4500 otáčkách za minutu po dobu 20 minut při teplotě 20°C, čímž jsem získala peletu.
3. Bakteriální peletu jsem resuspendovala v 0,01 M MgSO₄. Mg napomáhá stimulaci při procesu přenosu DNA.
4. 20 ml kultury jsem obohatila acetosyringonem (200 µl 20 mM HCS) a tuto suspenzi jsem nechala 10 minut na třepačce. Takto připravenou suspenzi jsem již mohla použít k transformaci.



Obrázek 2. Suspenze bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

4.4 Izolace plazmidové DNA metodou minipreps

K důkazu existence plazmidu nesoucího transgeny *nptII* a *GUS* jsem izolovala DNA z použitých bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. DNA jsem izolovala také z bakterií rodu *E.coli* poskytnutých od UMBRu, neboť tyto bakterie slouží také jako modelový organismus a využívají se k uchovávání plazmidu nesoucího transgeny *nptII* a *GUS*.

Tabulka 4. Složení roztoku A na 1l

Chemikálie	Množství
TRIS (1 M, pH 8)	25 ml
EDTA (0,5 M)	20 ml
Glukóza (20%)	45 ml
Destilovaná voda	910 ml

Zdroj: Vlastní

Tabulka 5. Složení roztoku B na 100 ml

Chemikálie	Množství
NaOH (0,2 M)	0,798 g
SDS (2%)	2 g
Destilovaná voda	100 ml

Zdroj: Vlastní

Popsaný postup je stejný pro oba druhy bakterií.

Pracovní postup

1. Do mikrozkušavky jsem napipetovala 1,5 ml bakteriální kultury. Bakterie jsem nechala stočit v centrifuze při 14 000 otáčkách za minutu po dobu dvou minut. Poté jsem odsála přebytečný roztok čtverečkem buny.
2. Do mikrozkušavky jsem znovu napipetovala 1,5 ml bakteriální kultury a vzorek znovu stočila při 15000 otáčkách za minutu po dobu dvou minut.
3. K vzniklému sedimentu bakterií jsem přidala 200 μ l roztoku A a směs resuspendovala pár sekund na vortex mixeru.
4. Dále jsem přidala 400 μ l roztoku B a směs okamžitě 6x promíchala rychlým převrácením. Poté jsem nechala směs stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Probíhala lyze buněk, oddělení proteinů od DNA a denaturace.
5. Následně jsem přidala 250 μ l 7,5 M octanu amonného a směs opatrně promíchala převrácením po dobu 1 minuty. Poté jsem dala směs na 30 minut do mrazáku při teplotě -20°C .
6. Poté jsem směs 2x centrifugovala při 14000 otáčkách za minutu po dobu dvou minut.
7. Vzniklý supernatant jsem přelila do čisté zkumavky a přidala k němu 0,5 ml isopropanolu, směs jsem promíchala a nechala hodinu stát.
8. Poté jsem směs centrifugovala při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut v chlazené centrifuze.

9. Přebytečný roztok jsem odsála, k sedimentu jsem přidala vychlazený 70% etanol a směs dala znovu centrifugovat na dvě minuty při 15 000 otáčkách za minutu.

10. Přebytečný etanol jsem vylila a mikroskopickou skúmavku se sedimentem nechala 30 minut sušit na buničině.

11. Nakonec jsem do mikroskopické skúmavky přidala 30 µl sterilní destilované vody. Nyní byla směs připravena k následné elektroforéze.

4.5 Gelová elektroforéza z bakterií *A. tumefaciens* a *E. coli*

K vyhodnocení přítomnosti plazmidů v bakteriích jsem použila vyizolovanou plazmidovou DNA z bakteriálních vzorků a její přítomnost zobrazila pomocí gelové elektroforézy. Pro separaci fragmentů DNA jsem připravovala 1 % gel. Pro vizualizaci plazmidové DNA jsem aplikovala do gelu ethidium bromid, jehož vlastností je vmezeřovat se mezi jednotlivé báze DNA a po ozáření ultrafialovým zářením emitovat světlo.

Tabulka 6. Složení zásobního roztoku 50x koncentrované TAE na 1 l

Chemikálie	Množství
Tris (pH 8)	242 g
Ledová octová kyselina	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml

Zdroj: Vlastní

Pro elektroforetickou separaci se ředí 50x koncentrovaný TAE pufr na pracovní roztoky o koncentraci 1x. Na 2 litry 1xTAE pufru se použije 1960 ml destilované vody a 40 ml 50xTAE pufru.

Pracovní postup

1. Nejdříve jsem si připravila 1 % gel. Do skleněné lahve jsem navážila 800 mg 1 % PCR agarózy a přidala jsem 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufru.

2. Tuto směs jsem dala rozvařit do mikrovlnné trouby na 4 minuty.

3. Když byl gel zcela čirý a rozvařený, nechala jsem ho zchladit na 50°C pod tekoucí vodou.
4. Poté jsem do zchladlé směsi přidala 10 µl ethidium bromidu.
5. Tuto směs jsem nalila do utěsněné elektroforetické vaničky, do směsi jsem vložila hřebínek pro vytvoření jamek a poté jsem nechala směs 30 minut ztuhnout.
6. Ze ztuhlého gelu jsem vyjmula hřebínek a gel s vaničkou jsem vložila do elektroforetické vany obsahující TAE pufr.
7. Do jednotlivých vytvořených jamek v gelu jsem napipetovala 9 µl vyizolované DNA z bakterie *A.tumefaciens* a 1 µl nanášecího pufru (loading buffer) a do další jamky 9 µl vyizolované DNA z bakterie *E.coli* 1 µl nanášecího pufru (loading buffer). Do další jamky jsem napipetovala 10 µl 1 kb ladderu (molekulový žebříček).
8. Elektroforetickou vanu jsem připojila ke zdroji napětí o velikosti 80 V po dobu 60 minut.
9. Závěrečným krokem tohoto procesu bylo nasvícení gelu ultrafialovým světlem, vyfotografování a zhodnocení výsledků.

4.6 Transformace listových segmentů *Nicotiana tabacum*

Jako modelový organizmus jsem použila tabák virginský (*Nicotiana tabacum*). UMBR AV mi poskytl 3 mladé listy netransformovaného tabáku pěstovaného v nesterilních skleníkových podmínkách, z kterých jsem vystříhla 30 segmentů k transformaci. Segmenty bylo nutné sterilizovat, což jsem provedla v roztoku obsahující chlornan sodný (5%) a kapku detergentu (jar). K transformaci tabáku jsem použila suspenzi bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (nesoucí transgeny *nptII* a *GUS*), kterou jsem si připravila den předem. Práci jsem prováděla za sterilních podmínek ve flow boxu.

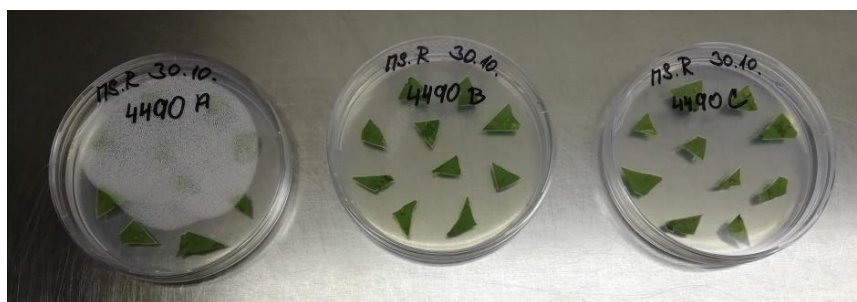
Pracovní postup

1. Z mladých listů tabáku jsem si vystříhla 30 segmentů ve tvaru malých trojúhelníků. Tyto segmenty jsem sterilizovala 15 minut v 10% roztoku složeného ze Sava obsahujícího chlornan sodný (5%), z destilované vody a z kapky detergentu (jar).

2. Poté jsem ve sterilních podmínkách dezinfekční roztok sterilní pipetou odsála a segmenty třikrát propláchla sterilní destilovanou vodou vždy po 10 minutách.
3. Sterilní segmenty jsem po dobu 20 minut nechala kultivovat za mírného třepání na třepačce s 20 ml suspenze bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. V tomto kroku se bakterie dostaly řeznými okraji a průduchy do listových segmentů, kam byly lákány látkami uvolňovanými z poraněného pletiva rostliny, čímž došlo v některých případech k transformaci buněk.
4. Po 20 minutách kultivace jsem ve flow boxu sterilní špičkou odsála roztok bakterií.
5. Segmenty jsem za sterilních podmínek umístila do tří Petriho misek s MS médiem. Segmenty jsem sázela na médium neobsahující antibiotika průduchy orientovanými navrch a rozmístila je vždy po 10 kusech na jednu Petriho misku. Na tomto médiu byly segmenty kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 28°C.
6. Následující den jsem segmenty přemístila na Petriho misky s MS.R médiem obsahujícím antibiotikum kanamycin (50 mg/l) sloužící k selekci transgenních buněk a timentin (250 mg/l) sloužící k postupné eliminaci přežívajících bakterií. Petriho misku jsem po obvodu zalepila parafilmem, aby nemohlo dojít ke kontaminaci.



Obrázek 3. Tři mladé listy netransgenního tabáku



Obrázek 4. Transformované segmenty tabáku na MS.R médiu v Petriho miskách

4.7 Kultivace a přesazování segmentů tabáku

Segmenty v průběhu kultivace začínaly tvořit kalusy. Kalusy byly dle potřeby přesazovány na čerstvá připravená selekční MS.R média obsahující kanamycin o koncentraci 50 mg/l, jenž slouží k selekci transgenních buněk od netransgenních a timentin o koncentraci 250 mg/l, který slouží k postupné eliminaci přežívajících bakterií. Z kalusů se tvořily prýty, které byly dle potřeby přesazovány na čerstvá MS média obsahující kanamycin o koncentraci 100 mg/l a timentin o koncentraci 250mg/l.

Selekční médium obsahující kanamycin zajistilo selekci a vizuální rozpoznání transgenních segmentů (zelené barvy, na médiu přeživaly) od netransgenních buněk (žloutly, na médiu byly usmrceny). Kultivace rostlin probíhala v kultivační místnosti s umělým osvětlením při teplotě 23°C.



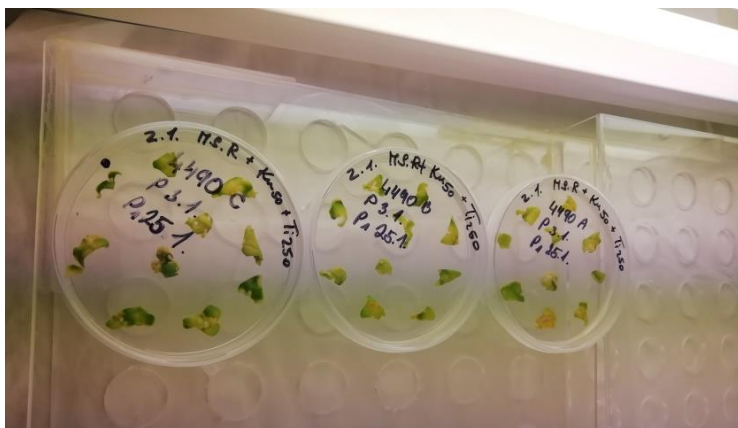
Obrázek 5. Poprvé přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky



Obrázek 6. Podruhé přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky

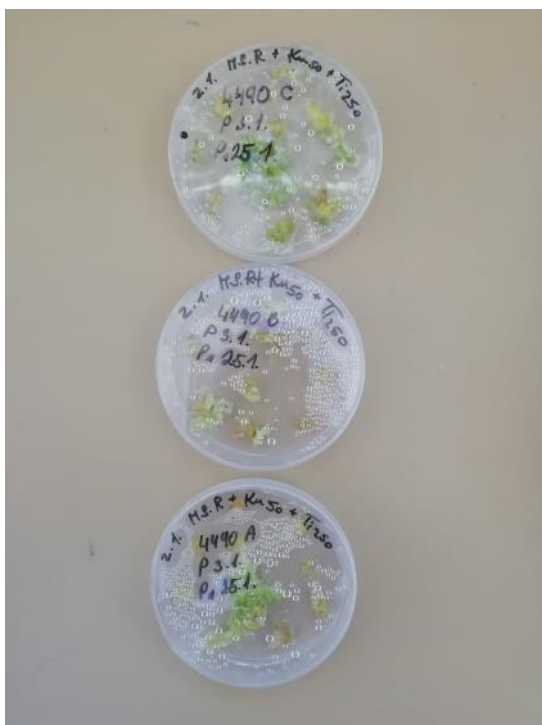


Obrázek 7. Potřetí přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky



Obrázek 8. Petriho misky se segmenty uložené v kultivační místnosti

Při čtvrtém přesazování začínaly některé segmenty poprvé tvořit začátky kalusů, ale zatím nebyly žádné náznaky tvorby prýtlů. Při přesazování jsem segmenty mírně zatlačila do čerstvého média a Petriho misku opět zajistila parafilmem proti kontaminaci.



Obrázek 9. Segmenty začínající tvořit kalusy

Při dalším přesazení bylo již dobře vidět a možné rozlišit, které segmenty vytvořily kalusy a u kterých segmentů nedošlo k transformaci, tudíž ani k tvorbě kalusů. Segmenty byly přesazeny na MS.R médium obsahující kanamycin o koncentraci 100 mg/l a timentin o koncentraci 250 mg/l.



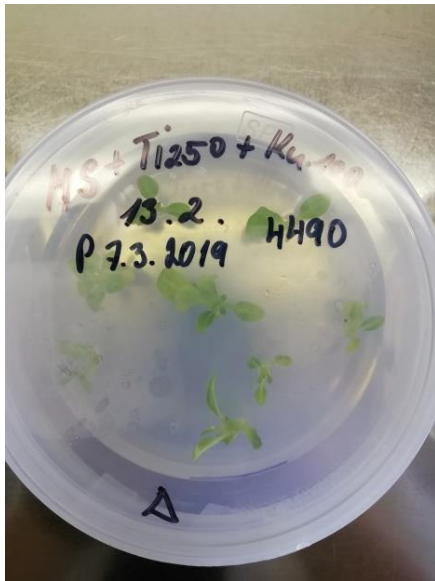
Obrázek 10. Segmenty tvořící kalusy a segmenty netvořící kalusy

Při dalším přesazení na selekční médium docházelo k uhynutí netransformovaných segmentů. Transformované kalusy se stále regenerovaly a rostly. V této fázi bylo možné vizuálně rozeznat transformované segmenty (zelené, vytvořily kalusy, obsahují transgen *nptII*) od netransformovaných segmentů (žluté, uhynuly, neobsahují transgen *nptII*). Z 30 segmentů, které jsem transformovala, 10 segmentů na selekčním médiu uhynulo (netransgenní) a 20 segmentů (transgenní) bylo schopné regenerace.



Obrázek 11. Uhynulé segmenty a regenerující se kalusy

Následovalo další přesazení. Kalusy vyrostly do fáze prýtvů. Prýtvu jsem přesadila na MS médium obsahující timentin o koncentraci 250 mg/l a kanamycin o koncentraci 100 mg/l.



Obrázek 12. Prýty na MS médiu obsahujícím antibiotika

Z prýtů vyrostly transgenní rostliny. Z 20 vypěstovaných transgenních rostlin jsem náhodně vybrala tři transgenní rostliny, přesadila je do hlíny a uložila je do malého přenosného skleníčku, v kterém jsem mohla regulovat přístupnost vzduchu, čímž docházelo k postupné adaptaci na normální okolní podmínky. Z těchto tří rostlin jsem následně prováděla izolaci rostlinné DNA, amplifikaci DNA metodou PCR, elektroforézu a histochemickou detekci.



Obrázek 13. Vypěstovaný GM tabák

4.8 Izolace rostlinné DNA

Za účelem provedení PCR amplifikace genu *nptII* bylo nejdříve nutné izolovat DNA ze tří mnou vypěstovaných transformovaných GM tabáků a z jednoho netransgenního tabáku vypěstovaného pracovníky UMBRu. Netransgenní tabák jsem použila z důvodu, abych ukázala a porovнала jeho výslednou DNA (neobsahující *nptII* a *GUS*) zobrazenou pomocí elektroforézy s DNA (obsahující *nptII* a *GUS*) z transgenních tabáků.

Postup izolace je stejný pro všechny čtyři vzorky rostlin.

Pracovní postup

1. Do 1,5 ml ependorfky jsem vložila malý lístek z transgenního tabáku a následně ho zhomogenizovala tyčinkou.
2. Ke zhomogenizované tkáni jsem přidala 400 μ l extrakčního pufru (200 mM Tris HCL, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 7,5-8) a směs pět vteřin zvortexovala.
3. Následně jsem směs centrifugovala při 14000 otáčkách za minutu po dobu dvou minut.
4. Poté jsem 300 μ l vzniklého supernatantu obsahujícího DNA přepipetovala do nové ependorfky a přidala k němu 300 μ l isopropanolu (poměr vůči supernatantu by měl být 1:1). Směs jsem zamíchala pomalu, aby nedošlo k fragmentaci DNA a nechala dvě minuty inkubovat při pokojové teplotě.
5. Ependorfku se směsí jsem nechala centrifugovat po dobu pěti minut při 14000 otáčkách za minutu. Při centrifugaci došlo k peletování DNA.
6. Na dně ependorfky vznikl pelet DNA, pomocí pipety jsem odstranila supernatant a do ependorfky přidala stejný objem 70% etanolu.
7. Následně jsem směs promíchala a poté ji nechala sušit na buničině, dokud se etanol neodpařil.
8. Do ependorfky jsem přidala 75 μ l TE pufru (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) a pelet jsem jemným třepáním rozmíchala. Nyní byl vzorek DNA připraven k amplifikaci.

4.9 Amplifikace DNA z GM tabáku pomocí PCR

Před zahájením amplifikace jsem si připravila reakční směs, kterou jsem dělala hromadně pro všechny vzorky, tudíž neobsahovala DNA. K amplifikaci genu *nptII* z transgenního tabáku jsem použila termocykler se specifickým nastavením, které uvádím v tabulce č. 8. Amplifikaci jsem prováděla ze třech předem připravených vyizolovaných DNA vzorků transgenních tabáků a z jednoho vzorku vyizolované DNA netransgenního tabáku.

Tabulka 7. Složení reakční směsi na 20 μ l

Reakční komponenty	Množství
Master mix	10 μ l
NPT 1 (forward primer)	0,5 μ l
NPT 2 (reverse primer)	0,5 μ l
Destilovaná voda	8 μ l
DNA templát	1 μ l

Zdroj: Vlastní

Pro amplifikaci genu *nptII* jsem použila specifické primery NPT 1 a NPT 2 (Bříza et al., 2008).

NPT 1 (5'-ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G-3')

NPT 2 (5'-GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G-3')

Tyto primery je potřeba před použitím naředit sterilní vodou. Množství vody se odvíjí od množství primeru.

Tabulka 8. Nastavení cyklu pro PCR s annealingovou teplotou 55 °C

Cyklus	Teplota [°C]	Čas [minuty]
1	95	2:00
2c	94	00:30
3c	55	00:45
4c	72	1:20
5	72	3:00

Zdroj: Vlastní

Cykly 2c-4c se opakovaly 34x.

Pracovní postup je stejný pro všechny čtyři vzorky.

Pracovní postup

1. Nejdříve jsem si připravila reakční směs pro čtyři vzorky.
2. Do amplifikační zkumavky jsem napipetovala 19 µl reakční směsi, která neobsahovala DNA a k tomu jsem přidala 1 µl vyizolované DNA.
3. Zkumavku jsem krátce vortexovala, centrifugovala a poté vložila do termocykléru nastaveného dle tabulky 8.
4. Po ukončení polymerázové řetězové reakce byly vzorky připraveny k vyhodnocení pomocí gelové elektroforézy.

4.10 Gelová elektroforéza z rostlinných vzorků

K vyhodnocení amplifikované DNA rostlinných vzorků jsem použila gelovou elektroforézu. Pro separaci fragmentů DNA jsem připravovala 1 % gel. Pro vizualizaci DNA jsem aplikovala do gelu ethidium bromid, jehož vlastností je vmezeřovat se mezi jednotlivé báze DNA a po ozáření ultrafialovým zářením emitovat světlo.

Pracovní postup

1. Nejdříve jsem si připravila 1 % gel. Do skleněné lahve jsem navázila 800 mg 1 % PCR agarózy a přidala jsem 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufu.

2. Tuto směs jsem dala rozvařit do mikrovlnné trouby na 4 minuty.
3. Když byl gel zcela čirý a rozvařený, nechala jsem ho zchladit na 50°C pod tekoucí vodou.
4. Poté jsem do zchladlé směsi přidala 10 µl ethidium bromidu.
5. Tuto směs jsem nalila do utěsněné elektroforetické vaničky, do směsi jsem vložila hřebínek pro vytvoření jamek a poté jsem nechala směs 30 minut ztuhnout.
6. Poté jsem ze ztuhlého gelu vyjmula hřebínek a gel s vaničkou jsem vložila do elektroforetické vany obsahující TAE pufr.
7. Do jednotlivých vytvořených jamek v gelu jsem napipetovala po 10 µl vzorky připravených DNA amplifikovaných PCR metodou. Do první jamky jsem nanesla negativní kontrolu (vodu), do druhé jamky pozitivní kontrolu (plazmid nesoucí *nptII*), do třetí až páté jamky vzorky z mých vypěstovaných tabáků, do šesté jamky vzorek z netransgenního tabáku vypěstovaného pracovníky UMBRu a do poslední jamky jsem napipetovala 10 µl 100 bp ladderu (molekulový žebříček).
8. Elektroforetickou vanu jsem připojila ke zdroji napětí o velikosti 90 V po dobu 60 minut.
9. Závěrečným krokem tohoto procesu bylo nasvícení gelu ultrafialovým světlem, vyfotografování a zhodnocení výsledků.

4.11 Histochemický test

Dalším testem, kterým si lze ověřit, zda byla transformace úspěšná, je histochemická detekce genu *GUS*. Pro histochemickou detekci jsem použila substrát X-Gluc, který v místě enzymové aktivity modře zbarvuje rostlinné buňky obsahující transgen *GUS*. Pro detekci jsem použila listy a stonky z GM tabáků. Jako negativní kontrolu jsem použila list a stonku z netransgenního tabáku.

Pracovní postup

1. Nejdříve jsem si připravila substrát X-Gluc. V 500 µl dimethylformidu jsem rozpustila 25 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid (X-Gluc). K tomu jsem přidala 50 ml 100 mM fosfátového pufru s pH 7.

2. Před barvením jsem přidala k substrátu 500 μl roztoku A (50 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a 500 μl roztoku B (50 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), což jsou oxidační katalyzátory.
3. Poté jsem ustříhla z mých transgenních tabáků dva malé mladé listy a dva malé segmenty stonku. Z netransgenního tabáku jsem použila jeden malý mladý list a jeden stonk.
4. Vzorky jsem vložila do sklenic a zalila je připraveným substrátem tak, aby byly celé ponořené.
5. Sklenice jsem vložila do exsikátoru, spustila vývěvu a vzorky 30 minut infiltrovala.
6. Poté jsem opatrně zrušila vakuum a vzorky nechala po dobu 24 hodin inkubovat při 37°C .
7. Následně jsem odbarvila zelené části vzorků pomocí 70 % etanolu.
7. Poté jsem sledovala vývoj modrého zbarvení.



Obrázek 14. Vzorky ponořené v substrátu X-Gluc



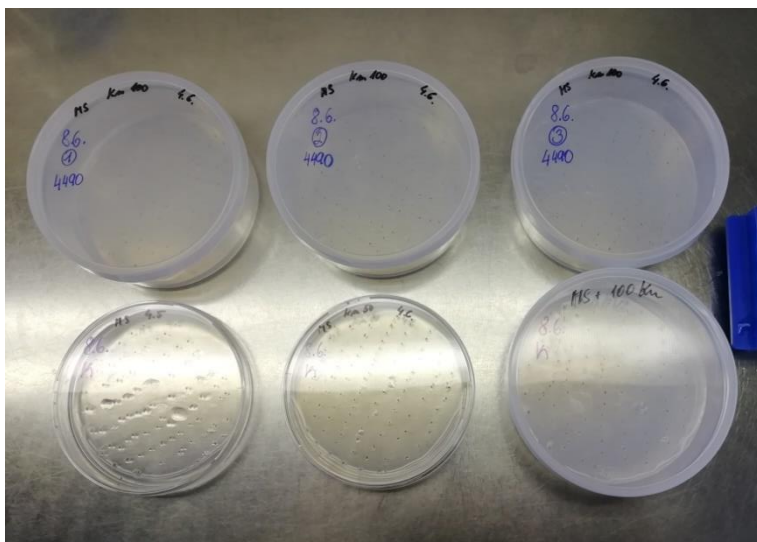
Obrázek 15. Vzorky v exsikátoru

4.12 Výsev semen *Nicotiana tabacum*

Semena *Nicotiana tabacum* jsem vysévala za účelem zjištění počtu kopií vneseného genu do další generace. Semena jsem odebrala z mnou vypěstovaných tří GM tabáků, které jsem poté vysela do třech misek obsahujících selekční MS médium s kanamycinem o koncentraci 100mg/l. Jednotlivé misky obsahovaly semena pouze z příslušné rostliny. Abych vizuálně rozeznala vyrostlé transgenní rostliny (tvořily kořínky delší než 1 cm) od netransgenních (tvořily malé nebo žádné kořínky, žloutly), použila jsem jako kontrolu semena z netransgenního tabáku, které jsem vysela na tři Petriho misky. Jedna kontrolní miska obsahovala médium bez antibiotik, druhá kontrolní miska obsahovala médium s kanamycinem o koncentraci 50 mg/l a třetí kontrolní miska obsahovala médium s kanamycinem o koncentraci 100 mg/l. Semena jsem před výsevem na médium sterilizovala v dezinfekčním roztoku.

Pracovní postup

1. Do ependorfky jsem vložila semena a k nim napipetovala 1 ml dezinfekčního roztoku a kapkou detergentu (jar). Aby se semena neshlukovala. Ependorfku jsem nechala 15 minut míchat, aby se dezinfekční roztok dostal do všech záhybů semen.
2. Poté jsem roztok odsála a semena 3x propláchla destilovanou vodou.
3. Ve flow boxu jsem semena jednotlivě špičkou nanášela na médium v 0,1 % roztoku agarózy. Do první misky jsem nanasla 104 semen z první rostliny, do druhé misky 80 semen z druhé rostliny, do třetí misky 123 semen ze třetí rostliny. Semena netransgenního tabáku jsem nanasla i na kontrolní Petriho misky.
4. Následně jsem uložila misky na 21 dní do kultivační místnosti.
5. Poté jsem spočítala množství transgenních a netransgenních rostlin druhé generace.



Obrázek 16. Vyšetá semena tabáku na médiu

4.13 Štěpné poměry

Po 21 dnech, kdy jsem vysela na médium obohacené kanamycinem semena tabáku získaná z první generace, jsem mohla spočítat množství vzniklých rezistentních a senzitivních rostlin v druhé generaci.

Z poměrů mezi rezistentními a senzitivními rostlinami se určuje počet lokusů, do kterých se začlenila T-DNA. Při integraci transgenů (T-DNA) do jednoho lokusu se vyskytuje štěpný poměr 3:1, do dvou lokusů 15:1 a do tří lokusů poměr 63:1 (Ondřej, Drobník, 2002).

Předpokládala jsem, že z první generace se přenesou vnesené transgeny (T-DNA) do jednoho místa genomu druhé generace ve štěpném poměru 3:1. Spočítala jsem si tedy počet rezistentních (rezis.) a senzitivních (senz.) rostlin v každé misce a také jejich štěpný poměr.

Štěpné poměry se hodnotí pomocí chí-kvadrát testu (χ^2).

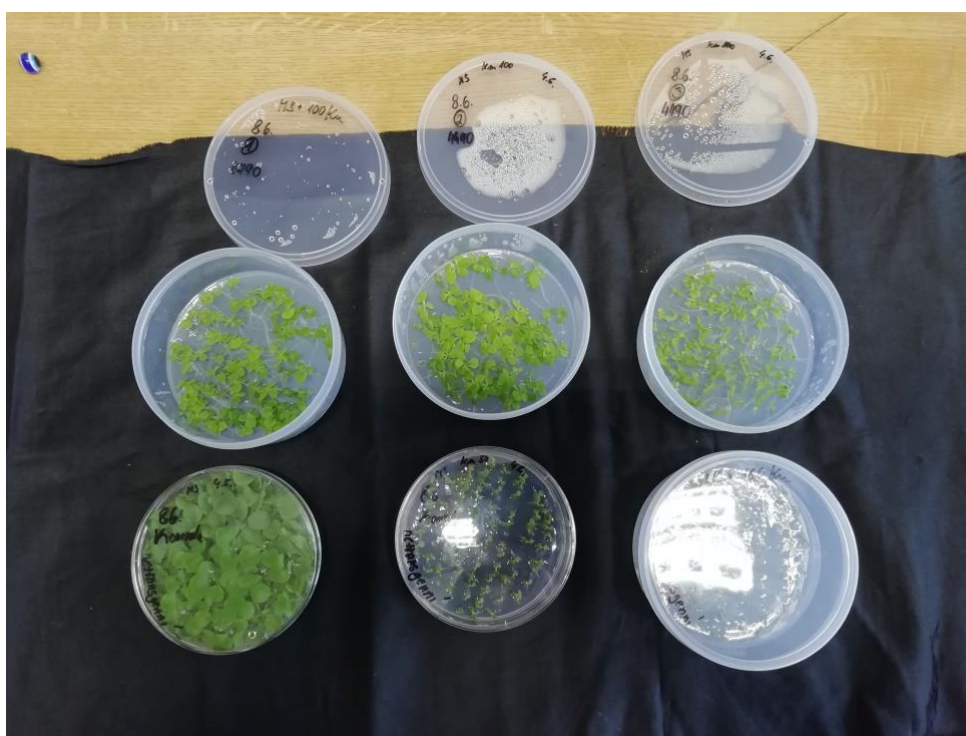
$$\chi^2 = \sum \frac{(X_i - N_{pi})^2}{N_{pi}}$$

X_i jsou sledované četnosti a N_{pi} jsou četnosti očekávané.

Vzorec pro štěpný poměr 3:1 lze definovat takto:

$$\chi^2 = \frac{(\text{sledovaný počet rezis. rostlin} - \text{očekávaný počet rezis. rostlin})^2}{\text{očekávaný počet rezis. rostlin}} + \frac{(\text{sledovaný počet senz. rostlin} - \text{očekávaný počet senz. rostlin})^2}{\text{očekávaný počet senz. rostlin}}$$

Na obrázku č. 17 lze vidět v horní řadě rezistentní i senzitivní rostliny druhé generace vyrostlé z vysetých semen. V dolní řadě lze vidět kontroly.



Obrázek 17. Druhá generace transgenních i netransgenních rostlin a kontroly

5. Výsledky a diskuze

Proces kultivace a regenerace, kdy z jediné transformované buňky tabákového segmentu vyrostl geneticky modifikovaný tabák, z kterého bylo možné provést izolaci DNA a následující testy k zjištění přítomnosti transgenů, trval pět měsíců. K ověření zda se mi transformace povedla, jsem použila DNA z rostlinných vzorků, kterou jsem amplifikovala pomocí PCR a poté jsem tuto DNA vyhodnocovala pomocí elektroforézy. K ověření transformace a přítomnosti transgenů jsem použila také histochemickou detekci.

Další tři měsíce trvalo, než dorostl GM tabák do fáze květenství a tvorby semen. Poté bylo možné odebrat semena pro další část bakalářské práce, konkrétně pro zjištění počtu přenesených kopií vneseného genu v další generaci.

Vypěstované GM rostliny obsahovaly selekční marker *nptII*, který v lidech vyvolává spoustu obav. Tento selekční marker způsobuje rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu a neomycinu (Çiftçi, 2012). Lidé mají strach z použití tohoto markeru v GM plodinách a tedy i z těchto plodin samotných, neboť kanamycin patří k významným antibiotikům pro léčbu tuberkulózy. Obávají se tak, že by při rozkladu genetické informace z GMO mohlo dojít k úniku genu *nptII* a k jeho nekontrolovatelnému šíření do životního prostředí, odkud by se mohl potenciálně zabudovat do DNA jiných organismů, především bakterií, které jsou součástí lidského organismu. Tyto bakterie by tak získaly novou vlastnost, a to rezistenci vůči antibiotiku kanamycinu, což by mohlo zapříčinit následné selhání léčby lidských infekčních onemocnění těmito antibiotiky (Miki, McHugh, 2004).

V současnosti stanovila Evropská unie předpisy pro povolování nových GMO a hodnocení rizika při jejich uvádění na trh a do životního prostředí a pro označení GMO a jejich produktů, které se dostanou do oběhu mezi spotřebitelem. Tyto předpisy jsou uvedeny v nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1831/2003, o zpětné sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a o sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z GMO a o změně směrnice 2001/18/ ES, nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. Dle těchto nařízení musí být označovány nejen samotné GMO, ale i produkty obsahující více než 0,9 % geneticky modifikované složky (Čeřovská et al., 2006).

Pravidla a požadavky pro činnosti s GMO jsou v České republice stanovena zákonem č. 78/2004, Sbírka o nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a genetickými produkty (Doubková, 2006).

Aby však mohla být přítomnost GMO v označených potravinářských produktech kontrolována, je v souladu s těmito předpisy nutná spolehlivá a přesná detekce GMO (Ondřej, Drobník, 2002). Nejspolehlivější a nejcitlivější využívanou metodou k detekci transgenů v GMO je technika PCR amplifikace DNA (Holst-jensen et al., 2003). Tato metoda je však v porovnání s ostatními metodami k detekci velmi nákladná a vyžaduje personál s odborným vzděláním (Ondřej, Drobník, 2002).

V mé práci jsem použila k detekci transgenů PCR metodu s následnou elektroforézou a histochemickou detekci. Poté jsem vyhodnocovala, která metoda je dle mých zkušeností k detekci výhodnější.

5.1 Gelová elektroforéza z bakterií *A. tumefaciens* a *E. coli*

Abych potvrdila přítomnost geneticky upraveného Ti plazmidu nesoucího transgeny *nptII* a *GUS* v bakteriích použitých k transformaci, zvolila jsem k interpretaci výsledků gelovou elektroforézu. Přítomnost geneticky upraveného plazmidu jsem však neprokazovala jen v bakteriích rodu *Agrobacterium tumefaciens*, ale i v bakteriích druhu *E.coli*. Bakterie *E.coli* jsem zvolila, neboť slouží jako hostitelský organizmus klonovacích plazmidových vektorů.

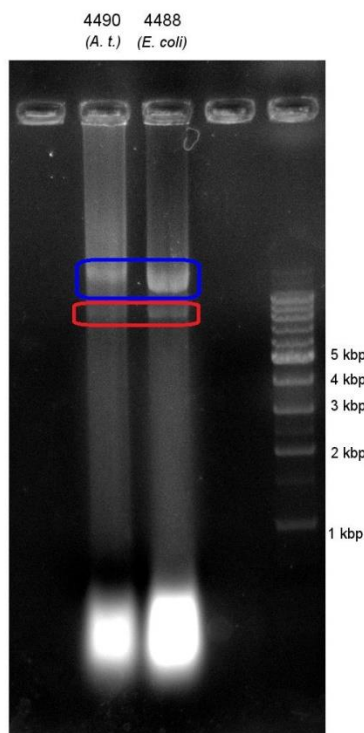
Před zahájením elektroforetické separace je nutné nejdříve izolovat DNA z bakterií. Izolaci DNA jsem provedla pomocí metody minipreps.

Gelová elektroforéza se řadí k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin. Gelová elektroforéza od sebe odděluje fragmenty DNA na základě velikostí, čím menší je molekula, tím rychleji se pohybuje v gelu (Brown, 2007). Pro separaci fragmentů DNA jsou nejvhodnější a nejčastěji používány 1% agarozové gely. Pro kvalitní separaci 5-10 kp DNA fragmentů je však vhodnější 0,7% agaróza. Pro odhad velikosti separovaných fragmentů DNA s očekávanou velikostí od 1 kb do 10 kb se používají velikostní markery 1kb laddery (Labguide, ©2019).

Gelovou elektroforézou lze také použít pro separaci a studium molekul DNA, které se vyskytují v různých molekulárních formách. Je tak možné odlišit kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od molekul lineárních nebo od otevřených kružnic, neboť každá tato forma se pohybuje v agarózovém gelu odlišnou rychlostí (Šmarda et al., 2005).

V mé práci jsem použila 1% agarózový gel a dle doporučení velikostní marker 1 kb ladder. Dle poskytnutých informací od Ing. Kocábka by měl mít upravený plazmid obsažený v bakteriích velikost 13 kp.

Na mém výsledném elektroforeogramu na obrázku č. 18 lze však vidět u obou bakterií 2 proužky o 2 různých velikostech. První proužky označené modře prokazují přítomnost tak zvané OC (open circle) formy plazmidu. OC forma znamená, že se plazmid rozvine do podoby otevřené kružnice. Velikost OC formy plazmidu dle velikostního ladderu odpovídá 13 kp. Druhé proužky označené červeně prokazují přítomnost tak zvané CCC formy plazmidu. CCC formy jsou kovalentně uzavřené kružnicové molekuly, které se v elektrickém poli pohybují nejrychleji. Velikost CCC formy plazmidu dle velikostního ladderu odpovídá 9 kp.



Obrázek 18. Elektroforeogram na přítomnost Ti plazmidu v bakteriích

5.2 Gelová elektroforéza z rostlinných vzorků

K ověření transformace a prokázání přítomnosti genu *nptII* v rostlinných vzorcích GM tabáku jsem použila metodu PCR a gelovou elektroforézu, neboť samotný růst rostlin na selekčním médiu obohaceným kanamycinem, není dostatečným důkazem, že rostliny opravdu obsahují plazmid nesoucí gen *nptII*.

Nejdříve tedy bylo nutné izolovat DNA z rostlinných vzorků tří transgenních tabáků a jednoho netransgenního tabáku, který jsem použila z důvodu, abych ukázala a porovнала jeho výslednou amplifikovanou DNA s DNA z transgenních tabáků. Poté jsem tedy vyizolovanou rostlinnou DNA, konkrétně gen *nptII*, amplifikovala pomocí PCR. K vyhodnocení amplifikovaného fragmentu DNA jsem použila již zmíněnou gelovou elektroforézu.

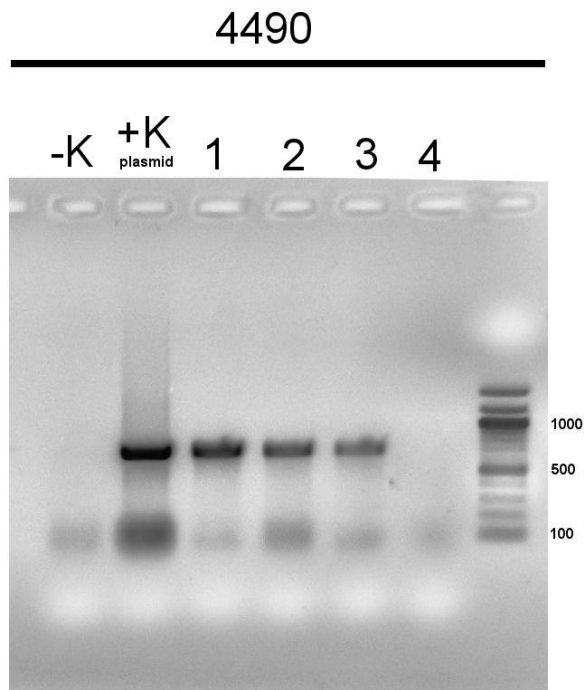
Jako negativní kontrolu jsem použila vodu, jako pozitivní kontrolu jsem použila DNA z bakterií *Agrobacterium tumefaciens* obsahující plazmid nesoucí selekční marker *nptII*. Že plazmid tento gen opravdu obsahuje, jsem prokázala již v předchozí gelové elektroforéze.

Pro elektroforézu jsem zvolila 1% agarózový gel a 100 bp ladder.

Podle elektroforeogramu na obrázku č. 19 lze vidět ve vzorcích 1-3 (transgenní rostliny) přítomnost tří proužků, jejichž velikost jsem dle DNA ladderu vyhodnotila jako 700 bp. Ve vzorku č. 4, který patří netransgennímu tabáku nelze vidět žádný proužek, který by detekoval přítomnost selekčního markeru *nptII*, neboť tento gen neobsahoval od samého začátku a tudíž nemohl být amplifikován.

Velikost DNA fragmentu nesoucího transgen *nptII* má být 699 bp (Bříza et al., 2008). V porovnání s tímto tvrzením v jiné práci se mé výsledky liší pouze o 1 bp. Kladná i záporná kontrola mi vyšla správně, považuji tedy mé výsledky za správné. Těmito testy jsem potvrdila úspěšnost transformace, a to, že mé transformované rostliny opravdu obsahují plazmid nesoucí selekční marker *nptII* způsobující rezistenci vůči kanamycinu.

Tento konkrétní plazmid obsahuje i signální gen *GUS*, jehož přítomnost byla potvrzena pomocí histochemického testu. Tím, že jsem potvrdila přítomnost selekčního markeru *nptII* v rostlinách pomocí elektroforézy, lze považovat, že jsem tím potvrdila i přítomnost signálního markeru *GUS* v rostlinách, neboť se oba markery nacházejí v části T-DNA bakterií, která se přenáší do DNA rostlin.



Obrázek 19. Elektroforeogram z rostlinných vzorků na přítomnost transgenu *nptII*

Dle mých zkušeností považuji tento proces detekce za náročnější a nákladnější. Avšak techniku PCR považuji za velmi přesnou a kvalitní molekulárně-biologickou metodu k amplifikaci specifického DNA fragmentu. Gelovou elektroforézu hodnotím taktéž velmi kladně. Výsledky amplifikované DNA lze dobře opticky zachytit a pomocí kb ladderu lze odečíst neznámou velikost fragmentů DNA. Tyto metody bych tedy doporučila k detekci GMO a sama bych je zvolila znovu.

5.3 *Ověření transformace histochemickým testem*

Pro ověření úspěšnosti transformace a přítomnosti transgenů v mnou vypěstovaných GM tabácích jsem použila histochemický test. Jako vzorky jsem použila 2 mladé listy a 2 malé stonky z GM tabáků číslo 2 a 3. Jako negativní kontrolu jsem zvolila 1 malý list a 1 stonku z netransgenního tabáku, který mi byl poskytnut Ústavem molekulární biologie rostlin.

Po odbarvení zelené barvy etanolem v rostlinných vzorcích bylo možné u GM vzorků vizuálně zpozorovat malé světlé modré skvrny lokalizované v různých částech listů a stonků, rostlinné buňky tedy obsahovaly transgen *GUS* a tudíž i transgen *nptII*. U vzorků negativní kontroly, nebyly viděny žádné modré skvrny, neboť rostlinné buňky neobsahovaly transgen *GUS* ani *nptII*. Tímto jsem prokázala úspěšnost transformace a přenesení transgenů do DNA rostlinných buněk tabáku.

Princip histochemického testu spočívá v použití chromogenního substrátu X-gluc, který je po rozštěpení v místě enzymatické aktivity β -glukuronidázy viděn jako fenotypický projev, který vypadá jako výrazná modrá nerozpustná krystalická sloučenina v rostlinných pletivech (OĞRAŞ, GÖZÜKIRMIZI, 1999). Histochemický test patří k relativně levným snadno proveditelným testům. Jeho výhodou je možné vizuální pozorování fenotypického projevu a snadné zachycení tohoto výsledku pomocí fotoaparátu. Nevýhodou tohoto testu je, že při něm dochází k ničení rostlinných buněk (Karcher, 2002).

V mém experimentálním pokusu byl fenotypický projev vnášeného genu *GUS* bohužel velmi slabý. Okem bylo možné vidět malé velmi světlé modré skvrny v rostlinných pletivech, ale nebylo možné tento projev vyfotografovat. Slabý projev byl nejspíše příčinou slabé exprese transgenů *GUS* v rostlinných pletivech.

I přes výhodu snadné proveditelnosti bych z mé zkušenosti tento test k detekci transgenů v GMO a k ověření transformace již ne zvolila.

5.4 Štěpné poměry

Pro zjištění výsledného počtu kopií transgenů přenesených do následující generace jsem musela provést test na selekčním médiu obsahujícím kanamycin, na které jsem vysela semena odebraná ze tří transgenních tabáků. Po 21 dnech ze semen vyrostly malé rostlinky, z kterých jsem spočítala množství rezistentních rostlin a senzitivních rostlin.

Množství sledovaných rezistentních a senzitivních rostlin druhé generace uvádím v tabulce č. 9.

Tabulka 9. Množství sledovaných rostlin

Rostlina	Počet sledovaných rezis.	Počet sledovaných senz.	Celkový počet
1.	86	18	104
2.	60	20	80
3.	96	27	123

Zdroj: Vlastní

Z tabulky č. 9 vyplývá, že z první rostliny první generace se přeneslo do následující generace 86 kopií transgenů, vzniklo tedy 86 rezistentních rostlin z celkových 104 zkoumaných rostlin. Z druhé rostliny první generace se přeneslo do následující generace 60 kopií transgenů, vzniklo tedy 60 rezis. rostlin z celkových 80 zkoumaných rostlin. A z třetí rostliny první generace se přeneslo do následující generace 96 kopií transgenů, vzniklo tedy 96 rezis. rostlin z celkových 123 zkoumaných rostlin.

Můj předpoklad byl, že do následující generace se přenesou kopie transgenů ve fenotypovém štěpném poměru 3:1. U každé rostliny jsem si tedy z celkového počtu vysetých semen spočítala teoretický počet očekávaných rezistentních a senzitivních rostlin následující generace pro mendelistický fenotypový štěpný poměr 3:1.

Počet očekávaných rezistentních a senzitivních rostlin uvádím v tabulce č. 10.

Tabulka 10. Množství očekávaných rostlin pro štěpný poměr 3:1

Rostlina	Počet očekávaných rezis.	Počet očekávaných senz.	Celkový počet
1.	78	26	104
2.	60	20	80
3.	92,25	30,75	123

Zdroj: Vlastní

Z počtů očekávaných a sledovaných rostlin jsem pomocí chí-kvadrát testu, jehož vzorec uvádím v kapitole 4.13 Štěpné poměry, počítala hodnotu pravděpodobnosti, kterou jsem poté porovnávala s kritickou hodnotou pro jeden stupeň volnosti na 5% hladině významnosti.

V tabulce č. 11 uvádím výsledné hodnoty chí-kvadrát testu.

Tabulka 11. Výsledky vypočítané pomocí chí-kvadrát testu

Rostlina	χ^2
1.	3,28
2.	0
3.	0,61

Zdroj: Vlastní

Kritická hodnota pro jeden stupeň volnosti na 5% hladině významnosti je 3,84 (Biopedia, ©2019). Všechny mé rostliny mají výslednou vypočítanou hodnotu nižší než je kritická hodnota 3,84 na 5% hladině významnosti, jak lze vidět v tabulce č. 11. To znamená, že mezi napozorovanými poměry mezi rezistentními a senzitivními rostlinami ve druhé generaci a teoretickým štěpným poměrem 3:1 se mi na 5% hladině významnosti pomocí chí-kvadrát testu nepodařilo prokázat rozdíl a tedy můj předpoklad mendelistického štěpného poměru 3:1, který odpovídá integraci transgenů (T-DNA) do jednoho lokusu, byl potvrzen u všech tří rostlin.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování odborné literární rešerše obsahující informace o lidských infekčních onemocněních, bakteriích, antibiotikách, antibiotické rezistenci, transgenozí a GMO a také se seznámit s problematikou týkající se obav spjatých s použitím genu *nptIII* v geneticky modifikovaných organizmech a jeho detekci.

Záměrem této práce bylo detekovat transgen *nptIII* ve vlastních vypěstovaných transformovaných tabácích nesoucích tento gen a zjistit, zda je pro detekci tohoto transgenů vhodnější metoda PCR a následná gelová elektroforéza, či histochemický test. Dalším záměrem bylo zjištění počtu vnesených kopií transgenů sledováním štěpného poměru rezistentních a senzitivních rostlin v generaci potomstva transformovaných rostlin.

Zjistila jsem, že k detekci transgenů konkrétně *nptIII* v GMO je vhodnější metoda PCR a gelová elektroforéza. Sice jsou tyto metody nákladově dražší, ale také jsou přesnější, kvalitnější a mají lépe viditelný výsledek, než histochemický test. K histochemickému testu je zapotřebí, aby GMO obsahovala také gen *GUS*, který však není vždy používán v kombinaci s genem *nptIII*.

Dále jsem zjistila štěpný poměr přenesených transgenů v následující generaci rostlin. Z mých tří transgenních tabáků jsem odebrala semena a vysela je na selekční médium, za účelem zjištění počtu přenesených kopií genů v následující generaci rostlin. Testem na selekčním médiu obsahujícím kanamycin a výpočty pomocí chí-kvadrát testu jsem zjistila a potvrdila předpokládaný mendelistický fenotypový štěpný poměr 3:1 u následujících generací všech tří rostlin. Kritická hodnota pro jeden stupeň volnosti chí-kvadrát testu na 5% hladině významnosti je 3,84, mé vzorky měly výslednou vypočítanou hodnotu nižší než je kritická hodnota 3,84 na 5% hladině významnosti, což mi potvrdilo štěpný poměr 3:1.

Při této práci jsem si osvojila přípravu médií potřebných ke kultivaci rostlin, dále proces transformace geneticky modifikovaného tabáku pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, a také jsem si osvojila molekulárně-biologické metody používané při detekci transgenů v GMO.

7. Seznam literatury

1. ADÁMKOVÁ, V., 2010. *Civilizační choroby - žijeme spolu*. Praha: Triton, 136 s. ISBN 978-80-7387-413-1.
2. BARTŮŇKOVÁ, J. a M. PAULÍK, 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 176 s. ISBN 80-247-0691-1.
3. BEDNÁŘ, J., 2000. *Základy genového inženýrství*. Brno: MZLU, 104 s. ISBN 80-7157-470-8.
4. BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 560 s. ISBN 80-238-0297-6.
5. BENEŠ, J, 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 600 s. ISBN 978-80-271-0636-3.
6. BENEŠ, J., c2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 652 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
7. Bicom: Infekční onemocnění, ©2020. *Bicom Ostrava* [online]. [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <http://www.bicom-ostrava.cz/infekcni-onemocneni>
8. BREYER, D., L. KOPERTEKH a D. REHEUL, 2014. Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for In Vitro Selection of Genetically Modified Plants – Scientific Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **33**(4), 286-330 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1080/07352689.2013.870422. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2013.870422>
9. BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
10. BŘÍZA, J., D. PAVINGEROVÁ, P. PŘIKRYLOVÁ, J. GAZDOVÁ, J. VLASÁK a H. NIEDERMEIEROVÁ, 2008. Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. *Biologia plantarum* [online]. **52**(3), 453-461 [cit. 2019-08-03]. DOI: 10.1007/s10535-008-0090-8. Dostupné z: <http://bp.ueb.cas.cz/doi/10.1007/s10535-008-0090-8.html>

11. ÇIFTÇI, Y.O., 2012. *Transgenic Plants: Advances and Limitations*. Croatia: IntechOpen, 492 s. ISBN 978-953-51-0181-9.
12. ČEŘOVSKÁ, M., 2006. Geneticky modifikované organismy pod dohledem – sledování GMO po uvedení na trh. In: ŠTĚPÁNEK, M., ŘÍHA, K. (eds). *Sborník - Geneticky modifikované organismy* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví, s. 30-35 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/17405/Sbornik_GMO_2006.pdf
13. DOBIÁŠ, L., 2003. *Obecná a speciální mikrobiologie*. Ostrava: Multex Soft, 218 s. Učební texty ostravské univerzity.
14. DOUBKOVÁ, Z., 2006. Geneticky modifikované organismy pod dohledem – proces schvalování nového GMO. *Sborník - Geneticky modifikované organismy* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví, s. 26-29. [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/17405/Sbornik_GMO_2006.pdf
15. DROBNÍK, J. a M. KLIMOVIČOVÁ, 2010. Sdružení Biotrin versus Greenpeace a jejich Výzva. *Svět biotechnologií* [online]. 2010, 3 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: https://archiv.biotrin.cz/czpages/bulletin/Internet_bulletin_201002.pdf
16. DROBNÍK, J., 2010. *Moderní šlechtění a potraviny: Co potřebujeme vědět o potravinách z geneticky modifikovaných plodin*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, 14 s. ISBN 978-80-903930-8-0.
17. Elektroforetická separace nukleových kyselin, ©2019. *Labguide* [online]. [cit. 2019-08-07]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
18. GlaxoSmithKline: Timentin, ©2008. In: *GlaxoSmithKline* [online]. [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/050658s023,050590s058,050590s059lbl.pdf
19. GM brambor firmy BASF by mohl zvýšit rezistenci vůči antibiotikům. *Enviweb* [online]. 2010 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <http://www.enviweb.cz/80884>

20. GM brambory firmy BASF by mohly zvýšit rezistenci vůči antibiotikům: Greenpeace vyzývá státy EU, aby uplatnily národní zákaz, 2010. *SZIF* [online]. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: https://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fzpravy%2Ftis%2Fzpravy_o_trhu%2F01%2F1268401759094.pdf
21. GOODIN, M. M., D. ZAITLIN, R. A. NAIDU a S. A. LOMMEL, 2008. *Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions®* [online]. 21(8), 1015-1026 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1094/MPMI-21-8-1015. Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-21-8-1015>
22. GÖPFERTO VÁ, D., D. JANO VSKÁ, K. DOHNAL a V. MELICHERČÍKOVÁ, 2002. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, 148 s. ISBN 80-7254-223-0.
23. GRIGORYAN, L., J. G. M. BURGERHOF, F. M. HAAIJER-RUSKAMP, et al., 2006. Is self-medication with antibiotics in Europe driven by prescribed use? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 59(1), 152-156 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1093/jac/dkl457. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl457>
24. HAVEL, P., 2010. Každý člověk (včetně Greenpeace) sní denně miliardy genů – a žijeme. *Aktuálně* [online]. [cit. 2020-07-11]. Dostupné z: <http://blog.aktualne.cz/blogy/petr-havel.php?itemid=9129>
25. HO, M., 2000. *Genetické inženýrství: naděje nebo hrozba?*. Praha: Alternativa, 300 s. ISBN 80-85993-52-x.
26. HOLEC, J., SOUKUP, J., Geneticky modifikované organismy pod dohledem – sledování GMO po uvedení na trh. Sborník - Geneticky modifikované organismy [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví, s. 10-16 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/17405/Sbornik_GMO_2006.pdf

27. HOLST-JENSEN, A., S. B. RØNNING, A. LØVSETH a K. G. BERDAL, 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **375**(8), 985-993 [cit. 2019-08-07]. DOI: 10.1007/s00216-003-1767-7. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-1767-7>
28. HYNIE, S., 2003. *Speciální farmakologie: Díl VII/B. Protiinfekční léčiva*. Praha: Karolinum, 240 s. ISBN 80-246-0657-7.
29. Chí-kvadrát test, ©2019. *Biopedia* [online]. [cit. 2019-08-06]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/genetika/chi-kvadrat-test>
30. JANUZSOVÁ, K., 2012. Bakteriální infekce. *Medixa* [online]. [cit. 2019-07-07]. Dostupné z: <https://cs.medixa.org/nemoci/bakterialni-infekce>
31. JELÍNEK, J. a V. ZICHÁČEK, 2007. *Biologie pro gymnázia*. 9.vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 576 s. ISBN 978-80-7182-213-4.
32. KARCHER, Susan J., 2002. *Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/228953279_Blue_plants_Transgenic_plants_with_the_GUS_reporter_gene
33. KATZUNG, Bertram G., 2006. *Základní a klinická farmakologie*. 9. uprav. a dopl. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.
34. KOUBOVÁ, M., 2019. Antibiotická rezistence u nás i v Evropě stoupá. *Zdravotnický deník* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.zdravotnickydenik.cz/2019/11/antibioticka-rezistence-u-nas-i-evrope-stoupa-cesti-lekari-stale-casteji-predepisuji-sirokospektra-antibiotika/>
35. KRAMÁŘ, R., 2007. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 72 s. ISBN 978-80-7394-021-8.
36. LEVY, Stuart B., 2007. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Praha: Academia, 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.

37. LINCOVÁ, D. a H. FARGHALI, 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Galén, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
38. LÜLLMANN, H., K. MOHR a L. HEIN, 2012. *Barevný atlas farmakologie*. 4. přeprac. a rozšíř.vyd. Praha: Grada Publishing, 384 s. ISBN 978-80-247-3908-3.
39. LÜLLMANN, H., K. MOHR a M. WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004, 728 s. ISBN 80-247-0836-1.
40. MARTÍNKOVÁ, J. a kol., 2007. *Farmakologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
41. MIKI, B. a S. MCHUGH, 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* [online]. **107**(3), 193-232 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.011. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165603002906>
42. NAZELENO, 2008. Geneticky modifikované potraviny: jaká jsou rizika? *Nazeleno* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.nazeleno.cz/bio/zdrava-vyziva/geneticky-modifikovane-potraviny-jaka-jsou-rizika.aspx>
43. OĞRAŞ, T.T. a N. GÖZÜKIRMIZI, 1999. Expression and Inheritance of GUS Gene in Transgenic Tobacco Plants. *TURKISH JOURNAL OF BOTANY* [online]. **1999** 23(5), 297-302 [cit. 2020-05-07]. ISSN 1303-6106. Dostupné z: <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-99-23-5/bot-23-5-3-9901-7.pdf>
44. ONDŘEJ, M. a J. DROBNÍK, 2002. *Transgenozé rostlin*. Praha: Academia, 316 s. ISBN 80-200-0958-2.
45. ONDŘEJ, M., 1992. *Genové inženýrství kulturních rostlin*, Praha: Academia, 232 s. ISBN 80-200-0310-X
46. OSEL, 2008. Jak je to s tolerancí ke kanamycinu. *Objective source E- learning* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.osel.cz/3612-jak-je-to-s-toleranci-ke-kanamycinu.html>

47. OVESNÁ, J. a K. DEMNEROVÁ, 2014. Současné trendy ve stanovení geneticky modifikovaných organismů (GMO). *Chemické listy* [online]. **108**(11), 1024-1029 [cit. 2020-05-17]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/433/433>
48. PHARMA-REPORTS, 2012. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 128 s. ISBN 978-80-7387-588-6.
49. PhytoTechLab: Antibiotic, ©2019. *PhytoTechnology Laboratories* [online]. [cit. 2019-07-05]. Dostupné z: <https://phytotechlab.com/catalogsearch/result/index/?p=2&q=antibiotic>
50. PORTER, J.R., 1976. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological reviews* [online]. 40(2), 260-269 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413956/#>
51. ROSYPAL, S., 1994. *Bakteriologie a virologie*. Praha: Scientia, 67 s. ISBN 80-85827-16-6.
52. ROSYPAL, S., 2003. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
53. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Karolinum, 566 s. ISBN 978-80-246-2932-2.
54. RYŠKOVÁ, O., 2000. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie*. Praha: Karolinum, 132 s. ISBN 978-80-246-0135-9.
55. SANDOZ, ©2020. Antibiotika. *Sandoz* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.sandoz.cz/o-spolecnosti-sandoz/nase-terapeuticke-oblasti/antibiotika>
56. SEDLÁK, K. a M. TOMŠÍČKOVÁ, 2006. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Scientia, 168 s. ISBN 80-86960-07-2.
57. SCHINDLER, J., 2008. *Ze života bakterií*. Praha: Academia, 144 s. ISBN 978-80-200-1666-9.
58. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.

59. SOTGIU, G., R. CENTIS, L. D'AMBROSIO, M. TADOLINI, P. CASTIGLIA a G.B. MIGLIORI, 2013. Do we need a new Fleming époque: The nightmare of drug-resistant tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology* [online]. 2(3), 123-125 [cit. 2020-05-07]. ISSN 2212-5531. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212553113000605?via%3Dihub>
60. SPÍŽEK, J., 1999. Rezistence na antibiotika. *Vesmír* [online]. 78(27), 27-32 [cit. 2019-07-07]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>
61. ŠILHÁNKOVÁ, L., 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: Academia, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
62. ŠMARDA, J., J. DOŠKAR, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ, 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
63. Tabák virginský, ©2020. *AtlasRostlin* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.atlasrostlin.cz/kvetiny/tabak-virginsky>
64. TICHÝ, O., ©2020. Jak je to s očkováním proti tuberkulóze? *VZP* [online]. ©2020 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.vzp.cz/o-nas/tiskove-centrum/otazky-tydne/jak-je-to-s-ockovanim-proti-tuberkuloze>
65. ÚZIS, 2019. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2018, 2019*. [online]. ÚZIS [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008271/tbc2018-cz-a2b.pdf>
66. VELAYATI, A.A., P. FARNIA a M.R. MASJEDI, 2013. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* [online]. 6(4), 307-309 [cit. 2020-07-07]. ISSN 940-5901. Dostupné z: <https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631557/>
67. VERMA, Ch., S. NANDA, R.K. SINGH a S. MISHRA, 2011. A Review on Impacts of Genetically Modified Food on Human Health. *The Open Nutraceuticals Journal* [online]. 4(1), 3-11 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.2174/1876396001104010003. Dostupné z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TONUTRAJ-4-3>

68. VILÍMOVSKÝ, M., 2019. Antibiotika. *Medlicker* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/1698-antibiotika>
69. VONDREJS, V., 2010. Odrůda genově modifikovaných brambor Amflora. *Vesmír* [online]. 2010, **89**(6), 392-393 [cit. 2020-05-11]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2010/cislo-6/odruda-genove-modifikovanych-brambor-amflora.html>
70. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
71. VOTAVA, M., c2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
72. YOUNT, L., 2008. *Biotechnology and Genetic Engineering*. New york: Infobase Publishing. ISBN 978-1-4381-3082-8.

8. Seznam obrázků

Obrázek 1. Připravená MS.R média ve flow boxu	46
Obrázek 2. Suspenze bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
Obrázek 3. Tři mladé listy netransgenního tabáku	52
Obrázek 4. Transformované segmenty tabáku na MS.R médiu v Petriho miskách	52
Obrázek 5. Poprvé přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky	53
Obrázek 6. Podruhé přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky	53
Obrázek 7. Potřetí přesazené segmenty na MS.R médiu s antibiotiky	53
Obrázek 8. Petriho misky se segmenty uložené v kultivační místnosti.....	54
Obrázek 9. Segmenty začínající tvořit kalusy	54
Obrázek 10. Segmenty tvořící kalusy a segmenty netvořící kalusy	55
Obrázek 11. Uhynulé segmenty a regenerující se kalusy	55
Obrázek 12. Prýty na MS médiu obsahujícím antibiotika.....	56
Obrázek 13. Vypěstovaný GM tabák.....	56
Obrázek 14. Vzorky ponořené v substrátu X-Gluc	61
Obrázek 15. Vzorky v exsikátoru	61
Obrázek 16. Vyšetá semena tabáku na médiu	63
Obrázek 17. Druhá generace transgenních i netransgenních rostlin a kontroly	64
Obrázek 18. Elektroforeogram na přítomnost Ti plazmidu v bakteriích	67
Obrázek 19. Elektroforeogram z rostlinných vzorků na přítomnost transgenu nptII.....	69

9. Seznam tabulek

Tabulka 1. Chemikálie na výrobu 500 ml MS média	44
Tabulka 2. Chemikálie na výrobu 1 l MS.R média.....	45
Tabulka 3. Chemikálie na přípravu 1 l LK média.....	46
Tabulka 4. Složení roztoku A na 1l	48
Tabulka 5. Složení roztoku B na 100 ml	49
Tabulka 6. Složení zásobního roztoku 50x koncentrované TAE na 1 l.....	50
Tabulka 7. Složení reakční směsi na 20 μl.....	58
Tabulka 8. Nastavení cyklu pro PCR s annealingovou teplotou 55 °C	59
Tabulka 9. Množství sledovaných rostlin	71
Tabulka 10. Množství očekávaných rostlin pro štěpný poměr 3:1.....	72
Tabulka 11. Výsledky vypočítané pomocí chí-kvadrát testu	72

10. Seznam zkratek

A.tumefaciens – *Agrobacterium tumefaciens*

AV – Akademie věd

BAP – 6- benzylaminopurin

BCG – bacillus calmette guerin, očkovací vakcína

Bt – *Bacillus thuringiensis*

CCC – covalent closed circle

cm – centimetr

č. - číslo

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E.coli – *Escherichia coli*

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

ES – evropská společenství

g – gram

GM – geneticky modifikované

GMO – geneticky modifikované organizmy

HCL – kyselina chlorovodíková

$K_3Fe(CN)_6$ – hexakynoželezitan draselný

$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ – hexakynoželeznatan draselný trihydrát

kb – kilopár bází

KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný

KOH – hydroxid draselný

l – litr

LK médium – Langley a Kado

M – molární

mg – miligram

MgSO₄ – síran hořečnatý

ml – mililitr

mM – milimolární

MS médium – Murashige and Skoog

MS.R médium - Murashige and Skoog. Regeneration

NAA – kyselina 1- naftyloctová

NaCl – chlorid sodný

NaOH – hydroxid sodný

nm – nanometr

OC – open circle

pb – pár bazí

PCR – polymerázová řetězová reakce

rezis. – rezistentní

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecylsíran sodný

senz. – senzitivní

TAE – Tris-acetát-EDTA

TBC – tuberkulóza

T-DNA – transferová deoxyribonukleová kyselina

TDR-TB – total drug resistant-tuberculosis, totálně rezistentní bakterie tuberkulózy vůči antibiotikům

Ti – tumor inducing

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

tzv. – tak zvané

UMBR – Ústav molekulární biologie rostlin

V – volt

°C – stupeň Celsia

μl – mikrolitr

μm - mikrometr