

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Způsoby detekce a kvantifikace výskytu GMO v
potravinách**

Bakalářská práce

**Sofia Akopyan
Výživa a potraviny**

Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2021-2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Způsoby detekce a kvantifikace výskytu GMO v potravinách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Jakubu Vaškovi Ph.D., za cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce.

Způsoby detekce a kvantifikace výskytu GMO v potravinách

Souhrn

Cílem této bakalářské práce je shrnout základní způsoby detekce a kvantifikace geneticky modifikovaných organismů v potravinách. Dále jsou v práci zohledněny rozdílné postupy a ukazatele jednotlivých metod, jako například polymerázová řetězová reakce a další metody od ni odvozené.

V úvodní kapitole jsou popisovány pojmy geneticky modifikovaných organismů a následně uveden proces jejich výroby v genetickém inženýrství. V rámci této kapitoly jsou také popsány cíle vytváření GM linií rostlin a regulace nakládání GMO po celém světě.

Následující kapitoly jsou věnovány metodám úpravy a izolace rostlinného materiálu pro následnou identifikaci GMO. V práci je také zohledněna metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), která je velmi důležitá pro pochopení principů detekce geneticky modifikovaných organismů. Dále je kapitola věnována dalším metodám, které jsou od PCR odvozené.

Klíčová slova: GMO, Monsanto, Roundup, Basta, PCR (polymerázová řetězová reakce), real-time PCR (PCR v reálném čase)

Methods of detection and quantification of GMOs in food

Summary

The main goal of this thesis is to summarize basic methods of detection and quantification of genetically modified organisms in food. Furthermore, different process and indicators of individual methods are taken into account in this thesis, such as the PCR (polymerase chain reaction) and other methods derived from it.

The introduction applies to the concept of genetically modified organisms and the process of their production in genetic engineering. The targets of creation GM lines and the regulation of GMO disposal worldwide, are also described in this chapter.

Further chapters are dedicated to methods of treatment and isolation of plant material for subsequent identification of GMOs. Principles of PCR (Polymerase Chain Reaction), which is very important for understanding the principles of detection genetically modified organisms. Then the chapter is dedicated to other methods that are derived from PCR, for example, reverse transcription, real-time PCR, and others.

Keywords: GMO, Monsanto, Roundup, Basta, PCR (polymerase chain reaction), real-time PCR

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Pojem GMO	9
3.1.1	Proces genetického inženýrství	9
3.1.2	Základní cíle tvorby geneticky modifikovaných rostlin	13
3.1.3	Regulace nakládání a označování GMO v Evropské unii a jiných zemích	17
3.2	Základní metody detekce a kvantifikace GMO	19
3.2.1	Úprava a zpracování rostlinného materiálu pro detekci GMO	19
3.2.2	Identifikace GMO	22
3.2.3	Metody vycházející z polymerázové řetězové reakce (PCR)	23
3.2.4	Další metody detekce GMO na základě polymerázové řetězové reakce	27
3.2.5	Real-time PCR	29
3.2.6	Metody založené na analýze DNA	32
	Závěr	36
	Seznam obrázků	37
	Seznam použitých zdrojů	38

1 Úvod

Pojem geneticky modifikovaného organismu (GMO) je obecně pojmem značně širokým a zahrňuje geneticky modifikované organismy od těch nejjednodušších, kam spadají mikroorganismy, až po ty nejsložitější, jako jsou rostliny a živočichové. V rámci bakalářské práce pak bude středem zájmu problematika související s geneticky modifikovanými zemědělskými plodinami a odvozenými produkty (potraviny a krmiva). Za účelem analýzy obsahu GMO v potravinách jsou většinou využívány metody polymerázové řetězové reakce a real-time PCR (PCR v reálném čase), kdy základem je v tomto ohledu analýza DNA.

Přeji si, aby se má práce stala alespoň malým přínosem pro toho, kdo se o danou problematiku zajímá.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce zpracování přehledu metod pro identifikaci GMO v potravinách, které dnes mají velké praktické využití nejen v potravinářství, ale i v jiných oblastech genetiky či medicíny. V bakalářské práci se autor zabývá představením o geneticky modifikovaných organismů, jejich tvoření a využití ve vědních oborech. Část práce je věnována jednotlivým metodám detekce. Následně je popsán princip jejich fungování a praktického využití na jednotlivých příkladech.

3 Literární přehled

3.1 Pojem GMO

Můžeme uvést, že snahou výrobců potravin a rovněž i zemědělských surovin, je nepochybně dosažení žádoucí kvality za přiměřené náklady. Narůstající zájem na ekologii, k němuž docházíme v moderním světě, však na druhou stranu omezuje možnosti z hlediska pěstební, chovatelské a zpracovatelské technologie. Jedním ze způsobů umožňujících dosažení požadovaného výsledku je právě genetická modifikace, které si klade za cíl zlepšení vlastností, dosažení vyššího výnosu, případně pak dosažení lepší zpracovatelnosti. Tím se zabývá vědecký obor genetického inženýrství. Organismy, u kterých je upravené pořadí genů nebo nukleových bázi v DNA se nazývají geneticky modifikované. (Ondřej & Drobník 2002).

Podle Ondřeje a Drobníka (2002), geneticky modifikovanými organismy (GMO) mohou být mikroorganismy, živočichové a rostliny které jsou schopné reprodukce a přenosu genetického materiálu, získaného metodami genetického inženýrství. Získaný dědičný materiál různých organismů byl změněn modifikací fragmentů DNA nebo kombinací genů a vložen do původního organismu. Využití GMO probíhá v různých oborech a je široce používáno v biologickém výzkumu, zemědělství, potravinářství, zdravotnictví. Například laboratorní myši jsou navrženy pro biomedicínské studie, bakterie jsou využité tak, aby produkovaly léky (např. inzulin) a různé plodiny pro zemědělství. Všechny tyto produkty genetického inženýrství byly vytvořeny pomocí stejných základních kroků výroby GMO.

3.1.1 Proces genetického inženýrství

Výroba geneticky modifikovaných organismu probíhá postřeednictvím 4 základních kroků, které jsou uvedeny na Obrázku 1. Tento postup je podrobně vysvětlen níže na příkladech společnosti Monsanto, protože podrobnosti o jejich technologiích jsou veřejně dostupné. Další velké společnosti jako Syngenta, BASF, Dow, Bayer a Du Pont používají podobné metody, které jsou stručně uvedeny na jejich příslušných webových stránkách.

Krok 1: Identifikace vlastnosti organismu. Aby vědci identifikovali žádoucí novou vlastnost, hledají znaky, které by umožnili plodině přežít ve specifickém prostředí. Pokud výzkumníci usilují o zlepšení nutričního obsahu plodiny, prozkoumali by seznam rostlin, o kterých se domnívají, že produkují živinu, která je předmětem zájmu. Příkladem takového rysu v současné době je tolerance k herbicidu Roundup (Paine et al., 2005).

Krok 2: Izolace požadovaného genu. Pro tvorbu GMO je obvykle izolován žádaný gen (řetězec DNA), opatřený vhodným promotorem tj. sekvencí DNA, která umožňuje jeho přepis do RNA. Přepis je ukončen díky přítomnosti terminátoru, což je specifický úsek na řetězci (Paine et al., 2005). Prostřednictvím propojení těchto elementů dochází ke vzniku takzvaného konstruktů na řetězci DNA. Jedná se o tzv. rekombinantní DNA nebo rekombinantní kazetu, ta je přenášena jako celek do genomu akceptora. V některých případech mohou být začleněny rovněž některé další elementy a tedy úseky DNA se specifickou funkcí, které zesilují expresi genů, případně ji modulují (Beránek, 2016).

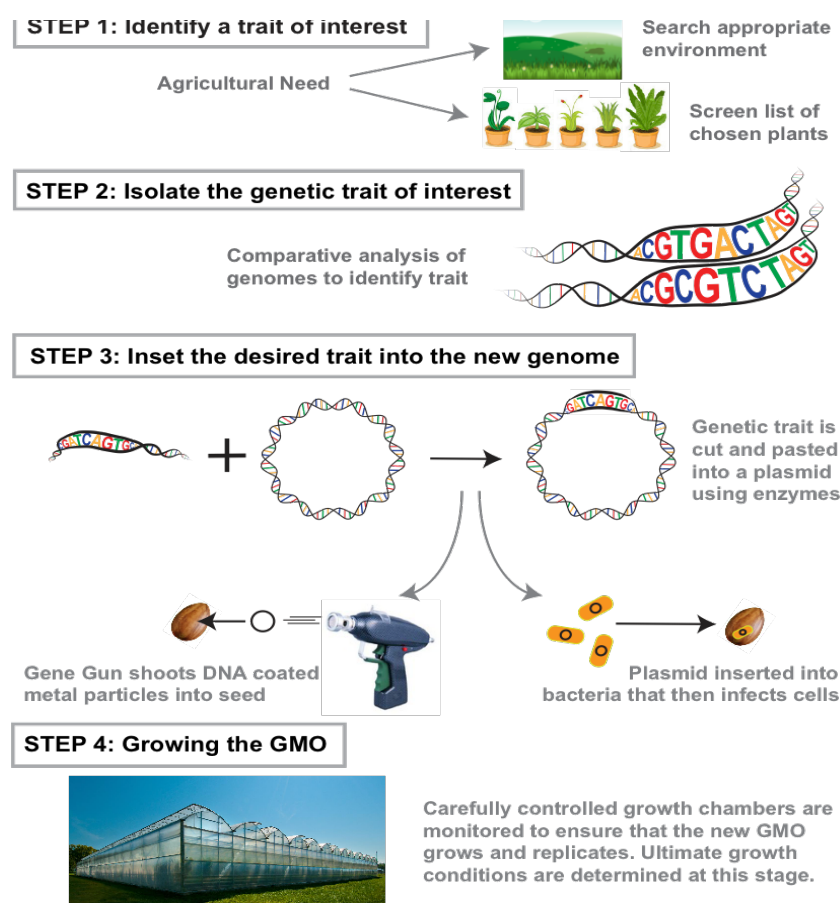
Krok 3: Vložení požadovaného genetického znaku do genomu. Změna genomu například u rostlinných semen je obtížná kvůli jejich tuhé struktuře. Mnoho biotechnologických společností používá „genové zbraně“, které vystřelují kovové částice potažené DNA do rostlinné tkáně (Boyle, 2011). Dle BBC (2019), společnost Monsanto již nepoužívá genové zbraně, ale místo toho využívá bakterií, zvané *Agrobacterium tumefaciens*, které přirozeně napadají semena a mění rostliny vložím fragmentů své vlastní DNA do jejich genomu. V biotechnologickém výzkumu obvykle upravuje bakterie, aby produkovaly požadovaný protein. To se provádí pomocí enzymů k štěpení a vkládání požadovaného vlákna DNA do plazmidu, což je malá kruhová molekula DNA. Bakterie jsou poté šokovány teplem nebo elektřinou, aby buňky přijaly upravený plazmid.

Celý proces přenosu se nazývá transgenóza a organismy, které jsou modifikovány tímto způsobem se označují jako transgenetické organismy. Obvykle jsou přenášeny 2 geny, jeden z nich kóduje žádaný protein, druhý umožňuje selekci geneticky modifikovaných buněk. Tím pádem tyto rekombinantní DNA jsou stabilně integrovány do genomu. Sekvence obklopující spojení DNA akceptora a rekombinantní DNA určuje dané GMO, které se vyrábí (Ratledge & Kristiansen 2006).

Krok 4: Pěstování GMO. Poté, co byla genetická vlastnost úspěšně vložena do genomu organismu, musí být modifikovaný organismus schopen růst a replikovat se se svým nově vytvořeným genomem. Nejprve je třeba zkontrolovat genotyp organismů, aby vědci množili pouze ty organismy, u kterých byl genom správně upraven.

Biotechnologické společnosti investují velké částky do udržování těchto rostlin naživu a reprodukce, jakmile byly úspěšně vytvořeny. Společnosti používají speciální klimaticky řízené růstové komory a biologové často kontrolují rostliny ručně, aby se ujistili, že rostou podle očekávání (Boyle, 2011).

Obrázek 1: 1. Identifikace vlastnosti organismu. 2. Izolace požadovaného znaku. 3. Vložení genetického znaku do genomu. 4. Pěstování GMO.



Zdroj: <https://www.bayer.com/en/agriculture>

Nejvýznamnější geny použité pro tvorbu GM rostlin jsou rezistentní vůči herbicidům na bázi glufosinátu-amonného (např. epsps, pat/bar) a geny rezistentní vůči hmyzu. Glufosinát-amonný je světle žlutá nebo modrá kapalina která se používá k regulaci jednoletých a trvalých plevelů. Také se aplikuje v ovocných sadech, vinicích, u okrasných stromů, na plantážích olejových palem (Beránek 2016).

Hlavním cílem většiny genetického inženýrství prováděného na potravinách je zvýšit výnos plodin a/nebo zlepšit nutriční hodnotu.

Podle Kočárka (2004), se od roku 1996 kdy poprvé se objevili první geneticky modifikované rostliny (např. soja, bavlna). V této době rostlinné kultury byly vysázeny na celkové ploše jenom 1,7 milionu hektarů. Do roku 2014 celková plocha GM rostlin dosáhla maximálně 181,5 milionu hektarů a v roce 2015 klesla na 179,7 milionu hektarů ve 28 zemích, tj o 1%. Roční výkyvy v hektarech GM plodin (jak nárůst tak i pokles) závisí na několika faktorech. Například v roce 2015 hlavním faktorem vedoucím ke snížení plochy byl pokles celkové zemědělské plochy kultur. V tuto chvíli bylo kukuřice o 4% méně a bavlny o 5%, což zapříčinily nízké ceny. Proto někteří zemědělci přecházejí na méně náročnou plodinu jako je GM sója, stejně jako další např. slunečnice a čirok. V roce 2015 se odolnost vůči hmyzu a herbicidům začala projevovat ve čtyř hlavních plodinách: kukuřice, sójové boby, bavlna a řepka. K dnešnímu dni je známo kolem 406 linií GM rostlin (linie sóji, kukuřice, řepky, bavlny, brambor, cukrové řepy, rajčat, rýže a taky tam patří slunečnice, papája, len, vojtěška, hřebíček, švestka, růže, tabák a další) (Beránek 2016).

3.1.2 Základní cíle tvorby geneticky modifikovaných rostlin

V současné době existuje několik hlavních směrů tvorby a využití GM plodin. Každý z nich má své výhody i rizika související s jejich používáním.

Vytváření GM rostlin může zvýšit produktivitu zemědělství a zlepšit nutriční hodnoty potravin. Také poskytuje nepřímé pozitivní efekty jako je snížení objemu používání pesticidů, zvýšení stability a bezpečnosti plodin potravinářských výrobků, což je velmi důležité pro rozvojové země (Brown 2007).

3.1.2.1 Zvýšení odolnosti rostlin vůči hmyzu

V současné době je velký problém napadení rostlin hmyzem, tím se snižuje produkce a výnosy rostlinných kultur. Například bakteriální Bt-toxin se používá v zemědělství jako účinný insekticid. Široké použití mají grampozitivní půdní bakterie zvané *Bacillus thuringiensis* (zkratka Bt), které produkují spory obsahující toxiny (častěji jsou označovány zkratkou Cry). Získané Bt-toxiny se používají pro výrobu pesticidů. Bacteriální geny (pocházející z Bt-toxinu), které vloženy do rostlinného genomu předávají rezistenci vůči řadě hmyzích škůdců a také mají insekticidní vliv na hmyz z velké řady *Lipidoptera* (motýli). Nejčastěji lze gen Bt-toxinu nalézt u kukuřice. Rezistence vůči hmyzu nastává v důsledku uložení následujících genů do genomu kukuřice- Cry2Ab2, Cry1A.105 a Ecry3.1Ab. Tyto geny jsou zodpovědné za syntézu endotoxinů, které mají schopnost se spojit s receptory buněk střevního epitelu hmyzu. Následně to vede k narušení osmotické rovnováhy a beněčné lýze. Příkladem této GM kukuřice je 5307, MON89034, MON810 (Kočárek, 2004).

3.1.2.2 Zvýšení odolnosti rostlin vůči působení herbicidů

Princip působení herbicidů je takový, že obvykle mají toxický účinek na jeden důležitý enzym pro rostlinu. Také narušují proces beněčného dělení, syntézy lipidů, organizace mikrotubul atd. Nejpůsobivějších výsledků v této oblasti bylo dosaženo metodami v genetickém inženýrství, kdy byly vytvořeny rostlinné linie nesoucí geny bakteriální rezistence vůči fosfotricinu Basta (4-hydroxy-methyl fosphinoyl-D,L-homoalanin), glyfozátu Roundup (A-fosfinometylglycin) a dalších.

Glyfozát (obchodní název- Roundup) inhibuje syntézu enzymu EPSPS (enzym 5-enolpyruvát šikimát-3-fosfosyntáza) v řadě rostlin (např. sója, cuková řepa, kukuřice). EPSPS hraje klíčovou roli v syntéze aromatických aminokyselin a proteinů. Glyfozát inhibuje produkci enzymu a tím pádem se netvoří určité proteiny. Princip odolnosti rostlin vůči herbicidům zahrnuje užití genu z bakterií rodů *Agrobacterium*, které jsou rezistentní vůči glyfozátu. Většinou se transgeny používají v sóje, bavlníku, řepce a kukuřici. Kukuřičný mutantní gen EPSPS izolovaný z rostlinných explantátů produkuje protein, který je funkční a enzym není degradován herbicidem díky mutaci. GM bavlna tvoří více než 80 % celkové produkce (rezistence k glyfozátu). GM bavlna je více hospodárná k životnímu prostředí a také snižuje potřebu orby a kypření.

Další herbicid zvaný fosfinitricin (obchodní název- Basta) má inhibiční účinek na enzym glutaminsyntázu. Glutaminsyntáza ničí amoniak, který vzniká při použití dusičnanů. Pokud je enzym inhibován, ionty amoniaku se hromadí do toxických koncentrací a rostlina umírá. Inaktivace glutaminsyntázy také vede k inhibici fotosyntézy. Oba tyto účinky se kombinují s působením herbicidu. Pro získání necitlivosti na tento herbicid byly použity dva transgeny. Oba jsou z běžné půdní aktinomycety *Streptomyces sp.* Jsou to geny zvané BAR a PAT. Gen BAR (bialaphos resistance) byl získán ze *Streptomyces hygroscopicus* a obdobný gen PAT (phosphinothricin acetyltransferase) byl klonován ze *Streptomyces viridochromogenes*. Enzymy kodované těmito geny přeměňují herbicidy na sloučeniny, které jsou netoxické pro rostliny a živočichy a rychle se rozkládají. Tyto enzymy přidávají acetylovou skupinu k alaninové aminoskupině fosfinitricinu, čímž ji inaktivují. Takový způsob rezistence vůči herbicidům byl rozvinut u řepky olejné a kukuřice.

Moderní zemědělská technika vyžaduje používání herbicidů, proto se neustále pracuje na zvýšení odolnosti zemědělských plodin vůči nim (Trnková 2015).

3.1.2.3 Odolnost vůči klimatickým podmínkám

Antioxidanty a geny, které kódují enzymatické a neenzymatické látky mají schopnost odstraňovat volné kyslíkové radikály a taky se používají k odstranění oxidačního stresu. Jedná z takových látek je superoxiddizmutáza. Příkladem je vnesení genu tabáku (kódujícího antioxidant superoxiddizmutázu) do genomu vojtěšky.

Dalším příkladem je sója MON87460. Sója obsahuje gen *cspB*, který syntetizuje bílkovinu (cold shock protein) produkovanou gram pozitivní bakterií bacil senný (*Bacillus subtilis*). Gen *cspB* pomáhá udržovat normální funkci buněk v podmínkách sucha (Higgins a Dworkin, 2012).

Problém odolnosti vůči dehydrataci je možné vyřešit změnou složení lipidů plazmatické membrány. Pomocí enzymu delta-desturáza, který koduje gen izolovaný ze sinice, mění se profil mastných kyselin v rostlině. Vložením tohoto genu do genomu rostliny dochází k jejím menším ztrátám vody (Trnková, 2015).

3.1.2.4 Změna složení tuku a mastných kyselin

Příkladem jsou geneticky modifikované linie řepky 23-18-17 a 23-198, které byly získány pro zlepšení složení mastných kyselin semen. Do genomu řepky byl vložen gen pro lauroyl-ACP thioesterázu získaný z kalifornského vavřínu a to umožnilo změnit složení mastných kyselin a přivedlo k akumulaci až 45% laurátu (kyselina laurová) místo kyselin stearové a olejové v řepkovém oleji (Health Canada, 1999). Použité linie řepky 23-18-17 a 23-198 při výrobě jako náhradu za jiné oleje s vysokým obsahem laurátu (např. palmový). Oleje s vysokým obsahem laurátů slouží jako hodnotný potravinářský produkt a také se používají v průmyslu pro výrobu detergentů, náhrady mléka a cukrářských tuků. Odrůdy s vysokým podílem kyseliny stearové obsahují kopii genu pro enzym stearát desaturázu. Tato genová struktura tlumí projev genu pro stearát desaturázu, což pak vede k nahromadění olejů s nadbytkem kyseliny stearové. Oleje s vysokým obsahem kyseliny stearové jsou vhodné pro výrobu margarínu. (Drobník, 2008).

3.1.2.5 Změna růstových vlastností a výnosu

Příkladem je sója MON87712 se zvýšeným růstem a reprodukční schopností (obsahuje gen *bbx32* kodující protein, který reguluje každodenní fyziologické procesy rostliny) a eukalyptus H421, který obsahuje gen *cel1*, který koduje protein pro podporu růstu (Passarge 2015). Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je zdrojem představených genů *bbx32* a *cel1*. Je to první rostlina, která byla v roce 2000 poprvé sekvenována. Huseníček je nenáročnou a jednoletou rostlinou s krátkou generační dobou (Hoskovec, 2007).

3.1.2.6 Změna kvality produktu

Jedním z příkladů je trvanlinost plodů rajčat. Rajče zvané FLAVR SAVRTM obsahuje gen flavr savr, který je zodpovědný za tvorbu antimediatorové-RNA. Tato RNA tlumí tvoření enzymu polygalakturonidázy, zodpovědného za rozklad molekul pektinu v buněčné stěně, což vede ke zpoždění měknutí plodů. Později se zjistilo, že aktivita enzymu polygalakturonidázy nezabrání změknutí ovoce, ale do značné míry zabrání kažení a propůjčí ovoci lepší chuťové vlastnosti. Komerční trvanlivost se prodloužila z 1 týdne na 2 až 3 týdny.

Další gen Etr1-1, který může být zaveden genomu rajčat pro zlepšení jejich vlastnosti, je umělé vytvořený. Tento gen brání expresi jednoho z genů pro tvorbu etylénu. Etylén je plynný hormon, který signalizuje a spouští řadu procesu pro zrání plodů. Pokud se etylén nevytvoří ve správnou dobu vývoje, rajče nezčervenají ani nedozrají. Lze je pak sklízet, přepravovat bez poškození a potom déle skladovat. Pokud mají ještě dozrát, umístí se do nádoby, do které spustí etylén. Pak se dostáneme dozrálé a nepokažené ovoce vhodné pro další využití a konzumaci.

Dalším příkladem je růže WKS82 / 130-4-9, která obsahuje gen bp40 izolovaný z Violky zahradní (*Viola wittrockiana*), který katalyzuje syntézu modrého pigmentu antokyanového delfinidinu a jeho derivátů (Ratledge 2006).

3.1.2.7 Zvýšení rezistence vůči virům

V roce 1986 P. Abel poprvé získal formu tabáku odolnou vůči viru tabákové mozaiky. Odolnost rostlin pomocí přenesení vírového genu do rostlinného genomu, který kóduje tzv. obalový protein (CP-coat protein). Tento přístup byl tedy úspěšně přizpůsoben k různým rostlinám (Gonsalves, 2004).

Rostlina produkuje vírovou bílkovinu dříve, než do něj vir vstoupí, což stimuluje aktivaci obranných mechanismů, které blokují množení hostitelů. Poprvé to bylo použito při záchraně průmyslu papáji. Šíření papájového ringspot viru (PRSV) je limitujícím faktorem produkce papáji po celém světě. V roce 1992 byl PRSV nalezen na ostrově Havaj, kde se pěstovalo asi 95 % havajské papáji. Během dvou let se PRSV rychle rozšířil a přivedl

průmysl k totální destrukci. Do roku 1995 byly vyvinuty první GM odrůdy papáji Rainbow a SunUp, které nejsou náchylné k infekci tímto virem a které se stále pěstují (Ratledge 2006).

3.1.3 Regulace nakládání a označování GMO v Evropské unii a jiných zemích

Na evropský trh je v současnosti povoleno uvádět pouze zhruba pět desítek GM rostlin (např. kukuřice, sója, bavlník, řepka a cukrovka). Veškeré povolené GMO potraviny a produkty z nich vyrobené, které obsahují více než 0,9 % GMO, musí být označeny v souladu s evropským nařízením č. 1829/2003. Nicméně je nutno dodat, že v rámci evropského trhu rovněž dochází k záchytu nepovolených GMO (například rýže). Proto je důležité GMO sledovat, platí pro ně nulová tolerance. Geneticky modifikovaní živočichové (například losos) nejsou prozatím povoleni k uvádění na evropský trh (Ministerstvo životního prostředí, 2004).

3.1.3.1 Normy nakládání v České republice

Je vhodné se krátce pozastavit u právních předpisů, které upravují nakládání s GMO v naší zemi. Můžeme uvést, že v tomto ohledu vychází ČR z platných právních předpisů EU, jelikož problematika nakládání s GMO a jejich produkty představuje součást společné politiky EU.

Mezi základní právní akty v ČR patří zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů a dále také zákon č. 252/1997 Sb., o zemědělství, ve znění pozdějších předpisů.

Dále můžeme uvést, že vydávání rozhodnutí ohledně nakládání s GMO je v kompetenci Ministerstva pro životní prostředí, které takto činí v kooperaci s dalšími ministerstvy. Vzhledem ke značné šíři problematiky byla stanovena Česká komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty. Na evropské úrovni pro tyto účely funguje Evropská komise o bezpečnosti potravin obsahujících GMO a dále pak rovněž některé další organizace.

V tuzemském prostředí je problematika nakládání s GMO upravena prostřednictvím zákona Ministerstva životního prostředí č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty prováděcí vyhláškou č. 209/2004 Sb., o bližších

podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Prostřednictvím zákona č. 346/2005 Sb., kterým se mění zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty následně došlo v roce 2005 k převedení evropské směrnice 2001/18/EC a 98/81/EC do tuzemské legislativy. Uvedený právní předpis tedy upravuje nakládání s GMO, jejichž schopnost reprodukce byla zachována a nakládání s produkty, které takové životaschopné organismy zahrnují (nevztahuje se tedy na potraviny vyrobené ze sójové mouky nebo řepkového oleje, krmiva obsahující kukuřičný šrot a další produkty, které životaschopné organismy neobsahují).

Můžeme uvést, že primárním smyslem je vymezit povinnosti pro fyzické a právnické osoby takovým způsobem, aby mohla být zajištěna ochrana zdraví člověka a zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti. Kromě toho je rovněž stanoven postup udělování oprávnění k nakládání s GMO a produkty a systém kontroly týkající se dodržování zákona. S ohledem na fakt, že oblast genetických modifikací se rozvíjí poměrně dynamicky a v současnosti nadále nejsou známy veškeré potenciální dlouhodobé dopady, jsou zákony postaveny na principu předběžné opatrnosti a zahrnují ustanovení, které připouští v případě potřeby možnost prostřednictvím rozhodnutí správního úřadu pozastavit nebo případně ukončit nakládání s GMO (Ministevstvo životního prostředí, 2011).

3.1.3.2 Označování GM potravin mimo EU

Zatímco v prostředí EU je tedy označování GM potravin a krmiv povinné na základě daného nařízení Evropského parlamentu, v některých dalších zemích, mezi které lze zařadit například USA, Kanadu, Brazílii a africké státy, pak toto označování naopak (prozatím) povinné není (Dostálová a Kadlec, 2014). Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) v tomto ohledu zastával názor, že značení produktů by nemělo vycházet ze způsobu, kterým byl daný produkt získán. Pakliže byl tento postup již jednou v minulosti schválen pro zemědělské postupy nebo průmyslovou výrobu, je tedy údajně označení na potravinách nadbytečné. Nicméně později začal být v USA připravován zákon, který bude povolovat, nikoli však požadovat označování potravin, vyrobených z GMO. Od doby, kdy v USA vznikl tento nový federální zákon o povinném označování produktů, které obsahují GMO, jsou dopady tohoto zákona nadále velice diskutovaným tématem. Dodejme, že tento federální zákon o označování GM potravin vstoupí v platnost na počátku ledna roku 2022.

V rámci EU lze tedy mluvit o silné podpoře jednotného označování GM potravin. Značení potravin je určeno zejména k tomu, aby byla samotnému spotřebiteli poskytnuta možnost zvolit si mezi GM a klasickým výrobkem a není tedy spojeno se zdravotní (ne)bezpečností produktu. Pakliže by totiž existovala určitá subjektivní pochybnost ohledně bezpečnosti určitého produktu, značením nedojde k vyřešení tohoto problému. Vhodným příkladem v tomto ohledu mohou být tabákové produkty, které jsou označovány jako zdraví škodlivé, nicméně nadále je spotřebitelé kupují. K problému z hlediska označování dochází v případě dovážených zpracovaných potravin, jejichž součástí jsou přísady z kukuřice a sóji, tedy plodin pěstovaných často právě jako GMO. Jak již bylo nastíněno, EU jako celek je z velké míry závislá na dovozu krmiv pro hospodářská zvířata, která jsou dovážena také ze zemí, kde k označování GM krmiv není stanovena žádná povinnost. Pro dovozce na základě toho dochází ke vzniku povinnosti na řádné označení takových produktů při dovozu do EU (Drobník, 2008).

3.2 Základní metody detekce a kvantifikace GMO

V rámci následující kapitoly se zaměřím zejména na pracovní postupy rozpoznávání geneticky modifikovaných organismů. Nejprve musím uvést postupy z hlediska úpravy a zpracování detekčního GM materiálu a následně budou podrobněji představeny ústřední metody pro detekci GMO, které jsou užívány v rámci nejen tuzemského prostředí, ale i po celém světě.

3.2.1 Úprava a zpracování rostlinného materiálu pro detekci GMO

Použití metod pro vysoce kvalitní a kvantitativní analýzu nukleových kyselin klade vysoké požadavky na kvalitu jejich uvolňování. Akumulace produktů záleží nejen na počtu cílových molekul DNA, ale také na stupni čištění vzorku od inhibitorů (látky zpomalující reakci). Metody extrakce GM vzorků by měli poskytnout minimalizaci ztrát nukleových kyselin. Během izolace se pro zajištění přesnější kvantitativní analýzy vzorků nesmí ztratit citlivost. Rostlinná tkáň a produkty jejich zpracování jsou obtížné pro izolaci

DNA, protože obsahují velké množství polysacharidů, fenolů a pigmentů. Kvůli nim se snižuje účinnost reakce (Demeke et al 2009).

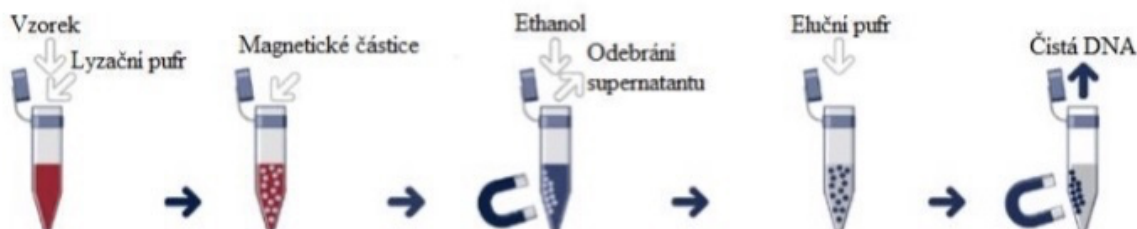
První důležitý krok izolace je šetrná destrukce buněk a tkání obsahujících nukleové kyseliny. Rozpad buněk a následné uvolnění jejich obsahu se provádí pomocí lyzačního pufru obsahujícího detergenty, které mohou způsobit destrukci v důsledku zvýšené permeability buněčné membrány (Shendure & Ji 2008). Nejčastěji se proto používá deodecylsulfát sodný (SDS). Jeho působením se dochází k disociaci nukleoproteinů a štěpení uvolněných proteinů enzymem proteináza K (nejběžnější) (Demeke et al 2009).

3.2.1.1 Metody izolace DNA

1. CTAB je klasická metoda homogenní izolace z rostlinných objektů pomocí detergentu cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB). Princip reakce spočívá v tom, že DNA vytváří komplex s cetyltrimethylamonium bromidem a s částicí silikagelu (nebo křemeliny) v přítomnosti činidla guanidinthiokyanát (Murray a Thompson 1980). V závislosti na rozdílné rozpustnosti CTAB- je lze izolovat a získat požadovanou DNA. Metoda je účinná pro izolaci malých množství DNA a RNA. CTAB se vyznačuje tím, že extrahovaná DNA získána s maximálním ziskem a minimálním množstvím inhibitorů. Je široce používána pro izolaci DNA z rostlinných surovin, rostlinných složek potravin a krmiv pro zvířata. Hlavní nevýhodou CTAB je značná doba jedné extrakce, která trvá déle než 4 hodiny. Při práci je potřeba velké množství manuálních postupů, což komplikuje práci pomocí metody CTAB (Porebski et al. 1997).
2. Metoda izolace DNA sorpcí na (para) magnetických částicích (MPs), jejichž jádro má speciálně upravený povrch pro vazbu nukleových kyselin a je obvykle složeno z maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nebo magnetitu (Fe_3O_4). MPs reagují na vnější magnetické pole a jsou schopny navázat různé molekuly. Při izolaci MPs jsou přidány do vzorku, kde se navážou na cílové molekuly. Modifikované MPs jsou pak magnetem přitahují se ke stěně zkumavky, při tom nenavázané částice opouštějí roztok. Pak zbývající roztok je zlikvidován. Dalším krokem je promytí a nakonec uvolnění MPs s navázanými molekulami do přidaného roztoku. Navázané molekuly se od MPs oddělují různými fyzikálně-chemickými kroky (např. denaturaci). S takto získanými molekulami můžeme dále pracovat (Safarik et al

2012). Na Obrázku 2 je vidět princip popsané reakce. Výhodou metody je, že proces sorpce je rychlý a netrvá déle než 1,5 hodiny. Nevýhodou je, že ztráty DNA jsou vyšší než při izolaci pomocí metody CTAB (Safarik et al 2012).

Obrázek 2: Princip izolace DNA pomocí magnetických částic (Creative diagnostics)



Zdroj: upraveno dle Berensmeier, 2006

3. Fenol-chloroformová metoda. Dochází k izolaci vodní fáze obsahující DNA od polysacharidů, volných nukleotidů, složek membrán, degradovaných proteinů a lipidů. Oddělení těchto složek je způsobeno smícháním pufrového fenolu a lyzační směsi. Po oddělení složek bude vodní fáze převedena do směsi chloroformu a isoamylalkoholu. Takto izolovaná DNA je zbavená jakýchkoliv znečištění. Následujícím okyselením (octan amonný nebo sodný) a přidáním 96% ethanolu (nebo acetonu) se DNA vysráží z vodné fáze. Dále nastává očištění sedimentu DNA 70% ethanolom a následně vyčištěné granule se rozpustí v demineralizované vodě nebo v TRIS/EDTA elučním pufru (Beránek, 2016).

4. Izolace pomocí chelexu. Je to pryskyřice, která složená ze styren divinylbenzenu s obsahem iminodiacetátového iontu. Tyto ionty jsou schopné vázat ionty kovů. Izolace DNA probíhá při vyloučení Mg^{2+} iontů z roztoku. V praxi se nejčastěji používá Chelex 100 pro extrakci DNA a je vhodná zejména ve forenzní genetice. Podle Šimkové (2012) je to obor genetiky, ve kterém je důležitá izolace DNA z malých vzorků jako například stopy slin, krve nebo vlasy. Takto zpracovaný materiál není dost čistý, proto se hodí pouze pro PCR analýzu. Výhodou metody je, že celý proces probíhá v jedné zkumavce a tím je menší riziko kontaminace vzorku (Budowle a Baechtel, 1990).

3.2.2 Identifikace GMO

Metody identifikace GMO rostlinného původu lze rozdělit na 3 základní skupiny:

1. Fyzikálně-chemické metody (např. chromatografie, spektrofluometrie, spektrofotometrie a další)- analyzují změny chemického složení produktů.
2. Immunologické metody (ELISA)- detekce bílkovinného produktu.
3. Metody založené na polymerázové řetězové reakci.

3.2.2.1 Fyzikálně-chemické metody

Umožňují analyzovat změny v chemickém složení produktů. Výhodou je schopnost analyzovat produkty které neobsahují DNA a proteiny (např. máslo, rafinovaný sojový olej). Příkladem jsou různé linie GM sóji. Jejich srovnání ve složení mastných kyselin ukázala zvýšení obsahu olejové kyseliny až na 83,8 % ve srovnání s analogem který obsahuje 23,1 %. (Ovesná a Pouchová, 2008).

3.2.2.2 Immunologické metody

Neznámějším příkladem je metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Je velmi populárním a efektivním nástrojem pro rychlou detekci konkrétního proteinu. Příkladem jsou testovací proužky Quick Stix (Envirologix, USA), Reveal (Neogen Corporation, USA) atd.

ELISA je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátek, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza), jehož produkt se obarví, což umožňuje vizuálně pozorovat průběh reakce. Na základě intenzity barvy na kalibrační křivce můžeme pozorovat přítomnost či nepřítomnost sledovaného proteinu. Dalším příkladem je GMO Soja RUR Test Kit pro kvantitativní stanovení glyfosátu [CP4EPSPS] sojových bobů 40-3-2. Mezi výhody patří jednoduchost a nízké náklady na analýzu (v případě hledání známého analytu). Nevýhodou je nemožnost analyzovat produkty, které prošli technologickým zpracováním (vysoká teplota, kyselé prostředí, enzymatické ošetření atd.) a potraviny ve kterých úroveň exprese bílkovin je nízký (Ovesná a Pouchová, 2008)

3.2.3 Metody vycházející z polymerázové řetězové reakce (PCR)

PCR můžeme označit jako metodu, při které dochází k opakované syntéze definovaného úseku dvouvláknové DNA do takového množství, které je detekovatelné a postačující pro další analýzy. Výsledkem je namnožení (amplifikace) zvoleného úseku genetické informace do velkého množství kopií. Amplifikace, která je dosažena cyklickým opakováním celého procesu syntézy má exponenciální charakter. Tato metoda je považována za nejcitlivější, která byla pro účely detekce biologicky významných molekul objevena (Šmarda, 2005).

3.2.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR je neznámější metodou detekce GMO, která založena na amplifikaci (namnožení) molekul DNA za cyklického opakování tří kroků, které se liší svými teplotními podmínkami. V každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí, díky čemuž dojde ke zdvojnásobení množství templátu pro následující cyklus. To znamená, že z každé molekuly původního templátu bude vytvořeno 2^n kopií, kde n je označením pro počet cyklů. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler (Obrázek 3), který je zkonstruován tak, aby bylo možné automaticky a velmi rychle měnit teplotu potřebnou pro provedení jednotlivých kroků (Aarts et al, 2002).

Polymerázová řetězová reakce je nejpoužívanější metodou v laboratořích po celém světě. Objevil ji americký chemik Kary Mullis, který dostal za ni Nobelovou cenu v roce 1993 (Garibian a Avashia, 2013).

Obrázek 3: Thermocycler PTC-200



Zdroj: <https://americanlaboratorytrading.com>

3.2.3.2 Průběh PCR

Na začátku do termocykleru se vkládají zkumavky se směsí skládající ze sledované DNA, primerů, dNTP(deoxynukleosidtrifosfát), *Taq*-polymerázy a pufr s ionty Mg^{2+} . Primery jsou to syntetické pořadí nukleotidů. Směs dNTP používá se jako zdroj energie v průběhu amplifikace. *Taq*-polymeráza je enzym který katalyzuje celý proces reakce PCR. Pufr s ionty Mg^{2+} v této směsi je kofaktorem *Taq*-polymerázy.

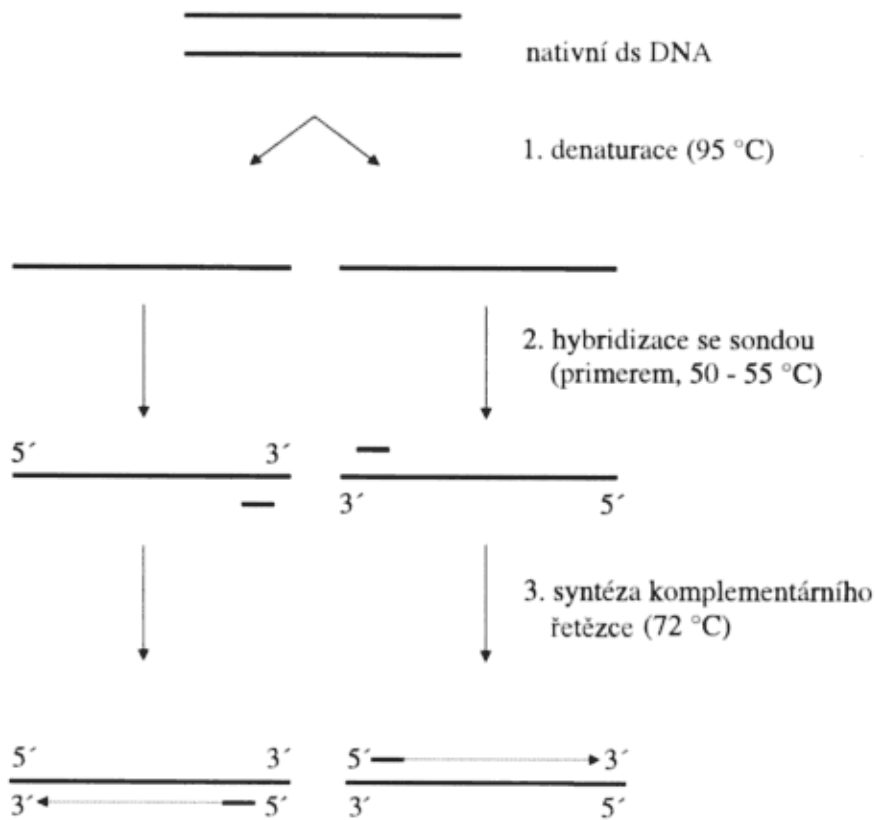
Dále následují 3 základní kroky amplifikace, které se opakují v několika cyklech, což je uvedeno na Obrázku 4.

1. Denaturace. Nastává krátkým zahřátím vzorku na 95-100 °C, kdy dojde k rozdělení DNA na dva jednovláknové komplementární řetězce. Teplota potřebná k úplné denaturaci templátu je závislá od jeho délky.
2. Annealing. Dochází ke snížení teplot na 55°C. V tuto chvíli nastává připojení primerů na specifická místa DNA. Primer navázaný na jednom vlákně vymezuje

začátek amplifikovaného úseku, primer na druhém komplementárním vlákně určuje konec amplifikovaného fragmentu. Vazbou obou primerů je tedy vymezena délka amplifikovaného úseku DNA. Díky přebytku primerů obsažených v reakční směsi je hybridizace většinou okamžitá a proto není dlouhá inkubace při annealační teplotě doporučována.

3. Elongace. Při ní dochází ke zvýšení na 72 °C. Při této teplotě má Taq-polymeráza maximální aktivitu. V průběhu elongaci dochází k vlastní polymerační reakci, k čemuž dochází na základě přiřazování stavebních kamenů nukleových kyselin (deoxyribonukleotidových trifosfátů) pomocí DNA polymerázy a dochází tím k syntéze nového komplementárního řetězce ve směru 5'-3'. Na konci prvního cyklu vznikají nové dvouvláknové fragmenty molekuly DNA identické s originálem. Produkty jednoho cyklu (amplikony) se stávají spolu s původními vlákny DNA templátem (vzorem) pro další cyklus. Doba elongace závisí na velikosti fragmentu, který má být amplifikován. 1 minuta je odpovídající na 1000 bp (párů bází) syntetizované DNA (Zima 2013).

Obrázek 4: Princip polymerázové řetězové reakce. 1) Denaturace nativní dsDNA na individuální řetězce. 2) Hybridizace s primerem při teplotě 50-55 C. 3) Syntéza řetězce DNA .



Zdroj: Zima, 2013

Základní problém se kterým setkali se tvůrci PCR , byla vysoká teplota, při níž reakce probíhá. Aby totiž byla denaturace DNA úspěšná, je třeba roztok zahřát téměř na 100 °C. Při této teplotě však dochází k degradaci naprosté většiny proteinů včetně DNA-polymerázy. K vyřešení problému nakonec napomohla bakterie *Thermophilus aquaticus*, žijící ve vývěrech horských minerálních pramenů. Z těchto baterii byla izolována termostabilní DNA-polymeráza, která je aktivní i při velmi vysokých teplotách. Tato je označována jako Taq DNA-polymeráza (Šmarda 2005).

Uvedené kroky představují pouze první cyklus PCR, který by však sám o sobě k amplifikaci zkoumaného úseku DNA nestačil. Teprve ve třetím cyklu se vytvářejí dvouřetězcové fragmenty DNA o délce odpovídající amplifikovanému úseku. Aby se jich vytvořilo dostatečné množství, provádíme zpravidla 30 až 50 vzájemně navazujících cyklů. Tímto způsobem je možné od jednoho úseku molekuly DNA získat až 10^9 kopií (Brown 2007).

Dodejme, že díky komplexu interakcí mezi jednotlivými složkami v PCR směsi a široké různorodosti využití této techniky je nemožné specifikovat jednu sadu reakčních podmínek, které by byly vhodné ve všech situacích, ale je nutné optimalizovat každou PCR reakci odděleně (Aarts et al., 2002)

Existuje řada způsobů detekce GMO odvozených od polymerázové řetězové reakce, které jsou dále podrobněji popsány.

3.2.4 Další metody detekce GMO na základě polymerázové řetězové reakce

Existuje mnoho variant, které lze dále rozšířit pro amplifikaci sekvencí DNA nebo RNA a dalších složek. Dále je uvedeno několik variant z rozsáhlé skupiny metod.

3.2.4.1 Reverzní transkripce PCR (RT-PCR)

Základem metody je přepis RNA do komplementární DNA, pomocí enzymu reverzní transkriptázy (Myers a Gelfand, 1991, Šmarda et al., 2005). Nejznámějším příkladem RT-PCR posledních let je infekční onemocnění Covid-19, které je způsobeno virem SARS-CoV-2 (ještě se tomu říká koronavirus). Abychom mohli diagnostikovat tuto chorobu, musíme detekovat virus v nosohltanovém výtěru. Upřesním, že SARS-CoV-2 je RNA virus a proto ho můžeme detekovat pouze reverzní transkripcí (Středa, 2020). RNA nelze použít jako templát pro PCR, proto je potřeba ji převést nejdříve na cDNA a pak amplifikovat už známým postupem polymerázové řetězové reakce. Reverzní transkripce a PCR mohou být oddělené různými reakcemi (two-step RT-PCR) nebo probíhat v jedné zkumavce (one-step RT-PCR). One-step RT-PCR je výhodnější z hlediska rychlosti a jednoduchosti, protože nízké množství kroků snižuje počet kontaminací a chyb při pipetování. Nevýhoda je v tom, že cDNA je už degradována a to není možné ponechat pro další experimenty. Two-step RT-PCR je citlivější, ale potřebuje více času. Teoreticky two-step RT-PCR je efektivnější, protože můžeme použít 3 typy primerů-oligo d(T)18, genově specifické a random primery. Při výběru tohoto postupu je možné zachránit cDNA pro další reakce (Šmarda et al., 2005).

3.2.4.2 Multiplexová PCR

Tento typ umožňuje současnou amplifikaci dvou nebo více fragmentů DNA přidáním do reakce více než jednoho párů primerů. Metoda poskytuje kvantitativní detekci transgenní DNA (Butler, 2010).

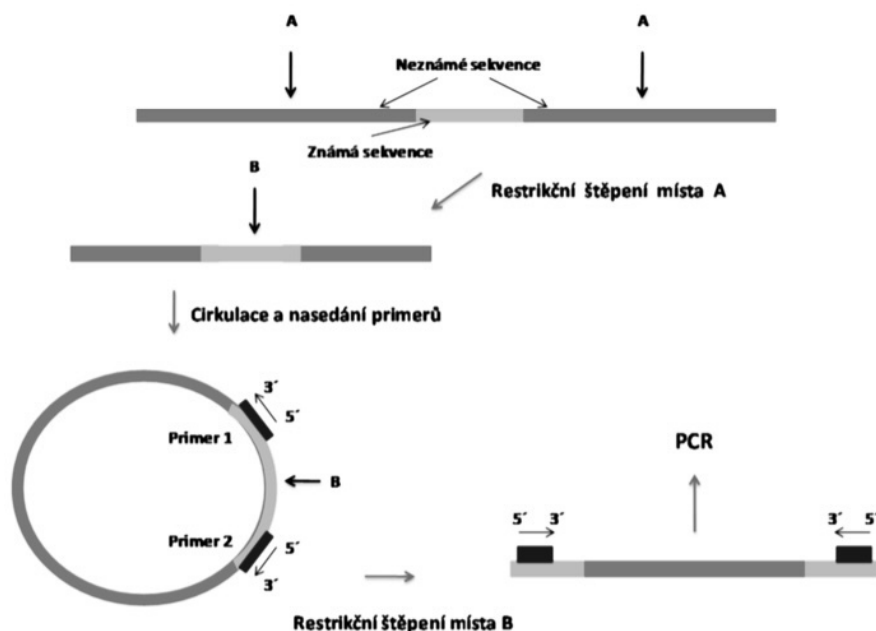
3.2.4.3 Nested PCR

Metoda zvyšuje specifitu reakce, do které se dodává vnitřní a vnější primer. V první fázi je DNA izolovaná ze vzorku a amplifikována pomocí externích primerů. V další fázi se amplikony z první fáze používají jako templáty DNA. Závěrečná kontrola se provádí pomocí gelové elektroforézy porovnáním délky fragmentů PCR se standardem (Feraý et al., 1992).

3.2.4.4 Inverzní PCR

To je specifická technika, založena na amplifikaci fragmentu DNA, který je ohraničen úseky známých sekvencí na obou koncích. Metoda se používá zejména v případě detekce genomového insertu (Ochman et al., 1995). Princip metody znázorněn na Obrázku 5.

Obrázek 5 Inverzní PCR. A) Dochází k rozdělování míst neznámých sekvencí pomocí restriční endonukleázy, následnou cirkulaci a nasednutí primerů. B) Restriční štěpení známé sekvence, pak fragmenty se amplikují známým způsobem pomocí PCR



Zdroj: Ochman et al., 1995

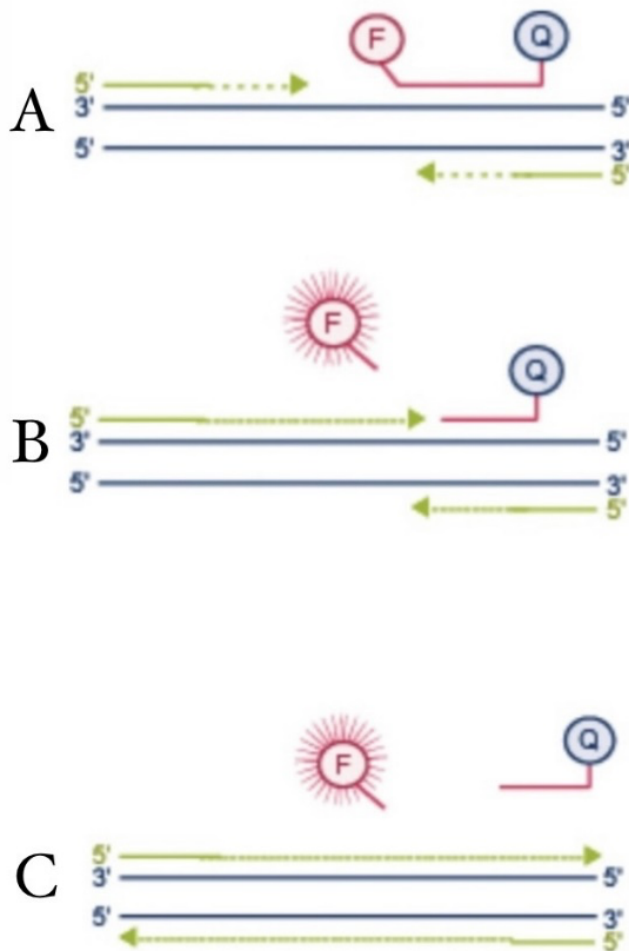
Musím doplnit, že existuje hodně dalších variant PCR, např., degenerate PCR (detekce homologních genů u rozdílných druhů), PRINS PCR (lokalizace určitých sekvencí v jedné bunce pomocí in situ hybridizace), PCR-RFLP určuje sekvenční polymorfismus genu pomocí restričních endonukleáz a velká řada dalších metod (Bermingham, Luettich, 2003).

3.2.5 Real-time PCR

Před desítkami let prokázaly experimenty možnost PCR v reálném čase. Po přidání do reakční směsi molekul fluorescenčního barviva, jsou molekuly schopny generovat fluorescenční signál při vazbě na DNA a zvýšit počet kopií ampliconu během PCR, který bude uměrný fluorescenčnímu signálu. Příkladem takové sloučeniny je ethidium bromid (EtBr), který je méně senzitivní a může vyvolat genetickou mutaci. Dnes se proto nejčastěji používá SYBR Green I, který je mnohem citlivější (Zipper et al., 2004).

Existují však i jiné možnosti realizace real-time PCR. Pomocí oligonukleotidu, na něj je připojena molekula fluoroforu a molekula zhášeče fluorescence. Díky přítomnosti 5'-3' exonukleázy v Taq-DNA polymeráze oligonukleotid se odštěpí a molekula fluoroforu se oddělí od molekuly zhášeče (Obrázek 5). Tento princip se nazývá fluorescenčně-rezonanční přenos energie, neboli Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), pomocí kterého provádí většina sond používaných pro rtPCR (Kaltenboeck a Wang, 2005).

Obrázek 6 Průběh reakce rtPCR.



Zdroj: Didenko, 2001

Popis:

A) Oligonukleotid (Q) je připojen na jednom z řetězců DNA. Fluorescence fluoroforu (F) zhasne.

B) Taq-DNA polymeráza štěpí oligonukleotid (Q). Odštěpený fluorofor (F) vyřazuje světlo s charakteristickou vlnovou délkou.

C) Následné zdvojení amplikonu působí záření jedné molekuly fluoroforu (F)

Tato metoda je známá při detekci DNA a RNA, která záložena na skutečnosti, že sekvence GMO je známá předem, ale pokud výsledek reakce je negativní, lze říct že zkoumaný vzorek neobsahuje známé GMO. V případě detekci sekvece, která nepatří k žádnému známému modifikovanému organismu, jeho přítomnost je možné pouze

předpokladat. Proto real-time PCR poskytuje nepřímý důkaz přítomnosti GMO v testovaném vzorku (Gryson, 2010).

Hlavní výhody real-time PCR v diagnostice GMO jsou vysoká specifita a senzitivita, rychlost získání výsledku, identifikace linií GMO, kvantitativní analýza, jednoduchost a flexibilita. Taky je možné vytvářet multiplexní analýzu vzorků v jedné reakční zkumavce.

I když DNA je stabilnější než protein, může také degradovat vlivem vysokých teplot, ultrafialového světla, přidáním kyselin a enzymů při výrobě potravin. Zjištěno, že DNA je neurčitelná v technicky zpracovaných potravinách (hydrolyzované rostlinné bílkoviny, rafinované oleje, škroby, omáčky, cukry a ethanol). Naopak u nezpracovaných potravin pokud je určeno dostatečné množství DNA pro analýzu, amplifikace proběhne. Vhodná délka pro detekci DNA aby ve vzorku bylo přibližně 100 párů bází.

Úvedené nevýhody jsou zanedbatelné ve srovnání s výhodami této metody. Proto je ve skutečnosti PCR v reálném čase základní metodou pro detekci DNA u transgenních organismů (Zipper et al., 2004; Quersi et al., 2009).

V závislosti na typu úkolů, který je možné provádět, existuje několik variant metody real-time PCR.

1. Screeningová analýza- detekce nejběžnějších promotorů a terminátorů. Umožňuje odhalit GMO ve vzorku bez jeho identifikace. Jsou používány primery odpovídající sekvencím regulačního promotoru (nejčastěji používané prvky při konstrukci GMO např. 35S CaMV, P-FMV) (Holst-Jensen, 2006).
2. Genově specifická analýza- detekce nejčastějších genů. Umožňuje detekovat GMO ve vzorku bez jeho identifikace a odhalit určité skupiny GMO (například odolnost vůči určitým herbicidům) (Holst-Jensen, 2006).
3. Design specifická analýza- detekce genetických konstruktů a GMO v sledovaném vzorku. K tomu se používají primery pro různé úseky GM DNA (například promotorový úsek nebo strukturní gen). Pomocí této analýzy vytvořeny různé linie GMO (např. kukuřice). Musíme ale vzít v úvahu, že stejný design lze použít k přeměně různých rostlin. Například genetické konstrukty pVZMBKO7 a pVZMGT10, které jsou přítomny v genomech linií kukuřice MON809, MON810, MON832 (Holst-Jensen, 2006).

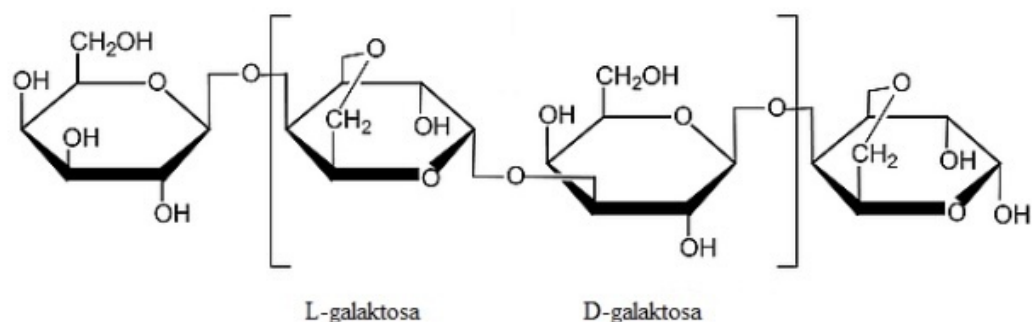
4. Detekce konkrétních linií GMO. Používá se primer odpovídající sekvenci GM DNA a primer shodný s rostlinnou genomovou DNA. Tato kombinace umožňuje kvantitativní analýzu rekombinantní DNA (Holst-Jensen , 2006).

3.2.6 Metody založené na analýze DNA

V současné době existuje několik alternativ kvantitativní PCR navržených k identifikaci více cílů současně. Vzhledem k tomu, že GMO v analyzovaném materiálu jsou ve stopovém množství, v první fázi je vzorek amplifikován klasickou PCR. Ve druhé fázi se používají metody mezi které patří:

1. Agarosová gelová elektroforéza. To je velmi účinná metoda hodnocení DNA, která se často využívá v laboratořích. Vhodná pro rozdělení různých fragmentů DNA ve velikostech od 100 bp po 25 kbp. Aby reakce proběhla, musíme použít gel, který je složen z polysacharidů- agarosa. Agarosa má lineární přehled, což je uvedeno na Obrázku 6. Ve své struktuře má L- a D-galaktosu, které se spojují glykosidovou vazbou. V průběhu tvrdnutí gelu se agarosa kovalentně spojuje a tvoří póry. Velikost póru souvisí s hustotou gelu. Čím menší jsou póry, tím hustší je gel (Lee et al., 2012 a VFU, 2014).

Obrázek 7 Struktura agarosy (L- a D-galaktosa)



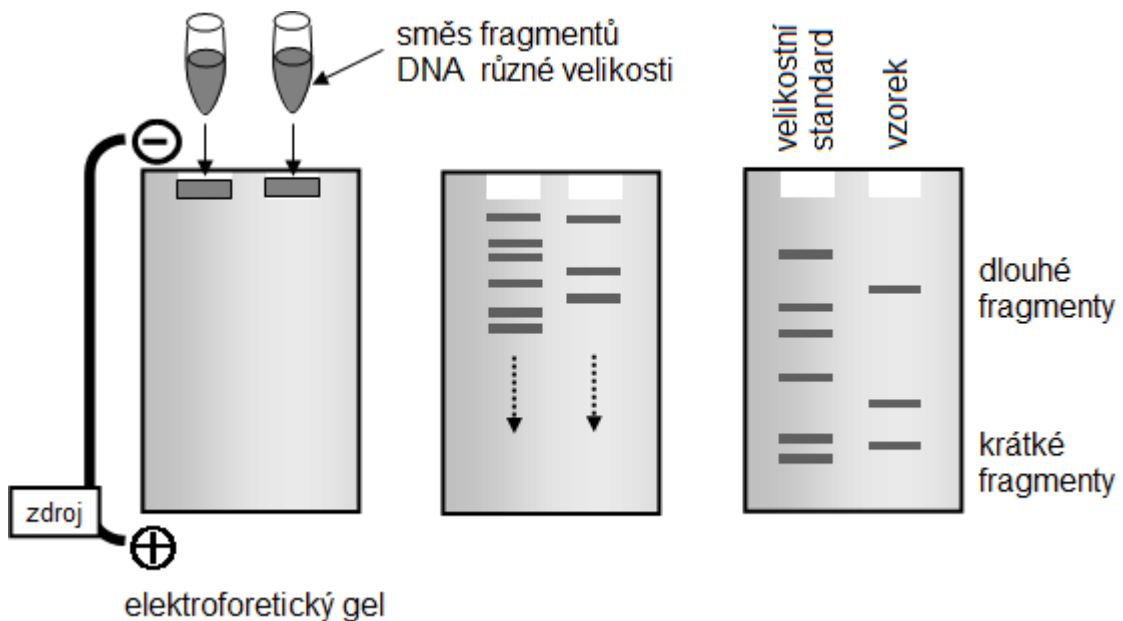
Zdroj: Merck KgaA, 2018

Princip reakce spočívá v tom, že nabitě molekuly se v elektrickém poli pohybují různou rychlostí. Tím, že DNA má fosfátové skupiny, je záporně nabitou molekulou a je schopná pohybu směrem ke kladně nabitě anodě (Lee et al., 2012).

Gel se nechá ztuhnout v elektroforetické vaničce. Po ztuhnutí do jamek pipetují vzorky DNA a po té promíchají s aplikačním pufrém. Aplikační pufr má větší hustotu, než

molekuly DNA, proto se používá k jejich zadržení v jamkách. Agarosový gel je obarven speciálními barvivy, které se vážou mezi sousedními páry bází a pod vlivem UV záření fluorescují. Dle intenzity fluorescence lze odhadnout kolik sledované DNA je ve vzorku, což je uvedeno na Obrázku 7. Nejčastější barvy, které pro tento účel se používají jsou ethidium bromid a SYBR Green (kyaninová barviva) (Šmarda, 2005).

Obrázek 8: Průběh elektroforézy na elektroforetické misce



Zdroj: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz

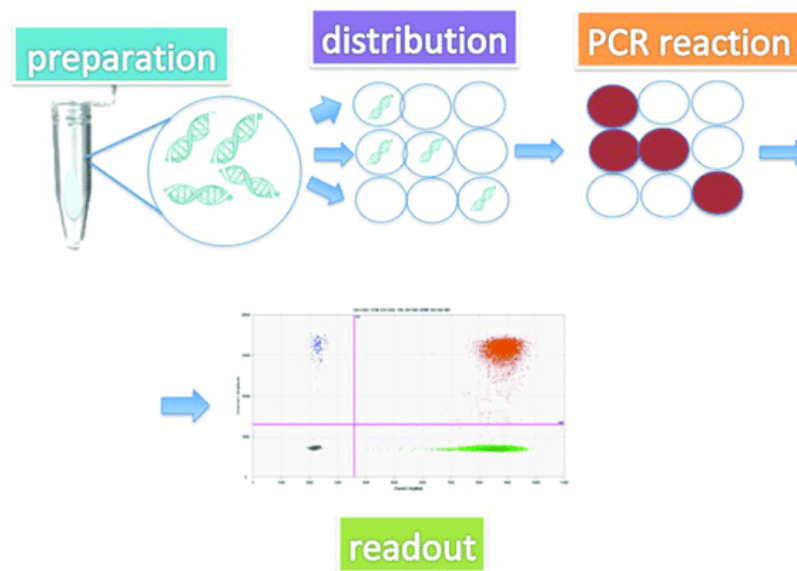
2. Technologie Microarray se používají pro zkoumání stavu exprese genů nebo celého genomu organismu v průběhu jedné reakce (Anklam et al., 2002).

3. Technologie xMAP je založena na již známých laboratorních metodách (jako jsou ELISA, PCR a další). Díky této technologii lze detekovat různé molekuly (např. DNA, RNA a bílkoviny) v jednom vzorku. V technologii xMAP se používá polystyrenové mikrokuličky s fluorescenčním barvivem. Mikrokuličky na svém povrchu mají ligandy, ke kterým se váže speciální analyt ze sledovaného vzorku. Zařízení (obvykle je to Luminex) analyzuje každou mikrokuličku jednotlivě během průtokové cytometrie. xMAP dokáže identifikovat 500 různých cílů současně (Anklam et al., 2002).

4. Digitální PCR. Základní rozdíl od klasické PCR je v tom, že reakční směs je po přidání DNA rozprášena na mnoho malých kapiček, které dopadají na jamky čipu, kde

produkty mezi sebou reagují. Čípy mohou obsahovat až desítky tisíc buněk. Výsledkem digitální PCR je spíše absolutní než relativní počet množství nukleových kyselin. Tato metoda se používá k detekci GM kukuřice, sóji a rýže. Výhodou metody je, že pro měření DNA není potřeba žádný referenční materiál. Ale propustnost metody je nízká, protože v jedné jámce lze detekovat pouze dva cíle. V tomto případě je metoda vhodnější pro fázi identifikace a stanovení GMO ve vzorku, nikoli však pro screening (Brod et al. 2014). Reakce a amplifikace vzorku se provádí v separované mikroskopické jamce (Vogelstein a Kanzler, 1999). Princip metody znázorněn na Obrázku 8.

Obrázek 9: Přehled digitální PCR. 1. Příprava vzorku. 2. Rozdělení vzorku na tisíce kapek. 3. Amplifikace. 4. Digitální analýza



Zdroj: Izzo et al., 2019

5. Izotermická amplifikace DNA. K provedení této reakce byly vybrány čtyři specifické skupiny primerů, které umožňují iniciovat reakci a zvyšují rychlost amplifikace. Reakce je isotermická při konstantní teplotě 60-65 °C. Výhodou metody je jednoduchost, protože není potřeba termocykler, místo toho lze použít vodní lázeň, termoblok nebo mikrovlnnou troubu. Další výhody jsou rychlost získávání výsledků, vysoká citlivost a stejně i odolnost vůči inhibitorům PCR (např. polysacharidy). Nevýhodou je náročnost výběru čtyř primerů pro jeden cíl. Taky tam patří nemožnost souběžné identifikace více GM cílů pomocí multiplexního přístupu a kvantifikaci DNA (Demeke a Jenkins, 2010).

Všechny výše uvedené metody nejsou vhodné pro schopnost zpracovávat větší množství materiálu než metoda real-time PCR, proto se stále používají ve zvláštních případech.

Závěr

Práce věnovala svou pozornost obsahu GMO v potravinách a jejím základním cílem bylo blíže představit způsoby detekce a kvantifikace výskytu GMO v potravinách, a to s důrazem na konkrétní metody, kterou jsou za tímto účelem v současnosti využívány. Nejprve byly v rámci práce definovány ústřední pojmy celého zkoumaného tématu, a to zejména termín geneticky modifikovaných organismu. Následně jsem se ve své práci již specificky zaměřila právě na konkrétních metodach detekce a kvantifikaci.

Jak bylo v práci jmenovano, GMO jsou definovány jako veškeré organismy vyjma člověka, kdy došlo k modifikaci genetického materiálu odlišným způsobem, než se za normálních okolností děje v přírodě díky rekombinaci rodičovských genomů. GMO jsou důsledně monitorovány a před uvolněním do oběhu dochází k hodnocení jejich bezpečnosti. Takové hodnocení přitom vychází z určených pokusů a využití daného konkrétního GMO. V případě GMO uvolněných do životního prostředí předchází zpravidla hodnocení v polních pokusech.

Přitom je třeba uvést, že postupy pro stanovení GMO jsou v současnosti jednoznačně dané. V současnosti jsou používány metody na bázi PCR (polymerázová řetězová reakce), které jsou v dostatečné míře robustní a přesné. Metody detekce a kvantifikace GMO v potravinách přitom byly v textu práce kompletně představeny.

Seznam obrázků

Obrázek 1: 1. Identifikace vlastnosti organismu. 2. Izolace požadovaného znaku. 3. Vložení genetického znaku do genomu. 4. Pěstování GMO.....	11
Obrázek 2:Princip izolace DNA pomoci magnetických částic (Creative diagnostics).....	21
Obrázek 3:Thermocycler PTC-200	24
Obrázek 4:Princip polymerázové řetězové reakce. 1) Denaturace nativní dsDNA na individuální řetězce. 2) Hybridizace s primerem při teplotě 50-55 C. 3) Syntéza řetězce DNA	26
Obrázek 5 Inverzní PCR. A) Dochází k rozdělování míst neznámých sekvecí pomocí restriční endonukleázy, následnou cirkulaci a nasednutí primerů. B) Restriční štěpení známé sekveci, pak fragmenty se amplikují známým způsobem pomocí PCR	28
Obrázek 6 Průběh reakce rtPCR.	30
Obrázek 7Struktura agarosy (L- a D-galaktosa)	32
Obrázek 8:Průběh elektroforézy na elektroforetické misce	33
Obrázek 9:Přehled digitální PCR. 1. Příprava vzorku. 2. Rozdělení vzorku na tisíce kapek. 3. Amplifikace. 4. Digitální analýza	34

Seznam použitých zdrojů

Aarts HJ, van Rie JP PF, Kok EJ. 2002. Traceability of genetically modified organism. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2: 69-77.

Anklam E, Gadani F, Heinze P. et al. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. Eur Food Res Technol 214: 3–26.

Available from: <https://www.bbc.com/news/world-europe-48253577> (accessed May 2019).

BBC, 2019. Monsanto 'compiled dossier' on political opponents

Beránek M. 2016. Molekulární genetika pro bioanalytiku. Karolinum, Praha.

Bermingham N, Luettich K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications, Current Diagnostic Pathology. 9: 159-164.

Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied Microbiology and Biotechnology. 73:495-504.

Boyle, Rebecca. 2011. How To Genetically Modify a Seed, Step By Step. Popular Science. Available at: <http://www.popsci.com/science/article/2011-01/life-cycle-genetically-modified-seed> (accessed January 2011).

Brod FC, van Dijk JP, Voorhuijzen MM, et al. 2014. A high-throughput method for GMO multi-detection using a microfluidic dynamic array. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406:1397-1410.

Brown T & Brown T. 2011. Sequencing, forensic analysis and genetic analysis. ATDBio. Southampton. Available from: <https://www.atdbio.com/nucleic-acids-book> (accessed February 2019).

Brown TA. 2007. Klonování genů a analýza DNA: úvod. Univerzita Palackého, V Olomouci.

Budowle B. and S. Baechtel. 1990. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. Appl. Theor. Electrophoresis. 1:181–187.

Butler J. 2010. Fundamentals of forensic DNA typing. Academic Press/Elsevier. Boston. Available from: <https://www.elsevier.com/books/fundamentals-of-forensic-dna-typing/butler/978-0-12-374999-4> (accessed August 2009).

Demeke T, Jenkins GR. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 396: 1977-1990.

Didenko VV. 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, *Biotechniques*. 31:1106-1121.

Drobník J. 2008. *Biotechnologie a společnost*. Praha: Přírodovědecká fakulta UK.

Garibian L, Avashia N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), *The Journal of investigative dermatology*. 133:1-4.

Gonsalves, D. 2004. Transgenic papaya in Hawaii and beyond, *AgBioForum*. 2004. 7:36-40.

Gryson N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 396: 2003-2022.

Health Canada, 1999. Novel food information-food biotechnology. High lauric acid canola lines 23-198, 23-18-17. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/high-lauric-acid-canola-lines-23-198-23-18-17.html> (accessed October 1999).

Holst-Jensen A, De Loose M, Van Den Eede G. 2006. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2799-2809.

Hoskovec L 2007. Huseníček rolní. O. s. Přírodovědná společnost, BOTANY.cz. Available from: <https://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/> (available at July 2007).

Hue-Roye K, Vege S. 2008. Principles of PCR-based assays, *Immunohematology*. 24: 170-175.

Izzo B, Gottardi EM, Errichiello S, Daraio F, Baratè C and Galimberti S. 2019. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Front. Oncol.* 9:833.

Kaltenboeck B, Wang C. 2005. *Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics.* Elsevier. *Advances in Clinical Chemistry.* Available from: [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(05\)40006-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(05)40006-2) (accessed November 2005).

Kočárek E. 2004. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika : molekulární biologie : biotechnologie : genomika.* Scientia, Praha.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments.* 62:3923.

Ministerstvo zemědělství. 2015. Trnková J, Hanák J, Křístková M. 2015. *Organizace a kontrola pěstování GM plodin v ČR.*

Ministerstvo životního prostředí. 2003. Články (Doubková Z, Roudná M.) 2004. *Legislativní opatření v oblasti biologické bezpečnosti.* Praha.

Ministerstvo životního prostředí. 2011. Roudná M. (ed.) *Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti.* Praha.

Murray HG, Thompson WF. 1980. Rapid Isolation of High Molecular Weight DNA. *Nucleic Acids Research.* 8:4321-4325.

Myers TW, Gelfand DH. 1991 Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase, *Biochemistry.* 30:7661-7666

Ochman H, Gerber AS, Hartl D L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, *Genetics.* 120:621 -623.

Ondřej M, Drobník J. 2002. *Transgenoze rostlin.* Academia, Praha.

Ovesná J, Pouchová V. 2008. Možnosti využití GMO pro potravinářské i nepotravinářské účely: Praha. Praha: Crop Research Institute. Available from: <https://adoc.pub/vurv-vvi-praha-vcht-praha-iti-gmo-pro-ske-i-nepotravinask.html> (accessed March 2008).

Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, et al. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*. 23:482-487.

Passarge E. 2019. Barevný atlas genetiky. Grada Publishing, Praha.

Porebski S, Bailey LG, Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*. 15: 8–15.

Ratledge C, Kristiansen B. 2006. *Basic biotechnology*. 3rd ed. Cambridge University Press, New York.

Safarik I, Pospiskova K, Horská K, Safarikova M. 2012. Potential of magnetically responsive (nano)biocomposites. *Soft Matter*. 8:5407-5413.

Sigma-Aldrich.2018. Germany: Merck KGaA, Darmstadt. Available at : <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>

Středa L, Beer J. 2020. *Telemedicína a Koronavirus. Věda v pohybu*. Praha.

Šimková H, 2012. *Breviář forenzní genetiky: forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích*. Brno: Tribun EU.

Šmarda J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.

Zima T. c2013. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Galén, Praha.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 32:e103.

Higgins D, Dworkin J. 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation, *FEMS Microbiology Review*. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x> (accessed January 2012).