

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PCR detekce geneticky modifikované sóji
v potravinách a krmivech

Autor bakalářské práce: Markéta Josková

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Irena Hoštičková

Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta JOSKOVÁ**
Osobní číslo: **Z16001**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Rostlinné**
Název tématu: **PCR detekce geneticky modifikované sóji v potravinách a krmivech**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Bakalářská práce bude obsahovat část teoretickou i část praktickou. V teoretické části budou shrnuty informace o problematice genetických modifikací a jejich využití v rostlinné výrobě. Dále budou popsány používané metody detekce produktů geneticky modifikovaných rostlin v potravinách a krmivech a jejich specifika.


V praktické části budou testovány jednotlivé metody izolace DNA z dostupných potravin a krmiv obsahujících sóju. Bude provedeno srovnání těchto metod s ohledem na cenu, časovou náročnost a kvalitu získaného vzorku DNA. Vzorky DNA budou testovány metodou PCR na přítomnost transgenů.

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 35 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

ABDULLAH, T., S. RADU, Z. HASSAN a J. K. HASHIM, 2006. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. Food Chemistry. 98(3), 575-579
GRYSON, N., DEWETTINCK K., MESSENS, K. 2007. Detection of genetically modified soy in doughs and cookies. Cereal Chemistry. 84(2), 109-115
HAGEN, M. a B. BENEKE, 2000. Detection of genetically modified soy (Roundup-Ready (TM) Soy) in processed foods. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 113(11-12), 454-458
ROTT, M. E., T. S. LAWRENCE, E. M. WALL a M. J. GREEN, 2004. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(16), 5223-5232
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Abstracts

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Irena Jelínková**
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2019**


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

Prohlášení

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 (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové a konzultantovi prof. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D. za vedení mé práce. Za jejich ochotu zodpovídat mé otázky, trpělivost a hlavně čas, který mi věnovali při zpracování této práce. Dále bych také chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu podporovali a motivovali.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout v teoretické části problematiku genetických modifikací a jejich hlavní využití. Dalším úkolem bylo popsat různé používané metody detekce geneticky modifikovaných rostlinných produktů a jejich vlastnosti. Praktická část je zaměřena na izolaci DNA z různých potravin a krmiv obsahující sóju. Pomocí metody PCR byly vzorky testovány na přítomnost DNA sóji, promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup. V rámci této práce bylo testováno celkem 42 vzorků a 5 z nich obsahovalo sóju transgenní.

Klíčová slova:

sója, PCR, GMO, potraviny, krmiva

Summary

The aim of this thesis was to summarize in the theoretical part the issue of genetic modifications and their main use. Another task was to describe various methods used for detection of genetically modified plant products and their properties. The practical part is focused on the isolation of DNA from various foods and feeds containing soy. Using the PCR method, samples were tested for the presence of soy DNA, the CaMV promoter, and the Roundup resistance transgene. A total of 42 samples were tested and 5 of them contained transgenic soy.

Key words:

soy, PCR, GMO, food, feed

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 9 |
| 2. Teoretická část | 10 |
| 2.1 Genetická modifikace | 10 |
| 2.2 GMO ve světě..... | 14 |
| 2.3 Rizika GMO | 17 |
| 2.4 Sója luštinatá | 18 |
| 2.5.1 GM sója..... | 19 |
| 2.5 Detekce GMO v krmivech a potravinách..... | 21 |
| 2.6 Metody detekce | 23 |
| 2.7.1 Testovací metody na bázi proteinu | 23 |
| 2.7.2 Testovací metody na bázi DNA | 26 |
| 2.7.3 Jiné metody | 32 |
| 3. Cíle práce | 34 |
| 4. Materiál a metody | 35 |
| 5. Výsledky | 41 |
| 6. Diskuze..... | 52 |
| 7. Závěr | 55 |
| 8. Seznam použité literatury | 56 |

1. Úvod

V poslední době je čím dál větší pozornost věnována geneticky modifikovaným organismům, které můžeme získat vložením genů žádoucích vlastností různého původu do cílového organismu. Nejrozšířenější využití mají rostliny hlavně v zemědělství pro vyšší výnosy, odolnost vůči herbicidům či škůdcům. Takto upravené plodiny jsou využity zejména v potravinách a krmivech. Mezi nejznámější a nejrozšířenější patří GM sója odolná vůči herbicidu Roundup. Ohledně GM plodin je kladeno mnoho otázek, týkající se rizik potenciálnímu špatnému vlivu na zdraví a životní prostředí a celkově má veřejnost na tyto plodiny negativní názory, proto musí produkty procházet přísnou kontrolou a testy ověřující přítomnost GMO. Při pozitivních výsledcích a překročení limitu obsahu GMO musí být tyto produkty řádně označeny pro zpětné dohledání při případných problémech. Existuje mnoho metod jak GMO v potravinách a krmivech detekovat. Liší se časovou a finanční náročností, vhodností využití nebo citlivostí. Jsou zaměřeny na detekci vložené DNA nebo exprimovaného proteinu vložených genů. Mezi nejpoužívanější metodu můžeme zařadit metodu PCR, během které dochází k namnožení úseků vložených genů, ty můžeme detekovat pomocí elektroforézy, kdy se DNA fragmenty separují podle velikosti na gelu. Jako další metoda používaná při identifikaci GMO patří např. real- time PCR nebo imunosorbční test ELISA.

2. Teoretická část

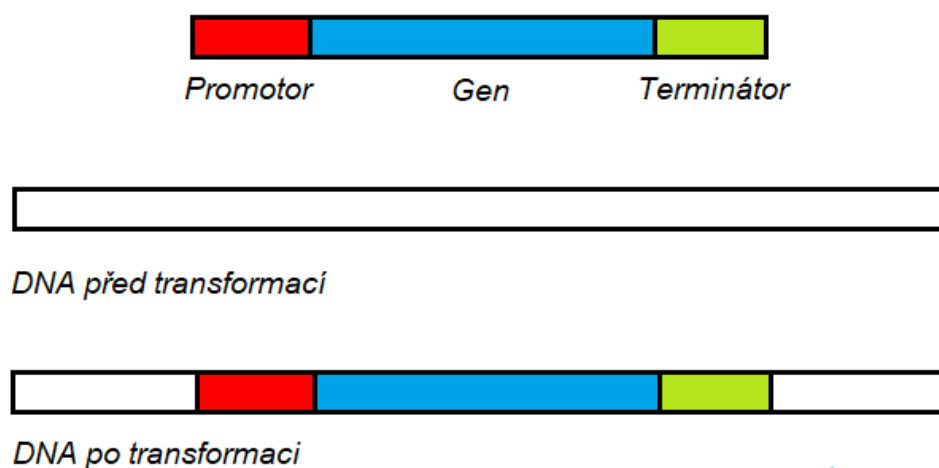
2.1 Genetická modifikace

Genetickou modifikaci (GM) můžeme jinak nazvat jako genetické inženýrství nebo technologii rekombinantní DNA (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2019) (DNA, která kombinuje elementy různého původu – promotor, vlastní kódující sekvence a terminátor), viz obrázek 1 (Ovesná et al., 2014). Je to technika, která je založena na přenosu DNA z jednoho organismu do organismu jiného, a tím dochází ke změnám vlastností rostlin, živočichů nebo mikroorganismů (Bawa a Anilakumar, 2013). Geny vybraných vlastností je možné izolovat z jakéhokoliv organismu (např. bakterie), které se upraví kombinací částmi genu z organismu jiného (např. rostliny) a díky současným technikám se vkládají takto upravené geny do cílové buňky, ze které se odvodí celý nový jedinec (Ovesná, 2005). První GM rostlina byl tabák odolný vůči antibiotikům produkován v roce 1983 (Bawa a Anilakumar, 2013) a první GMO schválený pro komercializaci bylo rajče Flavr-Savr v roce 1994 (Fraiture et al., 2015). Přesnější označení GM rostlin je transgenní rostliny (Custers, 2006), u kterých rozlišujeme transgenezi a cisgenezi. K transgenezi dochází mezi organismy, které se sexuálně nekříží a jeden nebo několik genů určitého druhu je možno přenášet do genomu druhu jiného. Cisgeneze je přenos genetického materiálu získaného pouze ze stejných nebo úzce příbuzných rostlin (Espinoza et al., 2013).

Konkrétních vlastností u živých organismů se dá také docílit křížením druhů mezi sebou (šlechtění), zde je ale větší pravděpodobnost přenosu i nežádoucích a nezamýšlených vlastností (Ladics et al., 2015). Rostliny s žádoucími znaky jsou vybírány, kombinovány opakovaným pohlavním křížením několik generací, proto je získání nových odrůd tímto procesem velmi zdlouhavé a trvá přibližně 12-15 let (Wieczorek a Wright, 2012), ale díky genetickému inženýrství se dá tento proces urychlit. Další výhodou je také nejen přenos genů mezi sexuálně neslučitelnými druhy, ale i zvýšení velikosti genofondu (Key et al., 2008).

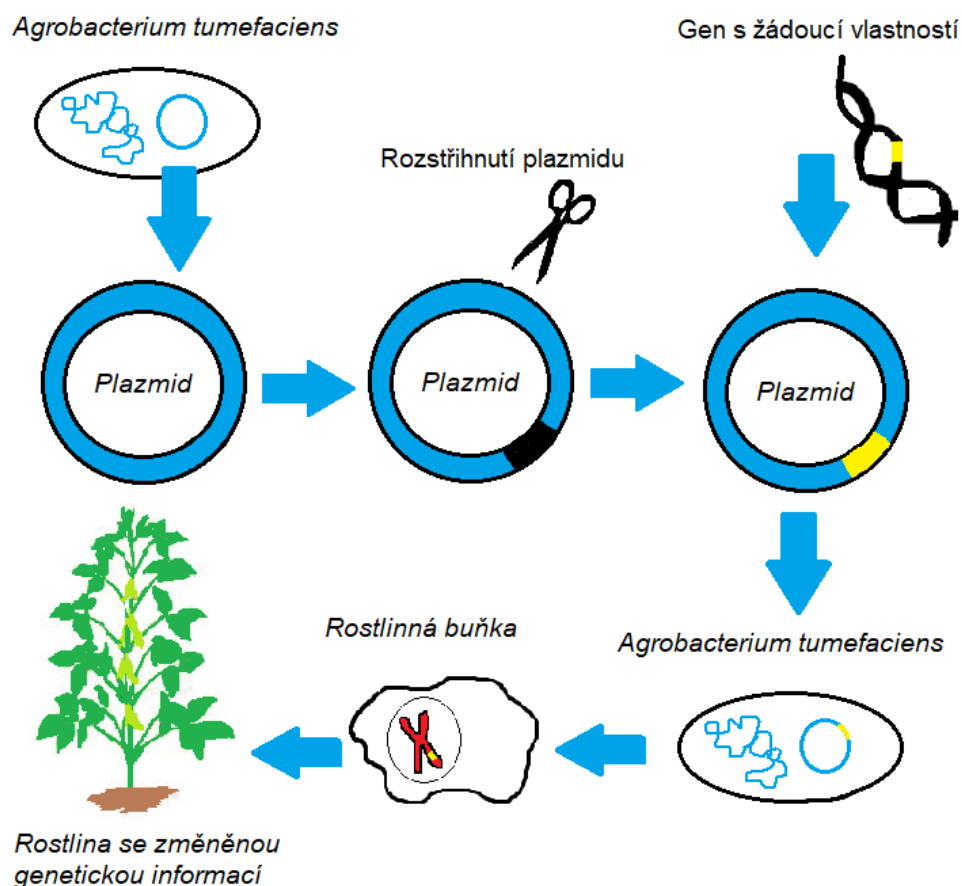
Změny rostlinného genomu a tím možnost využití GM se poprvé objevila v roce 1978, kdy bylo zjištěno, že dědičná hmota se dá předávat z půdních bakterií *Agrobacterium tumefaciens* do dědičného základu rostlin, které se dají snadno regenerovat z jediné buňky ve zkumavce (in vitro) (Ovesná, 2005; de la Riva, 1998), z některých se staly dokonce registrované odrůdy. Mezi nejčastěji pěstovanou

transgenní rostlinu patří sója odolná vůči herbicidu Roundup (Roundup Ready sója) (Ovesná, 2005; Cuhra et al., 2015).



Obrázek 1: Transformace různých DNA elementů do DNA organismu

Obsahem bakterií jsou nejen chromozomální DNA, ale i malé kruhové molekuly DNA (plazmidy). Část plazmidu (plazmidu Ti) dokáže bakterie vložit do genomu rostliny, která poté musí tvořit růstové stimulatory a potravu i pro bakterii. Tímto se vytváří na rostlině nádorovitý útvar. K narušení plazmidů se využívají restriční enzymy, ke kterým se přidávají žádané DNA fragmenty a ty se připojují na místo přerušení. Pomocí enzymů spojovacích ligáz se fragmenty DNA napojují a plazmid se uzavře. Poté se plazmid s novou informací vloží zpět do bakterie, viz obrázek 2 (Custers, 2006). Ale rostliny nemusí plazmid agrobakterie přijmout, proto se využívá genové dělo, kdy jsou nejprve částičky wolframu nebo zlata (mikroprojektilů), sloužící jako náboje, potaženy přenášenými geny plazmidové DNA. Poté jsou pomocí děla vstřelovány do rostlinných buněk na Petriho misce. Jak náboje s vysokou rychlostí pronikají do buněk, plazmidová DNA je uvolněna z povrchu částic. Potom je část DNA vložena do chromozomální DNA buněk (Prado et al., 2014; Custers, 2006; Homrich et al., 2012). Tyto transformované rostlinné buňky se pak regenerují do celých jedinců pomocí běžného způsobu množení rostlin technikou tkáňových kultur (Prado et al., 2014).



Obrázek 2: Princip změny vlastností RR sóji přenosem genů z plazmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a částí DNA s žádoucími geny do rostliny

Geneticky modifikované organismy

Genetickými modifikacemi vytváříme produkty nazývané geneticky modifikované organismy (GMO), které můžeme charakterizovat jako organismy (kromě člověka), ve kterých byl genetický materiál (DNA) změněn způsobem, který se přirozeně nevyskytuje (páření, rekombinace) (Fridovich-keil a Diaz, 2018; Polčáková, 2010) a většinou se na první pohled neliší od nemodifikovaného organismu (Doubková, 2008). Využívány jsou především GM rostliny, zatímco zavedení GM zvířat na farmy nebo na trh se předpokládá v blízké budoucnosti (Lievens et al., 2015). Modifikace mikroorganismů (bakterie) se používají především ve farmaceutických aplikacích a v potravinářství (Vitorino a Bessa, 2017).

Mezi nejčastěji GM rostliny, které se doposud vyvinuly a komercializovaly, patří GM kukuřice, sója, řepka olejná a bavlna, které byly

modifikovány hlavně pro toleranci vůči herbicidům a odolnost vůči hmyzím škůdcům (Clive, 2011; Šmarda, 2016; Roudná, 2008).

S GMO se manipuluje v uzavřených provozech, kde se provádí hlavně výzkum, a nebo se uvolňují do životního prostředí (Ovesná et al., 2014). Jejich hlavním úkolem je zvýšení produkce v zemědělství, protože mohou snížit využití pesticidů, šetřit fosilní paliva, snižovat emise CO₂ a chránit půdu (Buiatti et al., 2013). Kvůli ztrátám úrody způsobené škůdci nebo chorobami není možné neustálé zvyšování chemické ochrany, která by měla špatný vliv na životní prostředí. Proto se vyvinuly upravené rostliny s novými vlastnostmi (Zdeňková, 2006). GM rostliny můžeme také rozdělit podle využití na tři základní skupiny:

- první generace, vhodné hlavně pro produkci v zemědělství (odolnost k herbicidům, škůdcům a virovým chorobám) (Ovesná, 2005; Ovesná et al., 2014),
- druhá generace se změnou a zlepšeným složením produktu (proteinů, olejů, vitamínů) (Ovesná, 2005; Ovesná et al., 2014)
- třetí generace, která má uplatnění hlavně ve zdravotnictví (výroba enzymů, jedlá vakcína). (Ovesná, 2005; Ovesná et al., 2014)

GM rostliny odolné vůči herbicidům

Chemické látky, které omezují růst plevelů (některých nebo všech rostlinných druhů) nazýváme herbicidy. Jen některé z nich jsou bezpečné pro člověka a živočichy jako např. herbicid Roundup nebo Liberty. Nevýhodou je ale tak vysoká účinnost, že ničí i rostliny kulturní (Custers, 2006). Avšak některé z rostlin obsahují enzym, který je vůči herbicidu necitlivý, dokáže ho přeměnit na neúčinné látky nebo jej vůbec nepřijme. Takové vlastnosti mají i GM rostliny s vloženým genem (z bakterií nebo jiných rostlin), díky němuž je rostlina vůči danému herbicidu tolerantní nebo ho určitý enzym metabolizuje. (Ovesná, 2005). Většina těchto plodin jsou Roundup Ready (plodiny RR) geneticky modifikované tak, aby tolerovaly herbicidy glyfosátu, jako je komerční produkt Roundup. První takové odrůdy byly zavedeny v roce 1996 a rychle získaly popularitu mezi zemědělci. Tolerance na herbicid má mnoho výhod. Snižuje výrobní náklady a má velký přínos pro životní prostředí, díky snížení objemu použitých herbicidů, potřeby úpravy půdy a odplevelování. Dále snižuje půdní erozi a celkově zvyšuje ochranu půdy (Brookes, 2014). I když roste množství plevelů odolných vůči tomuto herbicidu, RR sója, RR kukuřice, RR řepka a RR bavlna patří stále mezi nejrozšířenější geneticky modifikované odrůdy rostlin (Cuhra, 2015).

Další velkou skupinou jsou rostliny odolné vůči herbicidu glufosinát, který je prodáván pod obchodní značkou Liberty. Gen vložený do těchto rostlin, pochází z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* kódující enzym fosfotricin-acetyl transferázu (PAT) proti účinku herbicidu glufosinát. (Halford, 2003). Sója patří i mezi GM rostliny odolné vůči aktivní složce herbicidu Isoxazol. (Ovesná, 2005).

GMO rostliny odolné vůči hmyzím škůdcům

Populace hmyzu mohou zničit porost během několika minut, proto se v zemědělství používají chemické přípravky, tzv. insekticidy. Některé z nich mohou být ale škodlivé pro ostatní živočichy i člověka, proto je snaha využívat jiné šetrnější možnosti (Custers, 2006). V 50. letech se využívalo DDT, které bylo nahrazeno toxinem z bakterie běžně žijící v půdě *Bacillus thuringiensis* (Bt toxin, Cry protein), využívaný v postřiku. Přenesený gen z bakterie *Bacillus thuringiensis* je aktivován v rostlině produkcí proteinu, který je toxický pro trávicí ústrojí hmyzu (Ye, 2000; Ovesná, 2005; Halford, 2003). Tato modifikace se využívá zejména u kukuřice proti zavíječi kukuřičnému (Custers, 2006), a tím je omezena aplikace chemických insekticidů (Doubková, 2008).

2.2 GMO ve světě

GMO jsou k dispozici komerčně od 90. let 20. století (Wunderlich a Gatto, 2015). Mezi nejrozšířenější GM plodiny ve světě patří GM sója (USA), dále GM kukuřice (USA), bavlník (Čína, Indie) a rýže (Roudná, 2008; Buiatt, et al., 2013; Kamle et al., 2017).

V posledních letech začalo množství těchto plodin růst, avšak znalosti o GMO se nezvyšovaly a spotřebitelé na celém světě vykazují omezené porozumění, mylné představy, a dokonce i neznalost GM produktů (Wunderlich a Gatto, 2015). Podíl ploch v rámci světa a komerční produkce těchto plodin je v EU zanedbatelný (Trnková et al., 2017) a dosahují pouze několika tisíc hektarů, představuje tak jen malé procento světové produkce (Brandt, 2003). Způsobeno je to hlavně kvůli obavám a neochotě odkoupení produktů GM plodin nebo zvířat krmených těmito plodinami. Souvisí to také s všeobecně negativním vnímáním GMO v EU (Trnková et al., 2017). Proto je závislá na dovozu krmiv pro zvířata pocházející z modifikovaných rostlinných materiálů stejně jako bavlna, která je široce používána v oděvním průmyslu (Tagliabue, 2017; Götzová, 2017).

V roce 2007 se již dvanáctým rokem celosvětově rozšiřovalo pěstování biotechnologických plodin, které narostlo o 12 % ve 23 zemích (Key et al., 2008). Zvyšující se přítomnost těchto plodin a postupné zavádění GM rostlin do Evropské unie (Key et al., 2008) přitahuje velkou pozornost také diskuze o jejich bezpečnosti a účincích (Wunderlich a Gatto, 2015).

GM plodiny jsou přísně regulovány, kontrolovány a je nutné je označovat než jsou uvedeny na trh, musí projít bezpečnostní zkouškou (Broeders et al., 2012). V současné době je USA největším světovým producentem GM plodin se 70,9 miliony ha (39 %). Druhý největší producent je Brazílie, dále Argentina, Indie a na pátém místě Kanada (Kamle et al., 2017).

V USA jsou GM plodiny součástí běžné stravy. Spotřebitelů, kteří se aktivně GM plodinám vyhýbají, se pohybuje jen okolo 13 %, oproti Evropě, kde mezi tyto spotřebitele patří většina a označují GMO za nepřírozené, přesto, že antibiotika jsou široce používána v drůbežářském průmyslu v krmivech a některé odrůdy pšenice byly produkovány pomocí radiačně indukované mutace a to je bráno jako přírozené. Celkově můžeme říci, že většina je bezpochybně proti GM potravinám, mnoho rozvojových zemí by mohlo tuto technologii využít, ale tak se nestane, dokud nezmizí obavy týkající se těchto technologií a obavy vývozu produktů do EU (Key et al., 2008).

V EU je povolena pěstovat pouze GM kukuřice, využita především jako krmivo, pěstuje se hlavně ve Španělsku. Ve Francii a Německu je zakázána úplně. Pro dovoz do EU jsou povoleny sója, bavlník nebo řepka olejná (Keményová, 2019). Uvolňování, používání a výzkum jsou u nás pečlivě kontrolovány a ošetřeny Evropským Parlamentem a Radou EU. Díky tomu mohou být vydána povolení o dovozu, uvádění na trh a pěstování GM plodin (Ovesná, 2005). Podle legislativy EU je povinnost značit GMO potraviny a krmiva z nich vyrobené pro možnost dohledání (např. zjištění negativního efektu na zdraví a životní prostředí) (Ovesná, 2014), pokud obsahují 0,9 % nebo více GMO (Delwaide et al., 2015). To je důvod, proč je potřeba provádět spolehlivé kontrolní testy pro detekci potravin, surovin a krmiv (Zdeňková, 2006).

2.3.1 GMO v ČR

Od konce 90. let začaly v České republice probíhat polní pokusy s různými GM plodinami, hlavně s kukuřicí a bramborami. (Doubková, 2008). Na území EU tedy i ČR je pro komerční využití pěstována jediná plodina, kukuřice, též označována jako „Bt kukuřice“ (Trnková et al., 2017), odolná vůči hmyzím škůdcům (zavíječ kukuřičný) k tvoření Bt toxinu. V roce 1998 byla tato linie povolena pro uvedení do oběhu a pro pěstování. Poprvé komerčně pěstována byla roku 2005 a v roce 2008 pak dosáhla plocha této plodiny 8 380 ha (Doubková, 2008).

Tato kukuřice je využita zejména jako krmivo, přímo pěstitelům nebo je využita na bioplyn (Trnková et al., 2017).

V roce 2010 byly poprvé také vysázeny GM brambory odrůdy Amflora se změněným složením škrobu. V následujících letech se ale v ČR tyto brambory přestaly pěstovat a byly zakázány (Trnková et al., 2017).

GM sóju je v zemích EU není povoleno pěstovat, je ale součástí dovážených krmiv pro hospodářská zvířata, V Evropě se pěstuje méně než 0,1 % celosvětové výměry GM plodin, ale je více než 70 % požadavků na krmivo pro zvířata (Tagliabue, 2017).

V České republice se GMO řídí zákonem č. 346/2005 Sb., tento zákon obsahuje pravidla o nakládání s GMO a GM produkty. Zahrnuje informace o uzavřeném nakládání s GMO, o uvádění do životního prostředí a do oběhu. Dále je zde sepsán postup povinného značení potravin a krmiva obsahující více než 0,9 % GMO. Povinnost obchodníků a pěstitelů EU je řádně označení povolených GM výrobků na trh slovy „geneticky modifikovaný organismus“, „tento výrobek obsahuje geneticky modifikované organismy“ nebo „tento výrobek obsahuje geneticky modifikovaný...(název organismu)“ (Doubková, 2005). Označené musí být i produkty, ve kterých není možné přítomnost GM materiálu dokázat (oleje). Potom se informace o původu dohledávají v povinných dokumentacích v řetězci od výrobce ke spotřebiteli. Výjimku v označování tvoří produkty, které obsahují GM materiál tvořící neúmyslné a nevyhnutelné příměsi v množství nepřesahující 0,9 %. Neoznačují se produkty pocházejících od zvířat krmených GM plodinami (maso, mléko a vejce) (Doubková, 2008).

Před uvolněním GMO do životního prostředí je nutnost posoudit rizika a prokázat bezpečnost daného GMO, která musí být schválena (Ovesná, 2005).

2.3 Rizika GMO

S touto novou technologií přichází otázka, jaká jsou rizika „manipulace s matkou přírodou“. Obavy veřejnosti z GM potravin a plodin se obvykle zaměřují zejména na bezpečnost lidí a životního prostředí (Bawa a Anilakumar, 2013). Často řešené otázky se týkají možných škodlivých účinků souvisejících s lidským zdravím. Ale GM potraviny konzumují stovky milionů lidí po celém světě bez negativních účinků a důkazů, že by tyto plodiny mohly být potenciálně toxické, je málo (Key et al., 2008; Azevedo et al., 2003). Je důležité si také uvědomit, že každá lidská činnost není úplně bez rizik. Stejně je tomu tak i u GMO a i jen minimální rizika nelze zcela vyloučit (Rakouský, 2008).

Zdravotní rizika spojená s GM potravinami se týkají toxicity, alergenicity, genetických rizik nebo přenosu rezistence na antibiotika (Bawa a Anilakumar, 2013; Lack, 2002). Toxicita by se mohla projevit u nového proteinu, který je produkován transgenem. (Key et al., 2008). Mezi největší obavy patří také možné vyvolání nepředvídatelných alergenních účinků, které mohou být navozeny i malou dávkou proteinů nebo jejich částí (Ruprich, 2006), proto je důležité sledování schopnosti nového GMO tvořit proteiny a hodnotit jejich alergenní a toxický potenciál než jsou produkty uvedeny na trh (Ruprich, 2006; Čeřovská, 2005).

Rizika se také týkají škodlivých účinků na životní prostředí a změn biodiversity postupným rozšiřováním růstu pěstování GM rostlin a tím i ovlivnění lidského zdraví (Bawa a Anilakumar, 2013). Mezi to patří sexuální hybridizace s geneticky nemodifikovanými rostlinami přenosem pylu, které se mohou křížit s ostatními druhy a tím zvýšit jejich plevelný charakter (Tsatsakis et al., 2017; Key et al., 2008). Dalším rizikem je vznik nových škůdců, nových onemocnění plodin, vliv na biodiverzitu nebo ovlivnění genetické čistoty dalších plodin (Ovesná, 2005). Jedno z podstatných rizik při pěstování transgenních rostlin ve volném prostředí je možnost přenosu genů jak mezi stejnými druhy rostlin, tak i mezi různými plodinami, potom je riziko, že by se mohly transgeny v prostředí stát odolné. Na druhou stranu jsou ale některé kulturní rostliny omezeny v křížení i s blízkce příbuznými rostlinami, proto lze většinou křížence dostat jen při určitých umělých podmínkách. Proto není časté, že by k tomuto křížení docházelo ve volné přírodě, to negativní důsledky (např. fertilní potomstvo). Jinak tomu je v genetických centrech kulturních rostlin, kde se musí přistupovat k možnosti přenosů genů jinak. (Soukup et al., 2005).

Dále by mohlo dojít k vývoji rezistentního hmyzu během několika let a rušit účinky transgenních rostlin. Také pokud se postřik herbicidů stane častěji používaný, okolní plevele by mohly vyvinout rezistenci vůči herbicidu tolerantnímu

pro plodinu. To by způsobilo potřebu zvýšení dávky herbicidu nebo změnu herbicidu, jakož i zvýšení množství a typů herbicidů na plodinách (Bawa a Anilakumar, 2013).

Jestli je možné vzájemné působení GM odrůd musí každá země ověřit podle místních podmínek s agro-ekosystémy. V ČR probíhá výzkum za podpory MZe ČR a Ministerstva životního prostředí. (Čeřovská, 2005).

2.4 Sója luštinatá

Sója luštinatá (*Glycine max*) je nejrozšířenější sója z rodu *Glycine* čeledě bobovité – *Fabaceae* a patří nejen mezi luskoviny, ale díky velkému množství oleje se řadí také mezi olejniny. (Doležal, 2004). Odkud pochází, není úplně známo, ale pravděpodobně z jihovýchodní Asie (Číny). Před více než dvěma sty lety se dostala tato kulturní rostlina do USA a koncem 18. století do Evropy. (Dostálová, 1990; Kadlec et al., 2009). Významná je produkcí olejnatých semen, která jsou jeden z nejdůležitějších a nejméně nákladných zdrojů bílkovin vyráběných na celém světě (Fried et al., 2018).

Tato jednoletá rostlina se silným kulovitým kořenem a dlouhými postranními kořeny může dosahovat až 2 m (závislost na podmínkách a odrůdě). Podle větvení lodyhy se rozděluje na formu pěstovanou na semeno s lodyhou vzpřímenou pevnou a na pěstovanou ke krmným účelům se slabší popínavou lodyhou. Celá rostlina je vlnatě chlupatá. Listy má složené, střídavé, řapíkaté, trojčetné s palisty. Květy jsou oboupohlavné, souměrné a drobné, rostoucí v hroznech s bílou až světle fialovou barvou. Tato rostlina patří mezi rostliny samosprašně, výjimečně cizosprašné s plodem žlutého, nazelenalého nebo hnědého, chlupatého, podlouhlého luku obsahující 1-4 semena (boby) s rozmanitou škálou barev, velikostí a tvarů. (Doležal, 2004; Dostálová, 1990).

Sója luštinatá a její odrůdy vyšlechtěné pro využití ve vyšších zeměpisných šířkách je vhodnou luskovinou pro pěstování v teplejších a nepřiliš suchých oblastech ČR. V ekologicky vhodných oblastech může být velkým přínosem v zemědělství, díky své produktivitě, funkci přerušovače obilních sledů, vysoké předplodinové hodnotě, ale i schopnosti ozdravování nebo zvýšením úrodnosti půdy při zařazení do osevního postupu. Zlepšuje fyzikální, chemické a biologické vlastnosti způsobem hloubkou zakořeňování, osvojováním živin, poutáním vzdušného dusíku a fyto-sanitárními účinky (Baranyk, 2010). Má dobré funkční vlastnosti, jako vázat vodu a tuk. Sója také hraje velkou roli ve výživě, kde je užitečná celá rostlina. Semena

jsou hlavně významná pro výživu lidí. Jako krmivo pro zvířata se využívají jak semena, tak i sušená nebo čerstvá nať. Velký význam má díky své nutriční a biologické hodnotě (Bulková, 2011; Dostálová, 1990) a dokáže se transformovat na strukturu, podobající se vlastnostem bílkovin masa, kdy ve srovnání s živočišnými bílkovinami je její výhodou daleko nižší cena (Kadlec et al., 2009). Uplatňuje se také v různých odvětvích průmyslu (Baranyk, 2010).

Po kukuřici, pšenici a rýži, co se plochy týče je čtvrtá, nejrozšířenější plodina na světě s více než 100 mil. ha s průměrným světovým výnosem okolo 2,3 t/ha. Této plodiny se vypěstuje největší množství v USA, Brazílii, Argentině a Číně. (Dostálová, 1990; Baranyk, 2010). Z celkové produkce sóji ve světě se v Evropě v místech s vhodnými podmínkami vypěstuje asi jen 2 %. Zvyšuje se produkce GM sóji, např. proti herbicidu Roundup (Kadlec et al., 2009).

O sóje se mluví jako o olejnině, protože patří mezi plodinu s vysokým obsahem oleje v semenech (19 %). Další důležitou složkou semen sóji je také velké množství bílkovin, přibližně 40 % významné hlavně ve výživě (Sultan et al., 2015). Další je podstatné zastoupení všech aminokyselin, kde je nejvýznamnější vysoké množství esenciální aminokyseliny, které si tělo nedokáže samo syntetizovat a musí být proto přijímáno potravou. Vysoký podíl nenasycených mastných kyselin, karotenů a vitamínů E obsahuje kvalitní tuk s vysokou nutriční a biologickou hodnotou, kterého sójové boby obsahují v průměru 18-23 %. Obsahují také 20-30 % bezškrobových glycidů, z čehož cukry jsou jen 5-6 %, 4,5-5 % minerálií, kam patří hlavně Ca, K, Mg a Fe, velké množství vitamínů B (B₁, B₃), také lecitin, fytin, kefalín a enzymy. Mezi další složku patří polyfenolické látky (izoflavony, fytoestrogeny) (Baranyk, 2010).

2.5.1 GM sója

Sója a kukuřice jsou nejčastěji kultivované GMO a patří mezi základní prvek mnoha potravin. Hlavně GM sója, která je v dnešní době součástí potravin běžně, hlavně v USA (Alaraidh, 2009).

GM u sóji luštinaté se zaměřují hlavně na toleranci k neselektivním herbicidům (herbicid-tolerantní sója), dále je to zlepšení kvality sójového oleje, změněný obsah proteinů nebo rezistence k hmyzím škůdcům a hádčátkům (Bečka a Jozefyová, 2005). Herbicid-tolerantní rostliny obsahují gen, díky kterému jsou odolné k určitému herbicidu a nejsou jím poškozeny. Mezi nejznámější patří herbicid glyfosát a glufosinát (Řehořová et al., 2017). Díky tomu mohou zemědělci pěstovat plodiny

šetrněji vůči životnímu prostředí na dokonale odplevelených pozemcích s vyššími výnosy (Green, 2012). Tolerantní odrůdy se od geneticky nemodifikovaných odrůd neliší nutriční hodnotou ani způsoby využití krmných a potravinářských účelů (Bečka a Jozefyová, 2005).

Roundup Ready sója

Mezi nejznámější GM sóju patří sója z linie GTS-40-3-2, prodávaná pod názvem Roundup Ready sója (RR sója). První rostliny byly testovány v USA v roce 1991 firmou Monsanto a dnes se řadí mezi celosvětově nejvíce pěstované GM plodiny (Řehořová et al., 2017). Při jejím pěstování lze bez poškození rostliny používat herbicid Roundup s účinnou složkou glyfosát proti plevelům. Tato sója byla poprvé schválena v Kanadě, v roce 1995 bylo poprvé povoleno uvolnění do životního prostředí i použití v krmivech a v roce 1996 byla povolena i v potravinářských výrobcích (Rott et al., 2004).

Tato vysoce tolerantní linie, (Padgette et al., 1995), byla získána expresí bakteriálního enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSP syntázy, EPSPS) z *Agrobacterium* sp. kmene CP4. Tato transgenní rostlina obsahuje tedy gen CP4 EPSPS z *Agrobacterium* sp. kmen CP4 (Wu et al., 2012), který v přírodě přenáší své geny do rostlin a způsobuje na nich turmory, dále také obsahuje promotor 35S (P-E35S) z viru mozaiky květáku, gen z *Petunie* zajišťujícího tvorbu tranzitního peptidu (CTP) pro transport enzymu EPSPS do chloroplastu a terminátor NOS 3 z *Agrobacterium tumefaciens* (Padgette et al., 1995; Řehořová et al., 2017).

Téměř všechna sójová pole se ošetřují herbicidy, protože plevele dokáží způsobit velké ztráty na výnosech, které mohou překročit i 75 %. Proto byla vyvinuta sója RR, aby pomohla zemědělcům. Vývoj začal objevem přirozeně se vyskytujícího genu v prostředí, který byl zodpovědný za toleranci k herbicidu glyfosátu. Gen CP4 EPSPS byl nalezen v bakterii, ze které byl izolován, extrahován a poté vložen do plazmidu. Pomocí transformace byl gen vložen do genomu sóji (Prado et al., 2014).

Jinak upravená sója

Mezi další herbicid-tolerantní sóju patří také sója odolná vůči herbicidu glufosinátu jako je např. Basta, Finale nebo Harvest (Řehořová et al., 2017). Herbicid tolerantní sója patří do skupiny tzv. první generace GM rostlin pro pěstitele. Do skupiny tzv. druhé generace GM rostlin, která je užitečná pro spotřebitele, patří

málo rozšířená GM sója, která se liší obsahem mastných kyselin v sójovém oleji. Tyto modifikace se vyznačují zejména vyšším obsahem kyseliny olejové, nebo nižším obsahem kyseliny linolenové (Bečka a Jozefyová, 2005). Sójový olej je komplexní směs pěti mastných kyselin (kyseliny palmitové, stearové, olejové, linolové a linoleové) s různými vlastnostmi (Cahoon, 2003).

Nejvýznamnější je transgenní produkce semen sóji s obsahem kyseliny olejové přibližně 80 % celkového oleje, což je znatelně vyšší obsah než u konvenční sóji, kde se obsah kyseliny olejové pohybuje okolo 25 %. Kromě toho tyto oleje obsahují relativně nízké hladiny polynenasycených mastných kyselin linolové a linolenové kyseliny (Cahoon, 2003) a mají srovnatelnou kvalitu jako olej podzemnicový nebo olivový, obecně jsou považovány za zdravější (Bečka a Jozefyová, 2005, Cahoon, 2003). Významná u těchto sójových olejů je vyšší stabilita (nežlukne) a lepší trvanlivost (Bečka a Jozefyová, 2005).

Pomocí GM lze také docílit rezistence k hmyzím škůdcům a hád'átkům. Vývojem prochází i změny v obsahu zásobních proteinů, mezi které patří vyšší obsah methioninu, lyzinu a threoninu (Bečka a Jozefyová, 2005).

2.5 Detekce GMO v krmivech a potravinách

GMO a GM produkty můžeme identifikovat zejména pomocí vložených genů a exprimovaných proteinů (Salisu et al., 2017).

Na rozdíl od způsobů detekce DNA, bylo vyvinuto jen pár způsobů, jak detekovat bílkoviny, protože DNA má lepší vlastnosti, mezi které patří: dobrá stabilita, umožnění extrakce ze všech typů tkáně a její rozbor ze zpracovaných a tepelně ošetřených potravin. Zejména je významná jedinečnost DNA v každém druhu buňky. Obsah genetické informace v DNA je větší než v bílkovinách, kvůli degeneraci genetického kódu při překlada z DNA do proteinu. Navíc při vkládání cizího genu do GMO organismu, se detekuje snadněji na úrovni DNA (Alaraidh, 2009).

GM produkty mohou být identifikovány kvalitativními i kvantitativními metodami (Markoulatos et al., 2004), které se provádí v laboratořích k tomu určeným a k testům speciálně přizpůsobeným (Ahmed, 2002).

Obecně se postup identifikace skládá ze tří různých kroků:

1. Detekce - Cílem je určit, zda je produkt GM nebo ne. Pro tento účel může být použita obecná screeningová metoda, kde jsou výsledky kladné nebo záporné. Metody screeningu jsou obvykle založeny na PCR, imunotestech nebo testech biologických. Metody detekce musí být dostatečně citlivé a spolehlivé, aby bylo možné získat přesné výsledky (Tripathi, 2011).
2. Identifikace: Účelem identifikace je zjistit, která GM plodina nebo produkt jsou přítomny a zda jsou v zemi autorizovány či nikoli (Tripathi, 2011).
3. Kvantifikace: Pokud bylo prokázáno, že plodina nebo její produkt obsahuje GM odrůdy, pak je nezbytné posoudit dodržování prahové regulace stanovením množství každé z přítomných GM odrůd. Obvykle se kvantifikace provádí pomocí Realtime PCR (Tripathi, 2011).
- 4.

Odběr vzorků

U testování GMO musí být analyzovaný vzorek reprezentativní. Důležitá je jak velikost vzorku, tak i postupy odběru, které by mohly ovlivnit závěry testovacích metod (nutný homogenní charakter). Dostatečná velikost vzorku umožňuje analýzu s požadovanou citlivostí (Sudhakar, 2006). Vzorek se musí důkladně rozemlít a potom následuje extrakce buď bílkoviny, nebo DNA (Ahmed, 2002).

Referenční materiály

Referenční materiály jsou základním nástrojem při zajišťování kvality analytických měření (Trapmann et al., 2002). Využívají se jako negativní a pozitivní kontroly pro ověření správnosti metod detekce. Definují se jako čisté látky nebo matricové materiály, a aby mohly být použity k posouzení, musí být homogenní a stabilní (Sowa, 2014). Každý GMO musí mít specifický referenční materiál, který by neměl být závislý na analytických metodách a měl by být soustředěn hlavně na základní složky než na hotové potraviny. Používají se zrna, upravené DNA nebo proteiny. Použitá zrna by měla mít podobné vlastnosti

jako testované vzorky (obsah GMO, stabilita a homogenita vzorku). Dále se také může jako referenční materiál používat plazmidová a genomová DNA (Ahmed, 2002).

2.6 Metody detekce

Existuje řada jak kvalitativních, tak i kvantitativních analytických metod, pro spolehlivou detekci přítomnosti nebo množství GMO (Anklam et al., 2002). Současné metody pro analýzu GMO jsou zaměřeny buď na transgenní vloženou DNA nebo nový protein (proteiny) exprimovaný v GM produktu (Miraglia et al., 2004). Většinou se při detekci na bázi DNA používá metoda PCR, nejčastěji využívaná metoda na bázi proteinů je ELISA (Miraglia et al., 2004; Marmioli et al., 2008). Využívá se ale také detekce pomocí chemické analýzy, jako je chromatografie. Pokud není dostupná informace o modifikované sekvenci, dá se GMO detekovat díky infračervené spektrofotometrii. Další je významná inovace čipů DNA (DNA microarrays) (Anklam, et al., 2002; Malik et al., 2018).

2.7.1 Testovací metody na bázi proteinu

Pro většinu metod založených na proteinech se používají enzymové imunisorbentní testy (Miraglia et al., 2004), které identifikují a kvantifikují molekuly, které mají být detekovány (analyty) pomocí protilátky a antigenu vázající se na protein. Specifické antigeny mohou být stimulovány specifickými imunitními odpověďmi a v důsledku imunitní reakce v těle jsou produkovány protilátky, které dokáží najít jakýkoli antigen v těle (Malik et al., 2018). Důležitý je výběr antigenu vázaný protilátkou (Miraglia et al., 2004). Využívají se polyklonální (citlivější) nebo monoklonální (vysoce specifické) protilátky v závislosti na specifičnosti detekce, jako jsou protilátky proti celému proteinu nebo specifickým sekvencím peptidu. Imunotesty mohou zjistit modifikované proteiny i v 1 % GMO. Tyto metody s protilátkami mohou být využity ve dvou formách: kompetitivní test, kde detektor a analyt soutěží o vazbu se zachycovacími látkami a dvousložkový (double antibody sandwich) test, který je považován za vhodnější, kde dochází ke vložení analytu mezi zachycovací a detekční protilátku. Metodou Western blot, nebo metodou ELISA jsou analyzovány produkty transgenní RR sóji (Ahmed, 2002).

Hlavní nevýhodou metod detekce proteinu je malá dostupnost protilátek specifických proti proteinům produkovaných vloženým genem (Káš et al., 2004). Pro imunologické testy je důležitá neporušená terciální a kvarterní struktura, a proto se dají používat pouze čerstvé materiály (Bonfini et al., 2001).

Western blot

Western blot je specifická metoda poskytující kvalitativní výsledky při stanovení přítomnosti určitého proteinu prostřednictvím protilátek (sond). Tato detekce je vhodnější při výzkumu než při běžném testování (Ahmed, 2002, Griffiths et al., 2019). Obsahuje tři kroky: separace podle velikosti, přenos na pevný nosič a označení cílového proteinu za použití správné primární a sekundární protilátky k vizualizaci. Proteiny vzorku se separují na základě molekulové hmotnosti prostřednictvím polyakrylamidové gelové elektroforézy (Yang a Mahmood, 2012; Clark, 2005). Výsledky jsou pak přeneseny na pevný nosič (nitrocelulózu nebo nylonovou membránu) pomocí elektrického pole a jednotlivé proteiny jsou zviditelněny značenými protilátkami (Clark, 2005). Nenavázaná protilátka se vymyje a ponechá pouze navázanou protilátku k proteinu, který nás zajímá. Tloušťka vytvořeného pásu odpovídá množství přítomného proteinu (Yang a Mahmood, 2012). Navázaná protilátka je nakonec pro vizualizaci obarvena látkou Ponceau, dusičnanem stříbrným, barvivem Coomassie nebo sekundárním imunologickým činidlem jako je např. protein A spojený s křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. (Ahmed, 2002).

Při testování sójových výrobků je u surovin citlivost detekce mezi 0,5 % a 1 %. Sójový protein však není možné identifikovat ve vysoce zpracovaných sójových výrobcích (Griffiths et al., 2019).

V porovnání s metodou ELISA, je u této metody výhoda určení molekulární hmotnosti proteinu. Na druhou stranu je ale časově náročnější a kvantitativní výsledky jsou méně přesné (Káš et al., 2004). Využívá se především ve výzkumech pro detekci GM proteinů, vhodná je i pro detekci proteinů nerozpustných. Nevýhodou je ale potřeba vysokých technických dovedností a více času (minimálně jeden den) (Griffiths et al., 2019).

ELISA

ELISA, test Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, je další metoda využívána k detekci proteinů ve vzorcích, založena na jednoduchém principu, kdy se na sebe váže antigen a protilátka (Crowther, 2009). Antigenem je nově syntetizovaný protein (Bonfini et al., 2001).

Tato metoda je kvantitativní, vysoce citlivá a ekonomická, ideální pro rozsáhlé laboratorní analýzy, kdy se protein nenedenaturuje. Využívá se mikrotitrační deska jamek s protilátkou. Doba průběhu se pohybuje okolo 90 minut a pomocí čtečky se poté určuje koncentrace ve vzorcích (Ahmed, 2002). Nejčastěji používaná je "sendvičová" forma, kdy je jeden antigen vložen mezi dvě protilátky nebo jedna protilátka je vložena mezi dva antigeny pro specifitější reakci. V tomto testu se roztok vzorku přidá do jamky destičky obsahující navázanou protilátkou specifickou pro GMO protein. Vzorek s antigenem je nanesen na destičku, a pokud je GM protein ve vzorku přítomen, naváže se na protilátku. Nenavázané antigeny se promyjí a do jamky se přidá jiná protilátka, specifická značená enzymem pro požadovaný protein. Po dalším promytí, aby se odstranila jakákoliv nenavázaná protilátka, se přidá substrát pro enzym, který indukuje změnu barvy v roztoku, která je přímo úměrná s množstvím GMO proteinu (Malik et al., 2018).

ELISA testy jsou ale omezeny u některých potravin, které jsou upravovány vysokými teplotami při zpracování, kdy jsou bílkoviny poškozeny a není snadné je detekovat (Thomison a Loux, 2001). Dále nemůže identifikovat vzorek GM, pokud několik odrůd mají stejný znak. Je potřeba specializované vybavení a vyškolený personál. Na druhou stranu je rychlejší než PCR metoda, levnější a protein měří na kvantitativní úrovni (Tripathi, 2011). Testy ELISA se snadno používají, jsou silnější a levnější než metody detekce DNA, ale je nedostatečná dostupnost protilátek a jejich vývoj může trvat i několik let, také jsou méně citlivé než metody na bázi DNA (Griffiths et al., 2019). Mezi další nevýhody patří citlivost, která se pohybuje přibližně okolo 0,5 až 1 % GMO nebo nedetekovatelnost kvůli nízkému množství cílového proteinu. (Griffiths et al., 2019).

U geneticky modifikované sóji se bílkoviny identifikují do teploty 65 °C. Při zahřátí na vyšší teplotu, již proteiny specifickými protilátkami není možné určit (Urbanek-Karłowska et al., 2001).

Lateral flow strip

Pro polní použití vznikla další varianta metody ELISA - Lateral Flow Strip (Stave, 1999). Vyznačuje se jednoduchým použitím, kde se rozlišují jen pozitivní nebo negativní výsledky a dá se vyhodnocovat vizuálně (Luppa et al., 2011). Test používá membránu, která obsahuje dvě zachytné zóny. Jedna zachycuje vázaný transgenní protein, druhá barevné činidlo. Proužek je ponořen do připraveného vzorku v extrakčním roztoku a vzorek migruje na druhý konec pásky. Když vzorek protéká, protilátky zachytí protein, který nás zajímá a bude se zde akumulovat. Tyto testy obecně poskytují kvalitativní nebo semikvantitativní výsledky s použitím protilátek a barevných činidel začleněných do proužku. Přítomnost jedné linky na membráně indikuje negativní vzorek a přítomnost dvou linek naznačuje pozitivní výsledek. (Chalam a Khetrapal, 2012; Meulenberg, 2012). Tato forma detekce je velice rychlá a ekonomická, poskytuje výsledky za 5-10 minut (Feng et al., 2018). Pásky byly komerčně vyvinuty pro detekci endotoxinů exprimovaných bakterií *Bacillus thuringiensis*, proteinu CP4 EPSPS v sóji, řepce, bavlně a cukrové řepě. Komerčně dostupné jsou omezeny jen na několik GM produktů, ale jsou vyvíjeny pásky, které mohou současně detekovat více proteinů (Ahmed, 2002).

Výhodou je rychlé, kvalitativní měření na přítomnost nebo nepřítomnost cílového proteinu. Není možná kvantifikace proteinu a nemůže být identifikován vzorek, u kterého může mít několik odrůd stejnou vlastnost (Tripathi, 2011).

2.7.2 Testovací metody na bázi DNA

Metody detekce DNA pro GM potraviny jsou založeny na komplementaritě dvou řetězců dvoušroubovice DNA, které hybridizují specifickým způsobem. DNA, která byla vložena do plodiny, se skládá z několika prvků, které řídí její fungování. Je to typicky promotorová sekvence, strukturní gen a stop sekvence pro gen. I když je k dispozici několik technik, běžně se používá Southern blot a hlavně metoda PCR. Mezi další patří technologie Microarray.

Důležitým krokem je purifikace a extrakce. V současné době je k dispozici několik metod extrakce, využívají se k vyzolování uspokojivé DNA. Faktory, jako je nadměrné teplo, aktivita nukleázy a nízké pH (zcela běžné při zpracování potravin) přispívají k degradaci DNA. To je nejpravděpodobnější u výrobků s dlouhou životností. Sloučeniny přítomné v potravinách (například proteiny, tuky, polysacharidy, polyfenoly, kakaové extrakty a karamelizovaný cukr) mohou inhibovat DNA polymerázu.

Nejčastěji dostupné GMO v EU obsahují některé ze tří genetických prvků: 35S promotor viru mozaiky květáku (CaMV), terminátor nopaliny syntázy (NOS) nebo markerový gen pro rezistenci na kanamycin (nptII). Tyto prvky se také vyskytují přirozeně v některých rostlinách a půdních mikroorganismech (Ahmed, 2002).

Southern blot s následnou hybridizací

Metoda Southern blot je využívána k detekci specifických DNA sekvencí, které jsou rozdělovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Poté je součástí této metody fixace izolované DNA vzorku na nitrocelulózu, nebo nylonovou membránu. DNA sekvence na tomto pevném nosiči mohou být dále identifikovány za pomoci komplementárních řetězců (sond), specifických pro určité GMO. Sondy mohou být značeny enzymaticky nebo radioaktivně (Edberg, 1985; Šmarda, 2005). Používá se jen jedna sonda a není provedena žádná amplifikace. Tato metoda je považována za méně citlivou než PCR, která využívá dvou primerů. (Ahmed, 2002). Nevýhodou Southern blot je potřeba velkého množství DNA a časová náročnost (Edberg, 1985). Intenzivní práce s mnoha kroky trvá 2-3 dny. Další nevýhoda je nevhodnost pro přesnou kvantifikaci nebo automatizaci. Současně lze použít pouze omezený počet sond vhodné pro detekci více analytů (Griffiths et al., 2019).

Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase chain reaction–PCR)

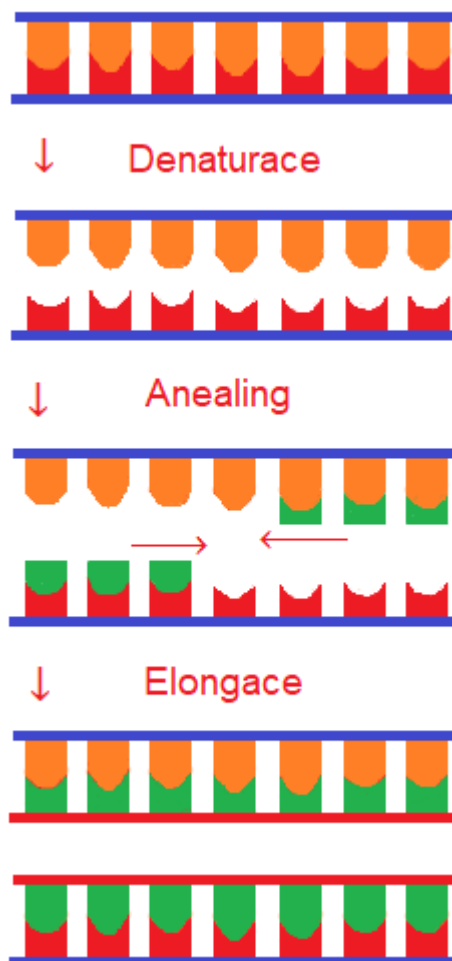
Jedna z metod, která byla označena za vhodnou k analýze potravin je PCR, proto byla také vybrána k detekci GMO (Alaraidh, 2009). Je to in vitro amplifikace (namnožení) určitých úseků (lokusů) nukleových kyselin, nejčastěji DNA, kdy je nutné znát nukleotidové sekvence, které ohraničují zkoumaný gen nebo úsek DNA (Kúdela et al., 2002; Snustad et al., 2009). PCR je syntéza, která se cyklicky opakuje. Nejprve je DNA s cílovým místem izolována a přidána do směsi, jejíž součástí jsou primery o 18-25 nukleotidech komplementárních k okrajovým úsekům určité sekvence. (Šmarda, 2005, Maheaswari et al., 2016). Při standardní PCR se používají dvojice primerů: přední (F), který se váže na konec 5' → 3' a primer reverzní (R), vázající se na druhý konec 3' → 5'. Tyto primery jsou navrženy tak, aby hybridizovaly na protichůdných řetězcích sledované sekvence (Maheaswari et al., 2016). Dále je potřeba DNA polymeráza, která katalyzuje syntézu řetězců, 4 typy deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs, N = Guanosin, Adenosin, Thymin nebo

Cytidin), Mg^{2+} ionty pro zajištění vhodného prostředí pro stabilitu a optimální aktivitu DNA polymerázy, vody, soli s Mg^{2+} a PCR pufr pro stálé a optimální pH prostředí (Šmarda, 2005). Reakce probíhá v opakujících se cyklech v tzv. termocykleru, který dokáže velmi rychle měnit teplotu. (Alberts, 1998). PCR obsahuje tři kroky závislé na měnící se teplotě, viz obrázek 3. Mezi ně patří:

Denaturace – Rozpojení vodíkových můstků, které spojují matricové řetězce DNA za zvýšené teploty na cca 94 °C po dobu 30 sekund (Kúdela et al., 2002; Snustad et al., 2009).

Annealing – Hybridizace DNA neboli nasedání primerů (dvou krátkých jednořetězcových specifických „matricových“ oligonukleotidů odvozených z DNA) na požadované místo každého z vláken DNA při teplotě 50–70 °C po dobu 15-60 sekund. (Kúdela et al., 2002; Snustad et al., 2009), kdy se podle známé sekvence nasyntetizují dva primery, kdy je každý komplementární k sekvenci jiného vlákna původní dvouřetězcové molekuly DNA na koncích zkoumaného lokusu, který má být namnožen (Alberts, 1998).

Elongace – Syntéza dvouřetězcové DNA probíhající díky teplotně stabilnímu enzymu DNA – polymerázy a volných nukleotidů, které se komplementárně vážou na původní řetězce ve směru ve směru 5'-3'. DNA – polymeráza dokáže nasyntetizovat několik miliard kopií dané sekvence (Kúdela et al., 2002; Snustad et al., 2009; Alberts, 1998), při teplotě 72 °C (Maheaswari et al., 2016).



Obrázek 3: Průběh PCR reakce

Po 30 cyklech obsahuje reakční směs teoreticky 2^{30} molekul požadovaného produktu. Jakmile dojde k amplifikační reakci, jsou k dispozici různé metody pro detekci amplifikovaného produktu. Nejjednodušší je identifikovat produkt podle velikosti pomocí elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu (Maheaswari et al., 2016).

Metoda je velmi citlivá a nejpřesnější z hlediska detekčních limitů. Cílová sekvence DNA se dá měřit jak kvalitativně, tak i kvantitativně. Jsou ale vyžadovány drahé, specializované vybavení a vyškolený personál (Tripathi, 2011). Metoda PCR se vyznačuje velkou citlivostí. Analyzován může být jakýkoliv typ tkáně, protože všechny buňky nesou stejnou DNA, ale vyznačuje se časovou náročností přípravy vzorku, doba testu je 2-3 dny. Celkově je dražší než metody založené na proteinu, kvůli potřebě termocykleru a elektroforetického zařízení.

Nevýhodou je citlivost na inhibitory, které mohou být přítomné v potravinách. Neexistuje žádná metoda PCR, která by dokázala detekovat všechny GMO (Griffiths et al., 2019).

Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, kterou můžeme separovat biologické vzorky, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny (DNA a RNA) s různou velikostí a nábojem. (Snustad et al., 2009; Schwedt, c1997). Nabité částice migrují ve stejnosměrném elektrickém poli díky stejnosměrnému napětí mezi dvěma elektrodami (Klouda, 1996). Pohyb částic je závislý na velikosti náboje, tvaru, intenzitě elektrického proudu, vlastnostech pufru, velikosti a stupni disociace (Čermáková, 2005).

V praxi je to nejvíce používaná metoda pro dělení makromolekul, která využívá porézní gely (nosiče), agarózové (k separaci a analýze DNA) a polyakrylamidové (k separaci a analýze proteinů), které fungují při separaci na principu síťového efektu. Využívají se např. při metodě SDS-PAGE. (Káš et al., 2005, Roy a Kumar, 2014). Celý gel je ponořen do pufru, který je důležitý pro udržení stabilní pH během separace a slouží jako vodivostní médium (Kealey a Haines, 2002). Dělení začíná pohybem částic ze stejné pozice. Dopředu se dostávají nabitě částice s větší pohyblivostí a částice s menší pohyblivostí se opožďují (Klouda, 1996; Kealey a Haines, 2002). Po dokončení dělení molekul se gel vizuálně zhodnotí po UV světlem (agarózový gel), nebo se obarví některým barvivem (polyakrylamidový gel).

Kvantitativní kompetitivní polymerázová řetězová reakce (QC- PCR)

Klíčovým aspektem analýzy GMO v potravinách je kvantifikace, protože maximální limity GMO v potravinách jsou základem pro označování v EU (Ahmed, 2002). Techniky založené na DNA, jako je polymerázová řetězová reakce, jsou široce používány pro identifikaci úseků DNA, ale nezjišťují množství, proto se vyvinula kvantitativní kompetitivní polymerázové řetězové reakce (QC-PCR) pro detekci a kvantifikaci (Wolf a Lüthy, 2001). Princip QC-PCR je založen na společné amplifikaci určitého fragmentu vzorku a uměle konstruovaného vnitřního standardu (kompetitor) se známou koncentrací, který je podstatný pro kvantitativní hodnocení výsledků. Kompetitor má stejná vazebná místa pro navázání stejného páru

primerů, ale od amplifikovaného fragmentu se liší ve velikosti (Priglová a König 2002). Díky tomuto malému rozdílu velikostí (<40bp) se dají reakční produkty rozlišit. Tato metoda funguje na principu analýzy série PCR reakcí s určitou koncentrací DNA zkoumaného vzorku, kdy se přidávají různé koncentrace DNA vnitřního standardu (Anklam et al., 2002). Podle toho, kdy je v reakci PCR-produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA stejné, tak, že mají pruhy na agarózovém gelu stejnou intenzitu, dá se porovnat množství DNA sekvence v analyzovaném vzorku (Bonfini et al., 2001). Výhodou je sice kvantifikace, ale tato metoda se také vyznačuje jak časovou, tak materiální náročností a odhad koncentrace cílové sekvence ve vzorku se určuje semikvantitativně, takže nelze určit přesné číselné hodnoty (Priglová a König, 2002).

Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase (real-time PCR)

Real-time PCR je jednoduchá metoda s vysokou citlivostí a spolehlivostí. V klasické PCR se amplifikovaná sekvence detekuje elektroforézou až po skončení reakce, ale u real-time PCR je možné měřit zmnožení produktu v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time) (Dudová a Hájek, 2008). A můžeme sledovat namnožení produktu po každém amplifikačním cyklu (Houghton a Cockerill, 2006). Pro detekci produktů se využívají fluorescenčně značené oligonukleotidy, mohou to být i barviva, která se vážou na DNA, a nebo sekvencově specifické primery či sondy (Dudová a Hájek, 2008; Houghton a Cockerill, 2006). Real-time PCR se může označovat také jako kvantitativní PCR (qPCR), protože amplifikovaná sekvence DNA se může stanovit, jak kvalitativně, tak i kvantitativně (podle počtu kopií DNA). Metoda je vysoce specifická díky třem oligonukleotidům (dva primery a jedna sonda) (Dudová a Hájek, 2008).

Pro odhad množství PCR produktu se používá barvivo SYBR Green I vázající se na dsDNA, hybridizační sondy, sondy přenosu fluorescenční rezonance nebo sondy hydrolýzy (technologie TaqMan) a molekulární majáky (Ahmed, 2002). Princip použití barviva SYBR Green je založený na jeho vazbě na dvojvláknovou deoxyribonukleovou kyselinu (dsDNA). Dražší varianta TaqMan funguje na základě dvojité značených oligonukleotidů (TaqMan sondy). Využívají exonukleázovou aktivitu enzymu Taq polymerázy při syntéze DNA (Tajadini et al., 2004; Ponchel et al., 2003). Pomocí TaqMan bylo analyzováno mnoho potravinářských výrobků obsahujících GM RR sóju (např. dětské výživy a dietní výrobky, sójové nápoje a dezerty, tofu, nudle, tuky, oleje a koření). Metoda se ukázala jako citlivá. Sójová

DNA však nemohla být detekována v tucích, olejích a kořenech (Ahmed, 2002). Tato metoda je velmi citlivá, ale dražší než běžná PCR, kvůli použití speciálního termocyklieru. Dále jsou nutné vysoké technické schopnosti (Dorak, 2007).

2.7.3 Jiné metody

Chromatografie

Chromatografické metody se využívají u GMO obsahující mastné kyseliny, triglyceridy a určité látky, které lze detekovat pouze kvalitativními způsoby. Tyto analytické techniky byly vyvinuty za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s hmotnostní spektrometrií s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI-MS) v GM řepce na přítomnost triglyceridů (Byrdwell et al., 2001; Jin et al., 2016). To bylo prokázáno u olejů pocházejících z GM řepky. Při porovnávání separovaných triglyceridů bylo možno pozorovat, že oleje z geneticky modifikovaných řepkových odrůd měly zvýšený obsah triacylglycerolů, což ukazuje na větší oxidační stabilitu pro řepkový olej s vysokým obsahem kyseliny stearové. Je však třeba zdůraznit, že tato metodika je použitelná pouze v případě, že jsou změny geneticky modifikovaných rostlin nebo odvozených produktů významné. Je to spíše kvalitativní metoda detekce než kvantitativní metoda (Anklam et al., 2002).

Infračervená spektroskopie

Některé genetické modifikace mohou změnit i strukturu pletiv rostlin, i když detekce olejů a proteinů neukazuje žádné rozdíly ve složení (např. Roundup Ready sója). Tyto rozdíly lze ale identifikovat infračervenou spektroskopií (Hurburgh et al., 2000, Anklam et al., 2002). Používá hlavně pro obiloviny a zrna ve výtazích, obvykle pro nedestruktivní analýzu celých zrn pro stanovení obsahu vlhkosti, bílkovin, oleje, vlákniny a škrobu. NIR se používá k rozlišení sójových bobů Roundup Ready od konvenční sóji (Esteve Agelet et al. 2013). Výhody této techniky je rychlost (<1 min), příprava vzorku není nutná, protože používá celá zrna, a je proto i levná. Hlavní nevýhodou je to, že neidentifikuje sloučeniny. Pokud jde o GMO, nedetekuje změnu DNA ani proteinu, ale mnohem větší neznámé strukturální změny, jako jsou ty, které jsou spojeny s parietální částí semen (např. Lignin nebo

celulóza), díky vzniku nové DNA (Ahmed, 2002). Shrnutí metod, detekujících produkty GMO jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Shrnutí metod, specificky detekující produkty GMO (Anklam et al., 2002; Tripathi, 2011)

d: den, min: minuty

| Parametr | Metody na bázi proteinu | | | Metody na bázi DNA | | | |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Western blot | ELISA | Lateral flow strip | Southern blot | Qualitative PCR | QC-PCR | Real-time PCR |
| Použití | Složité | Průměrné | Jednoduché | Složité | Složité | Složité | Složité |
| Speciální vybavení | Ano | Ano | Ne | Ano | Ano | Ano | Ano |
| Citlivost | Vysoká | Vysoká | Vysoká | Střední | Velmi vysoká | Vysoká | Vysoká |
| Doba trvání | 2 d | 30-90 min | 10-20 min | 6 hod | 2-3 d | 2 d | 1 d |
| Kvantitativní výsledky | Ne | Ano | Ne | Ne | Ne | Ano | Ano |
| Vhodnost pro polní testy | Ne | Ano | Ano | Ne | Ne | Ne | Ne |
| Hlavní využití | Vědecké laboratoře | Testovací zařízení | Polní testování | Vědecké laboratoře | Testovací zařízení | Testovací zařízení | Testovací zařízení |

3. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo izolovat DNA z různých potravin a krmiv pravděpodobně obsahujících sóju a vzorky analyzovat na přítomnost DNA sóji, promotoru CaMV a genu pro transgen způsobující odolnost k herbicidu Roundup pomocí velmi citlivé a přesné metody PCR a výsledky porovnat s dostupnými informacemi o výrobcích.

4. Materiál a metody

Vzorky

V potravinách a krmivech od různých výrobců byl stanovován obsah GM sóji. Konkrétně byly analyzovány různé sójové náhražky masa, tyčinky, dochucovadla pokrmů nebo tofu. Detekce byla zaměřena na gen pro sójový protein lektin, podle kterého se mohla určit přítomnost sóji v produktu. Dále se testovala přítomnost promotoru z viru mozaiky květáku (CaMV) GM sóji a transgenů způsobujících odolnost k herbicidu Roundup. Použité vzorky a další informace jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité vzorky a shrnutí informací

| Číslo vzorku | Název výrobku | Výrobce | Uvedení sóji ve složení na obalu | Značení přítomnosti GMO na obalu |
|--------------|--------------------|-----------------------|--|---------------------------------------|
| 1 | Margot | Nestlé Česko s. r. o. | Sójová tyčinka 75%, sójová mouka 17 % | Neuvedeno |
| 2 | Sójový špalek | Albert | Sójové vločky (29 %) | Neuvedeno |
| 3 | Zora Sójové řezy | Nestlé Česko s. r. o. | Sójové vločky 30 % | Neuvedeno |
| 4 | Proteinová tyčinka | Max Sport s. r. o. | Sójový protein, emulgátor lecithin (sója), sójový olej | Neuvedeno |
| 5 | Krmivo pro kuřata | ZZN Pelhřimov a. s. | Sójový extrahovaný šrot loupáný, toastovaný, Sójový olej | Obsahuje geneticky modifikovanou sóju |
| 6 | Sójové kostky | Bona Vita s. r. o. | Odtučněná sójová mouka | Neuvedeno |
| 7 | Sójové nudličky | Bona Vita s. r. o. | Odtučněná sójová mouka | Neuvedeno |

| | | | | |
|----|------------------------|--------------------------------|--|----------------------------------|
| 8 | ALA Sójový dezert | Vega Provita s. r. o. | Sójové boby 7,5 % | Neuvedeno |
| 9 | Alpro Puding vanilkový | Emco s. r. o. | Loupané sójové boby (6,4 %) | Neuvedeno |
| 10 | PATIFU Sójová paštika | Veto Eco s. r. o. | Tofu 22 % (sója) | Neuvedeno |
| 11 | Sójové párky | Kalma k. s. | Sójová bílkovina (11 %) | Obsahuje nemodifikovanou sóju |
| 12 | Tavenýr | Soy'n' Health s. r. o. | Sójové boby (8 %) | Geneticky neupravené sójové boby |
| 13 | Sójová omáčka | F.W. Tandoori s. r. o. | Sójové boby (20 %) | Neuvedeno |
| 14 | Cuisine | ALPRO C. V. A | Loupané sójové boby (7,9 %), emulgátor (lecitiny sójové) | Neuvedeno |
| 15 | Oplatka | Pečivárne Lipt.Hrádok s. r. o. | Sójová mouka | Neuvedeno |
| 16 | Věnečky žloutkové | Sunfood s. r. o. | Sójová mouka | Neuvedeno |
| 17 | Trubičky Alaska | Alaska Foods s. r. o. | Emulgátor: sójový lecitin | Neuvedeno |
| 18 | Bezlepková tyčinka | OK-FAIN, spol. s. r. o. | Sójový lecitin | Neuvedeno |
| 19 | Polomáčené sušenky | Druid CZ s. r. o. | Částečně ztužený sójový tuk | Neuvedeno |

| | | | | |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|--|-----------|
| 20 | Křupky Baconchio | Intersnack a. s. | Hydrolyzovaná sójová bílkovina | Neuvedeno |
| 21 | Burger žvýkačka | Fini Golosinas Espana, S.L.U. | Sójový lecitin | Neuvedeno |
| 22 | Křupky Cheetos | Pepsico CZ s. r. o. | Obsahuje sóju | Neuvedeno |
| 23 | Perník s náplní | Albert Heijn B.V. | Výrobek obsahuje sóju | Neuvedeno |
| 24 | Ovesná kaše | Bonavita s. r. o. | Částečně ztužený sójový olej | Neuvedeno |
| 25 | Sójový jitrničák | Amunak s. r. o. | Fermentovaná sója | Neuvedeno |
| 26 | Tofu natural | Sunfood s. r. o. | Sója | Neuvedeno |
| 27 | Tofu karbanátky | Sunfood s. r. o. | Tofu 72 % | Neuvedeno |
| 28 | RETRO Sójová tyčinka | Chocoland a. s. | Sójové vločky (29 %) | Neuvedeno |
| 29 | Pomazánka tofu | Sunfood s. r. o. | Tofu (sója) 70 %, sója | Neuvedeno |
| 30 | Amunak sójový škvařík | Amunak s. r. o. | Sójová bílkovina (31 %), fermentovaná sója | Neuvedeno |
| 31 | Sojanéza | Kalma k. s. | Sója 6 % | Neuvedeno |
| 32 | Miso | Sunfood s. r. o. | Sójové boby | Nevedeno |
| 33 | Cookies | Galletas Gullón s. a. | Emulgátor: sójový lecitin, sójová mouka | Neuvedeno |
| 34 | Banánové sójové mléko | ALPRO C. V. A | Loupané evropské sójové boby (9,8 %) | Neuvedeno |

| | | | | |
|----|---------------------------------|----------------------|---|--|
| 35 | Tatarka sójová | Kalma k. s. | Sója 29 % | Neuvedeno |
| 36 | Vajahit náhrada vajec | Topnatur s. r. o. | Sójová mouka, sójový lecitin | Neuvedeno |
| 37 | AO | HANSA C. B. s. r. o. | Sójový extrahovaný šrot, sójový protein, sójový olej | Vyrobeno z geneticky modifikované sóji |
| 38 | ČOS T | HANSA C. B. s. r. o. | Sójový extrahovaný šrot, sójový koncentrát, sójový olej | Vyrobeno z geneticky modifikované sóji |
| 39 | P1 | HANSA C. B. s. r. o. | Sójový extrahovaný šrot | Vyrobeno z geneticky modifikované sóji |
| 40 | Extrudovaný sójový šrot | Neznámý | Sójový extrudovaný šrot | Vyrobeno z geneticky modifikované sóji |
| 41 | Smiley sticks – tyčinka pro psy | Frolic | Přesné složení neuvedeno | Neuvedeno |
| 42 | Peanut crunch bar | Cambridge plan | Sójový lecitin, sójové proteinové nugety | Neuvedeno |

Izolace

Pro izolaci DNA byl použit komerční kit MagCore® Genomic DNA Tissue Kit, který je navržen pro izolaci DNA (včetně genomické, mitochondriální a virové DNA) z různých živočišných tkání nebo buněk použitím MagCore® přístroje pro automatickou extrakci. Poskytnuté filtrační kolony dokáží přefiltrovat pevné tkáně, aby bylo zabráněno ucpání špičky pipety během procesu v MagCore® přístroji. Metoda používá předplněnou kazetu, která obsahuje proteinázu K a chaotropickou sůl, aby lyzovala buňky a odbourávala bílkoviny. DNA se váže na celulózu magnetické kuličky. Po promytí kontaminantů je purifikovaná DNA eluována slabým solným elučním pufrům. Celá sada pro jeden vzorek obsahuje předplněnou kazetu s reagensy, špičku na pipetu, mikrozkuřavku na vzorek, eluční mikrozkuřavku, filtrační kolonu, GT pufr a proteinázu K. Dále byla k izolaci potřeba

váha, pinzeta, nožík, centrifuga, vortex, inkubátor, pipety se sterilními špičkami a homogenizátory. Pro změření koncentrace a čistoty vyizolovaného DNA byl použit spektrofotometr BioSpecNano.

Postup izolace DNA

1. Odebrala jsem pomocí nožíku a pinzety kousek vzorku a navážila 30-40mg do mikrocentrifugačních mikrozkuvek.
2. Přidala 20 μ l proteinázy K a 500 μ l GT pufru, promíchala homogenizátorem a pár sekund vortexovala, dokud se látky nezhomogenizovaly.
3. Směs jsem inkubovala po dobu 15 min. na 56 °C v inkubátoru. Během inkubace jsem mikrozkuvku převracela každé 2-3 min. pro rovnoměrné rozpuštění.
4. Při obsahu nerozpustných zbytků ve zkumavce jsem přepipetovala supernatant (kapalná část) do filtračních kolonek a centrifugovala na plnou rychlost po dobu 5 min. pro dostání čistého roztoku vzorku.
5. Napipetovala jsem 400 μ l čistého roztoku vzorku do MagCore vzorkových mikrozkuvek.
6. Umístila jsem připravené vzorkové mikrozkuvky, vymývací mikrozkuvky a špičky do předurčených otvorů v robotu.
8. Zvolila program Code.401 na robotu MagCore® a spustila izolaci.
9. Po skončení izolace jsem změřila čistotu a koncentraci extrahované DNA každého vzorku.

PCR

K detekci GM sóji v potravinách byla použita metoda PCR, která je založena na použití speciálně navržených párů primerů (R a F), označujících konkrétní sekvence genu pro sóju, promotor CaMV a transgen pro odolnost k herbicidu Roundup. Tyto primery mají určitou teplotou nasedání a velikost amplifikovaných úseků, viz tabulka 3. Pro správný průběh PCR je potřeba reakční směs z určitého množství látek, které jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 3: Použité primery

| Primery | Sekvence primerů (5'-3') | Velikost amplifikovaných fragmentů (bp) | Teplota nasedání (°C) | Zdroj |
|----------------------|---|---|-----------------------|---------------------|
| Lektin | GCCCTCTACTCCACCCCATCC GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG | 118 | 58 | Meyer et al., 1996 |
| CaMV promotor | ATTGATGTGATATCTCCACTGACG CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT | 101 | 62 | Tengel et al., 2001 |
| Roundup Ready | TGGCGCCCAAAGCTTGCATGGC CCCCAAGTTCCTAAATCTCAAGT | 356 | 58 | Tengel et al., 2001 |

Tabulka 4: Reakční směs pro PCR

| Látka | Množství (µl) |
|-----------|---------------|
| MasterMix | 5 |
| F primer | 0,5 |
| R primer | 0,5 |
| Voda | 3 |
| DNA | 1 |

Gelová elektroforéza

Kontrola a analýza PCR reakce se provádí pomocí gelové elektroforézy, která dokáže separovat amplifikované úseky nukleových kyselin podle velikosti v elektrickém poli, kde se DNA pohybuje podle různých parametrů, jako je například tvar a velikost. Protože má DNA záporný náboj, pohybuje se od katody k anodě. Pro porovnání velikosti separovaných fragmentů se používá marker (ladder), kdy se srovnává poloha fragmentu DNA s polohami markeru. Výsledný produkt PCR reakce byl analyzován na 1,5% agarózovém gelu, kde jako fluorescenční barvivo byl použit ethidium bromid. Poté byl výsledný gel nasvícen pod UV transiluminátorem pro porovnání výsledků a snímán fotoaparátem.

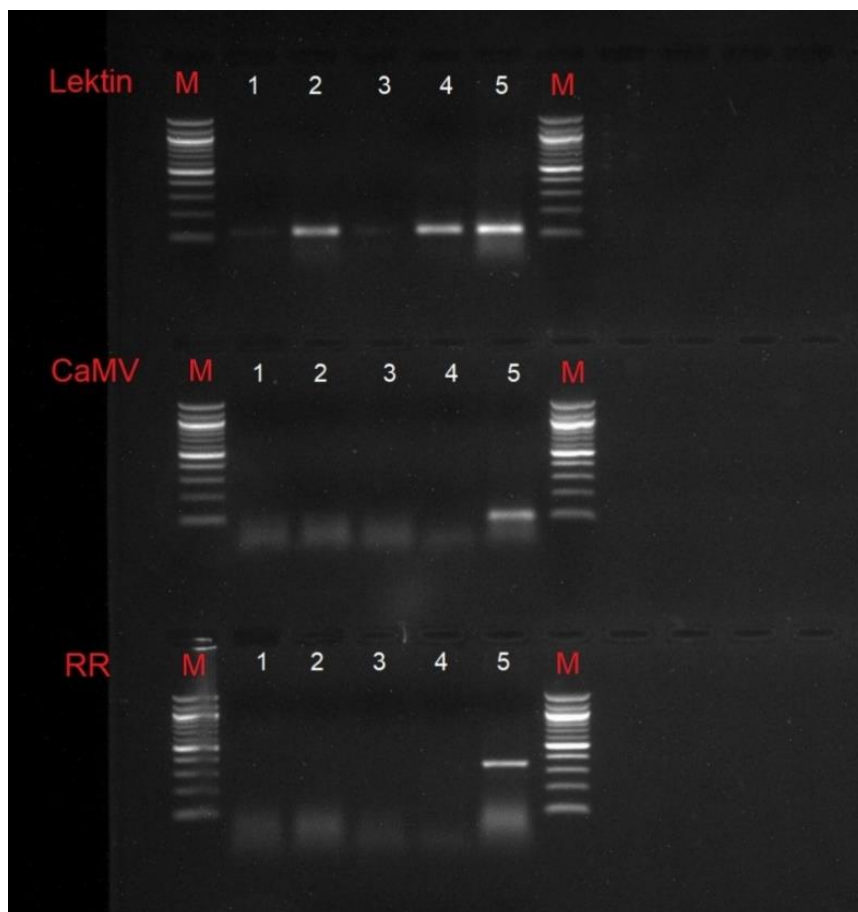
5. Výsledky

Po izolaci DNA ze vzorků byly změřeny koncentrace, které jsou zaznamenány v tabulce 5. Vyhodnocení výsledků PCR detekce GMO sóji v potravinách nebo krmivech je znázorněno na obrázcích 4-9. Každý obrázek zobrazuje analýzu vzorků testovaných na přítomnost DNA sóji, promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup. Negativní vzorky bez DNA a marker 100bp byly použity pro kontrolu a porovnání výsledků.

Tabulka 5: Koncentrace získané DNA jednotlivých vzorků

| Číslo vzorku | Název výrobku | Koncentrace DNA (ng/μL) |
|--------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | Margot | 81,48 |
| 2 | Sójový řez | 115,31 |
| 3 | Sójový špalek | 128,32 |
| 4 | Proteinová tyčinka | 19,66 |
| 5 | Krmivo pro kuřata | 203,04 |
| 6 | Sójové kostky | 116,53 |
| 7 | Sójové nudličky | 120,99 |
| 8 | ALA Sójový dezert | 23,87 |
| 9 | ALPRO Puding vanilkový | 33,81 |
| 10 | PATIFU Sójová paštika | 36,74 |
| 11 | Sójový párek | 72,53 |
| 12 | Tavenýr | 28,99 |
| 13 | Sójová omáčka | 4,75 |
| 14 | Cuisine | 11,10 |
| 15 | Oplatka | 46,62 |
| 16 | Věnečky žloutkové | 277,73 |
| 17 | Trubičky Alaska | 11,35 |
| 18 | Bezlepková tyčinka | 16,69 |
| 19 | Polomáčené sušenky | 33,57 |
| 20 | Křupky Baconchio | 38,55 |
| 21 | Burger žvýkačka | 4,06 |
| 22 | Křupky Cheetos | 13,00 |
| 23 | Perník s náplní | 4,99 |

| | | |
|----|---------------------------------|--------|
| 24 | Ovesná kaše | 82,16 |
| 25 | Sójový jitřičák | 54,26 |
| 26 | Tofu natural | 291,99 |
| 27 | Karbanátky tofu | 212,08 |
| 28 | RETRO Sójová tyčinka | 223,96 |
| 29 | Pomazánka tofu | 65,84 |
| 30 | Amunak sójový škvařík | 12,69 |
| 31 | Sojanéza | 17,80 |
| 32 | Miso | 10,00 |
| 33 | Cookies | 6,60 |
| 34 | Banánové sójové mléko | 13,61 |
| 35 | Tatarka sójová | 28,13 |
| 36 | Vajahit náhrada vajec | 40,71 |
| 37 | AO | 95,69 |
| 38 | ČOST | 186,92 |
| 39 | P1 | 235,22 |
| 40 | Extrudovaný sójový šrot | 64,03 |
| 41 | Smiley sticks – tyčinka pro psy | 40,36 |
| 42 | Peanut crunch bar | 14,93 |



Obrázek 4: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100bp marker (referenční materiál)

1: Margot

2: Sójový řez

3: Sójový špalek

4: Proteinová tyčinka

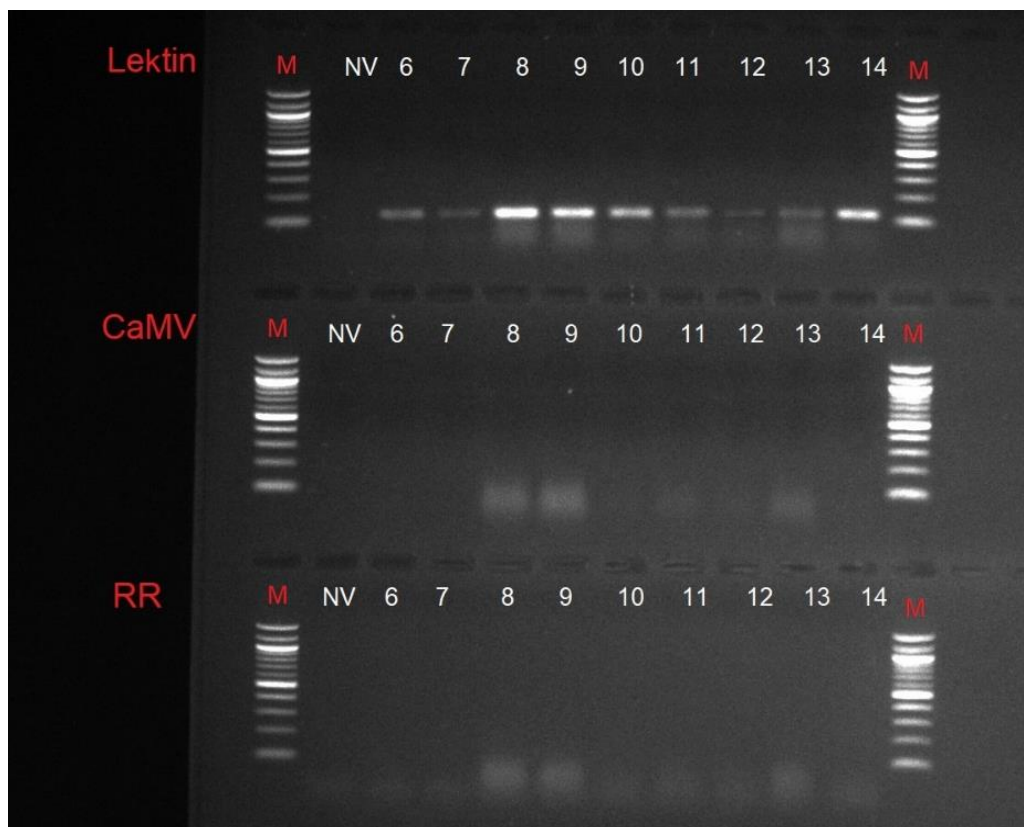
5: Krmivo pro kuřata

Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 4 byl v testovaných vzorcích DNA extrahované z Margot, Sójového řezu, Sójového špalku, Proteinové tyčinky a Krmiva pro kuřata potvrzen výskyt DNA sóji. Podle intenzity proužků jsem pravděpodobně nejúčinněji purifikovala DNA z Krmiva pro kuřata (vz. č. 5) a nejméně ze vzorků Margot a Sójový špalek (vz. č. 1 a 3). Výskyt promotoru CaMV byl potvrzen u vzorků DNA extrahované ze Krmiva pro kuřata (vz. č. 5). U tohoto vzorku byl také potvrzen výskyt transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup.



Obrázek 5: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100bp marker (referenční materiál)

NV: negativní vzorek (kontrolní vzorek bez DNA)

6: Sójové kostky

7: Sójové nudličky

8: ALA sójový dezert

9: ALPRO puding vanilkový

10: PATIFU sójová paštika

11: Sójový párek

12: Tavenýr

13: Sójová omáčka

14: Cuisine

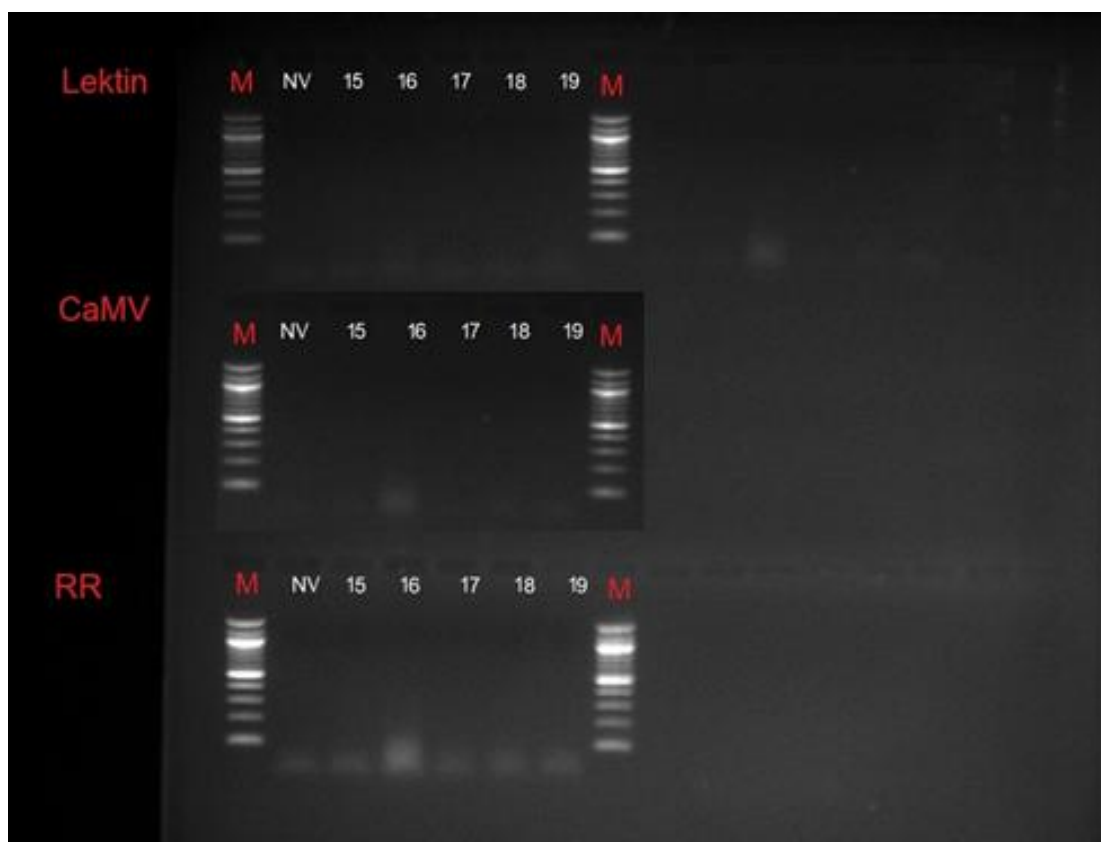
Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 5 byl v testovaných vzorcích DNA extrahované ze Sójových kostek, Sójových nudliček, ALA sójového dezertu, ALPRO pudingu vanilkového, PATIFU sójové paštiky, Sójového párku, Tavenýru, Sójové omáčky a Cuisine potvrzen výskyt DNA sóji. Podle intenzity proužků jsem pravděpodobně nejúčinněji purifikovala DNA z ALA sójového dezertu (vz. č. 8) a nejméně ze vzorků Sójové nudličky, Tavenýr a Sójová omáčka (vz č. 7, 12 a 13).

Výskyt promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup nebyl potvrzen u žádného ze vzorků extrahované DNA.



Obrázek 6: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100bp marker (referenční materiál)

NV: negativní vzorek (kontrolní vzorek bez DNA)

15: Oplatka

16: Věnečky žlutkové

17: Trubičky Alaska

18: Bezlepková tyčinka

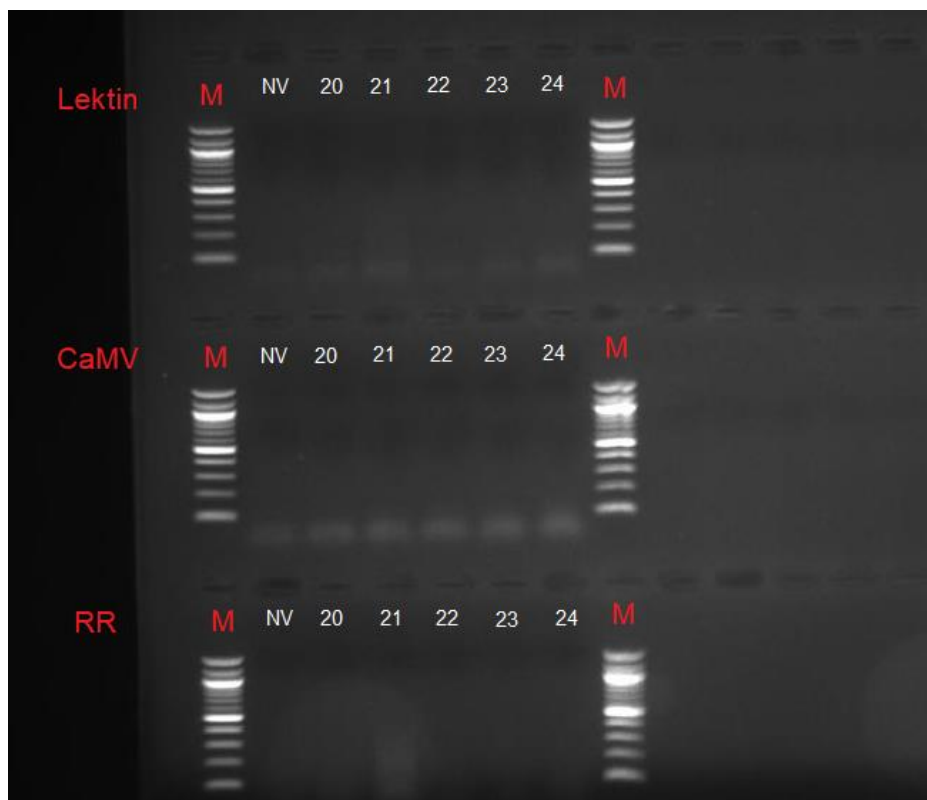
19: Polomáčené sušenky

Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 6 nebyl v testovaných vzorcích DNA extrahované z Oplatky, Věneček žlutkových, Trubiček Alaska, Bezlepkové tyčinky, Polomáčené sušenky potvrzen výskyt DNA sóji. Podle absence proužků se mi nepodařilo purifikovat DNA z žádných ze vzorků, proto ani výskyt promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup nebyl potvrzen u žádného ze vzorků extrahované DNA.



Obrázek 7: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100bp marker (referenční materiál)

NV: negativní vzorek (kontrolní vzorek bez DNA)

20: Křupky Baconchio

21: Burger žvýkačka

22: Křupky Cheetos

23: Perník s náplní

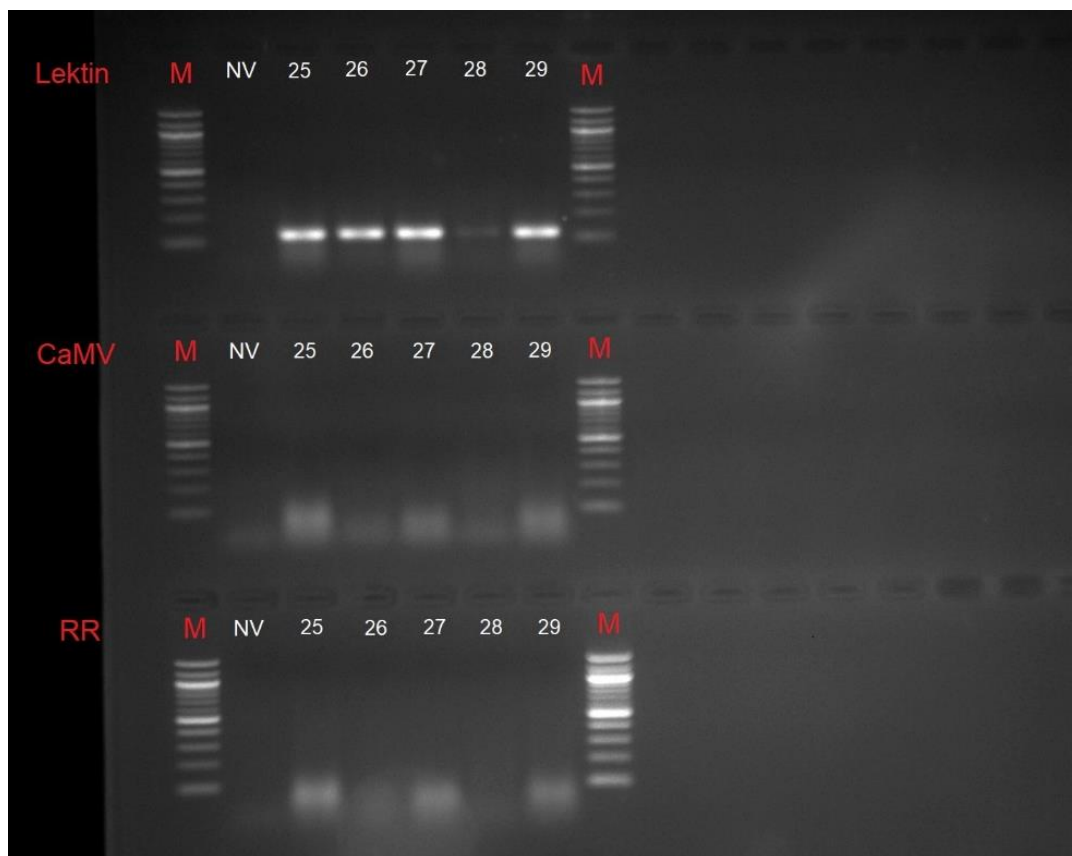
24: Ovesná kaše

Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 7 nebyl v testovaných vzorcích DNA extrahované z Křupek Baconchio, Burger žvýkačky, Křupek Cheetos, Perníku s náplní a Ovesné kaše potvrzen výskyt DNA sóji. Podle absence proužků se mi nepodařilo purifikovat DNA z žádných ze vzorků, proto ani výskyt promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup nebyl potvrzen u žádného ze vzorků extrahované DNA.



Obrázek 8: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100 bp marker (referenční materiál)

NV: negativní vzorek (kontrolní vzorek bez DNA)

25: Sójový jitrničák

26: Tofu natural

27: Karbanátky tofu

28: RETRO sójový tyčinka

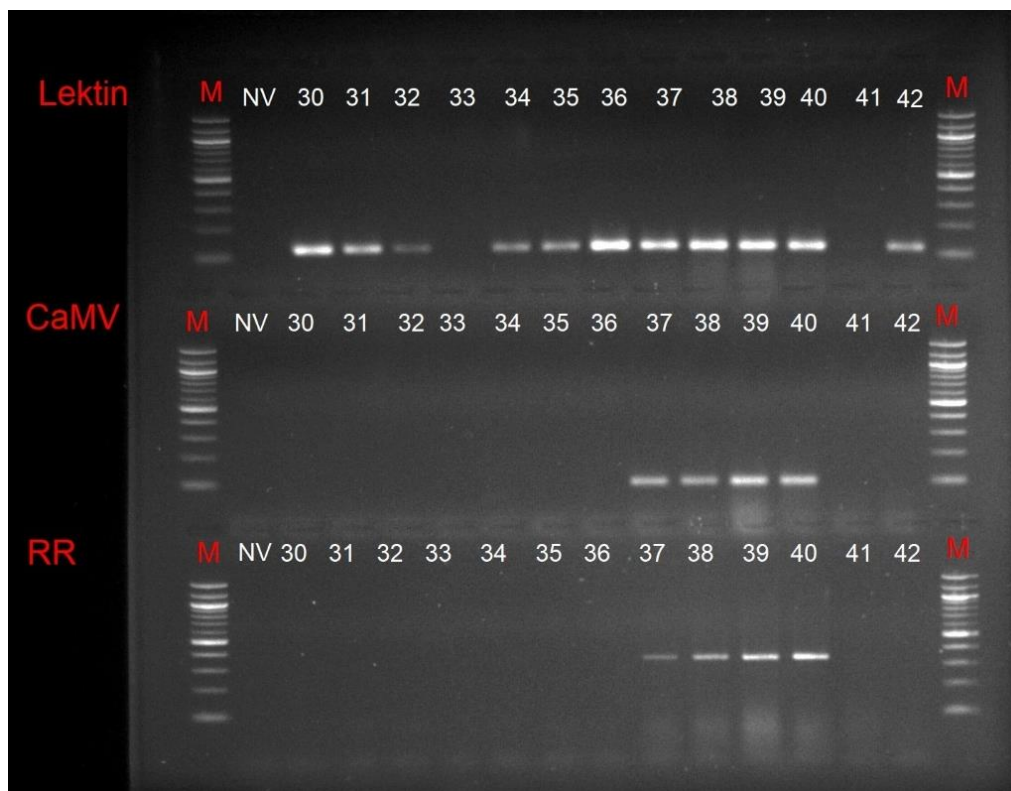
29: Pomazánka tofu

Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 8 byl v testovaných vzorcích DNA extrahované ze Sójového jitrničáku, Tofu natural, Karbanátků tofu, RETRO sójové tyčinky a Pomazánky tofu potvrzen výskyt DNA sóji. Podle intenzity proužků jsem pravděpodobně nejúčinněji purifikovala DNA ze Sójového jitrničáku, Tofu natural, Karbanátků tofu a Pomazánky tofu. (vz. č. 25, 26, 27 a 29) a nejméně ze vzorku RETRO sójová tyčinka (vz. č. 28). Výskyt promotoru CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup nebyl potvrzen u žádného ze vzorků extrahované DNA.



Obrázek 9: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu z PCR

M: 100 bp marker (referenční materiál)

NV: negativní vzorek (kontrolní vzorek bez DNA)

30: Amunak sójový škvařík

31: Sojanéza

32: Miso

33: Cookies

34: Banánové sójové mléko

35: Tatarka sójová

36: Vajahit náhrada vajec

37: AO

38: ČOS T

39: P1

40: Extrudovaný sójový šrot

41: Smiley sticks – tyčinka pro psy

42: Peanut crunch bar

Lektin: přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV: přítomnost promotoru viru mozaiky kvěťáku

RR: přítomnost transgenu pro odolnost k Roundupu ve vzorku

Podle elektroforeogramu na obr. 9 byl v testovaných vzorcích DNA extrahované z Amunak sójového škvaříku, Sojanézy, Miso, Banánového sójového mléka, Tatarky sójové, Vajahit náhrady vajec, AO, ČOS T, P1, Extrudovaného sójového šrotu a Peanut crunch bar (30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 a 42) potvrzen

výskyt DNA sóji. Podle intenzity proužků jsem pravděpodobně nejučinněji purifikovala DNA z Amunak sójového škvaříku, Vajahit náhrady vajec, AO, ČOS T, P1 a Extrudovaného sójového šrotu (vz. č. 30, 36, 37, 38, 39 a 40) a nejméně ze vzorku Miso (vz. č. 32). Žádné DNA se mi nepovedlo purifikovat ze vzorků Cookies a Smiley sticks – tyčinka pro psy. Výskyt promotoru CaMV byl potvrzen u vzorků DNA extrahované z AO, ČOS T, P1 a Extrudovaného sójového šrotu (vz. č. 37, 38, 39 a 40). U těchto vzorků byl také potvrzen výskyt transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup.

Další informace testovaných vzorků a výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Souhrn výsledků detekce GM sóji u všech testovaných vzorků

(+) : pozitivní

(-) : negativní

AO, ČOS T, P1: Kompletní krmiva pro selata

| Číslo vzorku | Název výrobku | Gen pro lektin | Gen pro CaMV | Gen pro RR |
|--------------|------------------------|----------------|--------------|------------|
| 1 | Margot | + | - | - |
| 2 | Sójový špalek | + | - | - |
| 3 | Sójové řezy | + | - | - |
| 4 | Proteinová tyčinka | + | - | - |
| 5 | Krmivo pro kuřata | + | + | + |
| 6 | Sójové kostky | + | - | - |
| 7 | Sójové nudličky | + | - | - |
| 8 | ALA Sójový dezert | + | - | - |
| 9 | ALPRO Puding vanilkový | + | - | - |
| 10 | PATIFU Sójová paštika | + | - | - |
| 11 | Sójový párek | + | - | - |
| 12 | Tavenýr | + | - | - |

| | | | | |
|----|-----------------------|---|---|---|
| 13 | Sójová omáčka | + | - | - |
| 14 | Cuisine | + | - | - |
| 15 | Oplatka | - | - | - |
| 16 | Věnečky žloutkové | - | - | - |
| 17 | Trubičky Alaska | - | - | - |
| 18 | Bezlepková tyčinka | - | - | - |
| 19 | Polomáčené sušenky | - | - | - |
| 20 | Křupky Baconchio | - | - | - |
| 21 | Burger žvýkačka | - | - | - |
| 22 | Křupky Cheetos | - | - | - |
| 23 | Perník s náplní | - | - | - |
| 24 | Ovesná kaše | - | - | - |
| 25 | Sójový jitrničák | + | - | - |
| 26 | Tofu natural | + | - | - |
| 27 | Karbanátky tofu | + | - | - |
| 28 | RETRO sójová tyčinka | + | - | - |
| 29 | Pomazánka tofu | + | - | - |
| 30 | Amunak sójový škvařík | + | - | - |
| 31 | Sojanéza | + | - | - |
| 32 | Miso | + | - | - |
| 33 | Cookies | - | - | - |
| 34 | Banánové sójové mléko | + | - | - |
| 35 | Tatarka sójová | + | - | - |

| | | | | |
|-----------|---------------------------------|---|---|---|
| 36 | Vajahit Náhrada vajec | + | - | - |
| 37 | AO | + | + | + |
| 38 | ČOST | + | + | + |
| 39 | P1 | + | + | + |
| 40 | Extrudovaný sójový šrot | + | + | + |
| 41 | Smiley sticks – tyčinka pro psy | - | - | - |
| 42 | Peanut crunch bar | + | - | - |

6. Diskuze

V posledních letech dostávají GM produkty velkou pozornost kvůli postupnému šíření (Wunderlich a Gatto, 2015) a obavám z negativního vlivu na zdraví člověka a životní prostředí, hlavně v EU. (Azevedo et al., 2003). Proto před tím, než jsou produkty uvedeny na trh, prochází přísnými kontrolami a testy (Broeders et al., 2012). Bylo vyvinuto několik metod pro detekci GMO v různých produktech. Většina potravin se velmi vysoce zpracovává nebo upravuje (vařením a ohřevem) a proteiny jsou tak denaturovány, k detekci jsou proto nevhodné proteomické metody. Naopak DNA je odolnější vůči působení vysoké teploty a stala se hlavním předmětem pro analýzu GM potravin pomocí metody PCR (LIU et al., 2005). Proto jsem ji použila i k mé analýze. Tato metoda je založena na amplifikaci určitých úseků DNA ve vzorku, probíhající v termocykleru (Snustad, 2009). Pro vizualizaci výsledků detekce se využívá gelová elektroforéza, kdy se DNA úseky separují podle velikosti a tvoří proužky, které jsou díky barvivu vidět pod UV světlem (Maheaswari, 2016).

Touto metodou jsem v rámci této bakalářské práce analyzovala celkem 42 vzorků potravin a krmiv obsahujících sóju na přítomnost DNA sóji v získaném vzorku genu pro lektin, čímž jsem potvrdila nebo vyvrátila přítomnost DNA sóji v získaném vzorku. Dále jsem detekovala přítomnost promotoru CaMV, který je často používán při transgenozí v nejčastějším transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup. Prvním krokem byla izolace DNA pomocí robota MagCore pro automatickou izolaci s kitem MagCore® Genomic DNA Tissue. Podle RBC Bioscience Corp. (2014) se s tímto přístrojem velmi jednoduše a rychle pracuje a je navíc efektivní. Automaticky čistí nukleové kyseliny ze široké škály typů vzorků. S předem naprogramovanými protokoly a magnetickými kuličkami na bázi perliček poskytuje konzistentní a stabilní purifikaci nukleových kyselin a je vhodný pro izolaci DNA z potravin a krmiv.

Koncentrace vyizolované DNA jednotlivých vzorků byla změřena na spektrofotometru BioSpecNano. Pohybovala se od 4,06-291,99 ng/μL, kdy nejnižší koncentraci 4,06 ng/μL měla DNA purifikovaná ze vzorku „Burger žvýkačka“ a nejvyšší 291,99 ng/μL měla DNA ze vzorku „Tofu natural“. Vzhledem k použití automatizované DNA izolace si myslím, že rozdíl v úspěšnosti izolace DNA závisela pravděpodobně na intenzitě úprav potravin, při kterých mohlo dojít k poškození DNA. Nejnižší koncentrace DNA právě ve vzorku získaném ze žvýkačky je podle mého názoru očekávatelná. Mnoho vědců izolovalo sóju z potravin pomocí metody CTAB, která je pracnější a je větší pravděpodobnost chybnosti než izolací robotem, kterou jsem zvolila u svých vzorků. Mandaci et al. (2014) při použití CTAB v porovnání s mými výsledky úspěšně amplifikovali fragmenty pro lektin sóji u všech vzorků. To

by mohlo být podle mě způsobeno buď spolehlivější izolací touto metodou, nebo vhodnějšími vzorky s obsahem sóji bez poškození DNA. Pacheco Coello et al. (2017) izolovali také úspěšně metodou CTAB, ale některé vzorky vykazovaly degradaci DNA, podle něho to způsobily obtížné odstranitelné kontaminující faktory, které inhibovaly extrakci DNA, nebo zpracování produktů, kde byla použita vysoká teplota, silná alkalická nebo kyselá činidla. Po dokončení PCR reakce a vizualizace výsledků byla většina mých vzorků (29) pozitivní na přítomnost genu sóji. I přesto, že u všech výrobků je na obalu uvedena přítomnost různých forem sóji kromě tyčinky pro psy, 13 vzorků bylo negativních. To může být s největší pravděpodobností, jak již bylo zmíněno, kvůli poškození DNA během úprav, špatné izolaci nebo s menší pravděpodobností nepřítomnosti sóji ve výrobku. Pacheco Coello et al. (2017) uvádí, že výroba potravinářských produktů ovlivňuje kvalitu a množství extrahované DNA. U jimiž testovaných vzorků extrahovaná DNA vykazovala nízkou koncentraci, a proto nemohla být viditelná na agarózovém gelu. LIU et al. (2005) došli ke zjištění, že k negativním výsledkům může také přispět nízká kvalita získané DNA a v důsledku toho selhání PCR, což může způsobit falešně negativní výsledky. Z tohoto důvodu je detekce genu pro lektin, tedy přítomnost sóji, považována také jako kontrola během PCR. Možným řešením by podle mě mohlo být zvýšení navážky vzorku pro izolaci a jeho zakoncentrování pomocí centrifugace před samotnou purifikací v přístroji. LIU et al. (2005) také ve své práci udávají, že většina potravin se zpracovává ohřevem nebo vařením a proteiny jsou tak denaturovány. Vhodnější je proto podle ní DNA než proteiny pro identifikaci GM potravin. Výsledky jejich analýz pokrmu tou-kan odhalují, že dostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci byla přítomna pouze v tou-kan bez dalšího zpracování a vařeného v sójové omáčce max 1 h. Tyto výsledky ukazují, že při delší době varu byla DNA zničena natolik, že pomocí PCR nebyly požadované fragmenty amplifikovány.

Intenzita zbarvení proužku separované DNA pod UV světlem na elektroforeogramu jsem myslela, že závisí mimo jiné na množství DNA přidané do reakce, tedy na koncentraci vzorků, a že nejintenzivněji zbarvené proužky budou u vzorků, u kterých byla vyizolována vyšší koncentrace DNA, ale z mých výsledků vyplývá, že to není pravidlem. Některé vzorky mohly mít menší intenzitu proužku kvůli nepřesnému pipetování, nebo u nich mohlo docházet k inhibici PCR reakce kvůli přítomnosti znečišťujících látek v těchto vzorcích. Ze všech mnou analyzovaných vzorků bylo 5 pozitivních na přítomnost sekvence odpovídající promotoru CaMV používaného k transgenozí a transgenů pro odolnost k herbicidu Roundup (Krmivo pro kuřata, AO, ČOS T, P1, Extrudovaný sójový šrot). Všechny tyto vzorky patří mezi GM krmiva pro zvířata, u kterých je povoleno používat produkty GMO a tato

skutečnost je u těchto výrobků řádně označena na obalu. Tato krmiva jsou v naprosté většině do EU dovážena. Z výsledků mnou provedených analýz také vyplývá, že všechny sójové potraviny v ČR jsou pečlivě kontrolovány a neobsahují GM sóju.

Podobnými detekcemi se zabývá i mnoho odborných publikací. Mandaci et al. (2014) provedli analýzu některých produktů potenciálně obsahujících GM sóju (sójová mouka, sójové maso, sójový krém, sójové výhonky, sójové mléko, sójová káva a tofu). Produkty byly nakupovány náhodně z trhů v tureckém Istanbulu. Turecko není sice součástí EU, ale je kandidátní zemí, proto zde platí stejná pravidla pro nakládání s GMO jako v EU. Ze vzorků Mandaci et al. (2014) extrahovali DNA metodou CTAB, která je pracnější a je větší pravděpodobnost vzniku lidské chyby než při izolaci robotem, kterou jsem zvolila u svých vzorků já. PCR amplifikace fragmentů pro sójový lektin potvrzující přítomnost DNA sóji ve vzorcích na rozdíl od mých výsledků úspěšně proběhla u všech vzorků testovaných v její práci. To mohlo být způsobeno buď spolehlivější purifikací DNA nebo výběrem vhodnějších vzorků s vyšším obsahem sóji bez poškození DNA. Autorka poté detekovala 35S promotor, tedy stejnou sekvenci, kterou jsem využila ve své práci i já a navíc NOS terminátorovou sekvenci, která je také součástí sekvence vložené do rostliny při transgenozí. Použitím dvou těchto sekvencí si autorka zvýšila pravděpodobnost zachycení GM sóji ve výrobcích. Považuji za vhodné v budoucnu využít detekci NOS terminátoru i při mých analýzách.

Meriç, et al. (2014) testovali 11 vzorků krmiv z Turecka. Stejně jako Mandaci et al. (2014) pomocí CTAB metody úspěšně extrahovali dostatečně kvalitní DNA ze všech těchto krmiv a zjistili, že je GM sója přítomna ve všech testovaných vzorcích. To odpovídá i mému zjištění, že v krmivech dostupných na českém trhu je obsažena geneticky modifikovaná sója.

7. Závěr

GM plodiny by mohly být velice užitečné pro lidstvo, neboť se díky nim může zvýšit úroda a snížit množství aplikovaných pesticidů. Bohužel, většina názorů na GMO rostliny a z nich získané potraviny je negativní a je mnoho předsudků ohledně negativního dopadu na zdraví, přestože k tomu není mnoho důkazů. V současné době je vyráběno mnoho potravin z geneticky modifikované sóji, jako je např. tofu a různé další náhražky masa, které jsou v některých zemích běžné, ale v EU je mnoho odpůrců, proto se GMO potraviny v Evropě přísně kontrolují a označují. Nejvíce používanou metodou pro detekci GMO je velice citlivá metoda PCR.

Cílem této bakalářské práce bylo provedení izolace DNA ze sójových výrobků a analýza genů pro promotor CaMV a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup pomocí metody PCR a následné elektroforézy. Na základě výsledků mnou provedených analýz jsem zjistila, že mezi sójovými výrobky prodávanými v České republice určenými k lidské konzumaci se nevyskytují výrobky obsahující GM sóju. Opačně je tomu tak u dovážených krmiv pro zvířata, jako jsou krmiva pro prasata nebo pro kuřata. Některé výrobky prošly tepelnými a dalšími úpravami, kdy byla DNA sóji degradována, a tak ji nebylo možné pomocí PCR detekovat.

8. Seznam použité literatury

AHMED, Farid E. *Detection of genetically modified organisms in foods*. TRENDS in Biotechnology. 2002, 215-222.

ALARAIDH, Ibrahim Abdullah. *PCR Based Detection of Genetically Modified Soy in Processed Foods Commercially Available in Saudi Arabia*. 2009.

ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 630 s. ISBN 80-902906-2-0.

ANKLAM, Elke, Ferruccio GADANI, Petra HEINZE, Hans PIJNENBURG a Guy VAN DEN EEDE. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology* [online]. 2002, **214**(1), 3-26 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1007/s002170100415. ISSN 1438-2377.

AZEVEDO, João Lúcio a Welington Luiz ARAUJO. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2003, **544**(2-3), 223-233 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2003.07.002. ISSN 13835742.

BARANYK, Petr. *Olejniny*. Praha: Profi Press, 2010, 206 s. ISBN 978-80-86726-38-0.

BAWA, A. S. a K. R. ANILAKUMAR. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(6), 1035-1046 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1007/s13197-012-0899-1. ISSN 0022-1155.

BEČKA, David a Lucie JOZEFYOVÁ. *Sborník z konference „Perspektivy sóji v ČR: Geneticky modifikovaná sója* [online]. Praha, 2005 [cit. 2019-04-11].

BONFINI, L., P. HEINZE, S. KAY a G. VAN DER ERDE. *Review of GMO detection and quantification techniques*. European Commission. Italy, 2001.

BRANDT, Peter. Overview of the current status of genetically modified plants in Europe as compared to the USA. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2003, **160**(7), 735-742 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1078/0176-1617-01031. ISSN 01761617.

BROEDERS, Sylvia R. M., Sigrid C. J. DE KEERSMAECKER a Nancy H. C. ROOSENS. How to Deal with the Upcoming Challenges in GMO Detection in Food and Feed. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2012, 1-11 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1155/2012/402418. ISSN 1110-7243.

BROOKES, Graham. Weed control changes and genetically modified herbicide tolerant crops in the USA 1996–2012. *GM Crops & Food* [online]. 2014, **5**(4), 321-332 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.4161/21645698.2014.958930. ISSN 2164-5698.

BUIATTI, M., P. CHRISTOU a G. PASTORE. The application of GMOs in agriculture and in food production for a better nutrition: two different scientific points of view. *Genes & Nutrition* [online]. 2013, **8**(3), 255-270 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1007/s12263-012-0316-4. ISSN 1555-8932.

BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011, 162 s. ISBN 9788070135327.

BYRDWELL, W. Craig, William E. NEFF a Gary R. LIST. Triacylglycerol Analysis of Potential Margarine Base Stocks by High-Performance Liquid Chromatography with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry and Flame Ionization Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(1), 446-457 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1021/jf0008801. ISSN 0021-8561.

CAHOON, Edgar B. Genetic Enhancement of Soybean Oil for Industrial Uses: Prospects and Challenges. *The Journal of Agrobiotechnology Management and Economics* [online]. 2003, **6**(1 & 2), 11-13 [cit. 2019-03-25].

CLARK, David P. *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. Amsterdam: Elsevier Science, c2005, 816 s. ISBN 0-12-175551-7.

CLARKE, Joseph D., Danny C. ALEXANDER, Dennis P. WARD, John A. RYALS, Matthew W. MITCHELL, Jacob E. WULFF a Lining GUO. Assessment of Genetically Modified Soybean in Relation to Natural Variation in the Soybean Seed Metabolome. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3**(1) [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1038/srep03082. ISSN 2045-2322.

CLIVE, James. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Briefs* [online]. Ithaca, NY, (43) [cit. 2019-04-11]. ISBN 978-1-892456-52-4.

CROWTHER, John R. *The ELISA Guidebook* [online]. 2. Totowa, NJ: Humana Press, 2009 [cit. 2019-04-11]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4. ISBN 978-1-60327-253-7.

CUHRA, Marek, Terje TRAAVIK, Mickaël DANDO, Raul PRIMICERIO, Daniel Ferreira HOLDERBAUM a Thomas BØHN. Glyphosate-Residues in Roundup-Ready Soybean Impair *Daphnia magna* Life-Cycle. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* [online]. 2015, **4**(1), 24-36 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.4236/jacen.2015.41003. ISSN 2325-7458.

CUHRA, Marek. Review of GMO safety assessment studies: glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. *Environmental Sciences Europe* [online]. 2015, **27**(1) [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1186/s12302-015-0052-7. ISSN 2190-4707.

CUSTERS, René. *Průvodce biotechnologiemi: biotechnologie v zemědělství a potravinářství*. Praha: Academia, 2006, 104 s. ISBN 80-200-1350-4.

ČERMÁKOVÁ, Marta. *Klinická biochemie*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013424-0.

DE LA RIVA, Gustavo A., Joel GONZÁLEZ-CABRERA, Roberto VAZQUEZ PADRON a Camilo AYRA-PARDO. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* [online]. Chile, 1998, **1**(3), 119-133 [cit. 2019-03-23]. ISSN 0717-3458.

DEEPAK, S., K. KOTTAPALLI, R. RAKWAL, G. OROS, K. RANGAPPA, H. IWAHASHI, Y. MASUO a G. AGRAWAL. *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes* [online]. 2007, **4**(8), 234-235 [cit. 2019-03-23].

DELWAIDE, Anne-Cécile, Lawton L. NALLEY, Bruce L. DIXON, Diana M. DANFORTH, Rodolfo M. NAYGA, Ellen J. VAN LOO, Wim VERBEKE a Hiroshi ESTEVE AGELET, Lidia, Paul R. ARMSTRONG, Jasper G. TALLADA a Charles R. HURBURGH. Differences between conventional and glyphosate tolerant soybeans and moisture effect in their discrimination by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(3), 1895-1901 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.087. ISSN 03088146.

EZURA. Revisiting GMOs: Are There Differences in European Consumers' Acceptance and Valuation for Cisgenically vs Transgenically Bred Rice?. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(5) [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0126060. ISSN 1932-6203.

DOLEŽAL, Petr. *Výživa zvířat a nauka o krmivech: (cvičení)*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, 292 s. ISBN 80-7157-786-3.

DOSTÁLOVÁ, Jana. *Význam sóje v lidské výživě: studie VTR*. Praha: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 1990, 52 s. Vědeckotechnický rozvoj v zemědělství.

DORAK, M. Tefik. Real-Time PCR Time PCR. *Gene-quantification* [online]. 2007 [cit. 2019-03-15].

DROBNÍK, Jaroslav, Josef HOLEC, Josef SOUKUP, et al. *GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY*. In: RUPRICH, Jiří. *Sborník přednášek ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze: Transgenní organizmy využívané jako potraviny*. 2006, s. 41-48.

DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* [online]. 2008, (1), 220-222 [cit. 2019-04-11].

EDBERG, S. C. Principles of nucleic acid hybridization and comparison with monoclonal antibody technology for the diagnosis of infectious diseases. *Yale J Biol Med.* [online]. 1985, **58**(5), 425–442 [cit. 2019-03-15].

ESPIÑOZA, C, R SCHLECHTER, D HERRERA, E TORRES, A SERRANO, C MEDINA a P ARCE-JOHNSON. Cisgenesis and Intragenesis: New tools For Improving Crops. *Biological Research* [online]. 2013, **46**(4), 323-331 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.4067/S0716-97602013000400003. ISSN 0716-9760.

HURBURGH. Differences between conventional and glyphosate tolerant soybeans and moisture effect in their discrimination by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(3), 1895-1901 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.087. ISSN 03088146.

FENG, Min, Steven SURYOPRABOWO, Hong TAO, Liqiang LIU, Qiankun ZHENG a Hua KUANG. Rapid detection of clonidine and its cross-reactivity with apraclonidine in pig urine using an immunochromatographic test strip. *Food and Agricultural Immunology* [online]. 2018, **29**(1), 821-832 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1080/09540105.2018.1460325. ISSN 0954-0105.

FRAITURE, Marie-Alice, Philippe HERMAN, Isabel TAVERNIERS, Marc DE LOOSE, Dieter DEFORCE a Nancy H. ROOSENS. Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions. *BioMed Research International* [online]. 2015, 1-22 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1155/2015/392872. ISSN 2314-6133.

FRIED, Harrison Gregory, Sruthi NARAYANAN, Benjamin FALLEN a Ricardo AROCA. Characterization of a soybean (*Glycine max* L. Merr.) germplasm collection for root traits. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(7) [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0200463. ISSN 1932-6203.

FRIDOVICH-KEIL, Judith L. a Julia M. DIAZ. *Genetically modified organism*. *Encyclopædia Britannica* [online]. 2018 [cit. 2019-04-10].

GÖTZOVÁ, Jitka. Geneticky modifikované potraviny a krmiva. *Ministerstvo zemědělství – Úřad pro potraviny* [online]. 2017 [cit. 2019-03-23].

GREEN, Jerry M. The benefits of herbicide-resistant crops. *Pest Management Science* [online]. 2012, **68**(10), 1323-1331 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1002/ps.3374. ISSN 1526498X.

GRIFFITHS, Kate, Lina PARTIS, David CROAN, Nicky WANG a Kerry R. EMSLIE. Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food. *Australian Government Analytical Laboratories: Research and Development Section* [online]. 2019 [cit. 2019-03-15].

HALFORD, Nigel G. *Genetically modified crops*. London: Imperial College Press, 2003, 124 s. ISBN 978-1860943539.

HOMRICH, M. S., B. WIEBKE-STROHM, R. L. WEBER a M. H. BODANESE-ZANETTINI. Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genet Mol Biol.* [online]. 2012, **35**(4), 998–1010 [cit. 2019-04-11].

HOUGHTON, Scott G. a Franklin R. COCKERILL. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery* [online]. 2006, **139**(1), 1-5 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.surg.2005.02.010. ISSN 00396060.

CHALAM, V. C. a R. K. KHETRAPAL. ELISA based detection of GMOs. *Ministry of Enviroment, Forest and Climate Change: Government of India* [online]. 2012 [cit. 2019-03-15].

JIN, Chunfen, Jyrki VIIDANOJA, Mingzhe LI, et al. Comparison of Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Field Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of Large Saturated Hydrocarbons. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, **88**(21), 10592-10598 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02789. ISSN 0003-2700.

KEALEY, D. a P. J. HAINES. *Analytical chemistry*. Oxford: BIOS, 2002. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.

KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.

KAMLE, Madhu, Pradeep KUMAR, Jayanta Kumar PATRA a Vivek K. BAJPAI. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods. 3 *Biotech* [online]. 2017, **7**(3) [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1007/s13205-017-0809-3. ISSN 2190-572X.

KÁŠ, J et al. *Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy: Vysoká škola chemicko-technologická*. Praha, 2004, 67 s. ISBN 80-86313-13-1.

KAŽMIERSKI, Tomáš, Zuzana DOUBKOVÁ, Slavomír RAKOUSKÝ, František KRAHULEC, Jaroslav PETR, et al. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika*. In: DOUBKOVÁ, Zuzana. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika: Geneticky modifikované organismy – využití ve světě a v České republice*. 2005, s. 14-17.

KAŽMIERSKI, Tomáš, Zuzana DOUBKOVÁ, Slavomír RAKOUSKÝ, František KRAHULEC, Jaroslav PETR, et al. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika*. In: ROUDNÁ, Milena. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika: Otázky kolem využívání geneticky modifikovaných organismů a mezinárodní pravidla*. 2005, s. 5-11.

KAŽMIERSKI, Tomáš, Zuzana DOUBKOVÁ, Slavomír RAKOUSKÝ, František KRAHULEC, Jaroslav PETR, et al. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika*. In: RAKOUSKÝ, Slavomír. *Genetické modifikace – možnosti jejich využití a rizika: Bezpečnost a zdravotní rizika geneticky modifikovaných plodin, potravin a krmiv z nich vyrobených*. 2005, s. 18-23.

KEMÉNYOVÁ, Zuzana. Usnadněte povolování GMO v Evropě, žádají čeští vědci. *Universitas: Magazín vysokých škol* [online]. 2019 [cit. 2019-04-11].

KEY, Suzie, Julian K-C MA a Pascal MW DRAKE. Genetically modified plants and human health. *Journal of the Royal Society of Medicine* [online]. 2008, **101**(6), 290-298 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1258/jrsm.2008.070372. ISSN 0141-0768.

KINNEY, ANTHONY J. DEVELOPMENT OF GENETICALLY ENGINEERED SOYBEAN OILS FOR FOOD APPLICATIONS. *Journal of Food Lipids* [online]. 1996, **3**(4), 273-292 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1111/j.1745-4522.1996.tb00074.x. ISSN 1065-7258.

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava: P. Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902155-0-5.

KÚDELA, Václav, Leopold FUCIKOVSKY a Anton NOVACKY. *Rostlinolékařská bakteriologie*. Praha: Academia, 2002, 347 s. ISBN 80-200-0899-3.

LACK, Gideon. Clinical risk assessment of GM foods. *Toxicology Letters* [online]. 2002, **127**(1-3), 337-340 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/S0378-4274(01)00517-3. ISSN 03784274.

LADICS, Gregory S., Andrew BARTHOLOMAEUS, Phil BREGITZER, et al. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants. *Transgenic Research* [online]. 2015, **24**(4), 587-603 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1007/s11248-015-9867-7. ISSN 0962-8819.

LIEVENS, A., M. PETRILLO, M. QUERCI a A. PATAK. Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, **44**(2), 159-176 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.05.001. ISSN 09242244.

LIU, Yi-Ching, Shin-Huang LIN, Hsi-Mei LAI a Shih-Tong JENG. Detection of genetically modified soybean and its product tou-kan by polymerase chain reaction with dual pairs of DNA primers. *European Food Research and Technology* [online]. 2005, **221**(6), 725-730 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1007/s00217-005-0066-2. ISSN 1438-2377.

LUPPA, Peter B., Carolin MÜLLER, Alice SCHLICHTIGER a Harald SCHLEBUSCH. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(6), 887-898 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.trac.2011.01.019. ISSN 01659936.

MAHEASWARI, Rajendran, Jaishree Tukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2016 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.4103/0972-124X.176391. ISSN 0972-124X.

MALIK, Kausar, Haleema SADIA a Muhammad Hamza BASIT. Protein-Based Detection Methods for Genetically Modified Crops. ANSARI, Mahmood-ur-Rahman, ed. *Protein-Protein Interaction Assays* [online]. InTech, 2018, 2018-07-18 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.5772/intechopen.75520. ISBN 978-1-78923-390-2.

MANDACI, Merve, Özgür ÇAKIR, Neslihan TURGUT-KARA, Sinan MERİÇ a Şule ARI. Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market. *Food Science and Technology (Campinas)* [online]. 2014, **34**(4), 717-722 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1590/1678-457X.6441. ISSN 1678-457X.

MARKOULATOS, P., N. SIAFAKAS, A. PAPATHOMA, E. NERANTZIS, B. BETZIOS, V. DOURTOGLOU a M. MONCANY. Qualitative and Quantitative Detection of Protein and Genetic Traits in Genetically Modified Food. *Food Reviews International* [online]. 2004, **20**(3), 275-296 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1081/FRI-200029418. ISSN 8755-9129.

MARMIROLI, Nelson, Elena MAESTRI, Mariolina GULLÌ, Alessio MALCEVSCHI, Clelia PEANO, Roberta BORDONI a Gianluca DE BELLIS. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **392**(3), 369-384 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1007/s00216-008-2303-6. ISSN 1618-2642.

MERİÇ, S., O. ÇAKIR, N. TURGUT-KARA a S. ARI. *Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples* [online]. 2014, **13**(1), 160-168 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.4238/2014.February.25.2.

MEULENBERG, Eline P. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. *Toxins* [online]. 2012, **4**(4), 244-266 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.3390/toxins4040244. ISSN 2072-6651.

MEYER, R., F. CHARDONNENS. a J. LUTHY. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm Unters Forsch* [online]. 1996, **203**(4), 339-344 [cit. 2019-04-29].

MIRAGLIA, M., K. G. BERDAL, C. BRERA, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2004, **42**(7), 1157-1180 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.fct.2004.02.018. ISSN 02786915.

OVESNÁ, Jaroslava a Kateřina DEMNEROVÁ. SOUČASNÉ TRENDY VE STANOVENÍ GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ (GMO). *Chem. Listy* 108, 2014, 1024-1029.

OVESNÁ, Jaroslava, Ladislav KUČERA, Josef SOUKUP, Josef HOLEC, Marie Čeřovská, et al. *Pěstování geneticky modifikovaných plodin v ČR: Koexistence různých forem zemědělství*. In: OVESNÁ, Jaroslava. *Sborník přednášek ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze: Geneticky modifikované organismy a jejich možné uplatnění v rostlinné výrobě*. Praha: 2005, s. 3-13.

OVESNÁ, Jaroslava, Ladislav KUČERA, Josef SOUKUP, Josef HOLEC, Marie Čeřovská, et al. *Pěstování geneticky modifikovaných plodin v ČR: Koexistence různých forem zemědělství*. In: SOUKUP, Josef, Josef HOLEC a Marie ČEŘOVSKÁ. *Sborník přednášek ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze: Vybrané agroekologické aspekty pěstování transgenních plodin*. Praha: 2005, s. 25-33.

PADGETTE, S. R., K. H. KOLACZ, X. DELANNAY, et al. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. *Crop Science* [online]. 1995, **35**(5) [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.2135/cropsci1995.0011183X003500050032x. ISSN 0011-183X.

PACHECO COELLO, Ricardo, Jorge PESTANA JUSTO, Andrés FACTOS MENDOZA a Efrén SANTOS ORDOÑEZ. Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC Research Notes* [online]. 2017, **10**(1) [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1186/s13104-017-3083-x. ISSN 1756-0500.

POLČÁKOVÁ, Petra. GMO – Geneticky modifikované organismy. *Zprávy z MUNI* [online]. 2010 [cit. 2019-03-15].

PONCHEL, Frederique, Carmel TOOMES, Kieran BRANSFIELD, et al. *BMC Biotechnology* [online]. **3**(1) [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1186/1472-6750-3-18. ISSN 14726750.

PRADO, Jose Rafael, Gerrit SEGERS, Toni VOELKER, et al. Genetically Engineered Crops: From Idea to Product. *Annual Review of Plant Biology* [online].

2014, **65**(1), 769-790 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213040039. ISSN 1543-5008.

PRIGLOVÁ, M. a J. KÖNIG. Kvantitativní PCR (Q-PCR). *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* [online]. 2002, **11**(2), 82-86 [cit. 2019-04-27].

RBC Bioscience Corp. *MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor Overview* [online]. 2014 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: *MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor Overview* [online]. RBC BIOSCIENCE CORP. 2014 [cit. 2019-04-28].

ROY, Suvra a Vikash KUMAR. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research* [online]. 2014, **3**(8), 955-960 [cit. 2019-04-11]. ISSN 2319-7064.

ROTT, Michael E., Tracy S. LAWRENCE, Erika M. WALL a Margaret J. GREEN. Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(16), 5223-5232 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1021/jf030803g. ISSN 0021-8561.

ŘEHOŘOVÁ, Kateřina, Jitka VIKTROVÁ a Tomáš MACEK. Současná situace v oblasti užití geneticky modifikovaných rostlin. *Chem. Listy* [online]. Praha, 2017, (111), 307-313 [cit. 2019-03-15].

SALISU, Ibrahim B., Ahmad A. SHAHID, Amina YAQOOB, Qurban ALI, Kamran S. BAJWA, Abdul Q. RAO a Tayyab HUSNAIN. *Molecular Approaches for High Throughput Detection and Quantification of Genetically Modified Crops: A Review. Frontiers in Plant Science* [online]. 2017, 8 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.3389/fpls.2017.01670. ISSN 1664-462X.

SCHWEDT, Georg. *The essential guide to analytical chemistry*. New York: Wiley, c1997, 248 s. ISBN 04-719-7412-9.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

SUDHAKAR, D. Detection methods for GMOs/LMOs. *Ministry of Environment, Forest and Climate Change: Government of India* [online]. 2006 [cit. 2019-03-15].

SULTAN, Sheikh Mohammad, Nilamani DIKSHIT a Umesh J. VAIDYA. Oil content and fatty acid composition of soybean (*Glycine max* L.) genotypes evaluated under rainfed conditions of Kashmir Himalayas in India. *Journal of Applied and Natural Science* [online]. 2015, **7**(2), 910-915 [cit. 2019-04-11]. DOI:10.31018/jans.v7i2.706. ISSN 2231-5209.

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

ŠMARDA, Jan. *Rostlinné geneticky manipulované organismy (GMO) a naše výživa* [online]. 2016, 8-17 [cit. 2019-03-15].

SOWA, Sławomir. *Certified Reference Materials in GMO analysis. THAILAND-EUROPEAN UNION Policy Dialogues Support Facility* [online]. Poland, 2014 [cit. 2019-04-27].

STAVE, James W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. *Food Control* [online]. 1999, **10**(6), 367-374 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/S0956-7135(99)00077-8. ISSN 09567135.

ŠTEFANOVIČKOVÁ, Alena, Tomáš KUCHTA a Peter SIEKEL. Dôkaz geneticky modifikovanej sóje v potravinách polymerázovou reazovou reakciou. *Bulletin potravinárskeho výskumu* [online]. Bratislava, 2000, **39**(4), 255–264 [cit. 2019-03-15].

TAGLIABUE, Giovanni. The EU legislation on “GMOs” between nonsense and protectionism: An ongoing Schumpeterian chain of public choices. *GM Crops & Food* [online]. 2017, **8**(1), 57-73 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1080/21645698.2016.1270488. ISSN 2164-5698.

TAJADINI, Mohamadhasan, Mojtaba PANJEHPOUR a ShaghayeghHaghjooy JAVANMARD. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research* [online]. 2014, **3**(1) [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.4103/2277-9175.127998. ISSN 2277-9175.

TENGEL, C., P. SCHSSLER, E. SETZKE, J. BALLER a M. SPEEGER-HAUSSELS. PCR-based detection of genetically modified soyabean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Bio Techniques*[online]. 2001, 3, 426-429 [cit. 2019-04-29].

THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Genetic engineering. *Encyclopædia Britannica* [online]. 2019 [cit. 2019-03-15].

THOMISON, P. R. a M. M. LOUX. Commonly Used Methods for Detecting GMOs in Grain Crops. *Horticulture and Crop Science* [online]. 2001 [cit. 2019-04-15].

TRAPMANN, S., H. SCHIMMEL, G. N. KRAMER, G. VAN DEN EEDE a J. PAUWELS. *Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms*. [online]. 2002, **85**(3) [cit. 2019-04-11].

TRIPATHI, L. *Techniques for detecting genetically modified crops and products*. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* [online]. 2011, **4**(13) [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.4314/ajfand.v4i13.71830. ISSN 1684-5358.

TRNKOVÁ, Jana, Jaroslav HANÁK a Marie KŘÍSTKOVÁ. Organizace a kontrola pěstování GM plodin v ČR [online]. Praha, 2017, 2-12 [cit. 2019-04-11]. ISBN 978-80-7434-335-3.

TSATSAKIS, Aristidis M., Muhammad Amjad NAWAZ, Demetrios KOURETAS, et al. *Environmental impacts of genetically modified plants: A review*. *Environmental Research* [online]. 2017, 156, 818-833 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.envres.2017.03.011. ISSN 00139351.

URBANEK-KARŁOWSKA, B P., M. FONBERG-BROCZEK, D. SAWILSKA-RAUTENSTRAUCH, P. BADOWSKI a M. JEDRA. *Usefulness of an immunoassay test TRAIT for detection of genetically modified Roundup ready soybean in food products* [online]. 2001, **52**(4), 313-320 [cit. 2019-04-15].

VITORINO, Luciana C. a Layara A. BESSA. Technological Microbiology: Development and Applications. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00827. ISSN 1664-302X.

WIECZOREK, A. M a M. G. WRIGHT. History of Agricultural Biotechnology: How Crop Development has Evolved. *Nature Education Knowledge* [online]. 2012, **3**(10):9 [cit. 2019-03-15].

WOLF, Christian a Jürg LÜTHY. Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Science* [online]. 2001, **57**(2), 161-168 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/S0309-1740(00)00088-7. ISSN 03091740.

WU, Honghong, Yu ZHANG, Changqing ZHU, Xiao XIAO, Xinghu ZHOU, Sheng XU, Wenbiao SHEN a Ming HUANG. Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(2), 1919-1932 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.3390/ijms13021919. ISSN 1422-0067.

WUNDERLICH, Shahla a Kelsey A GATTO. Consumer Perception of Genetically Modified Organisms and Sources of Information. *Advances in Nutrition* [online]. 2015, **6**(6), 842-851 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.3945/an.115.008870. ISSN 2156-5376.

YANG, Ping-Chang a Tahrin MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **4**(9), 429-434 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.4103/1947-2714.100998. ISSN 1947-2714.

YE, X. Engineering the Provitamin A (-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science* [online]. 2000, **287**(5451), 303-305 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1126/science.287.5451.303. ISSN 00368075.

ZDEŇKOVÁ, Kamila. *Detekce geneticky modifikovaných organizmů v potravinách a potravinářských surovinách*. 2006.