



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Detekce GMO v potravinách a krmivech pomocí
PCR**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Dominika Škrnová

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Detekce GMO v potravinách a krmivech pomocí PCR“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 6. 2020

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady, trpělivost a připomínky při psaní bakalářské práce. Ráda bych na tomto místě také poděkovala své rodině za podporu a motivaci během psaní této práce.

Název bakalářské práce v českém jazyce

Abstrakt

Geneticky modifikované organismy (GMO) se v mnoha zemích staly kontroverzním tématem, protože jejich přínosy pro výrobce potravin i pro spotřebitele jsou spojeny s potenciálními biomedicínskými riziky a vedlejšími účinky na životní prostředí. V této práci se snažím shrnout aktuální poznatky o geneticky modifikovaných (GM) plodinách a představit různé metody detekce GMO v potravinách a krmivech. V praktické části této práce bylo z různých zdrojů náhodně odebráno třicet vzorků potravin a krmiv obsahujících kukuřici. Cílem mé práce bylo tyto vzorky otestovat na přítomnost GMO, ověřit údaje uvedené na jejich obalech a zjistit, zda jsou v souladu s legislativou EU, která požaduje označování produktů obsahujících více než 0,9% GM materiálu. Dalším cílem byla optimalizace metody izolace DNA z testovaných vzorků. Pro izolaci genomové DNA ze vzorků jsem použila NucleoSpin[®] Food Kit a automatický izolátor nukleových kyselin MagCore[®]. Koncentrace extrahované DNA byla změřena za využití absorbce UV světla pomocí spektrofotometru BioSpec-nano. Gen pro zásobní protein kukuřice zein byl použit k potvrzení přítomnosti amplifikovatelné kukuřičné DNA. Po extrakci DNA následovalo provedení PCR používající různé sady primerů k detekci čtyř různých GM odrůd kukuřice: Bt11, Bt176, Mon810 a T25. Elektroforéza na agarózovém gelu byla použita k separaci DNA fragmentů, které byly následně vizualizovány za použití manuálního gelového dokumentačního systému InGenius. Navzdory současným nařízením, ani jeden ze tří pozitivních vzorků, u kterých byla prokázána přítomnost kukuřice MON810, neměl na svém obalu označení. U vzorků, které měly na obalu uvedeno „GMO free“, skutečně nebyla prokázána přítomnost ani jedné z vyšetřovaných GM odrůd kukuřice.

Klíčová slova

GMO; GM plodiny; detekce GMO; genetické inženýrství; transgenní; PCR

Název bakalářské práce v anglickém jazyce

Abstract

The term “genetically modified organism (GMO)” has become a controversial topic in many countries as its benefits for both food producers and consumers are accompanied by potential biomedical risks and environmental side effects. In this thesis, I attempt to summarize up-to-date knowledge about genetically modified (GM) crops. I also introduce different methods for detecting GMOs in food and feed. In the practical part of this thesis, thirty food and feed samples containing maize were randomly collected from different sources. The aim of this study was to test these samples for the presence of GMO, verify the information given on the label, and check that it complies with the EU legislation requiring that any food or feed containing more than 0.9% GM content has to be labeled. The next aim was to optimize the method for DNA extraction from the tested samples. In order to isolate genomic DNA from the samples, I used the NucleoSpin[®] Food kit and the MagCore[®] Automated Nucleic Acid Extractor. The concentration of extracted DNA was evaluated by ultraviolet (UV) absorption using a BioSpec-nano spectrophotometer. The gene coding for the zein storage protein of maize was used to confirm the presence of amplifiable maize DNA. DNA extraction was followed by PCR protocols using different sets of primers to detect four maize events: Bt11, Bt176, Mon810, and T25. Agarose gel electrophoresis was used for the separation of DNA fragments that were subsequently visualized using InGenius manual gel documentation system. In spite of the current regulations, none of the three samples tested positive for the presence of MON810 maize had any such indication on their label. The samples that claimed to be "GMO free" on their label actually did not show the presence of any of the GM maize events tested.

Keywords

GMO; GM crops; GMO detection; genetic engineering; transgenic; PCR

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část	8
2.1 <i>Geneticky modifikované organismy</i>	8
2.1.1 Biotechnologie v zemědělství	8
2.1.2 Co se označuje jako GMO?	9
2.1.3 Historie úpravy plodin	11
2.1.4 Výroba GM plodin.....	12
2.1.5 Kontroverze týkající se GMO.....	15
2.1.6 Legislativa.....	16
2.1.7 Budoucnost GM technologie	17
2.2 <i>Metody detekce GMO v potravinách a krmivech</i>	18
2.2.1 Testovací metody založené na detekci DNA	18
2.2.2 Testovací metody založené na detekci RNA	21
2.2.3 Testovací metody založené na detekci proteinu	22
2.2.4 Jiné metody	25
3. Cíle práce	27
4. Materiál a metody	28
4.1 <i>Vzorky</i>	28
4.2 <i>Izolace DNA</i>	29
4.2.1 Manuální izolace DNA	29
4.2.2 Automatická izolace DNA.....	31
4.3 <i>Měření koncentrace DNA</i>	32
4.4 <i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	32
4.4.1 Příprava vzorku pro PCR.....	32
4.4.2 Primery použité pro PCR.....	33
4.5 <i>Elektroforéza na agarózovém gelu</i>	34
5. Výsledky	36
6. Diskuze	50
7. Závěr	53
8. Seznam literatury	54
9. Seznam obrázků.....	64
10. Seznam zkratk.....	66

1. Úvod

Konvenční techniky genetického inženýrství vytvářejí modifikace v genomu stabilní integrací DNA elementů, které se v původním genomu nevyskytovaly. Takto upravený organismus nabude nových charakteristik, které by za normálních okolností neměl. V zemědělství se většinou jedná o získání herbicidní tolerance a rezistence vůči hmyzu, snížení kazivosti a upravení nutričního složení. V posledních letech jsou potraviny a krmiva produkovaná technologiemi genetického inženýrství umisťována na světový trh. Schválení těchto technologií se v každé zemi může lišit na základě obchodních zájmů a toho, co lidé potřebují a vyžadují. Aspekty biologické bezpečnosti, regulace a označování geneticky upravených potravin jsou kontroverzním tématem ve většině zemí. Evropská unie se při nakládání s geneticky modifikovanými organismy (GMO) a jejich produkty řídí pravidlem předběžné opatrnosti a reguluje používání GMO v potravinách a krmivech přísněji než například USA. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 vyžaduje označení potravinových produktů obsahujících více než 0,9% autorizovaného GM materiálu. Aby mohla být zajištěna sledovatelnost a kontrola GMO v potravinářském průmyslu, je nutné znát metody, které umožní GM plodiny detekovat, identifikovat a případně kvantifikovat. Během posledních let bylo vyvinuto několik analytických metod, které se k monitorování přítomnosti GMO využívají. Nejpoužívanější z nich je polymerázová řetězová reakce (PCR), jeden z nejdůležitějších vynálezů v molekulární biologii.

2. Teoretická část

2.1 *Geneticky modifikované organismy*

Tato kapitola shrnuje aktuální poznatky o GM plodinách. Krátce popisuje biotechnologie používané v zemědělství, definuje, co se označuje jako GMO, shrnuje historii úpravy plodin, výrobu, kontroverzi i legislativu týkající se GMO. V závěru nahlíží do budoucnosti GM technologií.

2.1.1 **Biotechnologie v zemědělství**

Po staletí zemědělci experimentovali s úpravou rostlin tak, aby získali plodiny, které by byly větší a odolnější vůči chorobám a škůdcům. V současné době vědci vědí, který konkrétní gen rostliny či jiného organismu odpovídá za určitý znak a jsou schopni tento gen izolovat a přenést ho do šlechtěné rostliny. Tento proces nazýváme transgenoze rostlin. Transgenní rostliny, tedy rostliny vzniklé přenosem genu, se též nazývají jako geneticky modifikované (Custers, 2006).

První experimenty na potravinářských plodinách, které byly geneticky upravené za použití technologie rekombinantní DNA, začaly v roce 1987. Rajče Flavr Savr od společnosti Calgene se v roce 1994 stalo po letech rozsáhlého testování dopadů na zdraví a životní prostředí první GMO plodinou schválenou ke komerční produkci. Toto rajče bylo modifikováno tak, že obsahovalo DNA sekvenci, která inhibovala produkci rajčatového enzymu polygalakturonázy, který hraje podstatnou roli při měknutí ovoce. Prodloužila se tak doba, po kterou rajče vypadalo hezky, bylo prodejné a poživatelné (Bruening et al., 2000).

Kromě vytvoření jídla hezkého na pohled se vědcům podařilo vyvinout plodiny, které se snadněji pěstovaly. V roce 1995 došlo ke schválení první plodiny produkující pesticidy (Mahgoub, 2016). O rok později byla schválena Bt-kukuřice, která obsahuje gen z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* a produkuje proteiny s insekticidním účinkem. V současné době je většina pěstované kukuřice v USA právě Bt (Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S.: Recent Trends in GE Adoption, 2019).

Dále byly plodiny geneticky upraveny tak, aby odolaly herbicidům. Farmáři tedy mohli používat herbicidní postřiky, aniž by se museli bát, že si poškodí úrodu. Asi nejznámější plodiny odolné vůči herbicidům jsou glyfosát rezistentní – Roundup-Ready

rostliny. První glyfosát rezistentní plodinou byla transgenní sója, vyrobená v roce 1996 společností Monsanto (Dill, 2005).

Výjimkou nejsou ani plodiny, které byly geneticky modifikovány za účelem zvýšení nutriční hodnoty. Vitamin A má důležitý význam pro naše oči a nelze opomenout ani jeho podstatnou funkci při ovlivňování růstu, reprodukce, buněčné diferenciace a proliferace a integrity imunitního systému. Následkem deficiencie vitamínu A ročně oslepne 1/2 milionu dětí, z nichž 2/3 předčasně zemřou (Müllerová et al., 2014). Proto byla vyvinuta GM zlatá rýže, která měla za cíl s touto deficiencí bojovat (Tang et al., 2009).

2.1.2 Co se označuje jako GMO?

Definování toho, co v kontextu rostlinných biotechnologií znamená „geneticky modifikovaný“, není tak jednoduché, jak by se mohlo na první pohled zdát. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/18/ES udává, že geneticky modifikovaným organismem je organismus, s výjimkou lidských bytostí, jehož genetický materiál byl změněn způsobem, kterého přirozenou cestou dosáhnout nelze. Potíž je v tom, že i některé techniky používané v „tradičním“ šlechtění rostlin a moderní genomice produkují genetické změny, ke kterým by přirozeně nedošlo. Například radiační a chemická mutageneze vytvoří v rostlině tisíce mutací. Produkty těchto metod jsou sice podle definice výše uvedené směrnice považovány za GMO, ale byla jim udělena výjimka. A to hlavně proto, že různé druhy plodin s uměle indukovanými mutacemi už byly rozšířené a používány po několik dekad, dávno předtím, než byla směrnice vůbec navržena (Halford, 2018). Například řepka olejka (*Brassica napus*) může být konzumována lidmi pouze díky tomu, že si v druhé polovině 20. století prošla intenzivním programem mutageneze, při kterém byly zredukovány hladiny jedovatých látek kyseliny erukové a glukosinolátů. K mutacím sice dochází i přirozenou cestou, ale ne v tak velké míře jako když jsou indukované chemickou nebo radiační mutagenezí (Halford, 2012).

Moderní techniky z oblasti genomiky rostlin v poslední době využívají diploidní linie k identifikaci lokusů kvantitativních znaků (QTL) a genetických markerů pro markery asistovanou selekci (MAS). Produkce diploidních linií zahrnuje křížení mezi druhy, které by se přirozeně nekřížily (např. pšenice a kukuřice), následované chemicky indukovaným zdvojnásobením počtu chromozómů haploidních embryí, ve kterých byly „cizí“ chromozomy eliminovány. Tato metoda také není velmi přírodní (Ren et al.,

2017). I tritikále, dnes již známá plodina s českým názvem žitovec, je hybrid pšenice a žita, který byl vytvořený v laboratoři. Nicméně ani tritikále, ani odrůdy dalších plodin vytvořené touto metodou nespádají pod legislativu EU, která se vztahuje na GM plodiny, a tudíž mohou být v EU uvedeny na trh, aniž by musely procházet bezpečnostními kontrolami a regulacemi, které se vztahují na GM plodiny (Evenson et al., 2006).

Definovat GM plodinu by mohlo například to, že obsahuje DNA z jiného sexuálně nekompatibilního rostlinného druhu. Na trhu existuje mnoho takových plodin. Například EPSPS gen používaný společností Monsanto k vytvoření glyfosát rezistentních plodin pochází z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Cry geny pocházející z bakterie *Bacillus thuringiensis* zase udělují rezistenci vůči hmyzu Bt plodinám. Tyto geny se nazývají transgeny a o organismu, který je přijímá, mluvíme jako o transgenním (Halford, 2018). Ale u genetických modifikací nemusí nutně docházet k přenosu DNA mezi druhy. Například v USA se na trhu nacházejí odrůdy brambor *Innate*[®] a *Innate*[®] Generation 2, které nesou několik znaků, které jim byly uděleny vloženými geny pocházejícími z brambory. Takto upravené brambory se nazývají cisgenní, nikoliv transgenní (Watson et al., 2016). O tom, zda by na cisgenní plodiny mělo být nahlíženo jinak než na plodiny transgenní, se stále vedou debaty. Pokud by se rozhodlo, že cisgenní plodiny nebudou podléhat regulacím, které se týkají GM plodin, vzbudilo by to otázku, jak blízce příbuzné by si měly rostlinné druhy být, aby se přenášený gen kvalifikoval jako cisgen, spíše než transgen (Schouten et al., 2006). Například gen způsobující rezistenci vůči plísni bramborové, *Rpi-vnt1.1*, který je obsažen v bramborách *Innate*[®] Generation 2, pochází z divoké brambory *Solanum venturii*. *Solanum venturii* je sice druh brambory, ale ne stejný jako kultivovaná brambora *Solanum tuberosum* (Foster et al., 2009). V současné době se o této problematice může pouze diskutovat, protože návrh toho, že by cisgenní plodiny neměly být regulovány stejně jako plodiny transgenní, byl již zamítnut (European Food Safety Authority, 2012). Ať už cisgenní či transgenní, gen je do hostitelského genomu zabudován pomocí DNA rekombinace. V přírodě se ale DNA rekombinuje neustále a proto přítomnost rekombinantní DNA sama o sobě nemůže sloužit jako definice GMO.

Vzhledem k výše uvedenému, Evropská komise nemůže použít vlastní oficiální definici GMO (organismus, jehož genetický materiál byl změněn způsobem, kterého se přirozenou cestou nedosáhne) při zvažování toho, zda by si nová odrůda plodiny měla projít stejným schvalovacím procesem jako GM plodiny, nebo definovat GMO jako

organismus obsahující cizí gen či rekombinantní DNA. Za důležitou se považuje metoda, která byla použita k vytvoření nové odrůdy plodiny, a která určí, zda budou plodina či její produkt označeny jako GMO (Halford, 2018).

2.1.3 Historie úpravy plodin

Mnoho lidí si myslí, že plodiny, které pěstujeme a jíme, jsou přirozené, ale není tomu tak. Většina pochází od šlechtitelů. K cílenému pěstování rostlin a jejich křížení začalo docházet cca před 10 tisíci lety, kdy člověk zjistil, že sázením semen rostlin do země získá vytouženou potravu, aniž by se musel stěhovat jinam. Postupem času člověk začal sázet pouze semena z nejsilnějších a nejproduktivnějších rostlin. Výběr nejlepších plodin se nazývá selekce. Správně provedenou selekcí získal šlechtitel silnější rostliny s vyšším výnosem (Custers, 2006). V přírodě také docházelo k samovolnému křížení místních rostlin s nově přivezenými. Kombinací různých variací DNA získávaly dosud známé rostliny nové žádoucí vlastnosti, ale i zvýšenou náchylnost k chorobám či škůdcům (Stratilová, 2016). Gregor Mendel, augustiniánský mnich z 19. století, je považován za otce moderní genetiky. Na základě experimentování s křížením hrachu (*Pisum sativum*) objevil a popsal zákony dědičnosti (Gautam, 2018). Přestože Mendel prokázal, že výběrem určitých druhů rostlin lze získat rostlinu o požadovaných vlastnostech, nebylo zatím možné vyvinout takovou plodinu, která by nezdělala i vlastnosti nežádoucí (Stratilová, 2016).

Navozování cílených dědičných změn se vědcům podařilo až s použitím genového inženýrství, které spočívá v přidávání nebo ubírání určitých úseků DNA. Dědičné vlastnosti všech organismů, to znamená i rostlin, jsou kódovány DNA. Pokud měníme DNA, měníme i znaky rostlin (Custers, 2006). Vznik technologií genetických modifikací lze vysledovat do roku 1944, kdy vědci zjistili, že DNA je nositelkou dědičné informace a byla odhalena její transformující aktivita (Passarge, 2018). O pár let později Watson a Crick objevili strukturu DNA a v roce 1958 dali vzniknout centrálnímu dogmatu, které popisuje cestu přenosu informací z DNA do mediátorové RNA (mRNA) za pomoci procesu zvaného transkripce, následovaného translací mRNA do proteinu. Od té doby se vědci snažili najít způsob, jak kontrolovat tok informací mezi nukleovými kyselinami a proteiny (Zhou, 2010). V roce 1973 Stanley N. Cohen a ostatní vědci vyvinuli technologii rekombinantní DNA, s jejíž pomocí vložili geny rezistence k antibiotikům do plazmidu bakterie *Escherichia coli*. Vytvořili tak první transgenní organismus (Berg et al., 2010). Biotechnologické firmy začaly této

technologie využívat a v roce 1985 transgenoze pronikla i do šlechtění rostlin. Genové inženýrství má oproti radiační mutagenезi tu výhodu, že je možné danou vlastnost pomocí genetické modifikace zacílit a zároveň nevznikají nežádoucí vlastnosti. Tabák (*Nicotiana*) s rezistencí k antibiotiku kanamycinu se v roce 1983 zapsal do historie jako první transgenní rostlina. První GM plodiny sice neměly vstup na trh jednoduchý, ale to vědce nezastavilo od vyvíjení nových technik šlechtění rostlin za pomoci manipulace s geny (Stratilová, 2016).

2.1.4 Výroba GM plodin

Jednoduše řečeno, geny jsou sekvence DNA, které obsahují nezbytné instrukce pro vytvoření fenotypových znaků, jako jsou například tvar semene či odolnost vůči specifickému škůdci (Lino et al., 2012). Instrukce obsažená v sekvenci nukleotidů určitého genu je převedena do biologické funkce proteinu skrze transkripci a translaci. Transkripce je proces, při kterém je informace obsažená v kódující sekvenci genu přepsána do jednořetězcové mRNA. Při translaci dochází k překladu informace (sekvence nukleotidů) v mRNA do sekvence aminokyselin, které tvoří protein (Passarge, 2018). Pro vytvoření GMO je zapotřebí donora, tedy organismu, ze kterého je žádoucí gen izolován, a hostitelského organismu, který se stane GMO za předpokladu, že gen, který přijímá, je přítomný a funkční ve všech jeho buňkách. Pokud jsou transformovány jen některé buňky, vznikne chimerický organismus, který má pouze omezené využití (Tourte, 2003). K přenosu genů do plodiny za účelem vytvoření GMO neboli transgenní plodiny se obvykle využívá proces o dvou krocích. Prvním krokem, který se nazývá transformace, je úspěšné vnesení genu do rostlinné buňky. Poté následuje regenerace transgenní rostliny ve tkáňové kultuře z transformovaných buněk. Přenášený gen, zvaný transgen, je většinou navržen tak, aby kontroloval kdy, a v jaké tkáni dojde k jeho expresi. Tím se zajistí optimalizace vlastností produktu a maximální přínos. Vnesení genu do rostlinné buňky je obvykle provedeno jedním ze dvou způsobů. Buď se jedná o přímý přenos DNA, nebo se nepřímo použije bakterie *Agrobacterium tumefaciens* jako prostředník (Oliver, 2014).

2.1.4.1 Konstrukce transgenu

Transformace rostliny vždy začíná konstrukcí transgenu. Ten vzniká tak, že se k izolovanému žádoucímu genu začlení promotor, tj. sekvence DNA, která umožňuje jeho přepis do RNA a proteinu. Přepis je ukončen díky terminátoru, který je do

konstruktů transgenů také začleněn. Konstrukt může obsahovat i jiné specifické úseky DNA jako například enhancery či silencers, které modulují expresi DNA. Správná konstrukce transgenů je klíčová pro úspěch produkce ideální transgenové linie (Low et al., 2018).

2.1.4.2 Přímý přenos DNA

Běžně používaná technika pro přímý přenos exogenní DNA je biolistická metoda (biolista = biologická balistika). Někdy se též můžeme setkat s termíny jako bombardování mikročásticemi či mikroprojektily. Tato metoda byla vyvinuta Johnem Sanfordem v pozdních osmdesátých letech. Ačkoliv se používané vybavení a mikroprojektily od doby svého vynalezení změnily, bombardování mikročásticemi stále funguje na stejném principu jako Sanfordovo původní genové dělo. Genové dělo (viz obrázek 1) za použití stlačeného helia vystřeluje mikročástice zlata či wolframu potažené DNA do tkáně rostliny. Vysoká rychlost umožní mikročásticím penetrovat buněčnou stěnu. Tímto způsobem mohou být transgeny transportovány do vnitřku rostlinné buňky, kde se oddělí od mikroprojektilu a integrují se do jaderného či plastidového genomu. (Taylor et al., 2002). Dalšími způsoby jak doručit DNA do rostlinných buněk jsou například elektroporace či mikroinjekce. Nicméně metoda bombardování mikročásticemi je více efektivní v přenášení velkých fragmentů DNA i celých chromozomů (Zhang et al., 2016).



Obrázek 1: Různé typy genových děl (Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf)

2.1.4.3 Nepřímý přenos DNA za použití bakterie jako prostředníka

Používání bakterie *Agrobacterium tumefaciens* otevřelo novou éru vnášení exogenní DNA do rostlinných buněk. Tato půdní bakterie z čeledi Rhizobiaceae má schopnost infikovat dvouděložné rostliny v místě jejich poranění a způsobovat u nich nemoc zvanou „crown gall“ (Yildiz et al., 2016) (viz obrázek 2). *A. tumefaciens* mění genom rostliny, čímž zapříčiní nejen proliferaci rostlinných buněk, ale také rostlině umožní produkovat modifikované aminokyseliny, které slouží jako zdroj potravy pro bakterii (Zhang et al., 2016). Schopnost měnit genom rostliny má tato bakterie díky tomu, že vlastní nádor indukující plazmid (Ti-plazmid). Ti-plazmid je malá kruhová molekula DNA, která má dva úseky nepostradatelné k indukci nádorů. Prvním úsekem je T-DNA, která vstupuje do rostlinných buněk, ale nenesení geny pro přenos a integraci. Úsek virulence, na rozdíl od prvního úseku, obsahuje geny nutné pro přenos T-DNA do rostlinných buněk. Vědci mohou využít *A. tumefaciens* jako vektor transgenů tak, že z T-DNA úseku Ti-plazmidu odstraní původní geny a nahradí je cílovými. Přenos DNA za použití *A. tumefaciens* je ve většině rostlinných druhů poměrně obtížný. Úspěch genetické transformace za použití této bakterie je limitovaný, vzhledem k tomu, že obranný mechanismus rostliny se aktivuje, když patogen zaútočí. Z tohoto důvodu se vědci snaží najít způsoby, jak zvýšit virulenci bakterie a účinnost transformace (Yildiz et al., 2016). Objevení Ti-plazmidů a porozumění mechanismům přenosu T-DNA byl začátkem upravování těchto plazmidů a měnění je na vektory využitelné v genomovém inženýrství rostlin. Rostliny upravené za pomoci *A. tumefaciens* byly komercializovány a jsou pěstovány po celém světě (Brenner et al., 2002).



Obrázek 2: „Crown gall“ v cukrové řepě způsobený divokým (onkogenním) kmenem *Agrobacteria* (Yildiz et al., 2016)

2.1.4.4 Regenerace rostlin z transformovaných buněk

Pod pojmem regenerace rostlin se rozumí fyziologická obnova, oprava nebo nahrazení rostlinné tkáně. Na rozdíl od živočichů, rostliny disponují vysokým stupněm vývojové plasticity, tedy mají schopnost velmi dobře se přizpůsobit okolnímu prostředí, a vykazují různé typy tkáňové nebo orgánové regenerace. Tuto regenerační kapacitu lze zvýšit exogenně dodávanými rostlinnými hormony *in vitro*, přičemž rovnováha mezi auxinem a cytokininem určuje to, jak se regenerované tkáně či orgány budou vyvíjet (Ikeuchi et al., 2016). Při přenosu DNA za účelem vytvoření transgenní rostliny se nové geny většinou dostanou jen do několika buněk, ale přitom jsou potřeba ve všech částech rostliny. Z tohoto důvodu se buňky obsahující transgeny musejí nechat vyvinout až do stadia celých rostlin. Díky svým regeneračním schopnostem, i nepatrný seříznutý kousek či jediná buňka mohou dát vznik celé rostlině. Takto vzniklá rostlina se nazývá transgenní. Ke zmnožení buněk až do stadia nové rostliny se využívá technika tkáňových kultur. Na umělých živných půdách se buňky postupně rozrůstají ve tkáň a nakonec v celou rostlinu (Custers, 2006).

2.1.5 Kontroverze týkající se GMO

Existuje mnoho kontroverzí týkajících se genetického inženýrství. V mnoha případech se diskutuje právě o GMO potravinách. Zatímco někteří lidé mají námitky, které pramení z náboženského přesvědčení, většina kritiků se spíše obává toho, jaký dopad může mít GMO na životní prostředí či zdraví lidí (Sears et al., 2001). Například článek vydaný v roce 1999 v časopise *Nature* tvrdí, že Bt kukuřice by mohla mít negativní vliv na populace motýlů. Podle autorů článku je problém v tom, že Bt toxin obsažený v pylu geneticky modifikované kukuřice se větrem roznese na ostatní rostliny rostoucí kolem kukuřičného pole. Pylem poprášené rostliny jsou potom zkonsumovány necílovými organismy, na které by Bt toxin neměl mít téměř žádný vliv. V laboratorních testech ale autoři článku došli k závěru, že larvy motýla monarchy stěhovavého (*Danaus plexippus*), živící se listy klejichy hedvábné poprášené pylem z Bt kukuřice, méně jedly, pomaleji rostly a vyskytla se u nich větší úmrtnost než u larev, které se krmily listy poprášenými nemodifikovaným pylem (Losey et al., 1999). Po publikaci tohoto článku se zvedla vlna odporu proti Bt kukuřici, ale následovala studie, která prokázala, že vliv této kukuřice na populaci monarchy stěhovavého je zanedbatelný (Sears et al., 2001).

Ačkoliv se o GMO potravinách stále aktivně debatuje a může se zdát, že zástup odpůrců GM technologie je nekončící, desítky let testování GM potravin a krmiv na laboratorních a hospodářských zvířatech ukázalo, že technologie použité k jejich výrobě není inherentně nebezpečná. Zatím nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky (Delaney et al., 2018). Tento závěr ale neodradil obchodníky od toho, aby vydělávali na strachu z GMO. Například Chipotle, restaurace nabízející „jídlo s integritou“, se v roce 2013 stala prvním velkým restauračním řetězcem, který zavedl označování GMO položek ve svém jídelníčku. Restaurace nezůstala jen u označování, ale postupně nahrazovala všechny své GMO potraviny (Bain et al., 2014). Na případech, jako je tento, jasně vidíme, že debaty o GM potravinách budou ještě nějakou dobu pokračovat.

2.1.6 Legislativa

S postupným nárůstem povědomí veřejnosti o existenci GM potravin, lidé začali vyžadovat jejich povinné označení. V současné době uzákonilo povinné označování GM potravin již 64 zemí. USA, největší producent GM plodin na světě, mezi nimi není, ačkoliv mnoho lidí za povinné označování v této zemi lobuje. Argumentují tím, že zákazník má právo si vybrat a při případných problémech by mělo být možné produkt zpětně dohledat. Oproti tomu existují tací, kteří s povinným označováním GM potravin nesouhlasí. Odpůrci argumentují tím, že uzákoněním povinného označování GM potravin by zbytečně klesla poptávka zákazníků po GM plodinách, což by zapříčinilo například vzrůst cen potravin (Marchant et al., 2014).

USA přistupuje k regulaci geneticky modifikovaných organismů a jejich produktů jinak než Evropa. V USA se regulace GM produktů řídí vlastnostmi produktů, nikoliv metodami, kterými byly produkty připraveny. Nakládání s GMO či jejich označování se v této zemi řídí předpisy, které se vztahují i na jiné potraviny nebo přísady do jídel. Oproti USA je Evropská unie obezřetnější a nakládání s GMO a jejich produkty se u nás řídí pravidlem předběžné opatrnosti. To znamená, že pokud není prokázána naprostá bezpečnost, je nutné počítat s tím, že může dojít ke vzniku nepříznivých následků, které by mohly mít negativní dopad na lidské zdraví či životní prostředí.

Nakládání s GMO a genetickými produkty je v Evropské unii upraveno nařízením ES 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech, které popisuje postup pro schvalování nových GM potravin a krmiv v EU, a kde je stanovena hranice tolerance pro povinné označování produktů GMO. Nařízení ES 1830/2003, o sledovatelnosti a označování GMO, se zaměřuje na systém sledovatelnosti a označování

GMO a jejich produktů v EU. V EU je možné legálně pěstovat pouze Bt kukuřici MON810, která je odolná proti zavíječi kukuřičnému. Potraviny či krmiva obsahující GMO, jehož podíl v jednotlivých složkách či jednosložkové potravíně je větší než 0,9%, musí mít na etiketě uvedeno: „Tento produkt obsahuje GMO“ (Stratilová, 2016).

2.1.7 Budoucnost GM technologie

GM technologie mají ohromný potenciál a existuje nepřeborné množství možností, jak by se daly využít. Využití, která jsou v současné době ve vývojových stádiích, zahrnují odolnost rostlin vůči chorobám a suchu, zrychlený růst u zvířat a strategie pro více efektivní farmaceutickou výrobu (Frequently Asked Questions on Genetically Modified Foods, 2014). S jistotou můžeme říci, že vývoj GM technologií postupuje nezastavitelně kupředu. Nedávno vědci objevili novou technologii zvanou CRISPR, která způsobila v molekulární biologii revoluci. Ještě před pár lety byla úprava DNA finančně i technicky náročná a za zásahy do DNA mohli vědci často vděčit spíše náhodě. Metoda CRISPR-Cas9 je jednoduchá a levná technologie, kterou může používat téměř každá laboratoř a která vědcům umožní rychle změnit DNA téměř každého organismu, včetně lidí. Tato metoda podle mnohých ovlivní celou společnost (Ledford, 2015). Základ této metody tvoří obrana bakterií vůči bakteriofágům, virům, které je napadají. Bakteriální buňka je schopná začlenit část DNA infikujícího bakteriofága do svého genomu a vytvořit tzv. Crispr lokus. Při opakované infekci bakterie využije informaci uloženou v Crispru a pomocí enzymu Cas9 v určitém místě rozštěpí DNA fága a ten následně zahyne. CRISPR-Cas9 se někdy označuje též jako molekulární nůžky, protože umí v genomu organismů najít konkrétní místo a tam DNA přerušit. DNA se po přerušení sice spojí, ale nedokonale, což vede ke vzniku mutací, které potom například vyřadí z funkce zasažený gen. Do tohoto systému lze vložit například další gen nebo regulační sekvenci, která po vložení do cílového místa upraví aktivitu určitého genu (Jinek et al., 2012).

Doposud byly konvenční šlechtitelské metody rostlin využívány k udržitelné produkci potravin na celém světě, ale hrozba klimatických změn spolu se stále se zvyšující globální populací vyžadují vývoj takových plodin, které jsou schopny růst ve více extrémních podmínkách a zároveň poskytnout zvýšenou úrodu a výživnější jídlo. Podle předpovědi Organizace spojených národů stoupne do roku 2050 počet obyvatel na devět miliard, a aby se všichni uživil, produkce potravin bude muset narůst o 70%. Šlechtitelé rostlin a genetické jsou pod neustálým tlakem, aby produkci potravin

udrželi a navyšovali. Bude zapotřebí inovativních přístupů, abychom byli schopni tento problém vyřešit, a genetické upravování našich plodin je jednou z potenciálních možností. Multidisciplinární přístup tradičního šlechtění rostlin, rostlinných biotechnologií a molekulární biologie by byl strategicky ideální pro vyvíjení nových vylepšených plodin s cílem nakrmit lidstvo (Al-Khayri, 2015).

2.2 Metody detekce GMO v potravinách a krmivech

GM plodiny jsou pěstovány po celém světě. V mnoha zemích ale jejich uvolňování na trh podléhá legislativním ustanovením. V praxi to znamená, že se na GM plodiny vztahují velmi přísná pravidla a regulace. Z toho plyne nutnost jejich sledovatelnosti. Aby mohla být zajištěna sledovatelnost a kontrola, je nutné znát metody, které umožní GM plodiny detekovat, identifikovat a případně kvantifikovat (Nazir et al., 2019). Metody detekce GMO vycházejí z principů jejich tvorby. GMO lze tedy identifikovat díky vnesené DNA, RNA, která se podle DNA transkribuje, a výslednému proteinu. Pro účely identifikace GMO lze také použít metodu stanovení změny specifických metabolitů (Li et al., 2017).

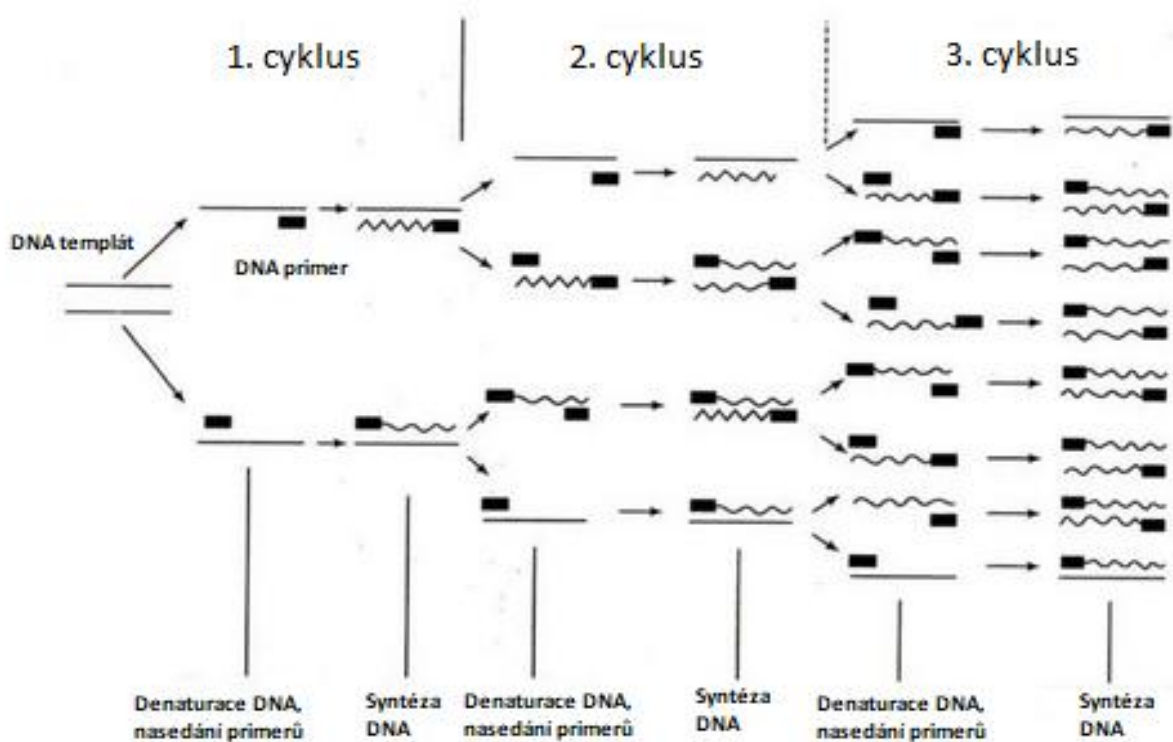
2.2.1 Testovací metody založené na detekci DNA

Metody založené na detekci DNA jsou nejvíce vhodné k detekci specifických sekvencí v genomu. Bez znalosti genové modifikace je použití těchto metod omezené (Grohmann et al., 2019). Existují tři hlavní typy metod založených na detekci DNA: polymerázová řetězová reakce (PCR), southern blotting a DNA microarray (Nazir et al., 2019).

PCR

PCR je jedním z nejdůležitějších vynálezů v molekulární biologii. Od doby svého vynalezení v polovině osmdesátých let dvacátého století se rychle stala rutinní metodou používanou v každé laboratoři molekulární biologie k identifikaci a manipulaci s genetickým materiálem (Chen et al., 2002). Běžně používané metody detekce GM plodin jsou založeny na PCR. Díky své univerzálnosti, citlivosti a specifitě je PCR preferovanou metodou například k identifikaci a kvantifikaci Bt genu. Aby bylo možné Bt gen detekovat, je nutné znát sekvence DNA použité v konstruktu transgenu. Mezi ně mohou patřit sekvence plazmidového vektoru, selekční markery, promotory a

terminátory (Kamle et al., 2013). PCR využívá biochemické procesy ke skenování DNA a lokalizaci GM sekvencí, které jsou nakonec zmnoženy (amplifikovány) miliardkrát (Strayer, 2002). Celý proces probíhá v několika cyklech, z nichž každý se skládá ze tří kroků: denaturace, nasedání primerů a syntéza DNA (viz obrázek 3). V prvním kroku probíhá denaturace, při které se dvoušroubovice DNA rozvolní a vzniknou dvě jednořetězcové molekuly DNA. Primery, krátké úseky jednořetězcové DNA, v druhém kroku identifikují začátek a konec GM sekvence a nasedají na ni. Třetí krok zahrnuje syntézu DNA. V místě, kde nasedly primery, se váže DNA polymeráza, díky které dochází k přirůstání vlákna DNA, které je komplementární k původní molekule DNA. Na konci prvního cyklu tedy vzniknou dvě identické kopie původní molekuly DNA. Cykly se obvykle opakují 40-50krát, což vede k exponenciální amplifikaci GM sekvence. Amplifikovaný transgen může být následně vizualizován za použití gelové elektroforézy (Nazir et al., 2019). PCR detekuje jakoukoli genetickou modifikaci i ve velmi malém množství a lze ji použít i k testování průmyslově zpracovaných potravin. Nevýhodou této metody je poměrně vysoká cena a časová náročnost (Strayer, 2002).



Obrázek 3: Princip PCR (Rastogi, 2010)

Southern blot

Další metodou založenou na detekci DNA, která slouží k identifikaci GM plodin je southern blot. Tato metoda byla popsána v roce 1975 Edwinem M. Southernem a v dnešní době se často používá k detekci specifických DNA fragmentů, které byly uměle vloženy do genomu transgenních plodin a jejich produktů (Nazir et al., 2019). Southern blot se skládá z pěti kroků. Prvním krokem je izolace a štěpení celkové DNA na fragmenty pomocí restričních enzymů. Dále probíhá elektroforetická separace fragmentů DNA na agarózovém gelu, po které následuje přenos a fixace DNA z gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu. Ve čtvrtém kroku je DNA přítomná na membráně hybridizována se značenou sondou, fragmentem DNA, který je komplementární k cílovému úseku nukleové kyseliny na membráně. Finální krok zahrnuje vizualizace sondy navázané k cílovému úseku DNA autoradiograficky nebo chemiluminiscenčně (kolorimetricky) (Lino et al., 2012). Southern blot je velmi spolehlivá metoda, která poskytuje důkaz o integraci transgenů. Díky této metodě lze také odhadnout počet kopií GM specifického úseku. Nicméně southern blot má i své nevýhody. K úspěšnému provedení analýzy je zapotřebí velkého množství DNA, které může být někdy obtížné získat (Nazir et al., 2019). Další nevýhodou této metody je vysoká cena, složité provedení, časová náročnost a komplikace spojené se zacházením s radioaktivními produkty, které vyžadují speciální manipulaci, skladování a likvidaci (Lino et al., 2012).

DNA čipy (microarrays)

Aby se minimalizoval čas potřebný k provedení analýzy a zredukovala se její cena, vědci byli odhodláni přijít s metodou, která by identifikovala či kvantifikovala GMO a zároveň by vyžadovala co nejmenší počet provedení PCR. Metoda DNA čipů má výhodu v tom, že umožňuje detekci až několik stovek tisíců různých úseků DNA najednou. Představuje tedy jednu z možností, jak urychlit DNA analýzu a snížit její ekonomickou nákladnost. DNA čipy, obvykle se jedná o sklíčka, mají na svém povrchu navázané specifické sondy, které hybridizují s komplementárními DNA sekvencemi v testovaném vzorku. Jelikož na jednom čipu může být imobilizováno několik různých sond, je možné provádět screening velkého množství cílů. Jsou používány dva různé přístupy. Před samotnou hybridizací na čipu dochází buď ke štěpení celkové DNA na fragmenty pomocí restričních enzymů, anebo jsou vybrané sekvence DNA

amplifikovány za použití PCR (von Götz, 2010). DNA v testovaném vzorku je označena fluorescenční značkou. Následně dochází k hybridizaci na čipu. Po promytí se provede detekce signálu, který je výsledkem hybridizace fluorescenčně značených DNA sekvencí ve vzorku se sondami na povrchu sklíčka (Kaliyappan et al., 2012).

2.2.2 Testovací metody založené na detekci RNA

Aby byla transgenní DNA efektivní a měla nějaký účinek na organismus, musí být přeložena do vznikajícího proteinu. Proces překladu neboli translace následuje po transkripci, při které je DNA přepsáno do messenger RNA (mRNA). Translace je považována za mezistupeň přenosu genetické informace do proteinu. Přítomnost mRNA je přímo spojená s genovou expresí. Metody molekulární biologie, které se používají k monitorování a studování genové exprese v GMO zahrnují např. kvantitativní real-time PCR či northern blotting. Tyto metody mohou být použity za účelem identifikace exprese transgenu v různých rostlinných tkáních a vývojových stádiích GMO (Nazir et al., 2019).

Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Různé typy PCR jsou v molekulární analýze transgenních odrůd používány za různými účely. Real-time PCR slouží k identifikaci GM odrůd a jejich produktů. Tato metoda se také používá ke kvantifikaci počtu kopií konkrétní cílové sekvence DNA, která byla vložena do transgenního organismu. Konvenční PCR metoda se od qPCR liší ve specifitě a citlivosti. Díky detekci emitované fluorescence lze qPCR monitorovat od prvního do posledního cyklu amplifikace. K emisi fluorescence dochází po navázání fluorescenčního substrátu na přítomnou DNA. Hladina detekované fluorescence odráží množství přítomné DNA, to znamená i množství výchozího templátu (Lino et al., 2012). K analýze genové exprese, kde je výchozím materiálem mRNA, je nutné použít metodu kvantitativní PCR reverzní transkripce (RT-qPCR). RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, a proto je potřeba ji nejprve přepsat do komplementární DNA (cDNA). cDNA je DNA, která je syntetizována podle RNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázy během procesu zvaného reverzní transkripce. Následuje použití DNA polymerázy, která z jednořetězcové cDNA vytvoří dvouřetězcovou DNA. Takto vytvořená DNA se následně využije jako templát pro reakci qPCR (Carter et al., 2015).

Northern blot

Northern blot je metoda velmi podobná southern blotu, která se používá k detekci RNA molekul ve vzorku, a která je šikovným nástrojem ke zkoumání genové exprese. Stejně jako southern blot, i tato metoda se skládá z pěti kroků: 1) izolace RNA, 2) elektroforetická separace RNA fragmentů na agarózovém gelu, 3) přenos a fixace RNA přítomné na gelu na nitrocelulózu či nylonovou membránu, 4) hybridizace RNA přítomné na membráně se sondou, 5) detekce pomocí autorografie (Lino et al., 2012). Jediným rozdílem je to, že se pracuje s mRNA a jako značená sonda slouží komplementární DNA (cDNA) (Nazir et al., 2019). Provádění experimentů s RNA typicky vyžaduje zvýšenou ochranu vzorku před degradací, protože RNA molekuly jsou mnohem méně stabilní než DNA a RNázy, enzymy degradující RNA, jsou všudypřítomné. (Carter et al., 2015).

2.2.3 Testovací metody založené na detekci proteinu

K identifikaci výsledného proteinu kódovaného vloženým transgenem lze využít imunochemické metody, které detekují GMO za pomoci monoklonálních či polyklonálních protilátek. Mezi tyto metody patří např. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) či western blot (Nazir et al., 2019). Kromě toho metody na bázi proteinu zahrnují použití hmotnostní spektrometrie jako nástroje, který umožní GM plodiny charakterizovat. Nicméně ačkoliv jsou testovací metody na bázi proteinu rychlé a jednoduché, mají také své nevýhody. Tyto metody se odvíjejí od úrovně exprese cílového proteinu, která je proměnlivá v závislosti na rostlinné tkáni a vývojovém stadiu rostliny. Proteiny jsou navíc po zpracování potravin vysoce degradované či denaturované. Jakákoliv modifikace v cílových proteinech by mohla pozměnit specifitu a citlivost prováděného testu. Navíc se tyto metody nedají použít, pokud genetická modifikace nemá žádný vliv na hladinu proteinu (Fraiture et al., 2015).

ELISA

Imunochemické metody jsou preferovaným způsobem detekce GM proteinů v transgenních rostlinách díky své citlivosti a nízké ceně. Mezi tyto metody se řadí i enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tento test poskytuje informaci o kvantitě proteinu v testovaných vzorcích. Imunochemické metody jsou založené na specifické vazbě mezi antigenem a protilátkou namířenou proti GM proteinu. Monoklonální protilátky (MAbs) jsou vysoce specifické a více citlivé. Existují dva

různé typy ELISA testu: kompetitivní a sendvičová (Kamle et al., 2019). Při sendvičovém provedení testu je specifický protein vychytáván ze vzorku protilátkou, která je navázána na dně jamky mikrotitrační destičky. Po promytí se do jamek přidá druhá protilátka značená enzymem, která slouží k detekci vychytaného proteinu. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který se přidá do reakční směsi, což se projeví zabarvením roztoku. Na rozdíl od kompetitivního ELISA testu, zabarvení roztoku u sendvičového typu ELISA je tím intenzivnější, čím je větší koncentrace proteinu. (Nazir et al., 2019). ELISA test byl úspěšně použitý k detekci proteinu kódovaného cp4-epsps genem v glyfosát rezistentní Roundup-Ready sóje. Monoklonální protilátky se také využívají k detekci Cry proteinů, které zajišťují odolnost k hmyzím škůdcům (Kamle et al., 2013). ELISA test je oproti strip testu více citlivý a zvládne detekovat proteiny i ve velmi nízkých koncentracích. Nicméně v porovnání se strip testem ELISA vyžaduje více času, vyškolený personál a dobré laboratorní vybavení (Nazir et al., 2019)

Imunochromatografický strip test

Běžně používaným testem založeným na protilátkách, který se používá ke screeningu GMO, je tzv. strip test, někdy též nazývaný lateral flow strip nebo dipstick test. Jedná se o polní variantu metody ELISA, která poskytuje informaci o přítomnosti či absenci specifických proteinů v testovaných vzorcích (Kamle et al., 2013). Strip testy jsou tenké plastové proužky pokryté nitrocelulózovou membránou. Na jednom konci tohoto proužku se nachází podložka, která slouží k aplikaci vzorku. Na druhém konci proužku je absorpční podložka, která urychluje tok membránou. Podložka sloužící k aplikaci vzorku se ponoří do roztoku homogenizovaného vzorku, který je třeba otestovat (Nazir et al., 2019). Roztok se poté pohybuje nitrocelulózovou membránou až k místům, která obsahují zlatem značené protilátky specifické pro exprimovaný GM protein. Pokud se konkrétní GM protein nachází ve vzorku, naváže se na tyto protilátky. Komplex protilátka-protein následně putuje membránou k testovací a kontrolní lince. Testovací linka obsahuje druhou protilátku, která je specifická pro testovaný GM protein. Když se zlatem značené protilátky vázající GM proteiny dostanou k této lince, komplex protilátka-protein se zachytí na druhé imobilizované protilátce a vytvoří „sandwich“, který se projeví zabarvením detekční zóny. Přebytečné zlatem značené protilátky jsou zachyceny na kontrolní lince, která se také zabarví. Pokud vzorek neobsahuje testovaný GM protein, zabarví se pouze kontrolní linka. Zabarvená kontrolní linka je důkazem správného průběhu reakce (Kamle et al., 2013). Strip test

poskytne výsledek během 5-15 minut, je levný a nevyžaduje žádné specifické vybavení či speciálně trénovaný personál (Nazir et al., 2019).

Western blot

Western blot je metoda, která umožňuje vědcům identifikovat specifické proteiny ve vzorcích GM plodin. K docílení tohoto úkolu je zapotřebí tří kroků. Prvním z nich je rozdělení směsi proteinů extrahovaných z rostlinných buněk na základě molekulární hmotnosti za použití elektroforézy. Separované proteiny jsou poté přeneseny na membránu. Posledním krokem je značení cílového proteinu primární a sekundární protilátkou za účelem jeho vizualizace (Yang et al., 2012). Pro separaci proteinů je nejčastěji využívána PAGE elektroforéza, tj. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Jelikož většina protilátek vyžaduje proteiny v jejich denaturované formě, je nutné vzorky před nanesením na gel připravit. Denaturace proteinů před provedením elektroforézy je docílena působením neiontového detergentu dodecylsírany sodného (SDS), který je součástí nanášecího pufru, a zahříváním směsi na 70-100 °C po dobu 5-10 minut. SDS kromě denaturace proteinů zajistí i to, že budou mít proteiny negativní náboj a při PAGE se v elektrickém poli budou pohybovat od záporného pólu ke kladnému (Hnasko et al., 2015). Při PAGE se proteiny separují na základě své molekulové hmotnosti. Malé proteiny cestují gelem směrem k anodě snadněji a rychleji než proteiny o velké molekulové hmotnosti. Následuje přenesení separovaných proteinů na membránu metodou elektroblotu. Membrána může být buď nitrocelulósová nebo vyrobená z polyvinyliden difluoridu (PVDF). Příslušný protein je na membráně detekován pomocí primární protilátky. Primární protilátka navázaná na protein je dále rozpoznávána sekundární protilátkou. Sekundární protilátka je obvykle značená enzymem umožňujícím vizualizaci, např. křenovou peroxidázou. Když je enzym vystavený substrátu, dojde k barevnému označení místa, kde se nachází cílový protein (Yang et al., 2012). V porovnání s ostatními testovacími metodami na bázi proteinu, western blot nepatří k nejjednodušším a umožňuje testovat pouze pár vzorků najednou. Z tohoto důvodu se k detekci GMO nepoužívá příliš často. Využití najde spíše pro výzkumné účely, kde se hodí k ověření výsledků generovaných jinou metodou testování (Nazir et al., 2019).

2.2.4 Jiné metody

Chromatografie

Termín chromatografie zahrnuje skupinu metod, které se využívají k analýze nebo separaci komplexních směsí. Směs látek je rozpuštěna v mobilní (pohyblivé) fázi, která proudí přes sloupec stacionární (nepohyblivé) fáze bez použití jakéhokoliv externího elektrického pole. Separace je založena na rozdílné afinitě jednotlivých složek směsi ke stacionární a mobilní fázi. Některé molekuly mají tendenci se pohybovat mobilní fází, zatímco jiné molekuly se více poutají ke stacionární fázi, a proto je jejich pohyblivost systémem pomalejší. Nakonec dojde k oddělení složek směsi a jednotlivé komponenty mohou být detekovány. Když je mobilní fáze v plynném stavu, chromatografická metoda je známá jako plynová chromatografie. Pokud je mobilní fáze ve stavu kapalném, metoda se nazývá kapalinová chromatografie (Mallik et al., 2016). Chromatografické metody mohou být využity například k monitorování změn v lipidových profilech GM plodin a jejich produktů. Plynová chromatografie spolu s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsou používány k určení autentičnosti rostlinných olejů stanovením diacylglycerolů a triacylglycerolů (Vucelić-Radović et al., 2019). Nicméně je nutné zdůraznit, že chromatografické metody lze použít pouze v tom případě, pokud došlo k významným změnám ve složení GM plodin a jejich produktů. Chromatografie patří ke kvalitativním metodám detekce spíše než ke kvantitativním (Anklam et al., 2002).

Blízká infračervená (NIR) spektroskopie

Metody založené na detekci DNA v transgenních rostlinách a jejich produktech jsou na rozdíl od jiných metod vysoce spolehlivé, ale jejich provedení je pracné, zdoluhavé, destruktivní a drahé. Oproti tomu NIR spektroskopie je časově nenáročná, levná, obvykle nevyžaduje žádnou úpravu vzorků a zkoumané vzorky nejsou analýzou nijak poškozeny. V oblasti identifikace GMO v potravinách a krmivech se jedná o poměrně mladou metodu (Alishahi et al., 2010). Infračervené záření je část elektromagnetického spektra s vlnovou délkou větší než viditelné světlo, ale menší než mikrovlnné záření. Rozsah vlnových délek pro blízkou infračervenou oblast (NIR) se pohybuje mezi 750-2500 nm (v přepočtu na vlnčet $13,400-4000\text{ cm}^{-1}$). Molekuly v analyzovaném vzorku absorbují části infračerveného záření z této oblasti, což dá za vznik NIR spektru, které zaznamenává změny ve vibračních a rotačně vibračních

pohybech molekul. Tento proces trvá několik sekund (Cozzolino, 2014). NIR spektra jsou tvořena vyššími harmonickými přechody (overtony) a kombinačními přechody. Většina těchto vibrací pochází z vazeb v organické hmotě, která tvoří potraviny a krmiva (C-H, O-H, S-H a N-H). NIR spektroskopie není schopná přímo rozpoznat změny ve struktuře DNA. Použití této metody je založeno na skutečnosti, že vzorky s různými spektrálními odezvami se liší ve fyzikálních a/nebo chemických vlastnostech. Změny ve fenotypu, které jsou následkem změn ve struktuře DNA, lze tedy pomocí NIR spektroskopie detekovat, protože se projeví jako změny ve výše zmíněných molekulárních vazbách. Nevýhodou je, že metodou NIR spektroskopie nelze provádět stanovení stopových látek (obvykle < 1 %) (Alishahi et al., 2010).

3. Cíle práce

Od poloviny 90. let 19. století, kdy byla schválena první GM plodina ke komerční produkci, význam GM plodin ohromujícím tempem vzrostl a plocha osetá těmito plodinami se několikanásobně zvětšila. EU přistupuje ke GM plodinám s vysokou mírou obezřetnosti a řídí se principem předběžné opatrnosti. Cílem této práce bylo ověřit údaje uvedené na obalech potravin a krmiv obsahujících kukuřici a zjistit, zda jsou v souladu s legislativou EU, která požaduje označování produktů obsahujících více než více než 0,9% GM materiálu. Dalšími cíli byla optimalizace metody izolace DNA z různých vzorků obsahujících kukuřici a PCR detekce transgenů.

4. Materiál a metody

4.1 Vzorky

Pro účely praktické části této bakalářské práce jsem si z běžně dostupných zdrojů opatřila třicet vzorků potravin a krmiv obsahujících kukuřici. Tyto vzorky jsem testovala na přítomnost GM materiálu. V tabulce 1 lze vidět, které produkty jsem k analýze použila. Do tabulky jsem ke každému vzorku zaznamenala i značku výrobku a uvedené informace o přítomnosti GMO na obalu. Testované vzorky jsem rozdělila do pěti sad pro přehlednější analýzu. Z každého vzorku jsem nejprve izolovala DNA, u které jsem také spektrofotometricky stanovila koncentraci. Následně jsem každou sadu testovala na přítomnost genu pro zein, podle kterého lze detekovat, zda vzorek vůbec obsahuje kukuřičnou DNA, a čtyř různých GM odrůd kukuřice: Bt11, Bt176, Mon810 a T25. Poslední fáze analýzy vzorků zahrnovala elektroforézu na agarózovém gelu a vizualizaci separovaných DNA fragmentů.

Tabulka 1: Testované potraviny a krmiva a informace o výrobcích

Testované potraviny a krmiva				
Sada	Vzorek	Produkt	Značka	Obsah GMO
1	1	Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované	Freshona	neuveďeno
	2	Křehké plátky kukuřičné se sýrem	Tesco	neuveďeno
	3	Kukuřičné Cornies se lněným semínkem	Racio	neuveďeno
	4	Pražená kukuřice s příchutí barbecue	Tesco	neuveďeno
	5	Corn Puffies Cream&Onion Flavour	L´Chefs	neuveďeno
	6	Celpo Fit nefritovaný snack slanina	Druid	neuveďeno
	7	Kukuřičné lupínky mořská sůl	Nový věk	neuveďeno
	8	Zlatá kukuřice	Bonduelle	neuveďeno
	9	Sladká kukuřice	Tesco	neuveďeno
2	10	Krupice kukuřičná	Probio	neuveďeno
	11	Kukuřičná mouka hladká	Druid	GMO free
	12	Kukuřičné placky	Vepy	neuveďeno
	13	Kukuřičné tyčky	Rej	neuveďeno
	14	Francouzská polévka	Maggi	neuveďeno
	15	Corn Flakes strouhanka	Bona Vita	neuveďeno

3	16	Krmivo pro hlodavce	Hobby Vit	neuveďeno
	17	Krmivo pro zahradní ptactvo	Vitakraft	neuveďeno
	18	Dentalife ťvťkací pochoutka pro psy	Purina	neuveďeno
	19	Lojovť koule pro venkovní ptactvo	Happy Food	neuveďeno
	20	Praťenť a solenť kukuřičnť zrna s chilli	Alesto	neuveďeno
	21	Kukuřice z pole u hřbitova - Ledenice	x	neuveďeno
	22	Krmivo pro baťanty	Osiva Boršov	neuveďeno
4	23	Krmivo pro hlodavce	Pet Royal	neuveďeno
	24	Jemný kukuřičný škrob v prášku	Amylon	neuveďeno
	25	Zeleninovť smťs na mťsle s kukuřicí	Dione	neuveďeno
	26	Mini Pizza ťunkovť s kukuřicí	Tesco	GMO free
	27	Hluboce zmraťenť smťs s kukuřicí	Vinica	neuveďeno
	28	Zeleninovť smťs hluboce zmrazenť	Nowaco	neuveďeno
	29	Kukuřice cukrovť pťedvařenť	Huercasa	neuveďeno
	30	Kompletní krmivo pro drobnť hlodavce	Fine Pet	neuveďeno

4.2 Izolace DNA

DNA se z danťho vzorku izoluje za pouťití kombinace chemickťho a fyzikťlního pťístupu. Izolace DNA je prvním a vťznamným krokem ke stanovení GMO v potravinťch a krmivech. Je tťeba zvolit postup, díky kterťmu se získť DNA v čistť formť. Bťhem celťho postupu jsem peĉlivť zachťzela se vzorky, abych zamezila kontaminaci jednoho vzorku stopami druhťho, napťříklad mikrokapťnkami DNA. Tyto mikrokapťnky by se mohly napťříklad uvolnit pťi pipetovťnání ĉi otevírání zkumavek. Kontaminaci jsem se snaťila zabťránit vyvarovťnáním se nevhodných pohybť a dotekť, ĉastým mťnťnáním rukavic a pouťíváním sterilního materiťlu. U vzorkť 1-4 jsem DNA izolovala manuťlnť i automaticky, abych byla schopnť metody mezi sebou porovnat, a urĉit, kterým zpťsobem mohu získat lépe izolovanou DNA. U zbylých sad jsem izolovala DNA pouze automaticky.

4.2.1 Manuťlní izolace DNA

Pro manuťlní izolaci DNA byl pouťit NucleoSpin® Food Kit, který slouťí k izolaci genomickť DNA z potravin a krmiv. DNA byla izolovťna podle manuťlu pťiloťenťho ke kitu. Jednotlivť kroky popsánť v manuťlu zahrnují homogenizaci vzorku, bunĉnou

lyzi, připravení podmínek vázání DNA, vázání DNA na silikagel, promývání a sušení a nakonec vymytí DNA – eluci. Jednotlivé kroky jsou popsány níže.

- 1) Pomocí vhodného nástroje jsem odebrala kousek vzorku a následně ho homogenizovala v porcelánové třecí misce s tloučkem. Lyzační pufr CF jsem předehřála na 65 °C. Do 2 ml sběrné zkumavky jsem navázila 200 mg zhomogenizovaného vzorku.
- 2) Ke vzorku ve sběrné zkumavce jsem přidala 550 µl předehřátého lyzačního pufru CF. Směs jsem důkladně vortexovala po dobu 15 s. Poté jsem do sběrné zkumavky přidala 10 µl proteinázy K a opět směs 2-3 s vortexovala. Následně jsem směs inkubovala 30 min při 65 °C. Aby se usadily buněčné zbytky, směs jsem centrifugovala po dobu 10 min ($>10\,000 \times g$).
- 3) Z kroku 2 jsem do nové mikrocentrifugační zkumavky převedla 300 µl čistého supernatantu. Dále jsem přidala 300 µl pufru C4 a 300 µl etanolu a směs vortexovala 30 s.
- 4) NucleoSpin® Food zkumavku jsem umístila do nové sběrné zkumavky, připipetovala 700 µl směsi z kroku 3 a zcentrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$. Proteklou tekutinu jsem vylila. Tento proces jsem zopakovala tak, že jsem do NucleoSpin® Food zkumavky připipetovala zbytek směsi z kroku 3, opět zcentrifugovala 10 min při $11\,000 \times g$ a proteklou tekutinu vylila.
- 5) První promytí: Do NucleoSpin® Food zkumavky jsem připipetovala 400 µl pufru CQW, a poté jsem ji zcentrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$. Proteklou tekutinu jsem vylila.
Druhé promytí: Do NucleoSpin® Food zkumavky jsem připipetovala 700 µl pufru C5, a poté jsem ji zcentrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$. Proteklou tekutinu jsem vylila.
Třetí promytí: Do NucleoSpin® Food zkumavky jsem připipetovala dalších 200 µl pufru C5, a poté jsem ji zcentrifugovala 2 min při $11\,000 \times g$, abych kompletně odstranila pufr C5.
- 6) Předehřála jsem eluční pufr CE na 70 °C. NucleoSpin® Food zkumavku jsem umístila do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a připipetovala 100 µl předehřátého elučního pufru CE. Inkubovala jsem 5 min při laboratorní teplotě

(18-25 °C), a poté jsem provedla centrifugaci 1 min při 11 000 x g, aby se uvolnila DNA.

4.2.2 Automatická izolace DNA

Pro tento typ izolace DNA jsem použila automatický izolátor nukleových kyselin MagCore[®] s komerčním kitem 401 MagCore[®] Genomic DNA Tissue Kit, který je určen k automatické extrakci celkové DNA (genomové, mitochondriální a virové). Kit obsahuje předem naplněnou kazetu s potřebnými reagensy, která se vkládá do izolátoru. Kazeta obsahuje proteinázu K a chaotropickou sůl. Tyto látky mají za úkol lyzovat buňky a degradovat proteiny. Proces purifikace probíhá tak, že se DNA váže na magnetické částice potažené celulózou, dále dojde k vymytí kontaminantů a purifikovaná DNA může být následně eluována za pomoci elučního pufru s nízkým obsahem solí. Postup izolace DNA je popsán níže

- 1) Pomocí vhodného nástroje jsem odebrala kousek vzorku a následně ho homogenizovala v porcelánové třecí misce s tlučkem. Do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky jsem navázila 30-40 mg zhomogenizovaného vzorku.
- 2) Po navážení jsem ke vzorku přidala 20 µl proteinázy K a 500 µl GT pufru. Směs jsem následně pár sekund vortexovala, až se jednotlivé složky směsi promíchaly.
- 3) Směs jsem inkubovala 15 minut při teplotě 56 °C. Během inkubace jsem mikrocentrifugační zkumavku převracela každé 2-3 minuty.
- 4) Pokud se stalo, že se v mikrocentrifugační zkumavce nacházely nerozpustné zbytky vzorku, přenesla jsem supernatant do filtrační kolonky a centrifugovala při plné rychlosti po dobu 5 minut, abych ve sběrné zkumavce dostala čistý roztok.
- 5) Napipetovala jsem 400 µl přefiltrovaného roztoku do MagCore zkumavky určené pro vzorek.
- 6) MagCore zkumavku jsem poté vložila do izolátoru, stejně jako eluční zkumavku, pipetovací špičku a kazetu s reagensy.
- 7) Na izolátoru jsem spustila program 401 a zahájila tak izolaci DNA.

4.3 Měření koncentrace DNA

Důležitým krokem je orientační spektrofotometrické stanovení koncentrace izolované DNA měřením při vlnové délce 260 nm. Koncentraci extrahované DNA jsem změřila proti slepému vzorku, kterým byla destilovaná voda. K měření na spektrofotometru BioSpec-nano jsem použila 1 μ l vzorku. Postupovala jsem takto:

- 1) Napipetováním 1 μ l blanku přímo na povrch spektrofotometru jsem změřila jeho koncentraci.
- 2) Stejným způsobem jsem změřila koncentraci DNA každého svého vzorku.
- 3) Hodnoty byly automaticky zaznamenány do počítače.

4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci GM kukuřice v potravinách a krmivech byla použita metoda PCR.

4.4.1 Příprava vzorku pro PCR

Před provedením PCR bylo třeba připravit reakční směs smícháním různých komponent nezbytných pro úspěšný průběh této reakce. Použitý PPP Master Mix obsahoval Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr. Dále obsažená aditiva a barvivo umožnilo okamžité nanesení vzorku na gel, aniž by bylo třeba přidat vkládací pufr. Kromě PPP Master Mixu stačilo pro přípravu vzorku dodat primery, templátovou DNA a vodu. Takto připravený vzorek bylo možné vložit do termálního cycleru a zahájit PCR. Poměr jednotlivých složek v reakční směsi je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Poměr jednotlivých složek v reakční směsi pro jeden vzorek

Reakční směs	
Složky	Objem (ml)
PPP MasterMix (TopBio)	10
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
DNA	1
H ₂ O	8

4.4.2 Primery použité pro PCR

Primery, krátké úseky jednořetězcové DNA, v druhém kroku PCR identifikovaly začátek a konec cílové sekvence a nasedaly na ni. V místě, kde nasedly primery, se poté navázala DNA polymeráza, díky které došlo k přirůstání vlákna DNA, komplementárního k původní molekule DNA. Na konci PCR vzniklo obrovské množství kopií původní molekuly DNA. Použila jsem pět párů primerů specifických k různým sekvencím DNA. Použité primery jsou popsány v tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled použitých primerů

Primery				
Cíl	Forward primer	Reverse primer	Velikost ampliconů (bp)	Zdroj
Gen pro zein	ZEIN	ZEIN	102	Gabriadze et al., 2014
Bt11	Cry 1A	Bt11	110	Özgen et al., 2013
Bt176	Cry 1A	Bt176	343	Özgen et al., 2013
MON810	Cry 1A	MON810	199	Özgen et al., 2013
T25	T25	T25	149	Özgen et al., 2013

4.4.2.1 Specifický primer pro kukuřici

Primery ZEIN forward and ZEIN reverse, které označují gen pro zásobní protein semen kukuřice zein, byly použity k potvrzení přítomnosti a kvality kukuřičné DNA izolované ze vzorků. Pokud byla cílová sekvence v izolované DNA přítomná, neporušená a amplifikovatelná, na agarózovém gelu bylo možné spatřit proužek označující fragment DNA o velikosti 102 bp.

4.4.2.2 Primery k detekci GM kukuřice

Vzorky obsahující kukuřici byly vyšetřeny pomocí PCR zaměřené na specifické typy GM kukuřice, které jsou představeny v tabulce 4. K amplifikaci specifických sekvencí DNA přítomných v GM kukuřici Bt11, Bt176, MON810 a T25 byly použity primery uvedené v tabulce 3.

Tabulka 4: Přehled vyšetřovaných odrůd GM kukuřice

Vyšetřované odrůdy GM kukuřice				
Odrůda	Protein	Donor	Zamýšlený efekt v GM plodině	Zdroj
Bt11	Cry1Ab	Bacillus thuringiensis	Odrůda Bt11 exprimuje protein Cry1Ab, protein toxický pro škůdce z řádu Lepidoptera (např. zavíječ kukuřičný).	Naegeli et al., 2019
	PAT	Streptomyces viridochromogenes	Odrůda Bt11 exprimuje PAT protein, který uděluje toleranci k herbicidům obsahujícím glufosinát amonný.	
Bt176	Cry1Ab	Bacillus thuringiensis	Odrůda Bt176 exprimuje protein Cry1Ab, protein toxický pro škůdce z řádu Lepidoptera (např. zavíječ kukuřičný).	Eizaguirre et al., 2006
MON810	Cry1Ab	Bacillus thuringiensis	Odrůda MON810 exprimuje protein Cry1Ab, protein toxický pro škůdce z řádu Lepidoptera (např. zavíječ kukuřičný).	Eizaguirre et al., 2006
T25	PAT	Streptomyces viridochromogenes	Odrůda T25 exprimuje PAT protein, který uděluje toleranci k herbicidům obsahujícím glufosinát amonný.	European Food Safety Authority, 2013

4.5 Elektroforéza na agarózovém gelu

Amplifikované cílové sekvence byly následně vizualizovány za použití elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu. Při elektroforéze bylo možné separovat DNA fragmenty na základě jejich molekulové hmotnosti. Velikostní marker zvaný „ladder“ sloužil jako hmotnostní standard pro odhad velikosti separovaných fragmentů DNA. Nanášela jsem ho do jamek v gelu paralelně k testovaným vzorkům. Jelikož jsem očekávala fragmenty o velikostí 100 – 1000 bp, použila jsem 100 bp ladder. Vizualizace molekul DNA po elektroforetické separaci byla možná proto, že byly obarvené fluorescenčním barvivem etidium bromidem (EtBr), který jsem přidala přímo do gelu při jeho přípravě. Amplifikované cílové sekvence DNA byly po obarvení EtBr vizualizovány pod fluorescenční lampou za použití manuálního gelového dokumentačního systému InGenius. Při provádění elektroforézy jsem postupovala následovně:

- 1) Nejprve bylo třeba připravit 1,5% agarózový gel. Do Erlenmeyerovy baňky jsem navázila potřebné množství agarózy, ke které jsem přidala TBE pufr. Použité množství agarózy a TBE pufru se odvíjelo od toho, jak velkou elektroforetickou vaničku jsem zamýšlela použít.
- 2) Agarózu jsem rozpustila v mikrovlnné troubě. Obvykle ji stačilo zahřívát 1-1,5 min. V průběhu rozehrívání jsem roztokem 1-2x zamíchala.
- 3) Dokonale rozpuštěnou agarózu, ve které již nebyla vidět žádná zrnka tající agarózy, jsem poté zchladila pod tekoucí vodou přibližně na 60 °C. Poté jsem do roztoku přidala EtBr, jehož množství také záviselo na velikosti elektroforetické vaničky.
- 4) Horký gel jsem vlila do utěsněné elektroforetické vaničky, ve které byl vložený hřebínek pro vytvoření jamek. Poté jsem gel nechala přibližně 20 minut ztuhnout.
- 5) Po ztuhnutí jsem odstranila z vaničky těsnění a vyndala hřeben. Vaničku jsem usadila do elektroforetické vany obsahující TBE pufr tak, aby jamky byly u záporného pólu.
- 6) Do jednotlivých jamek jsem následně napipetovala 10 µl připravených vzorků vyndaných z termálního cycleru, 100 bp ladderu a negativní kontroly.
- 7) Elektroforetickou vanu jsem přikryla víkem a zapnula elektroforetický zdroj. Pokud jsem chtěla separovat amplifikované fragmenty genu pro zein, napětí jsem nastavila na 90 V a elektroforézu nechala běžet 25 min. Pokud jsem chtěla rozdělit amplifikované fragmenty transgenů u vyšetřovaných odrůd GM kukuřice, napětí jsem nastavila na 120 V a elektroforézu nechala běžet 30 min.
- 8) Nakonec jsem gel vyjmula z elektroforetické vany, vizualizovala ho pod UV světlem, vyfotografovala a výsledky vyhodnotila.

5. Výsledky

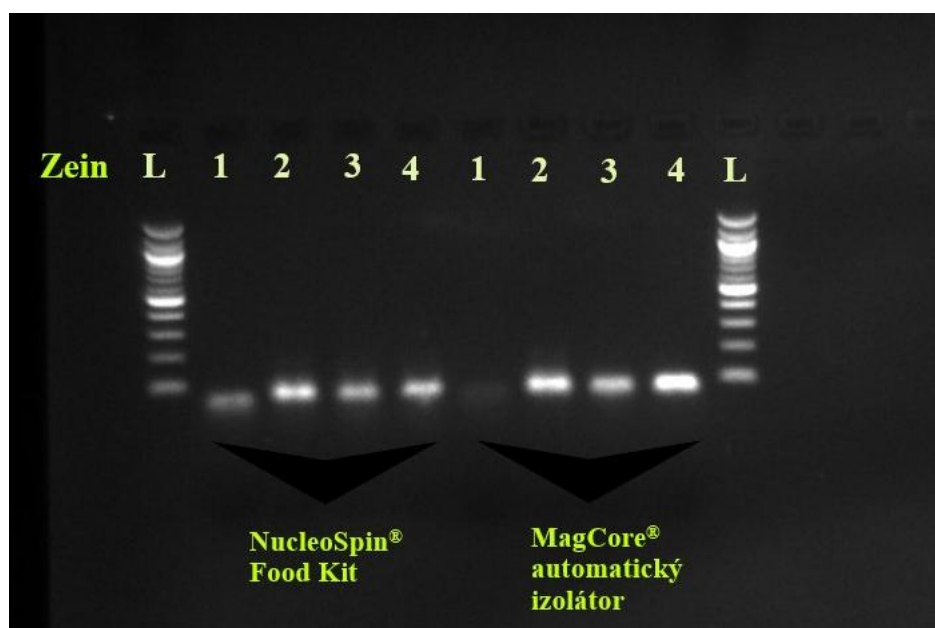
Koncentrace DNA izolované z jednotlivých produktů je zaznamenána v tabulce 5.

Tabulka 5: Koncentrace izolované DNA u jednotlivých vzorků

Naměřené koncentrace izolované DNA		
Vzorek	Produkt	Koncentrace DNA (ng/μL)
1	Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované	1,06
2	Křehké plátky kukuřičné se sýrem	15,82
3	Kukuřičné Cornies se lněným semínkem	27,82
4	Pražená kukuřice s příchutí barbecue	8,02
5	Corn Puffies Cream&Onion Flavour	4,34
6	Celpo Fit nefritovaný snack slanina	103,42
7	Kukuřičné lupínky mořská sůl	14,26
8	Zlatá kukuřice	8,01
9	Sladká kukuřice	8,07
10	Krupice kukuřičná	19,57
11	Kukuřičná mouka hladká	39,67
12	Kukuřičné placky	11,31
13	Kukuřičné tyčky	54
14	Francouzská polévka	49,86
15	Corn Flakes strouhanka	25,98
16	Krmivo pro hlodavce	17,55
17	Krmivo pro zahradní ptactvo	15,91
18	Dentalife žvýkací pochoutka pro psy	61,17
19	Lojové koule pro venkovní ptactvo	11,01
20	Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli	23,26
21	Kukuřice z pole u hřbitova - Ledenice	15,17
22	Krmivo pro bažanty	57,83
23	Krmivo pro hlodavce	44,5
24	Jemný kukuřičný škrob v prášku	4,45
25	Zeleninová směs na másle s kukuřicí	28,35

26	Mini Pizza šunková s kukuřicí	84,39
27	Hluboce zmražená směs s kukuřicí	7,89
28	Zeleninová směs hluboce zmražená	16,98
29	Kukuřice cukrová předvařená	7,74
30	Kompletní krmivo pro drobné hlodavce	5,97

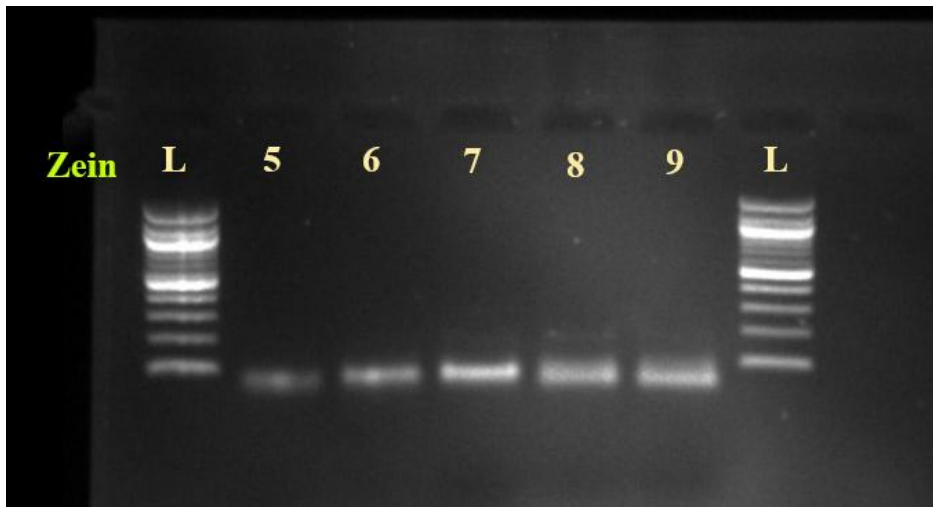
Na obrázcích 4-8 jsou znázorněny výsledky PCR analýzy vzorků testovaných na přítomnost genu pro zásobní protein semen kukuřice zein, který sloužil k potvrzení přítomnosti a kvality izolované kukuřičné DNA. Proužek označující fragment DNA o velikosti 102 bp bylo možné na agarózovém gelu spatřit, pokud byla cílová sekvence v izolované DNA přítomná, neporušená a amplifikovatelná. Takovéto vzorky mělo smysl dále testovat na přítomnost jednotlivých GM odrůd.



Obrázek 4: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 1-4 (vlastní zdroj). Zein: přítomnost kukuřičné DNA ve vzorku; L: 100 bp ladder; 1: Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované; 2: Křehké plátky kukuřičné se sýrem; 3: Kukuřičné Cornies se lněným semínkem; 4: Pražená kukuřice s příchutí barbecue

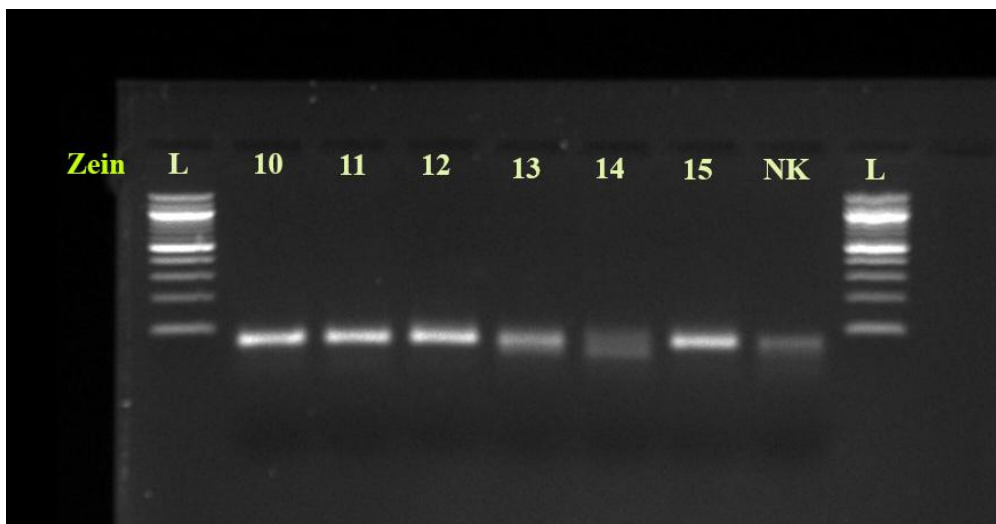
Na elektroforeogramu na obrázku 4 lze vidět porovnání výtěžnosti kukuřičné DNA izolované dvěma různými metodami. Podle intenzity a umístění proužků lze vidět, že výtěžnost kukuřičné DNA byla u obou metod velmi podobná. Přítomnost kukuřičné DNA byla potvrzena ve vzorcích Křehké plátky kukuřičné se sýrem (vz. č. 2),

Kukuřičné Cornies se lněným semínkem (vz. č. 3) a Pražená kukuřice s příchutí barbecue (vz. č. 4). Kukuřičnou DNA se nepodařilo izolovat ze vzorku Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované (vz. č. 1).



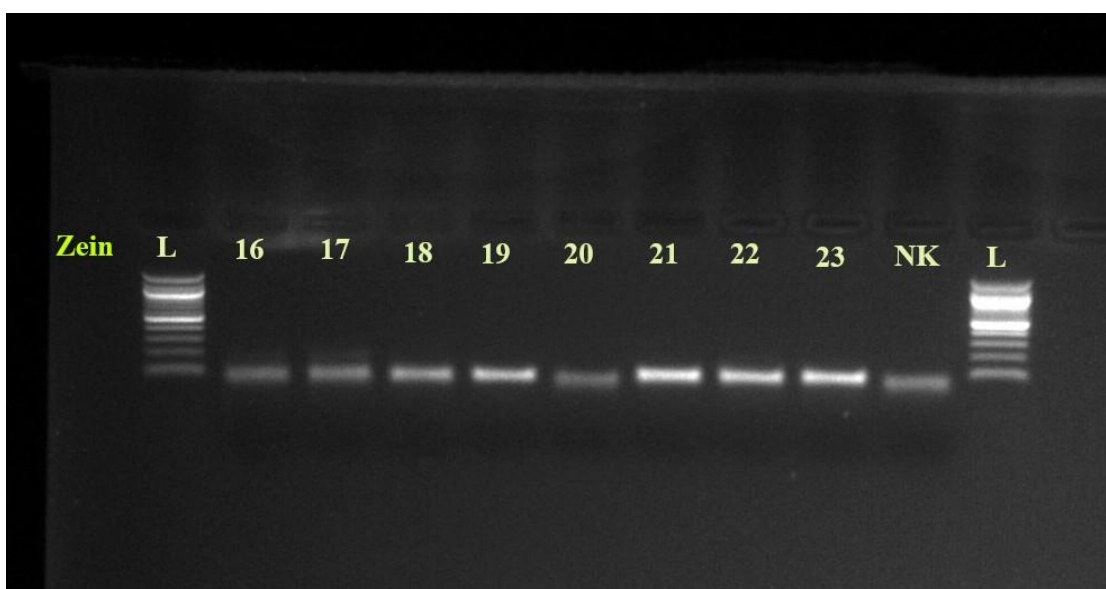
Obrázek 5: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 5-9 (vlastní zdroj). Zein: přítomnost kukuřičné DNA ve vzorku; L: 100 bp ladder; 5: Corn Puffies Cream&Onion Flavour; 6: Celpo Fit nefritovaný snack slanina; 7: Kukuřičné lupínky mořská sůl; 8: Zlatá kukuřice; 9: Sladká kukuřice

Podle intenzity a umístění proužků na obrázku 5 lze vidět, že jsem pravděpodobně nejúčinněji izolovala DNA ze vzorku Kukuřičné lupínky mořská sůl (vz. č. 7). Ve vzorcích Celpo Fit nefritovaný snack slanina (vz. č. 6), Kukuřičné lupínky mořská sůl, Zlatá kukuřice (vz. č. 8) a Sladká kukuřice (vz. č. 9) byla potvrzena přítomnost kukuřičné DNA. Kukuřičnou DNA se nepodařilo izolovat ze vzorku Corn Puffies Cream&Onion Flavour (vz. č. 5).



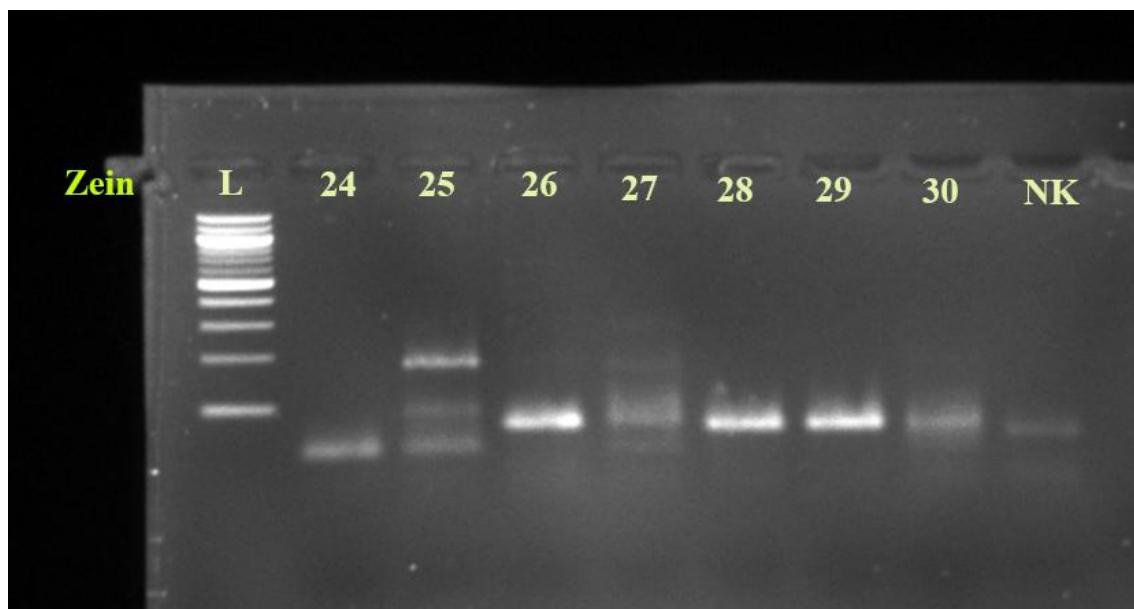
Obrázek 6: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 10-15 (vlastní zdroj). Zein: přítomnost kukuřičné DNA ve vzorku; L: 100 bp ladder; 10: Krupice kukuřičná; 11: Kukuřičná mouka hladká; 12: Kukuřičné placky; 13: Kukuřičné tyčky; 14: Francouzská polévka; 15: Corn Flakes strouhanka; NK: negativní kontrola

Podle intenzity a umístění proužků na obrázku 6 lze vidět, že jsem pravděpodobně nejúčinněji izolovala DNA ze vzorků Krupice kukuřičná (vz. č. 10), Kukuřičná mouka hladká (vz. č. 11), Kukuřičné placky (vz. č. 12) a Corn Flakes strouhanka (vz. č. 15). Ve vzorcích Krupice kukuřičná, Kukuřičná mouka hladká, Kukuřičné placky, Kukuřičné tyčky (vz. č. 13) a Corn Flakes strouhanka byla potvrzena přítomnost kukuřičné DNA. Kukuřičnou DNA se nepodařilo izolovat ze vzorku Francouzská polévka (vz. č. 14).



Obrázek 7: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 16-23 (vlastní zdroj). Zein: přítomnost kukuřičné DNA ve vzorku; L: 100 bp ladder; 16: Krmivo pro hlodavce; 17: Krmivo pro zahradní ptactvo; 18: Dentalife žvýkácí pochoutka pro psy; 19: Lojové koule pro venkovní ptactvo; 20: Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli; 21: Kukuřice z pole u hřbitova – Ledenice; 22: Krmivo pro bažanty; 23: Krmivo pro hlodavce; NK: negativní kontrola

Podle intenzity a umístění proužků na obrázku 7 lze vidět, že jsem pravděpodobně nejučinněji izolovala DNA ze vzorků Lojové koule pro venkovní ptactvo (vz. č. 19), Kukuřice z pole u hřbitova – Ledenice (vz. č. 21), Krmivo pro bažanty (vz. č. 22) a Krmivo pro hlodavce (vz. č. 23). Ve vzorcích Krmivo pro hlodavce (vz. č. 16), Krmivo pro zahradní ptactvo (vz. č. 17), Dentalife žvýkácí pochoutka pro psy (vz. č. 18), Lojové koule pro venkovní ptactvo, Kukuřice z pole u hřbitova – Ledenice, Krmivo pro bažanty a Krmivo pro hlodavce byla potvrzena přítomnost kukuřičné DNA. Kukuřičnou DNA se nepodařilo izolovat ze vzorku Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli (vz. č. 20).

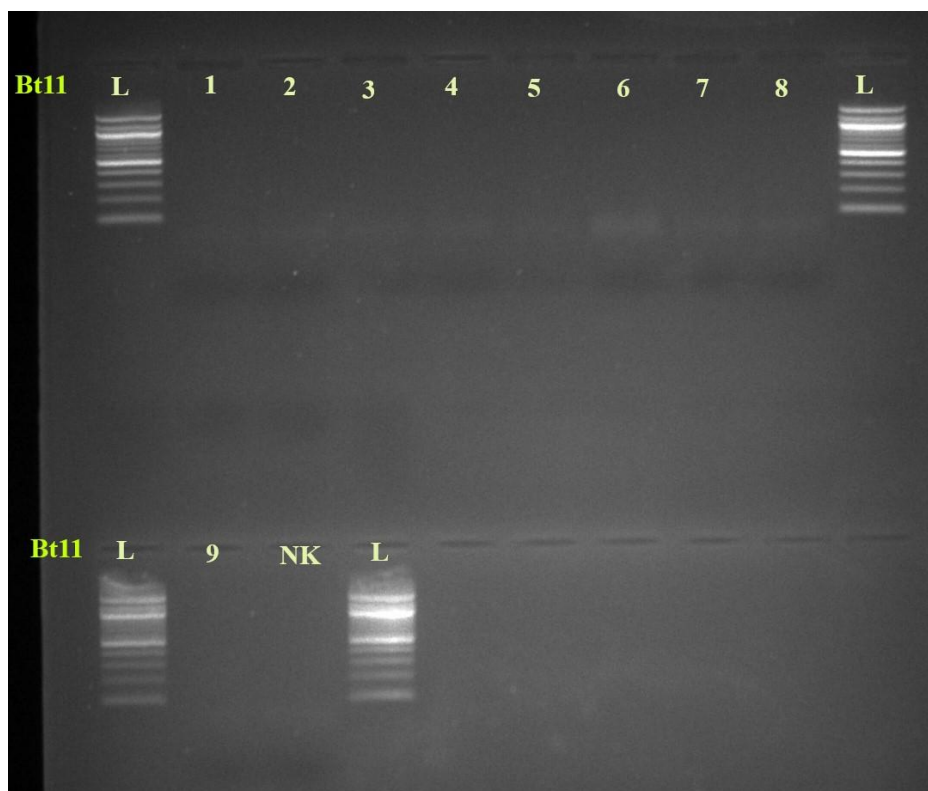


Obrázek 8: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 24-30 (vlastní zdroj). Zein: přítomnost kukuřičné DNA ve vzorku; L: 100 bp ladder; 24: Jemný kukuřičný škrob v prášku; 25: Zeleninová směs na másle s kukuřicí; 26: Mini Pizza šunková s kukuřicí; 27: Hluboce zmražená směs s kukuřicí; 28: Zeleninová směs hluboce zmražená; 29: Kukuřice cukrová předvařená; 30: Komplettní krmivo pro drobné hlodavce; NK: negativní kontrola

Podle intenzity a umístění proužků na obrázku 6 lze vidět, že jsem pravděpodobně nejučinněji izolovala DNA ze vzorků Mini Pizza šunková s kukuřicí (vz. č. 26),

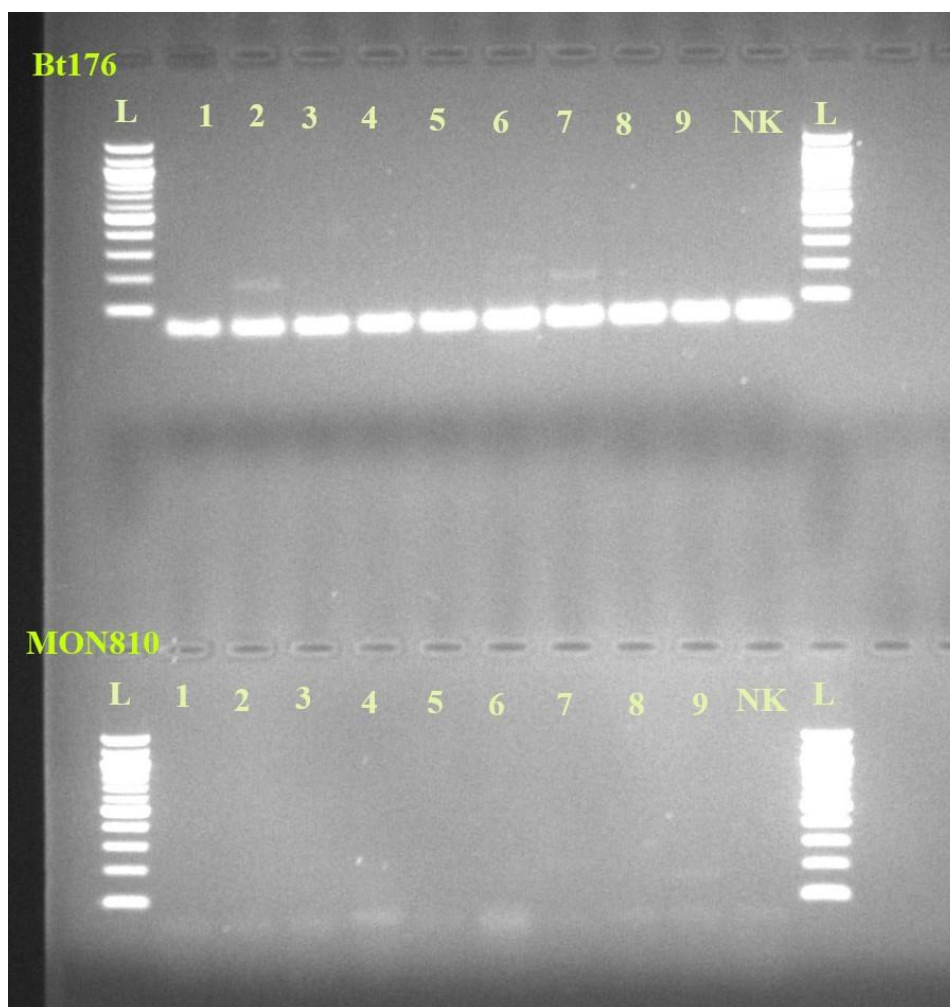
Zeleninová směs hluboce zmrazená (vz. č. 28) a Kukuřice cukrová předvařená (vz. č. 29). Ve vzorcích Zeleninová směs na másle s kukuřicí (vz. č. 25), Mini Pizza šunková s kukuřicí, Hluboce zmrazená směs s kukuřicí (vz. č. 27), Zeleninová směs hluboce zmrazená, Kukuřice cukrová předvařená a Kompletní krmivo pro drobné hlodavce (vz. č. 30) byla potvrzena přítomnost kukuřičné DNA. Kukuřičnou DNA se nepodařilo izolovat ze vzorku Jemný kukuřičný škrob v prášku (vz. č. 24).

Na obrázcích 9-11 jsou zobrazeny elektroforeogramy amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v GM odrůdách kukuřice Bt11, Bt176, MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 1.



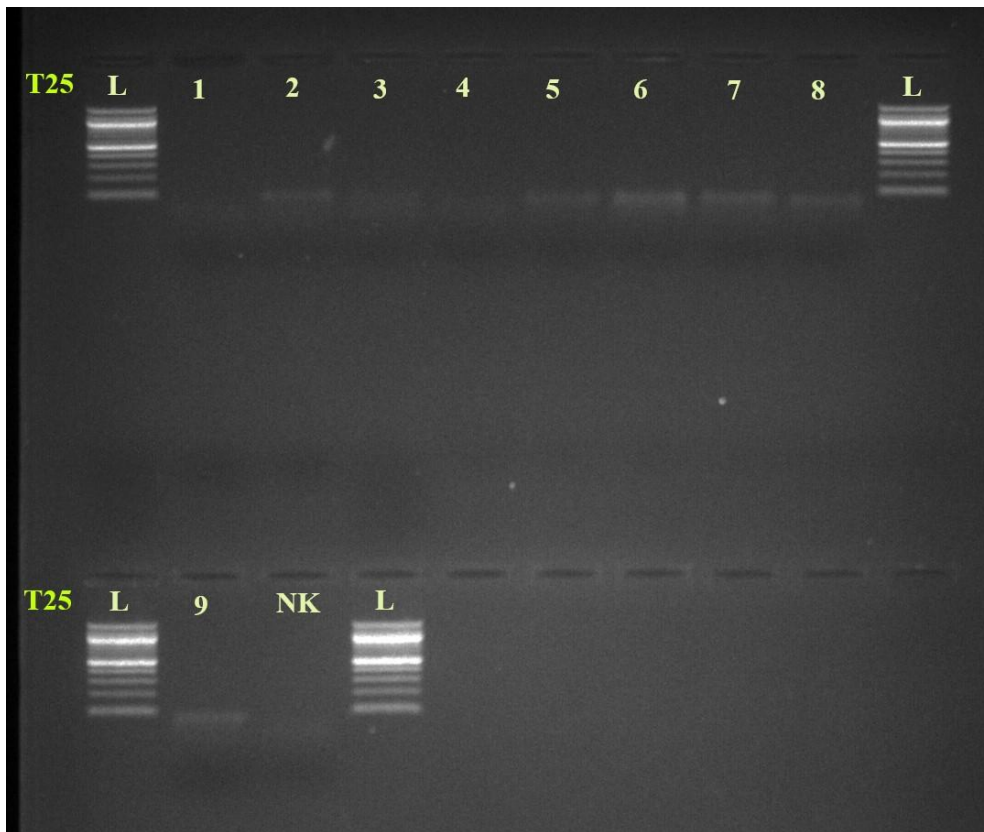
Obrázek 9: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsaženého v kukuřici Bt11 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj). Bt11: přítomnost transgenů obsažených v GM odrůdě kukuřice Bt11; L: 100 bp ladder; 1: Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované; 2: Křehké plátky kukuřičné se sýrem; 3: Kukuřičné Cornies se lněným semínkem; 4: Pražená kukuřice s příchutí barbecue; 5: Corn Puffies Cream&Onion Flavour; 6: Celpo Fit nefritovaný snack slanina; 7: Kukuřičné lupínky mořská sůl; 8: Zlatá kukuřice; 9: Sladká kukuřice; NK: negativní kontrola

Na obrázku 9 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 1 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 110 bp, a proto nebyl výskyt GM odrůdy kukuřice Bt11 prokázán.



Obrázek 10: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj). Bt176: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt176; MON810: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice MON810; L: 100 bp ladder; 1: Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované; 2: Křehké plátky kukuřičné se sýrem; 3: Kukuřičné Cornies se lněným semínkem; 4: Pražená kukuřice s příchutí barbecue; 5: Corn Puffies Cream&Onion Flavour; 6: Celpo Fit nefritovaný snack slanina; 7: Kukuřičné lupínky mořská sůl; 8: Zlatá kukuřice; 9: Sladká kukuřice; NK: negativní kontrola

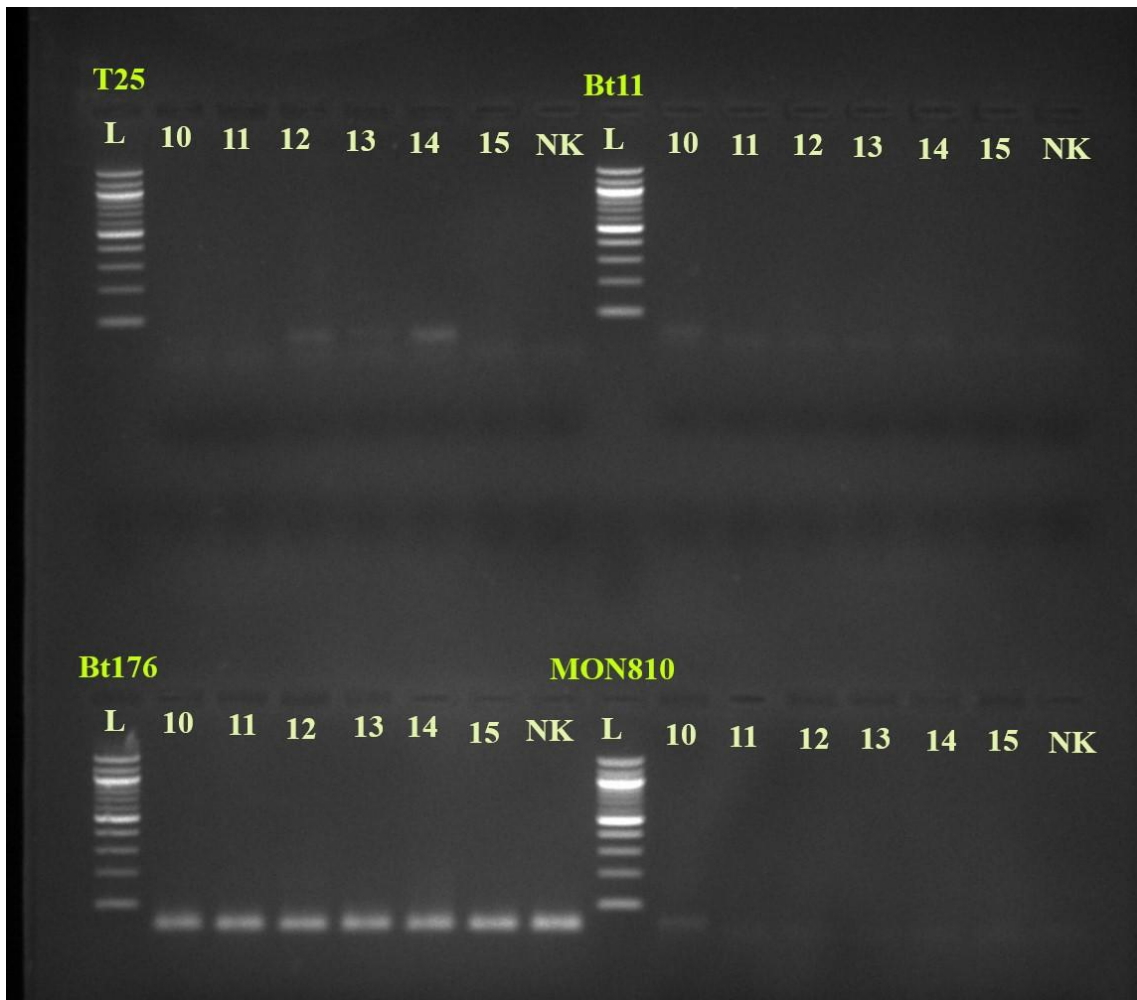
Na obrázku 10 je patrné, že v horní části elektroforeogramu se amplifikovaly fragmenty u vzorků 2 a 7. Velikost fragmentů ale neodpovídá velikosti 343 bp, a proto nebyl výskyt GM odrůdy kukuřice Bt176 prokázán u žádného vzorku ze sady 1. V dolní části elektroforeogramu byly amplifikovány fragmenty u vzorku Sladká kukuřice (vz. č. 9). Velikost fragmentů by mohla odpovídat velikosti 199 bp, tedy kukuřici MON810.



Obrázek 11: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsaženého v kukuřici T25 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj). T25: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice T25; L: 100 bp ladder; 1: Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované; 2: Křehké plátky kukuřičné se sýrem; 3: Kukuřičné Cornies se lněným semínkem; 4: Pražená kukuřice s příchutí barbecue; 5: Corn Puffies Cream&Onion Flavour; 6: Celpo Fit nefritovaný snack slanina; 7: Kukuřičné lupínky mořská sůl; 8: Zlatá kukuřice; 9: Sladká kukuřice; NK: negativní kontrola

Na obrázku 11 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 1 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 149 bp, a proto nebyl výskyt GM odrůdy kukuřice T25 prokázán.

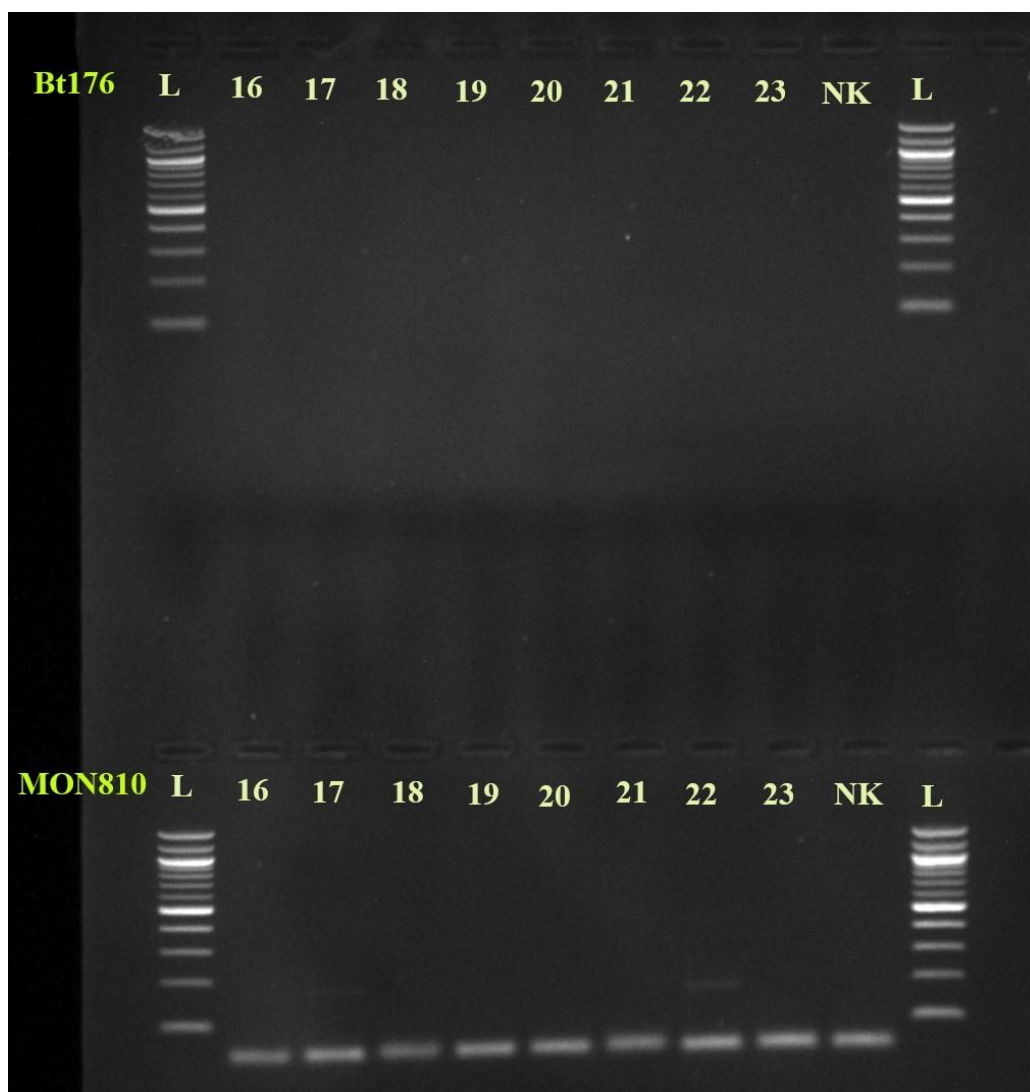
Na obrázku 12 je zobrazen elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v GM odrůdách kukuřice Bt11, Bt176, MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 2.



Obrázek 12: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici T25, Bt11, Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 2 (vlastní zdroj). T25: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice T25; Bt11: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt11; Bt176: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt176; MON810: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice MON810; L: 100 bp ladder; 10: Krupice kukuřičná; 11: Kukuřičná mouka hladká; 12: Kukuřičné placky; 13: Kukuřičné tyčky; 14: Francouzská polévka; 15: Corn Flakes strouhanka; NK: negativní kontrola

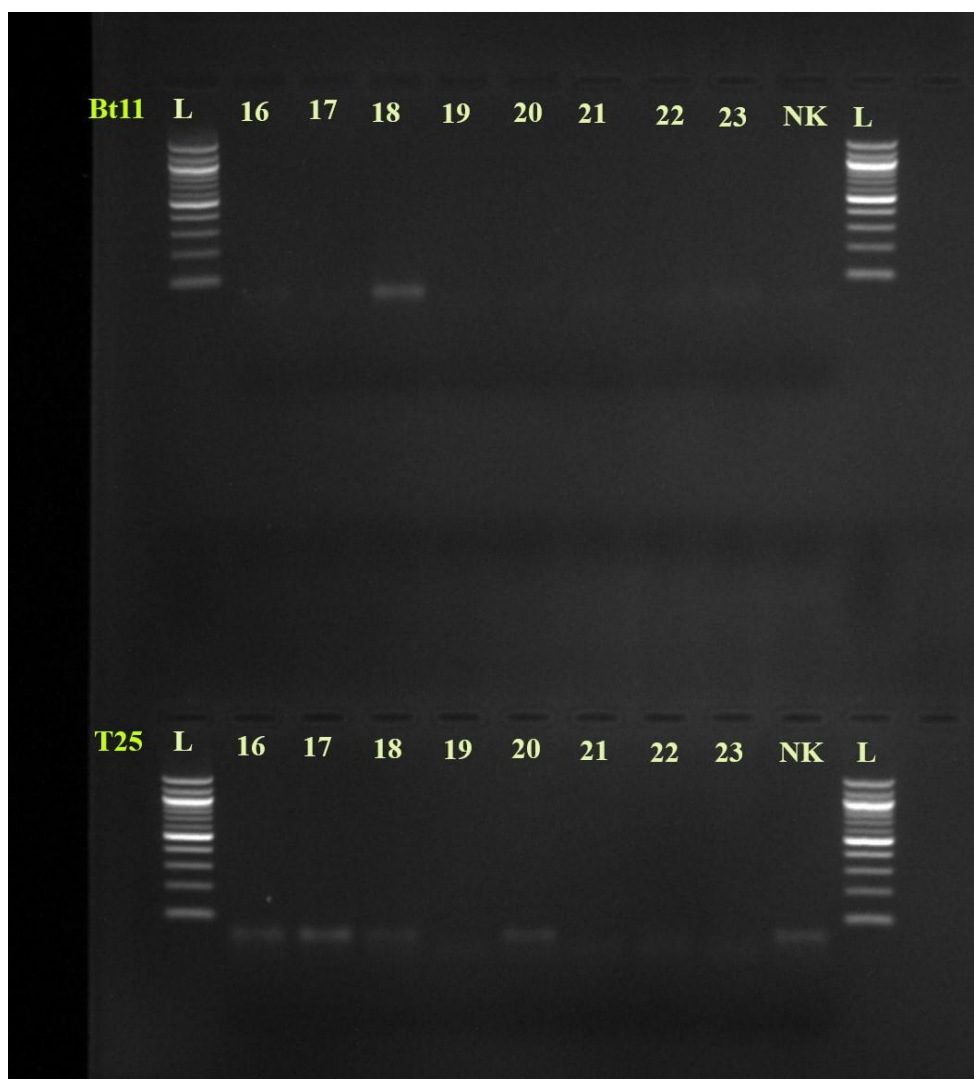
Na obrázku 12 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 2 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 110, 199, 343 ani 149 bp, a proto nebyl výskyt vyšetřovaných GM odrůd kukuřice v této sadě prokázán.

Na obrázcích 13-14 jsou zobrazeny elektroforeogramy amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v GM odrůdách kukuřice Bt11, Bt176, MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 3.



Obrázek 13: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 3 (vlastní zdroj). Bt176: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt176; MON810: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice MON810; L: 100 bp ladder; 16: Krmivo pro hlodavce; 17: Krmivo pro zahradní ptactvo; 18: Dentalife žvýkáci pochoutka pro psy; 19: Lojové koule pro venkovní ptactvo; 20: Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli; 21: Kukuřice z pole u hřbitova – Ledenice; 22: Krmivo pro bažanty; 23: Krmivo pro hlodavce; NK: negativní kontrola

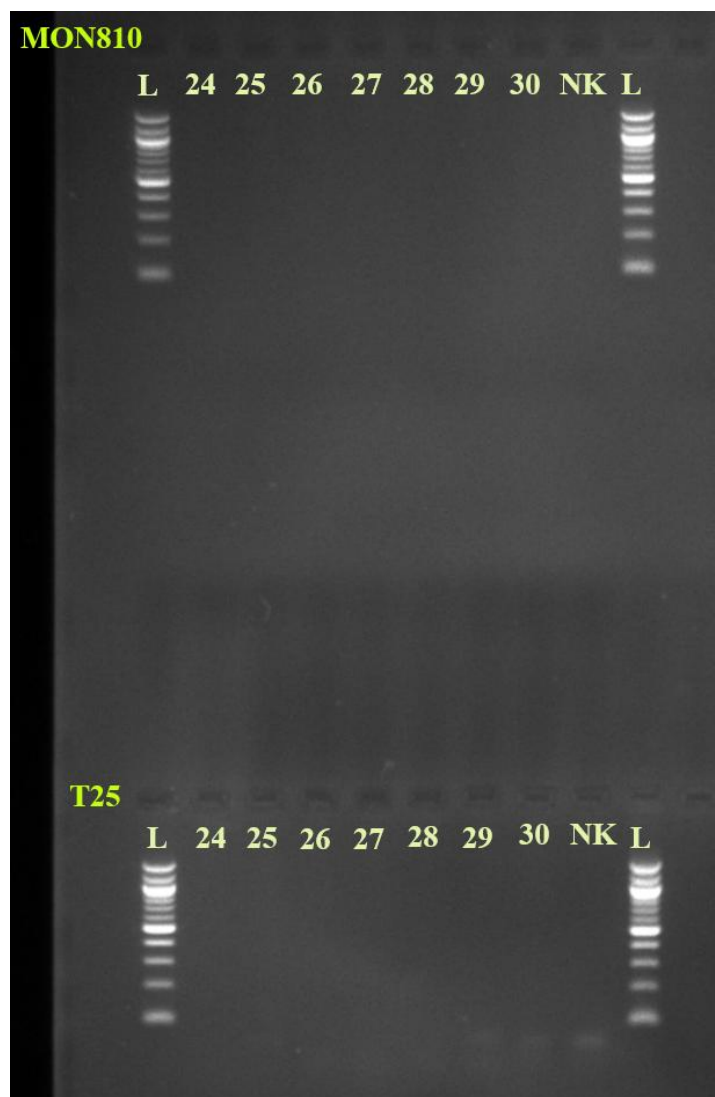
Na obrázku 13 v horní části elektroforeogramu je patrné, že u žádného vzorku ze sady 3 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 343 bp, a proto se výskyt GM odrůdy kukuřice Bt176 neprokázal. V dolní části elektroforeogramu byly amplifikovány fragmenty u vzorků Krmivo pro zahradní ptactvo a Krmivo pro bažanty (viz. č. 17 a 22). Velikost fragmentů by mohla odpovídat velikosti 199 bp, tedy kukuřici MON810.



Obrázek 14: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt11 a T25 ve vzorcích ze sady 3 (vlastní zdroj). Bt11: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt11; T25: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice T25; L: 100 bp ladder; 16: Krmivo pro hlodavce; 17: Krmivo pro zahradní ptactvo; 18: Dentalife žvýkáci pochoutka pro psy; 19: Lojové koule pro venkovní ptactvo; 20: Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli; 21: Kukuřice z pole u hřbitova – Ledenice; 22: Krmivo pro bažanty; 23: Krmivo pro hlodavce; NK: negativní kontrola

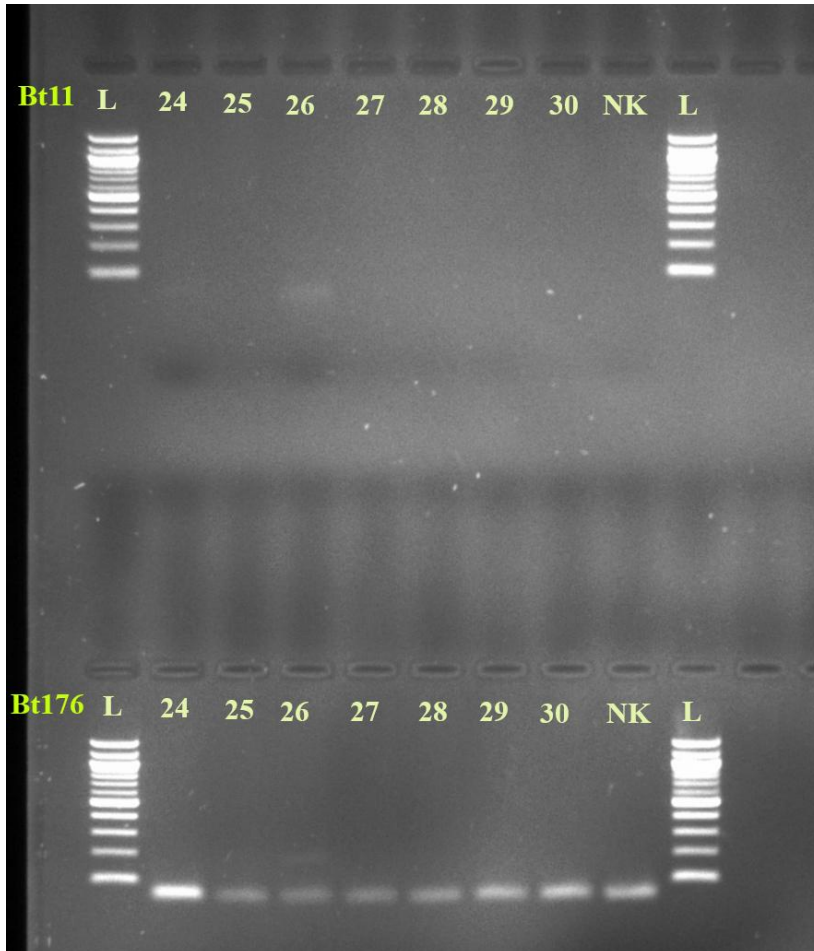
Na obrázku 14 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 3 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 110 ani 149 bp, a proto nebyl výskyt vyšetřovaných GM odrůd kukuřice Bt11 a T25 v této sadě prokázán.

Na obrázcích 15-16 jsou zobrazeny elektroforeogramy amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v GM odrůdách kukuřice Bt11, Bt176, MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 4.



Obrázek 15: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 4 (vlastní zdroj). MON810: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice MON810; T25: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice T25; L: 100 bp ladder; 24: Jemný kukuřičný škrob v prášku; 25: Zeleninová směs na másle s kukuřicí; 26: Mini Pizza šunková s kukuřicí; 27: Hluboce zmražená směs s kukuřicí; 28: Zeleninová směs hluboce zmražená; 29: Kukuřice cukrová předvařená; 30: Kompletní krmivo pro drobné hlodavce; NK: negativní kontrola

Na obrázku 15 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 4 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 199 ani 149 bp, a proto nebyl výskyt vyšetřovaných GM odrůd kukuřice MON810 a T25 v této sadě prokázán.



Obrázek 16: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt11 a Bt176 ve vzorcích ze sady 4 (vlastní zdroj). Bt11: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice Bt11; B176: přítomnost transgenů obsaženého v GM odrůdě kukuřice B176; L: 100 bp ladder; 24: Jemný kukuřičný škrob v prášku; 25: Zeleninová směs na másle s kukuřicí; 26: Mini Pizza šunková s kukuřicí; 27: Hluboce zmražená směs s kukuřicí; 28: Zeleninová směs hluboce zmražená; 29: Kukuřice cukrová předvařená; 30: Kompletní krmivo pro drobné hlodavce; NK: negativní kontrola

Na obrázku 16 je patrné, že u žádného vzorku ze sady 4 nebyly amplifikovány fragmenty o velikosti 110 ani 343 bp, a proto nebyl výskyt vyšetřovaných GM odrůd kukuřice Bt11 a Bt176 v této sadě prokázán.

Výsledky PCR analýzy jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Shrnutí stanovení přítomnosti GM odrůd kukuřice v potravinách a krmivech metodou PCR

Výsledky PCR analýzy vzorků						
Vzorek	Produkt	Zein	T25	Bt11	Bt176	MON810
1	Kukuřičné klásky	-	-	-	-	-
2	Křehké plátky kukuřičné se sýrem	+	-	-	-	-
3	Kukuřičné Cornies se lněným semínkem	+	-	-	-	-
4	Pražená kukuřice s příchutí barbecue	+	-	-	-	-
5	Corn Puffies Cream&Onion Flavour	-	-	-	-	-
6	Celpo Fit nefritovaný snack slanina	+	-	-	-	-
7	Kukuřičné lupínky mořská sůl	+	-	-	-	-
8	Zlatá kukuřice	+	-	-	-	-
9	Sladká kukuřice	+	-	-	-	+
10	Krupice kukuřičná	+	-	-	-	-
11	Kukuřičná mouka hladká	+	-	-	-	-
12	Kukuřičné placky	+	-	-	-	-
13	Kukuřičné tyčky	+	-	-	-	-
14	Francouzská polévka	-	-	-	-	-
15	Corn Flakes strouhanka	+	-	-	-	-
16	Krmivo pro hlodavce	+	-	-	-	-
17	Krmivo pro zahradní ptactvo	+	-	-	-	+
18	Dentalife žvýkáci pochoutka pro psy	+	-	-	-	-
19	Lojové koule pro venkovní ptactvo	+	-	-	-	-
20	Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli	-	-	-	-	-
21	Kukuřice z pole u hřbitova - Ledenice	+	-	-	-	-
22	Krmivo pro bažanty	+	-	-	-	+
23	Krmivo pro hlodavce	+	-	-	-	-
24	Jemný kukuřičný škrob v prášku	-	-	-	-	-
25	Zeleninová směs na másle s kukuřicí	+	-	-	-	-
26	Mini Pizza šunková s kukuřicí	+	-	-	-	-
27	Hluboce zmražená směs s kukuřicí	+	-	-	-	-
28	Zeleninová směs hluboce zmražená	+	-	-	-	-
29	Kukuřice cukrová předvařená	+	-	-	-	-
30	Kompletní krmivo pro drobné hlodavce	+	-	-	-	-

6. Diskuze

GM plodiny byly poprvé schváleny ke komerční produkci v roce 1994 a v současné době je jimi oseta plocha o velikosti téměř 190 milionů hektarů. Více než 80% pěstovaných GM plodin představuje důležité potraviny jako je kukuřice, sója nebo řepka olejka. Drtivá většina těchto plodin je pěstována v USA a Brazílii, zatímco více než třicet jiných zemí zakazuje jejich kultivaci. Odpůrci GMO se nacházejí především v EU, která nakládání s GMO a jejich produkty přísně reguluje. Výsledkem těchto regulací je povinné označování potravin a krmiv. Jelikož přítomnosti GMO nelze úplně zabránit a jejich náhodná přítomnost se může vyskytnout například na poli či při transportu, povinnost označování nastává u produktů obsahujících více než 0,9% autorizovaného GM materiálu (Becker et al., 2018).

Organismus vzniklý za pomoci technik genetického inženýrství a též většinu jeho produktů lze jednoznačně identifikovat za použití metody PCR. Tato metoda cílí na „cizí“ sekvence DNA, které byly do původního genomu vloženy (Grohmann et al., 2019). Při PCR analýze je během několika cyklů cílová sekvence DNA zmnožena až miliardkrát za použití genově specifických primerů. Amplifikovaný gen je následně vizualizován pomocí gelové elektroforézy (Nazir et al., 2019). Metodou PCR jsem pro účely této bakalářské práce stanovovala GMO ve 30 vzorcích potravin a krmiv obsahujících kukuřici. Nejprve jsem vzorky testovala na přítomnost genu pro zein, zásobní protein kukuřice. Tento gen byl použit k potvrzení přítomnosti a kvality kukuřičné DNA ve vzorcích. Následně jsem PCR využila k detekci čtyř různých GM odrůd kukuřice: Bt11, Bt176, Mon810 a T25. Metoda PCR byla pro analýzu mnou pořízených vzorků obzvláště vhodná, protože se mezi těmito vzorky nacházely i průmyslově zpracované produkty. Podle Fraiture et al. (2015) se tyto produkty nedoporučuje analyzovat za pomoci metod, které jsou založeny na identifikaci výsledného proteinu kódovaného vloženým transgenem. A to proto, že proteiny ve zpracovaných potravinách jsou obvykle vysoce degradované či denaturované a jakákoliv modifikace v cílových proteinech by mohla pozměnit specifitu a citlivost prováděného testu.

Izolace DNA byla prvním a významným krokem při stanovení GMO ve vzorcích. Byl třeba zvolit postup, který by umožnil získat dostatečné množství DNA v čisté formě. Většina metod izolace DNA jsou modifikované verze CTAB metody. Klasická metoda CTAB je ale velmi časově náročná, proces extrakce zahrnuje několik

centrifugací a inkubací, práci se škodlivými látkami a k izolaci DNA je potřeba většího množství vzorku (Abdel-Latif et al., 2017). Tyto důvody mě přiměly vyzkoušet dvě rychlejší metody. Ze vzorků 1-4 jsem DNA izolovala pomocí jak komerčního kitu NucleoSpin® Food Kit, tak automatického izolátoru nukleových kyselin MagCore®, abych byla schopná určit, která ze dvou metod poskytne lepší výsledky. Protože obě metody fungovaly a dospěla jsem k téměř totožným výsledkům, rozhodla jsem se u zbylých vzorků izolovat DNA pouze za pomoci automatického izolátoru. Tato varianta byla sice dražší, ale méně časově náročná.

Důležitým krokem bylo také orientační spektrofotometrické stanovení koncentrace izolované DNA. Měření jsem provedla při vlnové délce 260 nm za použití spektrofotometru BioSpec-nano. Naměřená koncentrace DNA se pohybovala v rozpětí od 1,06 do 103,42 ng/μL. Nejnižší koncentraci DNA měl vzorek DNA izolovaný z produktu Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované, zatímco nejvyšší koncentrace DNA byla naměřena u vzorku DNA izolovaného z výrobku Celpo Fit nefritovaný snack slanina. Rozdíl ve výtěžnosti DNA u jednotlivých vzorků byl pravděpodobně způsoben různým stupněm průmyslového zpracování produktů. Greiner et al. (2005), Ujhelyi et al. (2008) a Vijayakumar et al. (2009), kteří také detekovali GMO v potravinách, měli stejně jako já potíže s izolováním dostatečného množství amplifikovatelné DNA z průmyslově zpracovaných produktů, a to kvůli účinkům, které techniky zpracování potravin mají na kvantitu a integritu DNA.

Izolovanou DNA ze vzorků jsem využila u PCR analýz. Nejprve jsem za pomoci PCR metody testovala vzorky na přítomnost genu pro zásobní protein kukuřice zein. Přítomnost tohoto genu byla detekována u těch vzorků, ve kterých byla kukuřičná DNA přítomná, neporušená a amplifikovatelná. Pouze takovéto vzorky mělo smysl dále testovat na přítomnost jednotlivých GM odrůd. Özgen et al. (2013) u svých vzorků také zjišťoval přítomnost genu pro zein, a to ze stejného důvodu jako já. Nicméně já jsem pro kontrolu testovala i vzorky, u kterých nebyla přítomnost kukuřičné DNA prokázána. Výsledky PCR jsem vizualizovala pomocí elektroforézy. Pokud byla amplifikovatelná kukuřičná DNA ve vzorku přítomná, na agarózovém gelu bylo možné spatřit proužek označující fragment DNA o velikosti 102 bp. Kukuřičnou DNA se mi nepodařilo izolovat u vzorků Francouzská polévka, která obsahovala kukuřičný škrob a Jemný kukuřičný škrob v prášku. Özgen et al. (2013) ve své práci uvedl, že se mu navzdory opakovanému snažení také nepodařilo izolovat DNA z kukuřičných škrobů, ačkoliv použil jiné metody izolace DNA než já (CTAB a Promega Wizard™ Genomic DNA

Purification Kit). Dále se mi nepodařilo prokázat přítomnost kukuřičné DNA ve vzorcích Pražená a solená kukuřičná zrna s chilli, Kukuřičné klásky v nálevu pasterizované a Corn Puffies Cream&Onion Flavour. Při průmyslovém zpracování těchto výrobků pravděpodobně došlo k degradaci DNA vlivem tepla, enzymatické aktivity či nízkého pH. Je také možné, že jsem při izolaci DNA udělala chybu, například jsem mohla nedostatečně homogenizovat vzorky. Negativní výsledky by také mohly být způsobeny nepřítomností kukuřice ve vzorcích, ale tato varianta je vysoce nepravděpodobná.

Dále jsem použila PCR metodu k detekci čtyř různých GM odrůd kukuřice: Bt11, Bt176, Mon810 a T25. Při testování vzorků na přítomnost kukuřice MON810 se objevily amplifikované fragmenty DNA o očekávané velikosti 199 bp u vzorků Sladká kukuřice, Krmivo pro zahradní ptactvo a Krmivo pro bažanty. U ostatních vzorků se neprokázala přítomnost ani jedné z testovaných GM odrůd kukuřice. Intenzita proužků u pozitivních vzorků je ale nepatrná. Z tohoto důvodu bych doporučovala vzorky přešetřit pomocí metody real-time PCR, která umožnila kvantifikovat obsah GMO v potravinách a krmivech již několika vědcům, jako například Becker et al. (2018) či Cottenet et al. (2019).

Všech 30 testovaných vzorků bylo pořízených z běžně dostupných zdrojů v Jihočeském kraji. Dva z těchto vzorků měly na etiketě nápis „GMO free“. Zbytek vzorků na svém obalu žádnou informaci týkající se přítomnosti či absence GM materiálu neuváděl. Özgen et al. (2013), který v Turecku testoval mírně a vysoce zpracované potraviny na přítomnost GM kukuřice a sóji, dospěl k závěru, že 20,3% ze 74 testovaných vzorků bylo pozitivních na obsah GMO. Ani jeden z těchto pozitivních vzorků nebyl označen, což odporovalo turecké legislativě. Výsledky mnou provedené analýzy byly poněkud příznivější, ačkoliv jsem testovala menší množství vzorků. Z mých výsledků vyplynulo, že pouze 10% z 30 testovaných vzorků obsahovalo GMO. Tyto vzorky ale také nebyly označeny. Nicméně je možné, že obsah GMO byl v těchto vzorcích nižší než 0,9%. Aby se dalo s jistotou prohlásit, že pozitivní vzorky jsou nebo nejsou v souladu s legislativou EU, musel by se v nich kvantifikovat obsah kukuřice MON810.

7. Závěr

Na základě výsledků této práce lze usoudit, že konvenční metoda PCR je vhodná k detekci GMO v potravinách a krmivech, a to i těch průmyslově zpracovaných. Třicet vzorků potravin a krmiv obsahujících kukuřici bylo testováno na přítomnost čtyř různých GM odrůd kukuřice: Bt11, Bt176, Mon810 a T25. Navzdory současným nařízením, ani jeden ze tří pozitivních vzorků, u kterých byla prokázána přítomnost kukuřice MON810, neměl na svém obalu označení, které je povinné u všech produktů obsahujících více než 0,9% autorizovaného GM materiálu. Je možné, že obsah GMO v těchto vzorcích byl nižší než 0,9%. Nicméně skutečnost, že pozitivní vzorky neměly na obalu řádné označení, ukázala, že kontrolu GMO v zemi nestačí provádět pouze sledováním během importu, ale důležité je i testování potravin a krmiv v místě prodeje. Přestože zatím nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na lidské zdraví či životní prostředí, zákazník má právo vědět, jaký produkt si kupuje a sám se rozhodnout, zda si produkt obsahující GMO zakoupí. Vzorky, které vyšly pozitivně, bych doporučovala přešetřit za pomoci real-time PCR, kterou lze kvantifikovat obsah GM kukuřice. U vzorků, které měly na obalu uvedeno „GMO free“, skutečně nebyla prokázána přítomnost ani jedné z vyšetřovaných GM odrůd kukuřice.

8. Seznam literatury

1. ABDEL-LATIF, A., OSMAN, G., 2017. Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize. *Plant Methods* [online]. 13(1) [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1186/s13007-016-0152-4. Dostupné z: <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-016-0152-4>
2. *Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S.: Recent Trends in GE Adoption*, 2019. [online]. USDA. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx>
3. ALISHAHI, A., FARAHMAND, H., PRIETO, N., COZZOLINO, D., 2010. Identification of Transgenic Foods Using NIR Spectroscopy: A Review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 75(1), 1-7 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1016/j.saa.2009.10.001. ISSN 13861425. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142509005125>
4. ANKLAM, E., GADANI, F., HEINZE, P., PIJNENBURG, H., VAN DEN EEDE, G., 2002. Analytical Methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* [online]. 214(1), 3-26 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1007/s002170100415. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170100415>
5. BAIN, C., DANDACHI, T., 2014. Governing GMOs: The (Counter) Movement for Mandatory and Voluntary Non-GMO Labels. *Sustainability* [online]. 6(12), 9456-9476 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.3390/su6129456. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2071-1050/6/12/9456>
6. BECKER, R., ULRICH, A., 2018. Improved Detection and Quantification of Cauliflower Mosaic Virus in Food Crops: Assessing False Positives in GMO Screening Based on the 35S Promoter. *European Food Research and Technology* [online]. 244(10), 1861-1871 [cit. 2020-05-23]. DOI: 10.1007/s00217-018-3099-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-018-3099-z>

7. BERG, P., MERTZ, J. E., 2010. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. *Genetics* [online]. 184(1), 9-17 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1534/genetics.109.112144. Dostupné z: <http://www.genetics.org/lookup/doi/10.1534/genetics.109.112144>
8. BRENNER, S., MILLER, J. H., BROUGHTON, W., 2002. *Encyclopedia of genetics*. San Diego: Academic Press. ISBN 9780122270802.
9. BRUENING, G., LYONS, J. M., 2000. The Case of the FLAVR SAVR Tomato. *California Agriculture* [online]. 54(4), 6-7 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.3733/ca.v054n04p6. Dostupné také z: <http://californiaagriculture.ucanr.edu/landingpage.cfm?articleid=ca.v054n04p6>
10. CARTER, M., SHIEH, J., 2015. Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. In: CARTER, M., SHIEH, J. *Guide to Research Techniques in Neuroscience* [online]. 2nd ed. USA: Elsevier, 2015, 219-237 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800511-8.00010-1. ISBN 9780128005118. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128005118000101>
11. COTTENET, G., BLANCPAIN, C., SONNARD, V., CHUAH, P. F., 2019. Two FAST Multiplex Real-time PCR Reactions to Assess the Presence of Genetically Modified Organisms in Food. *Food Chemistry* [online]. 274, 760-765 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.050. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618316212>
12. COZZOLINO, D., 2014. An Overview of the Use of Infrared Spectroscopy and Chemometrics in Authenticity and Traceability of Cereals. *Food Research International* [online]. 60, 262-265 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.08.034. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691300478X>
13. CUSTERS, R., 2006. *Průvodce biotechnologiemi: biotechnologie v zemědělství a potravinářství*. Praha: Academia. ISBN 80-200-1350-4.
14. DELANEY, B., GOODMAN, R. E., LADICS, G. S., 2018. Food and Feed Safety of Genetically Engineered Food Crops. *Toxicological Sciences* [online]. 162(2), 361-371 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1093/toxsci/kfx249. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/toxsci/article/162/2/361/4675348>

15. DILL, G. M., 2005. Glyphosate-resistant Crops: History, Status and Future. *Pest Management Science* [online]. 61(3), 219-224 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1002/ps.1008. ISSN 1526-498X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ps.1008>
16. EVENSON, R. E., SANTANIELLO, V., 2006. *International Trade and Policies for Genetically Modified Products*. Cambridge, MA: CABI Pub. ISBN 978-0851990569.
17. FOSTER, S. J., PARK, T. H., PEL, M., BRIGNETI, G., ŚLIWKA, J., JAGGER, L., VAN DER VOSSSEN, E., JONES, J. D. G., 2009. Rpi-vnt1.1 , a Tm-2 2 Homolog from Solanum Venturii , Confers Resistance to Potato Late Blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions* [online]. 22(5), 589-600 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1094/MPMI-22-5-0589. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-22-5-0589>
18. FRAITURE, M. A., HERMAN, P., TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M., DEFORCE, D., ROOSENS, N. H., 2015. Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions. *BioMed Research International* [online]. 2015, 1-22 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1155/2015/392872. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/392872/>
19. *Frequently Asked Questions on Genetically Modified Foods*, 2014. [online]. WHO. [cit. 2020-03-12] Dostupné z: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/
20. GAUTAM, A., 2018. Mendel's Laws. In: VONK, J., SHACKELFORD, T. (eds). *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Cham: Springer International Publishing [online], 1-3 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1007/978-3-319-47829-6_2054-1. ISBN 978-3-319-47829-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-47829-6_2054-1.

21. GREINER, R., KONIETZNY, U., VILLAVICENCIO, A. L. C. H., 2005. Qualitative and Quantitative Detection of Genetically Modified Maize and Soy in Processed Foods Sold Commercially in Brazil by PCR-based Methods. *Food Control* [online]. 16(8), 753-759 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.06.015. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713504001343>
22. GROHMANN, L., KEILWAGEN, J., DUENSING, N., DAGAND, E., HARTUNG, F., WILHELM, R., BENDIEK, J., SPRINK, T., 2019. Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Plant Science* [online]. 10 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.3389/fpls.2019.00236. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00236/full>
23. HALFORD, N. G., 2012. *Genetically modified crops*. 2nd ed. London: Imperial College Press. ISBN 978-1-84816-838-1.
24. HALFORD, N. G., 2018. Legislation Governing Genetically Modified and Genome- edited Crops in Europe: the Need for Change. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 99(1), 8-12 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1002/jsfa.9227. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.9227>
25. HNASKO, T. S., HNASKO, R. M., 2015. The Western Blot. In: HNASKO, R. (eds). *ELISA: Methods and Protocols* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 87-96 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5_9. ISBN 978-1-4939-2741-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2742-5_9
26. CHEN, B. Y., JANES, H. W., 2002. *PCR Cloning Protocols*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), ISBN 08-960-3969-2.
27. IKEUCHI, M., OGAWA, Y., IWASE, A., SUGIMOTO, K., 2016. Plant Regeneration: Cellular Origins and Molecular Mechanisms. *Development* [online]. 143(9), 1442-1451 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1242/dev.134668. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.134668>

28. OLIVER, J. M., 2014. Why We Need GMO Crops in Agriculture. *Missouri medicine* [online]. 111(6), 492-507 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173531/>
29. JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A., CHARPENTIER, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* [online]. 337(6096), 816-821 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1126/science.1225829. Dostupné také z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1225829>
30. KALIYAPPAN, K., PALANISAMY, M., GOVINDARAJAN, R., DURAIYAN, J., 2012. Microarray and Its Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 4(6), 310-312 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.4103/0975-7406.100283. Dostupné z: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2012/4/6/310/100283>
31. KAMLE, S., ALI, S., 2013. Genetically Modified Crops: Detection Strategies and Biosafety Issues. *Gene* [online]. 522(2), 123-132 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913004010>
32. KAMLE, S., LI, D., OJHA, A., KUMAR, A., 2019. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of GM Proteins in Transgenic Crops/Produce. In: ZHANG, B. (eds). *Transgenic Cotton* [online]. New York, NY: Springer New York, 159-166 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1007/978-1-4939-8952-2_12. ISBN 978-1-4939-8951-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8952-2_12
33. LEDFORD, H., 2015. CRISPR, the Disruptor. *Nature* [online]. 522(7554), 20-24 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1038/522020a. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/522020a>
34. LI, R., QUAN, S., YAN, X., BISWAS, S., ZHANG, D., SHI, J., 2017. Molecular Characterization of Genetically-Modified Crops: Challenges and Strategies. *Biotechnology Advances* [online]. 35(2), 302-309 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.01.005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017300058>

35. LINO, J., de ALMEIDA CANADO, G. M., BORM, A., SILVA, W., ALEMU, T., 2012. Biosafety and Detection of Genetically Modified Organisms. In: OZDEN CIFTCI, Y. (eds). *Transgenic Plants - Advances and Limitations* [online]. Croatia: InTech, 427-448 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.5772/31508. ISBN 978-953-51-0181-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/biosafety-and-detection-of-genetically-modified-organisms>
36. LOSEY, J. E., RAYOR, L. S., CARTER, M. E., 1999. Transgenic Pollen Harms Monarch Larvae. *Nature* [online]. 399(6733), 214-214 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1038/20338. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/20338>
37. LOW, L. Y., YANG, S. K., KOK, D. X. A., ONG-ABDULLAH, J., TAN, N. P., LAI, K. S., 2018. Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method. In: ÇELIK, Ö. (eds). *New Visions in Plant Science* [online]. London: InTech, 41-61 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.5772/intechopen.79369. ISBN 978-1-78923-702-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/new-visions-in-plant-science/transgenic-plants-gene-constructs-vector-and-transformation-method>
38. AL-KHAYRI, J. M., 2015. *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-319-22520-3.
39. MAHGOUB, S. E. O., 2016. *Genetically Modified Foods: Basics, Applications, and Controversy*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4822-4281-2.
40. MALLIK, B., CHAKRAVARTI, B., CHAKRAVARTI, D. N., 2016. Principles of Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. 13(1), 6.1.1-6.1.23 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1002/cpet.7. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpet.7>
41. MARCHANT, G. E., CARDINEAU, G. A., 2014. The Labeling Debate in the United States. *GM Crops & Food* [online]. 4(3), 126-134 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.4161/gmcr.26163. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmcr.26163>
42. MÜLLEROVÁ, D., AUJEZDSKÁ, A., 2014. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2510-2.

43. NAZIR, S., ZAFFAR IQBAL, M., SAJID-UR-RAHMAN, 2019. Molecular Identification of Genetically Modified Crops for Biosafety and Legitimacy of Transgenes. In: CHEN, Y. Ch., CHEN, S. J. (eds). *Gene Editing - Technologies and Applications* [online]. London: IntechOpen, 1-18 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.5772/intechopen.81079. ISBN 978-1-78984-508-2. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/gene-editing-technologies-and-applications/molecular-identification-of-genetically-modified-crops-for-biosafety-and-legitimacy-of-transgenes>
44. ÖZGEN ARUN, Ö., YILMAZ, F., MURATOĞLU, K., 2013. PCR Detection of Genetically Modified Maize and Soy in Mildly and Highly Processed Foods. *Food Control* [online]. 32(2), 525-531 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513000388>
45. PASSARGE, E., 2018. *Color atlas of genetics*. 5th ed. Stuttgart: Thieme. Flexibook. ISBN 978-3-13-241440-2.
46. RASTOGI, S. C., 2010. *Biochemistry*. 3rd ed. New Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. ISBN 978-0-07-068175-0.
47. REN, J., WU, P., TRAMPE, B., TIAN, X., LÜBBERSTEDT, T., CHEN, S., 2017. Novel Technologies in Doubled Haploid Line Development. *Plant Biotechnology Journal* [online]. 15(11), 1361-1370 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1111/pbi.12805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12805>
48. European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Scientific Opinion Addressing the Safety Assessment of Plants Developed through Cisgenesis and Intragenesis. *EFSA Journal* [online]. 10(2) [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2561. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.2561>
49. SEARS, M. K., HELLMICH, R. L., STANLEY-HORN, D. E., 2001. Impact of Bt Corn Pollen on Monarch Butterfly Populations: A Risk Assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 98(21), 11937-11942 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1073/pnas.211329998. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.211329998>

50. SCHOUTEN, H. J., KRENS, F. A., JACOBSEN, E., 2006. Cisgenic Plants Are Similar to Traditionally Bred Plants. *EMBO reports* [online]. 7(8), 750-753 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1038/sj.embor.7400769. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.embor.7400769>
51. STRATILOVÁ, Z., JEDLIČKOVÁ, M., 2016. *GMO bez obalu*. 4. vyd. Praha: Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin. ISBN 978-80-7434-295-0.
52. STRAYER, D., 2002. *Identity-preserved Systems: a Reference Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 0-8493-1390-2.
53. TANG, G., QIN, J., DOLNIKOWSKI, G. G., RUSSELL, R. M., GRUSAK, M. A., 2009. Golden Rice Is an Effective Source of Vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 89(6), 1776-1783 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27119. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/6/1776/4596817>
54. TAYLOR, N. J., FAUQUET, C. M., 2002. Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology. *DNA and Cell Biology* [online]. 21(12), 963-977 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1089/104454902762053891. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/104454902762053891>
55. TOURTE, Y., 2003. *Genetically Modified Organisms: Transgenesis in Plants*. Enfield, NH: Science Publishers. ISBN 978-1578082605.
56. UJHELYI, G., VAJDA, B., BÉKI, E., NESZLÉNYI, K., JAKAB, J., JÁNOSI, A., NÉMEDI, E., GELENCSÉR, É., 2008. Surveying the RR Soy Content of Commercially Available Food Products in Hungary. *Food Control* [online]. 19(10), 967-973 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.10.004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507002216>
57. VON GÖTZ, F., 2010. See What You Eat—Broad GMO Screening with Microarrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 396(6), 1961-1967 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1007/s00216-009-3204-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3204-z>

58. VUCELIĆ-RADOVIĆ, B., LAZIĆ, D., NIKŠIĆ, M., 2019. *Application of Molecular Methods and Raman Microscopy/Spectroscopy in Agricultural Sciences and Food Technology* [online]. London: Ubiquity Press [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.5334/bbj. ISBN 9781911529521. Dostupné z: <https://www.ubiquitypress.com/site/books/10.5334/bbj/>
59. VIJAYAKUMAR, K. R., MARTIN, A., GOWDA, L. R., PRAKASH, V., 2009. Detection of Genetically Modified Soya and Maize: Impact of Heat Processing. *Food Chemistry* [online]. 117(3), 514-521 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609004889>
60. WATSON, R. R., PREEDY, V. R., 2016. *Genetically Modified Organisms in Food: Production, Safety, Regulation and Public Health*. Boston: Elsevier Science/Academic Press. ISBN 978-0-12-802259-7.
61. YANG, P. Ch., MAHMOOD, T., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 4(9), 429-434 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.4103/1947-2714.100998. Dostupné z: <http://www.najms.org/text.asp?2012/4/9/429/100998>
62. YILDIZ, M., AYCAN, M., PARK, S., 2016. New Approaches to Agrobacterium tumefaciens-Mediated Gene Transfer to Plants. In: JAMAL, F. (eds). *Genetic Engineering - An Insight into the Strategies and Applications* [online]. Croatia: InTech, 23-45 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.5772/66465. ISBN 978-953-51-2835-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/genetic-engineering-an-insight-into-the-strategies-and-applications/new-approaches-to-agrobacterium-tumefaciens-mediated-gene-transfer-to-plants>
63. ZHANG, Ch., WOHLHUETER, R., ZHANG, H., 2016. Genetically Modified Foods: A Critical Review of Their Promise and Problems. *Food Science and Human Wellness* [online]. 5(3), 116-123 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.fshw.2016.04.002. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213453016300295>

64. ZHOU, A. Q., 2010. Exploration of the Central Dogma at the Interface of Chemistry and Biology: 2010 Yale Chemical Biology Symposium. *Yale Journal of Biology and Medicine* [online]. 83(3), 131–133 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20885900/>

9. Seznam obrázků

Obrázek 1: Různé typy genových děl (Bio-rad.com. [online]. [cit. 2020-03-26].
Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf)

Obrázek 2: „Crown gall“ v cukrové řepě způsobený divokým (onkogenním) kmenem *Agrobacteria* (Yildiz et al., 2016).

Obrázek 3: Princip PCR (Rastogi, 2010).

Obrázek 4: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 1-4 (vlastní zdroj).

Obrázek 5: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 5-9 (vlastní zdroj).

Obrázek 6: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 10-15 (vlastní zdroj).

Obrázek 7: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 16-23 (vlastní zdroj).

Obrázek 8: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů genu pro zein u vzorků 24-30 (vlastní zdroj).

Obrázek 9: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenu obsaženého v kukuřici Bt11 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj).

Obrázek 10: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj).

Obrázek 11: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenu obsaženého v kukuřici T25 ve vzorcích ze sady 1 (vlastní zdroj).

Obrázek 12: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici T25, Bt11, Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 2 (vlastní zdroj).

Obrázek 13: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt176 a MON810 ve vzorcích ze sady 3 (vlastní zdroj).

Obrázek 14: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt11 a T25 ve vzorcích ze sady 3 (vlastní zdroj).

Obrázek 15: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici MON810 a T25 ve vzorcích ze sady 4 (vlastní zdroj).

Obrázek 16: Elektroforeogram amplifikovaných fragmentů transgenů obsažených v kukuřici Bt11 a Bt176 ve vzorcích ze sady 4 (vlastní zdroj).

10. Seznam zkratek

- GM — geneticky modifikovaný/á/é
- GMO — geneticky modifikovaný organismus
- mRNA — messenger RNA
- T-DNA — transferred DNA
- Bt — *Bacillus thuringiensis*
- DNA — deoxyribonukleová kyselina
- RNA — ribonukleová kyselina
- EP — Evropský parlament
- EU — Evropská unie
- USA — Spojené státy americké
- A. tumefaciens* — *Agrobacterium tumefaciens*
- ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay
- tzv. — tak zvaný
- tzn. — to znamená
- PAGE — elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- SDS — dodecylsírán sodný
- PVDF — polyvinylidenfluorid
- např. — například
- PCR — polymerázová řetězová reakce
- qPCR — kvalitativní PCR
- μg — mikrogram
- mg — miligram
- s — sekunda

min — minuta

cDNA — komplementární DNA

NIR — blízké infračervené záření

nm — nanometr

bp — párů bází

EtBr — etidium bromid

V — Volt

vz. — vzorek

č. — číslo