Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav výživy zvířat a pícninářství

Sledování transferu genetické informace z krmiva u vykrmovaných kuřat

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Mgr. Ing. Eva Mrkvicová, Ph.D.

Vypracovala:

Mgr. Michaela Matoušková

Brno 2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: Sledování transferu genetické informace z krmiva u vykrmovaných kuřat vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb.,o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.*

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne 29. 4. 2015

……

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Ing. Evě Mrkvicové, Ph.D. a svému konzultantovi Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za cenné rady a čas věnovaný osobním konzultacím.

Tato diplomová práce vznikla na základě řešení projektu TP IGA MENDELU v Brně 1/2014.

ABSTRAKT

Sledování transferu genetické informace z krmiva u vykrmovaných kuřat

Tato práce se zabývá detekcí zkonzumované rostlinné DNA v tělech pokusných brojlerů. Brojleři COBB 500 byli po 27 dní krmeni krmnými směsmi obsahujícími pšenici odrůdy Konini s purpurovým perikarpem, nebo běžnou pšenici odrůdy Bohemia. Na dalších 15 dní krmného pokusu byli převedeni na monodietu sestávající z výše uvedených odrůd pšenice. Následně byly odebrány vzorky krve a trusu brojlerů, z nichž byla izolována DNA. Tato DNA sloužila jako templát pro analýzu přítomnosti pšeničné DNA v krvi a trusu pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Hledané PCR produkty měly délku 558 bp a 174 bp. V žádném z 12 vzorků krve nebyly fragmenty pšeničné DNA detekovány. U vzorků trusu se nepodařilo analýzu metodou PCR provést, a to pravděpodobně kvůli přítomnosti komplexních polysacharidů rostlinného původu, které působí jako inhibitory PCR. Výsledky této studie ukazují, že pšeničná DNA byla v trávicím traktu brojlerů strávena a fragmenty DNA delší než testovaných 174 bp neproniky skrze epiteliální buňky trávicího traktu do krve brojlerů.

Klíčová slova: brojler, trávení DNA, detekce DNA, polymerázová řetězová reakce

ABSTRACT

Observing transfer of genetic information from fodder in broilers

This study deals with detection of consumed plant DNA in the bodies of experimental broilers. For 27days, COBB 500 broilers were fed by fodder containing Konini wheat variety with purple pericarp or common Bohemia wheat variety. For the next 15 days, the broilers were switched to monodiet – the fodder contained only Konini or Bohemia wheat variety. At the end of the experiment, samples of broiler blodd and excrement were taken and DNA was extracted from these samples. The extracted DNA was used as a template for polymerase chain reaction analysis (PCR). The sought-after PCR products were 558 bp and 174 bp long. Wheat DNA fragments were not detected in any of the 12 blood samples. The PCR analysis using DNA isolated from excrement samples could not be accomplished. The likely reason is that the DNA samples contain complex plant polysaccharides that inhibit PCR. The results of this study indicate that the wheat DNA was digested in the digestive system and that fragments of DNA longer that the tested 174 bp did not penetrate through epithelial cells of the digestive system to broiler blood.

Key words: broiler, DNA digestion, DNA detection, polymerase chain reaction

Obsah

1 ÚVOD....8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED....9
2.1 Kur domácí....9
2.1.1 Kur domácí jako pokusný organismus....9
2.1.2 Trávicí ústrojí kura....10
2.2 Pšenice setá....11
2.2.1 Pšenice jako potravina....12
2.2.2 Antokyany....13
2.3 Průnik DNA z krmiva do orgánů a tkání konzumenta....17
2.3.1 Trávení zkonzumované DNA....18
2.3.2 Příklady studií, v nichž rostlinná DNA nebyla detekována....19
2.3.3 Příklady studií, v nichž rostlinná DNA byla detekována....19
2.3.4 Příklady studií prováděných na kurech....20
2.3.5 Horizontální přenos genů....22
3 CÍL PRÁCE....23
4 MATERIÁL A METODIKA....24
4.1 Krmný pokus a získání vzorků krve a trusu brojlerů....24
4.1.1 Charakteristika krmného pokusu a odběr vzorků krve a trusu....24
4.1.2 Charakteristika použitých krmných směsí....25
4.2 Izolace DNA z krve brojlerů....27
4.3 Izolace DNA z krmiva....28
4.4 Izolace DNA z trusu....29
4.5 Polymerázová řetězová reakce....30
4.5.1 Výběr genů a primerů pšenice a brojlerů pro PCR....30
4.5.2 PCR a agarózová gelová elektroforéza....31
5 VÝSLEDKY....34
5.1 Izolace DNA z krve brojlerů....34
5.2 Izolace DNA z pšenice....35
5.3 Izolace DNA z trusu....36
5.4 Detekce DNA pšenice v krvi brojlerů pomocí PCR....36
5.4.1 Určení teploty nasedání primeru TaActin_pšenice....37
5.4.2 Detekce DNA pšenice v izolátu DNA z krve brojlerů....38
5.5 Detekce DNA pšenice v trusu brojlerů pomocí PCR....41
6 DISKUZE....45
6.1 Zpracování vzorků krve brojlerů....45
6.2 Primer TaActin_pšenice....46
6.3 Zpracování vzorků trusu a detekce DNA pšenice....46
6.4 Detekce DNA pšenice v krevních vzorcích....47
7 ZÁVĚR....49
8 POUŽITÁ LITERATURA....50
9 SEZNAM OBRÁZKŮ....59
10 SEZNAM TABULEK....60
11 SEZNAM ZKRATEK....61

1 ÚVOD

Transfer genetické informace z rostlinné potravy do tkání a orgánů konzumenta je v posledních letech intentzivně studovaným tématem. Bylo provedeno množství experimentů, které si kladly za cíl potvrdit nebo vyvrátit prostup rostinné DNA do krve a dalších orgánů a tkání pokusných organismů. Výsledky těchto experimentů jsou ovšem velice různorodé. V části studií rostlinná DNA v těle pokusných zvířat detekována nebyla, v části studií naopak byla zachycena v různých orgánech a oblastech trávicího traktu. Jako pokusné organismy se pro tyto experimenty nejčastěji využívají laboratorní potkani nebo myši, prasata, skot a v neposlední řadě i kur domácí. Vybrané studie byly provedeny dokonce i na lidských dobrovolnících.

Většina studií je prováděna na geneticky modifikovaných plodinách, které jsou součástí krmiv podávaných pokusným organismům. V naší práci byly místo geneticky modifikovaných plodin použity dvě odrůdy pšenice. První byla pšenice odrůdy Konini s purpurovým perikarpem, která je nyní testována jako nové potenciální krmivo pro zvířata a potravina pro člověka a která obsahuje vyšší množství antokyanů než běžné odrůdy pšenice. Druhou odrůdou byla běžně používaná pšenice Bohemia.

Jako pokusný organismus byl vybrán kur domácí, přesněji kohoutci brojlerových kuřat hybridní kombinace COBB 500. Tito brojleři byli během krmného pokusu převedeni na monodietu sestávající u první skupiny z pšenice odrůdy Konini a u druhé skupiny z pšenice odrůdy Bohemia. Význam převedení brojlerů na monodietu vyplývá z některých literárních zdrojů, které uvádí, že při detekci rostlinné DNA v organismu konzumenta záleží na množství zkonzumované rostlinné DNA. Z tohoto důvodu se jako nejvhodnější vstupní materiál pro analýzu jeví vzorky tkání a orgánů pokusných organismů, kteří byli krmeni pouze tím rostlinným druhem, jehož DNA je posléze v těchto vzorcích hledána. Po ukončení krmného pokusu byly vzorky krve a trusu brojlerů analyzovány pomocí metody PCR a pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledky analýzy jsou interpretovány ve vztahu k níže uvedeným literárním pramenům.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Kur domácí

Kur je pro člověka zdrojem potravy již po několik tisíciletí a s výzkumem v oblasti biologie je spojen už po několik století. Domestikace kura je datována do období 2 000 let př. n. l., její prvopočátky ovšem sahají až do období 6 000 let př. n. l. Nejbližším předkem domestikovaného kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) je kur bankivský (*Gallus gallus*), který je dodnes rozšířen v Asii (Fumihito et al., 1994).

2.1.1 Kur domácí jako pokusný organismus

Pravděpodobně poprvé byl kur použit jako modelový organismus už Aristotelem, který jako první popsal kuřecí embryo. Mezi další příklady vyuití kura k vědeckým pokusům lze zařadit například objev cirkulace krve (Harvey, 1628 in Burt, 2007), přenos infekce (Pasteur, 1880 in Burt, 2007), nebo popis plemen drůbeže (Darwin, 1868 in Burt 2007). Také genetika ptáků je úzce spojena s kurem domácím. Pojmy jako alely, vazba genů nebo epistáze byly definovány na základě pozorování morfologických znaků kura, jako např. barvy peří (Burt, 2007). Kur je také důležitým modelovým organismem ve výzkumu v oblasti imunologie a kuřecí embrya se využívají ke studiu vývoje obratlovců (Stern, 2005).

Počátky moderní genetiky ptáků jsou spojeny s rozvojem genetického vazbového mapování pomocí molekulárních markerů a s QTL – tzv. mapováním lokusů kvantitativních vlastností (Burt, 2007). Genové mapy kura byly využity k porovnávání s genovými mapami savců pro hledání syntenií mezi jejich genomy (Burt, 2005). Tyto mapy byly následně zpřesňovány pomocí fyzického a cytogenetického mapování (Burt, 2007).

Brzy po osekvenování lidského genomu, které bylo dokončeno v roce 2003, se přistoupilo k sekvenování genomu ptáků. Pro sekvenaci byla zvolena slepice kura bankivského *(Gallus gallus),* který je pokládán za nejbližšího předka domestikovaného kura; projekt byl dokončen roku 2004. Vybraná samice pocházela z inbrední linie, protože bylo žádoucí, aby se v sekvenovaném genomu nacházelo co největší množství

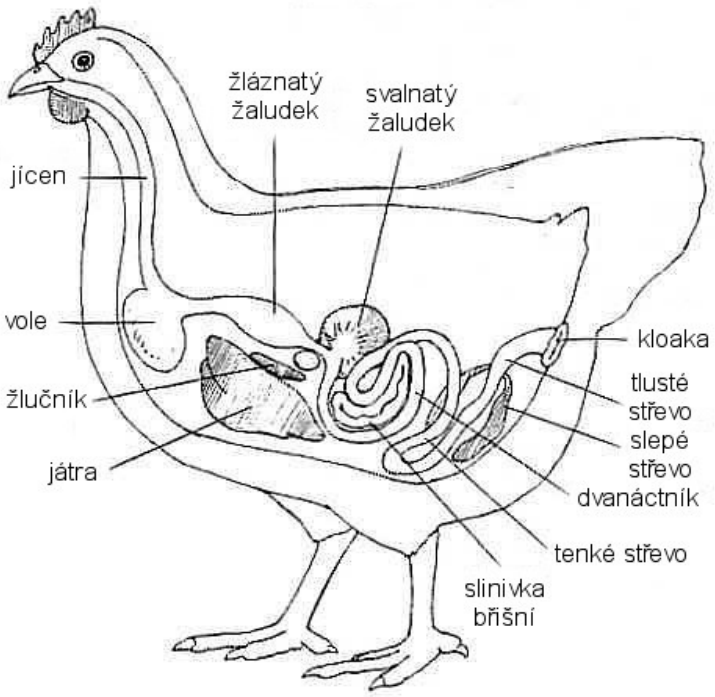
alel v homozygotní sestavě. V haploidním stavu genom tvoří 1,1 Gbp, což je zhruba třetinová velikost oproti savčím genomům, a počet genů se odhaduje na 20–23 tisíc. Karyotyp je tvořen 38 páry autozomů a jedním párem gonozomů (2n = 78), samice mají pohlaví heterogametické (ZW) a samci homogametické (ZZ) (Hillier et al., 2004; Burt, 2007).

Znalost sekvence genomu kura bankivského byla využita např. k fylogenetickým studiím. Dále je využívána při šlechtění např. k identifikaci jednonukleotidových polymorfismů (SNP), které napomáhají k vyhledávání potenciálních genetických markerů pro QTL. Kur se také používá jako modelový organismus pro výzkum některých humánních onemocnění, např. očních vad (Burt, 2007).

2.1.2 Trávicí ústrojí kura

Trávicí ústrojí kura odpovídá podobě trávicího ústrojí vyšších obratlovců. Schématicky je znázorněno na Obr. 1. Trávicí trubice začíná zobákovou dutinou, do níž ústí několik párů slinných žláz, které vylučují hlenovitý sekret – sliny. Slinné žlázy jsou nejvíce rozvinuté u ptáků konzumujících suchou stravu. U kura vyloučí denně 7-30 ml slin. Dále trávicí trubice pokračuje hltanem do jícnu, který se rozšiřuje ve vole. V něm dochází ke shromažďování a změkčování potravy, na niž působí enzymy ze slin (především amyláza a lipáza) spolu s enzymy obsaženými v potravě. Po voleti trávicí trubice pokračuje žaludkem, který se dělí na dvě části, žláznatý a svalnatý. Ve žláznatém žaludku dochází ke trávení potravy chemickou cestou. Nachází se zde žlázy produkující mucin, kyselinu chlorovodíkovou a pepsinogen, pH se zde pohybuje mezi 1,5–2,0. Pomocí pepsinu ve žláznatém žaludku probíhá štěpení proteinů na peptidy a aminokyseliny. Ve svalnatém žaludku je potrava zpracována mechanicky, pokračuje v něm trávení proteinů a částečně jsou zde tráveny lipidy a sacharidy. Antiperistaltickými pohyby se sem dopravuje pankreatická šťáva a trávení je dále podpořeno gritem – drobnými kaménky a pískem. Sliznice svalnatého žaludku je pokryta kutikulou, která ji chrání proti působení kyseliny chlorovodíkové a pepsinu. Za svalnatým žaludkem se nachází dvanáctník, do něhož ústí vývody slinivky břišní – enzymy, které slinivka produkuje, spolu se žlučí neutralizují kyselé pH tráveniny.

Dalšími oddíly jsou tenké a tlusté střevo; na rozdíl od savců se i v tlustém střevě nacházejí klky. Tlusté střevo se skládá ze dvou slepých střev a přímého střeva. Slepá střeva jsou u kura významně rozvinuta a probíhá v nich mikrobiální trávení sacharidů, které nebyly stráveny v tenkém střevě. Posledním oddílem trávicí trubice je kloaka, která tvoří společný vývod trávicího, močového a pohlavního ústrojí a dochází zde i k resorpci vody (Klasing, 1998; BioLib, 2014).



Obr.1 Trávicí ústrojí kura (Suwito, 2015, upraveno)

2.2 Pšenice setá

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejhojněji pěstovaných plodin na světě a zároveň jednou ze základních surovin pro výživu lidí a hospodářských zvířat. Je rovněž významným zdrojem látek s pozitivním vlivem na zdraví konzumentů – např. vlákniny, fenolických látek, antokyanů, tokoferolů a karotenoidů. Některé studie z poslední doby ukazují, že konzumace potravin vyrobených z celozrnné pšeničné mouky snižuje výskyt onemocnění jako je rakovina, ischemická choroba srdeční,

diabetes nebo obezita. Celozrnné pšeničné výrobky také snižují hodnoty lipoproteinů o nízké hustotě (LDL – low density lipoprotein) a triglyceridů (Dwyer, 1995; Adom et al., 2003; Eticha et al., 2011).

2.2.1 Pšenice jako potravina

Počátky pěstování pšenice sahají přibližně 10 000 let do minulosti a jsou spojovány s neolitickou revolucí, kdy se lidé místo lovu zvířat a sběru potravy začali usazovat na jednom místě a věnovali se zemědělství. Tato původní pěstovaná forma pšenice byla diploidní, jednalo se o *Triticum urartu* s genomem AA, nebo tetraploidní, která vznikla křížením *Triticum urartu* s trávou druhu *Aegilops speltoides* s genomem BB. Výsledkem bylo vyšlechtění druhu *Triticum turgidum* s genomem BBAA. Genetické analýzy ukazují, že tyto druhy pšenice pochází z oblasti dnešního jihovýchodního Turecka. Její pěstování se rozšířilo na Blízký východ zhruba před 9 000 lety a v té době se také objevila první hexaploidní pšenice s genomem BBAADD, která vznikla křížením *Triticum turgidum* s trávou druhu *Triticum tauschii* s genomem DD. Tato hexaploidní pšenice, *Triticum spelta,* byla předchůdcem dnešní *Triticum aestivum.* Dnes je 95 % pěstované pšenice na celém světě hexaploidní a zbývajících 5 % tvoří tetraploidní tvrdozrnná pšenice a některé další minoritní druhy (Dubcovsky a Dvorak, 2007; Shewry, 2009).

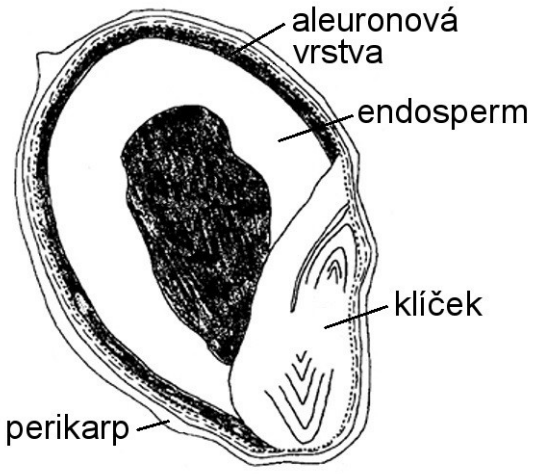
Genom pšenice tvoří 17 Gbp, což je přibližně pětinásobek velikosti savčího genomu, a odhaduje se, že obsahuje 124 000 genů (International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2014). Karyotyp je tvořen 21 páry chromozomů. V současné době probíhá sekvenování genomu pšenice, které by mělo být hotové do roku 2018. Předpokládá se, že znalost pšeničného genomu bude mít vliv na efektivitu výběru vhodných genetických markerů spojených s určitými vlastnostmi a na šlechtění pšenice celkově. Bude snad rovněž možné využít poznatku, že jednotlivé geny nacházející se na odpovídajících chromozomech třech subgenomů pšenice mají tendenci dominovat v odlišných pletivech, nebo v různých stádiích vývoje buňky (Pfeifer et al., 2014; Ledford, 2014).

Pšenice je primární pěstovanou surovinou a hlavní složkou potravy pro člověka

a zvířata ve více než 100 zemích světa. Obsahuje průměrně 12-14 % proteinu (konečné množství je mimo genotypu závislé i na podmínkách pěstování), 60-70 % škrobu, 1,5 % tuku, vitamíny (např. vitamín A, D, E, K, vitamíny skupiny B nebo vitamín C) a minerální látky (např. Fe, Zn, Cu, Mn nebo Se) (Burk a Solomons, 1985; Shewry, 2009). Výživová hodnota pšenice pro člověka je v posledních letech často diskutovanou otázkou. Historicky byla vždy v konzumaci upřednostňována bílá mouka před moukou celozrnnou. V posledních letech se ovšem tento trend otáčí a naopak začíná být preferována mouka celozrnná, která mimo endospermu obsahuje i klíček a otruby. Celozrnná mouka, v porovnání s moukou bílou, obsahuje vyšší množství antioxidantů a dalších prospěšných látek, např. nerozpustnou vlákninu (Shewry, 2009).

2.2.2 Antokyany

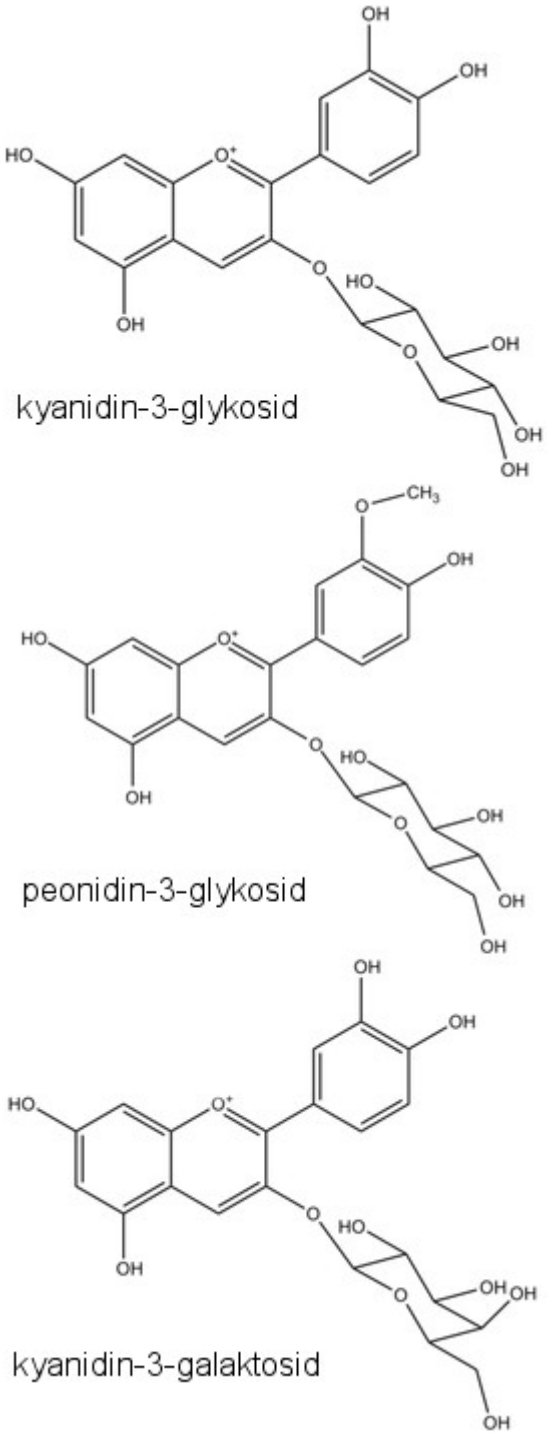
Antokyany jsou produkty rostlinného sekundárního metabolismu s antioxidační aktivitou. Způsobují zbarvení od modré přes purpurovou až po červenou barvu. U obilek pšenice se nacházejí v obalových vrstvách, modré pigmenty v aleuronu a purpurové pigmenty v perikarpu, viz Obr. 2 (Abdel-Aal et al., 1999; Slavin, 2004).



Obr. 2 Obilka pšenice (www.icrisat.org, upraveno)

Purpurové zbarvení obilek pšenice se odvozuje od tetraploidní pšenice, která pochází z oblasti dnešní Etiopie. Později byly geny způsobující purpurové zbarvení přeneseny do hexaploidní pšenice: v roce 1930 se purpurová zrna pšenice dostala z Etiopie do Plant Breeding Institute, Cambridge, UK na Novém Zélandu, kde byla křížena s komerčními hexaploidními varietami. Konečným výsledkem šlechtění bylo několik nových variet hexaploidní pšenice s purpurovými obilkami a mezi nimi i Konini (Zeven, 1991; Eticha et al., 2011).

Z pohledu chemické struktury patří antokyany mezi heteroglykosidy rozpustné ve vodě. Obsahují dvě části, složku barevnou (aglykon, nazývaný též antokyanidin) a složku cukernou, na níž je aglykon vázán glykosidickou vazbou (Čapounová, 2003). V pšenici s purpurově zbarvenými obilkami se v nejvyšší míře vyskytují kyanidin-3-glykosid, peonidin-3-glykosid a kyanidin-3-galaktosid (Abdel-Aal et al., 1999; Eticha et al., 2011). Jejich chemická struktura je znázorněna na Obr. 3.



Obr. 3 Antokyany v nejvyšší míře zastoupené v purpurových obilkách pšenice (www.polyphenols.com, upraveno)

Jak je uvedeno výše, purpurové zbarvení perikarpu bylo do běžné hexaploidní pšenice (*Triticum aestivum* L., genom BBAADD) přeneseno z purpurové tetraploidní

Triticum durum (genom BBAA) (Zeven, 1991; Tereschenko, 2011). Geny určující tuto vlastnost se označují *Pp* (purple pericarp). U *Triticum durum* je purpurové zbarvení zrna řízeno geny *Pp1* na chromozomu 7B, *Pp2* na 6A a *Pp3* na 2A. Později bylo zjištěno, že *Pp3* je tvořen dvěma alelami, které se značí *Pp3a* a *Pp3b* a mají komplementární účinek (Arbuzova a Maystrenko, 2000; Khlestkina et al., 2009). Dle Tereschenko et al. (2011) u *Triticum aestivum* s purpurově zbarvenými obilkami nese D genom jeden ze dvou komplementárních genů podmiňující jejich purpurové zbarvení. Tento gen byl lokalizován na krátkém raménku chromozomu 7D a autoři předpokládají, že je ortologní s genem pro purpurové zbarvení na chromozomu 7B u *Triticum durum*.

Zvyšování obsahu antokyanů v potravě je žádoucí pro jejich antioxidační účinky na organismus konzumenta, tedy pro jejich ochrannou funkci proti působení volných radikálů. Volné radikály reagují s DNA, lipidy a proteiny, a proto se považují za spouštěcí faktory různých onemocnění (Slavin, 2004). Antokyany tedy mají např. preventivní úlohu při vzniku rakoviny a srdečních chorob, zpevňují stěny cév, chrání buněčnou membránu před působením volných radikálů, mají antimutagenní účinky nebo podporují vstřebávání vitamínu C. V potravinách spočívá jejich úloha v tom, že je chrání před znehodnocením způsobeným oxidací, která se projevuje např. žluknutím přítomných tuků (Rückschloss et al., 2010). Předpokládá se, že využití antokyanů v jídelníčku by při pravidelné a dlouhodobé konzumaci mohlo mít příznivý účinek na lidské zdraví a některé odrůdy pšenice by mohly sloužit jako surovina pro výrobu funkčních potravin (Pokorný et al., 2001; Knievel et al., 2009).

Martinek et al. (2011) analyzovali využití purpurových odrůd pšenice pro produkci mouky s vyšším obsahem antokyanů. Výsledky analýz ukázaly, že do běžné mouky vyrobené z pšenic s purpurovým perikarpem se dostává jen malé množství barviv, protože mouka obsahuje především vnitřní část endospermu, kde převažují bílá škrobová zrna. Konzumace celozrnných pšeničných výrobků, které obsahují otruby, a tedy i tu část zrna, která obsahuje antokyany, by významně zvýšila příjem těchto přírodních antioxidantů u člověka (Dykes a Rooney, 2007).

Prozatím je pšenice s purpurovým perikarpem testována především jako krmivo pro hospodářská zvířata. Výsledky krmných testů uvádí např. pozitivní vliv zkrmování této pšenice na hmotnostní přírůstek slepic o 6,22 % a počet snesených vajec o 3,34 % (Rückschloss et al., 2010).

2.3 Průnik DNA z krmiva do orgánů a tkání konzumenta

Množství DNA, která je pozřena spolu s potravou, se u člověka pohybuje mezi 0,1 až 1 g na osobu a den. Obsahuje fragmenty rostlinných a živočišných genů v různých stupních degradace a bakteriální DNA. (Flachowsky et al., 2005). V zažívacím traktu dochází k průniku makromolekul ze střev do krevního řečiště – je tedy možné, že takto dochází i k průniku fragmentů zkonzumované DNA (Řehout et al., 2008). Byly provedeny studie, které měly průnik této DNA z trávicího traktu do dalších tkání a orgánů organismu potvrdit nebo vyvrátit. Výsledky vybraných studií budou uvedeny dále v této kapitole. Ačkoli se jejich závěry od sebe liší, tyto studie mají společné to, že detekují krátké fragmenty DNA a genů, ale jen minimum z nich se zabývá otázkou průniku dlouhých úseků zkonzumované DNA skrze trávicí trakt do dalších tkání a orgánů konzumenta (Spisák et al., 2013).

Většina těchto studií je prováděna s použitím geneticky modifikovaných (GM) rostlin, které slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata. Geneticky modifikované rostliny jsou takové rostliny, jejichž genetický materiál byl změněn za použití technik genetického inženýrství. Tyto rostliny dnes tvoří významnou část plodin dostupných na trhu. S rozvojem jejich pěstování se dostala do popředí otázka jejich bezpečnosti pro konzumenty – tzn. pro hospodářská a jiná zvířata, ale i pro člověka. Mezi nejrozšířenější plodiny patří ty, které jsou odolné proti herbicidům nebo proti hmyzu, jako např. *Bt* kukuřice. Hlavním cílem krmných pokusů s GM rostlinami je porovnání výživových hodnot s geneticky nemodifikovanými plodinami. Další, neméně důležitou otázkou, je možnost průniku rostlinné DNA do zvířecích tkání a případný vliv na konzumenty takového masa, mléka a vajec (Swiatkiewicz et al., 2010).

Jako pokusné organismy byli nejčastěji používáni laboratorní potkani nebo myši, kur (Einspanier et al., 2001; Aescherbacher et al., 2005; Sieradzki et al., 2013), prasata (Swiatkiewicz et al., 2010; Sieradzki et al., 2013) a skot (Einspanier et al., 2001; Phipps et al., 2003; Sieradzki et al., 2013), výjimečně byly vybrané studie provedeny na lidských dobrovolnících (Netherwood et al., 2004; Spisák et al., 2013).

2.3.1 Trávení zkonzumované DNA

DNA je přítomna v buňkách rostlin, živočichů i mikroorganismů, takže téměř každé krmivo a potravina DNA obsahují. Při konzumaci a trávení stravy v organismu dochází za pomoci trávicích šťáv a enzymů k degradaci jednotlivých složek potravy a k fragmentaci zkonzumované DNA. Veškerá DNA, ať je transgenní, nebo netransgenní, se skládá ze stejných stavebních jednotek, nukleotidů, které jsou citlivé ke stejným trávicím procesům (Aescherbacher et al., 2005).

Nejvyšší koncentrace neporušených molekul rostlinné DNA v těle kura je předpokládána ve voleti. Zde ovšem již začíná trávicí proces a DNA je degradována pomocí přítomných kyselin a enzymů. V dalších částech trávicího traktu, ve slinivce a tenkém střevě, dochází k produkci deoxyribonukleázy I, která hraje v další degradaci rostlinné DNA významnou roli. I když je následné trávení DNA ve střevech kura poměrně rychlé, DNA může být proti degradaci chráněna některými složkami potravy nebo přítomnými mikroorganismy. Možnost průniku fragmentů genů do epiteliálních buněk tenkého střeva a dále do organismu tedy nemůže být zcela vyloučena (Schubbert et al., 1994; Aescherbacher et al., 2005; Sieradzki et al., 2013). Dle Mazza et al (2005) je základní tkání, která by měla být v takto zaměřených studiích analyzována, krev pokusných organismů. Právě do ní přechází makromolekuly absorbované epiteliálními buňkami tenkého střeva a buňkami imunitního systému.

Analýzy zaměřené na průchod DNA gastrointestinálním traktem ukázaly, že fragmenty rostlinné DNA z potravy mohou být v trávenině detekovány. Rostlinná DNA tedy může z trávicího traktu proniknout do krevního řečiště, které ji přepraví do dalších orgánů. Tyto krátké fragmenty DNA pravděpodobně přetrvávají v celku v organismu jen po krátkou dobu a poté jsou degradovány (Schubbert et al., 1994, 1997, 1998). Mechanismus průniku DNA z tráveniny skrze epiteliální buňky trávicího traktu není zcela známý, ovšem předpokládá se, že rychlost degradace DNA souvisí s jejím navázáním na proteiny, kdy volná DNA je degradována rychleji. Aescherbacher et al. (2005) testovali přidáním proteinázy do krmiva rychlost degradace rostlinné DNA v trávicím traktu kura, ovšem výše uvedený předpoklad nepotvrdili.

2.3.2 Příklady studií, v nichž rostlinná DNA nebyla detekována

V části experimentů, které sledovaly výskyt rostlinné DNA v orgánech a tkáních krmených zvířat, nebyl průnik rostlinné DNA z gastrointestinálního traktu prokázán. Swiatkiewicz et al. (2010) použili jako pokusné organismy prasata a v jejich trávicím traktu, krvi a svalech analyzovali přítomnost amplikonů transgenních genů kukuřice a sóji. Fragmenty transgenu *Bt* kukuřice, genu *Cry*1A, o délce desítek až stovek párů bazí byly detekovány pouze v trávenině žaludku, dvanáctníku, slepého a tlustého střeva, ovšem nikoli v krvi nebo ve svalovině.

Sieradzki et al. (2013) se také zaměřili na transgeny z GM sóji a kukuřice, jejichž přítomnost zjišťovali v krvi, orgánech, obsahu trávicího traktu a vejcích u nosnic, brojlerů, prasat a telat. Rostlinná DNA byla detekována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Krátké fragmenty rostlinné DNA byly zjištěny v trávenině žaludku u všech pokusných druhů a ve dvanáctníku u prasat. V dalších částech trávicího traktu, exkrementech, krvi, játrech, slezině, pankreatu, ledvinách, plicích, vejcích a svalovině nebyla rostlinná DNA detekována.

2.3.3 Příklady studií, v nichž rostlinná DNA byla detekována

Některé studie naopak dokazují, že zkonzumovaná DNA z potravy není trávením zcela degradována a že malé fragmenty DNA mohou být nalezeny ve tkáních a orgánech daného konzumenta, nebo mohou být absorbovány mikroorganizmy střevní mikroflóry, či somatickými buňkami intestinálního traktu. Netherwood et al. (2004) provedli experiment s 21 lidskými dobrovolníky, do jejichž stravy zařadili GM sóju a následně detekovali pomocí kompetitivní PCR přítomnost transgenu *epsps* a netransgenního genu pro lecitin *Le1*. Ve střevním obsahu tenkého střeva byl transgen detekován, po průchodu tlustým střevem již jeho přítomnost nebyla prokázána.

Další experiment na lidských dobrovolnících provedli Spisák et al. (2013), kteří analyzovali více než 1 000 vzorků krve, v nichž za pomoci sekvenace přítomné DNA hledali fragmenty chloroplastové DNA. U více než 900 vzorků byla přítomnost chloroplastové DNA prokázána, autoři byli díky sekvenování dokonce schopni určit, ze kterých rostlin tato DNA nejčastěji pochází. Protože tato studie byla součástí

rozsáhlejšího výzkumu týkajícího se chorob gastrointestinálního traktu, autoři uvádí, že i když se koncentrace rostlinné DNA v krvi mezi jednotlivými vzorky výrazně liší, nejvyšší koncentrace zaznamenali u osob, které trpí zánětlivými onemocněními.

Analýzu přítomnosti transgenní a netransgenní DNA kukuřice a sóji provedli i Phipps et al. (2003), ovšem tentokrát byl experimentálním organismem skot. Autoři zjišťovali výskyt PCR produktů transgenního genu sóji *cp4epsps*, GM kukuřice *Cry*IA a genu pro Rubisco. Zatímco transgeny byly detekovány pouze v trávenině bachoru a dvanáctníku, fragmenty genu pro Rubisco byly nalezeny nejen v trávenině bachoru a dvanáctníku, ale i v mléku a výkalech, a velikost těchto fragmentů se pohybovala od 351 bp po 1176 bp.

2.3.4 Příklady studií prováděných na kurech

Einspanier et al. (2001) testovali přítomnost rostlinné DNA v různých tkáních a orgánech u brojlerů, nosnic a souběžně u skotu. Zvířata byla krmena běžnou kukuřicí a *Bt* kukuřicí obsahující rekombinantní gen z *Bacillus thuringiensis*. Oblastmi kukuřičného genomu, které byly hledány v orgánech drůbeže, byly fragmenty chloroplastové DNA a část genu *Cry*IA typického pro *Bt* kukuřici. Analýza byla provedena pomocí PCR. U brojlerů byla chloroplastová DNA detekována ve všech tkáních mimo krve a lymfocytů. Naopak části genu *Cry*IA nebyly prokázány v žádném vzorku. U nosnic byla analýza provedena navíc u vajec a trusu, výsledky byly totožné jako u brojlerů a ve vejcích a trusu nebyly chloroplastová DNA, ani *Cry*IA detekovány. U skotu byly chloroplastová DNA i *Cry*IA přítomny v chymu, nízké koncentrace chloroplastové DNA byly detekovány v mléce a lymfocytech. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 1. Autoři tuto rozdílnost výsledků vysvětlují především vlastnostmi gastrointestinálního traktu kura, který je poměrně krátký, takže DNA je při trávení degradována méně než u skotu.

Tab. 1 Detekce rostlinné chloroplastové DNA (199 bp) v živočišných tkáních pomocí PCR (Einspanier et al., 2001, upraveno)

Analyzovaná tkáň	**Kráva**	**Býk**	**Kur**
Lymfocyty	+	n. d.	n. d.
Krev	-	-	n. d.
Svalovina	n. d.	-	+
Játra	n. d.	-	+
Slezina	n. d.	-	+
Ledviny	n. d.	n. d.	+
Mléko	(+)	n. d.	n. d.
Vejce	n. d.	n. d.	-
Trávenina	+	n. d.	n. d.
Exkrementy	-	n. d.	-

Vysvětlivky: Analýza provedena na 17 vzorcích drůbeže, 5 býcích a 4 kravách; n. d. neurčováno, – nedetekováno, (+) slabý signál, + pozitivní signál.

Aescherbacher et al. (2005) také testovali přítomnost chloroplastové a transgennní DNA v tkáních a orgánech brojlerů a nosnic, kteří byli rozděleni do kontrolní skupiny (krmeni běžnou kukuřicí) a do skupiny experimentální (krmeni *Bt* kukuřicí). Pro detekci chloroplastové DNA zvolili fragment genu pro invertázu *ivr* a pro detekci rekombinantní DAN geny *bla* a *Cry*IA. Analýza byla provedena pomocí PCR a analyzovanými vzorky byla tkáň svalů, jater, sleziny, krev a dále vzorky tráveniny z různých částí trávicího traktu, exkrementy a vejce. Výsledky byly obdobné jako u výše zmíněného Einspanier et al. (2001). Chloroplastová DNA byla detekována ve vzorcích tráveniny až po tenké střevo, kde byl signál již velice slabý. Dále byla zjištěna v testovaných tkáních orgánů i ve svalovině a krvi. Ve vejcích a exkrementech detekována nebyla. Transgenní DNA z *Bt* kukuřice nebyla amplifikována v žádném z testovaných vzorků. Dle autorů je tento rozdíl v zjištění přítomnosti chloroplastové a transgenní DNA způsoben tím, že transgenní DNA se v krmivu v porovnání s netransgenní DNA vyskytuje v mnohem menší míře.

2.3.5 Horizontální přenos genů

Dalším tématem týkajícím se možného transferu DNA z krmiva do tkání daného organismu je otázka horizontálního přenosu genů, což je transfer genetického materiálu přímo do živé buňky nebo organismu. U plodin, které jsou součástí krmných směsí, se jedná o možný přenos rostlinné DNA na mikroorganismy střevní mikroflóry (Keese, 2008; Oraby et al., 2014). Horizontální přenos genů je zkoumán především v souvislosti s GM plodinami a analyzují se zejména vzorky tráveniny v jednotlivých částech trávicího traktu a exkrementy.

Experiment zaměřený na horizontální přenos genů byl součástí studie Sieradzki et al. (2013), kteří se zaměřili na střevní bakteriální mikroflóru brojlerů, nosnic, prasat a telat, jež byli krmeni GM sójou a kukuřicí. Analýza byla zaměřena na výskyt transgenní rostlinné DNA ve vzorcích DNA izolovaných z *Enterobacteriaceae* sp., ovšem v žádném ze vzorků se její přítomnost neprokázala. V dalších studiích, např. ve výše zmíněných Aescherbacher et al. (2005) a Einspanier et al. (2001), byly zkoumanými vzorky exkrementy pokusných zvířat, ovšem ani zde nebyla rostlinná DNA detekována.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je sledování transferu genetické informace ze zkrmované pšenice z trávicího traktu do tkání vybraného modelového organismu, a to kohoutků brojlerových kuřat. Tato diplomová práce je součástí krmného pokusu, při níž jsou vykrmovaní brojleři převedeni na monodietu sestávající u jedné skupiny z purpurové pšenice odrůdy Konini a u druhé skupiny z běžné pšenice odrůdy Bohemia. Hlavní náplní práce je izolace DNA ze vzorků krve a trusu brojlerů a analýza přítomnosti DNA pšenice v těchto vzorcích provedená pomocí metody PCR a agarózové gelové elektroforézy.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Krmný pokus a získání vzorků krve a trusu brojlerů

Analýza, jejímž účelem byla detekce pšeničné DNA v krvi a trusu brojlerů, byla součástí rozsáhlého krmného pokusu, který byl dále zaměřen na antioxidační aktivitu antokyanů obsažených v pšenici Konini s purpurově zbarveným perikarpem. Zvířata byla chována v souladu se zákonem č. 409/2008 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, na akreditovaném pracovišti, č. j. akreditace 57890/2012 – MZE – 17214 (platnost do 15.4.2015). V naší studii byly krev a trus jako testované vzorky vybrány na základě výše uvedených literárních zdrojů a s ohledem na dostupnost vzorků, které bylo možné získat při krmném pokusu.

4.1.1 Charakteristika krmného pokusu a odběr vzorků krve a trusu

K pokusu bylo použito 64 kohoutků brojlerových kuřat hybridní kombinace COBB 500 od věku dvanácti dnů. Brojleři byli označen křídelní známkou, zváženi a rozděleni do osmi klecí po osmi brojlerech tak, aby průměrná váha brojlerů v jednotlivých klecích byla vyrovnaná. Ve stáji byla regulována teplota a vlhkost vzduchu dle příručky chovu brojlerů COBB (COBB, 2008). Osvětlení ve stáji bylo nastaveno na 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Během celého krmného pokusu byli brojleři krmeni *ad libitum*. Každý den ve stejnou dobu bylo u jednotlivých klecí zváženo nespotřebované krmivo a navážena krmná dávka pro další den. Každý třetí den probíhalo kontrolní vážení jednotlivých brojlerů. Každý den také probíhal odběr vzorků trusu z jednotlivých klecí.

Brojleři byli rozděleni do dvou skupin po 32 brojlerech. V první části experimentu, která trvala 27 dnů, tedy do 39 dnů věku brojlerů, byla první skupina krmena krmnou směsí obsahující purpurovou pšenici Konini, druhá skupina byla krmena krmnou směsí s běžnou pšenicí Bohemia. Složení obou krmných směsí je podrobněji popsáno v následující kapitole.

V druhé části experimentu, která trvala 15 dní, tedy do 54 dnů věku brojlerů, byly obě skupiny převedeny na monodietu. První skupina byla krmena pouze

purpurovou pšenicí Konini a druhá skupina běžnou pšenicí Bohemia.

Na konci druhé části krmného pokusu, tedy celkově po 42 dnech od začátku první části krmného pokusu, v 54 dnech věku brojlerů, byla brojlerům odebrána krev z křídelní žíly do zkumavek obsahujících lithium heparin (Li HEPARIN 34 I. U.). Z těchto 64 vzorků bylo pro další analýzy náhodným výběrem vybráno dvanáct vzorků. U šesti vzorků byli daní brojleři krmeni purpurovou pšenicí Konini a u zbývajících šesti vzorků byli krmeni běžnou pšenicí Bohemia. Krevní vzorky byly pro následné analýzy uchovány při -20 ºC.

Jak bylo zmíněno výše, každý den probíhal odběr vzorků trusu. Vzorky byly odebírány z každé klece a uchovávány v Petriho miskách při -20 ºC pro další zpracování. Po ukončení krmného pokusu byly vzorky trusu lyofilizovány a v tomto stavu byly při laboratorní teplotě uchovány až do jejich použití pro izolaci DNA.

4.1.2 Charakteristika použitých krmných směsí

V první části experimentu, která trvala 27 dní, byli brojleři krmeni krmnou směsí, která u experimentální skupiny obsahovala purpurovou pšenici Konini a u kontrolní skupiny běžnou pšenici Bohemia. Pro účely této práce budou dále krmiva označována takto: Krmivo obsahující purpurovou pšenici Konini bude nazýváno Konini a krmení obsahující běžnou pšenici Bohemia bude pojmenováno Kontrola. V obou případech bylo složení krmné směsi následující – viz Tab. 2. Složení krmných směsí bylo vypočítáno podle Doporučeného obsahu živin v krmných směsích a výživné hodnoty krmiv pro drůbež (Zelenka a Heger, 2008).

Tab. 2 Složení krmné směsi Konini a krmné směsi Kontrola (data poskytnuta E. Mrkvicovou, Ústav výživy zvířat a pícninářství, Mendelova univerzita)

Složka krmné směsi	**Podíl složky v krmné směsi v %**
Pšenice	78
Sójový extrahovaný šrot	13,1
Pšeničný škrob	0,6
Dihydrogenfosforečnan vápenatý	0,7
Mletý vápenec	0,3
Řepkový olej	4
Premix minerálních látek a vitamínů	3,3

Dále bylo určeno živinové složení obou krmných směsí, procentuální zastoupení jednotlivých složek je uvedeno v Tab. 3. Pšenice odrůdy Bohemia a Konini obsahují rozdílné množství dusíkatých látek, u Konini je to 14,26 % a u Bohemia 11,94 %, krmná směs Kontrola obsahující pšenici Bohemia tedy byla doplněna lepkem na stejný obsah dusíkatých látek jako krmná směs Konini.

U obou odrůd pšenice bylo také spektrofotometricky určeno celkové množství antokyanů: pšenice Bohemia obsahuje 24,95 $mg.kg^{-1}$ antokyanů a pšenice Konini 41,70 $mg.kg^{-1}$ (data poskytnuta T. Vyhnánkem, Ústav biologie rostlin, Mendelova univerzita).

Tab. 3 Živinové složení krmné směsi Konini a krmné směsi Kontrola (data poskytnuta E. Mrkvicovou, Ústav výživy zvířat a pícninářství, Mendelova univerzita)

	Podíl živin v krmné směsi v %		**Přepočteno na absolutní sušinu v %**	
Živinová složka	**Konini (jen pšenice Konini)**	**Kontrola (pšenice Bohemia a lepek)**	**Konini (jen pšenice Konini)**	**Kontrola (pšenice Bohemia a lepek)**
Sušina	89,29	89,63	100	100
Popel	2,03	1,85	2,27	2,06
Dusíkaté látky	14,26	15,61	15,97	17,42
Tuk	1,62	1,59	1,81	1,77
Vláknina	2,63	2,31	2,95	2,57

V druhé části experimentu byli brojleři převedeni na monodietu. Experimentální skupina, která byla v první části experimentu krmena krmnou směsí Konini obsahující pšenici odrůdy Konini, byla nyní krmena pouze purpurovou pšenicí Konini. Kontrolní skupina, která byla v první části experimentu krmena krmnou směsí Kontrola obsahující běžnou pšenici odrůdy Bohemia, byla v druhé části experimentu krmena pouze touto běžnou pšenicí Bohemia doplněnou lepkem na stejný obsah dusíkatých látek jako pšenice odrůdy Konini. Po ukončení druhé části krmného testu byla brojlerům odebrána krev a brojleři byli poraženi.

4.2 Izolace DNA z krve brojlerů

Izolace DNA z krve brojlerů byla provedena kolonkovou metodou pomocí kitu Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) od výrobce Geneaid. Jednotlivé kroky izolace DNA vycházely z návodu výrobce kitu, ovšem některé části postupu byly optimalizovány a mimo reagencií z kitu byly navíc použity proteináza K a RNáza A.

V prvním kroku izolace DNA byla provedena lyze buněk: Po rozmražení vzorků bylo použito 10 µl vzorku krve, 600 µl RBC Lysis Buffer, 20 µl proteinázy K (koncentrace proteinázy K: 20 mg/ml), tato směs byla inkubována při laboratorní teplotě 10 minut, poté byla centrifugována a pelet byl resuspendován v 100 µl RBC Lysis Buffer. Do roztoku bylo přidáno 200 µl GB Buffer, reakční směs byla inkubována 1 h při 60 ºC a každé 3 minuty byla promíchána. Poté bylo přidáno 2 µl RNázy A (koncentrace RNázy A: 100 mg/ml).

V druhém kroku došlo k navázání DNA uvolněné z lyzovaných buněk na membránu kolony: Do reakční směsi bylo přidáno 200 µl absolutního ethanolu a vzniklá sraženina byla rozbita pipetou. Směs byla přenesena do kolony a zcentrifugována.

Ve třetím kroku byla DNA navázaná na membráně kolony promyta: Do kolony bylo přidáno 400 µl W1 Buffer, reakční směs byla zcentrifugována, promyta 600 µl Wash Buffer a opět zcentrifugována.

Ve čtvrtém kroku byla DNA uvolněna z membrány kolony do elučního pufru: Do středu kolony bylo napipetováno 100 µl předehřátého Elution Buffer a reakční směs

byla inkubována 3 minuty při laboratorní teplotě, poté byla zcentrifugována.

U získaných roztoků izolované DNA byla spektrofotometricky zjištěna jejich koncentrace a čistota a vzorky byly uchovány při -20 ºC pro další analýzy.

4.3 Izolace DNA z krmiva

Izolace DNA z krmiva byla provedena kolonkovou metodou pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit od výrobce QIAGEN. Jednotlivé kroky izolace DNA vycházely z příručky kitu (DNeasy Plant Handbook, 2012). Analyzovaným vzorkem byly obilky pšenice odrůdy Konini a obilky kontrolní pšenice odrůdy Bohemia, které byly použity při přípravě krmných směsí Konini a Kontrola pro krmný pokus.

V prvním kroku byla provedena lyze buněk a degradace proteinů a polysacharidů: Bylo naváženo 20 mg suchého rostlinného materiálu, ten byl zmražen v tekutém dusíku a zhomogenizován. K homogenátu bylo přidáno 400µl pufru AP1 a 2µl RNázy A (koncentrace RNázy A: 100 mg/ml). Reakční směs byla promíchána, inkubována 10 minut při 65°C a během inkubace ještě 3x promíchána. Poté bylo přidáno 130 µl pufru AP2, reakční směs byla promíchána a inkubována 5 minut při 0°C na ledu.

V druhém kroku došlo k navázání DNA uvolněné z lyzovaných buněk na membránu kolony: Reakční směs byla přenesena do kolony a zcentrifugována. Kapalná frakce byla přenesena do nové mikrozkumavky, bylo k ní přidáno 600 µl AP3/E pufru, postupně byla směs přenesena na kolonu a zcentrifugována.

Ve třetím kroku byla DNA navázaná na membráně kolony promyta: Do kolony bylo přidáno 500 µl pufru AW a reakční směs byla zcentrifugována. Tento krok byl ještě jedenkrát zopakován.

Ve čtvrtém kroku byla DNA uvolněna z membrány kolony do elučního pufru: Na membránu kolony bylo napipetováno 100 µl předehřátého AE pufru, reakční směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla zcentrifugována. Tento krok byl ještě jedenkrát zopakován.

U získaných roztoků izolované DNA byla spektrofotometricky zjištěna jejich koncentrace a čistota a vzorky byly uchovány při -20 ºC pro další analýzy.

4.4 Izolace DNA z trusu

Pro izolaci rostlinné DNA z trusu byly použity lyofilizované vzorky trusu, které byly odebrány v posledních dnech krmného pokusu: ve 33. a 34. dni. Tyto konkrétní dny byly zvoleny proto, aby byli brojleři krmeni pšenicí, co nejdéle to v rámci krmného pokusu bylo možné. Předpokládalo se, že pokud se pšeničná DNA vyskytuje v obsahu trávicho traktu a trusu v nedegradované formě, takto se maximalizuje pravděpodobnost její detekce ve vzorcích trusu. Celkem byla provedena izolace DNA osmi vzorků: u vzorků odebraných 33. den dva vzorky pocházely z klecí brojlerů krmených pšenicí Konini (v tabulce jako Konini) a dva z klecí krmených pšenicí Bohemia (v tabulce jako Kontrola). Stejně tomu bylo i u vzorků odebraných 34. den krmného pokusu. Tyto údaje jsou shrnuté v Tab. 4.

Tab. 4 Vzorky trusu pro izolaci rostlinné DNA

Den krmného pokusu	**Použité krmivo**
33	Konini
33	Konini
33	Kontrola
33	Kontrola
34	Konini
34	Konini
34	Kontrola
34	Kontrola

Při zpracování vzorků trusu byly vybrány větší soudržné části trusu a pro minimalizaci rizika kontaminace pšeničnou DNA při zpracování byly vzorky odebrány z prostřední části těchto částí. Při samotné izolaci rostlinné DNA bylo postupováno podle stejného protokolu jako při izolaci rostlinné DNA z obilek pšence, který je popsán v kapitole 4.3. Pouze v prvních krocích protokolu bylo vynecháno mražení vzorků v tekutém dusíku, protože vzorky již byly lyofilizované.

U získaných roztoků izolované DNA byla spektrofotometricky zjištěna jejich koncentrace a čistota a vzorky byly uchovány při -20 ºC pro další analýzy.

4.5 Polymerázová řetězová reakce

V kapitole 3.3, která se věnuje literárnímu přehledu v oblasti průniku DNA z krmiva do orgánů a tkání konzumentů, uvedení autoři používají pro detekci rostlinné DNA v orgánech a tkáních pokusných organismů dvě metody. Nejčastěji je využívána metoda PCR, v menší míře pak sekvenování buď amplikonů získaných pomocí PCR, nebo DNA izolované ze vzorků tkání, orgánů nebo obsahu tráveniny z gastrointestinálního traktu, kdy je pomocí sekvenování určován původ a druhová skladba DNA ve vzorku. Tato práce je zaměřena na detekci známého vzorku DNA v krvi a trusu brojlerů, konkrétně na DNA pšenice, a tak na základě výše uvedených teoretických poznatků byla zvolena detekce pšeničné DNA pomocí metody PCR.

4.5.1 Výběr genů a primerů pšenice a brojlerů pro PCR

Pro detekci DNA pšenice byly vybrány dva geny: gen pro pšeničný aktin (v textu značen jako *TaActin*) (Himi et al., 2011) a gen pro pšeničnou cytosolovou glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (v textu značen jako *GAPDH*) (Zhang et al., 2008). Dále byl pro účel pozitivní kontroly vzorků krve brojlerů vybrán gen pro GTP-cyklohydrolázu 1 (v textu značen jako *GCH1*) (Řehout et al., 2008). Výběr těchto konkrétních genů byl odvozen od tzv. provozních (neboli housekeepingových) genů. Pro tyto geny je charakteristické, že jejich exprese je konstantní jak v jednotlivých buňkách, tak v různých tkáních a pletivech daného organismu. Této vlastnosti se využívá např. i při real-time PCR, kdy provozní gen slouží jako referenční gen pro standardizaci analýzy (Jain et al., 2006).

Gen pro GTP-cyklohydrolázu 1 (*GCH1*) se u kura nachází na 5. chromozomu. V databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) je uveden pod kódem NP_990554.1. Gen pro pšeničný aktin (*TaActin*) se v databázi NCBI nachází pod kódem AB181991.1 a gen pro pšeničnou cytosolovou glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (*GAPDH*) je v NCBI uveden pod kódem AF251217.1.

Primery byly zakoupeny v lyofilizované formě, naředěny destilovanou vodou dle pokynů výrobce Metabion international AG a poté byly uchovány při -20 ºC.

Sekvence primerů získány z výše uvedené literatury týkající se provozních genů a společně s teplotou nasedání primerů (tzv. teplotou annealingu) použitou při PCR jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5 Použité primery pro PCR

Název primeru a organismu	**Primer přímý (F), zpětný (R)**	**Sekvence primeru (5'-3')**	**Teplota annealingu**	**Literatura**
GCH1_kur	F	ATCCCCAGGCAAACA TCCTC	60 ºC	Řehout et al. (2008)
GCH1_kur	R	CCTCGACATCCAGCT CACAT	60 ºC	
TaActin_pšenice	F	GAGGGATACACGCTT CCTCA	62 ºC	Himi et al. (2011)
TaActin_pšenice	R	GAAAGTGCTAAGAGA GGCCAAA	62 ºC	
GAPDH_pšenice	F	CGAAGCCAGCAACCT ATG	60 ºC	Zhang et al. (2008)
GAPDH_pšenice	R	CAAAGTGGTCGTTCA GAGCA	60 ºC	

Délky amplifikovaných fragmentů genů byly pomocí online aplikace Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) určeny u primeru GCH1_kur 776 bp, u TaActin_pšenice 558 bp a u GAPDH_pšenice 174 bp.

4.5.2 PCR a agarózová gelová elektroforéza

Pro amplifikaci fragmentů DNA s použitím výše jmenovaných primerů byly jako templátové vzorky DNA použity izoláty DNA z krve a trusu brojlerů, z pšenice Konini (značeno jako Konini) a z pšenice Bohemia (značeno jako Kontrola). Reakční směs pro PCR byla připravena v celkovém objemu 25 µl na jeden vzorek a její kompletní složení je uvedeno v Tab. 6. Jako DNA polymeráza byla použita Go Taq DNA Polymerase od výrobce Promega (koncentrace 5U/µl) a jako PCR pufr byl použit Green Go Taq Reaction Buffer od téhož výrobce (pH 8,5, obsahuje Mg^{2+} o koncentraci 7,5 mM).

Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR

Složka reakční směsi	**Objem složky v µl**
Deionizovaná H_2O	16,8
PCR pufr	5
Směs dNTP	0,1
Primer přímý	1
Primer zpětný	1
Taq polymeráza	0,1
Templátová DNA	1
Celkový objem	25

Samotná PCR probíhala za podmínek, které jsou uvedené v Tab. 7 a Tab. 8. Teplota nasedání primerů se u jednotlivých primerů lišila.

Tab. 7 Teplotní program PCR pro primery GCH1_kur a GAPDH_pšenice

Fáze PCR	**Teplota**	**Čas**	**Opakování**
Počáteční denaturace	94 ºC	3 min	-
Denaturace	94 ºC	30 s	30x
Annealing	60 ºC	45 s	
Elongace	72 ºC	60 s	
Konečná elongace	72 ºC	5 min	-
Chlazení	4 ºC	1 h	-

Tab. 8 Teplotní program PCR pro primer TaActin_pšenice

Fáze PCR	**Teplota**	**Čas**	**Opakování**
Počáteční denaturace	94 ºC	3 min	-
Denaturace	94 ºC	30 s	30x
Annealing	62 ºC	45 s	
Elongace	72 ºC	60 s	
Konečná elongace	72 ºC	5 min	-
Chlazení	4 ºC	1 h	-

Následně byl vznik PCR produktů ověřen pomocí agarózové gelové elektroforézy. Byl použit 1% agarózový gel, do něhož byl přidán ethidium bromid, a

100 bp marker od výrobce New England Biolabs obsahující fragmenty lineární DNA. Samotná agarózová gelová elektroforéza byla provedena na zařízení Agagel Maxi od výrobce Biometra.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z krve brojlerů

Prvním krokem v analýze přítomnosti DNA pšenice v krvi brojlerů byla izolace DNA z krevních vzorků. Pro tento účel byl vybrán kit Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) určený pro izolaci DNA z krevních buněk. Při izolaci bylo postupováno podle návodu kitu, ovšem některé kroky byly optimalizovány na základě výsledků ze zkušebních izolací.

První krok v optimalizaci procesu souvisí s izolací DNA, kdy při lyzi krevních buněk docházelo k tvorbě sraženiny, která přilnula na membránu kolony, a tak znemožnila navázání DNA na membránu a průchod lyzovaného obsahu krevních buněk skrze membránu do sběrné zkumavky. Proto bylo oproti 200 µl krve brojlerů, které je doporučované v návodu kitu, použito pro izolaci DNA jen 10 µl krve. Dále bylo do 600 µl RBC Lysis Buffer přidáno 20 µl proteinázy K (koncentrace 20 mg/ml), která napomohla efektivnější lyzi přítomných krevních buněk. Následně byla lyze buněk podpořena delší inkubací po přidání GB Buffer: v návodu kitu je uvedeno inkubovat vzorek při 60 ºC alespoň 10 minut, ovšem vzorek byl inkubován při uvedené teplotě 1 h a každé tři minuty byl promíchán převrácením zkumavky.

Výsledná koncentrace a čistota izolovaných vzorků DNA byla změřena spektrofotometricky, hodnoty jsou uvedeny v Tab. 9. Koncentrace izolované DNA se pohybovala přibližně od 110 ng/µl po 270 ng/µl, množství izolované DNA bylo tedy dostatečné pro následující analýzu pomocí PCR. Čistota DNA změřená spektrofotometricky a vyjádřená jako A280/260 se pohybovala přibližně od 1,6 po 1,7.

Tab. 9 Koncentrace a čistota DNA izolované z krve brojlerů

Číslo vzorku izolované DNA	**Varianta krmiva**	**Koncentrace DNA v ng/µl**	**A280/260**
1	Konini	148,1	1,660
2	Konini	111,5	1,629
3	Konini	129,1	1,647
4	Konini	142,0	1,665
5	Konini	140,2	1,657
6	Konini	266,5	1,694
7	Kontrola	102,0	1,714
8	Kontrola	212,9	1,683
9	Kontrola	264,0	1,696
10	Kontrola	191,3	1,669
11	Kontrola	127,9	1,630
12	Kontrola	114,3	1,650

5.2 Izolace DNA z pšenice

Dalším krokem v analýze přítomnosti DNA pšenice v krvi brojlerů byla izolace pšeničné DNA z pšenice odrůdy Konini (pro přípravu krmiva označeného Konini) a z odrůdy Bohemia (pro krmivo značené Kontrola). Koncentrace a čistota izolovaných vzorků DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje Picodrop, naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10 Koncentrace a čistota DNA izolované z pšenice odrůdy Konini a Bohemia

Varianta odrůdy pšenice (krmné směsi)	**Koncentrace DNA v ng/µl**	**A280/260**
Konini (Konini)	63,8	1,623
Bohemia (Kontrola)	43,3	1,559

5.3 Izolace DNA z trusu

DNA byla z lyofilizovaných vzorků trusu izolována za postupu vycházejícího z izolačního protokolu určeného pro izolaci rostlinné DNA. Koncentrace a čistota izolovaných vzorků DNA byla změřena spektrofotometricky, hodnoty jsou uvedeny v Tab. 11. Koncentrace izolované DNA byla poměrně nízká, pohybovala se od 3,9 ng/µl po 18,2 ng/µl. Čistota DNA změřená spektrofotometricky a vyjádřená jako A280/260 se pohybovala přibližně od 1,1 po 2,5.

Tab. 11 Koncentrace a čistota DNA izolované z trusu

Den krmného pokusu	**Varianta krmiva**	**Koncentrace DNA v ng/µl**	**A280/260**
33	Konini	7,2	1,766
33	Konini	18,2	1,289
33	Kontrola	3,9	2,520
33	Kontrola	14,4	1,055
34	Konini	13,2	1,074
34	Konini	6,9	1,877
34	Kontrola	11,2	1,072
34	Kontrola	9,5	1,321

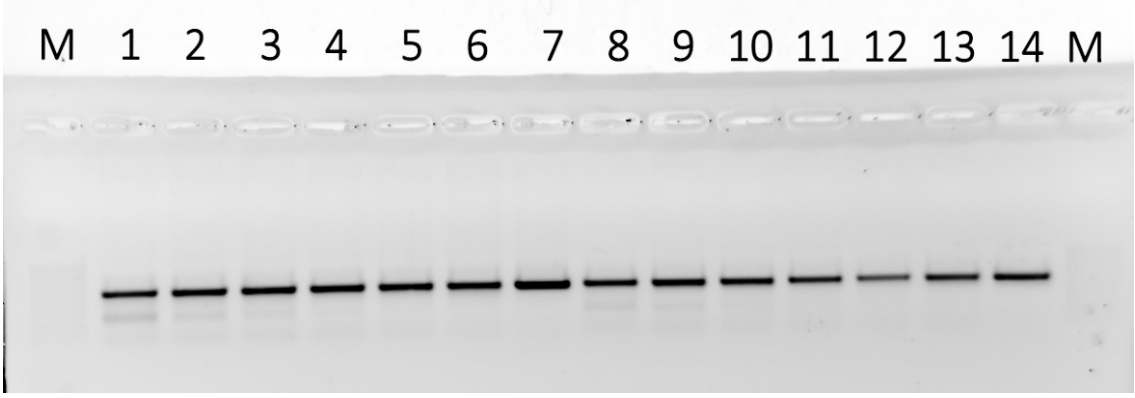
5.4 Detekce DNA pšenice v krvi brojlerů pomocí PCR

Pro detekci DNA pšenice v krvi brojlerů pomocí PCR byly vybrány dva pšeničné geny a k nim odpovídající primery, při jejichž použití byl amplifikován krátký fragment těchto genů: primer TaActin_pšenice a GAPDH_pšenice.

Celkem bylo analyzováno 12 izolátů DNA z krevních vzorků. Šest vzorků pocházelo od brojlerů krmených pšenicí odrůdy Konini (označováno jako Konini) a šest od brojlerů krmených pšenicí odrůdy Bohemia (označováno jako Kontrola). Dále byly jako kontrolní vzorky využity izoláty DNA z pšenice, a to jak z odrůdy Konini, tak z odrůdy Bohemia.

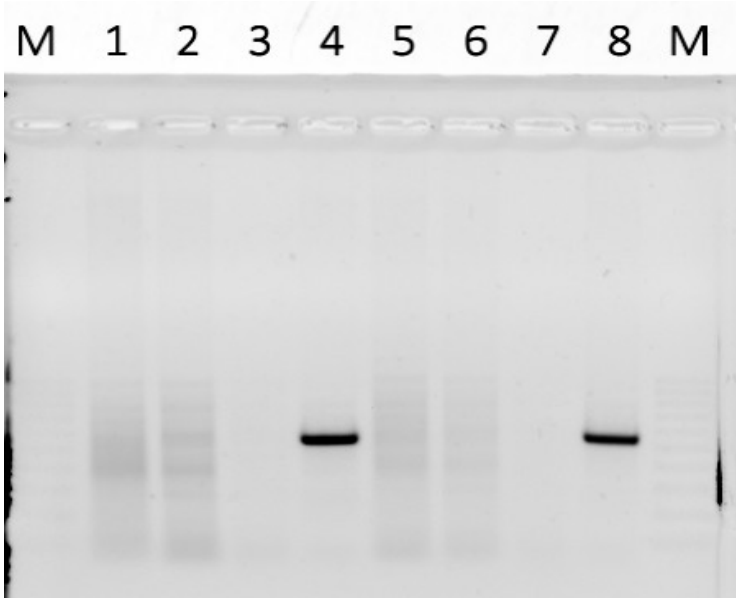
5.4.1 Určení teploty nasedání primeru TaActin_pšenice

Při prvotním ověřování funkčnosti a teploty nasedání primerů bylo nutné stanovit optimální teplotu annealingu pro TaActin, která nebyla v literatuře jednoznačně určena. K tomu byla využita gradientová PCR, při níž bylo testováno rozpětí teplot od 56 ºC po 62 ºC v intervalu 1 ºC. Testování bylo provedeno na izolátu DNA z pšenice odrůdy Konini (označováno jako Konini) i Bohemia (označováno jako Kontrola). Výsledky PCR byly ověřeny pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1% gelu, viz Obr. 4. Dále byla při další gradientové PCR otestována annealingová teplota 63 ºC a 64 ºC a toto testování bylo spojeno s prvotní analýzou přítomnosti pšeničné DNA v krvi brojlerů za pomocí primeru TaActin. Tato druhá gradientová PCR byla provedena na třech vzorcích DNA z krve brojlerů a DNA z pšenice odrůdy Konini, viz Obr. 5. Jako nejvhodnější annealingová teplota byla vybrána teplota 62 ºC.



Obr. 4 Agarózová gelová elektroforéza: templát: DNA pšenice, použitý primer: TaActin_pšenice, testovaná teplota annealingu: 56-62 ºC

M: hmotnostní marker 100 bp; vzorky č. **1-7** testovány na krmivu Konini, vzorky č. **8-14** testovány na krmivu Kontrola: **1:** 56 ºC, **2:** 57,2 ºC, **3:** 58 ºC, **4:** 59 ºC, **5:** 60 ºC, **6:** 61 ºC, **7:** 62 ºC, **8:** 56 ºC, **9:** 57,2 ºC, **10:** 58 ºC, **11:** 59 ºC, **12:** 60 ºC,**13:** 61 ºC, **14:** 62 ºC, **M:** hmotnostní marker 100 bp



Obr. 5 Agarózová gelová elektroforéza: templát: DNA brojlerů a pšenice, použitý primer: TaActin_pšenice, testovaná teplota annealingu: 63 ºC a 64 ºC

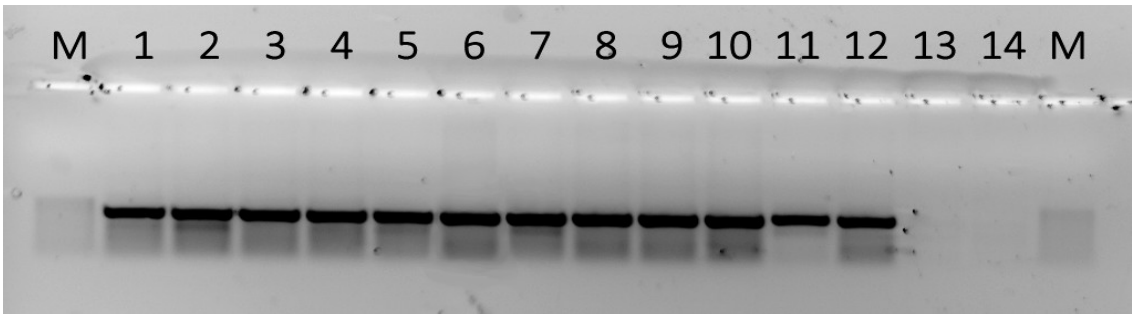
M: hmotnostní marker 100 bp; vzorky č. **1-4** testovány pro teplotu 63 ºC, vzorky č. **5-8** testovány pro teplotu 64 ºC: **1, 2, 3:** vzorky DNA z krve brojlerů, **4:** DNA z Konini, **5, 6, 7:** vzorky DNA z krve brojlerů, **8:** DNA z Konini, **M:** hmotnostní marker 100 bp

5.4.2 Detekce DNA pšenice v izolátu DNA z krve brojlerů

Po určení optimální teploty nasedání primeru TaActin_pšenice a ověření annealingových teplot primerů GAPDH_pšenice a GCH1_kur bylo přistoupeno k samotné analýze izolátů DNA z krve brojlerů pomocí PCR. Následující analýzy byly kvůli ověření správnosti výsledků prováděny ve třech opakováních na všech 12 vzorcích DNA z krve.

Nejprve bylo nutné ověřit, že izolace DNA z krve brojlerů byla provedena správně a DNA se podařilo izolovat. K tomu, kromě změření koncentrace DNA v izolátu, byla provedena analýza pomocí PCR, kde byla jako templátová DNA použita DNA izolovaná z krve brojlerů a DNA izolovaná z obou variant krmiv. Jako primer byl použit GCH1_kur. Výsledky jsou zobrazené na Obr. 6 agarózové gelové elektroforézy.

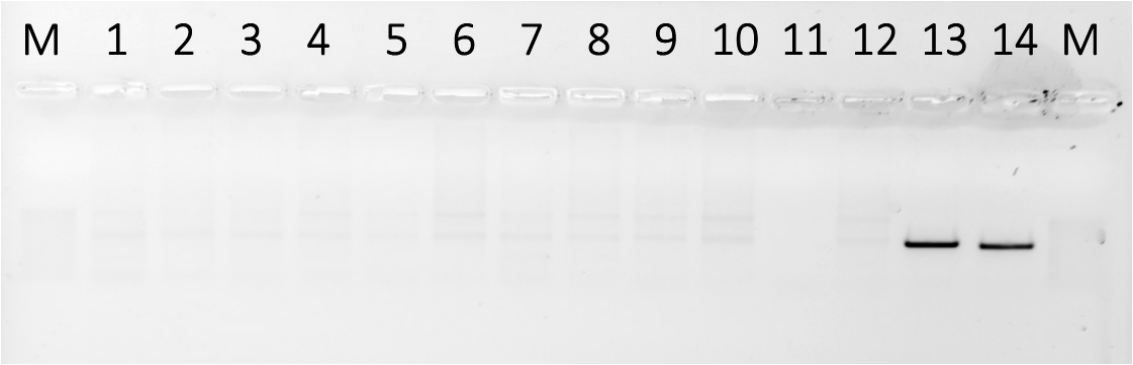
Vzorky č. 1-12 jsou izoláty DNA z krve brojlerů, č. 13 a 14 jsou izoláty pšeničné DNA z pšenice Konini (značeno Konini) a Bohemia (značeno Kontrola), které byly použity jako negativní kontrola správně provedené PCR. U vzorků č. 1-12 došlo k amplifikaci fragmentu genu *GCH1*, u vzorků č. 13 a 14 tento fragment podle očekávání amplifikován nebyl. Bylo tedy ověřeno, že ve vzorcích č. 1-12 se nachází DNA brojlerů, a tudíž byla izolace DNA z jejich krve provedena správně.



Obr. 6 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: GCH1_kur, délka PCR produktu: 776 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; brojleři **č. 1-6 krmeni Konini**, brojleři **č. 7-12 krmeni Kontrolou**: **1:** DNA č. 1; **2:** DNA č. 2; **3:** DNA č. 3; **4:** DNA č. 4; **5:** DNA č. 5; **6:** DNA č. 6; **7:** DNA č. 7; **8:** DNA č. 8; **9:** DNA č. 9; **10:** DNA č. 10; **11:** DNA č. 11; **12:** DNA č. 12; **13:** negativní kontrola, vzorek DNA z krmiva Konini; **14:** negativní kontrola, vzorek DNA z krmiva Kontrola; **M:** hmotnostní marker 100 bp

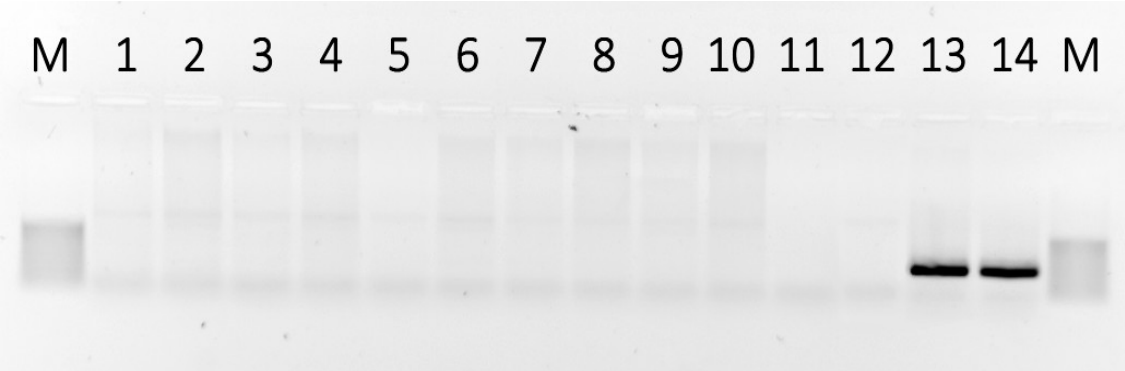
Dalším krokem byla samotná detekce pšeničné DNA v izolátech DNA z krve brojlerů. Tato analýza byla provedena s použitím dvou pšeničných primerů. Nejprve byla PCR provedena za použití primeru TaActin_pšenice. Vzorky č. 1-12 jsou izoláty DNA z krve brojlerů, č. 13 a 14 jsou izoláty pšeničné DNA z pšenice Konini (značeno Konini) a Bohemia (značeno Kontrola), které byly použity jako pozitivní kontrola správně provedené PCR a funkčnosti primeru. Jak je zřejmé z následujícího Obr. 7, u vzorků DNA z krve brojlerů nebyl hledaný fragment genu pšenice amplifikován, zatímco u vzorků DNA izolované z pšenice k amplifikaci došlo. Dá se tedy předpokládat, že fragment genu *TaActin* o délce větší než 558 bp v izolátu DNA z krve brojlerů není přítomen.



Obr. 7 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: TaActin_pšenice, délka PCR produktu: 558 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; brojleři **č. 1-6 krmeni Konini**, brojleři **č. 7-12 brojleři krmeni Kontrolou**: 1**:** DNA č. 1; **2:** DNA č. 2; **3:** DNA č. 3; **4:** DNA č. 4; **5:** DNA č. 5; **6:** DNA č. 6; **7:** DNA č. 7; **8:** DNA č. 8; **9:** DNA č. 9; **10:** DNA č. 10; **11:** DNA č. 11; **12:** DNA č. 12; **13:** pozitivní kontrola, vzorek DNA z krmiva Konini; **14:** pozitivní kontrola, vzorek DNA z krmiva Kontrola; **M:** hmotnostní marker 100 bp

Výsledky předchozí analýzy byly ověřeny metodou PCR s použitím druhého primeru GAPDH_pšenice, který poskytuje kratší PCR produkt. Opět jako vzorky č. 1-12 byly použity izoláty DNA z krve brojlerů a č. 13 a 14 byly izoláty pšeničné DNA z pšenice Konini (značeno Konini) a Bohemia (značeno Kontrola), které sloužily jako pozitivní kontrola správně provedené PCR a funkčnosti primeru. I v tomto případě u vzorků DNA z krve brojlerů nebyl hledaný fragment genu *GAPDH* amplifikován, zatímco u vzorků DNA izolované z pšenice k amplifikaci došlo – viz Obr. 8. I v tomto případě se dá předpokládat, že zjišťovaný fragment genu *GAPDH* o délce větší než 174 bp taktéž není v izolátu DNA z krve brojlerů přítomen.



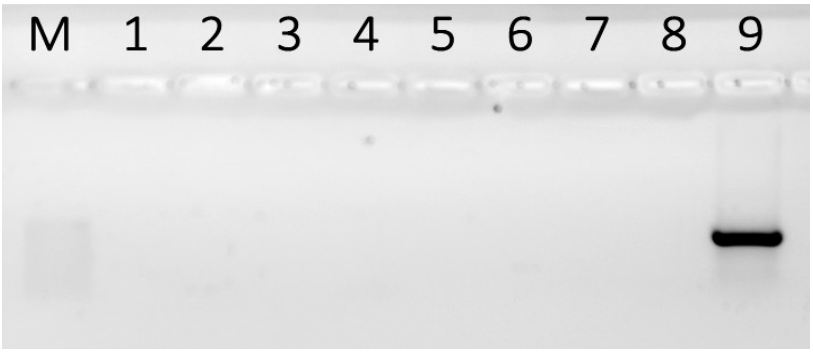
Obr. 8 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: GAPDH_pšenice, délka PCR produktu: 174 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; brojleři **č. 1-6 krmeni Konini**, brojleři **č. 7-12 krmeni Kontrolou**: 1**:** DNA č. 1; **2:** DNA č. 2; **3:** DNA č. 3; **4:** DNA č. 4; **5:** DNA č. 5; **6:** DNA č. 6; **7:** DNA č. 7; **8:** DNA č. 8; **9:** DNA č. 9; **10:** DNA č. 10; **11:** DNA č. 11; **12:** DNA č. 12; **13:** pozitivní kontrola, vzorek DNA z krmiva Konini; **14:** pozitivní kontrola, vzorek DNA z krmiva Kontrola; **M:** hmotnostní marker 100 bp

5.5 Detekce DNA pšenice v trusu brojlerů pomocí PCR

Mimo DNA izolované z krve brojlerů byla detekce přítomnosti pšeničné DNA také provedena na vzorcích trusu. Ten byl odebírán každý den krmného pokusu, ovšem pro tuto analýzu byly vybrány vzorky z posledních dnů krmného pokusu, tedy ze dne 33 a 34.

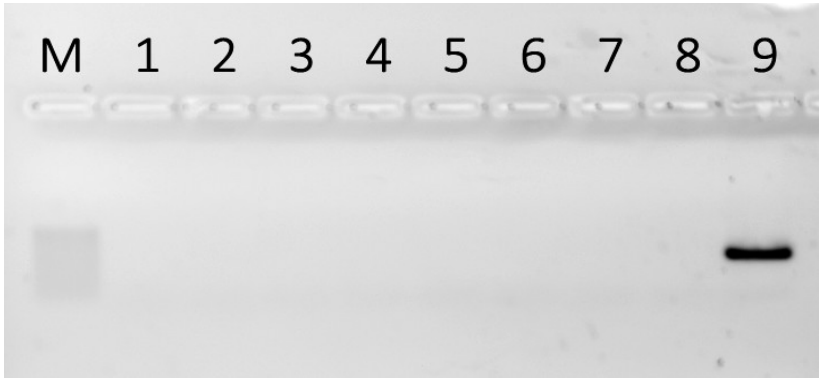
Nejprve byla provedena PCR s použitím primeru GCH1_kur. Jako templátová DNA sloužily izoláty DNA z trusu a jako pozitivní kontrola správně provedené PCR a funkčnosti primeru byl použit vzorek DNA z krve brojlera. Na Obr. 9 je patrné, že k amplifikaci segmentu genu *GCH1* u vzorků trusu nedošlo, amplifikace byla úspěšná pouze u kontrolního vzorku s templátovou DNA izolovanou z krve brojlera.



Obr. 9 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: GCH1_kur, délka PCR produktu: 776 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; **1:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 1; **2:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 2, **3:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **4:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **5:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 1, **6:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 2, **7:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **8:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **9:** pozitivní kontrola – DNA z krve brojlera, vzorek č. 233B

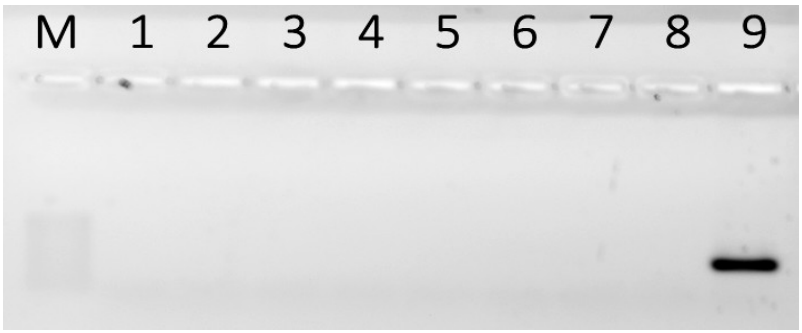
I přes negativní výsledek předchozí analýzy pomocí PCR byla provedena PCR testující přítomnost pšeničné DNA pomocí primeru TaActin_pšenice. Jak je vidět na Obr. 10, výsledek byl obdobný jako u předchozí analýzy. U templátových vzorků DNA z trusu k amplifikaci nedošlo, amplifikován byl pouze segment genu *TaActin* při použití templátového vzorku DNA izolovaného z pšenice odrůdy Konini.



Obr. 10 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: TaActin pšenice, délka PCR produktu: 558 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; **1:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 1; **2:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 2, **3:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **4:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **5:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 1, **6:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 2, **7:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **8:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **9:** pozitivní kontrola – DNA z Konini

Pro ověření předchozího negativního výsledku byla provedena PCR s použitím primeru GAPDH_pšenice, tkterý poskytuje kratší PCR produkt. I v tomto případě, jak je vidět na Obr. 11, při použití templátové DNA izolované ze vzorků trusu k amplifikaci požadovaného segmentu DNA nedošlo. Amplifikace byla úspěšná pouze u templátové DNA izolované z pšenice odrůdy Konini, která byla použita jako kontrolní vzorek.



Obr. 11 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: GAPDH_pšenice, délka PCR produktu: 174 bp

M: hmotnostní marker 100 bp; **1:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 1; **2:** 33. den, krmeno Konini, klec č. 2, **3:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **4:** 33. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **5:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 1, **6:** 34. den, krmeno Konini, klec č. 2, **7:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 3, **8:** 34. den, krmeno Kontrolou, klec č. 4, **9:** pozitivní kontrola – DNA z pšenice Konini

6 DISKUZE

6.1 Zpracování vzorků krve brojlerů

Při zpracování krevních vzorků je nutné zabránit vzniku sraženiny za pomoci antikoagulantů. Někteří autoři (např. García et al., 2002) nedoporučují použití heparinu v případě, že je krev dále analyzována pomocí PCR, protože heparin může inhibovat průběh PCR, místo heparinu doporučují použití EDTA. Naopak jiné studie (např. Lam et al., 2004) uvádí, že heparin a EDTA jsou v tomto případě rovnocenné a při použití heparinu k inhibici PCR nedochází. V této práci byly použity zkumavky obsahující lithium heparin (Li HEPARIN 34 I. U.), do nichž byla odebrána krev z křídelní žíly brojlerů. Dle García et al. (2002) závisí inhibiční účinky heparinu na PCR především na množství DNA v reakční směsi a na koncentraci heparinu ve vzorcích. V naší analýze se pohybovalo množství DNA izolované z krve brojlerů v jednom vzorku PCR směsi přibližně od 110 ng po 270 ng (konkrétní hodnoty viz Tab. 9 v kapitole 5.1), koncentrace heparinu v reakční směsi určována nebyla. Při těchto hodnotách množství DNA v reakční směsi PCR proběhla, což bylo ověřeno pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Při izolaci DNA z krve brojlerů bylo také nutné vyřešit vytváření sraženiny, která vznikala v počáteční fázi izolace při lyzi krevních buněk, přilnula k membráně kolony a znemožnila dokončení izolačního procesu. Pro izolaci DNA byl použit komerční kit Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) od výrobce Geneaid. Postup doporučený výrobcem kitu není optimalizován na krevní vzorky ptáků, proto bylo nutné jej upravit tak, aby sraženina nevznikala. Toho bylo docíleno snížením doporučeného vstupního objemu krevního vzorku na 10 µl a použitím proteinázy K ve fázi izolace, kdy probíhala lyze krevních buněk.

Výrobce kitu také doporučuje, aby pro případné zvýšení koncentrace izolované DNA v roztoku bylo použito menší množství elučního pufru, než je doporučených 100 µl. V tomto kroku izolace byl dodržen základní návod kitu a bylo použito 100 µl elučního pufru i přes to, že množství vzorku krve použité pro izolaci bylo dvacetinásnobně menší, než je v návodu kitu doporučeno. Erytrocyty brojlerů obsahují jádro, a tudíž byla koncentrace izolované DNA dostatečná i v 100 µl elučního pufru – pohybovala se přibližně od 110 ng/µl po 270 ng/µl. Čistota DNA změřená

spektrofotometricky a vyjádřená jako A280/260 se pohybovala přibližně od 1,6 po 1,7, vzorky tedy byly znečištěné přítomnými proteiny.

6.2 Primer TaActin_pšenice

Primer TaActin_pšenice odvozený od genu pro pšeničný aktin byl vybrán dle Himi et al. (2011), kde byl použit jako standard pro reverzně transkripční PCR. Protokol pro reverzně transkripční PCR Himi et al. (2011) převzali ze svého dřívějšího experimentu (Himi et al., 2004), kde použili teplotu nasedání primeru 58 ºC. Tuto teplotu jsme se rozhodli před dalšími analýzami ověřit pomocí gradientové PCR. Testovaný teplotní rozptyl se pohyboval mezi 56-64 ºC a testované teploty byly 56 ºC, 57,2 ºC, 58 ºC, 59 ºC, 60 ºC, 61 ºC, 62 ºC, 63 ºC a 64 ºC. Tyto konkrétní hodnoty teplot vycházely z možnosti nastavení gradientového termocykleru (QB-96 Quanta Biotech) a termocykleru použitého pro samotnou analýzu DNA z krve pomocí PCR (T3 Thermocycker Biometra). Po gradientové PCR byla provedena agarózová gelová elektroforéza a na jejím základě byla vybrána teplota annealingu dle intenzity pruhu produktu gradientové PCR a dle nepřítomnosti nespecifických produktů. Jako nejvhodnější teplota nasedání primeru byla vyhodnocena teplota 62 ºC.

6.3 Zpracování vzorků trusu a detekce DNA pšenice

Izolace DNA ze vzorků trusu byla provedena podle stejného protokolu jako izolace DNA z pšenice. Tento postup pomocí izolačního kitu určeného pro rostlinné vzorky byl zvolen proto, aby byly v trusu zachyceny případné fragmenty DNA pšenice. Koncentrace DNA izolované z trusu se pohybovala od 3,9 ng/µl po 18,2 ng/µl. Čistota DNA změřená spektrofotometricky a vyjádřená jako A280/260 se pohybovala přibližně od 1,1 do 2,5, izoláty tedy byly silně znečištěny. Následně byla provedena PCR, při níž se nepodařilo amplifikovat žádný fragment DNA, a to ani za použití primeru GCH1_kur, ani primerů TaActin_pšenice a GAPDH_psenice, i když vzorky použité jako pozitivní kontrola ukázaly, že PCR byla provedena správně. Monteiro et al. (1997),

který se věnoval analýze vzorků DNA izolovaných z exkrementů, uvádí, že tento typ vzorků je pro analýzu pomocí PCR obtížný na zpracování, protože exkrementy obsahují komplexní polysacharidy rostlinného původu, které působí při PCR jako inhibitory této reakce. Jako možné řešení navrhuje jejich hydrolýzu enzymatickou cestou před provedením PCR. Rossi et al. (2005) tento problém vyřešili použitím kitu určeného přímo na izolaci DNA ze vzorků exkrementů. Předpokládáme, že právě přítomnost těchto komplexních polysacharidů v trusu byla důvodem, proč PCR provedená na těchto vzorcích neproběhla.

6.4 Detekce DNA pšenice v krevních vzorcích

Jak je uvedeno ve výsledcích, přítomnost PCR produktů DNA pšenice v krvi brojlerů nebyla v našem experimentu prokázána. Abychom mohli vyloučit nesprávné provedení jednotlivých kroků analýzy a v případě krevních vzorků přítomnost inhibitorů PCR, v jejím průběhu se nacházelo několik kontrolních bodů, které napomohly tuto možnost minimalizovat. Postup a optimalizace izolace DNA z krve brojlerů byly již popsány výše v kapitolách věnujících se metodologii a diskuzi zpracování těchto vzorků.

Pro PCR byly vybrány primery odvozené od tzv. provozních genů: pšeničných genů *TaActin* a *GAPDH* a genu *GCH1* kura. Velikost amplikonů DNA pšenice je na základě prostudované literatury (viz Řehout et al., 2008, Zhang et al., 2008 a Himi et al., 2011) natolik malá, aby templátová DNA pocházející z pšenice nebyla fragmentovaná a v případě její přítomnosti ve vzorcích došlo k její amplifikaci: u genu *TaActin* se jedná o fragment o délce 558 bp a u genu *GAPDH* o 174 bp. Při samotné PCR byly vždy použity vzorky DNA z krve nebo pšenice jako pozitivní nebo negativní kontrola správně provedené analýzy. Při ověřování úspěšnosti izolace DNA z krve byly všechny vzorky otestovány pomocí primeru specifického pro kura, a zároveň byla jako negativní kontrola použita DNA izolovaná z pšenice. Při zjišťování přítomnosti pšeničné DNA v izolátu DNA z krve byly jako pozitivní kontrola správně provedené PCR použity vzorky DNA izolované z pšenice. Veškeré analýzy byly provedeny ve třech opakováních vždy se stejným výsledkem.

Einspanier et al. (2001), kteří ve své studii zachytili v orgánech brojlerů chloroplastovou DNA, uvádí, že detekovatelnost rostlinné DNA závisí na množství zjišťované DNA, kterou pokusný organismus v krmivu pozře, a na velikosti hledaného fragmentu DNA (v dané studii se jednalo o fragment velikosti 199 bp). Stejným způsobem vysvětluje shodné výsledky svého experimentu i Aescherbacher et al. (2005). Sieradzski et al. (2013) uvádí, že v krevních vzorcích pokusných organismů, mezi nimiž bylo i 96 slepic, fragmenty rostlinné DNA nenašli; ve své studii pracovali s PCR produkty o délce 118 bp. Naopak Rossi et al. (2005) detekovali v krevních vzorcích brojlerů fragmenty rostlinné DNA o délce 439 bp.

V naší studii byli brojleři v posledních 15 dnech krmného pokusu převedeni na monodietu. Dávka zjišťovaných genů v krmivu tedy byla vysoká, ovšem DNA pšenice nebyla v krevních vzorcích detekována. Hledané úseky genomu pšenice v krevních vzorcích měly délku 558 bp a 174 bp. Zjišťovaný fragment genu *TaActin* délky 558 bp byl pravděpodobně pro detekci pomocí PCR příliš dlouhý, zřejmě byl degradován při trávicích procesech. Pokud byl fragment genu *GAPDH* délky 174 bp v krevních vzorcích přítomen, mohl být dle výsledků Einspanier et al. (2001) a Rossi et al. (2005) detekován. Ovšem dle Sieradzski et al. (2013) byla jeho délka pro detekci v krvi příliš velká.

Spisák et al. (2013) uvádí ve své studii, která byla provedena na lidských dobrovolnících, že rostlinná DNA byla v krevních vzorcích detekována významně častěji, pokud v organismu daného člověka v době experimentu probíhal zánět. K podobnému závěru dospěl i Řehout et al. (2008), který uvádí, že výskyt rostlinné DNA v orgánech brojlerů může být ovlivněn právě probíhající infekcí.

Brojleři byli při krmném pokusu převedeni na monodietu, která trvala 15 dnů. Tento způsob výživy není pro jejich organismus příznivý, ovšem i přes to byla rostlinná DNA v jejich trávicím traktu degradována a v krevních vzorcích nebyla detekována.

7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na sledování transferu genetické informace ze zkrmované pšenice u vybraného modelového organismu, a to u kohoutků brojlerových kuřat. Byla součástí krmného pokusu, při němž byli vykrmovaní brojleři převedeni na monodietu, která u jedné skupiny sestávala z purpurové pšenice odrůdy Konini a u druhé skupiny z běžné pšenice odrůdy Bohemia. Metodika práce vychází z literatury uvedené v literárním přehledu.

Analýzy byly provedeny na dvou typech vzorků: na krvi brojlerů, která jim byla odebírána 15. den krmení monodietou, a na vzorcích trusu, které byly odebírány 13. a 14. den krmení monodietou. Krevních vzorků bylo analyzováno dvanáct, šest z nich pocházelo z brojlerů krmených pšenicí Konini a šest z nich z brojlerů krmených pšenicí Bohemia. Vzorků trusu bylo osm, vždy dva ze 13. dne od skupiny krmené Konini a dva od skupiny krmené Bohemia a totéž ze 14. dne krmení monodietou.

Analýza výskytu DNA pšenice ve vzorcích krve a trusu byla provedena pomocí metody PCR. K tomu byly využity dva pšeničné primery a pro kontrolu správného provedení izolace DNA z krve brojlerů a správného provedení PCR jeden primer kura. Analýzy byly provedeny ve třech opakováních a výsledky byly vyhodnoceny pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Výsledkem analýz je to, že v žádném ze vzorků krve nebyly fragmenty DNA pšenice detekovány. Protože během analýz odebraných krevních vzorků bylo provedeno několik kontrol, které měly minimalizovat riziko nesprávně provedených laboratorních metod, předpokládáme, že se v analyzovaných vzorcích fragmenty DNA pšenice delší než testovaných 174 bp nevyskytovaly. Ve vzorcích trusu nebyl výskyt DNA pšenice prokázán, protože PCR při analýze těchto vzorků neproběhla. To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností komplexních polysacharidů rostlinného původu v izolátech DNA z trusu, které působí jako inhibitory PCR. Pro získání výsledků i z této části analýzy by bylo nutné ji zopakovat a před provedením PCR tyto komplexní polysacharidy hydrolyzovat enzymatickou cestou, nebo použít izolační kit přímo určený pro vzorky exkrementů.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ABDEL-AAL E.-S.M. a HUCL P., 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry.* roč. 76, č. 3, s. 350-354. ISSN 0009-0352.

ADOM K. K., SORRELLS M. E. a LIU R. H., 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* roč. 51, č. 26, s. 7825-7834. ISSN 0021-8561.

AESCHBACHER K., MESSIKOMMER R., MEILE L. a WENK C., 2005. Bt176 corn in poultry nutrition: physiological characteristics and fate of recombinant plant DNA in chickens. *Poultry science*. roč. 84, č. 3, s. 385–394. ISSN 0032-5791.

ARBUZOVA V. S. a MAYSTRENKO O. I., 2000. Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. *Cereal Research Communications.* roč. 28, č. 2, s. 235-237. ISSN 1788-9170.

Aves: Profil taxonu. *BioLib.cz* [online]. [vid. 2015-03-31]. Dostupné z: http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8304/pos0,200/.

BURK R. F. a SOLOMONS N. W., 1985. Trace elements and vitamins and bioavailability as related to wheat and wheat foods. *American Journal of Clinical Nutrition*. roč. 41, č. 5 SUPPL., s. 1091–1102. ISSN 00029165.

BURT D. W., 2005. Chicken genome : Current status and future opportunities. *Genome Research*. roč. 15, s. 1692–1698. ISSN 1549-5469.

BURT D. W., 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry science*. roč. 86, č. 7, s. 1460–1471. ISSN 0032-5791.

COBB. *COBB Broiler Management Guide* [online]. 2008. [vid. 2015-03-27]. Dostupné z: http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-broiler-management-guide---english.pdf.

ČAPOUNOVÁ D., 2003. *Využití pektolytických enzymů při výrobě červeného vína*

[online]. [vid. 2015-03-29]. Brno. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Milan Drdák. Dostupné z: http://www.vutium.vutbr.cz/tituly/pdf/ukazka/80-214-2410-9.pdf.

DARWIN C. *The Variation of Plants and Animals under Domestication.* London (UK): John Murray, 1868. Dostupné také z: http://test.darwin-online.org.uk/converted/published/1868_Variation_F877/1868_Variation_F877.2.html.

DNeasy Plant Handbook. *www.qiagen.com* [online]. [vid. 2015-03-15]. Dostupné z: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en.

DUBCOVSKY J. a DVORAK J., 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science (New York, N.Y.)*. roč. 316, č. 5833, s. 1862–1866. ISSN 0036-8075.

DWYER J., 1995. Overview: Dietary Approaches for Reducing Cardiovascular Disease Risks. *The Journal of Nutrition.* č. 125, s. 656S-665S. ISSN 1541-6100.

DYKES L. a ROONEY L. W., 2007. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World*. roč. 52, č. 3, s. 105–111. ISSN 01466283.

EINSPANIER R., KLOTZ A., KRAFT J., AULRICH K., POSER R., SCHWÄGELE F., JAHREIS G. a FLACHOWSKY G., 2001. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *European Food Research and Technology*. roč. 212, č. 2, s. 129–134. ISSN 1438-2377.

ETICHA, F., H. GRAUSGRUBER, S. SIEBENHANDL-EHN a E. BERGHOFER, 2011. Some Agronomic and Chemical Traits of Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheat (Triticum L .). *Journal of Agricultural Science and Technology*. roč. 1, s. 48–58. ISSN 2345-3737.

FLACHOWSKY G., CHESSON A. a AULRICH K., 2005. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Archives of animal nutrition*. roč. 59, č. 1, s. 1–40.

ISSN 1745-039X.

FUMIHITO A., MIYAKE T., SUMI S., TAKADA M., OHNO S. a KONDO N., 1994. One subspecies of the red junglefowl (Gallus gallus gallus) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 91, č. 26, s. 12505–12509. ISSN 0027-8424.

GARCÍA M. E., BLANCO J. L., CABALLERO J. a GARGALLO-VIOLA D., 2002. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 40, č. 4, s. 1567–1568. ISSN 00951137.

HARWEY, W. *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et San- guinis in Animalibus*. Frankfurt, Germany: Guiliemi Fitzeri, 1628. Dostupné také z: www.google.cz/books?id=D69QAAAAcAAJ&ots=H18GqpcPl5&dq=Exercitatio%20Anatomica%20de%20Motu%20Cordis%20et%20San-%20guinis%20in%20Animalibus.&lr&hl=cs&pg=PP1#v=onepage&q=Exercitatio%20Anatomica%20de%20Motu%20Cordis%20et%20San-%20guinis%20in%20Animalibus.&f=false.

HILLIER L. W., MILLER W., BIRNEY E., WARREN W., HARDISON R. C., PONTING C. P., BORK P., BURT D. W., GROENEN M. A. M., DELANY M. E., DODGSON J. B., CHINWALLA A. T., CLIFTEN P. F., CLIFTON S. W., DELEHAUNTY K. D., FRONICK C., FULTON R. S., GRAVES T. A., KREMITZKI C., LAYMAN D., MAGRINI V., MCPHERSON J. D., MINER T. L., MINX P., NASH W. E., NHAN M. N., NELSON J. O., ODDY L. G., POHL C. S., RANDALL-MAHER J., SMITH S. M., WALLIS J. W., YANG S.-P., ROMANOV M. N., RONDELLI C. M., PATON B., SMITH J., MORRICE D., DANIELS L., TEMPEST H. G., ROBERTSON L., MASABANDA J. S., GRIFFIN D. K., VIGNAL A., FILLON V., JACOBBSON L., KERJE S., ANDERSSON L., CROOIJMANS R. P. M., AERTS J., van der POEL J. J., ELLEGREN H., CALDWELL R. B., HUBBARD S. J., GRAFHAM D. V., KIERZEK A. M., MCLAREN S. R., OVERTON I. M., ARAKAWA H., BEATTIE K. J., BEZZUBOV Y., BOARDMAN P. E., BONFIELD J. K., CRONING M. D. R., DAVIES R. M., FRANCIS M. D., HUMPHRAY S. J., SCOTT C. E., TAYLOR R. G., TICKLE C., BROWN W. R. A., ROGERS J., BUERSTEDDE J.-M., WILSON S. A., STUBBS L., OVCHARENKO I., GORDON L., LUCAS S., MILLER M. M., INOKO H.,

SHIINA T., KAUFMAN J., SALOMONSEN J., SKJOEDT K., WONG G. K.-S., WANG J., LIU B., WANG J., YU J., YANG H., NEFEDOV M., KORIABINE M., DEJONG P. J., GOODSTADT L., WEBBER C., DICKENS N. J., LETUNIC I., SUYAMA M., TORRENTS D., von MERING C., ZDOBNOV E. M., MAKOVA K., NEKRUTENKO A., ELNITSKI L., ESWARA P., KING D. C., YANG S., TYEKUCHEVA S., RADAKRISHNAN A., HARRIS R. S., CHIAROMONTE F., TAYLOR J., HE J., RIJNKELS M., GRIFFITHS-JONES S., URETA-VIDAL A., HOFFMAN M. M., SEVERIN J., SEARLE S. M. J., LAW A. S., SPEED D., WADDINGTON D., CHENG Z., TUZUN E., EICHLER E., BAO Z., FLICEK P., SHTEYNBERG D. D., BRENT M. R., BYE J. M., HUCKLE E. J., CHATTERJI S., DEWEY C., PACHTER L., KOURANOV A., MOURELATOS Z., HATZIGEORGIOU A. G., PATERSON A. H., IVARIE R., BRANDSTROM M., AXELSSON E., BACKSTROM N., BERLIN S., WEBSTER M. T., POURQUIE O., REYMOND A., UCLA C., ANTONARAKIS S. E., LONG M., EMERSON J. J., BETRÁN E., DUPANLOUP I., KAESSMANN H., HINRICHS A. S., BEJERANO G., FUREY T. S., HARTE R. A., RANEY B., SIEPEL A., KENT W. J., HAUSSLER D., EYRAS E., CASTELO R., ABRIL J. F., CASTELLANO S., CAMARA F., PARRA G., GUIGO R., BOURQUE G., TESLER G., PEVZNER P. A., SMIT A., FULTON L. A., MARDIS E. R. a WILSON R. K., 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. roč. 432, č. 7018, s. 695–716. ISSN 0028-0836.

HIMI E. a NODA K., 2004. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression. *Journal of Experimental Botany*. roč. 55, č. 396, s. 365–375. ISSN 00220957.

HIMI E., MAEKAWA M. a NODA K., 2011. Differential expression of three flavanone 3-hydroxylase genes in grains and coleoptiles of wheat. *International Journal of Plant Genomics*. roč. 2011. ISSN 16875370.

International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) genome. *Science (New*

York, N.Y.). roč. 345, č. 6194, s. 1251788-1-1251788-11. ISSN 1095-9203.

JAIN M., NIJHAWAN A., TYAGI A. K. a KHURANA J. P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. roč. 345, s. 646–651. ISSN 0006291X.

KEESE, P., 2008 Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environmental Biosafety Research.* roč. 7, č. 3, s. 123-149. ISSN 1635-7922.

KHLESTKINA E. K., RÖDER M. S. a BÖRNER A., 2009. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (Triticum durum L.). *Euphytica*. roč. 171, č. 1, s. 65–69. ISSN 00142336.

KLASING K. C. *Comparative avian nutrition.* Wallingford (UK): Cab International, 1998. ISBN 0-85199-219-6.

KNIEVEL D. C., ABDEL-AAL E. S. M., RABALSKI I., NAKAMURA T. a HUCL P., 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (Triticum aestivum L.). *Journal of Cereal Science.* roč. 50, č. 1, s. 113-120. ISSN 0733-5210.

LAM N. Y. L., RAINER T. H., CHIU R. W. K. a LO Y. M. D., 2004. EDTA is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clinical Chemistry*. roč. 50, č. 1, s. 256-257. ISSN 0009-9147.

LEDFORD H., 2014. Fiendish wheat genome reveals grain's history. *Nature* [online]. [vid. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.nature.com/news/fiendish-wheat-genome-reveals-grain-s-history-1.15577#/ref-link-4.

MARTINEK, P., VYHNÁNEK T., PODHORNÁ J., NOVOTNÁ P., VACULOVÁ K., KADLÍKOVÁ M., JIRSA O. a KUREČKA R, 2001. Pšenice s odlišným zabarvením zrna a možnosti jejich využití v potravinářství. Úroda 12, vědecká příloha, s.117-123. ISSN 0139-6013.

MAZZA R., SOAVE M., MORLACCHINI M., PIVA G. a MAROCCO A., 2005. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Research*. roč. 14, č. 5, s. 775–784. ISSN 09628819.

MONTEIRO L., BONNEMAISON D., VEKRIS A., PETRY K. G., BONNET J., VIDAL R., CABRITA J. a MÉGRAUD F., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 35, č. 4, s. 995–998. ISSN 00951137.

NETHERWOOD T., MARTÍN-ORÚE S. M., O'DONNELL A. G., GOCKLING S., GRAHAM J., MATHERS J. C. a GILBERT H. J., 2004. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature biotechnology*. roč. 22, č. 2, s. 204–209. ISSN 1087-0156.

Obilka pšenice. *Icrisat.com* [online]. [vid. 2015-03-29]. Dostupné z: http://www.icrisat.org/text/research/grep/homepage/sgmm/Caryopsis.jpg.

ORABY H. A. S., KANDIL M. M. H., HASSAN A. A. M. a AL-SHARAWI H. A., 2014. Addressing the issue of horizontal gene transfer from a diet containing genetically modified components into rat tissues. *African Journal of Biotechnology.* roč. 13, č. 48, s. 4410-4418. ISSN 1684-5315.

PASTEUR, L., 1880. Sur les maladies virulentes et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera des poules. *Comptes rendus de l'Aacadémie des sciences.* č. 90, s. 242-248.

PHIPPS R. H., DEAVILLE E. R. a MADDISON B. C., 2003. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. roč. 86, č. 12, s. 4070–4078. ISSN 0022-0302.

PFEIFER M., KUGLER K. G., SANDVE S. R., ZHAN B., RUDI H., HVIDSTEN T. R. a OLSEN O. A., 2014. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. *Science.* vyd. *345, č.*6194, s. 285-287. ISSN 1095-9203.

POKORNÝ J., YANISHLIEVA N. a GORDON M.. *Antioxidants in food: practical applications*. Cambridge (UK): Elsevier, 2001. ISBN 0-8493-1222-1.

Polyphenols: products [online]. [vid. 2015-03-28]. Dostupné z: http://www.polyphenols.com/products/category111.html.

ROSSI F., MORLACCHINI M., FUSCONI G., PIETRI a, MAZZA R. a PIVA G., 2005. Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. *Poultry science*. roč. 84, s. 1022–1030. ISSN 0032-5791.

RÜCKSCHLOSS Ľ., MATÚŠKOVÁ K., HANKOVÁ A. a JANČÍK D., 2010. Vplyv pšenice s purpurovou farbou zrna na parametre úţitkovosti nosníc a kvalitu vajec. *Potravinárstvo – Journal of Food Science.* roč. 3, č. 4, s. 231-235. ISSN 1750-3841.

ŘEHOUT, V., HANUSOVA L., KADLEC, J., ČÍTEK, J. a HOSNEDLOVÁ B., 2008. Detection of DNA fragments from roundup ready soya and Bt maize in organs of broilers. *Journal of Agrobiology.* č. 25, s. 145-148. ISBN 0851994296.

SHEWRY P. R., 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*. roč. 60, č. 6, s. 1537–1553. ISSN 00220957.

SCHUBBERT R., LETTMANN C. a DOERFLER W., 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular and General Genetics.* č. 5, s. 495-504. ISSN 0026-8925.

SCHUBBERT R., RENZ D., SCHMITZ B. a DOERFLER W., 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 94, č. 3, s. 961–966. ISSN 0027-8424.

SCHUBBERT R., HOHLWEG U., RENZ D. a DOERFLER W., 1998. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: Chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Molecular and General Genetics*. roč. 259, č. 6, s. 569–576. ISSN 00268925.

SIERADZKI Z., MAZUR M., KWIATEK K., ŚWIĄTKIEWICZ S., ŚWIĄTKIEWICZ M., KORELESKI J., HANCZAKOWSKA E., ARCZEWSKA-WŁOSEK a. a GOLDSZTEJN M., 2013. Assessing the possibility of genetically modified DNA transfer from GM feed to broiler, laying hen, pig and calf tissues. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. roč. 16, č. 3, s. 435–441. ISSN 1505-1773.

SLAVIN J., 2004. Whole grains and human health. *Nutrition research reviews*. roč. 17, č. 1, s. 99–110. ISSN 0954-4224.

SPISÁK S., SOLYMOSI N., ITTZÉS P., BODOR A., KONDOR D., VATTAY G., BARTÁK B. K., SIPOS F., GALAMB O., TULASSAY Z., SZÁLLÁSI Z., RASMUSSEN S., SICHERITZ-PONTEN T., BRUNAK S., MOLNÁR B. a CSABAI I., 2013. Complete Genes May Pass from Food to Human Blood. *PLoS ONE*. roč. 8, č. 7, s. 1–12. ISSN 19326203.

STERN C. D., 2005. The chick: A great model system becomes even greater. *Developmental Cell*. roč. 8, č. 1, s. 9–17. ISSN 15345807.

SUWITO, C. Digestive system. In *Photobucket* [online]. [vid. 2015-03-25]. Dostupné z: http://s144.photobucket.com/user/cindy_suwito/media/chkdigsys.jpg.html.

SWIATKIEWICZ S., TWARDOWSKA M., MARKOWSKI J., MAZUR M., SIERADZKI Z. a KWIATEK K., 2010. Fate of Transgenic DNA from Bt Corn and Roundup Ready Soybean Meal in Broilers Fed GMO Feed. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. roč. 54, s. 237–242. ISSN 0042-4870.

TERESHCHENKO O. Y., GORDEEVA E. I., ARBUZOVA V. S., BÖRNER a. a KHLESTKINA E. K., 2012. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. *Cereal Research Communications*. roč. 40, č. 3, s. 334–341. ISSN 0133-3720.

ZELENKA J. a HEGER J. *Doporučený obsah živin v krmných směsích a výživná hodnota krmiv pro drůbež: Recommended nutrient content in poultry diets and nutritive value of feeds for poultry.* Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007, 78 s. ISBN 978-80-7375-091-6.

ZEVEN A. C., 1991. Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica.* roč. 56, č. 3, s. 243-258. ISSN 1573-5060.

ZHANG J., HUANG S., FOSU-NYARKO J., DELL B., MCNEIL M., WATERS I., MOOLHUIJZEN P., CONOCONO E. a APPELS R., 2008. The genome structure of the 1-FEH genes in wheat (Triticum aestivum L.): New markers to track stem carbohydrates and grain filling QTLs in breeding. *Molecular Breeding*. roč. 22, s. 339–351. ISSN 13803743.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1 Trávicí ústrojí kura str. 11

Obr. 2 Obilka pšenice str. 13

Obr. 3 Antokyany v nejvyšší míře zastoupené v purpurových obilkách pšenice str. 15

Obr. 4 Agarózová gelová elektroforéza: templát: DNA pšenice, použitý primer: TaActin_pšenice, testovaná teplota annealingu: 56-62 ºC str. 37

Obr. 5 Agarózová gelová elektroforéza: templát: DNA brojlerů a pšenice, použitý primer: TaActin_pšenice, testovaná teplota annealingu: 63 ºC a 64 ºC str. 38

Obr. 6 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: GCH1_kur, délka PCR produktu: 776 bp str. 39

Obr. 7 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: TaActin_pšenice, délka PCR produktu: 558 bp str. 40

Obr. 8 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z krve brojlerů, použitý primer: GAPDH_pšenice, délka PCR produktu: 174 bp str. 41

Obr. 9 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: GCH1_kur, délka PCR produktu: 776 bp str. 42

Obr. 10 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: TaActin pšenice, délka PCR produktu: 558 bp str. 43

Obr. 11 Agarózová gelová elektroforéza: DNA z trusu brojlerů, použitý primer: GAPDH_pšenice, délka PCR produktu: 174 bp str. 44

10 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Detekce rostlinné chloroplastové DNA (199 bp) v živočišných tkáních pomocí PCR str. 21

Tab. 2 Složení krmné směsi Konini a krmné směsi Kontrola str. 26

Tab. 3 Živinové složení krmné směsi Konini a krmné směsi Kontrola str. 26

Tab. 4 Vzorky trusu pro izolaci rostlinné DNA str. 29

Tab. 5 Použité primery pro PCR str. 31

Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR str. 32

Tab. 7 Teplotní program PCR pro primery GCH1_kur a GAPDH_pšenice str. 32

Tab. 8 Teplotní program PCR pro primer TaActin_pšenice str. 32

Tab. 9 Koncentrace a čistota DNA izolované z krve brojlerů str. 35

Tab. 10 Koncentrace a čistota DNA izolované z pšenice odrůdy Konini a Bohemia str. 35

Tab. 11 Koncentrace a čistota DNA izolované z trusu str. 36

11 SEZNAM ZKRATEK

GM	geneticky modifikované
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerázová řetězová reakce
QTL	lokusy kvantitativních znaků
RPM	otáčky za minutu
SNP	jednonukleotidový polymorfismus