



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**PCR detekce geneticky modifikované sóji
v potravinách a krmivech**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Nikola Chadimová

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci s názvem „PCR detekce geneticky modifikované sóji v potravinách a krmivech“ vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Nikola Chadimová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové za cenné rady, věnovaný čas a obětavý a trpělivý přístup. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a nejbližším za trpělivost a veškerou podporu během celého mého studia.



PCR detekce geneticky modifikované sóji v potravinách a krmivech

Abstrakt

Geneticky modifikované organismy, jejichž genetická výbava byla cíleně pozměněna získávají vlastnosti, které dříve neměly. Jedním z hlavních důvodů těchto cílených genetických úprav u rostlin je odolnost vůči herbicidům. Zejména u sóji se využívá modifikace na odolnost k herbicidu glyfosátu. Dosud stále nebyla prokázána bezpečnost potravin vyrobených z geneticky modifikovaných plodin či z živočišných produktů zvířat krmených GM krmivy. Tato bakalářská práce se zaměřuje jednak na optimalizaci metod pro detekci GMO ve zpracovaných potravinách a v krmivech, a dále také na ověření pravdivosti údajů, týkající se přítomnosti GMO, uváděné firmami na obalech potravin či krmiv.

Rešeršní část této práce obsahuje informace o genovém inženýrství, problematice geneticky modifikovaných organismů a zaměřuje se také na popis technik potřebných k detekci GMO především ve zpracovaných potravinách, ale také v krmivech dostupných na českém trhu.

Metodická část této bakalářské práce se zaměřuje na detekci CaMV 35S promotoru vyskytující se v DNA plodin, které prošly genetickou úpravou. Přítomnost specifického transgenního materiálu zahrnovala detekci konkrétního genu odolného vůči glyfosátu, který můžeme znát zejména pod obchodním názvem Roundup. K analýze GMO byly využity základní molekulárně biologické metody.

Klíčová slova

genetická modifikace; GMO; transgeny; genové inženýrství; sója; PCR



PCR detection of genetically modified soybean in food and feed

Abstract

Genetically modified organisms which genetic equipment has been specifically targeted of have been acquiring properties they did not have before. One of the main reasons for this aimed genetic modification in plants is herbicide resistance. Especially in soy case is used the modification to resist to glyphosate. The safety of the food which has been made of genetically modified crops or products of animal fed with GM feed has not been proved so far. This bachelor thesis focuses on methods for detection of GMOs in food and feed. Also, it focuses on verifying the data concerning the presence of GMOs presented by companies on food or feed packaging.

The research part of this work contains information about genetic engineering, the issue of genetically modified organisms and also focuses on the description of techniques needed to detect GMOs, especially in processed foods, but also in feeds available on the Czech market.

The methodical part of this bachelor thesis focuses on the detection of CaMV 35S promoter occurring in DNA crops that have undergone genetic modification. The presence of a specific transgenic material involved the detection of a particular glyphosate-resistant gene, which is particularly known under the trade name Roundup. There were used basic molecular biological methods to analyze GMOs.

Key words

genetic modification, GMO, transgenes, genetic engineering, soy, PCR

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Rešeršní část.....	8
1.1 Geneticky modifikované organismy.....	8
1.2 Izolace nukleových kyselin.....	16
1.3 PCR.....	20
1.4 Elektroforetická separace nukleový kyselin	26
3. Motivace a cíle práce	28
4. Materiál a metody	29
1.5 Vzorke k testování	29
1.6 Izolace DNA	31
1.7 PCR detekce.....	33
1.8 Gelová elektroforéza.....	35
5. Výsledky	37
6. Diskuze	48
7. Závěr	52
8. Seznam použité literatury.....	53

1. Úvod

Transgenoze neboli přenos genu určitého organismu do genomu jiného druhu (Toman, 2009) má za cíl získat nové, výnosnější a kvalitnější odrůdy rostlin, které budou odolné vůči biologickým a abiotickým stresovým faktorům a získají nové užitkové vlastnosti. Tato metoda je současně i předmětem vědeckého studia molekulární genetiky rostlin, která umožňuje poznat lépe rostlinný genom od jednotlivých genů přes vzájemné interakce těchto genů až po jejich interakce s vývojem rostlin a s prostředím. Transgenoze umožňuje mimo jiné zjišťovat, do jaké míry jsou geny živočichů a mikroorganismů příbuzné nebo vzdálené genům rostlinným a také umožňuje sledovat hlavní molekulární mechanismy působení rostlinných patogenů. Nejčastěji využívané transgeny kódují jednak toleranci k některým specifickým typům herbicidů a jednak odolnost vůči hmyzím škůdcům. Oba zmíněné typy transgenů, které se v současných transgenních odrůdách využívají, byly poprvé v laboratorních podmínkách přeneseny do modelových rostlin zhruba před dvaceti lety. Až po více jak deseti letech se objevily první transgenní odrůdy. Tato doba byla nutná k provedení dostatečně rozsáhlých sérií pokusů, při nichž bylo důležité dokázat bezpečnost geneticky modifikovaných rostlin. Podle současné legislativy EU (Direktivy 2001/18/EC) je nutné dlouhodobě monitorovat geneticky modifikované plodiny, které jsou uváděny do prostředí a do oběhu. Neškodnost GM odrůd pro přírodu i člověka je prokázána existencí velkého množství vědeckých prací a není znám žádný vědecký důkaz prokazující větší nepříznivé vlivy, než má velkoobjemová rostlinná výroba. Je ale třeba podotknout, že mnohé studie se poprvé prováděly až v souvislosti s geneticky modifikovanými rostlinami a odrůdy, které byly netransgenní sloužily pouze jako kontroly. Proto nejsou transgenní a netransgenní odrůdy takzvaně měřeny stejným metrem, jelikož nároky na „neškodnost“ jsou u geneticky modifikovaných odrůd mnohem větší než u těch klasických (Káš, 2004)

2. Rešeršní část

1.1 *Geneticky modifikované organismy*

O geneticky modifikovaném (transgenním) organismu hovoříme tehdy, pokud došlo ke změně jeho původního genetického materiálu metodou genové technologie. Ta umožňuje v genomu (tj. soubor všech genů buňky či organismu) určité buňky pozměnit genetické informace vložením genů jiných genomů do genomu původního. Tato metoda na rozdíl od pěstění a křížení umožňuje cíleně vybavit organismy určitými dědičnými vlastnostmi. Otevírají se tak možnosti získání užitkových rostlin s vlastnostmi, které například usnadňují výsadbu a zlepšují odolnost proti škodlivému hmyzu (Kasper, 2015)

Za geneticky modifikované organismy se podle mezinárodních dohod považují organismy (např. semena rostlin) a produkty, které jsou plně vyrobeny z geneticky modifikovaného materiálu (v jakékoli příměsi) nebo kde neúmyslná příměs překračuje 1 % (Ondřej, Drobník, 2002). Při procesu vytváření geneticky modifikovaných rostlin mohou vznikat velké změny v přirozeném fungování DNA dané plodiny. Může dojít jak k mutaci původních genů, tak k jejich smazání či dokonce k jejich trvalému vypnutí nebo zapnutí a stovky genů mohou úplně změnit svůj stupeň exprese. Naopak nově vložené geny se mohou smíchat s jinými geny, rozpadnout se na fragmenty, mohou se zkrátit nebo u nich může dojít k inverzi nebo duplikaci. Následkem toho mohou mít geneticky modifikované bílkoviny, které rostlina produkuje nechtěné vlastnosti a škodlivé vedlejší účinky (Smith, 2015)

1.1.1 *Genové inženýrství*

Objev J. G. Mendela týkající se matematických pravidel dědičnosti znaků z rodičů na potomstvo pozorovaných při křížení hrachu, umožnil vědcům na začátku 70. let 20. století přenášet geny z jednoho organismu do druhého. V praxi byl však první přenos genů využit v roce 1982. Jednalo se o přípravu lidského inzulinu, při níž byl do bakterie vložen lidský gen právě na syntézu inzulinu. Experimenty zahrnující zemědělské plodiny

začaly až po roce 1985. První geneticky modifikovanou plodinou zavedenou do praxe bylo rajče. Cílem genetické modifikace u těchto rajčat bylo utlumení činnosti enzymu polygalakturonázy, který má schopnost štěpit pektin. Rajčata díky tomu neměkla, byla pevnější a mohla se déle skladovat. Tím se omezilo trhání nezralých rajčat, která měla tímto způsobem odolat nepříznivým vlivům transportu. Genové modifikace neměly za cíl pouze zlepšit chuť a vzhled plodiny, ale také usnadnit jejich pěstování. Proto v roce 1995 vznikla první pesticidy produkující plodina a také se začalo s úpravou rostlin pro odolnost vůči herbicidům. Nejznámějším herbicidem je takzvaný Roundup Ready (glyfosát) (Yount, 2008)

1.1.2 Produkce nových materiálů a potravin

Za významný vědecký průlom byl prohlášen objev učiněný v 70. letech 20. století, při kterém se potvrdilo, že vědci dokážou přenášet geny z DNA jednoho druhu do jiného druhu. Bylo tak možné vybavit rostliny, živočichy a další organismy takovými geny, které by se nedaly získat přirozenou cestou a dosáhnout tak znaků, které se předtím u daných druhů nenacházely. Vědci tak začali pracovat na některých zajímavých kombinacích. Do DNA kozy byly vloženy pavoučí geny v naději, že kozí mléko bude obsahovat bílkovinu nacházející se v pavučině, která by se dala použít při výrobě neprůstřelných vest. Pokožka prasete měla po vložení kravských genů stejně strakaté zbarvení, jako měla kráva. Další zajímavá genetická modifikace spočívala ve vložení genů medúzy do prasečích embryí, která způsobila, že prasetům v noci svítily rypáky. Rajčata a jahody se staly odolné vůči mrazu po přenesení genů ryb žijících v arktických oblastech. Pro tvorbu spermicidu se vpravovaly geny člověka do kukuřice a například semenářské společnosti daly plodinám nové znaky. Průmysl zabývající se vývojem GM semen se nazývá agrobiotechnologický. V současné době se komerčně pěstují čtyři hlavní geneticky modifikované plodiny – kukuřice, sójové boby, bavlna a řepka. Vyrábí se z nich například rostlinné oleje a deriváty kukuřice a sóji se využívají při zpracování všech potravin. Existují i jiné GM rostliny například tykev, cuketa, papája nebo vojtěška (Smith, 2015).

Proces genetické modifikace se týká také zvířat. Hospodářská zvířata podléhající této modifikaci by tak mohla produkovat i potraviny zcela nových vlastností. Do středu zájmu se dostává hlavně kravské mléko, jakožto významný zdroj živin, který ale zdaleka nemohou konzumovat všichni bez problémů. Laktóza (mléčný cukr) může být pro některé dospělé nestravitelná a pokud se dostane ve větším množství do střeva, dojde na něm k nežádoucímu pomnožení střevních mikroflóry, což způsobuje střevní potíže. Producenti i zpracovatelé mléka se proto snažili získat kravské mléko se sníženým obsahem laktózy. Jednou z variant, jak takové mléko získat je vpravení genu pro laktázu (enzym rozkládající mléčný cukr na jednoduché cukry) do DNA skotu. Nasvědčují tomu pokusy prováděné na myších, při nichž byl do jejich genetické informace přenesen gen pro laktázu s regulačními sekvencemi, které zajistily tvorbu funkčního enzymu v mléčné žláze. V buňkách mléčné žlázy tak docházelo k rozkladu laktózy na jednoduché cukry. V důsledku toho docházelo u myši k uvolňování mléka se silně sníženým obsahem mléčného cukru. Výživná hodnota mléka však nebyla rozkladem laktózy výrazně snížena, jelikož mláďata myši živená tímto mlékem rostla zcela normálně.

Genetické modifikace mohou přispět i ke zvýšení kvality vepřového masa. DNA prasat by byla obohacena o gen FAD2 izolovaný z DNA špenátu. V rostlině se podle tohoto genu vyrábí enzym delta-12 desaturáza, který má schopnost přeměňovat nasycené mastné kyseliny na kyseliny nenasycené. V organismu prasete tak dochází pod vlivem FAD2 k přeměně pětiny tuků s nasycenými mastnými kyselinami na tuky, které obsahují nenasycené kyseliny. Ty jsou ze zdravotního hlediska považovány za méně škodlivé. FAD2 se díky svým vlastnostem využívá také u GM olejnin, aby se u nich zvýšil obsah oleje v semenech (Káš, 2004)

1.1.3 Sója

Potraviny, zejména ty z rostlinných zdrojů, vždy hrály zásadní roli v lidské výživě. Kromě živin, které nám poskytují mají také vlastnost chránit lidský organismus proti různým onemocněním (Suliburska, Krejpcio, 2014). Sója (lat. *Glycine max.*) je jednou z důležitých rostlin, jelikož je to levný zdroj oleje a proteinů využívaných v potravinách

pro lidi a zvířata (Natarajan et al., 2013). Sójová semena jsou známá pro obsah prvků jako je vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor a zinek. Tyto chemické prvky slouží hned k několika funkcím lidského těla a jsou pro důležité například pro kosti a tvorbu zubů. Jsou také součástí různých enzymů zodpovědných za buněčný metabolismus (Mataveli et al., 2010). Kromě toho má sója fyziologicky aktivní metabolity, jako jsou isoflavony (rostlinné hormony vyskytující se v sóji), lecitiny, tokoferoly (přírodní chemické látky vitamínu E) a saponiny (látky rostlinného původu snižující povrchové napětí kapalin). Tyto metabolity jsou důležité pro udržení dobrého zdraví (Yamada et al., 2012).

1.1.4 Transgenní sója

Dvě nejvíce pěstované geneticky modifikované plodiny jsou kukuřice a sója. Právě tyto dvě plodiny jsou základními složkami většiny potravin (Abdullah et al., 2005). U potravin, které jsou vyrobeny z transgenních rostlin (takové, do jejichž dědičného základu byly vpraveny geny z jiných organismů) musí být před jejich uvedením na trh dobře dokumentováno, že jsou podstatně shodné s potravinami stávajícími, a že nemají na zdraví člověka či zvířat nepříznivý účinek. Shoda spočívá v kvantitativní i kvalitativní shodě ve všech znacích mimo ten znak, který je kódován transgenem a tuto shodu je nutno prokázat. V opačném případě musí být produkt uveden na trh jako nová potravina. To je ovšem postup legislativně složitější. Jako příklad zde poslouží postup při prokazování schůdnosti používání transgenní sóji s transgenem pro odolnost vůči herbicidu glyfosátu v potravinářském průmyslu. Sójový bob je luštěnina, která je ekonomicky důležitá pro výrobu olejů, krmiv i jídla. Obsahuje okolo 40 % bílkovin a 20 % oleje v semenech (Jackson, Linskens, 2002). Jakožto jedna z nejstarších kulturních rostlin je v současné době nejvíce produkovaná v USA (asi 60 mil. tun ročně) a přibližně polovina její produkce je transgenní. Většina této transgenní sóji obsahuje transgen pro odolnost vůči glyfosátu (herbicid). Vzhledem k faktu, že není ve státech Evropské Unie dovoleno pěstovat geneticky modifikované plodiny a zároveň není moc států, které by pěstovaly plodiny geneticky neupravené, musí být GM sója importována z Argentiny, Brazílie či USA. Tyto státy a jiné jsou hlavními státy pěstující GM plodiny. Jediná GM plodina

pěstovaná v EU je tzv. MON810 kukuřice. Tento typ kukuřice je odolný vůči hmyzu a pěstuje se ve státech jako je Polsko, Portugalsko, Slovensko, Španělsko, Rumunsko a také Česká Republika (Rosculete et al., 2018). Do České republiky se každý rok dováží asi 10 000 tun sójových bobů, a ještě mnohem větší množství různých výrobků ze sóji jako například tofu, sójová mléka, dezerty, zmrzliny, jogurty apod. Až u 60 % potravin jsou využívány produkty sójových bobů. Mezi tyto potraviny patří ku příkladu sójová moučka, sójový olej, texturovaný sójový protein, sójové izoláty, sójová mouka, sójový koncentrát a lecitin (směs fosfolipidů). Při prokazování podstatné shody byly srovnávány odrůdy sóji, které obsahují jediný transgen – gen pro enzym enolpyruvylšikimátfosfátsyntázu (EPSP) – z genomu *Agrobacterium tumefaciens* kmene CP4, s odpovídajícími odrůdami, z kterých byly odvozeny a nejsou transgenní. Protein kódovaný transgenem není podobný žádnému známému toxickému proteinu, není ani akutně toxický, a dokonce nemá žádné alergenní působení. V simulovaných trávicích systémech dochází k jeho rychlému rozkladu. Tyto systémy jsou laboratorní směsi enzymů napodobující složení žaludeční šťávy a slouží k hodnocení rychlosti trávení bílkovin. U běžných bílkovin je doba úplného rozkladu proteinů přibližně 2 minuty. Dále bylo zjištěno, že transgenní rostliny nevykazují žádné rozdíly v citlivost k chorobám, škůdcům a ani rozdíly v interakci s půdní mikroflórou v porovnání s netransgenními rostlinami. Krysy a křepelky, které byly krmeny nezpracovanými boby nevykazovaly žádné nepříznivé vlivy. Obě odrůdy sóji (transgenní a netransgenní) byly srovnávány z hlediska jejich celkového obsahu složek jako jsou bílkoviny, tuky, polysacharidy, vláknina, popelovina, a byla zjištěna úplná shoda v těchto složkách. Při dalších analýzách byly proteiny degradovány na aminokyseliny a byl zjišťován poměr osmnácti hlavních aminokyselin a poměr jednotlivých mastných kyselin v olejích. Zvláště obsah bílkovin, které jsou obsaženy i v netransgenní sóji a mají potravinářsky nepříznivé vlastnosti byl sledován podrobněji. U parametrů zahrnující inhibitor trypsinu, lektin sóji, fytoestrogeny, cukry stachyóza a rafinóza, fytát či ureáza nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi transgenními a odpovídajícími netransgenními odrůdami. Transgenní organismy a jejich produkty musí být označeny i přesto, že u nich byla prokázána podstatná shoda se stávajícími produkty a absence negativních vlivů na zdraví člověka i zvířat. Podle českého zákona č. 153/2000 Sb. je

vyžadováno značení geneticky modifikovaných organismů a produktů z nich zhotovených. Nový zákon o potravinách, který nabyl účinnosti v roce 2002 vyžaduje, aby byly značené potraviny, jež obsahují součásti z geneticky modifikovaných surovin (Ondřej, Drobník, 2002).

1.1.5 Zdravotní rizika GMO

K syntéze nového proteinu dochází v případě přenosu genů z jednoho organismu do organismu jiného. Hlavní riziko konzumace GMO představuje vznik potravinové alergie zapříčiněné pořadím aminokyselin, které tvoří strukturu nové bílkoviny. Potenciál ke vzniku alergie mají proteiny v případě, že je jejich sekvence shodná s jiným potravinovým alergenem, který způsobuje nežádoucí odpověď imunitního systému (Kramkowska et al., 2013). Problém ale může nastat i v případě, že je geneticky modifikovaná bílkovina taková, jaká by být měla. (Smith, 2015). Většina případů spojených s alergií způsobenou konzumací transgenních potravin je v souvislosti s genovou expresí organismů, které mají potenciál ke vzniku alergie. Geneticky modifikovaná sója obsahující metionin (aminokyselina, syntetizována vneseným genem jako produkt) izolovaný z para ořechů je často zmiňovaným příkladem potravinové alergie (Kramkowska et al., 2013), a kvůli této nežádoucí vlastnosti nebyl tento produkt nikdy uveden na trh. (Batista, Oliveira, 2009).

Vložené geny (transgeny) se rovněž mohou přenést z jídla do vnitřních orgánů nebo střevních bakterií, čímž nastává další problém. Toto tvrzení bylo již dříve považováno za mylné, a to na základě předpokladu, že se tyto geny v trávicí soustavě rychle ničí. Tvrzení vyvrací výzkumy prováděné na zvířatech. Ukázalo se, že pozřená DNA může cestovat po celém těle, a dokonce se může skrze placentu dostat i do plodu. Transgeny z GM plodin podávaných zvířatům se našly v jejich krvi, ledvinách, játrech a slezině. Při pokusu, v němž lidé požili GM potraviny, bylo potvrzeno, že genetický materiál vložený do geneticky upravené sóji byl přenesen do DNA bakterií vyskytujících se v našich střevech (Smith, 2015). Konzumaci „cizí“ DNA (bakterií, virů) jsou lidé vystaveni, aniž by si to uvědomovali. Potrava vždy obsahuje nějaké množství bakterií (Batista, Oliveira, 2009). U lidí a zvířat běžně konzumujících rostlinou stravu jako součást každodenní stravy, nebyl v jejich genomu nalezen žádný rostlinný gen. Sója odolná glyfosátu obsahuje gen z půdní bakterie. Dochází tak ke kódování enzymu podobnému sójovému enzymu, ale bez citlivosti ke glyfosátu. Stejný enzym můžeme běžně nalézt u většiny půdních bakterií. Pokud vezmeme v potaz, že jeden gram ornice může obsahovat až miliardu těchto

bakterií, je jasné, že se dostanou i do naší potravy. Tyto nepatogenní mikroorganismy jsou při laboratorních testech označovány jako aerobní mikroorganismy. Dle hygienických norem je v některých případech přípustná hranice až deseti milionů mikroorganismů na jeden gram potravin (Drobník, 2008)

1.1.6 Značení geneticky modifikovaných potravin a krmiv

Geneticky modifikované organismy jsou odbornou veřejností považovány za zdravotně nezávadné a rovnocenné klasickým potravinám. Právo možnosti výběru spotřebitele je proto respektováno. Povinnost označování GM potravin vyplývá z legislativy Evropské unie (Dostálová, Kadlec, 2014). Požadavky na označování potravin a krmiv vykazující přítomnost GMO jsou uvedeny v Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1831/2003 O sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z geneticky modifikovaných organismů a o změně směrnice 2001/18/ES.

1.1.7 Detekce transgenů v potravinách a krmivech

Vzhledem k nařízení EU platnému od roku 1977 musí být produkty vyrobené z geneticky modifikovaných organismů označovány. Pro kontrolu bylo nutné zavedení co neúčinnějších, nejspolehlivějších a nejpřesnějších metod pro detekci GMO v potravinářských produktech (Rott et al., 2004).

K detekci GMO se mohou využívat metody jako je chromatografie, hmotnostní či infračervená spektrometrie (Huang, Pan, 20005). Nejvíce využívanou metodou pro detekci geneticky modifikovaných surovin, respektive transgenů, které obsahují je především PCR (polymerázové řetězové reakce) (Ondřej, Drobník, 2002).

1.2 *Izolace nukleových kyselin*

Pomocí izolace nukleových kyselin lze získat čisté molekuly DNA/RNA extrakcí z buněčného jádra nebo mitochondrií (Kuciel, Urban, 2016).

1.2.1 *Izolace DNA z rostlinných tkání*

Izolace nukleových kyselin je jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie. Pro většinu molekulárně genetických analýz je důležitý extrakt vyšetřované nukleové kyseliny, který je zbaven podílu bílkovin (Beránek, 2016). Prvním důležitým krokem izolace je šetrné narušení buněk či tkání, ve kterých se nukleové kyseliny nachází. Nesmí však dojít k poškození těchto kyselin. Aby došlo k rozkladu buněk a následně k uvolnění jejich obsahu, používá se lyzační pufr obsahující detergenty, které způsobí rozrušení membrán vlivem zvýšení permeability buněčných membrán. Jako detergent se nejčastěji využívá dodecylsírán sodný (SDS). Následně dochází k disociaci nukleoproteinových komplexů a ke štěpení uvolněných proteinů pomocí enzymu proteináza K (nejčastěji)

Izolace DNA, respektive její principy, vychází z vlastností deoxyribonukleové kyseliny:

1. snadná precipitace DNA alkoholem,
2. fosfátové estery se při neutrálním pH chovají jako anionty, jelikož jsou to silné kyseliny,
3. báze jsou bazické pouze slabě a jsou bez náboje,
4. vodíkové vazby mezi skupinami –NH₂ a –OH jsou v rozmezí pH 4-9 stabilní,
5. maximum absorpce UV světla nukleových kyselin je při 260 nm a jednovláknová DNA dává větší absorbanci než dvouvláknová o 20–30 %, a poslední vlastností DNA molekuly je její mimořádná stabilita (Zima, 2012). Množství a kvalita extrahované DNA závisí zejména na metodě, která byla použita (Lick et al., 1996).

1.2.2 *Metody izolace DNA*

Fenol-chloroformová izolace

Při této metodě izolace DNA dochází k oddělení vodné fáze obsahující DNA od degradovaných proteinů, polysacharidů, lipidů, volných nukleotidů a nerozložených složek membrán. Oddělení těchto složek je zapříčiněno přidáním pufrovaného fenolu k lyzační směsi, která se nejdříve homogenizuje (tzv. vortexuje) a následně centrifuguje. Vodná fáze se po oddělení složek odpipetuje do směsi chloroformu s isoamylalkoholem, čímž se odseparovaná DNA zbaví případných zbytků z fáze fenolické. Následným okyselením (octanem amonným či sodným) a přidáním 96 % ethanolu (případně acetonu nebo isopropanolu) se DNA precipituje z vodné fáze. Samotná precipitace probíhá při teplotách od -20 až do -80 °C asi 30 minut. Předposlední fáze zahrnuje purifikaci sedimentu DNA 70 % ethanolem. Pelety získané purifikací se usuší na vzduchu a poté se rozpustí v elučním pufru TRIS/EDTA (neboli TE pufr) nebo v demineralizované vodě. Celá tato metoda trvá několik hodin (Beránek, 2016).

Izolace DNA pomocí chelexu

Chelex je pryskyřice, která je složená ze styren divinylbenzen kopolymeru a obsahuje iminodiacetátové ionty. Tyto ionty jsou schopny vázat polyvalentní kovové ionty. Vyvazování Mg^{2+} iontů z roztoku je pro izolaci DNA důležité, jelikož jsou pro vysokých teplotách (95–100 °C) schopny poškodit DNA a také mohou aktivovat nukleázy uvolněné při lýze buněk (např. DNázy), které způsobují degradaci DNA (Čapková Frydrychová et al., 2013).

V praxi se pro extrakci DNA touto cestou nejčastěji využívá Chelex 100. Tato metoda nachází své využití zejména ve forenzní genetice, kde je důležitá izolace DNA z miniaturního množství vzorků, jako jsou vlasy, stopy slin či krevní stopy. Vzhledem k tomu, že nedochází k odstraňování inhibitorů z roztoku, je vhodné používat tuto techniku pouze v případě, že vzorky obsahují malé množství inhibitorů (Šimková, 2012).

Naopak výhodou je minimální riziko kontaminace vzorku, jelikož celý proces extrakce probíhá v jediné zkumavce. DNA extrahovaná touto metodou není dostatečně čistá, tudíž se kromě PCR nehodí pro další aplikace.

Prvním krokem izolace je homogenizace vzorku. Následuje destrukce buněčných komponent vysokou teplotou a alkalickým prostředím. Po inkubaci a centrifugaci vzorku dojde k separaci roztoku, který obsahuje genetický materiál od zbytků buněčných složek a pryskyřice chelexu. Takto zpracovaný materiál je dále využit pro amplifikaci pomocí PCR (Čapková Frydrychová, 2013).

Izolace pomocí magnetických částic

Magnetické částice, jejichž jádro tvoří nejčastěji maghemit nebo magnetit mají speciálně upravený povrch pro navázání nukleových kyselin. Průměr těchto kulovitých částic se pohybuje v rozmezí od 5 nm až do 100 μm (Penka, Tesařová, 2011). Magnetické jádro zodpovídá za interakci s vnějším magnetickým polem. Nemagnetický obal zas zajišťuje interakci se systémem biomolekul (Šafařík et al., 2012). Tento obal je tvořen polymerní vrstvou, která chrání magnetické jádro před nežádoucí nespecifickou reakcí s analytem (Saiyed et al., 2008). Magnetické částice musí disponovat supermagnetickými vlastnostmi, což znamená, že mají magnetické vlastnosti v závislosti na působení vnějšího magnetického pole (Plank et al., 2003).

Jako první se při extrakci pomocí magnetických částic přidává do reakce lyzační pufr, poté magnetické částice a vazebný pufr umožňující vazbu DNA s funkční skupinou - COOH na nosičích. V této fázi dochází k působení magnetického pole na magnetické částice. Dochází k imobilizaci částic a k odstranění supernatantu. V posledním kroku jsou částice promývány pufrům (bez NaCl), který způsobí uvolnění DNA z částic (Ma et al., 2007).

CTAB

Klasická CTAB metoda je nejrozšířenější metoda pro extrakci DNA z rostlinných materiálů. Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) má schopnost vytvářet komplex s nukleovými kyselinami. Při vysoké koncentraci solí je tento komplex rozpustný a při snížené koncentraci tvoří sraženinu. Právě díky rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinou DNA. CTAB také uvolňuje DNA z membrán a proteinů a působí tak jako detergent (Jankiewicz et al., 1999). Pufr obsahující CTAB se inkubuje při 65 C, což způsobí denaturaci proteinů a zároveň disociaci kontaminantů z DNA. Po inkubaci se odstraní denaturované proteiny a většina uhlovodíků pomocí chloroformisoamyl alkoholové extrakce. Vodná fáze obsahující DNA je následně zředěna pufr, který obsahuje CTAB, ale neobsahuje sůl. Tyto podmínky vedou k vytvoření nerozpustného komplexu CTABu s nukleovými kyselinami, čímž vznikne precipitát. Následuje purifikace DNA (70 % ethanolem) od uhlovodíkových kontaminant, jelikož u většiny uhlohydrátů, které zůstaly v roztoku po chloroformové extrakci s vysokým obsahem solí, nedochází k precipitaci s komplexem CTAB – nukleové kyseliny. Stejně jako u fenol-chloroformové izolace se pelety získané purifikací usuší na vzduchu, a nakonec se rozpustí v TE pufr nebo ve sterilní vodě. (Glick, Thompson, 1993).

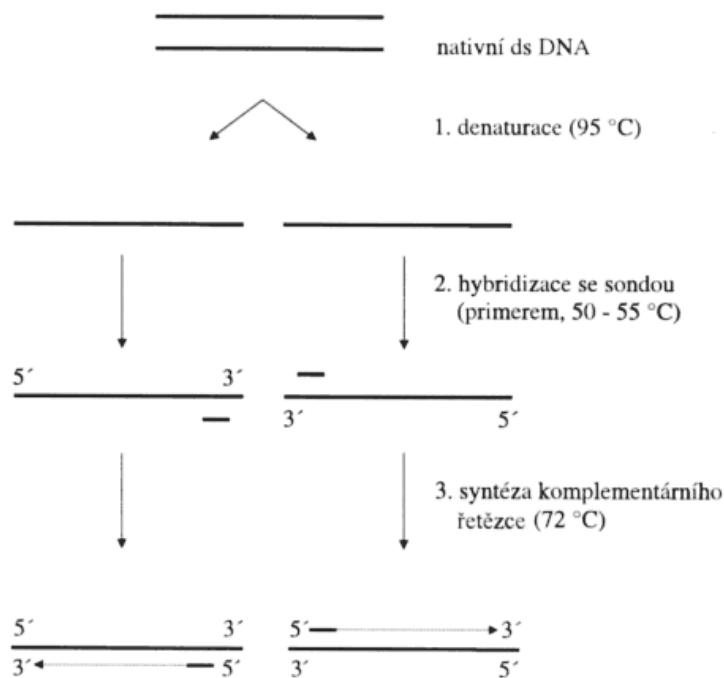
1.3 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce využívaná technika v molekulární biologii (Griffin, 1994). Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybraného úseku DNA. Při procesu PCR se jednotlivě střídají tři teplotní fáze. Nejprve dochází k denaturaci dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA. Nemusí být známa nukleotidová sekvence DNA, stačí, aby byla známa sekvence krátkých úseků na obou koncích cílové DNA, tzv. primerů, která má být amplifikována. Tyto primery (oligonukleotidové sondy) hybridizují na obou stranách cílové DNA a tím označují počátek syntézy nového vlákna, kterou katalyzuje termostabilní DNA polymeráza, nejčastěji tzv. Taq polymeráza (z bakterie *Thermus aquaticus*), probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci (Zima, 2014)

1.3.1 Princip

Každý cyklus polymerázové řetězové reakce se skládá ze tří teplotních fází (viz. obrázek 1):

1. **Denaturace** – dochází k oddělení vláken dsDNA při optimální teplotě 95 °C, přičemž toleranční rozpětí se pohybuje mezi 92 až 98 °C
2. **Annealing** – hybridizace primerů obvykle mezi 50 a 62 °C, nízká teplota podstatně snižuje specifitu a vysoká teplota zamezuje amplifikaci, pro každý pár primerů je odlišná optimální teplota anealingu
3. **Elongace/extenze** – v tomto kroku dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA polymerázou obvykle při teplotě mezi 68 a 74 °C (Aarts et al., 2002)



Obrázek 1 Princip polymerázové řetězové reakce (tři kroky prvního cyklu) (Zima, 2014)

Obvyklý počet cyklů se pohybuje v rozmezí 15–40 a je ovlivněn životností enzymů, koncentračními poměry reakční směsi a požadovaným výtěžkem. Primery (oligonukleotidové sondy) obsahují 17-30 nukleotidů, které jsou komplementární ke 3' a 5' konci cílové DNA sekvence. Jelikož je reakce katalyzována termostabilními enzymy, musí se pro jejich správnou funkci do reakční směsi přidávat pufr obsahující Mg^{2+} ionty. Jako stavební jednotky reakční směsi slouží dNTP (deoxynukleosidtrifosfáty), které zajišťují syntézu cílové sekvence. Amplifikace probíhá v tzv. termocykléru, což je přístroj, který je schopen velmi rychle měnit teplotu reakčního prostředí (Aarts et al., 2002). Na nutnost zavedení technik, které minimalizují kontaminaci amplifikonem (produkt PCR) poukázaly zkušenosti s PCR. V praxi se využívá negativní a slepá (reakční směs bez cílové DNA) kontrola (Zima, 2014).

1.3.2 Složky reakční směsi

DNA templát

Pro reakci často stačí i malé množství nukleové kyseliny. Důležitý požadavek na templátovou DNA pro PCR je, aby nebyl vzorek kontaminován žádnou jinou DNA například z rukou pracovníka či nedostatečně čistých pomůcek, jelikož by se i velmi malé množství této kontaminující DNA mohlo v reakci namnožit na takové množství, které je detekovatelné, a tím by došlo ke zkreslení výsledku. Vzorek templátové DNA také nesmí obsahovat látky inhibující DNA polymerázu. Jedná se často o běžně užívané reagentie při izolaci, čištění a zpracování DNA jako je fenol, proteináza K, ethanol apod.

Oligonukleotidové primery

Jedná se o primery zpravidla o délce 17 až 30 nukleotidů a jsou komplementární k sekvencím, které ohraničují úsek DNA templátu, který má být amplifikován. Pro PCR reakci jsou nutné primery dva. Forward primer neboli kódující, kterým začíná 5' konec řetězce genu se v průběhu PCR elonguje ve směru transkripce a reverse primer neboli antikódující. Pro správný průběh PCR reakce by primery měly splňovat několik požadavků:

- Musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být nejlépe zcela komplementární k úseku, na který mají nasedat
- Primery by neměly být vzájemně komplementární. Pokud by tomu tak nebylo, začaly by se samy chovat jako templáty
- Aby nedocházelo k vnitřní hybridizaci (tvorbě „smyček“), neměl by primer obsahovat vnitřně komplementární sekvence
- Rozložení AT a CG párů by mělo být rovnoměrné, zejména na 3' konec by neměl obsahovat příliš CG
- Teploty, při kterých oba primery nasedají, by se neměly výrazně lišit

Polymeráza

Při vysoké teplotě dochází k denaturaci enzymu. Proto nemůže být vzhledem k vysoké teplotě v denaturační fázi PCR použita jakákoliv DNA polymeráza. Pokud by byla použita polymeráza, která není termostabilní, musela by se v každém cyklu vzhledem k její denaturaci znovu přidávat. S ohledem na tuto skutečnost se dnes využívají právě termostabilní DNA polymerázy, původně izolované z bakterií, které žijí v horkých pramenech. Nejvýznamnější a nejpoužívanější polymerázou pro PCR metody je tzv. Taq polymeráza, jejíž teplotní optimum se pohybuje okolo 75 °C. Pokud teplota dosáhne více než 90 °C, polymeráza ztrácí aktivitu, ale přesto odolává denaturaci. Kromě již zmíněné Taq polymerázy se používá dalších několik enzymů, které jsou například termostabilnější, dokáží syntetizovat delší řetězce (Taq polymeráza „odpadá“ po připojení několika stovek bází), mají vyšší aktivitu nebo dokáží opravit chybně zařazený nukleotid (mají 3'- exonukleázovou aktivitu) na rozdíl od Taq polymerázy, která udělá v průměru jednu chybu na 10 až 20 tisíc zařazených bází.

Reakční roztok

Základní reakční roztok obsahuje mimo čtyř deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ještě soli a pufrující složku. Tyto složky zajistí vhodnou iontovou sílu prostředí. Důležitou součástí jsou hořčnaté ionty Mg^{2+} působící jako kofaktor polymerázy. Vysoká koncentrace hořčnatých iontů může vést ke vzniku nespecifických produktů. Nízká koncentrace zase může způsobit nízký výtěžek reakce. Lepší specifčnost produktu a stabilizaci polymerázy mohou zajistit složky směsi jako je albumin, síran amonný, betain aj. (Šmarda, 2005).

1.3.3 Modifikace PCR

Multiplexová PCR

Tento typ reakce umožňuje souběžně amplifikovat dva a více úseků DNA tím, že se do reakce přidá více než jeden pár primerů. Jeden z párů primerů je komplementární k transgenu a druhý k internímu genu. Tato metoda umožňuje kvantitativní detekci transgenní DNA. Porovnává se množství produktu této reakce z obou cílových sekvencí (Butler, 2010).

Nested PCR

Nested PCR zvyšuje specificitu reakce. Využívají se dva páry primerů – vnitřní a vnější. V první fázi se pomocí vnějších primerů amplifikuje ze vzorku izolovaná DNA. V další fázi slouží jako DNA templát ampikon z fáze první. Využívá se vnitřních primerů, které jsou specifické k vnitřnímu úseku ampikonu a dochází tak k amplifikaci kratšího úseku DNA sekvence než v předchozí fázi. Konečná detekce se provádí pomocí gelové elektroforézy porovnáváním délky fragmentů PCR produktu se standardem (marker molekulové hmotnosti) (Feraý et al., 1992)

Kvantitativní real-time PCR

Tato technika využívá fluorescenčně značené sondy a detekční systém, který měří intenzitu fluorescence, která je přímo úměrná množství PCR produktu (Bartůňková, Paulík, 2011). Oproti klasické PCR využívá real-time PCR speciální cycler, který kontinuálně zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu. Fluorescenční substrát (nejčastěji SYBR green – schopnost nespecificky se vázat) po navázání na DNA způsobí fluorescenci, díky které lze detekovat množství přítomné DNA. Intenzita

fluorescence stoupá v důsledku vazby většího množství barviva při prodlužování dsDNA pomocí DNA polymerázy. Jelikož se fluorescenční substrát váže na veškerou dsDNA ve vzorku, může tak zvýšená intenzita signálu pocházet jak ze specificky tak i z nespecificky namnožené DNA. Kvantifikace se provádí buď absolutní nebo relativní (častěji). Při absolutní kvantifikaci se odečítá množství DNA z kalibrační křivky, kterou poskytne vzorek DNA o dané koncentraci. U relativní kvantifikace se porovnává množství fluorescence testovaného vzorku s množstvím fluorescence vzorku jiného (Andersen et al., 2006).

1.4 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforetická separace molekul DNA či RNA je důležitou součástí PCR technik. Princip separace je založen na rozdělení makromolekul ve stejnosměrném elektrickém poli podle velikosti povrchového náboje. Větší fragmenty nukleových kyselin se v elektrickém poli pohybují pomaleji než fragmenty menší. Putování makromolekul od záporné ke kladné elektrodě je způsobeno záporným nábojem fosfátových skupin, které nesou DNA i RNA. Existují dva typy elektroforetických aparatur – vertikální a horizontální. U vertikální elektroforézy se jako nosič pro separaci fragmentů o velikosti několika desítek párů bází využívají polyakrylamidové gely. Horizontální elektroforéza zpravidla využívá agarózový gel a umožňuje separaci fragmentů o délce několika set až tisíců párů bází (Penka, Buliková, 2009).

1.4.1 Metody

Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) využívá jako nosné medium pro separaci polyakrylamidový gel. V tomto případě se jedná o elektroforézu vertikální, při které polymerizuje směs akrylamidu a bisakrylamidu při pokojové teplotě v TAE pufru. Polymerizaci umožňují volné radikály, které poskytuje persulfát amonný (APS) způsobující homolytické štěpení vazeb O – O. Volná zásada TEMED (tetrametylendiamin) urychluje polymerizaci, jelikož katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Mezi jiné iniciátory polymerizace patří také riboflavin účinný již při velmi nízkých koncentracích (5–10 ng/l). Nízké pH nebo přístup O₂ inhibují polymerizaci. Koncentrace akrylamidu se liší v závislosti na velikosti separovaných DNA fragmentů (3,5 % - 20 %) (Zima, 2014).

Kapilární zónová elektroforéza

Při kapilární zónové elektroforéze (též CZE z angl. *Capillary Zone Electrophoresis*) dochází uvnitř kapiláry, která propojuje dvě nádoby, k unášení nabitých molekul elektroosmotickým tokem separačního pufru. Elektrody, ponořené do roztoku základního elektrolytu, jsou zdrojem elektrického napětí, které způsobuje pohyb iontů. Jeden konec kapiláry, která je naplněná základním elektrolytem, se ponoří do nádoby s analyzovaným vzorkem, čímž vnikne na její začátek malý „sloupek“ vzorku. Poté se kapilára opět vrátí do elektrolytu a spustí se hnací napětí a postupně dojde k separaci analyzované látky. Detektor na druhém konci kapiláry zaznamenává průchod jednotlivých separovaných látek. Po průchodu analyzovaného iontu změní signál detektoru svou hodnotu. Na časovém záznamu se objeví zóna neboli „pík“. Účinnost separace se odvíjí od parametrů daného píku (čím vyšší a užší, tím větší účinnost).

Kapilární gelová elektroforéza

Tato metoda označována zkratkou CGE (z angl. *Capillary Gel Electrophoresis*) umožňuje rozdělit látky na základě jejich pohyblivosti v gelu. Gel v kapiláře maximalizuje rozdíly mezi rychlostmi velkých iontů různých tvarů, které migrují póry gelu. Vzhledem k tomu, že gel neumožňuje vznik elektroosmotického toku, dochází k putování jen jednoho druhu iontů směrem k detektoru. Intenzita elektrického pole, typ a porozita gelu, molekulová hmotnost a také náboj separované molekuly udává její pohyblivost v gelu. Na rozdíl od CZE může být při CGE separován a detekován jen jeden typ iontů. Využití CGE se uplatňuje zejména pro velké ionty, jako jsou bílkoviny, peptidy či nukleové kyseliny (Gaš, 2001)

3. Motivace a cíle práce

Dle stanovení české legislativy musí mít výrobky obsahující 0,9 % geneticky modifikované složky na svém obalu označení. Tuto skutečnost upravuje zákon č.110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích, novelizován zákonem č. 306/2000 Sb. platný od roku 2002. Výrobky jako je olej, kde není přítomna DNA, a tudíž nelze prokázat genetickou modifikaci se podle zákona musí také označovat. Výrobek obsahující GMO musí mít na svém obalu označení: „geneticky modifikováno“ nebo „obsahuje geneticky modifikovaný organismus“. Stejně tak je tomu i u nebalených výrobků, jako je chleba a pečivo. Produkty zvířat (mléko, maso, vejce ...) krmených GM krmivou nemusí být označeny.

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit pravdivost údajů na obalech potravin informujících o přítomnosti/nepřítomnosti GMO pomocí metody PCR.

4. Materiál a metody

Praktickou část své bakalářské práce jsem pod odborným dohledem Ing. Ireny Hoštičkové vykonala v laboratořích Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Veškerou práci jsem vykonala po seznámení a v souladu s bezpečnostním a provozním řádem laboratoře a za použití ochranných pomůcek.

Praktická část bakalářské práce je zaměřená na stanovení geneticky modifikované sóji v potravinách a krmivech zahrnovala izolaci DNA ze vzorků potravin a krmiv, dále stanovení koncentrace izolované DNA, amplifikaci specifického úseku DNA metodou PCR a následně vizualizaci výsledků gelovou elektroforézou.

1.5 Vzorky k testování

Pro testování přítomnosti GM sóji jsem zvolila potraviny a krmiva běžně dostupné na českém trhu. Některé potraviny mají na svém obalu informaci, zda potravina je, respektive není, vyrobena z geneticky upravených plodin. Veškeré typy potravin a krmiv, firmy vyrábějící tyto produkty a informace uvedené na obalu jsou zobrazené v tabulce 1. Testované vzorky jsem pro lepší a přehlednější analýzu rozdělila do čtyř sad. Po vyizolování DNA jsem každou sadu postupně testovala na přítomnost genu pro Lectin, CaMV a RR (více viz. kapitola 4.4). Konečná fáze zahrnovala vizualizaci výsledků pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Tabulka 1 Seznam všech testovaných potravin a krmiv

sada vzorků	typ potraviny/krmiva	firma	údaje o GMO na obalu
1	sója	Lagris	x
	sójové kostky	Ekoprodukt	x
	čokoládový dezert	Alpro	x
	sojanéza	Kalma	x
	tofu	Veto	GMO free
	sojakrém	Lunter	x
	arašídová tyčinka	Cambridge Weight Plan	x
	dentální tyčinka pro psy	Frolic	x
	extrudovaný sójový šrot	x	x
2	tofu párky pikantní	Lunter	x
	tofu natural	SUNFOOD s.r.o.	x
	jitrničák sójový	Amunak	x
	svačinka sójová	Amunak	x
	tofu karbanátky	SUNFOOD s.r.o.	x
	granule	x	x
	krmná směs pro kuřata	x	x
3	tyčinka Dianella	Chocoland a.s.	x
	sójové řezy	Zora	x
	pochoutka toskánská	Veto	x
	sojáčik čokoláda	Sojaprodukt	x
	sójové nudličky	BonaVita	GMO free
	sojolka	Sojaprodukt	x
4	xČOT	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	ČOS T	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	KPB T	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	P1	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	ČOT B	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	A0	Hansa C.B.spol. s.r.o.	x
	TELSTART	ZEA Sedmihorky	GMO free
	N1 PLUS drť	VKS Pohledští Dvořáci a.s.	NON GMO
	N1 PLUS granule	VKS Pohledští Dvořáci a.s.	NON GMO
	VKCH 2 PLUS	VKS Pohledští Dvořáci a.s.	NON GMO
K2 PLUS	VKS Pohledští Dvořáci a.s.	NON GMO	

1.6 Izolace DNA

Prvním krokem při analýze potravin a krmiv obsahujících sóju byla izolace DNA. Pro izolaci DNA byl použit magnetický izolátor nukleových kyselin MagCore HF16 Plus s komerčním kitem 401 MagCore® Genomic DNA Tissue Kit. Tento kit je vhodný pro izolaci celkové DNA (včetně genomové, mitochondriální a virové RNA) a obsahuje všechny nezbytné reagentie a spotřební materiál pro izolaci DNA pomocí magnetických kuliček. Reagentie jsou předpipetované do kazety, která se následně vkládá do izolátoru. Obsah reagentií v kazetě je uveden v tabulce č.2.

Tabulka 2 Seznam reagentií obsažených v kazetě pro izolaci DNA

reagentie	objem [μl]
lyzační pufr	500
vazebný pufr	1000
beads mixture pufr	500
promývací pufr 1	1000
promývací pufr 2	1000
ddH ₂ O	1000
eluční pufr	1000

Postup izolace DNA

1. V třecí misce jsem pomocí tloučku najemno rozdrtila vzorky potravin a krmiv, u kterých bylo třeba získat homogenní směs pro lepší manipulaci v následujících krocích
2. Na analytických vahách jsem jednotlivě navázila 40 mg každého vzorku do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml
3. Po navážení jsem přidala ke každému vzorku 20 μl proteinázy K a 500 μl BT pufru
4. Každou směs jsem dala krátce vortexovat
5. Poté jsem dala směsi inkubovat na 56 °C po dobu 15 minut. Každé 2-3 minuty jsem každou směs promíchala v ruce

6. Po inkubaci jsem vložila mikrozkušavky do centrifugy a nechala stočit 3 minuty na 14000 rpm
7. Pokud vzorek po centrifugaci obsahoval nerozpustné částice bylo nutné odstředěnou část převést pipetou do horní části filtrační kolonky, vložit do centrifugy a stáčet 5 minut na 14000 rpm
8. Po centrifugaci jsem převedla 400 μ l čistého tkáňového roztoku do zkumavek izolátoru určených pro vzorek (*Sample Tube*)
9. Do izolátoru jsem umístila eluční zkumavky (*Elution Tube*), pipetovací špičky (*Pipette Tip*), nastavila program *Code-401* a spustila.
10. Po uplynutí doby přibližně 40 minut byl proces izolace ukončen.

Měření koncentrace DNA

K měření koncentrace vytěžené DNA jsem použila spektrometr BioSpec-nano. Jedná se o UV-VIS spektrometr speciálně navržený pro použití biotechnologických laboratořích. Ke svému měření používá extrémně malé objemy vzorků (1–2 μ l). Objem dané DNA je pipetován přímo na povrch, kde dochází k jeho měření. Tento přístroj umožňuje kvantitativní stanovení nukleových kyselin (DNA, RNA) a oligonukleotidy. Díky zdroji záření s xenonovou lampou má rozsah 220–280 nm.

Pracovní postup

1. Nejdříve jsem změřila koncentraci slepého vzorku (blanku)
2. Odpipetovala jsem 1 μ l blanku z kazety, přenesla ho na spektrofotometr a nechala změřit jeho koncentraci
3. Následně jsem koncentraci DNA každého vzorku změřila stejným způsobem jako blank
4. Koncentrace jednotlivých vzorků byly automaticky zaznamenány programem do přehledné tabulky ve formátu .pdf

1.7 PCR detekce

Před samotnou amplifikací jsem musela připravit reakční směs. Poměr jednotlivých komponent reakční směsi (pro jeden vzorek) je uveden v tabulce č. 3. Reakční směs jsem vždy míchala najednou pro všechny vzorky, tudíž neobsahovala DNA. Kvůli nepřesnosti pipetování jsem vždy počítala s jednou reakcí navíc, takže například při reakci pro 10 vzorků jsem počítala reakční komponenty pro 11 vzorků.

Tabulka 3 Poměr komponent reakční směsi

reakční komponenty	objem [μ l]
Master mix	5
forward primer	0,5
reverse primer	0,5
H ₂ O	3
DNA templát	1

PPP master mix (TopBio) obsahuje Taq polymerázu, dNTP směs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a PCR pufr s obsahem MgCl₂

Primery přicházejí od výrobce a před použitím je třeba je naředit. Před ředěním nejdříve zkumavku s primerem krátce zcentrifugujeme. Pro naředění používáme sterilní vodu a nejlépe špičky s filtrem. Množství vody se odvíjí od množství primeru. Pro svou práci jsem používala celkem 3 páry primerů podrobněji popsanych v tabulce č.4. Každý pár primerů je specifický k jinému úseku DNA. Sekvence primerů byly přejaty z odborných publikací taktéž uvedených v tabulce.

Tabulka 4 Přehled použitých primerů

typ primeru	velikost DNA fragmentu	zdroj
Lectin forward	118 bp	Rott et al., 2004
Lectin reverse	118 bp	Rott et al., 2004
CaMV forward	101 bp	Abdullah et al., 2006
CaMV reverse	101 bp	Abdullah et al., 2006
RR forward	356 bp	Abdullah et al., 2006
RR reverse	356 bp	Abdullah et al., 2006

Lectin – pár primerů specifických pro sójový gen lectin, amplifikace fragmentu určuje přítomnost DNA sóji ve vzorku

CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S promoter – pár primerů určující přítomnost promotoru používaného při transgenozí ve vzorku.

RR (Roundup Ready) – pár primerů určující přítomnost transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup (účinná látka glyfosát) ve vzorku.

Pracovní postup

1. Jako první jsem připravila reakční směs pro požadovaný počet vzorků. Poté jsem hotovou směs, která neobsahovala DNA, napipetovala do jednotlivých amplifikačních zkumavek. Do každé ze zkumavek jsem pipetovala objem 9 μ l.
2. Následně jsem přidala 1 μ l vyizolované DNA k reakční směsi ve zkumavce
3. Všechny zkumavky jsme krátce vortexovala, centrifugovala a vložila do termocykléru GenePro™ Thermal Cycler a spustila program pro GM sóju.
4. Celkový čas potřebný pro amplifikaci byl 96 minut
Teploty a časy jednotlivých fází PCR jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Teplotní fáze polymerázové řetězové reakce

fáze	teplota	čas	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	45 s	30x
3	60 °C	30 s	
4	72 °C	30 s	
5	72 °C	10 min	
6	4 °C	∞	

1.8 Gelová elektroforéza

Po ukončení polymerázové řetězové reakce jsem vzorky vyhodnocovala pomocí gelové elektroforézy. Pro separaci nukleových kyselin jsem připravovala 1,5 % gel a pro vizualizaci DNA jsem používala ethidium bromid, který se vmezeňuje mezi jednotlivé báze DNA, a po ozáření ultrafialovým zářením emituje světlo.

Pracovní postup

1. Jako první jsem si připravila 1,5 % gel. Do Erlenmeyerovy baňky jsem navážila 1,5 g agarózy a smíchala se 120 ml TBE pufru
2. Směs agarózy a pufru jsem dala rozvařit do mikrovlnné trouby a ponechala v ní, dokud nebyl gel zcela čirý
3. Rozvařenou agarózu jsem poté zchladila přibližně na 60 °C pod tekoucí vodou
4. Do zchladlé směsi jsem přidala 6 µl EtBr (ethidium bromidu)
5. Takto připravenou směs jsem nalila do utěsněné elektroforetické vaničky, vložila hřebínek (pro vytvoření jamek) a nechala ztuhnout přibližně 20 minut
6. Po ztuhnutí jsem z gelu opatrně vyjmula hřebínek a gel i s vaničkou vložila do elektroforetické vany obsahující TBE pufr
7. Následně jsem do jednotlivých jamek v gelu pomocí pipety nanášela 8 µl PCR produktu
8. Do první jamky jsem vždy nanášela 10 µl 100 bp ladderu (molekulový marker)
9. Elektroforetickou vanu jsem připojila ke zdroji napětí o velikosti 120 V
10. Separace molekul probíhala 45 minut

11. Posledním krokem elektroforézy bylo nasvícení gelu UV světlem, vyfotografování a následné zhodnocení výsledku.

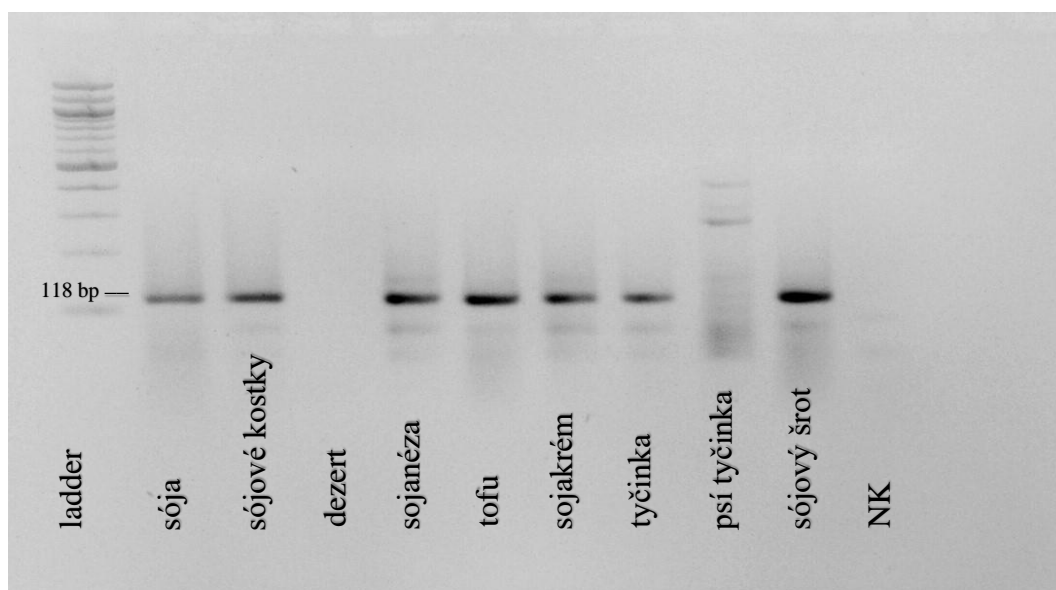
5. Výsledky

Soubor testovaných vzorků v rámci této bakalářské práce společně s naměřenými koncentracemi jednotlivých vzorků je shrnut v tabulce č.6. O čistotě DNA vypovídají hodnoty OD_{260/280} a OD_{260/230}. Jedná se o poměry absorbancí vzorku při daných vlnových délkách. Oba tyto indexy by měly být větší než 1,8. Nízký index OD_{260/280} svědčí o kontaminaci proteiny a nízký OD_{260/230} index svědčí o kontaminaci solemi nebo rozpouštědly. Všechny výše zmíněné parametry extrahované DNA jsou zobrazeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Koncentrace a čistota vytěžené DNA jednotlivých vzorků

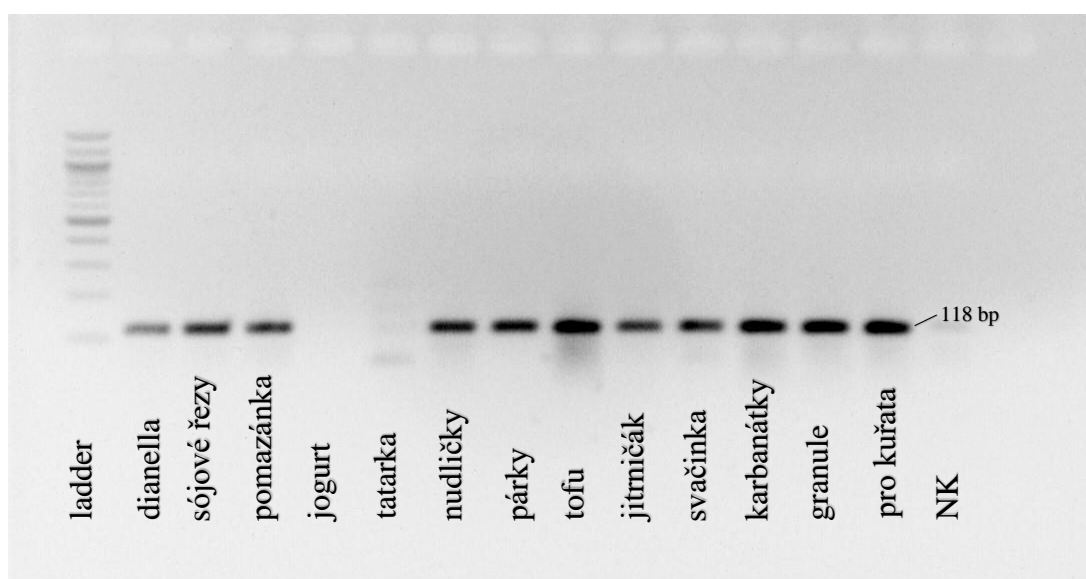
sada vzorků	typ potraviny/krmiva	koncentrace DNA [ng/μl]	OD260/280	OD260/230
1	sója	476,62	2,16	1,94
	sójové kostky	99,46	2,13	1,32
	čokoládový dezert	33,33	1,8	0,5
	sojanéza	47,52	2,26	1,04
	tofu	352,17	2,07	1,54
	sojakrém	105,07	2,21	1,63
	arašídová tyčinka	44,61	1,86	0,84
	dentální tyčinka pro psy	68,73	2,17	1,91
	extrudovaný sójový šrot	328,01	2,13	1,75
2	tofu párky pikantní	19,81	1,24	0,39
	tofu natural	877,68	2,1	1,59
	jitrničák sójový	47,35	1,84	1,22
	svačinka sójová	150,73	1,81	0,86
	tofu karbanátky	427,98	2,12	1,82
	granule	194,33	2,19	2,12
	krmná směs pro kuřata	219,41	2,18	2,07
3	tyčinka Dianella	33,65	1,53	0,53
	sójové řezy	108,99	2,04	1,6
	pochoutka toskánská	51,54	2,12	1,63
	sojáčik čokoláda	7,33	1,79	0,48
	sójové nudličky	138,57	2,16	1,63
	sojolka	5,56	2,65	0,51
4	xČOT	273,43	2,08	1,71
	ČOS T	220,19	2,14	2
	KPB T	132,81	2,03	1,81
	P1	285,32	2,09	2,01
	ČOT B	193,22	2,08	1,87
	A0	127,13	2,06	1,86
	TELSTART	226,33	2,07	1,73
	N1 PLUS drť	216,93	2,09	1,97
	N1 PLUS granule	252,66	2,08	1,84
	VKCH 2 PLUS	208,27	2,08	1,91
	K2 PLUS	159,08	2,08	2,1

U následujících vzorků byla provedena analýza přítomnosti DNA sóji pomocí primerů specifických pro gen *lectin*. Podle elektroforeogramu na obrázku č.2 byl očekávaný 118 bp fragment amplifikován ve vzorcích DNA získaných ze sóji (Lagris), sójových kostek (Ekoprodukt), sojanézy (Kalma), tofu (Veto), sojajakrému (Lunter), tyčinky (Cambridge Weight Plan) a sójového šrotu. DNA sóji nebyla prokázána ve vzorku DNA získaného z dezertu (Alpro) a psí tyčinky (Frolic)



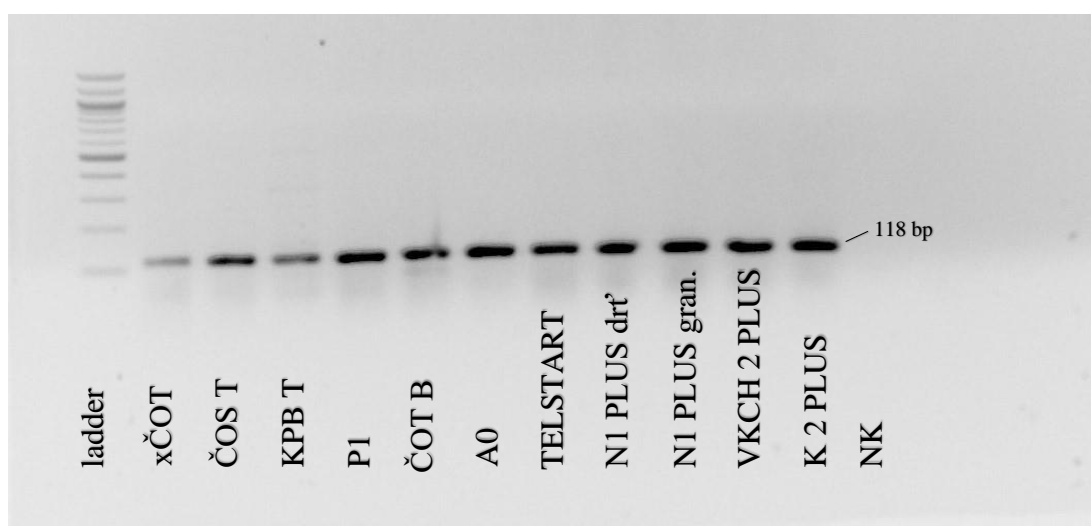
Obrázek 2 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 1 na přítomnost DNA sóji. Očekávaná délka fragmentu byla 118 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

Podle elektroforeogramu na obrázku č.3 byl očekávaný 118 bp fragment amplifikován ve vzorcích DNA získaných z dianelly (Chocoland), sójových řezů (Zora), pomazánky (Veto), nudliček (BonaVita), párků (Lunter), tofu (SUNFOOD), jitrničáku (Amunak), svačinky (Amunak), karbanátků (SUNFOOD), granulí a směsi pro kuřata. DNA sóji nebyla prokázána ve vzorku DNA získaného z jogurtu (Sojaproduct) a tatarky (Sojaproduct).



Obrázek 3 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 2 (párky-pro kuřata) a 3 (dianella-nudličky) na přítomnost DNA sóji. Očekávaná délka fragmentu byla 118 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

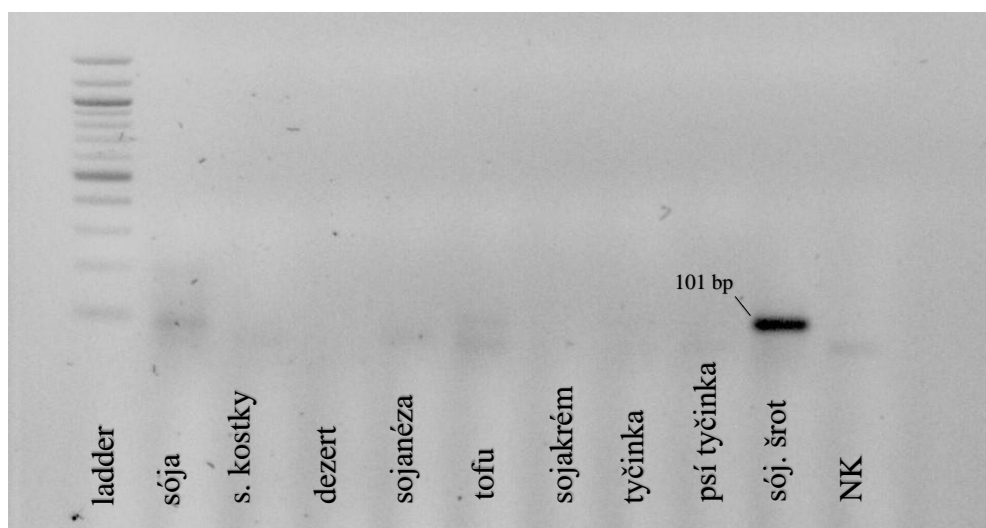
Podle elektroforeogramu na obrázku č.4 byl očekávaný 118 bp fragment amplifikován ve vzorcích DNA získaných ze vzorků krmiv xČOT, ČOS T, KPBT, P1, ČOT B, A0 (Hansa C. B. spol. s.r.o.), TELSTART (ZEA Sedmihorky), N1 PLUS drť, N1 PLUS granule, VKCH 2 PLUS, K2 PLUS (VKS Pohledští Dvořáci a.s.)



Obrázek 4 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 4 na přítomnost DNA sóji. Očekávaná délka fragmentu byla 118 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

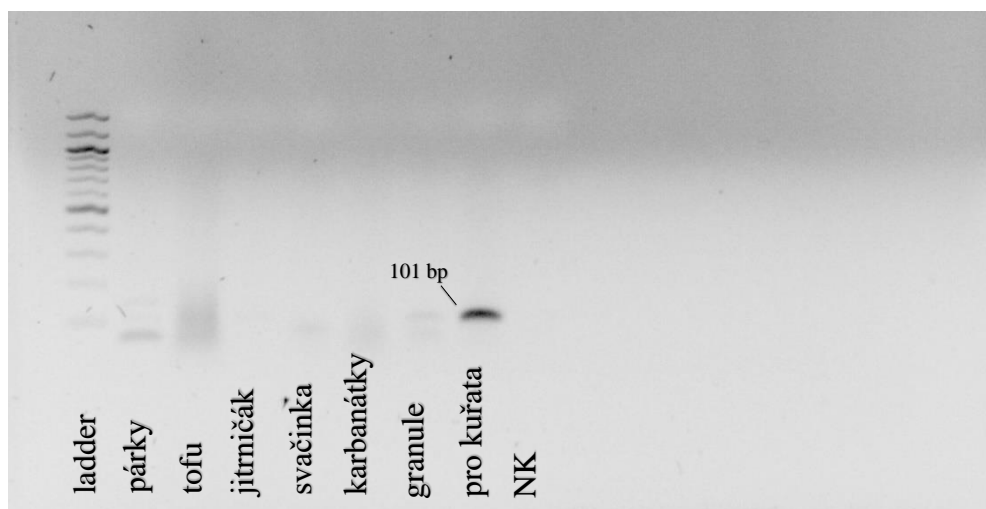
U následujících vzorků byla provedena analýza na přítomnost CaMV 35S promotoru používaného při transgenozí.

Podle elektroforeogramu na obrázku č.5 byl očekávaný 101 bp fragment amplifikován v jediném vzorku DNA získaného z extrudovaného sójového šrotu.



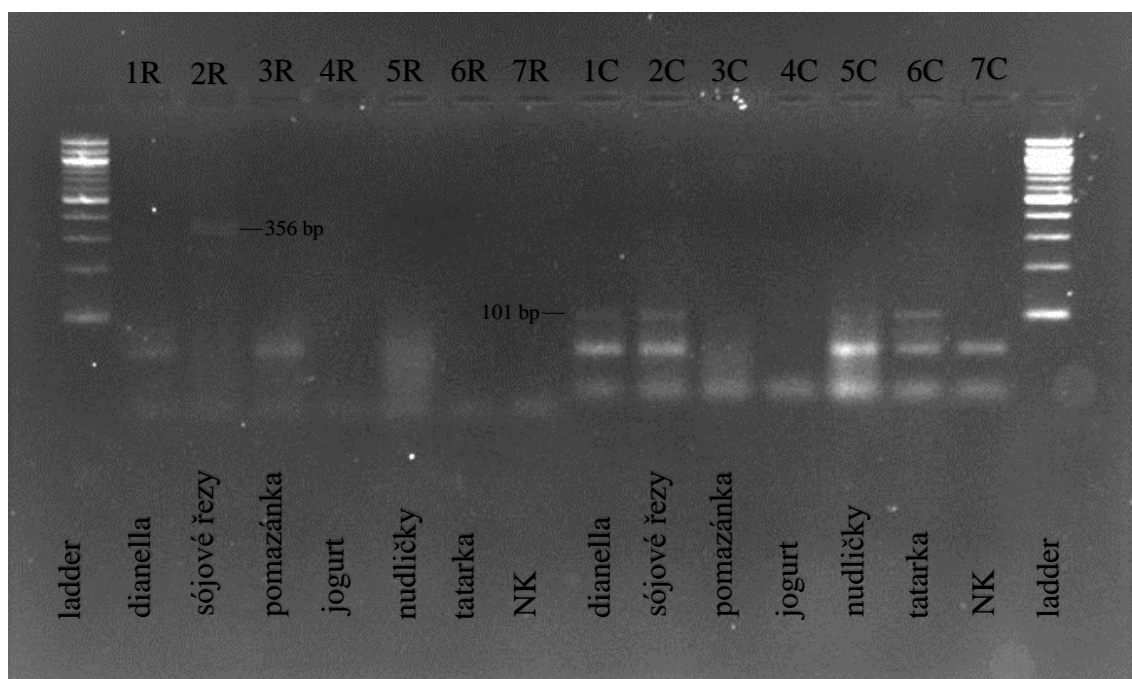
Obrázek 5 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 1 na přítomnost CaMV 35S promotoru. Očekávaná délka fragmentu byla 101 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

Podle elektroforeogramu na obrázku č.5 byl očekávaný 101 bp fragment amplifikován v jediném vzorku DNA získaného z krmiva pro kuřata.



Obrázek 6 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 2 na přítomnost CaMV 35S promotoru. Očekávaná délka fragmentu byla 101 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

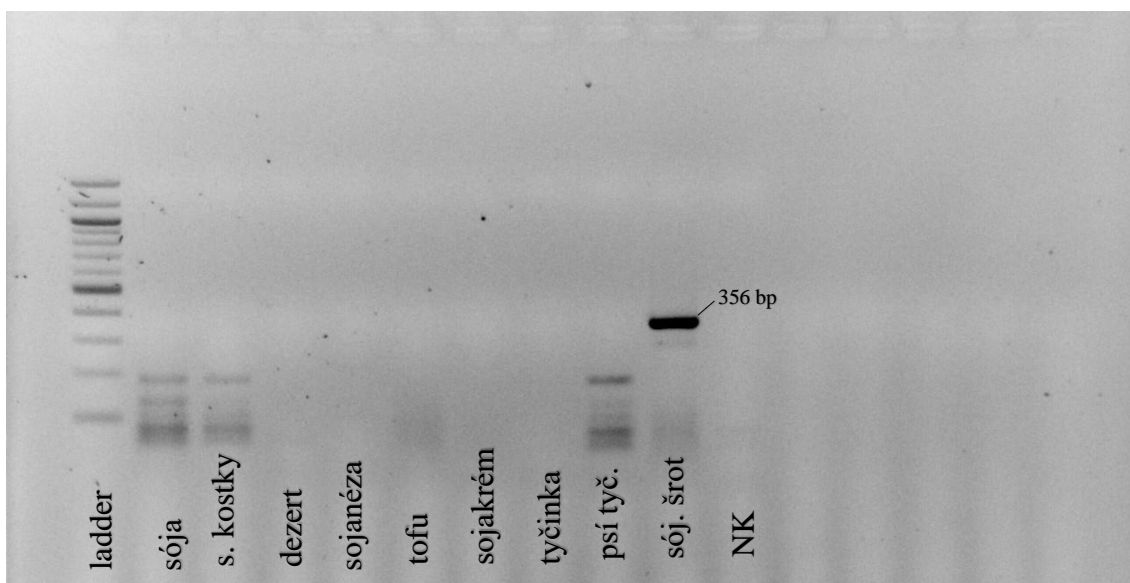
Podle elektroforeogramu na obrázku č.7 byl očekávaný 101 bp fragment amplifikován ve vzorcích DNA získaných z dianelly (Chocoland), sójových řezů (Zora) a tataruky (sojaprodukt). Fragment o délce 356 bp byl amplifikován v jediném vzorku DNA získaného ze sójových řezů (Zora). U vzorků pomazánka (Veto), jogurt (Sojaprodukt) a nudličky (BonaVita) nebyla ve vzorku DNA prokázána přítomnost žádného z testovaných genů (CaMV a RR)



Obrázek 7 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 3 na přítomnost CaMV 35S promotoru (1C-7C) a transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup (1R-7R). Očekávaná délka fragmentu byla 101 bp (CaMV) a 356 bp (RR); ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

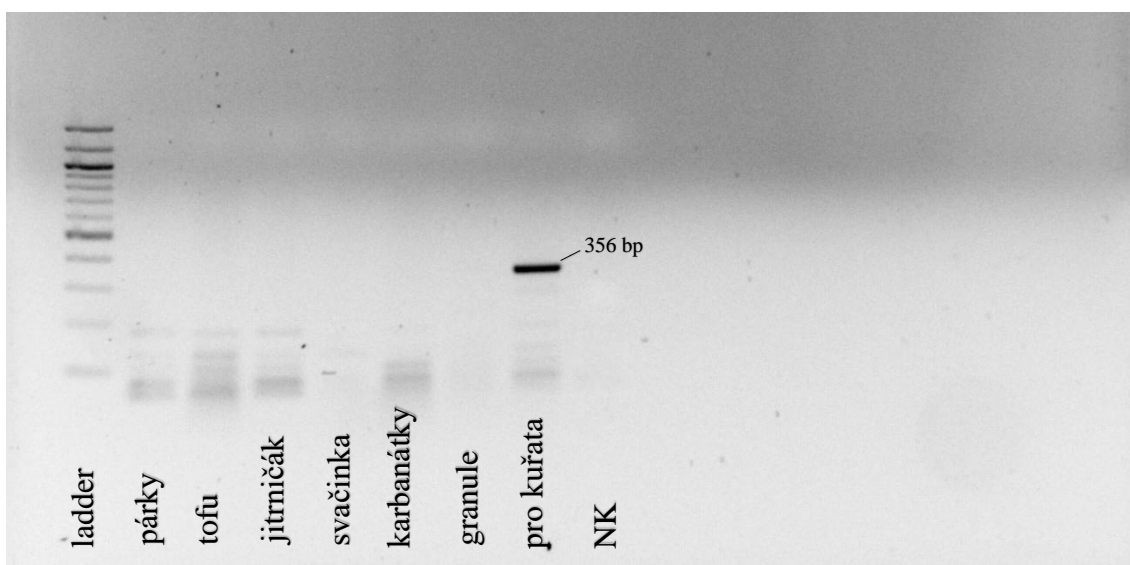
U následujících vzorků byla provedena analýza na přítomnost transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup (účinná látka glyfosát) ve vzorcích DNA.

Podle elektroforeogramu na obrázku č.8 byl očekávaný 356 bp fragment amplifikován v jediném vzorku DNA získaného z extrudovaného sójového šrotu.



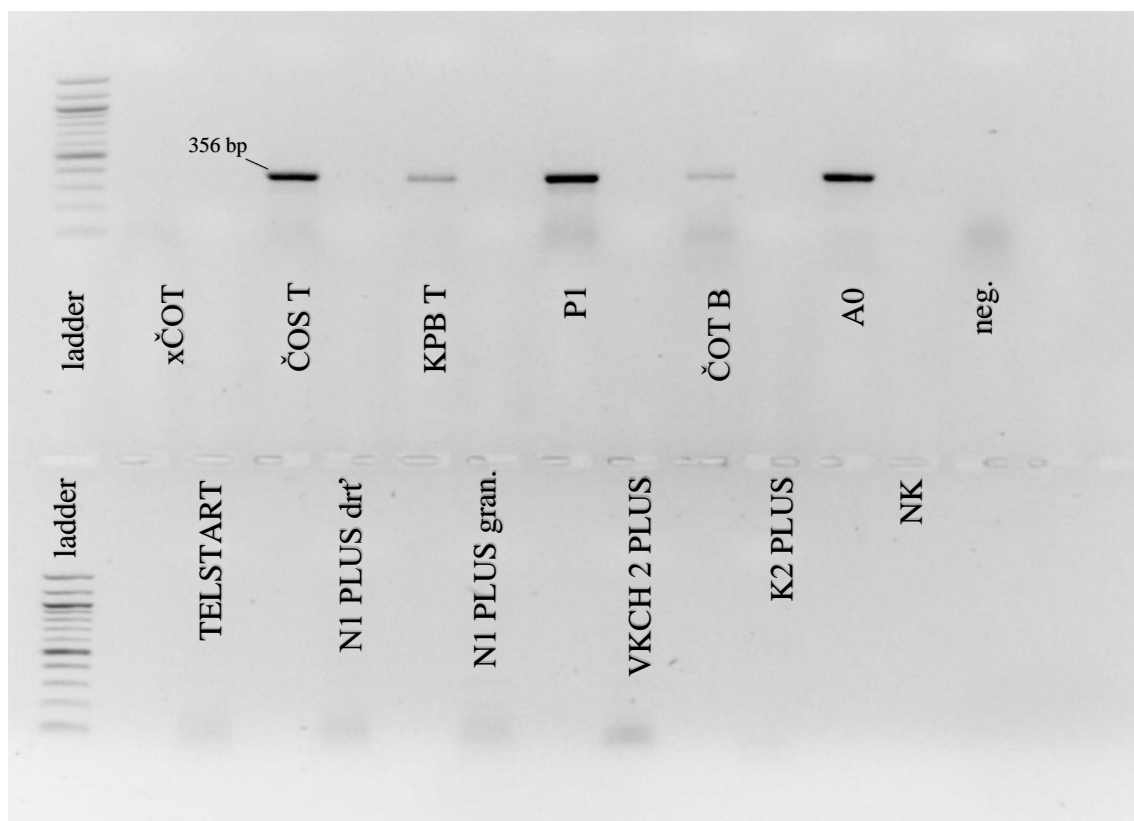
Obrázek 8 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 1 na přítomnost transgenu odolného k herbicidu Roundup. Očekávaná délka fragmentu byla 356 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

Podle elektroforeogramu na obrázku č.9 byl očekávaný 356 bp fragment amplifikován v jediném vzorku DNA získaného z krmné směsi pro kuřata.



Obrázek 9 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 2 na přítomnost transgenu odolného k herbicidu Roundup. Očekávaná délka fragmentu byla 356 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

Podle elektroforeogramu na obrázku č.10 byl očekávaný 356 bp fragment amplifikován ve vzorcích DNA získaných z krmiv označených ČOS T, KP B T, P1, ČOT B a A0 (Hansa C. B. spol. s.r.o.). Přítomnost transgenu odolného k herbicidu Roundup nebyla prokázána u vzorků TELSTART (ZEA Sedmihorky), N1 PLUS drť, N1 PLUS granule, VKCH 2 PLUS a K2 PLUS (VKS Pohledští Dvořáci a.s.).



Obrázek 10 Elektroforeogram PCR analýzy vzorků ze sady 4 na přítomnost transgenu odolného k herbicidu Roundup. Očekávaná délka fragmentu byla 356 bp; ladder (marker molekulové hmotnosti) o délce 100 bp; NK: negativní kontrola

V následující tabulce č. 8 jsou shrnuty výsledky PCR analýzy všech testovaných vzorků. Znaménkem „+“ jsou označeny vzorky pozitivní pro přítomnost daného genu. Znaménko „-“ označuje vzorky bez přítomnosti daných genů. Vzorky s označením „ +/-“ informují o slabě pozitivním (zdánlivě negativním) výsledku, zapříčiněným možnými chybami při přípravě PCR směsi (kontaminace) či špatné manipulaci při nanášení vzorků do agarózového gelu. Slabá pozitivita může být také způsobena nízkou koncentrací a čistotou vytěžené DNA.

Tabulka 7 Výsledky PCR analýzy na přítomnost jednotlivých genů ve vzorcích DNA.

sada vzorků	typ potraviny/krmiva	lectin	CaMV	RR
1	sója	+	-	-
	sójové kostky	+	-	-
	čokoládový dezert	-	-	-
	sojanéza	+	-	-
	tofu	+	-	-
	sojakrém	+	-	-
	tyčinka	+	-	-
	dentální tyčinka pro psy	-	-	-
	extrudovaný sójový šrot	+	+	+
2	tofu párky pikantní	+	-	-
	tofu natural	+	-	-
	jitrničák sójový	+	-	-
	svačinka sójová	+	-	-
	tofu karbanátky	+	-	-
	granule	+	-	-
	krmná směs pro kuřata	+	+	+
3	tyčinka Dianella	+	+	-
	sójové řezy	+	+	+/-
	pochoutka toskánská	+	-	-
	sojáčik čokoláda	-	-	-
	sójové nudličky	+	-	-
	sojolka (tatarka)	+	+	-
4	xČOT	+	-	-
	ČOS T	+	+	+
	KPB T	+	+/-	+/-
	P1	+	+	+
	ČOT B	+	+/-	+/-
	A0	+	+	+
	TELSTART	+	-	-
	N1 PLUS drť	+	-	-
	N1 PLUS granule	+	-	-
	VKCH 2 PLUS	+	-	-
	K2 PLUS	+	-	-

6. Diskuze

Současné předpisy Evropské Unie stanovují, že produkty obsahující více než 0,9 % geneticky modifikované složky musí být označeny. Například pokud čistý sójový produkt obsahuje 1 % sóji z geneticky modifikované odrůdy musí být označena. V případě, že produkt obsahuje 0,5 %, označen být nemusí. Pokud produkt obsahuje 10 % sóji a 90 % jiných složek, platí, že i kdyby bylo pouhé jedno z 10 % sójové složky geneticky modifikované, musí být produkt též patřičně označen, i přesto, že by v přepočtu na celkové množství obsahoval pouze 0,5 % GM složky (Rott et al., 2004). Mimo státy EU se povolené množství GM složky v potravinách v jiných státech liší. V Japonsku a Taiwanu se jedná například o 5 %, Severní Korea povoluje limit 3 % a hranice 1 % je uplatňována na Novém Zélandě. V Kanadě a Spojených státech je pro změnu označování GM produktů dobrovolné (Gryson et al., 2007)

Vzhledem k tomu, že jsou pravidla pro užívání a označování GMO produktů a odvozených složek realizována po celém světě (Abdullah et al., 2006), je v souladu s těmito pravidly nutná spolehlivá a přesná detekce GMO. Zejména v Evropě je hlavní metodou kontroly dodržování předpisů souvisejících GMO technika PCR amplifikace DNA, která je známá pro svou vysokou senzitivitu a specifitu (Holst-Jensen et al., 2003). V porovnání s metodami založenými na proteinech je vybavení a provoz nákladný a vyžaduje personál s vysokoškolským vzděláním (Gryson et al., 2007). Získávání spolehlivých výsledků může být navíc ovlivněno přítomností PCR inhibitorů a poškozením DNA vlivem zpracování produktu (Anklam et al., 2002). Reakci může ovlivňovat také design zvolených primerů. Ty mohou být komplementární k různým úsekům (sekvencím) Roundup Ready specifického konstruktů. Naopak u primerů komplementárních ke stejnému úseku konstruktů může docházet k rozdílům v délce nebo mohou být posunuty o jednu či více bazí (Hoef et al., 1998).

Pro účely této bakalářské práce jsem sehnala celkem 33 vzorků. Krmiva byla zastoupena celkem 15 vzorky a potraviny 18 vzorky. Veškeré potraviny byly pořízeny v běžně dostupných obchodních řetězcích. Dva vzorky potravin měly na svém obale označení „*GMO FREE*“. Ostatní žádné označení týkající se přítomnosti GMO neměly. Předpokládala jsem, že vzhledem k legislativě upravující označování GM produktů, by

žádný ze vzorků neměl obsahovat GM sóju. Každý vzorek byl testován na přítomnost genu pro lektin. Výrazné černé proužky na elektroforéze svědčí o přítomnosti tohoto genu a tedy DNA sóji. U některých vzorků nebyla prokázána přítomnost lektinového genu. V tomto případě se jedná o vzorek s označením „*dezert*“ (Alpro) a „*psí tyčinka*“ (Frolic). Negativní výsledek souvisí s největší pravděpodobností s koncentrací vyzolované DNA a s její „čistotou“. V případě vzorku „*dezert*“ (Alpro) byla koncentrace DNA velmi nízká (33,33 ng/μl). U vzorku „*psí tyčinka*“ (Frolic) je koncentrace v porovnání s ostatními také velmi nízká. Výrobce zde navíc neuváděl přítomnost sóji či jiné sójové bílkoviny ve složení, ale pouze přítomnost rostlinné bílkoviny. Vzhledem k velkému počtu složek surovin nejen v tomto vzorku, ale i v ostatních víceložkových potravinách, je možné pozorovat zmnožené nespecifické fragmenty o jiné délce, než je délka detekovaného genu. Naopak v jamce pro negativní kontrolu, by vzhledem k nepřítomnosti DNA nemělo při procesu PCR dojít k amplifikaci. Pokud k ní dojde a na agarózovém gelu jsou viditelné zmnožené fragmenty, je výsledek neplatný a celý proces počínaje PCR se musí znovu opakovat. Při detekci promotoru CaMV 35S a transgenu Roundup u potravinových vzorků bylo určování pozitivitu vzhledem k velmi nízkým koncentracím vytěžené DNA obtížnější. Proužky, které zobrazují amplifikovaný gen odpovídající délky, se po osvětlení UV světlem zobrazovaly velmi slabě.

Celkem u třech potravinových vzorků se ukázalo, že obsahují GM sóju. Dá se předpokládat, že vzhledem k výše zmíněné legislativě, která nařizuje označování těchto potravin v případě, že hodnota GM složky je vyšší nebo rovna 0,9 %, nepřesahují tyto vzorky danou mez. Z mnou prováděných analýz to ale nelze ověřit. Množství GM sóji ve výrobku bych musela stanovit pomocí qPCR. Tato metoda nebyla však předmětem mé bakalářské práce. Konkrétně se jednalo o tyčinku *Dianella*, (Chocoland a.s.), *sójový řez* (Zora) a *sojolka* (Sojaprodukt). *Sójový řez* (Zora) vykazuje pozitivitu jak pro přítomnost promotoru CaMV 35S, tak pro specifický transgen RR. Jedná se tedy o geneticky modifikovanou potravinu. Tyčinka *Dianella* (Chocoland a.s.) a *sojolka* (Sojaprodukt) jsou pozitivní na přítomnost CaMV 35S promotoru, ale nikoli na přítomnost transgenu pro odolnost k herbicidu Roundup. Lze se tedy domnívat, že tyto dva produkty také obsahují GM sóju, která však obsahuje jiný transgen než transgen pro odolnost

k herbicidu Roundup. U některých potravin se podařilo získat pouze velmi nízkou koncentraci DNA. Tato skutečnost měla vliv na výsledek analýzy při detekci některých genů, kde se výsledek jevil jako negativní. Při detekci genu pro *lectin* se konkrétně jednalo o vzorky *čokoládový dezert* (Alpro), *dentální tyčinka pro psy* (Frolic), *sojáčik* (Sojaprodukt) a *sojolka* (Sojaprodukt). Koncentrace DNA těchto potravin se pohybovala pod hodnotou 50 ng/μl. Výjimkou byla *dentální tyčinka pro psy*, která sice měla hodnotu koncentrace DNA vyšší, než 50 ng/μl (68,73ng/μl), ale i přesto se jedná v porovnání s ostatními o nízkou hodnotu. Zde je příčinou negativního výsledku detekce genu pro *lectin* přítomnost, respektive nepřítomnost sóji ve složení výrobku. Výrobce udával ve složení obsah „*rostlinné bílkoviny*“, přítomnost sóji jsem proto předpokládala. S největší pravděpodobností tomu vzhledem k výsledku méj analýzy nebylo. U tohoto, ale i jiných vzorků, které mají ve svém složení spoustu dalších surovin, lze na agarózovém gelu pozorovat přítomnost i jiných nespecifických fragmentů. Právě i zastoupení jiných složek, které se v daném výrobku nachází, ovlivňuje konečnou koncentraci vyizolované DNA. U produktů obsahujících pouze čistou sóju, jako jsou například sójové boby (Lagris) nebo tofu (SUNFOOD s.r.o.), je koncentrace DNA sóji mnohonásobně vyšší, než u potravin jako je například sójový jogurt (Alpro), kde je procentuální zastoupení sóji či jiných sójových složek velmi nízké. To samé se týká i krmiv. V případě krmiv s označením „*KPB T*“ (Hansa C.B.spol. s.r.o.) a „*ČOT B*“ (Hansa C.B.spol. s.r.o.), je fragment na elektroforéze jako výsledek detekce transgenu velmi slabě viditelný. Tato slabá viditelnost je v případě *KPB T* krmiva (Hansa C.B.spol. s.r.o.) pravděpodobně způsobena nižší koncentrací DNA a také celkovým zastoupením sóji obsažené v tomto krmivu. Podobně tomu bylo i u krmiva *ČOT B* (Hansa C.B.spol. s.r.o.), kde sice koncentrace DNA je srovnatelná s ostatními, ale v porovnání s nimi má ve svém složení namísto extrudovaného sójového šrotu „pouze“ sójové slupky a sójový protein. Z celkového počtu 15 krmiv testovaných na přítomnost GMO bylo pozitivní na výskyt GM sóji 7 vzorků. Žádné z těchto krmiv nemělo na svém obale informaci vypovídající o přítomnosti geneticky modifikovaných složek, U krmiv, které byly označeny jako „*NON GMO*“ či „*GMO FREE*“ skutečně nebyla prokázána přítomnost genů svědčící o genetické modifikaci daného krmiva. Analýzy na přítomnost GM sóji v potravinách byly

například prováděny také v Malajsii. Roundup Ready sója se zde u sójových bobů vyskytovala v 9 případech z 20 a také v 8 případech z celkových 37 vzorků tofu (Abdullah et al.,2005). Ve srovnání s mnou získanými výsledky je to o poznání větší procento výrobků s obsahem GM sóji než u výrobků dostupných na českém trhu.

7. Závěr

Cílem této bakalářské práce na téma PCR detekce geneticky modifikované sóji v potravinách a krmivech bylo praktické zvládnutí a osvojení si molekulárně – biologických metod využívaných při detekci GMO a vypracování rešeršní části týkající se principů těchto metod a problematiky GMO. Záměrem této práce bylo zjištění, zda sója nebo jiné sójové složky (sójové vločky, sójové slupky apod.), které můžeme v potravinách a krmivech nalézt, prošly procesem genetické modifikace či nikoli, a zda jsou informace o nepřítomnosti GM sóji na obalech potravin pravdivé.

Ze všech potravin nesly pouze dvě z nich na svém obalu informaci o nepřítomnosti transgenů (GMO free). U takto označených potravin byla nepřítomnost GM sóji potvrzena. Ze všech testovaných potravinových vzorků celkem tři z nich obsahovaly transgenní sóju. V jednom případě se jednalo o sóju obsahující jiný transgen, než je transgen způsobující odolnost k herbicidu Roundup.

U krmiv bylo vyjádření o nepřítomnosti GMO četnější. Vyskytovalo se téměř na 1/3 z nich. Všechna krmiva nesoucí označení „NON GMO“ či „GMO FREE“ skutečně neobsahovala transgenní sóju. Co se týče detekce genů prokazující přítomnost promotoru používaného při transgenozí a přítomnost transgenů pro odolnost k herbicidu Roundup, byla u krmiv oproti potravinám celkově vyšší četnost výskytu těchto genů. Pozitivitu vykazovala přibližně polovina z testovaných vzorků krmiv.

Žádná potravina neměla na svém obalu informaci o přítomnosti GMO. Lze tedy předpokládat, že procentuální zastoupení GMO v těchto potravinách bylo nižší než 0,9 %.

Produkty obsahující geneticky modifikované složky jsou podrobovány přísným testům. Proto není třeba obávat se zdravotních rizik při jejich konzumaci. Vliv GMO na zdraví člověka dosud nebyl žádnými testy prokázán. Populárně naučné články zabývající se problematikou GMO zaměřenou zejména na rizika spojená s konzumací GMO nejsou vědecky podloženy, proto se jedná o pouhé spekulace. Záleží zde zcela na zákazníkovi a jeho preferencích, zda si výrobek označený jako GMO zakoupí či nikoli.

8. Seznam použité literatury

1. AARTS, H. J., RIE, J.-P. P. van a KOK, E. J., 2002. *Traceability of genetically modified organism*. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2(1), 69-77.
2. ABDULLAH, T., RADU, S., HASSAN, Z. a HASHIM, J. K., 2006. *Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method*. Food Chemistry. 98(3), 575-579.
3. ANDERSEN, CH. B., HOLST-JENSEN, A., BERDAL, K. G., THORSTENSEN, T. a TENGS, T., 2006. *Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR Green-based detection assays in detection and quantification of Roundup Ready soybean*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(26), 9658-9663.
4. ANKLAM, E., GADANI, F., HEINZE, P., PIJNENBURG, H., EEDE, G. V., 2002. *Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products*. European Food Research and Technology. 214(1), 3-26.
5. BARTŮŇKOVÁ, J., a PAULÍK, M., 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0691-1.
6. BATISTA, R. a OLIVEIRA, M. M., 2009. *Facts and fiction of genetically engineered food*. Trends in Biotechnology. 27(5), 277-286.
7. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.
8. BROD, F. C. A. a ARISI, A., C., 2007. *Recombinant DNA in meat additives: Specific detection of Roundup Ready soybean by nested PCR*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 87 (10), 1980–1984.
9. BROD, F. C. A., FERRARI, C. S. dos, VALETNE, L. L., ARISI, A. C. M., 2007. *Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk*. LWT-Food Science and Technology. 40(4), 748–751.
10. BUTLER, J. M., 2010. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Boston: Academic Press/Elsevier. ISBN 0123749999.
11. ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ, R., SÝKOROVÁ, M., ŠÍCHOVÁ, J., BROŽ, J., 2016. *Ekotech: Kurz základních metod molekulární biologie* [online], 2016. [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/10436559-Kurz-zakladnich->

[metod-molekularni-biologie.html](#)

12. DOSTÁLOVÁ, J. a KADLEC, P., 2014. *Potravinářské zbožíznalství*. ISBN 978-80-7418-208-2.
13. DROBNÍK, J., 2008. *Biotechnologie a společnost*. Praha: Přírodovědecká fakulta UK. ISBN 978-80-246-1484-7.
14. FERAY, C., SAMUEL, D., THIERS, V., GIGOU, M., PICHON, F., BISMUTH, A., REYNES, M., MAISONNEUVE, P., BISMUTH H. a BRÉCHOT, C., 1992. *Reinfection of Liver Graft by Hepatitis C Virus after Liver Transplantation*. 89(4), 1361-1365.
15. GAŠ, B., 2001. *Kapilární elektroforéza*. Vesmír [online]. 80(7), 370-373 [cit. 2019-02-23]. ISSN1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-7/kapilarni-elektroforeza.html>
16. GLICK, B. R. a THOMPSON, J. E., 1993. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0849351642.
17. GRIFFIN, H. G. A GRIFFIN, A. M., 1994. *PCR technology: current innovations*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0849386748.
18. GRYSON, N., DEWETTINCK, K. a MESSENS, K., 2007. *Detection of Genetically Modified Soy in Doughs and Cookies*. Cereal Chemistry. 84(2), 109-115.
19. HOEF, A. M. A. van, KOK, E. J., BOUW, E., KUIPER H. A. a KEIJER, J., 1998. *Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products*. Food Additives and Contaminants. 15(7), 767-774.
20. HOLST-JENSEN, A., RØNNING, S. B., LØVSETH, A. a BERDAL, K. G., 2003. *PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 375(8), 985-993.
21. HUANG, CH.-CH. a PAN, T.-M., 2005. *Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified Roundup Ready soybean*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(10), 3833-3839.
22. INNIS, M. A., GELFAND, D. H. a SNINSKY, J. J., 1995. *PCR strategies*. San Diego: Academic Press. ISBN 0123721830.

23. JACKSON, J. F., LINSKENS, H. F. a INMAN, R. B., 2002. *Testing for genetic manipulation in plants*. New York: Springer. ISBN 3540431535.
24. JANKIEWICZ, A., BROLL, H. a ZAGON, J., 1999. *The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer)*. European Food Research and Technology. 209(2), 77–82.
25. KASPER, H., 2015. *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4533-6.
26. KÁŠ, J., 2004. *Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy*. Praha: JPM Tisk s.r.o. ISBN 80-86313-13-1.
27. KRAMKOWSKA, M., GRZELAK, T. a CZYŻEWSKA, K., 2013. *Benefits and risks associated with genetically modified food products*. Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM. 20(3), 413–419.
28. KUCIEL, J. a URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-385-1.
29. MA, Z. a LIU, H., 2007. *Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine*. China Particuology. 5(1-2), 1-10.
30. MATAVELI, L. R. V., POHL, P., MOUNICOU, S., ARRUDA M. A. a SZPUNAR, J., 2010. *A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds*. Metallomics. 2(12), 800-805
31. NATARAJAN, S., LUTHRIA, D., BAE, H., LAKSHMAN, D. a MITRA, A., 2013. *Transgenic Soybeans and Soybean Protein Analysis: An Overview*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 61(43), 11736-11743
32. ONDŘEJ, M. a DROBNÍK, J., 2002. *Transgenozé rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0958-2.
33. PENKA, M. a BULIKOVÁ, A., 2009. *Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2299-3.
34. PENKA, M. a TESAŘOVÁ, E., 2011. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

35. PLANK, CH., SCHILLINGER, U., SCHERER, F., BERGEMANN, CH., RÉMY, J.-S., KRÖTZ, F., ANTON, M., LAUSIER, J. a ROSENECKER, J., 2003. *The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery*. Biological Chemistry. 384(5), 737-747.
36. ROSCULETE, E., BONCIU, E., ROSCULETE, C. A. a TELEANU, E., 2018. *Detection and Quantification of Genetically Modified Soybean in Some Food and Feed Products. A Case Study on Products Available on Romanian Market*. Sustainability. 10(5), 1325
37. ROTT, M. E., LAWRENCE, T. S., WALL, E. M. a GREEN, M. J., 2004. *Detection and quantification od roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(16), 5223-5232.
38. SAFARIK, I., POSPISKOVA, K., HORSKA, K. a SAFARIKOVA, M., 2012. *Potential of magnetically responsive (nano)biocomposites*. Soft Matter. 8(20), 5407-5413.
39. SAIYED, Z. M., RAMCHAND, C. N. a TELANG, S. D., 2008. *Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support*. Journal of Physics: Condensed Matter. 20(20): 204153
40. SMITH, J. M., 2015. *Doba jedová*. Přeložil Daniel MICKA. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7387-924-2.
41. SULIBURSKA, J. a KREJPCIO, Z., 2014. *Evaluation of the content and bioaccessibility of iron, zinc, calcium and magnesium from groats, rice, leguminous and nuts*. Journal of Food and Technology. 51(3), 589-594
42. ŠIMKOVÁ, H., 2012. *Breviář forenzní genetiky: forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích*. Brno: Tribun EU. ISBN 978-80-263-0247-6.
43. ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
44. TOMAN, M., 2009. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2464-5.
45. YAMADA, T., TAKAGI, K. a ISHIMOTO, M., 2012. *Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis*. Breeding Science. 61(5), 480-494

46. YOUNT, L., 2008. *Biotechnology and Genetic Engineering*. New York: Infobase Publishing. ISBN 978-1-4381-3082-8.

47. ZIMA, T., 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

Seznam obrázků

1. ZIMA, T., 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

Seznam zkratek

EU – Evropská Unie

GM – geneticky modifikovaný

GMO – geneticky modifikovaný organismus

Např. – například

Atd. – a tak dále

ES – Evropská směrnice

µm – mikrometr

µl – mikrolitr

apod. – a podobně

dsDNA – dvouvláknová DNA

ng – nanogram

l – litr

č. – číslo

s.r.o. – s ručením omezeným

a.s. – akciová společnost

obr. – obrázek

PCR – polymerázová řetězová reakce