

Detekce geneticky modifikovaných organismů v potravinách a potravinářských surovinách

Bc. Kristína Tocíková

Diplomová práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristína Tocíková**
Osobní číslo: **T18283**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Detekce geneticky modifikovaných organismů v potravinách a potravinářských surovinách**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Geneticky modifikované organismy – charakterizace, příprava, vlastnosti, legislativní předpisy
2. Geneticky modifikované potraviny a potraviny s podílem GMO – charakterizace, legislativní předpisy
3. Metody stanovení geneticky modifikovaných organismů v potravinách

II. Praktická část

1. Optimalizace molekulárně-biologických metod pro stanovení geneticky modifikovaných organismů a potravin
2. Stanovení přítomnosti geneticky modifikovaných organismů v potravinách
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] HELLER, K. Genetically engineered food: methods and detection. 2nd updated and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, 299 s. ISBN 9783527609468.
- [2] QUERCI, M., VAN DEN BULCKE, M., ŽEL, J., VAN DEN EEDE, G., BROLL, H. New approaches in GMO detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396: 1991-2002. 2010.
- [3] COTTENET, G., BLANCPAIN, C., SONNARD, V., FONG CHUAH, P. Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. Food Chemistry, 274: 760-765. 2019.
- [4] NAKAMURA, K., ISHIGAKI, T., KOBAYASHI, T. ET AL. Identification of chickpea (*Cicer arietinum*) in foods using a novel real-time polymerase chain reaction detection method. Journal of Food Composition and Analysis, 71: 8-16. 2018.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Teoretická část této práce je zaměřena na geneticky modifikované organizmy (GMO), potraviny obsahující GMO a metody k detekci GMO. Na detekci přítomnosti a množství geneticky modifikovaných organismů v zemědělských plodinách a potravinách bylo vyvinuto mnoho analytických kvantitativních a kvalitativních metod. Najpoužívanější metodou k detekci GMO je PCR metoda.

Cílem experimentální části této práce bylo detegovat přítomnost GMO v potravinářských surovinách pomocí PCR a real-time PCR metody. Izolace DNA proběhla pomocí kitů a pomocí CTAB metody. Jednotlivé postupy izolace DNA byly optimalizovány za účelem získu nejčistší DNA. Také bylo nutné stanovit prahové množství jednotlivých GMO v potravinářských surovinách, protože podle legislativních předpisů potraviny, které obsahují méně než 0,9 % GMO nemusí být označeny.

Klíčové slova: PCR, real-time PCR, geneticky modifikované organizmy, geneticky modifikované potraviny

ABSTRACT

The theoretical part of the diploma thesis is focused on genetically modified organisms (GMOs), genetically modified food and methods to detect GMOs. Many analytical methods, qualitative and quantitative, have been developed to determine the presence and amount of genetically modified organisms (GMOs) in agricultural crops and foods. The most widely used method to detect GMOs is the PCR method.

The aim of the experimental part of this thesis was to detect the presence of GMOs in food raw materials by PCR and real-time PCR. DNA was isolated by kits and by CTAB method. Individual DNA isolation procedures have been optimized to obtain the purest DNA. It was also necessary to set threshold level for individual GMOs in food raw materials because according to legislation, food containing less than 0,9% GMOs don't have to be labeled.

Keywords: PCR, real-time PCR, genetically modified organisms, genetically modified food

Touto prácou by som sa rada poďakovala mojej vedúcej diplomovej práce pani doc. RNDr. Leone Buňkovej, Ph.D., za jej odbornosť a cenné rady pri spracovaní teoretickej i experimentálnej časti diplomovej práce, či ochotu pomôcť počas celého štúdia. Taktiež by som sa rada poďakovala Ústavu inžinierstva ochrany životného prostredia za poskytnutie priestoru a nástrojov na realizáciu experimentálnej časti diplomovej práce. Vďaka patrí i pani laborantke Ing. Veronike Kučabovej za pomocnú ruku pri vypracovaní a zhotovení experimentálnej časti diplomovej práce a za vytvorenie priateľského prostredia.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČASŤ	10
1 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANIZMY	11
1.1 CHARAKTERIZÁCIA	11
1.2 PRÍPRAVA	11
1.2.1 Geneticky modifikované rastliny	11
1.2.2 Geneticky modifikované mikroorganizmy	13
1.3 VLASTNOSTI	16
1.4 PESTOVANIE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH PLODÍN	18
1.5 LEGISLATÍVNE PREDPISY	19
2 GENETICKY MODIFIKOVANÉ POTRAVINY A POTRAVINY S PODIELOM GMO.....	22
2.1 CHARAKTERIZÁCIA	22
2.1.1 Geneticky modifikované potraviny	22
2.1.2 Bezpečnosť geneticky modifikovaných potravín a potravín obsahujúcich geneticky modifikované organizmy	24
2.2 LEGISLATÍVNE PREDPISY	25
3 METÓDY STANOVENIA GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANIZMOV	27
3.1 METÓDY ZALOŽENÉ NA DETEKcii NUKLEOVÝCH KYSELÍN – POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA PCR	28
3.2 IMUNOMETÓDY	33
3.3 ALTERNATÍVNE METÓDY	34
4 CIELE PRÁCE	35
II PRAKTICKÁ ČASŤ	36
5 MATERIÁL	37
5.1 POTRAVINÁRSKY MATERIÁL	37
5.2 CHEMIKÁLIE A KITY	38
5.3 ZLOŽENIE ROZTOKOV	38
5.4 PRÍSTROJE.....	39
6 METÓDY	41
6.1 IZOLÁCIA DNA	41
6.1.1 Izolácia DNA pomocou CTAB metódy.....	41
6.1.2 Izolácia DNA pomocou optimalizovanej CTAB metódy	42
6.1.3 Izolácia DNA pomocou DNeasy® mericon Food kit (QUIAGEN).....	43
6.1.4 Izolácia DNA pomocou DNeasy® Plant Mini Kit(QUIAGEN).....	44
6.1.5 Izolácia DNA pomocou EliGene® Plant DNA Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON)	45

6.1.6	Izolácia DNA pomocou PowerFood [®] Microbial DNA Isolation Kit (QUIAGEN).....	47
6.1.7	Izolácia DNA pomocou E.Z.N.A. [®] Food DNA kit (OMEGA)	48
6.1.8	Izolácia DNA pomocou NucleoSpin [®] Plant II kitu (Macherey-Nagel).....	49
6.1.9	Izolácia DNA pomocou NucleoSpin [®] Foodkitu (Macherey-Nagel).....	50
6.2	MERANIE KONCENTRÁCIE VYIZOLOVANEJ DNA.....	51
6.2.1	Meranie koncentrácie DNA pomocou QFX Fluorometru (DeNovix).....	51
6.2.2	Meranie koncentrácie a čistoty DNA pomocou spektrofotometra Infinite 200 PRO (Tecan).....	51
6.3	PRÍPRAVA PRIMEROV K QPCR REAKCII	52
6.4	POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA (KLASICKÁ PCR).....	54
6.4.1	Vyhodnotenie klasickej PCR pomocou agarózovej elektroforézy.....	55
6.5	KVANTITATÍVNA PCR (REAL-TIME PCR).....	55
6.5.1	Vyhodnotenie qPCR pomocou absolútnej kvantifikácie	57
7	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	59
7.1	ČISTOTA A KONCENTRÁCIA VYIZOLOVANEJ DNA.....	59
7.2	PRÍTOMNOSŤ GMO V POTRAVINÁRSKYCH SUROVINÁCH A POTRAVINÁCH POMOCOU KLASICKEJ PCR.....	62
7.3	PRÍTOMNOSŤ GMO V POTRAVINÁRSKYCH SUROVINÁCH A POTRAVINÁCH POMOCOU QPCR A NÁSLEDNE URČENIE MNOŽSTVA GMO	64
7.3.1	Určenie presného množstva GMO v potravinárskych surovinách a potravinách pomocou absolútnej kvantifikácie	69
	ZÁVER.....	75
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	76
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	82
	ZOZNAM OBRÁZKOV	83
	ZOZNAM TABULIEK	84

ÚVOD

V súčasnej dobe majú geneticky modifikované organizmy (GMO) širokú škálu uplatnenia. Osobitnou kategóriou uplatnenia pre tieto organizmy je potravinársky priemysel. S rozvíjajúcim sa odvetvím genetických metód rastie produkcia nie len geneticky modifikovaných plodín, ktoré môžu byť následne spracované do potravín a potravinárskych surovín, ale aj vznik geneticky modifikovaných živočíchov. Zákazník v dnešnej dobe požaduje informácie o zložkách potravín, vrátane potravinových alergénov a geneticky modifikovaných organizmov, ktoré sú súčasťou potravinárskych produktov.

Metódy, ktoré slúžia k detekcii prítomnosti geneticky modifikovaných organizmov sa neustále vyvíjajú v súlade s právnymi predpismi. Pretože tradičné skriningové metódy sa zameriavajú iba na obmedzený počet markerov, nie všetky GMO sa dajú ľahko zistiť (Cottenet et al., 2019). Zisťovanie geneticky modifikovaných organizmov u potravín si vyžaduje metódu, ktorá je špecifická, citlivá a zdatná, najmä ak sa testujú zložité potravinové matrice – spracované potraviny. K detekcii GMO existuje celá rada metód, vrátane metódy polymerázovej reťazcovej reakcie (PCR), ktorá sa považuje za najrozšírenejšiu (Nakamura et al., 2018). Okrem klasickej PCR, pomocou ktorej však nemožno určiť obsah GMO v produkte, sa využíva hlavne kvantitatívna metóda real-time PCR. Okrem metód založených na detekcii nukleových kyselín je možné využiť i metódy na detekciu špecifických proteínov (ELISA, Western blot), prípadne alternatívne metódy (chromatografia, NIR).

V tejto práci boli detegované GMO v kukuričných a sójových potravinárskych produktoch. Pred využitím metódy PCR bola prevedená izolácia DNA pomocou komerčne dodaných kitov a pomocou cetyltrimetylamoniumbromid (CTAB) metódy. Metódy izolácie DNA boli optimalizované z dôvodu zisku vysokej koncentrácie DNA s najvyššou čistotou. Meranie vyizolovanej DNA bolo následne prevedené dvoma spôsobmi, a to fluorometricky a spektrofotometricky. Po prevedení real-time PCR bol obsah GMO v daných produktoch vyrátaný pomocou absolútnej kvantifikácie, pri ktorej sa porovnáva množstvo transgénu vo vzorke proti štandardu. Podľa právnej legislatívy produkty, ktoré obsahujú viac než 0,9 % GMO musia byť značené. Cieľom tejto práce bolo zavedenie metodiky analýzy GMO pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR), detekcia prítomnosti GMO v daných produktoch a určenie ich percentuálneho obsahu. Týmito postupmi sa následne môže zamedziť falšovaniu potravín pri ich príprave, či predaji v tržnej sieti.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANIZMY

1.1 Charakterizácia

Geneticky modifikovaný organizmus (GMO) je organizmus, ktorý má pozmenený dedičný materiál pomocou genetickej modifikácie (GM). Genetická modifikácia je proces, kedy dochádza k zmene dedičného materiálu umelou cestou, ako je napríklad kríženie. Takéto pozmenené organizmy sú schopné rozmnožovania, či prenosu genetického materiálu a majú pozmenené vlastnosti (Zdeňková et al., 2002).

Základná štruktúra DNA je rovnaká vo všetkých živých objektoch. U všetkých organizmov sú rôzne vlastnosti určené sekvenciou párov báz DNA. Vedci môžu v dnešnej dobe odobrať jeden alebo viac špecifických génov z takmer akéhokoľvek organizmu vrátane rastlín, zvierat, baktérií alebo vírusov a zaviesť tieto gény do genómu iného organizmu. U takého to organizmu následne dôjde k zmene určitých vlastností, ako je napríklad odolnosť voči herbicídum a škodcom, zvýšenie nutričnej hodnoty, či zvýšenie významných látok. Takéto plodiny sa následne môžu stať atraktívne pre konzumentov a priemyselné odvetvia (Štefanovičová et al., 2002, Wiczorek a Wright, 2012).

Hlavným dôvodom zavedenia geneticky modifikovaných organizmov – rastlín na trh je obmedzenie ekologickej záťaže pri pestovaní plodín, či funkčnosť obrany rastlín voči stresovaným podmienkam (Zdeňková et al., 2002). Okrem využitia GMO v potravinárskej a poľnohospodárskej sfére sa tieto modifikované organizmy využívajú i vo farmaceutickom odvetví a to pri tvorbe vakcín, ako je napríklad rekombinantná vakcína proti hepatitíde B, či tvorba rôznych biolátok. Medzi takéto biolátky patria peptidové hormóny i rekombinantný ľudský inzulín (Beneš, 2007).

1.2 Príprava

1.2.1 Geneticky modifikované rastliny

V poľnohospodárskej biotechnológii sa zmeny uskutočňujú priamo v genóme rastliny. Akonáhle je gén, ktorý určuje požadovaný znak alebo vlastnosť identifikovaný, môže byť vybraný, extrahovaný a prenesený priamo do iného rastlinného genómu. Rastliny, ktoré majú gény z iných organizmov sa označujú ako transgénne. Prítomnosť požadovaného génu sa môže testovať v ktoromkoľvek štádiu rastu, napríklad i v malých sadenicích

v skleníku. Pestovateľ tak môže rýchlo vybrať tie rastliny, ktoré najlepšie vyjadrujú požadovaný znak. Výroba nových odrôd plodín pomocou génového inžinierstva trvá v priemere asi 10 rokov (Wieczorek a Wright, 2012).

Geneticky modifikované rastliny (transgénne rastliny) vznikajú procesom transgenózy. Pri tomto procese dochádza k prenášaniam génov medzi rôznymi organizmami, pričom konečným organizmom je geneticky modifikovaný organizmus – GMO. Prvá transgénna rastlina vznikla v roku 1983. Jednalo sa o tabak, ktorý obsahoval rezistenciu k antibiotiku kanamycínu. Ako prvá plodina uvedená na trh v USA bola rajčina, ktorá bola odolná k vírusu tabakovej mozaiky. Táto rajčina mala pozmenené vlastnosti. Jednalo sa hlavne o predĺženú dobu skladovania, teda možnosť vývozu na väčšie vzdialenosti (Taufarová et al., 2014).

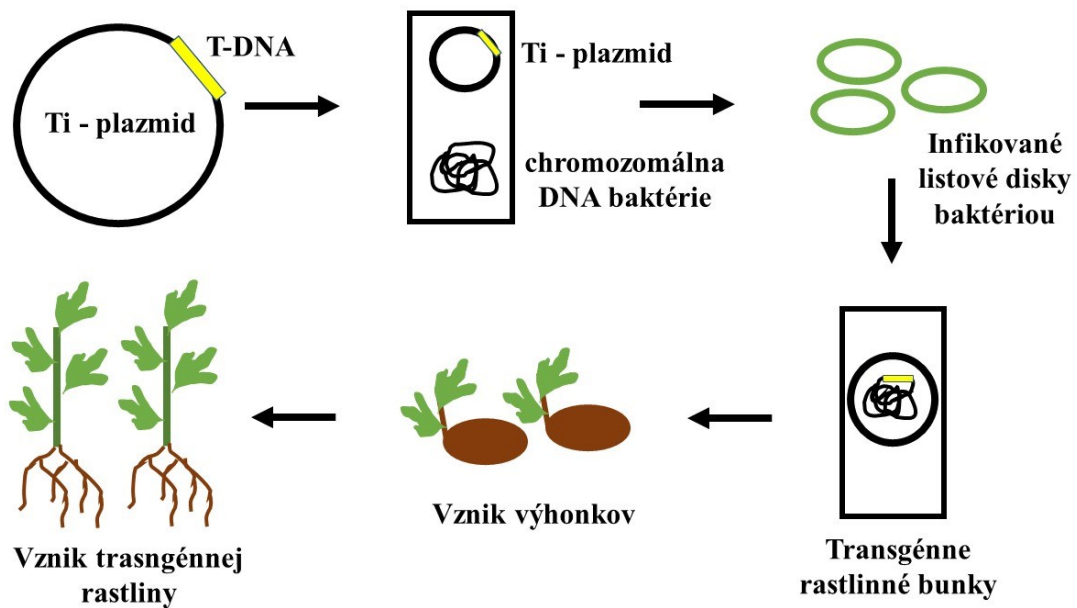
Medzi najznámejšie metódy transgenózy patrí:

A) Priama transgenóza prostredníctvom DNA

U priamej transgenózy prostredníctvom DNA je využitá transgenóza protoplastov, kde k príjmu DNA dochádza iba pomocou endocytózy, ktorú možno stimulovať elektroporáciou. Pre priamu transgenózu sa využívajú i mikroprojektily (guličky) obsahujúce zlato alebo wolfrám. Tieto guličky sa zmiešajú s roztokom DNA, ktorá sa prichytí na guličke. Gulička je následne vstrelená pomocou prístroja do pletiva, kde dochádza k integrácii transgénu. Je nutné aby mikroprojektil prenikol do jadra a bunka plne prežila zásah (Taufarová et al., 2014).

B) Transgenóza prostredníctvom baktérie *Agrobacterium tumefaciens*

Transgenóza pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (Obrázok 1) je založená na prirodzenej schopnosti vnášať gény, ktoré sú lokalizované na Ti plazmide (vyvoláva nádor, ktorý obsahuje látky prospešné pre baktérie) do genómu rastliny práve pomocou tejto baktérie. V princípe dochádza k vloženiu záujmového génu (transgénu) do bakteriálneho plazmidu, pričom tento plazmid je vložený do baktérie. Následne baktéria integruje záujmový gén do genómu rastliny, kde z modifikovanej bunky vyrastie transgénna rastlina. Táto nepriama metóda je vhodná pre väčšinu dvojkľúčolistových rastlín a niektoré jednokľúčolistové a nahosemenné rastliny (Taufarová et al., 2014).



Obrázok 1 Prenos DNA do rastlinných buniek a následný vznik transgéennej rastliny pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*. Upravené podľa Karcher a Gelvin (2011).

Tradičné formy šľachtenia nepriamo menia genetiku rastlín prostredníctvom výberu rastlín so špecifickými vlastnosťami, zatiaľ čo procesom génového inžinierstva sa tieto vlastnosti menia priamym vykonávaním zmien v DNA. Preto génové inžinierstvo umožňuje vysoko cieleňý prenos génov, rýchle a efektívne sledovanie génov v nových odrodách a nakoniec aj vyššiu účinnosť pri vývoji nových odrôd plodín s novými a žiaducimi vlastnosťami (Wieczorek a Wright, 2012).

1.2.2 Geneticky modifikované mikroorganizmy

U mikroorganizmov sa novo dodaný gén s požadovanou vlastnosťou prejavuje pomocou potrebných molekulárnych nástrojov, medzi ktoré patrí metóda prenosu génu, promótor na kontrolu expície požadovaných génov, klonovacie vektory a selekčné markerové gény na identifikáciu rekombinantných mikroorganizmov (Han, 2004).

Metódy prenosugénu

Existuje viacero spôsobov prenosu génov do hostiteľského organizmu. Medzi základné metódy patria: transformácia, elektroporácia a konjugácia.

Najčastejšie používanou metódou pre prenosu génov na zavedenie DNA do hostiteľského objektu je transformácia. Prijatie plazmidovej DNA mikroorganizmom sa dosiahne ak sa mikroorganizmus nachádza vo fyziologickom štádiu kompetencie, ktoré sa zvyčajne vyskytuje v špecifickom rastovom štádiu (Lorenz a Wackernagel, 1994). Prijem DNA na základe prirodzene sa vyskytujúcich schopností je však zvyčajne neefektívny. Kompetenciu je možné vyvolať pôsobením chemikálií, ktoré pôsobia na bakteriálne bunky, čím dôjde k jednoduchšiemu prijatiu DNA. V prípade baktérie *Escherichia coli* sa príjem plazmidovej DNA dosiahne po ošetrení buniek chloridom vápenatým alebo chloridom rubídia (Sambrook et al., 1989). Pre mnoho mikroorganizmov, napríklad pre *Streptomyces* produkujúce antibiotikum, je transformácia plazmidovej DNA komplikovanejšia. Preto sa musia najprv pripraviť protoplasty využívajúce lyzozým, ktorý slúži na odstránenie väčšiny bunkovej steny. Protoplasty sa zmiešajú s plazmidovou DNA v prítomnosti polyetylénglykolu, ktorý podporí príjem DNA (Han, 2004).

Alternatívnym spôsobom transformácie DNA do nového organizmu môže byť metóda elektroporácie. Táto metóda je navrhnutá hlavne na transformáciu eukaryotických buniek. Princípom elektroporácie sú krátke vysokonapäťové impulzy, ktoré zasiahnu bunky dostanú ich do elektricky kompetentného stavu (Neumann et al., 1982). Vplyvom vysokonapäťového impulzu sa v bunkovej membráne vytvárajú prechodné póry, ktoré umožňujú absorpciu DNA. Niektoré faktory ako sú rastová fáza, rastové médium, hustota buniek a podmienky elektroporácie musia byť optimalizované kvôli dosiahnutiu požadovanej účinnosti. Elektroporácia sa často používa keď je účinnosť transformácie protoplastov nedostatočná alebo neúčinná (Han, 2004).

Ako ďalšia metóda, ktorá môže byť použitá na prenos plazmidovej DNA do mikroorganizmu je konjugácia. Pri tomto procese sa DNA prenáša z darcu na bakteriálneho príjemcu pomocou špecializovaného multiproteínového komplexu. Dôležitým predpokladom pre konjugáciu je spojenie medzi bunkovými povrchmi interagujúcich darcovských a prijímajúcich buniek. U gramnegatívnych baktérií je tento fyzický kontakt vyvolaný komplexnými extracelulárnymi vláknami označenými ako sex pili (Grohmann et al., 2003). Po uskutočnení konjugácie sa darcovské bunky eliminujú antibiotikami, voči ktorým sú bunky príjemcu rezistentné. Bunky príjemcu obsahujúce prenesený plazmid sa identifikujú na základe selekčného markérového génu neseného plazmidom. Tak ako metóda elektroporácie, aj metóda konjugácie má výhodu v tom, že sa nespolieha na tvorbu protoplastov a regeneráciu bunkovej steny. Okrem toho táto

metóda ponúka možnosť obídenia reštrikčných bariér prenosom jednovláknovej plazmidovej DNA (Matsushima et al., 1994).

Promótor

Promótor je určitý segment DNA, ktorý je zodpovedný za reguláciu expície génu. Promótory sa môžu deliť na konštitatívne a indukovateľné. Konštitatívne promótory sú nepretržite aktívne, zatiaľ čo indukovateľné promótory sa aktivujú iba vtedy, keď sú splnené určité podmienky. Výber vhodného promótoru je dôležitým faktorom pre optimalizáciu expície cieľového génu. Ak je žiaduca nepretržitá expícia cieľového génu, použije sa silný konštitatívny promótor. Indukovateľné promótory sa používajú, ak je potrebné kontrolovať načasovanie expície cieľového génu. To platí najmä pri expícii cudzích génov, vrátane toxínových génov v *Escherichia coli* (Han, 2004).

Najbežnejšie používaný indukovateľný promótor pre expiciu cieľového génu v *E. coli* je *lac* promótor. Ten sa aktivuje, ak sa k rastúcej kultúre pridá nehydrolyzovateľný analóg laktózy izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranozid (IPTG). Tento promótor je relatívne slabý, a preto je často vhodný na expiciu génov kódujúcich toxické proteíny (Baneyx, 1999). Promótory závislé od indukcie IPTG sú zvyčajne nežiaduce k produkcii terapeutických proteínov z dôvodu vysokých nákladov a možnej toxicity (Figge et al., 1988).

Okrem *lac* promótoru existujú aj alternatívne promótory, ako je napríklad promótor arabinózy. Tento promótor sa indukuje po pridaní L-arabinózy do média. Ďalším alternatívnym promótorom je promótor studeného šoku založený na géne *cspA* z *E. coli*, ktorý sa indukuje pri poklese teploty. Ide o promótor, ktorý nie je schopný dosiahnuť vysokú hladinu akumulácie požadovaných proteínov, pretože sa inaktivuje do 2 hodín po znížení teploty. Promótory *phoA* a *trp* sú aktivované vyčerpaním fosfátov alebo tryptofánu v médiu. Tieto promótory sú pomerne jednoduché, preto sú pomerne často využívané pre priemyselné aplikácie (Baneyx, 1999).

Vektory

Výber správneho klonovacieho vektora závisí od metódy prenosu génu, požadovaného produktu modifikácie a aplikácie modifikovaného mikroorganizmu. Existuje obrovské množstvo vektorov rôzneho druhu. Replikačné vektory s vysokým alebo nízkym počtom kópií sa bežne používajú na expiciu požadovaných génov v hostiteľoch na výrobu exprimovaných proteínov i na zvýšenie dávky génu obmedzujúceho rýchlosť

biosyntetickej dráhy. Kosmidové a bakteriálne umelé chromozómové vektory, ktoré akceptujú fragmenty DNA až do 100 kb. sa používajú pri klonovaní veľkého množstva DNA do heterológneho hostiteľa na manipuláciu a produkciu metabolitov na vysokej úrovni (Rao et al., 1987, Sosio et al., 2000).

Selekčné markerové gény

Selekčné markerové gény, ktoré často kódujú proteíny udeľujúce rezistenciu na antibiotiká sú dôležitou súčasťou klonovacích vektorov a sú potrebné na identifikáciu transformovaných buniek. Selekcia je nutný proces, pretože v skutočnosti je počet transformovaných buniek výrazne nižší od netransformovaných. Aby došlo k zabezpečeniu úplnej eliminácie netransformovaných buniek je potrebná expresia markerového génu (Han, 2004).

Markerové gény pre antibiotickú rezistenciu nie sú však vhodné na tvorbu rekombinantných organizmov, ako sú baktérie mliečneho kvasenia a kvasinky používané na fermentáciu potravín (Akada et al., 2002, Renault, 2002). Pre baktérie mliečneho kvasenia boli vyvinuté a včlenené do klonovacích vektorov alternatívne selekčné systémy založené na vlastnostiach organizmu, ktoré sú spojené s plazmidmi vrátane metabolizmu laktózy, proteolytickej aktivity, syntézy DNA a rezistencie na bakteriociny (von Wright a Sibakov, 1993, Renault, 2002). Jedným z problémov spojených s týmito selekčnými systémami je to, že majú tendenciu poskytovať viac netransformovaných buniek ako selekčné systémy založené na markerových génoch na bázy antibiotík (von Wright a Sibakov, 1993).

Na konštrukciu rekombinantných kvasiniek, ktoré sú potrebné na fermentáciu potravín bol vyvinutý rad selekčných systémov založených na kvasinkových génoch namiesto markerových génov založených na rezistencii na antibiotiká (Akada, 2002). Medzi takýto systém patrí napríklad systém založený na géne *YAPI*, ktorý je zodpovedný za adaptáciu stresu v kvasinkách. Výhodou tohto selekčného systému je úplná eliminácia netransformovaných buniek (Akada et al., 2002).

1.3 Vlastnosti

GMO je možné deliť do niekoľkých skupín:

- GMO prvej generácie

- GMO druhej generácie
- GMO tretej generácie

GMO prvej generácie sa zameriava na zvýšenie výnosu pre pestovateľov zavedením rezistencie na vírusové, plesňové, bakteriálne choroby, škodcov ako je hmyz (*Bt* odrody), alebo toleranciou voči herbicídom (*HT* odrody). *Bt* odrody obsahujú gén, ktorý je zodpovedný za tvorbu insekticídov. Takéto exprimujúce gény sú odvodené od pôdnej baktérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), ktorá počas sporulácie produkuje kryštály insekticídneho proteínu (delta endotoxíny), ktoré sú toxické pre cieľný hmyz. Rastliny, ktoré obsahujú tento gén, fungujú podobným systémom. Toxíny sú produkované v neaktívnej forme, ktorá je aktivovaná proteinázami v čreve hmyzu. Toxín sa viaže na receptory v črevnej výstelke a poškodzuje ho. Cicavce tieto receptory nemajú, teda tento toxín nie je pre nich toxický (Robinson, 2001).

Na druhej strane *HT* odrody sú odolné voči herbicídom, ktoré sa používajú na ničenie burín. Tie znižujú úrodu aj kvalitu plodín tým, že buriny súťažia s plodinami o živiny a svetlo. Široko používané herbicídy, medzi ktoré patria glufosinát (kyselina dialkylfosforná) a glyfosát (A-fosfinometylglýcin), pôsobia toxicky na enzým, ktorý je dôležitý pre rastlinu. Napríklad glufosinát inhibuje glutaminsyntázu, zatiaľ čo glyfosát inhibuje syntézu enzýmu EPSPS (5-enolpyruvátšikimát-3-fosfosyntáza), ktorý je zodpovedný za syntézu aromatických aminokyselín. Inhibíciou enzýmu EPSPS sa v rastline netvoria niektoré proteíny. Vplyvom ďalších herbicídov následne dochádza k inhibícii syntézy lipidov, celulózy v bunkovej stene, či inhibícii bunkového delenia. Herbicidtolerantné GM rastliny sa získajú vložением génu izolovaného z ktoréhokoľvek z niekoľkých pôdných mikroorganizmov. Napríklad *Agrobacterium* je rezistentná voči glyfosátu. Medzi najznámejšie plodiny, ktoré sú odolné voči herbicídom, patrí kukurica, repka olejná a sójové bôby (Řepková, 2013).

Medzi GMO druhej generácie patria potraviny so zlepšenými alebo zmenenými výživovými vlastnosťami. Existuje niekoľko kategórií takýchto výrobkov, v ktorých by technológia genetickej modifikácie bola prospešná: odstránenie alebo zníženie hladín antinutričných faktorov, toxínov, alergénov; zavedenie alebo zvýšenie úrovne faktorov podporujúcich zdravie; zmena pomeru makroživín alebo mikroživín (hlavne vitamíny alebo minerály). Medzi jednu z najznámejších GMO plodín druhej generácie patrí „zlatá ryža“. Aj keď ryža patrí medzi základnú surovinu pre krajiny ako sú Afrika, Ázia a Latinská Amerika, ryža nemá dostatok základných živín. Práve v juhovýchodnej Ázii

trpia deti slepotou, hnačkami, chorobou dýchacích ciest a osýpkami, za ktoré je zodpovedný nedostatok vitamínu A. Aby sa obišlo týmto problémom, bola vyvinutá geneticky modifikovaná ryža, ktorá je doplnená provitamínom A (beta-karoténom). Do tejto ryže boli zavedené pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* dva gény z narcisu (gén *psy* pre fytoendesaturázu a gén *lyc* pre lykopen- β -cyklázu) a jeden gén z baktérie (gén *crtl* pre ζ -karoten desaturázu). Pomenovanie „zlatá ryža“ dostala kvôli žltej farbe zrn (Robinson, 2001).

Poslednou skupinou sú GMO tretej generácie, ktoré sú špecifické odolnosťou proti biotickým stresom, ako je chlad, teplo, zasolenie a iné. Stresové faktory spôsobujú znižovanie vitality rastliny a znižovanie výnosu. Pri účinku stresu dôjde k prestavbe buniek poškodených stresom, čím dochádza k zmene metabolizmu pomocou aktivácie určitých génov. Následne sú syntetizované stresové bielkoviny (enzýmy, proteíny), ktoré sa snažia eliminovať poškodenie. Ak nie je možné poškodenie buniek napraviť, dôjde k ich zániku, čo vedie k programovanej bunkovej smrti. Princípom GM rastlín odolných voči stresovým faktorom je aktivácia fyziologických procesov a špecifických génov poskytujúcich ochranu rastline, ktoré sú vyvolané stresovými faktormi. Napríklad niektoré tropické rastliny, ako je tabak, reagujú citlivo na chlad. Pri poškodení môže dôjsť k vädnutiu, neschopnosti rastu, či k sterilite a úhynu. Tento tabak bol transformovaný génom z rastliny *Arabidopsis thaliana*, ktorá je odolnejšia voči mrazu. Takýto transformovaný tabak mal vyššiu hladinu nenasýtených mastných kyselín než netransformovaný tabak a vyššiu odolnosť voči nízkym teplotám (Řepková, 2013).

1.4 Pestovanie geneticky modifikovaných plodín

Pestovanie geneticky modifikovaných, inak povedané biotechnologických plodín v Európskej únii (EÚ) je od roku 1998 obmedzené na niekoľko krajín. V roku 2016 boli geneticky modifikované plodiny pestované na viac ako 185 miliónoch hektároch v 26 štátoch sveta, kde takéto plodiny pestovali v EÚ iba štyri krajiny: Španielsko, Portugalsko, Česká republika a Slovenská republika, pričom sa jednalo o kukuricu MON810. Celková výmera pestovania biotechnologických plodín v týchto štyroch krajinách sa odhadovala na 136 363 hektárov. Španielsko túto plodinu pestovalo v roku 2016 o rozlohe 129 081 hektárov. Za Španielskom nasledovalo Portugalsko (7 069 hektárov), Slovenská republika (138 hektárov) a Česká republika (75 hektárov). Najväčšími producentmi GM plodín mimo krajín EÚ sú USA, Brazília, Argentína,

Kanada, či India (ISAAA, 2016). Napriek rôznorodosti dopadov sú priemerné agronomické a ekonomické prínosy GM plodín významné. Vplyvy sa líšia najmä podľa modifikovaných vlastností plodín a geografickej oblasti, kde sa tieto plodiny pestujú. Semená GM plodín sú síce finančne nákladnejšie, ale v konečnom dôsledku ide o úspornejšie pestovanie z dôvodu šetrenia peňazí pri kúpe chemických postrekov, prípadne mechanickej ochrane voči škodcom (Klümper a Qaim, 2014).

Slovenská republika pestovala svoju prvú komerčnú GM plodinu kukuricu v roku 2006. V roku 2016 vysadila približne 138 hektárov GM kukurice, čo v porovnaní s rokom 2015 predstavuje nárast o 34 hektárov. Nárast hektárového porastu GM kukurice v roku 2016 sa pripisuje zamoreniu hmyzu vijačky kukuričnej. Od roku 2006 až 2007 Slovensko zvýšilo výsadbu biotechnologickej kukurice z 30 hektárov na 900 hektárov. Pokles výsadby biotechnologickej kukurice od roku 2011 bol spôsobený príkazom vlády, čo je pre poľnohospodárov, ktorí sa snažia vysadiť GM kukuricu, veľmi odrádzajúce od výhod, ktoré ponúka. Ako členský štát EÚ môže Slovensko pestovať kukuricu MON810, ktorú EÚ schválila pre všetkých 28 členských krajín (ISAAA, 2016).

V Českej republike sa v roku 2016 vysadilo iba 75 hektárov GM kukurice, čo predstavuje pokles o 922 hektárov z 997 hektárov vysadených v roku 2015. Vrchol v pestovaní GM kukurice nastal v roku 2008, kedy sa z 250 hektárov navýšilo pestovanie na 8 380 hektárov. Takáto GM kukurica sa využívala na výrobu bioplynu a ako krmivo pre dobytok v poľnohospodárskom odvetví. V roku 2010 česká vláda schválila pestovanie GM zemiakov typu Amflora, ktoré sú známe produkciou vyššieho obsahu škrobu. Tieto zemiaky boli využité v priemyselnom odvetví a ich pestovanie sa však zastavilo po tom, ako sa spoločnosť BASF presunula do Spojených štátov kvôli nepriaznivým podmienkam pestovania voči GM plodinám v Európe (ISAAA, 2016).

1.5 Legislatívne predpisy

Podľa zákona 78/2004 Sb. Zákon o nakladaní s geneticky modifikovanými organizmami genetickými produkty možno geneticky modifikovaný organizmus definovať ako organizmus (okrem človeka), ktorého dedičný materiál bol pozmenený genetickou modifikáciou za použitia technických postupov ako sú:

- a) techniky rekombinantnej nukleovej kyseliny, ktoré vytvárajú nové kombinácie dedičného materiálu vloženíím úseku nukleovej kyseliny pripravenej akýmkoľvek

- spôsobom mimo organizmus do akéhokoľvek vírusu, bakteriálneho plazmidu alebo iného vektorového systému a jeho následným začlenením do organizmu príjemcu, v ktorom sa normálne nevyskytuje, ale v ktorom je schopný ďalšieho množenia sa,
- b) techniky zavádzajúce dedičný materiál pripravený akýmkoľvek spôsobom mimo organizmus priamo do organizmu príjemcu, zahrňujúce mikroinjekciu, makroinjekciu, biolistické metódy, mikroenkapsuláciu a umelé chromozómy, alebo
 - c) techniky bunkovej fúzie, vrátane fúzie protoplastov, alebo hybridizácie buniek, pri ktorej sú fúziou dvoch alebo niekoľkých buniek vytvorené životaschopné bunky s novou kombináciou dedičného materiálu, a to metódami alebo prostriedkami, ktoré sa nevyskytujú prirodzene.

Na druhej strane, tento zákon nedovoľuje vznik geneticky modifikovaných organizmov technickými postupmi ako sú: oplodnenie *in vitro*; bakteriálna konjugácia, transformácia, transdukcia a podobné prirodzené procesy; indukcia polyploidie a haploidie.

Čo sa týka označovania geneticky modifikovaných organizmov, každá osoba, ktorá vo svojej podnikovej činnosti uvádza geneticky modifikovaný organizmus alebo produkt na trh je zo zákona 78/2004 Sb. povinná označiť takýto organizmus alebo produkt slovami „Tento produkt obsahuje geneticky modifikované organizmy“. Ďalej toto označenie musí obsahovať obchodný názov genetického produktu, názov geneticky modifikovaného organizmu, meno a adresu sídla osoby zodpovednej za uvádzanie organizmu/produktu na trh a údaj o tom, kde je možné získať ďalšie prístupné informácie o danom produkte.

Uvedenie GMO do životného prostredia prislúcha podľa zákona 78/2004 Sb. iba právnickej, či fyzickej osobe, ktorá má oprávnenie k podnikaniu, a ktorej bolo udelené povolenie na uvedenie GMO do životného prostredia. Každá žiadosť o toto povolenie musí obsahovať názov projektu; identifikačné, kontaktné a ďalšie údaje o odbornom poradcovi a kontaktnej osobe na pracovisku; informácie o geneticky modifikovanom organizme; informácie o mieste uvedenia do životného prostredia; účel a doba uvedenia do životného prostredia; informácie o monitoringu atď. (Zákon 78/2004 Sb.).

Účelom nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1946/2003 – cezhraničné pohyby geneticky modifikovaných organizmov, je usilovanie o vykonávaní niektorých bodov Cartagenského protokolu o prevencii biotechnologických rizík, kvôli nežiadúcim účinkom niektorých geneticky modifikovaných organizmov na ľudské zdravie a životné prostredie. Pre zaistenie ochrany vytvára oznamovací systém na výmenu informácii

o vývoze týchto organizmov do zemí nachádzajúcich sa mimo Európsku úniu. Čo sa týka Cartagenského protokolu, ide o medzinárodnú dohodu, ktorej cieľom je zabezpečiť bezpečnú manipuláciu, prepravu a použitie živých modifikovaných organizmov, ktoré môžu mať nepriaznivé účinky na biologickú diverzitu, či ľudské zdravie (Nariadenie (ES) č. 1946/2003).

Podľa vyhlášky č. 89/2006 Sb. o bližších podmienkach pestovania geneticky modifikovanej odrody je nutné dodržiavať určité vzdialenosti dané touto vyhláškou od štátnych hraníc Českej republiky. Napríklad minimálna vzdialenosť pestovania geneticky modifikovaných zemiakov od štátnych hraníc Českej republiky je 400 m. Túto minimálnu vzdialenosť je nutné dodržať aj v prípade pestovania geneticky modifikovanej kukurice a sóje. Takisto je nutné dodržať lehotu pre poskytovanie informácii pred predpokladaným zahájením pestovania geneticky modifikovaných odrôd, kde u geneticky modifikovaných zemiakov, sóje a kukurice to je od 1.3. príslušného kalendárneho roku. Touto vyhláškou sú určené i údaje, ktoré je nutné uchovať pri pestovaní geneticky modifikovaných plodín: názov plodiny a geneticky modifikovanej odrody; výmera plochy, na ktorej sa nachádza geneticky modifikovaná odroda; dátum zahájenia pestovania geneticky modifikovanej odrody; množstvo zasiatej alebo vysadenej geneticky modifikovanej odrody; miesto skladovania geneticky modifikovanej odrody; informácie o nákupnom množstve; údaje o použití produktu geneticky modifikovanej odrody a iné (Vyhláška č.89/2006).

V súčasnosti sa v EÚ pestuje jedna geneticky modifikovaná plodina, *Bt* kukurica MON810, ktorú vyvinula spoločnosť Monsanto. Kukurica MON810 bola schválená ešte pred zavedením smernice 2001/18 a predáva sa od konca 90. rokov. Niekoľko členských štátov Európskej únie však zakazuje pestovanie kukurice MON810. Tieto zákazy sa však často považujú za porušenie postupu schvaľovania GMO v EÚ (Dries et al., 2019).

2 GENETICKY MODIFIKOVANÉ POTRAVINY A POTRAVINY S PODIELOM GMO

S rozvojom biotechnológií postupne rastie i množstvo geneticky modifikovaných organizmov na trhu. Keďže sa tento rast rýchlo zvyšuje, zvyšujú sa aj obavy verejnosti na bezpečnosť potravín, hlavne na nepriaznivé účinky geneticky modifikovaných potravín na zdravie konzumenta. Verejnosť chce mať možnosť si vybrať medzi geneticky modifikovanými a geneticky nemodifikovanými potravinami.

Podľa nariadenia EÚ č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách sa každá potravina, ktorá obsahuje geneticky modifikovaný organizmus v hodnote vyššej než 0,9 % musí značiť (Nariadenie EÚ č. 1829/2003).

2.1 Charakterizácia

2.1.1 Geneticky modifikované potraviny

V súčasnosti existuje niekoľko GM plodín používaných ako zdroj potravín. V novembri 2015 Úrad pre potraviny a liečivá USA (FDA) schválil prvého transgénneho lososa určeného na konzumáciu v USA. Tento geneticky modifikovaný atlantický losos (AquAdvantage® losos) je schopný dosiahnuť svoju obchodnú veľkosť do 18 mesiacov namiesto 3 rokov (Menozzi et al., 2013). Tento losos obsahuje gén pre rastový hormón z lososa kráľovského (*Oncorhynchus tshawytscha*) pod kontrolou promotora z tresky škvrnatej (*Macrozoarces americanus*). Legislatíva v USA však nevyžaduje osobitné označovanie lososa AquAdvantage®, pretože agentúra FDA považuje tohto lososa za materiál, ktorý sa významne nelíši od lososa atlantického (*Salmo salar*). Tento losos je schválený nie len v USA, ale aj v Kanade, kde je jeho rast povolený len v uzavretých priestoroch. Kanada schválila i predaj geneticky modifikovaného lososa na konzumáciu pre ľudí a ako krmivo pre zvieratá (Devlin et al., 2015). Tento losos je však v súčasnosti v Európskej únii zakázaný.

Medzi zaujímavú geneticky modifikovanú plodinu patrí papája línie 55-1. Vedci použili techniky genetického inžinierstva na vznik transgénej papáje vložením génu obalového proteínu proti vírusu PRSV (Papaya Ringspot Virus) priamo do genómu papáje (Gonsalves et al., 2000). PRSV sa vo všeobecnosti prenáša voškami. Vírus spôsobuje žlté alebo mozaikové sfarbenie na listoch, olejové pruhy na kmeni a skreslenie mladých listov.

Infikovaná rastlina je typická zakrpateným rastom a jej plody sú deformované a nevhodné k požívaniu. Toto ovocie obsahuje vysoké hladiny troch karotenoidov (β -kryptoxantínu, β -karoténu a lycopénu), ktoré sú hlavným zdrojom vitamínu A. Táto papájalínie 55-1 bola schválená na ľudskú spotrebu, ako čerstvá alebo spracovaná v USA od roku 1997 (ISAAA, 2012).

Bangladéš je známy produkciou geneticky transformovaného baklažánu (*Solanum melongena*) známeho pod názvom *Bt* Brinjal. Tento geneticky modifikovaný baklažán nesie gén, ktorý je zodpovedný za ochranu proti hmyzu *Leucinodes orbonalis* (FSB). K vzniku *Bt* brinjalu je nutné zaviesť génu *cryIAC*, ktorý exprimuje insekticídny proteín, ktorý prepožičiava rezistenciu voči FSB. Gén *cryIAC* pochádza z pôdnej baktérie *Bacillus thuringiensis*. V hmyzom čreve je insekticídny proteín solubilizovaný a aktivovaný črevnými proteázami za vzniku toxického fragmentu. Aktivovaný insekticídny proteín sa následne viaže na dva rôzne receptory. Dochádza k narušeniu tráviacich procesov, strate transmembránového potenciálu, deštrukcii buniek a paralýze, ktorá spôsobuje smrť. Keďže *Bt* brinjal je cielený len na určitý druh hmyzu neohrozuje ľudí, vtáky a ryby, pretože im chýbajú špecifické receptory a podmienky na aktiváciu proteínu *Bt* v črevách. (Choudhary a Gaur, 2009).

Medzi prvý geneticky modifikovaný rastlinný produkt, ktorý bol uvedený na trh patrí paradajka FLAVR SAVR™. Enzým polygalakturonáza (PG), ktorý sa nachádza v paradajkách má schopnosť rozpúšťať pektín bunkovej steny, čím dochádza k zmäčkovaniu plodu. Vedci z Calgene Inc. v Davise navrhli zavedenie génu s opačným účinkom, ktorý bol zodpovedný za drastické zníženie, prípadne zabránenie tvorby PG. Takéto geneticky modifikované paradajky ostali dlhšie pevné a trvanlivé, čím umožnili transport na dlhšie trasy bez predbežného mäknutia. Preprava takýchto paradajok predišla zberu zelených plodov a ich umelému dozrievaniu pomocou etylénu. Avšak po tom, ako spoločnosť Campbell pod tlakom verejnosti vyhlásila, že nebude používať geneticky modifikované paradajky vo svojich produktoch sa tieto paradajky stiahli z trhu (Bruening a Lyons, 2000).

Geneticky modifikované oleje možno rozdeliť do dvoch hlavných kategórií. Medzi prvú skupinu geneticky modifikovaných olejov patria oleje so zvýšenou oxidačnou stabilitou. Tieto oleje sa používajú hlavne do šalátových dresingov, na vyprážanie a poťahovanie potravín. Majú vysoké zastúpenie oleátov a linolenátov. Druhá skupina geneticky modifikovaných olejov sa vyznačuje zmenenou hladinou nasýtených mastných kyselín.

Medzi najpoužívanejšie geneticky modifikované oleje patria: slnečnicový, sójový, repkový a ľanový (Hazebroek, 2000).

V niektorých prípadoch sa výrobok priamo konzumuje ako potravinu, avšak vo väčšine prípadov sa geneticky modifikované plodiny predávajú ako komodity, ktoré sa ďalej spracovávajú na potravinové prísady. Podľa databázy ISAAA najnovšie schválenú plodinu prijali Filipíny v decembri 2019. Jedná sa o ryžu GR2E (Zlatá ryža) slúžiacu na výrobu potravín, krmív a na pestovanie (ISAAA, 2019).

2.1.2 Bezpečnosť geneticky modifikovaných potravín a potravín obsahujúcich geneticky modifikované organizmy

Potenciálne nebezpečenstvá spojené s potravinami môžu pochádzať z mikroorganizmov, nutričných deficitov a chemických látok, ktoré sa prirodzene vyskytujú v potravinách (prírodné toxické látky), ktoré sa zámerné zavádzajú do potravinového reťazca (potravinárske prídavné látky), alebo ktoré sa vyskytujú náhodne (kontaminanty životného prostredia). Pre skupinu obyvateľstva s vysokou citlivosťou môžu predstavovať nebezpečenstvo aj zložky potravín, hlavne prídavné látky v potravinách, ktoré sa považujú za bezpečné až dokonca žiadúce pri bežných koncentráciách. Napríklad siričitany, ktoré sa používajú ako konzervačné látky môžu u astmatikov citlivých na siričitany spôsobiť závažné reakcie (Robinson, 2001). Geneticky modifikované potraviny a potraviny, ktoré obsahujú GMO sú preto podrobnejšie skúmané, než konvenčné potraviny. Zmeny v prirodzených výživových charakteristikách, zmeny toxicity a alergénosti potravín sa môžu vyskytnúť v dôsledku zmien v génovej expresii, či už sú spôsobené tradičnými technikami šľachtenia rastlín alebo prostredníctvom genetickej modifikácie. Zloženie potravín môže byť zmenené:

- vloženými génmi a ich produktmi,
- nepriamymi alebo nezamýšľanými účinkami génovej expesie,
- nezamýšľanými mutáciami, ktoré sú výsledkom inzercie génu (Robinson, 2001)

Desaťročia výskumu naznačujú, že potravinová DNA nemá žiadnu priamu toxicitu, keďže znalosť prirodzene sa vyskytujúcich toxických látok a rozsah ich hladín v potravinách poskytuje referenčné hodnoty pri hodnotení novo vytvorených potravín. Pri vývoji nových odrôd plodín, či už prostredníctvom konvenčného šľachtenia alebo využitia genetickej modifikácie sa hodnotia toxické látky charakteristické pre daný druh. Napríklad

charakteristickou toxickou látkou obsiahnutou v cícery je lotaustralín. V zemiakoch to je zasa solanín (Robinson, 2001).

Na druhej strane je alergénnosť geneticky modifikovaných potravín spojená s proteínmi zavedenými do GM plodín. Tieto proteíny sú podobné proteínom, ktoré sú známe a ktoré sa už vyskytujú v potravinách. Medzi faktory, ktoré by zohľadnili, či je proteín pravdepodobným alergénom patrí (Robinson, 2001):

- veľkosť proteínov (najznámejšie alergény o veľkosti 10 – 40 kDa),
- stálosť trávenia (väčšina alergénov je odolná voči degradácii žalúdočnou kyselinou a tráviacimi proteázami),
- podobnosť proteínovej štruktúry s alergénmi,
- stabilita potravín pri spracovaní a varení.

Celkovo sa uvádzajú dva príklady alergenity GM plodín. V prvom prípade ide o projekt vzniku geneticky modifikovaného hrachu pridaním bielkovín z fazule, ktorá prepožičala rezistenciu voči húsenici. Avšak tento modifikovaný hrach sa stiahol z trhu potom, ako sa ukázalo, že spôsobil u myši pľúcnu alergiu (Prescott et al., 2005). V druhom prípade sa jednalo o sójové bôby, ktoré boli skonštruované tak, aby exprimovali proteín z para orechov. Je však známe, že para orechy sú zodpovedné za závažné alergické reakcie, hlavne anafylaktický šok u malej časti ľudskej populácie. Následnými testami sa potvrdilo, že prenesený gén kodoval hlavný alergén a sójové bôby boli následne stiahnuté z výroby. Preto porovnanie s už bezpečne konzumovanými proteínmi by pomohlo naznačiť, či je zavedený proteín alergénny (Robinson, 2001).

2.2 Legislatívne predpisy

Od komercializácie prvej geneticky modifikovanej plodiny v polovici 90. rokov niektoré skupiny spotrebiteľov požadujú podrobnejšie a komplexnejšie označovanie potravín obsahujúcich GMO. Preto bol stanovený prah tolerancie pre prítomnosť geneticky modifikovaného materiálu v geneticky nemodifikovaných výrobkoch. Ak množstvo GM materiálu vo výrobku presiahne prah tolerancie, výrobky sa musia označiť ako výrobky obsahujúce geneticky modifikovaný materiál (Devos et al., 2009).

Politika označovania výrobkov môže zahŕňať zákaz označovania, dobrovoľné označovanie, u ktorého je vedené, že výrobok neobsahuje GMO, alebo povinné označovanie, kde výrobok obsahuje GMO. Pri jeho implementácii je stanovená hranica

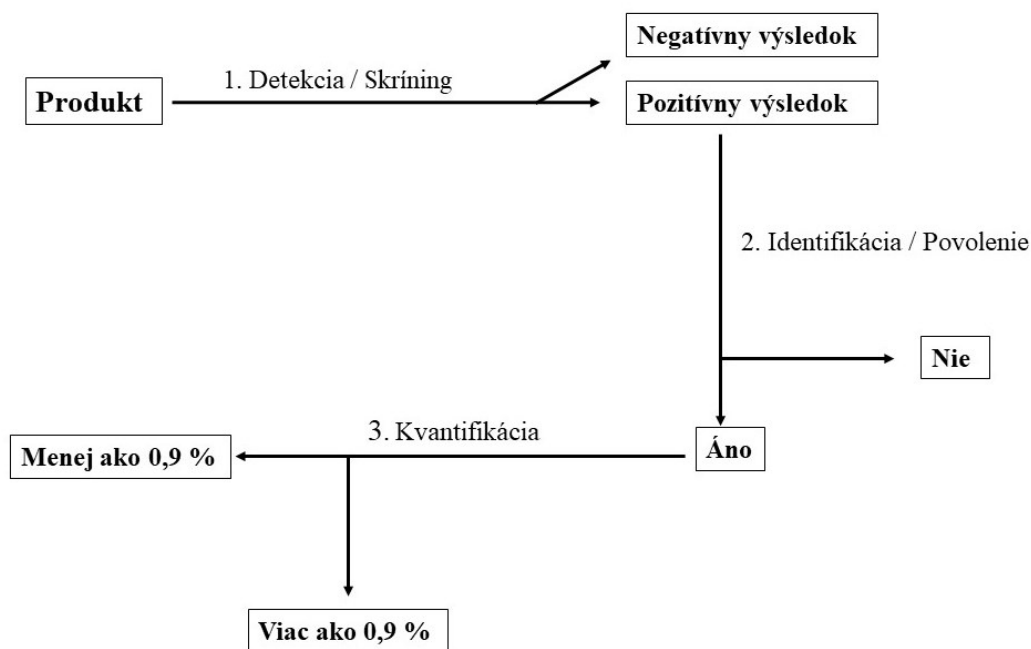
právnej tolerancie, ktorá sa tiež líši v závislosti od krajiny, čo komplikuje obchod a prepravu tovaru. Napríklad v USA, Kanade a Japonsku bola prahová hodnota stanovená na 5%. Austrália, Nový Zéland, Južná Afrika, Brazília a Čína majú prahové hodnoty tolerancie 1% (Ramessar et al., 2010), zatiaľ čo v Európskej únii, ak má komerčný výrobok viac ako 0,9% geneticky modifikovaného materiálu, musí byť podľa nariadenia Európskeho parlamentu a rady č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách označený ako geneticky modifikovaný produkt. Toto nariadenie sa okrem značenia genetiky modifikovaných potravín zameriava i na ochranu zdravia a životov ľudí, zdravia zvierat a životných podmienok zvierat a záujmov životného prostredia a spotrebiteľov a vymedzuje pravidla pre povolenie geneticky modifikovaných organizmov a dohľad nad nimi. Žiadosť na povolenie sa musí predložiť príslušnému vnútroštátnemu orgánu, ktorý potom začne štandardizovaný schvaľovací postup založený na rizikách. Posúdenie rizika sa centralizuje s Európskym úradom pre bezpečnosť potravín (EFSA) a schvaľovanie sa udeľuje Komisii na základe politického rozhodnutia (Nariadenie EU č. 1829/2003).

3 METÓDY STANOVENIA GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANIZMOV

Všeobecná legislatíva vyžaduje presnú kvantifikáciu geneticky modifikovaných organizmov v plodinách, potravinách a prídavných látkach. Detekciu GMO v daných produktoch je nutné zabezpečiť z dôvodu dodržania prahovej tolerancie GMO vo výrobkoch.

Metódy detekcie GMO sú založené hlavne na detekcii špecifických fragmentov DNA, napr. polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) alebo na detekcii novo exprimovaných proteínov, napr. pomocou enzýmovej imunosorbentovej analýzy (ELISA). Vo všeobecnosti proces testovania potravín obsahujúcich GMO v súlade s nariadením o označovaní v EÚ pozostáva z troch rôznych krokov (Obrázok 2):

1. Detekcia/skríning GMO s cieľom zistiť zloženie potravín a poľnohospodárskych výrobkov. Analytické metódy musia byť dostatočne citlivé a spoľahlivé.
2. Identifikácia GMO a či je dané GMO povolené v rámci EÚ. Predpokladom pre identifikáciu GMO je dostupnosť podrobných informácií o ich molekulárnom zložení.
3. Kvantifikácia s cieľom určiť množstvo jedného alebo viacerých povolených GMO v produkte a výsledok porovnať s prahovými hodnotami (Anklam et al., 2002).



Obrázok 2 Operačné postupy na zisťovanie, identifikáciu a kvantifikáciu geneticky modifikovaných organizmov v súlade s nariadením o označovaní v Európskej únii. Upravené podľa Anklam et al., 2002.

V závislosti od vnútroštátnych právnych predpisov môžu byť na optimálnu skriningovú alebo identifikačnú analýzu GMO vhodné rôzne typy metód. Takisto na výber metódy má vplyv typ vzoriek, ktoré sa majú analyzovať (osivá, suroviny alebo spracované potraviny, krmivá). Jednotlivé metódy k detekcii GMO sa môžu použiť samostatne, či v kombinácii s ďalšími metódami. Vývoj validovaných metód detegujúcich pozmenené sekvencie DNA však musí byť v súlade s akceptovanými štandardmi (napr. ISO / CEN) (Querci et al., 2009).

3.1 Metódy založené na detekcii nukleových kyselín – polymerázová reťazová reakcia PCR

Technológia polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je založená na replikácii DNA – kopírovanie DNA vo všetkých živých bunkách. Táto metóda sa uplatnila až po zavedení termostabilnej DNA polymerázy (Saiki et al., 1988). Na detekciu GMO v danom produkte sú potrebné dvojice primerov, z ktorých každý primer zodpovedá jednému koncu segmentu DNA, ktorý má byť amplifikovaný. Pre väčšinu GMO povolených na celom svete však v súčasnosti neexistujú žiadne publikované páry primerov vhodné na spoľahlivú

identifikáciu alebo kvantifikáciu. Biotechnologické spoločnosti spravidla zachovávajú dôvernosť informácií o sekvenciách opisujúcich genetické modifikácie. Aj keď sa za posledné roky vyvinulo a uverejnilo niekoľko párov primerov na analýzu GMO, mnoho z týchto párov má obmedzený rozsah použitia (napr. priméry vhodné iba na skrining). Tieto problémy následne sťažujú vývoj a validáciu metód. Mletie, zahrievanie, ošetrovanie kyselinou a ďalšie spracovanie zložiek potravín spôsobuje degradáciu DNA. V dôsledku toho veľa výrobkov má nízky obsah DNA pochádzajúcich z GMO a táto DNA má často nízku kvalitu. Aj za použitia vhodných primerov sa z dôvodu obmedzení templátovej DNA nemusí dosiahnuť spoľahlivý analytický výsledok. Testovanie GMO môže byť následne limitované na jednoduchý skrining pomocou PCR metódy (Holst-Jensen et al., 2003).

Testy GMO založené na PCR môžu byť rozdelené do najmenej štyroch kategórií zodpovedajúcich ich úrovni špecifickosti. Každá kategória zodpovedá zloženiu fragmentu DNA, ktorý je amplifikovaný v PCR. Je nutné si uvedomiť, že každé GMO má odlišné zloženie fragmentu – geneticky modifikované kukurice MON809 a MON810 sa považujú za dva rôzne GMO, hoci obidva patria k rovnakému druhu (*Zea mays*) a boli transformované rovnakým plazmidom (pV-ZMBK07). Navyše génový konštrukt sa skladá z niekoľkých prvkov: gén záujmu, promótor slúžiaci ako štartovací signál a terminátor fungujúci ako stop signál. Väčšina geneticky modifikovaných rastlín bola transformovaná konštruktmi obsahujúcimi promótor vírusu mozaiky karfiolu (CaMV), alebo terminátor nopalínsyntázy *Agrobacterium tumefaciens* (T-Nos) (Holst-Jensen et al., 2003).

Izolácia DNA

Pred každým prevedením polymerázovej reťazovej reakcie je nutné vyizolovať DNA s čo najvyššou kvalitou a čistotou. Možno teda povedať, že účinnosť PCR závisí od kvality a čistoty DNA. Kvalita DNA je určená dĺžkou fragmentu a stupňom poškodenia v dôsledku vystavenia teplu, nízkemu pH a enzýmom nukleáz, ktoré sú zodpovedné za hydrolýzu, či enzymatickú degradáciu. Kvalita DNA sa líši v závislosti od skúmaného materiálu, stupňa spracovania vzorky a použitej metódy extrakcie DNA. Čistotu DNA môžu ovplyvniť rôzne kontaminanty obsiahnuté v potravinových zložkách. Napríklad *Taq* polymeráza je inhibovaná polysacharidmi, kyselinou etyléndiamíntetraoctovou (EDTA), fenolom, či dodecylsulfátom sodným (SDS) (Anklam et al., 2002).

V princípe extrakcia DNA z rastlinných produktov pre detekciu GMO zahŕňa niekoľko krokov:

1. Rozbitie bunkových stien. To sa dosiahne väčšinou drvením. Pri drvení je možné využiť suchý ľad, prípadne tekutý dusík, či iné.
2. Prítomnosť detergentu. Zväčša ide o detergenty CTAB a SDS, ktoré sú súčasťou pufrův slúžiacich na extrakciu DNA.
3. Prídavok EDTA následne viaže Mg^{2+} ióny, čím dôjde k inaktivácii nukleáz. Alternatívou v tomto kroku môže byť použitie proteínázy K, ktorá inaktivuje a degraduje proteíny.
4. V prítomnosti CTAB dochádza k oddeleniu inhibítorov (sacharidy) od DNA na základe odlišnej rozpustnosti.
5. Pomocou organického rozpúšťadla (chloroform) sú následné separované bunkové zložky (lipidy, polyfenoly).
6. Nakoniec dochádza k oddeleniu detergentu a zakoncentrovaniu DNA pomocou alkoholu, či vyzrážaniu soli (Anklam et al., 2002).

Alternatívou kroku 4 až 6, kde dochádza k separácii DNA od iných bunkových komponentov môže byť dosiahnuté purifikáciou na DNA kolóne. Pri použití týchto kolón, ktoré sú zložené z oxidu kremičitého sa zistilo, že polysacharidy nachádzajúce sa v produkte majú tendenciu viazať sa na stĺpce kolóny, čím dochádza k ovplyvneniu účinnosti separácie (Hübner et al., 2001).

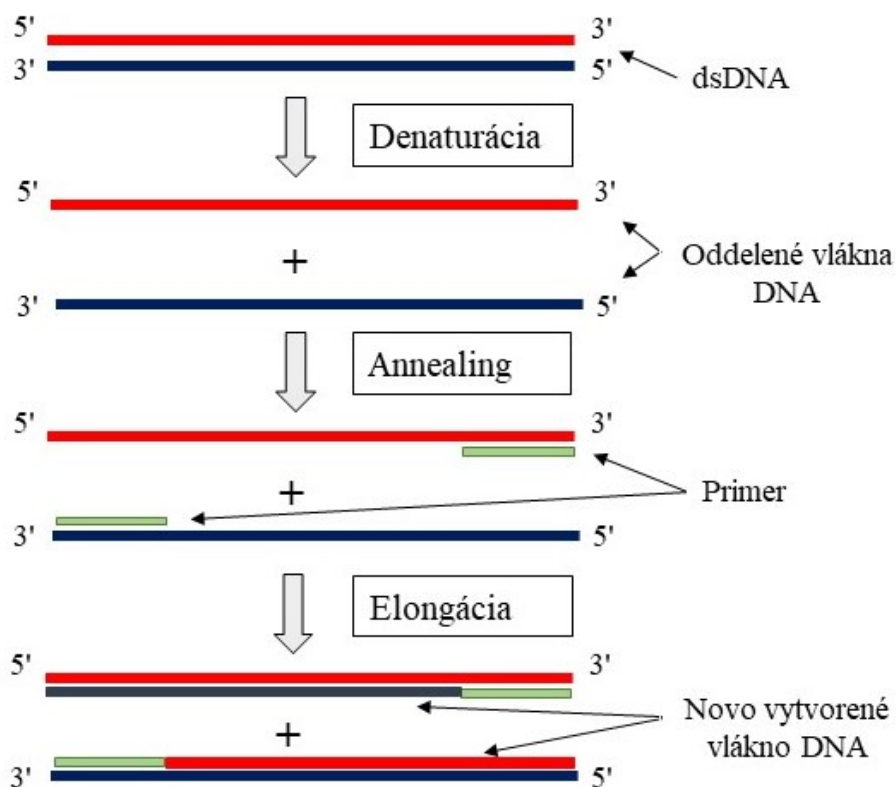
Kvantitatívna PCR (qPCR)

Reakcia PCR všeobecne pozostáva z niekoľkých krokov (Obrázok 3):

1. Počiatočná denaturácia, u ktorej sa reakčná teplota zvýši na 95 °C a reakcia sa inkubuje zväčša 2–5 minút, avšak maximálne 10 minút (v závislosti od enzýmových charakteristík a zloženia templátu). V tomto kroku dochádza k takzvanému roztaveniu dvojvláknovej DNA na samostatné vlákna. Keďže je DNA v tomto kroku vystavená vysokej teplote, táto fáza musí byť dostatočne dlhá na oddelenie všetkých vlákien. Avšak táto fáza nemôže trvať príliš dlho z dôvodu zachovania nepoškodenej DNA. Degradácia DNA by následne znížila citlivosť detekcie.
2. Cyklizácia, ktorá zahŕňa:

- a. Denaturáciu: Reakčná teplota sa zvýši na cca 95 °C, dochádza k narušeniu vodíkovej väzby medzi komplementárnymi bázami a k vzniku jednovláknovej DNA (ssDNA).
 - b. Annealing (nasadnutie primerov): Teplota sa zníži približne na 45–60 °C pod teplotu topenia primerov (T_m), z dôvodu naviazania primerov na templát.
 - c. Predĺženie: Teplota sa zvýši na 72 °C, dochádza k aktivovaniu DNA polymerázy, ktorá je zodpovedná za vznik nového vlákna.
3. Opakovanie krokov a – b vedie k exponenciálnej amplifikácii amplikónu (Nolan, 2014).

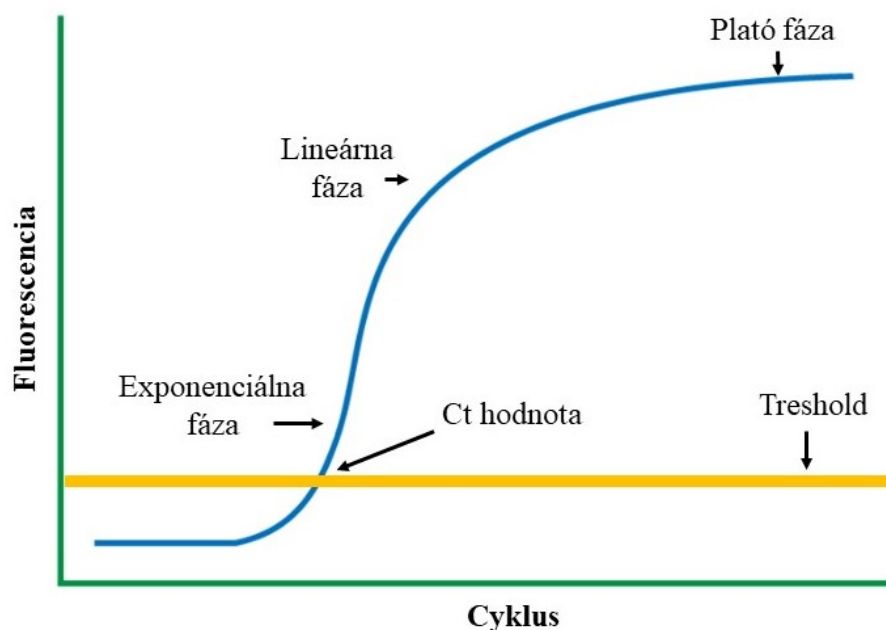
Na začiatku druhého cyklu sú v reakcii dve rôzne formy templátu, a to pôvodné vlákna DNA a novo syntetizované vlákna DNA. Zostávajúce pôvodné vlákna DNA, ktoré neboli aktivované v prvom cykle, môžu byť zachytené v druhom cykle a výsledkom budú molekuly pozostávajúce z primeru a extenzného produktu. Molekuly z prvého cyklu, ktoré boli aktivované a predĺžené, budú templátom pre primery, ktoré sú komplementárne k novo syntetizovanému materiálu (Nolan, 2014).



Obrázok 3 Znáznornenie priebehu PCR reakcie. Upravené podľa (Nolan, 2014).

Priebeh qPCR možno zaznamenať do viacerých fáz (Obrázok 4). Keďže cyklizácia prebieha opakovane, dochádza k exponenciálnej amplifikácii skopírovaných sekvencií. Následne dochádza k lineárnej fázy, kde primery sa spotrebúvajú na neúmerne narastajúce množstvo amplikónu, a teda sa priebeh reakcie začína spomaľovať. Teoreticky by PCR mala viesť k nepretržitej exponenciálnej amplifikácii, avšak reakcia nakoniec dosiahne fázu plató. V tejto fázy už nedochádza k zväčšovaniu amplikónu, pretože primery sú už spotrebované. Cyklus, v ktorom je zaznamenaná hodnota začiatku exponenciálnej fázy sa označuje hodnotou Ct. Inak povedané, Ct hodnota udáva počet cyklov, pri ktorom fluorescencia vzorky prekročí prahovú hodnotu (treshold) (Nolan, 2014). Výsledkom qPCR reakcie je teda hodnota Ct, ktorá je použitá k ďalším výpočtom.

Okrem real-time PCR môžu byť využité ďalšie metódy, ktoré sú založené na detekcii nukleových kyselín. Medzi také metódy patrí metóda mikročipov, kde princípom je spojenie teplotnej reťazovej reakcie s mikročipovou gélovou elektroforézou. Ide o rýchlu metódu, kde detekcia PCR produktu je umožnená už pri 10. cykle po približne 20 minútach. Okrem metódy mikročipov sa k detekcii GMO využíva aj Southern blotting. Princípom Southern blottingu alebo Southern prenosu je prenos DNA na hybridizačnú membránu. Samotný prenos nie je prevedený jednoduchou difúziou ale pomocou vákua, či kapilárnymi a elektroforetickými procesmi (Zdeňková et al., 2002).



Obrázok 4 Znázornenie jednotlivých fáz priebehu qPCR reakcie (Nolan, 2014).

3.2 Imunometódy

Medzi imunometódy patria metódy Western blotting (prenosu) a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Tieto metódy sú založené na špecifickej reakcii medzi protilátkou a antigénom. Medzi významné pozitívne metódy ELISA patrí menšia náročnosť, vyššia špecifickosť, citlivosť a pomerná jednoduchosť. Oproti tomu metódou Western blotting je možné stanoviť presnú hmotnosť proteínu, aj keď táto metóda je pomerne časovo náročná (Register, 1997).

Metóda ELISA umožňuje paralelne spracovať 96 vzoriek bez použitia nebezpečných látok ako je napríklad etidiumbromid, ktorý sa zväčša využíva pri metóde PCR, a ktorý má karcinogénne vlastnosti. Metóda ELISA sa obvykle využíva v spojení s metódou PCR, kde sa biotinylovaný produkt PCR zachytí na mikrotitračných doštičkách potiahnutých streptavidínom a neznačené vlákno sa odstráni alkalickou denaturáciou. Špecifická hybridizácia DNA sondy označenej digoxigenínom s imobilizovaným vláknom súčasne identifikuje PCR produkt. Táto metóda sa však nevyužíva často na detekciu GMO, aj keď bola využitá na detekciu Roundup Ready sóje. Predovšetkým má uplatnenie v mikrobiológii a virológii (Brunnert et al., 2001). Medzi proteíny, ktoré možno detegovať pomocou imunochemických analytických metód patria *Bt* insekticídne proteíny (Cry1Ab) a proteíny fosfínotrícín acetyltransferázy (PAT) tolerantné voči herbicídum (*Ht*). K dispozícii sú rôzne komerčné kity k výkonu metódy ELISA, u ktorých sa uvádza, že detegujú špecifické proteíny v potravinárskych plodinách, ako sú *Bt* proteíny (Cry1Ac, Cry1C, Cry3A, Cry2A, Cry9C, CP4) a *Ht* (PAT) proteíny. Je však potrebné si uvedomiť, že expresia jednotlivých proteínov je rozdielna medzi odrodami plodín. Takisto obsah proteínov nie je rovnomerne distribuovaný v celej rastline. Napríklad v kukurici sú najvyššie hodnoty daných proteínov obvykle pozorované v listoch a nie v zrne (Anklam et al., 2002).

Western blotting je vysoko špecifická metóda, ktorá poskytuje kvalitatívne výsledky vhodné na určenie, či vzorka obsahuje cieľový proteín pod, prípadne nad stanovenú prahovú úroveň. Pretože elektroforetická separácia proteínu sa uskutočňuje za denaturačných podmienok, eliminujú sa všetky problémy spôsobené solubilizáciou, agregáciou a zrážaním cieľového proteínu náhodnými proteínmi. Táto metóda je však vhodnejšia pre výskumné aplikácie, než na bežné testovanie. Pri tejto metóde sa vzorky solubilizujú detergentmi a redukčnými činidlami a následne sa separujú elektroforézou na SDS-polyakrylamidovom géle. Komponenty sú následne prenesené na pevný podklad,

obvykle ide o nitrocelulóзовú membránu. Väzobné miesta imunoglobulínu na membráne sú blokované sušeným odtučneným mliekom a naviazaná protilátka sa zafarbí dusičnanom strieborným, farbivom Coomassie alebo sekundárnym imunologickým činidlom, ako je proteín A spojený s chrenovou peroxidázou (HRP), či alkalickou fosfatázou (Sambrook a Russel, 2000).

3.3 Alternatívne metódy

Medzi alternatívnu metódu slúžiacu na detekciu GMO možno zaradiť metódu založenú na chromatografii. Tieto metódy je možné uplatniť pri detekcii GMO len ak sa zloženie geneticky modifikovaných organizmov líši od nemodifikovaných organizmov. Jedná sa hlavne o zloženie mastných kyselín a triglyceridov. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) spojená s chemickou ionizačnou hmotnostnou spektrometriou slúži na detekciu olejov pochádzajúcich z geneticky modifikovanej repky. Pomocou tejto metódy je skúmaná prítomnosť triglyceridov, kde je možné pozorovať, že oleje pochádzajúce z geneticky modifikovaných odrôd repky majú zvýšený obsah triacylglycerolov, čo vykazuje vyššiu oxidačnú stabilitu. Táto stabilita je spôsobená vysokým obsahom kyseliny stearovej a kyseliny laurovej. Je však potrebné si uvedomiť, že chromatografická metóda je uplatniteľná iba ak dôjde k významným zmenám v zložení geneticky modifikovaných rastlín alebo produktov pochádzajúcich od týchto geneticky modifikovaných organizmov (Byrdwell a Neff, 1996).

Medzi ďalšiu alternatívnu metódu k detekcii GMO možno zaradiť metódu blízkej infračervenej spektroskopii (NIR). Táto metóda je rýchla, nízko nákladová, nie je potrebná žiadna príprava vzoriek a nie je časovo náročná. Technológia NIR v genetickej oblasti a najmä v geneticky modifikovaných potravinách sa považuje za novú alternatívu. Nevýhodou je práve jej vysoká citlivosť na chemické viazanie molekúl organických látok v potravinách a krmivách (C – H, O – H a N – H), čím sa obmedzuje jej presnosť. Princípom tejto metódy je identifikácia fenotypových zmien, ktoré sú spôsobené genotypovými zmenami, ktoré nakoniec spôsobia zmeny na molekulárnych väzbách C – H, C – N a C – O. Pomocou tejto metódy je teda možné vyhodnotiť expresiu špecifického génu na základe fenotypových zmien (Alishahi et al., 2010). Táto technológia už bola uplatnená pri rozlíšení jačmennej múky s vysokým obsahom aminokyseliny lyzínu od jačmennej múky s normálnym obsahom tejto aminokyseliny (Munck et al., 2001), pri detekcii transgénnej kukurice (Campbell et al., 2000) a iné.

4 CIELE PRÁCE

TEORETICKÁ ČASŤ

Vypracovanie literárnej rešerš zameranej na geneticky modifikované organizmy, ich charakterizácie, príprava, vlastnosti a legislatívne predpisy. Ďalej bola teoretická časť práce zameraná na geneticky modifikované potraviny a potraviny s podielom GMO – charakterizácie a legislatívne predpisy a metódy stanovenia geneticky modifikovaných organizmov v potravinách.

PRAKTICKÁ ČASŤ

- optimalizácia molekulárno-biologických metód pre stanovenie geneticky modifikovaných organizmov v potravinách,
- stanovenie prítomnosti geneticky modifikovaných organizmov v potravinách,
- vyhodnotenie výsledkov a formulácia záverov práce.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

5 MATERIÁL

5.1 Potravinársky materiál

<u>Sójové produkty</u>	múka plnotučná toastová, kocky (sójové mäso), proteínový izolát 90%, proteín, rezy, bôby, sójovo-kokosová tyčinka
<u>Kukuričné produkty</u>	múka, plátky, tortila

Jednotlivé vzorky boli priamo dodané firmou i náhodne vybrané v tržnej sieti. Z dôvodu diskretnosti a na vyžiadanie výrobcov v tejto práci nie sú uvedené názvy firiem a sídla, ktoré dané potravinárske výrobky poskytli, prípadne u ktorých boli zakúpené. V tabuľke 1 sú zobrazené jednotlivé produkty, ktoré boli použité v tejto práci a ich označenie z dôvodu ľahšieho orientovania sa v tejto práci.

Tabuľka 1 Potravinárske materiály a ich označenie

Názov potravinárskeho materiálu	Označenie potravinárskeho materiálu
Sójová múka plnotučná toastová	9
Sójové kocky	17
Sójový proteínový izolát 90%	8
Sójový proteín	SP
Sójovo-kokosová tyčinky	14
Sójové rezy	15
Sójové rezy	16
Sójové bôby	SB
Kukuričná múka	18
Kukuričné plátky	11
Kukuričné plátky	12
Kukuričná tortila	KT

5.2 Chemikálie a kity

<u>Bio-Rad</u>	SsoFast™ EvaGreen® Supermix
<u>Biotium</u>	GelRed Nucleic Acid Gel Stain,
<u>ELISABETH PHARMACON</u>	EliGene® Plant DNA Isolation Kit
<u>Macherey-Nagel</u>	NucleoSpin® Plant II Kit, NucleoSpin® Food Kit
<u>Metabion</u>	Primery
<u>OMEGA</u>	E.Z.N.A.® Food DNA Kit
<u>Promega</u>	GoTaq Hot Start Green MasterMix
<u>QUIAGEN</u>	Power Food Microbial DNA Isolation Kit, DNeasy® mericon Food Kit, DNeasy® Plant Mini Kit
<u>ThermoScientific</u>	GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

5.3 Zloženie roztokov

S1 roztok

- 10 mM MgCl₂
- 10 mM Tris(hydroxymetyl) aminometan
- 0,5 % Triton X-100

Podrobené autoklávovaniu a pH 7,5

S2 roztok

- 1% SDS

Podrobené autoklávovaniu

TE pufor

- 0,12 g Tris(hydroxymetyl) aminometan
- 0,03 g Na₂EDTA
- Doplnené vodou do 100 ml, následne autoklávované

Výsledná hodnota pH 8,0

1% agarózový gél

- 1 g agaróza
- 100 ml 1x Tris-acetát-EDTA (TAE) pufor
- 4 kvapky farbičky GelRed

Zmes Fenol/chloroform/isoamylalkohol

- V pomere 25:24:1; pH 8,0

CTAB extrakčný pufor

- 2 g hexadecyl-trimethylamoniumbromid
- 8,2 g NaCl
- 0,74 g Na₂EDTA
- 1,2 g Tris(hydroxymetyl) aminometan
- Doplnené vodou do 100 ml, následne autoklávované

Výsledná hodnota pH 8,0

CTAB precipitačný pufor

- 0,5 g hexadecyl-trimethylamoniumbromid
- 0,23 g NaCl
- Doplnené vodou do 100 ml, následne autoklávované

Roztok 1,2 M NaCl

- 7,0 g NaCl
- Doplnené vodou do 100 ml, následne autoklávované

Výsledná hodnota pH 8,0

5.4 Prístroje

- Centrifuga minispin plus (Eppendorf)
- Laboratórne sklo
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR)

- Termocyklér CFX96 Touch™ pre qPCR (Bio-Rad)
- Termocyklér C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Termostat Bio TDB-100 (Biosan)
- Váhy (KERN)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Vortex-Genie 2 (QUIAGEN)
- QFX Fluorometer (DeNovix)
- Spektrofotometer Infinite 200 PRO (Tecan)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE)
- Elektroforetická vanička, model 4 (OWL Separation System Inc.)
- Vanička na polymerizáciu agarózového gélu
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Mikroskúmavky (Eppendorf)

6 METÓDY

6.1 Izolácia DNA

Izolácia DNA z daných vzoriek prebehla dvoma spôsobmi: metódou CTAB a pomocou komerčných kitov. Jednotlivé postupy k izolácii DNA boli optimalizované z dôvodu zisku čo najčistejšej DNA o najvyššej koncentrácii. Laboratórne pomôcky ako je lyžica, trecia miska s tlčíkom a nožnice, prípadne iné, boli pred samotnou izoláciou DNA očistené dekontaminačným roztokom. Počas celého priebehu izolácie boli použité laboratórne rukavice z dôvodu obmedzenia kontaktu chemikálii s pokožkou. Jednotlivé zloženia roztokov, ktoré neboli súčasťou kitu sú popísane v bode 5.3.

K izolácii genómovej DNA, nachádzajúcej sa v potravinách bola použitá CTAB metóda. Táto metóda slúži na izoláciu nukleových kyselín za použitia zmesi fenol/ chloroform/ isoamylalkohol, ktorá slúži ako nepolárne rozpúšťadlo. Dochádza k rozdeleniu bunkového lyzátu na dve fázy. Vrchná vodná fáza obsahuje nukleové kyseliny, ktoré sú následne vyzrážané etanolom. Táto metóda bola použitá aj s následnou optimalizáciou.

Izolácia DNA bola prevedená i pomocou komerčne dodaných kitov. Jednalo sa o kity, ktoré slúžili k izolácii DNA z potravín a kity slúžiace k izolácii rastlinnej DNA.

6.1.1 Izolácia DNA pomocou CTAB metódy

1. V trecej miske sa pomocou tlčíku zhomogenizovala daná vzorka na sypkú hmotu - prach.
2. 450 μ l roztoku S1 a 250 μ l roztoku S2 bolo pridaných k 0,1 g danej vzorky. Zmes sa nechala pretrepávať po dobu 10 min. Po uplynutí danej doby sa zmes scentrifugovala pri 14000 RPM (revolutions per minute; počet otočiek za minútu) po dobu 5 min pri laboratórnej teplote. Následne sa supernatant prepipetoval do čistej mikroskúmavky.
3. Do mikroskúmavky bolo pridaných 700 μ l zmesi fenol/chloroform/ isoamylalkohol. Daný objem sa premiešal pomocou vortexu po dobu 15 s. Po uplynutí doby sa zmes scentrifugovala pri 14000 RPM po dobu 5 min pri laboratórnej teplote. Následne vrchná vodná fáza bola prepipetovaná do čistej mikroskúmavky.

4. Do mikroskúmavky bol pridaný isopropanol v rovnakom objeme ako bol objem vrchnej vodnej fáze. Následne zmes bola premiešaná pomocou miešadla vortex po dobu 15 sekúnd a ponechaná pri laboratórnej teplote po dobu 2 minút.
5. Obsah mikroskúmavky bol zcentrifugovaný pri 14000 RPM počas 10 min.
6. Precipitát bol premytý v 500 μ l 70% etanolu vychladeného na -20 °C. Následne prebehla centrifugácia pri 14000 RPM počas 5 min. Supernatant bol odstránený a mikroskúmavka bola vložená do laminárneho boxu, kde došlo k vysušeniu.
7. Vysušená peletka na dne mikroskúmavky bola resuspendovaná v 30 μ l TE pufru a uskladnená do ďalšieho dňa v chladničke.

6.1.2 Izolácia DNA pomocou optimalizovanej CTAB metódy

1. Jednotlivé vzorky sa rozdrvili v trecej miske na jemný prach. Do skúmavky boli odvážené 0,2 g jemného prachu.
2. K vzorkám bolo napipetovaných 1500 μ l CTAB extrakčného pufru predhriateho na 65 °C. Skúmavka s obsahom sa zľahla premiešala pomocou vortexu. Do skúmavky bolo následne napipetovaných 10 μ l ribonukleázy A o koncentrácii 10 mg/ml a 10 μ l α -amylázy o koncentrácii 10 mg/ml. Vzorka sa mierne premiešala pomocou vortexu a nechala inkubovať v termostate pri teplote 65 °C po dobu 10 minút za stáleho miešania.
3. Po uplynutí doby bolo ku vzorke napipetovaných 10 μ l proteinkinázy K o koncentrácii 20 mg/ml. Vzorka bola opäť mierne premiešaná pomocou vortexu a ponechaná k inkubácii v termostate za stáleho miešania počas 30 minút pri teplote 65 °C.
4. Po odobratí vzorky z termostatu prebehla centrifugácia počas 15 minút pri 4 500 RPM pri pokojovej teplote.
5. Do novej čistej skúmavky bolo napipetovaných 850 μ l chloroformu, ku ktorému sa pridalo 850 μ l supernatantu. Skúmavka s obsahom bola následne premiešaná pomocou vortexu do mliečneho sfarbenia a zcentrifugovaná počas 20 min pri 4 500 RPM pri pokojovej teplote.
6. Do novej skúmavky bolo napipetovaných 1 300 μ l CTAB precipitačného pufru, ku ktorému bolo pridaných 650 μ l supernatantu.
7. Následne prebehla inkubácia pri pokojovej teplote počas 60 minút bez miešania.

8. Po uplynutí doby, bola skúmavka s obsahom podrobená centrifugácii pri 4 500 RPM počas 20 minút. Po centrifugácii bol supernatant odstránený a peletka na dne skúmavky bola rozpustená v 350 μ l 1,2 M NaCl.
9. Do skúmavky bolo následne pripipetovaných 350 μ l chloroformu. Skúmavka sa premiešala pomocou miešadla vortexdo mliečneho sfarbenia a zcentrifugovala pri 4 500 RPM počas 15 min.
10. Po centrifugácii bolo zo skúmavky napipetovaných 350 μ l hornej vodnej fázy do novej čistej skúmavky. K vodnej fázy bolo napipetovaných 420 μ l isopropanolu a skúmavka sa mierne premiešala a nechala inkubovať počas 20 minút pri laboratórnej teplote bez miešania.
11. Následne prebehla centrifugácia pri 4 500 RPM počas 15 min.
12. Supernatant sa opatrne odstránil a do skúmavky bolo napipetovaných 500 μ l 70 % etanolu. V tomto kroku bola skúmavka niekoľko krát prevrátená aby došlo k uvoľneniu peletky a tak k vymytiu zvyšku CTAB.
13. Následne prebehla centrifugácia pri 4 500 RPM počas 10 min. Supernatant bol odstránený a peletka mierne vysušená vo flowboxe.
14. Po vysušení bola peletka resuspendovaná v 100 μ l TE pufru. Takto pripravená vyzolovaná DNA bola následne použitá k meraniu koncentrácie, prípadne uskladnená v mrazničke k ďalšiemu použitiu.

6.1.3 Izolácia DNA pomocou DNeasy[®] mericon Food Kit (QUIAGEN)

1. Pred použitím kitu bola v trecej miske pomocou tĺčiku zhomogenizovaná daná vzorka na sypkú hmotu - prach.
2. Do 50 ml skúmavky boli pridané 2 g zhomogenizovanej vzorky. Následne do skúmavky boli pridané Proteináza K (dodaná kitom) v množstve 25 μ l a Food Lysis Buffer (dodaný kitom) v množstve 10 ml. K vzorkám, ktoré mali tendenciu bobtnať ako sú napríklad kukuričné pláty, bolo pridané dvojnásobne množstvo Food Lysis Buffer t.j. 20 ml.
3. Vzorky sa následne inkubovali v ternostate pri 60 °C počas 30 min za stáleho miešania. Po uplynutí danej doby sa vzorky vložili do misky s ľadom, kým vzorka nedosiahla pokojovú teplotu t.j. 15-25 °C.
4. Vzorky boli následne scentrifugované pri 6 000 RPM počas 5 min pri pokojovej teplote.

5. Po zcentrifugovaní bolo zo vzoriek odpipetovaných 700 μ l supernatantu do čistej 2 ml skúmavky, ktorá obsahovala 500 μ l chloroformu. Obsah v skúmavke bol mierne premiešaný pomocou vortexu a následne sцентрифugovaný počas 15 min pri 14 000 RPM.
6. Do novej čistej 2 ml skúmavky bol napipetovaný 1 ml Buffer PB (dodaný kitom) a 250 μ l z hornej fázy skúmavky z kroku č. 5. Obsah v skúmavke bol následne zvortexovaný
7. Do QIAquick spin column (dodané kitom) vlozenej do 2 ml skúmavky bolo napipetovaných 600 μ l vzorky. Skúmavka bola následne vložená do centrifúgy na 2 min pri 14 500 RPM. tekutina, ktorá sa nachádzala na dne skúmavky bola následne odstránená a na QIAquick spin column bolo opäť napipetovaných zvyšných 600 μ l vzorky. Znova prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 2 minút. Následne tekutina v skúmavke bola odstránená.
8. Na QIAquick spin column bolo napipetovaných 500 μ l Buffer AW2 (dodané kitom). Následne prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 2 minút. Tekutina zo skúmavky bola odstránená a skúmavka s QIAquick spin column už bez pridania akéhokoľvek pufru opäť zцентрифugovaná pri 14 500 RPM počas 1 minúty.
9. QIAquick spin column bola vložená do čistej novej 2 ml skúmavky. Na QIAquick spin column bolo napipetovaných 100 μ l Buffer EB (dodané kitom). Vzorka bola inkubovaná 1 minútu pri pokojovej teplote. Po uplynutí doby bola skúmavka zцентрифugovaná pri 14 500 RPM počas 2 minút. Vyizolovaná DNA bola následne uskladnená v mrazničke, prípadne hneď použitá k ďalej analýze.

6.1.4 Izolácia DNA pomocou DNeasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN)

1. Potravinárska vzorka bola zhomogenizovaná na jemný prach v trecej miske a odvážená do 15 ml skúmaviek o hmotnosti 0,2 g.
2. Do skúmavky bolo pridaných 400 μ l Buffer AP1 (dodané kitom) a 4 μ l RNase A (dodané kitom). K vzorkám, ako sú kukuričné pláty a sójové kocky bolo pridané dvojnásobne množstvo Buffer AP1, z dôvodu bobtnania.
3. Vzorky sa následne jemne premiešali na vortexe a inkubovali sa počas 10 minút pri 65 °C a občasného miešania.
4. Po inkubácii bolo k vzorkám napipetovaných 130 μ l. Následne sa vzorky premiešali na vortexe a nechali inkubovať na ľade počas 5 minút.
5. Následne prebehla centrifugácia pri 4 500 RPM počas 10 minút.

6. Supernatant bol prepipetovaný na QIAshredder spin column (dodané kitom) umiestnenom v 2 ml skúmavke. Opäť prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 2 min.
7. Po centrifugácii bola prepipetovaná tekutina z dna skúmavky do novej čistej 2 ml skúmavky. Následne bol pridaný Buffer AW1 (dodaný kitom) a to v 1,5-násobnom množstve objemu prepipetovanej tekutiny. Skúmavka bola mierne premiešaná pomocou miešadla vortex.
8. Na DNeasy Mini spin column (dodané kitom) umiestnenom v 2 ml skúmavke bolo napipetovaných 650 μ l vzorky z bodu 7. Prebehla centrifugácia pri 8 000 RPM počas 1 minúty.
9. Po centrifugácii bola odstránená tekutina na dne skúmavky a opäť na DNeasy Mini spin column bolo napipetovaných zvyšných 650 μ l vzorky z bodu 7. Následne prebehla centrifugácia pri 8 000 RPM počas 1 minúty.
10. Po centrifugácii bola DNeasy Mini spin column premiestnená do novej čistej 2 ml skúmavky. Následne bolo pridaných 500 μ l Buffer AW2 (dodané kitom) a vzorka bola podrobená centrifugácii pri 14 000 RPM počas 1 min.
11. Z dna skúmavky bola odstránená tekutina znovu na DNeasy Mini spin column bolo napipetovaných 500 μ l Buffer AW2. Opäť prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 2 minút.
12. Následne bola DNeasy Mini spin column premiestnená do novej čistej skúmavky. Na povrch bolo napipetovaných 50 μ l Buffer AE (dodané kitom) a inkubované pri pokojovej teplote 10 minút. Prebehla centrifugácia pri 8 000 RPM počas 1 minúty.
13. Po centrifugácii bolo opäť napipetovaných 50 μ l Buffer AE a zcentrifugovaných pri 8 000 RPM počas 1 minúty. Vyizolovaná DNA bola následne uskladnená v mrazničke, prípadne hneď použitá k ďalej analýze.

6.1.5 Izolácia DNA pomocou EliGene[®] Plant DNA Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON)

1. Vzorky potravín boli zhomogenizované na jemný prach v trecej miske a odvážené do 1,5 ml skúmaviek o hmotnosti 0,2 g.
2. Do skúmavky so vzorkou bolo pridaných 450 μ l Buffer P1 (dodaný kitom). Vzorky, ktoré bobtnajú, mali dvojnásobný objem Buffer P1. Obsah v skúmave bol mierne premiešaný pomocou vortexu.

3. Do skúmavky bolo napipetovaných 50 μ l Lysis Buffer P2 (dodané kitom). Následne obsah skúmavky bol mierne premiešaný pomocou vortexu a inkubovaný pri 70 °C počas 10 minút za občasného premiešania.
4. Nasledovala centrifugácia pri 13 000 RPM počas 3 min pri pokojovej teplote.
5. Supernatant bol prepipetovaný do novej čistej 1,5 ml skúmavky, ktorá obsahovala 175 μ l Inhibitor Removal Buffer P3 (dodané kitom). Obsah skúmavky bol jemne premiešaný pomocou vortexu a inkubovaný na ľade 5 min.
6. Po inkubácii prebehla centrifugácia pri 13 000 RPM počas 3 min.
7. Do novej čistej 2 ml skúmavky bol prepipetovaný supernatant o objeme 500 μ l a 500 μ l Binding Buffer P4 (dodaný kitom). Obsah bol zvortexovaný po dobu 5 sekúnd a do skúmavky napipetovaných ďalších 500 μ l Binding Buffer P5 (dodaný kitom). Obsah bol premiešaný pomocou miešadla vortex po dobu 5 sekúnd.
8. Na Spin Filter (dodaný kitom) bolo napipetovaných 750 μ l vzorky z bodu 7. Vzorka sa centrifugovala pri 10 000 RPM počas 1 min pri pokojovej teplote. Následne tekutina na dne skúmavky bola odstránená a na Spin Filter bolo napipetovaných zvyšných 750 μ l vzorky. Opäť prebehla centrifugácia pri 10 000 RPM počas 1 min. Po centrifugácii bol Spin Filter premiestený do novej čistej 2 ml skúmavky.
9. Na Spin filter bolo napipetovaných 500 μ l Wash Buffer P6 (dodané kitom) a vzorka bola zcentrifugovaná pri 10 000 RPM počas 1 min. Po centrifugácii bola tekutina z dna skúmavky odstránená a na povrch Spin Filter bolo napipetovaných 500 μ l Wash Buffer P7 (dodané kitom). Opäť prebehla centrifugácia pri 10 000 RPM počas 1 min.
10. Tekutina, ktorá sa nachádzala na dne skúmavky po centrifugácii bola odstránena a skúmavka bola znova zcentrifugovaná pri 12 000 RPM počas 2 min.
11. Spin Filter bol prenesený do novej čistej 2 ml skúmavky a na povrch bolo napipetovaných 100 μ l Elution Buffer P8 (dodané kitom). Následne prebehla inkubácia pri pokojovej teplote počas 10 min. Po uplynutí doby bol obsah v skúmavke podrobený centrifugácii pri 10 000 RPM počas 1 min. Vyizolovaná DNA bola použitá k ďalším postupom, prípadne uskladnená v mrazničke.

6.1.6 Izolácia DNA pomocou PowerFood[®] Microbial DNA Isolation Kit (QUIAGEN)

1. Vzorky potravín boli rozdrvené na prach v trecej miske pomocou tľičku. 0,2 g vzorky bolo premiestených do skúmavky, ku ktorej boli dodané guľičky na drtenie. Do tejto skúmavky boli napipetované 2 ml pufru PF1 (dodané kitom).
2. Skúmavka s obsahom bola prenesená na vortex s nosičom, kde boli skúmavky upevnené a pomocou miešadla vortex premiešané v horizontálnej polohe pri najvyššej rýchlosti počas 10 min.
3. Obsah skúmavky bol zcentrifugovaný pri 14 500 RPM počas 1 min.
4. Supernatant bol prepipetovaný do čistých 2 ml skúmaviek. K supernatantu bol napipetovaný roztok PF2 (dodaný kitom) o objeme 100 µl. Obsah skúmavky sa následne inkuboval pri 4 °C počas 5 min. Nasledovala centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 minúty pri pokojovej teplote.
5. Supernatant bol prepipetovaný do novej čistej skúmavky. Do skúmavky bol ďalej pridaný roztok PF3 (dodané kitom) o objeme 900 µl. Obsah skúmavky bol mierne premiešaný pomocou vortexu.
6. Na kolónku bolo napipetovaných 650 µl zmesi z bodu 5. Skúmavka bola následne centrifugovaná pri 14 500 RPM počas 1 min. Tekutina na dne skúmavky bola odstránená a na povrch kolónky bolo napipetovaný zvyšný objem zmesi. Zmes bola opäť podrobená centrifugácii pri 14 500 RPM počas 1 min.
7. Po centrifugácii bola kolónka prenesená do čistej novej 2 ml skúmavky. Na povrch kolónky bolo napipetovaných 650 µl roztoku PF4 (dodané kitom). Obsah skúmavky bol zcentrifugovaný pri 14 500 RPM počas 1 min.
8. Tekutina z dna skúmavky bola odstránená a na povrch skúmavky bolo napipetovaných 650 µl roztoku PF5 (dodané kitom). Skúmavka s kolónkou bola opäť zcentrifugovaná pri 14 500 RPM počas 1 min. Tekutina z dna skúmavky bola odstránená a skúmavka bola vložená do centrifúgy na 2 min pri 14 500 RPM.
9. Kolónka bola prenesená do novej čistej 2 ml skúmavky. Na povrch kolónky bolo napipetovaných 50 µl roztoku PF6 (dodané kitom). Prebehla inkubácia pri pokojovej teplote po dobu 15 min.
10. Po uplynutí doby bola skúmavka zcentrifugovaná pri 14 500 RPM počas 1 min. Kolónka bola odstránená a vyzolovaná DNA bola uchovaná v mrazničke, prípadne použitá v ďalších krokoch.

6.1.7 Izolácia DNA pomocou E.Z.N.A.[®] Food DNA Kit (OMEGA)

1. Do 15 ml skúmavky bolo navážených 0,2 g vzorky, ku ktorej sa pridalo malé množstvo sklenených guľčiek na rozdrvenie. Do skúmavky bolo napipetovaných 1 400 µl MB1 Buffer (dodaný kitom).
2. Skúmavka sa nechala vortexovať na Vortex-Genie 2(QUIAGEN) počas 5 min pri pokojovej teplote. Následne sa vzorka scentrifugovala pri 6 000 RPM počas 20 s.
3. Do skúmavky bol pridaný DS Buffer (dodaný kitom) v objeme 84 µl a 20 µl Proteinase K Solution (dodané kitom). Obsah v skúmavke bol následne premiešaný na vortexe.
4. Skúmavka sa nechala inkubovať 20 min. pri 60 °C bez miešania.
5. Po uplynutí inkubačnej doby bol obsah v skúmavke zcentrifugovaný pri 13 000 RPM počas 5 min pri pokojovej teplote.
6. Do 1,5 ml skúmavky bol následne prepipetovaný supernatant o objeme 400 µl. K supernatantu bol napipetovaný RBB Buffer (dodaný kitom) o objeme 800 µl.
7. Na HiBand DNA Mini Column (dodané kitom) bolo napipetovaných 700 µl vzorky z predchádzajúceho bodu. Následne prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min. pri pokojovej teplote.
8. Po centrifugácii bola z dna skúmavky odstránená tekutina a na povrch HiBand DNA Mini Column bol napipetovaný zvyšný objem vzorky z bodu č 6. Následne prebeha centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min. pri pokojovej teplote a z dna skúmavky bola odstránená tekutina, ktorá prešla HiBand DNA Mini Column.
9. Na povrch HiBand DNA Mini Column bolo napipetovaných 600 µl HBC Buffer (dodané kitom) a prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 30 sekúnd.
10. Po centrifugácii bol odstránený filtrát a do novej tuby bol premiestnený HiBand DNA Mini Column. Na povrch bolo napipetovaných 700 µl DNA Wash Buffer (dodané kitom) a zcentrifugované pri 14 500 RPM počas 30 sekúnd. Po centrifugácii bol odstránený filtrát.
11. Opäť sa zopakoval bod č. 10.
12. Následne bola zcentrifugovaná prázdna skúmavka s HiBand DNA Mini Column pri 14 500 RPM počas 2 min. Tento krok slúžil k vysušeniu zvyškového pufu z kolónky.

13. HiBand DNA Mini Column bola premiestnená do novej čistej 1,5 ml skúmavky a na jej povrch bolo napipetovaných 100 µl Elution Buffer (dodaný kitom) zahriateho na 70 °C. skúmavka sa nechala inkubovať pri pokojovej teplote počas 10 min.
14. Následne prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min. Filtrát sa opäť naniesol na HiBand DNA Mini Column a skúmavka sa nechala inkubovať 5 min.
15. Po inkubácii prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min.
16. Vyzolovaná DNA bola následne použitá k meraniu koncentrácie a uložená v mrazničke k ďalšiemu použitiu.

6.1.8 Izolácia DNA pomocou NucleoSpin® Plant II Kit (Macherey-Nagel)

1. Vzorka potravinovej látky bola rozdrvená v tretej miske pomocou tláčku na prach. Následne do mikroskúmavky bolo odvážených 100 mg vzorky.
2. Do mikroskúmavky do vzorky bolo napipetovaných 300 µl Buffer PL2 (dodaný kitom) a obsah bol zľahka zhomogenizovaný.
3. Po premiešaní vzorky pomocou vortexu bolo napipetovaných 10 µl RNázy A a celý obsah bol opäť premiešaný pomocou vortexu. Následne prebehla inkubácia pri 65 °C počas 30 min bez miešania.
4. Po uplynutí inkubačnej doby bolo k vzorke napipetovaných 75 µl Buffer PL3 (dodaný kitom). Mikroskúmavka sa inkubovala 5 minút na ľade bez miešania.
5. Po uplynutí doby bola mikroskúmavka zcentrifugovaná pri 10 000 RPM počas 30 sekúnd.
6. Do novej skúmavky bol vložený NucleoSpin® Filter (dodaný kitom), na ktorý bol napipetovaný supernatant z bodu 5. Následne prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 2 min.
7. NucleoSpin® Filter bol odstránený a k filtrátu bolo napipetovaných 450 µl Buffer PC (dodaný kitom). Obsah v mikroskúmavke bol mierne premiešaný pomocou vortexu a prepipetovaný na NucleoSpin® Plant II Column (dodaný kitom) vloženom v novej mikroskúmavke. Opäť prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min.
8. Po centrifugácii bol filtrát odstránený a na NucleoSpin® Plant II Column bolo napipetovaných 400 µl Buffer PW1 (dodaný kitom) z dôvodu vyššieho zisku čistoty vyizolovanej DNA. Obsah v skúmavke bol podrobený centrifugácii pri 14 500 RPM počas 1 min.

9. Následne filtrát bol odstránený a na NucleoSpin® Plant II Column bolo napipetovaných 700 µl Buffer PW2 (dodaný kitom). Opäť prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min. Po centrifugácii bol filtrát na dne skúmavky odstránený a na NucleoSpin® Plant II Column bolo znova napipetovaných 200 µl Buffer PW2. Prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 2 minút a filtrát bol odstránený. NucleoSpin® Plant II Column sa nechala vo flowboxe vysušiť počas 15-20 min.
10. Po vysušení bolo na NucleoSpin® Plant II Column napipetovaných 50 µl Buffer PE (dodaný kitom) predohriateho na 65 °C. Skúmavka s NucleoSpin® Plant II Column bola následne inkubovaná počas 5 min pri 65 °C. Po uplynutí doby prebehla centrifugácia pri 14 500 RPM počas 1 min, NucleoSpin® Plant II Column sa odstránila a vyizolovaná DNA bola použitá k ďalším postupom.

6.1.9 Izolácia DNA pomocou NucleoSpin® Food Kit (Macherey-Nagel)

1. 200 mg zhomogenizovaného materiálu bolo prenesených do mikroskúmavky. K materiálu bolo následne pridaných 550 µl Buffer CF (dodaný kitom) predohriateho na 65 °C. Mikroskúmavka bola mierne premiešaná a následne k materiálu bolo pripipetovaných 10 µl proteinázy K.
2. Mikroskúmavka bola premiešaná na vortexe a inkubovaná pri 65 °C počas 30 min bez miešania. Po uplynutí doby inkubácie prebehla centrifugácia pri 11 000 RPM počas 10 min.
3. Do novej mikroskúmavky bolo prepipetovaných 300 µl supernatantuspolu s 300 µl Buffer C4 (dodaný kitom) a 300 µl 96% etanolu. Obsah v mikroskúmavky bol premiešaný pomocou miešadla vortexpo dobu 30 s.
4. Na NucleoSpin® Food Column (dodané kitom), ktorý bol vložený v mikroskúmavke bolo prepipetovaných 700 µl supernatantu spolu s etanolom a Buffer C4 z bodu č. 3. Následne prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 1 min. Po centrifugácii bola odstránená kvapalina, ktorá prešla kolónou.
5. Prebehlo prvé čistenie, kde na NucleoSpin® Food Column bolo napipetovaných 400 µl Buffer CQW (dodané kitom) a nasledovala centrifugácia pri 14 000 RPM počas 1 min. Získaná kvapalina na dne skúmavky bola po centrifugácii odstránená.
6. Následne prebehlo druhé čistenie, kde na NucleoSpin® Food Column bolo napipetovaných 700 µl Buffer C5 (dodané kitom) a opäť prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 1 min.

7. Po druhom čistení nasledovalo finálne čistenie, kde na NucleoSpin® Food Column bolo opäť napipetovaných 200 µl Buffer C5. Prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 1 min.
8. NucleoSpin® Food Column bola presunutá do novej čistej mikroskúmavky. Na jej povrch bolo napipetovaných 100 µl Buffer CE (dodaný kitom), ktorý bol predohriaty na 70 °C a mikroskúmavka sa nechala inkubovať pri pokojovej teplote počas 15 min.
9. Následne prebehla centrifugácia pri 14 000 RPM počas 1 min a vyizolovaná DNA bola následne použitá k zmeraniu koncentrácie a k ďalším postupom.

6.2 Meranie koncentrácie vyizolovanej DNA

Koncentrácia vyizolovanej DNA bola nameraná pomocou prístrojov QFX Fluorometru (DeNovix) a spektrofotometra Infinite 200 PRO (Tecan).

6.2.1 Meranie koncentrácie DNA pomocou QFX Fluorometru (DeNovix)

Pre meranie koncentrácie vyizolovanej DNA pomocou prístroju QFX Fluorometru (DeNovix) bol použitý AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation kit.

1. Do skúmavky bol napipetovaný DNA Quantitation Buffer (dodaný kitom) o objeme 200 µl a 4 µl AccuGreen™ Dye farbiva. Obsah skúmavky bol mierne premiešaný pomocou vortexu.
2. Do čistej priehľadnej mikroskúmavky bola následne napipetovaná táto zmes o objeme 190 µl, ku ktorej bola pridaná vyizolovaná DNA o objeme 10 µl.
3. Do dvoch ďalších čistých priehľadných mikroskúmaviek obsahujúcich zmes z bodu 1. bolo napipetovaných AccuGreen™ Standard 1 a AccuGreen™ Standard 2 o objeme 190 µl.
4. Následne prebehlo vlastné meranie, kde najprv sa merala koncentrácia štandardov a potom koncentrácia daných vzoriek obsahujúcich vyizolovanú DNA.

6.2.2 Meranie koncentrácie a čistoty DNA pomocou spektrofotometra Infinite 200 PRO (Tecan)

Ako elučný pufor pre meranie koncentrácie a čistoty DNA bol použitý pufor, v ktorom bola daná vyizolovaná DNA rozpustená v poslednom kroku izolácie. Po hodnotení boli zaznamenané hodnoty uložené v programe Microsoft Office Excel.

1. Do jamiek patentovanej NanoQuant platničky bol napipetovaný elučný pufor o objeme 2 μ l.
2. Platnička bola vložená do spektrofotometra a prebehlo meranie. Následne sa platnička vybrala zo stroja a bola očistená 70 % etanolom.
3. Na platničku do jamiek boli napipetované jednotlivé vzorky o objeme 2 μ l.
4. Platnička bola opäť vložená do prístroja a prebehlo vlastné meranie. Výsledky boli následne vyhodnotené a uložené.

6.3 Príprava primerov k qPCR reakcii

V tejto diplomovej práci boli použité sekvencie primerov, ktoré sú dostupné na stránkach Štátnej veterinárnej a potravinárskej správy Slovenskej republiky. Jednotlivé primery sú navrhnuté k použitiu referenčných metód, ktoré sa používajú pri výkone úradnej kontroly k analýze potravín za účelom detekcie a stanovenia geneticky modifikovaných organizmov. Tabuľka 2 zobrazuje použitie primery, ich sekvencie i veľkosť.

Tabuľka 2 Primery použité k PCR reakciám

Sledovaná oblasť/primer	Sekvencia	Veľkosť (bp)	Popis
Sójový lecitín/ Lec1-Fw	5'-GCCCTCTACTCCACCCCATCC-3'	118	Sójový lecitín, endogén (sója), vhodné pre klasickú PCR
Sójový lecitín/ Lec1-Rev	5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG-3'		
35S promotor/CaMV1Fw	5'-GAAGGTGGCTCCTACAAATGCC-3'	199	Vírus karfiolovej mozaiky, (transgén)
35S promotor/CaMV1Rev	5'-GTGGGATTGTGCGTCATCCC-3'		
<i>ivr</i> / IVR-Fw	5'-CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC-3'	225	Gén pre invertázu, endogén (kukurica)
<i>ivr</i> / IVR-Rev	5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3'		
lectin (Le1) gene/ Lec(qPCR)-Fw	5'-CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC-3'	74	Sójový lecitín, endogén (sója), vhodné k qPCR
lectin (Le1) gene/ Lec(qPCR)-Rev	5'-GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC-3'		
5'-host genome/ IBR-Fw	5'-TTCATTCAAATAAGATCATAACAGGTT-3'	84	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom sóje GTS 40-3-2 a hostiteľským genómom sóje, (transgén)
lziert/ IBR-Rev	5'-GGCATTGTAGGAGCCACCTT-3'		
5'-host genome/ Bt11Fw	5'-TGTGTGGCCATTTATCATCGA-3'	68	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom kukurice Bt11 a hostiteľským genómom kukurice, (transgén)
Inzert/ Bt11Rev	5'-CGCTCAGTGGAACGAAAACCTC-3'		
5'-host genome/ MON863-Fw	5'-TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT-3'	84	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom kukurice MON863 a hostiteľským genómom kukurice, (transgén)
Inzert/ MON863-Rev	5'-GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC-3'		

6.4 Polymerázová reťazová reakcia (klasická PCR)

Klasická PCR prebiehala v reakčnej zmesi o celkovom objeme 20 μl . Ako templát pre túto reakciu bola použitá vyextrahovaná DNA. Každá reakčná zmes obsahovala templát, príslušné primery, GoTaq Hot Start Green MasterMix (MM) a vodu určenú k PCR reakcii v určitých objemoch, ktoré sú uvedené v tabuľke 3. Celkovo boli pripravené 2 sady reakčnej zmesi pre danú vzorku. Prvá sada reakčnej zmesi obsahovala kombináciu primerov, ktoré slúžili na detekciu endogénu v danej vzorke. Druhá sada reakčnej zmesi obsahovala kombináciu primerov, ktoré detegovali prítomnosť T-DNA inzertu v danej vzorke. Pri klasickej PCR bola takisto navyše pripravená jedna PCR zmes, ktorá neobsahovala templát. Jednalo sa o negatívnu kontrolu, u ktorej je nutné, aby nedošlo k amplifikácii DNA fragmentu. Ak by bola zaznamenaná amplifikácia DNA fragmentu u negatívnej kontrole, značilo by to prítomnosť neželanej cudzorodej DNA v niektorej zo zložiek PCR (voda, primer, MM), teda kontamináciu, ktorá mohla vzniknúť napríklad nesterilným pipetovaním.

Takto pripravená zmes, ktorá bola nanapipetovaná do mikroskúmavky bola prenesená do termálneho cykléru. Cyklér bol následne nastavený na optimálne podmienky pre priebeh reakcie. Podmienky cykléru sú zobrazené v tabuľke 4. Po ukončení reakcie bola prevedená elektroforéza na agarózovom géle, ktorou sa vyhodnotila PCR reakcia.

Tabuľka 3 Reakčná zmes použitá pre klasickú PCR

Chemikálie	Objem na jednu reakciu (20 μl)
MM	10 μl
Voda	7 μl
Primer Fw	1 μl
Primer Rev	1 μl
Templát	1 μl

Tabuľka 4 Nastavenie cykléru pre priebeh klasickej PCR reakcie

Krok PCR cyklu	Čas (t)	Teplota (T)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94°C	7 min	1x
Denaturácia	94°C	30 s	40x
Annealing	60°C	30 s	
Elongácia	72°C	1 min	
Konečná elongácia	72 C°	10 min	1x
Chladenie	10 C°	∞	1x

6.4.1 Vyhodnotenie klasickej PCR pomocou agarózovej elektroforézy

Elektroforéza na 1% agarózovom géle bola prevedená z dôvodu vyhodnotenia PCR reakcie, teda detekcie T-DNA inzertu a endogénu v danej vzorke. Jedno percentný agarózový gél bol pripravený z 1 g agarózy a 100 ml 1% TAE pufru, ktoré boli prenesené do Erlenmayerovej banky. Erlenmayerová banka bola prenesená do mikrovlnnej trúby a zmes agarózy a 1% TAE pufru bola privedená k varu. Po rozpustení agarózy boli do mierne vychladnutej zmesi pridané 4 kvapky farbičky GelRed na zvýraznenie DNA. Zmes bola následne naliata do vaničky s hrebeňom, ktorá slúžila na stuhnutie gélu. Po stuhnutí gélu bol hrebeň odstránený a gél s touto vaničkou bol prenesený do elektroforetickej vaničky obsahujúcej 1% TAE pufor, ktorý bol doplnený po povrch gélu. Do prvej jamky bol napipetovaný tzv. marker (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ThermoScientific) o objeme 3 μ l. Do ďalších jamiek boli napipetované dané vzorky o objeme 5 μ l. Následne sa zapojili dané elektródy a prebehla elektroforéza s nepretržitým napätím 90 V počas 30 min. Po uplynutí danej doby bol gél prenesený do UV-transiluminátoru a pozorovaný pod UV svetlom pomocou kamery. Pomocou programu GeneSnap boli následne vyhotovené jednotlivé fotografie gélu.

6.5 Kvantitatívna PCR (real-time PCR)

Táto metóda bola použitá k detekcii génov v použitých vzorkách. Ide o metódu, ktorá využíva kvantitatívne vyhodnotenie v reálnom čase. Z hľadiska detekcie fluorescenčného signálu bola použitá metóda SYBR Green I. SYBR Green I je farbivo viažuce sa na DNA,

ktoré emituje fluorescenciu v prípade, ak sa naviaže na DNA. Pre túto metódu bola použitá zmes SsoFast™ EvaGreen® Supermix od firmy Bio-Rad.

Kvantitatívna PCR, inak qPCR prebehla v reakčnej zmesi o celkovom objeme 20 μ l. Vyextrahovaná DNA slúžila ako templát. Každá zmes obsahovala SsoFast™ EvaGreen® Supermix, templát, vodu určenú k qPCR a príslušné primery v určitých objemoch, ktoré sú uvedené v tabuľke 5. Táto zmes bola rozpipetovaná do mikrotitračnej doštičky a vložená do termocykléru C1000 Touch Thermal Cycler od firmy Bio-Rad. Podmienky reakcie sú zobrazené v tabuľke 6. Po ukončení reakcie bola vyhodnotená PCR reakcia a prevedená absolútna kvantifikácia na určenie množstva GM zložky v danej vzorke.

Tabuľka 5 Reakčná zmes použitá pre PCR v reálnom čase

Chemikálie	Objem na jednu reakciu (20 μ l)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	10 μ l
Voda	6 μ l
PrimerFw	1,5 μ l
Primer Rev	1,5 μ l
Templát	1 μ l

Tabuľka 6 Podmienky reakcie pre priebeh PCR v reálnom čase

Krok PCR cyklu	Teplota (T)	Čas (t)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94°C	7 min	1x
Denaturácia	94°C	30 s	40x
Annealing	60°C	30 s	
Elongácia	72°C	1 min	
Konečná elongácia	72 C°	10 min	1x
Chladienie	10 C°	10 min	1x

6.5.1 Vyhodnotenie qPCR pomocou absolútnej kvantifikácie

Počiatkové množstvo GM zložky v daných vzorkách bolo vypočítané pomocou absolútnej kvantifikácie. Pre výpočet tohto množstva je nutné dané vzorky amplifikovať so sériou štandardov so známou koncentráciou, teda ide o porovnanie množstva transgénu vo vzorke proti štandardu. Pre túto prácu boli použité ako kukuričné, tak i sójové štandardy, ktoré obsahovali 0%; 0,1% a 1% GM zložky. Pre výsledky absolútnej kvantifikácie boli použité 3 sériové riedenia 0x, 10x, 100x. Vzorky i štandardy boli napipetované do mikrotitračnej doštičky teda v troch riedeniach a v dvoch opakovaniach (pre reprodukovateľnosť výsledkov).

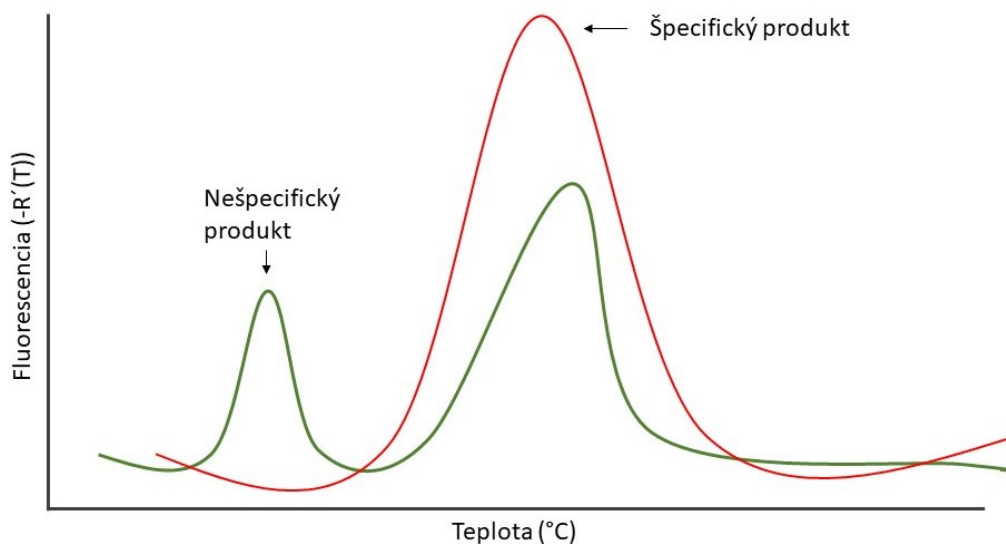
Po skončení real-time PCR reakcie boli získané CT hodnoty daných vzoriek ako pre endogén, tak pre transgén. Najprv bola vypočítaná hodnota delta CT, kde CT hodnota endogénu bola odčítaná od CT hodnoty transgénu. Bola vyrátaná efektívnosť reakcie, kde získané hodnoty z kalibračnej priamky boli porovnané s optimálnymi hodnotami parametrov, ktoré sú uvedené v tabuľke 7, kde rovnica kalibračnej krivky je v tvare $y = -bx + a$. Parameter y predstavuje výstup, teda závislá premenná, b (slope) je vyjadrený ako sklon kalibračnej krivky, x predstavuje vstup, teda nezávislá premenná a parameter a (intercept) predstavuje odskok začiatku regresnej priamky od nulového bodu. Zatiaľ čo reakčná účinnosť ($r.e.$) je vypočítaná zo sklonu kalibračnej priamky (M) pomocou rovnice $r.e. = 10^{(-\frac{1}{M})} - 1$ (Trachtová et al., 2011).

Tabuľka 7 Popis optimálnych parametrov charakterizujúcich kalibračnú priamku

Parametre kalibračnej krivky	Optimálne hodnoty parametrov
Sklon priamky (M)	-3,9 až -3,0
Reakčná účinnosť ($r.e.$)	$\pm 0,99$
Korelačný koeficient (R^2)	80 až 110%

Na výpočet presného množstva GM zložky boli použité hodnoty toho riedenia, u ktorého bola vyrášaná najlepšia efektivita reakcie. Následne zo série štandardov bola získaná kalibračná krivka pomocou lineárnej regresie, kde kalibračná priamka bola zhotovená zo závislosti delta CT hodnôt na zlogaritmovanej koncentrácii štandardov.

Ďalším dôležitým krokom k vyhodnoteniu qPCR je analýza krivky topenia. Táto krivka je spojená s farbivom SYBR Green I, ktoré sa viaže na DNA. Postupom PCR reakcie sa zvyšuje množstvo DNA, čo spôsobuje, že na amplikóny sa viaže viac farbiva, a teda sa zvyšuje intenzita signálu. Avšak takéto farbivo sa viaže na všetky amplifikované produkty, teda i diméry primerov, či produkty, ktoré sú nešpecifické. Preto je nutné previesť analýzu kriviek topenia, kde výsledkom je vyhodnotenie špecificity produktov obrázok 5. Pokiaľ vzorka obsahuje špecifický produkt, krivka topenia bude obsahovať len jeden pík. Pokiaľ vo vzorke je prítomný nešpecifický produkt, krivka topenia bude obsahovať viac ako jeden pík (Ririe et al., 1997).



Obrázok 5 Analýza kriviek topenia vo dvoch vzorkách. Červená krivka obsahujúca jeden pík = špecifický produkt, zelená krivka obsahujúca 2 píky = nešpecifický produkt. Upravené podľa Nolan (2014).

7 VÝSLEDKY A DISKUSIA

7.1 Čistota a koncentrácia vyizolovanej DNA

Ako už bolo spomínane na izoláciu DNA zo vzoriek bola použitá CTAB metóda a komerčne dostupné kity. Po tejto izolácii prebehla kontrola a meranie koncentrácie a čistoty vyizolovanej DNA. Čistá DNA by mala nadobúdať hodnoty 1,8 až 2,0. Vzorky, ktoré mali najvyššiu koncentráciu a najlepšiu čistotu boli následne použité k PCR reakciám. V tabuľke 8 je vzorovo zobrazená koncentrácia a čistota vzorky 12 (kukuričné plátky) za použitia rozličných metód izolácie DNA. V tabuľke 8 nie sú uvedené koncentrácie za použitia CTAB metódy, pretože voľným okom bolo pozorované, že vyizolovaná DNA nebola čistá ani po opakovanej izolácii touto metódou a po premeraní fluorometrom a spektrofotometrom boli jednotlivé koncentrácie príliš nízke, až nezaznamenateľné prístrojom. Táto metóda bola následne označená ako za neúspešnú pri izolácii DNA z takýchto vzoriek.

Tabuľka 8 Nameraná koncentrácia a čistota u vzorky 12 (kukuričné plátky) za použitia rozličných metód izolácie DNA

Vzorka	Spôsob izolácie DNA	Fluorometer	Spektrofotometer	
		Koncentrácia ng/μl	Koncentrácia ng/μl	Čistota
12	DNeasy [®] mericon Food Kit (QUIAGEN)	7,20	29,73	1,97
	DNeasy [®] Plant Mini Kit (QUIAGEN)	0,10	4,21	1,90
	EliGene [®] Plant DNA Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON)	9,85	22,9	1,72
	PowerFood [®] Microbial DNA Isolation Kit (QUIAGEN)	0,02	2,06	2,16
	E.Z.N.A. [®] Food DNA Kit (OMEGA)	7,77	66,1	2,19
	NucleoSpin [®] Plant II Kit (Macherey-Nagel)	0,61	9,47	1,54
	NucleoSpin [®] Food Kit (Macherey-Nagel)	5,00	14,31	1,84
	CTAB s optimalizáciou	0,36	2,4	1,66

Pri nameraných koncentráciách si možno povšimnúť, že CTAB metóda aj po optimalizácii dosahuje veľmi nízke koncentrácie a čistota takejto vyizolovanej DNA nie je postačujúca. Oproti CTAB metóde možno povedať, že izolácia DNA z potravinárskeho materiálu je úspešnejšia za použitia komerčne dodaných kitov. Metódy izolácie DNA zo surovín, ktoré sú založené na použití kitov vedú k úspešnejšej izolácii DNA bez neprijateľnej degradácie DNA. K degradácii DNA prispievajú faktory ako nadmerné teplo, nukleázová aktivita a nízke pH, ktoré je špecifické pri bežnom spracovaní potravín. Takéto faktory sa najčastejšie vyskytujú pri výrobkoch s dlhou dobou skladovateľnosti, ako sú napríklad pripravené mäsové guľky v paradajkovej omáčke a hovädzie mäso v konzerve (Ahmed, 2002).

Ako najvhodnejší kit k izolácii DNA z potravinárskych vzoriek sa javí DNeasy[®] mericon Food Kit od firmy QUIAGEN. Čistota takejto vyizolovanej DNA je pomerne vysoká. Podobne vysokú čistotu možno zaznamenať i za použitia iných kitov ako sú DNeasy[®] Plant Mini Kit od firmy QUIAGEN, alebo NucleoSpin[®] Food Kit od firmy Macherey-Nagel. Jednotlivé koncentrácie sa takisto líšia i typom použitého materiálu vid'. tabuľka 9. Zatiaľ čo kukuričné plátky patria medzi „suché“ materiály, ktoré veľmi rýchlo absorbujú vodu a po prídavku pufry bobtnajú, vzorky ako sójové rezy sa správajú po prídavku pufry odlišne. Sójové rezy sa pomerne ťažko dezintegrujú a po prídavku pufry je zväčša nutné dodať mechanickú silu, ako je využitie trepačky, či prídavok sklenených guľčiek.

Z tabuľky 9 si možno všimnúť, že potravinársky materiál, ako sú kukuričné plátky (vzorka č. 12) dosahoval pri izolácii DNA vyššie koncentrácie a lepšiu čistotu za použitia DNeasy[®] mericon Food Kit od firmy QUIAGEN, zatiaľ čo u vzoriek ako sú sójové tyčinky (vzorka č. 15) je vhodnejšie použiť NucleoSpin[®] Food Kit od firmy Macherey-Nagel. Pri izolácii DNA zo vzoriek, ako je sójový proteínový izolát 90% (vzorka č. 8), boli oba spomínané kity dostatočne vyhovujúce. Niektoré zlúčeniny prítomné v potravinách, ako sú napríklad proteíny, tuky, polysacharidy, polyfenoly, kakaové extrakty a karamelizovaný cukor môžu inhibovať DNA polymerázu, ktorá je dôležitá pri PCR reakcii (Vroh Bi et al., 1996). Preto je nutné k PCR reakcii použiť čo najčistejšiu DNA.

Tabuľka 9 Zobrazenie koncentrácií a čistoty vzoriek 12 (kukuričné plátky), 15 (sójové rezy) a 8 (sójový izolát) za použitia troch vzorovo vybraných kitoch slúžiacich k izolácii DNA zo vzoriek

Vzorka	Spôsob izolácie DNA	Fluorometer	Spektrofotometer	
		Koncentrácia ng/μl	Koncentrácia ng/μl	Čistota
12	DNeasy [®] mericon Food Kit (QUIAGEN)	7,20	29,73	1,97
	DNeasy [®] Plant Mini Kit (QUIAGEN)	0,10	4,21	1,90
	NucleoSpin [®] Food Kit (Macherey-Nagel)	5,00	14,31	1,84
15	DNeasy [®] mericon Food Kkit (QUIAGEN)	3,60	25,00	2,02
	DNeasy [®] Plant Mini Kit (QUIAGEN)	0,07	8,00	1,74
	NucleoSpin [®] Food Kit (Macherey-Nagel)	24,5	85,66	1,91
8	DNeasy [®] mericon Food kit (QUIAGEN)	8,85	51,4	2,02
	DNeasy [®] Plant Mini Kit (QUIAGEN)	0,03	5,70	1,90
	NucleoSpin [®] Food Kit (Macherey-Nagel)	34,10	69,02	1,96

Ďalej si možno povšimnúť, že meranie koncentrácií vyizolovanej DNA z potravinárskych materiálov bolo prevedené 2 odlišnými prístrojmi, a to pomocou fluorometru a spektrofotometru. Čo sa týka spektrofotometru, tak nukleové kyseliny absorbujú ultrafialové svetlo, preto jednotlivé vyizolované DNA boli merané pri dvoch vlnových dĺžkach, t.j. 260 nm a 280 nm. Pri vlnovej dĺžke 260 nm sa zaznamenáva koľko svetla prejde vzorkou; čím viac svetla sa vzorkou absorbuje, tým vyššia koncentrácia nukleovej kyseliny bude vo vzorke. Avšak pre správne určenie koncentrácie na základe absorbancie je dôležitá čistota nukleovej kyseliny. Tá sa určuje z pomeru absorbancií pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm, pretože proteíny absorbujú svetlo pri vlnovej dĺžke 280 nm. Čistá DNA by mala nadobúdať hodnoty 1,8 až 2,0. Fluorometer funguje na inom princípe ako spektrofotometer. U fluorometru meranie fluorescencie farbiva, ktoré sa viaže na DNA, je citlivejšie a zaznamenáva prítomnosť nižšej koncentrácie DNA, ako je to u spektrofotometra. Preto využitie fluorometra je vhodnejšie na meranie koncentrácie DNA, ktorá má byť použitá k qPCR.

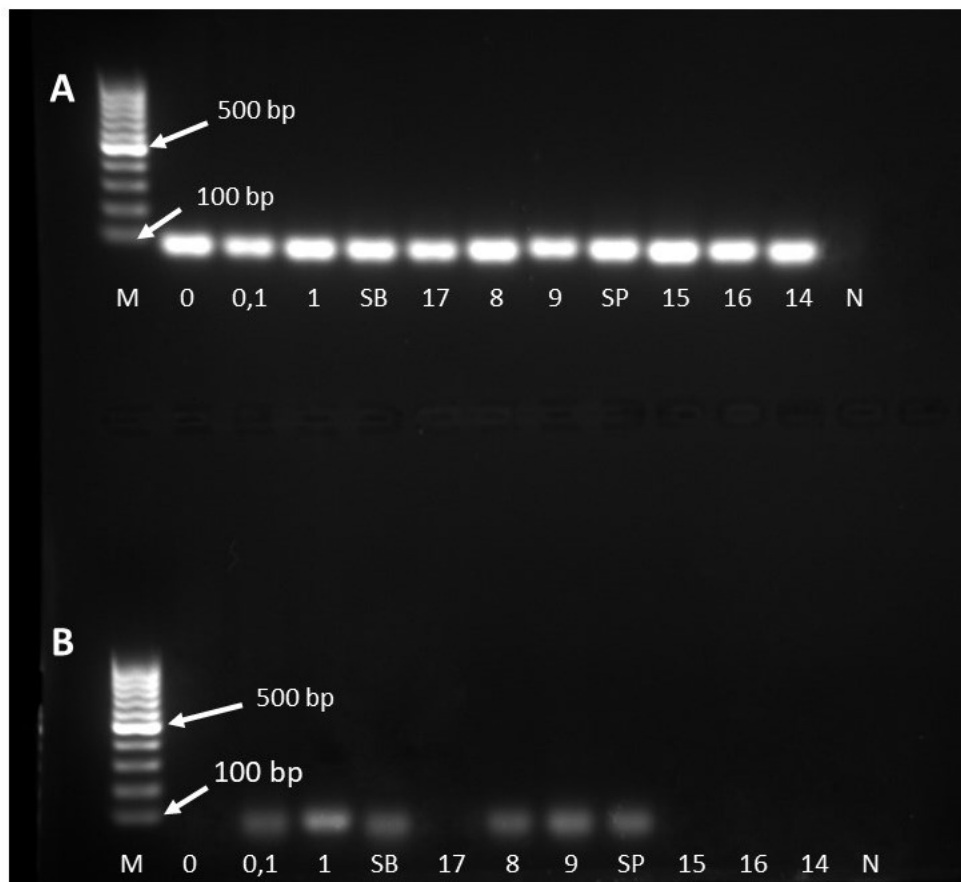
7.2 Prítomnosť GMO v potravinárskych surovinách a potravinách pomocou klasickej PCR

V tejto práci bola vyizolovaná DNA z jednotlivých vzoriek použitá k PCR reakcii, ktorou sa potvrdila prítomnosť geneticky modifikovaných zložiek v surovinách. Pri PCR reakcii boli použité vždy dva páry primerov. Tieto primery sú navrhnuté tak, aby hybridizovali na opačných reťazcoch sledovanej sekvencie a taktiež aby amplifikovali sekvenciu medzi primermi miliónkrát prostredníctvom série opakujúcich sa cyklov. Jeden pár primerov detegoval prítomnosť endogénu, zatiaľ čo druhý pár primerov detegoval prítomnosť transgénu. Amplifikované segmenty boli podrobené elektroforéze na 1% agarózovom gély, aby sa oddelila amplifikovaná DNA podľa určitej veľkosti. Na obrázku 6 možno pozorovať vyhodnotenie elektroforézy na 1% agarózovom gély pre sójové produkty. Prítomnosť geneticky modifikovanej zložky bola zaznamenaná u vzoriek SB, 8, 9 a SP. Takisto si možno povšimnúť intenzitu pásika u štandardov. U štandardu, ktorý obsahuje 0% GM zložky nie je zaznamenaný žiadny band, pretože neobsahuje žiadne percento geneticky modifikovanej zložky. U štandardov 0,1% a 1% sa vyskytujú bandy, čo značí prítomnosť GM zložky.

Na obrázku 7 možno pozorovať vyhodnotenie elektroforézy na 1% agarózovom gély pre kukuričné produkty. Pre túto detekciu boli použité iné sady primerov ako u sójových vzoriek. Prítomnosť GM zložky bola zaznamenaná vo vzorkách KT a 18. Vzorky 11 a 12 neobsahovali geneticky modifikovanú zložku.

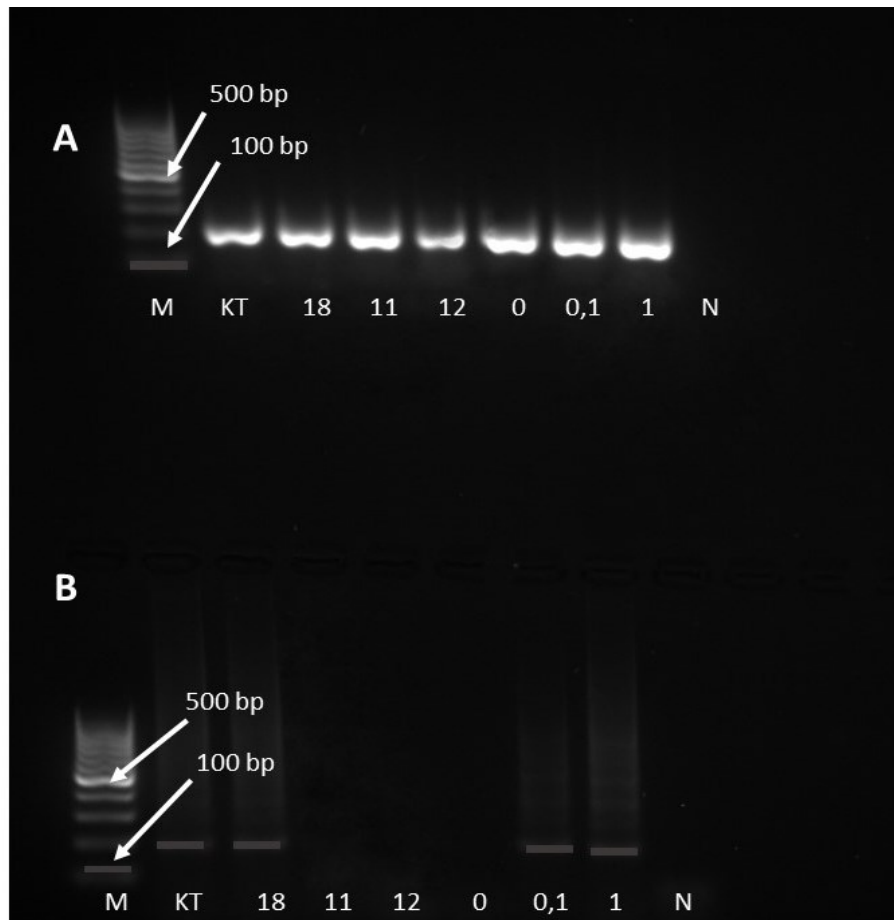
Väčšina v súčasnosti dostupných GMO v EÚ obsahuje ktorýkoľvek z troch genetických prvkov: promótor vírusu mozaiky karfiolu (CaMV) 35S, terminátor nopalínsyntázy (NOS) alebo markerový gén rezistencie na kanamycín (nptII). Tieto prvky sa prirodzene vyskytujú aj v niektorých rastlinách a pôdnych mikroorganizmoch, a preto sa dajú detegovať pomocou PCR, čo vedie k falošne pozitívnym výsledkom. Na potvrdenie pozitívnych výsledkov je možné vykonať PCR reakciu špecifickú pre daný produkt. Takáto reakcia využíva sadu páru primerov, ktoré prekračujú hranice dvoch susedných genetických prvkov (napr. promótor, cieľové gény a terminátory), alebo ktoré sú špecifické na detekciu zmenenej sekvencie cieľového génu (Ahmed, 2002). Keďže metóda detekcie terminátora NOS je menej citlivá a vedie k vyšším falošne negatívnym výsledkom, v tejto práci bola použitá dvojica primerov na detekciu vírusu karfiolovej mozaiky. Takisto možno povedať, že klasická PCR nedosahuje takej vysokej citlivosti ako

qPCR a nemožno ňou určiť presné množstvo GM zložky obsiahnutej v danej surovine. Klasickou metódou sa teda určí iba prítomnosť/neprítomnosť daného transgénu. Po preverení prítomnosti, či neprítomnosti geneticky modifikovanej zložky v surovinách bola následne prevedená qPCR, ktorou sa nie len potvrdila prítomnosť transgénu, ale sa aj určilo množstvo zastúpenej geneticky modifikovanej zložky v týchto vybraných surovinách.



Obrázok 6 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pre sójové vzorky.

A = sada primerov pre endogén (Lec1-Fw + Lec1-Rev); **B** = sada primerov pre transgén (CaMV1 Fw + CaMV1 Rev). M = (100 bp) marker; 0 = 0% štandard; 0,1 = 0,1% štandard; 1 = 1% štandard; N = negatívna kontrola, SB až 14 = potravinárske vzorky a suroviny.



Obrázok 7 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pre kukuričné vzorky.

A = sada primerov pre endogén (IVR-Fw + IVR-Rev); **B** = sada primerov pre transgén (CaMV1 Fw + CaMV1 Rev). M = (100 bp) marker; 0 = 0% štandard; 0,1 = 0,1% štandard; 1 = 1% štandard; N = negatívna kontrola, SB až 14 = potravinárske vzorky a suroviny.

7.3 Prítomnosť GMO v potravinárskych surovinách a potravinách pomocou qPCR a následne určenie množstva GMO

Kvantifikácia GMO potravinárskych vzoriek prebehla pomocou real-time PCR. Pre referenčný gén (endogén) bol sledovaný gén, ktorý sa prirodzene vyskytuje v genóme danej potraviny (pre sójové produkty je to lektínový gén a pre kukuričné produkty je to gén pre invertázu). Čo sa týka sledovaného transgénu, boli použité sady primerov pre špecifickú odrodu GMO plodiny, ako je kukurica Bt11, alebo univerzálna sada primerov pre detekciu vírusu karfiolovej mozaiky. Pre jednoduchšiu orientáciu primerov vid' Tabuľka 10. Pri použití sady primerov MON863-Fw a MON863-Rev nebola potvrdená prítomnosť transgénu pre špecifickú odrodu GMO kukurice MON863.

Tabuľka 10 Primery použité k qPCR pre jednotlivé vzorky

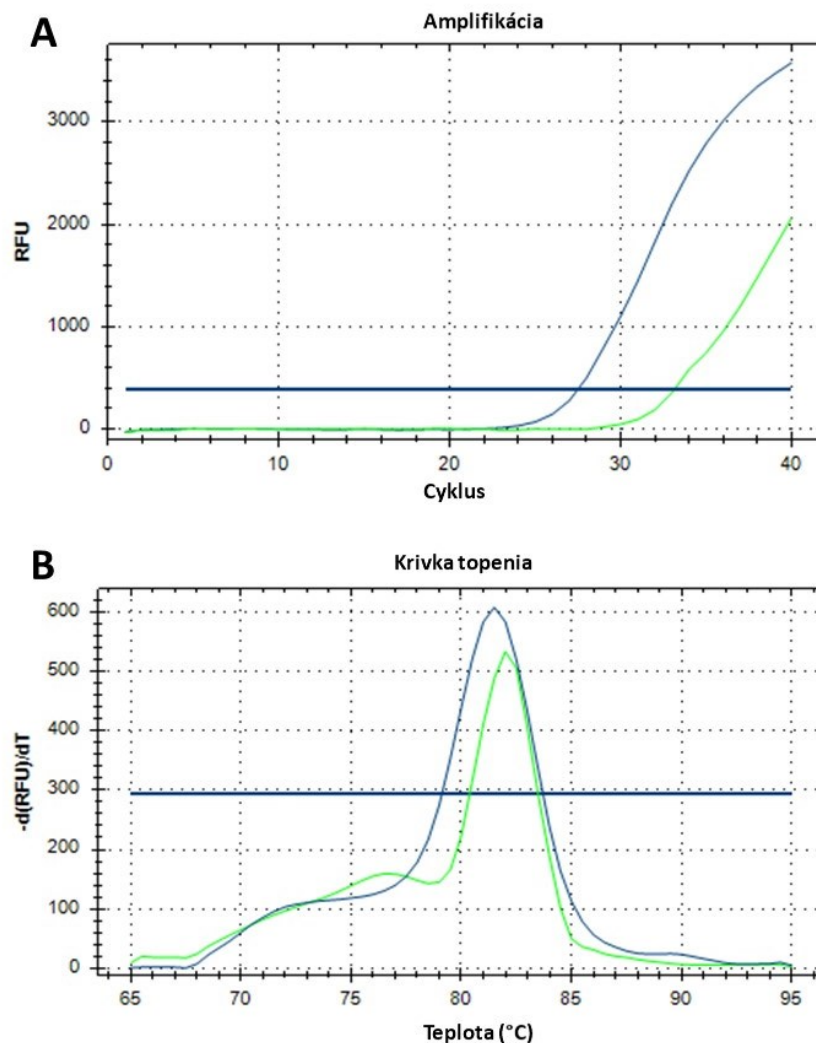
	Sója	Popis	Kukurica	Popis
Endogén	Lec(qPCR)-Fw	Lektínový gén	IVR-Fw	Gén pre invertázu
	Lec(qPCR)-Rev		IVR-Rev	
Transgén	CaMV1Fw	Vírus karfiolovej mozaiky	CaMV1Fw	Vírus karfiolovej mozaiky
	CaMV1Rev		CaMV1Rev	
	IBR-Fw	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom sóje GTS 40-3-2 a hostiteľským genómom sóje	Bt11Fw	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom kukurice Bt11 a hostiteľským genómom kukurice, (transgén)
	IBR-Rev		Bt11Rev	
			MON863-Fw	5 'integračný hraničný región (IBR) medzi inzertom kukurice MON863 a hostiteľským genómom kukurice, (transgén)
			MON863-Rev	

Okrem vyhodnotenia prítomnosti, alebo neprítomnosti daného transgénu v skúmanej vzorke je dôležitá i krivka topenia, ktorá udáva špecifickosť daného produktu. Pokiaľ vzorka obsahuje špecifický produkt, krivka topenia bude obsahovať len jeden pík.

Na obrázku 8 možno pozorovať prítomnosť transgénu, ktorý je označený zelenou amplifikačnou krivkou a prítomnosť endogénu označeného modrou amplifikačnou krivkou u vzorky SB. Jednotlivé reakcie sa hodnotia cyklom (Ct hodnota), v ktorom fluorescencia prvýkrát stúpa nad prahovú hodnotu (modrá vodorovná priamka). Ak je východiskového materiálu veľa, amplifikácia sa pozoruje v skorších cykloch a Ct hodnota je nižšia. Ak je východiskový materiál prítomný v menšom množstve, v neskorších cykloch sa pozoruje amplifikácia a Ct hodnota je vyššia. Takáto korelácia medzi fluorescenciou, Ct hodnotami a množstvom amplifikovaného produktu umožňuje kvantifikáciu templátu (Nolan., 2014). Taktiež u krivky topenia je zreteľné, že daný produkt je špecifický, pretože obsahuje len jeden pík na krivke endogénu (modrou farbou) i na krivke transgénu (zelenou farbou). Možno teda povedať, že vzorka SB obsahovala geneticky modifikovanú zložku. Podobne

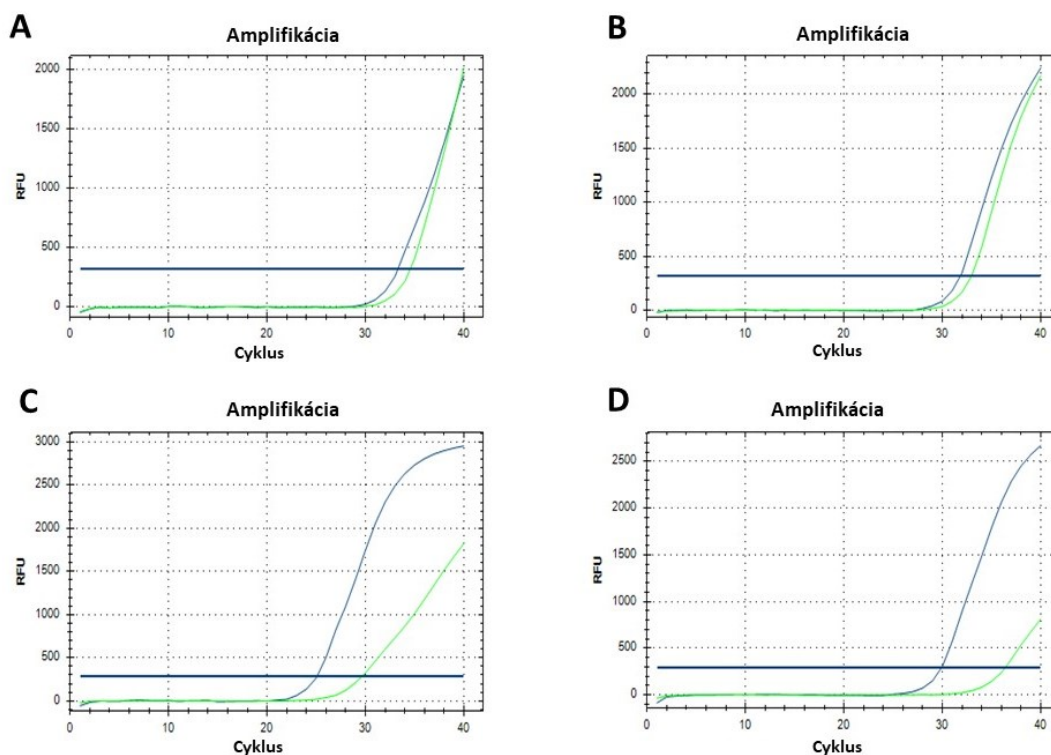
boli vyhodnotené všetky vzorky danou sadou primerov, kde sa u kukuričných vzoriek nepotvrdila prítomnosť MON863 kukurice.

Rovnakým princípom boli vyhodnotené všetky zvyšné vzorky. Na obrázku 9 sú znázornené výstupy real-time PCR záznamov vzoriek (9, 8, 18, KT), u ktorých bola potvrdená prítomnosť transgénu, teda jednalo sa o vzorky s geneticky modifikovanou zložkou.



Obrázok 8 Výstup real-time PCR záznamu pre kvantifikáciu sójovej vzorky SB.

A graf znázorňujúcu amplifikačnú krivku potvrdzujúcu prítomnosť daných génov, **B** graf znázorňujúcu krivku topenia potvrdzujúcu špecifickosť daného produktu. Modrá amplifikačná krivka a krivka topenia = sada primerov Lec(qPCR)-Fw + Lec(qPCR)-Rev (endogén), zelená amplifikačná krivka a krivka topenia = sada primerov IBR-Fw + IBR-Rev (transgén).



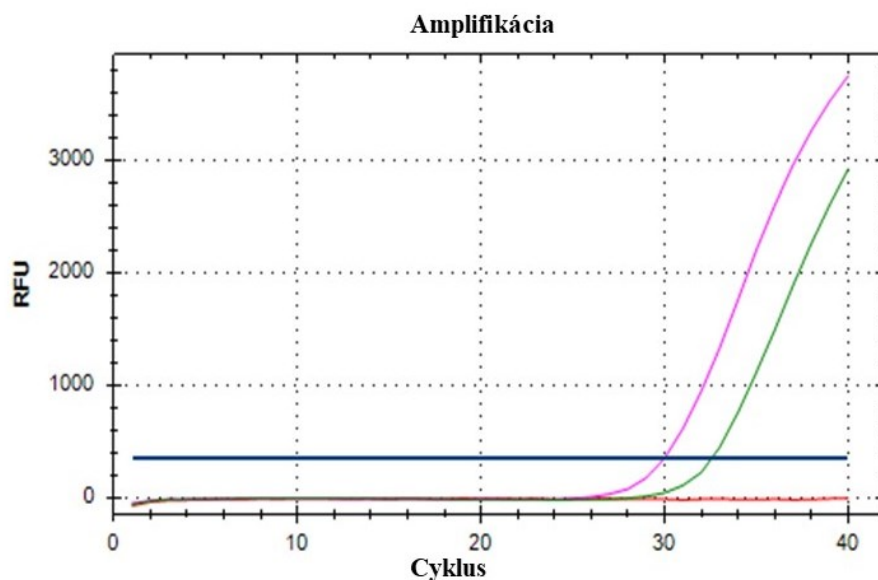
Obrázok 9 Výstup real-time PCR záznamov pre jednotlivé vzorky. **A** záznam vzorky 9 (sójová múka plnotučná toastová), **B** záznam vzorky 8 (sójový proteínový izolát), **C** záznam vzorky 18 (kukuričná múka), **D** záznam vzorky KT (kukuričná tortila). Modrá amplifikačná krivka pre sadu **A** a **B** = sada primerov Lec(qPCR)-Fw + Lec(qPCR)-Rev (endogén), zelená amplifikačná krivka pre sadu **A** a **B** = sada primerov CaMV1Fw + CaMV1Rev (transgén). Modrá amplifikačná krivka pre sadu **C** a **D** = sada primerov IVR-Fw + IVR-Rev (endogén), zelená amplifikačná krivka pre sadu **C** a **D** = sada primerov Bt11Fw + Bt11Rev (transgén).

U vzoriek 17 (sójové kocky), SP (sójový proteín), 14 (sójovo-kokosová tyčinka), 15 (sójové rezy), 16 (sójové rezy), 11 (kukuričné plátky) a 12 (kukuričné plátky) nebola zaznamenaná prítomnosť geneticky modifikovanej zložky, teda nejednalo sa o GMO suroviny. Problémom môže byť nesprávne použitie metódy. Štefaničová et al. (2002) vo svojej práci poukázali, že pri detekcii kukurice Bt 176 pomocou duplex PCR získali nešpecifické produkty a výsledky neboli jednoznačné, zatiaľ čo pri použití klasickej PCR boli výsledky jednoznačné. Ďalším problémom môže byť izolácia DNA z polotovarov. Práve vzorky 11, 12, 14, 15 a 16 boli pomerne zložité k izolácii DNA, čo viedlo k nízkemu

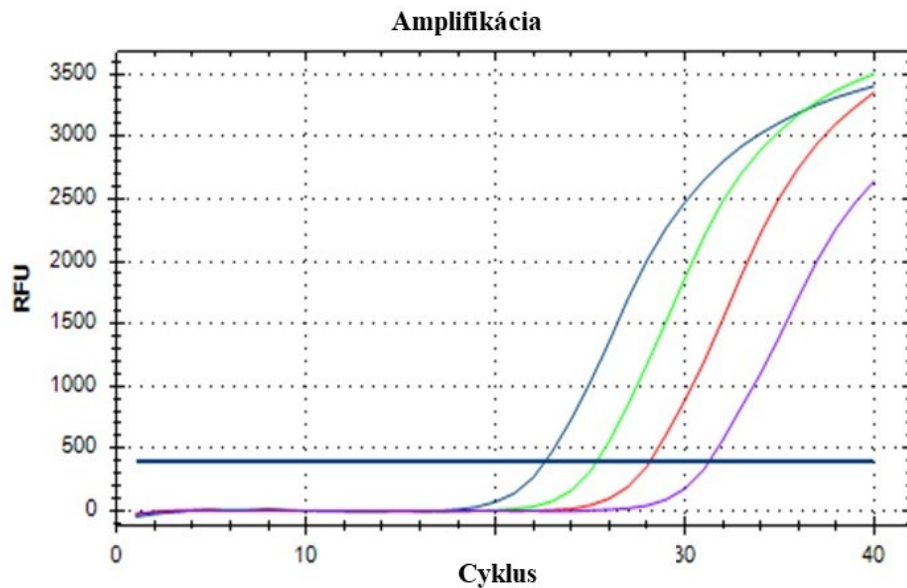
obsahu a väčšiemu znečisteniu DNA. Takáto DNA následne nie je postačujúca k detekcii pomocou PCR metódy.

K výpočtu presnej koncentrácie GMO v surovine je nutné i použitie štandardov. V tejto práci boli použité ako kukuričné, tak i sójové štandardy. Prítomnosť transgénu bola overená nie len klasickou PCR, ale aj real-time PCR (Obrázok 10). Je zrejmé, že prítomnosť transgénu 0% štandardu nie je detegovaná, pretože tento štandard neobsahuje žiadnu geneticky modifikovanú zložku. Amplifikáciu 1% štandardu možno očakávať skôr, pretože oproti 0,1% štandardu obsahuje väčšie množstvo GM zložky, teda Ct hodnota bude nižšia.

Dôležité sú i riedenia štandardov a vzoriek. Získané Ct hodnoty jednotlivých riedení následne slúžili k výpočtom presného množstva GM zložky v danej vzorke. So stúpajúcim nariedením DNA je možné pozorovať, že prítomnosť transgénu je detegovaná až v neskoršom cykle (Obrázok 11). Na presné určenie obsahu geneticky modifikovanej zložky bola prevedená absolútna kvantifikácia.



Obrázok 10 Výstup real-time PCR záznamu pre detekciu transgénu u štandardov. Červená amplifikačná krivka = 0% štandard, zelená amplifikačná krivka = 0,1% štandard, ružová amplifikačná krivka = 1% štandard.



Obrázok 11 Výstup real-time PCR záznamu pre nariedený 1% štandard. Modrá amplifikačná krivka = neriedený, zelená amplifikačná krivka = 10x riedený, červená amplifikačná krivka = 100x riedený, fialová amplifikačná krivka = 1000x riedený.

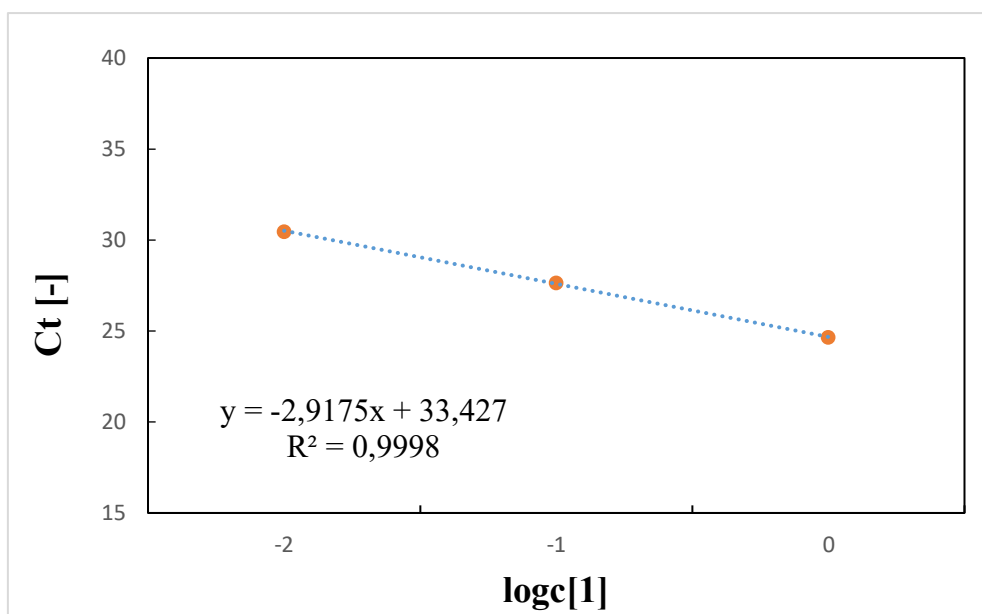
7.3.1 Určenie presného množstva GMO v potravinárskych surovinách a potravinách pomocou absolútnej kvantifikácie

Pre výpočet presného množstva GMO v danej vzorke je nutné vzorky amplifikovať so sériou štandardov pri riedeniach 0x, 10x, 100x, celkovo v dvoch opakovaníach, teda v duplikátoch. Medzi jednotlivými duplikátmi musí byť nízka štandardná odchýlka. Ak by táto odchýlka bola vysoká, značilo by to nepresné pipetovanie, či prítomnosť inhibítorov. Z výstupu real-time PCR reakcie boli následne získané hodnoty C_t pre každú vzorku vrátane štandardov (ako endogén, tak transgén) a následne bola vypočítaná hodnota ΔC_t , kde C_t hodnota endogénu bola odčítaná od C_t hodnoty transgénu (tabuľka 11).

Výpočet C_t hodnôt je takisto dôležitý k výpočtu efektivity PCR reakcie. Efektivita, alebo účinnosť testu, sa stanoví zmeraním gradientu štandardnej krivky, ktorá je grafom log cieľovej koncentrácie oproti priemerných C_t hodnôt (Obrázok 12).

Tabuľka 11 Ukážka výpočtu Ct hodnôt pre výpočet efektivity a presného množstva GMO vo vzorke.

Vzorka SB, endogén, primery Lec(qPCR)-Fw + Lec(qPCR)-Rev				
Ct hodnoty v dvoch opakovaniach	Riedenie	Priemer Ct hodnôt z dvoch opakovaní	ΔCt	logc
24,65	0	24,65	7,34	0
24,65	0			
27,48	0,1	27,64	5,64	-1
27,80	0,1			
30,47	0,01	30,49	4,83	-2
30,50	0,01			



Obrázok 12 Graf znázorňujúci závislosť logc od priemernej Ct hodnoty, efektivity PCR reakcie pre vzorku SB.

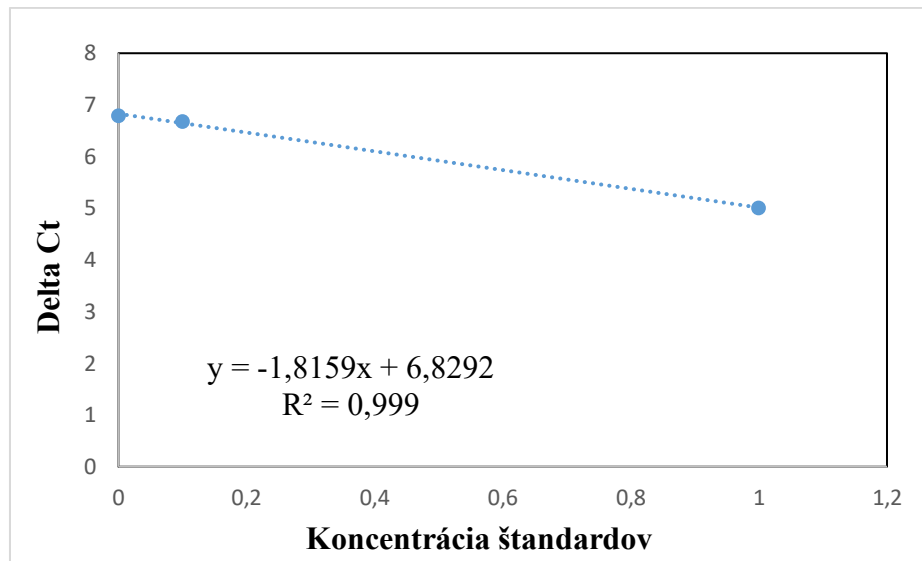
Hodnota R^2 , alebo ako dobre údaje zapadajú na priamku štandardnej krivky, je mierou reprodukovateľnosti a je ovplyvnená presnosťou pipetovania a dynamickým rozsahom testu. Ak je $R^2 < 0,855$, test nemusí dať spoľahlivé výsledky, pretože reprodukovateľnosť medzi replikáciami je nízka. Môžu celkovo nastať 3 prípady: ak sa jeden alebo viac bodov na najnižších úrovniach vstupnej nukleovej kyseliny posunie preč od lineárnej oblasti grafu, je pravdepodobné, že nameraná koncentrácia presiahne citlivosť testu. Ďalší prípad

môže nastať, ak sa jeden alebo viac bodov na najvyššom počte kópií vstupnej nukleovej kyseliny posunie preč od lineárnej oblasti grafu, vtedy je pravdepodobné, že reakcia je nasýtená a že koncentrácia presahuje užitočné rozmedzie testu. Posledný prípad môže nastať, ak je niekoľko alebo viac náhodných bodov nad alebo pod čiarou, čo znamená, že problémom je pipetovacia presnosť alebo optimalizácia testu (Nolan, 2014). Keďže u vzorky SB bolo $R^2 = 0,9998$, možno teda povedať, že test je spoľahlivý a efektivita reakcie je 99,98%. Ďalším spôsobom určenia efektivity je zo smernice. Získané hodnoty parametrov z kalibračnej krivky boli vypočítané a porovnané s optimálnymi hodnotami parametrov, ktoré sú uvedené v tabuľke 12.

Ak je účinnosť 100%, hodnoty C_t 10-násobného riedenia budú od seba vzdialené 3,3 cyklu (pri každej zmene C_t dôjde k dvojnásobnej zmene). Ak je sklon pod -3,6, potom má PCR slabú účinnosť. Nadpriemerná efektivita je pri hodnotách sklonu vyšších než je -3,3 ako to je v tomto prípade. Hlavným dôvodom nadmernej efektivity je inhibícia polymerázy. Inhibítory polymerázy obsahujú nadmerné množstvo DNA alebo prenášaný materiál vo vzorke. Bežné kontaminanty obsahujú napríklad polysacharidy, chlorofyly, proteinázu K, octan sodný, ale i látky použité pri izolácii DNA, ako sú etanol, fenol a SDS. Je pravdepodobnejšie, že k inhibícii dôjde u koncentrovanejších vzoriek, a preto jedným zo spôsobov, ako zlepšiť sklon krivky, je zriedenie vzorky. Avšak vyššie riedenia spôsobia nižšie koncentrácie DNA, preto nie je vhodné zahrnúť do kvantifikačnej štúdie veľmi koncentrované alebo veľmi zriedené vzorky. Medzi ďalšie príčiny vzniku nadpriemernej efektivity možno zaradiť chyby pri pipetovaní, nepresné série riedení, prítomnosť nešpecifických produktov a dimérov primerov a iné (Čepin, 2017). Takýmto spôsobom bola vyhodnotená efektivita u všetkých vzoriek.

Tabuľka 12 Výpočet efektivity zo smernice u vzorky SB

Parametre kalibračnej krivky	Optimálne hodnoty parametrov	Vypočítané hodnoty u vzorky SB
Sklon priamky (M)	-3,9 až -3,0	-2,9175
Reakčná účinnosť (<i>r. e.</i>)	± 0,99	1,20
Korelačný koeficient (R^2)	80 až 110%	99,98%



Obrázok 13 Kalibračná krivka zo závislosti ΔCt hodnôt na zlogaritmovanej koncentrácii štandardov pre vzorku SB.

Presné množstvo geneticky modifikovanej zložky vo vzorke bolo vyrátané z kalibračnej krivky pomocou lineárnej regresie, kde kalibračná priamka bola zhotovená zo závislosti ΔCt hodnôt 0%; 0,1% a 1% štandardov na zlogaritmovanej koncentrácii štandardov (obrázok 13). Pre vzorku SB bolo následne vyrátané množstvo GM zložky na hodnotu 0,66%. Pomocou tejto lineárnej regresie boli vypočítané presné množstva GM zložky vo vzorkách, ktoré sú uvedené v tabuľke 13.

U vzoriek, u ktorých nebola potvrdená prítomnosť transgénu pomocou real-time PCR nebola vyrátaná koncentrácia GM zložky, teda vzorky 17, 15, 16, 11 a 12 neobsahovali GMO. Podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 zo dňa 22. Septembra 2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách sa potraviny, ktoré obsahujú GMO, pozostávajú z nich alebo sú z nich vyrobené a podiel v jednotlivých zložkách alebo v jednozložkovej potrave nepresahuje obsah vyšší než 0,9% sa nemusia značiť ako "geneticky modifikovaný/á/é" alebo "vyrobený/á/é z geneticky modifikovaného/ej (názov zložky)". Na základe výsledkov možno teda povedať, že ani u jednej vzorky nebola detegovaná hodnota GMO vyššia než 0,9%, teda vzorky neboli sfalšované.

Tabuľka 13 Vypočítané množstvá GM zložky v jednotlivých vzorkách.

Vzorka	Vypočítaná koncentrácia GM zložky vo vzorke (%)
8	0,61
9	0,065
SB	0,66
18	0,71
KT	0,82

V práci Kyrova et al., (2018) boli monitorované geneticky modifikované potraviny, ktoré sa vyskytujú na trhu v Českej republike. Medzi hlavné transgénne plodiny, ktoré sa pestujú po celom svete patrí kukurica, sója a ryža. Na detekciu takýchto GM plodín bola takisto použitá metóda PCR, kde bolo sledovaných 1 152 vzoriek. Ako uvádza práca Kyrova et al., (2018), z 1 152 vzoriek bolo detekovaných 107 vzoriek obsahujúcich GMO, kde najviac GMO bolo zastúpených v kukuričnej múke a to až 63 vzoriek. Čo sa týka samotnej línie, boli zaznamenané kukuričné línie MON810, NK603 a Bt176. Medzi druhú najviac zastúpenú geneticky modifikovanú plodinu patrí ryža, kde z 1 152 vzoriek bola detegovaná u 39 vzoriek. Je zaujímavé, že v jednej vzorke ryže bola zistená nepovolená ryža línie Bt63. Sója Roundup Ready bola detegovaná v 4 vzorkách sójových bôbov a v jednej vzorke sójového produktu (Kyrova et al., 2018). Aj keď v tejto diplomovej práci neprebíhala detekcia geneticky modifikovanej ryže, možno tieto výsledky porovnať s prácou Kyrova et al., (2018), keďže v tejto diplomovej práci bol zaznamenaný najvyšší obsah GMO v kukuričných produktoch (kukuričná múka a kukuričné tortily) oproti sójovým produktom.

Prítomnosť GMO v potravinárskych produktoch bola detegovaná i v iných krajinách. Napríklad v Chorvátsku bola zaznamenaná prítomnosť GMO v 139 vzorkách z 2 797 vzoriek, kde najviac GMO sa vyskytovalo v zmesi korenín a v surovinách zložených zo sójových bôbov, ktoré slúžili na ďalšie spracovanie v potravinárskom priemysle (pekársky priemysel, mäso priemysel) (Cattunar et al., 2011). V Srbsku prebehla štúdia GMO v neoznačených vegetariánskych potravinách a v potravinách určených pre zdravú výživu. Základnými surovinami v testovaných vzorkách bola kukurica, sója a/alebo ryža. Celkovo bolo analýze podrobených 100 vzoriek, kde promótor 35S bol detegovaný v 8 vzorkách. Žiadna vzorka neobsahovala geneticky modifikovanú kukuricu a geneticky

modifikovanú ryžu (Zdjelar et al., 2013). V krajinách, ako je Tunisko, nie sú vytvorené právne predpisy týkajúce sa značenia a pestovania geneticky modifikovaných plodín. Na tomto trhu bolo detekcii GMO podrobených 365 vzoriek, z ktorých 7 bolo potvrdených s pozitívnym výskytom GMO (Chaouachi et al., 2013).

V tejto práci prebehla izolácia DNA pomocou 7 komerčne dodaných kitov a pomocou CTAB metódy. Jednotlivé metódy izolácie DNA boli optimalizované zo zisku čo najčistejšej DNA s najvyššou koncentráciou. Koncentrácia vyizolovanej DNA bola premeraná spektrofotometricky a fluorometricky. Následne vyizolovaná DNA bola podrobená klasickej i real-time PCR, kde bola detegovaná prítomnosť GMO. Pomocou tejto práce možno potvrdiť, že jednotlivé postupy k detekcii GMO v potravinárskych produktoch boli optimalizované, a preto ich možno využiť aj v budúcnosti v laboratórnych cvičeniach na univerzite Tomáša Bati v Zlíne.

Ako si možno povšimnúť, potraviny na českom a svetovom trhu obsahujú povolené i nepovolené geneticky modifikované potraviny. Spotrebitelia teda majú na výber širokú škálu potravín, ktoré obsahujú geneticky modifikované organizmy a geneticky nemodifikované organizmy. Preto by mali byť ďalšie štúdie GMO zamerané nie len na detekciu prítomnosti geneticky modifikovaných plodín, ako je kukurica a sója v potravinárskych produktoch, ale aj na prítomnosť iných GMO, ako je napríklad geneticky modifikovaná papája, či geneticky modifikované oleje a iné.

ZÁVER

Teoretická časť diplomovej práce bola zameraná na geneticky modifikované organizmy, ich prípravu, charakterizáciu, vlastnosti a legislatívne predpisy. Takisto bola zameraná na potraviny a potravinárske suroviny s podielom GMO. V dnešnej dobe existuje široká škála geneticky upravených organizmov, ktoré sa využívajú na pestovanie, či spracovanie do potravinárskych produktov. Medzi najpoužívanejšie GMO plodiny, možno zaradiť sóju a kukuricu. Posledná kapitola teoretickej časti tejto diplomovej práce je zameraná na metódy k detekcii GMO. Najpoužívanejšou metódou detekcie GMO je metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá je založená na detekcii nukleových kyselín. Okrem tejto metódy môžu byť k detekcii GMO využité i imunometódy a alternatívne metódy, medzi ktoré patrí chromatografia a NIR.

Praktická časť diplomovej práce bola zameraná na:

- optimalizácii biologicko-molekulárnych metód k detekcii GMO,
- stanovení prítomnosti GMO vo vzorkách a následnom vyhodnotení.

K detekcii GMO bolo podrobených celkovo 12 vzoriek, jednalo sa o sójové a kukuričné produkty. Pomocou kombinácie primerov bola potvrdená prítomnosť prirodzene sa vyskytujúceho génu (endogén) a prítomnosť vloženého génu (transgén). Klasická PCR bola vyhodnotená elektroforézou na 1 % agarózovom gély, kde bola potvrdená prítomnosť endogén u všetkých vzoriek a prítomnosť transgénu u vzoriek KT, 18, SB, SP, 9, 8. Na vyhodnotenie real-time PCR nie je potrebná elektroforéza, pretože táto metóda meria množstvo DNA PCR produktu po každom cykle, teda v reálnom čase. Prítomnosť transgénu bola detegovaná u vzoriek KT, 18, SB, 9 a 8. Rozdiely vo výsledkoch môžu byť spôsobené prítomnosťou kontaminantov DNA, či prostredím a prácou pri pipetovaní. Pomocou absolútnej kvantifikácie bolo nakoniec vyrátané presné množstvo GMO u vzoriek, u ktorých bola potvrdená prítomnosť transgénu. Najvyššiu koncentráciu GM zložky bola detegovaná u vzorky KT a to až 0,82 %. Najnižšia koncentrácia bola zaznamenaná u vzorky 9, a to 0,065%. Žiadna vzorka nepresiahla legislatívne danú hodnotu 0,9 %, teda vzorky neboli sfalšované. Pomocou tejto práce bola zavedená metodika analýzy GMO pomocou qPCR v laboratóriu molekulárnej biológie ÚIOŽP.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Ahmed F. E. (2002): Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 20(5), 215–223.

Akada R. (2002): Genetically modified industrial yeast ready for application. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(6), 536–544.

Akada R., Shimizu Y., Matsushita Y., Kawahata M., Hoshida H., Nishizawa Y. (2002): Use of a YAP 1 overexpression cassette conferring specific resistance to cerulenin and cycloheximide as an efficient selectable marker in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 17–28.

Alishahi A., Farahmand H., Prieto N., Cozzolino D. (2010): Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75(1), 1–7.

Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van Den Eede G. (2002): Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology* 214(1), 3–26.

Baneyx F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10(5), 411–421.

Beneš K. (2007): Biofarmaceutika (Bioléčiva). *Chemické listy* 101, 18–24.

Bruening G, Lyons J. (2000): The case of the FLAVR SAVR tomato. *Calif Agr* 54(4), 6–7.

Brunnert H. J., Spener F., Borchers T. (2001): PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. *European Food Research and Technology* 213(4-5), 366–371.

Byrdwell W. C., Neff W. E. (1996): Analysis of genetically modified Canola Varieties by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric and Flame Ionization Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 19, 2203–2225.

Campbell M. R., Sykes J., Glover D.V. (2000): Classification of single and double-mutant corn endosperm genotypes by near-infrared transmittance spectroscopy. *Cereal Chemistry* 77, 774–778.

Cattunar A., Capak K., Novak J.Z., Micovic V., Doko-Jelinic J. Malatestinic, D. (2011): Monitoring the presence of genetically modified food on the market of the Republic of Croatia. *Coll. Antropol.* 35, 1231–1236.

Cottenet G., Blancpain C., Sonnard V., Chuah P. F. (2019): Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. *Food Chemistry* 274, 760–765.

Čepin U., *Understanding qPCR Efficiency and Why It Can Exceed 100 %* [online]. 2017 [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>

Devlin R.H., Sundström L.F., Leggatt R.A. (2015): Assessing ecological and evolutionary consequences of growth-accelerated genetically engineered fishes. *Bio Science* 65, 685–700.

Devos Y., Demont M., Dillen K., Reheul D., Kaiser M., Sanvido O. (2009): Coexistence of genetically modified and Non-GM crops in the European Union: a review. *Sustain. Agric.* 29, 11–30.

Dries L., Heijman W., Jongeneel R., Purnhagen K., Wesseler J. (Eds.). (2019): EU Bioeconomy Economics and Policies: Volume II. Palgrave Advances in Bioeconomy: Economics and Policies. doi:10.1007/978-3-030-28642-2

Figge J., Wright C., Collins C. J., Roberts T. M., Livingston D. M. (1988): Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli* lac repressor in monkey cells. *Cell* 52, 713–722.

Gonsalves D., Ferreira S., Manshardt R., Fitch M., Slightom J. (2000): Transgenic virus resistant papaya: new hope for controlling papaya ringspot virus in Hawaii, APSnet [cit. 2011-03-17] Dostupné z: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Papaya.aspx>

Grohmann E., Muth G., Espinosa M. (2003): Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(2), 277–301.

Han L., (2004): Genetically Modified Microorganisms. *The GMO Handbook* 29–51.

Hazebroek J. (2000). Analysis of genetically modified oils. *Progress in Lipid Research* 39(6), 477–506.

Holst-Jensen A., Rønning S. B., Løvseth A., Berdal K. G. (2003): PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375(8).

Hübner P., Waiblinger H.U., Pietsch K., Brodmann P. (2001): Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. *Journal AOAC Int.* 84, 1855–1864.

Chaouachi M., Nabi N., Hafsa A.B., Zellama M.S., Skhiri F., Said K. (2013): Monitoring of genetically modified food and feed in the Tunisian market using qualitative and quantitative real-time PCR. *Food Sci. Biotechnol.* 22, 1161–1170.

Choudhary B., Gaur K. (2009): The Development and Regulation of Bt Brinjal in India (Eggplant/Aubergine). ISAAA Brief No.38. ISAAA: Ithaca, NY. [cit. 2020-03-17] Dostupné z: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/38/download/isaaa-brief-38-2009.pdf>

ISAAA (2012): GM Approval Database [online]. ISAAA , 2012 [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=227&Event=55-1>

ISAAA (2016): Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA (2019): GM Approval Database [online]. ISAAA , 201 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=528>

Karcher S. J., Gelvin S. B. (2011): Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene for the undergraduate biology curriculum. [cit. 2011-03-09] Dostupné z: <http://www.bio.purdue.edu/people/faculty/karcher/blue2000/blue.html>

Klümper W., Qaim M. (2014): A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS ONE* 9, 11.

Kyrova V., Ostry V., Surmanova P., Ruprich J. (2018): Monitoring of genetically modified food on the Czech food market and a cross-country comparison. *Acta Alimentaria* 47(1), 10–16.

Lorenz M. G., Wackernagel W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563–602.

Matsushima P., Broughton M. C., Turner J. R., Baltz R. H. (1994): Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* 146, 39–45.

Menozzi D., Mora C., Merigo A. (2013): Genetically modified salmon for dinner? Transgenic salmon marketing scenarios. *Ag Bioforum* 15, 276–293.

Munck L., Pram Nielsen J., Møller B., Jacobsen S., Søndergaard I., Engelsen S. B., Nørgaard L., Bro R. (2001): Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics, *Analytica Chimica Acta* 446, 171–186.

Nakamura K., Ishigaki T., Kobayashi T., Kimata S., Soga K., Fujii U. Kishine M., Takabatake R., Manoc J., Kittac K., Kawakamib H., Nishimaki-Mogami T., Kondo K. (2018): Identification of chickpea (*Cicer arietinum*) in foods using a novel real-time polymerase chain reaction detection method. *Journal of Food Composition and Analysis* 71, 8–16.

Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 zo dňa 22. Septembra 2003 o Geneticky modifikovaných potravinách a krmivách.

Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1946/2003 z 15. júla 2003 o cezhraničnom pohybe geneticky modifikovaných organizmov.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982): Gene transfer in to mouselyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO* 1. 1, 841–845.

Nolan T., *A Technical Guide: PCR TECHNOLOGIES* [online]. Sigma-Aldrich Co., 2014 [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/pcr-technologies-guide.pdf

Prescott V. E., Campbell P. M., Moore A., Mattes J., Rothenberg M. E., Foster P. S., Higgins T. J. V., Hogan S. P. (2005): Transgenic Expression of Bean α -Amylase Inhibitor in Peas Results in Altered Structure and Immuno genicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(23), 9023–9030.

Querci M., Van den Bulck, M., Žel J., Van den Eede G., Broll H. (2009): New approaches in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(6), 1991–2002.

Ramessar K., Capell T., Twyman R. M., Christou P. (2010): Going to ridiculous lengths–European coexistence regulations for GM crops. *Nat. Biotechnol.* 28(2), 133–136.

Rao R. N., Richardson M. A., Kuhstoss S. (1987): Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* 153, 166–198.

Register J. C. (1997): Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. *Trends in Biotechnology* 15(4), 141–146.

Renault P. (2002): Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie* 84, 1073-1087.

Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 245(2), 154–160.

Robinson C. (2001): Genetic modification technology and food – Consumer health and safety. ILSI Europe Concise monographs, Belgium: International Life Science Institute, 45 s. ISBN 1-57881-125-2.

Řepková J. Genetika rostlin: [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013, 189 s. [cit. 2020-03-10]. ISBN 978-80-210-6408-9. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/skripta/genetika_rostlin_skripta.pdf

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839).

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (eds.) (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sambrook J., Russel D. (2000): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edn), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sosio M., Guisino F., Cappellano c., Bossi E., Puglia A. M., Donadio S. (2000): Artificial chromosomes for antibiotic-producing actinomycetes. *Nat. Biotechnol.* 18, 343–345.

Štefaničová A., Kuchta T., Siekel P. (2002): Dôkaz geneticky modifikovanej kukurice v potravinách polymerázovou reťazovou reakciou, *Bulletin potravinárskeho výskumu* 41, 31–40.

Tauferová A., M. Petrášová, J. Pokorná, B. Tremlová a P. Bartl. (2014): *Rostlinná produkce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 140 s. ISBN 978-80-7305-717-6. Dostupné tiež z: <https://fvhe.vfu.cz/files/roslinna-produkce.pdf>

Trachtová Š., Kaman O., Španová A., Veverka P., Pollert E., Rittich B. (2011): Silica-coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science* 34(21), 3077–3082.

von Wright A., Sibakov M. (1993): Genetic modification of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria* (Salminen, S. and von Wright, A., eds.). Marcel Dekker, New York, NY, pp. 161-198.

Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., DuJardin P. (1996): Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115, 205–206.

Vyhlášky č. 89/2006 Sb. O bližších podmienkach pestovania geneticky modifikovanej odrody.

Wieczorek A. M., Wright M. G. (2012): History of Agricultural Biotechnology: How Crop Development has Evolved. *Nature Education Knowledge* 3(10), 9.

Zákon č. 78/2004 Sb. Zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

Zdeňková K., Pazlarová J., Macková M., Demnerová K. (2002): Přehled metod detekce geneticky modifikovaných organismů v potravinách a potravinářských surovinách. *Chemické listy* 96, 25–32.

Zdjelar G., Nikolic Z., Vasiljevic I., Bajic B., Jovicic D., Ignjatov M., Milosevic D. (2013): Detection of genetically modified soya, maize, and rice in vegetarian and healthy food products in Serbia. *Czech J. Food Sci.* 31, 43–48.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

bp	páry báz
CTAB	cetyltrimetylamoniumbromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linkedimmunosorbentassay
GM	geneticky modifikovný/á/é
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
KT	kukurličné tortily
PCR	polymerázová reťazová reakcia
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
SB	sójové bôby
SDS	dodecylsírán sodný
SP	sójový proteín
TAE	tris-acetát-EDTA
ÚIOŽP	Ústav inžinierstva ochrany životného prostredia

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Prenos DNA do rastlinných buniek a následný vznik transgénnej rastliny pomocou baktérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	13
Obrázok 2 Operačné postupy na zisťovanie, identifikáciu a kvantifikáciu geneticky modifikovaných organizmov v súlade s nariadením o označovaní v Európskej únii.	28
Obrázok 3 Znáročenie priebehu PCR reakcie.	31
Obrázok 4 Znáročenie jednotlivých fáz priebehu qPCR reakcie.	32
Obrázok 5 Analýza kriviek topenia vo dvoch vzorkách.	58
Obrázok 6 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pre sójové vzorky.	63
Obrázok 7 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pre kukuričné vzorky.	64
Obrázok 8 Výstup real-time PCR záznamu pre kvantifikáciu sójovej vzorky SB.	66
Obrázok 9 Výstup real-time PCR záznamov pre jednotlivé vzorky.	67
Obrázok 10 Výstup real-time PCR záznamu pre detekciu transgénu u štandardov.	68
Obrázok 11 Výstup real-time PCR záznamu pre nariadený 1% štandard.	69
Obrázok 12 Graf znázorňujúci závislosť log ₁₀ od priemernej Ct hodnoty, efektivita PCR reakcie pre vzorku SB.	70
Obrázok 13 Kalibračná krivka zo závislosti ΔC_t hodnôt na zlogaritmovanej koncentrácii štandardov pre vzorku SB.	72

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Potravinárske materiály a ich označenie	37
Tabuľka 2 Primery použité k PCR reakciám.....	53
Tabuľka 3 Reakčná zmes použitá pre klasickú PCR.....	54
Tabuľka 4 Nastavenie cykléru pre priebeh klasickej PCR reakcie.....	55
Tabuľka 5 Reakčná zmes použitá pre PCR v reálnom čase	56
Tabuľka 6 Podmienky reakciepre priebeh PCR v reálnom čase	56
Tabuľka 7 Popis optimálnych parametrov charakterizujúcich kalibračnú priamku	57
Tabuľka 8 Nameraná koncentrácia a čistota u vzorky 12(kukuričné plátky) za použitia rozličných metód izolácie DNA	59
Tabuľka 9 Zobrazenie koncentracii a čistoty vzoriek 12 (kukuričné plátky), 15 (sójové rezy) a 8 (sójový izolát) za použitia troch vzorovo vybraných kitoch slúžiacich k izolácii DNA zo vzoriek.....	61
Tabuľka 10 Primery použité k qPCR pre jednotlivé vzorky	65
Tabuľka 11 Ukážka výpočtu Ct hodnôt pre výpočet efektivity a presného množstva GMO vo vzorke.	70
Tabuľka 12 Výpočet efektivity zo smernice u vzorky SB	71
Tabuľka 13 Vypočítané množstvá GM zložky v jednotlivých vzorkách.....	73