

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

**2008**

**ČERMÁKOVÁ JITKA**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Zemědělská fakulta**  
katedra rostlinné výroby

---



**Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství**  
**Studijní obor: Rostlinné biotechnologie**

**Vývoj a optimalizace metodiky pro detekci GMO brambor**

**Jitka Čermáková**

Vedoucí diplomové práce: **Doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**České Budějovice**

---

**2008**

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**Zemědělská fakulta**  
**Katedra rostlinné výroby**  
**Akademický rok: 2006/2007**

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka ČERMÁKOVÁ**

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**

Název tématu: **Vývoj a optimalizace metodiky pro detekci GMO brambor**

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

Úvod: Stručný nástin významu tématu a cíl práce.

Cílem práce bude vytvoření a ověření metodiky pro PCR-based detekci transgenů u brambor. Bude sledován vliv metody izolace DNA, vliv rostlinné tkáně a ontogenetického stavu na výsledky a opakovatelnost detekce.

Literární přehled: zhodnocení významu molekulárních markerů, technik genetické analýzy pro detekci specifických genů, zhodnocení , přínos a perspektivy pěstování transgenních plodin

Materiál a metody: popis metodiky PCR analýzy, charakteristika studovaných klonů

Výsledky: vyhodnocení primárních elektroforetických dat, uspořádání do tabulek a grafů, databáze spekter

Diskuse: porovnání vlastních výsledků s literárními údaji , posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

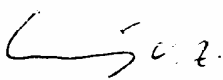
Rozsah grafických prací: fingerprinty, databáze spekter, grafy  
a tabulky  
Rozsah pracovní zprávy: 30-40 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G.: DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, Boca Raton: CRC Press, 2005  
Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley & Sons, Inc., New York.  
Gene Flow from GM Plants, Blackwell 2005  
Metodiky EU - GMO

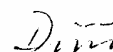
Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Katedra rostlinné výroby  
Datum zadání diplomové práce: 10. ledna 2007  
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2008

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Martin Křížek, CSc.  
děkan

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.  
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 20. února 2007

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně na základě vlastních experimentálních výsledků a s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 28.dubna 2008

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné rady, návrhy a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce a Ing. Aleně Novákové za pomoc při experimentální práci a zpracování výsledků této práce.

## ANOTACE

Geneticky modifikované (GM) nebo transgenní plodiny, dnes často označované jako „Biotech plodiny“ jsou komerčně pěstovány od roku 1996. Zároveň od tohoto roku jsou komerčně pěstovány i GM brambory v USA, Mexiku, Kanadě a později v Jižní Africe, Číně a Indii. V roce 2006 byla celková plocha schválených Biotech plodin 102 milionů hektarů a Biotech plodiny byly pěstovány ve dvaadvaceti státech, jedenáct z nich bylo průmyslových a jedenáct rozvojových. Česká republika je jednou ze šesti států Evropské unie, kde jsou v současné době pěstovány Biotech plodiny. Jedním z nejpřesvědčivějších důvodů pro pěstování Biotech plodin je jejich schopnost zvyšovat produktivitu a stabilitu produkce, uchovávat biodiverzitu a jejich schopnost produkce obnovitelných zdrojů založených na bio-palivech, čímž se z Biotech plodin stává technologie, která chrání prostředí.

Tato diplomová práce byla zaměřena na vyvinutí rychlé, přesné a levné metody, založené na PCR, pro detekci transgenu v bramborách – hlízách a listech, umožňující sledovat přítomnost GMO v obchodovaných bramborách a výrobcích i případnou kontaminaci prostředí.

**Klíčová slova:** Geneticky modifikované organismy, *Solanum tuberosum*, Polymerázová řetězová reakce, Real-Time PCR

## ANNOTATION

Genetically modified (GM) or transgenic crops, now more often called “*Biotech crops*” they are commercially cultivated since 1996. And also since 1996, the first year of commercialization of biotech crops, GM potatoes were cultivated in USA, Mexico, Canada and later in South Africa, China and India. The global area of approved biotech crops in 2006 was 102 million hectares and 22 countries grew biotech crops, 11 developing countries and 11 industrial countries. The Czech Republic is on of the six EU countries where biotech crops are cultivated at present. The most compelling case for biotechnology, and more specifically biotech crops, is their capability to contribute to: increasing crop productivity and stability of productivity and production; conserving biodiversity, as a land-saving technology; the production of renewable resource based bio-fuels.

This diploma paper was focused on developing of fast, precise and cheap method based on PCR to detect the presence of transgenes in potatoes – tubers and leaves, allows monitoring the presence of GM potatoes in market, environment, etc. and to quantify “contamination” of ware potatoes (tubers) with GM ones.

**Keywords:** Genetically modified organisms, *Solanum tuberosum*, Polymerase chain reaction, Real-Time PCR



## OBSAH

1. ÚVOD.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	13
2.1. Legislativa GMO .....	13
2.2. GMO ve světě .....	13
2.3. GMO v České Republice .....	14
2.4. Geneticky modifikované brambory.....	15
2.4.1. Charakteristika GM brambor schválených pro uvádění do životního prostředí v ČR .....	16
2.5. Princip detekce GMO .....	17
2.6. Metody stanovení GMO .....	18
2.6.1. Metody založené na detekci DNA .....	19
2.6.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
2.6.1.2. Kvantitativní kompetitivní polymerázová řetězová reakce (QC-PCR) .....	23
2.6.1.3. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR) .....	23
2.6.1.5. DNA – čipy .....	25
2.6.2. Metody založené na detekci RNA .....	25
2.6.2.1. Zpětná PCR (RT-PCR) .....	25
2.6.3. Metody založené na detekci proteinu .....	26
2.6.3.1. Western blot .....	26
2.6.3.2. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ....	27
2.6.4. Ostatní metody .....	28

2.6.4.1. Chromatografie .....	28
2.6.4.2. Infračervená spektroskopie .....	28
3. MATERIÁL A METODY .....	29
3.1. Rostlinný materiál .....	29
3.2. Izolace templátové DNA z hlíz a listů .....	29
3.3. PCR analýza – detekce transgenu .....	30
3.4. qRT – PCR .....	32
4. VÝSLEDKY .....	33
4.1. PCR analýza – detekce transgenu .....	33
4.2. qRT – PCR .....	34
5. DISKUSE .....	37
6. ZÁVĚR .....	40
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....	41
8. POUŽITÉ ZKRATKY .....	46

## 1. ÚVOD

V průběhu 70. a 80. let 20. století byly vyvinuty technologie, které umožňují připravit rekombinantní DNA, tj. molekulu DNA jejíž jednotlivé části pocházejí z DNA odlišných organismů a získat organismy, označované jako geneticky modifikované (GMO) či transgenní (OVESNÁ, 2005). Geneticky modifikovaný organismus je podle zákona č. 78/2004 Sb. definován jako takový organismus (kromě člověka), jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací, tj. cílenou změnou dědičného materiálu způsobem, kterého se nedosáhne přirozeně – např. křížením, roubováním, somatickou hybridizací. Tato definice se vztahuje na organismy schopné rozmnožování nebo přenosu dědičného materiálu, tj. mikroorganismy, rostliny, živočichy a buněčné kultury; nevztahuje se na člověka (DRÁPAL, 2003).

Transgenní rostliny mají řešit otázky spojené s potřebou rychlého zvyšování zemědělské produkce, která úzce souvisí s růstem lidské populace. Dalším problémem, s jehož řešením mohou pomoci, jsou každoroční ztráty úrody po napadení škůdci nebo chorobami, protože množství chemikálií používaných na ochranu proti nim není z ekologického hlediska možné neustále zvyšovat. Hlavním cílem genetických modifikací je tedy zasáhnout do rostlinného genomu tak, aby došlo k vytvoření organismů rezistentních k herbicidům, odolných vůči škůdcům, bakteriálním, plísňovým a virovým infekcím, extrémním podmínkám, nebo ke zvýšení nutriční hodnoty potravin (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

Moderní biotechnologie však vzbuzují i řadu etických, environmentálních, sociálních i zdravotních obav. Důvodem je především skutečnost, že se jedná o zcela nové technologie, s neznámými důsledky jejich používání. Týká se to zejména uvolňování živých modifikovaných organismů do prostředí, kde mohou ovlivnit přírodní biologickou diverzitu. Nedostatečné jsou též informace o toxicitě a alergenitě potravin vyrobených z GMO (ROUDNÁ, 2004).

Aby mohly být transgenní organismy a jejich produkty uvedeny na trh, musí být tedy podrobně otestováno, že nemají negativní vliv na zdraví člověka a zvířat a musí být viditelně označeny jako transgenní (ONDŘEJ, 2002). V Evropské Unii musí být značeny potraviny a potravinářské přísady obsahující rekombinantní DNA nebo modifikovaný protein nad minimální hodnotu 0,9 %. Další země si ustanovily své vlastní legislativní směrnice a prahové hodnoty (LEIMANIS et al., 2006; ŽEL et al., 2005). Např. v Norsku a Maďarsku je

detekční limit 2 % GMO, ve Švýcarsku 1 % GMO (MEYER, 1999), v mnoha asijských zemích je stanovena hranice 5 %. Požadavek na značení GMO není v USA, kde jsou GMO považovány za ekvivalent konvenčních potravin (LEIMANIS et al., 2006).

Potřeba monitorování a kontroly přítomnosti a množství GMO v zemědělských plodinách a z nich odvozených produktech vytvořila požadavek na analytické metody schopné detekce, identifikace a kvantifikace buď vnesené DNA nebo exprimovaných proteinů v transgenních rostlinách (BONFINI et al., 2001).

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **2.1. LEGISLATIVA GMO**

Vzhledem k povaze GMO a možnostem teoreticky kombinovat genetické informace z odlišných organismů, je nakládání s GMO přísně regulováno (OVESNÁ, 2005). V České republice je nakládání s geneticky modifikovanými organismy upraveno zákonem č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty a změně některých souvisejících zákonů. Datum účinnosti tohoto zákona je od 25.2.2004 a nahrazuje zákon 153/2000 Sb. Dne 13. září 2005 nabyla účinnosti novela zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty – zákon č. 346/2005 Sb. (MZE, 2007). Tento zákon v zásadě kopíruje Směrnici EU 2001/18/EC (OVESNÁ, 2005). Hlavním cílem zákona je zajistit bezpečné nakládání s GMO bez nepříznivých vlivů na zdraví člověka a zvířat, životní prostředí a biodiverzitu, aniž by zákon kladl bezpečnému nakládání s GMO zbytečné překážky. Zákon poskytuje občanům jistotu, že nakládání s GMO a jejich použití je pod odbornou kontrolou. Zajišťuje též informování veřejnosti v oblasti GMO (ONDŘEJ a DROBNÍK, 2002).

Významný závazek v mezinárodní oblasti představuje Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti (CPB), který byl přijat v lednu r. 2000 v Montrealu (v platnost vstoupil 11. září 2003) jakožto první a dosud jediný protokol k Úmluvě o biologické rozmanitosti. Česká republika je povinna dodržovat řadu nařízení EU, které se týkají bezpečnosti potravinového řetězce. Také musí zabezpečit kontrolu výskytu GM složek v potravním řetězci a jejich správné značení. (OVESNÁ et al., 2005).

### **2.2. GMO VE SVĚTĚ**

První maloparcelové polní pokusy s pěstováním transgenních rostlin byly prováděny v roce 1986 v USA (tabák odolný proti hmyzím škůdcům) a první transgenní odrůda se objevila na trhu r. 1994 (rajče, odrůda Flavr Savr s prodlouženou životností plodů). Do rostlin jsou vnášeny geny pro tyto hlavní znaky: tolerance k herbicidu, rezistence k hmyzím škůdcům, pylová sterilita pro heterózní šlechtění, rezistence k virovým chorobám, u řepky změna spektra mastných kyselin v oleji semen, u rajčete prodloužená konzumní zralost, u karafiátu prodloužená životnost řezaných květů. Obvykle každá odrůda má jeden z těchto nových znaků, v některých se kombinují dva vnesené znaky (JAMES, 2006; ONDŘEJ, 2003).

Od r. 1996 došlo k nebyvalému nárůstu pěstebních ploch GM plodin a to i přesto, že využití transgenních materiálů v řadě zemí omezovala negativní stanoviska či dokonce moratoria na pěstování a dovoz komodit obsahujících GM suroviny. Podle údajů mezinárodní organizace *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA) celosvětové plochy transgenních plodin za r. 2006 dosáhly výměry 102 milionů hektarů. Nejvíce pěstovanými GM plodinami jsou sója (58,6 mil. ha), kukuřice (25,6 mil. ha), bavlník (13,4 mil. ha) a řepka (4,8 mil. ha), v menší míře řepa cukrovka, brambor, len, tabák, rajče, papája či karafiáty. Zatímco meziroční nárůst ploch GM plodin v letech 2004 a 2005 činil 9 milionů ha a tedy navýšení o 11 %, o rok později již 12 mil. ha (13 %). Současně se zvýšil i počet zemí, které tyto produkty moderních biotechnologií pěstovaly na nynějších 22; mezi nimi jsou od roku 2005 i čtyři členské státy EU a to Francie, Portugalsko, Česká Republika a Slovensko (RAKOUSKÝ a HRAŠKA, 2007).

Mezi největší celosvětové pěstitelé náleží tradičně USA, které v r. 2006 využívaly GM plodiny již na 54,6 milionech ha, následované Argentinou (18 mil. ha), Brazílií (11,5 mil. ha), Kanadou (6,1 mil. ha), Indií (3,8 mil. ha) a Čínou (3,5 mil. ha) (JAMES, 2006).

### **2.3. GMO V ČESKÉ REPUBLICĚ**

V ČR bylo schváleno pro uvádění do životního prostředí 11 GM plodin: brambor se změnou obsahu cukrů, brambor se změněným složením škrobu, brambor se změněným složením škrobu (odrůda Amflora), brambor se zvýšenou odolností k *Phytophthora infestans*, brambor se zvýšeným podílem amylopektinu, brambor se zvýšeným podílem amyulózy, hybrid kukuřice NK603 x MON 810, kukuřice linie GA21, kukuřice NK603, len setý a slivoň Stanley (MZE, 2008).

V ČR pracuje několik laboratoří, které se stanovením GMO zabývají. Některá z nich jsou rutinními pracovišti, jiná jsou zaměřena i na výzkum v této oblasti. Laboratoře ČR jsou zapojeny do ENGL (European Network of GMO Laboratories) a pracují podle mezinárodně uznávaných standardů. Referenční laboratoří je RL GMO při VÚRV Ruzyně. Řetězec laboratoří zajišťuje kontrolu potravin, krmiv, sadby, osiva i životního prostředí (OVESNÁ, 2005).

## 2.4. GENETICKY MODIFIKOVANÉ BRAMBORY

Brambory (*Solanum tuberosum*) jsou čtvrtou nejdůležitější plodinou na světě po pšenici, kukuřici a rýži v rámci plochy pěstování, výnosu a ceny (ALEXANDER et al., 2003).

Regulace výskytu patogenů a škůdců brambor je problémem pěstitelů v mnoha částech světa. Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*), virus svinutky bramboru (PLRV) a Y virus brambor jsou nejvíce devastujícími patogeny způsobujícími až 90% ztráty na výnosu u napadených rostlin (PALUCHA et al., 1998). Většina geneticky modifikovaných brambor byla proto vytvořena za účelem zvýšení jejich rezistence k herbicidům, škůdcům, patogenům, pesticidům, a škodlivým vlivům vnějšího prostředí (PŘIBYLOVÁ et al., 2006).

Získány byly odrůdy rezistentní k herbicidům hygromycinu, fosfinotricinu, metotrexátu (BARREL et al., 2002) a bromoxynilu (EBERLEIN et al., 1998).

Geneticky modifikované brambory nesoucí gen *cryIIIa* z *Bacillus thuringiensis* produkují v listech toxický protein a nová odrůda tak získává vyšší odolnost vůči napadení mandelinkou bramborovou (NAVRÁTIL, 2004). Dále byly transformovány linie brambor genem pro lektin ze sněženky (*GNA*) – insekticidní efekt *GNA* založen na zhoršení vývoje hmyzu a snížení jejich plodnosti (GATEHOUSE et al., 1996).

Pro navození rezistence k *Phytophthora infestans* byl do brambor vnesen gen pro temporin A (OSUSKY et al., 2004), chitin vážící protein *ac2* z *Amaranthus caudatus* poskytuje ochranu před houbovou infekcí (PŘIBYLOVÁ et al., 2006). K ochraně proti patogenům byl také testován gen glukose oxidase z *Aspergillus niger* (WU et al., 1995). Ochranou proti viru svinutky bramboru (PLRV) může být inzerce plášťového proteinu PLRV do genomu rostliny (VAN DER WILK et al., 1991).

Pomocí genetických modifikací lze také upravovat skladbu polysacharidů v hlízách brambor. Snížení exprese *GBSS* genu pomocí antisense RNA vede ke snížení obsahu amyulózy v bramborovém škrobu. Ten je vhodný zejména pro papírenský, textilní průmysl, výrobu barev, lepidel aj. Potravinářsky využitelný je škrob se zvýšeným obsahem amyulózy, získaný pomocí antisense RNA genů pro SBE 1 a SBE 2 enzymy. Další uplatnění tohoto škrobu je např. v produkci biodegradovatelných plastů (HEERES et al., 1997).

Kromě biologických faktorů jsou rostliny ovlivňovány biotickými podmínkami, především teplotou, dostupností vody a zasolením půdy. Proto je jedním z hlavních biotechnologických cílů vytvořit rostliny odolné k těmto stresům. (PŘIBYLOVÁ et al., 2006). Zvýšenou odolnost nízkým teplotám poskytuje vnesení genu pro AFP protein

(WALLIS et al., 1997), byly získány i rostliny brambor vysoce tolerantní k zasolení půdy (JEONG et al., 2001)

Dále lze pomocí genetických modifikací zlepšit nutriční kvalitu brambor, nebo dokonce zajistit produkci látek významných pro humánní medicínu, stejně jako jejich potenciální aplikace při tvorbě vakcín. Důležitou skupinou jsou i modifikované brambory produkující látky využitelné v potravinářském a chemickém průmyslu (PŘIBYLOVÁ et al., 2006).

#### **2.4.1. Charakteristika GM brambor schválených pro uvádění do životního prostředí v ČR**

##### Brambor se změnou obsahu cukrů

Jedná se o soubor rostlin, do nichž byl vnesen úsek T-DNA exprimující v hlízách bramboru (v důsledku použití hlízově specifického promotoru B33 z genu pro tvorbu patatinu) gen v původní nebo upravené podobě (*PFKII*), kódující bakteriální enzym fosfofruktokinázu. Tento enzym má odlišné fyzikálně chemické vlastnosti, které zajišťují jeho aktivitu v hlízách skladovaných při nízkých teplotách. V důsledku této aktivity mají hlízy snížený obsah rozpustných cukrů. Datum vzniku oprávnění: 03.05.2006 (MŽP, 2008).

##### Brambor se změněným složením škrobu

Modifikaci způsobující změnu ve složení škrobu. Vložení fragmentu genu syntetázy (*gbss*) škrobu vázané na škrobové zrno (v antisense orientaci vzhledem k fragmentu *gbss* promotoru bramboru) vede k redukci podílu amylozy ve škrobu bramborové hlízy. To má za následek nárůst množství amylopektinu v bramborách. Gen *gbss* je vlastní gen bramboru (*Solanum tuberosum*). Datum vzniku oprávnění: 23.06.2005, resp. 18.05.2007 u odrůdy Amflora (MŽP, 2008).

##### Brambor se zvýšenou odolností k *Phytophthora infestans*

Modifikace má vést k vyšší odolnosti vůči plísni bramborové (*Phytophthora infestans*). *R* geny (pocházejí z genomu bramboru *Solanum bulbocastanum*) specificky rozlišují cílový patogen a vyvolávají obrannou odpověď v rostlině, a tak ji před infekcí chrání. Datum vzniku oprávnění: 17.05.2007 (MŽP, 2008).



### Brambor se zvýšeným podílem amylopektinu

Geneticky modifikované klony brambor, vykazující posun ve složení škrobu v hlízách směrem k vyššímu obsahu amylopektinu a v důsledku toho snížení obsahu amyulózy, byly získány po transformacích odrůdy P800 použitím vektorového konstruktů s vloženým fragmentem genu syntetázy škrobu (*gbss*) vázané na škrobové zrno (v „antisense“ orientaci). Datum vzniku oprávnění: 22.05.2006 (MŽP, 2008).

### Brambor se zvýšeným podílem amyulózy

Geneticky modifikované klony brambor, vykazující posun ve složení škrobu v hlízách směrem k vyššímu obsahu amyulózy a v důsledku toho snížení obsahu amylopektinu, byly získány po transformacích odrůd P800 a P763 použitím dvou typů blízké příbuzných vektorových konstruktů zavedením fragmentů genu *be1* a *be2* jako duplikovaného invertovaného opakování enzymu štěpícího bramborový škrob napojeného na fragment promotoru *gbss*, společně s genem kódujícím protein 1 (*StGHI*), který zesiluje biosyntézu škrobu, aniž by se tím snížilo množství škrobu v hlízách. Datum vzniku oprávnění: 22.05.2006 (MŽP, 2008).

## **2.5. PRINCIP DETEKCE GMO**

Stěžejním krokem pro korektní stanovení GMO je odběr a příprava vzorku. Proces vzorkování určuje reprezentativnost výsledků, zatímco kvalita a kvantita analyzovaného vzorku se může měnit v závislosti na přípravě vzorku (ANKLAM et al., 2002).

Detekce přítomnosti GMO obvykle zahrnuje tři kroky:

1. **Detekce** (screening GMO): Účelem detekce je zjištění, zda vzorek obsahuje GMO. Analytická metoda pro detekci musí být citlivá a spolehlivá, většinou jsou to metody založené na PCR. Výsledkem screeningu je pozitivní či negativní vyhodnocení (ANKLAM et al., 2002).

Pro účely rutinního screeningu se používají selekční markery 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (CaMV), T-*nos* terminátor genu pro nopalín syntázu z *Agrobacterium tumefaciens* a neomycin fosfotransferáza (*npII*). Tyto genetické kontrolní elementy jsou přítomny v mnoha GMO vyskytujících se běžně na trhu (MACCORMICK et al., 1998; LEIMANIS et al., 2006; MEYER, 1999).

2. **Identifikace:** Pokud je detekce GMO pozitivní, následuje zjišťování, o jaké GMO se jedná a zda jsou schváleny v rámci EU (nebo jiných zemích, kterých se týká regulace GMO). Jediné analytické metody, které umožňují jednoznačně identifikovat každý druh GMO jsou metody založené na PCR (ANKLAM et al., 2002).

Identifikace GMO založená na PCR závisí na detailní znalosti kódující sekvence transgenní DNA a molekulární struktury GMO, aby mohl být vybrán příslušný oligonukleotidový primer (OVESNÁ et al., 2002). Pro přesnou identifikaci musí být výběr primeru založený na sekvencích, které jsou charakteristické pro jednotlivé transgenní organismy, například hraniční oblasti mezi místem integrace a transformované genetické složky specifické GMO - tzv. okrajové fragmenty (BONFINI et al., 2001).

3. **Kvantifikace:** Dalším krokem je determinace množství jednoho či více schválených GMO v produktu a zhodnocení shody s regulační hranicí (0,9% v EU). Kvantifikace je prováděna pomocí metod kvantitativní PCR nebo Real-time PCR (ANKLAM et al., 2002).

## 2.6. METODY STANOVENÍ GMO

Byla vyvinuta řada analytických metod, kvalitativních i kvantitativních, pro spolehlivou detekci přítomnosti nebo množství GMO v zemědělských komoditách. Kromě „klasických“ metod pro analýzu DNA a proteinů, jako např. polymerázová řetězová reakce (PCR) a ELISA mohou být některé typy GMO detekovány také doplňkovými metodami chemické analýzy, jako je chromatografie či infračervená spektroskopie (ANKLAM, 2002). Běžně používané metody detekce GMO jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny uvedené metody mají určitá omezení, ať již specifitu, citlivost, možnost ovlivnění ostatními složkami potravin, vhodnost metody pro daný vzorek, časovou efektivnost nebo cenu stanovení (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

<b>Molekulárně - biologické metody</b>	<b>Detekce DNA</b>	PCR a její variace (multiplex PCR, nested PCR)
		Kvantitativní kompetitivní PCR (QC-PCR)
		PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qRT PCR)
		Southern blot
		DNA čipy
		PCR-ELISA
	<b>Detekce RNA</b>	Reversní transkripce – PCR (RT-PCR)
		Northern blot
		RPA (ribonuclease protein assay)
<b>Imunochemické metody</b>	<b>Detekce proteinu</b>	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
		Western blot (Imunoblot)
<b>Ostatní techniky</b>		Určení aktivity produktu transgenu
		Chromatografie
		Infračervená spektroskopie

**Tab. 1 :** Metody používané pro detekci GMO (ZDEŇKOVÁ et al., 2004)

## 2.6.1. Metody založené na detekci DNA

### 2.6.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Specifická amplifikace DNA použitím polymerázové řetězové reakce byla poprvé popsána roku 1985 Dr. Kary Banks Mullisem, který za objev PCR získal Nobelovu cenu (MA et al., 2006) . Od té doby počet aplikací této metody exponenciálně vzrůstá. PCR a její různé modifikace nachází široké uplatnění i při detekci a analýze GMO. Technika je velmi citlivá a umožňuje amplifikaci vybrané sekvence DNA z velmi malého množství templátové DNA (ANKLAM et al., 2002).

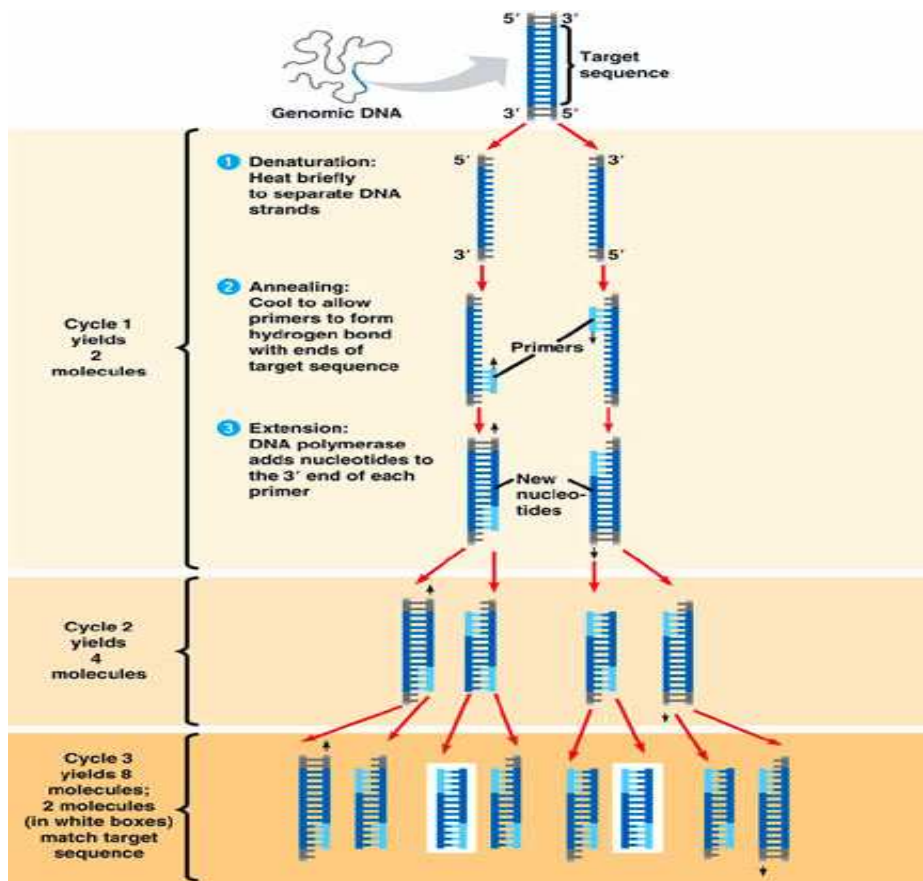
Komponentami každé PCR reakce jsou přesně definované primery (syntetické oligonukleotidy s typickou délkou 25-30 bp), adekvátní množství deoxynukleotidů, termostabilní DNA polymeráza (Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*) a pufr s hořčičnými ionty (PUSTERLA et al., 2006).

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy (MA et al., 2006). Cílová sekvence je ohraničena zpravidla dvěma primery. Každý primer je komplementární k jednomu ze dvou řetězců cílové dvouvláknové DNA. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích

protisměrně (ANKLAM et al., 2002). Princip konvenční PCR obvykle zahrnuje tři body (MA et al., 2006):

1. denaturace DNA: dvouřetězcová DNA je tepelně denaturována (94°C), dochází k rozbití vodíkových můstků spojujících oba řetězce a vznikají dvě molekuly jednořetězcové DNA
2. připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (annealing): teplota je snížena, na 35°C – 70°C (závislé na zastoupení CG), což dovolí navázání primerů na jejich komplementární sekvence
3. syntéza nových řetězců DNA (elongace): teplota je poté zvýšena na 72°C, optimální teplotu pro *Taq* polymerázu, která prodlouží primery na 3' konci

Cílová sekvence je v každém reakčním cyklu duplikována a množství cílové sekvence exponenciálně vzrůstá v následných cyklech podle počtu cyklů (MUWONGE, 2005). Produktem PCR je teoreticky  $2^n$  kopií vybraného úseku DNA, kde  $n$  je počet proběhlých cyklů (MA et al., 2006). Skutečná účinnost reakce se odhaduje na 60 – 85 % (SAIKI *et al.*, 1985). Proces je obvykle zastaven po 35 - 40 cyklech (počet cyklů závisí na množství DNA a délce amplikonu) a produkt je vizualizován pomocí gelové elektroforézy (PUSTERLA et al., 2006).



Obr. 2: PCR (převzato z

[http://scienceblogs.com/insolence/2007/06/the\\_autism\\_omnibus\\_the\\_difference\\_betwee.php](http://scienceblogs.com/insolence/2007/06/the_autism_omnibus_the_difference_betwee.php))

Velmi důležitá je standardizace metody, protože změna v parametrech, jako je množství vzorku, metoda izolace DNA, kvalita DNA, primer a DNA-polymeráza, termocykler a teplotní profil, počet PCR cyklů či verifikace amplikonů, to vše ovlivňuje citlivost metody (MEYER, 1999).

Metoda PCR je vysoce specifická, citlivá a rychlá. Umožňuje najít teoreticky jedinou odlišnou molekulu DNA ve vzorku materiálu během několika hodin, čehož je využíváno pro rychlé analýzy velkého počtů vzorků. Detekční limity PCR metod u GM rostlin se pohybují v rozmezí 0,0001 až 1 % GMO. Pomocí PCR je však prokázána pouze přítomnost sekvencí komplementárních ke zvoleným primerům. Výsledky nenaznačují, zda je DNA sekvence integrována do genomu rostliny ani její koncentraci (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

Obměnou tradiční polymerázové řetězové reakce je metoda **multiplex PCR** založená na přidání násobného množství párů primerů do reakční směsi, což umožňuje analyzovat více parametrů v průběhu jednoho reakčního procesu. Přítomnost více párů

primerů může způsobovat problémy (diskriminace delších fragmentů, vznik nespecifických produktů apod.), přesto je multiplex PCR používána v řadě aplikací, mimo jiné i při detekci GMO (ZDEŇKOVÁ et al., 2004). Tento způsob amplifikace se uplatňuje například při kvantitativní detekci transgenní DNA, při které je jeden pár primerů komplementární k internímu genu a druhý pár primerů k transgenu (MANNERLÖF a TENNING, 1997). Porovnáním množství PCR produktů vzniklých namnožením obou cílových úseků bývá kvantifikována transgenní DNA v analyzovaném vzorku (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

Ke zvýšení citlivosti a přesnosti může být použita tzv. **nested PCR**, která je složena ze dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí s 25 – 40 reakčními cykly a využívá dva druhy primerů (vnitřní a vnější). Protipólem zvýšené citlivosti je však vzrůstající riziko kontaminace (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

### **Kvantifikace GMO pomocí PCR**

Byly vyvinuty další metody založené na PCR, jako je kvantitativní kompetitivní PCR (QC-PCR) a real-time PCR, které řeší problémy se stanovením vztahu mezi koncentrací cílové DNA a množstvím PCR produktu vzniklého při amplifikaci (ANKLAM et al., 2002).

Tyto analytické metody lze rozdělit do dvou skupin (ANKLAM et al., 2002):

- 1) společná amplifikace cílové sekvence a vnitřního standardu pomocí kvantitativní kompetitivní PCR (QC-PCR) a dvojité QC-PCR (produkt vyhodnocen až po ukončení PCR)
- 2) měření PCR produktu v počátečních fázích reakce, kdy je účinnost amplifikace (E) stále ještě konstantní a proto jsou koncentrace produktu v korelaci s počátečním množstvím cílové DNA sekvence. Tohoto principu využívají metody PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qRT PCR) a PCR-ELISA

### **2.6.1.2. Kvantitativní kompetitivní polymerázová řetězová reakce (QC-PCR)**

QC-PCR je založena na společné amplifikaci cílové sekvence vzorku a uměle konstruovaného vnitřního standardu o známé koncentraci. Vnitřní standard, známý jako kompetitor, je pro konečné kvantitativní hodnocení klíčovou složkou. Má stejná vazebná místa pro stejný pár primerů, ale liší se ve své velikosti (PRIGLOVÁ a KÖNIG, 2002). Tento malý velikostní rozdíl (<40 bp) umožňuje rozlišení mezi oběma reakčními produkty. Při QC-PCR je vždy zapotřebí analyzovat sérii PCR reakcí jedné koncentrace DNA analyzovaného vzorku s přidávkou různých koncentrací DNA vnitřního standardu. Pokud je na začátku reakce výrazný nadbytek jedné cílové DNA, je produkt amplifikace tohoto úseku ve značném přebytku (ANKLAM et al., 2002). Okamžik, ve kterém jsou intenzity PCR-produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA ekvivalentní (pruh o stejné intenzitě na agarosovém gelu), je potom použit ke stanovení množství cílové sekvence v původním vzorku (BONFINI et al., 2001).

Výhodou tohoto postupu je kromě kvantifikace též odhalení případné inhibice PCR a tím i falešné negativy, nevýhodou je časová a materiálová náročnost a semikvantitativní odhad koncentrace cílové sekvence ve vzorku (PRIGLOVÁ a KÖNIG, 2002). V současné době použití QC-PCR při detekci GMO nebývá používáno často, je upřednostňována kvantifikace pomocí Real-time PCR (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

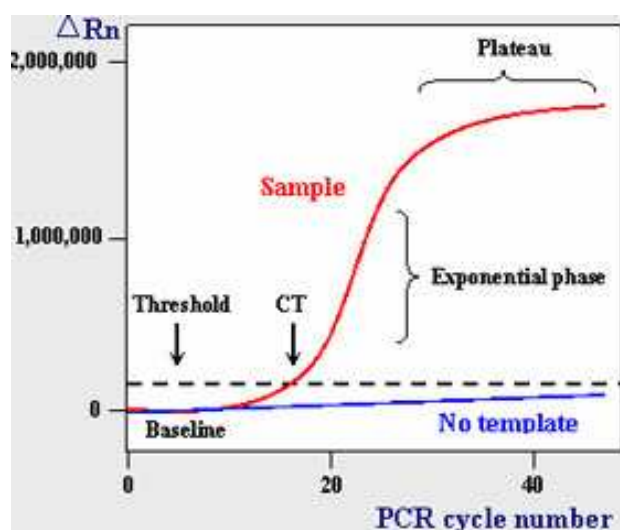
### **2.6.1.3. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR)**

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase, nazývaná také kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QRT-PCR) nebo kinetická polymerázová řetězová reakce (kPCR), je technikou využívající současnou kvantifikaci a amplifikaci molekuly DNA (MA et al., 2006).

Tuto techniku vyvinuli v roce HIGUCHI et al. (1992). Využili přitom vlastnosti interkalačního barviva ethidiumbromidu (Et-Br), který po ozáření UV fluoreskuje (fluorofor). Principem metody je rychlé a přesné zaznamenávání množství produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu reakce (VAITILINGOM et al., 1999). V současnosti existují pro kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR tři obecné metody, založené na použití (MA et al., 2006):

- interkalačního barviva vázajícího se na DNA (SYBR Geen)
- fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu (TaqMan, FRET, molekulární majáky, Bi-funkční molekuly Scorpions)
- fluorescenčně značených primerů (AmpliFluor, LUX)

Za předpokladu, že se vytvoří adekvátní množství produktu a hladina fluorescence je dostatečná, přístroj (speciálně upravený termocykler) signál zachytí. V průběhu dalších cyklů se bude míra fluorescence zvyšovat. Extrapolací vzniklé křivky zpět k nule lze určit počet cyklů nutných pro vytvoření detekovatelného množství produktu. Tato hodnota, označovaná jako  $C_T$ , závisí na prvotním množství templátu – nutno zajistit, aby množství vstupního materiálu bylo vždy stejné (BONFINI et al., 2001).



**Obr 3:** Typická křivka Real-time PCR (převzato z <http://www.rt-pcr.com/>) : Osa x znázorňuje počet reakčních cyklů, osa y počet kopií cílové sekvence. Čárkovaná linie značí prahovou úroveň, což je libovolná hodnota (obvykle kolem 0,1) využívaná k určení  $C_t$ . Je-li přítomen vzorek, vytváří se esovitá křivka s exponenciální a plato fází. Zploštění křivky je způsobeno menším množstvím primerů oproti templátu.

Ačkoliv je vysoká cena přístrojů a specifických reagensů překážkou pro mnoho laboratoří, Real-time PCR může být v současné době považována za nejpřesnější a nejvýhodnější kvantitativní metodu (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).



#### **2.6.1.4. DNA čipy**

Tato technika využívá pevné inertní podložky obsahující imobilizované úseky DNA komplementární k hledaným sekvencím (LEMIEUX et al., 1998). Na velmi malé plošce čipu jsou umístěny stovky různých krátkých DNA sond. Při vlastním stanovení jsou na čip aplikovány značené molekuly DNA nebo RNA vzorku, které hybridizují s komplementárními sekvencemi jednovláknové DNA sondy. Detekce zachycených cílových úseků je prováděna pomocí fluorescenčně značené protilátky. V místech, kde došlo k hybridizaci je fluorescence emitována laserovým paprskem a detekována fotobuňkou (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

Hlavní výhodou je miniaturizace, vysoká citlivost a možnost detekovat velké množství různých DNA sekvencí v jednom pokusu. Technologie čipů je však velmi nákladná (LEIMANIS et al., 2006).

### **2.6.2. Metody založené na detekci RNA**

V mnoha případech jsou analýzy exprese transgenů zaměřeny na proteiny nebo jiné finální produkty, jejichž akumulace má být fenotypovým projevem exprese. Ne vždy je možné provést analýzu proteinů. Požadovaných výsledků lze také dosáhnout analýzou RNA transkriptů. Dokonce v případech, kdy jsou známy výsledky analýzy proteinů, poskytl analýza RNA užitečné informace o akumulaci transkriptu a jeho stabilitě. Pomáhá i při objasňování nepředpokládaných fenotypových projevů. Pro měření množství RNA mohou být použity takové techniky jako reverzní transkripce - PCR (RT-PCR), Northern blot a ribonuclease protein assay (RPA) (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

#### **2.6.2.1. Zpětná PCR (RT-PCR)**

RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, a proto se produkty tvoří pouze tehdy, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena do cDNA reversní transkriptázou a následně amplifikována PCR se dvěma specifickými primery standardním postupem (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

Výhody RT-PCR, v porovnání s Northern blotem a RPA, jsou malá množství potřebného materiálu, vysoká citlivost a snadnost přípravy vzorku (REGISTER, 1997).

### **2.6.3. Metody založené na detekci proteinu**

Specifická detekce nového proteinu syntetizovaného genem vneseným pomocí transformace představuje alternativní způsob identifikace geneticky modifikovaných rostlin. Nicméně, genetické modifikace nemusí vždy vést k produkci proteinu či hladina proteinové exprese nemusí být postačující pro detekci. Některé proteiny mohou být také exprimovány pouze v určitých částech rostliny (BONFINI et al., 2001). LONGSTAFF et al. (1995) udává hodnotu exprese transgenního produktu v rozmezí 0 – 2 % celkového rozpustného proteinu za použití silného promotoru, nicméně ve většině případů je exprese nižší než 2 % (BONFINI et al., 2001).

Hlavní nevýhodou metod založených na detekci proteinu je malá dostupnost protilátek specifických proti proteinům produkovaným expresí vloženého genu (ZDEŇKOVÁ et al., 2004). Jelikož jsou metody detekce proteinů většinou založené na imunologickém stanovení, je nutná neporušená terciální a kvarterní struktura proteinů, a proto jsou tyto metody omezeny pouze na čerstvý materiál (BONFINI et al., 2001).

#### **Imunochemické metody**

Základem imunochemických metod je specifická interakce antigenu s protilátkou. V případě detekce GMO je antigenem nově syntetizovaný protein (BONFINI et al., 2001). Tyto metody jsou běžně používány pro studium akumulace proteinů v transgenních rostlinách. K detekci GMO se nejčastěji používají:

- Western blot (imunoblotting)
- ELISA

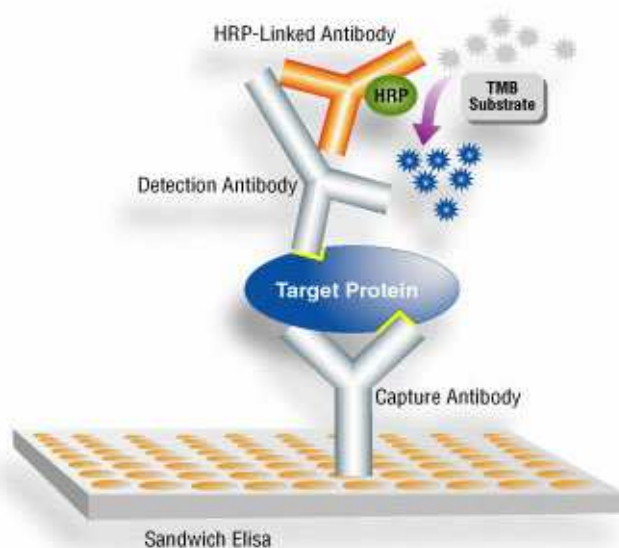
##### **2.6.3.1. Western blot**

Western blot se používá pro identifikaci polypeptidů prostřednictvím protilátek (sond) a následuje obvykle po jejich rozdělení PAGE elektroforézou a přenosu na membránu. Jednotlivé proteiny jsou identifikovány podle toho, jak se váží s příslušnými značenými protilátkami.

Výhoda Western přenosu oproti ELISA metodě je schopnost stanovit molekulární hmotnost proteinu. Western hybridizace je však časově náročnější a kvantitativní výsledky jsou určovány s menší přesností (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

### 2.6.3.2. ELISA

Metodu ELISA vyvinuli Peter Perlmann a Eva Engvall na Stockholmské Universitě ve Švédsku a první článek o této metodě uvedli v roce 1972. Techniku ELISA lze použít ve dvou variantách, sendvičová technika (přímá nekompetitivní ELISA) a kompetitivní technika (MONROE, 1984). Pro detekci GMO se nejčastěji používá "sendvičový" formát (obr. 4). Využívá většinou dvou protilátek, z nichž první je imobilizovaná na povrch nosiče a specificky interaguje s antigenem. Druhá protilátka, značená enzymem (nejčastěji peroxidasa, alkalická fosfatasa,  $\beta$ -galaktosidasa a glukosa oxidasa) reaguje s jinými determinantními skupinami na odlišné části molekuly antigenu. Po přidání chromogenního substrátu je výsledná enzymová reakce vyhodnocena spektrofotometricky (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).



**Obr. 4:** Přímá nekompetitivní ELISA  
(převzato z [www.newenglandbiolabs.de](http://www.newenglandbiolabs.de))

Pro detekci GMO byla vyvinuta řada ELISA systémů se specifitou k markerovým genům, široce používaných k rostlinným genetickým modifikacím, jako je např. neomycin fosfotransferáza II (*nptII*), enzym 5-enolpyruvátšikimát-3-fosfosyntáza (*EPSPS*), insekticidní proteiny z bakterie *Bacillus thuringiensis CryA1b* a protein fosfinotricin acetyltransferáza (*PAT*) (ROGAN et al., 1992).

Pro polní použití byla vyvinuta varianta metody ELISA - **Lateral Flow Strip** (STAVE, 1999). Kromě časové nenáročnosti (výsledky během 5 - 10 minut) jsou výhodami nízká cena a jednoduchost provedení. Lateral flow strip se používají pouze pro informativní

stanovení, pozitivní výsledky testu musejí být potvrzeny jinou metodou (ZDEŇKOVÁ et al., 2004).

## **2.6.4. Ostatní metody**

### **2.6.4.1. Chromatografie**

Pokud se významně liší složení GMO od nemodifikovaného organismu (např. zastoupení mastných kyselin nebo triglyceridů), mohou být tyto rozdíly detekovány pomocí tradičních chemických metod založených na chromatografickém principu. Toto je možné využít např. při detekci oleje získaného z GM řepky pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s hmotnostní ionizační spektrometrií (HPLC-MS). Tyto metody jsou vhodné spíše pro kvalitativní analýzu (ANKLAM et al., 2002).

### **2.6.4.2. Infračervená spektroskopie**

Určité zásahy do genomu organismu mohou změnit i strukturu pletiv v rostlinách, přestože nejsou detekovatelné žádné významné rozdíly ve složení proteinů nebo olejů (např. Roundup Ready soja). Změny ve struktuře mohou být zaznamenány pomocí infračervené spektroskopie (HURBURGH et al., 2000). Nicméně schopnost rozlišit malé množství GMO v nemodifikovaných produktech je v tomto případě značně obtížné, stejně jako při použití chromatografických metod (ANKLAM et al., 2002).

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Rostlinný materiál

Pro tuto diplomovou práci byl použit geneticky modifikovaný genotyp Desireé a kontrolní odrůda Desireé. Transgenní materiál byl dodán z genové banky VÚB Havlíčkův Brod v podobě *in vitro* kultury mikrohřízek a odebraných listů.



a) kontrolní linie

b) transgenní GNA linie

**Obr. 5:** Experimentální rostliny odrůdy Desireé z *in vitro* kultury v laboratorních podmínkách (VÚB Havlíčkův Brod).

#### 3.2. Izolace templátové DNA z hlíz a listů

Izolace DNA byla provedena pomocí CTAB dle modifikovaného protokolu podle Williamse a Rogerse (NOVÁKOVÁ et al, 2008). Modifikace spočívala v přidání PVP (40-360000) k extrakčnímu CTAB puftru.

#### **Protokol izolace DNA pomocí CTAB (modifikovaný podle Williamse a Rogerse)**

Do 1,5 ml mikrozkuvek se přenese 100 mg rostlinného materiálu, zmrazí se v tekutém dusíku a rozdrtí na prášek. Poté se přidá 500  $\mu$ l 2x PVP-CTAB + 1 % merkaptoethanolu přehřátého na 65°C, směs je inkubována při 65°C 45 minut.

Po centrifugaci 12000 rpm 10 min se převede supernatant do nových 1,5 ml mikrozkušavek a přidá se 500 µl chloroformu s IAA. Směs se 10 min promíchává a následně centrifuguje při 12000 rpm 5 min.

Vodná fáze je přenesena do nových 1,5 ml mikrozkušavek a přidá se 1/5 5 % CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500 µl chloroformu s IAA a směs se 10 min promíchává. Následuje centrifugace při 12000 rpm 5 min a vodná fáze je přenesena do nových 1,5 ml mikrozkušavek.

Přidají se 2/3 ledového izopropanolu, směs se 2x – 3x promíchá a uloží na 30 min do -20°C. Následuje centrifugace při 12000 rpm a 4°C 10 min. Odstraní se supernatant a přidá se 300 µl 1xTE, pelet se nechá rozpustit 30 – 60 min při 37°C.

Přidají se dva objemy 100 % ledového ethanolu, směs se 2x – 3x lehce promíchá a uloží se na 20 min do -20°C. Následuje centrifugace při 12000 rpm a 4°C 10 min. Odstraní se supernatant, přidá se 1000 µl 70 – 80 % ethanolu a směs se lehce promíchá. Následuje centrifugace při 12000 rpm a 4 °C 2 min, odstraní se supernatant a pelet se dá sušit (max. 3 hodiny). Přidá se 50 – 150 µl sterilní H<sub>2</sub>O (podle velikosti peletu) a nechá se rozpustit 40 min při 37°C. Roztok DNA se uchovává při -20°C.

### 3.3. PCR analýza – detekce transgenu

Metodika detekce transgenu v geneticky modifikované odrůdě Desiree za využití multiplexové PCR – jeden primerový pár (GNA) byl navržen pro amplifikaci 140 bp v rámci transgenu a druhý primerový pár (UGP) byl navržen jako, interní standard pro amplifikaci 88 bp úseku genu *UGP* (BOROVKOV et al., 1996)

Sekvence primerů:

UGP - bramborový standard (BOROVKOV et al., 1996)

UGP-af7: 5'GGACATGTGAAGAGACGGAGC3'

UGP-ar8: 5'CCTACCTCTACCCCTCCGC3'

GNA - marker pro lektin (TANG et al., 1999)

GNA-1: 5'ATGGCTAAGGCAGTCTCCTC3'

GNA-2: 5'TCATTACTTTGCCGTCACAAG3'

Složení PCR reakce:

Tris-HCl (pH 8,8)	75mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20mM
Tween 20	0,01%
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM
dATP	200μM
dDTP	200μM
dGTP	200μM
dTTP	200μM
Taq purple DNA polymeráza	2,5U
Primer	10pM
Templátová DNA	25ng

PCR reakce probíhala v objemu 25 μl.

Teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace	3min	94°C
Denaturace	50s	94°C
Annealing	50s	62°C
Elongace	50s	72°C
Závěrečná elongace	7min	72°C

Proběhlo 30 cyklů.

Reakce proběhla na TC-XP Cycleru (BIOER TECHNOLOGY).

### **Elektroforéza**

PCR produkty byly vizualizovány barvením ethidium bromidem po elektroforéze na 1,5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru.

Jako standard pro určení velikosti fragmentů byl použit 100bp hmotnostní marker (New England Biolabs). Vlastní elektroforéza probíhala asi 45min při 90V.

### 3.4. qRT-PCR

Pro potřebu kvantifikace GMO byla optimalizována metodika Real-Time PCR s detekčním systémem SYBR Green I.

Sekvence primerů:

UGP - bramborový standard (BOROVKOV et al., 1996)

UGP-af7: 5'GGACATGTGAAGAGACGGAGC3'

UGP-ar8: 5'CCTACCTCTACCCCTCCGC3'

GNA - marker pro lektin (TANG et al., 1999)

GNA-1: 5'ATGGCTAAGGCAGTCTCCTC3'

GNA-2: 5'TCATTACTTTGCCGTCACAAG3'

Složení PCR reakce:

Master mix DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit	1x
Primery	0,5 µM
ROX	1x
Templátová DNA	10ng

Teplotní profil PCR reakce:

Počáteční inkubace	2min	50°C
Počáteční denaturace	3min	95°C
Denaturace	50s	95°C
Annealing	50s	60°C
Elongace	50s	72°C

Proběhlo 45 cyklů.

Melting křivka byla detekována v rozmezí 55°C – 90°C.

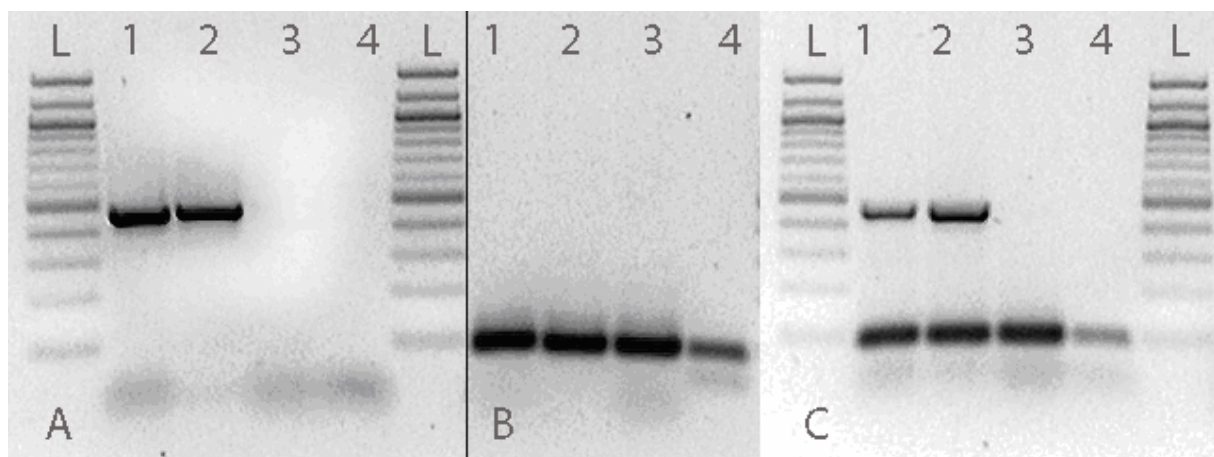
Reakce probíhala na přístroji MiniOpticon (BIORAD).



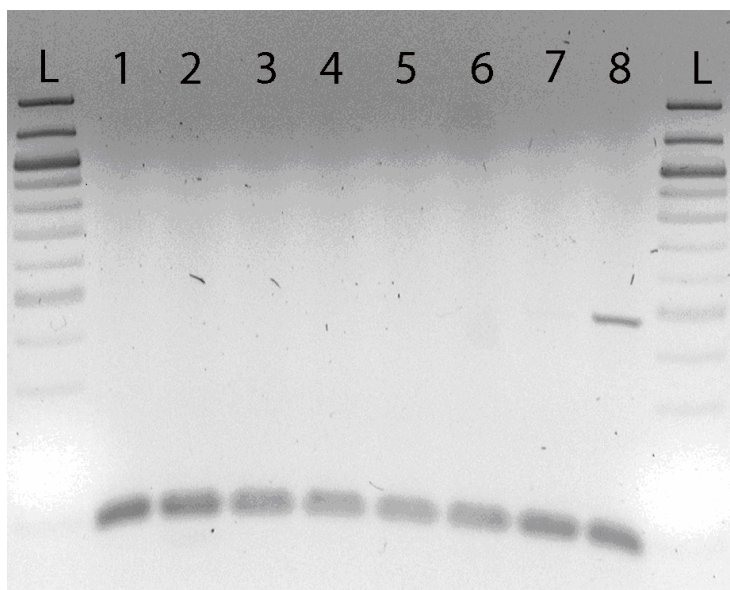
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. PCR analýza – detekce transgenu

Navržený metodický postup umožňuje specifickou detekci přítomnosti transgenu v hlízách a listech brambor. U GMO brambor jsou po multiplexové PCR získány 2 produkty – fragment odpovídající detekovanému transgenu a fragment genu *UDP* signalizující „správný“ průběh PCR reakce. U kontroly pak byl získán pouze fragment genu *UDP*. Detekční limit reakce je 5 % kontaminace transgenu (0,125 ng DNA transgenního organismu).



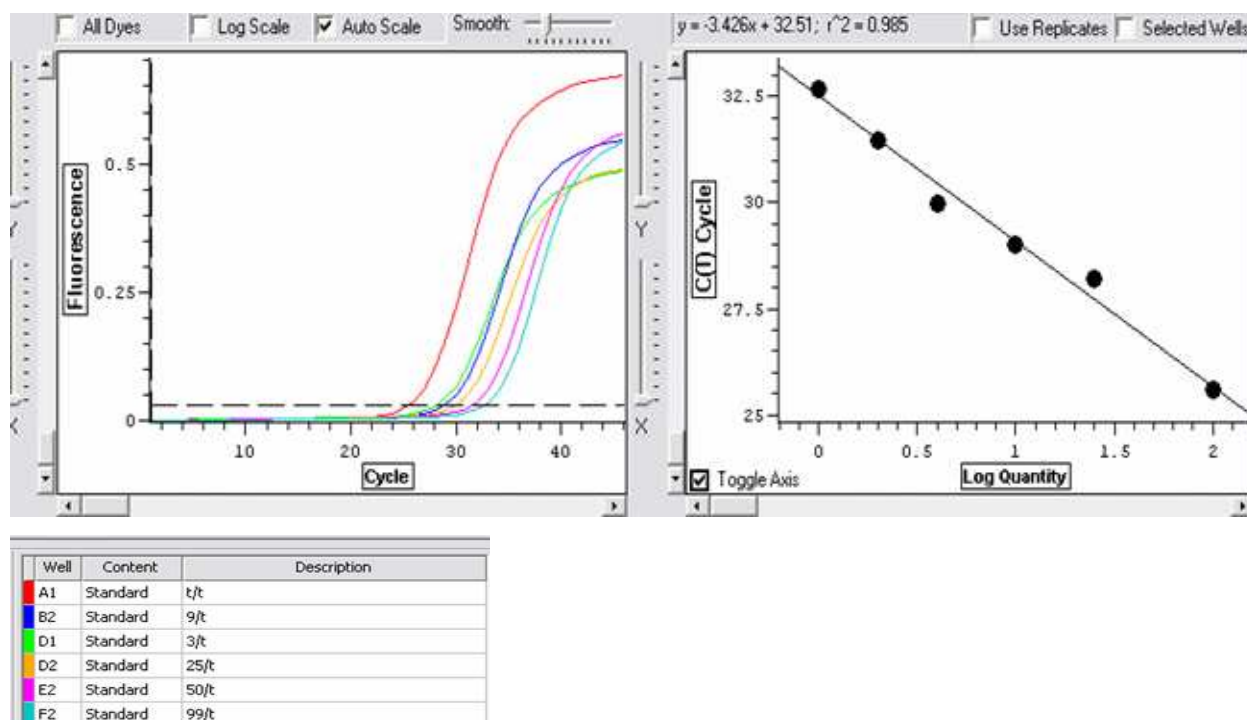
**Obr. 6:** A-amplifikace lectinového genu (primery GNA), B-amplifikace bramborového genu *UDP*-glucose pyrophosphorylase (primery UGP), C-multiplex primerů GNA a UGP, 1A-C DNA izolovaná z transgenní hlízy, 2A-C DNA izolovaná z listu transgenní rostliny, 3A-C DNA izolovaná z kontrolní hlízy, 4A-C DNA izolovaná z listu kontrolní rostliny.



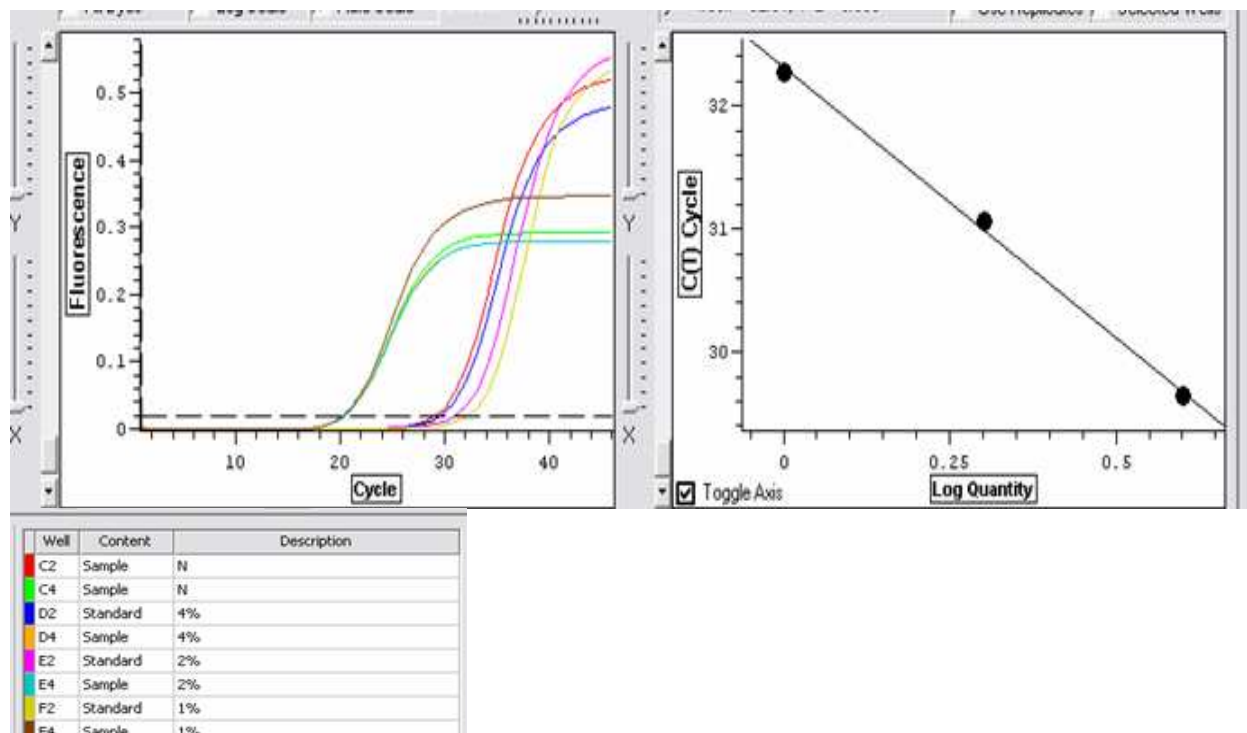
**Obr. 7:** Multiplex PCR s primery GNA a UGP u vzorků s různou koncentrací transgenu: 1 - 0,1 %, 2 - 0,5 %, 3 - 1 %, 4 - 1,5 %, 5 - 2 %, 6 - 3 %, 7 - 4 %, 8 - 5 %.

## 4.2. qRT-PCR

Byla optimalizována standardní křivka pro kvantifikaci transgenu (obr.8) a posléze byl kvantifikován neznámý vzorek (obr.9).



**Obr. 8:** Standardní křivka, procento transgenu (A1) 100 %, (B2) 10 %, (D1) 25 %, (E2) 2 %, (F2) 1 %.



**Obr. 9:** Kvantifikace neznámého vzorku, procento transgenů (D2, D4) 4%, (E2, E4) 2%, (F2, F4) 1%, (C2, C4) neznámý vzorek.

Přístroj MiniOpticon nabízí funkci vyhodnocení kvantifikace neznámého vzorku (Obr.10) tato hrubá data byla dále statisticky zpracována a výsledky jsou zaznamenány v tabulce 2.

Well	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	%
C2	SBG1	Sample	N	72.04%	29.14	5.276

**Obr. 10:** Kvantifikace neznámého vzorku, vyhodnocení MiniOpticon (BIORAD).

vzorek	log	ct	%GMO
4	0,602059991	9,26	4,006851251
2	0,301029996	10,61	1,993115019
1	0	11,94	1,001738592
N		8,81	5,057006434

**Tab. 2:** Kvantifikace neznámého vzorku (N), statistické vyhodnocení.

Metodika qRT-PCR s detekčním systémem SYBR Green I. se ukázala jako vhodná pro kvantifikaci kontaminace GMO neznámého vzorku, kde analyzovaný vzorek měl obsah GMO 5 % a stejných závěrů bylo dosaženo i provedenou analýzou. Limity reakce: detekční limit = 0,01 % a kvantifikační limit = 0,05 %.

## 5. DISKUSE

Cílem této diplomové práce byla optimalizace a porovnání metod založených na PCR, především duplex PCR a Real-Time PCR, pro detekci a kvantifikaci GM brambor.

V současné době existuje řada principiálně rozdílných metod, jež mohou být použity pro kvantifikaci a charakterizaci transgenní DNA, eventuelně výsledného produktu její exprese. Při výběru vhodných detekčních metod pro konkrétní materiál je vždy předem nutné zvážit výpovědní hodnotu, citlivost, specifičnost a další výhody i nevýhody každého metodického postupu. Nejčastěji je detekce a kvantifikace GMO prováděna metodou PCR (ZDEŇKOVÁ et al., 2004). Tuto metodu použili ve svých pracích například OVESNÁ et al. (2002) pro detekci Roundup Ready soji, VILJOEN et al. (2006) pro detekci GM kukuřice a GM soji či WATANABE et al. (2004) k detekci GM brambor. PŘIBYLOVÁ et al. (2005) studovala použití metod založených na PCR u brambor geneticky modifikovaných genem *ac2* z *Amaranthus caudatus* a detekci sledovaného genu testovala na DNA ze semen *Amaranthus caudatus*. Metoda PCR je vysoce specifická, rychlá a citlivá (detekční limity PCR metod u GM rostlin se pohybují v rozmezí 0,0001 až 1 % GMO) a vhodná pro detekci již známého transgenu (ZDEŇKOVÁ et al., 2004). Nevýhodou metody PCR pro prvotní screening GMO je nutnost provádět jednu reakci na jeden hledaný gen. Proto je v tomto případě velkým přínosem pro detekci GMO použití DNA čipů, pomocí nichž je možné detekovat velké množství různých DNA sekvencí v jednom pokusu. Tuto metodou detekoval GMO například LEIMANIS et al. (2006).

Pro kvantifikaci GMO je nejčastěji používána metoda Real-Time PCR. V předkládané práci byl použit detekční systém SYBR Green I, při kterém se fluorescenční barvivo SYBR Green I váže na DNA a se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu vzrůstá i fluorescenční signál. LIN et al. (2006) a RØNNING et al. (2003) použili pro kvantifikaci GM kukuřice Real-Time PCR s detekcí produktu pomocí sondy TaqMan. Sonda TaqMan je opatřena fluorescenční značkou na 5'-konci a zhášečem na 3'-konci. Po vytvoření homoduplexu dojde k ukončení zhášení a emisi fluorescence. Výhodou detekčního systému SYBR Green v porovnání s TaqMan je nižší cena a jednoduché použití. Nevýhodou je nutnost optimalizace z důvodu výskytu nespécifického produktu (MA et al., 2006). V předkládané práci byl stanoven detekční limit Real-Time PCR 0,01% a kvantifikační limit 0,05%. RØNNING et al. (2003) uvádí detekční limit 10 počátečních kopií templátu a kvantifikační limit 40 kopií templátu u čistého vzorku GM kukuřice, respektive 100 kopií u vzorku potravin obsahujících GM kukuřici.

Pomocí PCR může být detekován některý z vnesených genetických elementů: promotor, strukturální gen, stop signál či markerový gen. Pro rutinní screening GMO se obvykle používají 35S promotor viru mozaiky květáku (CaMV), T-*nos* terminátor genu pro nopalín syntázu z *Agrobacterium tumefaciens* a neomycin fosfotransferáza (*nptII*) – selekční marker podmiňující rezistenci k antibiotiku kanamycinu. Často detekovaným genem u transgenních brambor je *cryIIIa* gen z *Bacillus thuringiensis*, jenž je obsažen v řadě GM odrůd – např. NewLeaf, NewLeaf Plus a NewLeaf Y, které jsou vyvinuty firmou Monsanto a komerčně využívány (WATANABE et al., 2004). Geneticky modifikovaná odrůda bramboru NewLeaf byla připravena vnesením genu *cryIIIa* do odrůdy bramboru Russet Burbank. Nová odrůda tak získala vyšší odolnost vůči napadení mandelinkou bramborovou (povolení získáno v roce 1995). Od r. 1998 se v USA pěstuje odrůda NewLeaf Plus, která obsahuje kromě genu *cryIIIa* také dva geny z PLRV (ORF1 a ORF2) a NewLeaf Y s genem viru PVY pro plášťový protein a genem *cryIIIa*. New Leaf Plus byl dále upraven odstraněním genu *nptII*, používaného pro selekci geneticky modifikovaných rostlin antibiotikem kanamycinem, a jeho nahrazením genem *EPSPS* z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, který modifikovaným rostlinám umožňuje odolávat působení herbicidů glyphosatového typu (NAVRÁTIL, 2004).

Metodu pro detekci syntetického genu *cryIIIa* v transgenních bramborech použitím PCR vyvinuli DONNA et al. (2004). MUWONGE (2005) použil ve své práci pro detekci GM brambor metodu PCR, pomocí níž detekoval přítomnost 35S promotoru, Nos terminátoru, genu pro neomycin fosfotransferázu (*nptII*) a syntetický gen *cryIIIa* (LEIMANIS et al., 2006). Detekci samotného 35S promotoru pomocí PCR použil VILJOEN et al. (2006) při stanovení GMO v potravinových produktech jižní Afriky. V případě detekce GMO pomocí P-35S je nutné provést kontrolu, zda se nejedná o falešně pozitivní výsledek způsobený kontaminací CaMV (LEIMANIS et al., 2006).

Pro účely mé práce byla použita transgenní odrůda Desireé, do které byl vnesen gen pro lektin ze sněženky (*Galanthus nivalis* aglutinin, *GNA*). Transformované rostliny obsahující *GNA* se vyznačují zvýšenou odolností k hmyzím škůdcům a proto je tento gen potenciálně využitelný v ochraně rostlin. Zatím však není komerčně produkována žádná odrůda brambor ani jiných plodin obsahující gen *GNA*, tyto transgenní rostliny vznikají v současnosti pouze pro experimentální účely (PUSZTAI, 1991; LUO et al., 2005). Z dalších plodin, jež byli transformovány genem *GNA*, lze jmenovat například pšenici (STOGER et al., 1999) či kukuřici (ZHAO-YU WANG et al., 2005).

Pro detekci a kvantifikaci GMO byl jako druhově specifický gen – endogen použit gen *UDP-glucose pyrophosphorylase*, který jakožto kontrola potvrzuje správný průběh PCR

reakce. MUWONGE (2005) pro tento účel použil gen pro patatin, hlavní zásobní protein bramborových hlíz. V práci WATANABE et al. (2004) byly použity primery pro *UGPase* gen, PŘIBYLOVÁ et al. (2006) detekovala gen pro trehalosa synthasu.

V této práci byl pro daný modelový případ stanoven detekční limit analýzy multiplex PCR 5 % kontaminace transgenu, metoda Real-Time PCR byla mnohem citlivější – detekční limit 0,01 %. Jelikož je v EU limit pro značení potravin obsahujících GMO 0,9 %, byla by pro tento účel vhodná pouze metoda Real-Time PCR. MATSUOKA et al. (2001) však uvádí detekční limit metody multiplex PCR 0,5 % u GM kukuřice. Další velmi citlivou metodou je detekce pomocí miročipů, kde LEIMANIS et al. (2006) určil detekční limit ve všech testech nižší než 0,3%, u většiny testů dokonce 0,1 %. Pomocí imunologických technik, jako je ELISA nebo western blot, lze určit přítomnost modifikovaného proteinu v rozmezí 0,3 – 1 % (AHMED, 2002).

## 6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace a porovnání metod založených na PCR pro detekci a kvantifikaci geneticky modifikovaných brambor. U geneticky modifikované odrůdy Desireé a kontrolní odrůdy Desireé byla stanovena přítomnost, resp. nepřítomnost transgenu *GNA* pomocí metody duplex PCR a následně kvantifikace tohoto transgenu ve vzorku metodou Real-Time PCR (qRT-PCR).

Pro metodu duplex PCR byl stanoven detekční limit reakce 5 % kontaminace transgenu (0,125 ng DNA transgenního organismu).

U metody qRT-PCR s detekčním systémem SYBR Green I. byl stanoven detekční limit 0,01 % a kvantifikační limit 0,05 %. Jelikož je v EU limit pro značení potravin 0,9 % obsahu GMO, ukázala se tato metoda jako vhodná pro kvantifikaci kontaminace GMO neznámého vzorku.



## 7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. **AHMED F. E. (2002):** Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.* 20: 216-223.
2. **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. *Eur Food Res Technol.* 214:3-26.
3. **BARREL P. J., SHANG Y., COOPER P. A., CONNER A. J. (2002):** Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 61-68.
4. **BOROVKOV, A.Y., P.E. MCCLEAN, J.R. SOWOKINOS, S.H. RUUD, AND G.A. SECOR. (1996):** Effect of expression of UDP-Glucose pyrophosphorylase antisense and ribozyme RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of transgenic potato plants. *J Plant Physiol* 147:644–652.
5. **BRIDGE P.D., ARORA D.K., REDDY C.A., ELANDER R.P. (1998):** Applications of PCR in Mycology. CAB International, Wallingford, UK, 376p.
6. **BONFINI L., HEINZE P., KAY S., VAN DER ERDE G. (2001):** Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection, Final report.
7. **DAVIES H.V. (1996):** Recent developments in our knowledge of potato transgenic biology. *Potato Research*, 39, 411–427.
8. **DONNA S. S., PHILIP W. M., SOLKE H. D. (2004).** Method for the detection of synthetic cry3A in transgenic potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 52:809-815.
9. **EBERLEIN C. V., GUTTIERI M. J., STEFFENCAMPBELL J. (1998):** Bromoxynil resistance in transgenic potato clones expressing the bxn gene. *Weed Science* 46, 2: 150-157.
10. **ENGVALL E., PERLMANN P. (1972):** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *The Journal of Immunology*, 109: 129-135.
11. **GATEHOUSE A.M.R., DOWN R.E., POWELL K.S., SAUVION N., RAHBE Y., NEWELL CH.A., MERRYWEATHER A., HAMILTON W.D.O., GATEHOUSE**

- J.A. (1996):** Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79, 295–307.
12. **HEERES P., JACOBSEN E., VISSER R.G.F. (1997):** Behaviour of genetically modified amylose free potato clones as progenitors in a breeding program. *Euphytica* 98: 169–175.
13. **HIGUCHI R., DOLLINGER G., WALSH P. S., GRIFFITH R. (1992):** Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* 10, 413 – 417.
14. **HURBURGH C.R., RIPPKE G.R., HEITHOFF C., ROUSSEL S.A., HARDY C.L. (2000):** Detection of genetically modified grains by near-infrared spectroscopy, p.12–17. In: *Proceedings PITTCON 2000 – Science for the 21st Century*, #1431. New Orleans.
15. **JAMES C. (2006):** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. *ISAAA Brief* No. 35.
16. **JEONG M.J., PARK S.C., BYUN M.O. (2001):** Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene transfer. *Molecules and Cells*, 12, 185–189.
17. **LEIMANIS S., HERNÁNDEZ M., FERNÁNDEZ S., BOYER F., BURNS M., BRUDERE S., GLOUDEN T., HARRIS N., KAEPPELI O., PHILIPP P., PLA M., PUIGDOMÉNECH P., VAITILINGOM M., BERTHEAU Y., REMACLE J. (2006):** A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology*. 61: 123-139.
18. **LEMIEUX, B., AHARONI A., SCHENA M. (1998):** Overview of DNA Chip Technology. *Molecular Breeding*, 4:277-289.
19. **LONGSTAFF M., EDMONDS H. S., NEWELL C. A. (1995):** An improved method for the detection and quantification of recombinant protein in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13:363–368.
20. **LUO S., ZHANGSUN D., TANG K. (2005):** Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 184-191.
21. **MA H., SHIEH K., CHEN G., QIAO X.T, CHUANG M. (2006):** Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2 (3).
22. **MANNERLÖF M., TENNING P. (1997):** Screening of transgenic plants by multiplex PCR. *Plant Mol Biol Rep* 15: 38-45.

23. **MACCORMICK C.A., GRIFFIN H.G., UNDERWOOD H.M., MASON M.J (1998):** Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. *J. Appl. Microbiol.* 84: 969-980.
24. **MATSUOKA T., KURIBARA H., AKIYAMA H., MIURA H., GODA Y., KUSUKABE Y., ISSHIKI K., TOYODA M., HINO A. (2001):** A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42: 28-32.
25. **MEYER R. (1999):** Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10. 391-399.
26. **MONROE D. (1984):** Enzyme Immunoassay. *Analytical Chemistry*, Vol. 56, No. 8, p920A-931A.
27. **MUWONGE A. (2005):** Detection of genetically modified potatoes by the polymerase chain reaction. School of Natural and Applied Sciences. Disertační práce.
28. **MŽP (2008):** Ministerstvo životního prostředí – registr povolených geneticky modifikovaných organismů, [www.env.cz](http://www.env.cz).
29. **NAVRÁTIL O. (2004):** Brambor jako geneticky manipulovaná rostlina. *Bramborářství*, 12, č. 3, s. 2-4.
30. **NOVÁKOVÁ A., ŠIMÁČKOVÁ K., KUBÁTOVÁ B., ČURN V. (2008):** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato, rukopis – odesláno do redakce *Euphytica*.
31. **ONDŘEJ M.:** Geneticky modifikované rostliny. In: Káš J. (2004): Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy. Vysoká škola chemicko-technologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, Praha.
32. **ONDŘEJ M., DROBNÍK J. (2002):** Transgenoze rostlin. Academia, Praha.
33. **OSUSKY M., OSUSKA L., HANCOCK R.E., KAY W.W., MISRA S. (2004):** Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research*, 13, 181–190.
34. **OVESNÁ J. :** Monitoring GMO v zemědělských a potravinářských produktech. In: Stejskal V., Kocourek F., Pažourková Z. (2005): Sborník ze semináře: Přínosy a rizika GMO využívaných v zemědělství a potravinářství ve vztahu k bezpečnosti potravin a k ochraně životního prostředí. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně. Str 16.
35. **OVESNÁ J., DĚDIČOVÁ L., HORÁČEK J., SADILOVÁ E., KUČERA L., MĚSKOVÁ L. (2002):** Comparison of Different PCR-based Protocols for Detection of Roundup Ready Soybean. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38, (1): 55–63.

36. **OVESNÁ J., KUČERA L., CHÁB D., POUCHOVÁ V. (2005):** Možnosti stanovení geneticky modifikovaných odrůd polních plodin. In: Sborník referátů ze VII. odborného a vědeckého semináře "Osivo a sadba", 10. února 2005, ČZU Praha, pp. 145-148.
37. **PADEGIMAS L., SHUL'GA, O.A., SKRIABIN, K.G. (1994):** Creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*, resistant to the herbicide phosphinothricin. *Molecular Biology*, 28, 437–443.
38. **PRIGLOVÁ M., KÖNIG J. (2002):** Kvantitativní PCR (Q-PCR). *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*; 11(2): 82-86.
39. **PŘIBYLOVÁ R., PAVLÍK I., ROZSYPALOVÁ Z., BARTOŠ M. (2006):** A PCR-based method for the detection of genetically modified potatoes by the gene *ac2* from *Amaranthus caudatus*. *Eur Food Res Technol.* 223: 139 – 142.
40. **PUSTERLA N., MADIGAN J.E., LEUTENEGGER C.M. (2006):** Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases. *J Vet Intern Med*;20:3–12.
41. **PUSZTAI A. (1991):** Plant Lectins. Cambridge University Press, New York.
42. **RAKOUSKÝ S., HRAŠKA M. (2007):** Transgenní plodiny - realita a perspektivy. In: Geneticky modifikované organismy v agroekosystému a jeho okolí. Sborník ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze, 18-23.
43. **ROGAN, G.J., REAM, J.E., BERBERICH, S.A. AND FUCHS, R.L. (1992):** Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1453–1458.
44. **ROUDNÁ M.:** Biologická bezpečnost v mezinárodním kontextu. In: Káš J. (2004): Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy. Vysoká škola chemicko-technologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, Praha.
45. **RØNNING S.B., VAĚTILINGOM M., BERDAL K.G., HOLST-JENSEN A. (2003):** Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol* 216:347-354.
46. **SAIKI R.K., SCHARF S.J., FALKOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERICH H.A., ARNHEIM N. (1985):** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, 230, 1350-1354.
47. **STAVE J. (1999):** Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. *Food Control* 10: 367–374.

48. **TANG K., TINJUANGJUN P., XU Y., SUN X., GATEHOUSE J.A., RONALD P.C., QI H., LU X., CHRISTOU P., KOHLI A. (1999):** Particle bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap sucking insect pests. *Planta* 208, 552-563.
49. **VAITILINGOM M., PIJNENBURG H., GENDRE F., BRIGNON P. (1999):** Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady<sup>WTM</sup> soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 5261-5266.
50. **VAN DER WILK F., POSTHUMUS-LUTKE WILLINK D., HUISMAN M.J., HUTTINGA H., GOLDBACH R. (1991):** Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Molecular Biology*, 17, 431–439.
51. **VILJOEN C.D., DAJEE B.K., BOTHA G.M. (2006):** Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labelling. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (2), pp. 73-82.
52. **WALLIS J.G., WANG H., GUERRA D.J. (1997):** Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Molecular Biology*, 35, 323–330.
53. **WATANABE T., KURIBARA H., MISHIMA T., KIKUCHI H., KODAMA T., FUTO S., KASAMA K., TOYOTA A., NOUNO M., SAITA A., TAKAHASHI K., HINO A., AKIYAMA H., MAITANI T. (2004):** New Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes. *Biol. Pharm. Bull.* 27(9) 1333—1339.
54. **WU G., SHORTT B.J., LAWRENCE E.B., LEVINE E.B., FITZ-SIMMONS K.C., SHAH D.M. (1995):** Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7, 1357–1368.
55. **ZDEŇKOVÁ K., JANOTOVÁ P., DEMNEROVÁ K.:** Detekce geneticky modifikovaných organismů v potravinách a potravinářských surovinách. In: Káš J. (2004): Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy. Vysoká škola chemicko-technologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, Praha.
56. **ŽEL J., CANKAR K., RAVNIKAR M., CAMLOH M., GRUDEN K. (2005):** Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection. *Accred Qual Assur.* 10: 531-536.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

bp	- pár bází
CaMV	- žilková mozaika kvěťáku (cauliflower mosaic virus)
cDNA	- komplementární DNA
CPB	- Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti
CTAB	- cetyltrimetylamoniumbromid
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
ELISA	- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENGL	- European Network of GMO Laboratories
EPSPS	- 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza
Et-Br	- ethidiumbromid
FRET	- přenos energie fluorescenční rezonancí
GBSS	- granule-bound starch synthase
GMO	- geneticky modifikované organismy
GNA	- lektin ze sněženky ( <i>Galanthus nivalis</i> agglutinin)
HPLC	- vysokotlaká kapalinová chromatografie
HPLC-MS	- vysokotlaká kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní ionizační spektrometrií
IAA	- kyselina indolyl-3-octová
ISAAA	- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications
nptII	- neomycin phosphotransferase II
ORF	- otevřený čtecí rámec
P-35S	- 35S promotoru z CaMV
PAGE	- polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	- polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PLRV	- virus svinutky bramboru (potato leaf roll virus)
QC-PCR	- kvantitativní kompetitivní PCR
qRT PCR	- PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase
RL	- referenční laboratoř
RNA	- ribonukleová kyselina
RPA	- ribonuclease protein assay
rpm	- otáčky za minutu

RT-PCR	- reversní transkripce – PCR
SBE	- starch branching enzymes
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	- 0,089 M Tris Base 0,089 M kyselina boritá 0,002 M Na <sub>2</sub> EDT A
TE pufr	- Tris – EDTA pufr
T-nos	- terminátor genu pro nopalín syntázu z <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
UDP	- glucose pyrophosphorylase
VÚB Havlíčkův Brod	- Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod
VÚRV Ruzyně	- Výzkumný ústav rostlinné výroby Ruzyně