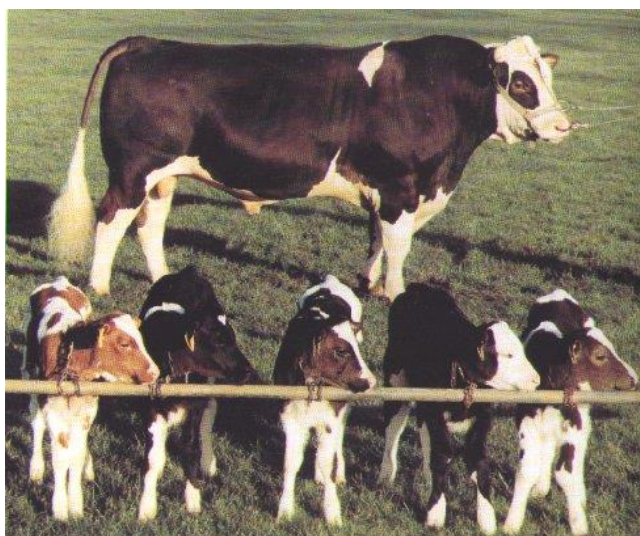


## Letní škola biofyziky 2024

### Detekce GMO v potravinách s využitím qPCR (alternativně PCR)

(Michal Berecka, Jitka Prachařová)

Organismy, jejichž genetická informace byla upravena genetickou modifikací, tedy způsobem, kterého nelze dosáhnout přirozenou rekombinací, se nazývají geneticky modifikované organismy (GMO). Na obrázku níže (Obr. 1) je první geneticky modifikovaný skot – býk Herman, do jehož embryonální buňky byl mikroinjektován lidský gen pro lactoferrin, kdy všechna jeho telata tento gen zdědila.

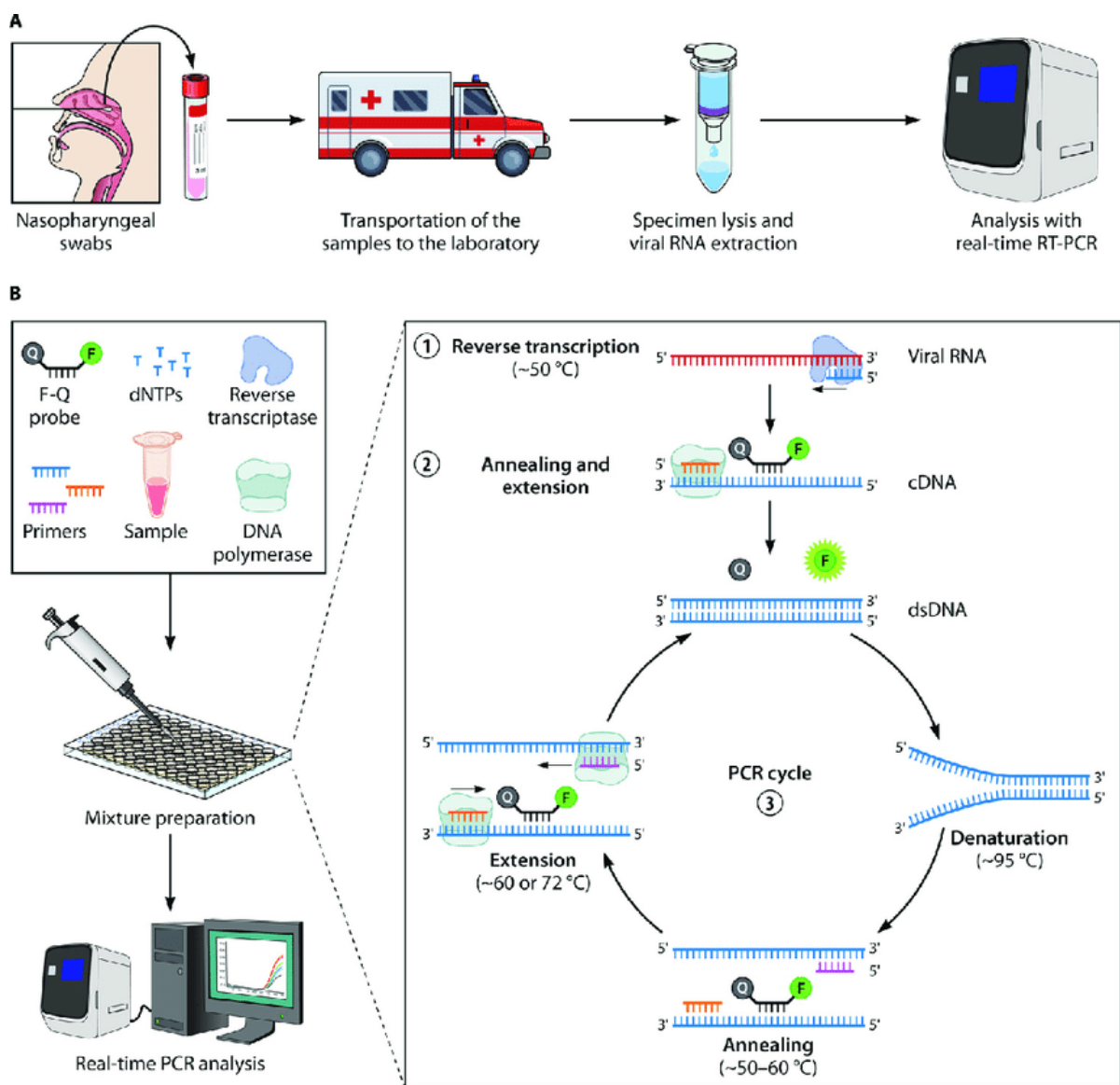


**Obr. 1:** Fotografie, na níž je zachycen první geneticky modifikovaný skot (r. 1990) – býk Herman, do jehož embryonální buňky byl mikroinjektován lidský gen pro lactoferrin, všechna jeho telata tento gen zdědila.

Genetické úpravy organismů mají v praxi různý smysl. Zejména se jedná o dosažení následujících cílů za pomoci metod genového inženýrství:

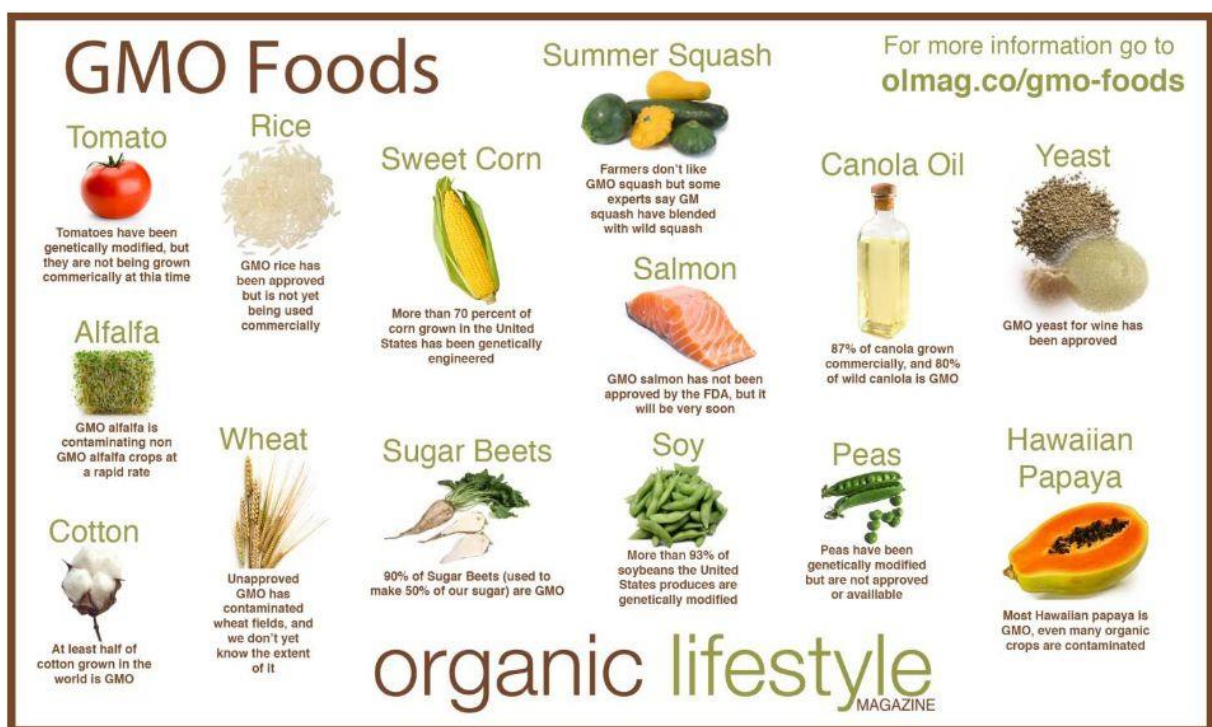
- ❖ **Zlepšení některých vlastností cílového organismu**  
(např. nižší potřeba vody u rostlin, zvýšení výnosů, vyšší odolnost proti škůdcům, delší trvanlivost potravin nebo vyšší obsah živin)
- ❖ **Získání nových poznatků ve výzkumu genů**  
(odhalení funkce určitých genů díky transgenním organismům, např. u „knock-out“ myši je vybraný gen uměle vyřazen z funkce)
- ❖ **Příprava léčiv a dalších látek bakteriemi či kvasinkami**  
(např. inzulin, hirudin, biopaliva)
- ❖ **Pěstování mikroorganismů vhodných pro odstraňování škodlivých látek z vody či půdy**  
(odstraňování odpadů biodegradací)
- ❖ **Léčba geneticky podmíněných chorob pomocí genové terapie**
- ❖ **Vývoj technologií genového inženýrství a ověření jejich funkčnosti**

Na studium GMO, jejich produkci a případné pěstování a využití v potravinářském průmyslu se v poslední době zaměřuje značná pozornost. V České republice je použití geneticky modifikovaných organismů upraveno zákonem, kdy je legislativně vyžadován také spolehlivý systém detekce GMO v potravinách, potravinářských surovinách a krmivech. Metody detekce jsou mimo jiné velmi často založeny na identifikaci GMO s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR). Podstatou PCR je amplifikace specifického produktu, kdy u kvantitativní PCR (qPCR) je možná detekce takového produktu (specifického úseku DNA) v reálném čase, v případě klasické PCR pak např. s využitím agarosové gelové elektroforézy. Podobná metoda detekce za pomoci qRT-PCR byla/je využívána také k identifikaci koronaviru SARS-CoV-2 (původce onemocnění covid-19) v biologických vzorcích (Obr. 2).



Obr. 2: Typické kroky při detekci SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR v reálném čase.

Mnohé GMO jsou dnes již běžně obsaženy v potravinách, jelikož některé suroviny použité při výrobě těchto potravin pocházejí např. z geneticky modifikovaných rostlin. Příklady „GMO food“ jsou uvedeny na Obr. 3. Transgenní rostliny jsou organismy, u kterých došlo k modifikaci genetického materiálu prostřednictvím technik genového inženýrství s cílem zlepšit jejich užité vlastnosti. Tato modifikace je záměrným a řízeným procesem, který se liší od přirozených genetických změn, které se vyskytují v důsledku evoluce nebo přirozeného výběru. Hlavním cílem těchto genetických manipulací je řešení problémů v zemědělství, zejména zvyšování produkce a snižování škod způsobených škůdci a patogeny. To je dosaženo například zvýšením odolnosti rostlin vůči škůdcům nebo zlepšením jejich schopnosti odolávat nemocem.



Obr. 3: Příklady GMO plodin.

Dalším běžným cílem genového inženýrství je vytvoření rostlin odolných vůči herbicidům. To umožňuje zemědělcům používat herbicidy k ničení plevelů bez poškození samotných plodin. Tato odolnost je obvykle dosažena vložením genu, který kóduje protein zajišťující odolnost rostliny vůči konkrétnímu herbicidu. Rostlina pak produkuje tento protein, což jí umožňuje přežít aplikaci herbicidu, zatímco plevely jsou zničeny. Je důležité poznamenat, že i když transgenní rostliny mohou přinést řadu výhod, jejich použití je také předmětem kontroverzí a diskusí, zejména v souvislosti s možnými dopady na životní prostředí a lidské zdraví. Proto je důležité, aby byly všechny genetické modifikace prováděny odpovědně a s přihlédnutím k potenciálním rizikům.



Relativně častou příměsí v potravinách je transgenní sója firmy Monsanto. Tato tzv. RoundUp Ready (RR) sója (Obr. 4) je nositelem genetické transformace zajišťující její toleranci vůči totálnímu herbicidu RoundUp. Základním principem této tolerance je fakt, že transgen umožňuje produkci modifikovaného enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSP) tolerantní vůči účinné látce herbicidu, glyfozátu. Před gen rezistence je v sóji vložen 35 S promotor CaMV. Tento promotor pak umožňuje nepřímou detekci transgenu. Součástí všech transgenů musí být selekční markery, které umožní jejich detekci.



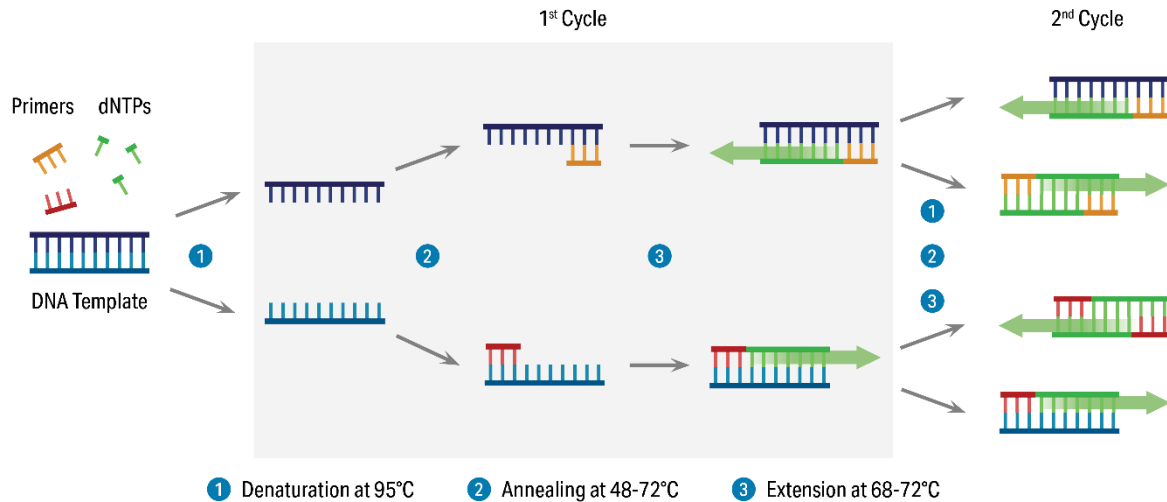
Obr. 4: RoundUp Ready (RR) sója je příměsí mnoha potravin.

V rámci této úlohy Letní školy biofyziky bude detekována exprese výše zmíněného transgenu ve vzorcích potravin (Margot tyčinka, sójový suk či mouka, apod.) s využitím qPCR (alt. PCR + elektroforéza). Studenti si tedy budou moci osvojit přípravu vzorku zahrnující izolaci DNA z potravin a seznámí se také s podstatou a provedením zmíněné qPCR. Navíc bude možné potvrdit či vyvrátit přítomnost RR sóji v GMO free potravinách sóju obsahujících. Podle české legislativy musí být potraviny obsahující více než 0,9 % geneticky modifikované složky označeny.

Polymerázová řetězová reakce je základním nástrojem molekulární biologie a její význam roste i v dalších oborech, jako je botanika a kriminalistika. Hlavní podstatou samotné PCR je amplifikace, neboli mnohonásobná replikace. Tento proces umožňuje zvýšení počtu kopií specifických úseků DNA (např. zmíněného transgenu). Lze jej s nadsázkou přirovnat k řetězové reakci při výbuchu atomové bomby, kde se produkty hromadí geometrickou řadou.

Klíčovou roli v tomto procesu hraje termostabilní DNA-polymeráza. Tato enzymatická molekula je schopná syntetizovat komplementární vlákno DNA podle templátového vlákna DNA. DNA-polymeráza je schopná syntetizovat druhé vlákno

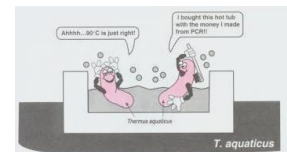
pouze od 3'-konce krátkého již existujícího jednovláknového úseku druhého vlákna, který se nazývá primer. Pokud se dva primery váží na dvě denaturovaná komplementární vlákna protisměrně, dojde k množení, neboli amplifikaci, vymezeného úseku DNA (Obr. 5). Tento proces je základem mnoha moderních biotechnologických aplikací.



**Obr. 5:** Princip PCR reakce, která sestává z několika cyklicky se opakujících kroků. (Převzato z: <https://www.stratec.co.uk/aat-bioquest/real-time-pcr-qpcr/>)

Celkově jsou pro PCR tedy třeba následující komponenty:

- ❖ **Templátová DNA** (vzorek k amplifikaci)
- ❖ **Primery** (krátké specifické úseky DNA zaručující specifitu amplifikace)
- ❖ **dATP, dTTP, dCTP, dGTP** (volné stavební jednotky DNA)
- ❖ **Termostabilní DNA polymeráza** (např. *Taq* z bakterie *Thermus aquaticus* či *Pfu* z *Pyrococcus furiosus*)
- ❖ **Pufř a soli** (KCl, MgCl<sub>2</sub>)

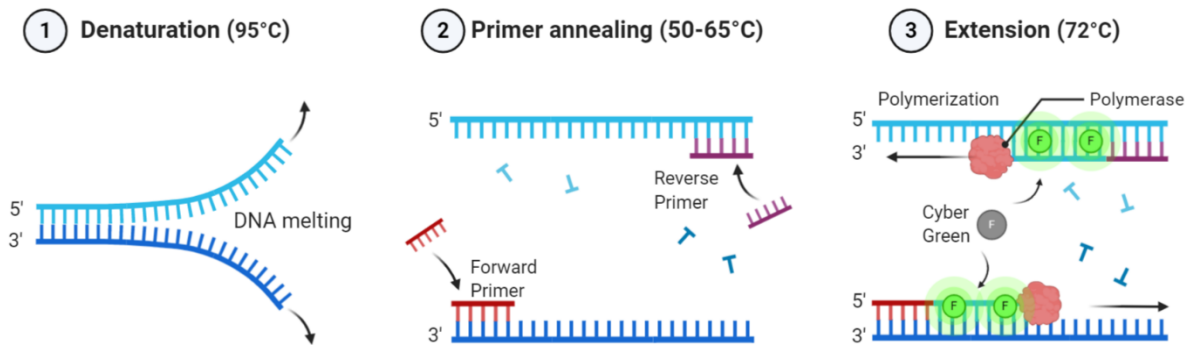


Za pomoci výše uvedených komponent a dochází k amplifikaci (zmnožení) DNA nebo RNA (potom RT-PCR, reverzní transkripce), v našem případě cílového transgenu. Samotná PCR pak zahrnuje několik opakování odlišných reakcí, které tvoří cyklus:

1. DNA templát je denaturován (oddělení řetězců – separace dsDNA).
2. Annealing, navázání primerů (hybridizace) na oddělené řetězce templátu. Primery se volí tak, aby byla amplifikována celá cílová sekvence.
3. Polymerace - tvoří se nové komplementární řetězce, působení polymerázy.

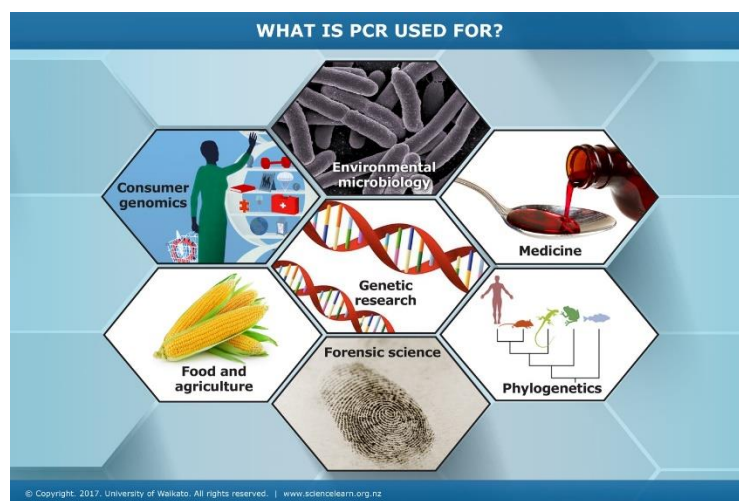
Vše probíhá pomocí změn teploty v přístroji zvaném termocycler.

Produkty PCR se analyzují elektroforézou (dle velikosti), jinou možností je hybridizace se značenými oligonukleotidy, detekce značenou protilátkou nebo kvantifikace produktu během reakce. Při modifikaci zvané kvantitativní PCR (qPCR; Obr. 6) je amplifikovaná DNA detekována v exponenciální fázi citlivými on-line metodami přímo v real-time termocycleru. Pro detekci se běžně využívají barviva jako SYBR Green (vmezeřuje = interkaluje do dvojvlákonové dsDNA) či různé modifikované oligonukleotidové DNA sondy, které hybridizují s komplementární DNA a následně fluoreskují.



**Obr. 6:** Princip qPCR s využitím barviva SYBR Green  
(Převzato z: <https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/real-time-pcr-qpcr/>)

PCR je tedy metodou molekulární biologie, která je dnes již běžně využívána v mnoha dalších odvětvích (Obr. 7), například pro: sekvenování DNA, vytváření fylogenetických stromů podle DNA, analýzu genů, kvantifikaci množství cílové sekvence DNA/RNA ve vzorku (qPCR), analýzu genové exprese (RT-PCR), identifikaci dědičných chorob, jednoznačnou identifikaci osob metodou genetické daktyloskopie, diagnostiku infekčních nemocí, zjišťování přítomnosti úseku genetické informace DNA nebo RNA (např. pro určení virové nebo bakteriální nákazy). Vy si budete moci tuto metodu osobně vyzkoušet při detekci RR sóji v potravinách.



**Obr. 7:** Příklady využití PCR.

## Úloha : Proved'te detekci GMO (RR sója) v potravinách pomocí PCR

(alt. qPCR, pokud bude k dispozici příslušné vybavení a chemikálie))

Pomůcky: erlenmayerovy baňky, předvážky, lžičky, elektroforetická aparatura, odměrný válec, třecí miska, centrifuga, vortex, automatické pipety, špičky, mikrozkuhavky, chlazený stojánek nebo led, vykuová odparka, termoblok, termocycler, mikrovlnná trouba, UV transluminátor, fotoaparát

Materiál a chemikálie:

- 1) Vzorky potravin (sójová tyčinka, sójová mouka, tyčinka Margot apod.)
- 2) S1 pufr (10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM Tri/HCl, pH 7,5; 0,5% Triton X-100; sterilizace autoklávováním, uchování v -20°C)
- 3) S2 pufr (1% SDS; sterilizace autoklávováním, uchování v -20°C)
- 4) S3 pufr (3M Octan draselný, sterilizace autoklávováním, uchování v -20°C)
- 5) TE pufr (10mM Tris-HCL, pH 8,0; 1mM EDTA)
- 6) Agaróza pro elektroforézu
- 7) Ethidium bromid
- 8) JumpStart *Taq* DNA Polymeráza (*Enzym je dodáván s odpovídajícím reakčním pufrem s MgCl<sub>2</sub>*).
- 9) Směs dNTPs (dTTP, dGTP, dATP, dCTP)
- 10) Syntetizované oligonukleotidy „primery“:  
35SF 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A3'  
35SR 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA3'
- 11) Vzorkovací roztok bromfenolové modři 6x
- 12) Standard molekulové váhy: 100 bp DNA ladder
- 13) TAE pufr
- 14) Izopropanol, ledový 70% etanol

Postup:

Izolace DNA z potravin:

1. Ze vzorku potravin navažte 0,1 g.
2. Vzorek homogenizujte v třecí misce (tyčinku Margot homogenizujte v tekutém dusíku).
3. K homogenizovanému vzorku přidejte 1 ml pufru S1, rozetřete podle potřeby a přeneste vzorek do mikrozkuhavky.
4. Třepejte na vortexu po dobu 10 min.

5. Centrifugujte 5 min při 13000g.
6. Supernatant přeneste do čisté 2 ml mikrozkušavky, přidejte 0,3 ml pufru S2.
7. Promíchejte několikerým obrácením zkumavky a inkubujte na ledu po dobu 5 min.
8. Centrifugujte 10 min.
9. Supernatant přelijte do čistých 2 ml mikrozkušavek, připipetujte 0,03 ml pufru S3, promíchejte několikerým otočením mikrozkušavky a nechte inkubovat na ledu 5 min.
10. Přidejte 0,5 ml izopropanolu (laboratorní teploty) a centrifugujte 20 min.
11. Slijte supernatant.
12. Precipitát promyjte 0,5 ml ledového 70% etanolu a centrifugujte 5 min.
13. Supernatant odstraňte, případné zbytky nechte vytéct z obrácené zkumavky, ústí osušte pomocí tamponu či buničité vaty.
14. Vyizolovanou DNA vysušte ve vakuu při teplotě 55°C (po dobu cca 30 min).
15. Izolovanou DNA rozpusťte v 0,03 ml TE pufru.

Příprava reakční směsi a provedení PCR (případně upravit pro qPCR):

1. Založte nový program na termocycleru:

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	94°C	1 min	1x
PCR amplifikace	94°C	30 s	30x
	55°C	30 s	
	72°C	1 min	
Melting 70-95°C	72 °C	1 min	

2. Připravte požadované složky „premixu“, zamražené zásobní roztoky rozejděte (v ruce).
3. Podle počtu vzorků a zvoleného objemu reakce připravte „premix“. Jednotlivé složky premixu přidávejte přesně dle pořadí v následující tabulce:

Chemikálie	1 reakce
dH <sub>2</sub> O → celkový objem 50 µl	35,6 µl
10x Thermo-start Buffer (1x)	5 µl
10 mM dNTP (0,2 mM)	1 µl
20 µM Primer 35SF (0,5 µM)	1,25 µl
20 µM Primer 35SR (0,5 µM)	1,25 µl
2,5 U/µl JumpStart <i>Taq</i> Polymerase (0,05 U/µl)	1 µl
Templát (DNA) 10 ng	5 µl



4. Po důkladném promíchání (vortex) a odstředění (minicentrifuga) rozpipetujte „premix“ do připravených PCR mikrokumavek. Přidejte vzorek.
5. Opět promíchejte, odstředte a vložte do cycleru.
6. Po proběhnutí reakce proveďte analýzu vzorků pomocí nativní agarosové gelové elektroforézy.

**POZOR! Během přípravy PCR reakční směsi je důležité dodržovat následující pravidla:**

- Reakční směs připravujeme a pracujeme s ní vždy v chlazených zkumavkách (chladicí stojánek, ledová tříšť).
- S *Taq* polymerázou manipulujeme jen po nezbytnou dobu, vždy ji chladíme a ihned po použití ukládáme zpět do mrazicího boxu.
- Pipetovací špičky, které používáme k přípravě zásobních roztoků a premixu, nikdy nepoužijeme k pipetování vzorků nebo produktů reakce. Podobně nemůžeme stejnou pipetu používat k pipetování vzorků a produktů. (Podobně jednotlivé složky reakční směsi pipetujeme novými špičkami.) V těchto případech hrozí nebezpečí kontaminace, kdy jsou výsledkem falešné pozitivní reakce.

Nativní agarosová gelová elektroforéza:

(v případě využití qPCR se nemusí provádět, bude záležet na časové dotaci cvičení)

1. Spočítejte, jak budete ředit zásobní roztok TAE 50x, abyste dostali pracovní roztok o potřebné koncentraci 1x a připravte si 300 ml pracovního roztoku.
2. Připravte si vaničku na gel a vyvažte ji do roviny. Zasaďte do otvorů hřebínek vhodné velikosti, který v gelu vytvoří jamky pro nanesení vzorků.
3. Odvažte si 0,4 g agarosy do erlenmayerovy baňky a zalijte jej 40 ml TAE 1x (1% gel).
4. Suspenzi dejte rozvařit na 5 min do mikrovlnné trouby, hlídejte, ať se neodpaří veškerá tekutina, v případě potřeby ji doplňte. Gel nechejte třikrát zavřít.
5. Počkejte na schládnutí gelu na cca 40-50 °C přidejte 4 µl ethidim bromidu a poté jej vlejte do připravené vaničky na gel, nechejte ztuhnout.
6. Ze ztuhlého gelu opatrně odstraňte hřebínek. Umístěte gel do elektroforetické vany a opatrně jej zalijte pufrem TAE 1x (s 5 µl EtBr na 100 ml pufru) po rysku na vaně.
7. Odeberte 5 µl PCR produktu a smíchejte s 2 µl BFM, naneste na gel.
8. Nakonec naneste na gel i standard molekulové hmotnosti (DNA ladder).

9. Na elektroforetickém zdroji nastavte konstantní napětí 80 V a připojte elektroforetickou komůrku ke zdroji.
10. Spusťte separaci a vzorky nechejte dělit, aby zóna BFM doputovala přibližně do poslední čtvrtiny gelu (cca 1 hodinu).
11. Vypněte zdroj a vaničku odpojte od zdroje napětí.
12. Vytáhněte opatrně gel a opláchněte jej destilovanou vodou.
13. Výsledek separace si prohlédněte a zaznamenejte pomocí transluminátoru a fotoaparátu.
14. Podle standardu určete přibližnou velikost DNA produktu/produktů a zhodnoťte výsledek detekce.