

Vlevo mapa zaznamenaných výskytů nutrie na území ČR (bílé body — náhodný výskyt zvířat uniklých ze zajetí, červené body — stálý výskyt v letech 2000–2004) ♦ Výskyt nutrií v ČR podle nadmořské výšky, vpravo; n — celkový počet výskytů. Orig. M. Anděry

dou (že by jeden z důkazů pozvolného oteplování klimatu)?

Také druhá otázka je poměrně důležitá a aktuální: jak dál a co s nutrií? Jako zavlečený, v přírodě nežádoucí druh může být za stanovených podmínek usmrcována a je třeba dělat vše, aby se literě zákona dostalo. Neexistuje totiž jediný seriózní argument, který by přítomnost či další rozšiřování nutrií v naší přírodě ospravedlnil či podpořil. Zvířena savců stanovišť břehové-

ho typu je již dlouho pod silným antropickým tlakem — vyhubení bobra evropského (*Castor fiber*) a norka evropského (*Mustela lutreola*), někdejší omezení a lokální vytlačení vydry říční (*Lutra lutra*), vysazení ondatry pižmové (*Ondatra zibethicus*) a v poslední době živelná expanze norka amerického (*M. vison*) doprovázená invazí psíka mývalovitého (*Nyctereutes procyonoides*) a počáteční fází imigrace mývala severního (*Procyon lotor*) — a řadí se

k nejvíce postiženým složkám naší současné krajiny (a to pomijíme ekologický šok způsobený zregulováním přirozeně meandrujících řečišť). Je proto žádoucí situaci spíše zklidnit, a ne přidávat dalšího exota. Problematika nutrií je o to závažnější, že procházíme obdobím zdárného zotavování bobříků populací, a zatím nevíme nic o tom, jak by oba druhy na sebe v našich podmínkách reagovaly. Využití nutrií pro kožezářinu či maso nechtě zůstane záležitostí chovů, ale z jejího výskytu ve volné přírodě se snažme udělat jen krátkou epizodu pro pamětníky.

Zjištění geneticky modifikované řepky olejky metodou PCR



Lukáš Kadeřábek, Kamila Zdeňková

Práce vznikla v rámci projektu Otevřená věda

Řepka olejka (*Brassica napus*) je jednoletá až 120 cm vysoká rostlina z čel. brukvovitých (*Brassicaceae*). Patří mezi základní zemědělské plodiny. Nejvýraznější je na jaře v období květu (duben, květen), kdy svým žlutým zbarvením dotváří ráz celé krajiny. Pěstování řepky olejky je významné zejména pro produkci kaloricky a nutričně vysoce hodnotných olejů s širokým uplatněním nejen v potravinářském průmyslu, ale i v dalších odvětvích (např. výroba mýdel, bionafty). Zbytky z výroby olejů je možné zpracovat v zemědělství (pokrutiny se využívají jako krmivo pro hospodářská zvířata). Nezanedbatelné je i to, že je v období květu velice ceněna jako medonosná rostlina. Pro tyto kvality se hojně pěstuje obzvláště v mírných pásech obou polokoulí. Česká republika se již několik let drží na žebříčku pěti největších světových producentů řepky a její sklizeň v r. 2006 přesáhla hranici 800 tisíc tun.

Jelikož jde o komerčně velice zajímavou plodinu, nikoho nepřekvapí, že již na počátku 90. let 20. stol. byly ve Spojených státech amerických testovány první geneticky

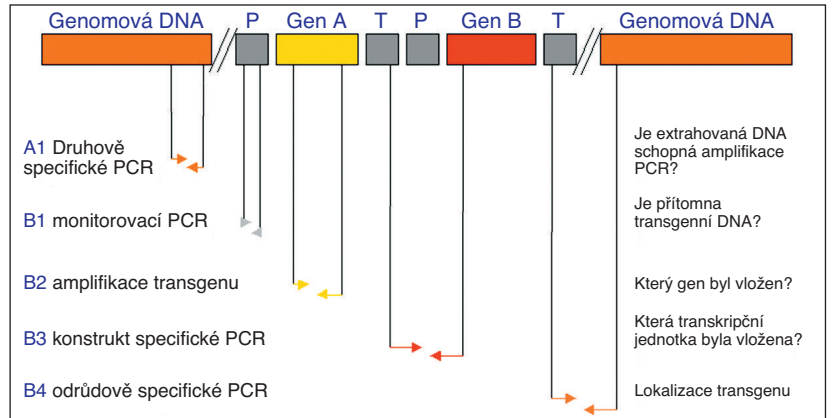
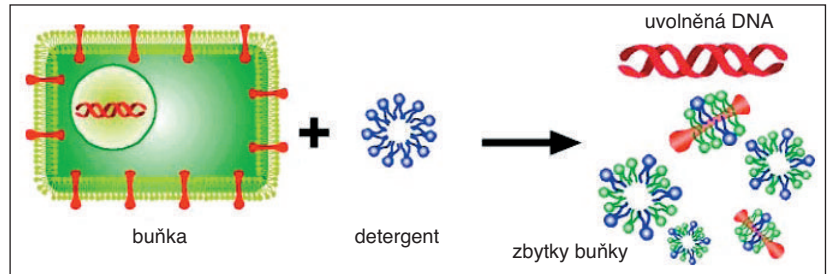
modifikované odrůdy řepky. Šlo zejména o rostliny produkující velké množství vyšších mastných kyselin, hlavně kyseliny laurové a myristové, dále pak kyseliny olejové. Vzápětí se začaly testovat i odrůdy odolné proti herbicidům (většinou na bázi glyfozátu nebo fosfinitricinu) s vloženým genem pro pylovou sterilitu. V dnešní době je oficiálně známo 15 geneticky modifikovaných odrůd řepky olejky, povolených zejména v Kanadě a v USA. V Evropě podléhá příprava, testování, distribuce a využívání geneticky modifikovaných odrůd rostlin platné legislativě Evropské unie, která se řídí principem předběžné opatrnosti a jejíž podstatnou a významnou částí je důkladné hodnocení případného rizika dané odrůdy. Na základě této legislativy vyplývá povinnost značit potraviny a krmiva obsahující více než 0,9 % geneticky modifikované složky. Česká republika se jako jeden ze států Evropské unie řídí těmito směrnice-mi. Nakládání se všemi geneticky modifikovanými organismy (GMO) podléhá v ČR zákonu č. 78/2004 Sb. ve znění novely č. 346/2005 Sb. Z legislativních požadavků

tak vyplývá potřeba zavedení spolehlivého, účelného a rychlého kontrolního systému pro detekci — zjištění GMO v potravinách a potravinářských surovinách.

V rámci roční stáže se první z autorů věnoval možnosti použití metody polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) pro stanovení přítomnosti geneticky modifikované řepky olejky. Jako vzorky používal drcená semena standardní, komerčně dostupné geneticky nemodifikované řepky, pro pozitivní test přítomnosti geneticky modifikované řepky použil vzorek semen odrůdy Roundup Ready (řepka olejka s tolerancí k herbicidu glyfozátu).

Pro potřeby PCR izoloval DNA ze semen metodou založenou na narušení a rozpuštění (lyze) rostlinných buněk pomocí povrchově aktivní látky cetyltrimetylammonium bromid (CTAB). Metoda byla upravena v laboratoři Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pro izolaci DNA z rostlinného materiálu. V krátkém čase dochází k navázání detergentu na membránu, což způsobí požadovanou lyzi buňky (viz obr.). DNA se uvolní do roztoku a zbytky buněk se odstraní postupným odstředěním. Další část izolačního postupu je zaměřena na vyčištění — purifikaci DNA a odstranění balastních látek či případných inhibitorů. Pomocí organických rozpouštědel (chloroformu, případně směsi isoamylalkoholu a chloroformu) dochází k odstranění hydrofobních látek (lipidy a polyfenoly) a precipitaci bílkovin. Posledním krokem izolace bývá srážení, přečištění a rozpouštění získané DNA ve vhodném roztoku (nejčastěji voda zbavená nukleáz či TE pufr).

Samotná PCR je enzymová metoda umožňující mnohonásobné namnožení defino-



Řepka olejka (*Brassica napus*), převzato z knihy F. E. Köhlera *Medicinal-Plants* (nakladatelství Gera Untermbaus, 1887)

Vpravo nahoře lyze buňky pomocí povrchově aktivní látky (detergentu) CTAB. Upraveno podle stránek Vzdělávacího centra genetiky při Univerzitě v Utahu

Vpravo dole předem připravená rostlinná transkripční jednotka (konstrukt) obsahující promotor (P), kódující sekvence (A, B) a terminátor (T). Dále jsou znázorněny rozdílné pozice komplementárních primerů a informace, které je možno získat z výsledků polymerázové řetězové reakce (PCR). Pokud jsou v dané reakci použity primery komplementární ke genomové DNA, ze získaných výsledků můžeme určit, je-li izolovaná deoxyribonukleová kyselina schopna namnožení procesem PCR (viz schéma — úroveň A1, druhově specifické PCR). V případě použití primerů komplementárních k regulačním sekvencím mohou získané výsledky potvrdit přítomnost transgenové DNA v testovaném vzorku potraviny nebo potravinářské suroviny (úroveň B1, monitorovací PCR). Prostřednictvím primerů nasedajících uvnitř transgenové DNA bývá určen vložený gen (úroveň B2, amplifikace transgenů). Primery komplementární k regulační sekvenci a genu určují vloženou transkripční jednotku (úroveň B3, konstrukt specifické PCR) a primery amplifikující úsek mezi regulační sekvencí a genomovou DNA určují druh transgenového organismu (úroveň B4, odrůdově specifické PCR). Upraveno podle K. Zdeňkové a kol. (2002)

vaných úseků DNA v podmínkách *in vitro*. K tomu je zapotřebí dvou specificky navržených oligonukleotidových primerů, komplementárních k 3' a 5' koncovým sekvencím cílového úseku. Pro úspěšnou detekci pomocí PCR je důležité zvolit vhodné sekvence a koncentrace primerů. Jejich umístění ovlivňuje informační hodnotu získaných výsledků (viz obr.). Základními parametry určujícími spolehlivý průběh jednotlivých fází PCR je teplota a trvání jednotlivých reakčních kroků. Důležitá je také kvalita a kvantita cílové DNA (sloužící jako předloha — templát pro reakci) a komplementárních oligonukleotidových primerů, použitých dostatečně termostabilní DNA polymerázy (stále i při teplotě vyšší než 94 °C) a dostatečné množství všech čtyř deoxyribonukleotidů (adenosintrifosfát, guanosintrifosfát, thymidintrifosfát a cytidintrifosfát). Reakce probíhá v pufru obsahujícím hořčičnaté ionty nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy.

V první fázi dochází při teplotě 94–96 °C k teplotnímu oddělení (denaturaci) řetězců dvoušroubovice templátové DNA. Druhým krokem je připojení primerů ke komplementárním úsekům na řetězcích cílové DNA, které obvykle probíhá při teplotě 50–65 °C. Poslední fází je prodloužení (elongace) primerů pomocí DNA polymerázy (nejčastěji při teplotě 72 °C). Následně se celý cyklus opakuje. Tím dochází k syntéze úseku ohraničeného primery, který tvoří hlavní produkt reakce. Počet cyklů (zpravidla 35 až 50) závisí na koncentracích poměrech v reakční směsi, požadovaném výtěžku a životnosti enzymu. Jelikož počet kopírovaných úseků narůstá geometrickou řadou, umožňuje nám tato metoda mnohonásobné namnožení cílového úseku DNA během několika hodin.

Pro správný průběh reakce je nezbytné dodržení přesných teplotních režimů v průběhu cyklů. Proto se pro tyto účely používají zvláštní přístroje — programovatelné termocykléry (schopné přesně

udržovat naprogramované teplotní režimy v daných časových mezích). Následuje identifikace, separace a purifikace (oddělení a vyčištění) stejně dlouhých namnožených úseků DNA získaných pomocí PCR (tzv. amplikonů), nejčastěji elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Vyhodnocení PCR je velmi důležité, při použití nevhodných primerů nebo reakčních podmínek může totiž dojít k amplifikaci jiného úseku DNA o podobné velikosti jako úsek požadovaný. Při elektroforéze se kvantita a kvalita produktu odhaduje porovnáním rozdělených namnožených úseků DNA se standardem známých molekulových hmotností, případně se provede restriční štěpení vzniklých PCR produktů.

V rámci svého projektu první z autorů v literatuře vyhledal již ověřené primery vhodné pro důkaz transgenů přítomného v geneticky modifikované řepce. Pro zajištění přesného teplotního režimu PCR si naprogramoval celý průběh reakce na termocykléru Biometra T-Gradient. K vyhodnocení výsledků reakce použil metodu horizontální agarózové elektroforézy. Pro odhalení možného znečištění či případné kontaminace, která by mohla zkreslit získané výsledky, mezi vzorky zařadil i pozitivní a negativní kontrolu. Jako pozitivní kontrolu použil semena téže odrůdy řepky s ověřenou přítomností hledaného transgenů, jako negativní kontrola postačila voda zbavená nukleáz.

Popisovaná metoda PCR se běžně používá pro rychlé analýzy mnoha vzorků. Nevýhodou jejího použití pro detekci GMO je, že touto metodou může být prokázána pouze přítomnost sekvencí komplementárních ke zvoleným primerům. Tímto postupem není možné stanovit koncentraci transgenové DNA ani prokázat její integraci do genomu rostliny.

Ve své další práci by autoři rádi navrhli vlastní primery a fluorescenčně značené sondy pro PCR s fluorescenční detekcí

v reálném čase (Real on Time PCR, qRT PCR) pomocí programu Primer express® v.2.0. Dále by první autor ověřil vhodnost jejich praktického využití pro detekci geneticky modifikované řepky. Hlavní výhodou qRT PCR oproti klasické PCR je možnost sledování celého průběhu amplifikační reakce, k detekci vznikajícího produktu jsou použity různé systémy založené na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Dalšími výhodami qRT PCR jsou možnosti kvantifikace obsahu geneticky modifikované složky a sledování vlivu inhibitorů na průběh reakce.

První autor je studentem Gymnázia Litoměřická v Praze 9. V laboratoři Ústavu biochemie a mikrobiologie při Vysoké škole chemicko-technologické v Praze pracoval na tématu detekce geneticky modifikované řepky pod odborným vedením K. Zdeňkové a K. Demnerové.