

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 11

Série 3

Milé řešitelky, milí řešitelé,

Právě nahlížíte do poslední letošní série našeho 11. ročníku biologického korespondenčního semináře Biozvěstu. Můžete se těšit na otázky z genetiky i témata jako je genové inženýrství, klonování, základní molekulární techniky nebo prověření toho, jak dýchá vodní hmyz. V praktické úloze se zaměříme na denní i noční motýly. Seriálová úloha nás tentokrát provede v omylech vědy.

Letošní expedice nás zavede v termínu **24.–28. 5. 2024** do Bílých Karpat. Zatím můžeme prozradit, že se na expedici, která je určena letošním nejlepším řešitelům, můžete opět těšit na demonstrace organismů v terénu, menší přednášky i slavnostní vyhlášení celého ročníku a mnoho dalšího. **Informace ohledně letošní expedice i registrace budou upřesněny a včas se je dozvíte emailem.**

Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na [internetové stránce Biozvěstu](#) (nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplíte (pouze v případě, že je tato série vaše první řešení v rámci aktuálního ročníku; **přidat se můžete kdykoli v průběhu roku**). Úlohy vám budeme zasílat automaticky na e-mailovou adresu uvedenou v přihlášce. Pokud budete chtít ukončit odběr novinek o Biozvěstu, napište nám e-mail.

Dále se k nám můžete připojit prostřednictvím [Facebooku](#), [skupiny „Biozvěst“](#), kde lze probírat aktuality a diskutovat dle libosti. Nově nás můžete sledovat též na Instagramu (<https://www.instagram.com/biozvest/>).

Vaše řešení nám posílejte na adresu biozvest@gmail.com

Nejpraktičtější formou řešení bude prostý text v e-mailu, ale přijímáme veškeré formáty příloh. Každou úlohu pište do samostatného e-mailu a v předmětu uveďte **Ročník-Série-Úloha-Jméno Příjmení**, např. **11-3-2-Bioslav Biomilný** v případě druhé úlohy třetí série aktuálního ročníku. Moc nám pomůže, když uvedený zápis dodržíte (na jeho základě si došlá řešení filtrujeme).

Uzávěrka 3. série: 21. 4. 2024 ve 23:59.

Po oficiální uzávěrce necháváme pro opozdilce tzv. „penalizační týden“, kdy ještě můžete zasílat svá řešení, budou Vám bodově ohodnocena, ale musíte již počítat s bodovou penalizací. Strhávat se bude 1 bod za každý den v každé úloze, která v tomto období přijde. Maximální ztráta za úlohu je tedy - 7 bodů, pošlete-li úlohu v nejpозdějši možný termín a zároveň minimální počet bodů za řádně řešenou úlohu po penalizaci nebude nikdy nižší než 1 bod. **Penalizační týden končí 28. 4. 2024 ve 23:59, po této době již nelze přimout žádná řešení.** Další den, tj. 29. 4. 2024, bude vydáno autorské řešení pro 3. sérii.

Hodnocení Vašich řešení i třetí výsledkovou listinu dostanete e-mailem. Tato finální výsledková listina bude zveřejněna na našich stránkách po ukončení expedice 2024, kde budou výsledky letošního ročníku slavnostně vyhlášeny.

Nelekejte se, když Vám přijdou úlohy na první pohled příliš těžké, ponořte se do informačních zdrojů a uvidíte, že na vše lze někde nalézt odpověď. Dobré tipy k řešení naleznete také na stránce Biozvěstu v sekci „Návody“. **Není nutné, abyste kompletně vyřešili všechny úlohy a asi se to ani nikomu nepodaří, stačí odeslat libovolně velký fragment. Vždy ale odpovídejte svými slovy; překopírování textu odjinud je velmi ošemetné. Když už se k němu uchýlíte, vždy**

uveďte zdroj.

Oceníme, pokud připišete jakékoliv nápady či připomínky (např. úloha byla příliš lehká/těžká, nesrozumitelná, nudná), úlohy se pokusíme tvořit k Vaší maximální spokojenosti.

Veškeré dotazy či připomínky směřujte na adresy biozvest@gmail.com či ell.psenickova@seznam.cz (na druhé adrese máte větší šanci na rychlé zodpovězení otázky), nebo na e-mailové adresy autorů konkrétních úloh. Kontakty naleznete na webu Biozvěstu. Biodiverzitě a řešení Biozvěstu zdar!

za celý kolektiv autorů Biozvěstu

koordinátorka
Eliška Pšeničková

Úloha 1: Bioslavovo fluorescenční akvárium

Autor: Kateřina Čermáková

Počet bodů: 23

Bioslavovi se zastesklo po nějakém zajímavém domácím mazlíčkovi, který by dostatečně seděl do domácnosti nadšeného biologa. Po chvíli přemýšlení mu na mysl vytanuly pestrábarevné svítící rybičky s fluorescenčními proteiny, které se v USA komerčně prodávají a o nichž se kdysi doslechl na jakési přednášce z genetiky. Geniální nápad! Po chvíli však zjistil, že mu v nákupu takového mazlíčka překáží evropská legislativa, neboť u nás není komerční chov těchto geneticky modifikovaných rybiček legální. Bioslav se nápadu na neonové akvárium nechtěl vzdát. Vypůjčil si od jednoho nejmenovaného kamaráda – molekulárního biologa – potřebné laboratorní vybavení a chemikálie a jal se vyrábět transgenní rybičku.



Obr. 1: Různé druhy transgenních rybiček s vloženými fluorescenčními proteiny. Převzato z: <https://www.bizjournals.com/austin/news/2017/08/23/austin-company-behind-glow-in-the-dark-fish-in-pet.html>

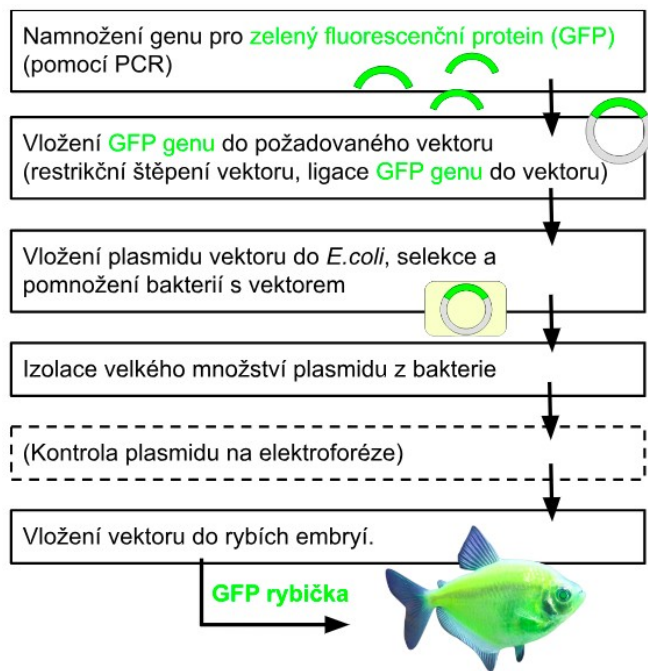
Genové inženýrství je obor, který se zabývá přípravou nových kombinací genů či jejich modifikací a jejich následné vkládání do genomu organismů. Organismus, do nějž vložíme „cizí“ gen, označujeme jako **transgenní**. Takovým transgenním organismem jsou i fluoreskující rybičky, které za svůj neonový světélkující zjev vděčí vloženým genům pro **fluorescenční proteiny** (tyto proteiny obvykle pochází ze světélkujících medúz či korálů).

1. Komerční prodej fluorescenčních rybiček je doménou USA a Asie, v Evropě jsou **geneticky modifikované organismy (GMO)** mnohem striktněji regulované a zájmový chov a prodej GMO rybiček legální není. Zatímco pro běžného člověka v Evropské unii je užívání

transgenních organismů značně omezené **striktní legislativou**, alespoň v biologických laboratořích genetická modifikace organismů a klonování genů (manipulace s molekulami nukleových kyselin a jejich replikace v živých organismech) dnes patří ke zlatému standardu molekulárních metod.

- a. O využití transgenních organismů se stále vedou dlouhé diskuse. Vymysli alespoň dva argumenty pro rozšířenější tvorbu a využívání transgenních organismů. Pokus se na problém také nahlédnout z druhé strany a vymyslet alespoň dva argumenty proč by mohlo být dobré GMO technologie více regulovat.
- b. Představa rybičky ozařující potměný pokoj jako malá žárovka je celkem zavádějící. V běžném akváriu lehká neonově barevná záře toliko nevynikne. Společnost prodávající tyto rybičky k nim nabízí i širokou paletu doplňků, zejména speciálních akvárií. Co je podmínkou k tomu, abychom si mohli barevnou záři rybičky naplno vychutnat?

Ve zbytku úlohy se budeme věnovat procesu, jak Bioslav vytvořil svoje vysněné rybičky se zeleným fluorescenčním proteinem (podobné jako z obrázku 1). Klonování genů má několik základních kroků, kterým se budeme dále věnovat. (1) Příprava fragmentů obsahujících **požadovaný gen**, (2) vložení požadovaného genu do příslušného **vektoru**, (3) vložení vektoru do živého organismu, (4) **selekce** jedinců nesoucích požadovaný gen. Bioslavův velmi jednoduchý postup je schematicky znázorněn na obr. 2. Úloha v žádném případě nepokrývá celé spektrum možných technik a postupů v rámci genového inženýrství. Jejím cílem je demonstrovat několik základních technik užívaných při klonování genů a demonstrovat, že vložení nového genu do organismu je **komplikovaný proces o mnoha krocích**. Ve skutečnosti by byl proces ještě složitější.



Obr. 2: Bioslavův postup.

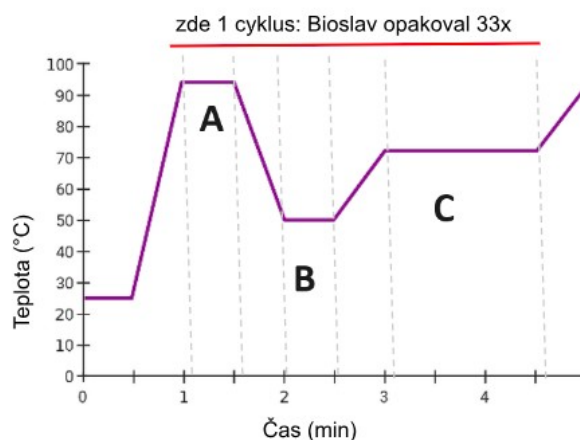
Na samý začátek Bioslav potřebuje získat úsek DNA s požadovaným genem – v jeho případě genem pro **zelený fluorescenční protein (GFP)**. K tomu má v podstatě dvě

možnosti – restrikční štěpení (k němu se dostaneme později) a **polymerázovou řetězovou reakci (PCR)**.

Zdrojem GFP genu pro PCR je pro Bioslava nějaký náhodný vzorek DNA z jiného zvířete produkujícího GFP.

2. Polymerázová řetězová reakce je způsob, jakým lze namnožit **konkrétní úsek DNA (tedy např. gen) v in vitro podmínkách** – tj. ve zkumavce, aniž bychom museli mít DNA v živých buňkách. Tím PCR (nejen) vědcům výrazně zjednodušuje a zrychluje práci s DNA.
 - a. Do základní reakční PCR směsi potřebuji přidat několik klíčových složek, aby reakce fungovala. Dvě z nich jsou dále zmiňované primery a DNA polymeráza. Jaké další složky jsou nezbytné pro zdárný průběh reakce?
 - b. Jaká je v reakční směsi funkce všech zmíněných složek z podotázky a.?
 - c. Vlákno DNA je **orientované** – má dva konce (tzv. **3' a 5'**; označení souvisí se strukturou molekuly – uhlíky v cukr-fosfátové kostře). Stejně tak primery – krátké úseky DNA – mají svojí orientaci. Často se primery zobrazují plně komplementární (tzn. celé sedí na templátové DNA). Jen u jednoho konce je však nezbytné, aby byl komplementární s templátovou DNA. Který konec primeru (3' nebo 5') musí být komplementární s templátovou DNA a proč?
 - d. Na jaké další vlastnosti primerů (alespoň 2) by sis dal pozor při jejich navrhování pro svoji reakci?
 - e. První používanou DNA-polymerázou byla **Taq polymeráza** izolovaná z gramnegativní bakterie *Thermus aquaticus* (proto **Taq**). Fungovala by stejně např. lidská polymeráza? Proč ano/ne?
 - f. Taq polymeráza, na rozdíl od celé řady dalších dnes používaných DNA polymeráz, postrádá tzv. **3'→5' exonukleázovou aktivitu**. Co to znamená, když má polymeráza tuto aktivitu? Jaký má tato enzymatická aktivita efekt na přesnost polymerázy a proč?

3. Základním principem PCR je **cyklické opakování** jistých tří kroků (viz A, B, C na obr. 3). Každý z kroků se děje při jiné teplotě. Přístroj, který vzorky **opakovaně zahřívá a ochlazuje** na přesně definované teploty, nazýváme **PCR cycler**. Níže na obrázku 3 je znázorněn teplotní program, který na PCR cycleru nastavil a použil Bioslav.

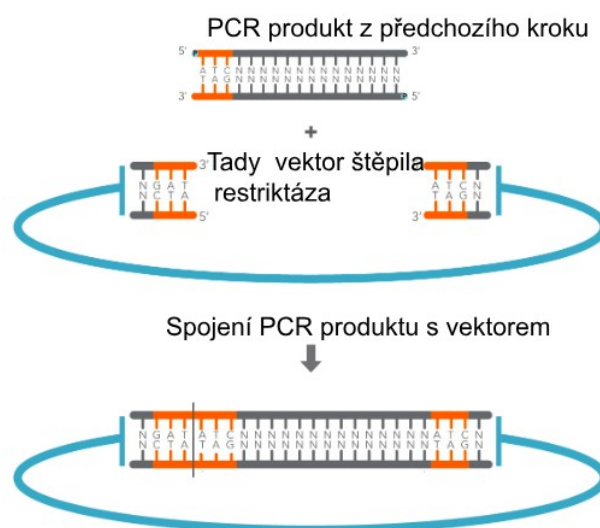


Obr. 3: Teplotní profil jednoho Bioslavova PCR cyklu.

- a. Co se v těchto jednotlivých krocích (A, B, C) děje?
- b. Teplota pro krok B se může měnit především v závislosti na tzv. **teplotě tání primerů** – tedy zjednodušeně teplota, kdy mají primery tendenci denaturovat – tzn.

pouštět se templátu (přesněji jde o teploty, při níž polovina všech primerů je volná a jedna polovina navázaná na templátovou DNA). Výpočet přesné teploty tání může být složitější. Uveď alespoň dva důležité faktory, které ovlivňují, při jaké teplotě se budou primery pouštět templátové DNA.

- c. Na začátku přidal Bioslav množství templátové DNA, které odpovídá 100 kopiím genu pro GFP. Bioslav opakoval PCR cyklus celkem 33x. Žádná reakce však není stoprocentně efektivní a reálná **efektivita reakce** bývá nižší. Spočítej, kolik kopií genu pro GFP vznikne po 33 cyklech při 100% efektivitě PCR reakce a kolik vznikne při 80% efektivitě (tzn. v každém kroku je zdvojen jen 80% přítomných kopií genu). Uveď výpočet.
4. Bioslav pomocí PCR namnožil gen pro GFP. Pokud bychom tento úsek vložili jen tak do buněk, pravděpodobně by se nic nestalo a náš úsek by byl bez jakékoliv změny v buňkách brzy **degradován**. Dalším krokem proto bude vložení genu pro GFP do náležitého **vektoru**. Vektorem se v genovém inženýrství myslí molekula DNA, do níž mohu vložit gen mého zájmu, aby zůstal v buňkách, případně se podle něj dokonce produkovala příslušná bílkovina. Vektorů máme celou řadu kategorií: virové/nevirové, integrativní (vkládající se do genomu)/replikativní (množí se – replikují – nezávisle na genomu hostitelské buňky), atd... Vůbec nejběžnějšími vektory pro klonování jsou tzv. **plasmidy** – malé kruhové molekuly DNA, které fungují relativně nezávisle na genomové DNA. Celkově by to bylo s vektory na dlouhé povídání a Bioslav sám v nich nemá příliš přehled. Proto se spokojíme s tím, že Bioslav získal od kamaráda vektor, který je možné namnožit v bakteriích a v rybičkách umí trvale začlenit (integravit) do genomu gen pro GFP – tj. vytvořit stabilně svítící rybky.
 - a. Představme si jednoduchý vektor-plasmid, od kterého čekáme jen to, že se udrží v bakteriálních buňkách a bude vyrábět jeden protein. Co minimálně musí obsahovat takový plasmid, aby takto fungoval?
 - b. Pokud chceme podle jednoho genu vyrábět protein ve dvou evolučně velmi vzdálených organismech, nemusí produkce proteinu snadno fungovat. Zrovna v případě malého GFP to problém není, leč v úplně odlišném organismu často **nemusí vznikat funkční protein**. Představ si například, že jsi **biotechnolog** ve farmaceutické firmě a chceš produkovat velké množství jistého lidského proteinu v snadno kultivovatelné bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*). Vymysli alespoň dva důvody, proč může být problém funkční lidský protein v jednodušším organismu jako bakterii/kvasince produkovat.
5. Protože je Bioslavův vektor uzavřená **kruhová molekula**, je důležité ji nejprve **naštěpit** a následně do otevřeného místa **připojit** náš gen namnožený pomocí PCR. Bioslav tak vektor naštěpil (otevřel) restriční endonukleázou. **Restriční endonukleázy** jsou enzymy, které umí **štěpit konkrétní sekvenci DNA**, a to **přesně definovaným způsobem** tak, že rozštěpené místo vypadá vždy stejně. Následně je třeba naštěpený vektor s namnoženým genem spojit dohromady do jedné kruhové molekuly. Celý tento proces je znázorněn na obr. 4.



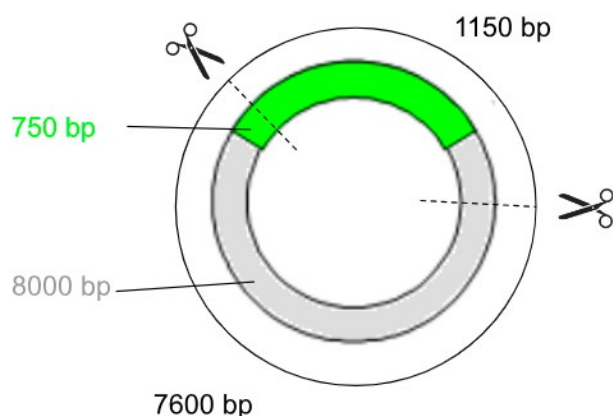
Obr. 4: Bioslavova restriktáza (restriční endonukleáza) naštěpila vektor a vytvořila tzv. tupé konce (ani jedno ze dvou vláken nepřesahuje). Do tohoto místa lze připojit PCR produkt z předchozího kroku. Převzato a upraveno z: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/cloning-strategies-part-3-blunt-end-cloning>.

- a. Genetickým inženýrům restriční endonukleázy umožňují vyrobit různé molekuly, jejichž konce se budou snadno **spojovaly**, což ale není původním účelem, k němuž sloužily. K čemu tyto enzymy rozeznávající konkrétní sekvence mohly sloužit **původní bakterii**, z níž pocházejí?
- b. Jak se nazývá skupina enzymů, které mohou spojit konce Bioslavova GFP genu s naštěpeným vektorem?
6. Do teď Bioslav připravoval gen svého zájmu v příslušném vektoru. Pár kopií vektoru s vloženým genem pro GFP se mu snad podařilo vytvořit. Jeho cílem je nyní hotový vektor ve velkém **namnožit**, aby ho měl dostatek na to, aby se mohl vůbec pokoušet jej vložit do rybiček. Snáze se transformují (tj. vkládá se do nich cizorodá DNA) a pěstují **bakteriální buňky**. Proto se Bioslav nejprve pokusil namnožit svůj hotový vektor v *E. coli*.
 - a. Buňky samy o sobě většinou nebudou ochotně sbírat DNA z okolí, navíc DNA musí překonat hned **několik bariér** (buněčná stěna, cytoplasmatická membrána, jaderná membrána) podle typu buněk, do nichž se snažíme cizorodou DNA vložit. Musíme buňky donutit nebo pomoci našemu vektoru, aby se dostal do buněk. Metod, jak vložit do organismu DNA, je celá hromada. Výběr vhodné metody závisí na tom, jaké buňky/organismy chceme použít. Uveď alespoň 4 techniky, jakými se dá vložit cizorodá DNA do buněk, a u každé stručně vysvětli, jak funguje.

Zdaleka ne do všech bakterií se Bioslavův vektor dostal. Mechanismů, jak **selektovat** bakterie, které plasmid mají, je opět více. Bioslav zvolil jednoduchou **rezistenci na antibiotika**. V jeho vektoru už totiž byl navíc gen pro enzym ničící penicilinová antibiotika. Pokud na Petriho misku s agarem s těmito antibiotiky rozetřel bakterie, vyrostly na ní jen ty, které umí antibiotikum zničit – a tedy měly by mít v sobě vektor. Skutečně – po pár hodinách se na misce objevilo pár **kolonií**: každá vznikla množením jedné jediné buňky, která měla to štěstí a vektor pohltila. Bioslav 6 kolonií vzal, bakterie ještě trochu pomnožil a pokusil se z nich

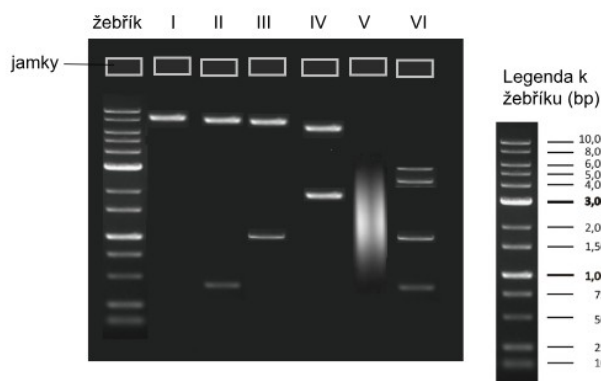
izolovat (sklidit) namnožený plasmid. **Výsledkem bylo 6 vzorků DNA**, u nichž Bioslav předpokládal, že obsahují požadovaný plasmid.

7. Jednou z nejběžnějších metod **izolace plasmidové DNA** je tzv. **alkalická lýze**, kterou zvolil i Bioslav. Stručně vysvětli, jak tato metoda probíhá. Na základě čeho se rozliší plasmidy od zbytku bakteriální DNA?
8. Mezi jednotlivými kroky klonování je vždycky záhodno **zkontrolovat**, jestli vše běží, jak má, a máme ve vzorcích to, co čekáme. Bioslav se rozhodl kontrolu provést aspoň před tím, než se vektor s genem pro GFP pokusí vložit do rybiček. Část z každého vzorku plasmidu naštěpil – tentokrát jinými restričními enzymy. Kde by mělo ke štěpení dojít, přibližuje následující schéma (viz obr. 5). K ověření Bioslav použil **agarózovou gelovou elektroforézu**, na níž pustil naštěpené vzorky.



Obr. 5: Kontrolní restriční štěpení. Původní vektor měl 8000 bp (base pair – jeden pár bází) – do něj byl vložen 750 bp dlouhý gen pro GFP. Jedno restriční místo leží v genu pro GFP, druhé ve zbytku plasmidu. Po štěpení by měly vzniknout dva fragmenty: 1150 bp a 7800 bp.

9. Vysvětli princip gelové elektroforézy.
 - a. Ke které elektrodě se budou pohybovat molekuly DNA? Proč?
 - b. Samotná DNA nemá žádnou barvu a na gelu sama o sobě vidět není. Uveď alespoň 1 konkrétní způsob, jak DNA na gelu zvidelnit.
 - c. Níže (obr. 6) vidíš výsledný Bioslavův gel s viditelnou DNA. Výsledky nedopadly úplně podle Bioslavových představ. To už se v laboratoři stává. Na základě předchozích informací rozhodni, který/é vzorek/ky jsou v pořádku a pravděpodobně obsahuje/í vektor s genem pro GFP.



Obr. 6: Bioslavův kontrolní gel. Nahoře znázorněná řada jamek, do nichž se dává vzorek. Levý sloupec – tzv. žebřík = směs fragmentů DNA o známé délce.

Dále zleva doprava – vzorky I–VI.

Až nyní se Bioslav přiblížil cíli. Ví, který/é vzorek/ky (I–VI) pravděpodobně obsahují vektor s GFP. Jeden vybírá a **mechanicky injikuje do malých rybích embryí**. V první generaci vznikají strakaté rybičky, které částečně svítí. Teprve po jejich vzájemném množení se Bioslavovi daří vybrat několik rybiček, které svítí celé. Má vyhráno!

Úloha 2: Po stopách genů

Autor: Sandra Jelínková

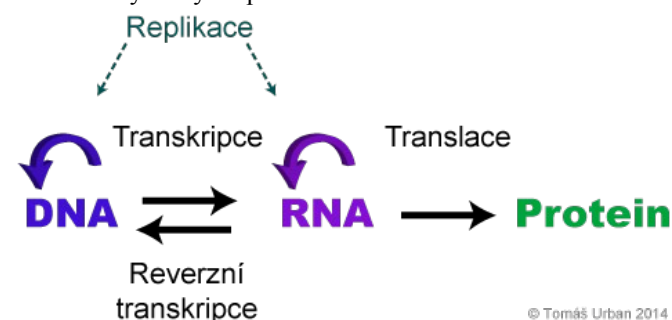
Počet bodů: 18

Genetika (z řečtiny gennaó = plodím, rodím) je biologická věda studující principy a příčiny dědičnosti a proměnlivosti živých organismů. Pojem gen označuje jednotku dědičné informace.

Genetika se stále více propojuje s praxí. V současné době se uplatňuje v různých škálech oborů. Patří k nim lékařství a farmacie, ale také sledování původu člověka, historie, kriminalistika a zemědělství. Základním krokem molekulárně-biologických analýz, které zkoumají genetický materiál, je **izolace DNA nebo RNA**. Izolaci genomové DNA lze provést z libovolného materiálu obsahujícího jaderné buňky (krev, tkáň, močový sediment) či jejich fragmenty nebo ze vzorků obsahujících volnou DNA (např. sérum). Nejčastěji je genomová DNA izolována z periferní nesrážlivé krve, kde se nachází v leukocytech.

V našem případě nás bude zajímat zejména lékařství, konkrétně onkogenetika, která se zabývá identifikací patogenních variant některých genů u pacientů s různými nádory.

Genetická informace, která se dědí, je primárně uložená v nukleotidové sekvenci složené ze čtyř deoxyribonukleotidů v DNA řetězcích (A, T, G, C) nebo čtyř ribonukleotidů v RNA řetězcích (A, U, G, C). Genetická informace určuje primární strukturu peptidů (v DNA a RNA sekvenci). Přenos genetické informace je souhrnně zobrazen v ústředním dogmatu molekulární biologie (obr. 7), kde je možný přenos genetické informace z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo z nukleové kyseliny do proteinu.



Obr. 7: Schéma centrálního dogmatu molekulární biologie. Zdroj: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1483&typ=html

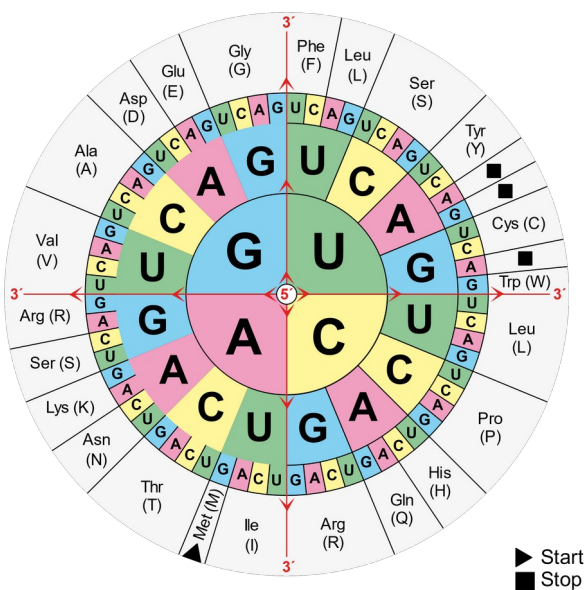
Dosud se předpokládá, že není možný přenos genetické informace z proteinu do nukleové kyseliny nebo z proteinu do proteinu. Na ribozomech dochází k překladu genetické informace ze sekvence nukleotidů nukleových kyselin do sekvence aminokyselin proteinů. Tato informace je zakódována – každou aminokyselinu kóduje trojice (triplet) nukleotidů, kterou nazýváme kodon, což je základní jednotka genetického kódu (obr. 8).

470761 atggaaatgagcagataataaagattatagcttttctttgtcaaaaggagactcaatatc
 581 D I V T N V S P R I I R G T T
 470821 ttactctttcatcagGACATTGTGACAAATGTTTCCCCAGAATCATCCGGGGAACCAC
 596 S G P M Y G P G Q S S F L N I E L I S E
 470881 CTCTGGCCCCATGTATGGCCCTGGACAAAGCTCCTTTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGA
 616 K T A A Y W C Q S V T E L K A D F P D N
 470941 GAAAACGGCTGCATATTGGTGTCAAAGTGTCACTGAACATAAGGCTGACTTTCCAGACAA
 636
 471001 Cgtaagtgtgatttaacatctaaaacaagagaattggcataagttggtgaatgtttattt

Obr. 9: Sekvence z otázky 5.

1. Následující písmenka značí tripletu nukleotidů. Napište, o jaké aminokyseliny se jedná – uveďte jednopísmenné zkratky i plné názvy.

ATT TGC GGT AAA AGC CTT TCA GTG
 AAT GAA ATG



Obr. 8: Aminokyseliny – genetický kód. Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_k%C3%B3d#/media/Soubor:Aminoacids_table.svg

2. Za pomoci kódující sekvence zjistěte, o jaký gen se jedná – uveďte zkratku genu, jeho plné jméno, počet bází, funkci proteinu, který kóduje v lidském organismu.
3. Zjistěte, jak se v dnešní době identifikují patogenní zárodečné varianty v genech (stačí uvést metodu).
4. V naší populaci se nově nyní u onkologických pacientů zjišťuje varianta v našem genu c.1905+1G>A. Napište, o jaký typ varianty se jedná a proč nás zrovna zajímá tato varianta u onkologicky nemocných pacientů?
5. V následující sekvenci (obr. 9) najděte a označte místa, kam budou nasedat PCR primery (E14f, E14r). Zapište hranice amplikonu (sekvence, kterou primery vymezují a

kteřá se bude pomocí PCR množovat) a vypočítejte jeho předpokládanou délku v bp (párech bází).

Amplifikace E14:

E14f: 5'-CTTTGTCAAAAGGAGACTCAATATC

E14r: 5'-TCACCAACTTATGCCAATTCTC

E14 (-) tj. bp

6. Napište princip Sangerova sekvenování.

Úloha 3: Potapěči z říše hmyzu

Autor: Kateřina Kubíková

Počet bodů: 17

Hmyz, podobně jako řada dalších bezobratlých, osídlil širokou škálu sladkovodních biotopů a různé skupiny se nově kolonizovanému prostředí do různé míry přizpůsobily. Všechny se však musely vypořádat s nejzávažnějším problémem – jak se neutopit?

Vodní živočichové mají v zásadě dvě možnosti, jak si obstarat nezbytný kyslík – získat jej přímo ze vzduchu nebo absorbovat kyslík rozpuštěný ve vodě. Případně mohou oba způsoby kombinovat. V této úloze se na konkrétních příkladech organismů seznámíme s různými způsoby dýchání vodních bezobratlých, konkrétně různých zástupců vodního hmyzu.

Nejdříve se blíže zaměříme na druhy, které kyslík získávají ze vzduchu a alespoň čas od času se musí „nadechovat“ u hladiny. Už u tohoto zdánlivě banálního procesu se na chvíli zastavíme. Mnoho druhů vodního hmyzu si totiž nezávisle na sobě z různých částí svých těl vyvinulo rozmanité struktury, pomocí kterých vzduch z prostoru nad hladinou přijímají.

1. Ke každé z níže uvedených struktur uveďte příklad druhu vodního hmyzu (popř. konkrétního vývojového stádia), který je využívá k nabírání vzduchu nad hladinou.

- Sifon na konci zadečku
- Tykadla
- Dýchací rohy na hrudi

2. Nyní se na nadechování vodního hmyzu podíváme i prakticky prostřednictvím jednoduchého experimentu. Vše potřebné určitě máte doma (nebo si to velmi snadno obstaráš), jediné, pro co budete muset cíleně vyrazit do lůna jarní přírody, budou larvy komárů. Teoreticky by k prove-

dení experimentu měly stačit dvě larvy, ale raději si jich přines více, kdyby některá při pokusech nespolečně pracovala. Už od brzkého jara najdeš larvy některých druhů komárů obývajících především tůňky a další menší vodní plochy. Doma si pak obstarej dvě, pokud možno úzké, průhledné nádoby (můžeš si půjčit ve škole klasické zkumavky, dobře poslouží přiměřeně velké epruvety, lékovky či panáky), jar či tekuté mýdlo, které v poměru 1:1 rozmíchej s vodou, a rostlinný olej. K řešení úlohy přilož alespoň dvě fotky dokumentující průběh experimentů.

Do obou nádob nalij do výšky alespoň 2 cm odstátou vodu (nebo vodu, ve které jsi larvy komárů přinesl/a) a opatrně přemísti (například zastříženým kapátkem) vždy jednu larvu komára. Po skončení experimentů larvy s co nejmenším množstvím vody vrať zpět do vody, ve které jsi je přinesl/a.

- Nejprve několik minut pozoruj chování larev ve vodě a stručně ho popiš.
- Do první zkumavky opatrně přikápní několik kapek roztoku jaru nebo tekutého mýdla a pozoruj změnu chování larvy. Pozorování stručně popiš a vysvětlí, k čemu z fyzikálního hlediska došlo.
- Vodu ve druhé zkumavce převrstvi vrstvou rostlinného oleje tak, aby překrývala celou plochu hladiny. Opět pozoruj chování larvy. Pozorování stručně popiš.
- Fenoménu pozorovaného v podotázce 2c bylo mimo jiné využito pro potlačení populací komárů při budování jedné gigantické stavby na přelomu 19. a 20. století. O jakou stavbu se jednalo, proč byli komáři eradikováni a jakým způsobem toho bylo docíleno?

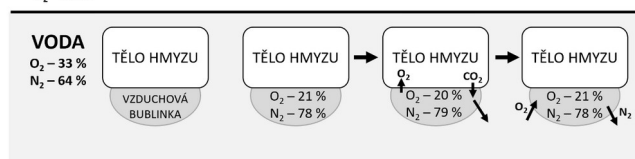
V předchozích otázkách jsme se zabývali případy, kdy se vodní živočich pro získání vzdušného kyslíku musí vynořit nad hladinu. To dává smysl – jak by se také bez vynoření z vody ven dostal ke vzduchu? A přece to je možné! Příkladem jsou vodní larvy mandelinkovitých brouků rákosníčků (*Dona-ciinae*).

- Jakým způsobem se tyto larvy dostávají ke vzdušnému kyslíku? Jmenuj dva další druhy hmyzu, které tuto dýchací strategii taktéž využívají.
- Řada vodních bezobratlých dýchajících vzdušný kyslík si podobně jako přístrojoví potápěči nosí zásobu vzduchu i pod hladinu, aby se nemuseli tak často vynořovat. Stejně jako způsob nádechu i umístění vzduchové zásoby se liší mezi jednotlivými druhy.
 - Uveď alespoň tři příklady zástupců vodního hmyzu, kteří si nosí pod hladinu zásoby vzduchu na rozdílných částech těla a ke každému vždy uveď příslušnou tělní část.

Vzduchová bublinka pod vodou funguje jako tzv. fyzikální plíce. Díky tomuto jevu je daný živočich schopen vydržet pod hladinou mnohem déle, než k čemu by mu mělo stačit množství kyslíku v nabraném objemu vzduchu.

- Prohlédni si následující schéma (obr. 10), které znázorňuje mechanismus fyzikálních plic, a svými slovy stručně vysvětlí princip jejich fungování.

VZDUCH
O₂ – 21 %
N₂ – 78 %



Obr. 10: Schéma znázorňující princip fyzikálních plic.

I když by se mohlo zdát, že díky principu fyzikálních plic vydrží takováto zásoba kyslíku navěky, není tomu tak. Bublina se postupně zmenšuje (hlavně díky unikání dusíku do vody) a zásoby je potřeba pravidelně doplňovat nad hladinou. Jinak tomu je např. u hluběnky skryté (*Aphelocheirus aestivalis*).

- Jak je možné, že se tato vodní plošnice vůbec nemusí chodit nadechovat k vodní hladině?

Nyní se přesuneme k bezobratlým, kteří absorbují kyslík přímo z vody, bez mezizastávky ve vzduchové bublince. U většiny z nich jsou dýchací orgány (zvané žábry) vychlípeny ven z těla. V tom se liší od suchozemských živočichů, kteří mají v typickém případě dýchací orgány zanořené do tělní dutiny a s okolním prostředím komunikují jen drobnými (často uzavíratelnými) otvory (vzpomeňme na naše plíce spojené s ústy jen úzkou průdušnicí).

- Vysvětlí, v čem je pro druhy přijímající kyslík rozpuštěný ve vodě výhodné mít dýchací orgány vyčnívající do prostoru a proč je naopak suchozemští živočichové mívají zanořené dovnitř těla.
- Příkladem takovýchto do prostoru čnících útvarů sloužících k příjmu kyslíku rozpuštěného ve vodě jsou lupínky na stranách zadečku larvy jepice, které vidíte na obrázku 11. Na nich je dobře znatelná větvená síť trubic (označená šipkou) rozprostřená vždy po celé ploše lupínku.



Obr. 11: Detail tracheálních žaber larvy jepice. Zdroj bude uveden v autorském řešení.

- O jakou větvenou trubicovitou strukturu se jedná? Tyto lupínky – stejně jako obdobné útvary u dalších zástupců vodních larev hmyzu sloužící k příjmu kyslíku rozpuštěného ve vodě stejným mechanismem – nazýváme tracheální žábry.
- V návaznosti na předchozí podotázku vysvětlí, čím se liší od „klasických“ žaber (například ryb, raka či mlžů).

V přírodě však snad ke všem pravidlům existují příslušné výjimky. A tak se i u nás běžně setkáme s jednou dobře známou a nápadnou skupinou hmyzu, jejíž všichni zástupci (ve stadiu larvy) dýchají tracheálními žábry ukrytými uvnitř těla.

7. O kterou skupinu se jedná a v které části těla je u ní dýchací aparát umístěn?

Úloha 4 (experimentální): Motýli předjaří

Autor: Tereza Štochlová

Počet bodů: 22

Když si představíme motýla, bude to nejspíš někde v létě na rozkvetlé louce. A je pravda, že v mírném pásu je možné pozorovat nejvíce druhů dospělců motýlů od května do července, poté jejich počet klesá. Přes zimu motýli až na výjimky nelétají a toto nepříznivé období přechkávají ve stadiu diapauzy. To znamená, že životní pochody jedince jsou silně omezeny a jeho vývoj pozastaven. Diapauza se u motýlů může vyskytovat v jakémkoliv stadiu jejich životního cyklu – vajíčko, housenka, kukla, dospělec. Vždy záleží na konkrétním druhu.

1. Jednou z největších nepříznivých podmínek, se kterou se motýli během zimy musí vypořádat, je mráz. Jaké adaptace si motýli (potažmo hmyz obecně) vyvinuli na fyziologické úrovni k přežití teplot pod bodem mrazu? Uveďte dvě.
2. Může diapauza probíhat i jindy, než v zimě? Kdy a proč?
3. Jakou jinou strategii kromě diapauzy motýli používají, aby se vypořádali s nepříznivým obdobím, které u nás během zimy panuje? Uveďte příklad druhu, který ji využívá.

I přes to však některé druhy motýlů můžeme pozorovat i brzy zjara, výjimečně i v teplých zimních dnech. Z našich denních motýlů je v tomto přeborník žluťásek řešetlákový (*Gonepteryx rhamni*), který někdy létá již koncem února. Dalšími druhy, které můžeme vidat už během března, jsou třeba babočka paví oko (*Inachis io*) nebo babočka kopřivová (*Aglais urticae*).

4. Co mají tyto motýli společného – proč zrovna tyto druhy vidáme už brzy na jaře?

Kromě denních motýlů se v předjaří můžeme setkat i s mnohými druhy motýlů nočních – těch existuje mnohem více druhů než denních a disponují nejrůznějšími životními strategiemi. Není proto překvapivé, že i v zimě jich najdeme větší množství. Noční motýli jsou díky létání v noci více přizpůsobeni na chladnější teploty, a tak se u mnohých druhů vyvinuly navazující adaptace pro let v zimě. Příkladem může být tmavoskvrnák dubový (*Agriopis leucophaearia*), zimovnice brusnicová (*Conistra vaccinii*) nebo drsnokřídlec hrušňový (*Phigalia pilosaria*).

5. Jakým způsobem se živí motýli, jejichž dospělci létají v zimě? Uveďte dva způsoby.

Na to, kdy motýli začnou létat, má také vliv aktuální počasí a průběh sezóny. Pokud například již v únoru dlouhodobě panují teploty nad nulou, motýli se začnou objevovat dříve, než když mrazy setrvávají až do dubna. Zdá se, že nestálé zimy posledních let s životním cyklem motýlů poměrně zamávaly. Minulý rok – 2023 – byl na motýly obzvláště chudý, a to nejen v předjaří, ale i během léta.

6. Jaké jsou možné důvody nízkého výskytu motýlů v minulé sezóně? Uveďte dva.

A teď již k praktické části úlohy, kde se podíváme na to, jaké druhy motýlů se vyskytují ve vašem okolí.

Vášim úkolem bude vydat se do přírody, abyste zjistili, zda a jaké druhy zde v tomto období můžete nalézt. Můžete přitom využít několik metod:

- **Denní motýly** budete moci zahlédnout hlavně během slunečných dnů, jak se vyhřívají. Proto pozorujte své okolí i třeba cestou přes město nebo na zahradě. Sledujte také zdi ve městech, motýly lze často objevit i na nich.
- Na **noční motýly** se naopak vydejte v noci, lépe tehdy, když je tepleji a zároveň nesvítí měsíc.
 - První možností je vyrazit do pěkného lesa vyzbrojeni silnou baterkou. Tou svíťte na kmeny nebo větve stromů, kde motýly budou sedět (obr. 12).
 - Druhou možností je pak motýly nalákat na světlo. K tomu budete potřebovat bílé prostěradlo, které natáhnete třeba na provaz mezi dva stromy, a lampu. Lampa by ideálně měla být taková, která vyzařuje alespoň nějaké UV záření, tedy například UV LED nebo zářivka. Pokud nemáte, můžete zkusit použít jakékoliv silnější světlo, i když výsledky budou asi o něco horší. Lampu umístěte asi 10-20 cm od prostěradla. Ideální je svítit v noci, kdy nesvítí měsíc, na místě, které není rušeno dalšími světelnými zdroji. Lampou svíťte na prostěradlo a čekejte – brzy se sem noční motýli slétnou. Alternativou je místo prostěradla svítit na bílou zeď. Místo pozoruje, nebo průběžně kontrolujte, alespoň hodinu – nicméně můžete pozorování protáhnout a svítit od soumraku až do půlnoci.
- Dále se můžete například zkusit podívat, jestli nějaké motýly nenajdete třeba i doma, v nějakých skrýších, nebo například ve spíži.
- Kromě dospělců můžete zkusit najít i nějaká jiná vývojová stadia – například housenky. Pozorně se tedy dívejte kolem sebe.



Obr. 12: Při svícení buďte pozorní, motýli mají často kryptické zbarvení. Na obrázku drsnokřídlec třešňový (*Lycia hirtaria*), foceno 31. března. Foto: Martina Kišlová

Všechny nálezy vyfoťte a zaznamenejte datum a místo nálezu. Nafocené motýly určete do druhu, pokud to je možné. Pravděpodobně s tím budete potřebovat pomoc – proto neváhejte a vaše fotky nahraje do jedné z následujících facebookových skupin:

kových skupin: **Motýlí klenoty** (pro denní motýly) nebo **Motýlí plevel** (pro noční motýly). V obou skupinách působí odborníci, kteří vám s určením druhů rádi pomohou. Při přidávání příspěvku nezapomeňte uvést datum nálezu a lokalitu – nejen, že tyto informace pomohou s určením, zároveň se všechny nálezy z těchto skupin následně nahrávají do Náleзовé databáze ochrany přírody (NDOP). Přidáním příspěvku do skupiny tak pomůžete vědě i ochraně přírody!

7. Jako řešení úlohy odevzdejte protokol, který bude obsahovat:

- **Hlavičku** – jméno, ročník, škola, název úlohy a datum;
- **Úvod** – shrnutí, co, proč a jak testujete, a zároveň odpovědi na všechny otázky položené v rámci této úlohy;
- **Metodiku** – podrobný popis toho, co, kdy a kde jste sledovali, jaké z výše popsaných metod jste využili – zde podrobněji popište, jaké pomůcky jste použili apod. (např. Svítily jste na prostěradlo, nebo na zeď? Kde? Čím konkrétně? Jak dlouho? atd.), jakým způsobem jste nalezené organismy určovali;
- **Výsledky** – popište data získaná experimentem, součástí výsledků bude:
 - tabulka s alespoň pěti různými pozorováními, přičemž alespoň jedno z nich bude noční motýl; tabulka bude obsahovat nalezené druhy, data pozorování a místa nálezu;
 - fotografie ke každému nálezu;
 - soupis druhů dalších aktivních bezobratlých kromě motýlů, na které jste během pozorování narazili;
- **Diskuzi** – neboli uvedení výsledků pokusů do kontextu současného poznání, zda jsou výsledky v souladu s tím, co jste očekávali, případné poukázání na nedostatky experimentu apod.; jako součást diskuze také uveďte:
 - kde jste našli nejvíce motýlů;
 - zda vám přišlo, že jste jich našli hodně, nebo málo;
 - na jaké problémy jste narazili;
 - další poznatky o průběhu pozorování, které jste nezmínili jinde.

Úloha 5 (seriálová): Omyly ve vědě a biologii

Autor: Jakub Štenc

Počet bodů: 20

Chybovat je lidské, odpouštět je božské. Tedy, alespoň tak praví již zažitá hláška. Nicméně, protože dělat chyby je v lidské povaze a vědci nejsou bohové, bylo, je a bude naše poznání světa okolo nás zatížené našimi chybami. Ty mohou svést i nejpozornějšího výzkumníka z cesty poznání a zavést ho na scestí. Podobně je ale naše poznání zatížené i naší mírou tolerance chyb, neboť v prostředí, kde chyby nejsou tolerovány, jsou omyly dost často schovávány a/nebo vysvětlovány tak, aby se nějakým způsobem vešly do přijímaného paradigmatu. To je velmi nebezpečné, protože to vede k zakonzervování chyb v rámci poznání a nedovoluje nám se z nich poučit dokud právě přijímané paradigma není nahrazené paradigmatickým novým, lepším. Ale i po změně paradigmatu je to opět celé zatížené staronovou chybou, příběh se znovu opakuje. Na druhou stranu, přílišná tolerance chyb a omylů pak může vést k nedozírným důsledkům a v některých případech i vyloženým katastrofám.

Pojďme se spolu podívat na pár příkladů omylů ve vědeckém poznání živé přírody jak ovlivnily naše chápání světa kolem nás. Zároveň se ale pojďme trochu zamyslet, co k těmto omylům vedlo, a jak se z nich a z procesů, které k nim vedly, můžeme poučit.

1. Aristoteles, velíkán řecké filozofie, například tvrdil, že úhoř říční (*Anguilla anguilla*) se vůbec nerozmnožuje, ale prostě se jen tak zjeví z bahnitě vody. Uveďte důvody proč si to mohl myslet.
2. Aristoteles to měl vůbec s rozmnožováním takové složité. Snažil se například rozlousknout i jak funguje rozmnožování včel. Co si o rozmnožování včel myslel?
3. Co mohlo být důvodem, proč si myslel, že se včely nerozmnožují pohlavně jako jiná zvířata? Vyjma odpovědi z předchozí otázky.
4. Samostatnou kapitolou je pak přístup učenců, biologů a dalších k ženám. Ženy už Aristoteles považoval za výrazně méně inteligentní než muže. Překvapivě tuto představu podporují i recentní studie srovnávající IQ u mužů a žen. Zde je ovšem nutné se kriticky zamyslet a dát si biologii dohromady se sociologií a historickým vývojem společnosti. Na jejich základě můžeme poměrně snadno vyvodit, proč zrovna IQ testy, či jiná srovnání mohou ukázat jisté rozdíly, které ale nutně neodrážejí inteligenci samotnou. Dokážete vysvětlit, proč mohou ženy dosahovat nižších výsledků IQ testů než muži?

Ženy představují zhruba polovinu populace u které lze očekávat, že dosahuje nejenom stejné úrovně inteligence jako muži, ale i dalších schopností, které jsou pro provádění výzkumu významné. Za jeden z největších omylů vědy tak lze označit dlouhodobou diskriminaci žen a dalších minorit (ať již etnických, sexuálních či genderových). Díky tomu se vědecká komunita ochudila o velké množství intelektuálního kapitálu, což dost možná vedlo ke zbrždění pokroku a s následky se potýkáme do dnešních dnů. Pojďme se tedy zamyslet nad příčinami diskriminace, abychom se mohli poučit z omylů našich předchůdců.

5. Diskriminace má často počátky ve viditelných rozdílech mezi etniky či menšinami. Původ snad nejhoršího příkladu vědou podpořené diskriminace můžeme vysledovat v mylné interpretaci evoluční teorie. Tento vědní obor pak následně získával na podpoře hlavně v západní Evropě a vrcholné popularity dosáhl za třetí říše. Jak se tento vědní obor nazývá?

Zásadní úlohu v popularitě této pseudovědy hrál fakt, že evropské státy v té době kolonizovaly ekonomicky, politicky a kulturně méně rozvinuté země. Díky tomu přicházela společnost do kontaktu s dosud neznámými zvyky a tradicemi, které si vykládala jako nekulturnost a projev nižšího stupně vyspělosti, který si spojovala s individuálním stupněm inteligence. To vedlo k formování myšlenek sociálního darwinismu.

6. Co je principem sociálního darwinismu a proč byl odsouzen?
7. Ve vědě hraje také důležitou roli tradice. Není náhodou, že výraz akademie je dle legend odvozen od háje pomerančovníků, kde své žáky vyučoval Platón. Tradice ve smyslu institucí a osob, které tyto instituce tvoří, je důležitá pro rozvoj vědy a poznání. Nicméně takové prostředí má i své stinné stránky: tradice vede ke konzervatismu a odmítání nových myšlenek. To poměrně

cynicky popisuje výrok „věda postupuje s každým jedním pohřbem“. Kdo se proslavil tímto výrokem a co tím myslel?

Velmi negativní dopad má na naše poznání také ideologie. Obzvláště, pokud ve společnosti převládá názor, že ideologie by měla zásadně tvarovat společnost ve všech jejích aspektech a vědecké bádání podléhá ideologické kontrole. V takovém prostředí pak nelze očekávat, že pokrok bude určovat kritické uvažování, což může vést k zakonzervování vědeckých omylů pomocí dogmat. Jedním z odstrašujících příkladů je Lysenkismus, který se ujal v minulém století v jedné nejmenované zemi.

8. Co to je lysenkismus?

9. Jaké byly přímé důsledky lysenkismu na soudobou společnost?

Podívejme se nyní na problém z pohledu metodického. V rámci našeho o poznání o tom, jak vzniká naše poznání je důležité klást si otázky jako: Jak vědci vlastně chyby generují? A jaké jsou typy chyb, které mohou dělat? Metodologie vědy a statistika mluví o takzvané chybě prvního a druhého druhu.

10. Co to znamená? Definujte chybu prvního a druhého druhu. Která z těchto chyb je potenciálně nebezpečnější?

Oba druhy chyb vznikají při vyhodnocování zda-li na základě výsledků experimentu můžeme potvrdit naši hypotézu. Je tedy očividné, že záleží na formulaci hypotézy a zvolení vhodného designu experimentu na to, jak velké důsledky může mít chyba prvního a druhého druhu.

11. Řekněme, že naše nulová hypotéza je, že lék, který testujeme na pacientech, léčí nemoc. Jaká jsou rizika v případě, že nastane chyba prvního a druhého druhu?

