

# Biologický korespondenční seminář



## Biozvěst

Ročník 3

Série 1

## Milí přátelé,

Vítáme Vás ve třetím ročníku Biozvěstu. Od nulté série je to již čtvrtý rok, co nám přináší Biozvěsti zajímavé přírodovědné problémy! Na co se můžete těšit? Každé dva měsíce pro Vás připravíme sadu pěti úloh, od klasických témat ryze „přírodoplyných“ až po nejnovější modní výstřelky z pole molekulární biologie. Doufáme, že si řešením našich úloh rozšíříte své obzory a možná pochopíte staré známé věci ve zcela nových souvislostech. Naprosto vyžít se budete moci v úloze experimentální a doufáme, že něco nového Vám přinese i seriál, který bude letos pojednávat o moderních biologických přístupech a začneme genomikou.

A nejen to! Na konci roku pro Vás uspořádáme terénní expedici v nějakém zajímavém přírodním prostředí.

Šíření moudrosti našich Biozvěstů podpořila Přírodovědecká fakulta UK mediální podporou v rámci projektu Přírodovědci.cz a finanční podporou 5 000 Kč na uspořádání terénní expedice v loňském roce.



## Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na internetové stránce Biozvěstu

[www.studiumbiologie.cz/biozvest](http://www.studiumbiologie.cz/biozvest)

(nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplňte. Úlohy Vám budeme zasílat automaticky na e-mail uvedený v přihlášce. Pokud budete chtít ukončit odběr novinek o Biozvěstu, napište nám e-mail.

Dále se k nám můžete připojit prostřednictvím Facebooku, skupina „Biozvěst“, kde se mohou probírat aktuality a můžete zde diskutovat dle libosti.

<https://www.facebook.com/groups/175384482597684/>

**Vaše řešení úloh nám posílejte na adresu:**

[biozvest@gmail.com](mailto: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. 3-1-2-Bioslav\_Biomilný v případě druhé úlohy první série aktuálního ročníku.

## Uzávěrka 1. série: pondělí 2.11.2015 o půlnoci.

V případě opožděného odevzdání úloh se strhává za každý celý den jeden bod s výjimkou zvláště závažných a omluvených situací.

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. Oceníme, pokud přiložíte jakékoliv 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](mailto:biozvest@gmail.com) či [vosolob@natur.cuni.cz](mailto:vosolob@natur.cuni.cz)

Mnoho zdaru při řešení Vám za kolektiv autorů přeje

Stanislav Vosolobě

## Úloha 1: Komáři a jejich vztahy

Autor: Magdalena Gajdošová

Počet bodů: 18

Komáry většinou vnímáme jen jako to otravné „něco“, co nám v noci znepříjemňuje spaní, protivně to bzučí a dělá to svědivé štípance. Když se zrovna nezaobíráme bojem s jejich bezprostřední blízkostí, uvědomujeme si občas i to, že v jiných zemích jsou pro lidi zdrojem mnohem větších problémů tím, že přenášejí nemoci, jako je třeba malárie. Lidskou malárii způsobuje výtrusovec rodu *Plasmodium*, žlutou zimnici a dengue viry z čeledi Flaviviridae a za mnohé další, komáry přenášená, onemocnění mohou další „živáčky“. Samičky komárů (samečci krev nesají) tak mnohdy neinteragují pouze se svými oběťmi, na nichž sají, ale někdy i s druhou stranou mince – s mikroorganismy, které naopak využívají je. Pojdme naše noční návštěvníky i jejich sofistikovaný systém vztahů poznat trochu blíže. Tak, abychom si, až nám zase o půlnoci bude něco bzučet kolem polštáře, uvědomovali, že původce toho bzučení není jen otravný, ale i docela zajímavý a rozhodně netriviální.



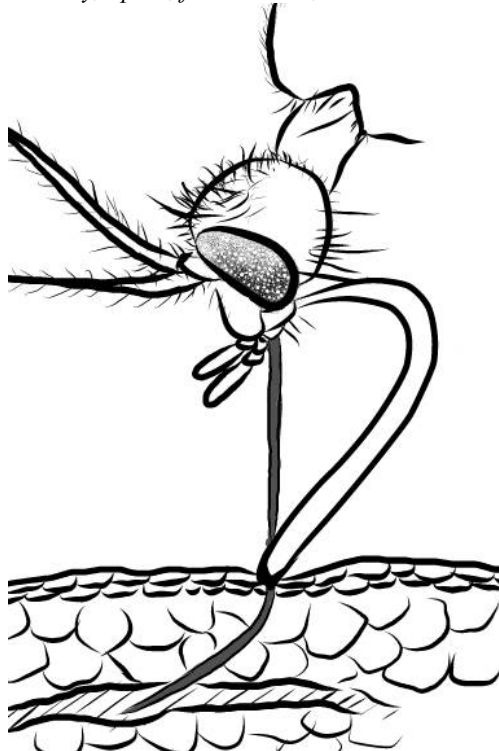
Obr. 1: Někteří komáři, například zástupci jihoamerického rodu *Sabethes*, jsou až překvapivě krásní. I oni jsou ale mnohdy vektory patogenů. Zdroj:

<https://www.flickr.com/photos/rainforests/5233962299>

1. Začněme odpědu, tedy od sosáku. Na následující kresbě vidíte, jak vypadá ústní ústrojí samičky komára. Krevsajícím hmyzu, který používá takto šetrné ústní ústrojí (které se ale anatomicky může lišit), se říká solenofágové nebo také v angličtině vessel feeders. Opakem jsou thelmofágové neboli pool feeders, kteří cévu zkrátka naruší, takže z ní začne do tkáně vytékat krev a tvoří se hematoma, z nějž thelmofágové krev odsávají.

- a) K čemu je pro komára dobré být radši solenofágem než thelmofágem?

- b) Které z následujících skupin krevsajícího hmyzu jsou solenofágové a kteří thelmofágové?  
*Vši, všenky, muchničky, mouchy tse-tse, zákeřnice, blechy, tiplici, flebotomové, ovádi.*



Obr.2: Do kůže proniká velmi tenký stilet, který je v době, kdy komár nesaje, ukrytý v obalu z labia (spodního pysku). Stilet proniká do kůže hostitele takřka bezbolestně a obvykle jím komár zajíždí rovnou do cévy a saje přímo z ní.

2. Kromě krve hostitele ale samička komára někdy nasaje i parazity. Těmi mohou být viry, bakterie, prvoci či dokonce parazitičtí červi (říká se jim mikrofilárie – jsou to larvy některých hlístic, tak malé, že je dokáže nasát i třeba právě komár). Tito parazité obvykle používají komára jako přenašeče (neboli vektor) a potřebují se dostat do jeho slinných žláz, odkud mohou být vstříknuti do dalšího hostitele a neskončit tak ve slepé uličce. Spolu s krví ale místo toho putují trávicí trubici komára, konkrétně do části zvané mesenteron, kde se potrava tráví. Je to jediná část trávicího ústrojí hmyzu, která není vystlaná chitinem, zato si zde však komár po každém krmení tvoří speciální ochrannou vrstvu zvanou peritrofická matrix, která mimo jiné chrání epitel střeva právě před patogeny. Patogen, který se chce dostat skrz stěnu střeva, aby mohl migrovat do slinných žláz, se tedy musí s peritrofickou matrix nějak vypořádat. Na to si různé patogeny našly různé vychytávky. Zjistěte, jak se skrz peritrofickou matrix dostávají následující paraziti a ke každému připište příklad choroby, kterou způsobuje:

- Plasmodium v komárech
- Mikrofilárie v komárech
- Arboviry v komárech
- Leishmanie ve flebotomech

3. Už z předchozí otázky je zřejmé, že patogen mnohdy musí být na svého vektora dobře adaptován a nemůže se nechat přenášet kdekým – někteří vektoři jsou vhodnější než jiní. Existují dva pojmy, které označují

vhodnost vektora pro daný patogen: *vectorial capacity* a *vector competence*. Jaký je mezi nimi rozdíl?

4. Zůstaňme ještě chvíli v trávicím traktu. Některé skupiny krevsajícího hmyzu mají v trávicí trubici umístěné speciální symbiotické bakterie. Zkuste pomocí následující tabulky vymyslet, proč je mají.

Taxon <sup>a</sup>	male	female	Symbionts	Location of symbionts
O. Pthiraptera So. Anoplura	blood	blood	+	ventral wall of midgut; ovaries
O. Hemiptera F. Cimicidae	blood	blood	+	fat body
F. Reduviidae Sf. Triatominae	blood	blood	+	blood storage region of midgut lumen
O. Siphonaptera	blood	blood	+	lumen of midgut
<b>O. Diptera</b>				
F. Psychodidae (Sf. Phlebotomina)	nectar	blood and nectar	-	-
F. Culicidae	nectar	blood and nectar	-	-
F. Simuliidae	nectar	blood and nectar	-	-
F. Ceratopogonida,	nectar	blood and nectar	-	-
F. Tabanidae	nectar and pollen	blood and nectar	-	-
F. Muscidae (G. Stomoxys)	blood and nectar	blood and nectar	-	-
(G. Glossina)	blood	blood	+	midgut wall

5. Po překonání peritrofické matrix putuje patogen obvykle do slinných žláz komára. Sliny komárů, podobně jako dalších krevsajících členovců, obsahují speciální látky, které pomáhají sát na hostiteli – například zabraňují srážení nasávané krve, takže se lépe saje a neucpává sosák, či pomáhají stiletlem přesně vyhledat a nabodnout cévu. Sliny zároveň mohou sloužit ku prospěchu i patogenům přenášeným komáry – mohou třeba v místě vbodnutí inhibovat buňky imunitního systému hostitele, takže se patogen spíše úspěšně přenesou. Přesto si plasmodia vyvinula ještě jednu „vychytávku“, jak si upravit sliny komára ku vlastnímu prospěchu. Co dělají a k čemu jim to je?
6. Říká se, že není dobré nechávat otevřené okno, když v noci v pokoji svítíme, protože komáry už na dálku láká především světlo. Je tomu ale opravdu tak? Zkuste zjistit, jaké lákadlo se používá v pastech na komáry určených k jejich likvidaci. Jakým smyslem se tedy komáři primárně na dálku orientují?

## Úloha 2: Založeno na skutečné události

Počet bodů: 10

Autor: Kristýna Minářová

Během jedné služby kolem osmé hodiny večer přišel vysoký, astenický pacient, 45-letý ZK. Dosud se léčil pouze s hyperfunkcí štítné žlázy, kouří, jinak byl zdravý. Při příchodu na ambulanci napadal na pravou nohu. Na otázku:

„Co Vás trápí?“, odpověděl, že ho bolí záda vpravo. Bolest byla intenzivní, začala ten den ráno a postupně se zhoršovala a vystřelovala mu podél žeber k hrudní kosti. Od rána měl mírný kašel, který byl spíše dráždivého charakteru, nemohl odkašlat. Po celou dobu vyšetření suše pokašlával. Na cílený dotaz zpočátku tvrdil, že se mu dýchá dobře, ale vzhledem k poslechovému nálezu jsem mu moc nevěřila. Při vyšetření se ukázalo, že pravá plíce při basi nedýchá. Na cílený dotaz později připustil, že se zadýchává při námaze. Při vyšetření dále vyšlo najevo, proč pan ZK při příchodu do ordinace kulhal. Pravá noha byla oteklá od kotníku do třísla, na bérce mírně zarudlá, spíše prokrvácením, než zánětem. Na pohmat bylo svalstvo kamenně tuhé. Noha mu otekala již asi 4 dny, před třemi pozoroval zarudnutí, které se ale nerozšiřovalo. Přestože dle zprávy od praktického lékaře měl pacient vysoké zánětlivé parametry (CRP > 190 mg/l), horečku, zimnici, třesavku nepozoroval. Při příchodu na infekční ambulanci měl teplotu 38,6°C.

1. Jaká je základní diagnosa, která pana ZK nejvíce ohrožuje na životě? Jak? Vysvětli.
2. Jaká další onemocnění u pacienta nově vznikla? Proč má pan ZK horečku? Souvisí se základním onemocněním nebo ne? Vysvětli.
3. O jaká další onemocnění by se mohlo jednat?
4. Jakými vyšetřeními byste potvrdili svou diagnosu?  
Pozn.: Úspěšným (i neúspěšným) řešitelům v mailu napíšu, jak to nakonec s panem ZK dopadlo. I pokud se nedoberete správného cíle, oceníme všechny Vaše správně vedené analýzy možných i nemožných příčin pozorovaných příznaků. Takže popište všechny myšlenkové pochody, které Vás vedly k závěrum.

### Úloha 3: (Ne)žer mě!

Autor: Jasna Simonová

Počet bodů: 18

Rostliny a živočichové kolem nás hýjí všemi možnými i nemožnými tvary a barvami. Okázalost vzhledu některých organismů lidí inspirovala ve zdobení vlastních jinak holých a barevně nevýrazných těl už od pradávna. O tom, jak ke svým barvám, perům, rohům a podobné parádě ostatní živí tvorové přišli, vznikaly mnohé fantastické legendy. Některým lidem stačilo poukázat na nezměrnou Stvořitelovu fantazii a po nějakých bližších příčinách se nepídili. S myšlenkou evolučního vývoje druhů však vyvstala otázka po konkrétním mechanismu, který za vzhledem jednotlivých druhů stojí. V této úloze se na jeden takovýto mechanismus podíváme podrobněji.

1. Tentokrát nezačneme s vysvětlením základních pojmů, ale vaším úkolem bude samostatně se v nich zorientovat: definujte pojmy mimikry, mimeze, mimetik, mimetický komplex a aposematismus. Pokuste se definici mimikry vytvořit tak, abyste mimikry odlišili od podobnosti organismů, která vznikla konvergentní evolucí. Kdo pojem mimikry poprvé definoval? V případě, že narazíte na různě pojaté definice, nezapomeňte citovat autora, z kterého vycházíte.
2. Mimikry často vedou k velmi nápadnému vzhledu. Jaký jiný evoluční mechanismus bývá odpovědný za nápadné zbarvení, u kterého není primární ochranný význam?

Tento evoluční mechanismus popsal jeden obzvláště významný biolog. Vysvětloval jim právě velmi výrazné zbarvení (či jinak výrazný vzhled) mnoha živočichů. Onen biolog si nicméně už velmi brzy uvědomil, že určitá zbarvení některých organismů nelze principiálně tímto evolučním mechanismem vysvětlit. O který mechanismus šlo a které zbarvení jím rozhodně vysvětlit nemůžeme?

3. Druhy živočichů napodobující jiné mohou tímto evolučně sledovat zásadně odlišné cíle. Doplňte následující tabulku (můžete v řešení poslat podobnou nově vytvořenou nebo odpovědi označit písmeny jednotlivých polí tabulky):

Typ mimikry	Jak funguje	Příklad
<i>a</i>	Neškodné druhy napodobují ty nebezpečné (nejedlé/ jedovaté)	<i>b</i>
<i>c</i>	<i>d</i>	Motýli <i>Heliconius</i>
<i>e</i>	Predátor/parazit napodobuje svoji kořist/hosťtele (aby je mohli napadnout)	<i>f</i>
Emsleyovo-Mertensovo (Mertensovské)	<i>g</i>	<i>h</i>

4. Mimikry často slouží jak ochrana před predací. Popište tři základní způsoby, jak se živočichové mohou zbarvením chránit (nejde jen o zbarvení aposematické). Každý typ ilustруйте příkladem druhu, který ho využívá.
5. Oblíbenými varovnými barvami jsou kombinace žluté nebo červené s černou. Lidé v našich podmínkách mají většinou zkušenost s vosami a jsou zvyklí si na černožluté zbarvení dávat pozor. Jejich strach však není vždy opodstatněný. Vypište vždy jeden druh mimetika vosy (či podobných žahadlových blanokřídlých) z co největšího množství hmyzích řádů (a neomezujte se jen na druhy u nás žijící).
6. Přestože se biologové tématu mimikry, aposematismus a původu výrazných zbarvení věnují už dlouho, stále jsou publikovány nové objevy. Ne vždy je zbarvení možné vysvětlit jednoduše výše zmíněnými mechanismy. Najděte jednoho českého a jednoho zahraničního vědce, kteří se této oblasti věnují. Popište, čím konkrétně se zabývají, případně i na co zajímavého přišli.
7. Co je zvláštního na rybičce na tomto obrázku?



(<http://waterlandlife.org/assets/mussel.jpg>) ©

Napovíme, že se jedná o příslušníka řádu Unionoida. Vysvětlete, v čem se liší reprodukční strategie tohoto druhu od jeho nejbližších příbuzných žijících u nás.

**Úloha 4 (praktická): Usínání vegetace!**

Autor: Eliška Pšeničková, Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 20

V této praktické úloze se seznámíme s životními cykly rostlin, konkrétně s usínáním vegetace, které nás čeká s přicházejícím podzimem. Praktická úloha má dvě části – teoretickou a praktickou.

V teoretické části je několik otázek, které vás zasvěti do problematiky a odpovědi na ně by se měly objevit ve vašem výsledném protokolu, který bude reprezentovat výsledky této úlohy. Jak takový protokol správně napsat naleznete na:

<http://www.studiumbiologie.cz/biozvest/navody.html#TOC-Vzorov-protokol-praktick-lohy>



1. Rok rozdělujeme z fenologického hlediska na dvě části, které to jsou a jak jsou do těchto dvou částí rozdělena roční období?
2. Co se s rostlinami děje v první a následně ve druhé části roku a co má na přechod rostliny do „kratší části“ největší vliv?
3. Proč listnatým stromům opadají na zimu listy?
4. Předtím, než list odpadne, na řapíku se vytvoří několik vrstev speciálních buněk jak se nazývají?
5. Tvorbu této vrstvy vyvolává hormon, který podporuje opad listů. Jak se jmenuje?
6. Není nezbytnou nutností, aby listy u stromů vždy opadaly, třebaže u většiny to tak je. Za určitých okolností může dojít ke stárnutí a dokonce i odumření listu, aniž by opadl. Opad listů po jejich odumření nastává až s tvorbou nových listů na jaře. U kterého našeho stromu tomu tak je?
7. Vyberete si dva druhy listnatých stromů (např. javor mlč, buk lesní a podobně), které budete pozorovat. Pozorování musí začít v době, kdy jsou stromy ještě zcela zelené. Pozorováním vybraných stromů chceme zjistit, kdy začne zbarvování (kdy se objeví první zbarvené listy) a jak dlouho bude trvat, než se zbarví celý strom. Ode dne, kdy se začnou první listy zbarvovat, zaznamenávejte odhadem, kolik procent zbarvených listů přibude každý den. Současně zaznamenávejte i procentuální odhad opadaného listů v průběhu 14 dní od chvíle, kdy začne strom opadávat. Výsledky obou stromů porovnejte. Doporučuji si dělat poznámky o počasí, neboť to má na pozorování zcela jistě svůj vliv. Pro zpracování dat použijte tabulku a vytvořte z dat graf vyjadřující průběh opadu v čase a do stejného grafu se pokuste vynést i meteorologická data, aby vyplynuly souvislosti. Fotodokumentace bude vítána a hodnocena.

8. Listy na podzim vlastně nežloutnou, spíš se odzelenují. *Chlorofyly a a b* se rozpadají a mizí. Do popředí se tedy dostávají další barviva, která i když se částečně rozloží, stále zabarví listy do různých barev. Která to jsou? Abyste prokázali, jaký je původ zabarvování listu, zkuste udělat chromatografii listových barviv! Na internetu naleznete plno protokolů. Během sledování v předchozí otázce si pravidelně odeberte vzorky listů v různých stádiích žloutnutí. Můžete je uschovat v mrazáku až do konce pokusu. Pak z každého listu vyřízněte stejně velký kus, rozdrťte s trochou písku pomocí staré lžičky a extrahujte barviva přidáním trocha lihu. Lihu přidejte stejné množství do všech vzorků. Potom vezměte filtrační (třeba do filtru na kávu) či ssavý papír a po malých kapkách naneste vedle sebe všechny vzorky (každou kapku nechte zaschnout a pak naneste další, aby se tam dostalo co nejvíce vzorku a snažte se opět o stejné množství pro každý vzorek, aby se dalo porovnávat zastoupení barviv) a nechte vyvíjet v nádobě s benzínem. Pokud budete mít k dispozici i lepší rozpouštědla, vyzkoušejte, inspiруйте se dostupnými protokoly. Chromatografii lze provést v kruhové či vertikální podobě. Vyhodnoťte, jak se mění podíly jednotlivých barviv a přidejte do protokolu fotografii chromatogramu.

9. Vytvořte sbírku několika barevných listů z 5 -10 druhů stromů, které určíte a následně rozřídíte podle jejich zbarvení (např. žluté, červené,...). Opět proveďte chromatografii (i když listy nebudete dlouhodobě skladovat je dobré je před extrakcí zmrazit, barviva se lépe uvolní). U vytvořených skupin určete, které barvivo u nich převažuje a zapříčiňuje právě ono zbarvení, které mají. Vaši sbírku i chromatogram vyfotografujete a fotky přiložíte do protokolu.

V případě, že bude žloutnutí či opad Vašeho stromu probíhat pomaleji a nestihli byste kompletní vyhodnocení do uzávěrky Biozvěstu, odpustíme v tomto speciálním případě pozdější odevzdání úlohy, avšak počítejte, že na začátku prosince zveřejníme autorské řešení a pak nebude možné úlohu ohodnotit.

**Úloha 5: Návštěva ve světě moderní biologie:****Genomika a sekvenování**

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 10

Letošní seriál se Vám pokusí přiblížit nejmodernější přístupy používané v biologii, abyste si mohli udělat představu, jak se dnes biologie dělá. Začneme úvodem do oboru, který, ač na první pohled působí jako ryze molekulárně-biologický, pronikl s razancí tornáda do téměř všech biologických disciplín. Co znamená „genomika“? Slovo je odvozeno ze základu „gen“, bude se tedy týkat dědičných vloh kódovaných v DNA, a přípony „omika“, která znamená, že zkoumáme všechny geny, které v určitém organismu jsou. Tedy zatímco genetik by se zajímal třeba o jediný gen a zkoumal jeho dědičnost a projevy, genomik studuje celou genetickou výbavu a interakce mezi geny. Podobně existují další tak zvané „omiky“, například transkriptomika, proteomika či metabolomika které zkoumají všechnu mRNA vznikající přepisem genů

(transkriptom), z ní vznikající proteiny (proteom) a metabolity (tedy většinou menší organické molekuly jako sacharidy a lipidy), které vznikají činností proteinových enzymů.

První předpoklad ke genomickému studiu je znát genetickou informaci daného organismu, tedy pořadí – sekvenci – všech nukleotidů na molekulách DNA tvořících chromosomy. Jak se sekvenuje organismus? Začneme historickým exkurzem. První sekvenační postupy byly pomalé, pracné a drahé. Princip je ale jednoduchý. Předpokladem je nejdříve izolovat DNA (v kostce: roztrít organismus, přidat detergent, čímž se rozpustí komplex DNA a histonů, a nakonec DNA poté vysrážíme přidáním ethanolu). Z každého chromosomu by hypoteticky vznikla jedna dvojšroubovice DNA molekul (u mnohobuněčných organismů řádově délky v desítkách až tisících milionů párů nukleotidových bází, píšeme jako Mbp, mega base pairs), ale reálně se dlouhé molekuly rozlámou a máme tak ve zkumavce roztok fragmentů tak sto až tisíckrát menších (pro představu, typický gen má tak 1-10 tisíc párů bází (kbp), takže na jednotlivých fragmentech mohou být třeba desítky genů). Směs DNA fragmentů potom pomocí enzymu ligázy vložíme do plasmidů izolovaných z bakterií a získáme kolekci plasmidů, z nichž každý nese v sobě zlomek sekvenovaného genomu. Tyto plasmidy potom vneseme zpět do bakterií, přičemž poměr bakterií a plasmidů je takový, že do bakterie se vnese nejvýše jeden plasmid. Směs pak rozetřeme na živné médium s antibiotikem a protože plasmid nese také gen pro resistenci k antibiotiku, přežijí pouze transformované bakterie (ty s plasmidem) a na misce s médiem budeme mít tisíce bakteriálních kolonií, kdy každá nese plasmid s jedním konkrétním kouskem sekvenovaného genomu. Teď máme takzvanou **DNA knihovnu** v bakteriích a pokud v ní chceme číst, stačí vzít z určité kolonie trochu bakterií, namnožit je, izolovat z nich plasmidovou DNA a tu lze již použít k sekvenaci. Oproti směsné výchozí DNA ze sekvenovaného organismu máme nyní mnohem větší množství čisté DNA konkrétního úseku genomu.

A můžeme sekvenovat! **Sekvenační metoda** je založena na stejném principu jako polymerázová řetězová reakce (PCR), což není nic jiného, než replikace DNA provedená ve zkumavce: DNA-polymeráza nám ochotně zkopíruje předložené vlákno DNA a vytvoří komplementární, ale musí mít **primer**, tedy krátký kousek (20–30 nukleotidů) již vytvořeného komplementárního vlákna, od kterého začne syntetizovat. Ten lze vyrobit uměle a v případě sekvenace DNA vložené do plasmidu můžeme vyrobit primer odpovídající známé sekvenci plasmidu před místem, kde je vložena sekvenovaná DNA. Aby polymerace začala, je ještě potřeba původní plasmid zahřát na 95 °C, čímž se dvojšroubovice rozplete na dvě jednořetězcové DNA. Po ochlazení se jednořetězcová DNA snaží rychle s něčím párovat a protože primerů je vysoká koncentrace, přednostně se párují s primerem. Na konec primeru si pak okamžitě sedne DNA-polymeráza a s pomocí volných nukleotidů přidaných do roztoku začne budovat komplementární vlákno (připomínáme, že konce DNA molekuly nejsou identické a připojování je možné pouze na jednom konci primeru, který se označuje 5'). Polymeráza vyrobí až několik tisíc nukleotidů dlouhé vlákno, než

z náhodných důvodů odpadne. V klasické PCR máme primery dva, pro začátek i konec určitého kopírovaného úseku a syntetisujeme obě vlákna původní dvojšroubovice, abychom ve výsledku měli znovu kompletní dvojšroubovici. Sekvence je jednodušší, máme pouze **jeden** primer a kopírujeme pomocí něho jen **jedno** z vláken dvojšroubovice. Tak jako u PCR, i u sekvenace provádíme řadu cyklů zahřátí a zchlazení a množství nově syntetisovaných vláken roste. Jak ale s pomocí polymerace zjistíme sekvenci vlákna? V polymerační směsi totiž kromě plasmidu, primeru, DNA-polymerázy a nukleotidů je ještě jedna přísada – modifikované nukleotidy (tzv. di-deoxynukleotidy), kterým chybí -OH skupina v pozici 5' na ribose, na kterou se normálně váže další nukleotid. Jakmile se tento nukleotid zabuduje do vznikajícího vlákna, syntéza tohoto vlákna skončila. Protože máme čtyři různé báze DNA (A, T, G, C), máme i čtyři typy di-deoxynukleotidů, značíme je A\*, T\*, G\* a C\*. Namícháme si tedy čtyři různé sekvenační reakce a do každé přidáme kromě klasických nukleotidů i malý podíl (třeba 5%) jednoho modifikovaného. A protože zabudování modifikovaného nukleotidu je čistě náhodná záležitost, tak například v reakci s T\* je při připojování každého nukleotidu T pětiprocentní šance, že se tam zabuduje ten modifikovaný a reakce skončí.

Byla-li by syntetisovaná sekvence

ACCGTAAGCGCTTATAAT

získáme ve zkumavce s T\* všechny tyto produkty

ACCGT\*

ACCGTAAGCGCT\*

ACCGTAAGCGCTT\*

ACCGTAAGCGCTTAT\*

ACCGTAAGCGCTTATAAT\*

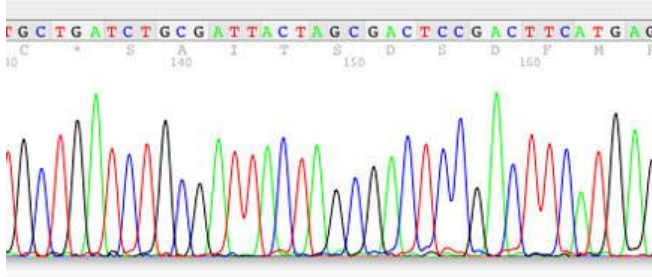
které se liší svojí délkou (5, 12, 14 a 17 nukleotidů).

Po reakci produkty z každé zkumavky pustíme na gelovou elektroforézu: DNA putuje v elektrickém poli anodě, protože je jako kyselina záporně nabitá. Když ji necháme procházet hustým gelem (agarosa či akrylamid), rozdělí se podle své velikosti na pásy, protože každá z molekul (v našem případě s délkami 5, 12, 14 a 17 nukleotidů) má jinou rychlost pohybu v gelu. Pokud je gel dostatečně dlouhý (alespoň 40 cm) a optimálně hustý, můžeme získat proužky, které se od sebe liší velikostí jednoho nukleotidu. V případě reakce s T\* budou na gelu proužky odpovídající délkám 5, 12, 14 a 17 nukleotidů a žádné jiné. Reakce s C\* naopak poskytne pruhy velikosti 2, 3, 9 a 11 nukleotidů atd. Tedy shrneme-li to, z pozice pruhu na elektroforéze poznáme kolik má konkrétní produkt nukleotidů a podle toho, zda-li se vyskytl v reakci s A\*, T\*, G\* či C\* poznáme, která báze na dané pozici v DNA je přítomna. Předpokladem je samozřejmě dostatečné zastoupení produktů **všech** možných délek ve všech reakcích.

V dřevních dobách molekulární biologie se skutečně sekvenace prováděli pomocí dlouhých elektroforéz a protože produktů nebylo mnoho, bylo třeba k visualisaci DNA na gelu používat radioaktivní nukleotidy. Radioaktivní záření z proužků se pak detekovalo na film. Vše to bylo velice pracné, drahé, toxické a radioaktivní a molekulární biologové se nedoživali důchodových věků.

Dnes se používá tento princip stále, ale di-deoxynukleotidy jsou značené fluorescenčně (každý jinou barvou) a dělení

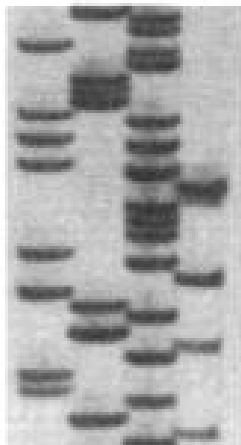
se provádí v tenké trubičce (opět podle jejich velikosti, která ovlivní rychlost průchodu trubičkou) na jejímž konci je laserový detektor fluorescence a ten snímá různé barvy podle toho, jaký značený nukleotid je na konci právě procházejícího vlákna DNA, viz obrázek. Délka spolehlivě sekvenovaného úseku je při použití této metody zhruba 500-1000 nukleotidů (při použití elektroforézy to bylo samozřejmě méně)



Tak jsme si ukázali, jak je možné přečíst pár set nukleotidů fragmentu DNA vloženého do plasmidu. Jak z těchto kousků poskládat genom, si ukážeme příště.

1. Klasické sekvenování se nazývá podle svého objevitele. Zjistěte, kdy a kdo toto sekvenování zavedl a který byl první osekvenovaný genom a jak byl dlouhý.
2. Které eukaryotické organismy byly kompletně přečteny dříve, než jste se narodili? Uveďte rok, kdy byl genom zveřejněn a pro zajímavost délku genomu.
3. Sestavte sekvenci DNA z tohoto sekvenačního gelu. Jednotlivé sloupce jsou označeny podle di-deoxynukleotidu, který byl přidán do reakce. Délka DNA molekuly odpovídající jednotlivým proužkům roste shora dolů.

G A T C



4. Která skutečnost zmiňovaná v textu se skrývá pod označením BAC? Co zkratka znamená?
5. Klasické sekvenování je dnes rutinní záležitostí, kterou provádí sekvenační laboratoře, stačí jim donést epinečku se vzorkem DNA, jen pár mikrolitrů! Každá biologicky orientovaná výzkumná instituce má svoji sekvenační laboratoř. Vyhledejte na internetu nějakou laboratoř co nejbližší Vašemu bydlišti a zjistěte, na kolik by přišla jedna sekvenační reakce.

