

# Biologický korespondenční seminář



## Biozvěst

Ročník 3

Série 2

## Milí přátelé,

Je tu druhá série třetího ročníku Biozvěstu, celkově již čtrnáctá pečlivě připravená sada úloh přírodovědného zaměření. Opět se máte možnost dozvědět spoustu zajímavého. V seriálové úloze vám bude představena úžasná šíře a potenciál, který v sobě skrývá sekvenování DNA. V první úloze nahlédnete do záhad evoluce blanokřídlého hmyzu a dvě z úloh budou tentokrát velice chutné – úloha o lanýžích a jedna přímo o pochutinách. V rámci experimentální úlohy si můžete vyzkoušet účinky fytohormonů v praxi, přímo před očima.

A pro pilné řešitele chystáme jako každý rok jarní terénní soustředění v některém z krásných koutů České republiky.



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 seminář řešit

Veškeré pokyny k řešení Biozvěstu najdete na adrese [www.studiumbiologie.cz/biozvest](http://www.studiumbiologie.cz/biozvest) (nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplíte. 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/>

**Svá řešení úloh nám pošlete 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 2. série je pondělí 4. 1. 2016 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 kompletně vyřešit všechny úlohy (a možná se to ani nikomu nepodaří), stačí odeslat libovolně velký fragment řešení. 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 směrujte na adresy [biozvest@gmail.com](mailto:biozvest@gmail.com) či [vosolsob@natur.cuni.cz](mailto:vosolsob@natur.cuni.cz)

Hodně štěstí a radosti z bádání Vám za kolektiv autorů přejí

Doubravka a Standa

Jazykovou úpravu brožurky provedla Jasněnka Simonová.

## **Úloha 1: Evoluce blanokřídlých**

Autor: Jiří Hadrava

Počet bodů: 8

Blanokřídlí (Hymenoptera) jsou velmi rozmanitou skupinou hmyzu. Z celého světa dnes známe více než 150 000 popsáných druhů, odhaduje se však, že skutečný počet druhů v této skupině může být i několikanásobně vyšší. Mezi blanokřídlé patří celá řada skupin od "obyčejného" hmyzu poletujícího po louce až po složitá společenství všudypřítomných mravenců. V této úloze si blíže představíme ty nejvýznamnější skupiny blanokřídlého hmyzu a podíváme se na jejich původ a evoluci. Budeme se zde věnovat zejména fylogenetickým stromům, pokud se tedy necítíte být s významem této struktury dostatečně obeznámeni, nakoukněte např. do úvodu ke 4. úloze poslední série loňského ročníku Biozvěstu.

1. Zde máte seznam třinácti vybraných čeledí blanokřídlého hmyzu:

Apidae, Cynipidae, Formicidae, Chalcididae, Chrysididae, Ichneumonidae, Orussidae, Siricidae, Sphecidae, Stephanidae, Tenthredinidae, Vespidae, Xyelidae.

Dohleďte ke každé z těchto skupin její české jméno a napište, zda se s nějakým zástupcem této skupiny lze setkat i v České republice.

2. Vzájemné fylogenetické vztahy mezi těmito skupinami nejsou doposud zcela objasněny, během posledních let však v této oblasti udělala věda obrovský pokrok. Zkuste tedy vyhledat několik fylogenetických stromů z poslední doby a podle nich nakreslete, jak nejspíš vypadá evoluční strom výše vypsáných skupin blanokřídlých (uznávat budu i více různých možností, vždy ale napište zdroj, odkud jste strom čerpal)

3. Tradičně bývají v klasifikaci blanokřídlého hmyzu používány tyto názvy: Aculeata, Apocrita, Parasitica,

Symphyta. Vyznačte do fylogenetického stromu, které jeho části odpovídá který z těchto čtyř názvů.



Zástupce blanokřídlých, včela rodu *Andrena*.

4. Které ze skupin Aculeata, Apocrita, Parasitica a Symphyta se podle vámi nakresleného fylogenetického stromu jeví jako parafyletické a které jako monofyletické skupiny?
5. Ke každé z čeledí uvedených u první otázky přiřaďte jednu takovou potravní strategii, která je pro larvy dané skupiny nejtypičtější. Možné potravní strategie jsou: masožravost, okusování krytosemenných rostlin, okusování nahosemenných rostlin, parazitoidie, pylozravost, vytváření hálek, xylofagie.
6. Na fylogenetickém stromě vyznačte, kde v evoluci asi došlo ke kterým změnám mezi potravními strategiemi larev uvedenými v otázce 4.
7. Kde byste v ČR hledali zástupce skupiny Stephanidae?

## Úloha 2: Nejen diamanty kuchyně

Autor: Lukáš Janošik

Počet bodů: 15

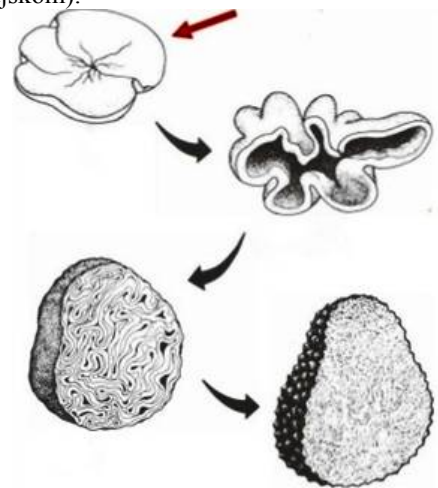
Určite všeci poznáte hľuzovky/lanýže (*Tuber*). Viacerí zástupcovia tohto rodu patria medzi vyhľadávané a vysoko cenené delikatesy a niektorí šefkuchári ich dokonca označujú za diamanty kuchyne. Hľuzovky sú však samozrejme zaujímavé aj z iného hľadiska. Tieto podzemné huby sú napríklad esenciálnymi partnermi vo vzťahoch s mnohými rastlinami, živočíchmi či inými hubami. Asi najznámejší a najpreskúmanejší je ich vzťah s listnatými drevinami s ktorými tvoria ektomykorízu. V súčasnosti sa dokonca dajú kúpiť sadenice dubov, ktorých korene sú už infikované ich mycéliom a človek si tak môže za priaznivých podmienok pestovať tieto nevšedné huby aj na vlastnej záhrade.

1. Niektoré druhy hub sa však pri jednom type mykorízy nezastavili, ich hýfy boli vyzolované aj z koreňov niektorých orchideí. Uveďte o aký typ mykorízy sa v tomto prípade jedná a aspoň dva rody orchideí, rastúcich aj v strednej Európe, u ktorých sa tento vzťah s hľuzovkami vyskytuje.
2. Hľuzovky majú okrem mykoríznych partnerov výrazný vplyv aj na mnohé ďalšie rastliny vo svojom okolí. Do pôdy totiž vylučujú veľké množstvo špecifických chemických látok, pričom mnohé z nich sa vyznačujú silným fytotoxickým efektom. Uveďte aspoň 3 rôzne skupiny fytotoxických látok, ktoré hľuzovky produkujú a pokúste sa zistiť, na čo im fytotoxíny slúžia.



Obr 1: Kruhové miesta takmer bez vegetácie označované ako brúle, spôsobené fytotoxínmi hľuzoviek.

3. Plodnice hľuzoviek sa obvykle vyskytujú v rôznej hĺbke pod zemou, to však bráni tomu aby sa ich spóry šíрили prostredníctvom vzduchu, ako to robí väčšina húb. Akú stratégiu využívajú hľuzovky na svoje šírenie a na čo im slúži hrubý obal výtrusu tvorený mohutnou ornamentikou? Pomôcka: Okrem fytotoxických látok niektoré druhy uvoľňujú aj 5- $\alpha$ -androstenol a dimethyl sulfid.
4. Kedysi dávno mal podľa všetkého predok rodu *Tuber* štandardné „miskovité“ nadzemné plodnice typu apothécium, aké dnes nachádzame napríklad u väčšiny druhov rodu *Peziza*, pričom aj v súčasnosti môžeme v prírode nájsť viaceré huby, ktoré tvarom svojich plodníc pripomínajú akýsi medzičlánok medzi nadzemným miskovitým apothéciom a podzemnou „hľuzou“. Uveďte príklad na aspoň 2 takéto medzistupne u ascomycétov (napríklad taxón s ešte otvorenými plodnicami, ktoré už sú ale z väčšej časti zanorené do zeme, taxón s už uzavretými podzemnými plodnicami s jednou dutinou vo vnútri alebo taxón s viacerými dutinami a čiastočne vyplneným vnútorným priestorom).



Obr.2: Schéma znázorňujúca možný prechod od štandardnej miskovitej plodnice k podzemnej „hľuze“.

5. Už bolo spomenuté, že podzemný spôsob života komplikuje hubám rozširovanie výtrusov, napriek tomu však tento životný štýl vznikol v priebehu evolúcie u askomycétov veľakrát nezávisle. Čo je najpravdepodobnejšia príčina toho, že sa všetky tieto skupiny húb rozhodli skryť pod zem?
6. Uveďte aspoň 3 rody askomycétov vyskytujúcich sa



v České republice, u kterých vznikol podzemný štýl života nezávisle.

7. Plodnice skryté v pôde tvoria aj mnohé druhy bazídiomycetov. Viaceré z nich boli v minulosti vyčleňované do samostatných rodov, no molekulárne dáta ukázali, že sa v skutočnosti často jedná len o akýchsi „extrémistov“ a ich najbližší príbuzní už často majú klasické plodnice s klobúkom a hlúbikom. Jedným takýmto druhom je aj *Lactarius stephensii*, ktorý na prvý pohľad známejších príbuzných skoro vôbec nepochopí. Mykológovia sa však v minulosti nenechali len tak oklamať, svedčí o tom aj fakt že pôvodný slovenský názov tejto huby bol rýdzikovec. Nájdite aspoň 2 znaky (mikroskopické alebo makroskopické), ktoré ukazujú na príbuznosť tohto druhu s ostatnými zástupcami rodu *Lactarius*.

8. Bioslav Biomilný sa jedného dňa rozhodol, že si svoje obľúbené pečene *Apodemus agrarius* ochutí trochu hľuzoviek, vybral sa teda aj s hrabličkami do neďalekej teplej dubiny a začal hľadať. Neprešlo veľa času a pod starým dubom sa mu podarilo odkryť niekoľko plodníc podzemnej huby. Nanešťastie ho vyrušilo stádo divokých prasidiat, ktoré mu napriek jeho statočnej obrane skoro všetky plodnice zožrali. Zostal iba jeden kus sterilnej plodnice, obalený hýfami. V takomto stave však už ani s mikroskopom nebolo možné určiť, o aký druh sa jedná. Bioslav sa ale samozrejme nevzdal, vyizoloval zo vzorky DNA, a v domácom cykléru pomocou PCR amplifikoval gén RNA polymerázy II a výsledný produkt dal osekvenovať. Na jeho prekvapenie však bola vzorka kontaminovaná. Väčšinu pôvodnej vzorky už ale minul a zostali mu len zväzky hýfových povrazcov, no aj tak sa rozhodol, že to ešte raz skúsi a celú procedúru zopakoval s nimi. Tentokrát už bol úspešný, tu je sekvencia, ktorú získal:
- ```
>sekvence1 TTTGCCATAACTGCAGCAAGGTGTT
GTCCGATATGTTAGTCTATGCTACTTTCTCGCAA
GGATTTTGGGCTTCGTATGATACTGACCCGATTT
TACACAGAGCGACCCCGAGTTTGTGTCGTCGCA
TCAACACACGGGACCCCAAGCTTCGTTTCAAC
CGTGTCTGGTCCGTTTGTAAAGAAGAAGCGCAA
GTGCGAGAACGAGGATCGCCAGAAAAGGAC
GACGACGATTCATACCAGGAATGAAGACTCA
AAATAACTGCAACAACCATGGTGGATGCGGCA
ACTTGCAGCCTTTGGTACGACAGGCTGCGCTG
CAACTCAAGGCTGCCTTCGAAGTGGCCCAGGA
AGACGGCCCTAAGAGAAAAGAGAGCGTACCCA
TCACTCCAGAGATGGCCACGGCATCTTGCGG
CGAATTTCCGAGTCGGACTTGCGCAACATGGG
TCTCAACTCCGACTACGCTCGTCCAGAATGGAT
GGTCATCACGGTCCCTGCCCGTCCCTCCGCTCC
CGTTCGTCTAGTATTTCCATGGATGGTACCGG
CACCGGTATGCGAAACGAAGACGACTTGACCT
ACAAGCTCGGCGACATCATCCGCGCCAACGGC
AACGTGAAGCAGGCTATCCGTGAAGGATCCCC
GCAACACATTGCACGGGATTTGAGGAG
```

Pomocou programu Blast

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) určite akému druhu patrí táto sekvencia. Prečo bola prvá vzorka kontaminovaná? Akú podzemnú hubu Bioslav našiel a je možné určiť konkrétny druh? (Postup, akým so sekvenciou pracovať, nájdete detailnejšie popísaný v 5.

úlohe 2. série 0. ročníku, na webe Biozvestu v sekcii „Archiv“.)

### Úloha 3: (Ne)dobroty

Autor: Doubravka Požárová

Počet bodů: 8

K Bioslavovi nedávno prijala se svými třemi siamskými kočkami tetička z Kostelce a přivezla mu spoustu sladkostí. Bioslav byl trochu smutný. Ještě nikdo z jeho příbuzných nepochopil, že by raději dostal krabičku pipetových špiček než bonboniéru. Ale co, když už sladkosti měl, rozhodl se prozkoumat, z čeho zajímavého jsou vyrobeny.

- Jako první se Bioslav podíval na obsah banánků v čokoládě. A nestačil se divit! V čokoládové hmotě této pochutiny (a nejen této) výrobce udává přítomnost tuků ze sedmi druhů rostlin. Opište si z obalu názvy olejů a najděte, z jakých rostlin jsou - uveďte latinský název rostlin a přidejte jejich obrázek či fotografii. Do mapky zakreslete, kde se nachází původní areály výskytu těchto druhů.
- Jeden z olejů, který najdete v obrovském množství nejen sladkostí, je olej palmový. Možná už jste někdy zachytili snahu varovat před tímto olejem a upozornit na tuto problematiku. Proč? Jaká jsou negativa používání tohoto oleje?
- Dále narazil Bioslav na sáček ovocného želé. Jaké hlavní látky/skupiny látek se používají k dosažení želé konzistence u potravin? U každé skupiny látek uveďte, z jakých organismů (skupin organismů) a kterých jejich částí se získávají. Jakou mají přibližně chemickou strukturu?
- Aby nám sladkosti přišly ještě lákavější, často jsou pestře barevné. Prohlédněte si při procházení obchodem obaly různých pochutin i potravin a zkuste najít alespoň 10 druhů organismů (zkuste se podívat nejen po rostlinách), ze kterých se extrahují barviva. K dosažení jakých barev se vámi nalezené druhy využívají? Našli jste i nějaké barvivo získané z prokaryot?
- V mnoha potravinářských výrobcích se setkáte s lešticími látkami. Jsou jimi například arabská guma, karnaubský vosk, šelak a včelí vosk. Odkud lidé tyto látky získávají? K jakým účelům je využívají v přírodě jejich "výrobci"?
- Dalšími záhadnými slovy objevujícími se na obalech pochoutek jsou invertovaný cukr a maltodextrin. V obou případech jde o sacharidy, jistým způsobem upravené. Jak a proč?

### Úloha 4: Ethylen jako fytohormon

Autor: Stanislav Vosolsobě s poděkováním Petře

Schiebertové (KEBR PřF UK) za objevení kultivační metody

Počet bodů: 15

Ethylen je jedna z nejjednodušších organických látek, bezbarvý plyn. Nepřekvapí nás, že rostliny vyrábí složité biomolekuly sacharidů a proteinů, ale dokonce i tuto sloučeninu, kterou bychom hledali spíše jako vprodukt nějaké chemické továrny umí vyrobit a navíc ji využívají

jako jednu z nejdůležitějších signálních látek. Díky plynulé povaze ethylen velmi dobře prostupuje rostlinným pletivem a na rostliny má dramatický vliv, například stimuluje opad listů a zrání plodů, tedy jevy spojené s řízenou smrtí buněk, čili senescencí. Dramatický vliv má i na semenáčky, jejichž růst silně blokuje. V této experimentální úloze si to ověříme na vlastní oči.

1. Vezměte větší zavařovací sklenici, do ní dejte pěkně velké zralé jablko a nad něj mističku se zvlhčenou zeminou. Do ní zasadte rychle klíčící semena, například řeřichy (klidně otestujte více druhů), přetáhněte dvěma vrstvami potravinové folie a oblepte okraje izolepou (je to lepší, než když uzavřete nádobu víčkem, protože folie propouští světlo). Vyrobtě si i kontrolní variantu, kde místo jablka vložíte kouli z mokrého papíru lehce zabalenou do igelitového sáčku jako kontrolu. Půdu vezměte nejlépe písčitou a krátce ji povařte v mikrovlnné troubě, ať neplesniví. Kdybyste chtěli experimentovat na nejvyšší úrovni, vypravte se na nádraží a pokud tam najdete suché stvoly brukvovité rostliny, která vzdáleně připomíná kokošku, ale má menší a méně zubaté listy a místo srdčitých šešulek dlouhé úzké šešule, tak jste našli huseníček, *Arabidopsis*, modelovou rostlinu všech rostlinných fyziologů, jednoletku, která vegetuje buď na jaře, nebo na podzim. Seberte stvoly, usušte a rozlámejte šešule a přes čajové sítko snadno získáte semena. Aby vám okamžitě klíčila, nechte zvlhčený výsev (zatím bez jablka) 1 týden v lednici, to stimuluje klíčení. Experiment pozorujte alespoň dva týdny po vyklíčení a pak porovnejte klíčivost semen a dosaženou výšku a vývojové stadium semenáčků ve variantě s jablkem oproti kontrole. Po celou dobu samozřejmě musíte nechat nádobu uzavřenou, aby se tam mohl ethylen akumulovat. Výsledky vyneste do grafu, pečlivě zpracujte pokus formou protokolu, pozorované rozdíly popište a diskutujte, zda vše vyšlo, tak jak jste očekávali. Bonusové body můžete získat za statistické vyhodnocení (v archivu úloh na webu si vyhledejte seriál o statistice v brožurkách z 1. ročníku a využijte metodu t-test, jež lze kromě programu R spočítat i v Excelu).
2. Zjistěte, kdy a za jakých okolností bylo působení ethyleny na rostliny pro vědu poprvé popsáno.
3. Vyrobení plyného fytohormonu může na první pohled působit jako pro rostlinu obtížný úkol. Popište, jak vypadá poslední krok syntézy a co za sloučeninu je jeho přímým prekurzorem.
4. Jev, který pozorujeme při klíčení semenáčků v ethylenové atmosféře se odborně nazývá jako „triple response, trojitá odpověď“. Popište, v čem spočívá a jaká je její fyziologická role v přírodě?

### Úloha 5: Další návštěva ve světě moderních biologických metod: Sekvenování všech generací

Autor: Stanislav Vosolobě

Počet bodů: 10

Nejdříve na úvod oprava minulého seriálu, chybně jsem napsal, že připojování nukleotidů k primeru při PCR probíhá na 5' konci, správně je „na 3' konci“, což je volná -OH skupina. Vlastní nukleotid se pak pochopitelně

připojuje 5' koncem, kde je trifosfátová skupina, která se štěpí, což energeticky pohání reakci a v hotovém vlákně zůstane pouze jediný fosfát. U di-deoxynukleotidu pak chybí -OH skupina na 3' konci.

A po opravě můžeme přejít k novému tématu, tedy jak genom poskládat. Výsledkem by mělo být několik nukleotidových sekvencí, které pokrývají jednotlivé chromosomy. Opět se poněkud liší přístupy užívané v minulosti a dnes. Základem sestavování genomu v minulosti byla genetická mapa genomu. K její konstrukci nám stačí obyčejné genetické křížení. Představme si nejdříve gen z definice klasické genetiky, tedy jako základní dědičnou jednotku pro určitou vlastnost. Pozoruje-li genetik konkrétní vlastnost u organismů (např. barvu), ptá se, kolika geny je vlastnost ovlivněna. Aby to zjistil, provádí křížení a pozoruje, jak se vloha předává mezi generacemi (podmínkou je samozřejmě, aby bylo více forem daného znaku, čili třeba barva bílá nebo černá atd.). Skutečnost, že je znak kódován jedním genem, lze dokázat podle toho, že v potomstvu po křížení je znak zastoupen podle Mendelových zákonů, které si snadno odvodíte, když si pro každého z rodičů rozevíšete všechny možné varianty gamet a rozevíšete všechny možnosti jejich kombinací v potomcích. Takže mějme nyní několik různých jednogenových znaků (barva srsti, pruhovanost srsti, délka srsti, kudrnatost...), které jsou v populaci reprezentovány více alelami (tj. srst černá, bílá, hnědá...) a položíme si otázku: Jak jsou znaky rozmístěny v genomu? Na kterých jsou chromosomech?

Nejsnadnější je zjistit, že znaky leží na různých chromosomech: Zkřížíme jedince třeba s bílou a dlouhou srstí s jedincem s černou a krátkou srstí, pak pozorujeme, zdali jsou v potomstvu oba znaky náhodně promíchány, či zda jsou ve vazbě, tedy přenášejí se společně (černá srst je zároveň krátká). Pokud jsou ve vazbě, pak jsou na stejném chromosomu a my si můžeme jednotlivé chromosomy zadefinovat podle toho, že nesou určitý, dobře definovaný gen.

A jak zjistíme, jak jsou jednotlivé geny na chromosomu uspořádány? Nyní využijeme rekombinací genomu. Máme-li heterozygotického jedince, který má jednu verzi sesterského chromosomu nesoucí geny černá-krátká-rovná a druhou s geny bílá-dlouhá-kudrnatá, dochází s určitou pravděpodobností při tvorbě gamet ke crossing-overům mezi sesterskými chromosomy (kdy se chromosomy rozstříhnou v určitých rekombinačních místech a prohodí si vzájemně části ramének) a tak se znaky mohou prohodit mezi chromosomy za vzniku zcela nové kombinace, třeba černá-dlouhá-kudrnatá, což můžeme zjistit jako příměs nového fenotypu v potomstvu, které je dostatečně veliké (alespoň stovky jedinců). Následně vyhodnocujeme, jak často se vzájemně rekombinují jednotlivé známé geny a vzhledem k tomu, že pravděpodobnost rekombinace roste se vzájemnou vzdáleností genů na chromosomu, můžeme geny poskládat do jednoznačného pořadí (má to samozřejmě určité zadrhele, jako třeba minimální rekombinovanost genů blízko centromery a podobně, ale to nebudeme nyní řešit). Pokud takto seřadíme dostatečné množství znaků, máme hotovou genetickou mapu. Pokud chceme velice hustou mapu, už se nepoužívají jako znaky geny a jejich makroskopicky

viditelné fenotypy (genů s jednoduchým fenotypovým projevem je totiž celkem málo), ale molekulární markery, které jsou založeny na tom, že identifikujeme variabilní místa v genomu a ty identifikujeme pomocí PCR či sekvenací (například máme v genomu úsek, který má v jedné alele jinou délku než ve druhé – to lze snadno rozlišit pomocí PCR daného úseku, kdy na elektroforetickém gelu získáme různé dlouhé produkty).

A co s genetickou mapou? Vzpomeňte si na minulý seriál, kdy jsme genom rozdělili na sérii fragmentů, které máme klonované v bakteriích jako DNA knihovnu. Genetickou mapu nyní použijeme jako lešení, „navlékáme“ na ni jednotlivé úseky z DNA knihovny podle toho, že obsahují některý ze známých markerů z genetické mapy. Výsledkem je pokrytí celého genomu co nejmenším počtem překrývajících se fragmentů z DNA knihovny, které potom sekvenujeme metodou zmíněnou minule. Výsledkem tohoto procesu je potom fyzická mapa genomu, která nepopisuje jen pořadí znaků, ale i přesnou vzdálenost mezi nimi v bázích DNA.

Zmínil jsem ale, že zpracovávání genetické mapy je metoda patřící k minulosti. Jak se postupuje dnes? Dnes dominuje shotgun přístup (česky „brokovnice“). Zatímco první přístup nejdříve zpracoval hierarchicky DNA knihovnu, takže z ní vybral tu nejideálnější kombinaci fragmentů, které pokrývají celý genom a pak je teprve sekvenoval, shotgun postup postupuje jinak: vezme všechny fragmenty z genetické knihovny, všechno sekvenuje a vytváří ohromné množství sekvenčních čtení, takže genom, který má třeba 1 milion bází bude reprezentován 10 miliony bází sekvenčních čtení délky maximálně několika set bází, jak umožňuje sekvenční metoda. Potom se tento obrovský balík sekvencí prožene superpočítačem a ten podle překryvů sestaví sekvenci.

Jaké jsou výhody a nevýhody obou postupů? Starší metoda je optimalisována na minimalisaci nutného sekvenování a v době, kdy bylo sekvenování drahé a pomalé, byla jedinou možností. Druhá metody je mnohem elegantnější dnes, kdy je vlastní sekvenování rychlé a levné a mnohem pracnější by byla tvorba genetické mapy. Ale na druhou stranu vzniká další problém. V genomu je veliké množství repetitivních sekvencí (dokonce je to většina genomu), které vypadají třeba jako sekvence CATCATCATC-ATCATCATCAT a podobně. Tyto repetitivní sekvence často vyplňují prostory mezi jednotlivými geny, které kódují proteiny, a když chceme sestavit genom z malých fragmentů, můžeme sice snadno složit sekvenci pro nějaký kratší úsek genomu, ale dříve nebo později dojdeme k repetitivní sekvenci, která se může vyskytovat mnohokrát na různých místech chromosomu a naše skládání nemůže pokračovat. Genetická mapa nám umožní jednotlivé fragmenty uspořádat a v nehorším případě nám zůstanou neznámá místa v určitých repetitivních oblastech, což příliš nevdává. Naproti tomu výsledkem shotgun přístupu nemusí být celé chromosomy, ale jen větší množství contigů, což jsou základní jednotky genomu, které vzniknou složením překrývajících se úseků, a zbydou omezené úseky, kde nelze genom složit. Contigy mohou mít délku třeba jen několik desítek tisíc bází oproti milionům bází, které mají chromosomy. Ještě se můžete setkat s termínem scaffold,

což je výsledek skládání contigů podle nějaké hierarchické mapy, kdy se nám sice nepodaří sestavit celý chromosom a zůstávají nám tam mezery v repetitivních sekvencích, ale známe jejich přesnou délku a polohu, takže okolní zbytek genomu sestavit můžeme.

Co umožnilo rozvoj shotgun sekvenování? Zejména obrovské zlevnění a zrychlení sekvenování díky metodám next-generation sequencing. Ty dnes umožňují provést sekvenaci velkých genomů, která dříve trvaly roky, za pár dní. A cena za sekvenaci se také snížila o mnoho řádů. Zmíňme třeba systém Illumina, který je dnes nejrozšířenější. Vezme se DNA, ta se rozláme na kousky dlouhé okolo 1 tisíce bází. K těmto kouskům DNA se na oba konce molekuly připojí malý úsek DNA fungující jako adaptor. DNA denaturujeme, takže máme jednořetězcovou DNA a za konec jednoho z adaptorů tyto kousky DNA přichytíme na speciální destičku, takže získáme jakýsi „les“ DNA molekul. Kromě tohoto „lesa“ je ale na destičce již od výroby upevněn „trávník“ krátkých molekul DNA, které jsou komplementární buď k jednomu, či k druhému adaptoru a těch je tam o mnoho řádů více (tak jako v lese máte jeden strom a okolo hustý podrost). Naše zachycená DNA tvořící „stromy“ má samozřejmě tendenci párovat s komplementárními adaptory na destičce pomocí svého volného adaptoru na konci, který není přichycen k destičce. To se skutečně stane a DNA vytvoří obloučky, jedním koncem je přichycena na destičce, druhým ke komplementárnímu adaptoru z destičky. Tento adaptor pak může sloužit jako primer a když přidáme DNA polymerázu, z jednořetězcové molekuly uděláme dvouřetězcovou. Získáme oblouk dvouřetězcové DNA, kterou opět denaturujeme. Vlákna se rozpletou a opět máme volnou původní molekulu DNA, ale z komplementárního adaptoru, ke kterému se původně chytala naše sekvence, je nyní celé nové komplementární vlákno. I toto nové vlákno bude na svém volném konci opatřeno adaptorem, který je komplementární k uvázanému adaptoru původní molekuly. Když necháme oba nové „stromy“ interagovat s „podrostem“, najdou si volné konce zase k sobě komplementární adaptory a po přidání polymerázy a opětovné denaturaci již získáme 4 „stromy“ DNA molekul. Je důležité, že tyto nové stromy tvoří hustý shluk a jsou mnohem blíže u sebe, než byly vzdálenosti mezi různými molekulami prvotní DNA, co jsme připojili na destičku. Po mnoha cyklech získáme husté skupinky stromů, které jsou tvořeny potomky jedné původní molekuly. Polovina je identická, polovina je komplementární. Ty komplementární odmyjeme z destičky a již tam máme jen les identických kopií původní molekuly. Potom můžeme přistoupit k vlastní sekvenaci, která spočívá v tom, že se k celé destičce přidají značené nukleotidy a polymeráza a spustí se polymerační reakce, která je nastavena tak, že se provede připojení právě jedné báze. Tato báze je opět klasicky fluorescenčně značena a po reakci scanujeme celou destičku laserem a dle barvy fluorescence poznáme, zda-li se připojila v daném „lesíku“ namnožených molekul DNA báze A, T, G či C. Vypadá to tak, že každý shluk identických DNA připojuje jednu konkrétní bázi a fluoreskuje tedy specifickou barvou. Čteci krok opakujeme, až osekvenujeme požadovanou délku molekuly, v případě Illumina systému je to okolo 100 bází. Díky miniaturisaci se na jednu destičku vejde ohromné

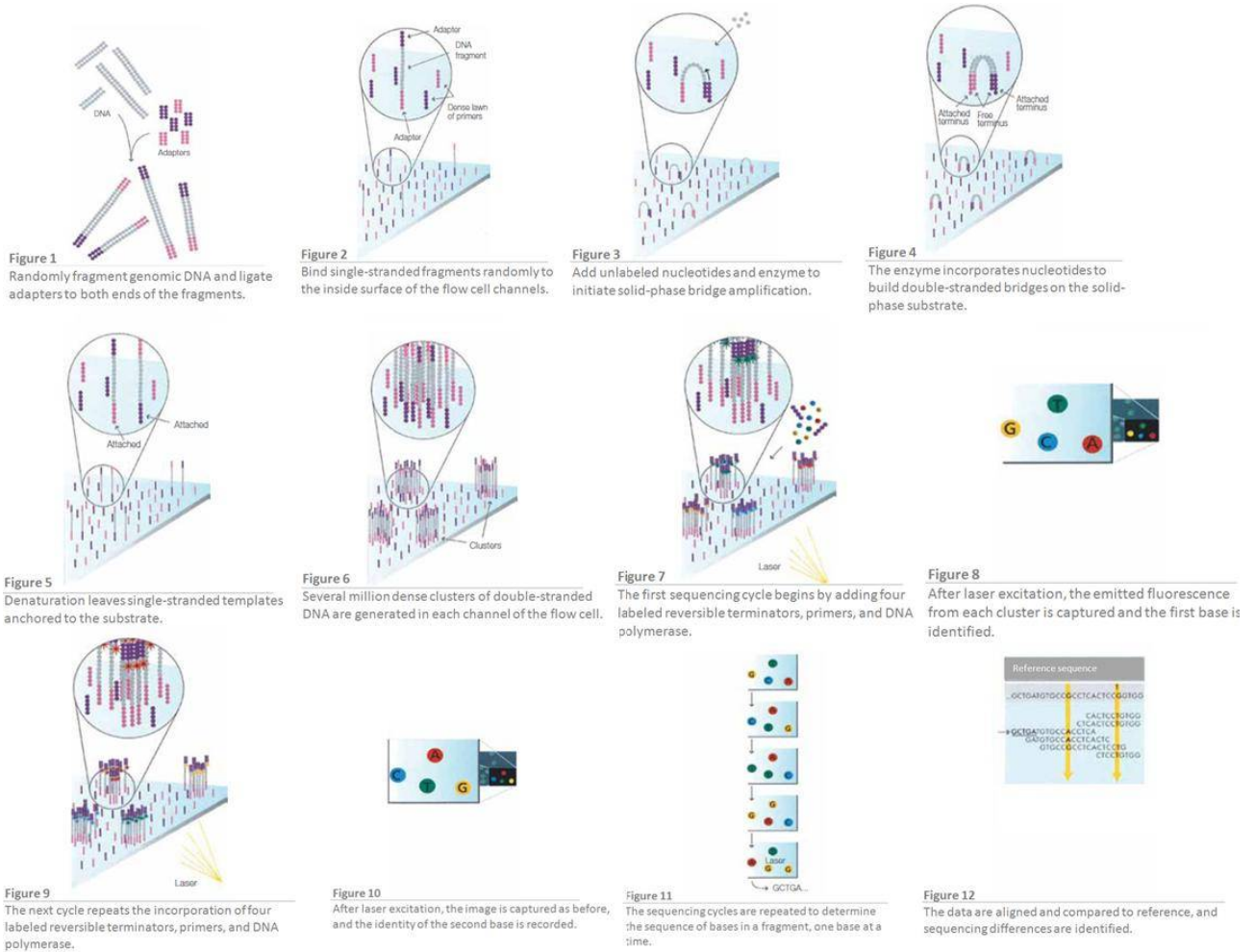
množství fragmentů a takže snadno sekvenujeme celý genom s použitím několika málo těchto destiček. Jediná nevýhoda oproti klasické metodě sekvenování je zhruba pětina délka přečteného úseku DNA, což znesnadňuje skládání genomu.

Ještě více sci-fi dojmem působí systém PacBio, který používá mikroskopické komůrky, do kterých se vejde jedna molekula DNA. Na dně komůrky je připevněna jediná molekula enzymu DNA polymerasa a ta postupně kopíruje vloženou molekulu DNA. Metoda je tak citlivá, že je možné identifikovat opět přes fluorescenční značení připojení jediného konkrétního nukleotidu! V tomto případě je možné přečíst až tisíce nukleotidů naráz, což je obrovský pokrok, protože to výrazně zpřesňuje skládání genomu z malých fragmentů. Bohužel je tato metoda stále poměrně drahá. Oproti tomu sekvenace Illuminou je dnes celkem finančně dostupná. Pro doplnění zmíním ještě jeden rozdíl next-generation sekvenování oproti klasickému: vždy se sekvenuje komplexní směs DNA fragmentů. V jednom běhu tedy přečtete miliony sekvencí (za cenu řádově desítek tisíc Kč), což je žádoucí při genomických pokusech, ale není použitelné, pokud byste si chtěli přečíst sekvenci jednoho jediného genu. Pro tu se stále používá klasická sekvenace (vychází okolo 100 Kč za vzorek).

1. Kompletně sekvenovaných organismů přibývá závratným tempem. Prohledejte na internetu seznamy kompletně sekvenovaných organismů a zjistěte, kolik je sekvenováno druhů hub, hmyzu, obratlovců a rostlin. Stačí přibližný řádový odhad.
2. U každé předchozí skupiny zjistěte, kolik genomů bylo získáno za poslední 3 roky.
3. Rozhlédněte se u vás doma a zjistěte, jaké vlastně organismy s kompletně sekvenovaným genomem máte přímo kolem sebe! Neomezujte se jen na makroskopické organismy.
4. Na závěr trochu detektivní úkol. Většina sekvenačních dat je volně přístupná na internetu a sekvenační projekty mívají zpravidla vlastní webové stránky, kde je mnoho užitečných dat.

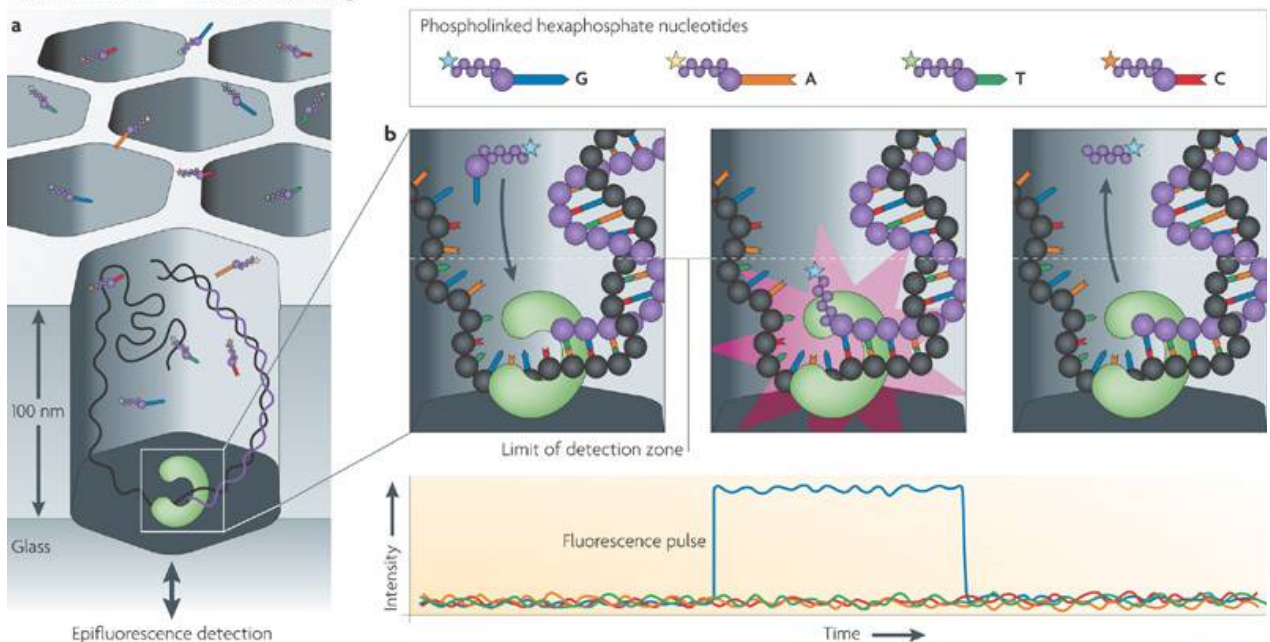
Vyberte si některý vámi oblíbený kompletně sekvenovaný organismu a zkuste se doklikat až na stránku, kde je možné stáhnout přímo data genomické sekvence. Většinou má hledaná stránka formát výpisu z FTP serveru s různými adresáři a soubory. Vedle souborů je i jejich velikost a genom je zpravidla největší. Vlastní sekvence je ve .fasta souboru (viz úvodní díl seriálu nultého ročníku Biozvěstu) s příponou .fa (či .fas, .fst, .fasta) a za ní ještě může být nějaká další divná přípona, která říká, že soubor je komprimován. Data mohou být buď v jednom souboru, nebo rozdělené po chromosomech, scaffoldech či contizích. Pošlete odkaz na stránku se soubory, které představují hledaná data.





Princip sekvenčního systému Illumina

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



Princip sekvenčního systému PacBio