

Kolektív autorov:

Sepšiová Regina
Brázdovič Filip
Červenák Filip
Džugasová Vladimíra
Gálová Eliška
Juríková Katarína
Kyzek Stanislav
Mentelová Lucia
Slaninová Miroslava
Ševčovičová Andrea
Zeiselová Lucia
Tomáška Ľubomír

LABORATÓRNE CVIČENIA
Z GENETIKY
A MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE

2018

Univerzita Komenského v Bratislave

Uvedené úlohy boli otestované a optimalizované v rámci projektu Genetika na kolesách pre pedagógov a študentov stredných škôl. Okrem stredoškolákov sú vhodné aj pre vysokoškolské kurzy, ktorých súčasťou sú základy genetiky a molekulárnej biológie. Podmienkou ich realizácie je základné laboratórne vybavenie popísané pri jednotlivých protokoloch.

© RNDr. Regina Sepšiová, PhD., Mgr. Filip Brázdovič, Mgr. Filip Červenák, doc. RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD., doc. RNDr. Eliška Gálová, PhD., Mgr. Katarína Juríková, Mgr. Stanislav Kyzek, Mgr. Lucia Mentelová, PhD., doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD., doc. RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD., Mgr. Lucia Zeiselová, prof. RNDr. Ľubomír Tomáška, DrSc.

Dizajn obálky:

Mgr. Tomáš Kovalinka

Recenzovali:

RNDr. Katarína Bruňáková, PhD.

RNDr. Soňa Nagyová, PhD.

PodĎakovanie:

Tieto učebné texty vznikli vďaka finančnej podpore Grantovej agentúry KEGA (KEGA 009UK-4/2016) a sú z časti výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV financovaného ERDF.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, 2018

ISBN 978-80-223-4555-2

OBSAH

Predhovor	4
1. Modelové organizmy v genetike	8
1. 1 Teoretická časť	8
1. 1. 1 <i>Escherichia coli</i>	9
1. 1. 2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1. 1. 3 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12
1. 1. 4 <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1. 1. 5 Myši a potkany	14
1. 1. 6 <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1. 2 Praktická časť	18
1. 2. 1 Pozorovanie a očkovanie kultúr mikroorganizmov	18
1. 2. 2 Kométový test na bunkách hrachu siateho (<i>Pisum sativum</i>).....	21
1. 2. 3 Rozlíšenie pohlavia a pozorovanie rôznych fenotypových znakov ovocnej mušky (<i>Drosophila melanogaster</i>).....	23
2. Princípy dedičnosti	26
2. 1 Teoretická časť	26
2. 1. 1 Mendelistická dedičnosť	26
2. 1. 2 Dedičnosť a pohlavie.....	27
2. 2 Praktická časť	28
2. 2. 1 Overenie princípov dedičnosti znakov viazaných na pohlavné chromozómy ..28	
2. 2. 2 Roztlakové preparáty polyténnych chromozómov z larválnych slinných žliaz <i>D. melanogaster</i>	32
3. „Športový gén“	35
3. 1 Teoretická časť	35
3. 2 Praktická časť	36
3. 2. 1 Izolácia DNA z bukálnej sliznice.....	36
3. 2. 2 Polymerázová reťazová reakcia fragmentov ACE génu	37
3. 2. 3 Elektroforéza DNA v agarózovom géli.....	40
4. Sledovanie zmien v topológii DNA	44
4. 1 Teoretická časť (Oxidačný stres a antioxidanty).....	44
4. 2 Praktická časť	44
4. 2. 1 Sledovanie účinku multivitamínovej zmesi na topológiu DNA.....	44
5. Reštrikčná analýza DNA	47
5. 1 Teoretická časť	47
5. 2 Praktická časť	47
5. 2. 1 Identifikácia neznámeho páchatel'a pomocou analýzy DNA	47
6. Analýza proteínov	50
6. 1 Teoretická časť (Indukcia expresie cieľového proteínu).....	50
6. 2 Praktická časť	52
6. 2. 1 Separácia proteínov polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (PAGE) a farbenie proteínov farbičkou Coomassie Brilliant Blue	52
6. 2. 2 Meranie koncentrácie proteínu v roztoku – Bradfordov test	56
Základné časti protokolu z laboratórneho cvičenia	59
Základné pravidlá bezpečnosti pri práci	60
Register pojmov	61

Pod'te priatel'ia, budeme sa hrať![†]

Úvodné kapitoly učebných textov, ktoré ste práve otvorili, majú za cieľ čitateľa pripraviť na to, čo môže očakávať na nasledujúcich stranách. Vy sa môžete tešiť na sériu zaujímavých praktických úloh z genetiky a molekulárnej biológie, ktoré budú malou ochutnávkou práce vo vedeckom laboratóriu. Hoci experimenty budú veľmi rôznorodé, spája ich jedna spoločná charakteristika: pri všetkých sa budete hrať!

Tak nestráčajme čas a začnime sa hrať hneď. Na konci tohto textu nájdete tabuľku a v nej niekoľko otázok. Skúste do stĺpca vedľa príslušnej otázky napísať odpoveď. Nebojte sa, že v mnohých prípadoch budete iba hádať (výnimku urobte iba v prípade, že nebudete poznať príslušný termín). Skúste tiež odolať pokušeniu a nepozrite sa na ďalšiu stranu, na ktorej je tabuľka vyplnená správnymi odpoveďami. Zamyslite sa, zväzte to, čo viete (a čo nevíete), zapojte fantáziu. Môžete aj spolupracovať so spolužiakmi, diskutovať o rôznych možnostiach, môžete navzájom súhlasiť i nesúhlasiť a na základe argumentov sa rozhodnúť pre najpravdepodobnejšiu hypotézu (odpoveď na danú otázku). Keď tabuľku vyplníte a porovnáte so správnymi odpoveďami, vráťte sa v texte na miesto za tromi bodkami.

[...]

Skúsme zosumarizovať, čo je výsledkom tejto jednoduchej hry. V prvom rade, dozvedeli ste sa niekoľko údajov, z ktorých niektoré sa vám môžu zdať aj zaujímavé. V niektorých prípadoch ste pritom určite boli prekvapení, ako sa vaše odhady líšia od uvedených čísel. Zistili ste tiež (ak ste sa navzájom radili), ktoré argumenty (vaše, či spolužiakov) viedli k presnejším odpoveďiam. V mnohých prípadoch ste odhadovali odpovede na základe vašej intuície (zdravého sedliackeho rozumu), pričom niektoré odhady boli veľmi presné a iné úplne mimo. Zistili ste tak podstatnú vec: intuícia nie je vždy spoľahlivý radca a nie je možné jej bezbreho dôverovať.

To je pomerne veľa benefitov, ktoré poskytla jednoduchá hra. Je pritom potrebné zdôrazniť, že jej cieľom nebolo byť najrýchlejší, či nazbierať najviac bodov. Jej cieľom bolo porovnať vlastné predstavy o odpoveďiach na otázky, ktoré sa týkajú živého sveta s predstavami, ktoré v súčasnosti ponúka vedecká literatúra.

Dôležité je si uvedomiť, že aktuálne vedecké poznatky o fungovaní prírody, včítane odpovedí uvedených v tabuľke, sú tiež výsledkom hry [1]. Hry, ktorá prebieha podobne ako tá, ktorú ste si pred chvíľou vyskúšali. V snahe pochopiť nejaký fenomén je potrebné najprv formulovať otázku; zamyslieť sa, čo vieme (a čo nevíeme) o danom fenoméne povedať; diskutovať o našich názoroch s ľuďmi, ktorí na danú otázku tiež hľadajú odpoveď; vymyslieť hypotézu, ktorá bude takúto odpoveď predstavovať; a následne túto hypotézu testovať. Jediný rozdiel v porovnaní s našou hrou je, že skúškou správnosti hypotézy nie je vyplnená tabuľka, ale experiment. Inak však sú výsledky tohto testu veľmi podobné tomu, ktorý ste absolvovali pred chvíľou. Niektoré hypotézy sú celkom presné (experiment dopadol približne tak, ako sme predpokladali), iné sa ukážu ako nesprávne. Tie prvé nás potešia, tie druhé poučia. Čaro tejto hry spočíva v tom, že vlastne nemôžeme prehrať.

Genetika je plná príkladov, ktoré ilustrujú experimentovanie ako formu hry. Gregor Mendel nepochybne pociťoval pri zistení, že početnosť rôznych foriem hrachu, ktoré získal po krížení, je možné vyjadriť jednoduchými pomermi celých čísel [2], rovnaký pocit zadosťučinenia ako hráč futbalu, ktorý skóruje rozhodujúci gól zápasu. James Watson a Francis Crick sa pri jednom z najdôležitejších objavov minulého storočia hrali so stavebnicou podobnou legu, z ktorej poskladali model dvojzávitnice deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) [3]. Rozdiel od lega bol len v tom, že ako stavebné prvky nepoužívali kocky, ale plechové makety nukleotidov (stavebných jednotiek DNA). A rozlúštenie genetického

kódu Marshallom Nirenbergom a jeho kolegami [4] prebiehalo podobným spôsobom, ako sa skladá puzzle. Len namiesto kúskov obrázku používali triplety báz (kodóny) a aminokyseliny a na rozdiel od klasického puzzle vopred nevedeli, ako bude vyzerat' celkový obraz. Vskutku to, čo v súčasnosti vieme o genetike, je výsledkom experimentálnych hier so vzrušujúcim priebehom pre divákov i samotných aktérov [5].

Pravdaže, ako každá hra, majú aj tie experimentálne svoje pravidlá. Dozvieme sa o nich na nasledujúcich stranách, ale predovšetkým počas realizácie samotných experimentov. Jedným z tých pravidiel je, že sa nesmieme zľaknúť nesprávnej hypotézy, omylu, nečakaného výsledku. Naopak, mnohé nečakané výsledky stáli pri zrode tých najdôležitejších objavov. Práve vďaka nečakane odrazenej lopte sa hráč často ocitne v skvelej šanci a záleží na ňom, či je pripravený ju využiť na skórovanie. „Šťastie praje pripraveným”, povedal Louis Pasteur vo svojej prednáške na Univerzite v Lille v roku 1854. Našou úlohou je vám v tejto príprave pomôcť.

Vráťme sa ešte raz k tabuľke. Je totiž poučná ešte v jednom podstatnom zmysle. Odpovede, ktoré ponúka, sú síce tými najlepšimi odhadmi, ktoré máme v súčasnosti k dispozícii, ale neznamená to, že sú konečné a správne. Sú podložené experimentálnymi údajmi, ktoré boli získané v mnohých laboratóriách, ale je veľmi pravdepodobné, že ich bude nevyhnutné na základe výsledkov ďalších experimentov korigovať. Tento odkaz je dôležitý preto, že jednou zo základných charakteristík vedy je, že neponúka nemenné pravdy. Skôr núti k pochybovaniu o adekvátnosti našich predstáv o fungovaní sveta. Na jednej strane to môže mnohých zneistiť, predovšetkým v situáciách, keď je vedec konfrontovaný s neomylným dogmatikom, ktorý má jednoduché a jasné vysvetlenia a odpovede na všetky otázky. Stačí, keď ich presvedčivo odprezentuje a odvoláva sa na „zdravý sedliacky rozum”. My však vieme, že intuícia často nie je dobrým radcom, predovšetkým v situáciách, keď nemáme dostatok relevantných informácií; tak ako v úvodnej hre s vyplňaním tabuľky. Cieľom vzdelávania je tieto informácie poskytnúť motivovaným, talentovaným a kreatívnym mladým ľuďom ako ste vy, a tak im vytvoriť podmienky pre skórovanie dôležitých gólov, budovanie estetických modelov a skladanie puzzle s vopred neznámymi obrázkami. Teda pre víťazstvá a radosti z objavovania [6] v experimentálnych hrách, ktorých výsledky nás priblížia k adekvátnemu poznaniu sveta, aj keď o správnosti našich predstáv budete stále musieť pochybovať.

Literatúra:

†Parafraza názvu detského seriálu z 1960. rokov „*Pojďte pane, budeme si hrať*”.

- [1] Kováč, L. (1991). Veda ako hra. Slovenské pohľady 4/91, 103–106; Kritika a kontext 7 (2-3) 2002; http://www.biocenter.sk/lkpublics_files/4-0.pdf. Odporúčam aj ďalšie inšpiratívne texty Ladislava Kováča: <http://www.biocenter.sk/lkpublics.html>
- [2] Mendel, J.G. (1866). Versuchen über Pflanzhybriden. Verhandlung des Naturforschenden Vereines in Brünn 4: 3-47.
- [3] Watson, J., Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737-738. Keď sa pozriete na obrázok, na ktorom sú Watson s Crickom odфотографovaní pár dní po poskladaní modelu, na ich tvárach rozpoznáte výraz víťazov: <http://www.thehistoryblog.com/wp-content/uploads/2013/05/Watson-Crick-DNA-model.jpg>
- [4] Nirenberg, M.W., Matthaei, H.J. (1961). The dependence of cell – free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47: 1588-1602.
- [5] Tomáška, L., Brázdovič, F., Červenák, F., Krajčovič, J., Ševčovičová, A., Cillingová, A., Dušínský, R., Džugasová, V., Gálová, E., Juríková, K., Miadoková, E., Nosek, J., Procházková, K., Sepšiová, R., Slaninová, M., Švec, M., Šubík, J., Vlček, D. (2015). Klasické experimenty v genetike: Na ceste k odhaleniu tajomstiev dedičnosti. CreateSpace Independent Publishing Platform, 242 p.
- [6] Kováč, L. (2017). Majme radosť z objavovania. SME 25 č. 53/17, str. 9; http://www.biocenter.sk/lkpublics_files/Kovac_Majme_radosť_z_objavovania.pdf
- [7] Milo, R., Phillips, R. (2015). Cell Biology by Numbers. Garland Science. http://www.rpgroup.caltech.edu/courses/aph161/2012/files_2012/homework/CaltechJan2012.pdf

Odhadnite:	Odpoveď:
<p>Počet buniek v ľudskom tele</p> <p>Objem molekuly vody (v nm³)</p> <p>Objem páru báz v DNA (v nm³)</p> <p>Objem bunky baktérie <i>Escherichia coli</i> (v μm³)</p> <p>Objem ľudského fibroblastu (v μm³)</p> <p>Objem ľudského oocyту (v μm³)</p> <p>Objem ľudskej spermie (hlavičky) (v μm³)</p> <p>Objem ľudského adipocytu (tukovej bunky) (v μm³)</p> <p>Počet molekúl proteínov v bunke baktérie <i>E. coli</i></p> <p>Počet molekúl proteínov v ľudskej bunke</p> <p>Priemer bežného globulárneho proteínu (v nm)</p> <p>Priemerná dĺžka génu*¹ v baktérii <i>E. coli</i> (v pároch báz)</p> <p>Priemerná dĺžka génu v ľudskej bunke (v pároch báz)</p> <p>Čas potrebný na prepis jedného génu v <i>E. coli</i> (v min)</p> <p>Čas potrebný na prepis jedného génu v ľudskej bunke (v min)</p> <p>Čas potrebný na jeden bunkový cyklus <i>E. coli</i> (v min)</p> <p>Čas potrebný na jeden bunkový cyklus ľudskej bunky (v min)</p> <p>Počet ribozómov v bunke <i>E. coli</i></p> <p>Počet ribozómov v ľudskej bunke</p> <p>Priemer častice vírusu detskej obrny (poliovírus) (v nm)</p> <p>Priemer častice vírusu HIV (v nm)</p> <p>Dĺžka genómu* bakteriofága T7 (v pároch báz)</p> <p>Dĺžka genómu vírusu herpes simplex (v pároch báz)</p> <p>Dĺžka haploidného* genómu človeka (v pároch báz)</p> <p>Dĺžka genómu <i>E. coli</i> (v pároch báz)</p> <p>Dĺžka genómu kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (v pároch báz)</p> <p>Frakcia objemu cytoplazmy hepatocytu tvorená mitochondriami (v %)</p> <p>Frakcia objemu cytoplazmy hepatocytu tvorená jadrom (v %)</p> <p>Frakcia objemu cytoplazmy hepatocytu tvorená lyzozómami (v %)</p> <p>Počet synáps v ľudskom mozgu</p> <p>Počet synáps na 1 mm³ mozgovej hmoty</p> <p>Priemer mikrotubulu deliaceho vretienka (v nm)</p> <p>Priemer aktínového mikrofilamentu (v nm)</p> <p>Počet buniek v jednom mililitri stacionárnej kultúry <i>E. coli</i></p> <p>Koncentrácia ATP v bunke <i>E. coli</i> (v mmol.dm⁻³)</p> <p>Koncentrácia etanolu vo fermentujúcej bunke kvasinky (v %)</p> <p>Koncentrácia etanolu vo fermentujúcej bunke kvasinky (v mmol.dm⁻³)</p> <p>Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená proteínmi (v %)</p> <p>Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená RNA (v %)</p> <p>Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená DNA (v %)</p> <p>Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená anorganickými soľami (v %)</p> <p>Rýchlosť pohybu bunky <i>E. coli</i> (v μm.sec⁻¹)</p> <p>Rýchlosť pohybu bunky riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (v μm.sec⁻¹)</p> <p>Rýchlosť pohybu cicavčieho fibroblastu (v μm.hod⁻¹)</p> <p>Čas potrebný na kompletnú výmenu buniek epitelu tenkého čreva (v dňoch)</p> <p>Čas potrebný na kompletnú výmenu buniek tukového tkaniva (v dňoch)</p> <p>Počet génov kódujúcich proteíny <i>E. coli</i></p> <p>Počet génov kódujúcich proteíny vírusu HIV</p> <p>Počet génov kódujúcich proteíny v ľudskej bunke</p> <p>Počet mutácií v DNA ľudskej bunky po jednom bunkovom delení</p> <p>Počet mutácií v DNA drozofily po jednom bunkovom delení</p> <p>Počet mutácií v DNA <i>E. coli</i> po jednom bunkovom delení</p>	

¹ Pojmy označené hviezdikou nájdete vysvetlené v Registri pojmov.

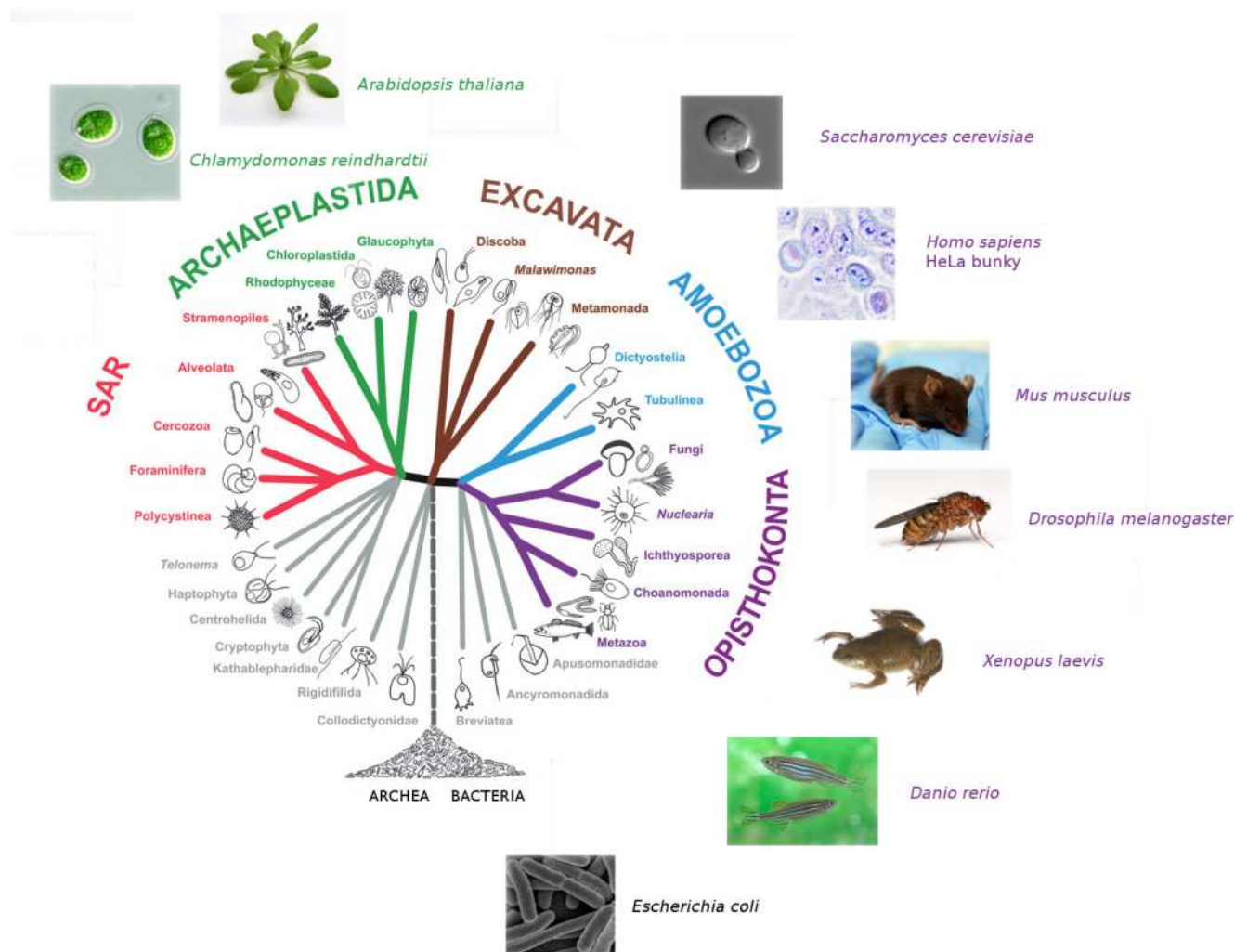
Odhadnite:	Odpoved':
Počet buniek v ľudskom tele	$4 \cdot 10^{13}$
Objem molekuly vody (v nm^3)	0,03
Objem páru báz v DNA (v nm^3)	1
Objem bunky baktérie <i>Escherichia coli</i> (v μm^3)	0,3-3
Objem ľudského fibroblastu (v μm^3)	2000
Objem ľudského oocyту (v μm^3)	$4 \cdot 10^6$
Objem ľudskej spermie (hlavičky) (v μm^3)	30
Objem ľudského adipocyту (tukovej bunky) (v μm^3)	600000
Počet molekúl proteínov v bunke baktérie <i>E. coli</i>	10^6
Počet molekúl proteínov v ľudskej bunke	10^{10}
Priemer bežného globulárneho proteínu (v nm)	4-5
Priemerná dĺžka génu v baktérii <i>E. coli</i> (v pároch báz)	1000
Priemerná dĺžka génu v ľudskej bunke (v pároch báz)	10^4 - 10^6
Čas potrebný na prepis jedného génu v <i>E. coli</i> (v min)	1
Čas potrebný na prepis jedného génu v ľudskej bunke (v min)	30
Čas potrebný na jeden bunkový cyklus <i>E. coli</i> (v min)	20
Čas potrebný na jeden bunkový cyklus ľudskej bunky (v min)	1200
Počet ribozómov v bunke <i>E. coli</i>	10^4
Počet ribozómov v ľudskej bunke	10^6
Priemer častice vírusu detskej obrny (poliovírus) (v nm)	30
Priemer častice vírusu HIV (v nm)	120-150
Dĺžka genómu bakteriofága T7 (v pároch báz)	40000
Dĺžka genómu vírusu herpes simplex (v pároch báz)	153000
Dĺžka haploidného genómu človeka (v pároch báz)	$3 \cdot 10^9$
Dĺžka genómu <i>E. coli</i> (v pároch báz)	$4,6 \cdot 10^6$
Dĺžka genómu kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (v pároch báz)	$1,2 \cdot 10^7$
Frakcia objemu cytoplazmy hepatocyту tvorená mitochondriami (v %)	20
Frakcia objemu cytoplazmy hepatocyту tvorená jadrom (v %)	6
Frakcia objemu cytoplazmy hepatocyту tvorená lyzozómami (v %)	1
Počet synáps v ľudskom mozgu	10^{13} - 10^{15}
Počet synáps na 1 mm^3 mozgovej hmoty	10^9
Priemer mikrotubulu deliaceho vretienka (v nm)	25
Priemer aktínového mikrofilamentu (v nm)	6
Počet buniek v jednom mililitri stacionárnej kultúry <i>E. coli</i>	10^9
Koncentrácia ATP v bunke <i>E. coli</i> (v $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	9,6
Koncentrácia etanolu vo fermentujúcej bunke kvasinky (v %)	5
Koncentrácia etanolu vo fermentujúcej bunke kvasinky (v $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	1000
Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená proteínmi (v %)	55
Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená RNA (v %)	20
Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená DNA (v %)	3
Frakcia sušiny bunky <i>E. coli</i> tvorená anorganickými soľami (v %)	1
Rýchlosť pohybu bunky <i>E. coli</i> (v $\mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$)	16-30
Rýchlosť pohybu bunky riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (v $\mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$)	5-150
Rýchlosť pohybu cicavčieho fibroblastu (v $\mu\text{m} \cdot \text{hod}^{-1}$)	30
Čas potrebný na kompletnú výmenu buniek epitelu tenkého čreva (v dňoch)	2-4
Čas potrebný na kompletnú výmenu buniek tukového tkaniva (v dňoch)	3000
Počet génov kódujúcich proteíny <i>E. coli</i>	4300
Počet génov kódujúcich proteíny vírusu HIV	9
Počet génov kódujúcich proteíny v ľudskej bunke	21000
Počet mutácií v DNA ľudskej bunky po jednom bunkovom delení	0,2-1
Počet mutácií v DNA drozofily po jednom bunkovom delení	0,06
Počet mutácií v DNA <i>E. coli</i> po jednom bunkovom delení	0,0005-0,005

Zdroj: [6] Milo, R. a Phillips, R. (2015) *Cell Biology by Numbers*.

1. MODELOVÉ ORGANIZMY V GENETIKE

1. 1 Teoretická časť

Ľudia zdieľajú životný priestor s mnohými organizmami. Za celú dobu nášho spolužitia ich bolo katalogizovaných približne 3,6 milióna². Podľa niektorých odhadov však na Zemi žije 7,4 - 10 miliónov druhov. Ani toto číslo ešte nie je finálne, pretože nezahŕňa mikroorganizmy žijúce v oceánoch a moriach. Ak zahrnieme do tohto počtu aj tie, tak sa dostaneme až k 1 triliónu (10^{12}) druhov. Všetky známe organizmy sú klasifikované a zaradené do jednej z troch domén života (Obr. 1. 1): archeóny (*Archaea*), baktérie (*Bacteria*) a eukaryoty (*Eukarya*). Tie sa ďalej členia na jednotlivé podskupiny.



Obr. 1. 1: Schematické zobrazenie fylogenetických vzťahov v rámci skupín eukaryotov. Na periférii sú fotografie najčastejšie využívaných modelových organizmov v genetike. Farba písma zodpovedá skupine, ku ktorej modelové organizmy patria. *Escherichia coli* patrí do skupiny Bacteria. SAR je skratkou pre organizmy patriace do skupín Stramenopiles, Alveolates a Rhizaria (Adl a kol. 2012, upravené).

² Údaj z projektu *Opentree of life* verzia z 26. 2. 2017, <https://tree.opentreeoflife.org>. Tento projekt má za cieľ zhromažďovať známe taxonomické dáta.

Veda je založená na pozorovaniach, formulovaní hypotéz a ich testovaní. V biológii sú predmetom štúdia organizmy a procesy, ktoré v nich prebiehajú. Tie organizmy, ktoré sa osvedčili pri štúdiu biologických otázok, sa označujú ako modelové. Práca s modelovými organizmami by mala byť finančne nenáročná, jednoduchá, mali by mať krátku generačnú dobu a produkovať vysokopočetné potomstvo. V súčasnosti je dôležité aj to, aby modelový organizmus mal pomerne malý genóm³, ktorý je možné upravovať pomocou nástrojov molekulárnej biológie. Tieto parametre spĺňa viacero organizmov, no v genetike dominujú hlavne baktéria *Escherichia coli*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, zelená riasa *Chlamydomonas reinhardtii* a dvojkľúčolistová rastlina *Arabidopsis thaliana*. Zo živočíchov sa najviac využívajú myši (*Mus musculus*), potkany (*Rattus norvegicus*), obojživelník *Xenopus laevis*, ryba *Danio rerio* a tzv. ovocná muška *Drosophila melanogaster*. Experimenty na ľuďoch nie sú prípustné, ale vo veľkej miere sa využívajú ľudské bunkové línie. Príkladom sú bunky línie HeLa, čo je najstaršia bunková línia odvodená z nádorových buniek krčka maternice (Obr. 1. 1).

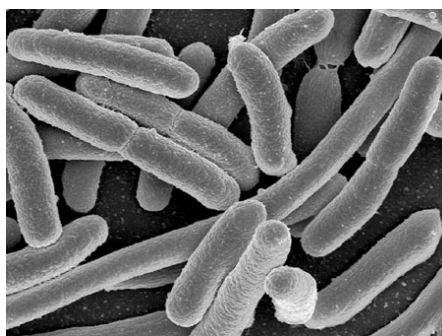
Neexistuje najlepší modelový organizmus. Každý má svoje prednosti, ale aj nedostatky. Tak ako si vybrať? Voľba by mala odvíjať od vedeckej otázky, ktorú chceme skúmať. Nasledujúce kapitoly sa venujú modelovým organizmom najčastejšie využívaným v genetike.

Odporúčaná literatúra:

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V. and Heiss, A. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59 (5): 429-514.
- Locey, K.J. and Lennon, J.T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *PNAS* 113 (21): 5970-5975.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G. and Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 9 (8): p.e1001127.

1. 1. 1 *Escherichia coli*

Baktérie ako jednoduché prokaryotické bunky predstavujú ideálny model štúdia mnohých základných aspektov biológie a biochémie. Najlepšie preštudovaným druhom baktérií je *Escherichia coli*, dlhodobo jeden z najvyužívanejších organizmov pri skúmaní základných mechanizmov molekulárnej genetiky.



Obr. 1. 2: Baktérie *Escherichia coli* (<https://www.biopedia.sk/virusy-a-bakterie/uzitocne-bakterie>).

Escherichia coli, známejšia skôr svojím skráteným označením *E. coli*, je gramnegatívna nesporelujúca fakultatívne anaeróbna pohyblivá tyčinka. *E. coli* sa

³ Pojmy označené hviezdikou nájdete vysvetlené v Registri pojmov.

fyziologicky nachádza v hrubom čreve teplokrvných živočíchov a človeka. Tvorí približne 0,1 % črevnej mikrobioty a jej prítomnosť je potrebná pre správny priebeh tráviacich procesov v čreve. Patogénne* kmene *E. coli* zapríčiňujú infekcie tráviacej sústavy a močových ciest, vyskytovať sa môžu aj v krvných vzorkách, kedy sú pôvodcom bakterémie*. Často spôsobujú nozokomiálne infekcie, t. j. infekcie vznikajúce hospitalizáciou alebo vyšetrením pacienta v nemocnici.

E. coli je pre svoju relatívnu jednoduchosť zvlášť užitočná pre molekulárnych biológov. Známa je sekvencia celého genómu *E. coli* – pozostáva približne zo $4,6 \cdot 10^6$ párov báz a kóduje asi 4300 – 5900 rôznych proteínov⁴. Malý genóm a rýchly rast *E. coli* za dobre definovaných laboratórnych podmienok predstavuje veľkú výhodu pre molekulárno-genetické analýzy. V závislosti od podmienok kultivácie sa *E. coli* priečne delí každých 20 až 60 min. Navyše, klonálna* populácia *E. coli*, v ktorej sú všetky bunky odvodené delením jedinej bunky, sa ľahko izoluje ako kolónia kultivovaná na pevnom médiu (Obr. 1. 8). Pretože bakteriálne kolónie obsahujúce viac ako 10^8 buniek možno získať v krátkom čase (za 12 až 16 h), selekcia a analýza genetických variantov kmeňov *E. coli* (napr. mutantov, ktoré sú rezistentné voči antibiotikám) je jednoduchá a rýchla. Väčšina súčasných koncepcií molekulárnej biológie a genetiky, vrátane nášho chápania replikácie DNA, genetického kódu, gémovej expresie* či proteosyntézy, vyplýva práve zo štúdií mnohých mutantov tejto baktérie.

Odporúčaná literatúra:

- Taj, M. K., Samreen, Z., Ling, J. X., Taj, I., Hassani, T. M., Yunlin, W. (2014). *Escherichia coli* as a model organism. *Int. J. Engg. Res. Sci. Tech.* 3 (2): 1-8.
- Cooper, G. M. (2000). Cells As Experimental Models (Chapter 1). In: *The Cell. A Molecular Approach*. 2nd edition, Boston University Sunderland (MA): Sinauer Associates, ISBN-10: 0-87893-106-6.

1. 1. 2 *Saccharomyces cerevisiae*

Hoci sú baktérie neoceniteľným modelom pri štúdiu viacerých konzervovaných bunkových procesov, nemôžu byť využité pri štúdiu bunkových štruktúr a funkcií, ktoré sú jedinečné pre eukaryotické organizmy. Kľúčovým modelom pre štúdium mnohých základných aspektov biológie eukaryotických buniek sa tak stali najjednoduchšie eukaryoty – kvasinky, ktoré majú podobne ako *E. coli* množstvo experimentálnych výhod.

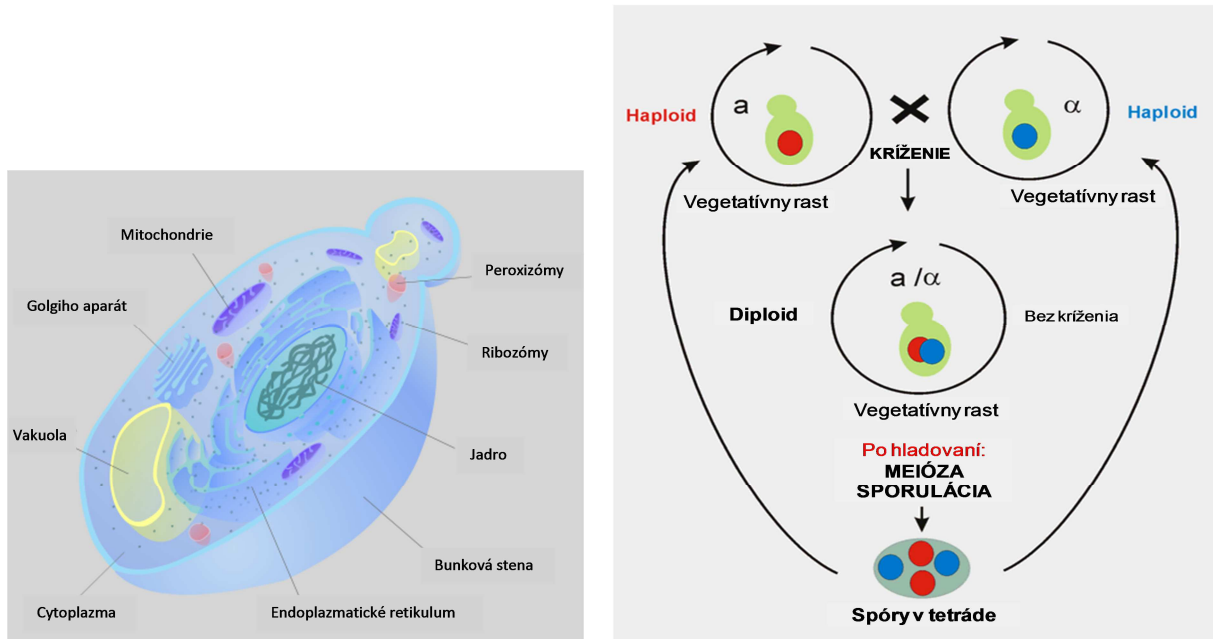
Najčastejšie používanou a najviac preštudovanou je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Táto kvasinka je pôvodcom kvasenia ovocných štiav, používa sa na skvasovanie sladu pri výrobe piva, na výrobu pekárenských kvasníc, pri príprave vína, na výrobu liehu i na výrobu vitamínov z radu B. V slovenčine vďaka svojmu využitiu získala prívlastky *pivná*, *vínna* či *pekárenská*.

Haploidný genóm* *S. cerevisiae* pozostáva z viac ako $1,2 \cdot 10^7$ bázových párov a obsahuje okolo 6200 génov, z ktorých takmer 40 % je podobných svojou sekvenciou* s génmi človeka. Hoci je kvasinkový genóm približne trojnásobne väčší než genóm *E. coli*, je jednoduchší ako genómy vyšších eukaryotov a zároveň bunka kvasiniek vykazuje typické vlastnosti eukaryotických buniek (Obr. 1. 3): obsahuje zreteľné jadro obklopené jadrovou membránou, genómová DNA je organizovaná do 16 lineárnych chromozómov rôznej veľkosti a cytoplazma obsahuje cytoskelet a subcelulárne organely.

Kvasinky *S. cerevisiae* môžu byť vďaka nepohlavnému (vegetatívne) rozmnožovaniu udržiavané v stabilnom haploidnom* alebo diploidnom stave*. Haploidné bunky opačných párovacích typov (označované ako \underline{a} a $\underline{\alpha}$) podliehajú pohlavnému

⁴ Ľudský genóm* je takmer 1000-krát zložitejší – pozostáva približne z 3 miliárd párov báz a kóduje približne 10^5 rôznych proteínov.

rozmnožovaniu - krížení (konjugácii): vzájomnou signalizáciou pomocou feromónov a receptorov rastú smerom k sebe, zhlukujú sa a nakoniec splyývajú do jednej diploidnej bunky (označovaná ako a/α) (Obr. 1. 3). Diploidné bunky sa môžu v prostredí bohatom na živiny mitoticky deliť a vytvárať tak diploidné potomstvo. Ak sa však diploidná bunka ocitne v prostredí nevhodnom pre jej ďalšiu rast a rozmnožovanie (hladovanie), dochádza k meiotickému deleniu a následnej sporulácii. Meiózou opäť vznikajú štyri haploidné bunky – spóry, ktoré u *S. cerevisiae* vytvárajú typickú tetradu. Sú obalené a chránené v útvere nazývanom askus (Obr. 1. 3).



Obr. 1. 3: Štruktúra bunky (vľavo; www.biocourseware.com/iphone/cell/index_pad.htm) a životný cyklus (vpravo; Feldman 2012) kvasiniek *S. cerevisiae*.

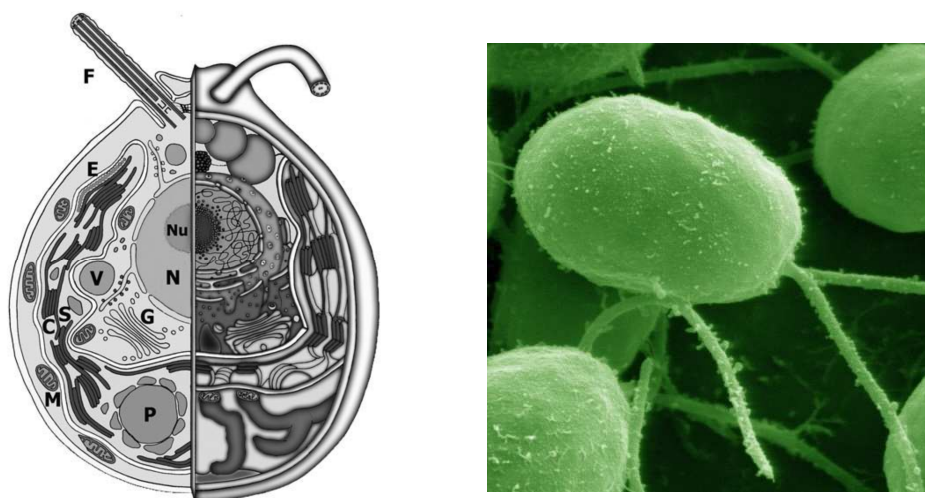
Kvasinky je možné jednoducho kultivovať v laboratóriu a študovať rovnakými molekulárno-genetickými prístupmi ako baktérie *E. coli*. Hoci sa kvasinky nereplikujú tak rýchlo ako baktérie, stále sa delia – pučia približne každé dve hodiny a môžu sa ľahko pestovať na pevných kultivačných médiách ako kolónie vznikajúce z jednej bunky. Následkom toho môžu byť kvasinky použité na rôzne genetické manipulácie či prípravu mutantných línií. Kvasinkové mutanty sú dôležité pri štúdiu viacerých základných procesov v eukaryotoch, vrátane replikácie DNA, transkripcie*, post-transkripčných úprav RNA alebo triedenia proteínov. Všeobecné poznatky o štruktúre a funkciách bunky získané štúdiom kvasiniek sú platné pre všetky eukaryotické bunky.

Odporúčaná literatúra:

- Botstein, D., Chervitz, S.A., Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* 277 (5330): 1259-1260.
- Cooper, G. M. (2000). Cells As Experimental Models (Chapter 1). In: *The Cell. A Molecular Approach*. 2nd edition, Boston University Sunderland (MA): Sinauer Associates, ISBN-10:0-87893-106-6.
- Feldman, H. (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology*, 2nd edition, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-3-527-33252-6.

1. 1. 3 *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii je jednobunková eukaryotická zelená riasa. Taxonomicky je zaradená do rodu *Chlamydomonas*, oddelenia *Chlorophyta*, ríše *Viridiplantae* (zelené rastliny). Rod *Chlamydomonas* sa odčlenil od skupiny Embryophyta (suchozemské rastliny) pred 1 miliardou rokov. Evolučný pôvod robí z *C. reinhardtii* neoceniteľný modelový organizmus pre analýzy komparatívnej fylogenomiky*. Študovanými sú najmä gény dôležité pre funkciu bičička, plastidov a fotosyntézy, ale aj regulátory bunkového cyklu. Bunka *Chlamydomonas* (Obr. 1. 4) má v priemere 10 μm a štandardný je pre ňu guľovitý až oválny tvar. V bunke je najvýraznejším veľký chloroplast v tvare písmena U. V tesnej blízkosti chloroplastu sa nachádza jadro, ktoré je chloroplastom čiastočne obklopené.



Obr. 1. 4: *Chlamydomonas reinhardtii* - jadro (N) s jadierkom (Nu), dve izoformy bičička (F), chloroplast (C) s červenou škvrou (stigma) (E), pyrenoid so škrobom (P), mitochondria (M), Golgiho aparát (G), škrobové zrná (S) a vakuoly (V).

Počet mitochondrií v bunke závisí od spôsobu výživy. *C. reinhardtii* je fotoautotrofný organizmus, ktorý však dokáže prežiť aj v heterotrofných podmienkach, v prítomnosti acetátu ako zdroja uhlíka. Heterotrofné bunky majú spravidla viac mitochondrií. V stróme chloroplastu je lokalizovaný pyrenoid, proteínová štruktúra chloroplastu špecializovaná na fixáciu oxidu uhličitého (CO_2). Morfológia pyrenoidu sa mení v závislosti na množstve CO_2 . So štruktúrou chloroplastu je spojená aj stigma (fotoreceptor), svetlocitlivý orgán riasy umožňujúci zachytávanie svetla a fototaxiu. Bunková stena *C. reinhardtii* je tvorená najmä na hydroxyprolín bohatými glykoproteínmi, na rozdiel od väčšiny rastlinných buniek, ktorých bunková stena je tvorená najmä celulózou. *C. reinhardtii* má dva bičičky, vystupujúce z bazálnych teliesok na prednom konci bunky. Rozlišujeme u neho dva párovacie typy (mt+ a mt-). Gametogenéza *C. reinhardtii* je indukovaná nedostatkom dusíka v živnom médiu. Gaméty* sú nerozlišiteľné na základe veľkosti a tvaru, avšak líšia sa vo svojej ultraštruktúre. Po splynutí gamét dochádza k vzniku diploidnej bezbičičkatej zygoty*, ktorá sa obalí sekundárnou bunkovou stenou. Po dozretí sa zygotička meioticky delí na 4 haploidné* zoospóry. Pre *C. reinhardtii* je typické mnohonásobné mitotické delenie, v ktorom sa materská bunka delí na $2n$ dcérskych buniek (n vyjadruje počet delení) v jednom reprodukčnom cykle. Pri každom delení dochádza k syntéze DNA, mitóze a cytokinéze, ale dcérske bunky sú uvoľnené až po ukončení posledného delenia.

C. reinhardtii predstavuje modelový organizmus pre výskum viacerých biologických procesov. Vďaka svojej schopnosti prežiť aj bez fotosyntézy je nenahraditeľným organizmom

pre štúdium génov zapojených v procese fotosyntézy, keďže pre väčšinu fotosyntetizujúcich organizmov je narušenie procesu fotosyntézy letálne*. Genóm pozostáva zo sedemnástich väzbových skupín (chromozómov). Okrem jadrového genómu má riasa aj mitochondriálny a chloroplastový genóm, ktorých sekvencie sú známe.

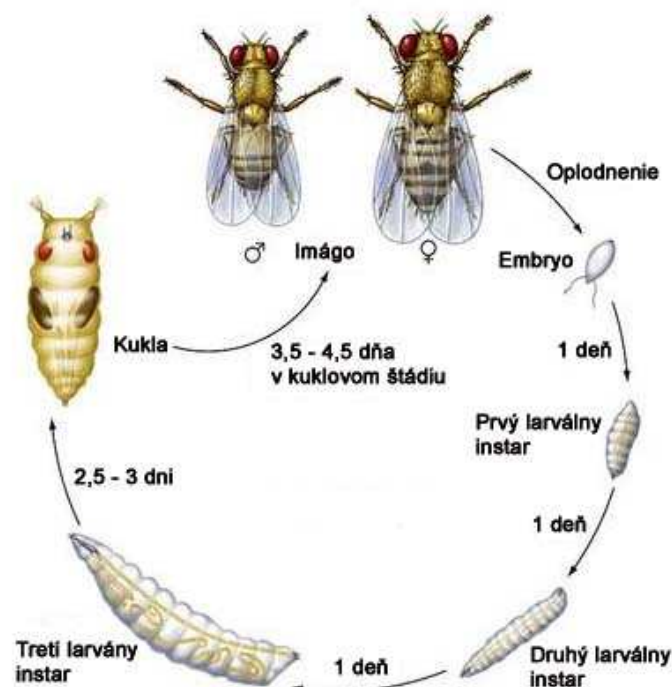
Odporúčaná literatúra:

- Harris, E.H. (2008): The *Chlamydomonas* sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and Its laboratory use. 2nd edition. Vol.1. Academic Press. ISBN-978-0-12-370873-1.
- <http://remf.dartmouth.edu/Chlamydomonas/>

1. 1. 4 *Drosophila melanogaster*

Malá ovocná muška (*Drosophila melanogaster*) z radu *Diptera* patrí medzi geneticky najlepšie preštudované mnohobunkové modelové organizmy. Práve vďaka nej boli začiatkom 20. storočia v skupine vedenej Thomasom Huntom Morganom potvrdené Mendelove zákony dedičnosti.

Za to, že sa drozofila radí k najčastejšie používaným laboratórnym organizmom, vďaka viacerým svojim vlastnostiam. Patrí medzi hmyz s dokonalou premenou, čo znamená, že počas svojho životného cyklu prekonáva niekoľko vývinových štádií: vajíčko, larva, kukla, dospelý jedinec (imágo). V štádiu kukly dochádza k radikálnej premene – metamorfóze, kedy sa larva premení na dospelého jedinca, ktorý je svojou anatómiou úplne odlišný od larvy. Životný cyklus trvá pri teplote 24 °C asi 12-14 dní, čo je veľká výhoda pri genetických experimentoch a kríženiach a za 14 dní má experimentátor novú generáciu (Obr. 1. 5).



Obr. 1. 5: Životný cyklus *D. melanogaster* (<http://www.creative-diagnostics.com/Drosophila.html>).

Ďalšími dôležitými vlastnosťami, ktoré z drozofily urobili vhodný modelový organizmus, je malý počet chromozómov (1 pár pohlavných chromozómov a 3 páry

autozómov*), veľké množstvo potomstva (1 samička dokáže naklásať za svoj život okolo 300 až 400 vajíčok), celkovo nenáročný chov, na ktorý nepotrebujeme žiadne špeciálne prístroje a je aj finančne nenáročný. Navyše je ovocná muška známa veľkým množstvom mutantných línií, čo naznačuje, že experimentálna indukcia nových mutácií je u nej pomerne jednoduchá. Všetky tieto jej vlastnosti a zároveň jej časté využívanie v laboratóriách viedli k tomu, že celý jej genóm* bol sekvenovaný* ako jeden z prvých živočíšnych genómov v roku 2000.

Vďaka vyššie spomenutým vlastnostiam sa tento drobný hmyz intenzívne využíva pri štúdiu genetiky, vývinovej biológie, embryogenézy, bunkového delenia, správania, neurobiológie, ako aj vo výskume genetických ochorení ako napr. karcinogenézy, Alzheimerovej choroby a iných.

1. 1. 5 Myši a potkany

Myši (*Mus musculus*), potkany (*Rattus norvegicus*) a iné malé stavovce sú jedny z prvých modelových organizmov využívaných vo vede. Prvé zmienky siahajú na začiatok 16. storočia do obdobia, kedy sa biológia pomaly menila z popisnej na experimentálnu vedu. V tom čase sa používali na štúdium reprodukcie, cirkulácie krvi a vplyvu zvýšeného tlaku. Vďaka svojej podobnosti s fyziológiou človeka sa využívajú ako modely pre ľudské ochorenia do dnešnej doby. Študované choroby sú napr. artritída, diabetes, kardiovaskulárne ochorenia a rakovina. Nezastupiteľnú úlohu majú tiež v imunológii, neurobiológii a behaviorálnych štúdiách.

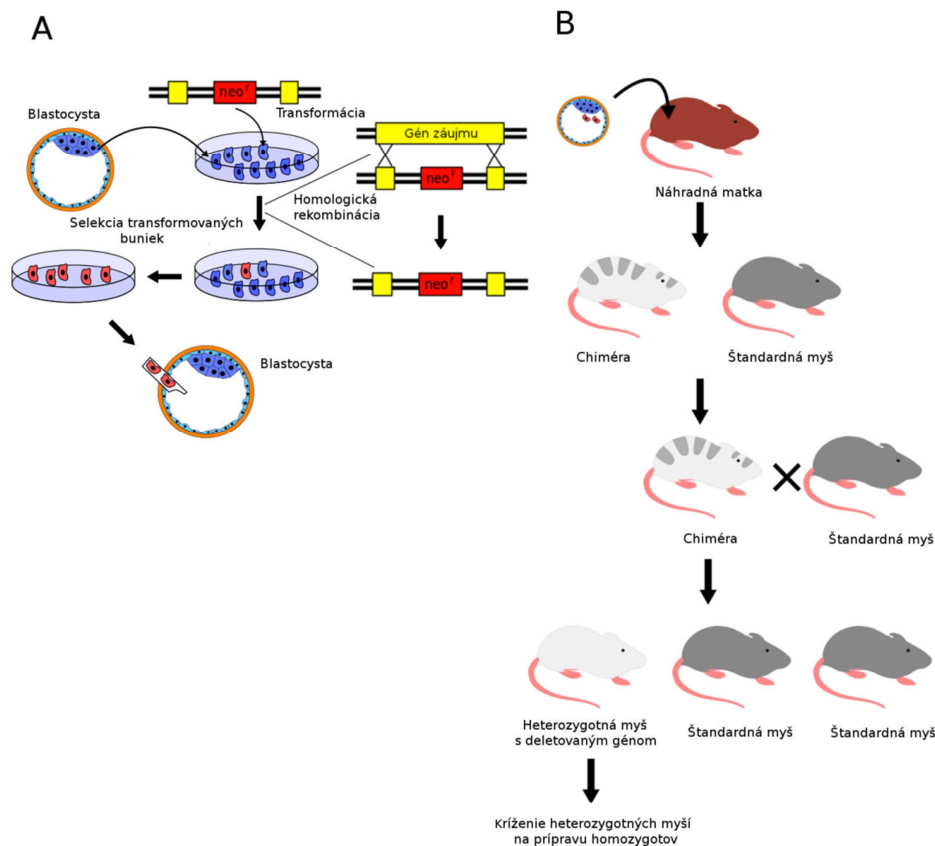
Z pohľadu genetického výskumu nadobudli tieto modely význam začiatkom tohto tisícročia. V roku 2002 bola stanovená sekvencia myšacieho a v roku 2004 potkanieho genómu* (Tab. 1. 1).

Tab. 1. 1: Základné informácie o myšiach a potkanoch.

	Myši	Potkany
Veľkosť genómu (Gb)	2,6	2,75
Počet chromozómových párov	20	21
Počet génov	~ 23000	~ 25000
Generačná doba (týždne)	5 – 8	8 – 12
Počet potomkov	3 – 4	6 – 12
Dĺžka života (roky)	2 – 3	2,5 – 3,5

Znalosť genómu umožňuje pozerat' sa aj na evolučnú históriu organizmu. Ďalším dôležitým zistením bolo, že potkany a myši sa ľuďom po genetickej stránke veľmi podobajú. Mnohé gény sú vysoko konzervované, čo znamená, že by ľudské gény a ich produkty mohli správne fungovať aj v myšiach a potkanoch. To isté platí aj v opačnom prípade. Veľkým míľnikom bol vývoj techník, ktoré umožnili s genetickou informáciou modelových organizmov manipulovať. Cieľom je študovať funkcie génov. Najjednoduchším spôsobom, ako to dosiahnuť, je ich odstránenie/delécia. Na základe fenotypového* prejavu sa potom dá odhadnúť úloha génu a jeho produktu. Manipulovať s genetickou informáciou mnohobunkových organizmov, ktoré sa rozmnožujú pohlavne, vôbec nie je jednoduché. Aby bol mutantný fenotyp pozorovateľný, tak genetická informácia by mala byť v každej bunke rovnaká. To znamená, že ak chceme odstrániť nejaký gén, mal chýbať v každej bunke, či už somatickej alebo zárodočnej. Pohlavne sa rozmnožujúce organizmy vznikajú zo zygoty*. Tá sa delí a počas embryonálneho vývinu sa diferencuje na jednotlivé tkanivá. Jedno zo skorých

štádií embryogenézy sa nazýva blastocysta. V tomto štádiu ešte nie sú bunky diferencované na zárodočné listy (endoderm, mezoderm, ektoderm). Bunky blastocysty sa odoberú a nechajú sa deliť (Obr. 1. 6A).



Obr. 1. 6: Príprava mutantných myší. A) Príprava heterogénnej blastocysty. Zárodočné kmeňové bunky (modré) sú extrahované z blastocysty. Po namnožení sú transformované delečnou kazetou so selekčným markerom *neo^r* (podmieňuje rezistenciu voči antibiotiku neomycín). Delečná kazeta sa v niektorých prípadoch vloží do genómu embryonálnej kmeňovej bunky procesom homologickej rekombinácie. Pomocou antibiotika neomycín je možné selektovať iba tie bunky, ktoré prijali delečnú kazetu. Tieto bunky sa ďalej injektujú do novej blastocysty. Blastocysta obsahuje heterogénnu populáciu embryonálnych kmeňových buniek (modré a červené bunky). **B) Príprava heterozygotnej a homozygotnej myši.** Blastocysta obsahujúca mutantné bunky sa vloží do náhradnej matky, kde sa ďalej vyvíja. V potomstve takejto matky sa budú nachádzať fenotypovo štandardné myši a chimérické myši. Chimérické myši sú tvorené bunkami, ktoré vznikli zo štandardných (šedá farba) a mutantných buniek (biela farba). Chimérické myši sú opäť krížené so štandardnou myšou. V istom pomere sa v populácii potomkov budú nachádzať heterozygotné myši pre znak, ktorý sledujeme. Ak by sa heterozygotné myši krížili navzájom, tak v 1/4 prípadov by sa v potomstve mali vyskytovať homozygotné myši s deletovanými génmi na oboch chromozómoch chromozómového páru.

Keď dosiahnu bunky dostatočný počet, pridá sa k nim cudzorodá DNA. Táto DNA nahradí procesom homologickej rekombinácie gén nášho záujmu, a tým dôjde k jeho delécii. Homologická rekombinácia je dôležitá pri opravách DNA a napríklad aj pri meióze. Proces, v ktorom bunka prijíma cudzorodú genetickú informáciu, označujeme ako transformácia. Nie vo všetkých bunkách však dôjde k transformácii. Preto sa používajú selekčné markery, napr. gény podmieňujúce rezistenciu voči antibiotikám. Ak pridáme antibiotikum do suspenzie s bunkami, prežijú iba tie, ktoré sú rezistentné, a teda tie, čo boli transformované. Takéto bunky sú následne injektované do novej blastocysty. Blastocysta bude obsahovať štandardné, ale aj rekombinantné kmeňové bunky. Z nich sa v náhradnej matke bude vyvíjať embryo (Obr. 1. 6B), ktoré bude po genetickej stránke chiméra* alebo mozaika*. Týmto spôsobom dostaneme

myš, ktorú ak krížime so štandardnou myšou, tak v istom pomere dostaneme myši, ktorých všetky bunky budú niesť deléciu génu nášho záujmu. Myši a potkany sú však diploidné organizmy. To znamená, že každý chromozóm sa v somatických bunkách vyskytuje v dvoch kópiách. V niektorých prípadoch nestačí, ak sa odstráni gén len na jednom chromozóme, aby sa prejavila mutácia fenotypovo. Hovoríme vtedy o recesívnej* mutácii. Aby sme prejav recesívnych mutácií mohli študovať, je nutné docieliť deléciu génu aj na druhom chromozóme, čo je technicky náročné. Našťastie stačí, ak krížime navzájom dve heterozygotné* myši. Homozygotnú* myš by sme mali dostať v 1/4 prípadov. Príprava mutantných myší a potkanov trvá niekoľko mesiacov, je pomerne náročná a nákladná. Z toho dôvodu vznikli strediská špecializujúce sa na ich prípravu.

Odporúčaná literatúra:

- Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D. and Miner, T.L. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420 (6915): 520-562.
- Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E. and Okwuonu, G. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 428 (6982): 493-521.
- Hedrich, H. J., Bullock, G. (2004). *The Laboratory Mouse*. Elsevier Academic Press. Pages: 656. ISBN: 9780123364258.
- https://en.wikipedia.org/wiki/Knockout_mouse

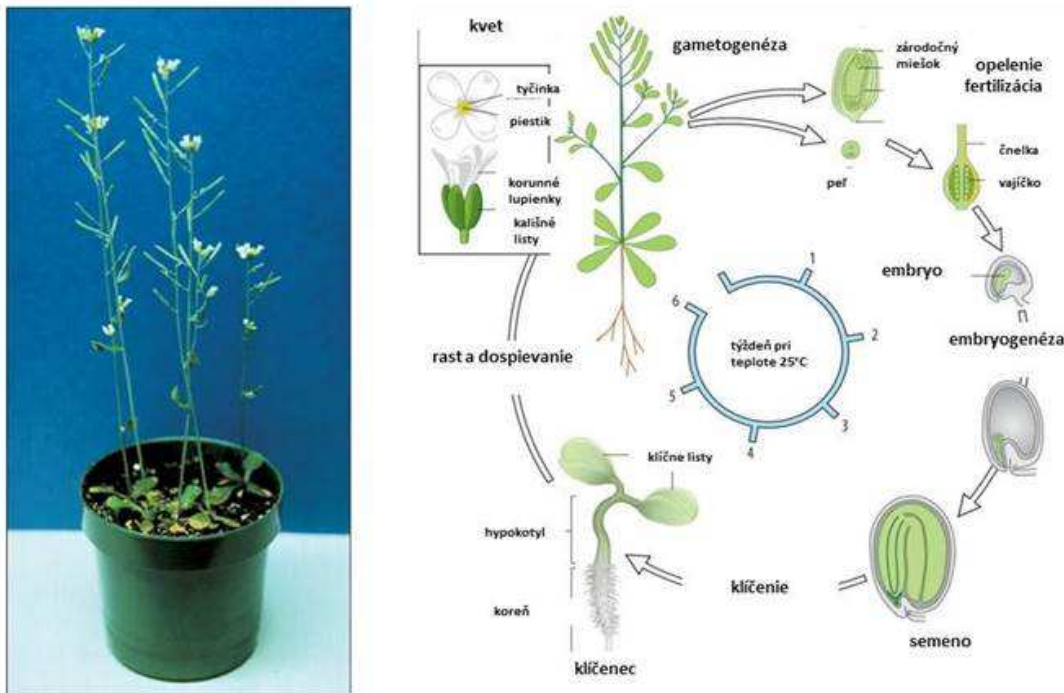
1. 1. 6 *Arabidopsis thaliana*

Rastliny sú neoddeliteľnou časťou živej prírody a ich skutočný význam by sme si uvedomili až v momente ich straty. Poskytujú potravu nielen ľuďom, ale aj živočíchom. Rastliny, ako zdroj prírodných materiálov, môžeme použiť na výrobu odevov, v stavebnom a drevospracujúcom priemysle, v medicíne a vo farmaceutickom priemysle pre ich liečivé účinky. Neodmysliteľná je aj ich úloha ako producentov kyslíka, ktorý dýchajú iné organizmy. Napokon nám poskytujú aj pocit pohody a pokoj v mysli, preto sa oddávna udržiavajú lesné parky a záhrady v našich mestách. V súčasnosti sa stretávame s rýchlym ubúdaním dažďových pralesov, so zmenou klímy, s rastom miest na celom svete, s populačnou explóziou, s obrovským tlakom na zvyšovanie produkcie poľnohospodárskych ekosystémov, a preto porozumieť rastlinám je nevyhnutné pre udržanie vhodného životného prostredia pre budúcnosť všetkého živého na Zemi.

Rastliny majú svoje dôležité miesto aj v genetike. Mnohé významné zákonitosti genetiky boli prvýkrát popísané práve pri rastlinách. Z viacerých príkladov môžeme spomenúť základné zákony klasickej genetiky objavené J. G. Mendelom, ktorý si pre svoje experimenty vybral hrach siaty, alebo objav mobilných genetických elementov popísaný B. McClintockovou na kukurici.

Vzhľadom na nevyhnutnosť poznať molekulárne a fyziologické procesy v rastlinách a analyzovať ich genómy* je potrebné mať k dispozícii vhodné modelové organizmy. Jedným z dnes najčastejšie používaných v rastlinnej genetike je arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*), ktorej druhové meno je odvodené od nemeckého botanika Johanna Thalla (16. storočie). Arábkovka je jednoročná rastlina z čeľade kapustovitých (*Brassicaceae*). Je to ekonomicky významná čeľaď, nakoľko do nej patrí veľké množstvo často používaných zeleniny (kapusta, karfiol, kaleráb, kel, brokolica, repka, horčica, reďkev, chren, žerucha). Arábkovka má niekoľko výhod pre využitie vo výskume:

- Experimentálna manipulácia (kríženie) s arábovkou je jednoduché a kultivácia rastlín je finančne nenáročná, je možné študovať javy od molekulárnych mechanizmov až po ich existenciu v ekosystémoch.
- Produkuje tisíce semien na jednej rastline (vysoký počet semien je ideálny z hľadiska mutagenézy – je možné mutovať veľký počet semien naraz – väčšia šanca získania mutácie). Plodom je šešuľa obsahujúca 20 až 30 semien.
- Arábovka je autogamná a diploidná rastlina. Kvety neprodujú nektár – sú málo atraktívne pre hmyz a vyvinula sa u nich autogamia*. Sú homozygotnými* líniami a vďaka tomu je možné ľahko identifikovať recesívne* znaky.
- Rastlina má nízky vzrast: 10 až 30 cm, výhodou je ekonomické pestovanie rastlín (veľký počet rastlín na malej ploche).
- Má nízky počet chromozómov a malý genóm. *A. thaliana* má len 5 chromozómov; DNA je tvorená 157 Mbp. Malý genóm je dôsledkom malého množstva repetitívnej DNA*.
- Životný cyklus (Obr. 1. 7) trvá 6 až 8 týždňov, počas roka má niekoľko generácií. Krátky životný cyklus umožňuje rýchlu genetickú analýzu.



Obr. 1. 7: Životný cyklus *A. thaliana* (upravené podľa Wolpert a kol., 2007).

- Transformácia rastlín je nenáročná, vďaka veľkému počtu mutantov a transformantov je zjednodušená identifikácia génov, ich klonovanie* a štúdium ich funkcie.
- Existuje veľký počet mutantných foriem rastlín (napr. pre kvitnutie, rezistenciu na mráz a sucho, rezistenciu na baktérie a huby, gény súvisiace s citlivosťou na použitie nových herbicídov, gény pre ontogenetický vývin, rast, vývin kvetu, pre citlivosť na svetlo a napokon asi 150 génov súvisiacich s génmi rôznych ochorení u ľudí).

- Genóm arábovky predstavuje prvý kompletne sekvenovaný* rastlinný genóm (identifikovaných približne 27700 génov jadra bunky).

Odporúčaná literatúra:

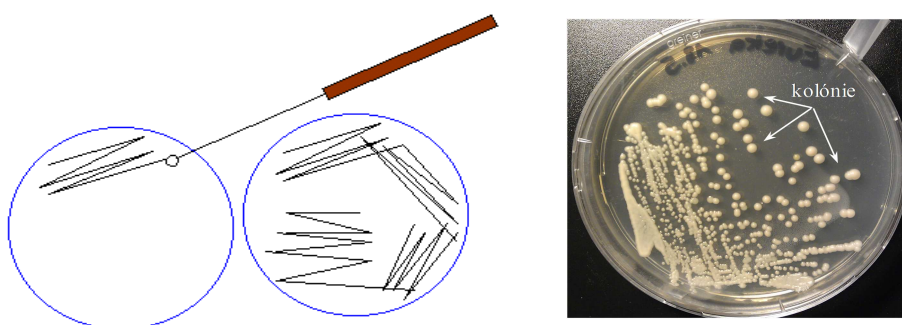
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Žnidar, I., Mukherjee, A. (2008). DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulfonate and γ -rays. *Environ. Exp. Bot.* 62: 113-119.
- Wolpert, L., Jessell, T, Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. (2007). Principles of Development. Third edition. Oxford University Press, USA, p. 559.

1. 2 Praktická časť

1. 2. 1 Pozorovanie a očkovanie kultúr mikroorganizmov

Princíp:

Pri práci s kultúrou mikroorganizmov používame rôzne mikroskopické techniky. Okrem samotného pozorovania kultúry mikroorganizmov, prípadne zisťovania výskytu nežiadúcej mikroflóry využívame mikroskopiu: (i) pri *priamom vyšetrení* napr. mikrobiologickej nezávadnosti potravín, identifikácii cudzorodých mikroorganizmov v rôznych štádiách biotechnologického procesu, pri kontrole čistoty a fyziologického stavu produkčných mikroorganizmov alebo pri diagnostike infekčného materiálu; (ii) na *bližšiu identifikáciu a charakterizáciu* izolovaných a pomnožených kultúr z uvedených zdrojov. *Svetelnou mikroskopiou* sa sledujú morfologické znaky mikroorganizmov, ich veľkosť, tvar, usporiadanie buniek, štruktúra, resp. farbitelnosť rôznymi farbivami metódami. Morfológia mikroorganizmov sa sleduje v *natívnom preparáte*, ktorý ukazuje skutočný a neporušený tvar mikroorganizmov. Pri rozmerovo väčších mikroorganizmoch (kvasinky, vláknité mikromycéty) možno okrem tvaru pozorovať aj obsah buniek, ako napr. vakuoly či granuláciu cytoplazmy. Natívny preparát sa pripravuje do destilovanej vody alebo fyziologického roztoku*. V závislosti od veľkosti mikroorganizmu sa pozorovanie robí buď suchým objektívom (kvasinky), ktorý nevyžaduje použitie imerzného oleja pri pozorovaní alebo využitím imerzného objektívu (baktérie).



Obr. 1. 8: Izolácia čistej kultúry mikroorganizmov rozterom (vľavo) a nárast očkovanej kultúry na povrchu pevného média v Petriho miske (vpravo).

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/55/Streak_plates.png

<https://eurekabrewing.wordpress.com/2013/03/>

Prenesenie časti populácie mikroorganizmov z prostredia, v ktorom sa nachádzali (rástli alebo boli udržiavané) do čerstvého sterilného živného média sa nazýva *očkovanie* (*inokulácia*). Mikroorganizmy sa očkujú sterilným očkovacím nástrojom (bakteriologické

očko, pipeta) do tekutých živných médií alebo na pevné živné médiá v Petriho miskách alebo skúmavkách. Tekuté živné médiá sa využívajú najmä ako rozmnožovacie médiá na získanie väčšieho množstva mikroorganizmov (biomasy). Očkovanie na pevné médiá sa uskutočňuje predovšetkým za účelom izolácie mikroorganizmov, získanie čistých mikrobiálnych kultúr, na dôkazy a rozlíšenie jednotlivých druhov mikroorganizmov, získanie charakteristických počítateľných kolónií*.

V prirodzenom prostredí sa vyskytujú heterogénne spoločenstvá mikroorganizmov prepojené navzájom predovšetkým vzťahmi výživy. Oddelenie jediného taxonomického druhu predpokladá prípravu tzv. *čistej kultúry*. Čistá kultúra sa získava izoláciou (oddelením) jedinej bunky od ostatných a jej následným rozmnožením. K najčastejšie používaným metódam izolácie patrí jednoduchá metóda – *izolácia rozterom (čiarovaním)*. Princíp tejto metódy spočíva v postupnom rozotieraní mikrobiálnej kultúry po povrchu pevného živného média v Petriho miske, ktoré predpokladá oddelenie samostatných buniek a ich pomnoženie do útvarov pozorovateľných voľným okom - *kolónií* (Obr. 1. 8).

Práca s bakteriologickým očkom: Pred aj po každom použití (očkovaní) sa očko vypáli (žíha), pričom sa drží takmer zvisle v plameni plynového kahana (Obr. 1. 9). Takto vypálené a sterilné očko sa nechá pred dotykom s kultúrou buniek ochladiť, buď priložením k okraju agarovej vrstvy alebo k vnútornej strane viečka Petriho misky.



Obr. 1. 9: Sterilizácia bakteriologického očka žíhaním v plameni kahana.

Ciele: 1. Pripraviť natívny preparát mikroorganizmu a pozorovať ho mikroskopicky.
2. Izolácia čistej kultúry kvasiniek na pevnom médiu.

Baktérie: *Escherichia coli*
Bacillus subtilis

Kvasinky: *Saccharomyces cerevisiae*
Schizosaccharomyces pombe
Yarrowia lipolytica
Magnusiomyces magnusii
Trigonopsis variabilis

Riasy: *Chlamydomonas reinhardtii*

Materiál a chemikálie: podložné a krycie sklíčka, automatické pipety so špičkami, kvapkadlá, bakteriologické očka, destilovaná voda, svetelný mikroskop, pevné YPD živné médium v Petriho miskách (2 % glukóza, 2 % peptón, 1 % kvasničný extrakt, 2 % agar).

Postup:

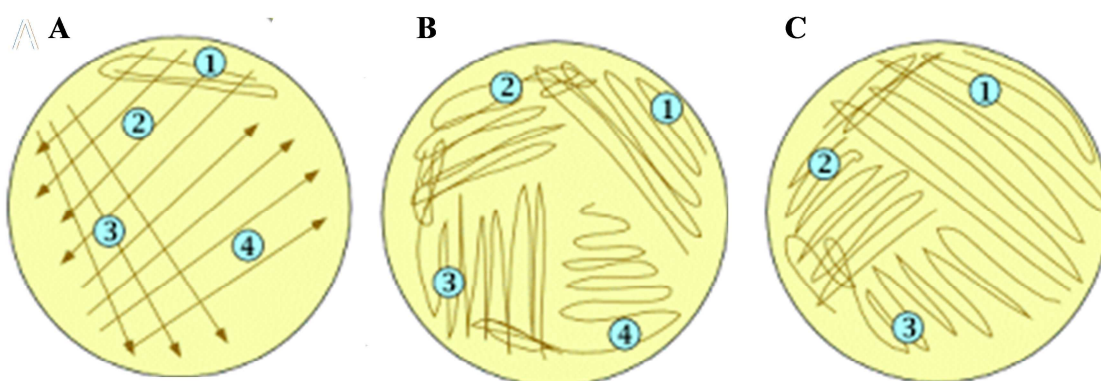
1. Pozorovanie živých mikroorganizmov

- Na podložnom sklíčku si do kvapky destilovanej vody nanesieme očkom malé množstvo kultúry kvasiniek a jemne rozmiešame. Pri príprave preparátu mikroskopických rias nanesieme na podložné sklíčko priamo kvapku tekutej kultúry.
- Suspenziu buniek prekryjeme krycím sklíčkom tak, aby sa nevytvorili bubliny. Ak kvapka presahuje okraje sklíčka, odsajeme ju opatrne kúskom buničitej vaty.
- Preparát pozorujeme svetelným mikroskopom, kvasinky aj riasy zvyčajne objektívom pri zväčšení 10x až 40x, bez použitia imerzného oleja.
- Do protokolu zakreslíme morfológické znaky sledovaného mikroorganizmu.

2. Izolácia čistej kultúry kvasiniek rozterom (Obr. 1. 10A)

(Poznámka: použiť môžeme aj inú metódu rozteru zobrazenú na obr. 1. 10)

- Sterilným bakteriologickým očkom odoberieme malé množstvo kvasinkovej kultúry (zodpovedajúce veľkosti polovice špendlíkovej hlavičky).
- Viečko Petriho misky s YPD médiom čiastočne odklopíme a na povrchu média vedieme čiaru dlhú asi 3 cm.
- Očko opäť vysterilizujeme v plameni, necháme ochladnúť a cez prvú čiaru vedieme pod uhlom 120° sériu 3-4 čiar.
- Postup opakujeme dovtedy, kým nevyužijeme celú plochu Petriho misky.
- Bunky kultivujeme 2 dni pri teplote 30 °C.
- Do protokolu zaznamenáme úspešnosť izolácie čistej kultúry kvasiniek zvolenou metódou rozteru.



Obr. 1. 10: Niektoré spôsoby rozterov používané pri izolácii čistej kultúry mikroorganizmov.
<http://www.medical-labs.net/streak-plate-methods-of-isolation-2210/>

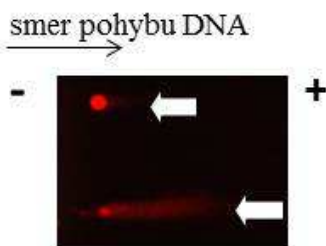
Odporúčaná literatúra:

- Betina, V. a kolektív (1987). Mikrobiologické laboratórne metódy. Alfa, Bratislava, 544 s., 063-032-87 MLM
- Džugasová, V. (2014). Bunková a molekulová biológia kvasiniek. Metódy a postupy pre praktické cvičenia. UK v Bratislave, 176 s., ISBN 97-80-23-68-2.

1. 2. 2 Kométový test na bunkách hrachu siateho (*Pisum sativum*)

Princíp:

Kométový test sa v súčasnosti používa ako veľmi spoľahlivá, rýchla, citlivá a finančne nenáročná metóda na detekciu poškodení DNA po pôsobení rôznych mutagénov v eukaryotických bunkách. Bunky sú ukotvené v agaróze na mikroskopických sklíčkach, ovplyvnené sledovaným poškodzujúcim agensom* a lyzované v roztoku s vysokou koncentráciou solí. Ak majú bunky väčšie množstvo poškodení DNA vo forme DNA zlomov, vykazujú zvýšenú migráciu chromozomálnej DNA z jadier smerom k anóde počas elektroforézy*, čo sa pri pozorovaní fluorescenčným mikroskopom* podobá tvaru kométy (Obr. 1. 11). (Pre vysvetlenie princípu elektroforetickej separácie DNA pozri kapitolu 3. 2. 3).



Obr. 1. 11: Mikroskopické zobrazenie kométového testu. Na hornej časti obrázku je bielou šípkou označená intaktná DNA z rastlinných buniek *Pisum sativum* L. a v dolnej časti obrázku poškodená/vyputovaná DNA v tvare komét (200x zväčšené). Znamienko + označuje anódu a – katódu.

Cieľ: Pripraviť preparát z rastlinných buniek na hodnotenie poškodenia DNA metódou kométového testu.

Materiál a chemikálie: naklíčené semená hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), ktorý bol ovplyvnený napr. nízkoteplotnou plazmou alebo iným agensom, ktorého efekt na poškodenie DNA chceme sledovať, rukavice, podložné sklíčka (pred experimentom vypálené a potiahnuté agarózou) a krycie sklíčka (vyčistené etanolom), automatické pipety so špičkami, žiletka, pinzeta, ľad, Petriho misky (plastové), mikroskúmavky, destilovaná voda, 1 % LMP agaróza (z angl. *low melting point agarose*), 1 % NMP agaróza (z angl. *normal melting point agarose*), 0,4M Tris-HCl (pH 7,5), 96 % etanol, elektroforetický roztok (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH>13), buničitá vata, filtračný papier, teplomer, termoblok, mikrovlnná rúra, elektroforetická komora, zdroj elektrického napätia, fluorescenčné* farbivo (napr. GelRed), fluorescenčný mikroskop OLYMPUS.

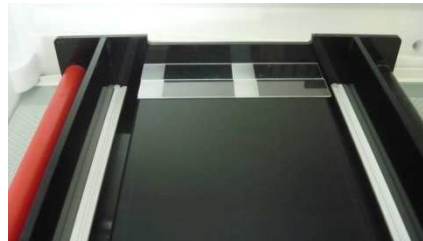
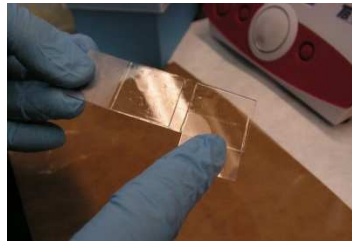
Postup:

Alkalický kométový test:

- Pred samotným experimentom je potrebné vysiať semená rastliny, s ktorou chceme pracovať, pretože pri experimente pracujeme už s koreňmi 3-dňových klíčencov.
- Do tlmivého roztoku 0,4M Tris-HCl (150 µl) nakrájame vysterilizovanou žiletkou jemným pohybom na čo najtenšie kúsky dva korene pre každú vzorku. Pri tomto kroku pracujeme v tme a na ľade.



- Následne z tejto suspenzie odpipetujeme 100 μ l do čistej skúmavky.
- Do rovnakej skúmavky pridáme 100 μ l roztopenej 1 % LMP agarózy a výslednú suspenziu premiešame.
- Suspenziu napipetujeme na 1 % NMP agarózou potiahnuté sklíčko (2 kvapky po 100 μ l) a prikryjeme vyčistenými kryciami sklíčkami.
- Vzorky odložíme na 10 min do chladničky.
- Zo vzoriek odstránime krycie sklíčka a uložíme ich do elektroforetickej komory.



- Do komory nalejeme vychladený elektroforetický roztok (1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, $\text{pH} > 13$) tak, aby boli sklíčka zakryté a vzorky necháme odvíjať 8 min pri teplote 4 – 8 $^{\circ}\text{C}$.



- Po uplynutí 8 min spustíme elektroforézu pri 20 V a 280 – 330 mA na 15 min pri teplote 4 – 8 $^{\circ}\text{C}$.
- Potom vzorky vyberieme z komory a premyjeme trikrát po 3 min s 0,4M Tris-HCl (pH 7,5).



- Následne na každú vzorku napipetujeme farbivo GelRed a necháme pôsobiť 5 min. Prebytočné farbivo odmyjeme ponorením sklíčok do destilovanej vody.
- Vzorky zakryjeme kryciami sklíčkami a pomocou fluorescenčného mikroskopu (200x zväčšené) vyhodnotíme relatívnu mieru poškodenia DNA.

Odporúčaná literatúra:

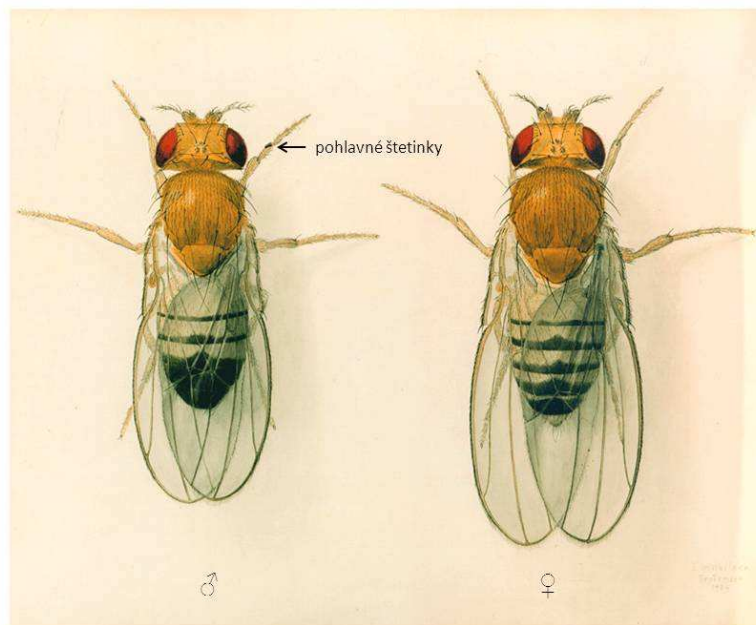
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Žnidar, I., Mukherjee, A. (2008). DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulfonate and γ -rays. *Environ. Exp. Bot.* 62: 113-119.
- Wolpert, L., Jessell, T, Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. (2007). Principles of Development. Third edition. Oxford University Press, USA, p. 559.

1. 2. 3 Rozlíšenie pohlavia a pozorovanie rôznych fenotypových znakov ovocnej mušky (*Drosophila melanogaster*)

Princíp:

Drozofila má výrazný pohlavný dimorfizmus, kedy je jednoduché rozlíšiť pohlavia medzi sebou na základe dobre viditeľných vonkajších morfológických znakov. Zvyčajne sú samičky všeobecne väčšie ako samčeky, ale tento atribút je závislý od dostupnosti a dostatku potravy počas larválneho štádia vývinu.

U samčekov je zreteľne viditeľná tmavá pigmentácia posledných brušných článkov na chrbtovej strane, z brušnej strany je v prípade imág viditeľný rozdiel v pohlavných orgánoch na konci tela. Samičky majú navyše na prvom páre nôh vyvinuté tzv. pohlavné štetinky (*sex combs*), ktoré pomáhajú samčekovi prichytiť sa na samičku počas kopulácie (Obr. 1. 12).



Obr. 1. 12: Pohlavný dimorfizmus *D. melanogaster* (upravené podľa <http://flybase.org/reports/FBim0000001>).

Ovocná muška je ako modelový organizmus známa aj tým, že je dostupné veľké množstvo mutácií s dobre pozorovateľným fenotypom*. Mutácie sú podľa fenotypového prejavu rozdelené na niekoľko kategórií, ako napr. mutácie vo farbe tela, mutácie vo farbe a tvare očí, krídiel, štetín a iných telových zakončení napr. tykadiel (Tab. 1. 2). Práve na takýchto mutantných jedincoch (líniách) založil svoj výskum dedičnosti Thomas Hunt Morgan.

Drozofila patrí medzi prvé vyššie organizmy, pri ktorých sa pomocou molekulárno-biologických metód podarilo získať transgénnych jedincov, t. j. jedincov s vloženou cudzorodou DNA. Po objavení fluorescenčných* proteínov (GFP – *green fluorescent protein*, získaných z morských živočíchov (napr. medúz) sa tieto proteíny začali intenzívne využívať pri vytváraní transgénnych živočíchov. V súčasnosti máme k dispozícii široké spektrum rôznofarebných fluorescenčných proteínov, pričom najviac využívané sú zelený (GFP), červený (RFP – *red fluorescent protein*) a žltý (YFP – *yellow fluorescent protein*) (Obr. 1. 16).

Tab. 1. 2: Príklady niektorých mutácií *Drosophila melanogaster* spôsobujúcich viditeľný fenotyp rôznych častí tela.

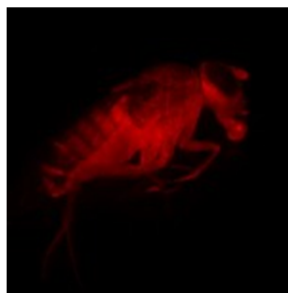
Mutácia	Fenotyp
ebony (e)	Tmavšia farba tela oproti jedincom divého typu
yellow (yw)	Pigmentácia tela svetlejšia a žltkastá oproti jedincom divého typu
Tubby (Tb) Dominantná mutácia	Larvy, kukly a dospelé jedince sú kratšie a zavalitejšie oproti jedincom divého typu
forked (f)	Niektoré hrudné štetiny môžu byť skrútené alebo rozdvojené (vidlicovité)
Humeral (Hu) Dominantná mutácia	Nadpočetné štetiny na prvom hrudnom článku za hlavou, niektoré môžu byť kratšie
Minute (M) Dominantná mutácia	Štetiny sú tenšie a kratšie, hlavne na dorzálnej strane hrude a hlavy oproti jedincom divého typu
Scutoid (Sco) Dominantná mutácia	Chýba viacero štetín, hlavne na hrudnom článku nazývanom scutelum
singed (sn)	Zvlnené štetiny, ktoré viac priliehajú k telu
Sternopleural (Sp) Dominantná mutácia	Nadpočetné štetiny na sternopleurite
Stubble (Sb) Dominantná mutácia	Hrubšie a kratšie štetiny oproti jedincom divého typu
brown (bw)	Hnedá farba očí
cinnabar (cn)	Jasnočervená farba očí
Moiré (Mé) Dominantná mutácia	Na očiach je viditeľný trblietavý vzor
purple (pr)	Purpurovo červená farba očí
sepia (se)	Tmavohnedá takmer čierna farba očí
scarlet (st)	Jasnočervená farba očí
white (w)	Biela farba očí
Bar (B) Dominantná mutácia	Zložené oči sú redukované do tvaru vertikálnej tyčinky
Drop (Dr) Dominantná mutácia	Redukovaná veľkosť očí, podobné mutácii Bar
Glazed (Gla) Dominantná mutácia	Redukovaná veľkosť očí, povrch je hladší oproti jedincom divého typu
Rough eye (Roi) Dominantná mutácia	Povrch zloženého oka je drsnejší oproti jedincom divého typu
cut (ct)	Krídla sú užšie, okraje krídiel dizruptované malými zárezmi
Curly (Cy) Dominantná mutácia	Krídla sú vykrútené do hora a do strán
dumpy (dp)	Krídla sú kratšie a distálne zrezané
Serrate (Ser) Dominantná mutácia	Krídla s množstvom zárezov po okrajoch
vestigial (vg)	Krídla sú zakrpatené

- Ciele:**
1. Popísať morfológické znaky rozlišujúce obe pohlavia *D. melanogaster*.
 2. Charakterizovať hlavné znaky mutantných línií *D. melanogaster*.
 3. Ukážka transgénnej línie *D. melanogaster* His-RFP.

Materiál a chemikálie: štandardná línia a mutantné línie *D. melanogaster*, súprava pre prácu s drozofilou (lupa, štetec, narkotizačná skúmavka, biela podložka, filcová podložka), podložné a krycie sklíčka, preparačné pinzety, éter, CO₂, fyziologický roztok (0,7 % NaCl), PBS (fosfátový tlmivý roztok), fixačný roztok (4 % paraformaldehyd v PBS), uzatváracie médium pre mikroskopiu (napr. Mowiol), stereomikroskop, fluorescenčný mikroskop.

Postup:

1. Popis morfológických znakov rozlišujúcich pohlavia *D. melanogaster*
 - S použitím anestézie (CO₂, éter) sa jedince štandardného typu uspia v uspávacích fľaštičkách alebo na podložke prepúšťajúcej CO₂.
 - Vlastnými očami alebo pomocou lupy a stereomikroskopu budeme hľadať rozdiely medzi pohlaviami a oddelíme samčekov od samičiek na základe vyššie uvedených pohlavných rozdielov.
2. Charakteristika hlavných znakov mutantných línií
 - V dostupných mutantných líniách *D. melanogaster* popíšeme viditeľnú mutáciu (znak) na základe rozdielu oproti muškám divého typu.
3. Ukážka transgénnej línie *D. melanogaster* His-RFP
 - Z línie His-RFP (línia tvoriaca červený fluorescenčný proteín pod promótorom* génu pre histón H2) vyberieme larvy 3. instaru*.
 - Larvy opláchneme v skúmavke s vodou, aby sme ich zbavili zvyškov potravy zachytenej na povrchu tela.
 - Larvu položíme do kvapky fyziologického roztoku na podložnom sklíčku a preparačnými pinzetami izolujeme larválne orgány (slinné žľazy, nervovú sústavu, imaginálne disky).
 - Orgány preniesieme do fixačného roztoku v inkubačnej komôrke a necháme fixovať 20 minút.
 - Odstránime fixačný roztok a orgány premyjeme 3 x 5 minút v PBS roztoku.
 - Premyté orgány preniesieme opatrne pinzetou na podložné sklíčko s kvapkou uzatváracieho média pre mikroskopiu. Na kvapku opatrne položíme krycie sklíčko.
 - Preparát necháme pár minút zatuhnúť a potom je pripravený na mikroskopickú analýzu.



Obr. 1. 16: Transgénne jedince *D. melanogaster* tvoriace červený fluorescenčný proteín
(<https://www.nightsea.com/galleries/drosophila/>)

Odporúčaná literatúra:

- Chyb S., Gompel N. (2013). Atlas of Drosophila Morphology, Academic Press.
- Lawrence P.A. (1992). The Making of a Fly, Blackwell Scientific Publications.

2. PRINCÍPY DEDIČNOSTI

2. 1 Teoretická časť

Ľudia sa už dávno zamýšľajú nad tým, prečo sa podobajú buď na jedného alebo oboch rodičov, prečo sú si dvojčatá podobné a s akou pravdepodobnosťou sa určitý znak preniesie na dcéru alebo syna. Mnohokrát sa však deti tých istých rodičov môžu výrazne líšiť tak, že ich nepovažujeme za bratov a sestry. Ľudia sa zaujímali aj o to, prečo sa rodí približne rovnaký počet dievčat aj chlapcov a ako je to v prírode u živočíchov a rastlín.

Všetkými týmito otázkami, ale aj mnohými inými, sa zaoberá genetika – veda o dedičnosti a premenlivosti. Dedičnosťou sa rozumie schopnosť prenášať znaky rodičov na potomkov. Tieto vlastnosti všetkých živých organizmov sú dané genetickou informáciou v podobe génov* – základných jednotiek, ktoré určujú vlastnosti jednotlivcov, ako aj celého druhu.

2. 1. 1 Mendelistická dedičnosť

Princípy dedičnosti ako prvý odhalil Johan Gregor Mendel (1822 – 1884). Výsledky svojich pokusov pri krížení hrachu sformuloval do pravidiel, ktoré dodnes poznáme ako Mendelove zákony (princípy). Tie vysvetľujú, ako sa dedia znaky, ktoré sú lokalizované na autozómoch* a ako sa budú po krížení prejavovať v nasledujúcej generácii. Každá diploidná* somatická bunka obsahuje dve haploidné sady chromozómov, jednu od matky a jednu od otca.

Príklad na ilustráciu: Krížime dve homozygotné rastliny. Jednu, ktorá má fialovo sfarbené kvety (podmienené prítomnosťou dominantnej alely* F v genotype*) a jednu, ktorá má sfarbené kvety na bielo (nepřítomnosť pigmentu – podmienené dvomi recesívnymi alelami* ff). Dominantné alely sa najčastejšie označujú veľkým písmenom, recesívne malým písmenom.

Takéto rastliny tvoria nasledujúce haploidné gaméty* (pohlavné bunky), ktoré vznikajú počas meiózy (redukčné delenie). Fialové rastliny (FF) by tvorili gaméty, ktoré by obsahovali dominantnú alelu F a biele rastliny by vytvárali len gaméty, ktoré by obsahovali recesívnu alelu f. V nasledujúcej generácii by sme potom získali všetky rastliny fialové (každá by obsahovala dominantnú alelu F, čo by spôsobilo vytvorenie farbiva).

P: FF x ff

G_P: F, F ; f, f

F₁: Ff

Následne z kríženia takýchto rastlín Ff (fialových, heterozygotných*, ktoré by niesli aj alelu pre bielu farbu) by sme získali takéto potomstvo:

F₁ x F₁: Ff x Ff

G_{F1}: F, f ; F, f

F₂: FF; Ff; Ff; ff

Štiepny pomer: 3:1 (3 fialové rastliny a 1 biela rastlina)

Po znovuobjavení Mendelových princípov dedičnosti sa začali genetici zaoberať aj odpoveďami na otázky, čo ovplyvňuje jedincov, že sa začínajú vyvíjať buď ako samce alebo samice. Ako sa dá vysvetliť existencia dvoch pohlavných typov? Ako je pohlavie organizmov ovplyvňované génmi a ako prostredím?

Väčšina eukaryotických organizmov sa rozmnožuje pohlavne, ale niektoré sa môžu rozmnožovať aj nepohlavne (napr. rastliny). Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza k splynutiu dvoch haploidných pohlavných buniek (gamét) do diploidnej zygoty*, ktorá dáva základ novému mnohobunkovému jedincovi. Pri nepohlavnom rozmnožovaní vzniká nový jedinec z jednej alebo viacerých buniek materského organizmu bez splynutia pohlavných buniek (pri rastlinných organizmoch sa takéto rozmnožovanie nazýva vegetatívne).

Pohlavne sa rozmnožujúce organizmy majú dva typy buniek: somatické (telové) a pohlavné, ktoré sú produktom meiózy. Chromozómy spoločné pre obe pohlavia sa označujú ako autozómy (označujeme ich symbolom A pre jednu chromozómovú sadu). Chromozómy, ktoré sa morfológicky aj geneticky líšia a sú typické pre určité pohlavie, sa označujú ako heterochromozómy, sex chromozómy, gonozómy alebo pohlavné chromozómy (označujeme ich X a Y, resp. Z a W; iný spôsob označenia Y chromozómu je \rightarrow).

Pre lepšie pochopenie to môžeme ilustrovať na pohlavnom type *Drosophila* (typ cicavčí). Pri tomto type je samičie pohlavie homogametické* (AAXX) a samčie je heterogametické* (AAXY). Týmto typom je determinované pohlavie u človeka, cicavcov, vo väčšine dvojdomyých rastlín a vo väčšine radov hmyzu, niektorých rýb a plazov.

	samička ♀	x	samček ♂
P:	AAXX		AAXY
G _p :	AX, AX	;	AX, AY
F ₁ :		AX	AY
	AX	AAXX ♀	AAXY ♂
	AX	AAXX ♀	AAXY ♂
Pomer pohlaví v F ₁ :	½ ♀	:	½ ♂

Ak by išlo o pohlavný typ *Abraxas* (vtáčí typ) (vyskytuje sa u vtákov, motýľov, niektorých rýb, obojživelníkov a plazov), kde samice majú pohlavie heterogametické (AAZW) a samci pohlavie homogametické (AAZZ), kríženie by vyzeralo nasledovne:

	samička ♀	x	samček ♂
P:	AAZW		AAZZ
G _p :	AZ, AW	;	AZ, AZ
F ₁ :		AZ	AZ
	AZ	AAZZ ♂	AAZZ ♂
	AW	AAZW ♀	AAZW ♀
Pomer pohlaví v F ₁ :	½ ♀	:	½ ♂



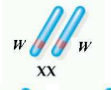

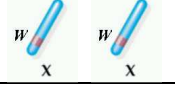
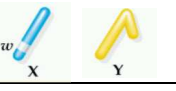
2. 2 Praktická časť






2. 2. 1 Overenie princípov dedičnosti znakov viazaných na pohlavné chromozómy



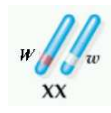

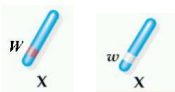

Princíp:

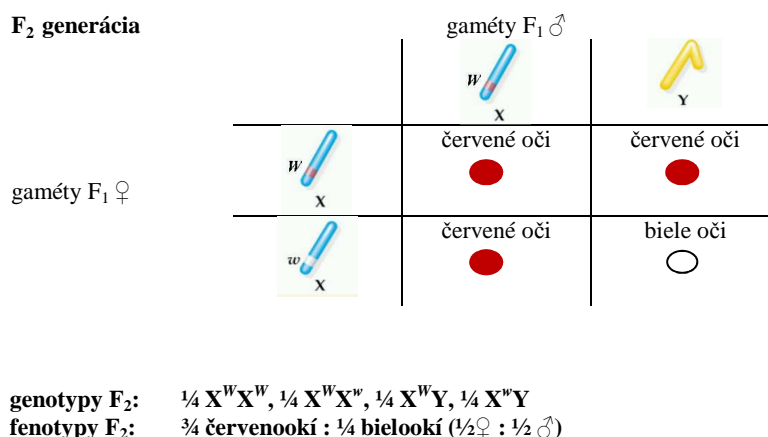
V našom experimente budeme sledovať sfarbenie očí *Drosophila melanogaster*. Červenohnedé sfarbenie očí *D. melanogaster* je podmienené dominantným génom *W*, biele sfarbenie jeho recesívnou alelou *w* – mutácia *white*. Gén je lokalizovaný na X chromozóme. Načrtneme si schému kríženia medzi: červenookou samičkou a bieloookým samčekom (a) a bieloookou samičkou a červenookým samčekom (b):

a) Kríženie medzi červenookou samičkou a bieloookým samčekom (Obr. 2. 1).

P generácia	rodič 1 ♀ červené oči	rodič 2 ♂ biele oči
fenotypy rodičov		
genotypy rodičov		
rodičovské gaméty		

F₁ generácia	gaméty rodiča 2 ♂		
gaméty rodiča 1 ♀			
	červené oči	červené oči	
			
genotyp F₁:	$\frac{1}{2} X^W X^w, \frac{1}{2} X^W Y$		
fenotyp F₁:	celé potomstvo červenooké ($\frac{1}{2} \text{♀} : \frac{1}{2} \text{♂}$)		

F₁ x F₁	rodič 1 ♀ červené oči	rodič 2 ♂ červené oči
fenotypy F ₁ generácie		
genotypy F ₁ generácie		
gaméty F ₁ generácie		

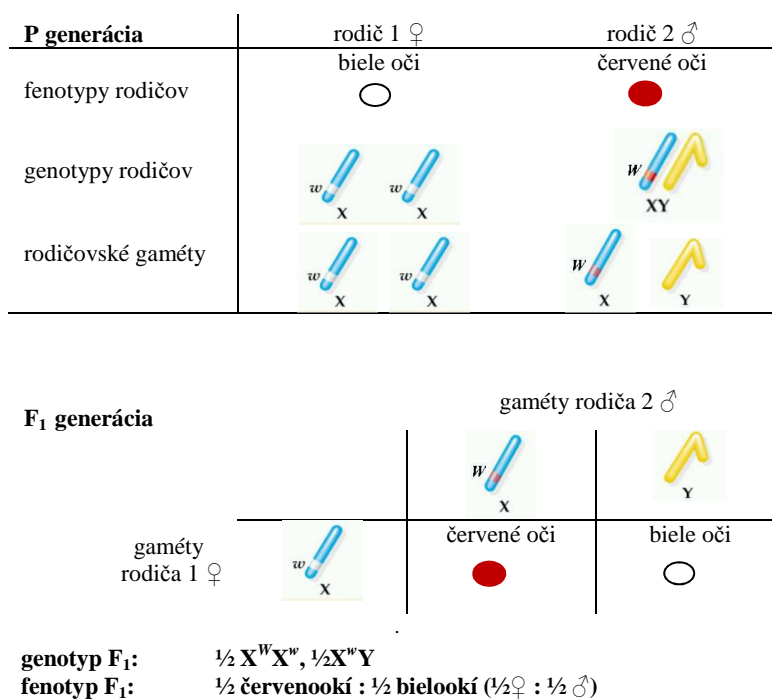




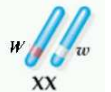





Obr. 2. 1: Znaky viazané na pohlavný chromozóm – kríženie medzi červenookou samičkou a bielookým samčekom (upravené podľa Russell, 2006).







Tabuľka 2. 1: Výsledné štiepne pomery v F₂ generácii pri krížení medzi červenookou samičkou a bielookým samčekom.

Štiepny pomer fenotypov v F ₂ generácii:	$\frac{3}{4}$ červenookých jedincov : $\frac{1}{4}$ bielookých jedincov
Štiepny pomer pohlaví:	1:1
Štiepny pomer fenotypov podľa pohlavia:	100 % červenookých samičiek, 50 % červenookých samčekov, 50 % bielookých samčekov.

b) Kríženie medzi bielookou samičkou a červenookým samčekom (Obr. 2. 2).



F₁ x F₁	rodič 1 ♀ červené oči	rodič 2 ♂ biele oči
fenotypy F ₁ generácie		
genotypy F ₁ generácie		
gaméty F ₁ generácie	 	 

F₂ generácia	gaméty F ₁ ♂	
		
gaméty F ₁ ♀	 červené oči	 červené oči
	 biele oči	 biele oči

genotypy F₂: $\frac{1}{4} X^W X^w$, $\frac{1}{4} X^w X^w$, $\frac{1}{4} X^W Y$, $\frac{1}{4} X^w Y$
 fenotypy F₂: $\frac{1}{2}$ červenookí : $\frac{1}{2}$ bielookí ($\frac{1}{2}$ ♀ : $\frac{1}{2}$ ♂)

Obr. 2. 2: Znaký viazané na pohlavné chromozómy – kríženie medzi bielookou samičkou a červenookým samčekom (upravené podľa Russell, 2006).

Tabuľka 2. 2: Výsledné štiepne pomery v F₂ generácii pri krížení medzi bielookou samičkou a červenookým samčekom.

Štiepny pomer fenotypov v F ₂ generácii:	$\frac{1}{2}$ červenookí jedinci : $\frac{1}{2}$ bielookí jedinci
Štiepny pomer pohlaví:	1:1
Štiepny pomer fenotypov podľa pohlavia:	50 % červenookých samičiek, 50 % bielookých samičiek, 50 % červenookých samčekom, 50 % bielookých samčekom.

Pri dedičnosti viazanej na pohlavné chromozómy získame po reciprokom krížení* rozdielne štiepne pomery (tabuľka 2. 1 a 2. 2). Štiepny pomer závisí od smeru kríženia, t. j. či je nositeľom recesívnej alely samček (otec) alebo samička (matka). V krížení, kde je ♀ homozygotne recesívna a ♂ dominantný sa uplatňuje dedičnosť krížom (t. j. znaky z matky sa prenású na synov a znaky z otca sa prenású na dcéry).

Ciel': Získanie zručností pri práci s modelovým objektom *D. melanogaster* a na príklade kríženia mutantnej a štandardnej línie overenie platnosti princípov dedičnosti znakov viazaných na pohlavné chromozómy.

Materiál a chemikálie: *D. melanogaster* – jedince so štandardným fenotypom, mutantná línia – *white*, skúmavky – nádoby na chov múch (Obr. 2. 3), živná pôda (agar, sušené kvasnice, cukor, detská krupica, filtračný papier, vatová zátka), dietyléter (na narkotizáciu hmyzu) v reagenčnej fľaši so zábrusom a kvapadlom, nádobka na narkotizáciu hmyzu, lupa, štetec na manipuláciu s muchami



Obr. 2. 3: *Drosophila melanogaster* v chovných nádobkách (skúmavkách).

Postup:

Podľa schém na obr. 2. 1. a 2. 2 urobíme nasledovné kríženia:

1. Kríženie prvej filiálnej generácie F_1 *

Muchy parentálnej generácie sklepeme a uspíme v narkotizačnej nádobke. Vyberieme 2 samičky štandardného fenotypu, ktoré musia byť virgínne (neoplozené, maximálne 4-5 hodín od vyletenia z kukly) a 3 samčekov s mutantným fenotypom. Opatrne ich preniesieme do nádoby s čerstvou pôdou a uzavrieme vatovou zátkou. Následne urobíme aj recipročné kríženie*, vyberieme 2 samičky s mutantným fenotypom a 3 samčekov so štandardným fenotypom. Po týždni, keď je nanosený dostatočný počet vajíčok, odstránime (sklepeme) rodičovských jedincov. Asi po dvoch týždňoch by sme v skúmavke mali mať F_1 generáciu potomkov.

2. Kríženie druhej filiálnej generácie F_2

Muchy F_1 generácie sklepeme a uspíme v narkotizačnej nádobke. Vyberieme opäť 2 samičky a 3 samčekov (samičky nemusia byť virgínne, nakoľko F_1 generácia je uniformná*). Prenesieme ich do nádoby a po dvoch týždňoch sledujeme F_2 generáciu múch. Rovnako postupujeme aj pri variante s recipročným krížením. Overíme, či platia pravidlá dedičnosti znakov viazaných na pohlavné chromozómy v praxi, porovnáme, nakoľko sa experimentálne získané štiepne pomery odlišujú od teoreticky očakávaných. Výsledky môžeme vyhodnotiť štatistickou metódou – χ^2 (chí-kvadrát) testom. Jej princíp spočíva v overení tzv. nulovej hypotézy, ktorá hovorí, že medzi teoretickými štiepnymi pomermi a experimentálnymi štiepnymi pomermi nie je rozdiel.⁵

⁵ Pre detailnejšie nastudovanie štatistickej metódy chí-kvadrát testu môžete pozrieť <http://www.biostathandbook.com/chigof.html>, prípadne Gálová, E., Ševčovičová, A., Miklovičová, M., Švec, M. (2006). Vybrané texty a príklady na cvičenia z genetiky. Univerzita Komenského, Bratislava, 106 s.

Odporúčaná literatúra:

- Gálová, E., Ševčovičová, A., Micolvičová, M., Švec, M. (2006). Vybrané texty a príklady na cvičenia z genetiky. Univerzita Komenského, Bratislava, 106 s.
- Russel, P. J. (2006). iGenetics. 5. vyd. Pearson Education, Inc., The Benjamin/Cummings Publishing company, San Francisco, 2006. 842 s.

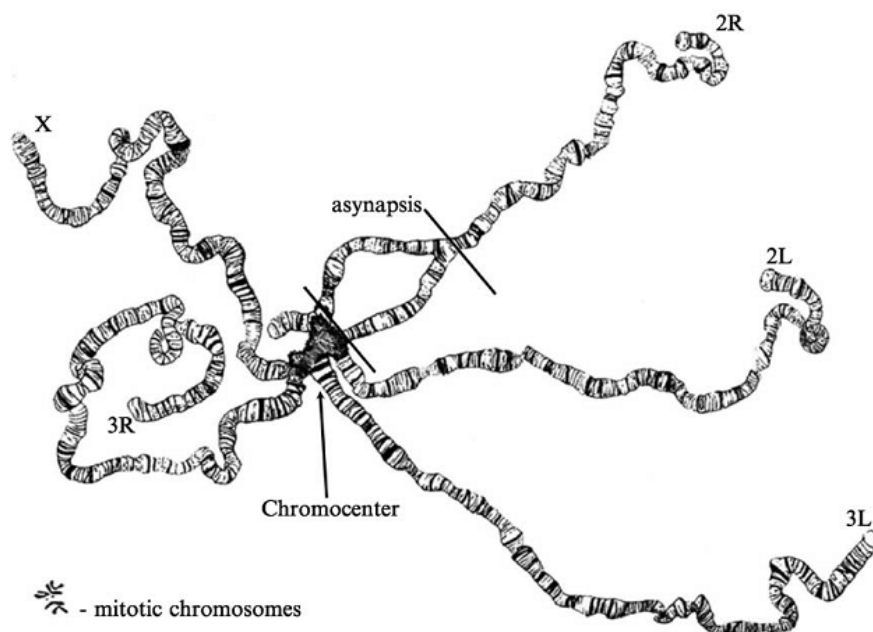
Otázky:

1. Aké potomstvo by sme získali po krížení rastliny F₁ generácie (genotyp Ff) s fialovou rastlinou (genotyp FF) alebo s bielou rastlinou (genotyp ff)? Vaše kríženie zapíšte.

2. 2. 2 Roztlakové preparáty polyténnych chromozómov z larválnych slinných žliaz *D. melanogaster*

Princíp:

Polyténne chromozómy boli prvýkrát popísané v roku 1881 E. G. Balbianim (College de France, Paríž) u pakomára pernatého (*Chironomus plumosus*). Nachádzajú sa v larválnych tkanivách rôznych druhov hmyzu. Sú to veľké chromozómy dobre viditeľné aj mikroskopicky použitím objektívu s menším zväčšením. Ich veľkosť je výsledkom atypického bunkového cyklu, kedy dochádza k 10 kolám DNA replikácie (S fáza) bez následnej mitózy, chromozómy (sesterské chromatídy) sa od seba neoddelia a ostávajú spojené v mieste, ktoré sa nazýva chromocentrum. Každý chromozóm takto obsahuje 1024 (2¹⁰) sesterských chromatíd. Keďže polyténne chromozómy sú niekoľkonásobne väčšie ako mitotické chromozómy (Obr. 2. 4), v minulosti sa veľmi intenzívne využívali v genetickom výskume *D. melanogaster* hlavne na mapovanie génov.



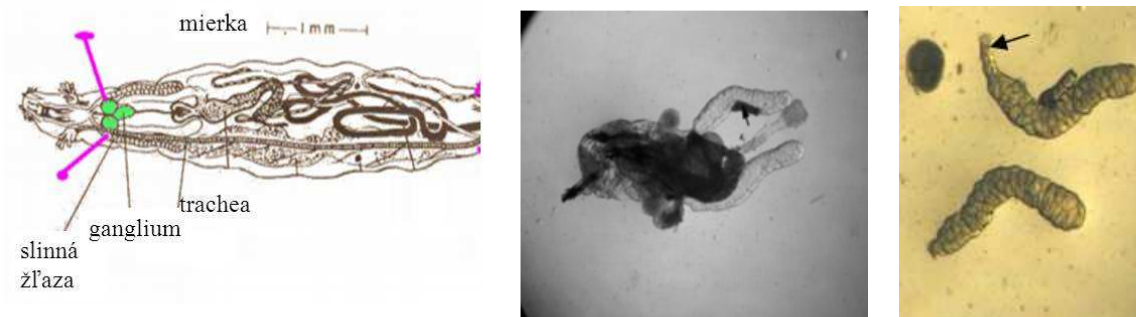
Obr. 2. 4: Morfológia polyténnych chromozómov *D. melanogaster* a porovnanie ich veľkosti s mitotickými chromozómami (Painter, 1934).

Cieľ: Vizualizácia polyténnych chromozómov v roztlakovom preparáte.

Materiál a chemikálie: stereolupa, mikroskop, podložné a krycie sklíčka, mikropipety, preparačné pinzety, filtračný papier, larvy 3. instaru línie divého typu *D. melanogaster*, 0,7 % NaCl (fyziologický roztok), 45 % a 60 % kyselina octová, 3 % orceín v 45 % a 60 % kyseline octovej

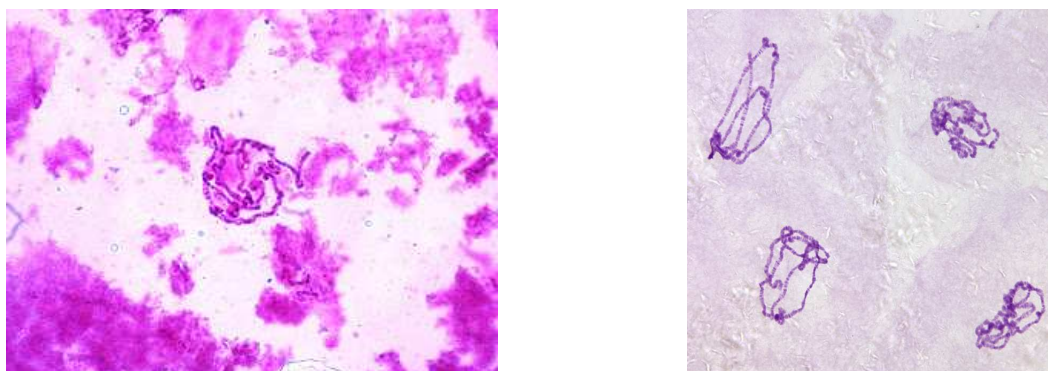
Postup:

- Do kvapky fyziologického roztoku na podložnom sklíčku izolujeme slinné žľazy 3. larválneho instaru pod stereomikroskopom pomocou preparačných pinziet (Obr. 2. 5).



Obr. 2. 5: Anatomia larvy a morfológia slinných žliaz *D. melanogaster*

(<http://web.as.uky.edu/biology/faculty/kellum/bio315/Lab%204A,%204B%20Exercise-Spring%202015.pdf>).



Obr. 2. 6 : Polyténne chromozómy *D. melanogaster* farbené orceínom, zväčšenie 400x

(<http://ibabmsc01.blogspot.sk/2012/03/polytene-chromosome.html>

http://www.faculty.umb.edu/yvonne_vaillancourt/Biology/introcc.html).

- Slinné žľazy pinzetou opatrne prenesieme do kvapky 45 % kyseliny octovej (fixačné činidlo) na čistom podložnom sklíčku a necháme fixovať 30 sekúnd.
- Pomocou pásika filtračného papiera opatrne odsajeme 45 % kyselinu octovú tak, aby sme na papierik nezachytili aj slinné žľazy.
- Na slinnú žľazu kvapneme roztok orceínu v 45 % kyseline octovej a necháme farbiť 3 až 10 minút pri izbovej teplote. Podľa potreby prikvapkáme ďalšiu kvapku roztoku, nakoľko sa tento roztok rýchlo odparuje a vysychá.
- Pomocou pásika filtračného papiera opäť opatrne odsajeme použitý roztok.
- Na tkanivo kvapneme 60 % kyselinu octovú a okamžite ju odsajeme filtračným papierom.
- Nakoniec na slinnú žľazu kvapneme 3 % roztok orceínu v 60 % kyseline octovej a uzavrieme krycím sklíčkcom.

- Preparát opatrne vložíme medzi filtračný papier a silno roztlačíme palcom na ruke. Existujú aj iné metódy roztlačania tkaniva, ako napríklad poklepávanie tupým koncom ceruzky alebo pinzety po oblasti, kde sa nachádza tkanivo, ktoré je zafarbené na červeno.
- Po roztlačení sa preparáty uzavrujú lakom na nechty a po zaschnutí laku sú preparáty pripravené na mikroskopickú analýzu (Obr. 2. 6).

Otázky:

1. V akých orgánoch hmyzu sa nachádzajú polyténne chromozómy?
2. Akým mechanizmom vznikajú polyténne chromozómy?

3. „ŠPORTOVÝ GÉN“

3. 1 Teoretická časť

Už v 70. rokoch minulého storočia sa vedci začali zaoberať vplyvom génov na športový výkon. Vykonávali štúdie zamerané hlavne na jednovaječné dvojčičky žijúce dlhodobo oddelene v rozdielnom prostredí. V roku 1998 sa Montgomery s kolektívom začal zaoberať športovými predispozíciami na úrovni genotypu jedinca. Zaujímal ich konkrétne mutácie a polymorfizmy* génov, ktoré by mohli zohrávať úlohu pri športovom výkone. Dnes takéto sekvenčné varianty génov označujeme ako PEPs (polymorfizmy zlepšujúce výkon, z angl. *Performance Enhancing Polymorphisms*). Montgomery položil základný pilier športovej genetiky. Objavil prvý konkrétny PEP polymorfizmus génu pre angiotenzín konvertujúci enzým (*ACE*). Dnes už vieme, že v našom genóme* je viac ako 200 takých polymorfizmov, ktoré sa vyskytujú v inej frekvencii u vrcholových športovcov v porovnaní s bežnou populáciou.

Gén *ACE* je v našom genóme lokalizovaný na dlhom ramene (q) 17. chromozómu v pozícii 23.3⁶. Produktom génu je membránový proteín – angiotenzín konvertujúci enzým, prípadne nazývaný aj kinináza II. Patrí medzi metaloproteínazy* závislé od zinku. Vyskytuje sa prevažne na povrchu epiteliálnych a endoteliálnych buniek. Je súčasťou renín-angiotenzínového systému (RAS), ktorý je kľúčovým elementom regulácie krvného tlaku, rovnováhy tekutín a solí v našom tele. *ACE* premieňa angiotenzín I na biologicky vysoko účinný angiotenzín II tak, že z decapeptidu* angiotenzínu I odštiepi histidín spolu s leucínom a vznikne oktapeptid* angiotenzín II (ANG II) so sekvenciou aminokyselín Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Ten spôsobuje zužovanie krvných ciev, čoho výsledkom je zvýšenie krvného tlaku. Ďalej sa angiotenzín II podieľa na stimulácii hormónu aldosterónu, ktorý podporuje absorpciu solí a vody v obličkách, a na inaktivácii bradykinínu. Bradykinín je tkanivový hormón pôsobiaci predovšetkým v mieste svojho vzniku. Spôsobuje rozšírenie ciev (dilataciu), ktorá znižuje krvný tlak, čiže keď je inaktivovaný, dochádza k opačnému javu – zvyšovaniu krvného tlaku. Rôzne experimentálne práce dokazujú, že ANG II má významnú úlohu v etiopatogenéze* mnohých ochorení kardiovaskulárneho systému.

Dĺžka *ACE* génu je 21 kilobáz. Pozostáva z 26 exónov* a 25 intrónov*. V roku 1990 bol popísaný polymorfizmus *ACE* génu, ktorý sa zakladal na prítomnosti (inzercii – I), respektíve neprítomnosti (delécii – D) 287 bp Alu repetície⁷ v 16. intróne zodpovedajúceho génu. Z tohto hľadiska je možná existencia troch rôznych genotypov*: DD, II alebo ID. O päť rokov neskôr sa zistilo, že koncentrácia a aktivita cirkulujúceho enzýmu *ACE* je úzko prepojená s polymorfizmom daného génu. Nositelia genotypu DD majú viac ako dvojnásobne vyššie hladiny plazmatického enzýmu v porovnaní s nositeľmi genotypu II, heterozygoti* majú tieto hladiny vyššie približne o 31 %. Tieto zistenia boli veľkou inšpiráciou pre ďalšie výskumy zaoberajúce sa definovaním vzťahu medzi *ACE* genóm a ochoreniami srdcovocievneho systému.

Pred 20 rokmi sa stal polymorfizmus génu *ACE* prvým geneticky preukázaným markerom športových predispozícií. V ľudskom kostrovom svalstve môže byť gén *ACE* pre angiotenzín konvertujúci enzým v dvoch variantoch. Jedinci s alelou* I (inzerčná alela) majú 16. intrón *ACE* génu dlhší o Alu repetíciu (287 bp) v porovnaní s nositeľmi alely D (delečná

⁶ Pozícia génu na chromozóme je určená na základe farbenia, ktoré vytvára na chromozóme špecifické „prúžky“, čím môžeme chromozóm rozdeliť na konkrétne oblasti a podoblasti. Číslo udáva polohu génu v oblasti vzhľadom k centromére.

⁷ Alu repetícia je úsek DNA, ktorý bol pôvodne charakterizovaný ako miesto, ktoré rozpoznáva reštrikčná endonukleáza *AluI*. Alu repetície sú najpočetnejšie repetitívne elementy v ľudskom genóme.

alela). Inzerčná alela vedie k nižšej aktivite enzýmu v sére a aj v tkanive. Predstavuje výhodu pre vytrvalostný výkon a uplatnenie anabolickej odpovede* po intenzívnom tréningu. Štúdie potvrdili, že prítomnosť tejto alely poskytuje zvýšenú mechanickú účinnosť tréňovaného svalstva. Väčšie zastúpenie homozygotného* genotypu pre inzerčnú alelu (II) u vytrvalostných športovcov môže byť odôvodnené zlepšením odolnosti svalstva voči únave, väčším zastúpením pomalých svalových vlákien, vyššou VO_2 max (maximálna rýchlosť spotreby kyslíka), nižším aeróbnym výdajom a väčšou aeróbnou kapacitou vplyvom tréningu. Nositelia delečnej alely majú vyššiu hladinu cirkulujúceho ACE v sére v porovnaní s jedincami homozygotnými pre inzerčnú alelu. Zistilo sa, že alela D nepredstavuje výhodu pre vytrvalostný výkon, ale je dôležitá pre silovo orientovaných športovcov. Genotyp DD je spojený so zvýšeným percentuálnym zastúpením svalových vlákien typu II b, ktoré sú nevyhnutné pre maximálny silový výkon behom krátkeho času.

3. 2 Praktická časť

3. 2. 1 Izolácia DNA z bukálnej sliznice

Princíp:

Na izoláciu DNA v množstvách, ktoré postačujú na analýzu polymerázovou reťazovou reakciou (PCR), sa veľmi často používajú bunky bukálnej sliznice. V prvom kroku izolácie je potrebné vzorku homogenizovať, na čo sa využíva roztok chelexu*. Chelex je živica viažúca kovalentne dvojmocné ióny (hlavne Mg^{2+}). Vyviazaním týchto iónov sa potlačí účinok nukleáz t. j. enzýmov, ktoré štiepia molekuly nukleových kyselín. Následne dochádza k deštrukcii bunkových štruktúr alkalickým prostredím a vysokou teplotou. V záverečnom kroku sa centrifugáciou oddelí roztok s DNA od zvyškov bunkových štruktúr a živice.

Ciel': Izolácia DNA z buniek bukálnej sliznice použitím chelexu.

Materiál a chemikálie: vortex, centrifúga, termoblok, vatové tyčinky, mikroskúmavky, špičky, pipety, chelex 100

Postup:

Najskôr odoberieme ľudskú DNA z bukálnej sliznice pomocou špeciálnej forenznej alebo obyčajnej vatovej tyčinky.

Izolácia chelexom:

- Do 1,5 ml mikroskúmavky pridáme vatovú tyčinku s bukálnym sterom.
- Pridáme 200-300 μ l chelexu (5 % chelex rozpustený v sterilnej redestilovanej vode) tak, aby bola vzorka kompletne ponorená.
- Po mechanickom otieraní a roztláčaní tyčinky v eppendorfke prebytočnú časť tyčinky odstrihneme.
- Vzorky inkubujeme 30 min. pri 56 °C.
- Počas inkubácie vzorky pravidelne vortexujeme.
- Po 30 min. vortexujeme vzorku pri vysokých otáčkach (12 000 g) 15 s.
- Inkubujeme 8 min. pri 99 °C.
- Vortexujeme opäť 15 s pri 12 000 g.
- Tyčinku dobre otrieme o okraj skúmavky a vyhodíme.
- Následne centrifugujeme 3 min. pri 12 000 g.
- Odpipetujeme opatrne vrchnú časť roztoku tak, aby sme nenabrali sedimentovaný chelex.

- Odmeríme koncentráciu DNA pomocou spektrofotometra (nanoPhotometer, Implen). Na základe hodnôt nameranej koncentrácie sa následne rozhodneme, aké množstvá jednotlivých vzoriek DNA využijeme pri PCR analýze.

3. 2. 2 Polymerázová reťazová reakcia fragmentov ACE génu

Princíp:

Polymerázová reťazová reakcia alebo **PCR** (z ang. *Polymerase Chain Reaction*) je metóda, ktorú využívajú biológovia na získavanie mnohých kópií určitého úseku DNA. Tie sa získavajú replikáciou – kopírovaním DNA v skúmavke, na rozdiel od prirodzenej replikácie DNA, ktorá prebieha v bunke počas S-fázy bunkového cyklu⁸. Oba typy replikácie DNA, prirodzená (prebiehajúca v bunke⁹) i „neprirodzená“ (uskutočnená v skúmavke¹⁰), sa zhodujú v základných požiadavkách, ktoré je nevyhnutné splniť, aby z prítomnej molekuly DNA mohla vzniknúť jej kópia.

Na reakciu v skúmavke i v bunke sú potrebné:

1. molekula DNA, ktorá slúži ako predloha (**templát**), podľa ktorej budú vznikáť jej kópie;
2. deoxyribonukleotidy¹¹ (**dNTP**), základné stavebné jednotky DNA. Počas replikácie sa postupne spájajú, až napokon vytvoria nové vlákno DNA;
3. enzým **DNA polymeráza***, ktorý vytvára väzbu medzi dNTP, čiže syntetizuje nové vlákno DNA;
4. **primery** (krátke úseky DNA, prípadne RNA). Slúžia ako „štartovací bod“ pre tvorbu nového vlákna DNA, pretože DNA polymeráza dokáže pripájať dNTP iba k už existujúcemu vláknu DNA;
5. **vhodné prostredie**. Každý enzým vyžaduje pre svoju optimálnu činnosť špecifické podmienky prostredia (pH, prítomnosť určitého typu iónov a ich vhodná koncentrácia a pod.). V bunke sú tieto podmienky zabezpečené rôznymi regulačnými mechanizmami. Do skúmavky však musíme pridať tzv. tlmivý roztok (**pufor**), ktorý v nej vytvorí optimálne podmienky pre činnosť DNA polymerázy.

Replikácia DNA v skúmavke sa však od replikácie DNA v bunke v niektorých ohľadoch líši. Pri replikácii dvojitých vlákien DNA je nutné, aby sa obe vlákna od seba oddelili a aby sa každé vlákno spojilo s primerom. V bunke tento proces zabezpečujú enzýmy, ktoré sa však do skúmavky nepridávajú. V metóde PCR sa namiesto toho využívajú rôzne teplotné podmienky. Čím je v skúmavke vyššia teplota, tým viac sa oslabujú väzby medzi dvomi vláknami DNA, až sa napokon tieto vlákna oddelia (dôjde k **denaturácii**). Následným znižovaním teploty sa obnovujú podmienky na spájanie vlákien molekuly DNA – vtedy dochádza k pripojeniu primerov na jednovláknové molekuly DNA na základe komplementarity báz¹². Tento proces sa nazýva **anelácia primerov**. Potom sa teplota opäť zvýši na takú hodnotu, ktorá je optimálna pre činnosť DNA polymerázy – syntézu nových vlákien a vytvorenie

⁸ Bunkový cyklus sa skladá z niekoľkých fáz, ktoré sa od seba vzájomne odlišujú. Počas S-fázy dochádza k replikácii DNA a obsah DNA sa tak v bunke zdvojnásobí. Po tejto fáze dochádza k rozdeleniu materskej bunky (M-fáza) na dve dcérske bunky.

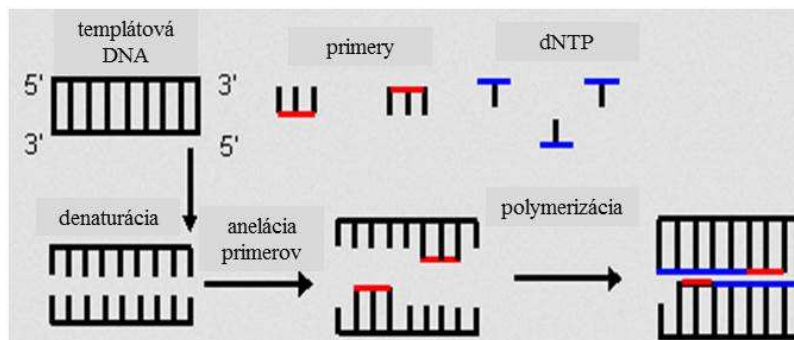
⁹ Procesy, ktoré sa odohrávajú v bunke, prípadne v celých organizmoch, sa označujú ako *in vivo*.

¹⁰ Procesy, ktoré sa odohrávajú v neprirodzenom prostredí (napr. v skúmavke), sa označujú ako *in vitro*.

¹¹ Deoxyribonukleotid (dNTP) pozostáva z deoxyribózy (cukor), bázy (G – guanín, C – cytozín, A – adenín, T – tymín) a fosfátových skupín.

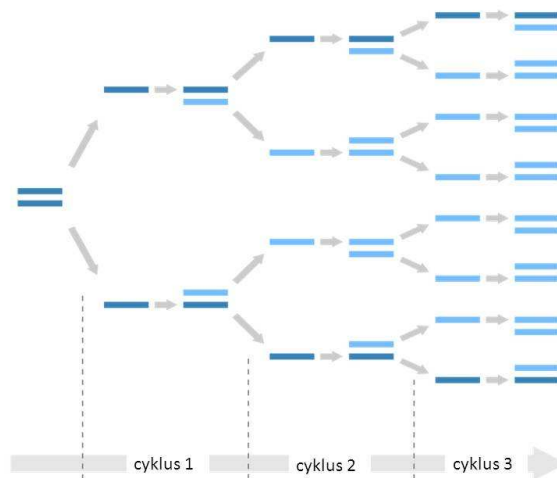
¹² Komplementarita báz znamená, že bázy sa prednostne spájajú s inými bázami: adenín sa prednostne spája s tymínom a opačne; cytozín sa prednostne spája s guanínom a opačne.

dvojvláknových molekúl DNA (proces **polymerizácie**). Všetky tri kroky sú ilustrované na obr. 3. 1.



Obr. 3. 1: Schematické znázornenie replikácie DNA v metóde PCR. Dvojvláknová DNA¹³ (templát) sa denaturuje (ang. denaturation), na uvoľnené vlákna sa pripoja primery (ang. annealing) a pomocou enzýmu DNA polymeráza sa spájajú základné stavebné jednotky dNTP (ang. extension) do novej dvojvláknovej molekuly DNA (upravené podľa <http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/PCR>).

Na rozdiel od replikácie DNA v bunke, kedy sa počas S-fázy bunkového cyklu vytvára ku každej prítomnej molekule DNA iba jedna kópia, pri PCR vznikajú **milióny** takýchto **kópií**. Tento vysoký počet je docielený tým, že proces replikácie sa niekoľkokrát za sebou opakuje a tým, že teoreticky každá prítomná molekula DNA (nielen pôvodná, ale i novovytvorené) môže slúžiť ako predloha – templát v ďalšom kole replikácie (Obr. 3. 2).



Obr. 3. 2: Počet kópií DNA sa počas PCR exponenciálne zvyšuje. Pôvodná molekula DNA ale aj novovytvorené kópie sú použité ako templát v ďalšom kole replikácie (napr. po skončení tretieho cyklu PCR budeme mať z pôvodne jednej molekuly DNA osem (2^3) kópií).

Zdroj: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>.

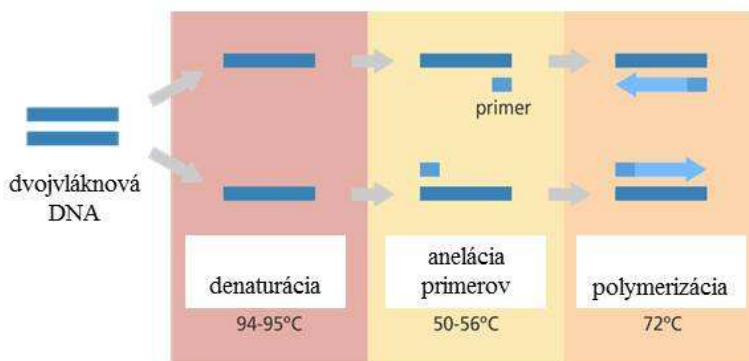
Viacere kolá replikácie sú docielené **teplotným programom** (Obr. 3. 3) zvoleným podľa potreby. Jeho základnými časťami sú:

1. **Úvodná denaturácia** – cca 95 °C (všetky prítomné dvojvláknové molekuly DNA sa denaturujú)

¹³ Každé vlákno DNA má svoj 5' a 3' koniec. Ako 5' koniec sa označuje ten koniec molekuly, na ktorom sa nachádzajú voľné fosfátové zvyšky (tie sú pripojené na 5' uhlík deoxyribózy). Ako 3' koniec sa označuje ten koniec molekuly, na ktorom sa nachádza voľná OH skupina (tá je pripojená na 3' uhlík deoxyribózy).

2. **Denaturácia** – cca 95 °C
3. **Anelácia primerov** – cca 50-65 °C (zvolená teplota závisí od zloženia primerov¹⁴)
4. **Polymerizácia** – cca 72 °C
5. **Záverečná polymerizácia** – cca 72 °C (sú dosyntetizované molekuly DNA, ktorých druhé vlákno nebolo úplne skopírované)

Body číslo 2, 3 a 4 sa niekoľkokrát (napr. 30-krát) po sebe opakujú, čím sa docieli 30 kôl replikácie DNA.



Obr. 3. 3: Fázy replikácie dvojvláknovej DNA vzhľadom na teplotný program PCR.

Zdroj: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>

Počas replikácie DNA sa v bunke kopírujú celé chromozómy, no pri PCR **sa cielene replikuje iba určitý úsek DNA**, s ktorého kópiami chceme ďalej pracovať. To docielime tým, že použijeme dvojicu špecifických primerov, ktoré sa dokážu pripojiť iba k okrajom tohto úseku (jeden primer na jeden okraj, druhý primer na druhý okraj). Vďaka tomu bude prebiehať replikácia DNA iba v tejto oblasti, a nie na všetkých chromozómoch.

Replikácia DNA pomocou metódy PCR sa odlišuje od replikácie DNA v ľudskej či v inej cicavčej bunke ešte v jednom dôležitom bode. Ako ste si mohli všimnúť, počas PCR sú všetky zložky v skúmavke, vrátane DNA polymerázy, vystavené vysokým teplotám (až 95 °C). Enzým DNA polymeráza je proteín (bielkovina) a podobne ako iné cicavčie proteíny sa pri takýchto vysokých teplotách stávajú ireverzibilne (natrvalo) nefunkčné. Z toho dôvodu sa pri PCR používa **DNA polymeráza z termofilných organizmov**¹⁵, čiže organizmov, ktoré za normálnych okolností žijú v takýchto teplotných podmienkach a sú voči nim prispôbené. Ich enzýmy si zachovávajú aktivitu aj pri vysokých teplotách.

Ciel': Amplifikácia (zmnoženie) úseku génu ACE z izolovanej ľudskej DNA.

Materiál a chemikálie:

Pre amplifikáciu oboch vlákien DNA sú potrebné dva primery. Reakčná zmes PCR obsahuje okrem DNA (200 – 600 ng), DNA polymerázy a daných primerov (1-2 µl z koncentrácie 10 mM) aj reakčný pufor, prípadne dNTP mix (pokiaľ nie je priamo v pufri) a redistilovaný vodu na doplnenie objemu (20 – 50 µl). Na amplifikáciu použijeme termocyklér*.

Použijeme nasledovné primery:

ACE-for: 5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT -3'

ACE-rev: 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA -3'

¹⁴ Čím viac cytozínov (C) a guanínov (G) primer obsahuje, tým vyššia bude teplota anelácie.

¹⁵ Medzi termofilné organizmy patria napr. baktérie rodu *Thermus*, ktoré dokážu prežiť v prostredí s teplotou od 55 °C do 100 °C.

Teplotný program:

1. Prvá denaturácia 8 min pri 95 °C
2. Denaturácia 1 min pri 95 °C
3. Anelácia 45 s pri 56 °C
4. Polymerizácia 45 s pri 72 °C
opakovanie 2. – 4. kroku 30 cyklov
5. Záverečná polymerizácia 10 min pri 72 °C
6. Schladenie vzoriek na 4 °C

Postup:

- Urobíme zmes pre PCR reakciu, kde pridáme k 200 – 600 ng DNA primery a reakčný pufor. Doplníme vodu do výsledného objemu (väčšinou 20 – 50 µl), v ktorom počítame aj s objemom enzýmu (enzým sa pridáva na koniec). Pri stanovení počtu jednotiek enzýmu na vzorku sa riadime informáciou na letáku priloženom k enzýmu (obyčajne je tam udaný počet jednotiek (U) na 1 µl a definícia jednotky). Všetko robíme v ľadovom kúpeli.
- Hotovú zmes preniesieme do termocykléra a spustíme predpísaný program.

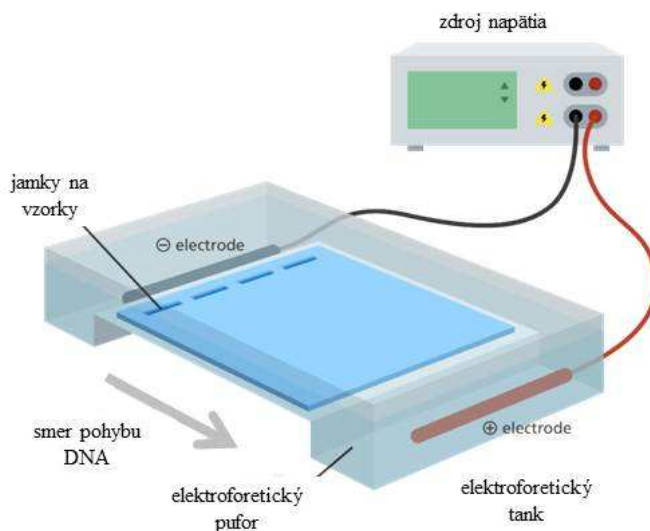
3. 2. 3 Elektroforéza* DNA v agarózovom géli*Princíp:*

Gélová elektroforéza je metóda, ktorá slúži na **separáciu** (oddelenie) DNA, RNA a proteínov **na základe ich veľkosti**, prípadne iných vlastností. Pri gélovej elektroforéze sa najčastejšie používajú dva typy gélov: agarózové a polyakrylamidové. K separácii nukleových kyselín dochádza priamo v použítom géli pomocou aparatury, ktorá vytvorí **elektrické pole**. Keďže nukleové kyseliny majú záporný náboj (vďaka fosfátovým zvyškom, ktoré obsahujú), po vytvorení elektrického poľa sa začnú pohybovať smerom od záporne nabitej elektródy (tzv. katóda) ku kladne nabitej elektróde (tzv. anóda) (Obr. 3. 4). Všeobecne platí, že čím sú molekuly menšie, tým viac sú pohyblivé a naopak, čím sú molekuly väčšie, tým sa pohybujú pomalšie (Obr. 3. 5).

Na oddelenie nukleových kyselín (DNA, RNA), na overenie ich prítomnosti vo vzorke a na určenie veľkosti fragmentov (úsekov) DNA sa zvyčajne používa **agarózová gélová elektroforéza**. Čím viac agarózy použitý gél obsahuje, tým je vhodnejší na separáciu menších fragmentov DNA. Takýto gél bude totiž pozostávať z pórov s menším priemerom, cez ktoré budú molekuly DNA pomalšie prechádzať a budú sa tak lepšie oddeľovať. Napr. 2 % agarózový gél je vhodný na separáciu fragmentov DNA s veľkosťou 200 – 1000 bp, v 0,7 % agarózovom géli efektívne separujeme fragmenty DNA s veľkosťou 5000 – 10000 bp. **Agarózový gél** sa pripravuje z práškovej agarózy. Tá sa pridá do tzv. **elektroforetického tlmivého roztoku**¹⁶ a následným zahrievaním sa prášok začne rozpúšťať, až vznikne priehľadný roztok. Postupným ochladzovaním sa neskôr z roztoku stane gélovitá hmota, do ktorej sa nanášajú vzorky DNA spolu s nanášacím roztokom¹⁷.

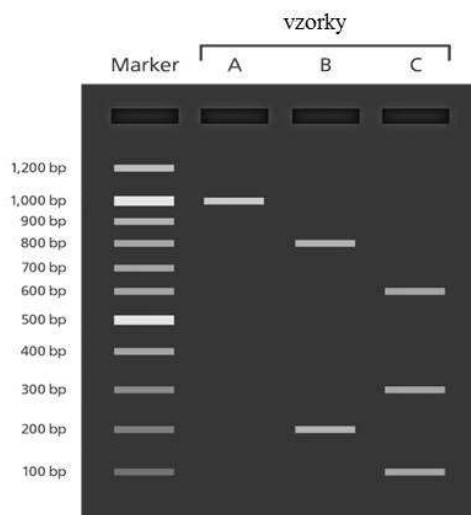
¹⁶ Tento roztok je dôležitým zdrojom iónov pre vznik elektrického prúdu a následnú separáciu DNA v géli.

¹⁷ Nanášacie farbivo pre gélovú elektroforézu obsahuje okrem samotných farbív aj glycerol. Tieto farbivá sa v géli pohybujú rovnakým smerom ako fragmenty DNA a podľa nich môžeme odhadnúť, kde v géli sa DNA práve nachádza. Glycerol sa vyznačuje vysokou hustotou, vďaka čomu klesnú všetky vzorky do gélu (neostanú na povrchu) a môže dôjsť k ich správne mu putovaniu v elektrickom poli.



Obr. 3. 4: Schematické zobrazenie aparatury na elektroforézu. Zdroj napätia vytvára elektrické pole, ktoré spôsobuje, že záporne nabitá DNA sa bude pohybovať od záporne nabitej elektródy (označenie: znamienko mínus) smerom ku kladne nabitej (označenie: znamienko plus).

Zdroj: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>



Obr. 3. 5: Schéma výsledku gélovej elektroforézy. Vzorky A, B a C obsahujú rôzny počet fragmentov DNA s rôznou veľkosťou. Na presnejšie zistenie veľkosti fragmentov slúži marker¹⁸, ktorý pozostáva z niekoľkých fragmentov DNA. Keďže ich veľkosť poznáme, vieme určiť aj veľkosti fragmentov vo vzorkách. Napr. vzorka C obsahuje fragmenty s veľkosťou 600 bp, 300 bp a 100 bp. Ako môžeme vidieť, najmenší fragment (100 bp) sa pohyboval najrýchlejšie a prešiel najväčšiu vzdialenosť od miesta, kde bola vzorka pridaná do gélu (čierny obdĺžnik). Najväčší fragment (1000 bp) vo vzorke A sa pohyboval najpomalšie, preto prešiel najkratšiu vzdialenosť. Zdroj: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>.

Fragmenty DNA sú bezfarebné, a preto nie sú vo vzorke ani v géli viditeľné. Z tohto dôvodu sa do gélu (pri jeho príprave) pridáva **farbivo**¹⁹, ktorá sa viaže na DNA. Po skončení

¹⁸ Marker používaný pri gélovej elektroforéze sa zvykne slangovo označovať anglickým slovom *ladder*. Vyplýva to z jeho podobnosti s rebríkom.

¹⁹ Jedným z takýchto farbív je etídium bromid, ktorý fluoreskuje po vystavení UV svetlu (svetelné spektrum s vlnovou dĺžkou cca 310 nm).

elektroforézy sa gél z aparatury vyberie a je osvetlený určitým **svetelným spektrom**. Použité farbivo je na toto spektrum citlivé (fluoreskuje), čím sa DNA „zviditeľní“ – vieme určiť, kde v géli sa DNA nachádza a určiť jej veľkosť pomocou použitého markera.

Ciel': Oddelenie jednotlivých fragmentov DNA po namnožení polymerázovou reťazovou reakciou (PCR).

Materiál a chemikálie:

Agaróza, 1x koncentrovaný TBE tlmiavý roztok (10x koncentrovaný roztok TBE: Tris 108 g, EDTA 5,84 g, H₃BO₃ 55 g, do 1000 ml doplniť destilovanou vodou), farbivo GelRed, nanášací roztok na DNA (0,4 % brómfenolová modrá, 0,4 % xylén cyanolová zelená, 50 % glycerol, 0, 1 % EDTA pH 8,0, ddH₂O), analyzované vzorky DNA, marker s naštiepenou DNA so známymi veľkosťami fragmentov. Prístrojovým vybavením je elektroforetická aparatura a zdroj napätia. Na vizualizáciu je potrebný transiluminátor s UV žiarivkou s vlnovou dĺžkou 260 nm.

Postup:

- Agarózový gél (2 %) si pripravíme rozvarením 2 g agarózy v 100 ml 1x TBE (Tris borátový pufo). Následne zmes čiastočne ochladíme a pridáme na vizualizáciu DNA 8 µl fluorescenčného* interkalačného* farbiva GelRed.
- Zmes nalejeme do pripravenej elektroforetickej vaničky. Vložíme hrebene a počkáme, kým gél nestuhne. Následne stuhnutý gél preniesieme do elektroforetickej aparatury, v ktorej je 1x TBE. Dôležité je mať stuhnutý gél ponorený, aby sme umožnili prechod prúdu.
- Do prvej dráhy naniesieme 1 – 5 µl vhodného markeru so známymi veľkosťami fragmentov. K jednotlivým vzorkám DNA s reakčnými zmesami pridáme nanášací roztok DNA v takom množstve, aby bol vo zorke 1x koncentrovaný. Následne vzorky naniesieme do jednotlivých dráh stuhnutého agarózového gélu.
- Veľkosť fragmentov v géli zistíme vizualizáciou na transiluminátore. Produkty amplifikácie génu ACE sú dlhé približne 490 bp (v prípade inzerčnej alely I) a 190 bp (v prípade delečnej alely D). Genotyp inzerčného homozygota (II) vidíme ako jeden fragment dlhý 490 bp, delečného homozygota (DD) ako jeden fragment dlhý 190 bp. Heterozygot (genotyp ID) má na géli dva fragmenty oboch dĺžok.

Odporúčaná literatúra:

- Alfredsson, G.A., Kristjansson, J.K. (1995): Ecology, Distribution, and Isolation of *Thermus*. V: *Thermus Species*. Sharp, R., Williams, R. (editori). Biotechnology Handbooks (Volume 9). Springer US.
- Hyjánek, J., Pastucha, D., Vodička, R. (2015): Možnosti genetického testování sportovní výkonnosti u dospělých sportovců. *Solen Medical Education*, 12(1): 39-41.
- Montgomery, H. E., Marshall, R., Hemingway, H., Myerson, S., Clarkson, P., Dollery, C., Hayward, M., Holliman, D. E., Jubb, M., World, M., Thomas, E. L., Brynes, A. E., Saeed, N., Barnard, M., Bell, J. D., Prasad, K., Rayson, M., Talmud, P. J., Humphries, S. E. (1998): Human gene for physical performance. *Nature* 393: 221-222.
- Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F. (1990): An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 86:1343-1346.
- Russel, P.J. (2010): iGenetics: A Molecular Approach. Third Edition. Pearsons Education, Inc.
- Williams, A. G., Rayson, M. P., Jubb, M., World, M., Woods, D. R., Hayward, M., Martin, J., Humphries, S. E., Montgomery, H. E. (2000): The ACE gene and muscle performance. *Nature* 403: 614.
- <http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>

Otázky:

1. Na akom princípe funguje agarózová gélová elektroforéza?
2. Ako by ste vedeli dokázať, že po polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) vznikli fragmenty DNA správnej veľkosti?

4. SLEDOVANIE ZMIEN V TOPOLOGII DNA*

4. 1 Teoretická časť (Oxidačný stres a antioxidanty)

Približne pred 2,7 miliardami rokov sa do nášho prostredia dostal prvý molekulárny kyslík (O_2), ktorý sa stal zdrojom reaktívnych foriem kyslíka (ROS). ROS, ktorých typickými predstaviteľmi sú napríklad superoxidový radikál ($O_2\bullet$), hydroxylový radikál ($\bullet OH$) a peroxid vodíka (H_2O_2), vznikajú aj v ľudskom tele v priebehu mnohých metabolických procesov alebo ako reakcia organizmu na vplyvy vonkajšieho prostredia. Pre normálne fungovanie organizmu je určitá hladina ROS nevyhnutná, keďže sú v nízkych hladinách dôležitou súčasťou niektorých enzymatických systémov. Pri vyššej koncentrácii však môžu poškodiť biomakromolekuly dôležité pre organizmus (bielkoviny, cukry, lipidy, nukleové kyseliny), čo vedie k poškodeniu bunkových kompartmentov a k bunkovej smrti. ROS tak môžu spôsobovať vážne zdravotné problémy a viesť k vzniku mnohých ochorení vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych ochorení, neurodegeneratívnych ochorení a prispievajú k starnutiu organizmu. Organizmy si však v priebehu evolúcie vyvinuli viaceré obranné systémy, ktorými sú schopné eliminovať negatívny účinok ROS. Patria medzi ne nízkomolekulové metabolity, akými sú kyselina askorbová, karotenoidy alebo flavonoidy. Tieto látky sú schopné zachytávať reaktívne častice, fungujú ako lapače ROS alebo vytvárajú neaktívne komplexy s kovmi. Okrem toho sú v bunke prítomné enzymatické antioxidačné systémy, medzi ktoré patria kataláza, superoxididizmutáza alebo peroxidázy. Za normálnych okolností existuje v tele rovnováha medzi množstvom vytvorených ROS a množstvom antioxidantov. Ak však dôjde k nadprodukcii ROS, dochádza k porušeniu tejto rovnováhy a vzniku oxidačného stresu.

Jednou z možností ochrany organizmu voči ROS je príjem antioxidantov v strave. Strava bohatá na antioxidanty môže zohrávať dôležitú úlohu v prevencii spomínaných ochorení. To, či niektorá látka dokáže fungovať ako antioxidant, môžeme overiť pomocou viacerých testov. Jedným z nich je aj DNA *topology assay*.

4. 2 Praktická časť

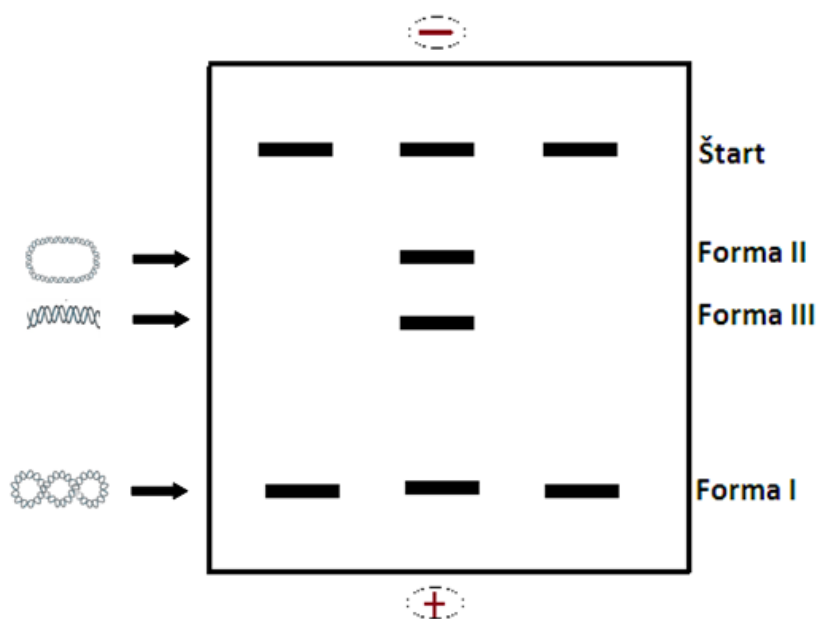
4. 2. 1 Sledovanie účinku multivitamínovej zmesi na topológiu DNA

Princíp:

DNA *topology assay* je test, ktorý slúži na sledovanie priamych účinkov agensov na plazmidovú DNA* po jej interakcii s testovanou látkou. Princípom metódy je elektroforetická* detekcia zmien indukovaných v topológii plazmidovej DNA. Reakčná zmes obsahuje ióny železa (Fe^{2+}), ktoré sú schopné katalyticky stimulovať tvorbu ROS. Tieto kationy sa oxidujú (v tzv. Fentonovej reakcii) na trojmocné (Fe^{3+}), pričom vzniká hydroxylový radikál ($\bullet OH$).

Prostredníctvom metódy DNA *topology assay* je možné odhaliť jednovláknové a dvojvláknové zlomy v molekule plazmidovej DNA na základe rozdielnej pohyblivosti jej topologických izomérov v géli. Konverzia nepoškodenej superšpiralizovanej DNA (Forma I) na relaxovanú cirkulárnu formu DNA (Forma II) nastáva v dôsledku vzniku jednovláknových zlomov na plazmidovej DNA. Ku konverzii superšpiralizovanej formy DNA na linearizovanú formu DNA (Forma III) dochádza v dôsledku vzniku dvojvláknových zlomov DNA. Forma I putuje v géli najrýchlejšie, preto sa nachádza najďalej od štartu a najpomalšie sa pohybuje Forma II, teda relaxovaná cirkulárna forma DNA (Obr. 4. 1).

Test je možné využiť nielen na detekciu poškodenia plazmidovej DNA testovanou látkou (detekcia potenciálneho genotoxického účinku testovanej látky), ale zároveň aj na odhalenie jej potenciálnych bioprotektívnych vlastností (tzv. antigenotoxický účinok). Genotoxický účinok sa testuje tak, že do reakčnej zmesi sa pridá plazmid a testovaná látka. Antigenotoxický účinok sa sleduje pridaním danej látky v prítomnosti dvojmocných katiónov železa. Ak ani po pridaní železnatých katiónov do reakcie v prítomnosti sledovanej látky nevzniká poškodenie DNA, sledovaná látka dokáže eliminovať účinok týchto katiónov a vykazuje teda protektívne účinky.



Obr. 4. 1: Schématické znázornenie migrácie jednotlivých foriem plazmidovej DNA.

Cieľ: Cieľom experimentu je zistiť, či môže multivitamínová zmes poškodzovať molekulu plazmidovej DNA, alebo či má schopnosť chrániť molekulu plazmidovej DNA pred účinkom poškodzujúcich agensov.

Materiál a chemikálie: superšpiralizovaný plazmid pBR322 (*Thermo Scientific*), testované látky (10 % multivitamínová zmes a esenciálny olej), destilovaná voda, deionizovaná voda, 96 % etanol, tlmivý roztok (K_2HPO_4 80,2 ml (17,418 g/100 ml dH_2O), KH_2PO_4 19,8 ml (13,608 g/100 ml dH_2O), dH_2O 900 ml), 0,5x TBE roztok (Tris 2,7 g, kyselina boritá 1,38 g, EDTA 0,19 g, dH_2O doplniť do 500 ml, upravíme pH s HCl na 8,3), farbivo GelRed, 1 % agarózový gél (NMP agaróza 0,5 g, 0,5x TBE 50 ml, GelRed 5 μ l), Stop C farbiaci roztok (50 % glycerol 1 ml, 0,5 M EDTA (pH 8) 2 μ l, brómfenolová modrá 1 mg, xyléncyanol 1 mg), 0,5 % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g, dH_2O 1 ml), automatické pipety, špičky, skúmavky, stojan na skúmavky, parafilm, aparátúra na elektroforézu, zdroj elektrického napätia, vanička na prípravu gélu, mikrovlnná rúra, transluminátor, stolová centrifúga

Postup:

- Pripravíme si 1 % agarózový gél (0,5 g agarózy rozpustíme v 50 ml TBE a pridáme 10 μ l farbiva GelRed), vložíme do neho hrebeň a necháme stuhnúť.

- Pripravíme si tri riedenia testovanej látky (multivitamínovej zmesi z lekárne alebo esenciálny olej), ktoré riedime v destilovanej vode alebo v 96 % etanole v závislosti od rozpustnosti daných látok.

Výsledná koncentrácia	Testovaná látka	Rozpúšťadlo
1 %	1 ml 10 % testovanej látky	9 ml
0,1 %	1 ml 1 % testovanej látky	9 ml
0,01 %	1 ml 0,1 % testovanej látky	9 ml
0,001 %	1 ml 0,01 % testovanej látky	9 ml

- Namiešame reakčnú zmes pre každú vzorku (3 vzorky bez prídavku 0,5 % FeSO₄·7H₂O, 3 vzorky s prídavkom 0,5 % FeSO₄·7H₂O).

	Vzorky bez železa	Vzorky so železom
plazmid pBR322	1 µl	1 µl
tlmivý roztok	1 µl	1 µl
testovaná látka	1 µl	1 µl
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0 µl	1 µl
destilovaná voda	7 µl	6 µl

- Ako negatívnu kontrolu použijeme plazmid bez prídavku testovanej látky a bez zdroja železnatých kationov. Pozitívnu kontrolu bude tvoriť plazmid spolu s iónmi železa.
- Vzorky inkubujeme 20 min. pri izbovej teplote.
- Ku každej vzorke pridáme 1 µl farbiaceho roztoku Stop C a vzorky premiešame.
- Vzorky nanesieme na gél a spustíme elektroforézu (1-2 hod, 70 V).
- Gél odfotíme a podľa prítomnosti jednotlivých izomérov plazmidovej DNA vyhodnotíme genotoxický, resp. antigenotoxický účinok testovanej látky.

Odporúčaná literatúra:

- Mittler R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **11**(1): 15-19.
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Int.* **2014**: 1-19.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**: 312-322.
- Čipák L., Miadoková E., Dingová H., Kogan G., Novotný L., Rauko P. (2001). Comparative DNA protectivity and antimutagenicity studies using DNA-topology and Ames assays. *Toxicology in vitro.* **15**(6): 677-681.
- Rauko, P., Novotný, L., Balážová, E. (1993). Potentiation of cis-DDP and pyridoxal effect on isolated DNA during simultaneous application. *Neoplasma.* **40**(5): 283-288.

Otázky:

1. Ako by ste overili, že v plazmide naozaj vzniká jednovláknový, resp. dvojitý zlom?
2. Po dlhšom vystavení vzorky iónom železa nie je na géli možné vidieť prúžky prislúchajúce jednotlivým formám DNA, ale pozorujeme šmuhu v oblasti krátkych fragmentov DNA. Pokúste sa vysvetliť príčinu tohto javu.

5. REŠTRIKČNÁ ANALÝZA DNA

5. 1 Teoretická časť

Reštrikčné endonukleázy sú enzýmy, ktoré sú schopné štiepiť (prestrihnúť) molekulu DNA na presne určenom mieste, ktoré je dané špecifickou sekvenciou* nukleotidov.²⁰ Tieto enzýmy sú produktom rôznych mikroorganizmov a ich názvy sú zostavené z prvého písmena rodu a prvých dvoch písmen druhu mikroorganizmu, z ktorého boli izolované. Napr. enzým *HindIII*, ktorý budeme v experimente používať pochádza z baktérie *Haemophilus influenzae*, kmeň R_d. Tento enzým rozpoznáva špecifický 6-nukleotidový úsek na DNA, ktorého poradie nukleotidov je uvedené na obr. 5. 1. Takéto miesto na DNA nazývame rozpoznávacie miesto pre danú reštrikčnú endonukleázu.



Obr. 5. 1: Rozpoznávacie miesto pre reštrikčnú endonukleázu *HindIII*.

Niektoré reštrikčné endonukleázy neštiepia obe vlákna v rovnakom mieste a po štiepení zanechávajú voľné jednovláknové konce. Objav reštrikčných endonukleáz bol veľmi významný²¹, pretože s ich pomocou je možné pripraviť rekombinantné DNA*, ktoré vznikajú spojením dvoch alebo viacerých molekúl DNA odlišného pôvodu.

5. 2 Praktická časť

5. 2. 1 Identifikácia neznámeho páchatel'a pomocou analýzy DNA

Princíp:

Kriminalistická genetická analýza je odvetvie kriminalistiky, ktoré sa zaoberá identifikáciou biologického materiálu a analýzou DNA, ktorú je možné z tohto materiálu získať. Skúma sa vzorka, tzv. stopa, odobratá z miesta činu, pričom zdrojom môže byť akýkoľvek biologický materiál obsahujúci DNA, napr. kvapka krvi, sliny, kúsok kosti, tkaniva, zub, vlas s koricom a pod. Z izolovanej DNA je možné použitím špecifických reštrikčných endonukleáz vytvoriť tzv. DNA profil jedinca. Využitím reštrikčných endonukleáz vytvárame profil na základe tzv. polymorfizmu* dĺžky reštrikčných fragmentov. Hoci majú rôzni ľudia DNA na vyše 99% zhodnú, nachádzajú sa tu úseky, ktorými sa jednotlivci medzi sebou líšia. Ak sa v takomto mieste nachádza rozpoznávacie miesto pre reštrikčnú endonukleázu, môžeme štiepenie využiť na identifikáciu neznámej vzorky DNA, pričom v prípade niektorých jedincov sa v danom mieste DNA štiepi a u iných nie. Keďže profil DNA má každý človek (okrem jednovaječných dvojčiat) unikátny, situácia je podobná ako s odtlačkami prstov, preto sa táto metóda niekedy nazýva aj DNA fingerprinting – DNA odtlačok, alebo DNA profilovanie. Aby sme mohli výsledky analýzy zviditeľniť, nanesieme poštiepenú DNA do agarózového gélu, v ktorom sa jednotlivé fragmenty DNA rozdelia podľa veľkosti. Po ožiarení svetlom príslušnej vlnovej dĺžky ich môžeme zachytiť kamerou (pozri str. 48,

²⁰ Existujú rôzne skupiny nukleáz, enzýmov, ktoré sú schopné štiepiť molekuly DNA. Mnohé z nich štiepia nešpecificky, nezávisle od presnej sekvencie DNA, iné vyžadujú prítomnosť rozpoznávacieho miesta. Pojem endonukleáza znamená, že enzým štiepi vlákno DNA vo vnútri, nie od konca.

²¹ Reštrikčné endonukleázy objavili v roku 1970 Hamilton Smith a Daniel Nathans, ktorí za svoj objav získali v roku 1978 Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu spolu s Wernerom Arberom, ktorý s nimi uskutočnil priekopnícke experimenty.

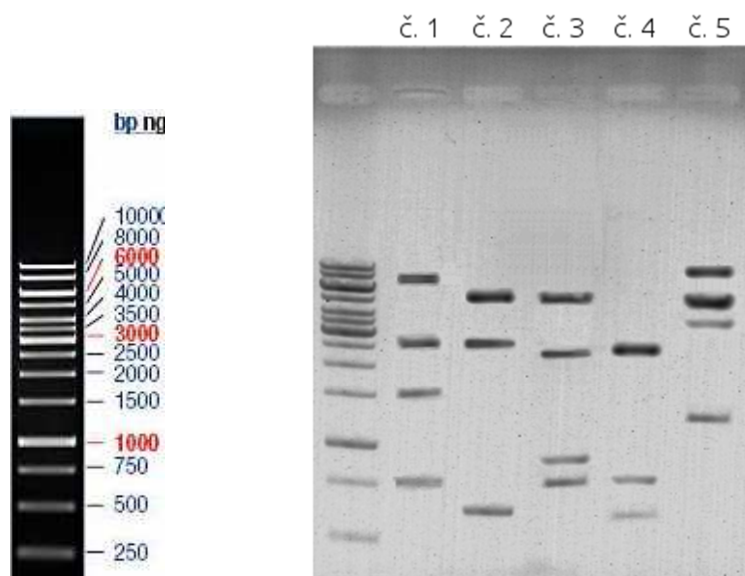
kapitola 3., úloha 3). Profily získané zo stôp nájdených na mieste činu sa porovnávajú s profilmi podozrivých osôb, čím je možné identifikovať páchatel'a.

Ciel': Cieľom experimentu je na základe reštrikčného štiepenia neznámej vzorky DNA a následnej analýzy agarózovou gélovou elektroforézou určiť, ktorému z podozrivých jedincov prislúcha profil analyzovanej neznámej vzorky DNA.

Materiál: mikropipeta, sterilné špičky, stojan na skúmavky, prázdne mikroskúmavky, skúmavky s neznámou vzorkou DNA, enzým *HindIII*, tlmivý roztok k príslušnému enzýmu, sterilná H₂O, skúmavka s tlmivým roztokom k príslušnému enzýmu, nanášací a farbiaci roztok *Novel Juice* (*New England Biolabs*), ukazovateľ molekulovej hmotnosti DNA, ľad, termoblok, elektroforetická aparátúra, 1% agarózový gél (pre prípravu gélu pozri kapitolu 3, úlohu 3), elektroforetický roztok 0,5x TBE, transluminátor s kamerou, obrázok s profilmi podozrivých

Postup:

- Prázdnu mikroskúmavku si označíme svojimi iniciálami.
- Postupne pipetujeme do mikroskúmavky: 12,5 µl sterilnej vody, 2 µl tlmivého roztoku k enzýmu *HindIII*, bez ktorého enzým nedokáže správne pracovať a 5 µl neznámej vzorky DNA (skúmavka označená X).
- Následne do reakcie pridáme 0,5 µl enzýmu *HindIII*.
- Reakcia prebieha v termobloku na 37 °C 15 min.
- Pripravený agarózový gél ponoríme do aparátúry s roztokom 0,5x TBE.
- Po štiepení DNA pridáme do vzorky 4 µl farbiaci roztok *Novel Juice*, ktorý umožní približne sledovať rýchlosť putovania DNA gélom a zároveň zabezpečí, aby pri nanášaní vzorky nevyplávali z jamiek v géli pri nanášaní.
- Vzorky nanesieme do príslušných dráh.



Obr. 5. 2: Reštrikčný profil podozrivých. Vľavo – ukazovateľ molekulovej hmotnosti DNA, vpravo – obrázok reštrikčného profilu 5 podozrivých osôb.

- Do poslednej jamky v géli pridáme 2 µl ukazovateľa molekulovej hmotnosti DNA.
- Aparatúru uzavrieme a zapne zdroj elektrického prúdu.

- Vzorok sa separujú 45 min. pri 120 V, potom ich pozrieme na transluminátore a odfoíme.
- Získaný profil neznámej vzorky DNA porovnáme s profilom podozrivých podľa obrázku 5. 2.

Odporúčaná literatúra:

- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M. P., Martin K. C., Martin K. (2016): Molecular cell biology, 8th edition, W. H. Freeman and Company, New York
- Sambrook J., Russell D. W.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual

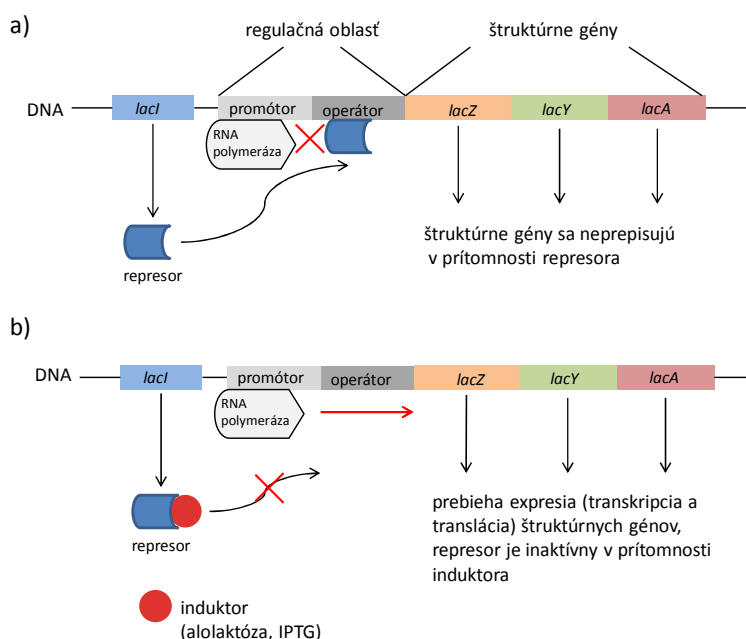
Otázky:

1. Ak je ľudský genóm zložený z 3 000 000 000 nukleotidov (písmen) a každý dvaja ľudia majú 99% DNA identickej, aká je pravdepodobnosť, že pri sledovaní jedného polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov identifikujeme nevinného človeka, ktorý má zhodou okolností rovnaký DNA profil ako páchatel'?
2. Existuje mnoho rôznych reštrikčných endonukleáz, ktoré sa používajú na analýzu polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov, no väčšina z nich štiepi DNA na približne podobný počet fragmentov. Akým jednoduchým spôsobom je možné výrazne zvýšiť spoľahlivosť tejto metódy bez použitia modernejších experimentálnych prístupov?

6. ANALÝZA PROTEÍNOV

6. 1 Teoretická časť (Indukcia expresie* cieľového proteínu)

Pri štúdiu proteínov a ich funkcií sa veľmi často stretávame s tým, že študovaného proteínu sa prirodzene v bunke z celkového množstva proteínov vyskytuje málo. Aby sme docielili vyšší obsah študovaného proteínu, využívame často tzv. heterológny expresný systém s možnosťou indukcie expresie proteínu. Heterológny systém znamená, že gén, ktorý kóduje želaný proteín, klonujeme metódami rekombinantných DNA* do vektora*, ktorý vnesieme do cudzieho hostiteľského organizmu²². V tomto hostiteľskom organizme vieme pomocou dobre preštudovaných mechanizmov regulovať expresiu cieľového proteínu a produkovať ho vo zvýšenej miere. V baktériách patrí medzi takéto mechanizmy regulácia expresie génov laktózového operónu* (Obr. 6. 1). Laktózový operón obsahuje gény, ktoré sú dôležité pre spracovanie laktózy v médiu. Baktéria ich prepisuje iba vtedy, keď je v médiu laktóza, a zároveň je nedostatok glukózy. V opačnom prípade je ich prepis potlačený, aby baktéria nevydávala energiu na produkciu proteínov, ktoré pre ňu za daných okolností nie sú potrebné.



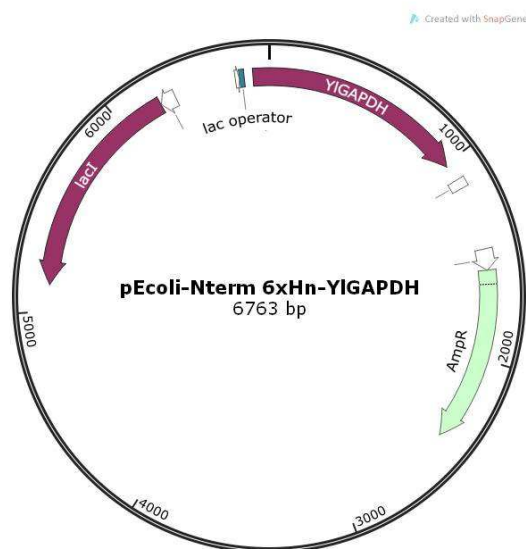
Obr. 6. 1: Schéma laktózového operónu počas neprítomnosti (a) a prítomnosti (b) laktózy v médiu.

Regulácia je zabezpečená nasledovne: ak je v médiu dostatok glukózy, produkt génu *lacI*, ktorý kóduje proteín nazývaný represor, sa viaže na regulačnú oblasť nazývanú DNA-operátor a zabraňuje RNA polymeráze*, aby spustila transkripciu* štruktúrnych génov*

²² Hostiteľský organizmus je najčastejšie organizmus s dobre preštudovanou reguláciou génov, ľahko sa s ním manipuluje a dokáže produkovať proteíny vo veľkých množstvách. Používajú sa najčastejšie baktérie *Escherichia coli*, prípadne kvasinky, napr. *Pichia pastoris*.

(*lacZ*, *lacY*, *lacA*)²³ dôležitých pre spracovanie laktózy (Obr. 6.1a). Ak je však laktóza v médiu, produktom jej rozkladu je alolaktóza, ktorá pôsobí ako induktor a viaže sa na molekuly represora. Represor s naviazaným induktorom nie je schopný viazať sa na regulačnú oblasť – operátor, čím uvoľní cestu RNA polymeráze a prebieha prepis génov dôležitých pre spracovanie laktózy (Obr. 6. 1b).

Regulačná sekvencia laktózového operónu a gén kódujúci represor (*lacI*) sú súčasťou vektora*, z ktorého prebieha v bunkách *E. coli* expresia cieľového proteínu (Obr. 6. 2).



Obr. 6. 2 : Schéma vektora s vloženým génom *YIGAPDH* na heterológnu expresiu proteínu v bunkách *E. coli*.

Cieľovým proteínom v našom experimente je enzým glyceraldehyd-trifosfátdehydrogenáza kvasinky *Yarrowia lipolytica* (*YIGAPDH*)²⁴. Gén kódujúci tento enzým sme technikami rekombinantnej DNA²⁵ vložili do molekuly vektora za regulačnú sekvenciu (laktózový operátor – lac operátor). V molekule vektora je vložený gén AmpR, ktorý zabezpečuje rezistenciu baktérie na antibiotikum ampicilín. Takýto gén označujeme ako selekčný marker, pretože na médiu s ampicilínom vyrastú iba tie baktérie, ktoré obsahujú v bunke molekuly vektora. Ak baktérie nesúce vo svojich bunkách vektor kultivujeme na médiu bez laktózy, *lacI* represor bráni prepisu nášho cieľového génu *YIGAPDH*. Po pridaní induktora²⁶ do média (v našom prípade IPTG) dôjde k spusteniu transkripcie RNA-polymerázou a dochádza k výraznej produkcii cieľového proteínu. Overenie zvýšenej produkcie proteínu po indukcii uskutočňujeme separáciou proteínov pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy* a následnou vizualizáciou proteínov použitím Coomassie Brilliant Blue farbiva.

²³ Gén *lacZ* kóduje enzým β -galaktozidázu, ktorý rozkladá laktózu na monosacharidy glukózu a galaktózu. Gén *lacY* kóduje enzým β -galaktozidpermeázu, ktorý zabezpečuje transport laktózy do bunky. Gén *lacA* kóduje β -galaktozidtransacetylázu, ktorá zabezpečuje pridávanie acetylovej skupiny k molekule laktózy za účinku acetylkoenzýmu A.

²⁴ Enzým GAPDH sa zúčastňuje procesu glykolýzy (tvorby energie enzymatickým rozkladom glukózy). Za účinku kofaktora NAD premieňa glyceraldehyd-trifosfát na glycerát 1,3-bifosfát.

²⁵ Techniky rekombinantnej DNA zahŕňajú v tomto prípade amplifikáciu úseku génu *YIGAPDH* metódou PCR, štiepenie molekuly vektora a PCR produktu vhodnými reštrikčnými endonukleázami a spojenie PCR produktu a vektorovej molekuly enzýmom DNA-ligáza.

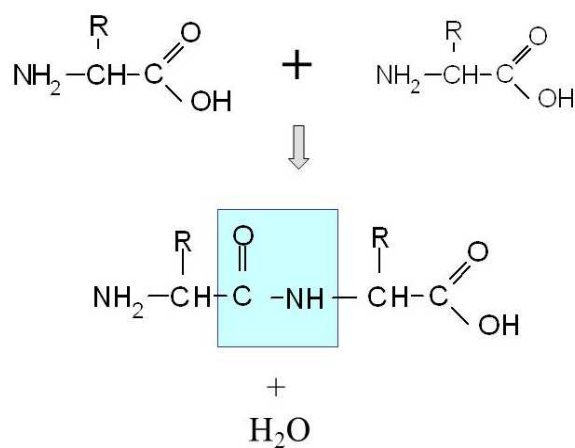
²⁶ Okrem prirodzeného induktora, ktorým je alolaktóza, sa v experimentoch používajú častejšie syntetické induktory, napr. IPTG (izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid).

Odporúčaná literatúra:

- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M. P., Martin K. C., Martin K. (2016): Molecular cell biology, 8th edition, W. H. Freeman and Company, New York.

6. 2 Praktická časť**6. 2. 1 Separácia proteínov polyakrylamidovou gélovou elektroforézou* (PAGE) a farbenie proteínov farbivom Coomassie Brilliant Blue***Princíp:*

Proteíny sú makromolekuly tvorené aminokyselinami, ktoré sú navzájom pospájané kovalentnými peptidovými väzbami (Obr. 6. 3).



Obr. 6. 3: Schéma vzniku peptidovej väzby medzi dvoma aminokyselinami s postrannými reťazcami (R).

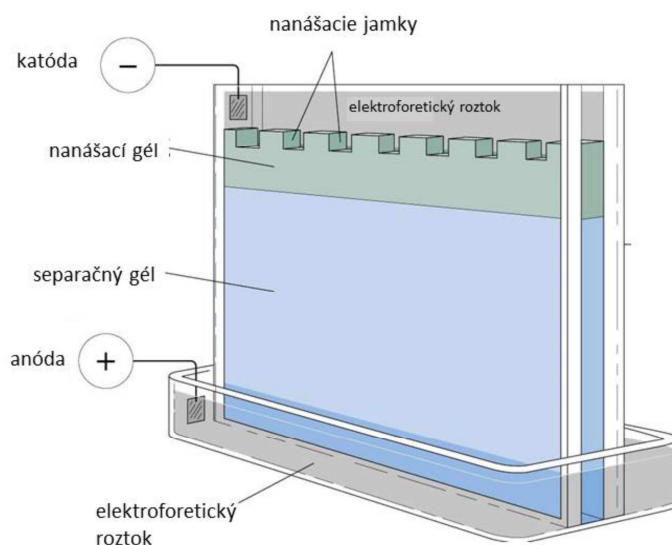
Na separáciu, čiže rozdelenie proteínov podľa molekulovej hmotnosti, sa najčastejšie používa polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE). Jej princíp je podobný ako pri agarózovej gélovej elektroforéze, ktorá sa používa na separáciu nukleových kyselín. Polymerizáciou zmesi akrylamidu a bisakrylamidu (BAA) vzniká pevný gél s pórovitou štruktúrou, pričom platí, že molekuly s nižšou molekulovou hmotnosťou prechádzajú týmito pórami rýchlejšie ako molekuly s vyššou molekulovou hmotnosťou. Keďže molekuly proteínov majú spravidla oveľa menšiu molekulovú hmotnosť ako nukleové kyseliny²⁷, nemôžeme na separáciu proteínov používať agarózový gél. Póry agarózového gélu sú oveľa väčšie ako póry polyakrylamidového gélu a vzorky proteínov by prešli géлом príliš rýchlo a nerozdelili sa efektívne. Polyakrylamidový gél sa skladá z dvoch častí: separačný gél (s vyššou koncentráciou BAA a vyšším pH) a nanášací gél (s nižšou koncentráciou BAA a nižším pH). Úlohou vrchného nanášacieho gélu je zhromaždiť proteíny extraktu na začiatok separačného gélu, aby vstupovali do separačného gélu naraz a v ideálnych podmienkach (Obr. 6. 4).

Pohyb proteínu v elektrickom poli závisí od celkového náboja proteínu, ktorý je daný jeho aminokyselinovým zložením²⁸. Aby sme proteíny efektívne rozdelili len na základe molekulovej hmotnosti, inkubujeme ich v prítomnosti detergentu* SDS (dodecylsulfát sodný)

²⁷ Približná hmotnosť úseku DNA s veľkosťou 1000 bp je 650 kDa. Z takéhoto úseku sa môže vytvoriť proteín s 333 aminokyselinami, ktoré majú molekulovú hmotnosť približne 36 kDa.

²⁸ Postranné reťazce aminokyselín určujú náboj aminokyseliny, záporne nabité aminokyseliny sú napr. kyselina asparágová, kyselina glutámová, kladne nabité napr. lyzín, arginín, histidín. Celkový náboj ovplyvňuje aj pH roztoku. Hodnota pH, v ktorom sa náboj kladne a záporne nabitých aminokyselín vyrovná, sa nazýva izoelektrický bod (pI). Pri takomto pH sa proteín v elektrickom poli nepohybuje.

a rovnako sa SDS pridáva aj do gélu. SDS je látka, ktorá dodáva proteínu silný záporný náboj a ruší prirodzený náboj proteínu daný jeho aminokyselinovým zložením.



Obr. 6. 4: Schéma prípravy polyakrylamidového gélu

Pôsobením SDS sa však rušia aj nekovalentné interakcie, a preto nie je vhodné použiť SDS, ak chceme izolovať proteínové komplexy alebo proteíny v natívnom, čiže prirodzenom stave. Na odhad molekulovej hmotnosti proteínov v géli používame štandard molekulovej hmotnosti proteínov (Obr. 6. 6), ktorý je zmesou proteínov s presne definovanou a známou molekulovou hmotnosťou. Po separácii proteínov pomocou PAGE je potrebné proteíny vizualizovať v géli. Na tieto účely sa najčastejšie používa farbivo Coomassie Brilliant Blue R-250²⁹, ktorá iónovými väzbami reaguje s proteínmi a dáva im fialovo-modré zafarbenie.

Cieľ: Rozdeliť extrakt proteínov podľa molekulovej hmotnosti pomocou PAGE a vizualizovať proteíny na géli zafarbením farbivom Coomassie Brilliant Blue.

Materiál a chemikálie: proteínové extrakty z baktérií, 2x koncentrovaný SDS PAGE nanášací roztok (0,5M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml, 10 % SDS 4 ml, glycerol 2 ml, 2-merkaptotanol 1 ml, ddH₂O 0,5 ml, brómfenolová modrá pár zrn), polyakrylamidový gél, aparátúra na elektroforézu, zdroj napätia, 10x koncentrovaný SDS PAGE elektroforetický roztok (Tris 12 g, glycín 57,6 g, 10 % SDS 40 ml, ddH₂O do 400 ml), štandard molekulovej hmotnosti proteínov, termoblok, PageBlue Protein Staining Solution (obsahuje farbivo Coomassie Brilliant Blue), automatické pipety a špičky, destilovaná voda.

Ostatné roztoky potrebné pri príprave polyakrylamidového gélu: 1,5 M Tris-HCl (Tris 36,3 g, ddH₂O do 200 ml, upravíme pH s HCl na 8,8), 0,5 M Tris-HCl (Tris 6 g, ddH₂O do 100 ml, upravíme pH s HCl na 6,8), 10 % SDS (SDS 20 g, ddH₂O do 200 ml), 10 % APS – skladuje sa v mrazničke (APS 1 g, ddH₂O do 10 ml).

²⁹ Schopnosť farbiva zachytiť isté minimálne množstvo proteínu na géli udáva jej detekčný limit. Detekčný limit Coomassie Brilliant Blue je približne 100 ng proteínu. Citlivejšou farbiacou metódou je farbenie striebrom, ktorého detekčný limit sa blíži k 1 ng proteínu.

Postup:

Pracujeme vždy v rukaviciach a manipuláciu s toxickými a mutagénnymi látkami je možné vykonávať len pod dohľadom učiteľa!³⁰

1. Príprava polyakrylamidového gélu:

- Pripravíme si aparatúru a sklá do stojanu (tenké a hrubé s 1 mm medzerníkom).
- Do kadičky pripravíme 12 % separačný gél:

ddH ₂ O	2,44 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,9 ml
30 % BAA ³¹	3 ml
10 % SDS	75 µl
10 % APS ³²	75 µl
TEMED ³³	10 µl

Poznámka: po pridaní TEMED-u sa spustí polymerizácia a gél začne hneď tuhnúť.

- Pipetou s objemom 1000 µl opatrne nalievame gél medzi sklá, približne do 3/4 objemu.
- Gél okamžite prevrstvime 1 ml izopropanolu a počkáme, kým stuhne.
- Do ďalšej kadičky pripravíme nanášací gél:

ddH ₂ O	2,975 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
30 % BAA	0,67 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Poznámka: **Pozor!** TEMED pridajte, až keď máte očistený separačný gél od izopropanolu (pozri ďalší bod).

- Ak je separačný gél stuhnutý, zlejeme izopropanol, prepláchneme stričkou s redistilovanou vodou a vysušime Whatman papierom*.
- Pridáme TEMED do nanášacieho gélu, dôkladne premiešame a pipetou s modrou špičkou opatrne nanesieme až po hornú hranicu skla.
- Pomaly zasunieme hrebeň so zubami (pozor, zvyšný gél vytečie) a počkáme, kým gél stuhne (Obr. 6. 5).
- Po stuhnutí opatrne vytiahneme hrebeň (potiahneme kolmo nahor) a vzniknuté dráhy premyjeme stričkou s destilovanou vodou.

2. Príprava vzoriek a elektroforéza:

- Vyberieme si vzorky proteínov a necháme ich rozmraziť na ľade.

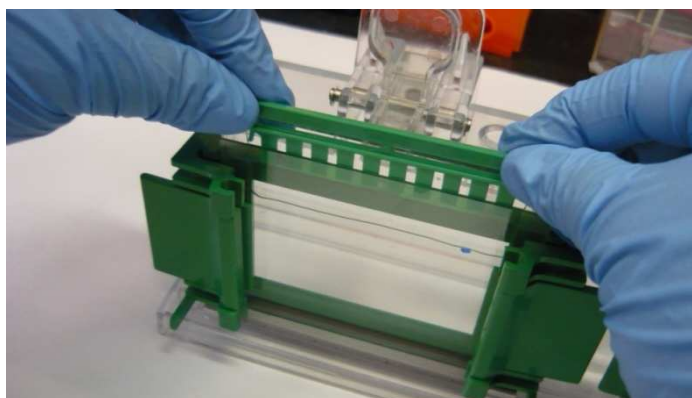
³⁰ Pozri kapitolu „Základné pravidlá bezpečnosti pri práci“.

³¹ BAA – bisakrylamid (zmes akrylamidu a bisakrylamidu v pomere 29:1). Nespolymerizovaná látka je toxická a mutagénna. Pozri kapitolu „Základné pravidlá bezpečnosti pri práci“. Gély preto dostanete pripravené.

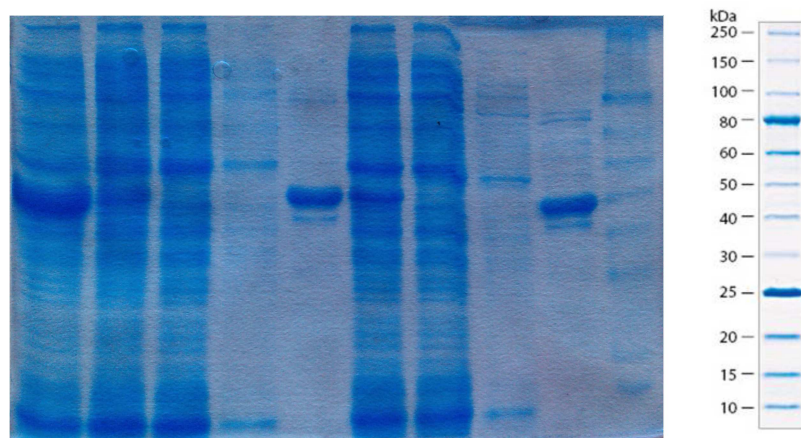
³² APS – persíran amónny (oxidačné činidlo, ktoré katalyzuje polymerizáciu akrylamidu a bisakrylamidu). Látka je v práškovej forme toxická a mutagénna. Po pridaní do gélu sa toxicita eliminuje.

³³ TEMED – tetrametyl etyléndiamín (iniciuje účinok APS poskytnutím voľných kyslíkových radikálov). Látka je toxická.

- Pridáme 50 μl 2x SDS- PAGE nanášací roztok³⁴ a proteíny rozvaríme inkubáciou na 95 °C 5 min.
- Vzorky centrifugujeme 1-2 min. pri 5000 g a necháme na ľade.
- Poskladáme elektroforetickú aparatúru a gél zalejeme 1x koncentrovaným elektroforetickým roztokom na SDS-PAGE.
- 10 μl zo vzoriek opatrne nanesieme do dráh, do poslednej dráhy dáme 5 μl proteínového štandardu molekulovej hmotnosti.
- Aparatúru zavrieme a spustíme elektroforézu na 120 V a konštantný prúd 20 mA (ak máme 2 gély, tak 40 mA).
- Zdroj vypneme, keď farebný nanášací roztok prejde celým gélom (cca po 1,5 h).
- Sklá opatrne rozoberieme a odrežeme časť s nanášacím gélom.



Obr. 6. 5: Príprava polyakrylamidového gélu.



Obr. 6. 6: Príklad proteínového gélu zafarbeného farbivom Coomassie Brilliant Blue a obrázok proteínového štandardu molekulovej hmotnosti (New England Biolabs).

3. Farbenie gélu Coomassie Brilliant Blue:

- Gél vložíme do Petriho misky s redestilovanou vodou a oplachujeme 3-krát 10 min.
- Vodu zlejeme a gél zalejeme farbivom PageBlue Protein Staining Solution.
- Farbíme minimálne 2 h, resp. cez noc pri izbovej teplote.
- Farbivo zlejeme a môžeme opakovane použiť (maximálne však 3-krát).
- Gél opláchneme redestilovanou vodou a necháme vo vode odfarbovať (Obr. 6. 6).

³⁴ 2x SDS PAGE nanášací roztok slúži jednak na farebné rozlíšenie nanesej vzorky a obsahuje glycerol, vďaka ktorému sa usadí vzorka na dne nanášacej jamky v géli.

Odporúčaná literatúra:

- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Nosek J., Tomáška E. (2013): Laboratory protocols in molecular and cell biology of yeasts
- Sambrook J., Russell D. W.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual

Otázky:

1. Chcete vizualizovať proteínový komplex zložený z dvoch proteínov, ktorého veľkosť je 120 kDa. Navrhnete zloženie polyakrylamidového gélu.
2. Po PAGE elektroforéze v otázke 1 ste zistili, že proteínový komplex izolovaný z buniek *E. coli* migruje v inej pozícii, ako keď ste ho izolovali z kvasiniek. Ako by ste si to vysvetlili?

6. 2. 2 Meranie koncentrácie proteínu v roztoku – Bradfordov test (*Bradford assay*)*Princíp:*

Bradfordov test využíva schopnosť farbiva Coomassie Brilliant Blue G-250 viazať sa na proteíny a pritom meniť svoje chemické vlastnosti. Molekula tohto farbiva má v nenaviazanej forme v kyslom prostredí absorpčné maximum pri 470 nm, čo znamená, že najlepšie zachytáva práve svetlo tejto vlnovej dĺžky. Roztok takého farbiva sa preto javí ako červený. Naopak, pri väzbe na proteín dochádza k tvorbe formy, ktorá najlepšie absorbuje svetlo vlnovej dĺžky 595 nm a takýto roztok je modrej farby.

Pri Bradfordovom teste sa využíva metóda spektrofotometrie, ktorá umožňuje merať množstvo svetla istej vlnovej dĺžky zachytené vzorkou. Ide o kvantitatívnu metódu – čím viac proteínu je vo vzorke, tým viac farbiva je naviazaného na proteíny, a tým vyššie je množstvo absorbovaného svetla pri vlnovej dĺžke 595 nm – hovoríme, že sa zvyšuje **absorbancia** vzorky pri 595 nm.

Z hodnoty absorbancie by nebolo možné určiť, aké je presné množstvo proteínu vo vzorke, dokázali by sme iba povedať, kde je proteínov viac alebo menej. Pre presné určenie množstva proteínov sa pred meraním experimentálnych vzoriek s neznámou koncentráciou proteínu odmeria absorbancia série vzoriek so známou koncentráciou proteínov. Takýmto vzorkám hovoríme **štandardy** a namerané hodnoty sú použité na konštrukciu kalibračnej krivky. Po odmeraní hodnoty absorbancie v študovaných vzorkách potom môže byť koncentrácia proteínov vo vzorke odčítaná z kalibračnej krivky. Štandardy sú často roztoky jedného konkrétneho proteínu – v našom prípade je to hovädzí sérový albumín (BSA).

Nevýhodou Bradfordovho testu je schopnosť použitej farbičky reagovať nielen s proteínmi, ale aj s niektorými inými látkami – ide napríklad o niektoré detergenty, flavonoidy alebo bázické proteínové tlmivé roztoky. Pred prípravou proteínových extraktov alebo purifikáciou proteínov je preto vhodné presvedčiť sa, že meraná vzorka takéto prímiesy neobsahuje.

Cieľ: Stanoviť množstvo proteínov v extrakte.

Materiál a chemikálie: proteínové extrakty (z baktérií, kvasiniek, rastlinných buniek, ...), destilovaná voda, 5x koncentrované Bradfordovo činidlo (Bio-Rad), hovädzí sérový albumín (BSA) v koncentrácii 100 µg/ml.

Postup:

- Pripravíme štandardy, na základe ktorých sa zostrojí kalibračná krivka (Tab. 6. 1). 1 x Bradfordovo činidlo treba pripraviť z 5 x koncentrovaného zásobného roztoku³⁵. Roztok proteínu (BSA) musí byť pridaný ako posledná zložka.

Tabuľka 6. 1: Zloženie štandardov na Bradfordov test.

- Okamžite po pridaní proteínu (BSA) vzorky premiešame prevrátením mikroskúmavky (3x).

Vzorka	BSA (100 µg/ml) [µl]	ddH ₂ O [µl]	1x Bradfordovo činidlo [µl]	Výsledná koncentrácia BSA [µg/ml]	OD ₅₉₅
Blank*	0	200	800	0	
štandard 1	5	195	800	0.5	
štandard 2	10	190	800	1	
štandard 3	20	180	800	2	
štandard 4	40	160	800	4	
štandard 5	60	140	800	6	
štandard 6	80	120	800	8	

- Vzorky inkubujeme pri izbovej teplote 5 minút. Čas inkubácie sa môže čiastočne líšiť (5 – 6,5 minúty), je však kľúčové, aby boli štandardy a neskôr merané vzorky s neznámou koncentráciou proteínu inkubované presne rovnaký čas.
- Zmeriame absorbanciu štandardov pri 595 nm. Na základe meraní skonštruujeme kalibračnú krivku. Na osi x budú známe koncentrácie štandardov a na osi y zmerané absorbancie. Kalibračná krivka sa štandardne konštruuje ako priamka odvodená z nameraných dát buď vizuálnym odhadom (ak je konštruovaná na milimetrový papier) alebo s využitím výpočtu metódou lineárnej regresie (prostredníctvom počítačového programu, napr. MS Excel, LibreOffice Calc a podobne)³⁶.

³⁵ Vždy je dobré si pripraviť 1x Bradfordovo činidlo aj na niekoľko (3-5) vzoriek navyše. Najmä pri neznámych extraktoch sa môže stať, že pri prvej vzorke neodhadnete správne množstvo proteínu a bude treba pripraviť novú vzorku. Nie je vhodné v jednom experimente merať vzorky pripravené so samostatne zarobenými roztokmi 1x Bradfordovho činidla, pretože aj malé rozdiely môžu viesť ku chybám v meraní.

³⁶ V prípade veľmi veľkej variability v nameraných dátach (pri lineárnej regresii $R^2 \ll 0.96$) treba zvážiť, či nedošlo k chybe pri príprave štandardov – merania sú zvyčajne pomerne konzistentné ($R^2 \sim 0.99$).

- Rovnako ako štandardy pripravíme na meranie absorbancie vzorky proteínov, ktorých koncentráciu chceme merať. Všeobecný výpočet na prípravu vzorky je uvedený v tabuľke 6. 2. Výsledná koncentrácia proteínov v meranej vzorke by mala byť v intervale, ktorý je pokrytý kalibračnou krivkou – v našom prípade teda 0,5 – 8 µg/ml.³⁷

Tabuľka 6. 2: Komponenty potrebné pre prípravu vzorky.

Objem proteínového extraktu [µl]	Objem ddH ₂ O [µl]	1x Bradfordovo činidlo [µl]
x	200 – x	800

- Podobne ako pri štandardoch, okamžite po pridaní proteínu treba začať merať čas. Po uplynutí inkubačnej doby odmeriame absorbanciu pri 595 nm.
- Na presné určenie koncentrácie proteínov v extrakte je vhodné odmerať viac vzoriek (replík) – vhodné sú najmenej tri. Na základe nameraných dát sa potom pre každý meraný extrakt vypočíta priemer koncentrácie.
- Na základe kalibračnej krivky určíme hodnotu koncentrácie proteínov v extrakte. Treba vziať do úvahy riedenie, ktorým bola pripravená vzorka na meranie z extraktu a prípadne, ak bol pôvodný extrakt riedený, aj predchádzajúce riedenia.

Odporúčaná literatúra:

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Quick Start Bradford Protein Assay Instruction Manual (Bio-Rad), <http://www.bio-rad.com/en-us/product/quick-start-bradford-protein-assay>
- Chemistry of Protein Assays (ThermoFisher), <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html#/legacy=www.piercenet.com>

Otázky:

1. Deoxycholát sodný je detergent, ktorý je súčasťou tlmivého roztoku, v ktorom máte rozpustený študovaný proteín. Máte obavy, že deoxycholát sa bude viazať na Bradfordovo činidlo, a tým ovplyvní absorbanciu vzorky, takže nebudete vedieť presne určiť koncentráciu proteínov v nej. Ako overíte, či deoxycholát sodný reaguje s použitým farbivom?
2. Na prípravu štandardov ste použili roztok BSA, ktorý ste (nesprávne) skladovali dlhodobo pri izbovej teplote. V dôsledku toho je BSA degradované – v roztoku je menej proteínu, ako predpokladáte. Na základe takto pripravených štandardov ste zostrojili kalibračnú krivku a stanovovali koncentráciu proteínu v neznámej vzorke. Ako váš výpočet ovplyvní degradované BSA? Bude nameraná koncentrácia v neznámej vzorke vyššia alebo nižšia, ako skutočná?

³⁷ V prípade neznámeho extraktu, u ktorého sa nedá vopred odhadnúť koncentrácia, je vhodné nachystať si iba jednu vzorku, u tej zmerať absorbanciu a odhadnúť jej približnú koncentráciu (extrapoláciou, ak je mimo rozsahu kalibračnej krivky). Ďalšie vzorky, ktoré budú využité na presné určenie koncentrácie proteínového extraktu, je potom potrebné pripraviť podľa odhadu z tejto prvej vzorky na koncentráciu pokrytú hodnotami kalibračnej krivky. Ak treba, pôvodný extrakt je možné zriediť a pripraviť vzorky na meranie z takejto zriedenej vzorky.

ZÁKLADNÉ ČASTI PROTOKOLU Z LABORATÓRNEHO CVIČENIA

Názov úlohy: Jasný a stručný názov úlohy.

Cieľ experimentu: Cieľ experimentu by mal stručne vystihnúť, čo je účelom cvičenia, akú hypotézu overujeme, prípadne aké zručnosti nadobudneme po uskutočnení experimentu.

Princíp: V časti „Princíp“ rozpracujeme základný teoretický princíp úlohy a základný princíp metód, ktorými ideme daný experiment uskutočniť.

Materiál a chemikálie: V tejto časti rozpíšeme použitý materiál, ktorý zahŕňa spotrebný materiál (plasty, špičky, skúmavky), sklo, pomôcky, technické vybavenie (prístroje), ale aj biologický materiál, t. j. názov druhu organizmu a prípadné označenie kmeňa organizmu, s ktorým budeme pracovať. V niektorých prípadoch je dôležité napísať aj presný genotyp použitého organizmu.

Vypíšeme všetky použité chemikálie, ich množstvá, resp. koncentrácie a použité roztoky s presným zložením.

Postup: V časti „Postup“ popíšeme presný postup experimentu (najčastejšie v bodoch), pričom postup by mal byť napísaný tak, aby bolo možné podľa tohto postupu daný experiment zopakovať.

Výsledky: V časti „Výsledky“ opíšeme, čo sme daným experimentom dosiahli a k akým výsledkom sme sa dopracovali. Súčasťou výsledkov môžu byť výpočty (koncentrácie, absorbcie a pod.). Ako dokumentácia výsledkov slúžia tabuľky, schémy, grafy a obrázky. Nad tabuľkou sa spravidla nachádza krátky popis, ktorý vystihuje, čo je v tabuľke znázornené. Grafy sú popísané zvyčajne pod samotným grafom, dôležité je nezabudnúť na popis osí grafu a prípadnej legendy. Obrázky sú popísané pod príslušným obrázkom, pričom ak je obrázkom vložená snímka z mikroskopu, resp. kreslený obrázok z mikroskopu, je potrebné uviesť príslušnú mierku alebo celkové zväčšenie. Vložené obrázky gélov musia obsahovať označenie a popis jednotlivých dráh nanosených do gélu. Ak je grafov, tabuliek a obrázkov viac, je potrebné ich očíslovať.

Diskusia a záver: V tejto časti zhodnotíme získané výsledky. Vyjadríme sa k tomu, či bol experiment úspešný, resp. či sme potvrdili stanovenú hypotézu. Výsledky môžeme konfrontovať so známymi publikovanými štúdiami. Identifikujeme prípadné nedostatky a navrhujeme možné zlepšenie prevedenia experimentu. Môžeme uviesť aj ďalšie smerovanie experimentov, ktoré by nadviazalo na získané výsledky.

ZÁKLADNÉ PRAVIDLÁ BEZPEČNOSTI PRI PRÁCI

- Pred prácou sa vždy dôkladne zoznámte s princípom experimentu a vlastnosťami použitých chemikálií a mikroorganizmov.
- Pri experimentoch neimprovizujte.
- Nemodifikujte postupy práce bez konzultácie s vyučujúcim.
- Mnohé chemikálie sú, alebo by potenciálne mohli byť, toxické, mutagénne alebo karcinogénne. Pri práci preto vždy používajte laboratórny plášť a rukavice, v prípade potreby aj ochranné okuliare.
- Používajte ochranné okuliare a plášť pri práci s UV svetlom.
- Mnohé mikroorganizmy sú potenciálne patogénne, nepoužitý materiál preto dezinfikujte autoklávovaním.
- Dodržujte zásady práce s elektrickými zariadeniami.
- Do mikrovlnnej rúry nedávajte kovové predmety.
- Používajte izolačné rukavice pri vyberaní horúcich roztokov a médií z autoklávu, mikrovlnnej rúry alebo termostatu.
- Buďte opatrní pri práci s plynovými kahanmi. Nikdy nenechávajte zapálený plameň bez dozoru. Mnohé chemikálie (napr. alkohol) sú silne horľavé, držte ich preto v dostatočnej vzdialenosti od kahanu. Po skončení práce sa uistite, že je prívod plynu do kahanu riadne uzavretý.
- Neotvárajte veko centrifúgy počas behu rotora.
- Nikdy nenaťahujte roztok do pipety ústami.
- V priestoroch laboratória nejedzte a nepite, rovnako neskladujte jedlo v laboratóriu.

Zoznam nebezpečných chemikálií:

Akrylamid – potenciálne neurotoxický. Po polymerizácii sa jeho toxicita stráca, avšak PAGE gély môžu obsahovať zvyšky nespolymerizovaného akrylamidu, preto s nimi vždy pracujte v rukaviciach.

Dodecylsírán sodný (SDS) – toxický v práškovej podobe. Chráňte sa pred vdýchnutím. Používajte rukavice.

Persíran amónny (APS) – toxický v práškovej podobe. Chráňte sa pred vdýchnutím alebo stykom s pokožkou. Používajte rukavice.

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametyletyléndiamín. Toxický, spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Škodlivý aj pri vdýchnutí. Chráňte sa pred vdýchnutím alebo stykom s pokožkou. Používajte rukavice.

Pred prácou s neznámou chemikáliou si vždy preštudujte jej kartu bezpečnostných údajov. V prípade zasiahnutia nebezpečnou chemikáliou vyhľadajte lekársku pomoc.

REGISTER POJMOV

Agens – látka spôsobujúca daný jav.

Alela – gén má zvyčajne viac foriem. Konkrétne formy génu nazývame alely.

Anabolická odpoveď – odpoveď organizmu spojená so syntézou nových organických látok a tvorbou štruktúr.

Autogamia – samooplodnenie, samoopelenie rastliny vlastným peľom.

Autozóm – chromozóm, ktorý nie je pohlavným chromozómom.

Bakterémia – prítomnosť baktérií v krvi. Krv je normálne sterilným prostredím, preto je výskyt baktérií v nej vždy abnormálnym, život ohrozujúcim stavom pacienta. Odborne je tiež tento stav nazývaný *sepsa*, laikom je však známy skôr pod názvom *otrava krvi*.

Blank – roztok bez vzorky (napr. voda, prípadne iné rozpúšťadlo), ktorý slúži na nastavenie merania spektrofotometra.

Dekapeptid – peptid zložený z 10 aminokyselín.

Detergent – chemická látka, ktorá obaluje a rozpúšťa mastné látky.

Diploid/diploidný stav – organizmus (alebo bunka) s dvomi homologickými sadami ($2n$) chromozómov, ktorý vznikol v dôsledku splynutia buniek s haploidným (n) počtom chromozómov. U človeka majú diploidný stav všetky telové (somatické) bunky, obsahujú 46 chromozómov (2×22 autozómov + 2 gonozómy).

DNA polymeráza – enzým zabezpečujúci syntézu DNA.

Dominancia – funkčný vzťah medzi alelami jedného génu, pri ktorom je dominantná alela nadradená druhej z alelového páru (recesívnej).

Elektroforéza – metóda používaná na separáciu biomolekúl (hlavne DNA a proteínov) v elektrickom poli na základe veľkosti, náboja či väzbovej afinity.

Etiopatogenéza – medicínsky výraz označujúci príčinu a vývoj choroby.

Exón – sekvencia DNA, resp. mRNA, ktorá tvorí kódujúcu časť génu, v procese zostrihu molekuly mRNA sa úseky intrónov vystrihnú z pôvodnej molekuly a úseky exónov sa spoja a prekladajú do výslednej molekuly proteínu v procese translácie.

Expresia – vyjadrenie genetickej informácie vo forme DNA do finálneho produktu, ktorým môže byť RNA alebo proteín.

Fakultatívne anaeróbna baktéria – baktéria schopná rásť v prostredí s kyslíkom aj bez kyslíka.

Fenotyp – vzhľad jedinca, ktorý je výsledkom spolupôsobenia genotypu a prostredia.

Filiálna generácia F_1 – generácia potomkov, potomstvo z kríženia. Číselný index (F_1 , F_2 ...) vyjadruje, o koľkú generáciu po krížení ide (z lat. *filus* = syn a *filia* = dcéra).

Fluorescencia – schopnosť niektorých látok emitovať (vyžiariť) svetlo istej vlnovej dĺžky po ožiarení svetlom inej, tiež charakteristickej vlnovej dĺžky.

Fyziologický roztok – 0,9 % vodný roztok chloridu sodného, obsahujúci 9 g NaCl v 1 litri vody. Jedná sa o izotonický roztok, t. j. s približne rovnakou osmolaritou ako krvná plazma.

Gaméty – zrelé pohlavné bunky obsahujúce spravidla haploidný počet chromozómov.

Genotyp – súbor všetkých dedičných znakov organizmu.

Genóm – celková genetická informácia organely, bunky, resp. organizmu. Tento pojem neoznačuje iba súbor génov, ale zahŕňa aj nekódujúce úseky.

Gén – základná jednotka dedičnosti lokalizovaná na určitom mieste (lokuse) na chromozóme.

Gonozóm – chromozóm určujúci pohlavie jedinca, pohlavný chromozóm (u človeka chromozómy X a Y).

Haploid/haploidný stav – bunka (prípadne celý organizmus), ktorá obsahuje iba jednu sadu (n) chromozómov (iba jeden chromozóm z každého páru). U človeka majú haploidný stav pohlavné bunky, ktoré obsahujú len 23 chromozómov (22 autozómov a 1 gonozóm). Pri rastlinách je haploidný stav charakteristický pre gametofyt a gaméty.

Homogametické pohlavie – jedinec tohto pohlavia vytvára gaméty rovnakého pohlavného typu (napr. u človeka ženy vytvárajú vajíčka vždy len s autozómami a pohlavným chromozómom X).

Homozygot – jedinec, ktorý dostal od rodičov pre určitú vlastnosť rovnaké alely, a preto tvorí vzhľadom na sledovaný lokus len jeden typ geneticky zhodných pohlavných buniek.

Heterogametické pohlavie – jedinec tohto pohlavia vytvára gaméty s rôznymi pohlavnými chromozómami (napr. u človeka muži vytvárajú spermie s autozómami a chromozómom X alebo autozómami a chromozómom Y).

Heterozygot – jedinec, ktorý dostal od rodičov pre určitú vlastnosť rôzne alely, a preto tvorí vzhľadom na sledovaný lokus geneticky rozdielne pohlavné bunky.

Hybrid – potomok kríženia dvoch rodičovských organizmov.

Chelex – suspenzia používaná napr. pri izolácii DNA, obsahuje polystyrénové „guličky“ s kovalentne ukotvenou kyselinou imidoctovou, ktorá viaže dvojmocné ióny kovov (napr. Mg^{2+} alebo Ca^{2+}) a chráni tak molekuly DNA pred degradáciou enzýmami prítomnými v slinách – aktivita týchto enzýmov je totiž na dvojmocných kovoch závislá.

Chiméra – organizmus, ktorý je tvorený bunkami viac ako jedného organizmu. Z genetického hľadiska je chimera tvorená aspoň dvoma bunkovými líniami s odlišnou genetickou informáciou.

Instar – vzrastový stupeň larválneho vývinu hmyzu ohraničený spravidla dvomi zvliekami larválnej kutikuly.

Interkalačné farbivo – farbivo, ktoré sa včleňuje do molekuly DNA medzi jednotlivé nukleotidy.

Intrón – sekvencia DNA, resp. mRNA, ktorá je v procese zostrihu molekuly mRNA vystrihnutá a neprekladá sa teda v procese translácie do molekuly proteínu.

Klon/klonálna populácia – súbor geneticky identických jedincov/buniek, ktorý je odvodený od jedného rodiča/bunky. Klony sa získavajú nepohlavným (vegetatívnym) množením alebo metódami molekulárnej biológie, genetiky a biotechnológií.

Komparatívna fylogenomika – prístup k štúdiu evolučných vzťahov medzi organizmami na základe porovnávania sekvencií DNA.

Letálny – nezlúčiteľný so životom.

Metaloproteinázy – proteolytické enzýmy (enzýmy štiepiace proteíny), ktoré vyžadujú k svojej aktivite kov.

Mozaika – organizmus, ktorý je tvorený bunkovými líniami s rôznou genetickou informáciou.

Oktapeptid – peptid zložený z 8 aminokyselín.

Operón – regulovateľná transkripčná jednotka, ktorá pozostáva z regulačných úsekov (promótor, operátor) a zo štruktúrnych génov, ktorých býva viac za sebou a sú prepisované počas transkripcie spolu; vyskytuje sa u prokaryotov.

Parentálna generácia – generácia rodičov (angl. *parents* = rodičia).

Patogén – najčastejšie mikroorganizmus, ktorý oslabuje organizmus hostiteľa a môže v jeho tele spôsobovať alebo vyvolať ochorenie. Patogénne môžu byť vírusy, baktérie, kvasinky, plesne a parazity, hostiteľa môže predstavovať človek, zvierka, rastlina, alebo aj ďalší mikroorganizmus.

Plazmidová DNA – kruhová (cirkulárna) molekula DNA, ktorá bola objavená pôvodne u prokaryotov, ale vyskytuje sa aj v niektorých eukaryotických bunkách (napr. u kvasiniek).

Polymorfizmus – vo všeobecnosti tento výraz znamená „existencia viacerých foriem“, v prípade polymorfizmu DNA ide o existenciu minimálne 2 variantov istého génu, pričom frekvencia najzriedkavejšej formy nie je menej ako 1 %.

Promótor – úsek DNA s regulačnou funkciou, na tento úsek viaže sa RNA polymeráza alebo iné súčasti transkripčného aparátu.

Recesivita – vzťah medzi alelami jedného génu; alela, ktorá je v heterozygotnom stave potlačená (neprejaví sa fenotypovo), je alela podradená alebo recesívna.

Reciproké kríženie – kríženie, kedy je v jednom prípade nositeľom sledovaného znaku z rodičovskej generácie samček a v druhom prípade je nositeľom daného znaku samička.

Rekombinantná DNA – molekula DNA, ktorá je vytvorená metódami molekulárnej biológie a pozostáva z častí, ktoré sú pôvodne z rôznych organizmov alebo rôznych molekúl DNA.

Repetitívna DNA – označenie pre typ DNA, ktorá pozostáva z opakujúcich sa úsekov DNA s rovnakou sekvenciou.

RNA polymeráza – enzým zabezpečujúci prepis molekuly DNA do RNA počas transkripcie.

Sekvenovanie DNA – metóda určenia presného poradia nukleotidov (A, T, C, G), čiže sekvencie v DNA.

Štruktúrny gén – gén, ktorého produktom je proteín.

Termocyklér – prístroj zabezpečujúci zmenu teplôt v stanovených časoch, využíva sa na polymerázovú reťazovú reakciu (PCR).

Topológia DNA – priestorové usporiadanie molekuly DNA, molekula DNA je v rámci sekundárnej štruktúry usporiadaná do dvojzávitnice, ktorá ďalším nadzávitnicovým stočením vytvára superhelix (terciárna štruktúra).

Transkripcia – prepis molekuly DNA do molekuly RNA.

Uniformita – rovnaký genotyp aj fenotyp v F₁ generácii.

Vektor – molekula DNA, najčastejšie kruhová plazmidová DNA, používaná pri technikách rekombinantnej DNA, slúži na prenos genetickej informácie.

Whatman papier – špeciálny typ hrubého filtračného papiera.

Zygota – diploidná bunka, ktorá vznikla splynutím dvoch gamét (oplodnená vajíčková bunka, začiatok nového organizmu).

Sepšiová Regina, Brázdovič Filip, Červenák Filip, Džugasová Vladimíra, Gálová Eliška,
Juríková Katarína, Kyzek Stanislav, Mentelová Lucia, Slaninová Miroslava,
Ševčovičová Andrea, Zeiselová Lucia, Tomáška Ľubomír

Laboratórne cvičenia z genetiky a molekulárnej biológie

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK
Korigovali: autori

ISBN 978-80-223-4555-2