

Molekuly na povel II.

I jediná molekula DNA se hledá mnohem lépe než jehla v kupce sena

ZUZANA STORCHOVÁ

Jan Amos Komenský a možná ještě i Johann Wolfgang Goethe měli to obrovské štěstí, že žili v době, kdy mohli porozumět fungování většiny strojů a přístrojů, jakož i principu používaných pracovních postupů. My naopak žijeme obklopeni spoustou převážně černých a šedivých beden, v jejichž nitru se dějí nepochopitelné věci, a používáme výrobky získané naprosto nejasnými cestami. Když ležel Ignác z Loyoly smrtelně raněn na lůžku, věděl, že buď zemře, nebo přežije, a jednoduché léčení pouštěním žilou či přikládáním náčinků na to nemuselo mít žádný vliv. Lidé tehdy světu kolem sebe rozuměli, a čemu nerozuměli, to bylo v rukou božích. Dnes v nemocnici z několika kapek nejrůznějších tělních tekutin o vás zjistí úžasné informace. Vám to sice nic neřekne, ale spoléháte se, že z toho nějaký odborník vyčte něco důležitého.

Molekulární biologie je také jeden z oborů, který se vymkl z kontroly porozumění daňového poplatníka. Zkusme se ale přece jenom podívat do tyglíků a baněk moderní laboratoře. Třeba se ukáže, že to zas taková hrůza není.

Vyrobte si sondu

Představte si, že máte izolovanou čistou DNA z buněk klokanů. Máte jí hodně, máte dost peněz i času, vhodnou náladu, všechny potřebné přístroje i chemikálie, a chcete zjistit, jestli se v této DNA nachází gen pro skákání buší stejný jako v DNA tarbíka (pevně doufám, že žádný takový gen neexistuje). Pořadí nukleotidů genu *Sbuš* (skákání buší) u tarbíka znáte a celý ten gen máte v ledničce v dostatečném množství (přesněji: ve zkumavce máte několik zcela čistých mikrolitrů destilované vody, v níž snad plavou miliardy molekul). Pokud je gen *Sbuš* u klokanů stejný jako u tarbíka, musí být jednořetězce těchto genů k sobě komplementární, musí spolu vytvářet hybridní tarbíkoklokaní dvouřetězce! Přítomnost genu *Sbuš* u klokanů potvrdíme tedy tak, že prokážeme schopnost nějakého úseku klokaní DNA párovat se s DNA genu *Sbuš* od tarbíka. Jak prostě.

Prvním krokem je příprava sondy, tedy kousku DNA, který nám komplementární molekulu vyhledá a označuje. Sonda bude v našem hypotetickém případě vytvořena z DNA genu *Sbuš* u tarbíka. Tuto DNA ale samozřejmě vůbec nevidíme, tak jako v molekulární biologii nevidíme nikdy nic, s čím pra-

cujeme. Proto ji musíme nějak označit, musíme ji, řečeno publicistickou hantýrkou, zviditelnit. To se nejčastěji dělá dvěma způsoby:

- Do molekuly DNA vložíme radioaktivní nukleotidy.
- Do molekuly DNA vložíme nukleotidy spojené s nějakou velkou, nápadnou molekulou, dobře rozeznávanou specifickými protilátkami. V dnešní době se k tomu velmi často používají nukleotidy s navázaným digoxygeninem, což je látka získaná z náprstníku (*Digitalis*).

Takto označenou DNA už umíme rozeznat. Radioaktivní sonda pochopitelně vyzařuje radioaktivní záření, které zachytíme na citlivý film (stejný jako na rentgenované kosti). Sonda značená digoxygeninem se zviditelňuje složitěji (ale zase nás neozařuje) – nejdříve ji necháme reagovat s protilátkou, a poté přidáme nějakou bezbarvou látku, kterou enzym napojený na protilátku změní na barvičku (obr. 1). Jak říkám, je to trochu složitější, ale není třeba si

ZASE TA KOMPLEMENTARITA

Opakování (Vesmír 77, 257, 1998/5)

V předchozím povídání jsme si řekli, že základní principy většiny metod molekulární biologie jsou velmi jednoduché, založené na fyzikálních a chemických vlastnostech nukleových kyselin. Opakovaně je třeba prohlašovat, že snad nejdůležitější vlastností je komplementarita – doplňkovost molekul nukleových kyselin. Ty jsou vytvořeny řetězci nukleotidů, které se mohou propojit i vzájemně a vytvořit dvoušroubovici – ovšem pouze tehdy, pokud si pořadí nukleotidů vzájemně odpovídá. Protože báze tvořící nukleotidy mohou v DNA vytvořit pouze dvě dvojice – adenin s tyminem a guanin s cytozinem – spojí se spolu dvě molekuly pouze tehdy, sejdou-li se příslušné dvojice vždy naproti sobě.

TGACAGCATTTCAG

ACTGTCGTAAAAGTC je komplementární

CTCGCGGAACCGA není komplementární

Spojení dvou řetězců přes báze jsou relativně slabá a fungují až od většího počtu nukleotidů. Ani síla vazby mezi dvojicemi není stejná – G a C jsou spojeny třemi ručičkami, A a T pouze dvěma. Proto čím delší jsou vzájemně komplementární řetězce a čím více obsahují páry G–C, tím lépe drží u sebe. Někdy dokonce tak dobře, že zůstanou spojeny i při vysoké teplotě, kdy je tepelný pohyb atomů a molekul velký a některé dvouřetězce se rozpadají na jednořetězce. Která ze dvou molekul

AATACGTAATTCACCTAAGAT

TTATGCATTAAGTGATTGTA

GGCGGTATGCAGCTAGCGGTACGTAGGC

CCGCGCATACGTCGATCGCCATGCATCCG

pak asi vydrží déle pohromadě, budeme-li neustále zvyšovat teplotu? No samozřejmě ta dole, neboť je delší a má více párů GC. Ale nic nemá věčné trvání – zvýšíme-li teplotu na 96 °C, nevydrží pohromadě žádný dvouřetězec, i kdyby byl sebedelší a obsahoval jenom páry G–C. Podobně jako na délce a obsahu párů G–C, závisí míra soudržnosti i na homologii – tedy na míře komplementarity. Pokud k sobě dva řetězce dobře pasují, vydrží i pořádné horko. Tak která z molekul vydrží vyšší teplotu?

GCGTAGCTGAGTAGCTA

CGCATCGACTCATCGAT

GCGTAGCTGAGTAGCTA

AGAATCTACTCCTCGCT

Mgr. Zuzana Storchová (*1970) viz *Vesmír* 77, 15, 1998/1

s tím lámat hlavu. Prostě umíme zařídit, abychom i takovouto sondu „uviděli“.

Hledáme molekulu!

Vlastní hledání v genomu obvykle neprobíhá v roztoku, ale na nějakém nosiči. Jednořetězcovou DNA, v níž budeme hledat, přeneseme a uchytíme na nosič, např. na nylonovou membránu. Je velice důležité, aby byla jednořetězcová – chceme přece, aby vytvářela hybridní dvouřetězce se sondou, kterou jsme dodali (mimořadně, podle toho se celému pro-

VYHLEDÁVÁNÍ DNA

1. Označením známé molekuly DNA (např. pomocí radioaktivity) získáme sondu, která nám umožní zviditelnit komplementární úsek prohledávané DNA.
2. Prohledávanou DNA izolujeme a v jednořetězcové podobě přeneseme a uchytíme na nosič (např. nylonovou membránu).
3. K nosiči s prohledávanou DNA přidáme jednořetězcovou naznačenou sondu a necháme inkubovat při teplotě, která odpovídá míře očekávané shody mezi sondou a hledaným úsekem – čím vyšší shoda, tím vyšší teplota, maximálně však používáme 68 °C.
4. Po (většinou celonoční) inkubaci důkladně odmyjeme zbytky nenachytané sondy.
5. Provedeme detekci přítomnosti sondy – na membráně zůstala jenom tehdy (a jen v tom místě), pokud je v prohledávané DNA úsek k ní komplementární. Podobně to lze provést i s RNA.

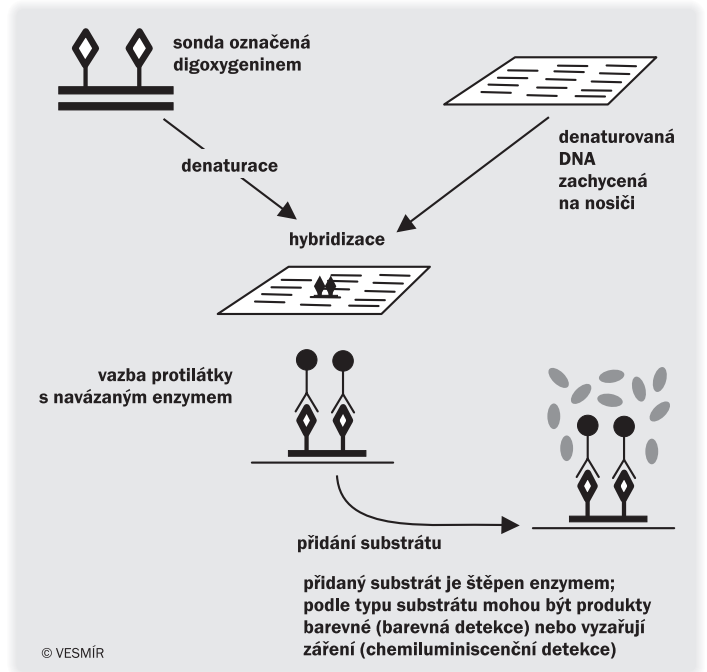
cesu říká hybridizace). Kdyby prohledávaná DNA byla od začátku dvouřetězcová, s žádnou jinou molekulou by se nemohla párovat, protože všechny ručičky jejích nukleotidů by se už někde držely! K jednořetězcové prohledávané DNA uchycené na nosiči přidáme sondu, která musí být také jednořetězcová. Proto sondu před přidáním k membráně 10 minut vaříme úplně stejně jako např. vajíčka před přidáním do bramborového salátu. Membránu se sondou vystavíme – a teď pozor – relativně vysoké teplotě. Používáme takovou teplotu, aby se spojení vytvořilo jenom tehdy, pokud jsou řetězce zcela komplementární. Kdybychom nechali zorky při nízké teplotě, mohla by se naše sonda zachytit i v místě, kde by nepasovala úplně dokonale (a), nebo třeba v místě, kde by sice pasovala skvěle, ale jenom na malém kousku (b).



Proto obvykle celý proces probíhá při 65 – 68 °C, pokud očekáváme naprostou komplementaritu, a při cca 50 – 55 °C, pokud si myslíme, že kousky DNA se přece jenom budou trochu lišit. Nachytávání sondy na membránu probíhá většinou přes noc, protože chceme mít naprostou jistotu, že se všechny molekuly s příslušným pořadím nukleotidů označily. Potom se ovšem musíme zbavit všech molekul nenavázané sondy. Proto membránu několikrát promýváme v řadě roztoků s přísně hlídáním složením a pH. Po dokonalém odmytí pak sondu zviditelníme – provedeme detekci. No, a když na citlivém filmu uvidíme černý flek (obr. 2), tak tam námi hledaná DNA je. A když ho neuvídíme, tak tam buď není, nebo jsme někde v postupu udělali chybu – a můžeme začít znovu.

Sláva hybridizaci

Metodu hybridizace lze využít pro řadu experimentů. Uvedli jsme si příklad, kdy v dosud neprobáda-

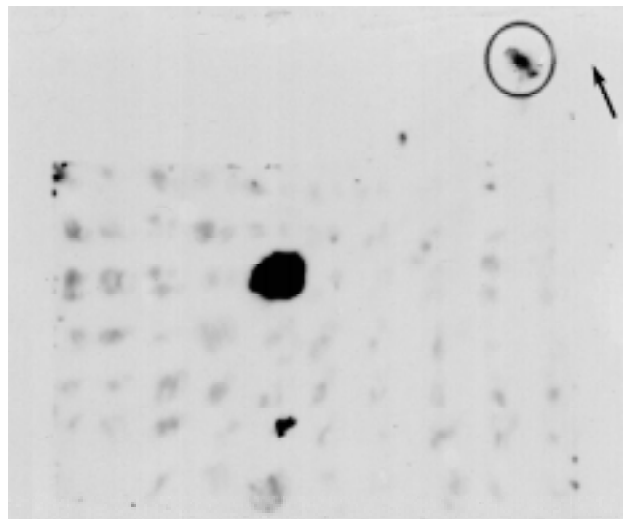


1. Princip detekce sondy značené digoxigeninem

né DNA hledáme nějaký gen známý z jiného organismu. Tak byla objevena spousta genů – jakmile badatelé najdou nějaký gen u myši, hned se podívají, jestli náhodou není také u člověka. Kromě toho podle míry komplementarity, tedy podle teploty, při níž spolu dva řetězce vytvoří dvouřetězec, lze poznat, jak moc jsou si dva kousky DNA z dvou různých organismů podobné. A tak metodu hybridizace používají nejrůznější odborníci k určování příbuznosti až totožnosti druhů (evoluční biologové) nebo k určování příbuznosti až totožnosti jedinců (kromě ekologů a systematiků i forenzní genetiky, to jest ti, co vám mohou přišít otcovství nebo taky vraždu).

Pomocí hybridizace můžeme najít jakýkoliv gen kdekoliv. Vzpomeňte si na příklad z minulého dílu – vyráběli jsme bakterii, která produkovala ve velkém lidský inzulin. Dříve, než se pro takovou bakterii postaví celá továrna, je třeba ověřit, zda v ní příslušný gen skutečně sídlí. To zjistíme tak, že v DNA bakterie specifickou sondou vyhledáme gen, který výro-

2. Černý flek na filmu je toužebně očekávaný pozitivní signál. Hledaná DNA je ve vzorku! Když se ovšem podíváte, kolik vzorků bylo testováno (ty slabší šmouhy okolo), zjistíte, že tentokrát experimentátor příliš úspěšný nebyl. Vpravo nahoře je označena kroužkem pozitivní kontrola a hned vedle šipkou kontrola negativní (snímek autorka).



bu inzulínu zajišťuje. Bakterie samy takový kousek DNA nemají, takže pokud získáme na filmu černý flek, je jasné, že se přenos genu zdařil.

Metoda hybridizace nukleových kyselin však zdaleka neslouží jenom k vyhledávání určitého úseku DNA. Lze ji použít například jako metodu k určení relativní míry podobnosti dvou různých DNA. To se dělá tak, že se vezme DNA dvou různých organismů a po denaturaci, tedy v jednořetězcové podobě, se smísí. Úseky DNA, které jsou komplementární, vytvoří hybridní dvouřetězce. Když pak změříme, kolik molekul zůstalo v jednořetězcové podobě (protože byly odlišné), získáme představu o relativní podobnosti našich dvou testovaných organismů. Když to provedeme s obrovským množstvím dvojic a statisticky zhodnotíme, můžeme získat fylogenetický strom testovaných organismů. Tak byl mimo jiné vytvořen v současnosti používaný systém ptáků (Vesmír 75, 692, 1996).

Hybridizovat lze nejen DNA, ale i RNA. Postup je v podstatě identický, jenom se kolem toho ještě více

navyvádí. RNA je totiž (to už taky víte) poměrně nestabilní a stává se snadnou obětí enzymů. Proto s ní musíme pracovat velmi opatrně, abychom nepřátelům RNA nedali ani tu nejmenší šanci. Pokud tuto zásadu nedodržíme, může být nepřítomnost signálu jenom důkazem naší špinavé práce, a nikoliv objevem zásadního charakteru.

To vše jsou jenom stručné ukázky možností využití techniky hybridizace nukleových kyselin. Stejně jako štěpení a spojování patří i hybridizace k základnímu arzenálu každé molekulárněbiologické laboratoře. Navíc na přelomu 80. a 90. let podnikla vítězně tažení do pracoven systematických zoologů a botaniků, kde však většinou zanechala jenom zmatek. Brzy ji totiž vytlačila jiná, mnohem snáze interpretovatelná a jednodušší metoda, o níž si povíme zas někdy příště. □

Autorka článku spolupracuje na grantu GA ČR 30251/1996. Redakce se omlouvá čtenářům i autorce za chybnou formulaci v souvislosti s grantem, uveřejněnou v minulém dílu.

Vztah k životu a ke smrti

Kritéria duchovního života v jednotlivých civilizacích a nový úděl člověka

VÁCLAV BŘICHÁČEK

JAROSLAV KREJČÍ: *Lidský úděl a jeho proměnlivá tvář*
Duchovní základy civilizační plurality

Praha, Karolinum 1996, 221 stran, cena 125 Kč; náklad neuveden

Profesor Krejčí po řadu let přednášel na Lancaster-ské univerzitě a zabýval se obecnými otázkami společenských věd se zaměřením na rozbor sociálních a kulturních vlivů na lidské myšlení a konání. Vrací se často do Čech a jeho publikace se postupně překládají. Kromě recenzované monografie již vyšly *Dějiny revoluce a Civilizace Asie a Blízkého východu*. Studie o lidském údělu je ucelený, byť stručný pohled na 5000 let sociálního a kulturního vývoje základních civilizačních oblastí lidstva, na jejich vzájemné ovlivňování a střetávání. Pro rozlišování kultur volí Krejčí dvě dimenze: *...postoj ke smrti, tj. jaký je běžný přístup k vypořádání se s touto nezbytnou skutečností, a postoj k životu, tj. obecně sdílené pojetí smyslu života.* (s. 7) Odtud odvozuje pět základních paradigmat lidského údělu, která procházejí, byť i se značnými proměnami, lidskými dějinami a vzájemně na sebe působí. Nejde jen o teoretické postoj, ale i o obecné systémy myšlení a jednání, které se prosazují v životní praxi širokých vrstev lidí dané civilizace. Analyzované systémy vznikaly v pásmu od Středozevního k Čínskému moři. Vědomě J. Krejčí

Kresba © Vladimír Renčín



pomíjí kulturu amerických Indiánů, která zůstala uzavřena do sebe, kultury africké, které nejsou dostatečně probádány, i některé dávnověké civilizace, jejichž písmo není jednoznačně rozluštno. Základní paradigmata:

- **Teocentrismus**, který vznikl v Mezopotámii u Sumerů. Základní pohled je zaměřen na Boha, člověk je na něm závislý a smyslem jeho života je služba Bohu. Odtud pak vede cesta k judaismu, křesťanství i islámu.

- **Tanatocentrismus**, pohled zaměřený na smrt, který se vytvářel v Egyptě faraonů. Smrt je nevyhnutelná, stále přítomná a člověk se na ni jen připravuje – staví pyramidy i vlastní hroby a tím do jisté míry běře do rukou vlastní osud.

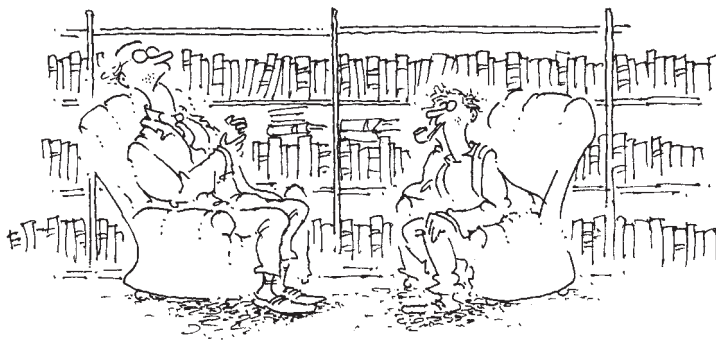
- **Antropocentrismus** klasického Řecka, kde v centru zájmu je člověk a styl jeho života. Bohové jednají v podstatě se stejnou motivací i hodnotami jako lidé.

- **Psychocentrismus** v Indii, zaměřující se na niterný prožitek náboženských a duchovních hodnot. Jde o etické kvality a dodržování starých rituálů. Rein-karnací se život vrací a smrt je nadějná, protože po dobrém životě může být příští život poněkud lepší a bližší ideálu nirvány.

- **Kratocentrismus** čínský, soustředující se na vládu. Základní ctností je synovská poslušnost k otci, úcta k předkům a poslušnost všech k vládci. Vládce přejímá odpovědnost a lidé jej uznávají. Uctíváním předků přežívá jedinec svůj osobní život. Hlavní část monografie je věnována vzájemnému působení jednotlivých civilizací a jejich proměnám. Výklad je stručný, snad až schematický, ale přehledný a dobře čitelný. Čtenář musí přijmout jiné časové měřítko. Z hlediska tisíciletí je jistě 13 let nacizmu v Německu či 40 let komunismu u nás (či 70 let v Rusku) jen malou a nepříliš významnou epizodou, ale z hlediska současníka je to zcela jiná perspektiva. V kapitole o sou-

Doc. PhDr. Václav Břicháček (*1930) vystudoval psychologii na Filozofické fakultě UK v Praze. Řadu let pracoval v Psychologickém ústavu UK. Zabývá se psychologickou metodologií a vývojovou psychologií s aplikací na výchovu ve volném čase (skauting). Je autorem knihy *Skautské putování na stezce životem*, Fons, Praha 1995.

časných alternativách vývoje se Krejčí zaměřuje na nové formy antropocentrismu, které se projevují v pojetí lidských práv, a na nový vývoj kratocentrismu, promítnutého do různých forem sociálního inženýrství, které se výrazně prosadily v marxizmu. Uvažuje o nových cestách islámu, o možnostech i slabinách dnešního Západu (optimismus i rizika po kolapsu Východu, ale i alternativní kultury mládeže), o nutném vzniku ekologického vědomí i o nových náboženských jevech, jako jsou sekty aj. V pozitivním myšlení je sice smrt chápána jako konec individuálního života, ale zároveň jako článek v kontinuitě rodu i širšího společenského žití. Jakési poselství nového údělu člověka, který se Krejčímu rýsuje, je zřejmé z následujícího úryvku: *...chci zdůraznit potřebu vzájemného porozumění těch, kteří ač vycházejí z protichůdných ontologických pozic, dospívají ke shodným názorům na praktický obsah mravních postulátů a kteří odmítají externí pozice. To znamená, že odmítají jak fanatický ateismus, jak jsme jej poznali za vlády komunistů, tak náboženský fundamentalismus, který povýšením své „pravdy“ na pravdu jedinou a samospasitelnou směřuje k negaci hlubší duchovní podstaty svého vlastního poslání. Pokud lze přijmout takovou střední cestu, pak už zbývá jen dodat, že u každého člověka je možno předpokládat nějakou tvůrčí schopnost a rozpoznávání dobra a zla; pěstová-*



MŮJ POHLED NA SVĚT OVLIVNILI HLAVNĚ JASPERS, FROMM, WITTGENSTEIN A KALAJNÍKOV.

Kresba © Vladimír Renčín

ní těchto kvalit je třeba pokládat za jeho povinnost. Na současném stupni vědeckého poznání k tomu přistupuje odpovědnost za životní prostředí a za naši planetu vůbec. Jen v rámci těchto povinností může člověk legitimně uplatňovat svá lidská práva. (s. 191) Krejčího monografie není jednoduché čtení, ale přináší mnoho námětů k zamyšlení, které byly po léta zanedbávány. Užitečná je výběrová bibliografie českých i přeložených publikací, které se vztahují k tématu (sestavil ji Z. Zbořil). □

Uhlovodíky ze dna moře Strach z energetické krize zažehnán?

PETR JAKEŠ

Záznam historie Země lze najít i v usazeninách mořského dna, kde však je skryt lidskému zraku. Proto už více než dvacet let probíhá ve Spojených státech průzkum oceánského dna. Výsledky tohoto tuze nákladného podnikání, viděno očima laické veřejnosti, nejsou právě oslnivé. Ani Blakeův hřbet na jihovýchod od kontinentálních Spojených států (Severní a Jižní Karoliny), do kterého byly umístěny vrty s pořadovým číslem 994, 995 a 997, nesliboval velké překvapení: vodorovně ložené vrstvy a několik horizontů silně odrážejících seizmické vlny.

Vzorky, které byly vytaženy z hloubek 250 až 400 metrů pod oceánským dnem, byly však výrazně porušené a pórovité, přitom k porušení došlo až během vytažování na povrch. Zcela jasně se dalo prokázat, že se z těchto hornin uvolňuje plyn. Metan, silně stlačený v pórech hornin oceánského dna, tu s vodou vytváří sloučeninu, která je za normálních teplot a tlaků nestabilní.

Jako sloučenina byl hydrát metanu vytvořen v laboratoři a je znám již od 19. století. Objev těchto sloučenin na oceánském dně vzbudil v 70. letech pozornost geologů. Svět teprve očekával energetickou krizi a potřeba alternativních zdrojů nebyla tak naléhavá. Navíc se soudilo, že výskyty jsou ojedinělé. Dnešní energetické uvažování jde jinými směry. Vzhledem k tomu, že hlavní složka – metan – je sloučenina snadno hořlavá, mohla by být, za předpokladu dost velkých zásob, využita jako alternativní palivoenergetická surovina. Ve srovnání s dalšími uhlovodíky se metan díky vysokému podílu vodíku a malému podílu uhlíku při hoření spaluje na vodu a poměrně malé množství oxidu uhličitého. Je to tedy sloučenina při pálení „ekologicky vhodná“, nepříliš přispívající skleníkovému jevu. (Metan jako takový však je zhruba desetinásobně účinnějším skleni-

vým plynem než oxid uhličitý.) Hydráty metanu tvoří podle odhadu více než jedno objemové procento hornin v horizontu mezi 250–400 metry hloubky a zásoby této suroviny jen v oblasti Blakeova hřbetu by (podle optimistického odhadu) mohly energeticky nasýtit Spojené státy na příští stovku let.

Další zásoby jsou v ostatních oceánských oblastech v okolí Aljašky, Norska, ale i Japonska. Je to tedy surovina zatím netušeného významu a soudí se, že by metan z těchto zdrojů zdvojnásobil množství fosilních paliv–uhlovodíků (tedy známých ložisek ropy a plynu), a tak by mohl významně přispět k řešení problému palivoenergetických zdrojů. Mohlo by se tedy zdát, že lidé mají s objemem zdroje tak ohromného významu vystaráno. Leč není tomu tak.

Zatímco o fyzikálních a chemických vlastnostech hydrátů metanu v laboratorních podmínkách se leccos ví, přirozené sloučeniny (třeba krystaly této látky) zatím nejsou známy. Z hloubek se je nedaří transportovat. A tak se objevují obavy, že při těžbě by metan mohl unikat do atmosféry. Soudí se, že technicky bude problém získávání metanu i dokonalé ochrany prostředí vyřešen během pěti až deseti let. Není však jasné, jak nákladné zařízení je třeba k získání plynu vybudovat a zda to vůbec bude rentabilní. Neví se, jestli podobné struktury jako v Blakeově hřbetu budou mít podobné vlastnosti, tedy zda tam budou pevnější vrstvy horniny obsahující v pórech stlačený metan.

Prvotní odhady publikované loni v květnu byly silně optimistické a hovořilo se o téměř zažehnaném strachu z energetické krize, článek ve Science koncem září minulého roku už byl skeptičtější. Odhady zásob nejsou tak velké, a navíc technologie získávání budou asi – při dodržení ekologických zásad – přece jen finančně náročné. □