

Molekuly na povel III.

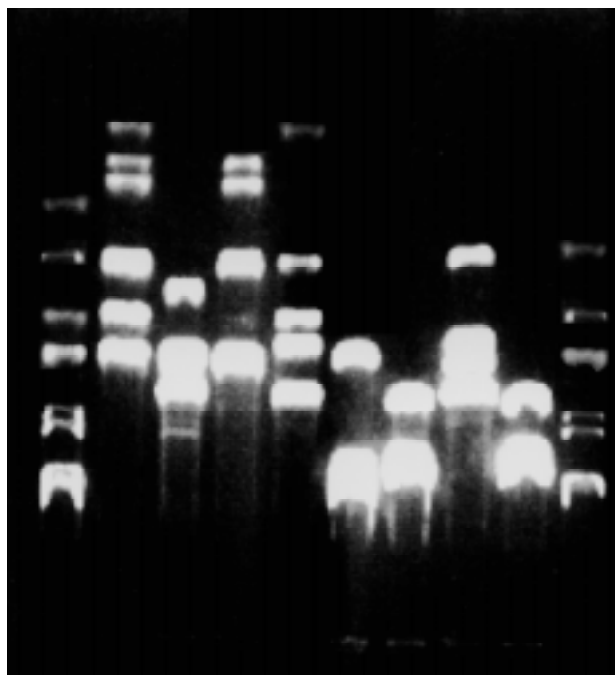
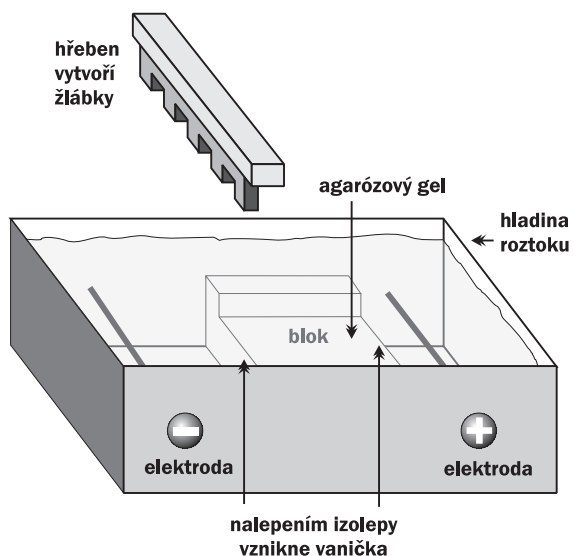
Jak to udělat, aby molekula byla dobře viditelná

ZUZANA STORCHOVÁ

Díky pilné práci novinářů bulvárních i seriózních plátek má běžný občan vcelku vyhraněnou představu o molekulární genetice i o molekulárním biologovi. Každému se snadno vybaví slovní spojení jako kód života, tajemná DNA, klíčová molekula ap. Molekuly nukleových kyselin jsou nepochybně v přírodě velmi důležité a objevy s tím spojené zrychlí tep každému zasvěcenci. Nicméně podobně jako všednodenní život Maty Hari nemusel být nijak zábavný a ona sama mohla být nudná a znučená, o molekulární biologii platí, že každodenní rutinní práce mnoho vzrušení nenabízí. V jedné situaci však zavládne v každé laboratoři hmatatelné napětí – když se snažíme prokázat, že jsme skutečně dospěli ke kůžnému výsledku.

Ona totiž DNA, ačkoliv je molekulou upravdě obrovskou, není běžně viditelná. Pokud s ní tedy něco provádíme, musíme mít předem vymyšleno, jak si výsledek provádění ověřit. Vždycky je to metoda časově i přístrojově náročná a tak nějak hodně za roh. Jako byste přítomnost někoho u vás v bytě zjišťovali měře-

1. Schematický náčrtek elektroforetického zařízení na agarózové gely. Do bločku s chráničky na stranách (díky nimž se vytvoří vanička) nalijeme tekutý gel a vložíme hřeben. Po utužení gelu hřeben vyndáme, odstraníme chránička a vložíme do vaničky mezi dvě elektrody tak, aby povrch gelu byl pod hladinou roztoku. Naneseme vzorek a do platinových elektrod zapojíme stejnosměrný elektrický proud.



2. Na obrázku vidíme proužky DNA vzniklé po restrikci, elektroforetické analýze a obarvení etidiumbromidem. Po stranách jsou naneseny hmotnostní markery, které umožňují určení velikosti fragmentů.

ním otřesů předmětů na kuchyňském stole u souseda. I zde však platí, že základní princip není obtížné pochopit – no, a pak už si jenom vymýšlíme variace.

Zviditelněním svého druhu je vyhledávání pomocí sondy při hybridizaci (viz Vesmír 77, 312, 1998/6). Pokud získáme na filmu černý flek, naše DNA je ve vzorku – vidíme ji tam. Zcela zvláštní typ „vidění“ je prostřednictvím bakterií. DNA vneseme do bakterií

JAK SE DĚLÁ ELEKTROFORÉZA?

Existuje samozřejmě několik možných způsobů. My si povíme jenom o jednom (všechny ostatní jsou do značné míry podobné). Do speciální formy na gely nalijeme roztok a vsuneme do ní tzv. hřeben. Po utužení a vydání hřebene získáme obdélník gelu s jamkami na nanesení vzorku (obr. 1). Roztok DNA s modrou barvičkou (která je také záporně nabitá a ukazuje nám, zda vůbec a jak se záporně nabitě molekuly gelem pohybují) nanese do jamek, zapneme elektrický proud (stejnosměrný) a čekáme. Zatímco my neděláme nic, molekuly nukleových kyselin se proplétají vlákny, dutinkami, komůrkami a jeskyňkami gelu. Čím větší molekula, tím hůře jí to jde, a tak za určitou dobu překoná mnohem kratší vzdálenost než molekula malá, která se dutinkami gelu snadno prosmýkne. A nejen to. Například kruhová, pevně smotaná molekula se pohybuje gelem mnohem rychleji než stejně velká molekula lineární. Zkrátka na gelu se nám jednotlivé molekuly od sebe oddělí buď podle velikosti, nebo podle trojrozměrné struktury. A to je to, co nás zajímá.

a takto upravené buňky vysejeme na médium, kde mohou vyrůst jenom buňky s cizorodou DNA v bříšku. Pokud tedy bakterie vyrostou, je v nich ta správná DNA a díky bakteriím ji vidíme. Odtud pramení ten poněkud přezíravý vztah molekulárních biologů k bakterii *Escherichia coli*, která k takovým účelům slouží. Nejčastějším způsobem, jak si DNA prohlédnout, však zůstává elektroforéza.

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

Hlavně elektřina

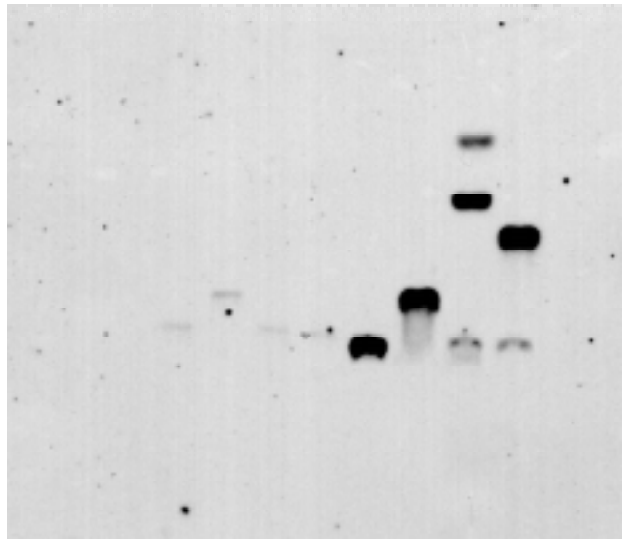
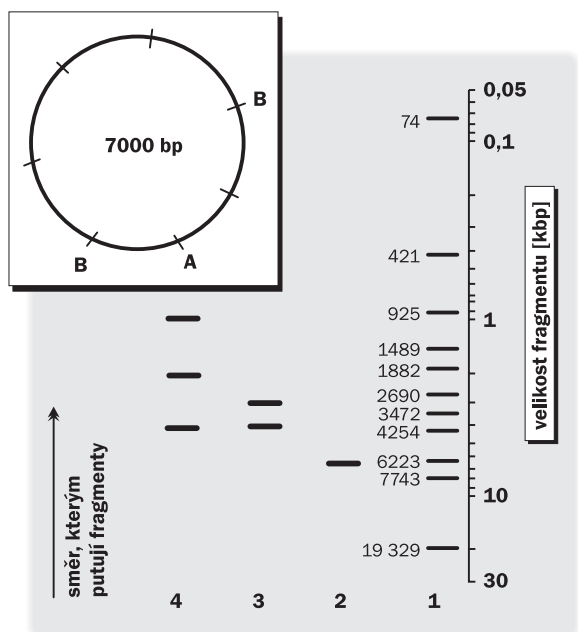
Molekulární biologie, tak jako kterákoli jiná činnost člověka, jede hlavně na elektřinu. Nukleové kyseliny jsou totiž skutečně kyseliny, tedy záporně nabitě molekuly. Za jejich (nemalý) záporný náboj mohou fosfátové spojky mezi jednotlivými nukleotidy. Díky tomu, že jsou negativně nabitě, pohybují se v elektrickém poli stejnosměrného proudu vždy od katody k anodě, tedy od - k +. To samo o sobě ale ještě nestačí. Molekuly nukleových kyselin se nepohybují jen tak ve vodě nebo v nějakém vodivém roztoku. Obvykle je necháme prolézat gelem, který se připravuje například z agarózy nebo z polyakrylamidu.

Elektroforézou molekuly sice rozdělíme, máme je na gelu, ale stejně nic nevidíme. Proto je nutné gel s našimi vzorky obarvit. To se dělá pomocí vmezeřující barvičky etidiumbromidu. Tato barvička se skutečně vmezeří do záhybů dvoušroubovice DNA a zůstane tam poměrně pevně zaklíněna – a pořad ještě nic nevidíme. Teprve když na takto obarvenou DNA posvítíme ultrafialovým světlem, vmezeřená barvička začne krásně oranžově svítit. A svítí jenom tam, kde nějaká DNA je (obr. 2).

Variace na známá témata

Ani bych snad neměla psát, co všechno nám elektroforéza nukleových kyselin umožňuje, aby se vám z toho nezamotala hlava. Nicméně alespoň základní věci. Díky elektroforéze lze poměrně přesně určit velikost molekuly. Máte-li k dispozici molekulu (nebo radši více molekul) o známé velikosti, můžete s její pomocí určit velikost neznámé molekuly. Zhotovíte si kalibrační křivku (pro každý gel je jiná, neboť velice záleží na konkrétních podmínkách elektroforézy),

3. Velmi jednoduchá ukázka, jak se lze pomocí restrikčního mapování alespoň zhruba orientovat v molekule DNA. Kruhovou molekulu naštěpíme enzymem A, enzymem B a oběma najednou. Získané fragmenty rozdělíme na elektroforéze a využijeme také hmotnostního markeru DNA, který poskytuje fragmenty o známé velikosti (dráha 1). Štěpením enzymem A získáme jeden fragment o velikosti 7000 párů bází (dráha 2), zatímco v dráze 3 vidíme, že enzymem B dojde k rozštěpení molekuly na dva fragmenty 3 a 4 kbp (kilobasepár – tisíc párů bází). Současným štěpením oběma enzymy získáme fragmenty 1, 2 a 4 kbp. Kombinací všech dosažených informací zjistíme jediné možné uspořádání restrikčních míst ve studované molekule i její velikost. Toto je samozřejmě velmi jednoduchý případ. V jedné molekule je obvykle restrikčních míst mnohem více.



4. Blotováním a následnou hybridizací získáme úplně jiný obraz než po elektroforéze – na filmu se totiž objeví pouze ty proužky, které nesou námi sledovaný fragment.

kde osa x určuje velikost molekuly a osa y logaritmus překonané vzdálenosti. Z této kalibrační křivky pak odečítáte podle vzdálenosti od jamky i velikost neznámých molekul. Pokud máme nějakou větší molekulu a chceme se v ní alespoň trochu zorientovat, použijeme tzv. restrikční mapování. O restrikcích už víme, že nám mohou každou molekulu DNA rozštěpit na menší fragmenty – pokud v té molekule najdou svá příslušná restrikční místa. Naštěpíme-li si tedy molekulu DNA jednotlivými restrikťázy i kombinacemi několika restrikťáz, a pak naštěpenou DNA proženeme gelem při elektroforéze, získáme obrázek proužků DNA. Odečtením podle kalibrační křivky určíme jejich velikost, součtem velikostí všech fragmentů zjistíme celkovou velikost molekuly a vzájemným kombinováním štěpů jednotlivými restrikťázy i kombinací restrikťáz získáme celkový obraz o místech pro jednotlivé enzymy na molekule – vytvoříme restrikční mapu (obr. 3). Ta nám pak poskytuje základní orientaci pro danou molekulu.

Elektroforéza nám od sebe oddělí jednotlivé fragmenty molekul nukleových kyselin. Tyto fragmenty můžeme z gelu izolovat a dále s nimi pracovat. Elektroforézou (ve zcela speciálním uspořádání) můžeme analyzovat i celé chromozomy. Také můžeme provést elektroforézu RNA. S tím si prostý výzkumník užije pořádný kus legrace, protože, jak už víme, RNA je třeba tvrdě bránit před RNázami.

Elektroforeticky můžeme analyzovat i proteiny. Tam je to ovšem trochu složitější. Na rozdíl od nukleových kyselin nemají bílkoviny vyhraněný elektrický náboj, ale jejich celkový náboj záleží na aminokyselinovém složení. Některé buněčné bílkoviny jsou tedy pozitivně nabitě, jiné negativně, některé více, jiné méně. Jejich pohyb gelem není určen pouze velikostí, ale i nábojem. Pro některé typy analýzy to vůbec nevádí, ale někdy to je velká nevýhoda. Lze ji ovšem odstranit tak, že elektroforézu proteinů provedeme v nadbytku látky sodiumdodecylsulfátu (SDS). To je taková celkem nezajímavá molekula, záporně nabitá, s dlouhým, dvanáctiuhlíkatým ocáskem. Jakmile potká nějakou bílkovinu, tak se na ni namotá. Tím na ni ovšem přenesení i svůj záporný náboj, takže nám odpadne starost s rozdílným nábojem bílkovin a ty se při elektroforéze za těchto podmínek dělí jenom podle velikosti. Takto upravené bílkoviny pak proženeme polyakrylamidovým gelem, fixujeme, obarvíme – a už je vidíme!

Nejúžasnější věci však zjistíme kombinací všech nám dosud známých metod. Můžeme například naštěpit DNA různými restriktázami a vzorky analyzovat elektroforézou. DNA se rozdělí podle velikosti a my ji z gelu přeneseme na membránu pomocí kapilárních sil v procesu, jenž se česky (roztomile staromilecky) jmenuje přesávka, ale v laboratorní hantýrce mu nikdo neřekne jinak než blotování. DNA přenesenou na membráně (a během přenosu denaturovanou) pak hybridizujeme se sondou vyrobenou podle nějakého fragmentu, který v naší molekule musí být. Díky tomuto postupu získáme nejenom restriktční mapu, ale i přesnou lokalizaci nějakého

pro nás zajímavého fragmentu v analyzované molekule (obr. 4). Nebo izolujeme veškerou buněčnou RNA, proženeme ji gelem, přeneseme na membránu a hybridizujeme se sondou vytvořenou podle sekvence nějakého úplně konkrétního, pro nás zajímavého genu. Získáme-li potom na filmu černý flek, znamená to, že v buňkách je přítomna RNA vytvořená podle onoho genu, a tedy nejenže je v genomu gen přítomen, ale navíc je i aktivní, tedy vytváří se podle něj mRNA (a zřejmě i bílkovina). Ale hlavně je elektroforéza opravdu jediná metoda, která umožňuje snadno a rychle vidět studovanou molekulu. A to není málo. □

PIERCE J. HOWARD: Příručka pro uživatele mozku

(z originálu „The owner's manual for the brain“ přeložil František Koukolík), nakladatelství Portál, Praha 1998, 400 stran, náklad neuveden, cena 329 Kč

P. J. Howardovi se podařil husarský kousek. Není odborník v kognitivní vědě ani v jiných vědách o mozku. Je manažer. Přesto zvládl principy kognitivní vědy natolik, že o ní napsal knihu. Protože je Američan, který dobře zná většinu svých bližních a ví, jaký je jejich vkus, je kniha praktická příručka. K americkým příručkám tohoto druhu bývá nedůvěřivý. Přestože jsem teoretik a nadto Evropan, P. J. Howard mou nedůvěru překonal. Příručku jsem přeložil. Je to chytrá, veselá a čtivá knížka. Nejsilnější je v místech, o nichž jsem mylně předpokládal, že budou nejslabší. Autor jim v knížce vyčlenil prostor nadepsaný *Užití*. Mluví o tom, k čemu jsou informace kognitivní vědy dobré v našem praktickém každodenním životě. Kniha má šest částí.

- *Chcete rychle pochopit, jak pracuje mozek?* pojednává o posledních novinkách kognitivní vědy. Stručně a jasně vysvětluje stanovisko k tak spleťtému vztahu, jakým je vztah mozku a vědomí. Jsou v ní i základní pojmy popisující principy stavby a činnosti mozku.
- *Váš osobní almanach* vypráví o tom, jak mohutně je tělo ovlivňováno vědomím. Obsahuje kouzelnou kapitolu o tom, jak se dá vyjít s druhým pohlavím. Další kapitoly mluví o stárnutí, výživě, spánku. Významné jsou informace o leváctví a praváctví.
- *Vztah mozku a osobnosti* se zabývá vrozenými a získanými vlastnostmi, osobnostními rysy a psy-

chobiologií emocí. Obsahuje kapitolu o třech pohledech na inteligenci.

- *Vztah lidí a jejich zaměstnání* je pravděpodobně nejpraktičtější část. Zdůrazňuje výhody optimistického pohledu na svět. Vysvětluje stres a syndrom vyhoření, zabývá se postupy umožňujícími stres každodenně zvládat. Významná je část pojednávající o ergonomice.
- Část nabízející praktické postupy, jak lépe pracovat s učební látkou, využijí zejména studenti, učitelé a rodiče. Dovědí se toho dost i o paměti a učení. Cenné jsou kapitoly o tvořivosti, například jak se dá pěstovat nebo naopak ubít.
- Závěrečná část se zabývá vztahem kognitivní vědy a filozofie. Cenná mi připadá kapitola o vývoji poznávání, nazvaná *Každodenní epistemologie*. Málokde je srozumitelněji podán výklad Kuhnova paradigmatu.

Kniha je určena širokému čtenářskému okruhu. Český čtenář si bude muset nejprve zvyknout na povinnou dávku amerického optimizmu. Snad to bude vyváženo tím, že autor dokázal k svým tvrzením zaujmout rozumný odstup, občas i s humorem. Pod ikonou *Varování čtenářům* stojí nápis: Spolknete-li všechno, co je v této knize napsáno, může vás to ohrozit na zdraví.

Knížka na zdraví neohrožuje. Naopak. Čím větší počet lidí by byl schopen dodržovat alespoň některá z pravidel uvedených v *Užití* pod jednotlivými kapitolami, tím lépe.

František Koukolík

PROTOKOL SEPSANÝ K VOLBĚ UČITELE Z 18. STOLETÍ; ZNÍŤ TAKTO:

Ježto po smrti dosavadního učitele jen pět uchazečů se přihlásilo, předsevzata s nimi zkouška před očima a ušima celé obce v kostele, potom dále zkoušení byli na faře.

1. *Martin Oves*, zdejší švec, 30 let starý, zpíval v kostele tři písně; ale měl by se učit ještě mnohé melodie, také hlas jeho mohl by býti lepší. Četl z knihy obstojně, a slabikoval jakž takž. Tři rukopisy četl prostředně. Zodpovídal tři otázky z rozumu dosti dobře. Recitoval z katechismu o svátosti oltářní bez chyby. Napsal tři řádky diktanda – 4 chyby. Počtů jest úplně neznalý.

2. *Jakub Maučka*, tkadlec z D., má padesátku za zády; zpíval tři písně, ale melodie přecházela do mnoha jiných písní, hlas měl by míti silnější, vícekrát vykvikl, což by nemuselo býti. Četl Jana 19, 1 – 7 s deseti chybami, slabikoval Jana 18, 23 – 26 bez chyby. Tři rukopisy četl – slabě a zajíkal se. Z rozumu tři otázky zodpovídal dobře. Z katechismu recitoval bez chyby. Diktanda napsal tři řádky – 5 chyb. Počtů také neznal.

3. *Václav Senohrad*, krejčí z S., stařec šedesátiletý, měl raději zůstat doma. Zpíval dvě písně; hlas má jako

bečící tele, také stále upadal do melodií jiných písní. Četl z Josua – hrozně, slabikoval s velikým namáháním; velké T mu bylo kamenem úrazu. Z rozumu tři otázky – zůstal na holičkách. Maje čísti tři rukopisy, přiznal se, že neumí. Z diktanda napsal velmi obtížně tři slova – k nepřčtení. Počítati neuměl docela nic; počítal na prstech jako malé dítě. Bylo mu řečeno, že jednal zpozdile, hláse se k probě, což sám slze a vzlykaje uznal.

4. *Jan Sejkora*, kotlár zdejší, padesátník, zpíval tři písně dobře. Četl a slabikoval Genesis 10, 13 – 18 dobře. Při katechismu zpozorováno, že v některých částech se nepocvičil. Diktanda napsal 3 řádky – ušlo to, pokud týče se písmen, ale udělal 10 chyb. Z počtů znal jen addici.

5. *Jan Vojtů*, poddůstojník z N.; ztratil v bitvě nohu, 45 let starý, zpíval tři písně dobře, má silný hlas, ale melodie chyběla. Tři rukopisy četl hbitě. Četl a slabikoval z Genesis 10, 13 – 18 obstojně. Katechismus uměl dobře. Čtyři otázky z rozumu – tak tak. Diktando 3 řádky, ale 8 chyb. Z počtů znal addici a trochu subtrakce.

Protože Jakub Maučka vždy „bonae famae“ byl a přímiluvčích mnoho měl, obdržel místo.

Ze sborníku *VIII. seminář o filozofických otázkách matematiky a fyziky*, Brno 1997