

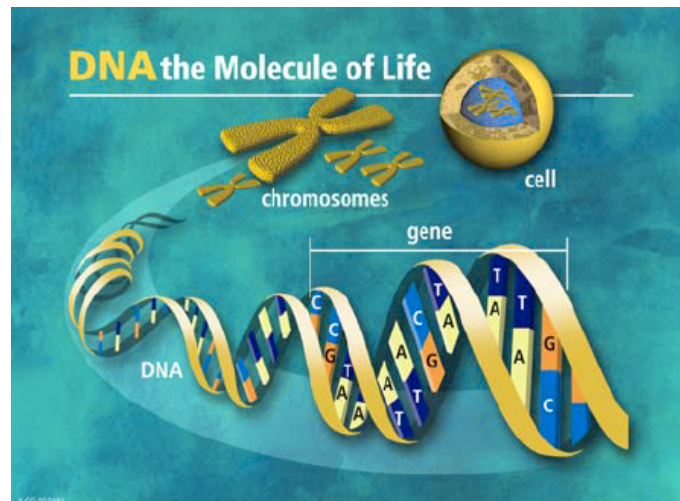
## Namísto politiky trošinku genetiky....

### ..... aneb opáčko z biologie nikoho nezabije :o) !

Tak, jako jsou pro fyzika základní stavební jednotkou hmoty atomy, pro biologa se vše točí kolem buněk, či jediné buňky. Možná právě to je jednou z mála věcí, které uvíznou v hlavách dětí i lidí nebiologických profesí z hodin biologie. Někteří si možná i vzpomenou, že podle toho, kolik buněk tvoří tělo určitého organismu, dělíme organismy na jednobuněčné (kdy jedna jediná buňka je zároveň i samostatným organismem, např. prvoci nebo kvasinky) a mnohobuněčné (tady si jistě každý doplní sám svého oblíbeného tvora nebo rostlinu). Mnohobuněčné organismy vypadají různě. Všechny však mají společné, že se buňky jejich těl specializovaly pro určité úkoly, a vytvořily tak orgány a orgánové soustavy. Specializace přitom může být poměrně "volnější", kdy jsou buňky i po oddělení od svého organismu schopny relativně samostatné existence v tzv. tkáňových kulturách, nebo je naopak specializace velice silná a buňka po oddělení zakrátko umírá (což je jeden z důvodů kvaltování s orgánem pro transplantaci).

Studenti prvních ročníků biologických oborů obvykle začínají svá studia přednáškami z předmětu Buněčné biologie, jež je dosti často "postrachem neviňátek". Tento předmět je provede nejen tím, jak buňky vypadají, ale zejména složitými vnitřními biochemickými procesy, které buňce dávají její výsadní postavení. Těch procesů je samozřejmě spousta, ale zase mají jedno společné – vše je totiž řízeno tím, co je vtipně schováno a kódováno ve struktuře jedné dlouhé molekuly, a to kyseliny deoxyribonukleové čili DNA (anglicky je kyselina "acid", proto zkratka končí A, ve starší české literatuře se užívá i DNK). Každou molekulu DNA bychom mohli rozstříhat na jednotlivé geny, což jsou kousky, co právě "kódují" všechny naše vlastnosti – tedy všechno to, co z nás dělá jedince druhu *Homo sapiens sapiens*, ale i jemnější vlastnosti jako barvu očí, tělesnou výšku, krevní skupinu i nadání pro hudbu či sport. V praxi to znamená, že pokud někde najdeme buňky obsahující dostatečně zachovanou DNA, jsme schopni pomocí laboratorních metod zjistit, z jakého organismu buňka pochází – tedy je-li lidská, psí, tabáková nebo jde o kvasinku. V případě buňky lidské bychom s největší pravděpodobností mohli zjistit i pohlaví původce a jeho etnickou příslušnost, také zda netrpěl nějakou geneticky podmíněnou chorobou.

DNA buněk se nachází v útvaru zvaném jádro (to je na obrázku nahoře modrý vnitřek žluté kulaté buňky), a obvykle bývá prostorově uspořádána do útvaru připomínajícího frankfurtský párek, kterému říkáme chromozóm (na obrázku žluté mašličky). V něm je vlákno DNA pokroucené a oplácené proteiny, takže je kompaktní a relativně stabilní – k rozmotání dochází jednak při zdvojování tohoto vlákna při buněčném dělení, nebo během tzv. transkripce, kdy je pomocí jiné molekuly (RNA) informace z DNA „opsána“ a předána k dalšímu zpracování.



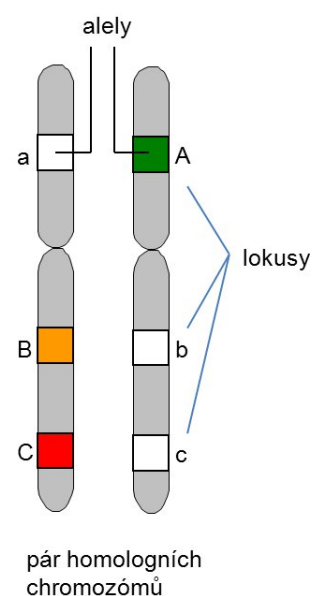
Každý člověk pravděpodobně má nějaké povědomí o existenci genů, i to, že jsou předávány z rodičů na potomky a že jsou nějakým způsobem odpovědné za fyzické znaky. Nejjednodušší definice genu se vlastně dá formulovat takto – gen je dědičný faktor podmiňující nějaký znak. Každý gen přitom může mít různé varianty, nazývané alely. Geny na chromozómu zaujímají určitou “topografickou” pozici zvanou lokus. Různé znaky (např. barva očí a barva vlasů) jsou podmíněny geny nacházejícími se na různých lokusech, velice často jsou i na různých chromozómech. Teď by asi bylo vhodné prozradit, že i počet a tvar chromozómů je do určité míry důležitou informací, neboť i v tom se mezi sebou druhy živočišné a rostlinné liší. Nicméně, počet chromozómů nijak nesouvisí se složitostí nebo evoluční “vyspělostí” organismu (uvozovky jsem použila proto, že “vyspělost” je naprosto lidské hledisko, a přírodě je takové nálepkování zcela cizí).

No a tím začíná ta legrace, protože člověk (ale nejen on) je tvor tzv. diploidní, protože má všechny chromozomy párové – jeden chromozom byl zděděn po matce, druhý, z téhož chromozómového páru, po otci. Toto je zajištěno během tvorby pohlavních buněk (čili gamet), spermií a vajíček. Každá pohlavní buňka má totiž jen po jednom chromozómu z každého páru (ke snížení počtu chromozómů dojde během specifického způsobu buněčného dělení zvaného meióza, ale o detailech snad někdy jindy...), a tak při splynutí spermie a vajíčka do zárodku nového jedince je opět obnoven párový počet. Pokud by ke snížení počtu během vzniku gamet nedošlo, tak by zárodek obsahoval chromozómů více, jeho potomek ještě více a tak dál, až by se už nic jiného do buněk nevešlo. Příroda se proti tomu pojistila tím, že pokud k něčemu podobnému náhodně dojde, je takový jedinec ve většině případů z dalšího rozmnožování vyřazen. Příkladně kvůli neplodnosti, u lidí jsou pak takovou mutací podmíněna mnohá onemocnění projevující se řadou vrozených vad – od srdeční nedostatečnosti, přes metabolické poruchy, až po demenci – a někdy stačí i jen jeden přebývajících či chybějících chromozóm.

Člověk má 23 chromozómových párů, přičemž 22 párů má jednu společnou vlastnost – když se podíváme na dva chromozomy téhož páru, budou mít každý gen na “topograficky” stejném místě, takže se do určité míry chromozomy jeví jako totožné (a říká se jim homologní). Výjimka jsou chromozomy pohlavní (tedy 23. pár), známé jako X a Y, kdy ženy mají pár shodný (XX), muži neshodný (XY). Ale nemusí tomu tak být pokaždé, jsou i zvířata, u kterých má rozdílné pohlavní chromozomy samička a sameček má naopak chromozomy stejné – např. většina ptáků a plazů. A třeba ptakopyskové mají v určení pohlaví pomocí chromozómů neuvěřitelný guláš, pohlavních chromozómů mají deset, a ještě k tomu potřebují další gen z jiného chromozómu. Prostě nic není jednoduché :o)

Ale zpátky k těm “totožným” chromozómům. V praxi to znamená, že každý gen máme v buňce vlastně dvakrát, tedy máme dvě alely téhož genu. Tyto dvě alely mohou být buď shodné (homozygotní) nebo různé (heterozygotní). Soubor alel určitého jedince se pak označuje jako jeho genotyp a projev genotypu

“navenek” (tedy to, jak dotyčný jedinec vypadá) jako fenotyp. Genotyp ovšem nelze ve většině případů jednoduše stanovit. Obě alely každého genu spolu určitým způsobem spolupracují, a ve fenotypu se



projeví výsledek této spolupráce. Označení alel se vlastně odvíjí od toho, jak moc se na fenotypu projeví, i od toho, jak se chovají vůči sobě navzájem. Alela, která se projeví za všech okolností, se nazývá dominantní, naopak alela, která se projeví jenom někdy a za specifických okolností, je recesivní. Alely se však mohou projevít stejně a jsou pak kodominantní nebo v různé míře neúplné dominance... Je toho hodně, protože i geny mezi sebou mohou spolupracovat – no propletenec k pohledání. Přitom je nutné mít pořád na paměti, co je genotyp, a co fenotyp.

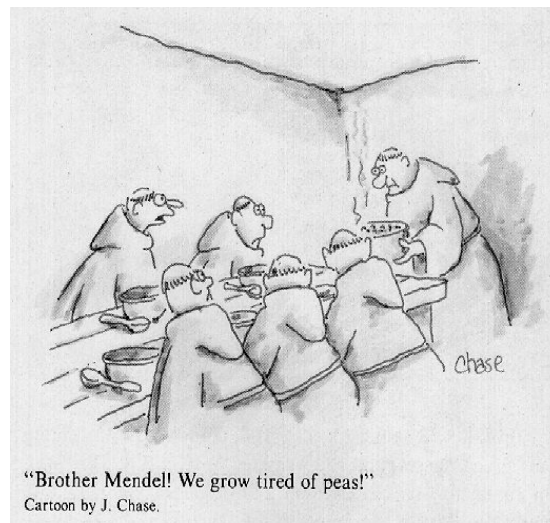
Následující obrázek snad pomůže tyto termíny i vztahy objasnit. Žluté útvary na obrázku znázorňují chromozómový pár, zelená úsečka představuje gen pro barvu kožíšku, sameček je v angličtině “male” (jeho gamety, spermie, poznáte podle ocásku), samička je pak “female”. Barva kožíšku je v tomto případě podmíněna kombinací dvou alel – dominantní  $B$  způsobuje černé zbarvení a recesivní  $b$  zbarvení hnědé. Myšky mohou mít tři různé genotypy –  $BB$  a  $bb$  jsou homozygoti, zatímco  $Bb$  bude jedinec heterozygotní. Z hlediska fenotypu to ale vypadá následovně:  $BB$  je myška černá,  $Bb$  také černá a jen  $bb$  je myška hnědá, čili fenotypové varianty jsou jenom dvě. Dále je důležité si uvědomit výše zmiňovanou skutečnost – gamety vznikají buněčným dělením, kdy se chromozómové páry “rozpůlí”. Takže to znamená, že pokud má rodič pro určitý gen dvě různé alely, polovina jeho gamet ponese alelu prvního typu, zatímco druhá polovina bude mít alelu typu druhého.

Obě rodičovské myšky mají heterozygotní genotyp  $Bb$ , přitom se shodují i ve fenotypu, neboť černá alela  $B$  je dominantní nad recesivní hnědou  $b$ . V jejich pohlavních buňkách bude vždy polovina nést alelu  $B$  a druhá polovina alelu  $b$ . Potomstvo těchto myších rodičů na tom ale bude trochu jinak. Pokud spolu mají spoustu myšátek, pak u nich můžeme vzhledem k tomuto znaku pozorovat přesné matematické podíly, jejichž odvozování se s radostí zabývají statistici a milovníci teorie pravděpodobnosti. Co nám říká tabulka na obrázku výše je zhruba následující: jestliže spermií s alelou  $B$  je jedna polovina (z celkového počtu spermií) a vajíček s alelou  $B$  také jedna polovina (z celkového počtu vajíček), pak pravděpodobnost jejich setkání v novém zárodku, respektive očekávaná četnost skutečných zárodků s kombinací alel  $BB$ , je rovna součinu původních četností odpovídajících si gamet, tedy jedné čtvrtině. Totéž platí i pro zárodky s ostatními kombinacemi alel, tedy  $Bb$ ,  $bB$  a  $bb$ . Z hlediska genotypu tedy bude  $\frac{1}{4}$  mláďat  $BB$ , polovina shodně s rodiči  $Bb$  (ted' už je jedno, od koho dostali kterou alelu, takže počet  $Bb$  a  $bB$  se sečte), a poslední  $\frac{1}{4}$   $bb$ . Ovšem z hlediska fenotypu je díky dominanci  $\frac{3}{4}$  mláďat černých (tedy všichni nositelé alespoň jednoho  $B$ ) a  $\frac{1}{4}$  jsou myšky hnědé (pouze ty, kterým  $B$  chybí). Zkráceně řečeno, potomstvo dvou heterozygotních rodičů bude mít genotypy v poměru  $\frac{1}{4} : \frac{1}{2} : \frac{1}{4}$ , neboli 1:2:1, zatímco pro fenotypy bude platit  $\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ , čili 3:1.

Pokud by ovšem alela  $B$  byla neúplně dominantní, tak by heterozygoti  $Bb$  byli černohnědí a genotypové podíly by se rovnaly podílům fenotypovým. Také se ovšem může stát, že alel pro barvu kožíšku je pro daný gen více – třeba  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ , atd., ale jedinci si nesou vždycky jen dvojici (třeba  $B_1B_2$  nebo  $B_1B_3$ ), a tato matematika zůstává pořád víceméně stejná.

Nyní bych měla připomenout genialitu opata Gregora Mendela, neboť právě on na základě svých pokusů a pozorování dospěl k názoru, že dědičnost znaků (resp. vloh) podléhá výše naznačeným matematickým pravidlům – a to přitom neměl o existenci alel, chromozómů či DNA ani potuchy. Nicméně se mu podařilo najít u hrachu takové znaky (bylo jich celkem 7 jako trpaslíků, barva a poloha květu na

stonku, barva a tvar semen, barva a tvar lusku, délka stonku), u kterých jsou alely v podobně jednoduchých vztazích, takže po neuvěřitelném množství experimentů s křížením a počítáním potomstva (odhaduje se to na cca 30,000 rostlin!!!) došel k oněm fenotypovým a genotypovým podílům, dokonce i k tomu původnímu pravidlu, že se alely do pohlavních buněk rozcházejí v poměru 1:1. Škoda, že se nikdy nesetkali s Darwinem, i když snad při své návštěvě Anglie o to Mendel usiloval, neboť velkou slabinou Darwinovy evoluční teorie byla právě neznalost zákonů dědičnosti. Darwin se domníval, že se sice vlastnosti po rodičích dědí, ale přitom dochází k jejich "průměrování". Ono to dokonce pro některé komplikovanější vlastnosti i zdánlivě platí (například výška člověka), ovšem bráno do důsledků by to znamenalo, že všechno živé skončí pěkně unifikovaně průměrné... a bylo by po evoluci. Mendelova práce tak zůstala zapomenuta "na polici", neboť ji navíc napsal celou německy, a tak ji mnozí anglicky mluvící biologové číst ani nemohli (tehdy se ještě tolik nenosilo umět více než jeden jazyk, zejména když ten váš rodný byl jazykem světového impéria). Až po několika dekádách se biometrik a statistik R. A. Fisher Mendelova díla chopil s patřičnou vervou a rozpracováním oněch pravidel a širší biologickou aplikací pomohl založit nový obor – populační a evoluční genetiku. No a to je vlastně "oslí můstek" k tomu, s čím se dnes může setkat každý člověk – tedy s použitím těchto kouzel v klinické genetice nebo forenzní vědě. Tyto obory se totiž zabývají tím, jak často se která alela určitého genu vyskytuje v určitém lidském společenství (jemuž říkáme odborně populace).



Tady je však nutné zmínit ještě jedno poměrně jednoduché pravidlo, kterému se po jeho objevitelích říká Hardyho-Weinbergova rovnováha. Ti dva si totiž (nezávisle na sobě) všimli, že pokud má populace sledovaného druhu určité vlastnosti, pak se četnosti alel z generace na generaci nemění, a navíc se jejich vztah k četnostem genotypů dá popsat binomickým rozvojem. Což asi zní opět strašlivě, ovšem není to nic záludného. Na úvod se můžeme vrátit k jednomu genu, který má jenom dvě alely – může to být třeba zase ona barva kožíšku. Pro názornost alelám přisoudíme vztah neúplné dominance, abychom na první pohled dokázali říci, jestli je myška homozygot nebo heterozygot. Tentokrát nás však tolik nezajímají myšky jako jednotlivci, ale jako celá myší populace, která se nám prohání na širých lánech za naší zahradou. Dáme si tu práci a zjistíme, že alela  $B$  se vykytuje s četností  $p$ , zatímco alela  $b$  má četnost  $q$ . Četnosti v tomto případě preferujeme relativní, takže pro ně platí vztah  $p + q = 1$ .

Noooo, dobrá, vezmu to pomaleji. Pochytám všechny ty malé potvory, dejme tomu, že jich bude právě 100. Nejdřív okometricky zkontroluji, že myšky mají jen předpokládané barvy, tedy ve vzorku mi neběhají zmutovaní albíni či jiné podivnosti. A pak vezmu tužku a papír, a zaznamenávám následující: černých ... 40, černohnědých ...40, hnědých (bacha, koušou nejvíc !!!) ... 20. Tak jo, ale to jsou fenotypy, a každá myš má dvě alely, takže začneme dělit a počítat:

40 černých myší je genotypově  $BB$ , tedy alel  $B = 80$  a žádná  $b$

40 černohnědých je  $Bb$ , tedy alel  $B = 40$  a taky alel  $b = 40$



20 hnědých myší je  $bb$ , tedy alel  $b = 40$  a žádná  $B$

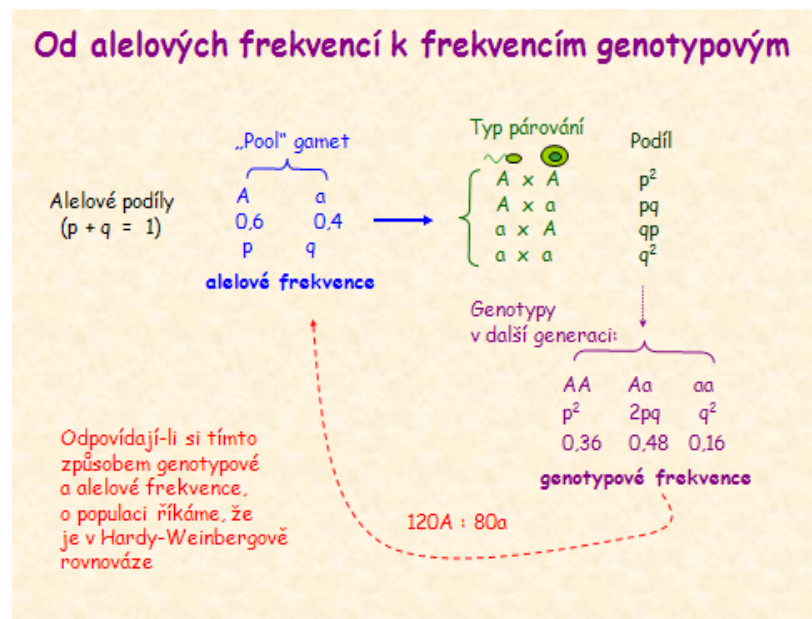
Sečteno a podtrženo, stovka myší má celkem 200 alel, z toho 120  $B$  a 80  $b$  (opět předpokládám tuto standardní situaci, tedy žádná nová alela  $b'$  !!!) Tahle čísla jsou četnosti absolutní, relativní dostaneme vydělením celkovým počtem alel, takže četnost  $B$  je  $p = 120/200 = 0,6$ , no a podobně četnost  $b$  je  $q = 80/200 = 0,4$ . A tedy platí  $p + q = 1$ . Tak vidíte, že to není těžké :o).

Hardyho-Weinbergův zákon nám tedy říká, že pokud se budou myšky vesele a nerušeně dále množit, pak když svůj pokus zopakujeme i v dalších letech, dojdeme ke stejným hodnotám  $p$  a  $q$ . Mno, to ale ještě není celé, ještě říká následovně: "Genotypové frekvence (četnosti) genu se dvěma různými alelami jsou binomickou funkcí alelových frekvencí." To zní asi hodně ošklivě, ale zapsáno pomocí matematického vzorce (binomický rozvoj) je to jednoduché:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Kdo měl rád algebru, tak si na ten vzoreček určitě vzpomene. (Pozn. laskavého korektora – čtverec součtu se nerovná součtu čtverců). Ve výrazu na pravé straně pak platí, že  $p^2 = P$  je četnost genotypu  $BB$ ,  $2pq = H$  četnost genotypu  $Bb$  a  $q^2 = Q$  četnost genotypu  $bb$ . Takže se ten vztah dá zapsat i následovně :  $(p + q)^2 = P + H + Q$ , a protože  $p + q = 1$ , tak musí platit, že také  $P + H + Q = 1$ . To je samozřejmě v pořádku, neboť  $P$ ,  $H$  a  $Q$  jsou relativní četnosti. Komu to pořád nějak vrtá v hlavě, může si promyslet následující biologickou situaci:

V naší myší populaci nastal čas páření, což znamená, že je vytvořeno ohromné množství pohlavních buněk (gamet, které si můžeme představit jako plovoucí v jednom velkém bazénu). Jenže i tady bude platit, že 60% spermií a 60% vajíček ponese alelu  $B$ , no a zbytek bude mít  $b$ . S jakou pravděpodobností se pak vytvoří jejich splnutím různé genotypy? Na obrázku vpravo je to znázorněno zeleně a černě, fialově pak výsledek v nové vzniklé generaci.



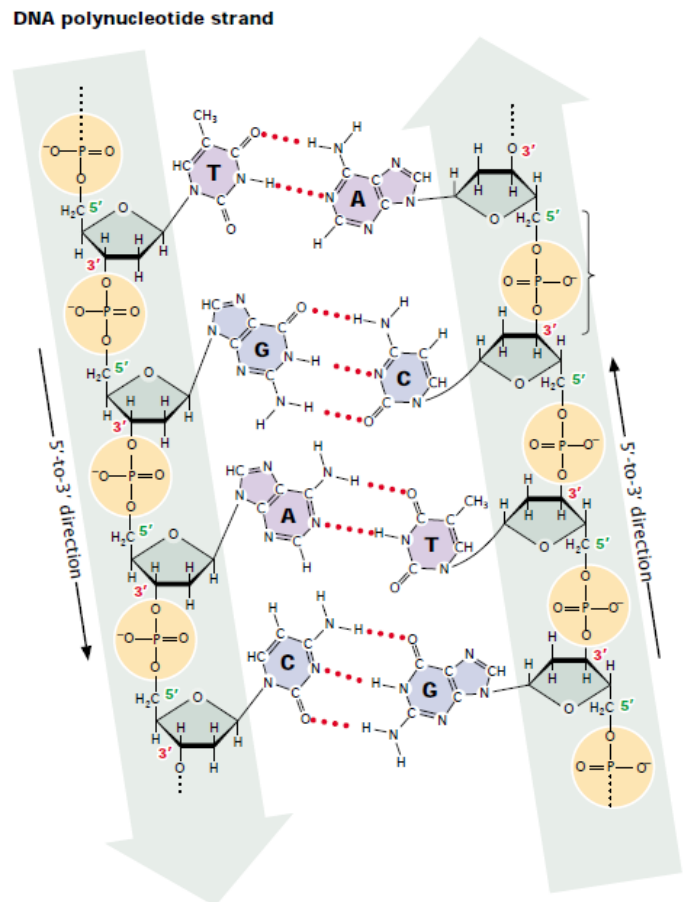
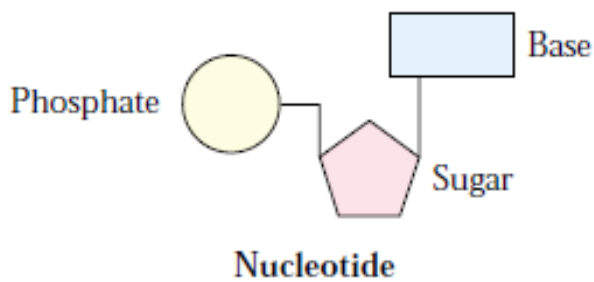
Na závěr bych asi měla prozradit, co jsou ty specifické vlastnosti, které populace pro fungování rovnováhy musí splňovat. Je to především náhodné páření (tedy to, že kterákoliv spermie může oplodnit kterékoliv vajíčko, proto si je představujeme plovoucí v jednom bazénu), neomezená velikost populace (čili těch jedinců v populaci se nedá dopočítat), nikdo se do sledované populace nestěhuje přes hory a doly (a když už, tak se v ní nerozmnožuje), žádná alela nemutuje na něco jiného, a také zde nepůsobí žádný přírodní výběr čili selekce (tedy sledované alely nepřináší svým nositelům extra výhody nebo nevýhody). Tyto vlastnosti jsou ty nejdůležitější, ale kupodivu princip rovnováhy je natolik robustní, že menší odchylky se na něm neprojeví. Velké odchylky ano – a to je pak konečně zajímavé pro evoluční

genetiky, neboť právě změny alelových četností v průběhu času jsou podstatou evoluce, a tak se snažíme dopřít, jak a proč k nim došlo a zda to bude mít i nějaký dopad do budoucnosti.

Ted' si dovolím odbočit a objasnit, co tedy konkrétně kutíme v laboratoři. Náš úkol je celkem jasný, potřebujeme zjistit, jaké alely určitých genů mají zkoumané organismy. Pokud se nám to podaří zjistit, tak stanovujeme jejich četnosti, no a dále pak už za pomoci různých softwarů modelujeme, co mohlo způsobit zjištěné hodnoty. Samozřejmě, namodelované situace je nutno neustále porovnávat s realitou, tedy tím, co o daném druhu vědí ostatní biologové – ať už systematici, fyziologové nebo ekologové. Forenzní věda i klinická diagnostika dělají něco podobného, ovšem tím druhem, který je u těchto oborů podroben zkoumání, je samozřejmě člověk. Zjednodušeně řečeno, forenzního genetika zajímá, jaká je pravděpodobnost, že se genotyp podezřelého shoduje se stopami z místa kriminálního činu. Klinický genetik se zase snaží zjistit, které geny podmiňují určité nemoci a s jakou pravděpodobností může vyšetřovaný jedinec onemocnět. Metody výzkumu i statistika jsou přitom velice podobné.

Prvním krokem v laboratoři je tedy odběr buněk obsahujících DNA. V podstatě lze použít jakoukoliv tkáň – kriminalisté na místě činu sbírají sliny (ty totiž obsahují buňky sliznice vnitřku úst), krev, sperma... myslím, že se tomu říká "biologické stopy". Čím je odebraná tkáň či stopa starší, tím hůře se z toho bude DNA dostávat. Vysycháním se totiž láme a pak už s ní nejde dále pracovat. Přesto se docela daří i analýza muzejních exponátů, dokonce i odběr z egyptských mumii přinesl pozitivní výsledky (to by teda faraoni koukali !!!). Dalším krokem je dostat DNA do nějakého roztoku, který by ji dál nepoškodil. Nejčastěji se dělá "extrakce", čili pouze uvolnění z buněk, fajnovější je "izolace", kdy získám čistou DNA ve víceméně vodném roztoku (pozn.: toto rozlišení je zřejmě jenom má "dojmologie", oba termíny se vesele používají v obou souvislostech). S čistou DNA se dále pracuje snáze, ale postup čištění má několik fází (něco jako filtrace a promývání), během nichž se část DNA ztrácí – jako když cedíme něco přes sítko, na kterém trochu cezeného ulpí a je posléze spláchnuto do kanálu. Extrakce je relativně jednoduchá. Opět použiji určitý roztok a v něm tkáň nebo materiál (kousek látky, smotek vlasů, cigaretový nedopalek) chvíli oplachuji, případně drtím plastovým sterilním drtíkem. Cílem je rozmačkat buňky a uvolnit DNA do roztoku. Pak se to musí zahřát (centrifuguje se to jen proto, aby se větší materiál usadil na dně zkumavky). V roztoku nad usazeninou se bude vznášet DNA, ale také proteiny a další buněčný sajrajt. Při izolaci se tyto nečistoty postupně odmyývají – nejsnazší je použít komerční sadu neboli kit. Ten obsahuje přesně definované a namíchané roztoky a speciální "sítka" (kolonku), skrz které nejdříve procedím počáteční extrakt a DNA se přitom nalepí na pidisítečko uvnitř. Pak to proplachuji a nakonec zase zcela specifickým roztokem způsobím, že se čistá DNA ze sítka uvolní a prolítne do nachystané zkumavky, takže si ji pak můžu zamrazit a schovat k dalšímu použití nebo rovnou začít analyzovat. Někdy se na cezení přes kolonku používá místo centrifugy vakuová odsávačka, ale pokud neodhadnete podtlak, může váš drahocenný vzorek skončit v... odpadu.

Zde bych asi konečně měla prozradit, jak DNA vypadá po biochemické stránce. Všichni už asi slyšeli o její dvoušroubovici, méně se už ale ví, z čeho se skládá. V podstatě jsou to tři základní složky: cukr deoxyribóza, báze (existují 4 typy G, A, T, C) a fosfát, které společně tvoří jednotlivé články řetězce, neboli nukleotidy.



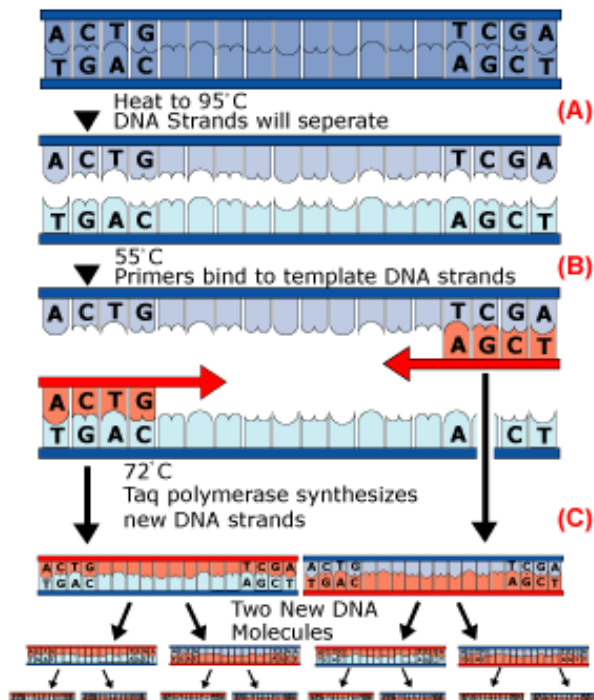
Oko chemiků zajisté potěší i další podrobnější obrázek, na němž je už i vidět, jak se jednotlivé nukleotidy spojují ve vlákna tvořící “postranice” výsledného žebříčku, stejně jako vazby mezi bázemi, což jsou “příčky”. Tady je také patrná superdůležitá věc – totiž báze typu T se bude vždy párovat jenom s bází A, zatímco báze G se zase pouze páruje s bází C. Tomu se říká komplementarita a v praxi to znamená, že jeden řetězec je tak trochu kopií či spíše “otiskem” toho druhého a v případě nutnosti (poškození jednoho řetězce) si je buňka schopna chybějící část opravit či doplnit.

**V dalším kroku hrátek s DNA** si namnožím (amplifikuji) pro mne zajímavý úsek – čili marker. Může to být nějaký gen nebo jeho část, ale často se používají i takové úseky DNA, které se navenek nijak neprojevují, nic nekódují, jen se tak flinkají na chromozómu a my vůbec netušíme, k čemu jsou buňkám dobré. Namnožení markeru je vlastně tak trochu koukání přírodě pod pokličku, protože dělám *in vitro* to, co ona umí *in vivo*. Také pěkně dlouho trvalo, než vědci na ten postup přišli, i když je v zásadě opět velice jednoduchý. Zásadní pro toto kutění byl objev teplomilné bakterie žijící v horkých pramenech Yellowstone National Park. Bakterie s názvem *Thermus aquaticus* se totiž rozmnožuje i při neuvěřitelně vysokých teplotách, při nichž jsou běžné enzymy dávno uvařené a k nepotřebě. Naše milá bakterie tedy musí mít extra enzymy vysokým teplotám odolné. Pro nás je nejdůležitější enzym DNA polymeráza, která umí podle předloženého “podkládku” uštrikovat stejnou DNA. Proces *in vitro* se nazývá polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) a schematicky to vypadá následovně: do zkumavky s pufr (pufr je v tomto případě slabě zásaditý roztok) přidám volné nukleotidy, DNA

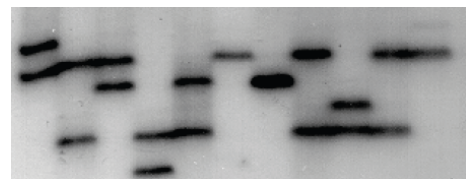
polymerázu, primery (to jsou podle mého návrhu syntetizované kratšounké kousky jednovláčkové DNA vymezující ten úsek DNA, který chci namnožit – na obrázku vyznačeny červeně) a přidám trochu vyextrahované DNA. Pak to umístím do “robotku“ (PCR termocykléru), který bude zkumavku cyklicky ohřívat a ochlazovat podle mého naprogramování. Každý cyklus má tři teplotní fáze:

- (A) – denaturace (95°C), DNA se rozmotá a oddělí se jednotlivá vlákna “jednořetězce“.
- (B) – annealing (cca 55-60°C), na jednotlivá vlákna si v přesně definovaném úseku nasednou primery.
- (C) – elongace (72°C), DNA polymeráza začne od nasedlého primeru přilepovat další nukleotidy, takže vlastně “dodělá“ druhé vlákno.

Tohle se opakuje obvykle 35x, přičemž množství produktu exponenciálně narůstá. Z jednoho původního kousku DNA je  $2^{35}$  kopií a to už je fakt moc (Pozn. laskavého korektora – přesně 34359738368)!



Výsledný produkt je možné vidět i pouhým okem (na UV prosvěcovači, jeví se to jako proužky). Vtip je v tom, že některé alely určitého genu lze rozeznat i jen podle délky. Zase velmi zjednodušeně, alela *B* má třeba 600 bází, alela *b* 450 bází. Když pak tu namnoženou DNA nechám procházet agarózovým gelem (což je hmota podobná té, ze které se dělají ovocné dorty) v elektrickém poli, tak ta kratší alela se pohybuje rychleji a po určité době pak na gelu vidím, jestli byl zkoumaný jedinec homozygot (má pouze jeden proužek) či heterozygot (dva proužky). Jestliže je alel více než dvě, může to vypadat jako na obrázku (alel lze rozeznat celkem 6, každý sloupec představuje jedince; homozygoti jsou č. 6, 7 a 11).



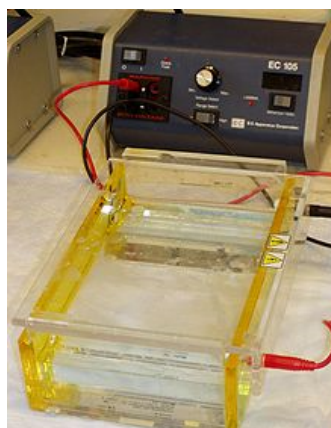
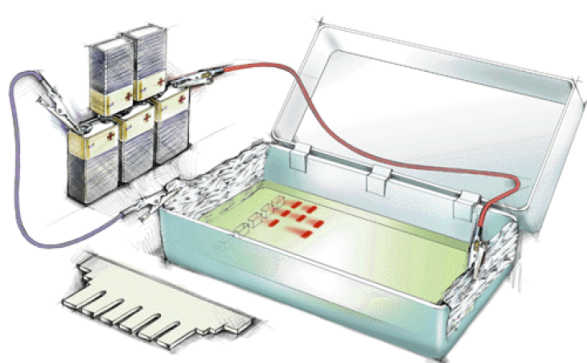
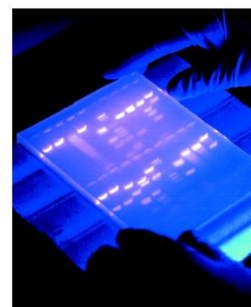
Trochu více do detailů, gelová elektroforéza je univerzální a základní technika umožňující separaci směsi molekul na gelu v elektrickém poli. Používá se jak pro zkoumání bílkovin, tak i DNA a RNA. Jeden genetik si kdysi dělal legraci, že právě masivní zavedení elektroforézy do laboratoří koncem 60. let minulého století způsobilo následnou energetickou krizi. No... kvůli úsporám energie se prý v té době stavěly americké university jako hnusné betonové balvany, většina učeben, laboratoří i kanceláří bez oken, zato všude klimatizace. Asi další z “městských“ legend :o)

Gel se používá různého typu. V dřevních dobách stačil i obyčejný škrob, dnes už spíše velice speciální agaróza nebo polyakrylamid (ten je ale na rozdíl od agarózy značně jedovatý). Podstatou je, že nalitím roztoku uvedené látky do formy a následným utužením vzniká porézní gel, kterým pak molekuly cestují. Směs molekul, jež má být rozdělena, je nanášena do jamek na jedné straně gelu, a ten je pak vystaven jednosměrnému elektrickému proudu (obvykle ponořený do komory s pufrům). Molekuly se začnou gelem pohybovat ke kladné anodě, přičemž rychlost jejich pohybu závisí na náboji, velikosti i tvaru molekul (obecně platí, že malé kousky běží rychleji – asi jako když běžíte lesem s krátkým nebo dlouhým žebříkem). Vzorky, které takto separujeme, bývají obvykle nanášeny společně s okem



viditelnou “barvičkou“. Ta rovněž gelem cestuje, takže můžeme kontrolovat, jestli už není čas všechno vypnout, gel vyjmout a jít prosvítit UV zářením. Viditelnost DNA je však způsobena jinou “barvičkou“, která se obvykle přidává do gelu a molekuly si ji při cestování do sebe “nalepí“. Nejběžněji se používá ethidium bromid, což je látka mírně mutagenní, a proto se v laboratořích používají latexové rukavice (takže nejen proto, abychom vypadali “cool“). Prosvícení se provádí ve tmě a výsledek vypadá jako z nějaké sci-fi (obrázek vpravo). Samozřejmě přitom musíme mít extra brýle, a pokud někdo kouká příliš dlouho, z temné komory vyleze podoben medvídku mývalovi – jenom škrabošku kolem očí má bílou místo černé a obličej hezky červený. Naštěstí už existují “udělátka“, takže na gel nemusím koukat přímo, ale vyfotím si ho ve speciální komoře digitální kamerou a s obrázkem si hraju na monitoru připojeného PC.

Pro zvědavé a zvědavé, domácí vyrobený elektroforetický aparát vypadá jako ten obrázek dole vlevo, profesionální vybavení pak znázorňují obrázky zbývající. Ty jsem si dovolila vypůjčit z anglické verze wikipedie, kde samozřejmě naleznete i spoustu dalších detailů, ze kterých ovšem laikovi může jít hlava kolem (ale vše je tam vysvětleno velice přehledně a názorně).



Tím bych to své povídání protentokrát ukončila, to příští bude zahrnovat vysvětlení systému CODIS (čili jak se identifikují jedinci v kriminalistické laboratoři) a něco málo zajímavostí z genetiky klinické (neboť i s tím se třeba můžete v běžném životě setkat). Ale ráda přidám i další věci – podle toho, co vás zaujalo či co vám už dlouho vrtá hlavou :o)

A pro toho, kdo je zvědavý i drobet šťoura, rád si hraje a doma ho pustí do kuchyně (nebo může trochu zapatlat koupelnu), může si sám zkusit vyextrahovat DNA v libovolném množství podle následujícího protokolu (nebo receptu – jak se tomu říká je celkem jedno).

## Jahodová DNA

Jahody jsou oblíbené a ještě stále na zahrádkách hojně pěstované ovoce. Kromě příjemné chuti a obsahu vitamínů však mají jednu velice zajímavou vlastnost také po stránce genetické. Mohou mít totiž i více než dvě sady chromozómů – nejběžnější kultivar *Fragaria ananassa* má dokonce chromozómových sad osm (není tedy diploidní, ale oktoploidní, každý chromozóm má dalších sedm sobě podobných). To znamená, že je výborným materiálem pro ukázkou extrahování DNA, neboť každá jahodová buňka jí obsahuje obrovské množství. Dalším kladem pro experiment je i to, že jahody jsou

měkké a můžeme je snadno rozmačkat. Zralé plody také obsahují enzymy (pektinázy a celulázy), které pomáhají rozložit buněčné stěny.



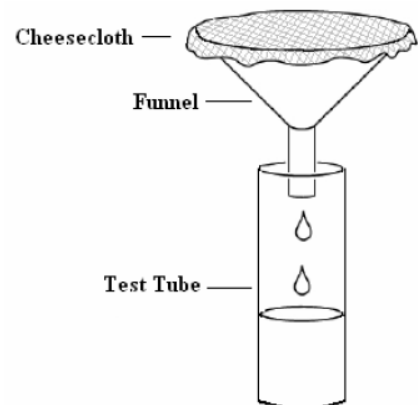
Co tedy budeme potřebovat:

- detergent, nejlépe saponát na nádobí
- plastový sáček (nejlepší je "zip-lock", tedy s vlastním zipovým uzávěrem)
- trochu kuchyňské soli
- pár čerstvých nebo mražených jahod
- plastové zkumavky (může to být prázdná průhledná lahvička od čehokoliv, ovšem důkladně vymytá a suchá) o objemu asi 50ml
- odměrku
- pipetu (pokud máte, stačí i dětská odsávačka hleníků – tedy plastová trubička s balónkem, opět čistě vymytá)
- kousek plátna nebo kávový filtr a trychtýřek
- ledově vychlazený alkohol (alespoň 70% isopropanol nebo etanol)
- skleněnou nebo plastovou tyčinku (může být i dřevěná špejle)

*Vlastní extrakce:*

Příprava extrakčního roztoku (pufru) – 450ml vody smíchejte s 25ml detergentu a lžičkou kuchyňské soli.

1. Do plastového sáčku dejte 1-2 jahody, uzavřete ho a jahody rozmačkejte na kaši (asi 2 min). Tím jste mechanicky narušili buňky a vytvořili homogenát.
2. Sáček otevřete a přidejte cca 15ml extrakčního roztoku. Detergent pomůže rozpustit tuky v buněčné membráně a sůl zadrží bílkoviny v roztoku, takže se nebudou v závěru srážet společně s DNA.
3. Znovu minutu promíchávejte a drťte.
4. Sestavte filtrační aparát podle obrázku vpravo (vloďte filtr do trychtýřku, který pak umístíte do plastové zkumavky nebo lahvičky).
5. Nalijte homogenát na filtr a nechejte překapat (tekutina v lahvičce je filtrát). Pak odstraňte trychtýř s filtrem.
6. Zkumavku s filtrátem držte zhruba pod úhlem 45° a pipetou opatrně nalijte stejný objem ledového alkoholu (je dobré alkohol nalévat pomalu po stěně zkumavky). Alkohol je lehčí než filtrát, a proto by měly vzniknout dvě oddělené vrstvy – alkohol jako vrchní a filtrát jako spodní.
7. Na rozhraní vrstev se postupně začne srážet (precipitovat) bílá vláknitá DNA, která se začne vznášet k povrchu horní vrstvy. DNA není v alkoholu rozpustná, proto se její molekuly nahloučí k sobě a tím pádem ji můžeme vidět i pouhým



okem. Čím studenější alkohol bude, tím lépe se DNA vysráží. Můžete ji opatrně vylovit tyčinkou či špejlí jako malý chuchvaleček.

Různé detergenty mají různou účinnost, takže pokud vám není líto jahod, můžete experimentovat, který bude fungovat nejlépe. Podobně lze experimentovat i s jinými druhy ovoce – banánem, kiwi, apod., pokus se dá provést i se sušeným hrachem. V tom případě je však nutno v první fázi použít mixér a v troše vody hrášek rozmixovat na kašičku. No a co se týká alkoholu, kolegyně odzkoušela gin a 60% vodku, ale to se prý DNA sráží jen ve formě šupinek, a alkohol musí být skutečně ledový (nejlepší je uchovávat láhev před pokusem nějaký čas v mrazáku).

A ještě použitá literatura (kromě celé řady internetových zdrojů) :

Benjamin A. Pierce Genetics (2002): A Conceptual Approach, First Edition, W.H. Freeman & Co.

Anthony J. F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart (2005) An Introduction To Genetic Analysis Eighth Edition, W.H. Freeman & Co.

Ricki Lewis (2002): Human Genetics: Concepts and Applications, McGraw-Hill.

Tara Rodden Robinson (2005): Genetics For Dummies®, Wiley Publishing, Inc.