

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vizualizace DNA s ohledem na využití ve výuce biologie na SŠ

DNA visualization with regard to high school biology education

Lucie Špačková

Vedoucí práce: RNDr. Edvard Ehler, Ph.D.

Studijní program: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na
vzdělávání

Studijní obor: B BI-TVS 20

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Vizualizace DNA s ohledem na využití ve výuce biologie na SŠ potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 15.4.2024

Ráda bych poděkovala panu doktoru Edvardu Ehlerovy za jeho trpělivé a vstřícné vedení. Dále bych ráda poděkovala učitelům z mého bývalého gymnázia, zejména Ladislavu Mertovi, za konzultace ohledně výuky molekulární biologie a poskytnutí výukových materiálů.

ABSTRAKT

Tato práce podrobně zkoumá problematiku vizualizace DNA a jejího využití ve výuce biologie na středních školách. Vychází z popisu širokého spektra technologických metod určených k vizualizaci DNA, zahrnujících gelovou elektroforézu, polymerázovou řetězovou reakci (PCR), sekvenování DNA, fluorescenční mikroskopii a molekulární hybridizaci. Důraz je kladen na detailní zkoumání struktury a vlastností DNA, včetně procesu replikace DNA, který je klíčový pro porozumění její funkce. Kromě toho práce srovnává různé typy dostupných vizualizačních barviv, používaných k barvení DNA, s cílem poskytnout komplexní přehled o jejich vlastnostech a účinnosti. Zvláštní důraz je kladen na možné aplikace těchto metod a barviv v rámci výuky biologie na středních školách, s ohledem na zlepšení interaktivního vzdělávání studentů. Celkově se práce snaží přinést ucelený pohled na problematiku vizualizace DNA a její využití ve vzdělávání na středních školách.

KLÍČOVÁ SLOVA

DNA, barvení, fluorescence, vizualizace DNA

ABSTRACT

This bachelor's thesis explores in detail the issue of DNA visualization and its use in the teaching of biology in high schools. It is based on the description of technological methods for DNA visualization, including gel electrophoresis, polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing, fluorescence microscopy and molecular hybridisation. Emphasis is placed on the study of the structure and properties of DNA, including the process of DNA replication, which is essential for the understanding of the function of DNA. It also compares the different types of visualization dyes available for staining DNA, providing a comprehensive overview of their properties and potential. Emphasis is placed on the potential applications of these methods and dyes in the context of high school biology education. Overall, the thesis attempts to provide a comprehensive view of DNA visualization and its use in high school education.

KEYWORDS

DNA, staining, fluorescence, DNA visualization

Obsah

Přehled použitých zkratk	8
Úvod	9
1 Základní struktura a vlastnosti DNA	10
1.1 Primární struktura DNA	10
1.1.1 Nukleotidy	10
1.2 Struktura dvoušroubovice DNA	11
1.2.1 Komplementarita bází	12
1.3 Vlastnosti DNA	12
1.4 Replikace DNA	13
1.5 Štěpení DNA	15
1.5.1 Restrikční endonukleázy	15
2 Technologie využívané ve vizualizaci DNA	17
2.1 Gelová elektroforéza	17
2.1.1 Typy gelů využívaných při elektroforéze	18
2.1.2 Elektroforéza v agarózovém gelu	19
2.1.3 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	20
2.2 Polymerázová řetězová reakce	21
2.2.1 Průběh PCR	21
2.3 Sekvenování DNA	23
2.3.1 Next Generation Sequencing (NGS)	24
2.4 Fluorescenční mikroskopie	24
2.4.1 Princip fluorescenční mikroskopie	25
2.4.2 Aplikace fluorescenční mikroskopie ve vizualizaci DNA	26
2.4.3 Využití fluorescenční mikroskopie	26

2.5	Molekulární hybridizace	26
2.5.1	Hybridizace in situ.....	27
2.5.2	FISH	28
3	Barvení DNA.....	29
3.1	Interkalační barviva	29
3.1.1	Ethidiumbromid.....	30
3.1.2	Propidium jodid	31
3.1.3	SYBR Green	32
3.1.4	DHDM.....	33
3.2	Barvy vázající se na malé žlábký DNA	34
3.2.1	DAPI.....	35
3.2.2	RedSafe, GelGreen, GelRed, Diamond Dye	35
4	Výuka vizualizačních metod DNA na středních školách	38
4.1	Příklady využití vizualizačních metod v praktické výuce	38
4.1.1	Struktura DNA.....	39
4.1.2	Restrikční štěpení	40
4.1.3	Gelová elektroforéza.....	41
4.1.4	PCR.....	42
4.1.5	Fluorescenční mikroskopie.....	43
4.1.6	Workshopy	43
	Závěr.....	45

Přehled použitých zkratk

A	adenin
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
bp	párů bází
C	cytosin
DAPI	4'6-diamidino-2-fenylindol
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfát
DHDM	3,4-dihydroxy-5,6-dimethoxyflavon
dsDNA	dvouřetězcovitá DNA
EtBr	ethidiumbromid
G	guanin
GMP	guaninmonofosfát
NSG	sekvenování nové generace
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI	propidium jodid
qPCR	kvalitativní polymerázová řetězová reakce
SG	SYBR Green I
T	thymin
U	uracil

Úvod

DNA je nositelkou genetické informace, která je uchovávána v genech a díky buněčnému dělení se předává z generace na generaci. Genetická informace, kódovaná ve struktuře DNA, je dána pořadím jednotlivých nukleotidů. Jednotlivé organismy se tedy liší uspořádáním nukleotidů. Nyní je DNA jednou z nejsnáze analyzovatelných buněčných makromolekul. Popsání struktury DNA, ve dvacátém století, bylo průlomem v biologii a dalo za vznik mnoha nových oborům.

V dnešní době je molekulární biologie jedním z hlavních oborů vědeckého výzkumu, který přináší neustále se rozvíjející poznatky o fungování živých organismů. Jedním z důležitých nástrojů v oblasti molekulární biologie je vizualizace DNA, která umožňuje zkoumat a zobrazovat strukturu, funkci a interakce genetického materiálu.

Tato práce se zaměřuje na vizualizaci DNA a její využití ve výuce biologie na středních školách. Cílem této práce je popsat technologické metody vizualizace DNA a provést analýzu dostupných barviv určených pro vizualizaci DNA. Dalším cílem je identifikovat možnosti efektivního využití těchto postupů ve výuce na středních školách s ohledem na specifika výuky biologie.

Tato práce by měla přinést ucelený pohled na problematiku vizualizace DNA a jejího využití ve výuce na středních školách.

1 Základní struktura a vlastnosti DNA

1.1 Primární struktura DNA

Základní stavební jednotkou DNA jsou nukleotidy, které se skládají ze tří částí: báze, cukru a fosfátové skupiny. Díky spojení, mezi mononukleotidy, fosfodiesterovou vazbou tvoří polynukleotidy základní strukturu dvoušroubovice DNA (Murray, 2002). Tato struktura nukleotidu je důležitým prvkem pro tvorbu polymerních řetězců DNA, které nesou genetickou informaci a řídí všechny biologické procesy organismů.

Deoxyribonukleová kyselina je nositelkou genetické informace v buňkách všech živých organismů. Je schopná tuto genetickou informaci přenést z jedné generace na další. Tato schopnost je velice důležitá a klíčová pro všechny biologické procesy v organismu. (Murray, 2002)

1.1.1 Nukleotidy

Nukleotidy nejsou pouze součástí DNA nebo RNA. Nachází se také v koenzymech jako je například FAD, NAD⁺, NADP⁺ a koenzymu A. Dále také slouží k regulacím. Hladina ADP řídí rychlost mitochondriální oxidativní fosforylaci, specifické nukleotidy jsou alosterickými regulátory enzymové aktivity a cyklický AMP i cyklický GMP plní úlohu druhého posla. Proto patří mezi základní jednotky v mnoha biologických procesech. (Murray 2002)

Jednou z důležitých vlastností nukleotidů je jejich schopnost polymerace. Tento proces zajišťuje postupné spojování nukleotidů do řetězce pomocí kondenzace. Výsledkem je tvorba oligonukleotidových až polynukleotidových řetězců, které jsou základními stavebními jednotkami nukleových kyselin. (Vodrážka 1996)

Struktura nukleotidu

Jednou ze tří částí nukleotidu jsou dusíkaté báze, které jsou tvořené aromatickými heterocyklickými sloučeninami. Pořadí dusíkatých bází v polynukleotidu určuje genetický kód a tím i různé biologické funkce. V molekule DNA se nacházejí čtyři druhy bází. Patří mezi ně adenin (A), guanin (G), thymin (T) a cytosin (C). V RNA nalezneme místo thyminu uracil(U). Dále se báze dělí na purinové báze a pyrimidinové báze. Mezi purinové báze patří adenin a guanin, zatímco k pyrimidinovým bázím patří cytosin, thymin a uracil. Cukr, druhá část nukleotidu, je pětiuhlíkatý cukr neboli pentóza. V RNA se nachází ribóza. U DNA se

jedná o deoxyribózu. Poslední částí nukleotidu je fosfátová skupina, která se váže na hydroxylovou skupinu cukru. (Alberts et al. 2006)

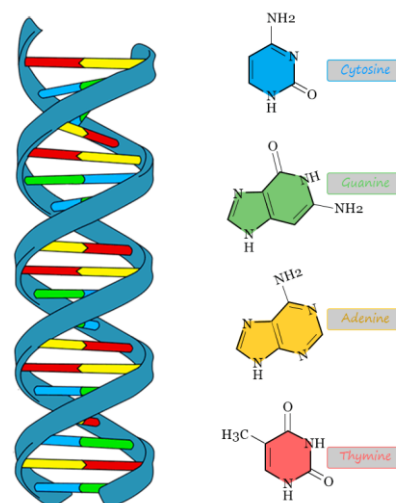
1.2 Struktura dvoušroubovice DNA

Sekundární strukturou DNA je pravotočivá dvoušroubovice neboli double helix. Vznik dvoušroubovice závisí na komplementaritě bází a vzniku vazby vodíkových můstků mezi bázemi. Dvouvláknová DNA (dsDNA) existuje v 6 formách, které se označují velkými písmeny A až E a Z. Za normálních fyziologických podmínek se DNA vyskytuje obvykle ve formě B. (Murray 2002)

Dlouhá polynukleotidová vlákna se skládají ze čtyř typů nukleotidových podjednotek

podle bází, které obsahují. Jednotlivé nukleotidy DNA jsou spojené kovalentní vazbou mezi deoxyribózou a fosfátem. Právě toto specifické spojení dává řetězci polaritu. Polarita jednoho řetězce nukleotidů je opačná k polaritě druhého. Díky tomuto uspořádání se mohou báze společně párovat, protože kdyby byla vlákna orientována stejným směrem nedošlo by k vazbě vodíkovými můstky mezi jednotlivými bázemi. Nukleotidy lze tedy spojovat pouze jedním specificky orientovaným způsobem.

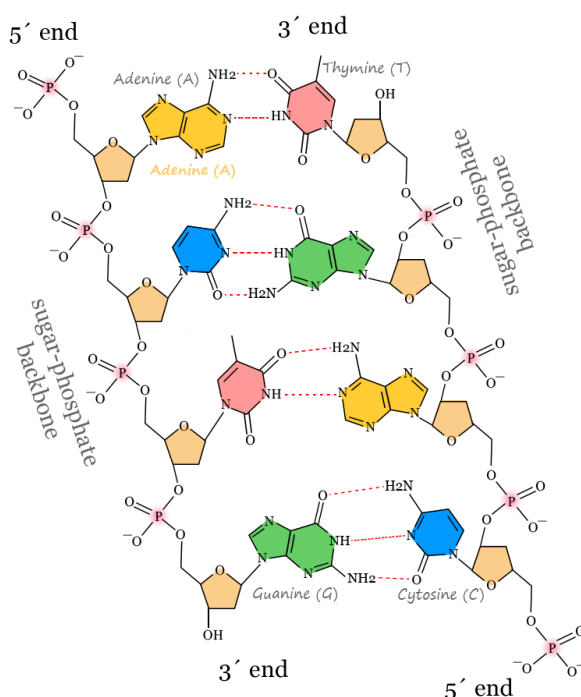
Vzhledem k tomu, že jsou řetězce DNA vůči sobě antiparalelní, se rozlišují jednotlivé konce jako konec 3' (čte se konec tři s čarou) a konec 5' (čte se konec pět s čarou). Vlákno s 3' koncem končí hydroxylovou (-OH) skupinou sacharidu na rozdíl od konce 5', kde se nachází fosfátová skupina. Konce vláken jsou díky své chemické polaritě odlišné. (Alberts et al. 2006)



Obrázek 1 Struktura DNA a dusíkaté báze (zdroj: <https://www.priyamstudycentre.com/2023/08/deoxyribonucleic-acid-dna.html>)

1.2.1 Komplementarita bází

Podle principu komplementarity bází se v DNA vážou dvojice pomocí vodíkových můstků. Mezi adeninem a thyminem vznikají dva vodíkové můstky, zatímco mezi guaninem a cytosinem se nacházejí tři vodíkové můstky (Alberts et al., 2006). Tato specifická vazba purinu s pyrimidinem je velice důležitá pro úspěšnou tvorbu dvoušroubovice DNA. Puriny i pyrimidiny jsou planární molekuly, což umožňuje jejich těsné uspořádání ve dvoušroubovici DNA. Díky komplementaritě bází mají jednotlivé nukleotidové páry tendenci zaujímat energeticky nejvýhodnější uspořádání. Ve dvouřetězové molekule je rotace kolem fosfodiesterových vazeb omezena, což preferuje konfiguraci anti na glykosidových vazbách. Tato specifická konfigurace, spolu s přítomností určitých tautomerních forem přítomných čtyř bází, zajišťuje specifčnost párování a stabilitu DNA. (Murray, 2002)



Obrázek 2 Komplementarita bází (zdroj: <https://www.priyamstudycentre.com/2023/08/deoxyribonucleic-acid-dna.html>)

1.3 Vlastnosti DNA

V molekulárním pojetí je gen běžně definován jako celá sekvence nukleové kyseliny, která je nezbytná pro syntézu funkčního genového produktu (polypeptidu nebo RNA). Podle této definice gen zahrnuje více než jen nukleotidy kódující sekvenci aminokyselin proteinu,

označované jako kódující oblast. Gen zahrnuje také všechny sekvence DNA potřebné pro syntézu určitého transkriptu RNA. (Lodish 2008)

Ve dvouvláknové molekule DNA se genetická informace uchovává v jednom řetězci, označovaném jako templát, zatímco druhý řetězec slouží jako kódující řetězec. Tato genetická informace je kódována pořadím monomerů, konkrétně purinových a pyrimidinových deoxyribonukleotidů, a je důležitá pro různé biologické procesy.

Genetická informace, uložená v nukleotidové sekvenci DNA, plní dva základní účely. Za prvé, slouží jako zdroj pro syntézu všech proteinů v buňce a organismu. Dále poskytuje dědičné znaky, které předává dceřiným buňkám nebo potomkům (Murray 2002). Protože uchovává velmi důležité informace, uložené v pořadí monomerů, je potřeba replikovat sekvenci s vysokou přesností. K tomuto účelu slouží proces replikace, který umožňuje přesnou reprodukci genetické informace.

1.4 Replikace DNA

Replikace je semikonzervativní proces, při kterém z jedné dvoušroubovice vznikají dvě. Nově vzniklé dvoušroubovice mají vždy jedno vlákno nově nasyntetizované podle původní předlohy. Díky tomu je úsek DNA přesně zkopírován do dvou identických dvoušroubovic. Templát, podle kterého se syntetizuje nové vlákno, tedy vzniká z obou vláken a umožňuje buňce replikovat geny před buněčným dělením. Významnou roli při replikaci má komplementarita bází. (Alberts et al. 2006)

Při každém buněčném dělení je nezbytné, aby buňka precizně zkopírovala svůj genom. Buňka dokáže duplikovat svou DNA rychlostí až 1000 nukleotidů za sekundu. V průměru se živočišná buňka nesplete o více než několik písmen při opisování ekvivalentu 1000 knih za pouhých 8 hodin. (Alberts 2013)

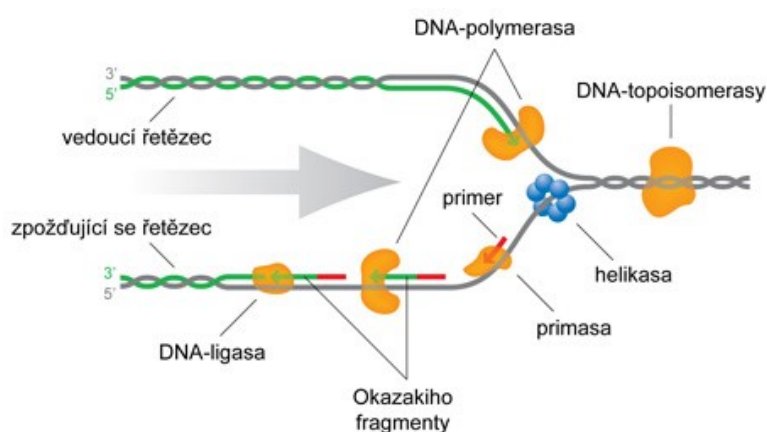
Základní princip replikace spočívá v párování bází, což je schopnost jednoho nukleotidového řetězce DNA párovat se s druhým, komplementárním, řetězcem. Každé vlákno tedy může sloužit jako šablona nebo forma pro syntézu nového komplementárního vlákna. Jinými slovy, označíme-li dvě vlákna DNA jako S a S', může vlákno S sloužit jako šablona pro vytvoření nového vlákna S', zatímco vlákno S' může sloužit jako šablona pro vytvoření nového vlákna S. Genetickou informaci v DNA lze tedy přesně kopírovat krásně

jednoduchým procesem, při kterém se vlákno S oddělí od vlákna S' a každé oddělené vlákno pak slouží jako šablona pro výrobu nového komplementárního partnerského vlákna, které je identické se svým předchozím partnerem. Schopnost každého vlákna molekuly DNA sloužit jako šablona pro výrobu komplementárního vlákna umožňuje buňce kopírovat neboli replikovat své geny před jejich předáním potomkům. (Alberts 2013)

Proces replikace DNA je komplexním mechanismem, který musí být proveden rychle a přesně, aby byla zajištěna stabilita genetické informace. O celý průběh replikace se stará replikační aparát, který je složený ze souboru proteinů. Tento aparát koordinuje a uskutečňuje celý proces replikace DNA. (Alberts et al., 2006).

Prvním krokem je rozšroubování DNA, kdy enzymy replikačního aparátu odpoutávají a rozplétají dvojitou vlákennou strukturu DNA. Následně dochází k oddělení jednotlivých vláken od sebe, což umožňuje přístup enzymů k jednotlivým templátům. Hlavní fází replikace je následné nasynthetizování nových vláken DNA. Tento proces probíhá podle templátu existujícího vlákna a zajišťuje přesné a správné párování nukleotidů (viz obrázek číslo 3). Proteinové složky replikačního aparátu řídí tuto syntézu a zabezpečují, že nově vzniklá DNA má stejnou sekvenci jako její mateřské vlákno. (Alberts et al., 2006).

Tento proces je velice důležitý pro výzkum DNA, protože si díky tomuto procesu můžeme nasynthetizovat jakýkoli úsek DNA, který právě chceme sledovat. Tento úsek lze poté neomezeně replikovat. (Alberts et al. 2006)



Obrázek 3 Replikace DNA

(zdroj: <https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=52897&displayformat=dictionary>)

1.5 Štěpení DNA

K vizualizaci DNA je nutné DNA rozštěpit na menší úseky. K tomuto účelu se využívají restriční endonukleázy, které katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Tyto nukleázy štěpí DNA pouze v místech se specifickým nukleotidovým pořadím. (Alberts et al. 2006)

1.5.1 Restriční endonukleázy

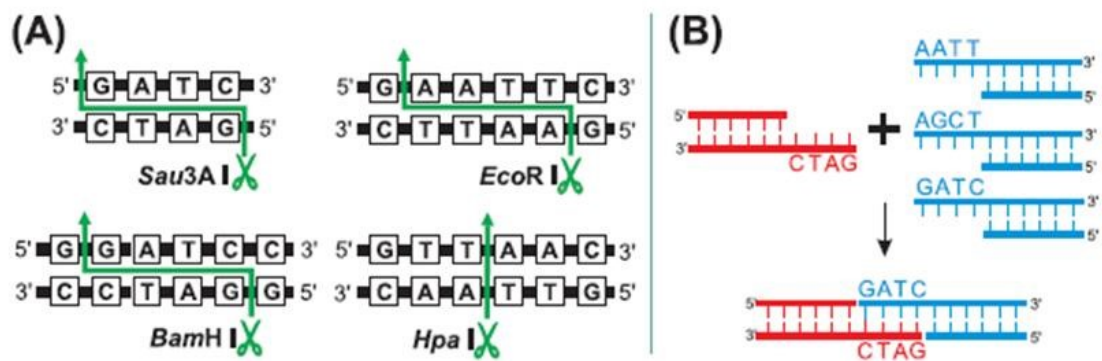
Restriční endonukleázy představují významné enzymy v molekulární biologii, které hrají zásadní roli v procesech ochrany organismů před vložením cizorodé DNA do svého genomu.

Mezi všemi proteiny, které se specificky vážou na sekvenci DNA, jsou restriční enzymy považovány za nejnáročnější. Tyto enzymy se vyskytují přirozeně v bakteriích a archeích a slouží k ochraně mikrobů před infekcí viry a parazitickými molekulami DNA. Restriční enzymy se vážou na krátké sekvence bází v DNA a katalyzují štěpení dvou řetězců DNA v blízkosti řetězce vazebných míst, čímž se DNA rozpadá na fragmenty.

Aby organismy zabránily štěpení své vlastní DNA restričními endonukleázami, vyvinuly se evoluční strategie, které zahrnují ochranné prvky jako jsou methyltransferázy. Tyto proteiny rozpoznávají stejnou specifickou sekvenci jako odpovídající restriční enzymy, ale místo štěpení připojují k bázím na obou řetězcích DNA metylovou skupinu. Metylovaná sekvence DNA již není náchylná k hydrolýze, jelikož ji endonukleáza nemůže rozpoznat. (Wilson et al. 2012)

Název	Bakteriální zdroj	Rozpoznávací sekvence a štěpení
<u>EcoR I</u>	<u>Escherichia coli</u> RY 13	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<u>Hind III</u>	<u>Haemophilus influenzae</u> Rd	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
<u>Pst I</u>	<u>Providencia stuartii</u> 164	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
<u>Taq I</u>	<u>Thermus aquaticus</u> YT1	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
<u>Alu I</u>	<u>Arthrobacter luteus</u>	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'

Obrázek 4 Příklady restričních endonukleáz
(zdroj: <https://biologie-v-kostce.blogspot.com/2011/05/58-restriční-nukleázy-význam-v-genomu.html>)



Obrázek 5 Štěpení restrikčními endonukleázami

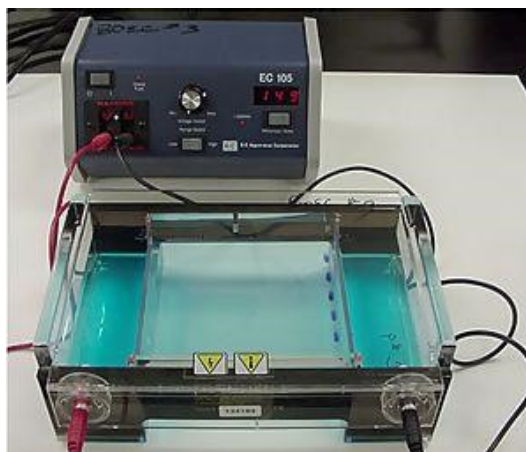
(zdroj: <https://biologie-v-kostce.blogspot.com/2011/05/58-restrikcni-nukleazy-vyznam-v-genovem.html>)

2 Technologie využívané ve vizualizaci DNA

V oblasti molekulární biologie existuje řada technologií, které umožňují vizualizaci a analýzu DNA s různými úrovněmi detailu a citlivosti. Mezi tyto technologie patří například gelová elektroforéza, polymerázová řetězová reakce (PCR), sekvencování DNA, fluorescenční mikroskopie, molekulární hybridizace a FISH (fluorescenční in situ hybridizace).

2.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza patří k metodám, které se zpravidla využívají k separaci nukleových kyselin a proteinů. Molekuly stejného tvaru se pohybují v elektrickém poli a jsou závislé na poměru náboje a jejich molekulové hmotnosti. Molekuly DNA se dělí na základě rozdílné pohyblivosti. Závisí tedy hlavně na náboji, velikosti nebo hmotnosti, a tvaru. Molekula DNA má v pH neutrálním roztoku záporný náboj. Zajišťuje ho ionizace fosfátové skupiny. Proto se molekuly pohybují k anodě, která má kladný náboj. (Křemen et al. 1998)



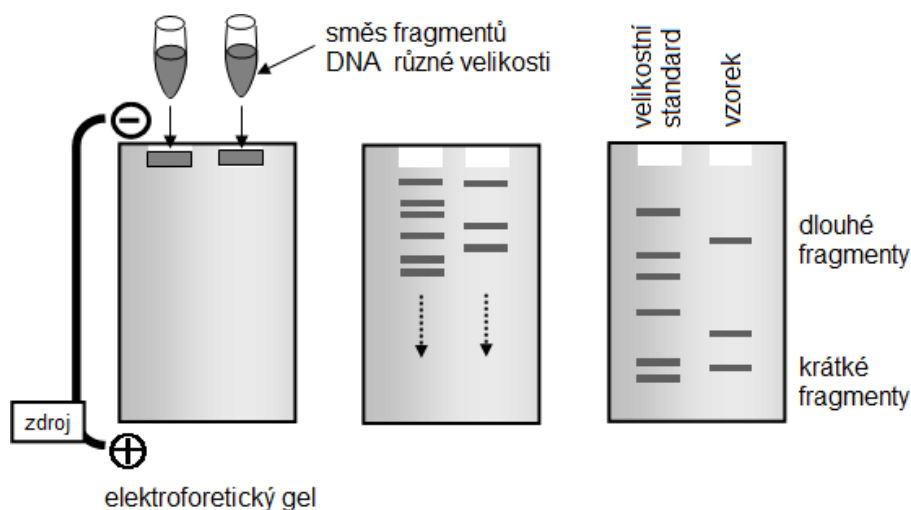
Obrázek 6 Elektroforetická vana a zdroj elektrického napětí
(zdroj: https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods6.html)

V případě použití elektroforézy na papíře nebo v roztoku, je pohyblivost nesteromálně dlouhých řetězců téměř stejná. Poměr náboje a molekulové hmotnosti nukleové kyseliny je prakticky stejný. Proto se k separaci používá elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Větší molekuly se skrz póry v gelu pohybují pomaleji než menší molekuly. (Křemen et al. 1998)

Srovnáním pohyblivosti řetězců DNA se zvolenými standardy o známé délce, lze pomocí elektroforézy určit délku separovaných řetězců DNA. Standardy se připravují restričními enzymy, které štěpí plazmidové nebo virové DNA.

Dále je elektroforetická pohyblivost DNA při gelové elektroforéze ovlivněna tvarem molekuly. Důležitým faktorem, který ovlivňuje rychlost pohybu DNA v gelu, je její

konformace. Studie ukazují, že DNA ve formě superhelixu má tendenci pohybovat se rychleji než lineární molekuly DNA o stejné délce (Murray 2002).



Obrázek 7 Gelová elektroforéza (zdroj:https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metody_gelova_elektroforeza&lang=cz)

Superhelikální forma DNA je typická pro genomy živých organismů a vzniká zavinutím dvouvláknové molekuly kolem sebe. Tento tvar umožňuje DNA kompaktně uložit do buněčného jádra a zároveň usnadňuje rychlejší pohyb v gelu během elektroforézy.

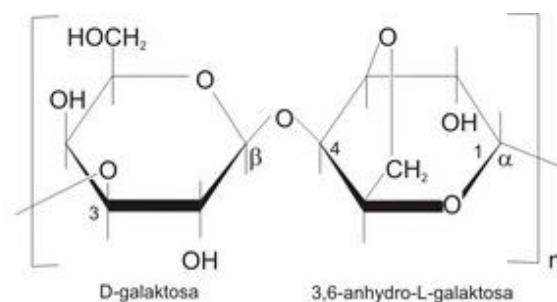
Lineární molekuly DNA mají tendenci mít větší tření v gelu kvůli svému roztaženému tvaru, což zpomaluje jejich pohyb při aplikaci elektrického pole. Tento rozdíl v pohybu mezi superhelikální a lineární DNA je důležitým faktorem při interpretaci výsledků gelové elektroforézy a při analýze struktury DNA.

2.1.1 Typy gelů využívaných při elektroforéze

Gely, využívané při elektroforéze, musejí splňovat několik vlastností. Mezi tyto vlastnosti patří homogenita, inertnost, pevnost a transparentnost a v neposlední řadě je velice důležité, aby se gely daly snadno připravit. Proto se nejčastěji využívá agaróza nebo polyakrylamid.

Agarózový gel

„Agaróza je lineární polysacharid, který se skládá z D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy.“ (Křemen et al. 1998) Gel se připravuje ve vodní lázni, kde se agar

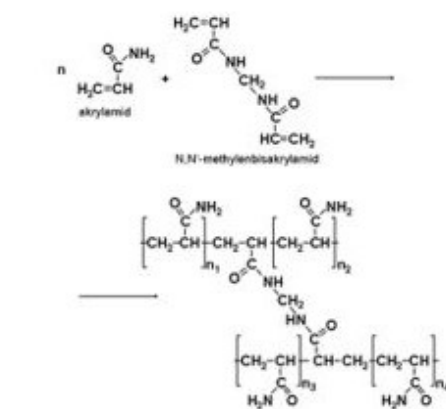


Obrázek 8 Vzorec Agarózy (zdroj:<https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za>)

rozpustí. Poté se gel nalije do šablony a přidá se druhá šablona vytvářející jamky. Tyto jamky jsou velice důležité pro další využití gelu. Do jamek se aplikují pozorované vzorky nukleových kyselin. Po zatuhnutí se šablona odstraní a nově vzniklá gelová podložka se přemístí do elektroforetického aparátu. (Křemen et al. 1998)

Polyakrylamidový gel

„Polyakrylamidový gel je tvořený z akrylamidu zesíťovaného bifunkčním N,N'-methylenbisakrylamidem.“ (Křemen et al. 1998) Jeho porozita a schopnost separace jsou závislé na celkové koncentraci a vzájemném poměru koncentrací monomerů. Obvyklá koncentrace gelu se pohybuje v rozmezí 3-20 %. V koncentrovaných gelech, které mají vyšší celkovou koncentraci monomerů, dochází k optimální separaci krátkých fragmentů DNA.



Obrázek 9 Vzorec Polyakrylamidu (zdroj: <https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za>)

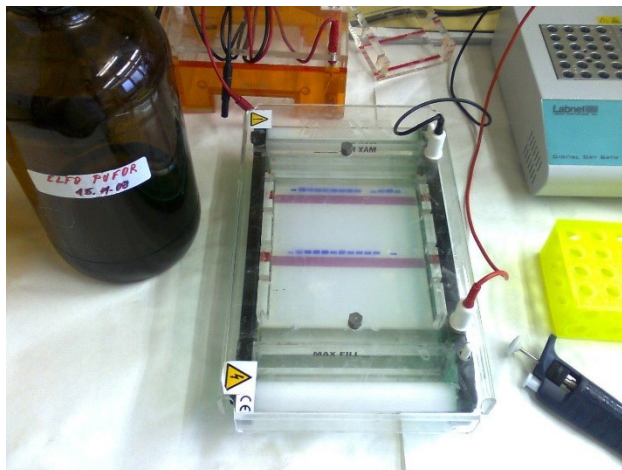
Naopak v řídkých gelech, s nižší celkovou koncentrací, se nejlépe separují řetězce DNA o délce 100-1000 nukleotidových párů.

Obvyklá délka gelu pro elektroforézu se pohybuje mezi 10-30 cm. Delší gely (50 cm a více) jsou využívány především pro sekvenování DNA. (Křemen et al. 1998)

2.1.2 Elektroforéza v agarózovém gelu

Před samotnou elektroforézou, pro lepší aplikaci na agarózový gel, je nezbytné vzorek DNA připravit. Tento proces zahrnuje několik následujících kroků. Nejprve je třeba rozštěpit molekulu DNA na jednotlivé fragmenty, které budou následně rozděleny gelovou elektroforézou. Pro lepší aplikaci vzorku na gel je třeba zvýšit hustotu roztoku, a k tomu se často využívá glycerol. Glycerol nejenže zvyšuje hustotu roztoku, ale také pomáhá udržet vzorek na povrchu gelu během aplikace.

Kromě glycerolu se ke vzorkům DNA přidávají i barviva, jako je bromfenolová modř a xylen-cyanol FF, která slouží k vizualizaci průběhu elektroforézy a umožňují přesné monitorování pohybu fragmentů DNA v gelu.



Obrázek 10 Elektroforéza na agarózovém gelu
(zdroj: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/elektroforeza-nukleovych-kyselin>)

Agarózové gely mohou mít různé koncentrace, což má významný vliv na dělení nukleových kyselin během elektroforézy. Například gel s koncentrací 0,5 % se často používá k separaci delších fragmentů DNA o délce 1-20 kbp, zatímco gel s koncentrací 1,5 % je vhodný pro separaci kratších fragmentů o délce 0,2-4 kbp. Pro fragmenty kratší než 1000 bp se obvykle upřednostňuje elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, který poskytuje vyšší rozlišení a přesnost při analýze kratších DNA fragmentů. (Křemen et al. 1998)

V agarózovém gelu se DNA pohybuje různou rychlostí podle své molekulové hmotnosti, přičemž platí, že čím je tato hmotnost vyšší, tím pomaleji se DNA pohybuje. „Pohyblivost DNA v agarózovém gelu je tedy nepřímo úměrná její molekulové hmotnosti.“ (Křemen et al. 1998)

2.1.3 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Jednou z nejrozšířenějších analytických metod je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Používá se od počátku 60. let minulého století. Polyakrylamidová elektroforéza je velmi efektivní separační technika, která umožňuje rozdělit řetězce DNA o libovolné délce až do obsahu 400-500 nukleotidů. Tato vysoká rozlišovací schopnost se využívá zejména pro

sekvenční analýzu DNA, která vyžaduje přesné oddělení a identifikaci nukleotidů v sekvenci. (Křemen et al. 1998)

2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) představuje metodu syntézy nukleových kyselin in vitro, která umožňuje specifickou replikaci, amplifikaci, určitého úseku DNA (Mullis a Faloona 1987). Amplifikace je proces zvýšení počtu kopií specifické sekvence DNA. Tento proces zahrnuje použití oligonukleotidových primerů (o délce 20-30 bází), které se vážou na počáteční body amplifikovaného fragmentu DNA, a opakované cykly tepelné denaturace DNA, žíhání primerů na jejich komplementární sekvence a prodlužování žíhaných primerů pomocí DNA polymerázy (Mullis a Faloona 1987).

PCR je automatizovaný proces, který probíhá v termocykleru, speciálním zařízení určeném pro řízení teplotních cyklů PCR. Reakční směs pro PCR obsahuje vzorek DNA, všechny čtyři typy nukleotidů, primerové oligonukleotidy a DNA polymerázu, jako je Taq polymeráza, izolovaná z bakterií termofilního původu. (Otová et al. 2020)

Produkty prodloužení primerů jsou schopné vázat další primery, což vede k exponenciálnímu nárůstu množství cílové DNA v každém cyklu replikace. Výsledkem je tedy exponenciální nárůst specifického cílového fragmentu DNA. (Mullis a Faloona 1987)

2.2.1 Průběh PCR

Předpokladem pro provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) je detailní znalost pořadí dusíkatých bází na začátku a na konci požadovaného úseku DNA, který chceme amplifikovat. (Otová et al. 2020) Pro úspěšnou amplifikaci je nezbytné vytvořit jednovláknové úseky DNA, nazývané primery, které slouží jako počáteční body pro syntézu nových DNA řetězců. (Otová et al. 2020)

Primerové oligonukleotidy, o délce 20-30 bází, se párují s komplementárními sekvencemi na cílové DNA. Tyto primery jsou orientovány tak, aby umožnily syntézu DNA polymerázou napříč oblastí mezi primerovými místy. (Mullis a Faloona 1987)

Thermocykler, zařízení používané pro provádění PCR, je programováno tak, aby v jednotlivých teplotních krocích byly automaticky dodržovány tepelné podmínky pro denaturaci DNA, připojení primerů a tvorbu komplementárních vláken DNA. (Otová et al. 2020) Tento proces se skládá ze tří hlavních kroků, které se cyklicky opakují během PCR.



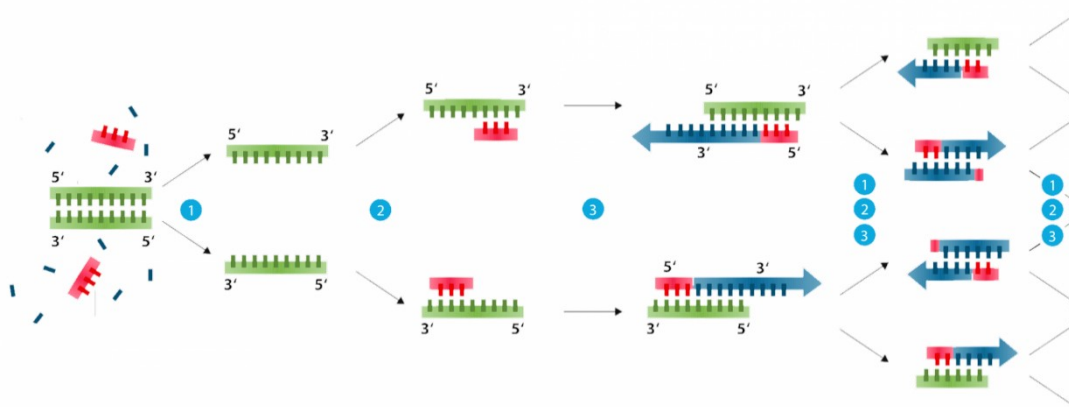
Obrázek 101 Thermocykler

(zdroj: <https://www.fishersci.be/shop/products/simpliamp-thermal-cycler-extended-warranty-package-5/p-7180381>)

Prvním krokem je denaturace. V průběhu PCR reakce je zkoumaný vzorek DNA nejprve tepelně denaturován při teplotě kolem 95 °C, čímž dochází k oddělení dvouvláknové DNA na jednotlivé vlákna. Poté se jednovláknové molekuly DNA hybridizují s primery při teplotě mezi 30-65 °C, což umožňuje jejich připojení ke specifickým úsekům DNA (Otová et al. 2020). Proto se druhému kroku říká hybridizace nebo anglicky annealing.

Třetí krok se nazývá elongace. Probíhá syntéza komplementárních vláken DNA při teplotě mezi 65-75 °C, kde působí Taq-polymeráza, izolovaná z bakterií termofilního původu, která je odolná vůči vysokým teplotám. Tato polymeráza přepisuje informaci z templátu DNA jen do místa navázání primerů, což zajišťuje, že nově vytvořené DNA řetězce odpovídají

žádanému úseku DNA. Tento cyklus se opakuje a umožňuje exponenciální amplifikaci cílové DNA sekvence během několika cyklů PCR. (Otová et al. 2020)



Obrázek 11 Schéma průběhu PCR

(zdroj: <https://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at27-pcr.html>)

2.3 Sekvenování DNA

Stanovení pořadí nukleotidů v genomu umožňuje porozumění genetické informaci a procesům v organismech. Jednou z historicky prvních metod sekvenování byla Sangerova enzymatická metoda, která získala široké uznání. Tato metoda využívala terminaci syntézy nového vlákna DNA po začlenění dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTP), které zabraňovaly dalšímu růstu řetězce. Výslednými fragmenty DNA byly pak různě dlouhé a obsahovaly informaci o pořadí nukleotidů. (Otová et al. 2020)

S postupem času však tuto metodu v mnoha ohledech překonala kapilární elektroforéza s laserovou detekcí fluorescenčně značených ddNTP. Tato technika umožnila automatizaci procesu sekvenování a výrazné zvýšení rychlosti a efektivity analýzy DNA.

V současnosti je nejčastěji používanou metodou sekvenování nové generace (NGS). Tato přímá diagnostická metoda umožňuje automatizované paralelní sekvenování velkého množství fragmentů DNA. To poskytuje možnost sekvenovat nejen jednotlivé geny, ale i celé genomy od více jedinců najednou. Tím se NGS stává neocenitelným nástrojem v oblasti genetické diagnostiky a výzkumu. (Otová et al. 2020)

2.3.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS), česky sekvenování nové generace, představuje revoluční metodu v oblasti sekvenování DNA, která umožňuje paralelní sekvenování milionů malých fragmentů DNA současně. Tato technologie je založena na bioinformatických analýzách, které sestavují tyto fragmenty a mapují je na lidský referenční genom, což umožňuje detailní analýzu jednotlivých bází v genomu. (Behjati a Tarpey 2013)

NGS má významnou výhodu oproti tradičnímu Sangerovu sekvenování v zachycování širšího spektra mutací. Zahrnuje malé změny bází, inserce a delece DNA, ale také velké genomové delece exonů nebo celých genů a přestavby, jako jsou inverze a translokace. Tím umožňuje získání komplexního pohledu na genomické změny v jediném experimentu. (Behjati, Tarpey, 2013)

Díky své neomezené citlivosti se NGS stává nezbytným nástrojem v genetické diagnostice. Na rozdíl od kapilárního sekvenování, které vyžaduje předběžné znalosti zkoumaného genu nebo lokusu, je NGS neselektivní a umožňuje zkoumání celých genomů nebo exomů k odhalení nových mutací a genů způsobujících onemocnění. (Behjati a Tarpey 2013)

2.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je hlavním nástrojem pro sledování fyziologie buněk. Umožňuje vizualizaci buněčných struktur a procesů s vysokým rozlišením. Přestože princip fluorescence a použití optických filtrů zůstávají podobné, konstrukce mikroskopů se vyvíjejí s cílem zlepšit kontrast obrazu a prostorové rozlišení. Princip fluorescence spočívá ve vyzařování světla látkou po absorpci vyšší energie, jako je UV záření, a následné emisi světla o větší vlnové délce. To umožňuje identifikaci a lokalizaci specifických molekul a struktur v buňce. (Sanderson et al. 2014)

Existují dvě hlavní formy fluorescenční mikroskopie: primární fluorescenci, známou také jako autofluorescence, a sekundární fluorescenci, kde se uměle dodané fluoreskující barvivo váže na specifické struktury buněk. Tato technika umožňuje identifikaci a studium různých buněčných procesů, včetně apoptózy, buněčného cyklu a rozlišení živých a mrtvých buněk. (Válová 2016)

Mezi nejmodernější techniky patří širokoúhlá mikroskopie, která umožňuje zobrazit rozsáhlé oblasti vzorku s vysokým rozlišením a kontrastem. Další inovativní metodou je laserová skenovací konfokální mikroskopie, která umožňuje získat ostré a kontrastní obrazy za použití laserového paprsku k osvětlení jednotlivých bodů vzorku a eliminuje nežádoucí signály z jiných rovin. Dvoufotonová mikroskopie je pokročilou technikou umožňující proniknout hlouběji do vzorku s minimálním poškozením a zkoumat živé buňky a tkáně ve větší hloubce. Tyto moderní metody fluorescenční mikroskopie přinášejí nové možnosti pro studium buněčné fyziologie a rozvoj lékařské diagnostiky.

2.4.1 Princip fluorescenční mikroskopie

Základní proces fluorescence spočívá v absorpci světelné energie indikátorem a následné emisi části této světelné energie o několik nanosekund později. Protože při tomto procesu dochází ke ztrátě části energie, má emitovaný foton menší energii než foton absorbovaný.

Světlo s krátkou vlnovou délkou (směrem k modré) má vyšší energii než světlo s dlouhou vlnovou délkou (směrem k červené). Proto má světlo emitované z indikátoru obvykle delší vlnovou délku než absorbované (excitační) světlo. Tento rozdíl, mezi excitační vlnovou délkou a emisní vlnovou délkou se nazývá Stokesův posun. (Sanderson et al. 2014)

Při provádění fluorescenční mikroskopie je důležité mít vhodné vybavení, jako jsou zdroje UV záření, excitační filtry a ochranné filtry. Zároveň je nutné minimalizovat riziko vybělení, kdy se fluorofory rozkládají pod vlivem intenzivního záření.

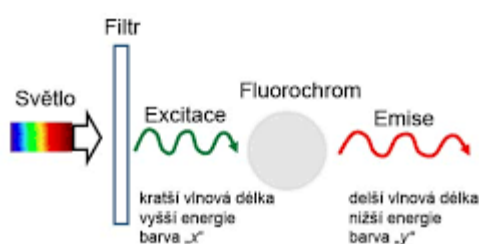


*Obrázek 12 Fluorescenční mikroskop
(zdroj: <https://www.mikroskopy-optika.cz/produkt/fluorescenci-mikroskop-model-b-383fl>)*

Fluorescenční mikroskopie je nenahraditelným nástrojem v moderní biologické a lékařské diagnostice, a to díky své citlivosti a schopnosti zachytit i nízké koncentrace fluorochromů. (Válová 2016)

2.4.2 Aplikace fluorescenční mikroskopie ve vizualizaci DNA

Fluorescenční mikroskopie využívá různé fluorochromy, jako jsou DAPI nebo propidium jodid, které se vážou na cílové struktury v buňce a umožňují jejich detekci s vysokou specificitou. (Válová 2016)



Obrázek 13 Schéma excitace a emise fluorochromu
(zdroj: <https://labguide.cz/reagencie/fluorochromy/>)

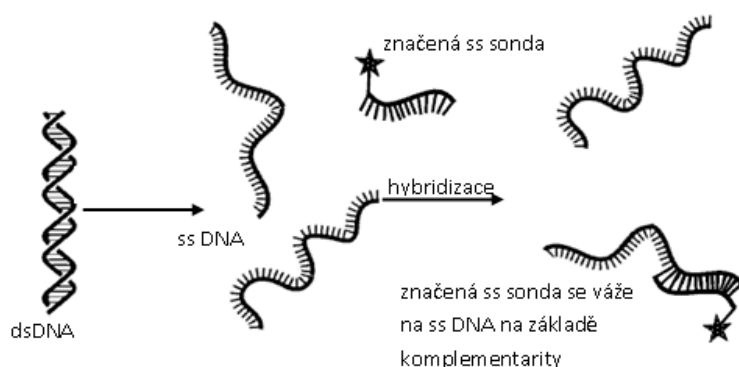
2.4.3 Využití fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie umožňuje širokou škálu aplikací v buněčné biologii, molekulární biologii a lékařské diagnostice. Od kontrastování buněčných struktur po detekci specifických antigenů a protilátek, tato technika poskytuje důležité informace o buněčných procesech a patologických stavech. Využití imunofluorescence v klinické praxi má zásadní význam při diagnostice infekčních onemocnění, autoimunitních chorob a nádorových onemocnění, což zvyšuje efektivitu léčby a prognózu pacientů. (Válová 2016)

2.5 Molekulární hybridizace

Molekulární hybridizace umožňuje studium genetických struktur a interakce mezi nimi. Identifikuje a lokalizuje specifické sekvence nukleových kyselin. Tato technika využívá schopností nukleových kyselin, jako je DNA a RNA, se navzájem vázat na základě komplementarity jejich nukleotidových sekvencí. Vznikají hybridní molekuly s různými kombinacemi: DNA:DNA, DNA:RNA nebo RNA:RNA. Stabilita hybridních molekul se liší v závislosti na typu molekulárního páru. Hybridy RNA:RNA jsou méně stabilní než RNA:DNA a DNA:DNA. (Křemen et al. 1998)

Pro detekci konkrétních sekvencí nukleových kyselin se využívají sondy, což jsou krátké oligonukleotidy nebo polynukleotidy s komplementárním nukleotidovým pořadím k cílové sekvenci. Tyto sondy mohou být značeny radioaktivními izotopy nebo neradioaktivními značkami a hybridizují s cílovou sekvencí za přísných podmínek pouze v případě přesné komplementarity. Pokud nejsou přesně komplementární hybridizují se i za méně přísných podmínek. Hybridizace lze provádět buď v roztoku, kde se hybridní molekuly separují chromatograficky nebo ultracentrifugací, nebo na nosičích, kde se analyzovaná nukleová kyselina imobilizuje na membráně a následně probíhá hybridizace. (Křemen et al. 1998)



Obrázek 14 Princip hybridizace
(zdroj: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-southern_blotting&lang=cz)

Pokročilou technikou molekulární hybridizace je hybridizace in situ, která umožňuje lokalizovat hybridní molekuly přímo v buňkách pomocí mikroskopie nebo elektronové mikroskopie. Tato metoda poskytuje důležité informace o prostorovém uspořádání nukleových kyselin a interakcích v buňce. (Křemen et al. 1998)

2.5.1 Hybridizace in situ

In situ hybridizace je jednou z nejčastějších metod hybridizace v molekulární biologii, která umožňuje přímou lokalizaci specifických nukleových kyselin v buňkách či tkáních. Tato technika je důležitá pro studium genové exprese, struktury chromozomů a genomických změn, které souvisí s různými patologickými stavy. In situ hybridizace se využívá k identifikaci genů, sledování jejich exprese a lokalizaci specifických sekvencí DNA či RNA v buněčných strukturách. (Levsky & Singer, 2003)

2.5.2 FISH

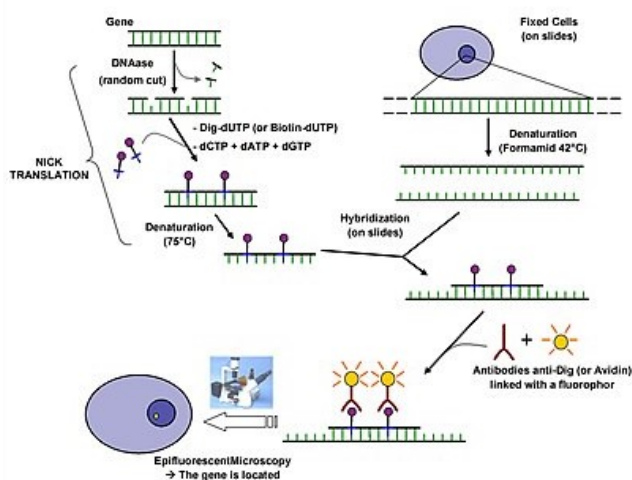
FISH metoda neboli Fluorescenční In Situ Hybridizace se využívá v cytogenetice. Pomocí fluorescenčně značené DNA sondy se detekují určité úseky DNA či chromozomů, které jsou vybarvené.

Tato metoda využívá sondy obsahující fluorofor, které se hybridizují s komplementárními sekvencemi v testovaných buňkách a tkáních a jsou následně detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo jiného zobrazovacího systému.

Původně byla vyvinuta jako nástroj pro fyzické mapování genů v chromozomech, FISH se rychle rozšířila do oblasti genetické diagnostiky, zejména pro detekci různých genetických anomálií, jako jsou aneuploidie, mikrodelece/mikroduplikace syndromů a chromozomální přestavby.

Nejnovější technologické pokroky v oblasti FISH zahrnují metody zlepšující účinnost značení sond a použití zobrazovacích systémů s vysokým rozlišením, což umožňuje přímou vizualizaci chromozomální organizace a transkripce RNA v jednotlivých buňkách.

Nové metody, jako je FISH zprostředkovaná Cas9 (CASFISH) a oligopaint-FISH, umožňují in situ vizualizaci chromozomových haplotypů a exprese mRNA více genů v rámci jednotlivých buněk. Tyto inovace odhalují nové poznatky o vnitrojaderné genomové struktuře a subcelulární transkripční dynamice, což přispívá k lepšímu porozumění biologickým procesům na úrovni jednotlivých buněk. (Cui et al. 2016)



Obrázek 15 Schéma FISH metody (zdroj: https://www.wikiskripta.eu/w/Hybridizace_in_situ)

3 Barvení DNA

Barvení je klíčovou technikou pro značení, detekci, vizualizaci a identifikaci biologických vzorků. V biologii, chemii a medicíně se barviva běžně používají k detekci nukleových kyselin, proteinů a dalších biologických složek. (Gupta et al. 2024)

Barviva, pro barvení nukleových kyselin, byla použita jako indikátor velikosti fragmentů, množství a kvality DNA na základě fluorescenčního signálu přítomného v gelu, ethidiumbromidem, už v roce 1972 a 1973. (Haines et al. 2015)

Barviva jsou chemické sloučeniny, které po navázání na určitý cíl vyvolávají vizuální odezvu. Pokud se cíl výzkumu ve vzorku nenachází, barvivo nevykazuje žádnou viditelnou odezvu. Díky těmto vlastnostem jsou barviva užitečná pro detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti specifického cíle ve vzorku. V závislosti na cíli a zkušebních podmínkách, může být pozorovatelná odezva kvalitativní nebo kvantitativní.

V biotechnologickém výzkumu je detekce a kvantifikace nukleových kyselin běžným úkolem. Při screeningu nukleových kyselin se používají dostupná nebezpečná a mutagenní fluorescenční barviva, jako je propidium jodid (PI), ethidium bromid (EtBr) a SYBR green. (Gupta et al. 2024)

3.1 Interkalační barviva

Interkalační barviva patří mezi hlavní typy barviv používaných k barvení nukleových kyselin. Tyto barviva mají schopnost spojit se s DNA a zvýšit svou fluorescenci, což je zásadní pro vizualizaci a analýzu DNA. Interkalační barviva mají planární strukturu. Díky ní se mohou vmezeřit neboli interkalovat mezi vlákna dvoušroubovice DNA. Příkladem je ethidium bromid, propidium jodid a SYBR® Green I.

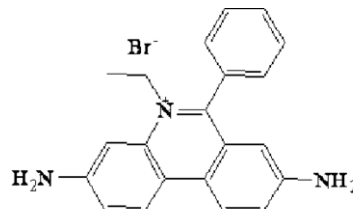
Ethidiumbromid a propidium jodid jsou dlouhodobě známé interkalační barviva, zatímco SYBR® Green I je mladší a modernější fluorochrom, který se stává preferovanější volbou pro barvení DNA.

Interkalační barviva se využívají v molekulární biologii pro různé aplikace, včetně elektroforetické separace DNA, kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)

a mikroskopie. Jejich použití umožňuje přesnou analýzu a vizualizaci nukleových kyselin. (Haines et al. 2015)

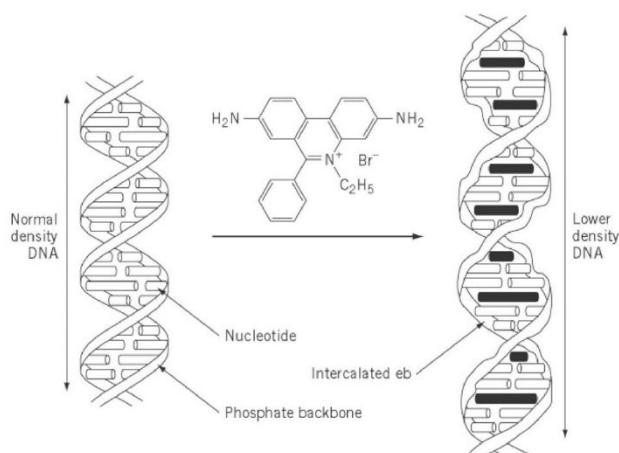
3.1.1 Ethidumbromid

Ethidumbromid je tmavě červená, netěkavá a ve vodě rozpustná sloučenina, která se používá jako marker nukleových kyselin při elektroforéze. Hlavní výhodou jejího využití je intenzivní fluorescenční odezva pod UV světlem, která se po navázání na DNA zesílí téměř 20krát. Díky tomu našla uplatnění v různých lékařských a farmaceutických laboratořích. (Křemen et al. 1998)



Obrázek 16 Vzorec Ethidumbromidu (zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-ethidium-bromide-and-doxorubicin_fig1_244970113)

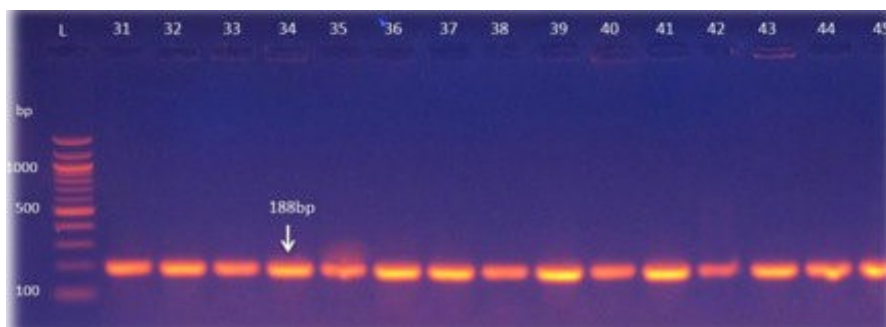
EtBr se interkaluje do hlavního žlábků DNA a pomáhá rozlišit fragmenty DNA díky své fluorescenční vlastnosti při vazbě na DNA. Ethidumbromid je díky své nízké ceně a vysoké citlivosti již po desetiletí nejpoužívanějším barvivem pro screening nukleových kyselin v agarózovém gelu.



Obrázek 17 Interkalace EtBr do DNA (zdroj: <https://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/>)

Vzhledem k tomu, že se specificky váže na molekuly nesoucí informaci, vyznačuje se silnou mutagenitou, karcinogenitou a teratogenitou v závislosti na organismu a okolnostech expozice. Proto práce s tímto karcinogenním materiálem vyžaduje dodržování zvláštních protokolů pro manipulaci a likvidaci. Náklady na detoxikaci a nakládání s odpadem však činí toto barvivo drahým a nebezpečným pro výzkumné pracovníky i životní prostředí. (Gupta et al. 2024)

Bylo zjištěno, že ethidiumbromid je genotoxický v koncentračním rozmezí obvykle používaném pro barvení gelů (0,5 µg/ml) a cytotoxický při nejvyšší testované dávce a je klasifikován jako silný mutagen. Ethidiumbromid interkaluje s dsDNA a vzhledem k tomuto mechanismu je dobře známou mutagenní sloučeninou.

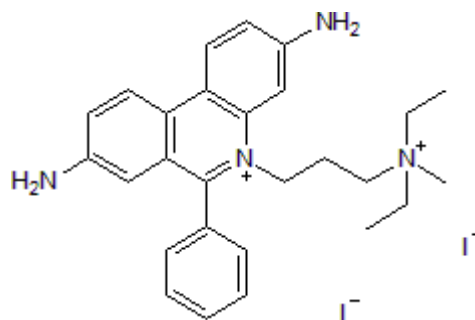


Obrázek 18 EtBr na agarózovém gelu pod UV světlem
(zdroj: https://www.researchgate.net/figure/fig-2A2B2C-Ethidium-bromide-stained-agarose-gel-electrophoresis-of-PCR-products_fig1_331089567)

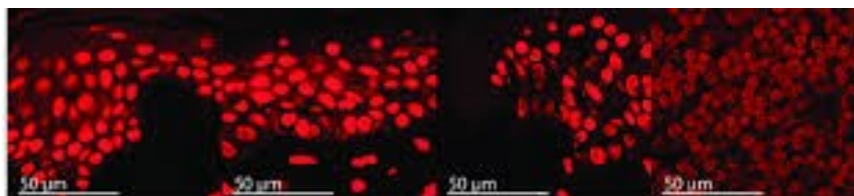
Historicky je nejběžnějším barvivem používaným pro barvení gelů, avšak vzhledem k jeho toxicitě a mutagenitě se dává přednost jiným barvivům, která jsou bezpečnější pro uživatele i životní prostředí. (Haines et al. 2015)

3.1.2 Propidium jodid

Propidium jodid je interkalující barvivo, které se často používá k barvení DNA při fluorescenční mikroskopii a průtokové cytometrii. Při interakci s dvouřetězcovou DNA PI emituje červené světlo (kolem 617 nm), což umožňuje jeho použití jako kontrastního činidla při vizualizaci buněčných jader nebo analýze buněčného cyklu. Jeho maximální vlnovou délku excitace je přibližně 494 nm.



Obrázek 20 Vzorec Propidium jodidu
(zdroj: https://www.rndsystems.com/products/propidium-iodide_5135)



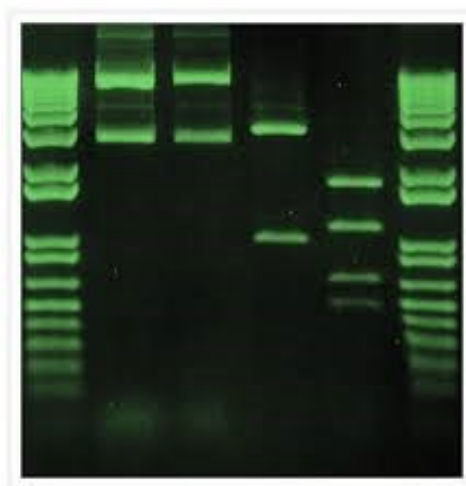
Obrázek 19 Kožní štěp obarvený PI ve fluorescenčním mikroskopu
(zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Propidium-iodide-PI-staining-in-human-full-thickness-skin-graft-cross-sections-No_fig3_321510625)

Při vizualizaci DNA propidium jodidem se DNA v buněčném jádře jeví jako červená při zelenožluté nebo modré excitaci (laserová excitace 568, resp. 488 nm) Protože se PI interkaluje mezi nukleotidový pár guanin a cytosin, barví nejen DNA, ale také RNA. (Suzuki et al. 1997)

3.1.3 SYBR Green

SYBR Green byl první z nové generace barviv na nukleové kyseliny v gelu, která byla představena v roce 1995.(Konschak a Tinhofer 2011) SYBR Green I (SG) je jedním z nejběžněji používaných interkalačních činidel pro značení dvouřetězcové DNA v kvantitativní polymerázové řetězové reakci (qPCR). Oproti tradičnímu ethidium bromidu SG nabízí jasnější fluorescenci a nižší riziko expozice pro člověka. (Dymond 2013) Díky své vysoké afinitě, velkému zesílení fluorescence při vazbě na dvou řetězcovou DNA (dsDNA), lze SYBR Green použít k detekci pouhých 20 pg dsDNA v jednom pásu elektroforézního gelu. (Konschak a Tinhofer 2011)

SYBR® Green I patří mezi kyanidová barviva, která jsou rovněž využívána jako sondy a značky spojené s nukleovými kyselinami v různých aplikacích, včetně průtokové cytometrie a kvantifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a elektroforézy v kapilárách a gelech.



Obrázek 21 SYBR green na agarózovém gelu
(zdroj:<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S33102>)

Oproti ethidiumbromidu jsou kyaninová barviva preferována pro svou nižší toxicitu a mutagenitu. Ethidiumbromid byl klasifikován jako silný mutagen, zatímco SYBR® Green I byl shledán slabým mutagenem. Přestože jsou toxická, v laboratořích se stále běžně používají. (Haines et al. 2015)

Tento fluorochrom je charakterizován svou nespecifickou povahou, což umožňuje jednodušší použití pro více vzorků bez složité přípravy. Nicméně, tato nespecifická afinita může být také problémem, pokud jsou primery nedostatečně navrženy. SG se váže na jakékoli dsDNA, včetně dimerů primerů a nespecifických produktů PCR. To může vést k ovlivnění fluorescence zájmového produktu a komplikovat analýzu. Aby se těmto problémům předešlo, používají se softwary pro návrh primerů, které pomáhají minimalizovat nespecifické interakce a optimalizovat podmínky qPCR. (Dymond 2013)

3.1.4 DHDM

Ve studii publikované na začátku tohoto roku, se setkáváme s látkou 3,4-dihydroxy-5,6-dimethoxyflavon zkráceně DHDM, která byla izolována z listů *A. nigra*. Je jedním z flavonoidů studovaných pro svou schopnost vázat se na DNA. Již dříve bylo prokázáno, že flavonoidy, jako jsou kvercetin a rutin, interkalují s DNA, což vede ke vzniku stabilních komplexů.

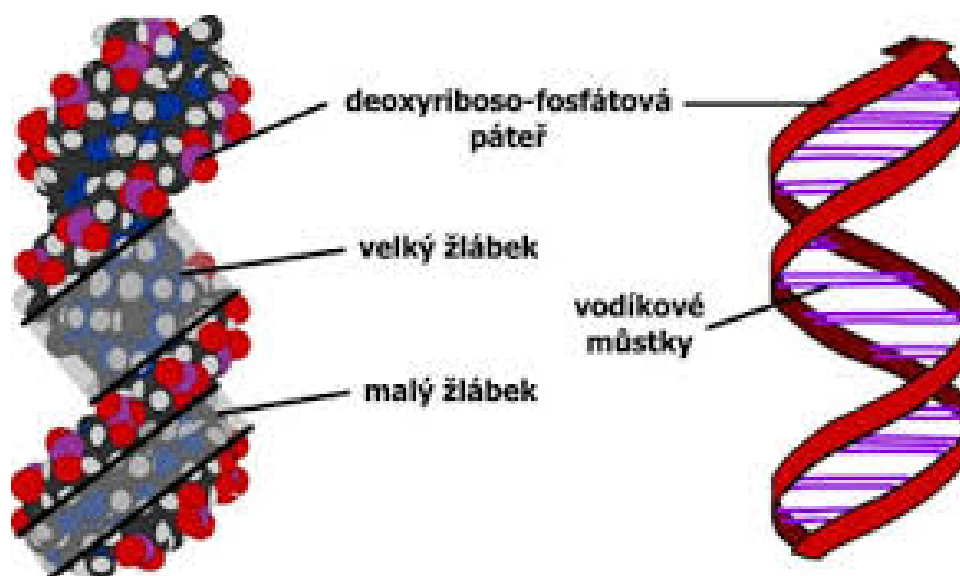
Nová studie se zaměřila na DHDM a potvrdila jeho schopnost vázat se na DNA, což bylo demonstrováno pomocí agarosové elektroforézy. Tato výzkumná práce ukazuje, že DHDM má potenciál jako alternativní barvivo k ethidiumbromidu při barvení nukleových kyselin, zejména dvouřetězcové DNA (dsDNA).

V porovnání s EtBr vykázal DHDM lepší účinnost barvení DNA, přičemž maximální intenzita pásu byla pozorována při koncentraci 50 ng DNA. To naznačuje, že DHDM může být slibnější volbou pro barvení DNA ve srovnání s EtBr, který je běžně používaným barvivem, ale má nežádoucí mutagenní a toxické vlastnosti. Navíc se ukázalo, že DHDM neinterkaluje s jednořetězcovou lineární DNA, ale váže se na dvouřetězcovou lineární DNA. Tato specifita DHDM pro dsDNA je klíčem k jeho aplikacím v biologických testech, jako jsou testy životaschopnosti buněk a rozlišování mezi živými a mrtvými buňkami.

Lze tedy říci, že výsledky této nově publikované studie naznačují, že DHDM má potenciál stát se alternativou k EtBr pro barvení DNA. Jeho schopnost vázat se na dsDNA a vytvářet s ní stabilní komplex naznačuje, že DHDM může být užitečným nástrojem pro studium DNA a dalších biologických procesů, kde je důležitá vizualizace nukleových kyselin. (Gupta et al. 2024)

3.2 Barvy vázající se na malé žlábký DNA

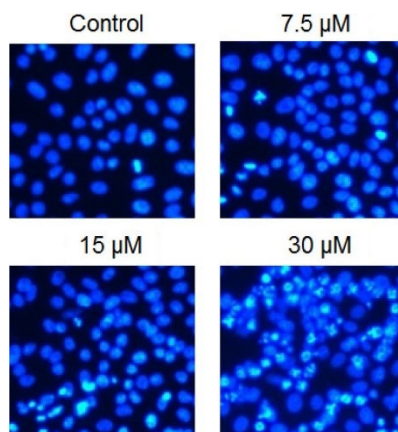
Alternativní barviva byla vyvinuta s cílem minimalizovat mutagenitu a toxicitu spojenou s použitím ethidiumbromidu a SYBR® Green I. Tato barviva se vyhýbají problémům spojeným s mutagenitou tím, že interagují se žlábký DNA, místo aby působila jako interkalátory. Patří mezi ně barviva, jako je Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, NSW, Austrálie), dále sem patří GelRed™ (Biotium) a GelGreen™ (Biotium), která jsou navržena tak, aby byla ještě méně mutagenní, protože neprostupují buněčnou membránou. Příkladem barviva vázajícího se na malé žlábký je barvivo DAPI. (Haines et al. 2015)



Obrázek 22 Velký a malý žlábek DNA (zdroj:http://www.studiumbiochemie.cz/meziobor_na2.html)

3.2.1 DAPI

DNA v buňkách se barví pomocí DAPI (4'6-diamidino-2-fenylindol) pro fluorescenční mikroskopii. Při barvení pomocí DAPI se DNA při ultrafialovém (uv) osvětlení jeví jako modrobílá fluorescence, a proto lze určit polohu buněčných jader a nukleoidů organel. Většina laserových konfokálních mikroskopů však nemá systém uv laserového osvětlení a toto použití DAPI je omezeno na specializovaný systém. (Suzuki et al. 1997)



Obrázek 23 Jádra buněk HeLa obarvená DAPI
(zdroj: https://www.researchgate.net/figure/DAPI-staining-showing-nuclear-morphology-of-the-AL-treated-HeLa-cells-The-experiments_fig3_338841375)

3.2.2 RedSafe, GelGreen, GelRed, Diamond Dye

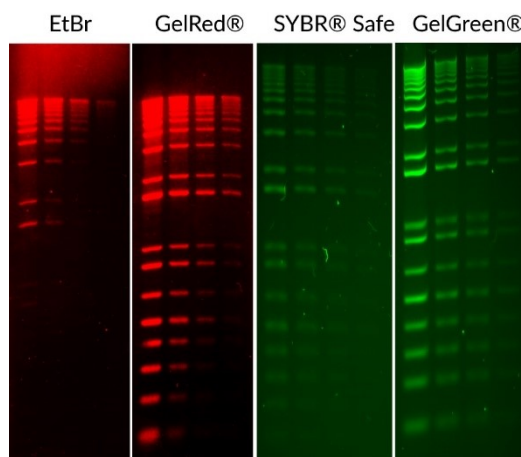
RedSafe, GelGreen, GelRed, Diamond Dye jsou komerčně dostupná barviva, o nichž se tvrdí, že jsou citlivější a mají nižší meze detekce, a navíc jsou méně toxická pro uživatele a životní prostředí.

Ve studii, publikované v roce 2015, porovnávají tato čtyři barviva pro jejich použití při barvení gelů a komentují jejich významné vlastnosti ve srovnání s ethidiumbromidem a SYBR® Green I. Tento článek podrobně popisuje vlastnosti dostupných barviv a jejich citlivost pro detekci DNA a jejich schopnost prostupovat buněčnou membránou.

Výrobce uvádí, že RedSafe je méně toxický a mutagenní než ethidiumbromid, a podle výsledků této studie, je stejně citlivý jako ethidiumbromid. Na základě těchto údajů není toto barvivo vhodné pro detekci DNA o nízkých koncentracích, protože nad 1 ng bylo dosaženo pouze nízkých signálů. Studie u RedSafe ukázala lineární závislost mezi koncentrací a intenzitou signálu.

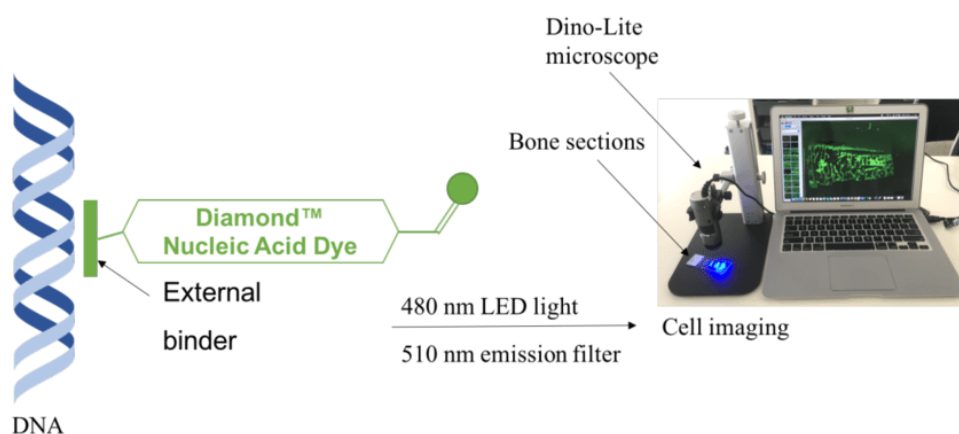
SYBR® Green I měl nejvyšší intenzitu ze všech barviv, což ukazuje, že toto barvivo má větší zesílení signálu, pokud je přítomna DNA. Druhou nejvyšší intenzitu mělo barvivo Diamond™ Nucleic Acid Dye, které rovněž dokázalo detekovat až 0,5 ng DNA, což ukazuje, že je stejně citlivé jako SYBR Green I. Mělo podobnou intenzitu signálu a hodnotu lineární závislosti. Toto barvivo má také tu výhodu, že je méně mutagenní než SYBR Green I, jak uvádí výrobce.

Barviva GelRed™ a GelGreen™ byla schopna detekovat až 0,5 ng DNA a obě vykazovala lineární vztah mezi koncentrací DNA a intenzitou signálu. GelGreen™ měl mnohem nižší intenzitu signálu ve srovnání s barvivem Diamond™ Nucleic Acid Dye, což ukazuje, že zesílení je u GelGreen™ při interakci s DNA mnohem nižší. Prodloužení doby barvení nebo přidání barviva před odlitím gelu může zvýšit intenzitu signálu.



Obrázek 24 Porovnání vizualizačních barviv výrobce (zdroj: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>)

Bylo zjištěno, že GelRed™ je nejcitlivější a nejbezpečnější barvivo pro použití s excitací UV světlem a GelGreen™ i Diamond™ Nucleic Acid Dye jsou citlivá a bezpečnější barviva při použití excitace modrým světlem. (Haines et al. 2015)



Obrázek 25 Diamond™ Nucleic Acid Dye a model fluorescenčního barvení in-situ (zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Diamond-Nucleic-Acid-Dye-and-Fluorescence-in-situ-staining-model-137-138-DNA-isolation_fig9_355183218)

Tato studie ukázala, že barvivo Diamond™ Nucleic Acid Dye prostupuje buněčnou membránou, a proto by nebylo tak bezpečné jako GelGreen™, ale mělo větší intenzitu signálu.

Tyto získané údaje ukázaly, že všechna barviva měla lineární vztah mezi koncentrací DNA a intenzitou získaných signálů. Nicméně ethidiumbromid má ve srovnání s ostatními barvivy nízkou hodnotu lineární závislosti. (Haines et al. 2015)

4 Výuka vizualizačních metod DNA na středních školách

Biologie na středních školách obvykle tvoří samostatný předmět, který je systematicky začleněn do vzdělávacího programu. Studenti se s ním setkávají v prvním až třetím ročníku, kde je zpravidla povinnou součástí vzdělání. Ve čtvrtém ročníku je často nahrazena volitelnými biologickými semináři, které umožňují studentům specializovat se podle svého zájmu a potřeb.

Výuka biologie na středních školách má za cíl nejen poskytnout studentům základní povědomí o biologických procesech, ale také je připravit na další studium nebo uplatnění v oblasti vědy a zdravotnictví. Kromě samotné biologie jsou do výuky často začleňována i témata z dalších vzdělávacích oborů, jako je geologie, výchova ke zdraví a environmentální výchova. Tímto způsobem se studenti seznamují s komplexními aspekty přírodních věd a učí se porozumět vzájemným vztahům mezi živými organismy a jejich prostředím.

Integrované vzdělávací obory a nově vytvořené předměty často umožňují širší pohled na biologické téma, propojují je s jinými disciplínami a podporují multidisciplinární přístup k vzdělávání. Takový přístup může studentům poskytnout komplexnější a hlubší porozumění biologickým konceptům a jejich významu v kontextu celého přírodního světa. (Pavlasová 2014)

4.1 Příklady využití vizualizačních metod v praktické výuce

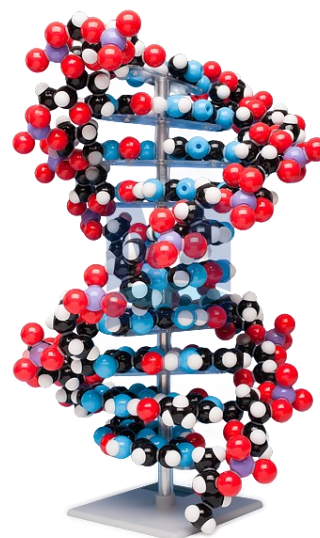
V dnešním vzdělávacím prostředí je třeba čelit výzvě, a to zaujmout a motivovat žáky. S přístupem k internetu mají studenti snadný přístup k obrovskému množství informací a zdrojů, což vytváří výzvu v tom, jak je udržet zapojené do výuky. Důsledkem je, že pro ně mnohdy není nic nového, protože mají tendenci si vyhledat informace sami.

Tento trend vyžaduje inovativní a kreativní přístup k výuce, který umožní učitelům překonat pasivní přístup studentů k učení. Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je poskytnout žákům prostředí, ve kterém mohou aktivně zkoumat a objevovat témata, která je zajímavá. To lze dosáhnout například pomocí praktických experimentů, diskuzních formátů, projektových prací či použitím nových technologií ve výuce.

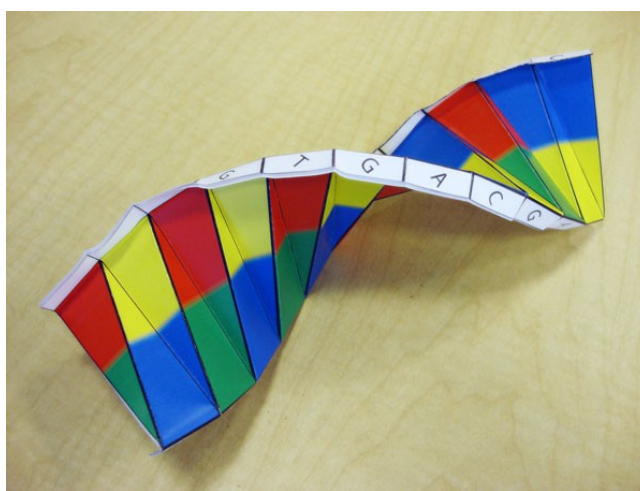
4.1.1 Struktura DNA

Na vizualizaci struktury DNA ve výuce se nejčastěji využívají modely a animace. Ty mají za úkol znázornit jednotlivé nukleotidy, které vytváří výslednou dvoušroubovici DNA. Můžeme mít modely plastové, jako je například stavebnice Molymod DNA (Martyčák [b.r.]), nebo existují papírové modely, které se nazývají DNA origami.

DNA je jednou z neznámějších biologických struktur. Abychom lépe pochopili její složitou strukturu a principy párování bází, můžeme využít kreativní metodu zvanou DNA origami. Tato metoda vychází z návrhu, který vytvořil Alex Bateman z EMBL-EBI, a umožňuje vytvořit 3D modely DNA pomocí skládání papíru. Verze DNA, která byla vytvořena ke stažení, je pravotočivá DNA. (Anon. [b.r.]



Obrázek 26 Velký model DNA Molymod
(zdroj: <https://www.ucebnipomucky.net/p/velky-model-dna>)



Obrázek 27 Origami DNA
(zdroj: <https://healthmatters2day.blogspot.com/2011/11/dna-origami.html>)

Animace se využívají pro znázornění jak struktury DNA, tak i pro lepší vysvětlení jednotlivých procesů. U replikace, se dá vysvětlit pomocí animace pořadí jednotlivých kroků, které enzymy se kdy napojují. Tyto animace můžeme najít například na stránce studiumbiochemie.cz, která využívá animační program Adobe Animate.

Úkolem žáků je zaklonovat „protein“ (v rámečku) z vektoru 1 do vektoru 2 pomocí restričních endonukleáz PstI a SacI. Restriční místa jsou ve vektorech zvýrazněna tučně. Jako restriční endonukleázy slouží nůžky. Po restrikci žáci přiloží přesahující konce inzertu i vektoru k sobě a „zaligují“ nový vektor pomocí izolepy.

Tuto názornou aktivitu na restriční štěpení jsem převzala od Ladislava Merty, který je učitelem na gymnáziu a zároveň se věnuje molekulární biologii. (Merta 2024)

4.1.3 Gelová elektroforéza

V dnešní době už jsou přístupné i zjednodušené verze všech těchto vizualizačních metod. Příkladem je stránka Bento.bio, která prodává přístroje, které je možné ve výuce využít. Jedná se o mobilní genomické zařízení Bento Lab, které kombinuje všechny základní nástroje pro molekulární biologii, obsahuje přenosný PCR přístroj, mikrocentrifugu, nádobu na gelovou elektroforézu a modrý LED transiluminátor.



Obrázek 30 Mobilní genomické zařízení Bento Lab (zdroj: <https://bento.bio/product/bento-lab/>)

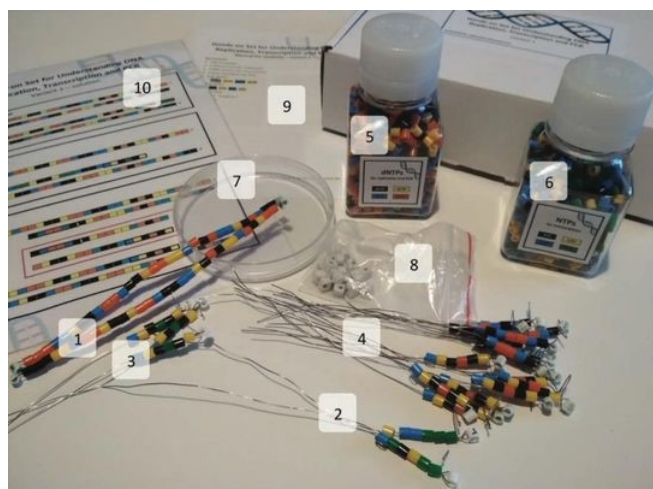
Sada Biotechnologie 101 je výukový nástroj, který přináší praktické zkušenosti s molekulární biologii přímo do třídy. Laboratoř Bento Lab spojuje všechny základní nástroje potřebné pro molekulární biologii v jednom přenosném zařízení. Sada Biotechnologie 101 je ideální pro ověření vzorků v terénu nebo jako inspirace pro praktické využití ve třídě.

Tato sada obsahuje všechny materiály potřebné pro prvotní použití laboratoře Bento Lab, včetně návodů a činidel. Bezpečně si procvičíte techniky. Obsahuje 10 miniprojektů založených na reálných příkladech výzkumu. Průvodce, který je v sadě přiložený, poskytuje podrobné instrukce, jak provádět genetickou analýzu a interpretovat výsledky. Vnitřní obsah sady zahrnuje směsi primerů PCR, FIREPol® Master Mix, agarózové tablety, elektroforetický pufr TBE, GelGreen® DNA Stain, 100 bp DNA Ladder a další potřebné reagensie pro experimenty. (Anon. [b.r.]

Dále existuje stránka na učební pomůcky conatex, která prodává sadu pro učitele. Tato sada obsahuje skoro všechny pomůcky pro gelovou elektroforézu a podrobnou příručku s návodem.

4.1.4 PCR

V roce 2020 v časopise *The American Biology Teacher* byl zveřejněn článek, který se zabývá lepším pochopením replikace DNA, transkripce a polymerázové řetězové reakce. Autoři vymysleli praktickou sadu, která je vyrobena z levných materiálů, jako jsou plastové korálky, vázací drát, guma na tužky, plastová Petriho miska, papírová krabice a plastové lahve nebo malé plastové sáčky uzavíratelné na zip. Sadu lze použít k různým účelům. Za prvé pomáhá studentům prakticky si osvojit pojem párování bází a dvouvláknové struktury DNA. Za druhé ji lze použít k demonstraci rozdílů mezi replikací a transkripcí. Zatřetí umožňuje nahlédnout do problematiky náhodného původu mutací. A samozřejmě může sloužit jako nástroj pro pokročilejší studenty k demonstraci techniky PCR.



Obrázek 31 Obsah sady pro demonstraci replikace, transkripce a PCR (zdroj: Merta et al. 2020)

Obsah sady: (1) dvouřetězcový DNA templát; (2) dva RNA primery pro replikaci; (3) tři RNA primery pro transkripci; (4) sedm párů primerů pro PCR; (5) volné dNTP v lahvičce; (6) volné NTP v lahvičce; (7) Petriho miska; (8) gumové "zátky"; (9) manuál pro studenty; a (10) klíč pro rychlé vyhodnocení výsledků.

Je třeba poznamenat, že sada má několik nedostatků, jako je krátká templátová molekula, pevné RNA primerů pro replikaci DNA. Tato sada je také orientována především na párování bází a nezahrnuje vodíkové vazby. Navzdory těmto nedostatkům však sada představuje užitečný a interaktivní nástroj pro výuku biologie na středních školách. (Merta et al. 2020)

4.1.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopy jsou velice nákladná zařízení, což omezuje jejich dostupnost pro běžné vzdělávací instituce. Vzhledem k vysokým finančním nákladům není běžné, že by tyto mikroskopy byly součástí klasické výbavy biologických laboratoří ve školách. Vzdělávací instituce se obvykle spoléhají na levnější alternativy mikroskopů. Avšak vývoj technologií může v budoucnu zvýšit dostupnost těchto pokročilých mikroskopů i ve školách.

4.1.6 Workshopy

Dobré je, že univerzity pořádají workshopy pro studenty, zejména v případech, kdy škola nemá dostatečné finanční prostředky na pořízení potřebného vybavení do svých laboratoří. Tyto workshopy poskytují studentům přístup nejen k potřebnému vybavení, ale také k odborným programům, které by jinak ve školní laboratoři nebylo možné absolvovat.

Díky těmto workshopům mají studenti možnost vyzkoušet si technologie a metody, které jsou mimo dosah běžného školního prostředí. To jim umožňuje rozšířit své znalosti a dovednosti v oblasti biologie a molekulární biologie, a to i za podpory zkušených výzkumníků a pedagogů. Takové zážitky nejenže přispívají k lepšímu porozumění probírané látky, ale také motivují studenty k dalšímu studiu a vědeckému bádání.

Například Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích má centrum pro přírodovědné vzdělávání, které aktivně podporuje zájem středoškolských studentů o biologii. Pravidelně pořádá bezplatné workshopy, které poskytují studentům možnost zapojit se do praktických aktivit spojených i s genetickými a molekulárními metodami. Např. 6.6.2024 Jihočeská

univerzita uspořádá workshop zaměřený právě na využití molekulárních metod. Tato akce umožní středoškolákům prakticky poznat procesy a techniky používané v moderní biologii. Studenti budou mít možnost seznámit se s PCR a s elektroforézou. (Anon. [b.r.]

Závěr

Tato práce byla zaměřena na vizualizaci DNA s ohledem na využití ve výuce biologie na středních školách. Hlavním cílem bylo popsat technologické metody vizualizace DNA a porovnat dostupná barviva pro vizualizaci DNA, abychom identifikovali možnosti efektivního využití těchto postupů ve výuce na středních školách.

V první části práce byla nastíněna základní struktura a vlastnosti DNA, včetně procesu replikace DNA, k lepšímu porozumění principů metod vizualizace. Dále byly prozkoumány nejběžnější techniky vizualizace DNA, jako je gelová elektroforéza, polymerázová řetězová reakce (PCR), sekvenování DNA, fluorescenční mikroskopie a molekulární hybridizace. Tato část práce poskytla pevný teoretický základ pro pochopení různých metod vizualizace DNA.

Ve druhé části byla detailněji zkoumána dostupná barviva, která se využívá ve vizualizaci DNA. Rešerše ukázala, že každá z těchto technik a barviv má své specifické vlastnosti a výhody, ale i nevýhody, které je nutno zvážit při jejich využití ve výuce na středních školách.

Zvláštní pozornost byla věnována možnostem aplikace těchto technik a barviv ve výuce, aby bylo možné studentům přiblížit metody molekulární biologie.

Na závěr lze konstatovat, že se jen zřídka objevuje experimentální vizualizace DNA ve výuce, kdy se ve školních laboratořích předvádí popsané technologické metody. Důvodem je nejspíše časová a finanční náročnost.

Seznam použitých informačních zdrojů

ALBERTS, Bruce, 2013. *Essential cell biology*. Fourth edition. New York, NY: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4454-4.

ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2006. *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.

Anon., [b.r.]. *DNA Origami* [online] [vid. 2024a-04-09]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/about-genomics/teaching-tools/dna-origami>

Anon., [b.r.]. *Elektroforéza v agarózovém gelu - sada pro učitele / Gelová elektroforéza, Restrikční analýza / Biologie | Učební pomůcky CONATEX* [online] [vid. 2024b-04-08]. Dostupné z: https://www.conatex.cz/catalog/biologie/imunologie_a_genetika/gelova_elektroforeza_r_estrikcni_analyza/product-elektroforeza_v_agarozovem_gelu_sada_pro_ucitele/sku-1086411

Anon., [b.r.]. *Workshopy pro středoškolské žáky - Přírodovědecká fakulta JU* [online] [vid. 2024c-04-08]. Dostupné z: <https://www.prf.jcu.cz/cz/fakulta/katedry/centrum-pro-prirodovedne-vzdelavani/juniorska-univerzita/workshopy-pro-stredoskolske-zaky>

BEHJATI, Sam a Patrick S. TARPEY, 2013. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* [online]. **98**(6), 236–238. ISSN 1743-0585, 1743-0593. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340

CUI, Chenghua, Wei SHU a Peining LI, 2016. Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **4** [vid. 2024-04-07]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2016.00089

DYMOND, Jessica S., 2013. Chapter Twenty Three - Explanatory Chapter: Quantitative PCR. In: Jon LORSCH, ed. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, Laboratory Methods in Enzymology: DNA, s. 279–289 [vid. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9

GUPTA, Manish Kumar, Sanjana SENTHILKUMAR a Latha RANGAN, 2024. 3, 5-Dihydroxy 4', 7-dimethoxyflavone–DNA interaction study for nucleic acid detection and differential cell staining. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **261**, 129713. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.129713

HAINES, Alicia M., Shanan S. TOBE, Hilton J. KOBUS a Adrian LINACRE, 2015. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. **36**(6), 941–944. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201400496

KONSCHAK, Robert a Ingeborg TINHOFER, 2011. Prestaining of PCR products with SYBR Green for agarose gel electrophoresis: advantages and limitations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. **49**(6), 1069–1071. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2011.171

KŘEMEN, Jaromír, Petr POHLREICH a Jana STRÍBRNÁ, 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-504-3.

LODISH, Harvey F., ed., 2008. *Molecular cell biology*. 6th ed. New York: W.H. Freeman. ISBN 978-0-7167-4366-8.

MARTYČÁK, RNDr Karel, [b.r.]. Velký model DNA | Učební pomůcky | RNDr. Karel Martyčák. www.ucebnipomucky.net [online] [vid. 2024-04-09]. Dostupné z: <https://www.ucebnipomucky.net/p/velky-model-dna>

MERTA, Ladislav, 2024. Rozhovor na téma: Aktivity ve výuce molekulární biologie na gymnáziu.

MERTA, Ladislav, Tomáš PINKR a Vanda JANŠTOVÁ, 2020. A Hands-On Set for Understanding DNA Replication, Transcription & Polymerase Chain Reaction (PCR). *The American Biology Teacher* [online]. **82**(1), 49–51. ISSN 0002-7685. Dostupné z: doi:10.1525/abt.2020.82.1.49

MULLIS, Kary B. a Fred A. FALOONA, 1987. [21] Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, Recombinant DNA Part F, s. 335–350 [vid. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6

MURRAY, Robert K., 2002. *Harperova Biochemie*. 23., 4. české. Jinočany: H & H. ISBN 80-7319-013-3.

OTOVÁ, Berta, Romana MIHALOVÁ a Klára BOBKOVÁ, 2020. *Základy biologie a genetiky člověka*. 2. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-4565-0.

PAVLASOVÁ, Lenka, 2014. *Přehled didaktiky biologie*. Praha: Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta. ISBN 978-80-7290-643-7.

SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN, 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2014**(10), pdb.top071795. ISSN 1940-3402, 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795

SUZUKI, Takeshi, Keiko FUJIKURA, Tetsuya HIGASHIYAMA a Kuniaki TAKATA, 1997. DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. **45**(1), 49–53. ISSN 0022-1554. Dostupné z: doi:10.1177/002215549704500107

TEPLÁ, Milada, [b.r.]. Biochemie - vzdělávací portál. *Studium biochemie* [online] [vid. 2024-04-09]. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/meziobor_na3.html

VÁLOVÁ, Pavla, 2016. Fluorescence. In: [online]. B.m. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/BBCMB_Fluorescence_2016.pdf

VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. *Biochemie*. 2. Praha: Academia. ISBN 80-200-0600-1.

WILSON, Geoffrey, Hua WANG, Daniel HEITER a Keith LUNNEN, 2012. Restriction Enzymes in Microbiology, Biotechnology and Biochemistry. *Encuentro*. **93**, 19–48.