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 |

2024

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 11.7.2024

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 zkratek ..... 8

Úvod ..... 9

1 Základní struktura a vlastnosti DNA ..... 10

1.1 Primární struktura DNA ..... 10

1.1.1 Nukleotidy ..... 11

1.2 Sekundární struktura DNA ..... 12

1.2.1 Vazby ve struktuře DNA ..... 13

1.2.2 Žlábky DNA ..... 16

1.2.3 Komplementarita bází ..... 18

1.3 Vlastnosti DNA ..... 19

1.4 Replikace DNA ..... 19

1.5 Štěpení DNA ..... 21

1.5.1 Restrikční endonukleázy ..... 21

2 Technologie využívané ve vizualizaci DNA ..... 23

2.1 Gelová elektroforéza ..... 23

2.1.1 Typy gelů využívaných při elektroforéze ..... 25

2.1.2 Elektroforéza v agarózovém gelu ..... 26

2.1.3 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu ..... 27

2.1.4 Vizualizace UV zářením ..... 28

2.1.5 Kapilární gelová elektroforéza ..... 28

2.2 Polymerázová řetězová reakce ..... 29

2.2.1 Průběh PCR ..... 29

2.3 Sekvenování DNA ..... 31

2.3.1 Metody sekvenování DNA ..... 31

2.3.2 Next Generation Sequencing (NGS) ..... 32
2.4 Fluorescenční mikroskopie ..... 36
2.4.1 Fluorescence ..... 36
2.4.2 Dělení fluorescenční mikroskopie ..... 37
2.4.3 Princip fluorescenční mikroskopie ..... 39
2.4.4 Aplikace fluorescenční mikroskopie ve vizualizaci DNA ..... 40
2.4.5 Využití fluorescenční mikroskopie ..... 40
2.5 Molekulární hybridizace ..... 41
2.5.1 Hybridizace in situ ..... 42
2.5.2 FISH ..... 42
3 Barvení DNA ..... 44
3.1 Interkalační barviva ..... 44
3.2 Mechanismus interkalačních činidel ..... 45
3.2.1 Ethidiumbromid ..... 46
3.2.2 Propidium jodid ..... 47
3.2.3 SYBR Green ..... 48
3.2.4 DHDM ..... 49
3.3 Barvy vázající se na malé žlábky DNA ..... 50
3.3.1 DAPI ..... 50
3.3.2 RedSafe, GelGreen, GelRed, Diamond Dye ..... 50
4 Použití vizualizačních metod DNA ve výuce na SŠ ..... 52
4.1 Příklady využití vizualizačních metod v praktické výuce ..... 53
4.1.1 Praktické experimenty ..... 53
4.1.2 Workshopy ..... 58
4.1.3 Nové technologie ve výuce ..... 58

Závěr ..... 61
Seznam použitých odborných zdrojů ..... 62
Seznam ostatních použitých zdrojů ..... 66
Seznam obrázkových zdrojů ..... 67

## Přehled použitých zkratek

| | |
|---|---|
| **A** | adenin |
| **ADP** | adenosindifosfát |
| **AMP** | adenosinmonofosfát |
| **bp** | párů bází |
| **C** | cytosin |
| **CE** | kapilární elektroforéza |
| **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 |
| **PAGE** | polyakrylamidový gelová elektroforéza |
| **PCR** | polymerázová řetězová reakce |
| **PI** | propidium jodid |
| **qPCR** | kvalitativní polymerázová řetězová reakce |
| **SBH** | sekvenování hybridizací |
| **SBS** | sekvenování syntézou |
| **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 novým 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

Nukleové kyseliny jsou biomakromolekulární látky vzniklé polykondenzací nukleotidů. První objevení nukleových kyselin proběhlo v roce 1869 švýcarským lékařem Friedrichem Miescherem, který izoloval látku z bílých krvinek a nazval jí nuklein. Tento objev položil základ pro další výzkum struktury a funkce nukleových kyselin (1.).

Významný pokrok v pochopení struktury a významu nukleových kyselin nastal až v polovině 20. století, kdy James Watson a Francis Crick v roce 1953 publikovali svůj model dvoušroubovice DNA (Watson a Crick 1953). Tento model ukázal, že DNA má strukturu dvouvláknové dvoušroubovice, kde jsou dva řetězce nukleotidů spojeny vodíkovými vazbami mezi komplementárními bázemi (Watson a Crick 1953).

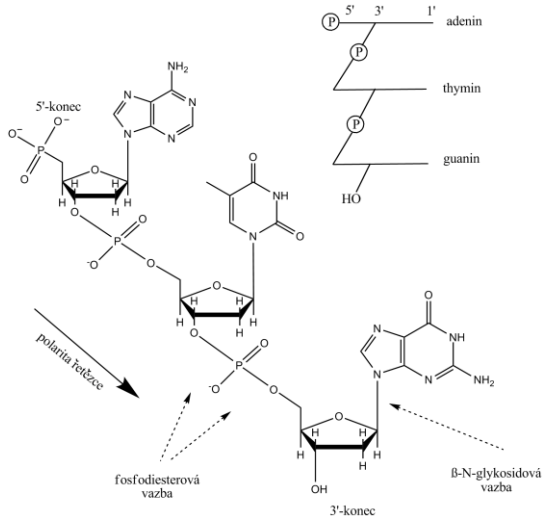
Ačkoli je většina organismů založena na dvouvláknové DNA, některé viry obsahují jednovláknovou DNA, což ukazuje na variabilitu genetické informace v přírodě (2.). Molekula DNA může být složena až z 10 milionů nukleotidů, což umožňuje uchování velkého množství genetické informace (Alberts et al. 2006).

Primární funkcí DNA je uchovávání genetické informace a její předání na potomstvo. Tato funkce je klíčová pro reprodukci a evoluci organismů, protože zajišťuje, že genetické instrukce jsou přesně kopírovány a předávány z generace na generaci (Lodish 2008).

## 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, kterou můžeme vidět na obrázku č. 1, 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. Tato informace je definována pořadím nukleotidů v řetězci DNA. 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).




*Obrázek 1 Primární struktura DNA*

### 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**

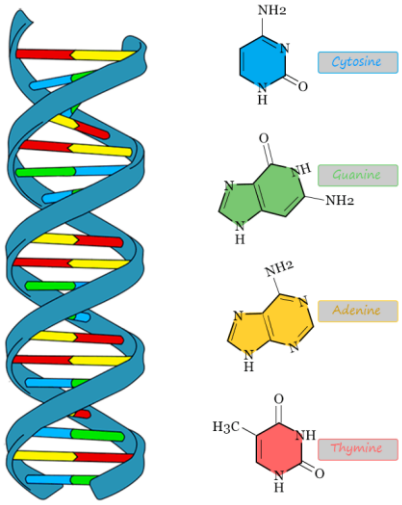
Jednou ze tří částí nukleotidu jsou dusíkaté báze, které jsou tvořené aromatickými heterocyklickými sloučeninami. Pořadí dusíkatých bází v polynukleotidu určuje genetický kód a tím i různé biologické funkce. Na obrázku č. 2 můžeme vidět čtyři druhy bází, které se nachází v molekule DNA. Patří mezi ně 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. Deoxyribóza je monosacharid odvozený od ribózy. Hydroxylová skupina na druhém atomu uhlíku je nahrazena atomem vodíku. Deoxyribóza je hlavní složkou deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Historicky se předpokládá, že primitivní organismy využívaly pouze ribózu v rámci ribonukleové kyseliny (RNA). Deoxyribóza se vyvinula později než ribóza, proto je její syntéza složitější. V současných organismech se deoxyribóza syntetizuje z ribózy enzymatickou reakcí za účasti katalytických proteinů. Díky přítomnosti deoxyribózy je DNA stabilnější než RNA.

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

## 1.2 Sekundární struktura DNA

Sekundární strukturou DNA je pravotočivá dvoušroubovice neboli double helix. Vznik dvoušroubovice závisí na komplementaritě bází a vzniku vazby vodíkových můstků mezi bázemi.




*Obrázek 2 Struktura DNA a dusíkaté báze*

Vodíkové můstky se řadí mezi slabé nevazebné interakce. Ačkoli tento název přesně nevystihuje podstatu těchto sil, tyto slabé nevazebné interakce mohou významně ovlivnit chemické vlastnosti, jako jsou bod tání, bod varu nebo rozpustnost různých látek (Svoboda 2005). Vodíkové vazby jsou přítomny v mnoha organických molekulách a patří mezi nejdůležitější interakce v biologických systémech. Vodíková vazba vzniká mezi vodíkem, který je součástí elektronegativního atomu, a dalším elektronegativním atomem, nejčastěji se jedná o atom kyslíku nebo dusíku (Svoboda 2005).

Slabé nevazebné interakce, jako jsou vodíkové vazby nebo van der Waalsovy síly, jsou dostatečně silné na to, aby udržely makromolekulární struktury pohromadě, ale nejsou dostatečně silné na to, aby spojily dva atomy do jediné molekuly. Přesto hrají klíčovou roli

v biologických procesech, jako je stabilizace terciární a kvartérní struktury proteinů nebo párování bází v nukleových kyselinách (Watson 2004).

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‘a konec 5‘. 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).

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).

### 1.2.1 Vazby ve struktuře DNA

Vznik všech chemických vazeb, včetně slabých interakcí a silných kovalentních vazeb, probíhá v souladu s termodynamickými zákony. Chemická vazba vzniká za uvolnění volné energie, což se projevuje zápornou hodnotou změny Gibbsovy volné energie (ΔG). Aby došlo k přerušení vazby, musí být dodáno stejné množství volné energie, jaké bylo uvolněno při jejím vzniku.

Tvorba kovalentních vazeb mezi atomy obvykle vyžaduje značně velkou zápornou hodnotu ΔG, což znamená, že uvolněná volná energie je velmi vysoká. Z tohoto důvodu kovalentně vázané atomy téměř nikdy nevznikají jednorázově, ale spíše postupně, přes několik mezistupňů.

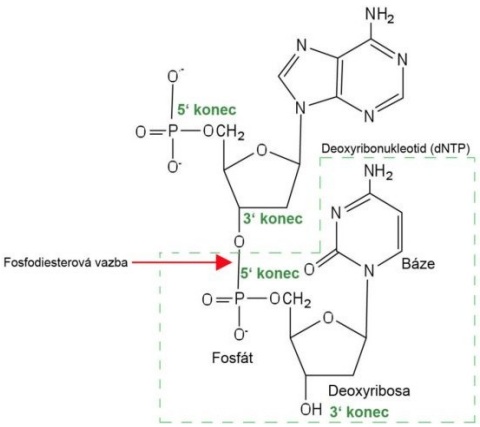
Naopak hodnoty ΔG při tvorbě slabých vazeb, jako jsou vodíkové vazby nebo van der Waalsovy interakce, jsou pouze několikanásobně vyšší než průměrná tepelná energie molekul při fyziologických teplotách. To znamená, že jednotlivé slabé vazby se ve živých

buňkách často vytvářejí a rozpadají, což umožňuje dynamickou stabilizaci makromolekulárních struktur, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny (Watson 2004).

Mnoho důležitých chemických dějů v buňkách nespočívá ve vytváření nebo rozbíjení pevných vazeb. Umístění většiny molekul v buňce závisí na slabých, resp. sekundárních přitažlivých nebo odpudivých silách. Kromě toho jsou slabé vazebné interakce důležité pro určení tvaru mnoha molekul (Watson 2004).

**Fosfodiesterová vazba**

Fosfodiesterová vazba vzniká, když dojde k reakci dvou hydroxylových skupin kyseliny fosforečné s hydroxylovými skupinami jiných molekul. Tato reakce vede k tvorbě dvou esterových vazeb. Proto se nazývá fosfodiesterová.



*Obrázek 3 Fosfodiesterová vazba*

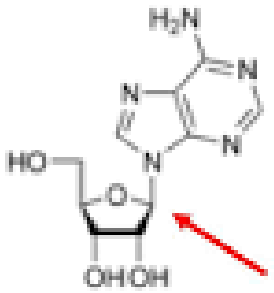
Fosfodiesterové vazby tvoří základní řetězec molekul DNA i RNA. Ve struktuře nukleových kyselin je fosfátová skupina jednoho nukleosidu připojena k sousednímu nukleosidu. Tento typ vazby v DNA, který vidíme na obrázku č. 3, známý jako 3', 5' fosfodiesterová vazba, spojuje 3' atom uhlíku jedné molekuly deoxyribózy s 5' atomem uhlíku druhé molekuly deoxyribózy (Watson 2004). Aby mohla vzniknout fosfodiesterová vazba mezi nukleosidy, dochází k hydrolýze trifosfátových nebo difosfátových forem nukleotidů, čímž se uvolňuje energie potřebná pro enzymově katalyzovanou reakci. Při replikaci DNA je tvorba fosfodiesterové vazby katalyzována enzymem DNA polymerázou.

Fosfodiesterové vazby vznikají nejen během replikace DNA, ale také při opravě nukleových kyselin. Tento proces může vyžadovat zapojení různých polymeráz, primerů a/nebo ligáz. Například DNA ligáza dokáže vytvořit fosfodiesterovou vazbu mezi nukleotidy při opravách řetězců DNA (Watson 2004)

K přerušení fosfodiesterové vazby dochází procesem zvaným hydrolýza. K urychlení reakce se využívají enzymy fosfodiesterázy. Tyto enzymy se podílejí na opravách DNA sekvencí. Například ribóza, která je součástí RNA, obsahuje o jednu hydroxylovou skupinu více než deoxyribóza v DNA, což činí RNA méně stabilní a náchylnější k alkalické hydrolýze oproti DNA. Při vyšším pH dochází k narušení fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidy, což způsobuje relativní nestabilitu RNA. Proto je RNA nevhodná pro dlouhodobé uchovávání genetické informace, ale zároveň je užitečná při procesech transkripce a translace (Watson 2004).

**N-glykosidická vazba**

N-glykosidická vazba představuje typ kovalentní vazby v biochemii, která se vytváří mezi sacharidy a jinými molekulami. Příklad N-glykosidické vazby můžeme vidět na obrázku č. 4. Jedná se o acetálovou vazbu sacharidů s -OH skupinou, což může zahrnovat alkoholy, lipidy nebo jiné sacharidy, čímž dochází ke vzniku oligo- a polysacharidů. Kromě toho může dojít k vazbě sacharidů s - NH2 skupinou, jako je tomu například u dusíkatých bází v DNA a RNA.



*Obrázek 4 Glykosidická vazba*

Všechny monosacharidy s karbonylovou skupinou mohou reagovat s -OH skupinami za vzniku poloacetálu. Tento typ vazby je znám jako O-glykosidová vazba.

N-glykosidová vazba se tvoří reakcí monosacharidu se skupinou -NH2 nebo -NH. Výsledné sloučeniny se nazývají nukleosidy. V lidském organismu se nukleosidy často vyskytují ve spojení s kyselinou fosforečnou, čímž vznikají fosforečné estery nukleosidů, známé jako nukleotidy (Matouš 2010).

**Vodíkové můstky**

Hlavními typy slabých nevazebných interakcí, které jsou klíčové v biologických systémech, jsou van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce, vodíkové vazby a iontové vazby. Rozdíl mezi vodíkovou vazbou a iontovou vazbou může být někdy nejednoznačné. Přestože jsou tyto van der Waalsovy síly relativně slabé, jsou dostatečně velké na to, aby zajistily interakci mezi jednotlivými molekulami nebo atomovými skupinami (Watson 2004).

Vodíková vazba vzniká mezi kovalentně vázaným atomem vodíku, který nese částečný kladný náboj, a záporně nabitým, kovalentně vázaným atomem akceptoru (viz obr č.6). Biologicky nejvýznamnější vodíkové vazby zahrnují atomy vodíku, které jsou vázány na atomy kyslíku (O-H) nebo dusíku (N-H), přičemž negativními akceptory jsou obvykle také atomy kyslíku nebo dusíku (Watson 2004).

Síla vodíkové vazby se pohybuje obvykle v rozmezí 5-10 kJ/mol. Vodíkové vazby vznikají snadno za správných strukturních podmínek a jejich přítomnost je důležitá pro stabilitu a funkci biologických molekul. Bez vodíkových vazeb by živá hmota nemohla existovat (Svoboda 2005).

V nepřítomnosti okolních molekul vody se energie těchto vazeb pohybuje mezi 3 a 7 kcal/mol, přičemž silnější vazby vznikají při větších rozdílech v nábojích mezi akceptorovým atomem a donorovým vodíkem (Watson 2004). Vodíkové vazby jsou slabší než vazby kovalentní, ale přesto jsou podstatně pevnější, než van der Waalsovy síly. Vodíková vazba udržuje dva atomy blízko u sebe, avšak ne tak těsně jako kovalentní vazba.

Polární molekuly, které mají nabité skupiny, interagují odlišně než nepolární molekuly s nesymetrickým rozložením náboje. Polární molekuly mohou vytvářet vodíkové vazby, zatímco nepolární molekuly mohou vytvářet pouze van der Waalsovy síly (Watson 2004).

Pro stabilitu DNA jsou zásadní π-π patrové interakce mezi bázemi, které představují nekovalentní interakce charakteristické pro aromatické molekuly. Tyto patrové interakce mají významnou roli při vytváření zkroucení dvoušroubovice DNA a ovlivňují termostabilitu vlákna podle obsahu jednotlivých bází. Přestože se často předpokládá, že vyšší stabilita sekvencí bohatých na G-C páry je způsobena třemi vodíkovými můstky ve srovnání se dvěma v A-T párech, realitou je spíše to, že významnou roli ve stabilitě G-C bohatých sekvencí hrají právě patrové interakce (Yakovchuk et al. 2006).

### 1.2.2 Žlábky DNA

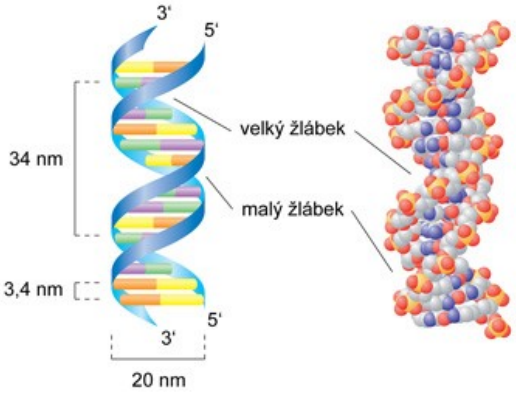
Dvoušroubovice DNA je charakterizována přítomností malých a velkých žlábků. Jak je možné vidět na obrázku číslo 5, na dvoušroubovici DNA se malé a velké žlábky střídají.

V důsledku dvojité struktury se řetězce molekuly DNA jeví jako prodloužený polymer obsahující dva odlišné žlábky. Liší se svou šířkou a hloubkou. Tyto žlábky nejsou stejné, kvůli geometrickému uspořádání základních párů v sekundární struktuře. Úhel mezi glykosidovými vazbami, tedy úhel, pod kterým se oba cukry odtrhávají od základního páru, je přibližně 120° pro řádkový úhel (nebo 240° pro široký úhel). Tento úhel způsobuje, že když se na sebe vrství stále více základních párů, úzký úhel mezi cukry na jedné straně základních párů vytváří menší žlábek a velký úhel na druhé straně generuje větší žlábek. Pokud by se cukry od sebe vzdalovaly po přímce, tj. pod úhlem 180°, měly by oba žlábky stejný rozměr, což by znamenalo, že by nevznikly velké a malé žlábky (Watson 2004).

Toto uspořádání žlábků je důležité pro interakce DNA s různými proteiny a dalšími molekulami. Například specifické vazebné proteiny často rozpoznávají sekvence DNA právě prostřednictvím interakce s těmito žlábky. Menší žlábek poskytuje méně přístupné místo pro vazbu, zatímco větší žlábek je více exponovaný a nabízí více možností pro specifické interakce s proteiny, což může hrát roli v biologických procesech (Watson 2004).

Díky přítomnosti charakteristických vzorů vodíkových vazeb na povrchu DNA ve velkém žlábku je možné odlišit jednotlivé základní páry. Typické vzory vodíkových vazeb jsou v hlavní drážce vystaveny tak, aby umožnily rozpoznávání a interakci s jinými molekulami.

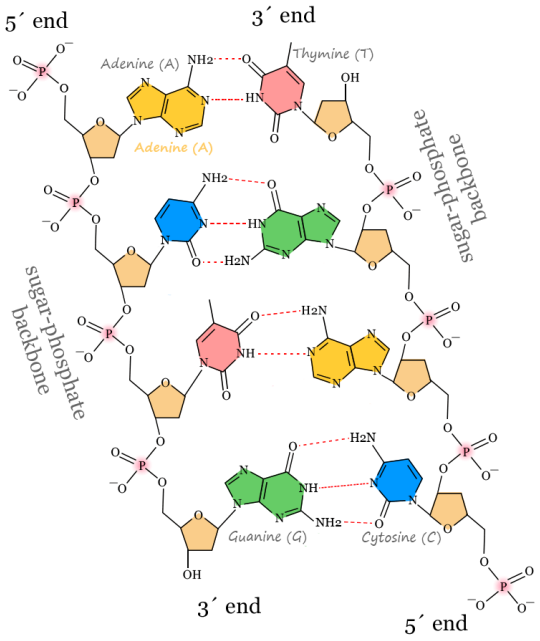
Každý základní pár má specifický kód chemických skupin. Tyto vzorce jsou zásadní, protože umožňují proteinům rozpoznat a specificky se vázat na určité sekvence DNA. Proteiny dokážou rozpoznat různé základní páry ve dvoušroubovici DNA díky schopnosti jejich aminokyselinových řetězců proniknout do velkého žlábku a navázat se na specifické chemické skupiny.




*Obrázek 5 Malý a velký žlábek dvoušroubovice DNA*

### 1.2.3 Komplementarita bází

Podle principu komplementarity bází se v DNA vážou dvojice pomocí vodíkových můstků. Jak můžeme vidět na obrázku číslo 6, 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.




*Obrázek 6 Komplementarita bází*

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 specifičnost párování a stabilitu DNA (Murray, 2002).

## 1.3 Vlastnosti DNA

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 (Murray 2002).

Zatímco genetická informace představuje kompletní soubor instrukcí pro celý organismus, geny jsou jednotlivé segmenty této informace, které kódují specifické proteiny nebo funkční RNA molekuly. Genetická informace je tedy celkový obsah genetických instrukcí v genomu, zatímco gen je specifická sekvence DNA, která má konkrétní funkci v buňce.

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).

## 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

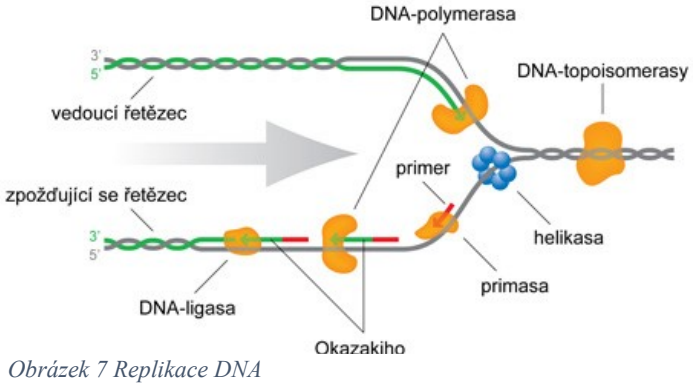
buňce replikovat geny před buněčným dělením. Významnou roli při replikaci má komplementarita bází (Alberts et al. 2006).

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).

Na obrázku č. 7 je znázorněn proces replikace DNA. Replikace je komplexní mechanismus, 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 dvouvláknovou strukturu DNA. Klíčovou roli mají enzymy DNA-polymerázy.




*Obrázek 7 Replikace DNA*

Následně dochází k oddělení jednotlivých vláken od sebe, což umožňuje přístup enzymů k jednotlivým templátům. Hlavní fází replikace je následné nasyntetizování nových vláken DNA.

Tento proces probíhá podle templátu existujícího vlákna a zajišťuje přesné a správné párování nukleotidů. 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 nasyntetizovat jakýkoli úsek DNA, který právě chceme sledovat. Tento úsek lze poté neomezeně replikovat (Alberts et al. 2006).

## 1.5 Štěpení DNA

K vizualizaci DNA je nutné DNA rozštěpit na menší úseky. K tomuto účelu se využívají restrikční 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 Restrikční endonukleázy

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

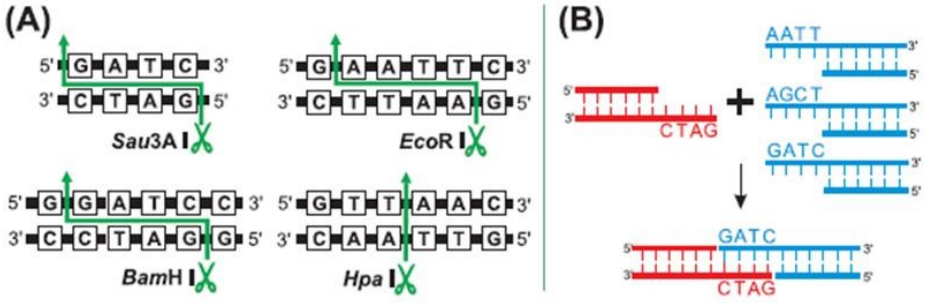
Mezi všemi proteiny, které se specificky vážou na sekvenci DNA, jsou restrikční enzymy považovány za nejnáročnější. Tyto enzymy se vyskytují přirozeně v bakteriích a archeích a slouží k ochraně mikrobů před infekcí viry a parazitickými molekulami DNA. Příklady bakterií můžeme vidět na obrázku číslo 8.

Restrikční enzymy se vážou na krátké sekvence bází v DNA a katalyzují štěpení dvou řetězců DNA v blízkosti řetězce vazebných míst, která jsou vyznačena na obrázku č. 9, čímž se DNA rozpadá na fragmenty.

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

*Obrázek 8 Příklady restrikčních endonukleáz*

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

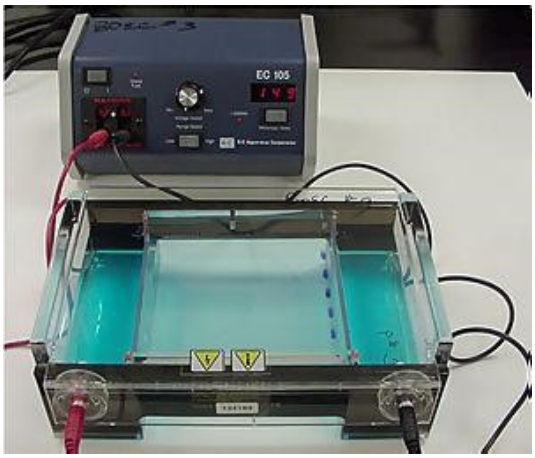



*Obrázek 9 Štěpení restrikčními endonukleázami*

# 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), sekvenování DNA, fluorescenční mikroskopie, molekulární hybridizace a FISH (fluorescenční in situ hybridizace).

## 2.1 Gelová elektroforéza



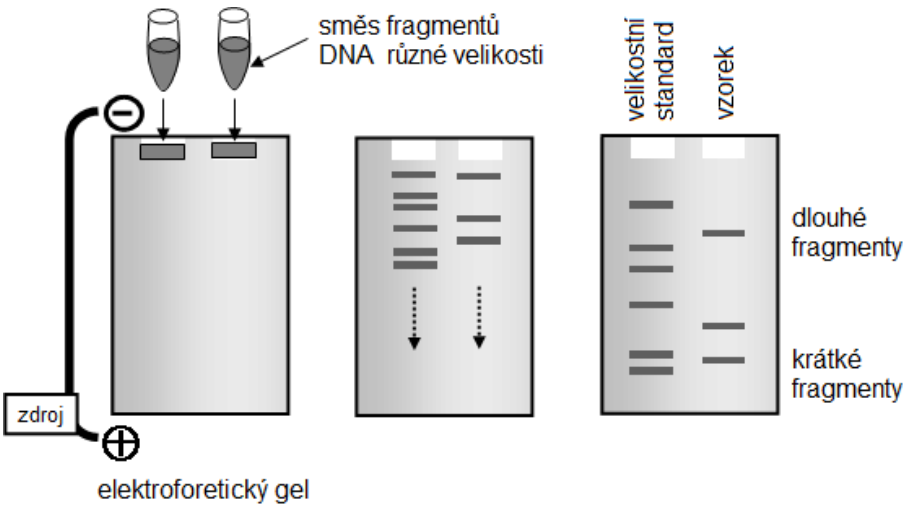

*Obrázek 10 Elektroforetická vana a zdroj elektrického napětí*

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).

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

V případě použití elektroforézy na papíře nebo v roztoku, je pohyblivost nestejnoměrně 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). Na obrázku číslo 10 můžeme vidět elektroforetickou vanu so které se gel vloží a připojí ke zdroji napájení.

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). Protože se větší molekuly pohybují v gelu pomaleji, nalézají se blíže ke vzorku viz dlouhé a krátké fragmenty na obrázku číslo 11.




*Obrázek 11 Gelová elektroforéza*

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.

E. M. Southern v roce 1975 publikoval metodu (Southern 1975), která umožnila identifikaci genů v restrikčních fragmentech separovaných gelovou elektroforézou. Tato metoda, známá jako Southernův přenos, představuje důležitou metodu pro analýzu specifických sekvencí DNA. Charakteristickým rysem této metody je přenos molekul DNA na nitrocelulózovou membránu.

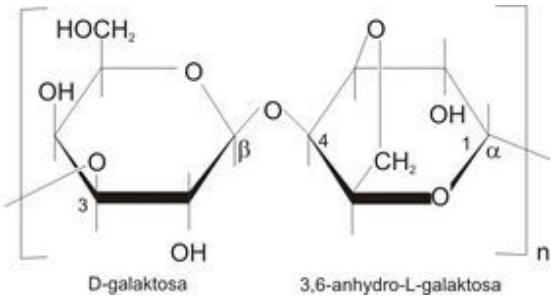
Restrikční endonukleázy se díky svým vlastnostem staly nepostradatelnými nástroji pro studium struktury DNA. Fragmenty vytvořené těmito enzymy lze s vysokým rozlišením oddělit elektroforézou v agarózových nebo polyakrylamidových gelech. Tradiční metody zahrnující rozříznutí gelu, eluci DNA a hybridizaci s RNA v roztoku nebo po navázání DNA na filtry, jsou časově náročné a často vedou ke ztrátě rozlišovací schopnosti gelové elektroforézy. Southernův přenos tento problém řeší metodou přenosu fragmentů DNA z proužků agarózového gelu na proužky nitrátu celulózy. Po hybridizaci s radioaktivní RNA lze fragmenty DNA obsahující přepisované sekvence detekovat jako ostré pásy pomocí radioautografie nebo fluorografie proužku nitrátu celulózy. Výhodou této metody je zachování vysoké rozlišovací schopnosti gelu, úspora RNA a nitrátových celulózových filtrů a možnost hybridizace několika elektroforetogramů během jednoho dne. Hlavní nevýhodou je, že fragmenty o velikosti 500 nukleotidových párů nebo méně, poskytují nízké výtěžky hybridu. Tato nevýhoda vede k jejich nedostatečnému zastoupení nebo úplné absenci v analýze (Southern 1975).

### 2.1.1 Typy gelů využívaných při elektroforéze

Gely, využívající se 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**

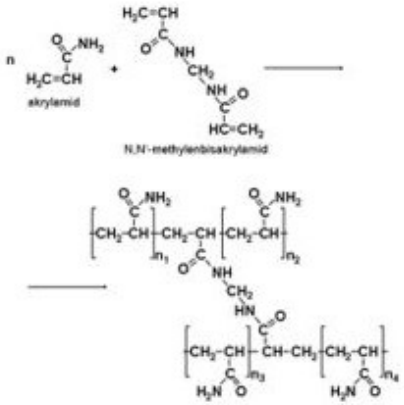
Agaróza je lineární polysacharid, který se skládá z D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy (viz obr. 12). Gel se připravuje ve vodní lázni, kde se agar rozpustí. Poté se gel nalije do šablony a přidá se druhá šablona vytvářející jamky. Tyto jamky jsou velice důležité pro další využití gelu. Do jamek se aplikují pozorované vzorky nukleových kyselin. Po zatuhnutí se šablona odstraní a nově vzniklá gelová podložka se přemístí do elektroforetického aparátu (Křemen et al. 1998).




*Obrázek 12 Vzorec Agarózy*

**Polyakrylamidový gel**

Polyakrylamidový gel se skládá z akrylamidu zesíťovaného bifunkčním N,N'-methylenbisakrylamidem (viz obr.13). 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. Naopak v řídkých gelech, s nižší celkovou koncentrací, se nejlépe separují řetězce DNA o délce 100-1000 nukleotidových párů.

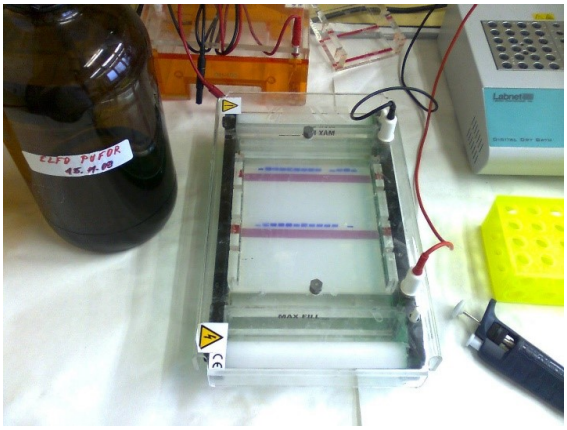



*Obrázek 13 Vzorec Polyakrylamidu*

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.



*Obrázek 14 Elektroforéza na agarózovém gelu*

Kromě glycerolu se ke vzorkům DNA přidávají i barviva, jako je bromfenolová modř (kterou můžeme vidět na obrázku č. 14) a xylen-cyanol FF, která slouží k vizualizaci průběhu elektroforézy a umožňují přesné monitorování pohybu fragmentů DNA v gelu.

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 (PAGE). 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).

Navzdory své užitečnosti, analýza pomocí PAGE čelí několika významným omezením, která snižuje její efektivitu a rozsah aplikace v enzymové analýze. Jedním z hlavních omezení PAGE je omezený počet vzorků a podmínek, které lze analyzovat na jednom gelu. Tento počet je závislý na procentuálním podílu gelu a velikosti substrátu, což často vede k nutnosti provádět více běhů pro komplexní studie. Tím se zvyšuje časová náročnost a náklady na analýzu.

Dalším problémem je kvantifikace produktů na PAGE gelech, která je relativně těžkopádná. Proces vyžaduje ruční skenování a analýzu gelů, což je nejen časově náročné, ale také

náchylné k chybám. Tato manuální fáze omezující efektivitu analýzy vede k tomu, že počet reakcí a podmínek, které lze v rámci jedné studie zkoumat, je značně omezen.

V důsledku těchto omezení je použití PAGE pro enzymové analýzy relativně neefektivní, což omezuje možnost provádět rozsáhlé a komplexní studie enzymů nukleových kyselin. Navzdory tomu zůstává PAGE důležitým nástrojem v molekulární biologii díky své schopnosti poskytovat důležité informace o struktuře a funkci biomolekul, i když je zapotřebí hledat nové metody a technologie, které by tato omezení překonaly a zvýšily efektivitu enzymových analýz (Greenough et al. 2016).

### 2.1.4 Vizualizace UV zářením

Po dokončení elektroforézy je nutné separované fragmenty DNA zviditelnit. Toho lze docílit vizualizačními barvivy, které se váží na DNA. Mezi běžně používaná barviva patří ethidiumbromid a SYBR Green. Tato barviva se po navázání na DNA zobrazují pod UV zářením v přístroji zvaném UV transluminátor, který umožňuje vizualizaci jednotlivých fragmentů DNA.

Kromě fluorescenčních barviv lze k detekci DNA fragmentů využít i radioaktivní značení nebo hybridizaci se značenou sondou. Sonda je krátký oligonukleotid, který se komplementárně váže na specifickou hledanou sekvenci DNA, což umožňuje její detekci (3.).

### 2.1.5 Kapilární gelová elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) byla poprvé představena jako nová a automatizovaná alternativa k deskové gelové elektroforéze (Karger a Guttman 2009). Tato inovativní technologie rychle získala pozornost, díky své schopnosti poskytovat vysoce efektivní a rychlé separace s vysokým rozlišením.

V roce 1988 byl představen první komerční přístroj pro kapilární elektroforézu (Kasper et al. 1988), který byl vybaven UV/VIS detekcí na koloně, automatickým nástřikem vzorků a počítačovou analýzou dat. Tento přístroj umožnil rychlé separace s vysokým rozlišením a představoval významný pokrok v oblasti analytických technik.

Od té doby následovalo mnoho dalších výrobců, kteří vyvinuli komerční jednotky pro kapilární elektroforézu. Tyto přístroje nejenže zlepšily účinnost a přesnost separací, ale také

umožnily vývoj kapilárních sekvenátorů DNA. Tyto sekvenátory využívají principů kapilární elektroforézy k rychlému a přesnému čtení sekvencí DNA, což výrazně přispělo k pokroku v oblasti genomiky.

Kapilární elektroforéza se stala nezbytným nástrojem v mnoha oblastech biotechnologie a molekulární biologie. Její automatizace a vysoké rozlišení umožňují efektivní analýzu široké škály biomolekul, včetně nukleových kyselin. Díky svým vlastnostem je kapilární elektroforéza preferovanou metodou pro aplikace, kde je požadována vysoká přesnost a rychlost analýzy (Karger a Guttman 2009).

## 2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězcová 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

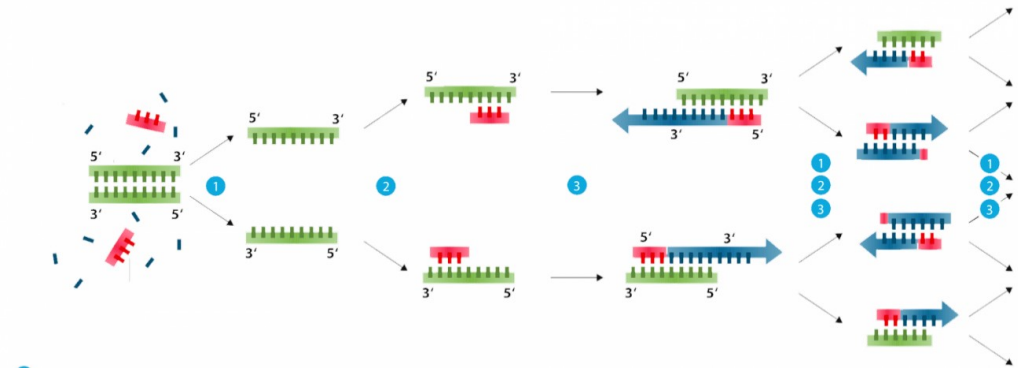
Předpokladem pro provedení polymerázové řetězcové reakce (PCR) je detailní znalost pořadí dusíkatých bází na začátku a na konci požadovaného úseku DNA, který chceme amplifikovat (Otová et al. 2020). Pro úspěšnou amplifikaci je nezbytné vytvořit jednovláknové úseky DNA, nazývané primery, které slouží 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, který můžeme vidět na obrázku č. 15, 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. Celkové schéma PCR můžeme vidět na obrázku č. 16.

*Obrázek 15 Thermocykler*

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.



*Obrázek 16 Schéma průběhu PCR*

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).

## 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 dideoxyribonukleotidtrifosfátů (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 Metody sekvenování DNA

Základními metodami sekvenování DNA byla Sangerova dideoxy syntéza a Maxam-Gilbertova metoda chemického štěpení (Slatko et al. 2018).

**Sangerova metoda**

Byla vyvinuta Frederickem Sangerem a jeho kolegy v letech 1975 (Sanger a Coulson 1975). Využívá specifické nukleotidy ukončující řetězec, známé jako dideoxy nukleotidy, které postrádají 3′ -OH skupinu. Tato absence znemožňuje DNA polymeráze vytvořit fosfodiesterovou vazbu, čímž dochází k ukončení syntézy DNA.

Pro detekci v sekvenačních gelech nebo v automatických sekvenačních strojích jsou ddNTP radioaktivně nebo fluorescenčně značeny (Slatko et al. 2018).

Sangerovo sekvenování, přestože je podle současných standardů NGS relativně pomalé, zůstává důležitou metodou díky několika inovacím. Mezi ně patří: vývoj fluorescenčních barviv, sekvenování s tepelným cyklem, které snížilo množství potřebné vstupní DNA, a termostabilní polymerázy pro účinné a přesné začlenění barviv do rostoucích řetězců DNA.

Vedoucí firmou v oblasti automatizovaného Sangerova sekvenování je Applied Biosystems (nyní součást ThermoFisher), která využívá fluorescenční barviva a kapilární elektroforézu (CE) ve svých sekvenátorech.

Technologie Sangerova sekvenování zůstává velmi užitečná pro aplikace, kde není vyžadována vysoká propustnost, například pro ověření plazmidových konstruktů nebo produktů PCR. Díky dostupnosti souprav pro molekulární biologii, činidel pro purifikaci DNA a levných syntetických primerů, je možné realizovat i rozsáhlejší projekty Sangerova sekvenování efektivně a ekonomicky.

**Maxam-Gilbertova metoda**

Byla publikována v roce 1980 (Maxam a Gilbert 1980). Je založena na chemické modifikaci DNA a následném štěpení vlákna DNA v blízkosti modifikovaných nukleotidů. I když tato metoda byla vylepšena za účelem eliminace toxických činidel, Sangerovo sekvenování se stalo standardem díky své přesnosti a spolehlivosti.

### 2.3.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS), česky sekvenování nové generace nebo sekvenování druhé generace, představuje revoluční metodu v oblasti sekvenování DNA, která umožňuje paralelní sekvenování milionů malých fragmentů DNA současně (Behjati a Tarpey 2013).

Termín "next generation" označuje další krok ve vývoji technologie sekvenování DNA, což implikuje, že v budoucnu dojde k pojmenování dalších generací nových technologií. Tento termín se často používá jako synonymum pro druhou generaci sekvenování, následující po původních Sangerových metodách, které využívaly radioaktivitu (Slatko et al. 2018).

NGS 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).

Přestože se tyto nové metody mohou na první pohled zdát nákladné, reakce často probíhají paralelně v nanolitrových, pikolitrových nebo zeptolitrových objemech v malých komorách, což činí náklady na jeden sekvenovaný pár bází minimální. Neustálé zdokonalování a miniaturizace technologie dále snižují náklady a zvyšují efektivitu (Slatko et al. 2018).

Metody sekvenování druhé generace se dělí do dvou hlavních kategorií: sekvenování hybridizací (SBH) a sekvenování syntézou (SBS).

**Sekvenování hybridizací (SBH)**

Metoda sekvenování pomocí hybridizace byla původně vyvinuta v 80. letech 20. století a spočívala v použití uspořádaných oligonukleotidů DNA se známou sekvencí na filtrech. Tyto oligonukleotidy byly hybridizovány se značenými fragmenty sekvenované DNA. Opakovanou hybridizací a promýváním nehybridizované DNA bylo možné určit, zda hybridizující označené fragmenty odpovídají sekvenci sond DNA na filtru. Tímto způsobem bylo možné vytvořit větší souvislou sekvenční informaci na základě překrývajících se hybridizačních míst sond (Slatko et al. 2018).

Tato technologie přinesla vývoj vysoce výkonných, cenově dostupných a miniaturizovaných sekvenačních procesů využívajících pole vzorků DNA nebo sond. Ve standardních přístupech k sekvenování DNA je délka rovnoměrně náhodné sekvence, kterou lze jednoznačně rekonstruovat, často omezena kvůli opakujícím se podsekvencím. Tyto opakující se sekvence mohou způsobit degenerace při rekonstrukci, což vede k nejednoznačným nebo chybovým výsledkům (Qin et al. 2012). Metoda SBH nabízí několik výhod oproti tradičním sekvenačním metodám, jako jsou delší sekvenační čtení a vysoká paralelnost analýz (Drmanac et al. 2002).

**Sekvenování syntézou (SBS)**

Sekvenování syntézou představuje další vývoj Sangerova sekvenování, avšak bez použití dideoxy terminátorů. Namísto toho některé technologie využívají reverzibilní terminátory. Tyto terminátory umožňují začlenění nukleotidů, po níž následuje detekce inkorporovaných nukleotidů a následné odstranění blokujících částí, které umožňuje pokračování syntézy DNA.

Obecně se využívá pevný nosič obsahující mikrokanálky nebo jamky, v nichž probíhají sekvenační reakce. Kombinují se cykly syntézy, zobrazování a začleňování dalších nukleotidů do rostoucího řetězce DNA.

Současné metody SBS se od tradičního Sangerova sekvenování liší několika významnými aspekty. Především generují kratší čtení úseků DNA, obvykle do 300–500 bází, což je výrazně méně než v případě Sangerova sekvenování. Další rozdíl spočívá ve vyšší chybovosti těchto metod. Aby se tato vyšší chybovost kompenzovala, spoléhají SBS technologie na vysoké pokrytí sekvence, známé také jako masivně paralelní sekvenování. Tento přístup zahrnuje generování milionů až miliard krátkých čtení úseků DNA (50–300 nukleotidů), což umožňuje přesnou rekonstrukci původní sekvence na základě konsenzuální sekvence (Slatko et al. 2018).

Každá sekvenační platforma má svůj specifický soubor potenciálních chyb sekvenčního kontextu, a uživatelé si musí být těchto omezení vědomi. Pro řešení těchto problémů se často využívá kombinace několika platforem s různými technologiemi.

Většina technologií SBS zahrnuje rozdělení jednotlivých molekul DNA do milionů oddělených jamek, případně jejich přivázání ke specifickým místům na pevném substrátu. Molekuly DNA, amplifikované metodou PCR nebo izotermicky modifikovanými amplifikačními metodami "rolling circle", jsou poté podrobeny reakcím syntézy DNA. Během těchto reakcí jsou detekovány značené nukleotidy nebo chemické reakce založené na inkorporaci určitých nukleotidů. Díky těmto technologickým inovacím je možné generovat miliony čtení sekvence DNA v jediném sekvenačním cyklu, přičemž délka sekvenačního běhu může trvat od několika hodin až po několik dní, v závislosti na požadované propustnosti (Slatko et al. 2018).

**454 Pyrosekvenování**

Přestože byla technologie 454 pyrosekvenování ukončena, je příkladem metody sekvenování druhé generace (Slatko et al. 2018). Tato metoda využívala nový přístup detekce pyrofosfátu, vedlejšího produktu inkorporace nukleotidů, k hlášení, zda byla určitá báze inkorporována do rostoucího řetězce DNA (Ronaghi et al. 1996). Jednotlivé fragmenty DNA o délce 400-700 bp jsou připojeny na adaptéry a amplifikovány pomocí PCR v individuální emulzní kuličkové reakci. Sekvence DNA na kuličkách jsou komplementární k

sekvencím na adaptorech, což umožňuje, aby se fragmenty DNA vázaly přímo na kuličky, ideálně jeden fragment na každou kuličku.

Syntéza DNA probíhá v komůrkách o velikosti pikolitru, kde se měří uvolňování pyrofosfátu. Postupným zaplavováním komůrek sekvenačními činidly obsahujícími jeden ze čtyř nukleotidů se po začlenění správného nukleotidu do syntetizovaného vlákna měří uvolňování pyrofosfátu pomocí reakce generující světlo. Intenzita generovaného světla poskytuje informace o přítomnosti a množství inkorporovaných nukleotidů, což umožňuje určování homopolymerních sekvencí. Přestože tato metoda čelila výzvám při sekvenování delších homopolymerních úseků, poskytovala dlouhé délky čtení (až 600-800 nukleotidů) a relativně vysokou propustnost (Slatko et al. 2018).

**Ion Torrent**

Sekvenační reakce technologie Ion Torrent probíhají v milionech jamek na polovodičovém čipu, který obsahuje miliony pixelů schopných převádět chemické informace na informace sekvenační. Tento inovativní přístup začíná fragmentací DNA na fragmenty o délce 200-1500 bází. Tyto fragmenty DNA jsou poté připojeny ke kuličkám pomocí komplementárních sekvencí přítomných na kuličkách i adaptérech a následně amplifikovány pomocí emulzní PCR. Tímto procesem se zajistí, že každá z milionů kuliček obsahuje několik kopií jedné sekvence DNA.

Po amplifikaci jsou kuličky přeneseny na čip obsahující jamky takovým způsobem, že do každé jamky vstoupí pouze jedna kulička. Jakmile přes jamky začnou protékat sekvenační činidla, uvolňuje se při inkorporaci příslušného nukleotidu vodíkový iont, který generuje elektrický signál. Hlavní výhodou tohoto systému je absence potřeby kamery, zdroje světla či skeneru; inkorporace nukleotidu se přímo převádí na napětí, které je ihned zaznamenáno. Tento proces výrazně urychluje sekvenování.

Technologie Ion Torrent™ převádí nukleotidovou sekvenci přímo na digitální informaci na polovodičovém čipu. Použití nejrozšířenější technologie pro konstrukci integrovaných obvodů umožňuje nízkonákladovou velkosériovou výrobu těchto zařízení a jejich škálování na vyšší hustoty a větší velikosti polí (Rothberg et al. 2011).

NGS má významnou výhodu oproti tradičnímu Sangerovu sekvenování v zachycování širšího spektra mutací. Zahrnuje malé změny bází, inzerce 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 studium fyziologii buněk. Umožňuje vizualizaci buněčných struktur a procesů s vysokým rozlišením. Přestože princip fluorescence a použití optických filtrů zůstávají podobné, konstrukce mikroskopů se neustále vyvíjejí za účelem zvýšení kontrastu a prostorového rozlišení obrazu. Fluorescence je založena na emisi světla látkou po absorpci energie, jako je UV záření, s následnou emisí světla o delší vlnové délce. To umožňuje identifikaci a lokalizaci specifických molekul a struktur v buňce (Sanderson et al. 2014).

### 2.4.1 Fluorescence

Fluorescence je specifická forma luminiscence, při níž má vyzařované světlo ve většině případů delší vlnovou délku a nižší energii fotonů než absorbované záření. Fluorescence nezahrnuje žádnou změnu v násobnosti elektronového spinu a obvykle následuje bezprostředně po absorpci záření. To znamená, že fluorescenční materiály přestanou zářit téměř okamžitě po odstavení zdroje záření.

Příkladem fluorescence je situace, kdy absorbované záření spadá do ultrafialové oblasti elektromagnetického spektra, která je neviditelná pro lidské oko, zatímco emitované světlo je v oblasti viditelné. Tento jev způsobuje, že fluoreskující látka má výraznou barvu, pozorovatelnou pouze při expozici UV záření (4.).

V přírodě se fluorescence často vyskytuje v některých minerálech a mnoha biologických formách napříč všemi říšemi života. Tato biologická fluorescence, známá jako

biofluorescence, znamená, že fluorofor je součástí živého organismu nebo je z něj získán. Vzhledem k tomu, že fluorescence je způsobena specifickou chemickou látkou, kterou lze ve většině případů syntetizovat uměle, je možné označit jako fluorescenční samotnou látku bez ohledu na její původ.

Fluorescence má širokou škálu praktických aplikací, zahrnujících oblast mineralogie, medicíny, chemických senzorů (například fluorescenční spektroskopii), fluorescenčního značení, barviv, biologických detektorů, a hlavně se využívá ve fluorescenční mikroskopii (4.).

### 2.4.2 Dělení fluorescenční mikroskopie

Existují dvě hlavní formy fluorescenční mikroskopie: primární fluorescenci, známou jako autofluorescence, a sekundární fluorescenci, kde se používají uměle dodaná fluoreskující barviva vázaná na specifické buněčné struktury. Tato technika umožňuje studium různých buněčných procesů, včetně apoptózy, buněčného cyklu a rozlišení živých a mrtvých buněk (5.).

Mezi nejmodernější techniky patří širokoúhlá mikroskopie, která zobrazuje rozsáhlé oblasti vzorku s vysokým rozlišením a kontrastem. Dále laserová skenovací konfokální mikroskopie, která používá laserový paprsek k osvětlení jednotlivých bodů vzorku a eliminuje nežádoucí signály z jiných rovin (6.).

Konfokální mikroskopy umožňují zaostření na konkrétní optickou rovinu vzorku, čímž umožňují snímání obrazu pouze z této vybrané roviny. Světlo přicházející z rovin před a za rovinou ostrosti není detektorem zachyceno. Tato selektivita je dosažena díky specifické konstrukci konfokálního mikroskopu. Světlo ze zdroje nejprve prochází prvním clonkou (angl. "pinhole") a následně je zaostřeno kondenzorem na vzorek. Fluorescence vycházející ze vzorku vstupuje do objektivu, který ji zaostří do druhé clonky. Pouze fluorescence z optické roviny, na níž je zaostřeno, projde druhou clonkou a dopadá na detektor.

Tento mechanismus umožňuje konfokálnímu mikroskopu snímat obraz bod po bodu, což zajišťuje vysoké prostorové rozlišení a minimalizaci šumu z okolních rovin. Pro realizaci bodového skenování vzorku bylo vyvinuto několik metod. Typickým příkladem je laserový skenovací konfokální mikroskop, který využívá laserový paprsek k excitaci fluorescenčních

molekul v přesně definovaných bodech vzorku. Další běžně používanou metodou je skenování pomocí Nipkowova kotouče, který umožňuje rychlejší snímání pomocí rotujících disků s množstvím malých otvorů (6.).

Konfokální mikroskopy tak poskytují možnost detailního zobrazování tenkých optických řezů vzorků, což je klíčové pro mnoho aplikací v biologii, medicíně a materiálových vědách. Tyto mikroskopy umožňují získání trojrozměrných obrazů vzorků a studium jemných struktur s vysokým rozlišením a kontrastem.

Dvoufotonová mikroskopie je pokročilou technikou umožňující proniknout hlouběji do vzorku s minimálním poškozením a zkoumat živé buňky a tkáně ve větší hloubce. Dvoufotonové fluorescenční mikroskopy využívají principu, při kterém lze fluorescenci, specifických fluorescenčních látek, vyvolat nejen jedním fotonem o požadované vlnové délce, ale také dvěma současně absorbovanými fotony s dvojnásobnou vlnovou délkou. Absorpce více fotonů současně je za běžných podmínek velice nepravděpodobná a dochází k ní pouze při využití velmi silných a nákladných laserů, a to pouze v rovině ostrosti, kde je intenzita laseru nejvyšší. Tento jev je výhodný, protože k fluorescenci dochází pouze v tenké optické rovině, což způsobuje, že dvoufotonový mikroskop se chová obdobně jako konfokální mikroskop (6.).

Excitace fluorescenční látky pouze v tenké optické rovině významně snižuje fotovybělování vzorku. Dále, použití fotonů s vysokými vlnovými délkami, které se blíží infračervenému spektru, umožňuje snadný průnik světla i do velmi hlubokých vrstev vzorku. Tato vlastnost je důležitá pro zobrazování tlustých biologických preparátů a pro zkoumání tkání in vivo, kde je nezbytné dosáhnout hluboké penetrace bez poškození vzorku. Dvoufotonová mikroskopie tedy představuje významný pokrok v oblasti fluorescenčního zobrazování, poskytující výhody vysokého prostorového rozlišení a minimálního poškození vzorku (6.).

Tyto moderní metody fluorescenční mikroskopie přinášejí nové možnosti pro studium buněčné fyziologie a rozvoj lékařské diagnostiky.

### 2.4.3 Princip fluorescenční mikroskopie

*Obrázek 17 Fluorescenční mikroskop*

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.

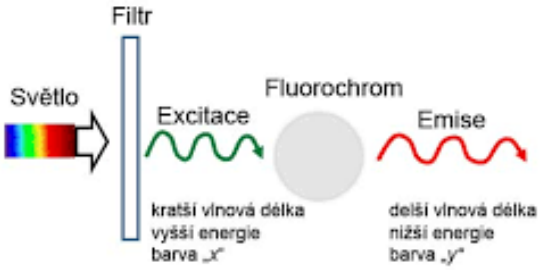
Světlo s krátkou vlnovou délkou (směrem k modré) má vyšší energii než světlo s dlouhou vlnovou délkou (směrem k červené). Proto má světlo emitované z indikátoru obvykle delší vlnovou délku než absorbované (excitační) světlo. Tento rozdíl, mezi excitační vlnovou délkou a emisní vlnovou délkou se nazývá 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 (6.).

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

### 2.4.4 Aplikace fluorescenční mikroskopie ve vizualizaci DNA

Fluorescenční mikroskopie využívá různé fluorochromy (viz obr. 18), jako jsou DAPI nebo propidium jodid, které se vážou na cílové struktury v buňce a umožňují jejich detekci s vysokou specificitou (5.).

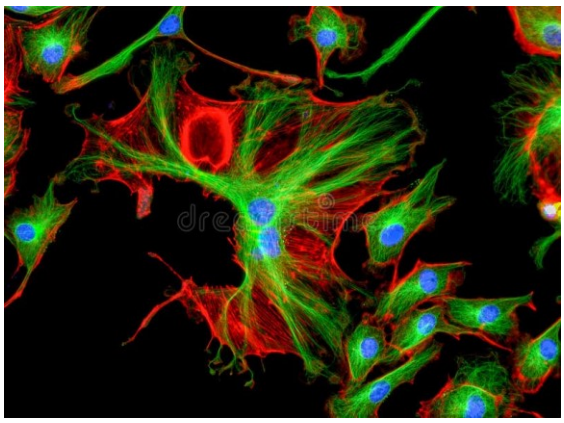



*Obrázek 18 Schéma excitace a emise fluorochromu*

### 2.4.5 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. Z fluorescenčního mikroskopu se skládají v počítači obrazy. Příklad obrazu můžeme vidět na obrázku číslo 19.

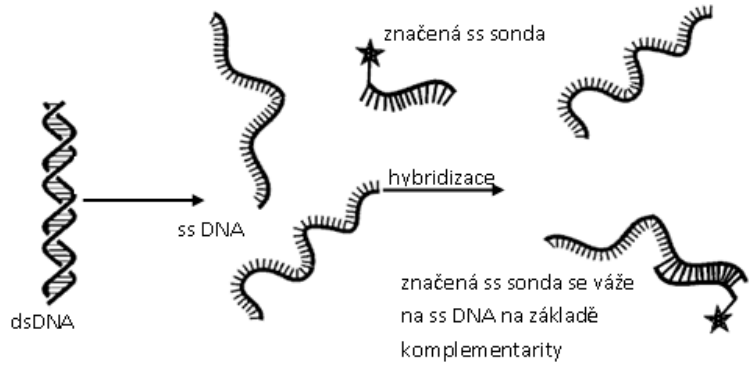
Využití imunofluorescence v klinické praxi je zásadní pro diagnostiku infekčních onemocnění, autoimunitních chorob a nádorových onemocnění, což zvyšuje efektivitu léčby a prognózu pacientů (5.).



*Obrázek 19 Fluorescenční mikroskopický obraz buněk plicní tepny skotu obarvených na mitochondrie, falloidin a jádra procházející mitózou.*

## 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).




*Obrázek 20 Princip hybridizace*

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 (na obrázku číslo 20 jsou značené hvězdičkou) 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).

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

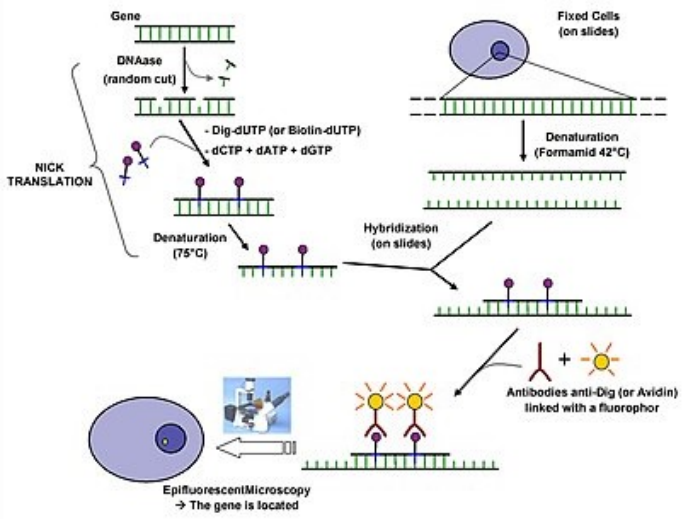
In situ hybridizace je jednou z nejčastějších metod hybridizace v molekulární biologii, která umožňuje přímou lokalizaci specifických nukleových kyselin v buňkách či tkáních. Tato technika je důležitá pro studium genové exprese, struktury chromozomů a genomických změn, které souvisí s různými patologickými 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. Schéma FISH metody můžeme vidět na obrázku číslo 21.

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.




*Obrázek 21 Schéma FISH metody*

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).

# 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, kterou lze využít ke stanovení koncentrace DNA.

Interkalační barviva mají planární strukturu. Díky ní se mohou vmezeřit neboli interkalovat mezi vlákna dvoušroubovice DNA. Příkladem je ethidiumbromid, 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).

## 3.2 Mechanismus interkalačních činidel

Interkalaci jako mechanismus interakce mezi kationtovými, planárními, polycyklickými aromatickými systémy správné velikosti poprvé navrhl Leonard Lerman v roce 1961.

Interkalace je proces, při kterém se molekuly vkládají mezi planární báze deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Tento proces je často využíván pro analýzu DNA a je základem některých typů otrav. Ethidium bromid například interkaluje mezi páry bází adenin-thymin.

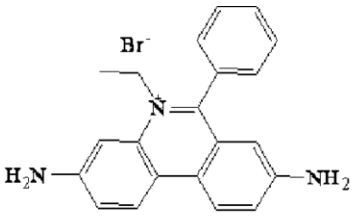
Molekuly (ligandy), které interagují s DNA, mohou tvořit kovalentní vazby, elektrostatické vazby nebo interkalovat mezi páry bází. K interkalaci dochází, když ligandy vhodné velikosti a chemické povahy vstupují mezi páry bází DNA. Tyto ligandy jsou většinou polycyklické, aromatické a planární, což umožňuje efektivní barvení nukleových kyselin.

Aby se interkalátor vešel mezi páry bází, musí DNA dynamicky uvolnit prostor odvíjením. Stupeň odvíjení závisí na interkalátoru. Toto odvíjení způsobí, že se páry bází oddělí a vytvoří otvor. Tento proces vyvolává lokální strukturální změny řetězce DNA, jako je prodloužení nebo zkroucení řetězce, což může vést k inhibici transkripce, replikace a procesů opravy DNA. Díky tomu se interkalátory stávají silnými mutageny a často i karcinogeny.

Ve vodném izotonickém roztoku je kationtový interkalátor elektrostaticky přitahován k povrchu polyaniontové DNA. Ligand vytěsňuje sodný a/nebo hořečnatý kationt přítomný v "kondenzačním mraku" těchto kationtů, který obklopuje DNA, a vytváří tak slabou elektrostatickou asociaci s vnějším povrchem DNA. Z této pozice ligand difunduje podél povrchu DNA a může sklouznout do hydrofobního prostředí mezi dvěma páry bází, které se přechodně "otevřou" a vytvoří interkalační místo, což umožní interkalátoru pohybovat se z hydrofilního prostředí obklopujícího DNA do interkalačního místa. Páry bází přechodně vytvářejí tato otevření v důsledku energie absorbované při srážkách s molekulami rozpouštědla.

Interkalátory DNA se používají v chemoterapeutické léčbě k inhibici replikace DNA v rychle rostoucích nádorových buňkách. Příkladem jsou například doxorubicin (adriamycin) a daunorubicin (7.).

### 3.2.1 Ethidiumbromid

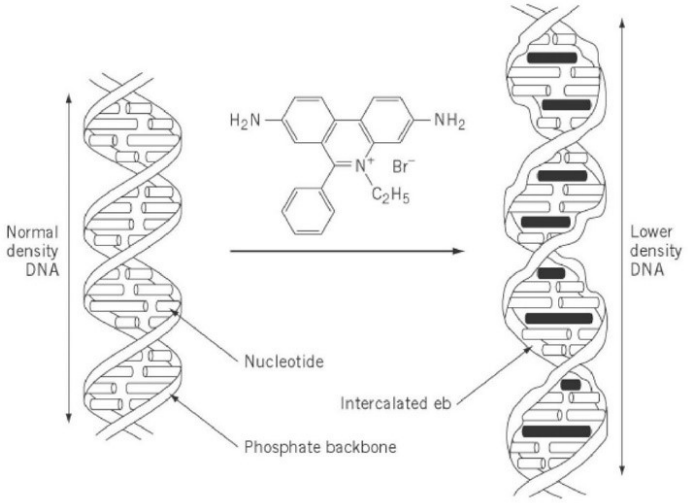



*Obrázek 22 Vzorec Ethidiumbromidu*

Ethidiumbromid (EtBr) 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).

EtBr se interkaluje do hlavního žlábku DNA (na obrázku 23 je interkalace vyznačena tlustou černou čarou) a pomáhá rozlišit fragmenty DNA díky své fluorescenční vlastnosti při vazbě na DNA. Ethidiumbromid je díky své nízké ceně a vysoké citlivosti již po desetiletí nejpoužívanějším barvivem pro screening nukleových kyselin v agarózovém gelu.

Vzhledem k tomu, že se specificky váže na molekuly nesoucí informaci, vyznačuje se silnou

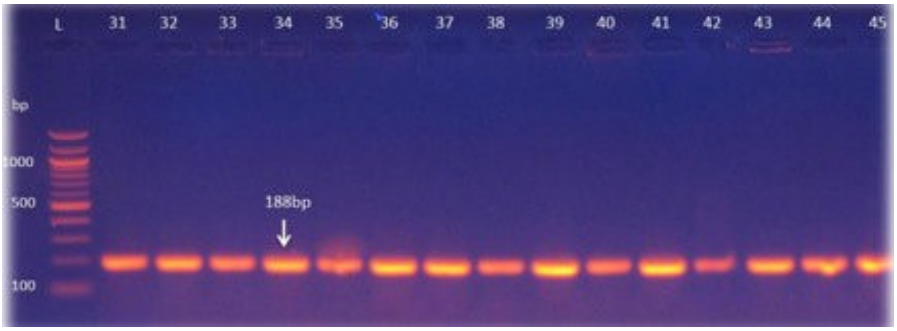



*Obrázek 23 Interkalace EtBr do DNA*

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.

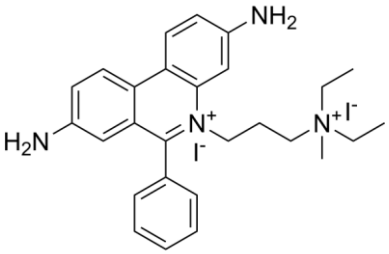



*Obrázek 24 EtBr na agarózovém gelu pod UV světlem*

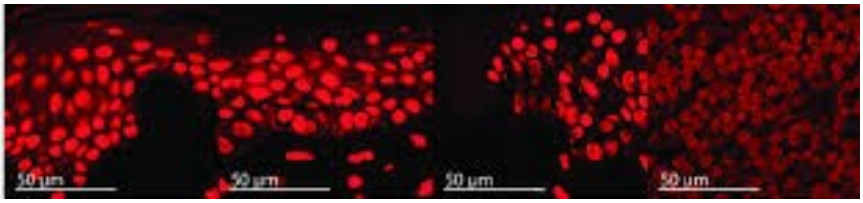
Historicky je nejběžnějším barvivem používaným pro barvení gelů, avšak vzhledem k jeho toxicitě a mutagenitě se dává přednost jiným barvivům, která jsou bezpečnější pro uživatele i životní prostředí (Haines et al. 2015).

### 3.2.2 Propidium jodid

Propidium jodid (viz obr. 25) 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 25 Vzorec Propidium jodidu*



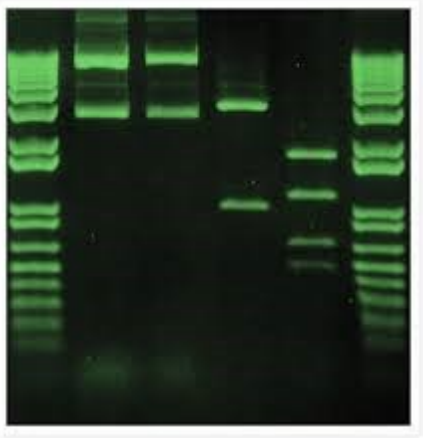

*Obrázek 26 Kožní štěp obarvený PI ve fluorescenčním mikroskopu*

Jak lze vidět na obrázku 26, 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).

### 3.2.3 SYBR Green

SYBR Green byl první z nové generace barviv na nukleové kyseliny v gelu, která byla představena v roce 1995 (Karlsen et al. 1995). 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 27 SYBR green na agarózovém gelu*

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 navržené. 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).

### 3.2.4 DHDM

Ve studii publikované na začátku tohoto roku (Gupta et al. 2024) , se setkáváme s látkou 3,4-dihydroxy-5,6-dimethoxyflavon zkráceně DHDM, která byla izolována z listů Alpinia nigra (česky zvané Galán nebo Alpinie). 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 etidiumbromidu 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.

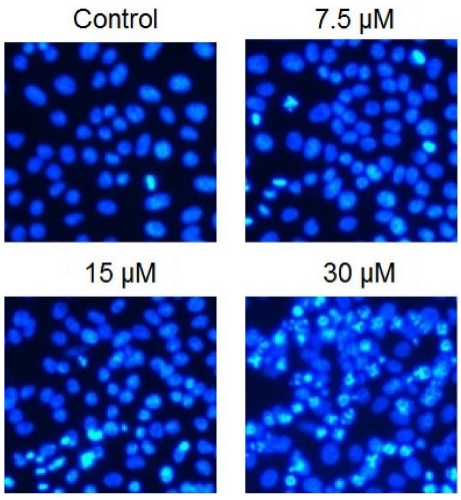
Lze tedy říci, že výsledky této nově publikované studie naznačují, že DHDM má potenciál stát se alternativou k EtBr pro barvení DNA. Jeho schopnost vázat se na dsDNA a vytvářet s ní stabilní komplex naznačuje, že DHDM může být užitečným nástrojem pro studium DNA a dalších biologických procesů, kde je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

## 3.3 Barvy vázající se na malé žlábky 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 žlábky 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 žlábky je barvivo DAPI (Haines et al. 2015).

### 3.3.1 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 (viz obrázek číslo 29), 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).

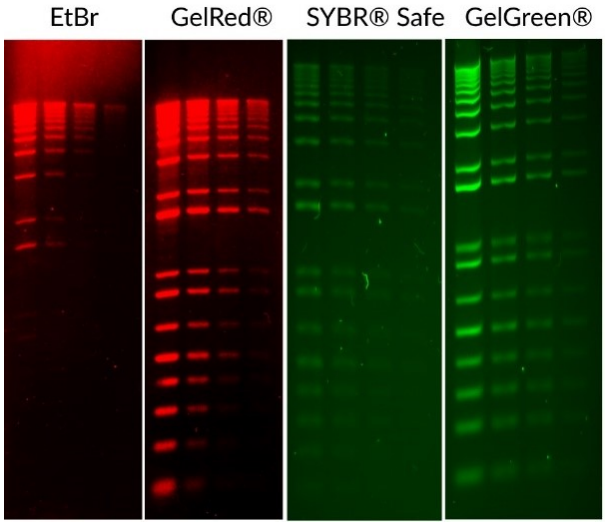



*Obrázek 28 Jádra buněk HeLa obarvená DAPI*

### 3.3.2 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 (Haines et al. 2015, obrázek č. 30), 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.




*Obrázek 29 Porovnání vizualizačních barviv výrobcem*

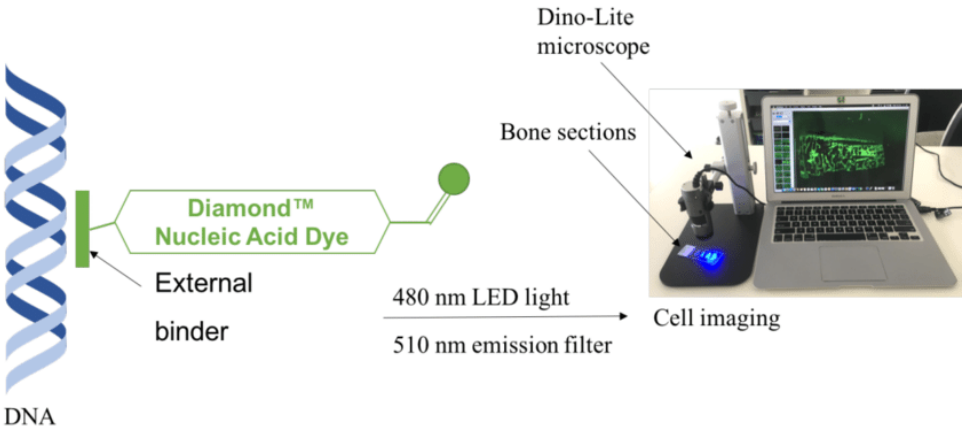
Výrobce uvádí, že RedSafe je méně toxický a mutagenní než ethidiumbromid, a podle výsledků této studie, je stejně citlivý jako ethidiumbromid. Na základě těchto údajů není toto barvivo vhodné pro detekci DNA o nízkých koncentracích, protože nad 1 ng bylo dosaženo pouze nízkých signálů. Studie u RedSafe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

Bylo zjištěno, že GelRed™ je nejcitlivější a nejbezpečnější barvivo pro použití s excitací UV světlem a GelGreen™ i Diamond™ Nucleic Acid Dye (viz obrázek číslo 31) jsou citlivá a bezpečnější barviva při použití excitace modrým světlem (Haines et al. 2015).




*Obrázek 30 Diamond™ Nucleic Acid Dye a model fluorescenčního barvení in-situ*

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 korelaci (Haines et al. 2015).

# 4 Použití vizualizačních metod DNA ve výuce na SŠ

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 zajímají. To lze dosáhnout například pomocí praktických experimentů, workshopů či použitím nových technologií ve výuce.

### 4.1.1 Praktické experimenty

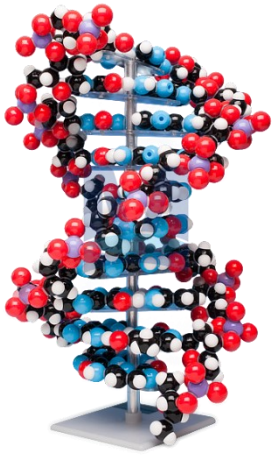
Praktické experimenty představují nedílnou součást výuky biologie, protože umožňují studentům získat přímou zkušenost s vědeckými metodami a principy. Tento přístup je založen na aplikaci teoretických znalostí v praxi, což posiluje pochopení biologických konceptů a procesů. Ve výukovém prostředí jsou nejčastěji využívány experimenty, které si žáci mohou vyzkoušet sami. Takové aktivity nejen zvyšují zájem studentů o danou problematiku, ale také podporují jejich schopnost kritického myšlení a dovednosti v oblasti vědeckého bádání.

Praktické experimenty ve školách zpravidla zahrnují zjednodušené modely nebo simulace reálných biologických systémů. Tyto modely jsou navrženy tak, aby byly snadno pochopitelné a realizovatelné v rámci školních podmínek, avšak zároveň dostatečně věrné k tomu, aby poskytly relevantní výsledky.

Integrace praktických experimentů do výuky biologie je tedy důležitým faktorem pro efektivní vzdělávání. Kromě zvyšování zájmu a angažovanosti studentů také podporuje rozvoj jejich praktických dovedností a schopností aplikovat teoretické poznatky v reálných situacích. Tímto způsobem přispívají praktické experimenty k celkovému zlepšení kvality výuky.

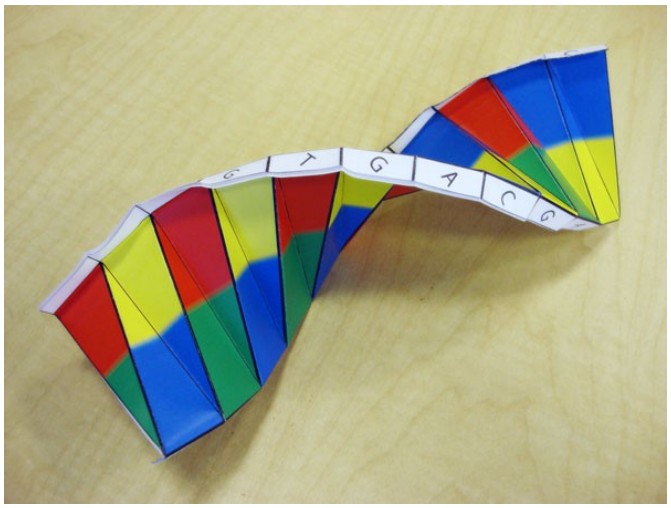
**Struktura DNA**

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 (8.), nebo existují papírové modely, které se nazývají DNA origami.



*Obrázek 31 Velký model DNA Molymod*

DNA je jednou z nejznámějších 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 (9.).



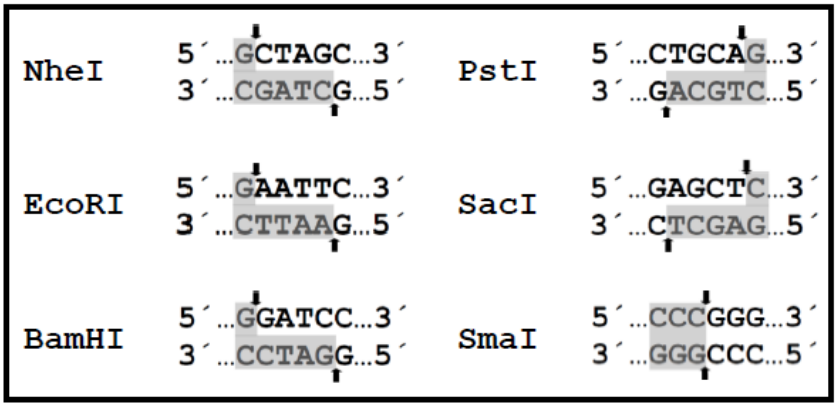

*Obrázek 32 Origami DNA*

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.

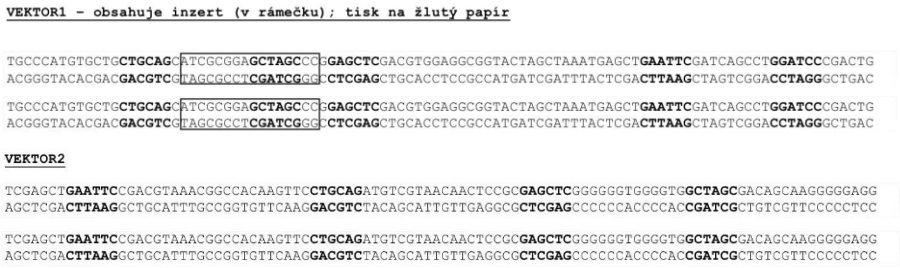
Animace jsou tvořeny s důrazem na interdisciplinaritu mezi biologií a chemií na základě poznatků ze současných středoškolských učebnic chemie a biologie (10.). Najdeme zde i animaci proteosyntézy anebo metody PCR.

**Restrikční štěpení**

Restrikční štěpení lze žákům přiblížit pomocí restrikčního štěpení na papíře. Žáci si zahrají na restrikční endonukleázy, které obvykle rozpoznávají a štěpí specifickou sekvenci DNA. Rozpoznávaná sekvence je zpravidla palindromatická a tudíž je sekvence nukleotidů v jednom vlákně shodná se sekvencí nukleotidů v komplementárním vlákně.




*Obrázek 34 Kartička restrikčních endonukleáz*




*Obrázek 33 Vektor 1 a 2 k restrikčnímu štěpení na papíře*

K této aktivitě je zapotřebí těchto pomůcek: kartička restrikčních endonukleáz, vytištěný vektor 1 (žlutý papír), vytištěný vektor 2 (bílý papír), lepidlo (pokud nejsou vektory již předem slepené), izolepa a nůžky.

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

Tuto názornou aktivitu na restrikční štěpení jsem převzala od Ladislava Merty, který je učitelem na gymnáziu a zároveň se věnuje molekulární biologii (11.).

**PCR**

V roce 2020 v časopise The American Biology Teacher byl zveřejněn článek (Merta et al. 2020), 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 35 Obsah sady pro demonstraci replikace, transkripce a PCR*

Obsah sady (viz obr. 35): (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).

### 4.1.2 Workshopy

Vhodným způsobem zájmového vzdělávání jsou také workshopy, které pořádají pro středoškolské studenty univerzity, 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 (12.).

### 4.1.3 Nové technologie ve výuce

V dnešní době jsou navíc přístupné zjednodušené verze mnoha vizualizačních metod, které byly dříve dostupné pouze v pokročilých vědeckých laboratořích. Díky technologickému pokroku mohou studenti ve školách využívat například jednoduché mikroskopy s vysokým rozlišením, digitální kamery pro záznam a analýzu experimentů, simulace biologických procesů na počítačích nebo si i přímo vyzkoušet elektroforézu. Tyto nástroje umožňují ještě detailnější a interaktivnější zkoumání biologických struktur, čímž se výrazně zvyšuje efektivita a atraktivita výuky.

Příkladem je stránka Bento.bio, která prodává přístroje na PCR nebo elektroforézu, které je možné ve výuce využít.

**Gelová elektroforéza**

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 36 Mobilní genomické zařízení Bento Lab (zdroj: https://bento.bio/product/bento-lab/)*

Sada Biotechnologie 101 je výukový nástroj, který přináší praktické zkušenosti s molekulární biologií 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 reagencie pro experimenty (13.).

Dále existuje stránka, která se zabývá učebními pomůckami. Firma se nazývá conatex a prodává sady navržené přímo pro učitele. Tato sada obsahuje skoro všechny pomůcky pro gelovou elektroforézu a podrobnou příručku s návodem (14.).

**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.

# 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 odborných 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.

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

DRMANAC, Radoje, Snezana DRMANAC, Gloria CHUI, Robert DIAZ, Aaron HOU, Hui JIN, Paul JIN, Sunhee KWON, Scott LACY, Bill MOEUR, Jay SHAFTO, Don SWANSON, Tatjana UKRAINCZYK, Chongjun XU a Deane LITTLE, 2002. Sequencing by hybridization (SBH): advantages, achievements, and opportunities. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* [online]. **77**, 75–101. ISSN 0724-6145. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-45713-5_5

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

GREENOUGH, Lucia, Kelly M. SCHERMERHORN, Laurie MAZZOLA, Joanna BYBEE, Danielle RIVIZZIGNO, Elizabeth CANTIN, Barton E. SLATKO a Andrew F. GARDNER, 2016. Adapting capillary gel electrophoresis as a sensitive, high-throughput method to accelerate characterization of nucleic acid metabolic enzymes. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(2), e15. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv899

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

KARGER, Barry L. a Andras GUTTMAN, 2009. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. **30**(Suppl 1), S196–S202. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900218

KARLSEN, Frank, Harald B. STEEN a Jahn M. NESLAND, 1995. SYBR Green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* [online]. **55**(1), 153–156. ISSN 0166-0934. Dostupné z: doi:10.1016/0166-0934(95)00053-W

KASPER, Thomas J., Mara MELERA, Philippe GOZEL a Robert G. BROWNLEE, 1988. Separation and detection of DNA by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. **458**, 303–312. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)90574-0

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 STŘÍBRNÁ, 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.

MATOUŠ, Bohuslav, 2010. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.

MAXAM, Allan M. a Walter GILBERT, 1980. [57] Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 499–560 [vid. 2024-06-26]. ISBN 978-0-12-181965-1. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(80)65059-9

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.

QIN, Yu, Tobias M. SCHNEIDER a Michael P. BRENNER, 2012. Sequencing by Hybridization of Long Targets. *PLoS ONE* [online]. **7**(5), e35819. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035819

RONAGHI, Mostafa, Samer KARAMOHAMED, Bertil PETTERSSON, Mathias UHLÉN a Pål NYRÉN, 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* [online]. **242**(1), 84–89. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.0432

ROTHBERG, Jonathan M., Wolfgang HINZ, Todd M. REARICK, Jonathan SCHULTZ, William MILESKI, Mel DAVEY, John H. LEAMON, Kim JOHNSON, Mark J. MILGREW, Matthew EDWARDS, Jeremy HOON, Jan F. SIMONS, David MARRAN, Jason W. MYERS, John F. DAVIDSON, Annika BRANTING, John R. NOBILE, Bernard P. PUC, David LIGHT, Travis A. CLARK, Martin HUBER, Jeffrey T. BRANCIFORTE, Isaac B. STONER, Simon E. CAWLEY, Michael LYONS, Yutao FU, Nils HOMER, Marina SEDOVA, Xin MIAO, Brian REED, Jeffrey SABINA, Erika FEIERSTEIN, Michelle SCHORN, Mohammad ALANJARY, Eileen DIMALANTA, Devin DRESSMAN, Rachel KASINSKAS, Tanya SOKOLSKY, Jacqueline A. FIDANZA, Eugeni NAMSARAEV, Kevin J. MCKERNAN, Alan WILLIAMS, G. Thomas ROTH a James BUSTILLO, 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* [online]. **475**(7356), 348–352. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature10242

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

SANGER, F. a A.R. COULSON, 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* [online]. **94**(3), 441–448. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2

SLATKO, Barton E., Andrew F. GARDNER a Frederick M. AUSUBEL, 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **122**(1), e59. ISSN 1934-3639, 1934-3647. Dostupné z: doi:10.1002/cpmb.59

SOUTHERN, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* [online]. **98**(3), 503–517. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(75)80083-0

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

SVOBODA, Jiří, 2005. *Organická chemie I*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-7080-561-9.

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

WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK, 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. **171**(4356), 737–738. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/171737a0

WATSON, James Dewey, 2004. *Molecular biology of the gene*. 5th ed. San Francisco Cold Spring Harbor, N.Y: Pearson/Benjamin Cummings Cold Spring Harbor laboratory press. ISBN 978-0-321-22368-5.

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

YAKOVCHUK, Peter, Ekaterina PROTOZANOVA a Maxim D. FRANK-KAMENETSKII, 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research* [online]. **34**(2), 564–574. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkj454

## Seznam ostatních použitých zdrojů


1. https://en.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Miescher
2. https://cs.wikipedia.org/wiki/Jednovl%C3%A1knov%C3%A1_DNA
3. https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
4. https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence
5. https://www.wikiskripta.eu/w/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop
6. https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop
7. https://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(biochemistry)
8. https://www.ucebnipomucky.net/p/velky-model-dna
9. https://www.genome.gov/about-genomics/teaching-tools/dna-origami
10. http://www.studiumbiochemie.cz/meziobor_na3.html
11. Učební materiály Ladislava Merty
12. https://www.prf.jcu.cz/cz/fakulta/katedry/centrum-pro-prirodovedne-vzdelavani/juniorska-univerzita/workshopy-pro-stredoskolske-zaky
13. https://bento.bio/product/bento-lab/
14. https://www.conatex.cz/catalog/biologie/imunologie_a_genetika/gelova_elektroforeza_restrikcni_analyza/product-elektroforeza_v_agarozovem_gelu_sada_pro_ucitele/sku-1086411

## Seznam obrázkových zdrojů


Obrázek 1. https://www.wikiskripta.eu/sites/www.wikiskripta.eu/images/4/4a/Struktura_polynukleotidov%C3%A9ho_%C5%99et%C4%9Bzce.png

Obrázek 2. https://www.priyamstudycentre.com/2023/08/deoxyribonucleic-acid-dna.html

Obrázek 3. https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Flabguide.cz%2Freagencie%2Fenzymy%2Fnukleazy%2F&psig=AOvVaw2ilBn0WYxHGxi_jXOuF0yI&ust=1719062861707000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCLDkxa3m7IYDFQAAAAAd

Obrázek 4. https://www.google.com/imgres?q=glykosidick%C3%A1%20vazba%20v%20DNA&imgurl=https%3A%2F%2Fslideplayer.cz%2Fslide%2F13482222%2F81%2Fimages%2F16%2FN-glykosidov%25C3%25A1%2Bvazba%2Bglykosidy%253A%2Bderiv%25C3%25A1ty%2Bcukr%25C5%25

Obrázek 5. https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=53086&displayformat=dictionary

Obrázek 6. https://www.priyamstudycentre.com/2023/08/deoxyribonucleic-acid-dna.html

Obrázek 7. https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=52897&displayformat=dictionary

Obrázek 8. https://biologie-v-kostce.blogspot.com/2011/05/58-restrikcni-nukleazy-vyznam-v-genovem.html

Obrázek 9. https://biologie-v-kostce.blogspot.com/2011/05/58-restrikcni-nukleazy-vyznam-v-genovem.html

Obrázek 10. https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods6.html

Obrázek 11. https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
Obrázek 12. https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za
Obrázek 13. https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za
Obrázek 14. https://biopedia.sk/molekularna-biologia/elektroforeza-nukleovych-kyselin
Obrázek 15. https://www.fishersci.be/shop/products/simpliamp-thermal-cycler-extended-warranty-package-5/p-7180381
Obrázek 16. https://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at27-pcr.html
Obrázek 17. https://www.mikroskopy-optika.cz/produkt/fluorescencni-mikroskop-model-b-383fl
Obrázek 18. https://labguide.cz/reagencie/fluorochromy/
Obrázek 19. https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fes.dreamstime.com%2Fimagen-del-microscopio-de-fluorescencia-las-c%25C3%25A9lulas-humanas-que-experimentan-la-mitosis-image100397498&psig=AOvVaw3fwqCTPZc1v4aiuF212DeI&ust=1719092810513000&source=i
Obrázek 20. https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-southern_blotting&lang=cz
Obrázek 21. https://www.wikiskripta.eu/w/Hybridizace_in_situ
Obrázek 22. https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-ethidium-bromide-and-doxorubicin_fig1_244970113
Obrázek 23. https://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/
Obrázek 24. https://www.researchgate.net/figure/Fig-2A2B2C-Ethidium-bromide-stained-agarose-gel-electrophoresis-of-PCR-products_fig1_331089567
Obrázek 25. https://www.medchemexpress.com/Propidium_Iodide.html
Obrázek 26. https://www.researchgate.net/figure/Propidium-iodide-PI-staining-in-human-full-thickness-skin-graft-cross-sections-No_fig3_321510625
Obrázek 27. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S33102

Obrázek 28. https://www.researchgate.net/figure/DAPI-staining-showing-nuclear-morphology-of-the-AL-treated-HeLa-cells-The-experiments_fig3_338841375

Obrázek 29. https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/

Obrázek 30. https://www.researchgate.net/figure/Diamond-Nucleic-Acid-Dye-and-Fluorescence-in-situ-staining-model-137-138-DNA-isolation_fig9_355183218

Obrázek 31. https://www.ucebnipomucky.net/p/velky-model-dna

Obrázek 32. https://healthmatters2day.blogspot.com/2011/11/dna-origami.html

Obrázek 33. materiály k výuce Ladislava Merty

Obrázek 34. materiály k výuce Ladislava Merty

Obrázek 35. Merta et al. 2020

Obrázek 36. https://bento.bio/product/bento-lab/