VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat

BIOLOGIE A GENETIKA

TEORIE KE CVIČENÍM

Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D.
MVDr. Dana Halová, Ph.D.
Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D.

BRNO 2017

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato skripta jsou spolufinancována z Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost:

„Inovace bakalářského a navazujícího magisterského studijního programu v oboru Bezpečnost a kvalita potravin“

(reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287)

Na úvod aneb co vás čeká…….

Do rukou se Vám dostává aktuální verze skript, která jsou určena pro Vás, především studenty bakalářského, ale i magisterského studia obou veterinárních fakult VFU Brno, pro praktická cvičení z předmětů Biologie a molekulárně biologické metody nebo Biologie. Tato skripta vznikla za finanční podpory Operačního programu CZ.1.07/2.2.00/28.0287: „Inovace bakalářského a navazujícího magisterského studijního programu v oboru Bezpečnost a kvalita potravin“.

Výuka biologie bude probíhat formou přednášek a praktických cvičení se zaměřením na obecnou biologii a základy genetiky. V souvislosti se změnou kurikula v magisterské i bakalářské formě studia došlo k redukci výuky ze dvou semestrů na jeden. Na tyto změny jsme reagovali úpravou sylabů a to jak v přednáškách tak i ve cvičeních. V zimním semestru bude výuka pro obě formy studia probíhat stejně. Během 13 týdnů se budete věnovat především mikroskopické technice. Budeme tedy po Vás chtít, abyste byli schopni popsat mikroskop (jeho části a co k čemu slouží) a uměli ho správně používat při pozorování trvalých preparátů, které budete mít na cvičeních k dispozici. Sami si zhotovíte různé nativní preparáty, krevní nátěry, bakteriologické roztěry a otestujete si svoji krevní skupinu. Naučíte se, jaký je rozdíl mezi rostlinnou a živočišnou buňku, jakým způsobem se pohybují, jak reagují na různá osmotická prostředí a jak se rozmnožují. Biologie se v dnešní době neobejde bez moderních metod, proto Vás seznámíme s metodami molekulární biologie (izolace DNA, PCR a gelová elektroforéza) a to formou řešení konkrétního úkolu – zjištění pohlaví ptačího jedince. Po absolvování těchto cvičení budete znát principy jednotlivých metod, jejich význam a praktické využití. Využijete i genetický model octomilku (*Drosophila melanogaster*) k jednoduchému experimentu, tak abyste si mohli ověřit, jak se dědí barva očí u tohoto hmyzu v dalších generacích.

V rámci samostudia budete počítat genetické příklady z oblasti mendelistické a nemendelistické dědičnosti, populační a kvantitativní genetiky. Měli byste zvládnout jednoduchá genetická křížení (kombinační čtverec, ale i rozvětvovací metodu) k odhalení genotypů a fenotypů různých generací potomstva výchozího křížení a jakým způsobem se dědí krevní skupiny u lidí a zvířat. Měli byste porozmět jak se mohou geny vzájemně ovlivňovat, jak probíhá mitochondriální a chloroplastová dědičnost, jak ovlivňuje dědičnost pohlaví a vazba genů a jaký je rozdíl mezi kvalitativním a kvantitativním znakem. Tyto poznatky budete aplikovat i do genetiky populací.

V těchto skriptech se můžete orientovat podle obsahu, který je rozčleněn do celků, zhruba tak jak budou probíhat na cvičeních. Každá kapitola začíná teoretickým úvodem do problematiky. Tuto část berte jako minimum znalostí, které od Vás budeme požadovat na cvičeních (je nutné, abyste na cvičení chodili připraveni!). Rovněž **doporučujeme chodit na přednášky**, kde se dozvíte o dané problematice více informací. Pro hlubší studium **využijte seznam studijní literatury a studijních pomůcek** na konci těchto skript. Skripta jsou doplněna o názorné obrázky, tabulky a grafy, vzorové genetické příklady, doporučenou literaturu, internetové odkazy a kontrolní otázky. Další potřebné informace (sylaby, rozvrhy, přednášky, pracovní listy do cvičení, odkazy na multimediální pomůcky atd.) naleznete na webových stránkách Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat.

Přejeme Vám hodně studijních úspěchů a doufáme, že tato skripta Vám budou užitečnou pomůckou.

Kolektiv autorů

OBSAH

1. Vedení protokolů na cvičeních ... 4
2. Metody získávání informací v biologických vědách ... 5
3. Zvětšovací zařízení (lupa, světelný mikroskop) ... 6
   3.1. Světelný mikroskop ... 6
      3.1.1. Vývoj světelných mikroskopů ... 6
      3.1.2. Složení světelného mikroskopu ... 7
      3.1.3. Druhy světelných mikroskopů ... 13
4. Mikroskopická technika ... 16
5. Chemické složení bioplazmy ... 19
   5.1. Prvky ... 19
   5.2. Látky ... 19
6. Prokaryota, zastavení objektu pod imerzí ... 22
   6.1. Prokaryota ... 22
      6.1.1. Doména bakterií (Bacteria) ... 22
      6.1.2. Doména archeí (Archaea) ... 23
7. Eukarya (eukaryota) – živočišná buňka, protozoa ... 25
8. Eukarya (eukaryota) – rostlinná buňka ... 28
9. Pohyb a taxe, nativní preparáty ... 30
   9.1. Pohyb a taxe ... 30
   9.2. Nativní preparáty ... 32
10. Vyšetření krve ... 33
   10.1. Metody vyšetření krve a jejich využití ... 33
   10.2. Měření velikosti mikroskopických objektů ... 34
   10.3. Transport látek, osmotické jevy (živočišná buňka) ... 35
   10.4. Určování krevních skupin ... 35
11. Buněčný cyklus, mitóza ... 38
12. Rozmnožování a vývoj ... 41
13. Modelový organizmus – *Drosophila melanogaster* ... 45
14. Cytogenetika ... 47
15. Metody molekulární biologie ... 50
16. Buněčné a tkáňové kultury ... 58
17. Nebuněčné formy života, elektronové mikroskopy ... 61
   17.1. Nebuněčné formy života ... 61
   17.2. Elektronové mikroskopy ... 64
18. Fyzikální a chemické vlivy vnějšího prostředí ... 68
19. Genetika ... 70
   19.1. Mendelismus, monohybridismus ... 70
   19.2. Dihybridizmus, polyhybridizmus a rozvětvovací metoda ... 71
   19.3. Polymorfní geny ... 74
   19.4. Dědičnost a pohlaví ... 75
   19.5. Genové interakce ... 76
   19.6. Vazba genů ... 78
   19.7. Nemendelistická dědičnost ... 80
   19.8. Kvantitativní genetika ... 82
   19.9. Populační genetika ... 83
20. Pokusy na živých zvířatech ... 85
21. Studijní literatura a studijní pomůcky ... 88

1. Vedení protokolů na cvičeních

Z každého praktického cvičení budete vypracovávat pracovní listy, které je třeba si vytisknout předem na každé cvičení. Pracovní listy si můžete stáhnout ze stránek Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat. Cílem mikroskopických cvičení bude zastavení objektů v mikroskopu a následné zhotovení kresby tužkou (je potřeba mít tužku o správné tvrdosti, vhodnou pro kreslení!), případně pastelkami (zelený chloroplast apod.). Je nutné, aby byly kresby dostatečně velké (v protokolech je na to vymezený prostor) a kvalitní. Zhotovenou kresbu doplňte o popis jednotlivých částí (buněčná stěna, jádro, chloroplast apod.). Část pracovních listů je věnovaná genetice a počítání genetických příkladů, což bude váš samostatný úkol (na cvičeních bude pouze malý prostor k vysvětlení problematických úkolů a ke kontrole správnosti řešení). Součástí pracovních listů jsou i kontrolní otázky, které je třeba správně zdopovědět, čímž si procvičíte probíranou problematiku.

Teorie ke každému cvičení (pro přípravu na cvičení a ke správnému zodpovězení kontrolních otázek) a vzorové příklady do genetiky (ke správnému vyřešení genetických příkladů) naleznete v těchto skriptech, které jou rovněž k dispozici na ústavních stránkách.

Pracovní listy budou Vaší vizitkou, proto se snažte při jejich psaní dodržovat určitou úroveň, tak abyste se za svoji vizitku nemuseli stydět. Na cvičeních budete mít dostatečný prostor pro přípravu a pozorování preparátů, tak i pro vyplnění pracovních listů.

Pracovní listy, jejich kompletnost (v případě absence je potřebné si protokoly doplnit) a úprava budou součástí hodnocení práce studentů ve cvičeních (společně s docházkou a úspěšným absolvováním zápočtových testů) a podmínkou udělení zápočtu.

2. Metody získávání informací v biologických vědách

Každý vědní obor včetně biologie usiluje o získávání nových informací, které mohou doplnit nebo rozšířit stávající poznatky, nebo slouží k ověřování hypotéz. Hlavní metodou pro získávání nových údajů je **pozorování**, ke kterému je možné využít všechny naše smysly (především zrak), jejichž účinnost se může v kombinaci s přístroji (lupa, mikroskop) znásobit.

V biologii a medicíně lze k získávání informací využít i složitější postupy, které vyžadují speciální znalosti a techniku. Jedná se například o klinické, biochemické, serologické, hematologické, imunologické, mikrobiologické (bakteriologické, virologické, parazitologické), cytogenetické, histologické, či patoanatomické vyšetření. Lze využít různé postupy s využitím pokusných laboratorních zvířat, buněčných či tkáňových kultur nebo živných půd a v neposlední řadě i moderní metody molekulární biologie. Další důležité informace mohou být získávány např. ze zdravotní dokumentace, statistických přehledů, z rozhovoru, z dotazníků, z odborných časopisů a z různých databází přístupných na internetu. Některým metodám z oblasti biochemie, hematologie, bakteriologie, cytologie a molekulární biologie jsou věnované samostatné či dílčí kapitoly.

Další metodou získávání nových údajů je **pokus** (experiment), což je výzkumný postup, při kterém se zjišťují následky vyvolané u zkoumaného objektu změnou jednoho z faktorů, které na objekt působí. Při pokusu musí být dodrženo pravidlo jedné proměnné, musí být dobře definované a stabilní podmínky, které umožňují reprodukovatelnost pokusu. K vyloučení chyb a k porovnání výsledků pokusu slouží kontrolní nebo slepé pokusy. K vyhodnocení výsledků pokusů se využívají různé statistické metody. Pokusům na živých zvířatech je věnována jedna samostatná kapitola.

Jelikož hlavním cílem praktických cvičení z biologie je naučit se pozorovat a klasifikovat některé jevy v živé přírodě na mikroskopické úrovni, jsou první kapitoly věnovány mikroskopické technice.

3. Zvětšovací zařízení (lupa, světelný mikroskop)

Studium mikroskopických struktur a funkcí biologických objektů se neobejde bez použití zvětšovacích technických zařízení, která umožňují pozorování detailů pod hranicí rozlišovací schopnosti lidského oka (0,2 mm). Zvětšení rozlišovací schopnosti lidského oka je možné pomocí lupy nebo světelného mikroskopu, což jsou optická zařízení, která zvětšují obraz předmětu 2 – 1000× v závislosti na použité optické soustavě a druzích čoček.

Na cvičeních budeme používat světelné mikroskopy se zvětšením v rozsahu **40** – **1000**× s rozlišovací schopností **0,2 µm**. Mikroskopem prochází světelný paprsek (od toho název světelný mikroskop), který je usměrňován skleněnými čočkami.

ČOČKY jsou jednoduchá optická zařízení zhotovená ze skla nebo jiného čirého materiálu (kazivec, umělá pryskyřice). Podle lomu paprsků, které přicházejí do čočky rovnoběžně s optickou osou, se dělí čočky na **spojky** (spojné čočky), které lámou rovnoběžně přicházející paprsky do ohniska a obraz zvětšují a **rozptylky** (rozptylné čočky), které rozptylují rovnoběžně přicházející paprsky a obraz zmenšují.

LUPA je nejjednodušší optické zařízení, které umožňuje jen malá zvětšení a lze je využít např. ke studiu částí květů, drobnějšího hmyzu a planktonu. Lupy jsou složeny z jedné nebo více čoček spojných, které zvětšují **2** – **30**×. Obraz pozorovaného objektu, vloženého mezi čočku a přední ohnisko, je **přímý** (nepřevrácený) a **zvětšený**. Na praktických cvičeních budeme používat lupu pouze pro pozorování octomilek (*Drosophila melanogaster*).

3.1. Světelný mikroskop

3.1.1. Vývoj světelných mikroskopů

"Spatřil jsem neuvěřitelné množství zvířátek plavajících čiperněji než cokoli, co jsem do té doby viděl. Největší z nich kroutila svými tělíčky a tak se pohybovala vpřed. A co víc - menších zvířátek bylo tolik, že voda vypadala jako živá." Citát pochází z dopisu, který roku 1674 zaslal Královské společnosti v Londýně holandský výrobce mikroskopů a amatérský pozorovatel mikrosvěta **Antonie van Leeuwenhoek**. Optickou část mikroskopu tvořila jediná čočka, vzorek se umisťoval na hrot před čočku a mikroskop se držel v ruce těsně u oka. Leeuwenhoekovy mikroskopy zvětšovaly až 270× a jejich rozlišovací schopnost byla až 1,35 µm. Anthonie van Leeuwenhoek nebyl první výrobce mikroskopů. Už kolem roku 1595 vznikl v dílně Holanďana **Zachariase Janssena** mikroskop tvořený dvěma čočkami umístěnými na opačných koncích posuvného tubusu, zvětšoval pouze 9× a trpěl vážnými optickými vadami. Mikroskopy Angličana **Roberta Hooka** z roku 1665 poskytovaly sice větší zvětšení, ale i ony měly potíže s kvalitou zobrazení. Optické vady složených mikroskopů byly odstraněny až v 19. století, kdy firma Weiss začala vyrábět mikroskopy s vylepšenými optickými vlastnostmi skla.

Základní princip optického mikroskopu se od 19. století nezměnil. Už v dobách Carla Zeisse narazil mikroskop na nepřekonatelné hranice dané fyzikálními zákony – zvětšení maximálně 1000× a rozlišení **0,2 µm**. Byly však vyvinuty mnohé metody, které rozšířily možnosti badatelů. Aby se např. světelným paprskům usnadnila cesta skrz vzorek do objektivu, používá se u větších zvětšení (imerzní objektiv se zvětšením 100×) tzv. **imerze**. Vědci se postupně naučili vzorky barvit různými barvivy, která se vážou pouze na určité

buněčné struktury, např. na některé buněčné organely, a tím zvyšují jejich viditelnost. Pozorování v temném poli nebo v polarizovaném světle, Nomarského diferenciální kontrast, metoda fázového kontrastu (která umí využít rozdíly v rychlosti, jakou světlo proniká vzorkem, ke zvýraznění kontrastu) – to jsou jen některé z řady optických „triků“, jimiž vědci dokáží zviditelnit zdánlivě neviditelné.

V minulosti měl výzkumník velmi omezené možnosti. Preparát mohl zabezpečit proti vyschnutí a uchovat, důležité objevy mohl překreslit, vyfotografovat, případně pomocí měřicí vložky v okuláru určit rozměry pozorovaných objektů. Dnešní mikroskopy propojené s počítači umožňují nejen pohodlnou archivaci digitalizovaných obrázků, ale i jejich podrobnou analýzu. Měření, výpočty buněčných objemů a koncentrací barevně odlišených látek, tvorba trojrozměrných modelů a skládání více obrázků do sebe se dnes stalo samozřejmostí.

3.1.2. Složení světelného mikroskopu

Část optická – objektivy, okuláry.

Část osvětlovací (světelná) – zdroj světla, kondenzor s lamelovou clonou, zrcátko (v současných mikroskopech zabudované v podstavci), případně filtry.

Část mechanická – podstavec, stativ (nosič), tubus, revolverový měnič objektivů, stolek se svorkami a křížovým vodičem preparátů, makroposuv a mikroposuv (točítka hrubého a jemného posuvu).

ČÁST OPTICKÁ

Je tvořena dvěma čočkami nebo dvěma soustavami čoček. Soustava čoček, která je blíže k pozorovanému předmětu (objektu), je označována jako **objektiv**, druhá, která je blíže k oku, se označuje jako **okulár**. Předmět se umísťuje mezi jednoduchou a dvojnásobnou ohniskovou vzdálenost objektivu, kterým vzniká **převrácený** a **zvětšený** obraz. Tento obraz se dále zvětšuje (**10×**) a pozoruje se okulárem.

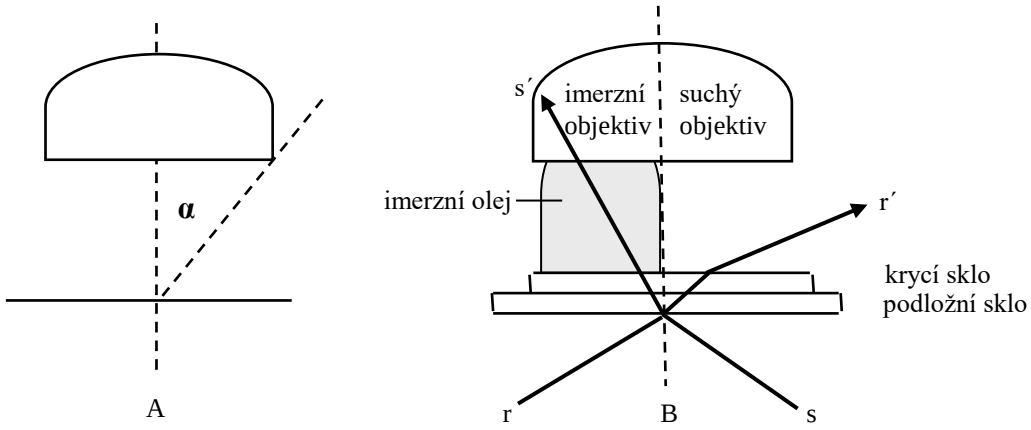
OBJEKTIVY jsou optické soustavy složené z několika čoček, buď volných, nebo tmelených dohromady. Soustavy čoček jsou uloženy ve válcovitých kovových pouzdrech (tubusech), která jsou opatřena na jednom konci standardním závitem.

Charakteristické vlastnosti objektivů:

- **Ohnisková vzdálenost (f)** je vzdálenost čočky od ohniska, kolísá od 1,5 mm (objektivy nejvíce zvětšující) do 20 mm (objektivy málo zvětšující).
- **Zvětšení (Z)** je nepřímo závislé na ohniskové vzdálenosti objektivu. Čím kratší je ohnisková vzdálenost, tím je větší zvětšení a naopak. **$Z = 250/f$**, kde 250 = konvenční pracovní vzdálenost lidského oka v mm. Celkové zvětšení světelných mikroskopů používaných na cvičeních je v rozmezí **40×** až **1 000×**.
- **Volná pracovní vzdálenost** je vzdálenost mezi čelní čočkou objektivu a krycím sklem preparátu. Volná pracovní vzdálenost se u více zvětšujících objektivů zmenšuje.
- **Velikost zorného pole** (plocha, kterou vidíme v mikroskopu) je závislá na okuláru a jeho cloně a na ohniskové vzdálenosti objektivu. Čím je ohnisková vzdálenost větší, tím je i zorné pole větší. Velikost zorného pole se u více zvětšujících objektivů zmenšuje (plocha, kterou v mikroskopu vidím se zmenšuje, vidím toho méně, ale ve větších detailech).
- **Numerická apertura (NA)** (apertura = otvor) je dána vzorcem: **$NA = n.\sin\alpha$**, kde n = index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem, α (alfa) = úhel svíraný optickou osou mikroskopu a pláštěm kužele, v němž se nacházejí paprsky, které z daného místa

preparátu mohou vstoupit do objektivu a podílet se na zobrazení. Na numerické apertuře je závislá světelnost a rozlišovací schopnost objektivu. Čím více zvětšující objektiv, tím větší je i NA. Numerická apertura je jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu uvedena.

- **Rozlišení (d)** je vlastnost objektivů rozlišit dva od sebe nepatrně vzdálené body ještě jako dva samostatné body. **$d = \lambda/NA$**, kde NA = numerická apertura, λ (lambda) = vlnová délka použitého světla. Čím větší je numerická apertura, tím je lepší rozlišení (tj. menší minimální vzdálenost mezi dvěma body). Čím kratší je vlnová délka, tím lepší je rozlišení. Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je **0,2 µm** (objekty do této velikosti jsme schopni pozorovat, na menší objekty je třeba použít elektronový mikroskop).
- **Světelnost objektivu** je schopnost objektivu zachytit co nejvíce paprsků, které se podílejí na vytvoření reálného obrazu. Závisí na numerické apertuře a velikosti otvorového úhlu (alfa). Množství světla, které vniká do objektivu, je rovněž závislé na **indexu lomu prostředí** (**n**), kterým paprsky procházejí. Prochází-li světlo podložním a krycím sklem (n = 1,5) a pak vzduchem (n = 1), paprsky se lámou od kolmice, čímž mnohé z nich do objektivu vůbec neproniknou (obr. 1). Světelnost je možné zvýšit homogenizací prostředí (použitím tzv. imerze), která vede k tomu, že paprsky procházejí přímočaře a do objektivu vstoupí téměř všechny paprsky, které se podílejí na vzniku obrazu. Mezi látky užívané k homogenizaci prostředí patří např. cedrový olej (n = 1,519) a tekutý kanadský balzám (n = 1,515 až 1,530). Voda má index lomu prostředí n = 1,33.



Obr. 1: A – poloviční otvorový úhel (α), svíraný optickou osou mikroskopu a pláštěm světelného kužele vnikajícího do objektivu. B – vliv indexu lomu prostředí mezi čelní čočkou objektivu a krycím sklem preparátu (u objektivu suchého a imerzního) na numerickou aperturu objektivu. U objektivu suchého (bez imerzního oleje) se šikmý paprsek (r) na rozhraní skla a vzduchu láme (odlišný index lomu) od kolmice a uniká mimo objektiv (r´). U imerzního objektivu proniká analogický šikmý paprsek (s) přímočaře sklem preparátu a imerzním olejem (stejný index lomu prostředí, paprsek se neláme) a je zachycen objektivem (s´). Imerzním olejem se tak zvyšuje světelnost objektivu.

- **Penetrační schopnost (hloubka ostrosti)** je schopnost objektivu zobrazit ostře současně několik optických rovin pozorovaného objektu. Je nepřímo závislá na numerické apertuře. Více zvětšující objektivy mají menší penetrační schopnost (je nutné proostřovat).

Typy objektivů:

1. **Podle použitého média mezi objektem a čelní čočkou objektivu:**
   a) **suché** - objektivy zvětšující 2 – 60× (existují i neimerzní 100× zvětšující objektivy, ale jejich cena je vysoká). Mezi objektem a čelní čočkou objektivu je vzduch (n = 1). Na cvičeních budeme používat suché objektivy 4 – 40×.
   b) **imerzní** - objektivy zvětšující 90 – 100× (výjimečně jsou vyráběny i 60× zvětšující imerzní objektivy). Mezi objektem a objektivem je umístěno médium (imerzní olej), které má přibližně stejný index lomu jako sklo preparátu, čímž se zvětšuje numerická apertura objektivu a s ní i světelnost a rozlišovací schopnost. Imerzní objektiv je odpružený, tj. je vybaven pružným uložením vstupní čočky, která se při dotyku krycího skla částečně zasune do pouzdra, čímž je objektiv chráněn před poškozením. Na cvičeních budeme používat imerzní objektiv 100×.
2. **Podle optických vlastností (stupně úpravy různých vad čoček):**
   a) **achromáty** jsou korigovány pro 2 barvy spektra (červená a modrozelená). Otvorová vada je korigována pro světlo žluté. Jsou používány pro běžnou mikroskopickou praxi.
   b) **apochromáty** mají korigovánu barevnou vadu pro 3 barvy spektra (žlutozelená, modrá a červená). Otvorová vada je korigována pro 2 barvy. Slouží pro zhotovování barevných mikrofotografií.
   c) **planachromáty, planapochromáty** mají korigované sklenutí zorného pole, které se jinak projevuje nemožností zaostřit rovinný objekt současně v celém zorném poli mikroskopu. Používají se pro zhotovování mikrofotografií.
   d) **monochromáty** jsou objektivy určené pro monochromatické světlo. Používají se např. při mikroskopování s využitím ultrafialového záření.

Barevná (chromatická) vada je způsobena optickou disperzí, tj. závislostí indexu lomu na vlnové délce světla. Bodový předmět je zobrazován na různá místa optické osy v závislosti na vlnové délce světla.

Otvorová (kulová, sférická) vada je způsobena tím, že objektiv je tvořen čočkami, které zdaleka nejsou tenké a navíc dochází i ke značnému odchylování paprsků od optické osy. Paprsky více odchýlené od optické osy jsou více lámány. Bodový předmět je pak zobrazován ne jako bod, ale jako úsečka ležící v optické ose.

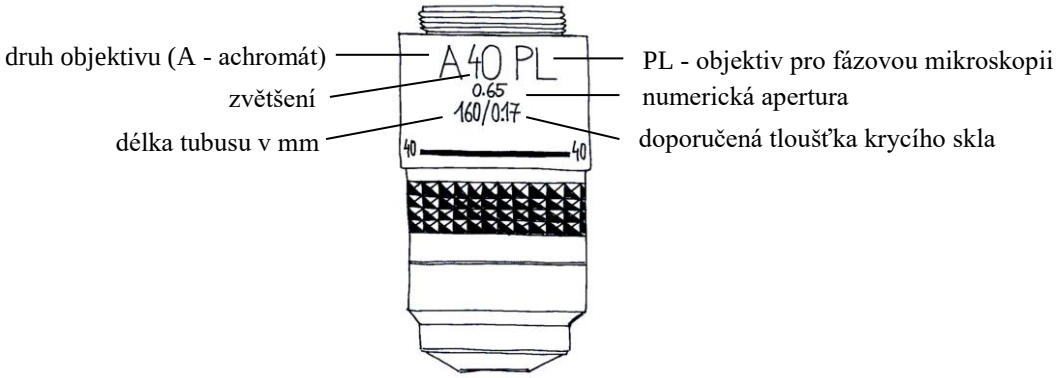
Označení objektivu:

Na objektivech je vyznačen **typ objektivu** (např. A – achromát, PL – objektiv pro fázovou mikroskopii, označený také širokým rastrovaným černým prstencem), **zvětšení**, **numerická apertura**, **délka tubusu** v mm, doporučená **tloušťka používaného krycího skla** v mm, případně **výrobce** a **výrobní číslo** (obr. 2).

Barevné značení objektivů:

Pro snadnou orientaci jsou dnes objektivy barevně odlišeny. V tabulce jsou uvedeny pouze objektivy, které jsou využívány na cvičeních.

Zvětšení	**4×**	**10×**	**40×**	**100×**
Barevné značení	červená	žlutá	modrá	bílá



Obr. 2: Značení objektivu.

OKULÁRY představují druhý optický systém, který přispívá ke zvětšení obrazu. Okuláry jsou složeny ze 2 – 3 čoček. Směrem k objektu je tzv. čočka kolektivní, která obraz vytvořený objektivem zmenší, ale současně jej zjasní a zkoriguje některé vady objektivů. Blíže k oku je tzv. čočka očnicová (frontální), která působí jako lupa a obraz zvětší. Nejčastěji se používají tzv. okuláry Huyghensovy (negativní), složené ze dvou plankonvexních čoček, které jsou obráceny vypouklými plochami směrem k objektivu. Mezi čočkami je umístěna clona, která vylučuje postranní paprsky a je v rovině ostrosti obrazu. To umožňuje vkládat na tuto clonu okulárový mikrometr pro **měření objektů**. Běžné okuláry mají zvětšení **10×** (jsou ale i okuláry se zvětšením 5×, 12,5×, 15×). Okuláry jsou výměnné, mají možnost nastavit vzdálenost očních pupil a rovněž provést **dioptrickou korekci** pro uživatele, kteří nosí brýle.

CELKOVÉ ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU (Z) se stanoví podle vzorce **Z = d.250/f1.f2**, kde d = optická délka tubusu, 250 = konvenční pracovní vzdálenost lidského oka v mm (250 mm), f1 = ohnisková vzdálenost objektivu v mm, f2 = ohnisková vzdálenost okuláru v mm.

Celkové zvětšení mikroskopu se rovná součinu zvětšení objektivu a okuláru:

	Zvětšení			
Okulár	10×	10×	10×	10×
Objektiv	4×	10×	40×	100×
Celkové zvětšení	**40×**	**100×**	**400×**	**1000×**

Zvětšení u kreseb lze zapsat dvěma způsoby: jako celkové zvětšení (40×, 100×, 400×, 1000×), nebo ve zlomku jako zvětšení okuláru ku zvětšení použitého objektivu (10/4, 10/10, 10/40, 10/100).

ČÁST OSVĚTLOVACÍ (SVĚTELNÁ)

Slouží k usměrňování, koncentrování a homogenizaci světelných paprsků vycházejících ze světelného zdroje a procházejících přes objekt do optické části mikroskopu a do oka.

ZDROJ SVĚTLA - využívá se buď přirozené světlo (denní sluneční světlo), nebo umělé zdroje světla (osvětlovací žárovky, vysokotlaké rtuťové výbojky), které jsou součástí lamp (např. Šiklova lampa). U novějších mikroskopů je zdroj světla zabudován přímo v podstavci mikroskopu.

KONDENZOR je složen z několika spojných čoček uložených v pouzdru pod stolkem, které soustřeďují paprsky v podobě kužele na preparát. Kondenzor je opatřen irisovou clonou.

IRISOVÁ (LAMELOVÁ) CLONA je složena z vějířovitě uspořádaných lamel, které se překrývají a tak mění průměr centrálního otvoru, jímž procházejí paprsky ze zdroje světla, čímž je regulováno množství světla vstupujícího do kondenzoru.

ZRCÁTKO je důležité pro usměrňování a koncentrování světelných paprsků do kondenzoru. Mikroskopy se zabudovanými zdroji světla mají plochá kovová zrcátka vestavěna v podstavci mikroskopu.

FILTRY upravují světlo ze zdroje tak, aby bylo vhodné pro přímé pozorování nebo fotografické účely. Ochranné filtry (žluté a oranžové) brání průniku škodlivého UV záření do oka, žlutozelený filtr je používán při pozorování ve fázovém kontrastu k monochromatizaci světla, polarizační filtry slouží k polarizaci světla, modrý filtr (kobaltové sklo) zachytává žlutou složku ze světla umělého zdroje.

ČÁST MECHANICKÁ

Tvoří kostru mikroskopu a je nosičem optické a osvětlovací části mikroskopu.

PODSTAVEC vytváří základnu pro celý přístroj, ukrývá zdroj světla, zrcátko a nosič filtrů.

STATIV (NOSIČ) má tvar obráceného písmene L. Na stativu je připevněn revolverový měnič objektivů, tubus s okuláry, pohyblivý stolek s křížovým vodičem preparátu a pod stolkem je na nosič upevněn kondenzor.

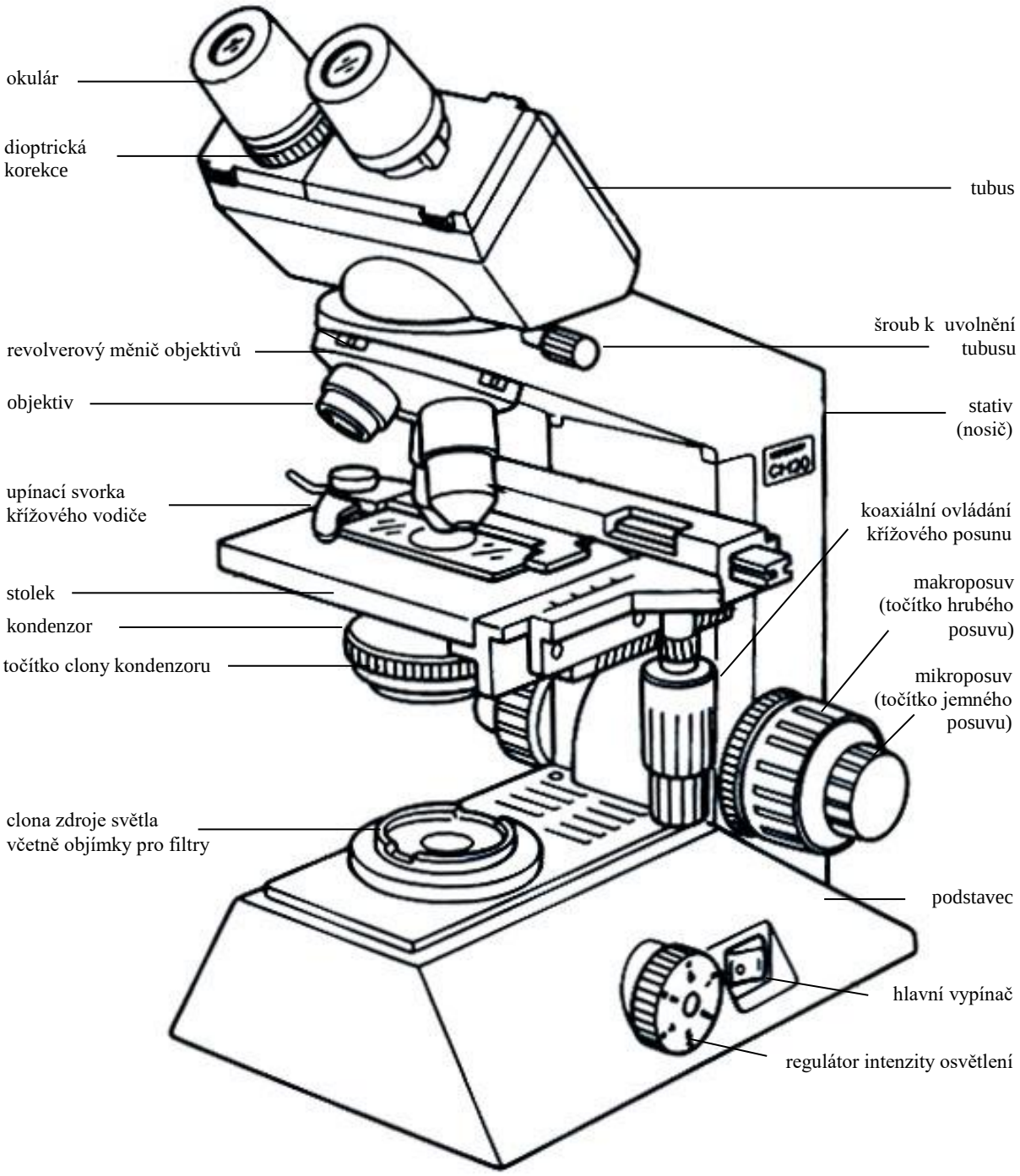
TUBUS je trubice dlouhá 160 až 170 mm, do jejíž horní části se zasunují okuláry o standardním průměru 23 mm. Spodní část tubusu je pevně spojena s revolverovým měničem objektivů. Existuje monokulární, **binokulární** a trinokulární tubus (jeden výstup slouží pro přesměrování světla do fotografického přístroje nebo televizní kamery).

REVOLVEROVÝ MĚNIČ OBJEKTIVŮ je složen z vypouklého kovového kotouče s kruhovým otvorem a je upevněn na dolním konci tubusu, tak aby středem otvoru procházela optická osa mikroskopu. Pod ním je pohyblivě upevněný druhý kotouč se třemi nebo čtyřmi otvory na přišroubování objektivů.

STOLEK slouží pro uložení pozorovaného objektu do optické osy mikroskopu. Proto je ve stolku otvor, kterým procházejí paprsky z osvětlovací části mikroskopu přes objekt optickou soustavou mikroskopu. Stolek bývá čtvercový, částečně otočný, nebo kulatý a plně otočný. Součástí stolku je křížový vodič preparátů, který usnadňuje hledání pozorovaného objektu. Preparát se vkládá do upínací svorky křížového vodiče.

KŘÍŽOVÝ VODIČ PREPARÁTŮ umožňuje posunovat preparát pomocí sáňkového zařízení dvěma směry (dopředu a dozadu, doleva a doprava), což se označuje jako koaxiální ovládání. Zařízení je zpravidla opatřeno měřítky k určení souřadnic horizontální polohy sledovaného detailu v preparátu.

MAKROPOSUV A MIKROPOSUV (HRUBÝ A JEMNÝ POSUV) jsou uloženy oboustranně po stranách stativu. Oba umožňují zaostření obrazu pozorovaného objektu v zorném poli. Makroposuv je větší, je uložen blíže ke stativu a slouží k hrubému zaostření objektu. Mikroposuv je menší a slouží k jemnému a přesnému doostření, na svém obvodu nese mikrometrické měřítko, které je rozděleno na dílky po 2,5 μm, což umožňuje proměřování tloušťky (výšky) pozorovaných objektů.



Obr. 3: Popis světelného mikroskopu.

3.1.3. Druhy světelných mikroskopů

1. Podle způsobu pozorování:
    a) **monokulární** (1 okulár)
    b) **binokulární** (2 okuláry)
2. Podle chodu paprsků světla:
    a) **v procházejícím světle, mikroskop inverzní**
    b) **v dopadajícím světle**
3. Podle druhu světla či osvětlení:
    a) **pro pozorování ve fázovém kontrastu**
    b) **pro pozorování v temném poli** (v zástinu)
    c) **pro pozorování v polarizovaném světle, Nomarského diferenciální kontrast**
    d) **fluorescenční**
    e) **konfokální**

Monokulární mikroskop slouží pro pozorování jedním okem s možností využití druhého oka ke kreslení.

Binokulární mikroskop slouží pro pozorování oběma očima současně. Obraz je systémem hranolů rozložen do dvou okulárů. Binokulární hlavice má vlastní zvětšovací optickou soustavu, se kterou je nutno kalkulovat při výpočtu celkového zvětšení pozorovaného objektu. Rozestup optických os okulárů lze přizpůsobit vzdálenosti očí, dioptrické rozdílnosti očí jsou kompenzovány dioptrickým doostřováním.

Mikroskopy pro pozorování v procházejícím světle – světlo přicházející ze zdroje je pomocí zrcátka odraženo do kondenzoru, kde je rovnoměrně rozloženo a koncentrováno na poměrně malou plochu.

Mikroskop inverzní má optickou soustavu „vzhůru nohama“, tj. jeho osvětlovací souprava a kondenzor jsou umístěny nad preparátem, zatímco objektivy jsou pod ním. Tento mikroskop je určen např. pro pozorování tkáňových kultur v kultivačních nádobách (viz buněčné kultury).

Mikroskopy pro pozorování v dopadajícím světle jsou určeny pro pozorování objektů, které jsou opacitní (nepropouštějí světlo), využívají se v mineralogii a metalurgii. Do této kategorie se řadí i preparační mikroskopy.

Výše zmíněné typy mikroskopů mohou být vybaveny příslušenstvím pro pozorování objektů za speciálních podmínek (např. pozorování ve fázovém kontrastu, v temném poli, v ultrafialovém, polarizovaném nebo interferenčním světle).

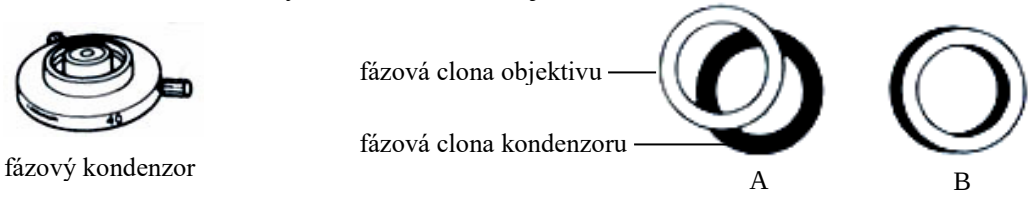
Mikroskopy pro pozorování ve fázovém kontrastu - k získání dostatečně kontrastního obrazu lze využít jednak barvení a jednak skutečnost, že světelné paprsky procházející prostředím, ve kterém dochází k lomu světla, se opožďují (fázový posun). Princip fázového kontrastu vychází z jevů, které nastávají při ohybu (difrakci) světelných paprsků na optické mřížce a při jejich interferenci. Za jeho objev obdržel holandský fyzik F. Zernike v r. 1953 Nobelovu cenu za fyziku.

Fázový kontrast je vhodný pro pozorování nativních nebarvených preparátů, nejlépe živých objektů, které se ve fázovém mikroskopu jeví jako tmavě nebo světle konturované. Pro pozorování ve fázovém kontrastu lze použít běžný mikroskop s použitím speciálních pomůcek, jako je **fázový kondenzor** (10 nebo 40), jemu odpovídající **fázový objektiv** (10× nebo 40×, s označením PL a černým gumovým prstencem) a **pomocný mikroskop**. Po vycentrování prstencových clon fázového kondenzoru a objektivu je mikroskop

připraven k pozorování ve fázovém kontrastu. K pozorování je možné použít **žlutozelený filtr**, který propouští zelené světlo o vlnové délce 540 nm, které zvyšuje kontrast obrazu.

Příprava mikroskopu pro pozorování ve fázovém kontrastu:

- Vysunout držák filtru ze spodní části kondenzoru a místo něj dát fázový kondenzor s označením 10 nebo 40.
- Kondenzor posunout co nejblíže pod stolek a úplně otevřít clonu.
- Nastavit na mikroskopu odpovídající objektiv pro pozorování ve fázovém kontrastu (10× nebo 40×, s označením PL a černým gumovým prstencem).
- Do tubusu okuláru vsunout místo jednoho okuláru pomocný mikroskop, zaostřit ho vysunutím jeho vnitřní části a poté utáhnout šroubek na boku pomocného mikroskopu.
- Pomocí šroubků na bocích fázového kondenzoru vycentrovat prstencové clony fázového kondenzoru a objektivu.
- Vysunout pomocný mikroskop z mikroskopu a místo něj dát normální okulár, mikroskop je připraven k pozorování ve fázovém kontrastu.
- Objekty je možno pozorovat s použitím kulatého skleněného zeleného nebo žlutozeleného filtru, který se vkládá na zdroj světla.



Obr. 4: Fázový kondenzor a fázové clony: A – nevycentrované, B – vycentrované.

Mikroskopy pro pozorování v temném poli (v zástinu) vyžadují zvláštní osvětlovací část (paraboloidní kondenzor), která propouští pouze šikmo procházející paprsky. Tím je objekt osvětlen pouze ze stran a zorné pole je tmavé. To umožňuje pozorovat objekty mnohem menší než ty, které je možno pozorovat v procházejícím světle. Této metody se využívá např. k diagnostice bakterií (leptospiry, *Treponema pallidum*), které nelze v procházejícím světle vidět.

Mikroskopy pro pozorování v polarizovaném světle slouží ke zjišťování dvojlomu různých látek. V okuláru nebo těsně pod ním je uložen polarizační filtr označovaný jako analyzátor a pod kondenzorem je umístěn druhý filtr - polarizátor. Vloží-li se mezi oba polarizační systémy objekt, který obsahuje látku opticky aktivní (tj. stáčí polarizační rovinu o určitý počet stupňů), dochází k průchodu světla. Optická aktivita se dá přesně odečíst ve stupních otáčením jednoho z obou filtrů.

Nomarského diferenciální kontrast využívá vlastnosti světla ke zvýšení rozdílů v jasu mezi různými částmi vzorku. Pracuje s polarizovaným světlem, které se na dvojlomných hranolech dělí na dva nepatrně posunuté obrazy. Výsledek působí dojmem šikmo osvětleného trojrozměrného objektu.

Mikroskopy fluorescenční patří mezi světelné mikroskopy, které využívají zajímavé vlastnosti některých látek. Při osvícení světlem o určité vlnové délce dojde k vymrštění elektronů v jejich atomech na energeticky bohatší dráhy kolem atomových jader. Při návratu elektronů na původní dráhu dojde k uvolnění energie ve formě záření o jiné, delší vlnové délce, než mělo záření, které celý efekt způsobilo. Jinými slovy látka se rozzáří. Fluorescenční mikroskopy, sériově vyráběné od 70. let 20. století, využívají tento princip k získání unikátních obrázků. Vzorek se vystaví záření o vlnové délce, která dokáže vyvolat fluorescenci některé z látek ve vzorku. Fluorescence vytváří obraz pozorovaného objektu. Oblasti vzorku, v nichž k fluorescenci nedošlo, zůstanou tmavé, protože zbytkové

záření je odfiltrováno. Mnohé přírodní látky, např. chlorofyl nebo některé vitaminy září pod vlivem UV paprsků. Fluorochromy jsou sloučeniny schopné fluorescence, které se využívají ke zviditelnění různých součástí buněk, např. DNA, proteinů (bílkovin). V mikroskopu je viditelná fluorescence v místě, kde se navázal fluorochrom na danou látku. Tato metoda se např. v kombinaci s přímými nebo nepřímými imunologickými metodami používá např. při diagnostice vztekliny.

Mikroskopy konfokální se začaly objevovat ve druhé polovině 80. let. Tyto mikroskopy využívají fluorescence ještě dokonaleji. U běžných fluorescenčních mikroskopů dopadá na detektor i světlo vyzářené z vrstev vzorku ležících nad a pod rovinou ostrosti. Konfokální mikroskop tento "světelný šum" odstraňuje. V cestě paprsku stojí zábrana s miniaturním otvorem, jenž propustí pouze světlo z právě zkoumaného místa, výsledkem je ostrý obraz. Zdrojem světla vyvolávajícím fluorescenci vzorku je u konfokálního mikroskopu laser, jehož paprsek míří pouze do jediného místa. Paprsek se obrovskou rychlostí bod po bodu posouvá, takže postupně osvítí celý vzorek. Údaje získané z jednotlivých bodů se v počítači složí do úplného obrazu. Laserový paprsek je možné zaměřit do jiné hloubky a postupně tak pořídit obraz z dalších vrstev vzorku. Mikroskop tak vytváří "optické řezy", jako by vzorek rozřezal na tenké plátky. Kdyby se jich na sebe poskládalo tisíc, byly by vysoké pouze 0,5 milimetru. Počítačovým zpracováním řezů lze vytvořit trojrozměrné modely zkoumaných struktur nebo animaci procházející vzorkem od povrchu až do hloubky několika desetin milimetru. První laserový konfokální rastrovací mikroskop byl vyroben r. 1978. Konfokální mikroskop je velmi citlivý, pro získání obrazu stačí malé množství barviv, což má význam pro pozorování živých buněk, kterým barvení příliš nesvědčí.

Konfokální mikroskopy se používají k tzv. „**life cell imaging**“, který umožňuje sledovat funkce vnitrobuněčných struktur *in vivo* a to až na molekulární úrovni: růst buněčných kultur v reálném čase, sledování účinků fyzikálních a chemických faktorů na buněčné kultury, studium mechanizmu buněčného dělení a zejména jeho poruch v somatických buňkách, buňkách zárodečné linie i raných embryích.

Kontrolní otázky – světelný mikroskop

- Z jakých částí se skládá světelný mikroskop?
- Co patří do optické, světelné a mechanické části mikroskopu?
- Jaké existují typy objektivů?
- Jaké jsou charakteristické vlastnosti objektivu?
- Jak se mění vlastnosti objektivů v závislosti na jejich zvětšení?
- Jaký je rozsah celkového zvětšení světelných mikroskopů?
- Jaká je rozlišovací schopnost světelných mikroskopů?

4. Mikroskopická technika

POTŘEBY K MIKROSKOPOVÁNÍ

Laboratorní sklo: podložní skla (76 × 26 × 1-1,2 mm se zabroušenými okraji nebo bez zábrusu), krycí skla (čtvercového nebo obdélníkového tvaru 18 × 18, 22 × 22, 30 × 40 mm), kádinky, zkumavky, Petriho misky, střičky, odměrné válce, nálevky

Nástroje: kahan, nůžky, skalpel, pinzeta, bakteriologická klička, preparační jehla, kapátko

Přístroje: mikroskop, lupa, vodní lázeň

Chemikálie: kyseliny, hydroxidy a jejich soli, barviva, imerzní olej

PŘÍPRAVA MIKROSKOPU K MIKROSKOPOVÁNÍ znamená umístění mikroskopu tak, aby nosič tubusu byl od pozorovatele odvrácen a volná strana mikroskopického stolku směřovala k němu. Mikroskop musí být snadno v dosahu, aby pozorovatel mohl pohodlně sedět. Nejlépe je psát záznamy vpravo od mikroskopu a vlevo si umístit potřeby pro přípravu preparátů (leváci naopak). Mikroskop se spouští spínačem umístěným v podstavci mikroskopu. Pokud přerušujete mikroskopování pouze na čas, mikroskop nevypínejte (opakovaným zapínáním se zkracuje životnost žárovky). Preparát se vkládá do rohu upínacího zařízení stolku a poté se uchytí svorkou. Při mikroskopování se postupuje od nejméně zvětšujících objektivů po nejvíce zvětšující, tj. 4×, 10×, 40× a 100×.

Při zvětšení 40× a vyšším je vhodné **korigovat optické vady očí,** protože většina lidí nemá obě oční čočky stejně dioptricky silné. Nejdříve je třeba upravit rozestup okulárů (oční rozestup) a poté se snažit pozorovat obraz oběma očima. Pozorování jen jedním okem vyvolává jeho neúměrnou zátěž a při opakovaném zatěžování zhoršuje vady oka. Rozdíl vede opět k neúměrnému zatěžování jednoho oka. Vadu je možné kompenzovat úpravou dioptrické síly levého okuláru takto: zavřete levé oko a obraz dokonale zaostřete mikrošroubem při pozorování pravým okem v pravém okuláru, zakryjte si pravé oko a pozorujte obraz levým okem v levém okuláru. Pokud není obraz dokonale ostrý, zaostřete objekt pomocí točítka dioptrické korekce na levém okuláru. Poté byste měli oběma očima vidět stejně ostře. Vyhledáním optimální vzdáleností očí od okulárů docílíte při troše cviku splynutí obrazu z obou okulárů a obě oči tak budete zatěžovat rovnoměrně.

ZASTAVENÍ OBJEKTU V ZORNÉM POLI MIKROSKOPU znamená umístění objektu do středu zorného pole a zaostření a osvětlení obrazu objektu v zorném poli. Preparát se pokládá na stolek mikroskopu pod pérovou svorku tak, aby objekt nebo krycí sklo byly umístěny nad otvorem stolku směrem k objektivu (podložním sklem dolů a krycím nahoru). Při zastavování objektu v mikroskopu je třeba se dívat do mikroskopu a současně pomocí křížového vodiče pohybovat preparátem na stolku mikroskopu a pomocí makroposuvu najít správnou volnou pracovní vzdálenost. Jakmile se v mikroskopu objeví objekt, provede se doostření pomocí mikroposuvu. Je třeba si také seřídit osvětlení mikroskopu pomocí regulátoru osvětlení (v podstavci mikroskopu) a zvýšit hloubku ostrosti pomocí irisové clony kondenzoru. Při pozorování málo kontrastních objektů (epitelie, objektivový mikrometr, pylová zrna) je potřeba více zaclonit a zaostřit na správnou optickou rovinu. Při pozorování preparátů je potřeba dát si pozor na tzv. **artefakty** (termín poprvé použil Sir Julian Huxley), jako jsou např. škrábance, kazy ve skle, bubliny, prach, útvary z želatiny apod., které bývají zaměňovány za pozorované objekty.

Nejčastější chyby (závady) a jejich odstraňování:

Do velkých zásahů a oprav mikroskopu se nepouštějte, výjimkou jsou některé technické závady, které můžete sami odstranit:

Chyba (závada)	Příčina	Odstranění
mikroskop nesvítí	šňůra není v zásuvce nebo není zastrčena "nadoraz" do mikroskopu	zastrčit šňůru do zásuvky a do mikroskopu "nadoraz"
makroposuv jde ztuha	špatné nastavení tuhosti chodu	natočte točítko makroposuvu proti směru hodinových ručiček
mikroskop samovolně sjíždí	špatné nastavení tuhosti chodu	natočte točítko makroposuvu ve směru hodinových ručiček
neostrý obraz, nejde zaostřit při použití objektivu 40x	preparát je krycím sklem dolů	položte preparát správně
	zalepený objektiv	vyčistěte objektiv
obraz je zamlžen	znečištěný objektiv (prach, olej)	objektiv očistěte od prachu a otřete hadříkem (vatovým tamponem) navlhčeným v alkoholu
	znečištěný okulár (při otáčení okulárem se otáčí i nečistota)	očistěte okulár od prachu, otisků prstů apod.
nedostatečné osvětlení obrazu	kondenzor je příliš nízko	posuňte kondenzor a nastavte nejlepší osvětlení
osvětlená jen část obrazu, abnormální zorné pole	neúplně otočena revolverová hlavice objektivů při střídání objektivů	otočte revolverovou hlavici až po zaklapnutí západky (pořádně "docvaknout" objektiv)
obraz je málo kontrastní	velký otvor u clony kondenzoru	přivřete irisovou clonu kondenzoru
nedaří se nalézt objekty při malém zvětšení	málo kontrastní objekty (epitelie, objektivový mikrometr, ale i pylová zrna)	více zaclonit a zaostřit na správnou optickou rovinu
objekt zmizí při přechodu na větší zvětšení 40x a 100x	objekt je umístěn na okraji zorného pole	vrátit se k menšímu zvětšení, a umístit objekt do středu zorného pole (středit)
vibrace preparátu, vzduchové bubliny	moc nebo málo vody	optimalizovat množství vody přidávané k preparátu
záměna za artefakty	hledání mimo správnou optickou rovinu	zaostřit na správnou optickou rovinu
nejde rozlišit objekty	tlustý preparát, příliš mnoho materiálu	připravit tenkou homogenní vrstvu

Fáze a zásady mikroskopování:

1. Umístění mikroskopu před sebe, tak aby byl snadno v dosahu, a aby pozorovatel pohodlně seděl (mikroskopem během mikroskopování nepohybovat - při velkých zvětšeních se objekt může ztratit). Kontrola kompletnosti mikroskopu a zapnutí mikroskopu.
2. Prohlédnutí preparátu nejdříve pouhým okem ke zjištění polohy, velikosti nebo obarvení objektu (na některých preparátech je fixem v kroužku vyznačeno, kde je třeba objekt hledat). Hledat v obarvené části preparátu.
3. Umístění preparátu na stolek pod pérovou svorku (krycím sklem nahoru) a umístění objektu (pokud je viditelný pouhým okem) do dráhy světelného paprsku (ověřit z dálky při otevřené irisové cloně).
4. Seřízení rozestupu okulárů a kontrola nastavení dioptrického doostřování.

5. Levá ruka ovládá makrošroub a mikrošroub k vyhledání správné optické roviny a zaostření, pravá ruka ovládá křížový posun k vyhledávání objektů. K systematickému prohlížení preparátu slouží meandrovitý způsob.
6. Pozorování objektu nejdříve pod málo zvětšujícími objektivy (4× a 10×), středně zvětšujícími objektivy (40×) a nakonec pod imerzním objektivem (100×). Objektivy 40× a 100× nejsou na vyhledávání objektu, ale na detailní prohlédnutí objektu nalezeného při menších zvětšeních. Při použití objektivů 4× a 10× ostřit makrošroubem, při použití objektivů 40× a 100× ostřit mikrošroubem.
7. Při každém zvětšení je potřeba upravit množství procházejícího světla pomocí regulátoru napětí v podstavci mikroskopu a zvýšením hloubky ostrosti pomocí irisové clony. Při malém zvětšení co nejvíce zaclonit (uzavřít irisovou clonu) a přitom přidat světlo na zdroji (ne přidušené oranžové). Při větších zvětšeních je třeba postupně přidávat osvětlení otvíráním irisové clony.
8. Před každým použitím více zvětšujícího objektivu je třeba objekt umístit do středu zorného pole (tzv. středění objektu).
9. Záznam o pozorování (protokol – kresba, popis, závěr).
10. Před vytáhnutím preparátu z mikroskopu je dobré vrátit se k nejméně zvětšujícímu objektivu - preparát se díky většímu prostoru bezpečněji vyndá. Očištění preparátu a objektivu od imerze alkoholem, vypnutí mikroskopu a jeho přikrytí igelitovým krytem.

MĚŘENÍ VÝŠKY (TLOUŠŤKY) OBJEKTU se provádí pomocí mikrometrického měřítka vyrytého na objímce mikroposuvu. Obvod tohoto šroubu je rozdělen na 50 dílků po 2,5 μm. Při měření se postupuje tak, že se zaznamená hodnota dílku na měřítku při zaostření detailu objektu v horní optické rovině a poté se odečte hodnota dílku na měřítku při zaostření detailu objektu v dolní optické rovině. Počet dílků (rozdíl mezi odečtenými hodnotami) násobený 2,5 μm představuje skutečnou výšku (tloušťku) objektu v μm.

Výška (tloušťka) objektu v μm = 2,5 x počet dílků otočených mezi horní a spodní optickou rovinou.

Kontrolní otázky – mikroskopická technika

- Z jakých částí se skládá světelný mikroskop?
- Co se děje s objektem při zobrazování ve světelném mikroskopu, jaký obraz vzniká?
- Jak se mění volná pracovní vzdálenost, velikost zobrazené plochy a detaily v zorném poli v závislosti na použitém zvětšení?
- Co znamená středění objektu a proč se dělá?
- Jak je třeba upravit clonu v závislosti na použitém zvětšení?
- Jak se provádí měření tloušťky (výšky) mikroskopického objektu?

5. Chemické složení bioplazmy

5.1. Prvky

Stejné chemické složení je sice jednou z obecných vlastností všech typů buněk, ale chemické prvky jsou součástí i neživé přírody. Některé prvky se nacházejí v živých organizmech častěji než v jejich neživém okolí. Prvky, které se vyskytují v živých organizmech, se nazývají **biogenní** a dělí se na makrobiogenní (makroprvky, makroelementy) a mikrobiogenní.

MAKROBIOGENNÍ PRVKY zahrnují C, H, O, N, S, P, K, Na, Cl, Ca, Mg a Fe. Mezi nejdůležitější makrobiogenní prvky se řadí **C**, **H**, **O**, **N**, **S** a **P**. Tyto prvky jsou obsaženy v informačních makromolekulách (nukleových kyselinách a proteinech) a představují až 95 % celkové hmotnosti živých organizmů. **Uhlík** patří mezi nejtypičtější prvky živých organizmů. Primárním zdrojem veškerého uhlíku je pro živou přírodu oxid uhličitý. **Vodík** a **kyslík** jsou vázány v molekulách vody, která je podstatnou složkou každé buňky. **Dusík** je součástí všech nukleových kyselin a proteinů. **Síra** je součástí některých aminokyselin a **fosfor** je přítomen jak v nukleových kyselinách, tak ve sloučeninách, které se účastní energetických přeměn v buňce (adenosintrifosfát, ATP). **Vápník** a **hořčík** umožňují činnost mnoha enzymů. Vápník také funguje jako druhý posel v buněčné signalizaci a uplatňuje se při svalovém stahu.

MIKROBIOGENNÍ PRVKY (OLIGOBIOGENNÍ, MIKROELEMENTY, STOPOVÉ PRVKY) zahrnují především těžké kovy a dále některé další prvky (Cu, Mn, Co, Br, Se, I, F, B, Si, Li, Ba, Zn atd.), tvoří asi 0,1 % celkové hmotnosti živých organizmů. Větší množství těžkých kovů se může v živých organizmech hromadit (kumulovat) nebo může mít přímo toxický účinek.

5.2. Látky

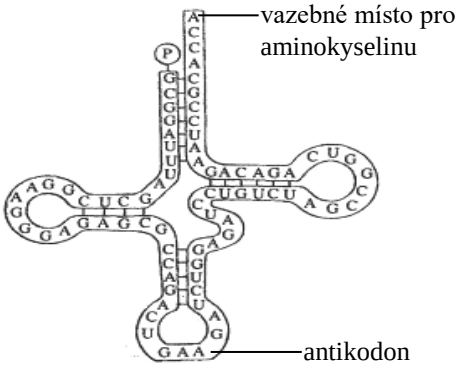
Látkové složení buňky tvoří voda (70 %), proteiny (15 %), nukleové kyseliny (7 %), polysacharidy (2 %), fosfolipidy (2 %), ionty a malé molekuly (4 %).

NUKLEOVÉ KYSELINY (NK) jsou tvořeny **nukleotidy**, jejichž pořadí (sekvence) určuje primární strukturu NK. Nukleové kyseliny tvoří genomy živých organismů.

Složení nukleotidu: **kyselina fosforečná** + **pentóza** (ribóza či deoxyribóza) + **dusíkaté báze** (purinové: **adenin** (A), **guanin** (G), pyrimidinové: **cytozin** (C), **tymin** (T) a **uracil** (U). Dusíkaté báze se spolu spojují na základě komplementarity: A-T (A-U), C-G.

Typy NK:

- **Deoxyribonukleová kyselina (DNA)** je tvořena zpravidla 2 polynukleotidovými řetězci (dvouvláknová, dvouřetězcová). V ose řetězce se střídá **kyselina fosforečná** s cukrem (**deoxyribóza**), spojené esterickou vazbou. Na cukr se glykozidovou vazbou váže dusíkatá báze, která je spojena s dusíkatou bází druhého řetězce vodíkovými můstky (mezi **A** a **T** jsou 2 vodíkové můstky, mezi **C** a **G** jsou 3 vodíkové



Obr. 5: tRNA "jetelový list".

můstky). V roce 1953 popsali J. Watson a F. Crick sekundární strukturu DNA jako pravotočivou dvouřetězcovou šroubovici, jejíž řetězce probíhají antiparalelně, tzn. na jednom konci řetězce DNA je fosfátová skupina (5' konec), zatímco na druhém je pentóza (3' konec). Na druhém vláknu je to obráceně.

- **Ribonukleová kyselina (RNA)** je tvořena zpravidla 1 polynukleotidovým řetězcem (jednovláknová). Skládá se z **kys. fosforečné**, cukru **ribózy** a dusíkatých bází **A**, **U**, **G**, **C**. Existuje několik typů RNA: **transferová** (tRNA), **ribozómová** (případně ribozomální, rRNA), **mediátorová** (mRNA), **malá interferující** (siRNA), **ribozymová**, **virová** (vRNA).

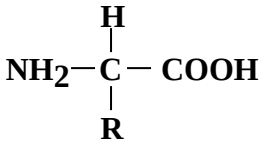
Nukleové kyseliny se množí replikací (u eukaryot probíhá v jádře, mitochondriích a chloroplastech, u prokaryot v cytoplazmě) – viz přednáška. Genetická informace obsažena v DNA se přepisuje do mRNA během transkripce (u eukaryot probíhá v jádře, mitochondriích a chloroplastech, u prokaryot v cytoplazmě), na ní navazuje translace (syntéza proteinů).

Funkce:

- Uchování genetické informace
- Ovlivnění činnosti buňky a celého organismu (prostřednictvím syntézy proteinů)

VODA tvoří u většiny živých organizmů 60 – 90 % jejich hmotnosti. Málo vody obsahují jen některé spory a semena jako adaptaci pro přetrvání v nepříznivých podmínkách. Voda byla nezbytným prostředím při vzniku života na Zemi a dodnes je podmínkou života. Životně důležité chemické reakce probíhají pouze ve vodných roztocích. Molekuly a ionty rozpuštěné ve vodě mohou prostupovat buněčnými povrchy. Voda má funkci rozpouštědla, pomáhá udržovat konstantní teplotu a udržuje stálost vnitřního prostředí – má význam pro osmotické děje v buňkách a udržování acidobazické rovnováhy.

PROTEINY jsou složeny z aminokyselin (AK).



Obr. 6: Obecný vzorec aminokyseliny: (NH_2 – aminová skupina, COOH – karboxylová skupina, R – postranní řetězec).

Dnes existuje **22 aminokyselin** (ke 20 běžnějším patří ještě selenocystein a pyrolysin), které se značí třípísmenným nebo jednopísmenným kódem: např. alanin (Ala, A), glycin (Gly, G), valin (Val, V), leucin (Leu, L). Aminokyseliny (AK, případně AA – amino acids) se spojují kovalentní **peptidovou vazbou** (spojuje se aminová skupina jedné AK s karboxylovou skupinou druhé AK), čímž vzniká **peptidový řetězec**, který má N konec (aminový, zakončen NH_2 skupinou) a C konec (karboxylový, zakončen COOH skupinou).

Běžný proteiny (bílkovina) je tvořena až 300 AK. Proteiny vznikají během genové exprese při translaci (překlad genetické informace z mRNA do pořadí aminokyselin) na ribozomech, které jsou vázané na drsné endoplasmatické retikulum (eukaryota) nebo volně v cytoplazmě (prokaryota) – viz přednáška. U proteinů rozlišujeme tyto struktury (konformace): **primární** – je dána pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci, zapisuje se od N-konce k C-konci proteinu (první určení primární struktury provedl v roce 1953 Frederick Sanger), **sekundární -** prostorové uspořádání polypeptidového řetězce, např. alfa šroubovice (alfa-helix), struktura skládaného listu (beta-sheet), **terciární** –

trojrozměrné uspořádání celého peptidového řetězce, **kvarterní** – uspořádání podjednotek v proteinových aglomerátech, tvořících jednu funkční bílkovinu např. fibrily kolagenu.

Funkce:
- **Stavební (strukturní)**: jsou součástí buněčných struktur, cytoskeletu, chromozomů a ribozomů (proteiny + NK), biomembrán (proteiny + fosfolipidy), buněčné stěny a extracelulární matrix (proteiny + polysacharidy).
- **Enzymatická**: urychlují chemické reakce (snižují aktivační energii chemických reakcí).
- **Informační**: podílí se na buněčné signalizaci (signály, receptory).

SACHARIDY jsou složeny z **monosacharidů** s obecným vzorcem $(CH_2O)_n$. Monosacharidy se spojují kovalentními **glykozidovými vazbami** za vzniku disacharidů, oligosacharidů (trisacharidy, tetrasacharidy atd.) až polysacharidů (tisíce jednotek).

Funkce:
- **Energetický zdroj:** glukóza, glykogen (živočichové), škrob (rostliny).
- **Mechanická podpora:** celulóza (rostliny), chitin (kostra hmyzu, buněčná stěna hub), glykolipidy, glykoproteiny (složka slizů, hlenu, chrupavek, buněčné membrány).

LIPIDY jsou tvořeny mastnými kyselinami a glycerolem.

Funkce:
- **Stavební:** fosfolipidy - součást buněčných membrán.
- **Energetický zdroj:** tukové kapénky.
- **Signalizace:** steroidní hormony.
- **Metabolismus vitamínů:** vitamíny (A, D, E, K) jsou rozpustné v tucích.

Kontrolní otázky – chemické složení bioplazmy

- Umíš zapsat obecný vzorec aminokyselin?
- Kolik existuje proteinogenních aminokyselin? Uveď příklady aminokyselin.
- Jak a kde vznikají proteiny?
- Umíš namalovat ribozom a tRNA?
- Jaké jsou konformace proteinů? Umíš je nakreslit?
- Jaká je funkce proteinů v buňce?
- Z čeho se skládají po chemické stránce nukleové kyseliny?
- Jak se párují dusíkaté báze v DNA a RNA? Kolik je vodíkových můstků ve vazbě?
- Jaký je rozdíl mezi DNA a RNA?
- Kdo popsal sekundární strukturu DNA?
- Umíš namalovat DNA?
- Jaký je monomer a funkce sacharidů v buňce?
- Jaké jsou stavební složky lipidů a jejich funkce v buňce?
- Co se používá k průkazu škrobu?
- K čemu slouží Lugolův roztok?
- Umíš namalovat škrobové zrno?
- Co se používá k průkazu tuků v buňkách?
- Mezi jaké inkluze patří tukové kapénky a škrobová zrna?
- Co se používá k průkazu proteinů?
- K čemu slouží Hellerova zkouška?

6. Prokaryota, zastavení objektu pod imerzí

6.1. Prokaryota

Prokaryota jsou tvořena buňkou **prokaryotického typu**, která je evolučně starší a jednodušší než buňka eukaryotického typu, průměrná velikost se pohybuje mezi **1-10 µm**. **Nukleoid** (prokaryotické jádro neohraničené membránou) obsahuje jeden chromozom složený z kružnicové dvouřetězcové DNA. Buňka není rozdělena na kompartmenty, neobsahuje mitochondrie ani plastidy. Ribozomy se sedimentační konstantou **70S** jsou uloženy v cytoplazmě. Množí se binárním dělením. Prokaryota se dělí na doménu bakterií a archeí.

6.1.1. Doména bakterií (Bacteria)

Bakterie jsou buňky prokaryotického typu. Většina (s výjimkou mykoplazmat) se vyznačuje přítomností buněčné stěny tvořené peptidoglykanem **mureinem.** Mezi glycerolem a karboxylovými kyselinami v plazmatické membráně je esterová vazba. Geny bakterií **neobsahují introny**, značná část genů je organizována do transkripčních jednotek typu **operonů**. Kromě nukleoidu obsahují **plazmidy**, malé kruhové dvouřetězcové molekuly DNA, které mohou obsahovat geny rezistence k antibiotikům. Tuto informaci si mohou bakterie mezi sebou předávat prostřednictvím **konjugace**. Při syntéze polypeptidového řetězce se v ribozomech jako první zařazuje aminokyselina **N-formylmetionin**. Rozmnožují se nepohlavně (binárním dělením nebo pučením), jsou autotrofní (fotoautotrofní nebo chemoautotrofní) nebo heterotrofní (fotoheterotrofní nebo chemoheterotrofní). Pohyb se uskutečňuje pomocí bičíků nebo klouzavým způsobem po povrchu substrátu. Některé bakterie jsou nepohyblivé.

Dělení bakterií:

1. **Podle tvaru:**
   a) kulovité (koky): dvojice (diplokoky), řetízky (streptokoky), čtveřice (tetrakoky), hroznovité seskupení (stafylokoky)
   b) tyčkovité (tyčky, tyčinky): dvojice tyček, řetízky tyček (streptobakterie), tyčky s endosporami mohou mít bacilární tvar (místo se sporou se nerozšíří) nebo klostridiální tvar (spora je uložena v rozšíření uprostřed buňky)
   c) zakřivené: vibrioidní (vibria), spirálovité (spirily) či helikální (spirochéty)
   d) větvící se: např. mykobakterie
2. **Podle umístění bičíků:**
   a) monotrichální nebo lofotrichální (bičíky na jednom konci buňky)
   b) amfitrichální (bičíky na obou koncích buňky)
   c) peritrichální (bičíky po celém povrchu buňky)
3. **Podle buněčné stěny:**
   a) Gram-negativní (G^-) s buněčnou stěnou – mají tenkou buněčnou stěnu z peptidoglykanu, nad ní je vnější vrstva (membrána) z fosfolipidů a lipopolysacharidů. Při barvení dle Grama se krystalová violeť v komplexu s jodidem draselným neváže na buněčnou stěnu, vymývá se etanolem a po použití jiného barviva (safranin, karbolfuchsin) se buňka zbarví červeně. Patří sem např. *Escherichia coli, Salmonella* Typhi, *Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Helicobacter pylori.*

b) Gram-pozitivní (G^+) s buněčnou stěnou – mají silnou buněčnou stěnu složenou z několika vrstev peptidoglykanu. Při barvení dle Grama váže buněčná stěna komplex krystalové violeti s jodidem draselným, buňka se barví modře až fialově. Patří sem např. *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Bacillus, Listeria* nebo *Clostridium*.
c) bakterie bez buněčné stěny (např. mykoplazmata).

Někteří zástupci bakterií:

1. **Nitrifikační bakterie:** žijí v půdě, oxidují amonné soli na dusitany a ty na dusičnany, tím obohacují půdu o dusík (př. *Nitrosomonas, Nitrococcus, Nitrobacter*); **hlízkové bakterie:** žijí v symbióze s bobovitými rostlinami, asimilují vzdušný dusík (např. *Rhizobium*)
2. **Oxygenní fototrofní bakterie:** gramnegativní bakterie obsahující bakteriochlorofyl, během fotosyntézy uvolňují O_2 podobně jako zelené rostliny. Dělí se na:
   a) **Prochlorofyta –** bakterie obsahující **bakteriochlorofyl a** a **bakteriochlorofyl b**, nemají fykobiliny, jsou buď jednobuněčné, nebo tvoří vícebuněčná vlákna.
   b) **Cyanobakterie (sinice)** – bakterie obsahující **bakteriochlorofyl a**, **fykobiliny** (modrý fykocyanin a alofykocyanin, u některých je fykoerytrocyanin nebo červený fykoerytrin) a karotenoidy. Většina druhů žije v rozmezí teplot od 2 °C (antarktická jezera) do 74 °C (horké prameny). Žijí ve sladké i slané vodě, kde jsou součástí planktonu (*Trichodesmium erythraeum* podmiňuje zbarvení Rudého moře) nebo bentosu. V letních měsících se mohou ve sladkých vodách obsahujících fosfáty a nitráty rozmnožit a vytvořit na povrchu hladiny tzv. vodní květ. Mohou žít endosymbioticky s rozsivkami nebo houbami a exosymbioticky s lišejníky nebo játrovkami.
3. **Patogenní bakterie** vyvolávající onemocnění**:** např. *Salmonella* (tyfus, paratyfus), *Shigella dysenteriae* (úplavice), *Streptococcus* (angína, spála), *Mycobacterium* (tuberkulóza), *Yersinia pestis* (mor člověka).

6.1.2. Doména archeí (Archaea)

Archea jsou také buňky prokaryotického typu. Mají tvar koků, spiril nebo tyček. S výjimkou rodu *Thermoplasma* mají buněčnou stěnu, která neobsahuje murein, ale může obsahovat pseudopeptidoglykan neboli **pseudomurein.** Vazba mezi glycerolem a vyššími karboxylovými kyselinami v plazmatické membráně je éterová. Geny přepisované do transferové RNA (tRNA) a ribozómové RNA (rRNA) (nikoli strukturní geny) obsahují **introny**, které jsou vystřihávány podobně jako u eukaryot, značná část genů je organizována do transkripčních jednotek typu **operonů**, při syntéze polypeptidového řetězce se v ribozomech jako první zařazuje aminokyselina **metionin**. Rozmnožují se nepohlavně binárním dělením nebo pučením. Jsou chemoautotrofní nebo chemoheterotrofní (obligátně nebo fakultativně), mezofilní nebo termofilní (rostou i při 100 °C).

Skupiny:

1. **Extrémně halofilní archea** - žijí v prostředí s vysokou koncentrací solí (9 – 23 % NaCl), jako jsou solná jezera.
2. **Archea produkující metan** - vyskytují se v horkých pramenech, v odpadních a stojatých vodách, na dně moří, v trávicím traktu přežvýkavců a termitů, kde přeměňují CO_2 a CO na metan.
3. **Hypertermofilní archea** - vyskytují se v horkých sirných pramenech nebo v podmořských vulkanických oblastech při teplotách 45-110 ^{o}C. Za anaerobních podmínek redukují síru na H_2S, za aerobních podmínek oxidují H_2S a síru na H_2SO_4.

Kontrolní otázky – prokaryota, zastavení objektu pod imerzí

- Jaký je rozdíl mezi eukaryotickou a prokaryotickou buňkou (velikost, stáří, organely, rozmnožování, pohyb atd.)?
- Jaká je velikost bakterií a jaký mikroskop se používá pro jejich pozorování?
- Jaký je rozdíl mezi bakteriemi a archei? Uveď příklady zástupců.
- Jaký je postup barvení dle Grama?
- Jaký je rozdíl mezi G+ a G- bakteriemi? Uveď příklady zástupců.
- Co znamená imerzní objektiv a k čemu slouží?

7. Eukarya (eukaryota) – živočišná buňka, protozoa

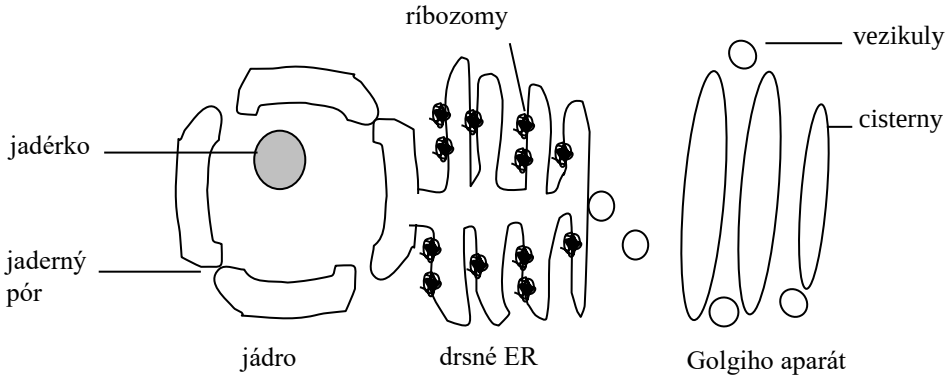
Jejich základní stavební jednotkou je buňka eukaryotního typu, která je vývojově mladší a složitější než buňka prokaryotního typu. Průměrná velikost eukaryotní buňky se pohybuje mezi **10-100 µm.** Eukaryotní buňky se množí mitózou, pohlavní buňky meiózou. Eukaryotní buňka může mít různý tvar a velikost, např. epiteliální buňky jsou kubické, buňky fibroblastů vřetenovité, nervové buňky mají dlouhé výběžky, bílé a červené krvinky u savců jsou obvykle kruhovité, u ptáků oválné. Od vnějšího prostředí je buňka ohraničena polopropustnou **cytoplazmatickou membránou**. Ribozomy mají sedimentační konstantu **80S**. U eukaryotních buněk jsou hojně zastoupeny **buněčné organely**, které jsou specializovány na různé funkce.

JÁDRO – na jeho povrchu je **dvojitá membrána**, která odděluje jádro od cytoplazmy. V jaderné membráně se nachází **jaderné póry**, kterými se uskutečňuje transport molekul z jádra do cytoplazmy a naopak. V jádře jsou chromozomy, které jsou tvořeny **lineární DNA** a proteiny **histony.** Jádra různých buněk se liší velikostí, tvarem i počtem.

JADÉRKO je součástí jádra a nachází se jen u eukaryotních buněk v interfázi. Obsahuje geny pro rRNA a tRNA a jejich produkty. Na počátku mitózy jadérko mizí a v telofázi opět vzniká. Počet jadérek v jednom jádře není pevný a také jejich velikost je různá a závisí na metabolické aktivitě buňky.

ENDOPLAZMATICKÉ RETIKULUM (ER) vytváří systém plochých váčků a kanálků a naléhá těsně na jádro. Jsou-li na jejich vnější straně přilehlé ribozomy, jedná se o **drsné ER**, na kterém probíhá syntéza proteinů. **Hladké ER** je bez ribozomů a probíhá v něm syntéza lipidů. Endoplazmatické retikulum je rovněž zásobárnou **vápníku**.

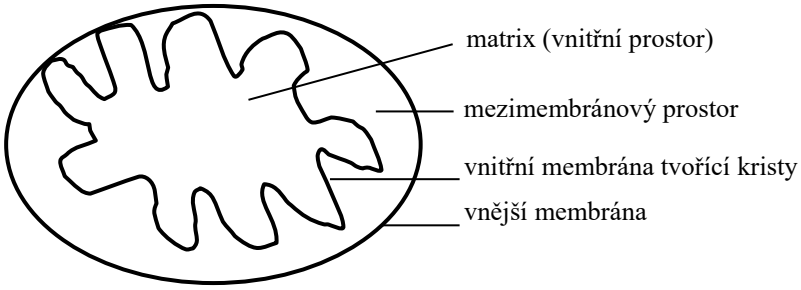
GOLGIHO APARÁT (GA) je systém samostatných plochých cisteren, u rostlin se tradičně označuje jako **diktyozom**. Do GA jsou transportními váčky (vezikuly) přepravovány z ER proteiny, lipidy a sacharidy, které jsou dále chemicky modifikovány. Primárně se v GA syntetizují látky, které jsou transportovány a vyměšovány z buňky (sekrety, enzymy, hormony) prostřednictvím sekreční dráhy (viz obr. 7).



Obr. 7: Sekreční dráha v buňce.

MITOCHONDRIE jsou oválné organely se dvěma membránami, z nichž ta vnitřní je zprohýbaná v kristy, vnitřní prostor se nazývá matrix (obr. 8). Mají chromozomy, které jsou prokaryotního typu s cirkulární dvojřetězcovou DNA bez histonů. V buňce může být jedna až tisíce mitochondrií. Mitochondrie lze považovat za centra buněčného dýchání a energetická centra v buňce. Uvolňují chemickou energii vázanou v organických látkách

(buněčné dýchání) a na vnitřní membráně se syntetizují molekuly ATP (**oxidativní fosforylace**), které jsou pro buňku okamžitým zdrojem energie.

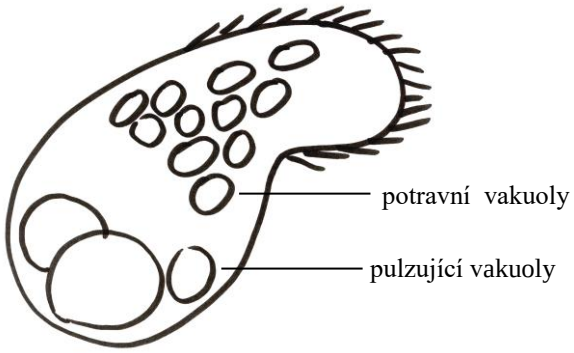


Obr. 8: Mitochondrie.

PEROXISOMY jsou kulovité útvary, obsahují oxidační enzymy. Podílejí se na katabolismu, detoxikaci látek a odbourání peroxidu vodíku.

LYZOSOMY (lysozomy, lysosomy) jsou malé měchýřkovité útvary obsahující hlavně trávicí enzymy. Dochází zde ke kyselé hydrolýze různých organických makromolekul na složky, které buňka následně využívá na stavbu vlastních makromolekul, nebo které vylučuje.

VAKUOLY se nachází u jednobuněčných eukaryot. Jedná se o **potravní (trávicí) vakuoly**, které jsou naplněné substrátem se živinami a **pulzující vakuoly**, které slouží k osmoregulaci (u sladkovodních eukaryot odstraňují přebytečnou vodu).



Obr. 9: Nálevník s vakuolami (pulzující a potravní)

PIGMENTOVÉ INKLUZE – vznikají ukládáním pigmentů. Buňky, které tento pigment obsahují, se označují jako chromatofory (např. melanofory obsahují tmavý pigment melanin).

Mezi eukaryota se řadí jednobuněčné eukaryotické organizmy (**protozoa**, dříve prvoci), **chromista**, **houby**, **rostliny a živočichové**. Eukaryota se aktuálně člení do šesti říší: **OPISTHOKONTA** (některá jednobuněčná eukaryota, houby, živočichové), **AMOEBOZOA**, **RHIZARIA**, **EXCAVATA** (v těchto třech říších jsou pouze jednobuněčná eukaryota), **ARCHAEPLASTIDA** (rostliny, řasy) a **CHROMALVEOLATA** (chromista a některá jednobuněčná eukaryota).

NÁLEVNÍCI jsou pojmenovaní podle toho, že se objevují v nálevech, např. v senném nálevu připraveném z vody, sena, rozkládajících se rostlin, listů a malého množství hlíny. Všude v přírodě a tedy i v seně jsou přítomné cysty nálevníků, ze kterých ve vodě vzniknou aktivní nálevníci.

Kontrolní otázky – živočišná buňka, protozoa

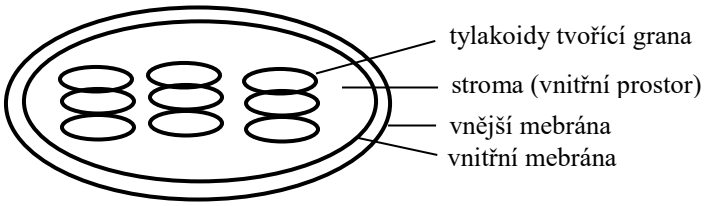
- Jaký je rozdíl mezi eukaryotickou a prokaryotickou buňkou (velikost, stáří, organely, rozmnožování, pohyb atd.)?
- Co patří mezi eukaryota?
- Jaká je velikost eukaryotní buňky?
- Co je to endosymbióza?
- Jaké organely se nachází v eukaryotické buňce a jakou mají funkci?
- Umíš nakreslit a popsat jádro, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrii?
- Umíš nakreslit nervovou buňku?
- Jaké tvary mohou mít jádra leukocytů?
- Jaké typy a počty jader se mohou vyskytovat u nálevníků?
- Jaké specifické barvení se používá k průkazu Golgiho aparátu a mitochondrií?
- Kde v buňce se nachází mitochondrie?
- Jaké inkluze se mohou nacházet v živočišné buňce?

8. Eukarya (eukaryota) – rostlinná buňka

Rostlinná buňka je eukaryotického typu (složení eukaryotické buňky bylo popsáno v Kapitole 7), ale na rozdíl od buňky živočišné má navíc buněčnou stěnu složenou z celulózy, dále obsahuje chloroplasty, zásobní a krystalické buněčné inkluze a velkou centrální vakuolu (ekvivalent lysozomů) s rostlinnými šťávami a barvivy (např. antokyany).

PLASTIDY se podle obsahu barviv rozlišují na bezbarvé leukoplasty, barevné chromoplasty, amyloplasty obsahující škrob, proteoplasty obsahující proteiny, oleoplasty obsahující tuky a chloroplasty obsahující zelené barvivo chlorofyl.

CHLOROPLASTY se nachází u rostlin a jejich funkční ekvivalenty se nacházejí i u některých bakterií. Mají chromozomy prokaryotního typu s cirkulární dvouřetězcovou DNA s histon-like proteiny (např. HC). Uvnitř chloroplastů na tylakoidních membránách probíhá nejdůležitější biochemický proces na Zemi – fotosyntéza spojená s tvorbou ATP (**fotosyntetická fosforylace**).



Obr. 10: Chloroplast – popis.

CENTRÁLNÍ VAKUOLA vyplňuje většinu objemu buňky. Centrální vakuola je ohraničena membránou (**tonoplast)**, která se aktivně podílí na regulaci osmotického tlaku v buňce. Ve vakuolách se ukládají zásobní sacharidy, alkoholy, barviva, ale i odpadní látky a jsou zde i enzymy, které tyto nepotřebné látky rozkládají. Zhoustne-li obsah vakuol, dochází k vykrystalizování některých látek a ke vzniku buněčných inkluzí.

INKLUZE můžeme rozdělit na několik typů: **zásobní** (např. škrobová zrna, viz Kapitola 5) a **krystalické** (krystaly šťavelanu vápenatého, které vznikly neutralizací přebytečné kyseliny šťavelové kationty vápníku jako např. rafidy, styloidy a drúzy).

ANTOKYANY jsou barviva, která se nachází např. ve vakuolách buněk oplodí bobulí ptačího zobu (*Ligustrum vulgare*). Antokyany chrání rostlinu proti nadměrnému ozáření, zvyšují odolnost proti mrazu a suchu a odpovídají za zbarvení, které může být v závislosti na pH červené (kyselé pH), fialové (neutrální pH 6,8-7,3) nebo modré (alkalické pH). Antokyany se vyskytují i v kořenech (červená řepa), stonku (begonie), listech (červené zelí), nebo květech (plicník lékařský).

OSMOTICKÉ JEVY – obecný princip viz Kapitola 10.

Rostlinná buňka:

- **Hypotonické prostředí** - voda proudí do buňky tak dlouho, dokud se nevyrovná vnitřní tlak plazmatické membrány protitlaku buněčné stěny, pak proudit přestane. Buněčná stěna je silná, napne se a dochází ke zvýšení **turgoru** (vnitřní tlak). Při poškození buněčné stěny může výjimečně dojít i k prasknutí buňky.
- **Hypertonické prostředí** - z rostlinné buňky uniká voda, ale tvar buňky se díky buněčné stěně, která drží tvar, nemění. Cytoplazma a vakuoly zmenšují svůj objem a plazmatická membrána se odděluje od buněčné stěny. Jev se označuje jako **plazmolýza**.

Kontrolní otázky – eukarya, rostlinná buňka

- Jaký je rozdíl mezi rostlinnou a živočišnou buňkou?
- Umíš nakreslit a popsat chloroplast?
- Co je to tonoplast?
- Co patří mezi krystalické inkluze?
- Co jsou to antokyany a k čemu slouží?
- Jak se mění zbarvení vakuol v bobulích ptačího zobu v závislosti na pH?
- Co je to turgor?
- Co je to plazmolýza (prostá a křečová)?

9. Pohyb a taxe, nativní preparáty

9.1. Pohyb a taxe

POHYB MOLEKUL - BROWNŮV MOLEKULÁRNÍ POHYB je náhodný pohyb mikroskopických částic v kapalném nebo plynném médiu. Tento pohyb poprvé zaznamenal v roce 1827 biolog **Robert Brown**, když pozoroval chování pylových zrn ve vodě. Podstatu tohoto jevu objasnil v roce 1905 **Albert Einstein** na základě kinetické teorie látek. Molekuly vody se v roztoku vlivem tepelného pohybu neustále srážejí, přičemž směr a síla těchto srážek jsou náhodné. Čím je částice menší, tím je pohyb výraznější.

POHYB BUNĚK/ORGANIZMŮ zahrnuje aktivní změnu tvaru jakékoliv součásti buňky, v užším pojetí se týká lokomoce (pohyb z místa na místo) buňky/organizmu. Na pohybu se podílí vlákna cytoskeletálního systému: **mikrofilamenta** (aktinová vlákna) a **mikrotubuly**. Jejich pohyb závisí na transformaci energie chemické v mechanickou, kterou realizují tzv. motorové proteiny (**molekulové motory** – dyneiny a kineziny asociované s mikrotubuly a myoziny I a II asociované s mikrofilamenty).

CYTOSKELET je součástí všech eukaryotních buněk. Jedná se o systém proteinových různě dlouhých vláken. Podle velikosti a funkce se vlákna cytoskeletu dělí na:

a) **intermediární (střední) filamenta –** z fibrilárních proteinů různých typů (keratiny, vimentiny, neurofilamenta, laminy), dodávají buňkám mechanickou pevnost, vytváří jejich vnitřní kostru a určují umístění některých organel v buňce. Na pohybu buněk se nepodílí.

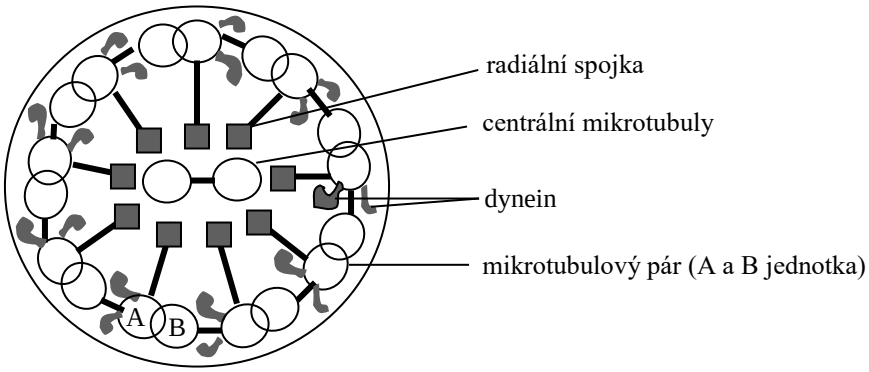
b) **mikrotubuly –** z globulárních proteinů tubulinů, vytváří vlákna mitotického vřeténka, řasinky a bičíky. Bičíky a řasinky eukaryotních buněk mají v centru 2 samostatné mikrotubuly, na periferii 9 párů mikrotubulů (tj. struktura 9+2).

c) **mikrofilamenta (aktinová vlákna) –** z globulárních proteinů aktinů, vytváří kontraktilní prstenec při dělení živočišných buněk (cytokineze), účastní se améboidního a svalového pohybu.

AMÉBOIDNÍ POHYB (měňavkovitý) je založen na vysílání výběžků (panožek) ve směru pohybu buňky. Růst panožek je zprostředkován klouzáním **mikrofilament** za pomocí molekulového motoru **myozinu I**. Po přichycení panožky k podkladu dojde ke kontrakci zadní části buňky a přelití cytoplazmy ve směru vytvořené panožky. Pohyb je charakteristický pro jednobuněčné měňavky (améby); u živočichů se takto pohybují např. makrofágy při fagocytóze.

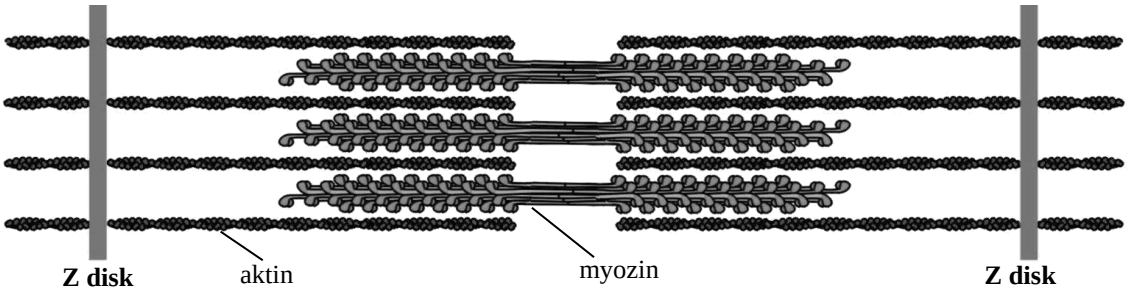
POHYB BIČÍKŮ A ŘASINEK EUKARYOT (tzv. kinocilií) je podmíněn klouzáním **mikrotubulů** poháněných molekulovými motory **dyneiny**. Hlavní strukturou kinocilií je svazek 10 párů mikrotubulů (struktura 9+2, tj. 9 párů po obvodu a 2 mikrotubuly ve středu, obr. 11). Kinocilie jsou na povrchu kryty cytoplazmatickou membránou a v buňce jsou pevně zakotveny v tzv. bazálních tělískách. Bičíky jsou dlouhé a jejich počet bývá malý (1-8). Pozorovat je lze u jednobuněčných eukaryotních organizmů s bičíky, ale i u buněk živočichů (spermie, plaménkové buňky protonefridií), modifikací bičíku je tzv. undulující membrána trypanosom. Řasinky (brvy) jsou krátké a většinou pokrývají celý povrch buňky. Pozorovat je lze především u jednobuněčných nálevníků, u živočichů nalezneme řasinky na tzv. řasinkovém epitelu (např. na povrchu ploštěnek a v dýchacích cestách savců). Modifikacemi brv jsou např. cirri (vzniklé splynutím skupiny brv v silnější útvar

a mající pohybovou a opornou funkci), nebo membranelly (vzniklé splynutím řad brv a sloužící k přihánění potravy).



Obr. 11: Příčný řez kinocilií – struktura 9+2.

SVALOVÝ POHYB je založen na zkracování sarkomer (základní kontraktilní jednotka svalu) svalového vlákna v důsledku posunu aktinových vláken podél myozinových. Impulzem pro svalový stah je **nervový vzruch**, který vyvolá uvolnění **Ca^{2+}** iontů ze sarkoplazmatického retikula (speciální název pro endoplazmatické retikulum ve svalových buňkách). Vápenaté ionty se váží na protein troponin C a způsobí změnu jeho konformace a následně i změnu konformace tropomyozinu, který je navázán na aktinové vlákno. **Aktinové vlákno** se uvolní z vazby a může reagovat s myozinovým vláknem (tvořeno molekulovým motorem **myozinem II**) a dojde ke svalovému stahu. Stah se uvolní načerpáním Ca^{2+} iontů do sarkoplazmatického retikula vápenatými pumpami, aktinové vlákno je opět zablokováno tropomyozinem a svalový stah odezní.



Obr. 12: Sarkomera – základní kontraktilní jednotka svalu.

TAXE jsou usměrněné pohyby jednobuněčných eukaryot (prvoků) a živočichů na působení podnětu (podráždění).

- **fototaxe** - pohyb ke světlu
- **oxygenotaxe** - pohyb do prostředí se zvýšenou koncentrací kyslíku
- **chemotaxe** - pohyb vyvolaný přítomností chemické látky

Taxe mohou být **pozitivní** nebo **negativní** podle toho, jestli je vyvolaný pohyb orientován směrem k podnětu nebo opačně.

9.2. Nativní preparáty

NATIVNÍ PREPARÁTY jsou preparáty připravené ze živých objektů neovlivněných žádným fixačním roztokem. Nelze je dlouhodobě uchovávat a není možné pozorovat některé detaily, které nejsou obarveny. Jako **médium** pro pozorování slouží tekutina, ve které se studované objekty vyskytují za přirozených podmínek (voda, krevní sérum, plazma, kultivační média), nebo tzv. izotonické roztoky, např. fyziologický roztok, nebo PBS (phosphate buffered saline, fosfátem pufrovaný fyziologický roztok). Některé objekty je možné pozorovat pouze položené na podložním skle a přikryté krycím sklem bez použití tekutého média (např. různé kožní deriváty - chlupy a peří, chitinové části členovců - blanitá křídla, šupiny). **Pozorování rychle se pohybujících organizmů** se usnadní přidáním některých viskózních látek (glycerol, želatina, arabská guma), které zvyšují odpor tekutiny a brzdí tak pohyb organizmů, nebo přidáním některých narkotik (voda s několika kapkami éteru, chloroformu nebo CO_2), které v malých dávkách vedou ke zpomalení pohybu. K omezení pohybu někdy stačí zvýšení tlaku na krycí sklo, odsátí přebytečné tekutiny apod. Preparát by neměl být příliš hustý, proto je dobré tekuté objekty ředit, části tkání je vhodné separovat na podložním skle preparační jehlou nebo rozdrtit druhým podložním sklem (kompresní preparát). Jinou metodou je příprava **nativního otiskového preparátu**, tj. přiložení řezné plochy objektu na podložní sklo, přikápnutí kapky tekutiny, přikrytí krycím sklem a pozorování částic, které ulpěly na skle. Pro **dlouhodobé pozorování** nativních preparátů slouží různé typy vlhkých komůrek. Ke zvýraznění některých struktur, které jsou pozorovatelné jen v živých organizmech, se používá vitální barvení.

Kontrolní otázky – pohyb a taxe, nativní preparáty

- Jaký je princip Brownova molekulárního pohybu?
- Jaké znáš typy pohybů u buněk/organizmů?
- Jaké cytoskeletální vlákno a molekulový motor se podílí na jednotlivých typech pohybů?
- Uveď příklad buněk s řasinkami a bičíky
- Umíš nakreslit příčný řez bičíkem (struktura 9+2)?
- Jak probíhá svalový pohyb?
- Umíš nakreslit sarkomeru?
- Co je to chemotaxe a oxygenotaxe u nálevníků?
- Jaké vakuoly se nachází u nálevníků?

10. Vyšetření krve

10.1. Metody vyšetření krve a jejich využití

HEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Krevní obraz (KO) – poskytuje údaje o počtu krevních elementů (erytrocyty, leukocyty, trombocyty), množství krevního barviva (hemoglobin) a hematokritu (procentuální podíl erytrocytů na objemu krve). Diferenciální rozpočet slouží ke stanovení počtu jednotlivých druhů bílých krvinek (neutrofilní, eozinofilní, bazofilní, monofilní, lymfocyty, monocyty atd.). Používá se při screeningu, krevních chorobách a zánětlivých onemocněních.

Sedimentace erytrocytů (**FW** - podle Fahrea a Westergreena) – použití při screeningu, zánětlivých, infekčních a nádorových onemocněních.

Quick test – určuje protrombinový čas, použití při léčbě koagulancii.

APTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) – slouží ke zjištění koagulačních faktorů IX, XI, XII pro vnitřní srážení, použití při heparinizaci, léčbě streptokinázou a u hemofilie.

Krvácivost (srážlivost) – použití při krvácivých chorobách a předoperačních vyšetřeních.

Určení krevní skupiny a Rh faktoru

Coombsův test – slouží k rozpoznání imunohemolytické reakce při inkompatibilitě Rh faktoru dítěte a matky.

BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ

Ionty (ionogram nebo mineralogram) – stanovení koncentrace elektrolytů v krvi (Na, K, Ca, P, Mg, Fe atd.). Použití: součást screeningu, rozvrat vnitřního prostředí, poruchy činnosti ledvin, šok, zvracení, průjmy, poruchy srdeční činnosti.

Metabolity – produkty metabolismu (např. urea, kreatinin, bilirubin).

Bílkoviny – stanovujeme celkovou bílkovinu, albuminy, imunoglobuliny. Použití: posouzení stavu výživy, imunity nebo sledování vývoje zánětu.

Enzymy – např. transaminázy (ALT, AST, ALP), GMT, LDH, CK a amylázy. Použití: onemocnění jater, žlučových cest, pankreatu, kosterních svalů apod.

Lipidy – např. cholesterol, triglyceridy.

Hormony – např. TSH, T_3, T_4, aldosteron, progesteron, apod.

Tumorové markery – např. alfafetoprotein, CA, CEA, PSA.

Léky – např. Digoxin, Phenobarbital, atd.

Speciální metabolity – např. vit. A, B_6, B_{12}, C, D apod.

Toxiny – např. alkohol.

stanovení **glykémie**

stanovení **acidobazické rovnováhy**

MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

bakteriologické – hemokultura

mykologické – plísně

virologické – viry

parazitologické – paraziti

SÉROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Těmito vyšetřeními se stanoví hladiny některých protilátek, které vznikají jako odpověď na infekční agens (viry, bakterie a parazity). Příkladem je stanovení **C-reaktivního proteinu (CRP)**, jehož koncentrace zejména při bakteriálních infekcích prudce stoupá.

10.2. Měření velikosti mikroskopických objektů

Měření velikosti objektu se provádí běžným mikroskopem, do jehož okuláru se vloží **okulárový mikrometr**. Je to kruhová, skleněná destička, na níž je vyryta 1 cm dlouhá úsečka rozdělená na 100 dílků po 0,1 mm. Okulárovým mikrometrem se provádí vlastní proměřování objektu. Jak velké dílky okulárového mikrometru se skutečně jeví v mikroskopu, lze zjistit porovnáním s jiným přesným měřidlem pozorovatelným celou optickou soustavou mikroskopu. K tomuto účelu slouží **objektivový mikrometr**, což je krycí sklo (přitmelené kanadským balzámem na podložní sklo), na kterém je vyryta 1 mm dlouhá úsečka rozdělená na 100 dílků, takže 1 dílek odpovídá 10 μm. Na začátku měření je nejdříve potřebné zjistit tzv. **mikrometrický koeficient**, tj. jaké hodnotě odpovídá jeden dílek okulárového mikrometru. K tomuto stanovení slouží okulárový mikrometr v jednom z okulárů a objektivový mikrometr, který se umístí na stolek mikroskopu a zastaví se jako běžný preparát. Otáčením okuláru s okulárovým mikrometrem se dají obě měřítka do takové polohy, aby byla vzájemně rovnoběžná. Potom se posouvá objektivovým mikrometrem tak, aby se jeho počáteční ryska kryla s počáteční ryskou okulárového mikrometru. Poté se hledá libovolný dílek objektivového měřítka, který se překrývá s dílkem okulárového měřítka (nejjednodušší je vzít pravý okraj kratšího měřítka a odečíst odpovídající hodnotu na okulárovém měřítku), hodnoty dílků se zaznamenají. Měření je potřebné provést pro všechna zvětšení objektivů. Při použití menších zvětšení je třeba hodně clonit a před přechodem na větší zvětšení (hlavně ze 40× na 100×) umístit objektivové měřítko do středu zorného pole, aby se neztratilo. Je třeba také počítat s tím, že objektivové měřítko se při větších zvětšeních také úměrně zvětšuje (pokud si nejste jisti, které měřítko je které, tak při otočení okulárem se otočí okulárový mikrometr).

Hodnota jednoho dílku okulárového mikrometru (mikrometrický koeficient) se vypočítá vydělením počtu dílků odečtených na objektivovém mikrometru počtem dílků odečtených na okulárovém mikrometru. Je nutné stanovit mikrometrický koeficient zvlášť pro jednotlivá zvětšení objektivů.

$$\textbf{Mikrometrický koeficient} = \frac{\textbf{Počet dílků obj. mikrometru} \times \textbf{10}}{\textbf{Počet dílků okul. mikrometru}}$$

Obr. 13: Příklad stanovení mikrometrického koeficientu pro zvětšení objektivu 4× (100. dílek objektivového mikrometru odpovídá 40. dílku okulárového mikrometru – do vzorce pro mikrometrický koeficient dosadíme 100×10/40 = 25 μm).

Mikrometrické koeficienty pro různé objektivy: **25** (4×), **10** (10×), **2,5** (40×), **1** (100×)

Při vlastním měření mikroskopického objektu se umístí preparát na stolek mikroskopu a zjistí se, kolika dílkům okulárového mikrometru odpovídá měřený objekt. Tento počet dílků se vynásobí mikrometrickým koeficientem pro daný objektiv a výsledek se vyjádří v μm.

10.3. Transport látek, osmotické jevy (živočišná buňka)

Buňka, jako otevřená soustava, může žít jen za stálé výměny látek, energie a informací se svým okolím. Hlavní strukturou regulující buněčný příjem a výdej látek je cytoplazmatická membrána, která je **polopropustná** (semipermeabilní). Svou selektivní propustností zajišťuje, že koncentrace látek uvnitř buňky jsou udržovány na úrovni optimální pro život buňky. Mezi mechanizmy transportu látek přes membránu patří:

PŘÍMÁ (PROSTÁ) DIFUZE – závisí na fyzikálních vlastnostech membrány, která je propustná pro nízkomolekulární látky např. plyny, uhlovodíky, organické kyseliny, močovinu, etanol a vodu. Difuze závisí na rozdílu koncentrace daných látek uvnitř a vně buňky tj. na koncentračním spádu, teplotě a velikosti molekul. Difuze probíhá tak dlouho, až se koncentrace na obou stranách membrány vyrovnají. Zvláštním případem difuze je osmóza.

OSMÓZA – souvisí s polopropustností membrány, tzn. vodu propouští snadno, ale nepropouští látky ve vodě rozpuštěné. Je-li buňka obklopena **izotonickým roztokem** (roztokem o stejné koncentraci, jakou má cytoplazma), k průchodu vody membránou nedochází. Osmotické jevy nastanou tehdy, je-li buňka obklopena roztokem **hypotonickým** (o nižší koncentraci než má cytoplazma) nebo **hypertonickým** (o vyšší koncentraci než má cytoplazma).

Živočišná buňka:

- **Hypotonické prostředí** - do buňky začne proudit voda (endosmóza vody), buňka zvětšuje svůj objem, až praskne. Jev se obecně označuje jako **plazmoptýza**, u červených krvinek jako **osmotická hemolýza**.
- **Hypertonické prostředí** - z buňky začne proudit voda ven (exosmóza) a buňka se začne svrašťovat. Někdy se tento jev označuje jako **plazmorhiza**.

TRANSPORT POMOCÍ MEMBRÁNOVÝCH TRANSPORTNÍCH PROTEINŮ - specifický transport větších nenabitých polárních molekul (aminokyseliny, nukleotidy, cukry) a iontů (H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-) pomocí kanálových proteinů, které vytváří póry (iontové kanály) pro difuzi rozpuštěných látek, nebo pomocí přenašečových proteinů na základě změny konformace (funkce turniketu).

ENDOCYTÓZA - příjem kapalin a různě velkých částic vchlípením plazmatické membrány a následnou tvorbou endocytotických váčků, které jsou přesouvány do lyzosomů, kde jsou stráveny. Příjem rozpuštěných látek se označuje jako **PINOCYTÓZA**, příjem pevných částeček je **FAGOCYTÓZA**.

EXOCYTÓZA – výdej kapalin a různě velkých částic buňkou.

10.4. Určování krevních skupin

KREVNÍ SKUPINY U LIDÍ

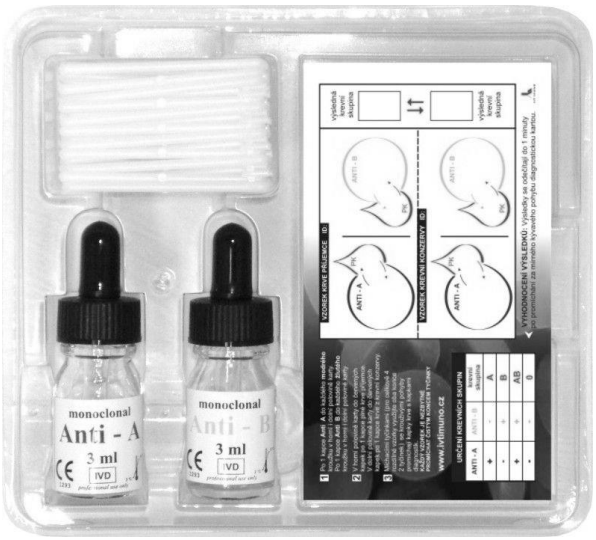
Krevními skupinami (KS) obecně rozumíme všechny antigeny na membránách erytrocytů, které jsou schopné vyvolat tvorbu protilátek. Jedná se o proteiny (receptory, enzymy či transportní proteiny), glykoproteiny či oligosacharidy. Tyto antigeny se obvykle označují jako **aglutinogeny**. Protilátky (**aglutininy**) se v krevním oběhu vyskytují buď přirozeně, nebo je jejich tvorba vyvolána průnikem krvinek jiné KS do krevního oběhu. Shlukování krvinek v přítomnosti příslušných protilátek proti daným antigenům se označuje jako **aglutinace** a využívá se pro rychlé orientační stanovení KS. U člověka je

Krevní skupina	Aglutinogen	Protilátky
A	A	anti-B
B	B	anti-A
AB	A, B	-
O	-	anti-A, anti-B

známo více než 30 systémů krevních skupin. Mezi nejvýznamnější patří systémy **AB0**, **Rh** či **MNS**. V **systému AB0** rozeznáváme čtyři základní krevní skupiny: A, B, AB a 0. Tento systém je nejstarší a nejvýznamnější. Jako první jej popsal rakouský vědec a lékař Karl Landsteiner v roce 1901 (a za tento objev dostal v roce 1930 Nobelovu cenu za medicínu). Landsteiner však popsal pouze tři krevní skupiny, A, B a C (dnes 0). Nezávisle na něm dospěl v roce 1907 ke stejnému objevu rovněž český lékař Prof. MUDr. **Jan Janský**. Ten ovšem správně identifikoval a klasifikoval všechny čtyři krevní skupiny, které sám označoval I, II, III a IV. Jedinci krevní skupiny A nesou na svých krvinkách aglutinogen A a tvoří protilátky anti-B, skupina B nese aglutinogen B a protilátky anti A. Skupina AB má oba aglutinogeny a žádné protilátky, skupina 0 nemá aglutinogeny (je přítomen jen jejich prekurzor) a tvoří protilátky proti oběma aglutinogenům.

Při transfúzi krve odlišné krevní skupiny hrozí **akutní hemolýza**: rychlá destrukce darovaných krvinek protilátkami příjemce a jejich následné odbourání prostřednictvím makrofágů a retikuloendoteliálním systémem.

URČOVÁNÍ KREVNÍCH SKUPIN U LIDÍ



K určení krevních skupin u lidí se používá „diagnostická souprava pro určování krevních skupin systému ABO (monoklonální)“. Tato souprava obsahuje monoklonální Anti-A, monoklonální Anti-B, diagnostické karty a tyčinky k promíchání diagnostik s krevními vzorky.

Princip testu: aglutinační reakce, která je založena na reakci mezi antigenem (na povrchu erytrocytů) a protilátkou (reagencie v testu).

Postup: Do každého modrého kroužku karty se kápne po 1 kapce monoklonálního diagnostika Anti-A. Do každého žlutého kroužku se kápne po 1 kapce monoklonálního diagnostika Anti-B. Do červeného kroužku se kápne po 1 kapce krve (po píchnutí do prstu tenkou jehlou stisknout prst a vymáčknout kapku krve). Přiloženými tyčinkami se promíchají kapky monoklonálních diagnostik s kapkami krve a to každý vzorek samostatným koncem tyčinky.

Hodnocení: Výsledky se odečítají do 1 minuty po promíchání za mírného kývavého pohybu diagnostickou kartou.

- Pozitivní reakce (aglutinace) indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu na erytrocytech.
- Negativní reakce (bez viditelné aglutinace) indikuje chybění odpovídajícího antigenu na erytrocytech
- Příslušná krevní skupina se určí podle následující tabulky

Reakce s diagnostikem		Krevní skupina
Anti-A	Anti-B	
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

Krevní skupiny v populaci lidí v ČR:

- A (45%)
- 0 (30 – 35%)
- B (15 – 20%)
- AB (5 – 7%)

Kontrolní otázky – vyšetření krve

- Co se používá k panoptickému barvení (dle Pappenheima) krevního nátěru?
- Jaký je rozdíl mezi ptačím a savčím erytrocytem (velikost, tvar a přítomnost jádra)?
- Jak se provádí měření velikosti mikroskopického objektu?
- K čemu slouží mikrometrický koeficient?
- Umíš nakreslit a popsat membránu (model tekuté mozaiky)?
- Jaké jsou způsoby transportu látek přes membránu?
- Jaký je rozdíl mezi endocytózou, exocytózou, pinocytózou a fagocytózou?
- Co je to osmóza?
- Jaké typy prostředí v souvislosti s osmotickými jevy rozlišujeme?
- Co se stane s živočišnou buňkou v hypotonickém, hypertonickém a izotonickém prostředí?
- Co znamená plazmoptýza a plazmorhiza?
- Co je to hemolýza?
- Jak vypadá hemolýza makroskopicky a mikroskopicky?
- Jaký je princip určování krevních skupin u lidí?
- Jaké jsou krevní skupiny u lidí (která skupina je nejčastější a která je vzácná)?

11. Buněčný cyklus, mitóza

BUNĚČNÝ CYKLUS je sled pochodů probíhajících v buňce od skončení jedné mitózy do konce mitózy následující a má 4 fáze: **G_1** (z angl. „gap“ - mezera), **S** (syntetická fáze), **G_2** a **M** (mitóza). První tři fáze se označují jako **interfáze**, která zaujímá 90 % času celého buněčného cyklu.

G_1 - buňka roste, probíhá v ní množení organel, syntéza proteinů, RNA a DNA polymerázy. Na začátku G_1 fáze leží **hlavní kontrolní bod**. Diferencované nedělicí se buňky (nervové, svalové) přecházejí do klidové fáze označované jako **G_0**.

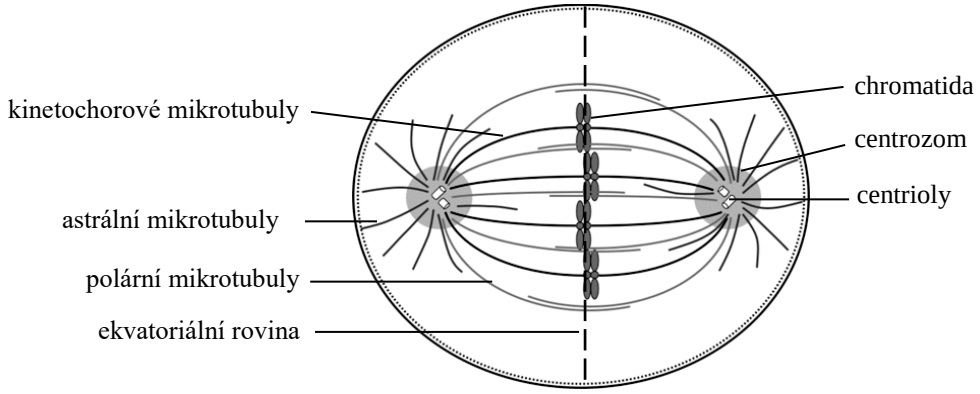
S - jaderná DNA se replikuje (replikace mimojaderné DNA probíhá během celého cyklu s výjimkou mitózy), zdvojuje se počet chromozomů a centrozomů.

G_2 - buňka opět roste a přibývá buněčných struktur.

M (MITÓZA) - slouží jak k budování mnohobuněčného organizmu, tak i k nepohlavnímu rozmnožování (u jednobuněčných a primitivnějších mnohobuněčných organizmů). Při mitóze dochází k rovnoměrnému rozdělení genetického materiálu, zdvojeného mechanizmem replikace DNA v predcházející S-fázi, do dvou dceřiných buněk, které jsou tak geneticky identické (klony).

Mitóza zahrnuje období vlastního dělení jádra (karyokineze) a dělení cytoplazmy buňky (cytokineze) a má 4-5 fází: profáze, (prometafáze - v mikroskopu těžko odlišitelná od jiných fází), metafáze, anafáze a telofáze.

Profáze - mizí jadérko, kondenzace (zviditelnění) chromozomů, centrozomy se rozchází k opačným pólům buňky a začíná se formovat **dělicí (mitotické) vřeténko** složené z pólů dělicího vřeténka (centrozomy) a mikrotubulů, vznik **kinetochorů** (komplex proteinů) v místě centromery na každé sesterské chromatidě chromozomu.



Obr. 14: Dělící vřeténko v živočišné buňce během metafáze.

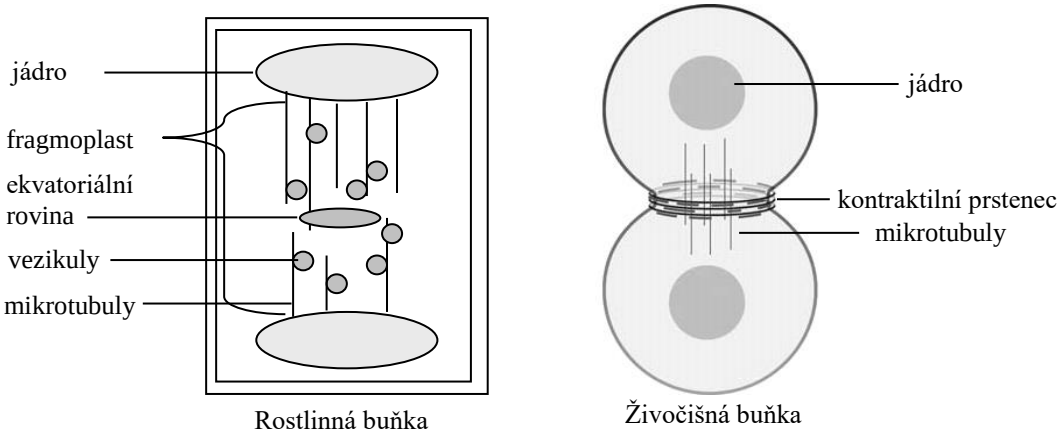
Prometafáze - rozpad jaderného obalu, vazba mikrotubulů dělicího vřeténka na kinetochory.

Metafáze - seskupení chromozomů v ekvatoriální rovině buňky za pomoci mikrotubulů a molekulových motorů kinezinů.

Anafáze - přerušení spojení sesterských chromatid proteolytickými enzymy a jejich rozchod (segregace) k opačným pólům vřeténka pomocí molekulových motorů dyneinů a zkracováním mikrotubulů.

Telofáze - dekondenzace dceřiných chromozomů, vznik dvou jader s jaderným obalem a jadérky, zánik dělicího vřeténka.

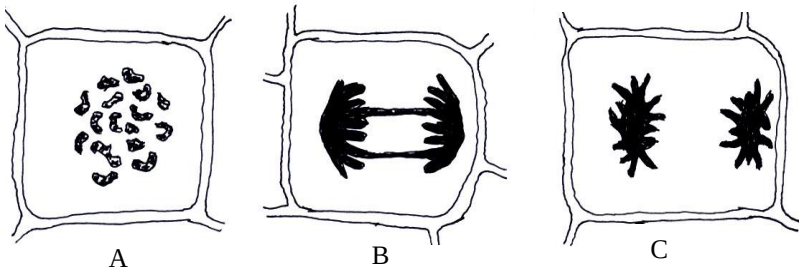
Cytokineze - obvykle začíná již v anafázi, kdy se u živočišných buněk začíná v ekvatoriální rovině pod plazmatickou membránou formovat **kontraktilní prstenec** tvořený mikrofilamenty a molekulovým motorem myozinem II. Stahováním prstence dojde k rozdělení buňky a poté se kontraktilní prstenec rozpadne. U rostlin a hub se v cytokinezi uplatňuje přepážka **fragmoplast**, která je formována ze zbytků polárních mikrotubulů v ekvatoriální rovině buňky. K fragmoplastu jsou podél mikrotubulů transportovány váčky z Golgiho aparátu. Váčky se slévají a rostou směrem k buněčné stěně, až dojde k rozdělení buňky.



Obr. 15: Cytokineze u rostlinné a živočišné buňky.

PORUCHY MITÓZY vznikají vlivem mutagenů (např. hydrochinonu). Následkem těchto poruch může být:

- **fragmentace chromozomů v profázi**
- **anafázový most** - vzniká tak, že se sesterské chromatidy spojí v místě telomer (opakující se nukleotidová sekvence na konci chromatid) a při mitóze tak nedojde k jejich oddělení.
- **anafáze u porušených chromozomů**



Obr. 16: Poruchy mitózy (A – fragmentace chromozomů v profázi, B – anafázový most, C – anafáze u porušených chromozomů).

Kontrolní otázky – buněčný cyklus, mitóza

- Jaké jsou fáze buněčného cyklu a co se děje v jednotlivých fázích?
- Jaké jsou fáze mitózy a co se děje v jednotlivých fázích?
- Co je to interfáze?
- Umíš nakreslit a popsat dělící vřeténko?
- Jak probíhá cytokineze u rostlinné a živočišné buňky?
- Jaké mohou být poruchy mitózy?
- Co je to anafázový most a jak vzniká?
- Co je to monaster?

12. Rozmnožování a vývoj

NEPOHLAVNÍ (ASEXUÁLNÍ, VEGETATIVNÍ) ROZMNOŽOVÁNÍ je vznik nového jedince z jedné nebo většího počtu somatických buněk mateřského jedince. Genetická informace se přenáší nezměněná, všichni potomci jsou tedy stejní jako generace předchozí. Hlavními způsoby nepohlavního rozmnožování jsou dělení a pučení:

a) **Dělení (fisiparie)** - dceřiní jedinci vznikají rozdělením mateřského jedince, který zaniká. Prvoci se dělí **podélně** (trypanosomy) nebo **příčně** (nálevníci). Známo je i mnohonásobné dělení, tzv. **polytomie** (např. při **schizogonii**, **sporogonii**, **gamogonii** u prvoků kmene Apicomplexa; nebo při **schizogenezi** (seriálním dělení) u živočichů, kdy se dceřiní jedinci začínají dělit dříve, než se sami oddělí od mateřského jedince a vzniká tak řetězec spojených jedinců (ploštěnky, mnohoštětinatci).

b) **Pučení (gemiparie)** - na mateřském jedinci se vyvíjí pupen, který postupně dorůstá v dceřiného jedince (časté u přisedlých organizmů - houbovců, žahavců, mechovců).

POHLAVNÍ (SEXUÁLNÍ, GENERATIVNÍ) ROZMNOŽOVÁNÍ - nový jedinec se vyvíjí z jediné buňky (**zygoty**), která vzniká splynutím samčí a samičí pohlavní buňky (**gamety**). Gamety vznikají redukčním meiotickým dělením. U **gonochoristů** se tvoří samčí gamety v jiném jedinci než gamety samičí; u **hermafroditů** jsou gamety obojího typu tvořeny jedním jedincem.

MEIÓZA je proces (gametogeneze), který slouží ke vzniku pohlavních buněk. Meióza je jaderné dělení, při němž se jádro dvakrát dělí, ale dělení předchází pouze jedna syntetická fáze (syntéza jaderné DNA). V prvním dělení (též heterotypické, první zrací, redukční, meióza I) se rozcházejí homologní chromozomy (dvojchromatidové). Ve druhém dělení (též homeotypické, druhé zrací, ekvační, meióza II) se rozcházejí sesterské chromatidy (identické chromatidy se stejnou nukleotidovou sekvencí). Mezi dvěma děleními může být interkineze (obdoba interfáze u mitózy), ale bez S fáze.

Heterotypické dělení - počet chromozomů je redukován na polovinu (diploidní počet **2n** se mění na haploidní počet chromozomů **n**). Má 4 fáze (profáze, metafáze, anafáze, telofáze):

- **PROFÁZE I** - z celého meiotického dělení zaujímá až 90 %. Může trvat několik hodin, dní až roků. Při zahájení profáze I jsou již chromozomy zdvojeny (dvojchromatidové, obsahují 2 sesterské chromatidy, ke zdvojení došlo během S fáze). Během profáze I je možné rozlišit 5 fází:

  Leptotene (časná profáze I, leptonema podle *leptos* = tenký) - chromozomy se začínají spiralizovat (začínají být viditelné), mají vzhled dlouhých jemných vláken. Začíná párování homologních chromozomů (nepohlavní chromozomy, obsahující stejné geny).

  Zygotene (období mezi časnou a střední profází I, zygonema podle *zygon* = dvojitá nit) - homologní chromozomy (každý má 2 sesterské chromatidy) se přikládají těsně k sobě a vzniká tzv. **bivalent** složený ze 4 chromatid (= **tetráda**). Za vyhledání a navázání již maximálně kondenzovaných homologních chromozomů odpovídá tzv. **synaptonemální komplex**, tj. seskupení proteinů, které specificky rozezná příslušný chromozomový pár.

  Pachytene (střední profáze I, pachytene podle *pachynema* = tlustý) - dochází k reciproké (vzájemné) výměně částí homologních chromozomů od otce a od matky (dochází k rekombinaci genetické informace). Tato výměna se označuje jako **crossing-over** a místa překřížení chromatid jako **chiazmata** (jednotné číslo **chiazma**). Synaptonemální komplex se rozpadá a chromozomy se více kondenzují (zkracují a ztlušťují).

Diplotene (střední až pozdní profáze I, diplonema podle *diplos* = dvojitý) - homologní chromozomy se od sebe oddělují (bez rekombinace nebo po rekombinaci vlivem crossing-overu).
Diakineze (pozdní profáze I, podle *diakino* = rozpojuji) - zaniká jaderná membrána a jadérko, vzniká dělicí vřeténko.

- **METAFÁZE I** - homologní páry chromozomů se pomocí mikrotubulů dělícího vřeténka řadí v ekvatoriální rovině.
- **ANAFÁZE I** - dochází k **segregaci chromozomů**. Segregace je **nezávislá,** tj. náhodně se k pólům buňky rozchází homologní chromozomy (dvojchromatidové) původově od otce a od matky nebo rekombinované při crossing-overu. Tím dochází k druhé rekombinaci genetické informace, jejímž výsledkem je jádro vytvořené kombinací otcovských, mateřských a v crossing-overu rekombinovaných chromozomů.
- **TELOFÁZE I** - kolem dvou nových jader s haploidním počtem dvouchromatidových chromozomů se vytvoří nová jaderná membrána. Vzniknou 2 haploidní buňky (2 haploidní jádra) oddělené buněčnou přepážkou a telofáze heterotypického dělení přechází do profáze homeotypického dělení.

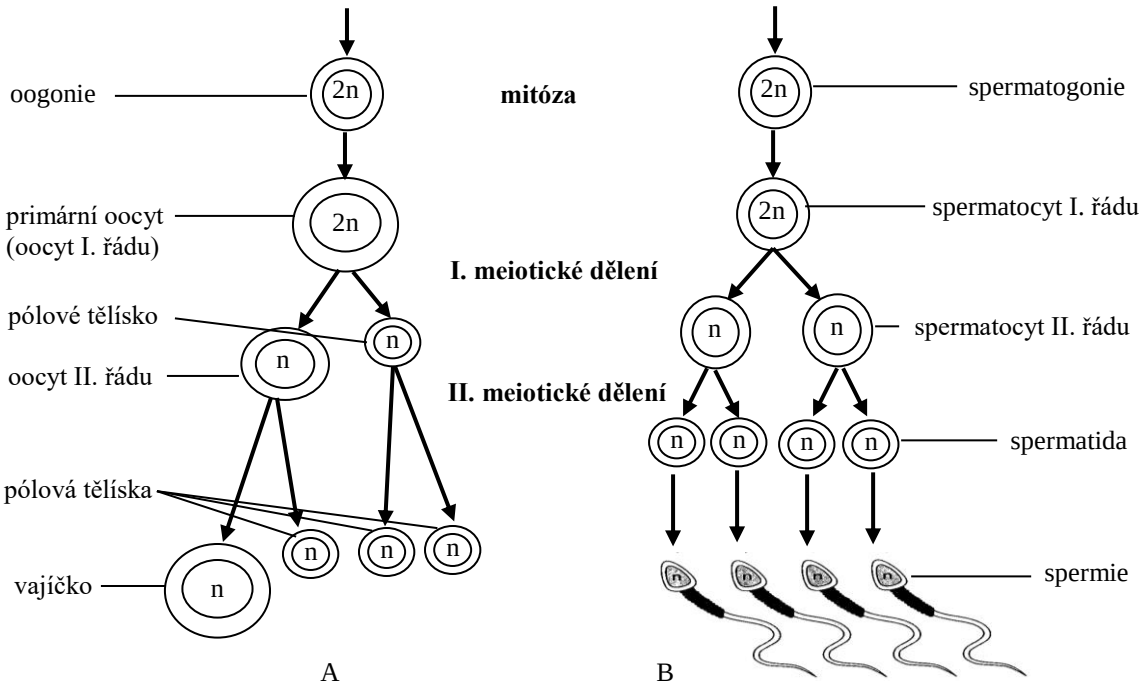
Homeotypické dělení - haploidní buňky se dělí jako při mitóze.

- **PROFÁZE II** - chromozomy se kondenzují, na konci profáze se diferencují 2 dělící vřeténka.
- **METAFÁZE II** - chromozomy zaujmou polohu v ekvatoriální rovině.
- **ANAFÁZE II** - dochází k podélnému rozštěpení centromer a k rozchodu sesterských chromatid dceřiných chromozomů k pólům dělicího vřeténka.
- **TELOFÁZE II** - tvoří se jaderná membrána kolem každé sady chromozomů. Následuje **cytokineze**, chromozomy se despiralizují a přestávají být viditelné.

Produktem meiózy výchozí mateřské buňky s diploidním počtem dvouchromatidových chromozomů je čtveřice gamet s haploidním počtem jednochromatidových chromozomů. Studium a pochopení průběhu meiózy se uplatňuje v cytogenetice.

SPERMIOGENEZE (spermatogeneze) je vznik a vývoj spermií ve varleti. **Spermatogonie** se mitoticky dělí na **spermatocyty I. řádu** (primární spermatocyt), které vstupují do prvého meiotického dělení za vzniku **spermatocytů II. řádu** (sekundární spermatocyt). Po druhém meiotickém dělení vznikají čtyři **spermatidy**, které se následně diferencují ve **spermie**. Diferenciace spermií (ztráta většiny cytoplazmy a vytvoření bičíku) se děje až po ukončení meiózy, kdy jsou buněčná jádra haploidní a buňky ukončily cytokinezi. Spermiogeneze je zahájena v době pohlavní dospělosti a trvá asi 74 dnů.

OOGENEZE je vznik a vývoj vajíček ve vaječníku. Vajíčka vznikají z diploidních zárodečných prapohlavních buněk (primordiální gonocyty), které osídlily vaječník a staly se z nich **oogonie**. Ty se mitoticky dělí a vznikají **primární oocyty** (oocyty I. řádu), které vstupují do meiózy (u člověka v 7. měsíci nitroděložního vývoje) a zastaví se v profázi prvého meiotického dělení (u ženy to je do 12-45 let). Během této doby primární oocyt roste až na konečný průměr 100 μm, pomocí endocytózy a folikulárních buněk (pomocné buňky obalující vajíčko) se v nich hromadí žloutek jako materiálová a energetická rezerva. Gonadotropní hormon vylučovaný z hypofýzy (folikulostimulační hormon, FSH) navodí v buňkách folikulů tvorbu pohlavních hormonů (estrogenů), které indukují pokračování zrání primárního oocytu. V pohlavní dospělosti pokračuje oogeneze. Ve 28 denních cyklech vzniká z primárního oocytu **sekundární oocyt** (oocyt II. řádu) a **první pólové tělísko**. Sekundární oocyt se zastaví v metafázi druhého meiotického dělení, kde setrvá až do oplození. Po oplození dokončí sekundární oocyt druhé meiotické dělení a vznikne **vajíčko** a **druhé pólové tělísko**. Vajíčko se začne rýhovat, pólová tělíska zanikají.



Obr. 17: A – schéma průběhu oogeneze, B – schéma průběhu spermiogeneze.

ESTRUS (říje) - dozrávání a uvolňování samičích gamet u savců probíhá opakovaně v tzv. **estrálním cyklu.** Rozlišujeme 4 fáze, pro něž je charakteristický mikroskopický nález ve stěru z poševní sliznice. Pro **proestrus** jsou typické epiteliální buňky s malým dobře barvitelným jádrem (v této době dozrává vajíčko ve vaječníku uvnitř folikulu, který je tvořen folikulárními buňkami, které produkují hormon **estrogen**); v **estru** převládají bezjaderné zrohovatělé epiteliální buňky (dochází k uvolnění zralého vajíčka z Graafova folikulu = ovulace); v **metestru** je možné najít buňky s velkými jádry a hlen (děložní sliznice se připravuje na případné zahnízdění oplozeného vajíčka, vzniká žluté tělísko „*corpus luteum*“, které produkuje hormon **progesteron**); v **diestru** převládá hlen a leukocyty (dochází k vyloučení neoplozeného vajíčka).

Monoestrická zvířata - říje (estrus, ovulace) probíhá jednou ročně (např. vlk, jelen).

Deiestrická zvířata - říje probíhá dvakrát do roka (např. pes).

Polyestrická zvířata - říje probíhá několikrát do roka (např. hlodavci, zajíc, mnozí domestikovaní savci).

UTAJENÁ BŘEZOST je prodloužení doby mezi pářením a porodem pozastavením vývoje zárodku zpravidla na konci rýhování ve stadiu blastocysty (některé kunovité a medvědovité šelmy, pásovci, srna aj. savci).

UTAJENÉ OPLOZENÍ - páření proběhne určitou dobu před ovulací a spermie jsou po kopulaci uchovávány v pohlavních cestách samice až do ovulace (např. u netopýrů a některých ptáků).

INDUKOVANÁ OVULACE (provokovaná říje) - stimulem pro ovulaci je vlastní akt páření (např. králík, zajíc, myš, drobné šelmy), případně ztráta mláďat (lvi, hulmani - noví vůdčí samci záměrně zabíjejí „cizí“, tedy ne svá mláďata = infanticida).

FYLOGENETICKÝ VÝVOJ je vývoj v historickém sledu, představující příbuzenské vztahy žijících i vymřelých organizmů.

ONTOGENETICKÝ VÝVOJ je individuální vývoj organizmu v průběhu jeho života od oplození vajíčka do dospělého stavu, případně až do jeho smrti. Probíhá ve dvou

obdobích: embryonálním (prenatálním) a postembryonálním (postnatálním) (u savců bývá včleněno ještě tzv. období fetální).

NEPŘÍMÝ VÝVOJ ŽIVOČICHŮ je vývoj jedince přes stádium larvy. Larvy mají zpravidla jinou potravní základnu a žijí v jiném prostředí než dospělci. **Primární larvy** jsou upravená vývojová stádia (např. obrvená blastula), **sekundární larvy** jsou stavebně zcela odlišné (larvy hmyzu a pulci žab). U hmyzu má nepřímý vývoj 2 varianty:

- **Proměna nedokonalá (hemimetabolie)** - larvy se podobají dospělci, tj. **imagu** hmyzu (kobylky, ploštice, všenky aj.).
- **Proměna dokonalá (holometabolie)** - larvy se morfologicky i ekologicky liší od imaga, které vzniká **metamorfózou** (u hmyzu přes stádium kukly, např. motýli). Vyskytuje se také u obratlovců s vnějším oplozením, jako jsou ryby a obojživelníci.

PŘÍMÝ VÝVOJ ŽIVOČICHŮ - z oplozeného vajíčka se vyvíjí jedinec podobný dospělci až do vzniku pohlavně dospělého jedince. Podle odlišného vývoje rozlišujeme:

- **Vejcorodost (oviparie)** - mláďata se líhnou z vajíček uložených v prostředí mimo tělo matky (ptáci, hmyz, plazi, ryby, někteří savci).
- **Vejcoživorodost (ovoviviparie)** - vajíčka zůstávají v pohlavních vývodech matky a její tělo opouštějí larvy nebo juvenilní jedinci (některý hmyz, ryby, plazi, př. zmije obecná).
- **Živorodost (viviparie)** - vývoj zárodku uvnitř mateřského organizmu, kde je vyživován alespoň částečně z těla matky prostřednictvím placenty (savci).

APOMIXE je vývoj jedince z haploidní buňky - gamety. Příklady apomixe:

- **Partenogeneze** (řecky *parthenos* = panna) - vývoj jedince z neoplozeného vajíčka zcela bez účasti spermie (pavoukovci, hmyz, některé druhy ryb a ještěrů).
- **Gynogeneze** - vývoj vajíčka je aktivován spermií, jež poskytuje dělicí aparát, jádro spermie však zaniká a dalšího vývoje se neúčastní (hlístice, ploštěnky, vzácně ryby a ještěrky).
- **Androgeneze** (řecky *andros* = muž) - vývoj jedince ze samčí pohlavní buňky (pouze u rostlin).

Kontrolní otázky – rozmnožování a vývoj

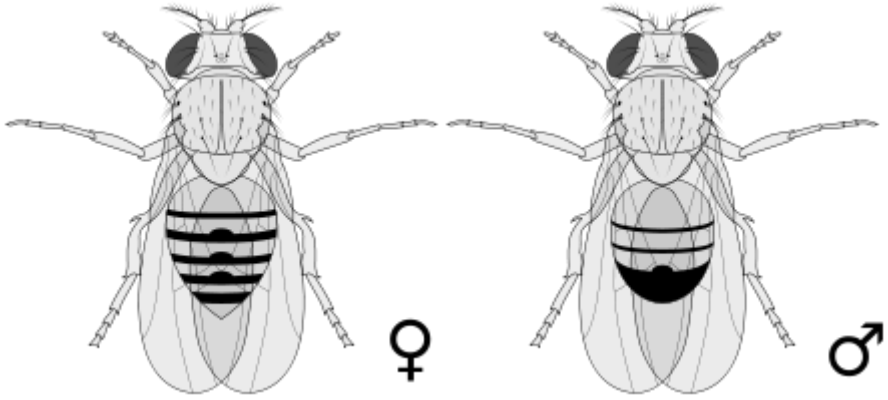
- Jaký je rozdíl mezi nepohlavním a pohlavním rozmnožováním?
- Jak se liší mitóza od meiózy?
- K čemu slouží meióza a jaké jsou fáze meiózy?
- Jaké jsou fáze profáze prvního meiotického dělení?
- Co je to crossing-over a kdy k němu dochází?
- Co je to spermiogeneze?
- Umíš zakreslit schéma spermiogeneze?
- Co je to oogeneze?
- Umíš zakreslit schéma oogeneze?
- Jak dlouho trvá spermiogeneze a jak dlouho oogeneze?
- Co jsou to folikulární buňky a jaký hormon produkují?
- Co je to Graafův folikul?
- Co je to corpus luteum a jaký hormon produkuje?
- Jaké jsou fáze estrálního cyklu a co je pro ně typické?
- Jaký je rozdíl mezi ontogenezí a fylogenezí?
- Umíš nakreslit příklad fylogenetického stromu?
- Jaký je rozdíl mezi proměnou dokonalou a nedokonalou (uveď příklady)?
- Co je to apomixe?

13. Modelový organizmus – *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (octomilka obecná, drozofila, lidově banánová nebo vinná muška) patří do řádu Diptera (dvoukřídlí) a jejím původním domovem je Indo-malajská oblast. Kromě tohoto druhu se ve střední Evropě nachází přes 10 jiných druhů rodu *Drosophila*. Genetické studium u drozofil začalo r. 1909 v laboratoři T. H. Morgana v USA. Jedná se o genetický model, který byl použit z několika důvodů: snadný chov a křížení, krátká generační doba, početné potomstvo, existence mutantních kmenů a malý genom (bylo popsáno a analyzováno 13 600 genů, celý genom čítá asi 116 Mb, miliónů párů bází). Karyotyp 2n = 8, z toho 1. pár chromozomů jsou gonozomy (metacentrické, X je větší než Y), 2. – 4. pár chromozomů jsou autozomy (2. a 3. pár velké metacentrické, 4. pár velmi malé metacentrické).

Životní cyklus:

- **vajíčko** (1 den), bílé, velikost 0,5 mm
- **první larvální stádium L1**, 1. instar (1 den)
- **druhé larvální stádium L2**, 2. instar (1 den)
- **třetí larvální stádium L3**, 3. instar (2 dny)
- **kukla** (4 dny), zpočátku bílá, později hnědne.
- **imago,** dospělec (40-50 dnů), velikost 2-3 mm, samička se od samečka liší velikostí, tvarem a zbarvením hřbetní strany zadečku (na zašpičatělém zadečku má tmavé pruhování, zatímco sameček má na kulatém zadečku celistvou tmavou skvrnu). Pro křížení se vybírají neoplozené (virginelní) samičky, tj. asi 4-6 hod. po vylíhnutí. Tyto samičky jsou světlejší, mají protáhlý zadeček a někdy ne zcela rozvinutá křídla. Samičky jsou schopny se pářit za 12 hodin od vylíhnutí z kukly, samečci se mohou pářit již za několik málo hodin. Za 6-10 dnů od páření klade samička až 300 vajíček.



Obr. 18: *Drosophila melanogaster* – rozdíl mezi samečkem a samičkou

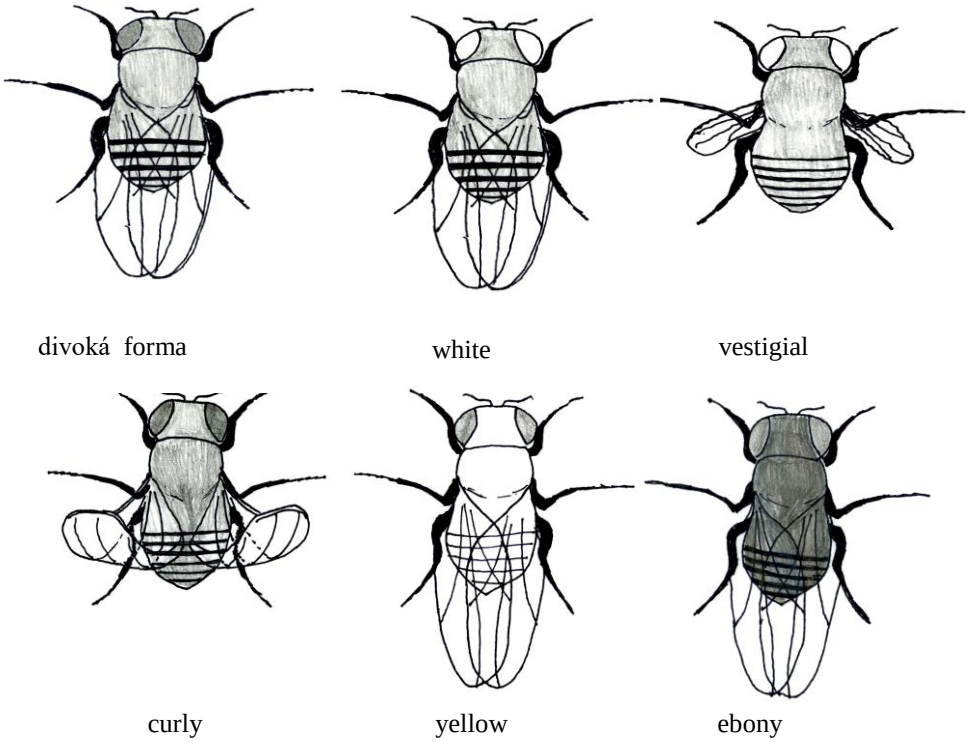
Laboratorní chov:

Mouchy se chovají v Erlenmeyerových baňkách při pokojové teplotě nebo v termostatu při 25 °C. Na dno baněk se nalije živné médium, které se připraví z kukuřičného šrotu, sušených kvasnic, cukru a agaru. Na živné médium se pokládá filtrační papír a po vpuštění drozofil do baněk se baňka uzavře vatovou zátkou.

Mutantní linie:

U drozofil je vyšlechtěna celá řada mutantních linií s rozdílnými geneticky založenými znaky (barva očí a těla, morfologie křídel). Mutantní alela se u drozofily značí symbolem s malým počátečním písmenem, je-li recesivní, což je většina (**w** „white“ = bílé oči; **y** „yellow“ = žluté tělo) a velkým písmenem, je-li dominantní (**B** „bar“ = zúžené oči). Standardní alela se značí symbolem (+).

Mutace	**Symbol**	**Fenotyp**
White	w	bílé oči
Vestigial	vg	zakrnělá křídla
Curly	cy	křídla zahnutá nahoru
Yellow	y	žluté zbarvení těla
Ebony	e	černé zbarvení těla
Eyeless	ey	redukované oči



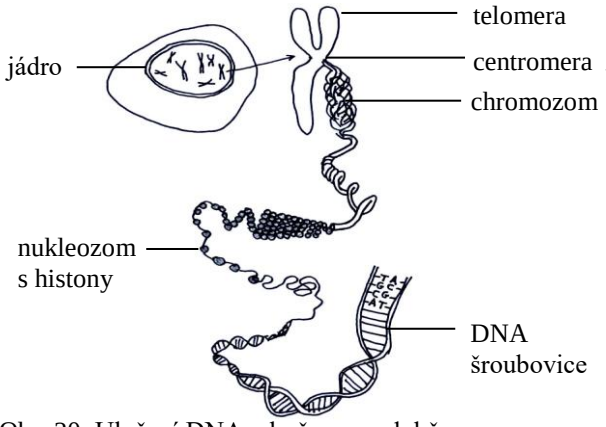
Obr. 19: Některé typy mutací u octomilky (*Drosophila melanogaster*) v porovnání s divokou formou.

Kontrolní otázky – modelový organismus *Drosophila melanogaster*

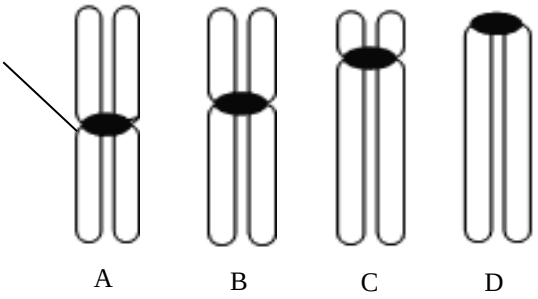
- Kdo používal octomilku ke svým experimentům?
- Proč se octomilky používají jako vhodný genetický model?
- Jaký je vývojový cyklus octomilky?
- Jaký je rozdíl mezi samcem a samicí octomilky?
- Kolik chromozomů má octomilka?
- Znáš příklady mutací u octomilek?
- Jak se dědí barva očí u octomilek?

14. Cytogenetika

CHROMOZOMY jsou pentlicovité útvary o velikosti 1-10 μm, které je možné pozorovat mikroskopem v dělicí se buňce. U eukaryot existuje více modelů struktury chromozomů (např. jednořetětězcové, víceřetězcové). Metafázický chromozom se skládá ze dvou chromatid, které jsou spojeny proteiny koheziny v místě primární konstrikce, tj. v místě centromery. Na základě polohy centromery se chromozomy dělí na **metacentrické**, **submetacentrické**, **akrocentrické** a **telocentrické**. Lidské chromozomy se rozdělují podle Denverské nomenklatury do sedmi skupin A až G podle jejich velikosti a uložení centromery. Chromozom je tvořen tzv. chromatinem tvořeným DNA, která je v trvalé vazbě s bazickými proteiny **histony** a dalšími kyselými proteiny. Podle intenzity barvení acetobarvivy, stupně kondenzace a intenzity transkripce se rozlišují dva druhy chromatinu: **euchromatin** (slabé barvení, malá kondenzace, transkripčně aktivní, přítomný v jádře inaktivní, pozorovatelný především při mitóze).



Obr. 20: Uložení DNA v buňce v podobě chromozomů



Obr. 21: Typy chromozomů podle polohy centromery (A – metacentrický, B – submetacentrický, C – akrocentrický, D – telocentrický).

Pohlaví jedinců většiny druhů s odděleným pohlavím (gonochoristů) je určeno pohlavními chromozomy (heterochromozomy, **gonozomy**). Ostatní chromozomy se označují jako somatické chromozomy (autochromozomy, **autozomy**). Diploidní buňky jedince homogametického pohlaví obsahují 2 stejné gonozomy, jedinec heterogametického pohlaví obsahuje dvojici rozdílných gonozomů, nebo jen jeden gonozom. V následující tabulce je uveden přehled počtu chromozomů, gonozomů a autozomů v tělních a pohlavních buňkách člověka.

Buňka	**Počet sad chromozomů**	**Celkem chromozomů**	**Gonozomy**	**Autozomy**
Tělní (somatická)	2 (2n)	46	2	44
Pohlavní (gameta)	1 (n)	23	1	22

DETERMINACE POHLAVÍ U ŽIVOČICHŮ

- Různý genetický základ u samce a samice (pohlavní chromozomy) – viz následující tabulka
- Stejný genetický základ u samce a samice (vliv prostředí, inkubační teplota) – u některých želv a krokodýlů má inkubační teplota vliv na pohlaví mláďat (při inkubační teplotě nižší než 28 °C se líhnou z vajec pouze samci, při teplotě 28 – 32 °C se líhnou samci i samice a při teplotě větší než 32 °C se líhnou pouze samice).

Typ chromozomového určení pohlaví	Samec	Samice	Zástupci
Typ savčí (*Drosophila*)	XY	XX	savci, většina řádů hmyzu, rostliny, některé ryby, někteří plazi, obojživelníci
Typ ptakopysk	X_1Y_1, X_2Y_2, X_3Y_3, X_4Y_4, X_5Y_5	X_1X_1, X_2X_2, X_3X_3, X_4X_4, X_5X_5	ptakopysk
Typ ptačí (*Abraxas*, systém ZW)	ZZ	ZW	ptáci, motýli, některé ryby, někteří plazi, obojživelníci, ojediněle u rostlin
Typ *Protenor* (systém XO)	XO	XX	ploštice, rovnokřídlý hmyz
Typ včela (podle sad chromozomů)	n	2n	společenský hmyz

POLYTENNÍ CHROMOZOMY (mnohovláknové, mnohořetězcové, obrovské, gigantické) jsou chromozomy, které je možné najít v různých tkáních (slinné žlázy, buňky střevního epitelu a malpighických trubic) larev některého dvoukřídlého hmyzu, rovněž i u rostlin např. v endospermu kukuřice, v máku, oměji, pšenici a řeřiše. Polytenní chromozomy jsou zpravidla 50-200× delší než normální chromozomy, měří 200-600 μm a dosahují šířky až 25 μm. Každý polytenní chromozom se skládá z množství chromatinových vláken, která vznikla mnohonásobnou replikací a zůstávají spolu v paralelním uspořádání. Při barvení acetobarvivy vykazují lineární řadu střídajících se proužků (disků a meziproužků tmavší a světlejší barvy), což je způsobeno rozdílným barvením heterochromatinu a euchromatinu. Při aktivním fungování ztrácejí některé části polytenních chromozomů diskovité uspořádání, vznikají méně barvitelné vychlípeniny tzv. pufy ("puffs", Balbianiho prstence), kde probíhá tvorba mRNA.

LYONIZACE, BARROVO TĚLÍSKO – u člověka a řady savců (např. kočka) u homogametického pohlaví (tedy samic), byla v nedělících se jádrech somatických buněk opakovaně prokázána přítomnost tzv. **pohlavního chromatinu**, který je podle svého objevitele označován jako **Barrovo tělísko**. Jedná se o 1 μm velký oválný útvar, který je ostře ohraničen a zpravidla bývá uložen při vnitřní straně jaderné membrány. Barrovo tělísko nelze obvykle prokázat ve všech buňkách (např. u žen se nachází ve 20 – 70% buněk ústní sliznice, u mužů se nachází v 0 – 3% buněk). Pohlavní chromatin je vlastně inaktivovaný chromozom X, který v interfázi zůstává spiralizován a je proto barvitelný. Většina genů inaktivovaného X chromozomu není geneticky aktivní, což počátkem 60. let zjistila M. F. Lyonová a tento jev (proces) byl nazván **lyonizace**. K irreverzibilní inaktivaci jednoho z chromozomů X dochází u savců již v rané fázi embryonálního vývoje. Trvání inaktivace nemusí být absolutní, kondenzovaný X chromozom může být reaktivován během tvorby vajíček. Vyšetření buněk na přítomnost pohlavního chromatinu se využívá k orientačnímu určování pohlaví u člověka.

CYTOGENETIKA je obor, který se zabývá studiem buněčných struktur nesoucích genetickou informaci. Pomocí cytogenetických metod se zjišťuje počet, tvar a struktura chromozomů a hledají se příčiny a následky jejich změn. Základní cytogenetickou metodou je chromozomová analýza, jejímž výsledkem je stanovení karyotypu. Materiálem

pro vyšetřování chromozomů v somatických buňkách během mitózy jsou buňky kostní dřeně, choria, plodové vody, ale jako nejvhodnější se jeví lymfocyty z periferní krve. Mitotická aktivita lymfocytů se stimuluje **fytohemaglutininem** (extrakt z fazole), který se přidá do kultivačního média a buňky se kultivují v termostatu 72 hod. při 37 °C. Ke konci kultivace se do média přidává asi na 2 hod **kolchicin**, který poruší funkci dělicího vřeténka, zastaví dělení buněk v metafázi a tak vyvolá nahromadění metafázických buněk. Buňky jsou dále umístěny do hypotonického prostředí, fixovány, naneseny na podložní sklo a obarveny Giemsovým barvivem. Vhodné karyotypy se mohou vyfotografovat, jednotlivé chromozomy vystříhat a roztřídit podle velikosti, umístění centromery a uspořádání proužků a sestavit tak karyogram.

KARYOGRAM, IDIOGRAM je schématické grafické znázornění chromozomového souboru jednotlivých druhů organizmů.

KARYOTYP je sestava chromozomů zjištěná u konkrétního jedince. Každý chromozom v preparátech je tvořen sesterskými chromatidami.

EUPLOIDIE jsou změny počtu sad chromozomů př. triploidie (3n), oktoploidie (8n).

ANEUPLOIDIE jsou změny počtu jednotlivých chromozomů, např. monosomie (2n-1), trisomie (2n+1). Aneuploidie mohou u člověka způsobovat poruchy (syndromy) se specifickými příznaky. K nejčastějším syndromům patří:

Downův syndrom – trisomie chromozomu 21, u obou pohlaví (47,XX+21; 47,XY+21)
Edwardsův syndrom – trisomie chromozomu 18, u obou pohlaví (47,XX+18; 47,XY+18)
Pataův syndrom – trisomie chromozomu 13, u obou pohlaví (47,XX+13; 47,XY+13)
Turnerův syndrom – chybí chromozom X, jen u žen (45,XO; nebo 45,X)
Syndrom tří X (metafemale) – navíc chromozom X, u žen (47,XXX)
Klinefelterův syndrom – navíc chromozom X, u mužů (47,XXY)
Syndrom dvou Y (Jacobův syndrom, metamale) - navíc chromozom Y, u mužů (47,XYY)

BARVICÍ METODY (proužkovací, „banding“ metody) slouží k přesné identifikaci jednotlivých chromozomů a jejich aberací:

G pruhy – nejpoužívanější metoda, kdy se chromozomy vystaví účinku trypsinu, který denaturuje proteiny chromozomů, které se obarví Giemsovým barvivem. Na chromozomech vzniknou tmavé a světlé proužky (úsek chromozomu s převahou párů bází adenin-tymin se barví tmavě, úseky, kde převažují páry bází cytosin-guanin se barví světle).

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) – využívá fluorescenční sondy ke specifickému barvení jednotlivých chromozomových párů. Je možné použít současně více sond (barev) k označení více párů chromozomů.

Kontrolní otázky – cytogenetika

- Čím se zabývá cytogenetika?
- Z čeho se skládá chromozom po chemické stránce?
- Jaké jsou typy chromozomů podle polohy centromery?
- Jaké jsou počty chromozomů (autozomů a gonozomů) v somatické a pohlavní buňce?
- Jak je determinováno pohlaví u různých skupin zvířat?
- Co je to polytenní chromozom?
- Co je to pohlavní chromatin (Barrovo tělísko) a jak vzniká?
- Jaký je rozdíl mezi trisomii a triploidii, jak se to dá zapsat?
- Z jakých buněk a jakým způsobem se dá zjistit karyotypy jedince?
- Umíš zapsat karyotyp člověka a domácích zvířat?
- Znáš příklady syndromů spojené s numerickou aberací? Umíš je zapsat?
- Jaká barvení se používají pro chromozomy?

15. Metody molekulární biologie

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE je vědní disciplína zabývající se studiem buněčných biologických procesů na molekulární úrovni. Princip fungování některých biologických jevů je odhalitelný pouze studiem jejich molekulární podstaty. Molekulární biologie studuje strukturu biomakromolekul (DNA, RNA a proteinů), jejich vzájemné interakce a regulace jejich funkcí ve vztahu k funkcím a vlastnostem buňky. Molekulární biologie tak na jedné straně souvisí s biologií buňky, na straně druhé s biochemií a genetikou. Tento dynamicky se rozvíjející obor integruje ve svém přístupu hlediska biologická, chemická i fyzikální. Metody molekulární biologie zahrnují např. fyzikální a chemické separační a charakterizační metody, jako jsou chromatografie, elektroforéza, elektronová mikroskopie a spektroskopie. Molekulárně biologické metody jsou široce využívané nejen v základním a aplikovaném genetickém výzkumu nebo v genovém inženýrství, ale i v archeologii, zoologii, botanice, klinické medicínské diagnostice, kriminalistice nebo v soudním lékařství. K hlavním metodickým přístupům molekulární biologie patří purifikace a separace nukleových kyselin, amplifikace nukleových kyselin, různé způsoby manipulace s nukleovými kyselinami, sekvenování DNA a dále pak různé metody analýzy genové exprese (studium transkripce a translace). V následující části kapitoly jsou vysvětleny principy nejpoužívanějších molekulárně biologických metod spolu s příklady jejich možného využití.

IZOLACE DNA – je prvním krokem většiny molekulárně biologických technik. Materiálem pro izolaci DNA mohou být jednotlivé buňky (např. prokaryotických organizmů nebo kvasinek), tkáně a orgány eukaryot, které jsou nejdříve homogenizovány, nebo například virové částice. Izolace DNA zahrnuje 3 základní kroky:

1. Rozrušení buněk nebo virových kapsidů působením enzymů (lysozym, celulázy) a/nebo detergentů (dodecylsulfát sodný).
2. Odstranění kontaminant pomocí enzymů (proteináza, RNAáza).
3. Vlastní extrakce DNA – nejčastěji je používaná **fenol–chloroformová extrakce**, kdy buněčný lyzát je promíchán se směsí fenolu a chloroformu. Fenol je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od NK. Proteiny jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco NK jsou vysoce nabité a přecházejí do vodné fáze. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných v následujícím kroku. Centrifugací je oddělena spodní organická fáze, tvořená fenolem, mezifáze, tvořená denaturovanými proteiny a zbytky buněk, a horní vodná fáze, v níž je rozpuštěna DNA. DNA je následně vysrážena **etanolem**, precipitát je shromážděn centrifugací a získaný sediment je rozpuštěn ve vhodném roztoku (např. ve vodě). K izolaci DNA ze vzorku krve či tkáně je možné použít komerčně dodávané izolační soupravy (kity), které výrazně zjednodušují a urychlují postup získání DNA.

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je metoda sloužící k mnohonásobnému zmnožení (**amplifikaci**) specifického úseku DNA *in vitro*. PCR zavedl v roce 1983 Kary Mullis (za objev této metody dostal Nobelovu cenu). Princip syntézy DNA touto metodou je podobný replikaci: kopie úseku DNA jsou syntetizovány pomocí enzymu DNA-polymerázy podle templátu ve formě jednořetězcové DNA na principu komplementarity bází. K zahájení reakce je zapotřebí dvou **primerů** (čti prajmrů) – chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů, které se připojují ke komplementárním úsekům protilehlých řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují

proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Jako templáty pro syntézu slouží oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

Reakční směs pro PCR:

- **templátová DNA** – může být izolována z různých mikroorganizmů, bioptických vzorků, stěrů, z buněk z tkáňových kultur, z tělních tekutin
- **2 primery** (každý komplementární k jednomu řetězci DNA)
- **dNTP** (deoxyribonukleosidtrifosfáty)
- **termostabilní DNA polymeráza** (např. *Taq* polymeráza získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech)

(dNTP a DNA polymeráza bývají součástí tzv. master mixu)

Reakční směs pro PCR se napipetuje do malé PCR zkumavky, která se vloží do speciálního přístroje **termocykleru** (čti termosajkleru), kde probíhají cyklicky se opakující kroky za různých teplot.

Průběh PCR:

1. **počáteční denaturace DNA** (separace řetězců) (94 °C, 2-5 min)

Vlastní řetězová reakce:

2. **denaturace** (separace řetězců) (94 – 95 °C, 20 – 45 s)
3. **připojení (nasedání) primerů** (55 – 65 °C, 30 – 90 s)
4. **polymerační reakce** (72 °C, 45 – 90 s)

(prodlužování řetězců pomocí DNA-polymerázy, která syntetizuje komplementární řetězce DNA z volných nukleotidů, nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus)

→ tyto kroky se cyklicky opakují (25-30 cyklů)

5. **závěrečná extenze** (72 °C, 5 min)
   (dosyntetizování případně nedosyntetizovaných řetězců)

Výhodou PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA (teoreticky stačí 1 molekula DNA). Touto metodou lze získat 2^n-1 kopií, kdy n je počet cyklů. Z jedné molekuly DNA lze tedy například získat po proběhnutí 30 amplifikačních cyklů víc než 10^9 kopií.

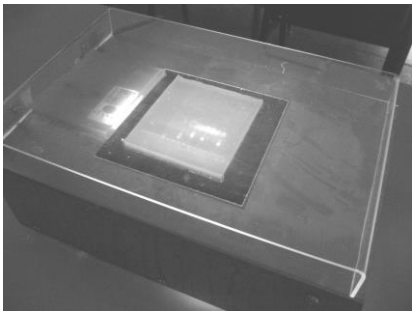
**PCR (polymerázová – používá se enzym DNA polymeráza, řetězová reakce – počet kopií DNA roste během jednotlivých cyklů řetězovou řadou – 2, 4, 8, 16, 32...).*

Výsledný produkt PCR (amplifikovaný úsek DNA) můžeme analyzovat např. stanovením velikosti produktu gelovou elektroforézou, štěpením restrikčními enzymy a posouzením vznikajících restrikčních fragmentů (RFLP), hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku nebo stanovením sekvence DNA (sekvenování). Variantou PCR umožňující syntézu cDNA podle RNA templátu je **reverzní PCR** (RT-PCR) využívající enzymu reverzní transkriptázy.

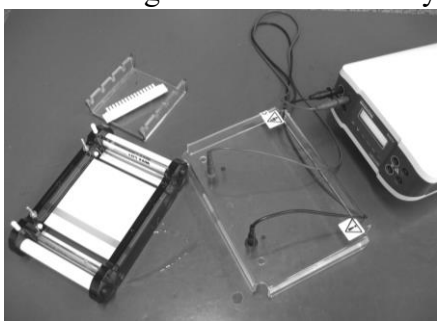
Využití PCR:

PCR má mnohostranné využití nejen v **základním výzkumu** (k izolaci genů nebo jejich částí, k přípravě značených sond, při sekvenování DNA) a **aplikovaném genetickém výzkumu** (k detekci mutací v genech, ke studiu polymorfizmu genů nebo v populační genetice), ale uplatňuje se i v **klinických disciplínách** (v prenatální diagnostice např. dědičných chorob, při detekci patogenních mikroorganizmů, k identifikaci onkogenů, ke stanovení pohlaví), v **archeologii**, **kriminalistice** (k identifikaci jedinců), v **soudním lékařství** (např. k určení paternity), v **potravinářském průmyslu** (k identifikaci falšování

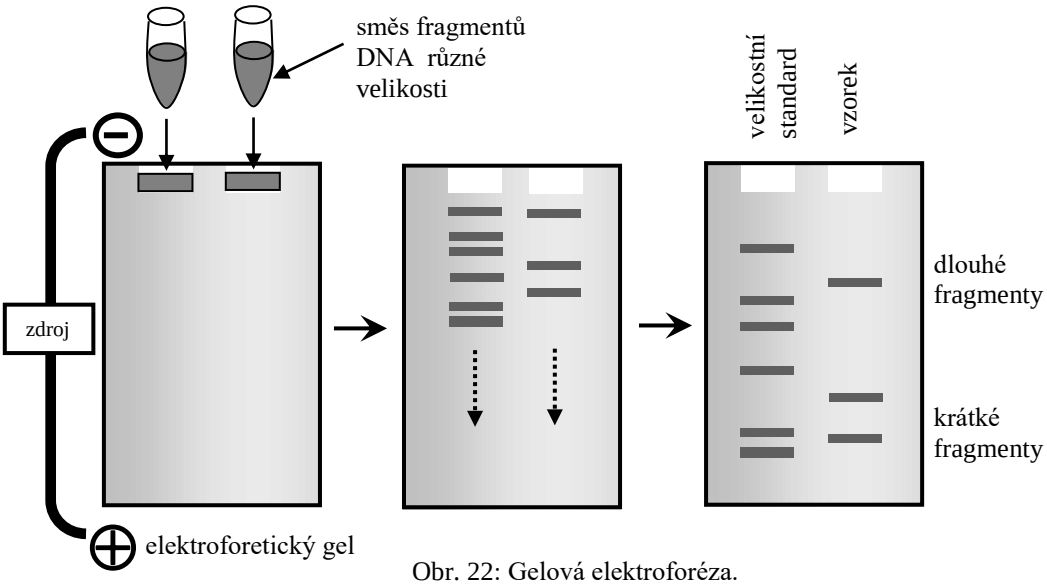
potravinářských výrobků) a v dalších vědních oborech (zoologie, botanika, mikrobiologie, parazitologie).



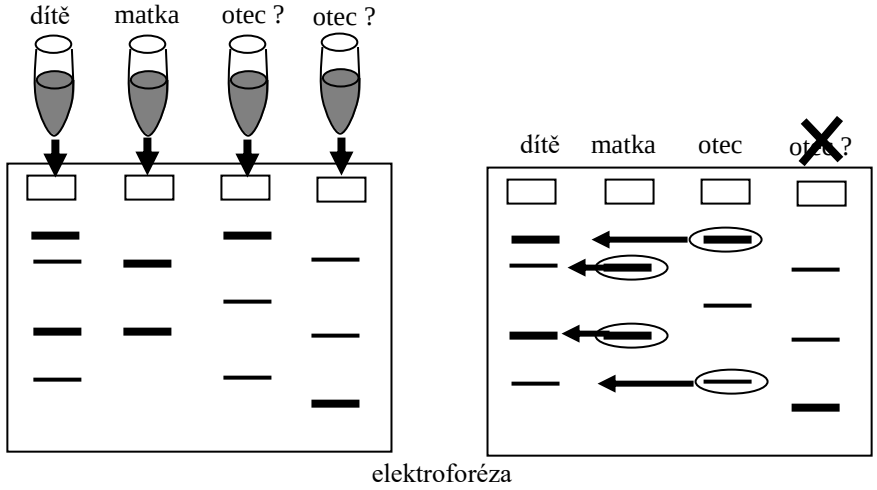
GELOVÁ ELEKTROFORÉZA patří k nejpoužívanějším separačním technikám sloužícím k izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Na tomto místě je vysvětleno použití gelové elektroforézy pro separaci různě dlouhých fragmentů DNA. Principem metody je **pohyb záporně nabitých molekul DNA** (hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabité fosfátové skupiny) **v elektrickém poli směrem k anodě**. Pomocí gelové elektroforézy můžeme separovat molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné **velikosti molekuly DNA**. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, nejčastěji v gelu tvořeném agarózou či polyakrylamidem (ve cvičení bude použita agaróza). Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry, jimiž se různě velké molekuly DNA pohybují různou rychlostí (velké fragmenty pomaleji, malé fragmenty rychleji). Agarózový gel se připravuje v různé hustotě (udávané v % práškové agarózy). Agaróza se rozpouští v pufru, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt (ve cvičení bude použit **TBE pufr** obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA). Vzorky se nanáší do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku. Zatížení DNA (klesne do jamky v gelu) a migrace DNA v gelu jsou zajištěny přidáním tzv. **nanášecího neboli vkládacího pufru**, který je tmavě zbarvený a je tak umožněna kontrola vložení PCR produktu do příslušné jamky a také migrace v gelu. Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. **velikostní marker** (hmotnostní standard, DNA ladder = žebřík) o definované velikosti jednotlivých fragmentů. Po proběhnutí elektroforézy je třeba separované fragmenty DNA zviditelnit. Pro vizualizaci DNA se používá značení barvivem, které se váže na DNA, např. ethidiumbromid nebo Midori Green (na cvičení bude použit Midori Green) a v UV záření v přístroji zvaném **UV transiluminátor** zviditelní fragmenty DNA. Pro detekci fragmentů DNA lze použít radioaktivní značení, nebo hybridizaci se značenou sondou (krátkým oligonukleotidem, který se komplementárně váže k hledané sekvenci). Rozdělené molekuly DNA lze také ve funkční formě izolovat z gelu.



RFLP (**restriction fragment length polymorphism**, **polymorfismus délky restrikčních fragmentů)** je metoda, jejíž podstatou je enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém restrikčním místě enzymem **restrikční endonukleázou**. Různé restrikční endonukleázy štěpí cílovou DNA v různých místech, v závislosti na sekvenci DNA. Po rozdělení vzniklých fragmentů pomocí gelové elektroforézy můžeme na základě velikosti a počtu fragmentů sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. polymorfizmy. Polymorfizmy v délkách restrikčních fragmentů jsou způsobeny přestavbami (např. inzercemi, delecemi a substitucemi bází) ve studované sekvenci, které způsobí změnu počtu restrikčních míst. Využití např. k určení pohlaví u ptáků nebo určení otcovství (test paternity).

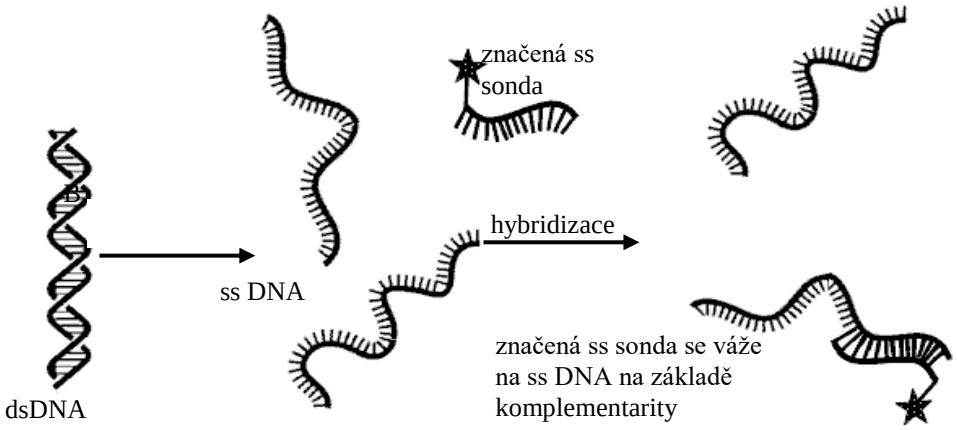


Obr. 22: Gelová elektroforéza.



Obr. 23: Určení otcovství na základě metody RFLP – DNA je izolovaná např. z buněk bukální sliznice a využita k amplifikaci specifické sekvence. Amplikon je následně rozštěpen enzymem a výsledné fragmenty jsou separovány gelovou elektroforézou. Výsledné fragmenty lze využít k vyloučení nebo potvrzení otcovství.

HYBRIDIZACE NUKLEOVÝCH KYSELIN je založena na specifickém spojení (**hybridizaci, renaturaci**) komplementárních nukleotidových sekvencí pocházejících z různých molekul NK. Základem hybridizace je obvykle značená **sonda** – krátký úsek DNA o známé nukleotidové sekvenci, s jejíž pomocí můžeme detekovat sekvenci k ní komplementární. Sonda může být značena fluorescenčně nebo radioaktivně. Nejčastěji bývá hybridizace prováděna na nosičích (viz Southernův přenos), ale je například možno hybridizovat NK i v intaktních buňkách (hybridizace *„in situ“*).



Obr. 24: Princip hybridizace DNA (ss – jednořetězcová, ds – dvouřetězcová).

Postup Southern blottingu (Southernův přenos) + hybridizace:

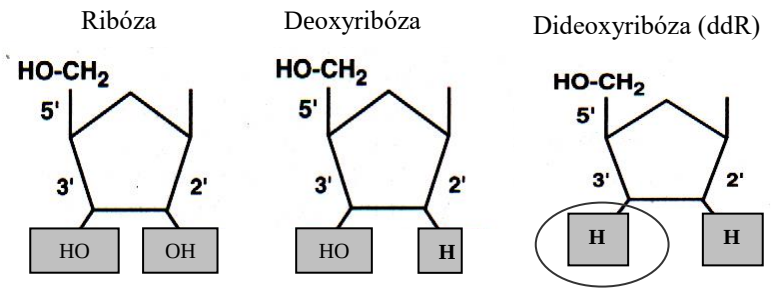
1. Příprava a značení sondy.
2. Rozdělení restrikčních fragmentů DNA daného vzorku gelovou elektroforézou.
3. Denaturace DNA a přenos jednořetězcových fragmentů DNA na nylonovou membránu = Southern blotting.
4. Inkubace membrány se značenou jednořetězcovou sondou → hybridizace (navázání) sondy s komplementární sekvencí DNA na membráně.
5. Odmytí nenavázané sondy.
6. Detekce navázané sondy = vizualizace (autoradiografie nebo stanovení fluorescence).

SEKVENOVÁNÍ DNA slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA (primární struktury). Sekvenování DNA je založeno na přípravě, separaci a detekci fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o 1 nukleotid. **Enzymová (Sangerova**, po Fredericku Sangerovi**) metoda** využívá modifikovanou PCR k syntéze kopií DNA, do nichž jsou začleňovány kromě deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) i dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP), které postrádají hydroxylovou skupinu na 3'-konci, na kterou by se mohl navázat další nukleotid v nově vznikajícím řetězci. Tyto ddNTP tedy slouží jako terminátory syntézy (viz obr. 25). Samotná syntéza DNA pomocí PCR se provádí odděleně ve čtyřech vzorcích, přičemž každý z nich obsahuje jiný dideoxynukleosidtrifosfát (A, T, G, nebo C).

Polymerázová řetězová reakce využívaná při sekvenování DNA má další specifika. Amplifikace produktu probíhá pomocí tzv. asymetrické PCR, která na rozdíl od „klasické" PCR využívá pouze jednoho primeru. Amplifikace PCR produktu tedy probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na který se tento primer specificky váže, a kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou.

Reakční směs:

- **templátová DNA**
- **1 primer** připojující se k místu na molekule DNA, od něhož chceme stanovovat sekvenci
- **4 typy normálních nukleotidů** v nadbytku (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **jeden typ ddNTP** v malém množství (v každém ze 4 vzorků je jiný)
- **DNA polymeráza**

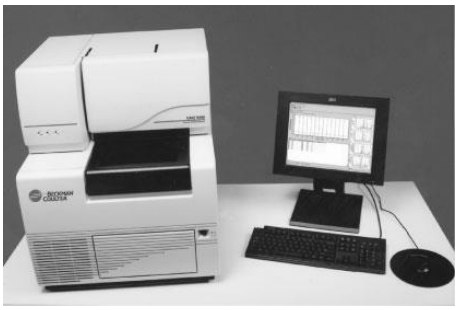


Obr. 25: Chemická struktura dideoxynukleosidtrifosfátu (ddNTP) a princip terminace syntézy nově vznikajícího řetězce DNA po začlenění dideoxynukleosidtrifosfátu do nově vznikajícího řetězce DNA.

Postup enzymového (Sangerova) sekvenování:

1. Příprava ssDNA jejíž sekvence má být stanovena.
2. Rozdělení do 4 vzorků, z nichž každý obsahuje jiný ddNTP
3. Reakce s DNA polymerázou, při níž se začlení do různých míst syntetizované DNA příslušný ddNTP obsažený ve směsi. V každém ze 4 vzorků vzniknou fragmenty, které jsou zakončeny jedním typem ddNTP (ddCTP, ddGTP, ddATP, nebo ddTTP).
4. Denaturace produktů
5. Elektroforetická separace umožňující oddělení fragmentů lišících se délkou o jednu bázi
6. Detekce fragmentů

Automatické sekvenování DNA je variantou enzymatického sekvenování DNA. Syntéza DNA probíhá v jedné PCR reakci (každý ddNTP je značen jinou fluorescenční značkou) a vzniklé produkty (různě dlouhé úseky jednořetězcové DNA) jsou tak označeny jinou fluorescenční značkou. K následnému stanovení sekvence DNA vzniklých PCR produktů se využívá genetický analyzátor – „**sekvenátor**“. Detekce těchto produktů probíhá během kapilární elektroforézy (=elektroforéza probíhá v tenké kapiláře naplněné gelem) pomocí laserového detektoru napojeného na počítač, který vyhodnocuje sekvenci.



Využití sekvenování DNA - sekvenování DNA má řadu aplikací ve vědě, medicíně a dalších oblastech. Sekvenují se celé genomy, případně jenom některé části, které mají pro daný obor význam. Ve **fylogenetice** představuje DNA sekvenování možnost studovat fylogenezi organizmů, kde se zpravidla sekvenuje DNA, která kóduje ribozomální RNA. **Antropologie** využívá srovnávání DNA ke zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA). Má využití rovněž ve **forenzních vědách** a v **kriminalistice** k testování paternity nebo například umožňuje stanovení viny či neviny v případě podezření z trestné činnosti. V **zemědělství** má možnost využití například při tvorbě geneticky modifikovaných plodin V **lékařství** slibuje sekvenování DNA například revoluci v diagnostice chorob a časnému zjištění náchylnosti jedince k určitým nemocem (rakovina, kardiovaskulární onemocnění) a v neposlední řadě také možnost využití v genové terapii.

Sekvenování příští generace (NGS, next-generation sequencing) je dalším stupněm vývoje sekvenačních metod. Tyto nejnovější metody jsou založeny na paralelizaci procesu sekvenování a produkci tisíců až milionů sekvencí současně a umožňují tak velmi rychlé a relativně levné sekvenování ve velkých objemech. Díky rychle klesajícím cenám a zvyšující se dostupnosti se tyto metody rychle prosazují nejen při studiu celých genomů

(tzv. celogenomové sekvenování) či jejich částí, ale také v rutinní DNA diagnostice v humánní medicíně, v cytogenetice aj.

GENOMIKA, BIOINFORMATIKA, BIOLOGICKÉ DATABÁZE A POČÍTAČOVÉ ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH DAT

Výše zmíněnými metodami automatického sekvenování DNA a sekvenování příští generace je dnes možno stanovit nukleotidové sekvence celých genomů. Komplexní analýzou genomů založenou na znalosti pořadí nukleotidů v DNA se zabývá obor **genomika**. V současné době je známa kompletní sekvence desítek genomů, a to nejen bakteriálních, ale i genomů vyšších organismů, např. kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mbp), drozofily (137 Mbp) a od roku 2000 je známá i nukleotidová sekvence lidského genomu (3 Gbp).

Genomové sekvence představují obrovský objem biologických dat, který nelze zpracovávat bez odpovídajícího počítačového vybavení. Pro účely přehledného uchovávání biologických dat, vyhledávání potřebných informací a jejich následné analýzy jsou využívány přístupy bioinformatiky. Termín bioinformatika se objevil poprvé v roce 1991, představuje spojení dvou technologií (oblast molekulární biologie a biotechnologií a oblast informačních technologií), u nichž došlo v posledních letech k explozivnímu růstu nových poznatků. Hlavní oblastí zájmu bioinformatiky je vyhledávání informací v databázích, srovnávání sekvencí nukleových kyselin a proteinů, vyhledávání genů, funkční genomika, klasifikace proteinů a proteomika, fylogenetické studie a srovnávací genomika.

Shromažďováním a správou dat, vývojem nástrojů pro jejich analýzu a poskytováním informací se ve světě zabývá několik institucí. Na internetových stránkách těchto institucí jsou veřejně přístupné biologické databáze, které obsahují rozsáhlé soubory dat (nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí), které jsou obvykle spojeny s počítačovým softwarem pro aktualizaci a vyhledávání dat.

Nejdůležitější databáze sekvencí nukleových kyselin a proteinů:

- **Databáze EMBL** byla zřízená v roce 1980 jako první databanka nukleotidových sekvencí Evropskou molekulárně biologickou laboratoří (EMBL - European Molecular Biology Laboratory) ve Velké Británii. Je veřejně přístupná na stránkách Evropského institutu pro bioinformatiku (**EBI** - European Bioinformatic Institute) http://www.ebi.ac.uk.
- **Databáze DDBJ** zahájila svojí činnost v roce 1984, shromažďuje data především z japonských výzkumů. Databáze je spravována Centrem informační biologie (**CIB** - Center for Information Biology, založen v roce 1995 jako oddělení Národního genetického institutu) v Japonsku a je veřejně přístupná na adrese http://www.ddbj.nig.ac.jp/.
- **GenBank** byla založena v roce 1992. Databázi nukleotidových sekvencí spravuje Národní centrum biotechnologických informací (**NCBI** - National Center for Biotechnology Information). Je přístupná na adrese http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.
- **Swiss-Prot** a **TrEMBL** je databáze zřízená v roce 1986 Švýcarským institutem pro bioinformatiku (SIB - Swiss Institute of Bioinformatics). Databáze obsahuje aminokyselinové sekvence proteinů a je přístupná na adrese http://www.expasy.org/sprot/.

Množství molekulárně-biologických dat se zvyšuje tak rychle, že je nezbytné mít k dispozici prostředky, pomocí kterých můžeme k těmto datům snadno přistupovat. Existují tři prostředky na získávání informací, které jsou vstupním bodem do několika (až 80) integrovaných databází: **Entrez** (vyvinut v NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/), **SRS** (Sequence Retrieval System, vyvinut v EBI, http://srs.ebi.ac.uk/)

a **DBGET/Link DB** (Integrated Database Retrieval System, vyvinut v Institutu pro chemický výzkum v Japonsku, http://www.genome.ad.jp/dbget/).

Nukleotidové sekvence můžeme pomocí počítačových analýz dále zpracovávat. Pomocí vhodného softwaru je možné identifikovat geny, jejich strukturu (exony a introny), nebo regulační oblasti (např. promotory, terminátory transkripce atd.). Na základě nalezených genů můžeme, opět s použitím vhodného softwaru, stanovit aminokyselinovou sekvenci proteinů kódovaných těmito geny a stanovit jejich základní charakteristiky (např. sekundární strukturu). Software vhodný k podobným analýzám je volně přístupný na Internetu např. na adresách http://www.ensembl.org nebo http://www.expasy.org.

Kromě výše zmíněné základní charakterizace lze také srovnávat nukleotidové sekvence různých buněk (organizmů, druhů atd.) mezi sebou, což je náplní **komparativní (srovnávací) genomiky.** Můžeme např. identifikovat rozdíly mezi genomy příbuzných druhů a určit tak jejich evoluční příbuznost (viz následující kapitola).

Kontrolní otázky – metody molekulární biologie

- Jaké znáš metody molekulární biologie?
- Jaký je princip izolace DNA?
- O co se zasloužili Kary Mullis a Frederick Sanger?
- Co je to PCR a jaký je její princip?
- Jaké jsou fáze PCR?
- Co vše je třeba pro PCR a v jakém přístroji probíhá?
- K čemu se PCR využívá?
- Co je to gelová elektroforéza a jaký je její princip?
- Co je to RFLP a jaký je její princip?
- K čemu se RFLP využívá?
- Jak funguje hybridizace a k čemu ji lze využít?
- Co je to sekvenování a jaký je jeho princip?
- Co vše je třeba pro sekvenování a v jakém přístroji probíhá?
- K čemu se sekvenování využívá?
- Jak se dá určit pohlaví ptáků pomocí metod molekulární biologie?
- Jak se dá určit otcovství pomocí metod molekulární biologie?

16. Buněčné a tkáňové kultury

Buňky, tkáně a dokonce i celé orgány (nebo části orgánů) mohou být udržovány (pěstovány) naživu mimo tělo v pufrovaném roztoku s živinami, tzn. za podmínek, jež věrně napodobují jejich fyziologickou situaci. V medicíně, biologii a příbuzných oborech se v souvislosti s pěstováním organizmů v umělých podmínkách ve zkumavkách či jiném laboratorním skle používá termín ***in vitro*** (z latiny „ve skle“). Naproti tomu termín ***in vivo*** (z latiny „v živém“) znamená výskyt organizmů (popř. jejich orgánů nebo jejich jednodušších složek a látek) v přirozených podmínkách (u složek či orgánů to znamená na/v živém organizmu). Prvotní tkáně používané pro založení kultur v laboratořích jsou často získávány ze zvířat, ale mohou být použity i lidské tkáně (např. krevní buňky, buňky z pupeční šňůry, placenty a chrupavek).

Využití: Metody buněčných a tkáňových kultur mají v dnešní době význam např. při vývoji a ověřování nových léků, při výrobě vakcín, v testech toxicity, v diagnostice, jsou používány ke kultivaci a dlouhodobým pasážím nitrobuněčných parazitů nebo virů nebo při genových manipulacích. Využití buněčných a tkáňových kultur tak velkou měrou přispívá i k omezování pokusů na zvířatech.

HISTORIE

- **Roux E.** (1885) jako první kultivoval embryonální kuřecí buňky v solném roztoku mimo tělo. Problémem byla dlouhodobá kultivace, aniž by došlo k bakteriální kontaminaci. Tento problém později vyřešila antibiotika.
- **Rous P.** a **Jones F.S.** (1916) používali proteolytický enzym trypsin k natrávení kousku tkáně. Takto dispergované buňky bylo možno opakovaně pasážovat - počátek studií moderních tkáňových kultur.
- **Eagle H.** (1955) definoval složení média potřebné ke kultivaci buněk (tzv. Eaglovo médium). Do té doby se používala nepřesně definovaná média složená např. z krevní plazmy a extraktů hovězích embryí.
- **Hayflick L.** a **Moorhead P.** (1961) prokázali, že lidské fibroblasty ve tkáňové kultuře po určitém počtu generací podléhají krizi a umírají (viz fázová křivka růstu buněk v tkáňových kulturách).
- **Wigler M.** a **Axel R.** (1977) vyvinuli metodu pro vnášení savčích genů do buněk v kultuře.

TKÁŇOVÉ KULTURY jsou tvořeny buňkami, které nejsou od sebe odděleny, a proto mohou na sebe navzájem působit, tak jako v organizmu. Tkáňové kultury tak nacházejí využití např. při kontrole účinků teratogenů a při testování kožní dráždivosti.

BUNĚČNÉ KULTURY jsou tvořeny izolovanými buňkami, které jsou pěstovány v kultivačních nádobách, kde rostou v jedné vrstvě (tzv. **monolayer)**. Modifikace metod tkáňových kultur umožňují pěstovat v kultuře celou řadu specializovaných buněk, nejpoužívanější jsou **fibroblasty** a **epiteliální buňky**. Buňky získané přímo z organizmu, jež jsou pěstovány v kultuře, jsou známy pod názvem **primární buněčné kultury**. Příležitostně se mohou tyto buňky spontánně přetransformovat do souvislých buněčných linií, jež jsou schopny přežít v podmínkách in vitro po mnoho let. Např. název buněčné linie HeLa je odvozen ze jména 31 leté Američanky Henrietty Lacksové, které byly odebrány buňky z nádoru děložního čípku v roce 1951. Ačkoliv buňky buněčné linie jsou si velmi podobné, často nejsou identické. Genetickou uniformitu buněčné linie lze zajistit klonováním buněk, kdy se z jedné izolované buňky vytvoří kolonie identických buněk, tzv. **klony**.

Příklady buněčných kultur:

Buněčná linie	Typ buněk	Původ	Způsob kultivace
Kc167	embryonální buňky	octomilka	adherentní
MDBK	epiteliální buňky	tur domácí	adherentní
MDCK	epiteliální buňky	pes	adherentní
Vero	epiteliální buňky	kočkodan	adherentní
HeLa	epiteliální buňky	člověk	suspenzní
BHK21	fibroblasty	křeček zlatý	suspenzní
SP2	plazmatické buňky	myš	suspenzní

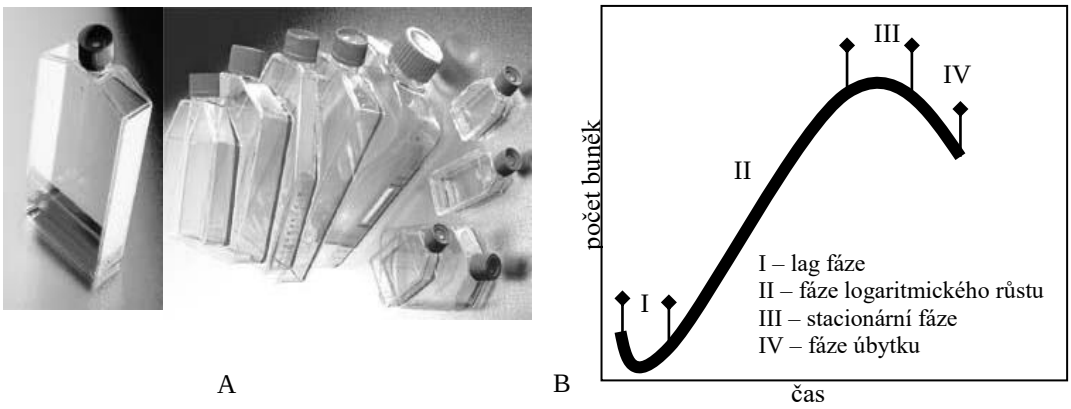
KULTIVAČNÍ NÁDOBY - buňky se kultivují ve skleněných či plastových lahvích označovaných jako „**Roux (čti "ru") láhve**“ v termostatu při optimální teplotě (37 °C).

KULTIVAČNÍ MÉDIUM poskytuje buňkám optimální prostředí a slouží jako zdroj živin pro jejich růst. Přidává se do kultivačních nádob a pravidelně se musí vyměňovat za nové. Média (MEM = minimální esenciální médium) obsahují definované množství **solí**, **glukózy**, **aminokyselin, vitaminů, inzulínu, transferinu**, **specifických růstových faktorů** a **bovinního fetálního séra.** K prevenci bakteriální kontaminace se do média přidávají **antibiotika** (penicilin, streptomycin). Většina buněčných linií roste dobře při **pH 7,4**, při poklesu pH na 6,5 přestanou růst a při pH pod 6,5 ztrácí životaschopnost. Jako indikátor pH v médiu se používá **fenolová červeň.** Při pH 7,4 je zbarvení média červené, při poklesu pH (spotřebování živin, nahromadění metabolitů) se barva mění do žluta a to je signál pro výměnu média za čerstvé.

Obr. 26: Inverzní mikroskop.

KULTIVACE BUNĚK A PASÁŽOVÁNÍ - při práci s buněčnými kulturami (výměna média, pasážování buněk atd.) je potřebné dodržovat pravidla sterilní manipulace (používání boxů a germicidních lamp). Růst buněk v kultivační nádobě je možné průběžně pozorovat prostřednictvím speciálního **inverzního mikroskopu**. Buňky rostou v určitých fázích, které znázorňuje tzv. **fázová křivka růstu**. Většina buněk roste v kultivačních nádobách až do doby, kdy dosáhne vysokého procenta **konfluence**, tj. stavu, kdy buňky zaplní povrch dna nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu, čímž dochází k tzv. **kontaktní inhibici**. V té době je potřebné přenést (**pasážovat**) buňky do nové kultivační nádoby. Necháme-li buněčnou kulturu růst do vysoké hustoty, selektují se buňky, které ztrácejí normální kontrolu růstu a nepodléhají kontaktní inhibici. Takovéto buněčné linie nazýváme **liniemi transformovanými**. Podle způsobu růstu v kultuře a odlišnému způsobu pasážování lze buňky dělit na adherentní a suspenzní:

- **Adherentní buňky** adherují (přichycují se) na dno kultivační lahve v důsledku sekrece proteinů extracelulární matrix, jako např. lamininu, fibronektinu, kolagenu. Při výměně média se slije staré médium a nahradí se čerstvým, při pasážování se k uvolnění buněk ze dna lahve používá proteolytický enzym trypsin nebo jiná proteáza.
- **Suspenzní buňky** jsou volně dispergované v médiu. Při výměně média nebo pasážování je potřebné oddělit médium od buněk odstředěním.



Obr. 26: A – plastové láhve pro kultivaci buněk, B – fázová křivka růstu buněk.

Kontrolní otázky – buněčné a tkáňové kultury

- V čem a za jakých podmínek se kultivují buňky in vitro?
- Jaký je rozdíl mezi pěstováním adherentních a suspenzních buněk?
- Jak se provádí pasážování buněk?
- Jaký průběh má růstová křivka buněk kultivovaných in vitro?
- Jaký mikroskop se používá k prohlížení buněčných kultur?

17. Nebuněčné formy života, elektronové mikroskopy

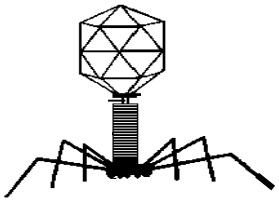
17.1. Nebuněčné formy života

Mezi nebuněčné formy života patří viry (nukleové kyselina a proteiny), viroidy, virusoidy (nukleové kyseliny) a priony (proteiny).

VIRY jsou submikroskopické částice, jejichž velikost se pohybuje v desítkách až stovkách nanometrů. Genom u nejmenších virů je tvořen 3 500 nukleotidy (RNA-bakteriofág R17) a 3 strukturními geny kódující protein kapsidy, protein pro absorpci viru na hostitelskou buňku a specifickou RNA-polymerázu. Největším nově objeveným virem je Mimivirus z čeledi Mimiviridae (virus „napodobuje“ bakterie), který byl zjištěn uvnitř buněk měňavky, měří 400 nm, jeho genetický kód se skládá z 800 000 nukleotidů a obsahuje až 900 genů.

Virion je jednotlivá částice (partikule), schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní. Je složen z **nukleokapsidu**, tj. **nukleové kyseliny** (NK), a to buď deoxyribonukleové (DNA), nebo ribonukleové (RNA) a z **kapsidy**, což je proteinový obal složený z proteinových molekul (kapsomer).

Obalené viry při zrání (maturaci) získávají membránový obal, který je odvozen z plazmatické nebo jaderné membrány (nebo z obou) hostitelské buňky, která je virem modifikována. Na povrchu obalu mohou být z glykoproteinů vytvořeny ostré výčnělky, tzv. hroty (peplomery), které udílí viru antigenní vlastnosti a jsou pro určité viry specifické.



Bakteriofág (zkráceně **fág,** „požírač bakterií“) je virus infikující bakterie. Proteinová kapsida je složená z hlavičky obsahující nukleovou kyselinu (DNA, RNA) a z bičíku, ze kterého vyrůstají bičíková vlákna, která slouží k přichycení. Tyto viry mohou lyzovat napadené bakterie a lze je tak využít k antibakteriální léčbě. Po infekci bakterie může bakteriofág přejít do latentního (lyzogenního) stavu, kdy se začlení do genetické informace buňky ve formě tzv. **profága.** Teprve při „stresu“ bakteriální buňky se virus aktivuje, začne se replikovat a buňku zlyzuje. Byly popsány i případy, kdy se kmeny bakterií se začleněnou virovou DNA stanou vysoce patogenními původci onemocnění.

Pro taxonomii a systematiku virů jsou důležité tyto znaky:

1) **rozměry a morfologie virionu**
2) **přítomnost (nepřítomnost) povrchového obalu:** obalené a neobalené viry
3) **typ a molekulární stavba genomové NK:**
   - typ NK: RNA-viry, DNA-viry
   - počet a tvar řetězců NK: ssRNA - jednořetězcová (z angl. single stranded), dsRNA - dvouřetězcová (z angl. double stranded), ssDNA, dsDNA, lineární (většinou) nebo kružnicová NK
   - polarita řetězce NK: (+)RNA (plus RNA, pozitivní RNA, stejná polarita jako mRNA), (-)RNA (minus RNA, negativní RNA), (+)DNA, (-)DNA.
4) **znaky proteinů kapsidu:** symetrie helikální (šroubovicová), ikozahedrální (dvacetistěnová), komplexní, binární (u bakteriofágů; hlavička obsahující NK má

ikozahedrální symetrií, dutý bičík sloužící ke vstřikování NK do hostitelské buňky má symetrii helikální)

5) **okruh hostitelů a afinita k jejich tkáním:**
   - okruh hostitelů: živočišné viry - viry obratlovců (včetně člověka) a viry bezobratlých (nejčastěji hmyzu), rostlinné viry, viry hub, řas a prvoků, viry bakterií (bakteriofágy, fágy) a viry fototrofních bakterií (cyanofágy)
   - afinita k tkáním: viry respirační, enterální, sexuálně přenosné, hepatické

Viry jsou zařazeny do řádů s koncovkou **virales**, čeledí s koncovkou **viridae,** podčeledí s koncovkou **virinae** a dále rozlišujeme rody, druhy a varianty.

Některá virová onemocnění:

Rostliny: mozaiková choroba tabáku, brambor, rajčat.

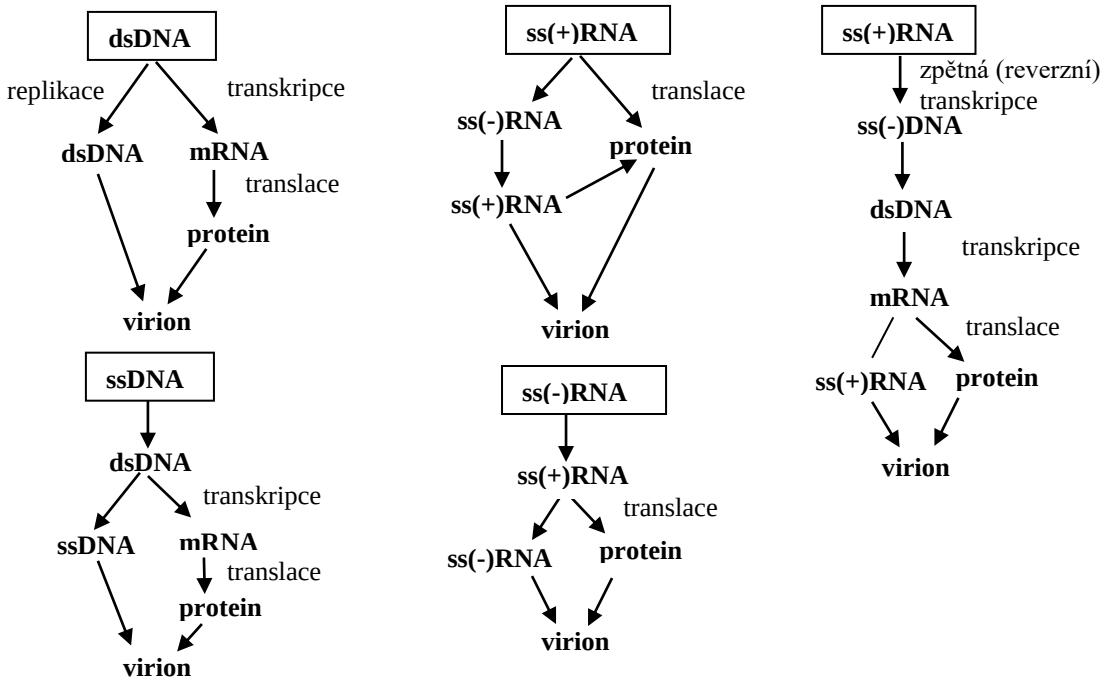
Zvířata: slintavka a kulhavka sudokopytníků, vzteklina, myxomatóza králíků, mor drůbeže.

Člověk: dětská obrna, lidská hepatitida A (Picornaviridae), neštovice (Poxviridae), opary, infekční mononukleóza (Herpesviridae), spalničky, příušnice (Paramyxoviridae), chřipka (Orthomyxoviridae), klíšťová encefalitida, lidská hepatitida C, žlutá zimnice (Flaviviridae, lat. flavus = žlutý), zarděnky (Togaviridae), AIDS (Retroviridae).

Reprodukce virů v hostitelských buňkách:

LYTICKÝ CYKLUS probíhá v 7 krocích:

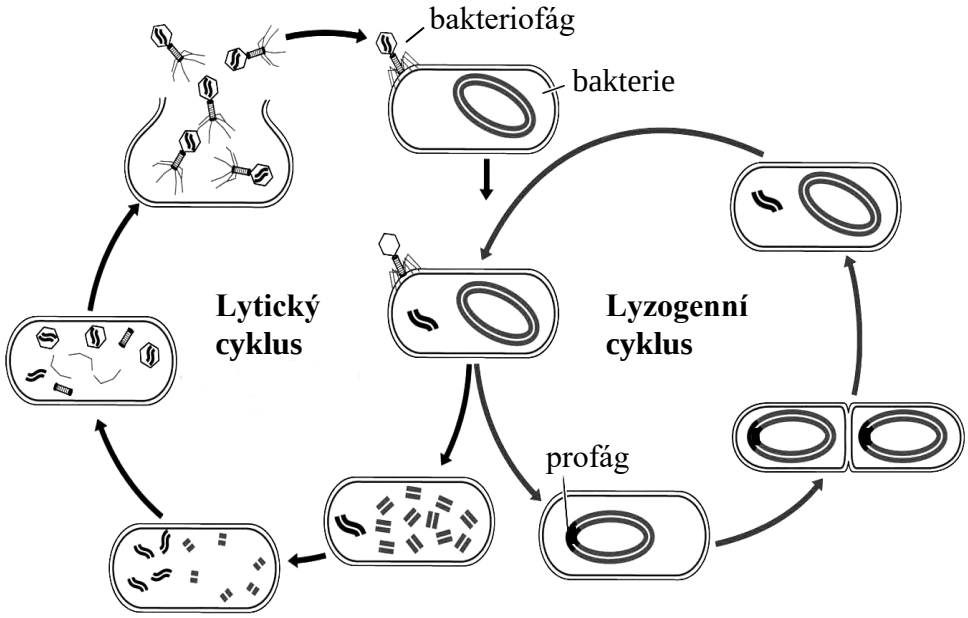
1. **vazba virionu na povrch buňky:** pomocí specifického receptoru
2. **proniknutí (penetrace) do buňky:** celý virion proniká do buňky pinocytózou (živočišné a rostlinné viry), nebo je do buňky vstříknuta pouze NK (u bakteriofágů), u obalených virů splývá jejich vnější obal s plazmatickou membránou buňky a do cytoplazmy se dostává nukleokapsid
3. **uvolnění NK z kapsidy:** enzymatickým rozložením
4. **replikace virové NK a genová exprese:** liší se v závislosti na typu NK:
   - **ds(+/-)DNA** (u bakteriofágů a živočišných virů) - DNA se replikuje a přepisuje do virové mRNA, podle které jsou syntetizovány proteiny
   - **ss(+)DNA** - nejdříve se nasyntetizuje komplementární řetězec DNA, další průběh jako u dsDNA
   - **ds(+/-)RNA** - k syntéze proteinů slouží jen jedno ze dvou vláken
   - **ss(+)RNA** (u bakteriofágů, živočišných a rostlinných virů) - může přímo sloužit jako mRNA pro syntézu proteinů, jinak dochází k nasyntetizování komplementární (-)RNA, která je matricí pro replikaci (+)RNA, která slouží jako mRNA pro syntézu proteinů nových virionů
   - **ss(+)RNA se zpětnou transkripci** (u živočišných virů - retrovirů), (+)RNA se přepisuje v komplementární ss(-)DNA, podle níž je dosyntetizována komplementární (+)DNA za vzniku ds(+/-)DNA. Oba procesy katalyzuje virová polymeráza **reverzní transkriptáza**. Dvouřetězcová DNA se začlení do genomu buňky jako **provirus**, odkud je přepisována do (+)RNA, která slouží k syntéze proteinů nových virionů.
   - **ss(-)RNA** (u bakteriofágů) - nejdříve probíhá syntéza komplementární (+)RNA s následnou tvorbou proteinů, podle (+)RNA se nasyntetizuje (-)RNA, která je součástí nových virionů.
5. **syntéza virových proteinů:** probíhá v cytoplazmě (na ribozomech) hostitelské buňky
6. **zrání (maturace) virionů:** spojování NK s kapsidem
7. **uvolnění virionů z buňky:** exocytózou nebo rozpadem (lýzou) buňky



Obr. 28: Schéma rozdílů genové exprese u různých virů v závislosti na typu jejich nukleové kyseliny.

VIROGENNÍ CYKLUS u živočišných virů (zejména virů čeledi Retroviridae – např. virus HIV) spočívá v začlenění virové NK (DNA) do genomu hostitelské buňky jako tzv. **provirus.** Provirus může být přenášen z rodičů na potomky, aniž by se infekce projevila. Spontánně nebo účinkem indukčních činitelů (UV paprsky, peroxidy atd.) se provirus vyčlení z chromozomu, a tím je spuštěn lytický cyklus. Virogenní cyklus **onkogenních virů** může vést i k nádorové transformaci hostitelské buňky.

LYZOGENNÍ CYKLUS (např. u bakteriofágů) je obdobou virogenního cyklu. Do genomu bakterií je začleňována virová NK jako tzv. **profág**.



Obr. 29: Lytický a lyzogenní cyklus u bakteriofágů.

VIROIDY jsou malé infekční cirkulární molekuly RNA bez proteinového obalu. Předpokládá se, že vznikají cirkularizací intronů genů svých eukaryotických hostitelů uvolněných posttranskripčním sestřihem. Nekódují žádný protein, replikují se v jádře buňky pomocí jaderných RNA polymeráz. Vyvolávají onemocnění kulturních rostlin (např. vřetenovitost brambor, onemocnění kokosových palem), která jsou obvykle vázána na určitou lokalitu (první viroidová onemocnění byla objevena až ve 20. století).

SATELITY (VIRUSOIDY) jsou samostatné krátké molekuly nukleových kyselin (DNA či RNA), které vyvolávají onemocnění u rostlin. Byly objeveny teprve roku 1981. Nemohou se replikovat nezávisle, ale vyžadují pomocný virus, v jehož kapsomeře jsou uzavřeny (jsou tedy jakýmisi „parazity jiných virů“). Nekódují žádný protein, replikují se v cytoplazmě.

PRIONY jsou infekční proteiny (bez NK) kódované strukturními geny hostitelského organizmu. Vznikají konformační změnou prionového proteinu $\mathbf{PrP^{C}}$ s prostorovou strukturou α-helix (šroubovice) na $\mathbf{PrP^{Sc}}$ s β-strukturou (složeného listu). Priony jsou původci přenosných spongiformních (houbovitý vzhled degenerované tkáně centrální nervové soustavy) encefalopatií. U lidí je to např. Creutzfeldtova-Jakobova choroba a kuru, u zvířat klusavka ovcí a koz (scrapie), bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, "nemoc šílených krav") a felinní spongiformní encefalopatie (FSE).

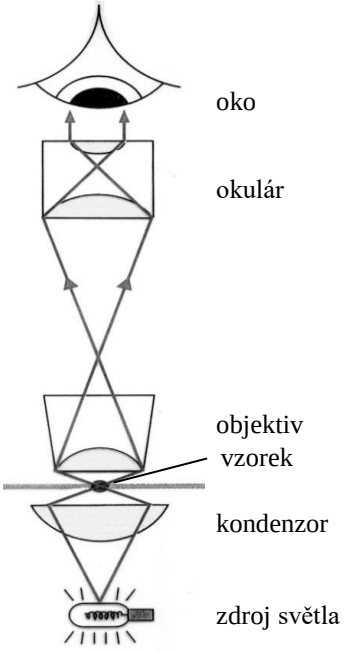
17.2. Elektronové mikroskopy

Některé objekty jako např. viry jsou tak malé, že je nelze pozorovat ani nejvýkonnějším optickým mikroskopem s nejlepšími skleněnými čočkami, což zjistil již v 19. století německý fyzik **Ernst Abbe**. Rozlišovací schopnost optického mikroskopu je totiž omezena vlnovou délkou viditelného světla (400-700 nm). A protože vlnovou délku pro nás viditelného světla neumíme zkrátit, bylo třeba pro posunutí hranice rozlišovací schopnosti mikroskopu najít jiné "světlo" s výrazně kratší vlnovou délkou. A tady začíná příběh elektronového mikroskopu, který byl zkonstruován ve 20. století a umožnil odhalit do té doby skrytá tajemství hmoty. Cesta k jeho sestrojení byla podmíněna technologickým pokrokem a sestávala z postupného propojování objevů mnoha badatelů. Důležitý byl objev elektronu anglickým fyzikem **J. J. Thompsonem** v roce 1897. Dalším krokem vedoucím k použití elektronů k zobrazení mikrosvěta byl poznatek, který v roce 1925 publikoval **Louis de Broglie**, že rychle letící elektrony se chovají nejen jako částice, ale mají i vlnový charakter podobně jako viditelné světlo. Protože elektron jako záporně nabitá částice ochotně přispěchá k čemukoliv kladně nabitému, je možné mu tímto způsobem udělit určitou rychlost, které odpovídá konkrétní vlnová délka. Navíc je možné dráhu letícího elektronu ovlivnit silným magnetickým polem podobným způsobem, jako je tomu při průchodu světla optickými čočkami. Tím byla nalezena cesta k novému "světlu" vhodnému pro zkoumání mikrosvěta. Postupně byly sestrojeny dva typy elektronových mikroskopů (transmisní a rastrovací), které využívají urychlené elektrony, a které posunuly hranici rozlišovací schopnosti do rozměru desetin nanometru, tj. na úroveň velikosti atomů. První transmisní elektronový mikroskop sestrojili v roce 1931 němečtí vědci **Max Knoll** a **Ernst Ruska**. Teprve v roce 1986 dostal Ernst Ruska za konstrukci transmisního elektronového mikroskopu Nobelovu cenu. Rastrovací elektronový mikroskop se na trhu objevil až v roce 1965.

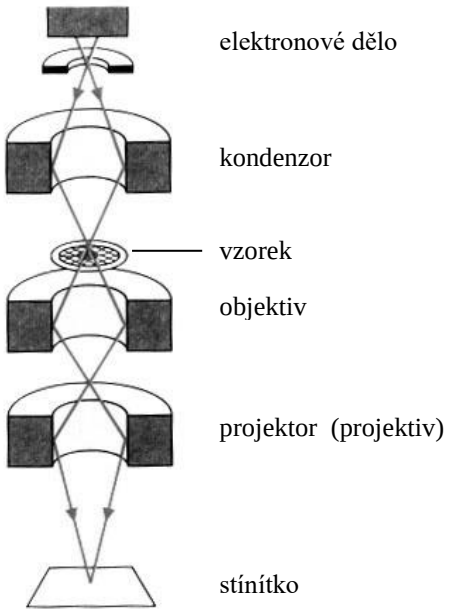
O rozvoj elektronové mikroskopie se zasloužil i český vědec **Armin Delong** (brněnský profesor, rodák z Bartovic u Ostravy), který uvedl první elektronový mikroskop do výroby už v roce 1949. V roce 2005 mu byla udělena Národní cena vlády České republiky Česká hlava.

Elektronové mikroskopy mohou dosahovat až **1 000 000**× násobného zvětšení a jejich rozlišovací schopnost se pohybuje na hranici **2** – **20 nm**, čímž umožňují pozorovat např. viry, které mají průměrnou velikost kolem 50 nm (do tečky za touto větou by se vešly stovky tisíc virů). V elektronovém mikroskopu se místo světelných paprsků pohybují elektrony (od toho název elektronový mikroskop), jejichž průchod mikroskopem je ovlivňován ne skleněnými, ale ektromagnetickými čočkami.

TRANSMISNÍ (PROZAŘOVACÍ) ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP (TEM) je zařízení, které se vejde do menší místnosti. Jeho nejnápadnější částí je tubus (asi metr dlouhá svislá dutá trubice), kterým procházejí elektrony. Ty jsou v horní části tubusu uvolňovány elektronovým dělem (nejčastěji rozžhavené wolframové vlákno - katoda), jehož pracovní teplota je okolo 2500 °C. Aby vlákno neshořelo, musí být prostor elektronového děla zbaven vzduchu. Stejně tak musí být vzduch vyčerpán i z ostatních prostorů, kterými elektrony na své pouti tubusem procházejí. Uvolněné elektrony jsou urychleny působením kladně nabité anody a získají rychlost (až polovinu rychlosti světla), která je nezbytná k prolétnutí celým tubusem. Zhruba v jeho polovině jim stojí v cestě vzorek, jímž musí proniknout. Elektrony, které jsou vzorkem zachyceny, nedopadnou a nerozzáří stínítko na dně tubusu, čímž vzniknou stíny vytvářející mnohonásobně zvětšený obraz vzorku. Průchod elektronového paprsku tubusem je ovlivňován elektromagnetickými čočkami. V horní části tubusu se nachází kondenzorové čočky, řídící sílu a průměr elektronového svazku. Pod vzorkem je umístěn objektiv (nejvýkonnější čočka), který zaostřuje svazek elektronů na vzorek a zvětšuje obraz asi 50×. O zvětšování obrazu na požadovanou hodnotu se postarají další čočky (projektor resp. projektiv) umístěné pod objektivem. Ke zviditelnění obrazu neseného elektrony slouží stínítko na dně tubusu. Je tvořeno fluorescenční látkou, která se po dopadu elektronů rozzáří v závislosti na množství a energii dopadajících elektronů. Obraz, který na něm elektrony vytvoří, je možné pozorovat mikroskopem, zaznamenat na fotografický materiál uložený pod stínítkem nebo pomocí speciální CCD kamery (Charge Coupled Device – nábojově vázaný prvek) jej přenést do počítače v digitalizované podobě.



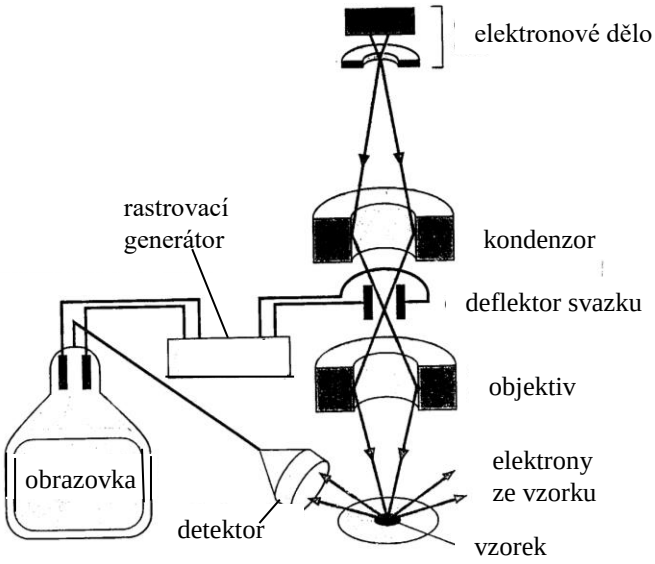
Obr. 30: Směr pohybu světelných paprsků ve světelném mikroskopu.



Obr. 31: Směr pohybu elektronů v elektronovém mikroskopu (TEM).

Velké požadavky jsou kladeny na vzorek, který nesmí obsahovat vodu, protože by se v prostoru zbaveném vzduchu vypařovala. Tloušťka vzorku by se měla pohybovat do 100 nanometrů, tak aby jím mohly elektrony procházet. Vzorek o velikosti 1 × 1 mm se zaleje do speciální pryskyřice a po vytvrzení se ze vzniklého bločku na ultramikrotonu odkrajují ultratenké řezy, které se pak pokrývají tenkou vrstvou těžkého kovu nebo jeho oxidu. Obraz pořízený v elektronovém mikroskopu je černobílý, ale pomocí počítačového programu je možné získat i barevný obraz dle vlastního výběru.

RASTROVACÍ (SKENOVACÍ) ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP (SEM) získal své jméno na základě skutečnosti, že elektronový svazek jako velmi jemný hrot přejíždí po povrchu vzorku a skenuje ho. Svazek se pohybuje v řádcích podobně jako při zapisování signálu na televizní obrazovce. Při dopadu elektronů jsou z povrchu vzorku vyraženy sekundární elektrony, které jsou zachyceny detektorem. Povrch vzorku je nutné upravit podobně jako u transmisního mikroskopu. Tento typ mikroskopu je oblíbeným nástrojem pro pozorování mikrosvěta díky schopnosti poskytnout velmi plastický obraz s vysokou hloubkou ostrosti (**trojrozměrný obraz**) i z tak členitých objektů, jakými je např. hmyz.



Obr. 32: Směr pohybu elektronů v elektronovém mikroskopu (SEM).

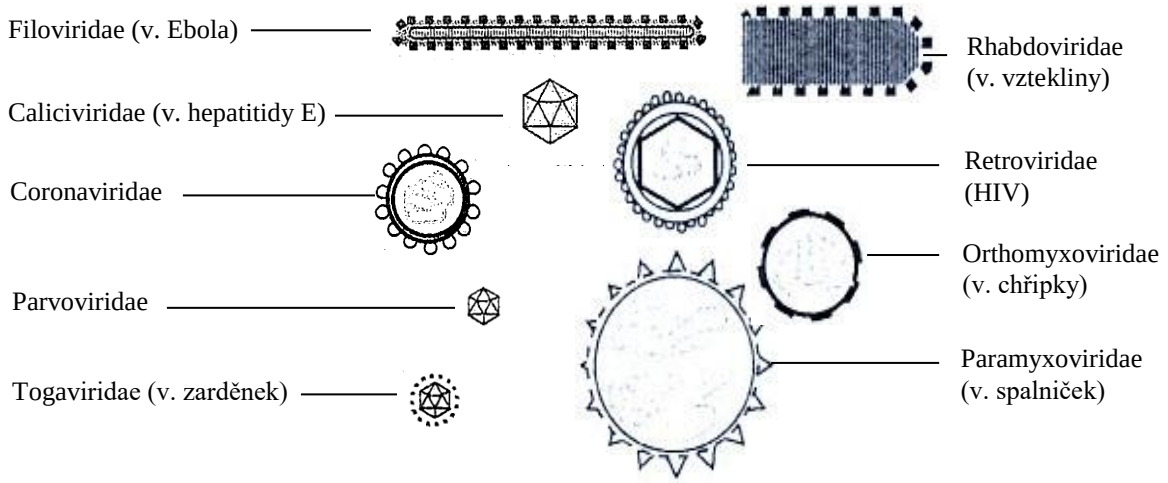
Mezi světelnými a elektronovými mikroskopy jsou určité analogie a určité rozdíly:

Světelné mikroskopy – využívají jako zdroj zobrazení světlo, světelný paprsek se pohybuje optickou soustavou mikroskopu, kterou tvoří skleněné čočky, rozlišovací schopnost je 0,2 μm, zvětšení max. 1000×, výhodou je, že lze pozorovat i nativní preparáty bez složité úpravy nebo fixace, pozorovaný obraz může být barevný.

Elektronové mikroskopy – využívají jako zdroj zobrazení elektrony, jejichž proud je usměrňován elektromagnety, rozlišovací schopnost je 2 – 20 nm, zvětšení max. 1 000 000×, nevýhodou je vysoká cena elektronových mikroskopů, složitá úprava vzorků, nutnost fixace a nemožnost pozorovat živé objekty, obraz pořízený z mikroskopu je černobílý, výhodou je možnost pořízení trojrozměrného obrazu (pomoci SEM).

Příklady virů:

Filovirus (filum = vlákno), kalicivirus (calyx = kalich), coronavirus (corona = koruna, věnec), parvovirus (parvus = malý), toga (toga = plášť, obal).



Kontrolní otázky – nebuněčné formy života

- Co patří mezi nebuněčné formy života?
- Jaké je chemické složení virů, prionů, viroidů a virusoidů?
- Znáš příklady virového a prionového onemocnění?
- Jaká je velikost virů?
- Jak probíhá reprodukce virů v buňce?
- Jaký je rozdíl mezi lytickým a lyzogenním cyklem?
- Jak probíhá genová exprese u virů v závislosti na typu nukleové kyseliny?
- Jaké jsou dva typy elektronových mikroskopů?
- Jaký je rozdíl mezi světelným a elektronovým mikroskopem?
- Jaký je rozdíl mezi transmisním a rastrovacím elektronovým mikroskopem?
- Jaké je zvětšení a rozlišovací schopnost elektronových mikroskopů?
- Jak je třeba upravit vzorek před pozorováním v el. mikroskopu?

18. Fyzikální a chemické vlivy vnějšího prostředí

FYZIKÁLNÍ VLIVY

Teplota - vysoké teploty způsobují denaturaci proteinů, naopak teploty pod bodem mrazu způsobují krystalizaci vody v buňce spojenou s jejím mechanickým poškozením.

Fotodynamie je jev, který vyvolávají některé látky, tzv. **fotodynamická barviva** (fagopyrin, hypericin obsažen v třezalce, eosin, akridin, fluorescein, porfyriny, chlorofyl), která způsobí zcitlivění organizmu na světlo. Vzniklá nemoc ze světla (např. fagopyrizmus skotu po zkrmení pohanky), může mít i letální následky. Princip fotodynamie spočívá v tom, že látky s fotodynamickým účinkem jsou barevné, nebo jsou v organizmu metabolizovány za vzniku barevných derivátů nebo metabolitů. Světlo je v povrchových tkáních organizmu absorbováno v relativně silné vrstvě a při běžných intenzitách záření je teplo produkované při absorpci fotonů v oblasti viditelného nebo ultrafialového spektra odváděno bez významnějšího patologického vlivu na tkáně. Je-li ovšem podkožní tkáň prostoupena barvivem, dochází k pohlcení tohoto záření v relativně slabé vrstvě, která se silně přehřívá. Tkáň reaguje uvolněním látek charakteristických pro zánět (histamin, bradykinin aj.), což se projeví lokálním zánětem. Při ozáření celého těla dochází k ataku na centrální nervový systém, což se projeví vznikem křečí, narušením celkového zdravotního stavu a následnou smrtí.

UV záření usmrcuje buňky velmi rychle (využití při sterilizaci). Největší účinek má záření o vlnové délce 260 nm, které je specificky absorbováno nukleovými kyselinami a způsobuje vznik tyminových dimerů a následné znemožnění replikace a transkripce.

Ionizující záření - účinek záření závisí na množství ionizací, vyvolaných podél stopy paprsku. Čím větší je rychlost částice, tím menší je množství vzniklých iontů. Částice α, které mají malou rychlost, vyvolávají velké množství ionizace podél krátké dráhy a mají tedy na buňku velký efekt. Paprsky γ, které pronikají organizmem větší rychlostí, poškozují menší počet buněk, ale zasahují i hluboko uložené tkáně. Hlavním mechanizmem účinku ionizujícího záření je tvorba velmi reaktivních volných radikálů (především H^+ a OH^-).

CHEMICKÉ VLIVY

Jedy (toxiny) jsou chemické látky, které způsobují porušení funkcí buňky nebo její smrt. Toxiny mohou působit na několika úrovních: **syntéza biopolymerů** (narušení syntézy buněčné stěny bakterií účinkem antibiotik - penicilinu, toxický účinek pro bakterie ne pro eukaryota), **transportní funkce buněčných membrán** (porušení soudržnosti membrán účinkem fosfolipáz včelího a hadího jedu nebo účinkem povrchově aktivních látek jako jsou saponiny, detergenty), **energetický metabolizmus** (poruchy syntézy ATP účinkem kyanidů a barbiturátů), **buněčný cyklus** (zastavení mitózy účinkem mitotického jedu kolchicinu).

Oligodynamie je schopnost některých poměrně stálých kovů (Au, Ag, Zn, Hg, Cu) emitovat ve vodním prostředí ionty, přestože tyto látky mohou být ve vodě nerozpustné. Tyto ionty nepříznivě ovlivňují jednobuněčné organizmy (např. nálevníky).

Fytoncidy jsou těkavé látky, které se vyskytují u vyšších aromatických rostlin (cibule, česnek, křen atd.) a mají antibakteriální, antimykotické a antivirové účinky. Např. v cibuli jsou obsaženy fytoncidy alliin a allicin. Velmi citlivými k fytoncidům jsou prvoci v senném nálevu a některý hmyz.

BUNĚČNÝ STRES je negativní působení vnějších faktorů na buňku.

STRESOVÉ FAKTORY (STRESORY) mohou být fyzikální, chemické nebo biologické, porušující životní procesy v buňkách.

Působení stresorů:

- **specifické -** ovlivnění pouze některé struktury či funkce buňky např. enzymové jedy blokují aktivitu některého enzymu, mikrotubulární toxiny zabrání vazbou na tubulin jeho polymerizaci v mikrotubuly atd.
- **nespecifické** - např. denaturace všech proteinů při teplotě nad 100 ^{o}C, účinkem těžkých kovů, kyselin, aldehydů a dalších chemických látek

Účinek stresorů:

- **cytocidní** – zánik buňky, tzv. nekróza
- **cytostatický** – zastavení buněčného cyklu
- **mitoklastický** – narušení průběhu mitózy
- **genotoxický (mutagenní)** – změna genetické informace

STRESOVÉ PROTEINY jsou proteiny syntetizované buňkou jako obranná reakce proti stresu. Některé **proteiny tepelného šoku** např. HSP60 (heat shock protein o velikost 60 kD) u *Escherichia coli* chrání buněčné proteiny před poškozením (denaturací) při zvýšené teplotě.

Kontrolní otázky – vlivy vnějšího prostředí

- Co patří mezi stresory?
- Jaký může být účinek stresorů?
- Co je to fotodynamie?
- Co patří mezi fotodynamická barviva a jaký je jejich účinek?
- Jaký je účinek ionizující záření na varle potkana?
- Co je to oligodynamie?
- Co jsou to fytoncidy a jaký je jejich účinek?

19. Genetika

19.1. Mendelismus, monohybridismus

GEN je úsek DNA nesoucí dědičnou informaci pro tvorbu proteinů (gen strukturní) nebo tvorbu tRNA a rRNA.

ALELA je konkrétní forma genu.

LOKUS je místo na **chromozomu**, kde je lokalizován určitý gen. Místa uložení genů v buňce jsou **genofory** (jaderné chromozomy, mitochondriální a chloroplastové chromozomy, plazmidy).

GENOM je soubor veškeré DNA v jádře (příp. v mitochondriích – mitochondriální genom a v chloroplastech – chloroplastový genom).

GENOTYP je soubor všech alel (forem genů) organizmu.

FENOTYP je soubor všech pozorovatelných vlastností (znaků) organizmu.

HOMOZYGOT je organizmus, jehož obě alely zkoumaného genu jsou stejné. Může být dominantní (dvě dominantní alely) nebo recesivní (dvě recesivní alely).

HETEROZYGOT je organizmus, jehož obě alely zkoumaného genu jsou navzájem různé.

P GENERACE (parentální) je rodičovská generace s odlišnými homozygotními genotypy (dominantní a recesivní).

F_1 GENERACE (první filiální) je první generace potomků, vzniká křížením (hybridizací) dvou jedinců z P generace za vzniku heterozygotů.

F_2 GENERACE (druhá filiální) je druhá generace potomků, vzniká křížením dvou jedinců z F1 generace.

B_1 GENERACE je první generace zpětného křížení (back crossing), křížení homozygotního rodiče a heterozygota.

ÚPLNÁ DOMINANCE platí, jestliže dominantní alela přítomná v homozygotní nebo heterozygotní sestavě má stejný fenotypový projev.

NEÚPLNÁ DOMINANCE (semidominance) má rozdílný projev dominantní alely v homozygotní a heterozygotní sestavě.

MONOHYBRIDIZMUS je sledování dědičnosti jednoho kvalitativního znaku.

MENDELOVA PRAVIDLA (ZÁKONY)

1. uniformita hybridů F_1 generace (heterozygoti)
2. identita reciprokých křížení
3. čistota vloh a jejich štěpení (princip segregace vloh)
4. vzájemná volná kombinovatelnost vloh

Platí za podmínek, že se jedná o **monogenní dědičnost** (1 znak je kódován 1 genem), **autozomální dědičnost** (geny leží na autozomech) a **každý gen je na jiném chromozomu**.

CHÍ KVADRÁT TEST (χ^2 test) je statistická metoda, která se používá pro stanovení významnosti nalezené odchylky mezi skutečně získanými (empirickými) a očekávanými (teoretickými) údaji **pro podíly z celku**. V genetice se používá pro ověřování štěpných poměrů.

$$\chi^2_{(N)} = \Sigma \frac{(x_i - e_i)^2}{e_i}$$

x_i….získaná (empirická) hodnota
e_i …očekávaná (teoretická) hodnota
N….počet stupňů volnosti (počet tříd štěpných poměrů zmenšený o jednu třídu)

Vypočtenou hodnotu porovnáme s tabulkovou hodnotou pro N stupňů volnosti na hladině významnosti $\alpha = 0{,}05$ (příloha 1). Jestliže je vypočtená hodnota χ^2 menší než tabulková, pak rozdíl mezi získanými a očekávanými údaji není statisticky významný a můžeme říci, že se sledovaný znak vyštěpil v očekávaném poměru.

Kontrolní otázky – monohybridizmus

- Co znamenají pojmy gen, genom, genotyp, lokus?
- Jaký je rozdíl mezi pojmy znak a fenotyp? Uveď příklad.
- Co znamenají pojmy homozygot a heterozygot (uveď příklady)?
- Co je to P generace?
- Co je to F1 generace a jak vzniká?
- Co je to F2 generace a jak vzniká?
- Jaký je fenotypový štěpný poměr v F2 generaci při úplné dominanci?
- Jaký je fenotypový štěpný poměr v F2 generaci při neúplné dominanci?
- Co je to B1 generace a jak vzniká?
- Jaký je fenotypový štěpný poměr v B1 generaci?
- Co vše patří do mendelistické dědičnosti?
- Jak zní Mendelovy zákony a za jakých podmínek platí?
- K čemu se v genetice používá Chí kvadrát test?

19.2. Dihybridizmus, polyhybridizmus a rozvětvovací metoda

DIHYBRIDIZMUS sleduje dědičnost dvou kvalitativních znaků.

Vzorový příklad 1: U slepic jsou opeřené nohy **F** dominantní nad holými **f** a hráškovitý tvar hřebínku **P** dominantní nad jednoduchým **p**. Dva kohouti A a B byli páření se dvěma slepicemi C a D. Všichni čtyři jedinci měli opeřené nohy a hráškovité hřebínky. Kohout A dal s oběma slepicemi všechno potomstvo opeřené s hráškovitým hřebínkem. Kohout B se slepicí C dal potomstvo opeřené i neopeřené, avšak pouze s hráškovitým hřebínkem; se slepicí D však dal všechny potomky opeřené, avšak část s hráškovitým a část s jednoduchým hřebínkem. Jaké byly genotypy obou kohoutů a slepic?

Postup: Máme odvodit genotypy rodičů z jejich fenotypů a fenotypů jejich potomků. Základem postupu je zapsat si genotypy/alely, které víme jistě, a postupně odvozovat a doplňovat doposud nejisté alely. Přitom s jistotou víme, že jedinec s recesivním fenotypem musí být recesivní homozygot, jedinec s dominantním fenotypem může být buď dominantní homozygot, nebo heterozygot. Možný postup je potom např. následující:

1) Všichni čtyři jedinci – A, B, C i D – vykazovali v obou sledovaných znacích dominantní fenotyp, v obou příslušných genech tedy museli nést přinejmenším jednu dominantní alelu, což můžeme zapsat jako **F-P-**. Musíme tedy vždy zjistit, jaká je ta druhá alela.
2) Z křížení B x D bylo získáno pouze potomstvo s jednoduchým hřebínkem, což je recesivní fenotyp a příslušní potomci tedy musí být recesivní homozygoti. Aby se to mohlo stát, oba rodiče museli být schopni recesivní alelu **p** poskytnout – a tedy museli být heterozygoti. O jedincích B a D tedy víme, že jsou genotypu F-Pp.

3) Z křížení B x C bylo získáno pouze potomstvo s hráškovitým hřebínkem (dominantní fenotyp). Víme, že kohout B je v příslušném genu heterozygot. Aby se v potomstvu heterozygota vyskytoval pouze dominantní fenotyp, musí tento heterozygot být křížen s dominantním homozygotem. Slepice C tedy je genotypu F-PP.
4) Kohout A dal s oběma slepicemi potomstvo s dominantním projevem v obou sledovaných znacích; slepice D je ale přitom v genu P heterozygot. Je-li v jejich potomstvu pouze dominantní fenotyp, musí být kohout A v genu P dominantní homozygot, tj. F-PP. Nyní už známe genotypy všech čtyř jedinců, co se týče genu P.
5) Z křížení B x C – tedy dvou opeřených jedinců – vzniká obojí potomstvo, tj. i neopeření (recesivní fenotyp, recesivní homozygoti). Aby dva jedinci s dominantním fenotypem měli potomstvo recesivního fenotypu, musí být (analogicky k bodu 2) oba heterozygoti. Genotyp kohouta B je tedy **FfPp**, genotyp slepice C je tedy **FfPP**.
6) Z křížení B x D – tedy opeřeného heterozygota s opeřenou slepicí, vzešlo pouze opeřené potomstvo. Analogicky k bodům 3 a 4 tedy musí slepice D být dominantní homozygot a její genotyp je tedy **FFPp**.
7) Z křížení A x C – tedy opeřeného kohouta s opeřenou heterozygotkou – také vzešlo pouze opeřené potomstvo. Analogicky k bodu 6 tedy musí být kohout A dominantní homozygot a jeho genotyp je tedy **FFPP**.

POLYHYBRIDIZMUS sleduje dědičnost více než dvou kvalitativních znaků.

DIHYBRIDNÍ KOMBINAČNÍ ČTVEREC zachycuje 16 zygotických kombinací vzniklých při vzájemném křížení dvou dihybridů v F_1 generaci.

F_1 generace: AaBb × AaBb
gamety: AB:Ab:aB:ab AB:Ab:aB:ab

F2 generace:

Gamety	**AB**	**Ab**	**aB**	**ab**
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Při psaní kombinačního čtverce je třeba dodržovat pravidla zápisu pořadí gametických genotypů. Při zápisu genotypového či fenotypového štěpného poměru začínáme z levého horního rohu čtverce a pokračujeme úhlopříčně směrem k pravému dolnímu rohu. Proto zápis dihybridního genotypového štěpného poměru v F_2 generaci je následující: 1AABB : 2AABb : 1AAbb : 2AaBB : 4AaBb : 2Aabb : 1aaBB : 2aaBb : 1aabb. Zápis dihybridního fenotypového štěpného poměru F_2 generace při úplné dominanci obou znaků je následující: 9 A-B- : 3 A-bb : 3 aaB- : 1 aabb (místo pomlčky v zápise genotypů je možné doplnit jak dominantní alelu, tak alelu recesivní; fenotypový projev se v obou případech shoduje).
Čtyři zygotické genotypy dihybridů (AaBb) leží v úhlopříčce, která se nazývá **úhlopříčka heterozygotů**. Z levého horního rohu čtverce pak vychází **úhlopříčka homozygotů** (AABB, AAbb, aaBB, aabb). Z prostředních 2 zygotických genotypových kombinací (AAbb, aaBB) se vytváří fenotypy, které se dosud při křížení P a F_1 generace nevyskytly a označují se jako **pěstitelské a chovatelské novinky**.

ZÁVORKOVÁ METODA

Principem je nejdříve zjistit štěpné poměry pro jednotlivé geny a následně tyto štěpné poměry vynásobit mezi sebou jako závorky. Lze použít pro stanovení genotypových i fenotypových štěpných poměrů.

Vzorový příklad 1: Aabbcc × AaBbCC (u všech genů je mezi alelami vztah úplné dominance).

Aa x Aa …AA, 2Aa, aa = štěpný poměr (1:2:1)
bb x Bb…..Bb, bb = štěpný poměr (1:1)
cc x CC…..Cc = 1
(1:2:1)x(1:1)x1= 1:1:2:2:1:1

ROZVĚTVOVACÍ METODA umožňuje odvodit štěpné poměry, aniž bychom použili kombinační čtverec. Tato metoda je vhodná zvláště pro zjišťování štěpných poměrů v potomstvech vícenásobných hybridů (polyhybridů). Principem je postupné větvení jednotlivých alternativ párů vloh (větví se heterozygoti).

Vzorový příklad 1: Za použití rozvětvovací metody stanovte genotypy gamet jedince s genotypem **AaBBCc**.

		genotyp:
AB	C	ABC
	c	ABc
aB	C	aBC
	c	aBc

Jedinec s výše uvedeným genotypem může vytvářet gamety se 4 různými genotypy.

Vzorový příklad 2: Pomocí rozvětvovací metody určete genotypový štěpný poměr a zastoupení genotypů u potomstva po křížení rodičů s genotypy: Aabbcc × AaBbCC (u všech genů je mezi alelami vztah úplné dominance).

Aa x Aa …AA, 2Aa, aa
bb x Bb…..Bb, bb
cc x CC…..Cc

		genotypy:
AA	BbCc	AABbCc
	bbCc	AAbbCc
2Aa	BbCc	2AaBbCc
	bbCc	2AabbCc
aa	BbCc	aaBbCc
	bbCc	aabbCc

Křížením rodičů s výše uvedenými genotypy mohou vznikat potomci s 6 různými genotypy v štěpném poměru 1 : 1 : 2 : 2 : 1 : 1.

Kontrolní otázky – di-, polyhybridizmus

- Jaký je fenotypový a genotypový štěpný poměr v F2 generaci při dihybridizmu?
- Jaký je fenotypový a genotypový štěpný poměr v B1 generaci při dihybridizmu?
- Umíš použít kombinační čtverec, rozvětvovací i závorkou metodu?

19.3. Polymorfní geny

POLYMORFNÍ GENY jsou geny, které mají ≥ 2 alely, nebo geny, jejichž nejčastěji se vyskytující alela má frekvenci menší než 99 %.

MNOHOTNÝ ALELISMUS - gen může být u různých jedinců v populaci vyjádřen celým souborem různých alel (např. u genu kontrolujícího barvu srsti u myší, barvu očí u octomilek, u genu krevní skupiny systému AB0 u člověka)

KODOMINANCE - žádná z rozdílných alel v heterozygotním genotypu nepřevládá a obě se podílejí při tvorbě fenotypu stejnou měrou (např. u krevních skupin).

DĚDIČNOST KREVNÍCH SKUPIN U LIDÍ - u člověka je známo více než 30 systémů krevních skupin. Každý systém je přitom kontrolován jedním genovým lokusem nebo dvěma či více blízce příbuznými homologními geny s nízkou či nulovou pozorovatelnou rekombinací. Mezi nejvýznamnější patří systémy **AB0**, **Rh** či **MNS**. Určování krevních skupin u lidí bylo vysvětleno v Kapitole 10.4.

Systém AB0 - **s**ystém AB0 je řízen jediným genem, který se nachází na chromozomu 9. Tento gen má tři základní alely (**I^A, I^B, i**). Alely I^A a I^B jsou navzájem **kodominantní** (tj. jsou-li u jedince-heterozygota přítomny obě současně, obě se také projeví ve fenotypu), alela ***i*** je vůči oběma předchozím recesivní. Alela ***I^A*** kóduje enzym, který z příslušného prekurzoru vytváří aglutinogen A, alela ***I^B*** obdobně vytváří aglutinogen B. Recesivní alela *i* kóduje variantu enzymu, která ztratila enzymatickou aktivitu.

Systém Rh (pojmenovaný podle aglutinace lidských červených krvinek sérem připraveným s použitím krve opic druhu makak rhesus) je definován jako systém asi 40 antigenů, z toho 5 hraje významnější roli (C, D, E, c, e). Nejsilnější a navenek se nejvíce projevující je antigen D, k němuž se vztahuje běžné používané označení „Rh faktor". Je-li přítomen, krev se označuje jako Rh+, v opačném případě Rh-. Přítomnost/nepřítomnost antigenu je determinována jediným genem, přičemž genotypy DD a Dd podmiňují fenotypový projev Rh+, genotyp dd podmiňuje fenotyp Rh-. V Evropě se udává následující zastoupení: 84 % Rh+, 16 % Rh- (v Asii ale např. zcela převládá Rh+).

Rh systém je spojen s patologickým stavem označovaným jako **hemolytická nemoc novorozenců**: pokud má žena Rh- potomka s mužem Rh+ (a dítě příslušnou alelu od otce zdědí), v jejím těle se vytváří protilátky anti-D, které pak mohou ohrozit nový Rh+ plod. U prvního těhotenství nic nehrozí, protože za normálních podmínek krvinky plodu neprocházejí přes placentu do krevního oběhu matky, a naopak. Při porodu však krvinky plodu s Rh+ mohou proniknout do krevního oběhu matky, tělo matky je rozezná jako cizorodou látku a začne tvořit protilátky anti-D. Ty pak zůstávají v těle matky a při dalším těhotenství mohou pronikat přes placentu do krevního oběhu plodu s Rh+, kde způsobují hemolýzu a poškození plodu. S každým dalším těhotenstvím se zvyšuje tvorba protilátek anti-D, proto i poškození plodů je větší a může dojít k odumření plodu. V současnosti se však používá účinná prevence: po porodu je matkám injekčně podán imunoglobulin (protilátka) anti-D, který naváže fetální erytrocyty v krevním oběhu matky dříve, než její imunitní systém začne protilátky sám aktivně produkovat.

Obvykle se spojuje systém AB0 se systémem Rh, např. A+, AB- apod.

DĚDIČNOST KREVNÍCH SKUPIN U KOČEK – u koček jsou rozeznávány tři krevní skupiny: **A, B a AB**. Krevní skupiny A a B jsou definovány jedním genem s dvěma alelami: dominantní A a recesivní b. Genotypy AA a Ab tedy vykazují krevní skupinu A, genotyp bb vykazuje krevní skupinu B. Krevní skupina AB je vzácná (méně než 1 %) a její genetická determinace dosud nebyla zcela objasněna; jednou z možností je, že jde o jedince genotypu Ab, u kterých hraje roli nějaký jiný gen, který umožní koexpresi obou alel. Novější studie navrhují, že se jedná o další recesivní alelu označovanou jako a^{ab}, která

je vůči alele A recesivní a vůči alele b dominantní (existuje zde tedy alelová série **A > a^{ab} > b**). Znalost krevních skupin u koček je opět důležitá v případě nutnosti **transfúze** (možnost vzniku transfúzní hemolytické reakce) a z hlediska **neonatální isoerytrolýzy u koťat**. Při podání krve skupiny A příjemci s krevní skupinou B dochází během několika minut až hodin k destrukci erytrocytů skupiny A. Neonatální isoerytrolýza nastává zejména u koťat, která se narodila kočce s krevní skupinou typu B spářené s kocourem krevní skupiny typu A. Koťata s krevní skupinou A sice nejsou ovlivněna protilátkami z krve matky v průběhu březosti (u koček je placenta přirozenou bariérou). Problém nastává až po porodu, kdy koťata (s krevní skupinou A) z kolostra, kterým jsou po porodu vyživována, dostávají anti-A protilátky, které způsobí destrukci jejich erytrocytů. Hlavní prevencí je tedy zjištění krevní skupiny kočky a kocoura, se kterým bude kočka spářena.

DĚDIČNOST KREVNÍCH SKUPIN U PSŮ - u psů je rozlišováno sedm hlavních systémů krevních skupin, které jsou souhrnně označovány jako systém DEA (Dog Erythrocyte Antigen): DEA 1 až 7. Pro každý tento systém s výjimkou DEA 1 může být pes pozitivní (jeho erytrocyty nesou příslušný antigen) nebo negativní (antigen se na krvinkách nenachází). Některé z těchto antigenů se vyskytují téměř u všech psů (DEA 4 a 6 u 98 % pozitivních psů), jiné jsou velmi vzácné. Nejvýznamnější je systém DEA 1, rozpadající se do dvou subsystémů DEA 1.1 a DEA 1.2. Každý pes může být vzhledem k těmto subsystémům pozitivní v jednom z nich nebo negativní v obou; nemůže být dvojnásobně pozitivní. Psům DEA 1.1- se nikdy nesmí dávat krev DEA 1.1+, neboť hrozí podobný problém jako u Rh systému a to senzitizace a následná hemolýza při další transfúzi. Zajímavé je, že po senzitizaci antigenem DEA 1.1 hrozí hemolýza i při podání krve lišící se v jiném systému než DEA 1.

Kontrolní otázky – polymorfní geny

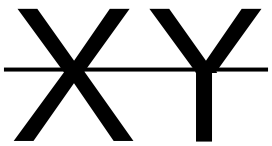
- Co znamená polymorfní gen?
- Který český vědec popsal všechny 4 krevní skupiny?
- Jaké genotypy odpovídají krevním skupinám u lidí?
- Co je to kodominance?
- Znáš princip dědičnosti krevních skupin u lidí?
- Jaké jsou krevní skupiny u koček a jak jsou determinovány?

19.4. Dědičnost a pohlaví

DĚDIČNOST VÁZANÁ NA POHLAVÍ (sex-linked) - geny leží na **GONOZOMECH** (pohlavních chromozomech). Je porušena podmínka Mendelových zákonů o autosomální dědičnosti.

1. **úplně pohlavně vázaná dědičnost** - geny leží na heterologních segmentech pohlavních chromozomů.
   a) **gen na heterologním segmentu Y** - dědičnost **holandrická** (znak se dědí z otců na syny), př. *hypertrichosis auriculae* (chlupatost uší člověka).
   b) **gen na heterologním segmentu X** - př. hemofilie člověka, barva očí u octomilek.
      - V P generaci dominantní alela u homogametického pohlaví XX - **uniformita F_1 generace**
      - V P generaci dominantní alela u heterogametického pohlaví XY - **dědičnost křížem**.

2. **neúplně pohlavně vázaná dědičnost** - geny leží na homologních částech pohlavních chromozomů (rekombinace je teoreticky možná, ale crossing-over je často blokován).



homologní části chromozomů

heterologní části chromozomů

Obr. 33: Pohlavní chromozomy X a Y s vyznačením homologních a heterologních částí.

DĚDIČNOST POHLAVÍM PODMÍNĚNÁ (sex-limited) - geny jsou na autozomech obou pohlaví, ale znak se projeví jen u jednoho pohlaví, který k tomu má anatomické predispozice (př. kryptorchismus – nesestoupení varlat do šourku).

DĚDIČNOST POHLAVÍM OVLÁDANÁ (sex-controlled) - geny jsou na autozomech obou pohlaví, ale jejich fenotypový projev v heterozygotním a dominantně homozygotním stavu je ovládán pohlavím hostitele. Znak se vyskytuje jen u jednoho pohlaví (př. vousy mužů).

DĚDIČNOST POHLAVÍM OVLIVNĚNÁ (sex-influenced) - geny jsou na autozomech obou pohlaví, ale jejich fenotypový projev v heterozygotním stavu je ovlivněn pohlavím nositele. Znak se vyskytuje u obou pohlaví (př. plešatost u člověka).

HEMIZYGOT – určitý gen má jen jednu alelu. Tento případ nastane např. v genotypu muže, který má odlišné pohlavní chromozomy a alely na nich uložené nemají své párové protějšky, proto se projeví ve fenotypu, ať jsou dominantní nebo recesivní.

Kontrolní otázky – dědičnost a pohlaví

- Jaký typ dědičnosti je kódován geny na gonozomech?
- Jaký je rozdíl mezi heterologní a homologní částí pohlavního chromozomu?
- Co je to holandrická dědičnost? Uveď příklad.
- Jaká podmínka Mendelových zákonů je porušena při dědičnosti na pohlaví vázané?
- Který Mendelův zákon je porušen při dědičnosti na pohlaví vázané?
- Jaký je příklad dědičnosti na pohlaví vázané?
- Jaký je rozdíl mezi dědičností úplně a neúplně pohlavně vázané?
- Co je to hemizygot? Uveď příklad.
- Jaké typy dědičnosti jsou kódovány geny na autozomech?

19.5. Genové interakce

GENOVÉ INTERAKCE představují uplatnění 2 či více genů na fenotypové realizaci jednoho znaku, tím je porušena podmínka platnosti Mendelových pravidel o monogenní dědičnosti.

RECIPROKÁ INTERAKCE je interakce bez změny štěpného poměru, sledovaný znak se vyskytuje ve více formách, z nichž každá je determinována jednou z kombinací alel rodičovských genů.

DOMINANTNÍ EPISTÁZE - dominantní alela epistatického genu potlačuje fenotypový projev hypostatického genu.

RECESIVNÍ EPISTÁZE - homozygotně recesivní sestava alel epistatického genu potlačuje fenotypový projev hypostatického genu.

INHIBICE - dominantní alela genu inhibitoru potlačuje funkci jiného genu, ale sama nemá žádný účinek na fenotyp.

KOMPLEMENTARITA - dominantní alely dvou či více genů se vzájemně doplňují při realizaci fenotypového znaku (znak se vytváří teprve tehdy, jsou-li přítomny obě dominantní alely).

KOMPENZACE - funkce dominantních alel dvou různých genů je protisměrná, čímž se jejich fenotypové účinky vzájemně vylučují.

DUPLICITA - na projevu znaku se podílí dominantní alely genu a intenzita projevu znaku záleží na vzájemných vztazích těchto genů. U duplicity kumulativní se účinky všech dominantních alel sčítají (duplicita kumulativní s dominancí nebo duplicita kumulativní bez dominance) u duplicity nekumulativní se nesčítají.

- **Duplicita nekumulativní** - jedna dominantní alela vyvolá projev znaku a celkový počet dominantních alel neovlivňuje intenzitu znaku. Existují dva odlišné fenotypy.
- **Duplicita kumulativní s dominancí** (mezi alelami je úplná dominance) závisí na počtu alelových párů v nichž jsou dominantní alely. Pokud je dominantní alela v obou genech, je projev znaku maximální, pokud je jen v jednom genu a je jedno ve kterém, je projev znaku poloviční. Existují tři odlišné fenotypy.
- **Duplicita kumulativní bez dominance** (mezi alelami je neúplná dominance) se účinek dominantních alel sčítá a intenzita znaku je dána počtem dominantních alel. Existuje pět odlišných fenotypů.

LETÁLNÍ GENY - geny, které způsobují svému nositeli smrt. Dominantní letální gen z populace vymizí, neboť nositel zemře, i když je heterozygot. Recesivní letální gen zabíjí nositele v homozygotní kombinaci a u heterozygota je v populaci udržován. Zvláštním případem je tzv. recesivní letalita dominantní alely, kdy stejně jako u dominantní letality škodí dominantní alela, ale pouze v homozygotním stavu (tj. heterozygoti přežívají).

Odvození štěpných poměrů u jednotlivých typů genových interakcí:

	A-B-	**A-bb**	**aaB-**	**aabb**
reciproká interakce	**9**	**3**	**3**	**1**
dominantní epistáze	12		3	1
recesivní epistáze	9	3	4	
komplementarita	9	7		
kompenzace	10	3	3	
inhibice	13		3	
duplicita kumulativní s dominancí	9	6		1
duplicita nekumulativní	15			1

	AABB	**AaBB AABb**	**AaBb aaBB AAbb**	**Aabb aaBb**	**aabb**
duplicita kumulativní bez dominance	1	4	6	4	1

Kontrolní otázky – genové interakce

- Co patří mezi genové interakce (včetně konkrétních příkladů)?
- Jaká podmínka Mendelových zákonů je porušena při genových interakcích?
- Co platí pro jednotlivé genové interakce? Jak se geny vzájemně ovlivňují?
- Umíš odvodit fenotypové štěpné poměry jednotlivých genových interakcí?
- Jaké znáš typy duplicit? Uveď konkrétní příklady.

19.6. Vazba genů

VAZBA GENŮ souvisí s umístěním rozdílných genů na stejném chromozomu, čímž je porušena podmínka platnosti Mendelových pravidel, že každý gen je na jiném chromozomu. Geny na stejném chromozomu tvoří **vazbovou skupinu**.

- **Úplná vazba** – geny leží na chromozomu blízko sebe, silná vazba, nemůže dojít ke crossing-overu mezi alelami různých genů.
- **Neúplná vazba –** geny leží na chromozomu daleko od sebe, slabá vazba, může dojít ke crossing-overu.

MORGANOVY ZÁKONY:

1) geny jsou na chromozomech uloženy lineárně za sebou
2) počet vazbových skupin je roven počtu páru homologních chromozomů

SÍLA VAZBY vyjadřuje pravděpodobnost vzniku crossing-overu mezi alelami různých genů, které jsou ve vazbě. Čím blíže jsou geny, tím je vazba silnější a tím je menší pravděpodobnost, že dojde ke crossing overu. Síla vazby se vyjadřuje následujícími čísly:

BATESONOVO ČÍSLO (c) je poměr četnosti gamet s rodičovským uspořádáním alel a s nerodičovským (tj. rekombinovaným) uspořádáním alel.

$$c = \frac{\text{počet potomků s nerekombinovaným fenotypem}}{\text{počet potomků vzniklých rekombinací}}$$

MORGANOVO ČÍSLO (p) udává podíl gamet s rekombinovaným genotypem k celkovému počtu potomků. Je udáváno v centimorganech (**cM**), kde 1cM je definován jako 1 % pravděpodobnost vzniku crossing-overu mezi testovanými geny.

$$p = \frac{100 \text{ x počet potomků vzniklých rekombinací}}{\text{počet všech potomků}} (cM)$$

Platí: $c = \frac{100 - p}{p}$ $\qquad$ $p = \frac{100}{c + 1}$

TESTOVACÍ KŘÍŽENÍ je obdoba zpětného křížení (křížení heterozygota s homozygotem), kdy lze podle fenotypového štěpného poměru v potomstvu zjistit četnosti jednotlivých genotypových kombinací. Při **tříbodovém testovacím křížení** (sledují se tři geny) můžeme sledovat štěpení genotypů v potomstvu. Např. při křížení AaBbCc x aabbcc, je možné rozlišit a zapsat 2 vazbové fáze (Na každé straně zlomku jsou alely uložené na jednom z homologních chromozomů):

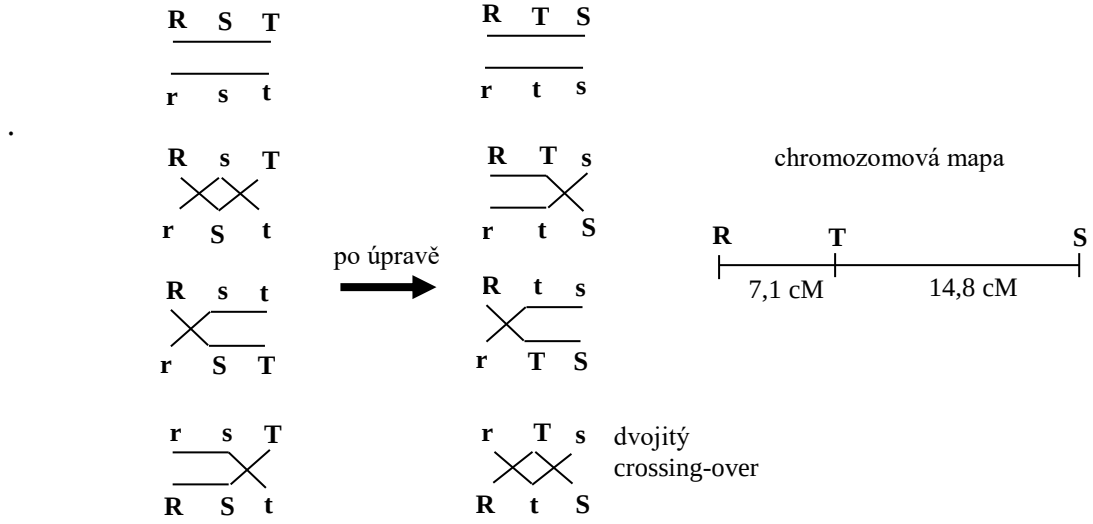
Vazbová fáze **cis:** $\frac{ABC}{abc} \times \frac{abc}{abc}$ Vazbová fáze **trans:** $\frac{AbC}{aBc} \times \frac{abc}{abc}$

Vzorový příklad 1: Určete vzájemnou lokalizaci genů RST a sílu vazby mezi sousedními geny na základě genetické analýzy potomstva vzniklého z testovacího křížení: RrSsTt × rrsstt.

Fenotypy	%
RST rst	78,5
RsT rSt	14,4
Rst rST	6,7
rsT RSt	0,4

Postup:

1) Stanovit skutečné pořadí genů podle fenotypu, který má nejmenší četnost, tj. vznikl dvojitým crossing-overem. Nejmenší četnost má čtvrtý fenotyp, ale nevznikl dvojitým crossing-overem (viz obr.), je proto potřeba změnit pořadí genů v rámci téhož chromozomu, tak aby vznikl dvojitý crossing-over a tím zjistíme i správné pořadí genů (v tomto případě to je RTS).
2) Změnit pořadí genů u všech odlišných fenotypů (viz obr.)
3) Vypočítat sílu vazby pro geny RT a TS (síla vazby souvisí s četností crossing-overu, proto sečteme četnosti, kde mezi danými geny došlo ke crossing-overu (viz obr. po úpravě). Síla vazby pro geny RT: p(RT) = 6,7 + 0,4 = 7,1 cM; a pro geny TS: p(TS) = 14,4 + 0,4 = 14,8 cM.
4) Sestavit chromozomovou mapu (jak jsou geny řazeny za sebou a jaká je mezi nimi vzdálenost).



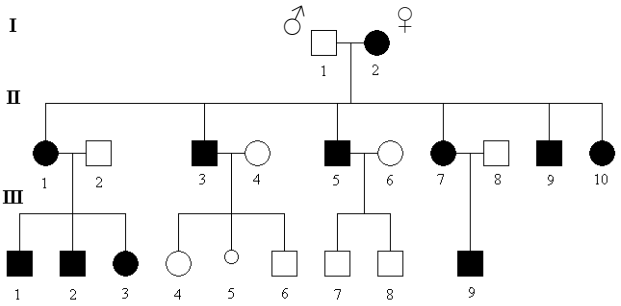
Kontrolní otázky – vazba genů

- Co je to vazba genů?
- Jaká podmínka a Mendelův zákon jsou porušeny při vazbě genů?
- Jak zní Morganovy zákony?
- Jaký živočišný model používal Morgan ke svým genetickým experimentům?
- Jaký je rozdíl mezi úplnou a neúplnou vazbou genů (vzdálenost mezi geny, síla vazby, pravděpodobnost crossing-overu)?
- Čím se vyjadřuje síla vazby?
- Co udává Batesonovo a Morganovo číslo?
- K čemu slouží tříbodové testovací křížení?
- Jaký je rozdíl mezi vazbovými skupinami cis a trans? Umíš oba typy vazby zapsat?
- Co znamená chromozomová mapa?

19.7. Nemendelistická dědičnost

MATERNÁLNÍ DĚDIČNOST - Ačkoli je podstatná část genomu uložena v jaderné DNA, řada strukturních genů je součástí cirkulárního mitochondriálního genomu, v případě rostlin navíc genomu chloroplastového. Dědičnost znaků kódovaných mitochondriálním (**mitochondriální dědičnost**) a chloroplastovým (**chloroplastová dědičnost**) genomem jsou příkladem **nemendelistické (nemendelovské) dědičnosti** (tedy takového typu dědičnosti, pro který neplatí Mendelovy zákony). Na rozdíl od mendelovské dědičnosti, při pohlavním rozmnožování je v tomto případě nositelem genetické informace vždy samičí gameta. Potomstvo má dědičný znak matky, proto se tento typ dědičnosti také označuje jako **maternální** či **matroklinní**.

MITOCHONDRIÁLNÍ DĚDIČNOST – s mutací mtDNA je spojena řada závažných dědičných genetických chorob např. Leberova optická neuropatie, Kearns-Sayreův syndrom. Jedinci postižení mitochondriální nemocí mohou být muži i ženy, ale tyto nemoci se mohou v rodinách přenášet jen po mateřské linii. Dítě zdědí mitochondriální DNA pouze od matky. Tomu odpovídá i typický maternální přenos chorob způsobených mutacemi mtDNA v rodokmenu.

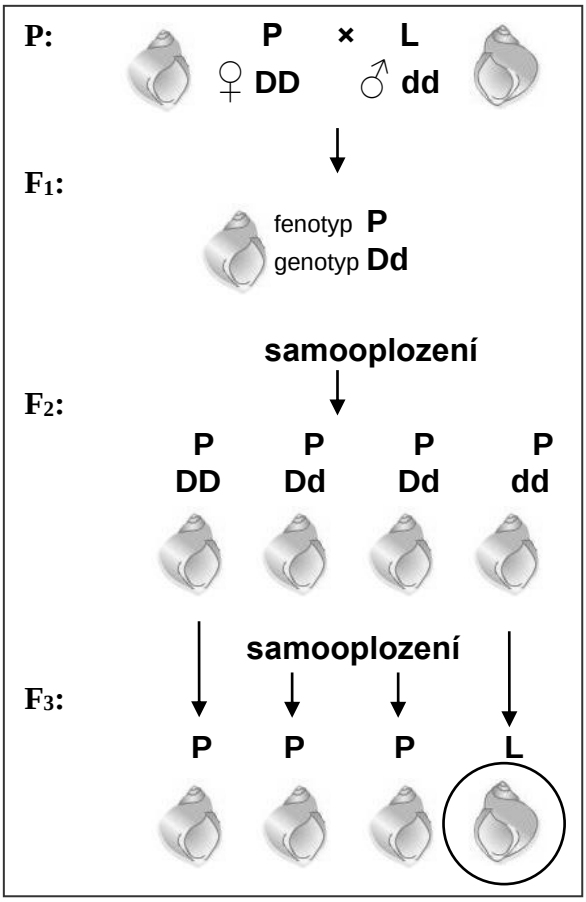


Obr. 34: Mitochondriální typ dědičnosti (Leberova optická neuropatie způsobující částečnou slepotu u dospělých středního věku). Černá značí jedince s chorobou, bílá zdravého jedince. Mutace v mitochondriální DNA se dědí pouze po matce, proto všechny děti otce s mitochondriálně dědičnou chorobou budou zdravé.

CHLOROPLASTOVÁ DĚDIČNOST. Maternální dědičnost vykazuje znak **panašování (skvrnitost) listů** nocenky jalapenské (*Mirabilis jalapa*). U této rostliny je zbarvení listů v F1 generaci dané zbarvením samičí rostliny, protože pyl neobsahuje prakticky žádnou cytoplazmu a tudíž ani chloroplasty s genetickou informací. V případě, že je samičí rostlina zelená (převaha chloroplastů), potomstvo bude zelené, je-li žlutá až bílá (vysoká převaha leukoplastů), potomstvo bude bílé. Panašované rostliny mají zhruba ekvivalentní počet chloroplastů a leukoplastů. V důsledku nerovnoměrné distribuce těchto organel během mitózy mají panašované rostliny zelené, žluté a bílé skvrny na listech. Nerovnoměrná distribuce chloroplastů a leukoplastů nastává také při meióze, takže samičí rostlina produkuje 3 typy pohlavních buněk - zelené, panašované a bílé. Generace F_1 tedy není uniformní a odchyluje se tak od zákonů mendelovské dědičnosti.

MATERNÁLNÍ EFEKT souvisí s vývojem oocytu v mateřském organizmu. Při maternálním efektu je fenotyp kódován genetickou informací v jádře (tj. odlišně od maternální dědičnosti). Při genové expresi vznikají podle této genetické informace proteiny, které jsou přeneseny do oocytu ještě před oplozením. Tyto proteiny přímo ovlivňují vývoj embrya v časném stádiu vývoje. Fenotyp zygoty je tedy ovlivněn produkty jaderných genů mateřského organizmu. Konkrétním příkladem je vinutí ulity plovatky toulavé (*Lymnaea peregra*).

Vzorový příklad 1: Směr vinutí ulity plovatky toulavé je dán alelami jaderného genu. Genotyp (DD, Dd) s dominantní alelou D určuje pravotočivou ulitu (P), genotyp (dd) s recesivními alelami d určuje levotočivou ulitu (L). Mezi alelami je úplná dominance. **Fenotyp potomka** (bez ohledu na jeho genotyp) **závisí na genotypu matky** (bez ohledu na její fenotyp). Princip: již před fertilizací je v oocytu přítomen protein (produkt genu matky), který ovlivňuje orientaci mitotického vřeténka v první mitóze po fertilizaci a tím ovlivňuje vinutí ulity (doprava nebo doleva) u potomka.



P generace: křížení samice s pravotočivou ulitou a samce s levotočivou ulitou.

F_1 generace: vzniká uniformní potomstvo s genotypem pro pravotočivost, fenotypově jsou všichni pravotočiví po matce.

F_2 generace: vzniká potomstvo s třemi různými genotypy (DD, Dd, dd), fenotypově jsou ale všichni pravotočiví po matce, která měla genotyp pro pravotočivost (Dd).

F_3: matka s genotypem (DD a Dd) produkuje pravotočivé potomstvo, matka s genotypem (dd) produkuje levotočivé potomstvo. Genotypově vzniká poměr 1:2:1, fenotypově 3:1.

Obr. 35: Maternální efekt při dědičnosti vinutí ulity plovatky toulavé (*Lymnaea peregra*). Směr vinutí ulity ovlivňuje pár alel: D – dominantní pro pravotočivost, d – recesivní pro levotočivost (P = pravotočivost, L = levotočivost).

Kontrolní otázky – nemendelistická dědičnost

- Co patří do nemendelistické dědičnosti?
- Co je to maternální dědičnost?
- Jak se dědí onemocnění kódované geny na mitochondriích (uveď konkrétní příklady)?
- Jak se dědí panašovanost listů?
- Co je to maternální efekt (uveď konkrétní příklad)?

19.8. Kvantitativní genetika

ZNAKY KVANTITATIVNÍ - projevují se kontinuitní (plynulou) proměnlivostí, dědí se na principu polygenní dědičnosti.

Celková fenotypová variance (V_P) = variance podmíněná dědičností **(V_G)** + prostředím **(V_E)**

- variance podmíněná dědičností = variance podmíněná aditivním působením genů, tj. sčítaným účinkem jednotlivých polygenů + variance podmíněná dominancí + variance podmíněná interakcí genů + variance podmíněná interakcí genotypu a prostředí
- variance podmíněná prostředím = variance podmíněná permanentně působícími vlivy prostředí + variance podmíněná dočasně působícími vlivy prostředí + variance podmíněná interakcí genotypu a prostředí

POLYGENY jsou alelové páry s malým účinkem, tvořící mnohočetné genové série, polygeny mají aditivní (někdy multiplikativní) účinek na fenotyp.

HERITABILITA (dědivost) - vztah mezi dědičnou a nedědičnou složkou proměnlivosti znaku (= podíl dědičně podmíněné složky na konečném fenotypovém projevu znaku).

KOEFICIENT HERITABILITY (h^2) - ukazatel heritability, podíl geneticky podmíněné variability na celkové fenotypové variabilitě určitého znaku. Hodnoty jsou v rozmezí od **0** (celá proměnlivost znaku je způsobena faktory prostředí) do **1** (celá proměnlivost znaku je dána geneticky). Může být nízká dědivost (hodnoty nižší než 0,2), střední dědivost (0,2 - 0,5) a vysoká dědivost (hodnoty nad 0,5). Vypočítává se z porovnání znaků ve skupinách: rodiče × potomci, sourozenci × polosourozenci, identická a neidentická dvojčata, jedinci ve skupinách při selekčních experimentech.

- Heritabilita v širším pojetí h^2_B (broad sense heritability), kde V_G je genetická variabilita, V_P je fenotypová variabilita.
- Heritabilita v užším pojetí h^2_N (narrow-sense heritability), kde V_A je aditivní genetická variabilita, V_P je fenotypová variabilita.

$$h_B^{\,2} = \frac{V_G}{V_P} \qquad h_N^2 = \frac{V_A}{V_P}$$

Základní statistické charakteristiky používané při studiu dědičnosti kvantitativního znaku:

PRŮMĚR $\bar{x}$ (aritmetický průměr, angl. mean)

ROZPTYL s^2 a **SMĚRODATNÁ ODCHYLKA** s (angl. variance, standard deviation) udávají rozpětí, jak jsou hodnoty rozděleny kolem průměru.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \qquad s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \qquad s = \sqrt{s^2}$$

KORELACE udává, zda existuje vztah mezi proměnnými hodnotami (kvantitativními znaky), vyjadřuje ji **korelační koeficient r.** Korelační koeficient nabývá hodnoty **-1 až 1**. Čím blíže od 0 k 1 (příp. -1), tím je korelace silnější. Korelace může být pozitivní (kladná hodnota, mezi dvěma znaky je přímá úměra), nebo negativní (záporné hodnoty, mezi dvěma znaky je nepřímá úměra). Pro výpočet se používají následující vzorce:

$$\mathrm{cov}_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n-1} = \frac{\sum x_i y_i - \frac{1}{n}\left(\sum x_i \sum y_i\right)}{n-1}$$

$$r = \frac{\mathrm{cov}_{xy}}{s_x s_y}$$

REGRESNÍ KOEFICIENT *k* se používá k výpočtu heritability v užším pojetí $\mathbf{h^2_N}$. Nabývá hodnot **od 0 do 1** (0 = plný aditivní účinek, 1 = žádný aditivní účinek genu na fenotypovou variabilitu).

$$k = \frac{\mathrm{cov}_{xy}}{s_x^2}$$

Kontrolní otázky – kvantitativní genetika

- Znáš příklady kvalitativního a kvantitativního znaku?
- Jak lze graficky vyjádřit kvalitativní a kvantitativní znak?
- Co je to fenotypová variabilita a čím je tvořena?
- Co je to heritabilita, jak se vypočítá a vyhodnotí?
- Jaké jsou základní statistické charakteristiky, které se používají při studiu kvantitativního znaku?
- Co je to korelace a jak se počítá korelační koeficient?
- Jaký je rozdíl mezi pozitivní a negativní korelací (uveď konkrétní příklad)?

19.9. Populační genetika

POPULACE je soubor jedinců téhož biologického druhu, kteří se mezi sebou vzájemně kříží (na určitém místě v určitém čase), mají plodné potomky a pocházejí od společného předka.

GENOFOND – je soubor veškeré genetické informace v populaci

GAMETOVÝ FOND – všechny gamety vytvořené jedinci populace.

ALELOVÁ (GENOVÁ) FREKVENCE - relativní četnost určité alely v souboru všech alel stejného genu v populaci.

GENOTYPOVÁ FREKVENCE – relativní četnost určitého genotypu v souboru všech genotypů v populaci.

HETEROZYGOTNOST POPULACE – podíl heterozygotů v populaci.

PANMIXIE – ničím neomezená možnost vzájemného křížení kteréhokoliv jedince s kterýmkoli dalším členem populace **–** každá samčí gameta má stejnou pravděpodobnost setkání s kteroukoliv samičí gametou.

PANMIKTICKÁ POPULACE – populace, u které dochází k panmixii.

HARDYŮV-WEINBERGŮV ZÁKON (HW zákon) – vyjadřuje matematický vztah mezi alelovými a genotypovými frekvencemi, kdy genotypové frekvence jsou binomickou funkcí alelových frekvencí. V dostatečně velké panmiktické populaci se alelové a genotypové frekvence z generace na generaci nemění za předpokladu, že nedochází k selekci, mutaci, genetickému posunu a toku genů.

Vztah alelových frekvencí: $p(A)+q(a)=1$

(kde **p** je frekvence dominantní alely A, **q** je frekvence recesivní alely a)

Vztah genotypových frekvencí: $P(AA)+H(Aa)+Q(aa)\ =1$

(kde **P** je frekvence dominantních homozygotů AA, **H** je frekvence heterozygotů Aa, Q je frekvence recesivních homozygotů aa)

Hardyův-Weinbergův zákon

Pro gen s dvěma alelami:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

frekvence alel frekvence genotypů

Pro gen s třemi alelami:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + 2pq + q^2 + 2pr + 2qr + r^2 = 1$$

Pokud známe frekvenci alel, odvodíme frekvenci genotypů a opačně.

Vzorový příklad 1: Albinismus je neschopnost syntézy pigmentu melaninu. Je to recesivně dědičné onemocnění. V populaci se vyskytuje jeden albín (aa) na 10 000 obyvatel (0,0001). Vypočítejte četnost alely a pro albinismus. Kolik % přenašečů albinismu (Aa) je v populaci?

Postup:

1) Nejprve je třeba si převést slovní zadání do symboliky zápisu alelových a genotypových četností. V tomto případě ze zadané genotypové frekvence recesivních homozygotů Q(aa) máme spočítat četnost recesivní alely q(a).
2) Pokud je populace v rovnováze podle HW zákona (a není-li řečeno jinak, předpokládáme, že ano), pak platí, že $Q = q^2$ a tedy alelová četnost recesivní alely je rovna druhé odmocnině z četnosti recesivních homozygotů, tj. q(a) = 0,01.
3) Dále máme spočítat četnost přenašečů, tj. genotypovou četnost heterozygotů v populaci H(Aa). Podle HW zákona platí, že H = 2pq. K provedení tohoto výpočtu si ale napřed musíme spočítat četnost dominantní alely p(A). Protože součet četností obou alel vždy dává dohromady 1 (p + q = 1), pak p = 1 – q = 0,99. Hledaná genotypová četnost heterozygotů H = 2*0,99*0,01 = 0,019 8, tj. 1,98 %.

Kontrolní otázky – populační genetika

- Jaká je definice populace?
- Co je to genofond a gametový fond?
- Co je to panmiktická populace?
- Jaká rovnice vystihuje Hardyův-Weinbergův zákon? Co je na jedné a druhé straně rovnice?
- Za jakých podmínek platí Hardyův-Weinbergův zákon?

20. Pokusy na živých zvířatech

Pokusy na zvířatech jsou úzce svázány s rozvojem lékařské vědy. Již v době antického Řecka byla řada fyziologických otázek objasněna na základě pokusů na zvířatech (domácích i divokých). V 18. století docházelo k rozvoji medicíny, který závisel i na výsledcích získaných v pokusech na zvířatech. Přesto, nebo právě proto v této době vzniklo hnutí proti pokusům na zvířatech a v roce 1875 byla založena první anti-vivisekcionistická organizace. Slovo vivisekce (z latiny "*vivo*" = živé a "*sectio*" = řezat), označuje pokusy na zvířatech, které jsou nelidské a kruté. V souvislosti s tím byl v roce 1876 v Anglii přijat první zákon na ochranu pokusných zvířat. Ve 20. století byly zakládány chovy laboratorních zvířat a docházelo k celosvětovému využití laboratorních zvířat v pokusech, což souviselo s rozvojem základního biomedicínského výzkumu, ale i výzkumu ve vojenském a farmaceutickém průmyslu. Používání zvířat v pokusech musí být odpovědné, rozumné a měly by být omezeny nebo odstraněny nehumánní aspekty, což se odráží i v zásadách **"3 R"**, které v roce 1959 navrhli Russell a Burch.

Zásady

Tyto zásady byly i velkým přínosem při formulaci legislativy v celé řadě zemí. **"3 R"** jsou počáteční písmena anglických slov:

REPLACEMENT (náhrada) – nahrazení pokusu na zvířatech jinými technikami, např. pokusy *in vitro* s buněčnými kulturami, použití nižších organizmů (bakterie, kvasinky, plísně, hmyz, plži atd.), imunologické metody, matematické modelování, video, filmy, počítačové výukové programy.

REDUCTION (snížení, redukce) – snížení počtu zvířat zařazovaných do pokusu.

REFINEMENT (zjemnění) – snížení až úplné vyloučení bolestivých a stresujících podnětů (cílem je zajistit welfare tj. pohodu zvířat).

Legislativa a pojmy

Pokusy na **zvířatech** a chov **laboratorních zvířat** (zvíře, které je rozmnožováno jen pro vědecké účely) musí probíhat v souladu s legislativními normami, tj. zejména zákonem **246/1992** Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (aktuální znění 359/2012 Sb.) a vyhláškou **419/2012** Sb., o ochraně pokusných zvířat. Účelem zákona je chránit zvířata, jež jsou živými tvory schopnými pociťovat bolest a utrpení, před týráním, poškozováním jejich zdraví a jejich usmrcením bez důvodu, pokud byly způsobeny, byť i z nedbalosti, člověkem. Zákon zakazuje týrání a jeho propagaci.

ZVÍŘE – každý živý **obratlovec**, kromě člověka, nikoliv však plod nebo embryo.

POKUSNÉ ZVÍŘE – živý obratlovec, s výjimkou člověka, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, který je nebo má být použit k pokusům; za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, pokud má být zvířeti umožněno žít nad rámec tohoto stadia vývoje a v důsledku prováděných pokusů je pravděpodobné, že po dosažení tohoto stadia vývoje je postihne bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození. Za pokusné zvíře se považují také živí hlavonožci.

POKUS – jakékoli invazivní či neinvazivní použití zvířete pro pokusné nebo jiné vědecké účely se známým nebo neznámým výsledkem nebo pro vzdělávací účely, které může zvířeti způsobit bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození nejméně o **intenzitě odpovídající vpichu jehly podle běžné veterinární praxe.**

Pokusy na zvířatech lze provádět výhradně pro tyto účely:

1) základní výzkum
2) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem:
   - zabránit a předejít onemocnění, špatnému zdravotnímu stavu nebo jiným
   - anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit
   - posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin
   - zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům
3) pro jakýkoli z cílů uvedených v písmeni b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
4) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
5) výzkum zaměřený na zachování druhů
6) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
7) trestní řízení a jiné soudní řízení

Dále jsou v zákoně definovány podmínky volby metod použitých při pokusu, které respektují zásady „3R“, možnosti znecitlivění pokusných zvířat, klasifikace závažnosti pokusů, možnosti opětovného použití pokusných zvířat a konec pokusu, včetně metod usmrcování pokusných zvířat.

Oprávnění

Navrhování pokusů a projektů pokusů mohou provádět pouze lékaři, veterinární lékaři a osoby s jiným vysokoškolským vzděláním v oblasti biologických oborů a kteří absolvovali kurz odborné přípravy a získali **osvědčení o odborné způsobilosti** k navrhování pokusů a projektů pokusů (podle § 15d a § 15e zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, vydává ministerstvo, a to na dobu **7 let**). Na základě tohoto osvědčení mohou tyto osoby provádět také pokusy na pokusných zvířatech, péči o pokusná zvířata a usmrcování pokusných zvířat.

Projekt pokusů

Pro provádění pokusu na zvířatech je potřebné vypracovat **projekt pokusu**, který musí obsahovat identifikaci uživatelského zařízení, jméno osoby odpovědné za průběh pokusu a osoby odpovědné za zvířata, popis pokusu a použité metodiky, druh a počet zvířat použitých v pokusu, způsob jejich značení a znecitlivění a způsob naložení zvířat po ukončení pokusu, netechnické shrnutí projektu pokusů a doložení kvalifikace osob. Součástí žádosti je i zdůvodnění pokusu, uplatnění metod v zájmu nahrazení a omezení používání pokusných zvířat a šetrného zacházení s nimi. Příslušné státní orgány vydávají na základě vyjádření odborných komisí (zřízené uživatelským zařízením) **povolení k použití pokusných zvířat** v jednotlivých pokusech.

Každý chovatel pokusných zvířat, dodavatel pokusných zvířat a uživatel pokusných zvířat je povinen pro své zařízení zřídit **odbornou komisi** pro zajišťování dobrých životních

podmínek pokusných zvířat. Ústřední komise a Výbor pro ochranu zvířat používaných pro vědecké účely, zřízené ministerstvem zemědělství slouží jako poradní orgány odborné komise.

Zařízení a zoohygienické podmínky

Zařízení, která manipulují s pokusnými zvířaty, je možné rozčlenit na **chovná**, **dodavatelská** a **uživatelská**. Tato zařízení musí mít pro svou činnost oprávnění. Oprávnění k chovu pokusných zvířat, k dodávce pokusných zvířat nebo k používání pokusných zvířat uděluje ministerstvo zemědělství. V případě prvního udělení oprávnění se oprávnění vydává na dobu 3 let, při každém dalším udělení oprávnění se oprávnění vydává na dobu 5 let. Uživatelské zařízení musí dodržovat **podmínky chovu** stanovené ve vyhlášce **419/2012** Sb., o ochraně pokusných zvířat.

Pro zajištění pohody zvířat (welfare) musí uživatelské zařízení zabezpečit následující **zoohygienické podmínky** v prostorech pro zvířata: teplotu a relativní vlhkost přizpůsobenou druhům pokusných zvířat, osvětlení, které uspokojí biologické potřeby pokusných zvířat, hluk nesmí mít nepříznivý vliv na welfare a jsou dány konkrétní požadavky na prostory, jejich velikost a vybavení pro jednotlivé druhy pokusných zvířat a požadavky na zdravotní péči pokusných zvířat. Odpovědný ošetřovatel musí denně kontrolovat zdravotní stav zvířat, zabezpečit krmení a napájení zvířat *ad libitum*, odstranit uhynulé kusy zvířat a vést evidenci o počtu a druzích pokusných zvířat.

Z hlediska mikrobiálního osídlení, rozsahu prováděné kontroly a v návaznosti na technologii chovu lze rozlišit čtyři základní skupiny laboratorních zvířat:

- **Konvenční zvířata** – s neznámým a obvykle nekontrolovaným mikrobiálním osídlením, nebo kontrolou zaměřenou pouze na přítomnost zárodků přenosných na člověka a hospodářská zvířata, obvykle chovaná v otevřených chovných zařízeních (bez bariéry).
- **SPF zvířata** (specific pathogen free) – s definovanou mikroflórou, pravidelně kontrolována na přítomnost náhodně získaných nežádoucích mikroorganizmů, chovaná za bariérou.
- **Gnotobiotická zvířata** (řecky gnotos = známý) – záměrně osídlena jedním, dvěma či více mikroorganizmy, chovaná v izolátoru.

GF zvířata (germ-free) **–** získaná hysterektomií v poslední fázi březosti, prostá virů, bakterií a parazitů, chovaná v izolátoru.

Kontrolní otázky – pokusy na živých zvířatech

- Co se skrývá pod zásadami „3R“, které by se měly dodržovat při pokusech na zvířatech?
- Za jakým účelem je možné dělat pokusy na zvířatech?
- Jak rozdělujeme zařízení, které přichází do kontaktu s laboratorními zvířaty?
- Co vše je potřebné učinit, aby uživatelské zařízení získalo akreditaci?
- Jaké podmínky je třeba dodržovat při využívání laboratorních zvířat k pokusům?
- Kdo může vést pokusy na zvířatech? Jaké vzdělání musí mít?
- Jaký je rozdíl mezi laboratorními zvířaty z odlišných chovů (konvenční, SPF, gnotobiotický GF)?

21. Studijní literatura a studijní pomůcky

Pracovní listy

- **Kobédová K., Marková J., Bártová E., Papoušek I.** Pracovní listy na cvičení, 2016 (IVA VFU Brno 2016FVHE/2150/34)

Knihy - biologie

- **Alberts B. a kol.**: Základy buněčné biologie, úvod do molekulární biologie buňky (orig. Essential Cell Biology, 1998), Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2001.
- **Nečas O. a kol.**: Obecná biologie pro lékařské fakulty, H & H, Jinočany, 2000.
- **Rosypal S. a kol.**: Nový přehled biologie, Scientia s.r.o., Praha, 2003.
- **Campbell N. A. a Reece J. B.**: Biologie (orig. Biology, 2002), Computer Press, a.s., Brno, 2006.

Knihy - genetika

- **Šiler a kol.**: Genetika drobných zvířat, Tigris, 2012, 220 s.
- **Snustad P a Simmons M.J.:** Genetika. MU Brno, 2009, 871 s.
- **Kočárek E.**: Genetika, Scientia spol.s. r.o., Praha, 2004

Multimediální pomůcky (odkaz přes ústavní stránky)

- **Bártová E., Halová D., Papoušek I.** Biologie a genetika pro bakaláře, VFU Brno (OPVK), 2014: http://mmp.vfu.cz/opvk2014/
- **Bártová E. a Frolková P.** Průvodce praktickou výukou z biologie a genetiky, VFU Brno (FRVŠ), 2011: http://mmp.vfu.cz/frvs2011/
- **Bártová E. a Literák I.** Molekulární biologie, VFU Brno (OPVK), 2011: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/

Příloha 1: Hodnoty chí kvadrát testu (χ^2) pro pravděpodobnost P = 0,95 až 0,001 a pro počet stupňů volnosti N = 1 až 30.

N	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,004	0,016	0,064	0,15	0,46	1,07	2,71	3,84	5,41	6,64	10,83
2	0,103	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	4,61	5,99	7,82	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,67	6,25	7,82	9,84	11,34	16,27
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	7,78	9,49	11,67	13,28	18,47
5	1,15	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	9,24	11,07	13,39	15,09	20,52
6	1,63	2,2	3,07	3,83	5,35	7,23	10,65	12,59	15,03	16,81	22,46
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	12,02	14,07	16,62	18,48	24,32
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	13,36	15,51	18,17	20,09	26,13
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	14,68	16,92	19,68	21,67	27,88
10	3,94	4,87	6,18	7,27	9,34	11,78	15,99	18,31	21,16	23,21	29,59
11	4,57	5,58	6,99	8,15	10,34	12,90	17,28	19,68	22,62	24,73	31,26
12	5,23	6,30	7,81	9,03	11,34	14,01	18,55	21,03	24,05	26,22	32,91
13	5,89	7,04	8,63	9,93	12,34	15,12	19,81	22,36	25,47	27,69	34,53
14	6,57	7,79	9,47	10,82	13,34	16,22	21,06	23,69	26,87	29,14	36,12
15	7,26	8,55	10,31	11,72	14,34	17,32	22,31	25,00	28,26	30,58	37,70
16	7,96	9,31	11,15	12,62	15,34	18,42	23,54	26,30	29,63	32,00	39,25
17	8,67	10,09	12,00	13,53	16,34	19,51	24,77	27,59	31,00	33,41	40,79
18	9,39	10,87	12,86	14,44	17,34	20,60	25,99	28,87	32,35	34,81	42,31
19	10,12	11,65	13,72	15,35	18,34	21,69	27,20	30,14	33,69	36,19	43,82
20	10,85	12,44	14,58	16,27	19,34	22,78	28,41	31,41	35,02	37,57	45,32
21	11,59	13,24	15,45	17,18	20,34	23,86	29,62	32,67	36,34	38,93	46,80
22	12,34	14,04	16,31	18,10	21,34	24,94	30,81	33,92	37,66	40,29	48,27
23	13,09	14,85	17,19	19,02	22,34	26,02	32,01	35,17	38,97	41,64	49,75
24	13,85	15,66	18,06	19,94	23,34	27,10	33,20	36,42	40,27	42,98	51,18
25	14,61	16,47	18,94	20,87	24,34	28,17	34,38	37,65	41,57	44,31	52,6
26	15,38	17,29	19,82	21,79	25,34	29,25	35,56	38,89	42,86	45,64	54,05
27	16,15	18,11	20,70	22,72	26,34	30,32	36,74	40,11	44,14	46,96	55,50
28	16,93	18,94	21,59	23,65	27,34	31,39	37,92	41,34	45,42	48,28	56,89
29	17,71	19,77	22,47	24,58	28,34	32,46	39,09	42,56	46,69	49,59	57,45
30	18,49	20,6	23,36	25,51	29,34	33,53	40,26	43,77	47,96	50,89	59,70

Autoři:	Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D., MVDr. Dana Halová, Ph.D., Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D.
Název:	BIOLOGIE A GENETIKA – teorie ke cvičením
Ústav:	Biologie a choroby volně žijících zvířat
Počet stran:	90
Vydání:	První
Podpořeno:	Projektem OP VK reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287
Vydavatel:	VFU Brno

ISBN 978-80-7305-699-5