

Biologie a genetika – inovace cvičení v rámci řešení projektu OPVK

Nová cvičení z molekulární biologie

V zimních semestrech 2009/2010 a 2010/2011 byla do praktické výuky prvního ročníku na obou veterinárních fakultách v předmětu Biologie a genetika nově zařazena cvičení z molekulární biologie. Tato cvičení byla v rámci MSP spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky (Operační projekt Vzdělávání pro konkurenceschopnost „Inovace výuky v oblasti ochrany a welfare zvířat“, hlavní řešitel Doc. MVDr. Petr Chloupek, CSc.). V inovovaných cvičeních měli studenti možnost prakticky si vyzkoušet použití metod molekulární biologie k řešení jednoho komplexního úkolu. Úkol byl zvolen a navržen tak, aby studenti pochopili, k čemu se dají metody molekulární biologie využít v praxi, a aby je zároveň cvičení bavila. Jednalo se o určení pohlaví ptačího jedince v biologickém materiálu pomocí analýzy DNA.

Přístrojové a materiálové vybavení bylo zajištěno tak, aby bylo možné realizovat výuku paralelně ve dvou cvičebnách. V rámci jedné cvičebny byli studenti rozděleni do pracovních skupin a každá skupina měla k dispozici pipety, izolační soupravy a spotřební materiál. Každý student zpracovával jeden vzorek. Materiál k vyšetření byl pro studenty zajištěn, ale studenti si mohli k vyšetření přinést i vlastní materiál. Řada z nich této možnosti využila a přinesla krev většinou z papouška, u kterého si chtěla určit či ověřit pohlaví.

Vlastní praktický úkol byl rozložen do tří navazujících cvičení. Během těchto cvičení se studenti seznámili s metodami molekulární biologie, jako je izolace DNA, amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), restrikční štěpení PCR produktu, elektroforéza, vizualizace DNA a hodnocení výsledku. Na prvním cvičení studenti lyzovali vyšetřovaný materiál pomocí lyzačního pufru, enzymu proteinázy K a enzymu RNázy A. Ve druhém cvičení izolovali DNA z vyšetřovaného materiálu pomocí kolonkové izolační soupravy a připravili směs pro PCR reakci. Následně proběhlo seznámení s přístrojem termocyklerem, ve kterém PCR reakce probíhá. Studenti umístili své směsi do přístroje a už se těšili na příští týden, jak to vše dopadne.



Na začátku třetího cvičení nechali studenti PCR produkt štěpit restrikční endonukleázou *HaeIII*, připravili agarózový gel (obr. 1) a zařízení pro elektroforézu. Velkým zážitkem studentů bylo nanášení vzorku do jamek gelu (obr. 2). Bylo na nich vidět, jak se jim třesou ruce svázané neobvyklou odpovědností. Každý zvolil pro nanášení vzorků jinou taktiku. Někdo seděl, někdo stál, někdo si podepřel ruku, jiný ji měl volně ve vzduchu. Přestože to všichni dělali poprvé, byl výsledek vynikající a vyučující byli spokojeni. Mezitím co probíhala elektroforéza, byli studenti seznámeni s genetickým analyzátozem, jeho využitím a principem sekven-

ce DNA (viz článek Roubalová E., Literák I.: Sekvenátor již také na naší univerzitě. *Vita Universitatis* 4, 2009, 19). Po proběhlé elektroforéze následovala vizualizace rozštěpeného PCR produktu pod UV světlem na UV transiluminátoru (obr. 3).

Až v této fázi se studenti měli dozvědět výsledek svého třítydenního snažení. Bylo to pro ně i pro nás velmi napínavé. V gelu se objevil a pod UV světlem zářil jeden nebo dva „proužky“, podle toho jestli se jednalo o samce, nebo samici (obr. 4 a 5). Bylo hezké sledovat reakce studentů a jejich radostné výkřiky „já mám holku“ nebo „tužil jsem, že to bude kluk“. Kromě



Obr. 1. Příprava gelu pro gelovou elektroforézu



Obr. 2. Nanášení vzorku do jamek gelu

radostných výkřiků bylo slyšet i povzdech „mně to nevyšlo“ nebo „já nic nemám, nic tam nesvítí“. Následovalo vysvětlování, kde mohla nastat chyba a že se to stává i těm nejlepším vědeckým pracovníkům.

Z bezprostředních reakcí studentů na cvičeních, ale i na základě vyplněných dotazníků hodnocení výuky vyplývá, že tato cvičení byla studenty hodnocena jako přínosná a splnila jejich očekávání. Studenti také navrhli, co by bylo dobré zlepšit. Tyto návrhy a připomínky ze strany studentů nám budou sloužit k zkvalitnění tohoto tématu v příštích letech. Téměř všichni studenti se poprvé prakticky seznámili s metodami molekulární biologie a ověřili si, k čemu lze tyto metody využít. Zjistili také, že laboratorní či vědecká práce může přinášet napětí, radost, ale i zklamání, když něco nevyšází. Pochopili, že taková práce vyžaduje pečlivost, soustředěnost, logické uvažování a trochu štěstí.

Něco teorie

Pohlaví je u ptáků určeno pohlavními chromozomy Z a W, přičemž samičí pohlaví je heterogametické s chromozomy ZW a samčí pohlaví je homogametické s chromozomy ZZ. V homologní oblasti pohlavních

chromozomů leží gen kódující CHD (chromo-helicase-DNA-binding) protein, jenž se uplatňuje při modelaci chromatinu a má helikázovou aktivitu. Tento gen je konzervativní (vyskytuje se u širokého spektra organismů) a v rámci třídy ptáci s výjimkou fylogeneticky okrajových druhů např. z nadřádu běžců *Ratitae* nacházíme v intronové oblasti rozdíl mezi variantou ležící na chromozomu Z (CHD-Z) a variantou na chromozomu W (CHD-W). Tento rozdíl umožňuje na základě analýzy genetického materiálu odlišit pohlaví ptáků. Principem testu je PCR amplifikace genu CHD a rozlišení mezi variantou CHD-Z a CHD-W pomocí restrikční analýzy (Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1998, 1071–1075).

Restrikční enzym nazvaný *HaeIII*, který rozeznává sekvenci nukleotidů CCGG, štěpí místo přítomné v intronu genu CHD-Z, ale nikoli CHD-W. Během restrikční reakce se připraví agarózový gel s barvivem SYBR-Safe, do kterého jsou následně naneseny produkty restrikční reakce – každý student měl jednu jamku/dráhu v gelu. Po proběhnutí elektroforetické separace štěpených PCR produktů byla provedena vizua-



Obr. 3. Vizualizace rozštěpeného PCR produktu pod UV transiluminátorem I

lizace DNA pomocí UV světla – v případě samice byly na gelu patrné fragmenty DNA o dvou velikostech představující štěpený CHD-Z – přibližně o velikosti 300 bp (odštěpený fragment není při tak malém množství díky nízké fokusaci v gelu patrný) a neštěpený CHD-W – přibližně 350 bp; a v případě samce 1 fragment štěpeného CHD-Z.

A co na to studenti?

„Na začátku zimního semestru jsme se dozvěděli, že ve cvičeních z Biologie a genetiky proběhne změna oproti předchozím rokům spočívající v zařazení praktického molekulárně-biologického cvičení. Byli jsme na tento úkol docela zvědaví, protože analýzy DNA jsou a budou dost aktuální. Navíc když genetickému testování lépe porozumíme, budeme asi také lépe chápat vědecké metody v některých televizních krimi seriálech. Dostali jsme možnost přinést si vlastní materiál k vyšetření, např. pár kapek krve, kdyby nás zajímalo pohlaví u konkrétního ptačího jedince.

Na lavicích jsme měli připravené potřebné pomůcky, především čerstvou ptačí tkáň – játra z bažanta. Každé pracovní skupině (my jsme byli tři studenti) byla přidělena sada pipet, špičky a souprava pro izolaci DNA. Z připravené tkáň jsme si každý odebral malou část pro izolaci DNA. Nejprve bylo nutné tkáň rozložit, připravit tzv. lyzát, což se zdá být poměrně jednoduchá věc – ke tkáni se přidá lyzační pufr a enzym proteináza K a tkáň se dá zahřívát do termobloku na 56 °C.

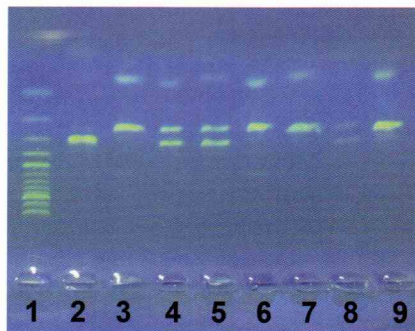
Vlastní izolace DNA proběhla v malém plastovém zařízení – kolonce. Kolonka má uprostřed křemičitý povrch, na který se DNA váže a kterým vše ostatní proteče do sběrné nádoby. Přelili jsme tedy do kolonky připravený tkáňový lyzát a dali ji do odstředivky. Po krátkém odstředění byla rozložena tkáň, tedy zeleno-hnědá tekutina, ve sběrné nádobce a DNA (doufali jsme) zachycena v kolonce. Pak následovala dvě promytí DNA v kolonce a po nich uvolnění DNA, odborně eluce, z kolonky vodou. Po poslední centrifugaci jsme tedy měli každý ve zkumavce svou izolovanou ptačí DNA v malém množství vody. Pokračovali jsme dalším krokem a tím byla příprava PCR.

V naší trojici jsme si připravili společnou směs Master Mixu, primerů a vody v objemu, který dostačoval pro naše 3 vzorky. Z této směsi jsme si každý odpipetoval do malé PCR zkumavky potřebné množství a přidal malé množství izolované DNA. Při práci s DNA se vůbec pracuje s velmi malými objemy, které jsou zpravidla v jednotkách či desítkách mikrolitrů – průměrná kapka vody má objem 50 µl. Vzorek s namíchanou PCR jsme vložili do termocykleru na konci cvičení, reakce probíhala necelé dvě hodiny a do příštího týdne byly PCR produkty uloženy v lednici.

Na to, abychom zjistili, zda se cílová DNA namnožila, nebo ne, bylo potřeba zachytit PCR produkt po elektroforéze na agarózovém gelu. Ale k tomu dojde až

po tzv. restriční reakci. Vlastní štěpení amplifikovaného produktu PCR probíhalo při 37 °C 45 min. V mezidobě jsme si připravili agarózový gel pro elektroforézu. Odvážili jsme určité množství polysacharidu agarózy, rozpustili v odměřeném množství elektrolytického pufru a důkladně povařili v mikrovlnné troubě. Rozvařenou agarózu jsme malinko ochladili a přidali barvivo, které nám umožní vidět (vizualizovat) DNA. Pak jsme roztok agarózy nalili do formičky (vaničky) a vložili tzv. hřebínek. Agaróza několik minut tuhla a vznikla tak gelová placka, ve které se po vyndání hřebínku vytvořily nanašecí jamky, do kterých se vkládá DNA. Agarózový gel jsme v zařízení pro elektroforézu zalili elektrolytickým pufrům a vložili do jamek PCR produkty po restričním štěpení.

Nebylo úplně jednoduché nanést PCR produkt do gelu – nikdo si nechtěl zkazit



Obr. 4. Gel po gelové elektroforéze (1 – velikostní standard, 2 – nerozštěpený PCR produkt, 3, 6, 7, 9 – samec, 4, 5, 8 – samice)

celý úkol tím, že mu teď všechno uplave. Po nanesení PCR produktů do gelu jsme pustili elektrický proud, abychom zahájili pohyb v elektrickém poli, tedy elektroforézu. Vizualně jsme ověřili, že proud probíhá a že vzorky putují správným směrem, a šli do laboratoře seznámit se s genetickým analyzátozem a principem sekvenování DNA. Po návratu do cvičebny jsme ukončili elektroforézu a umístili gel na UV transiluminátor, což je zdroj UV záření. Po rozsvícení UV světla jsme konečně viděli, jak vypadá „výsledek PCR na gelu“ – je to svítící proužek v určité vzdálenosti od nanašecí jamky. Tato vzdálenost ukazuje na velikost molekul DNA. Čím je větší molekula, tím se pohybuje v gelu pomaleji a vzdálenost od jamky je menší.

Já jsem měl proužky 2, tedy samičku, naštěstí stejně jako další mí spolužáci, kteří měli stejný zdroj tkáň jako já. Někteří spolužáci neměli v gelu nic: nevyšlo jim to. Na závěr jsme si ještě objasnili kroky, kde bylo možné udělat chybu. Pak jsem měl ještě o něco větší radost, že se mi analýza podařila.“

■ text: **MVDr. Eva Bártová, Ph.D.**

RNDr. Lenka Dubská, Ph.D.

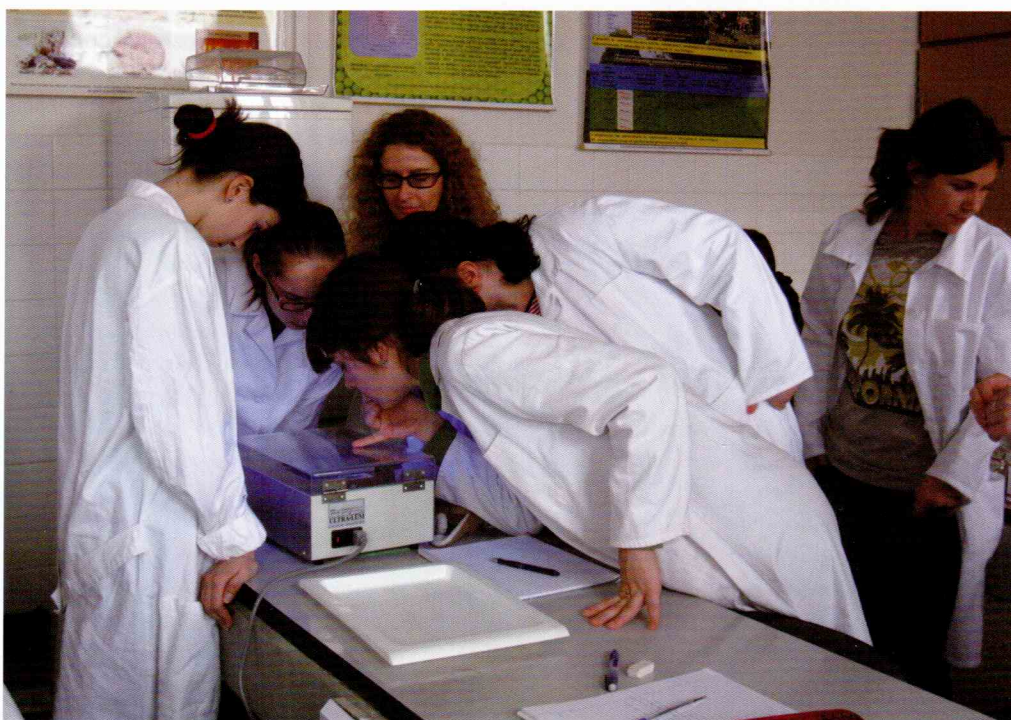
prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat FVHE

Petr Kruml

student 2. ročníku FVHE

foto: Ivan Literák, Eva Bártová



■ Obr. 5. Vizualizace rozštěpeného PCR produktu pod UV transiluminátorem II