

## Obor č. 12: Tvorba učebních pomůcek, didaktická technologie



# SBÍRKA ATRAKTIVNÍCH EXPERIMENTŮ Z BIOLOGIE

**Škola:** Klvaňovo gymnázium a střední zdravotnická škola  
Kyjov, třída Komenského 549/23, 697 01 Kyjov

**Konzultant:** Mgr. Stanislav Vosolsobě, Ph.D.

## Obsah

	Úvod .....	3
1.	<b>Mikrobiologická laboratoř</b>	
1.1	Úvod do problematiky .....	5
1.2.1	Návod – Sukcese na plotně .....	7
1.2.2	Návod – Testování látek s antimikrobiálními účinky .....	8
1.3	Praktická doporučení k experimentům .....	9
1.4	Protokol Sukcese na plotně .....	11
	Protokol Testování látek s antimikrobiálními účinky .....	14
2.	<b>Enzymologická laboratoř</b>	
2.1	Úvod do problematiky .....	19
2.2.1	Návod – Testování vzorků potravin na přítomnost katalázy .....	21
2.2.2	Návod – Demonstrace mechanismu účinku katalázy .....	22
2.2.3	Návod – Závislost aktivity katalázy na pH .....	23
2.2.4	Návod – Závislost aktivity katalázy na teplotě .....	24
2.3	Praktická doporučení k experimentům .....	25
2.4	Protokol Testování vzorků potravin na přítomnost katalázy .....	26
	Protokol Demonstrace mechanismu účinku katalázy .....	30
	Protokol Závislost aktivity katalázy na pH .....	32
	Protokol Závislost aktivity katalázy na teplotě .....	35
3.	<b>Fytohormonální laboratoř</b>	
3.1	Úvod do problematiky .....	39
3.2.1	Návod – Testování vlivu ethyleny na klíčení a dozrávání .....	41
3.2.2	Návod – Testování vlivu ethyleny na opad listů .....	42
3.3	Praktická doporučení k experimentům .....	43
3.4	Protokol Testování vlivu ethyleny na klíčení a dozrávání .....	45
	Protokol Testování vlivu ethyleny na opad listů .....	49
4.	<b>Fotosyntetická laboratoř</b>	
4.1	Úvod do problematiky .....	54
4.2.1	Návod – Fotosyntéza: role kyslíku a oxidu uhličitého .....	55
4.2.2	Návod – Fotosyntéza a dýchání .....	56
4.3	Praktická doporučení k experimentům .....	57
4.4	Protokol Pozorování průběhu fotosyntézy za různých podmínek .....	58
	Protokol Fotosyntéza a dýchání .....	61
5.	<b>Molekulárně – biologická laboratoř</b>	
5.1	Úvod do problematiky .....	64
5.2.1	Návod – DNA Origami – kreativní dílna .....	68
5.2.2	Návod – Šifra v DNA .....	69
5.2.3	Návod – Izolace DNA z různých biologických materiálů .....	74
5.3	Praktická doporučení k experimentům .....	75
5.4	Protokol DNA Origami – kreativní dílna .....	76
	Protokol Šifra v DNA .....	79
	Protokol Srovnání několika metod izolace DNA z různých materiálů .....	84
6.	<b>Bioinformační laboratoř</b>	
6.1	Úvod do problematiky .....	91
6.2.1	Návod – Čárové kódy života .....	94
6.2.2	Návod – Vytvoření fylogenetického stromu .....	97
7.	<b>Seznam použité literatury</b> .....	102

Vážený učitelé,

obracím se na Vás s prosbou o spolupráci. Jmenuji se Magdalena Ambrozková a v rámci své středoškolské odborné činnosti jsem sestavila, vypracovala a vyzkoušela návody na atraktivní experimenty z biologie. Nechtěla jsem kopírovat pokusy, které se v mírných obměnách uvádějí v středoškolských učebnicích biologie, ale přála jsem si vytvořit soubor zajímavých, inovativních a v některých případech i zcela originálních experimentů. Návody, které jsem vytvořila, obsahují i témata zpracovávající látku, která se na střední škole učí jen teoreticky, a praktické pokusy se v rámci středoškolského vyučování běžně nedělají.

Chtěla bych Vás požádat, zdali byste nebyli ochotni se zapojit do pedagogického výzkumu a některé z těchto experimentů otestovat během praktické výuky biologie. O průběhu testování mám tuto představu:

- z mé nabídky si vyberete několik (třeba i všechny) laboratorních úloh
- testování studenti budou rozděleni do dvou skupin  
Skupina 1) si vyslechne teoretický úvod do problému (dodám zpracováno do krátké přednášky v .ppt)  
Skupina 2) si vyslechne teoretický úvod + bude provádět praktický experiment podle návodu
- Ještě před provedením experimentu obě skupiny studentů vyplní krátký anonymní test, který zmapuje, jak porozuměli dané problematice
- S určitým časovým odstupem (asi 1 měsíc) obě skupiny vyplní krátký test velmi podobný předchozímu, který zmapuje, zda provedení experimentu přispělo k lepšímu pochopení a zapamatování si dané látky

Já v současné době studuji ve 2. ročníku na gymnáziu, takže mé hodnocení experimentální výuky na středních školách je poměrně subjektivní. Mě přírodní vědy, zejména biologie a chemie, velmi baví, a očekávala jsem, že během studia na střední škole budeme ve škole nabyté vědomosti a znalosti testovat i v praxi. Těšila jsem se, že své znalosti z chemie uplatním v praktikách z biologie a naopak. Moje očekávání se ale zatím nenaplnují.

Od roku 2016 dělám korespondenční seminář inspirovaný biologickou tematikou Biozvěst. Seminář má ročně 4 sady úkolů a v každé sadě je vždy i jeden praktický úkol. Tyto experimentální úlohy mě bavily nejvíce. Při jejich vypracovávání se ukázalo, že mohu dělat i velmi zajímavé a zdánlivě náročné experimenty, aniž bych byla vázána na laboratoř a laboratorní vybavení.

Proto jsem oslovila „duchovního otce Biozvěstu“ – Mgr. Stanislava Vosolsobě s dotazem, zda bych mohla zpracovat tyto praktické úlohy z minulých ročníků Biozvěstu a další tematicky podobné nebo atraktivní návody na experimenty do brožury, která by byla k dispozici jako doplněk k praktické výuce biologie na středních školách.

Inspiraci k prováděným experimentům jsem hledala nejen v Biozvěstu, ale v celé řadě učebnic, zejména starších, v návodech k laboratorním cvičením, v popularizačních článcích a videích, hlavně zahraničních, které se věnují popularizaci biologie a chemie.

Všechny vytipované úlohy jsem předem vyzkoušela, optimalizovala a opatřila poznámkami o jejich realizaci, dostupnosti materiálů, surovin a chemikálií.

Práce je rozdělena do 6 kapitol, každou kapitolu jsem tematicky pojmenovala jako „Laboratoř“ proto, že podobné experimenty se realizují ve specializovaných laboratořích s příslušným vybavením. Já jsem ale chtěla ukázat, že řadu pokusů lze provádět i v „jednoduchých“ podmínkách např. školní laboratoře nebo i v domácím prostředí – bez potřeb speciálního vybavení. Protože jsem neměla k dispozici žádné sofistikované měřicí přístroje, jsou mé experimenty hodnoceny spíše jen kvalitativně (reakce proběhla, plyn se uvolnil, roztok se odbarvil, listy opadaly, bakterie nerostly apod.) než kvantitativně.

Každá kapitola obsahuje čtyři podkapitoly:

- teoretický úvod do problému, popis experimentu včetně hlubšího vniku do problematiky, rozbor možných úskalí nebo variací pokusu.
- stručný návod k experimentu
- rozšířenou diskusi k experimentu, popis optimalizace pokusu, dostupnost materiálu apod.
- vzorový protokol/protokoly v rámečku, tak jak jsem experiment prováděla já, který by měl sloužit jako vzor a předjímat očekávané výsledky experimentu

**Mikrobiologická laboratoř** si klade za cíl v konkrétních pokusech zviditelnit mikroorganismy nacházející se v našem okolí. V úvodu do problematiky jsem chtěla akcentovat význam bakterií v pozitivním kontextu. Proto jsem požádala o svolení Dr. Radkina Honzáka, zdali mohu použít a distribuovat jeho text „Enterální mozek a mikrobiom“, který je součástí knihy Psychosomatická prvouka<sup>[1]</sup> a populárně naučným způsobem dokládá, jak důležitou roli hrají mikroorganismy v našem těle a v našem bezprostředním okolí. Honzákův text (se svolením autora) přikládám zvlášť, jako pdf soubor je dostupný na Google disku. Protože jde o delší text, doporučuji dát ho studentům k dispozici předem jako samostudium, případně text rozdělit na několik tematických částí, které by studenti zpracovali formou referátu.

Pokusy v této kapitole jsou koncipovány tak, že je mohou provádět studenti (nebo skupiny) dle poskytnutého návodu samostatně a mají i výzkumný charakter – studenti zjišťují nové skutečnosti, případně si ověřují své předpoklady.

V **Enzymologické laboratoři** dochází k prolínání učiva chemie a biologie. Jako experimentální model jsem si vybrala enzym katalázu. Pokusy s katalázou velmi didakticky charakterizují tento enzym a jeho závislost na reakčních podmínkách. Experimenty lze pojmut i badatelsky, např. zjišťováním míry aktivity katalázy v různých biologických materiálech (které studenti chtějí otestovat, nebo které si sami přinesou) a jejich vzájemné srovnávání.

**Fytohormonální laboratoř**, alespoň pro mě, skýtá velký badatelský potenciál. Zde se mým experimentální modelem stal fytohormon ethylen. Při plánování svých experimentů jsem vycházela z faktu, že ethylen se uvolňuje ze zrajícího ovoce a jako plyn může ovlivňovat i rostliny ve svém bezprostředním okolí. Vyrobila jsem jednoduchou „ethylenovou komoru“ – uzavíratelnou skleněnou nádobu, kterou je možné použít k úspěšnému prokazování vlivu ethylenu na klíčení rostlin, dozrávání ovoce nebo opadávání listů.

**Fotosyntetická laboratoř** má snahu zatraktivnit teoreticky probírané učivo o fotosyntéze a buněčném dýchání. Z vlastní zkušenosti vím, že toto téma, k jehož pochopení je potřeba mít alespoň základní fyzikální, chemické i biologické znalosti, není u mých spolužáků příliš oblíbené. S potěšením jsem zjistila, že i ve světě řada pedagogů řeší, jak tuto problematiku zatraktivnit a přiblížit studentům. Objevila jsem biochemické komiksy Dr. Hoslera z Juniata College v Pensylvánii<sup>[2]</sup>, s jehož svolením jsem komiksy o fotosyntéze a dýchání přeložila do češtiny. Komiks o fotosyntéze je jako příloha 1 součástí této sbírky, komiks o dýchání je dostupný jako pdf soubor na Google disku.

**Molekulárně biologická laboratoř** se v mém podání snaží prakticky přiblížit tento obor, který je na středních školách vyučován z větší části jen abstraktně. Přitom jde o disciplínu, která v posledních letech prodělává téměř raketový rozvoj a její metody jsou běžně využívány v téměř každém biologickém a medicínském odvětví. I při tvorbě této „laboratoře“ jsem se nechala inspirovat zahraničními edukativními portály a nabízím možnost, jak alespoň trochu prakticky přiblížit manipulace a experimenty, které jsou jinak striktně vázány na nejmodernější výzkumná pracoviště a laboratoře se sofistikovaným vybavením.



**Bioinformační laboratoř** v sobě zahrnuje témata, která se, myslím, na středních školách zatím nevyučují, nebo jen okrajově. Přitom bioinformatika zpracovává poznatky z genetiky a molekulární biologie, jedněch z nejrychleji se rozvíjejících přírodních věd, jak jsem již psala dříve, nepostradatelných pro většinu biologických disciplín. Přitom jde o soubor moderních přístupů, které dnešní „digitální generace“ studentů dobře a snadno přijme, pokud jí to bude vhodným způsobem vysvětleno a zprostředkováno. Já jsem se s tímto tématem setkala jednak při řešení úloh z Biozvěstu, a také na týdenním workshopu MOLBIB na JU v Českých Budějovicích, kde jsme izolovali vlastní DNA, pomocí PCR jsme si připravili mtDNA, a tu jsme nechali sekvenovat. Pak jsme společně prováděli genetickou analýzu konzervovaných oblastí a pomocí práce s databázemi jsme mohli odhalit původ naší vlastní mateřské linie (tzv. mitochondriální Evu). Tato práce pro mě byla obrovsky zajímavá a moc mě to bavilo. V této kapitole nabízím návod, jak se jednoduše zorientovat v dostupných molekulárně-biologických databázích, jak si vyhledat data, která mě zajímají, jak je možné jednotlivá data mezi sebou porovnávat a zjišťovat tak např. míru příbuznosti nebo konstruovat fylogenetické stromy.

# 1. MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ

## 1.1 Úvod do problematiky

S tématy, které se nějakým způsobem dotýkají mikrobiologie, se setkáváme na gymnáziu v biologii již v 1. ročníku. Většině studentů z těchto hodin utkví v paměti pasáže o patogenních mikroorganismech, dokáží přiřadit patogenního původce k příslušné nemoci a popsat její příznaky. Já bych však chtěla poukázat na to, že s mikroorganismy se nepotkáváme jen, když jsme nemocní, mikroorganismy jsou všude kolem nás a také v nás – jako součást našeho těla. A zdaleka ne všechny jsou patogenní, s většinou z nich umíme nějak vycházet a některé jsou pro fungování našeho těla naprosto nepostradatelné.

V knize MUDr. Radkina Honzáka Psychosomatická prvouka<sup>[1]</sup> je kapitola věnovaná mikrobiomu – čili mikroorganismům, kteří obývají naše těla. Tato látka je v knize velmi poutavě zpracovaná, včetně citací a odkazů na renomované odborné práce. Doporučuji, aby si studenti (doma) tento text přečetli (text je poměrně dlouhý – takže se dá rozdělit na několik témat – studenti by si tato témata rozebrali a hodina by mohla začít sérií krátkých referátů). Jsem si jistá, že toto samostudium určitě ztraktivní předkládané úlohy z mikrobiologie.

V těchto úlohách bych chtěla ukázat, jak lze bez použití speciální techniky mikroorganismy kolem nás „zviditelnit“ a prozkoumat projevy jejich života. Při tom bych ráda „napodobila“ klasické mikrobiologické metody, ovšem v podmínkách běžné školní laboratoře nebo i domácího prostředí.

### Mikrobiologická laboratoř

Jestliže chceme mikroorganismy kolem nás zviditelnit a pozorovat pouhým okem, musíme je pěstovat a pomnožit do takového množství, aby vytvořily buď zákal (pokud se pěstují v tekuté kultuře) nebo kolonii (pokud se pěstují na pevné živné půdě – např. na Petriho miskách).

#### Živná média

Jde o prostředí, ve kterém mikroorganismy rostou. Mělo by obsahovat:

- zdroj energie
- zdroj uhlíku, dusíku
- biogenní a oligobiogenní prvky
- vhodné pH a vhodnou teplotu

Konkrétně si pod tímto výčtem můžete představit např. poctivý masový osolený vývar (polévku).

Pokud má být živná půda pevná, musí se přidat nějaký zpevňovací prostředek, nejčastěji to bývá agar nebo želatina.

#### Agar

Je to polysacharid, který se získává z mořských řas. Mikroorganismy ho prakticky nerozkládají. Ve vodě se „rozptýlí“ při teplotě kolem 100°C a tuhne při teplotě 40 – 50°C. Místo agaru je možné použít i běžně dostupné cukrářské želé, které rovněž obsahuje agar jako želírující látku.

#### Plotny – Petriho misky

Jsou to skleněné nebo plastové kruhové misky s volně přiléhajícím víčkem. Petriho misky lze nahradit i jiným typem skleněné nádoby, např. nízkou zavařovací sklenicí s víčkem. Miska se do určité výšky zalije tekutým agarem a nechá ztuhnout. Takovouto nalitou misku v mikrobiologii označujeme jako plotnu. Po ztuhnutí agaru se na plotny vysévají nebo očkují mikroorganismy. Ztuhlé, ale nezaočkované plotny lze také uschovat (cca až po dobu 1 týdne) v chladničce pro pozdější použití.

### **Aseptická práce**

Obecně všechny mikrobiologické techniky se provádějí v prostředí, které by mělo být sterilní. Všechny pomůcky a materiály, se předem sterilizují, pracuje se ve sterilních boxech. Tyto boxy disponují protiproudem vzduchu, který zabraňuje průniku nesterilního vzduchu dovnitř (proti člověku fouká sterilní vzduch). Takové prostředí při domácích experimentech navodíme jen těžko, přesto se ale vyplatí snažit se pracovat co „nejčistěji“. Petriho misky – pokud jsou skleněné, „sterilizujeme“ v troubě, cca 20 minut při 150°C. Pokud jsou plastové, tak nesterilizujeme.

Hlavně je nutné omezit pohyb rukou nad otevřenou miskou, při práci v jedné ruce držet víčko a jím svrchu krýt misku, druhou rukou se pracuje – při nedostatku zkušeností a praxe je lépe pracovat např. ve dvojicích (jeden drží víčko, druhý pracuje), aby manipulace s plotnami byla co nejrychlejší. Při práci nemluvit.

### **Kultivace mikroorganismů**

Po zaočkování nebo přenesení mikroorganismů na živná média (agarové plotny) se mikroorganismy množí. Každý z nich má nějaké své teplotní optimum (obvykle nepřesahující 37°C), ale běžně vyrostou i při pokojové teplotě (20 – 22° C), jen to bude trvat o něco déle. Obecně se hodí mít něco jako kultivační box – může to být i větší uzavíratelná papírová krabice, kde budou uloženy rostoucí plotny. Plotny by se měly kultivovat dnem vzhůru, kvůli kondenzaci vody na víčku. Pokud chceme plotnu s již narostlými koloniemi po krátkou dobu uchovat, uložíme ji v chladničku, tím se růst bakterií významně zpomalí.

### **Zásady bezpečnosti práce**

Já jsem pracovala s nepatogenními kmeny mikroorganismů – jejich zdrojem bylo mé bezprostřední okolí. I tak se určitě vyplatí pracovat s jistou bezpečností a opatrností, protože tím, že se bakterie kultivují – dojde k jejich pomnožení – z jedné buňky, která „poletuje“ v ovzduší nám na plotně naroste miliarda buněk a kdybychom je např. (nedopatřením) pozřeli, mohou nám způsobit velké problémy. Dalším nebezpečím jsou plísňe, které samozřejmě na kultivačních plotnách velmi ochotně vyrostou. Jakmile jsou plotny porostlé plísněmi, je lepší je vůbec neotevírat, aby se spory a hyfy nedostaly do vzduchu, kde bychom je mohli vdechnout.

### **Likvidace ploten**

Plotny porostlé mikroorganismy zlikvidujeme tak, že po odklopení víčka polijeme agar čistícím prostředkem na bázi chlornanu (např. SAVO), odstraníme ho z Petriho misky a zlikvidujeme jako organický odpad (alternativou je povaření v tlakovém hrnci). Skleněné misky se samozřejmě umyjí a recyklují, plastové misky se dají také recyklovat, běžně se však v laboratořích používají jen jednou.

„Mikrobiologická laboratoř“ obsahuje návody na dvě úlohy + protokoly, které jsem k těmto úlohám vypracovala. Při psaní protokolů jsem se řídila zásadami, které se doporučují při psaní protokolů v Biologickém korespondenčním semináři Biozvěst<sup>[3]</sup>

Jde o tom, že všechny protokoly by měly mít jednotnou formu, která je identická pro psaní jakékoli vědecké práce.

### **1.2.1 Sukcese mikroorganismů na plotně s bujónovým agarem**

#### **Časová dotace:**

Příprava ploten přibližně 60 minut, růst kolonií 4–5 dnů

#### **Pomůcky a materiál:**

Petriho misky  
bujón (masox)  
agar  
voda

#### **Postup práce:**

Připravíme si živné médium. Svaříme 500 ml vody a rozpustíme jednu kostku bujónu. Směs přefiltrujeme přes filtrační papír (tím se odstraní drobná „zelenina“ a část tuku). Do filtrátu rozpustíme 5 g agarů a znovu přivedeme k varu. Opatrně ale pokud možno rychle nalijeme směs do Petriho misek. Necháme zchladnout. Z tohoto množství se dá nalít přibližně 10–12 ploten (Petriho misek) o průměru 9 cm.

Po ztuhnutí opatrně setřeme vodu z horního víčka, která se tam vysrážela. Plotny necháme odkryté (např. 1 hodinu) na různých místech, poté přiklopíme víčko a kultivujeme při pokojové teplotě. Na jiné plotny můžeme opatrně poklepat bříšky prstů, na další zase otisknout nějaký předmět (např. minci, list, klíč).

Pozorujeme mikroorganismy, které začínají růst na plotnách.

#### **Výsledky a závěr:**

Každý den průběžně kontrolujeme nárůst na plotnách. Jako první se již druhý den objeví drobné bakteriální kolonie. Poté se mohou objevit i kolonie kvasinek. Druhý až třetí den na plotnách můžeme pozorovat mimo bakteriálního nárůstu také plísně. Dokumentujeme fotografiemi nebo nákresem. Pokud se na plotnách objeví plísně, neodklopujeme víčka.

### 1.2.2 Testování účinnosti čistících a dezinfekčních prostředků a dalších látek na růst mikroorganismů

#### Časová dotace:

testování cca 30–60 minut, růst kolonií 1–2 dny

#### Pomůcky a materiál:

Plotny s narostlými koloniemi z předchozí úlohy

nepoužité plotny s živným médiem

kolečka vystřižená (nebo vyražená pomocí raznice) z filtračního papíru

dřevěná párátka s plochým koncem

mikrobiologická „hokejka“ (skleněná zahnutá tyčinka, lze použít i malou kovovou lžičku)

pinzeta

technický líh

kahan (zapalovač)

různé desinfekční a čistící prostředky, které budeme testovat (doporučuji ponechat na kreativitu studentů, ať si každý přinese z domova přípravek, u kterého bude ověřovat antibakteriální vlastnosti)

#### Postup práce:

Vybereme plotnu z předchozí úlohy, např. tu, kde jsou kolonie mikroorganismů narostlé z otisků prstů. Plotny, na kterých jsou patrné plísně, nebudeme používat. Skleněnou mikrobiologickou hokejku sterilizujeme tak, že ji smočíme v lihu a necháme „ohořet“. Počkáme, až hokejka zchladne a poté hokejkou jemně, ale rychle, rozetřeme narostlé kolonie, pokud možno po celé plotně. Kolečka z filtračního papíru, které jsme (zabalené v alobalu) sterilizovali společně s Petriho miskami troubě, namáčíme pinzetou do testované látky a poté klademe na plotnu s rozetřenými koloniemi. Další dny sledujeme, jak rostou mikroorganismy v bezprostřední blízkosti koleček s testovanými látkami. Dokumentujeme fotograficky nebo nákresem.

#### Výsledky a závěr:

Některé z testovaných přípravků (např. antibakteriální mýdla, jodová tinktura, SAVO apod.) projeví svůj antibakteriální potenciál tím, že v jejich blízkém okolí bude zóna bez nárůstu kolonií – tzv. inhibiční zóna. Čím větší tato zóna je, tím vyšší antibakteriální účinek daná látka má. U těchto přípravků se pak snažíme dohledat účinnou látku (informace v příbalovém letáku apod.), která má na bakterie letální (smrtící) účinek.

Může se stát, že na plotně, kterou jsme testovali, vyrostly společně bakterie i kvasinky. Testovaná látka sice může mít antibakteriální účinky, ale na kvasinkové (eukaryotické) buňky nebude působit. Pokud chceme testovat pouze bakterie (to je samozřejmě při prokazování ANTIBAKTERIÁLNÍCH účinků vhodnější), pak si vybereme z narostlé plotny jednu bakteriální kolonii – ověříme pod mikroskopem – pokud se bude jednat o kvasinky, uvidíme kulaté buňky, pokud se bude jednat o bakterie, bez obarvení pravděpodobně neuvidíme nic. Bakteriální kolonii přeneseme (např. sterilním dřevěným párátkem) do kapky vody na „čisté plotně“ a opatrně rozetřeme mikrobiologickou hokejkou. Dále postupujeme stejně.

### 1.3 Jak vznikaly tyto úlohy – praktická doporučení

Petriho misky – používám skleněné Petriho misky, protože se v domácích podmínkách dají „lépe sterilizovat“ a po umytí a vyčištění se mohou recyklovat. Zakoupeno zde:

<https://www.verkon.cz/sklenene-petriho-misky/>

#### Bujón

Nejvíce se mi osvědčil bujón od Vitany - <https://vitana.cz/produkty/bujony/masox/masox-12-kostek>, mikroorganismy na něm dobře rostou, takže zřejmě neobsahuje žádný konzervant. Já jsem používala při svých experimentech jednu kostku na 500 ml živného média. Do této směsi jsem přidávala agar, tak aby výsledná koncentrace byla 1% (čili na množství 500 ml jsem přidávala 5 g agaru).

#### Agar

Používala jsem tento typ agaru –

<https://www.naturaljihlava.cz/produkt/204/agar-agar-natural-10g>

Běžně dostupný v prodejnách se zdravou výživou, cena za 10 g je přibližně 20 Kč

#### Mikrobiologická hokejka

Objednávala jsem na serveru aliexpress - <https://www.aliexpress.com/item/10pcs-Glass-Bacterial-Cell-Spreaders-Lab>, bohužel musím upozornit na velmi dlouhé dodací lhůty. V současnosti se nejvíce používají jednorázové plastové sterilní hokejky [https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=423&product\\_id=105](https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=423&product_id=105)

Nejsnadnější je vyrobit si vlastní hokejku v chemickém praktiku ze skleněné tyčinky (ohnutím nad plamenem)

#### Sterilizace Petriho misek a živného média

Petriho misky jsem vyskládala na plech a sterilizovala v troubě cca 20 minut při 180°C. Pokud jsem misky okamžitě nepoužila k nalévání ploten, obalila jsem je předem do alobalu a takto zůstaly relativně sterilní i pro další použití. Pokud jsem misky ihned po sterilizaci nalévala, do alobalu jsem je nebalila. Když jsem chtěla mít jistotu, že na plotnách po ztuhnutí bude co nejméně kontaminace, nechala jsem již nalité a uzavřené plotny v troubě ještě asi 10 minut při 120°C. Plotny jsem většinou nechávala „sušit“ cca 24 hodin po nalití, víčko jsem neodklápěla. Před použitím ploten však bylo většinou nutné ještě ubrouskem setřít vodu, která se vysrážela na horním víčku. Pokud jsem plotny po ztuhnutí ihned nepoužila, zabalené v mikrotenových sáčkích jsem je uchovávala v chladničce dnem vzhůru.

#### Technika testování pomocí koleček z filtračního papíru

K této metodě jsem se dopracovala po předchozích ne moc úspěšných pokusech, kde jsem se podle různých návodů snažila vyhloubit v agaru „jamku“ a testovanou látkou tuto jamku naplnit. Vůbec se mi to nedařilo, ani korkovrtem – jak je v různých protokolech doporučováno. Jamky takto vyrobené neměly stejnou velikost a esteticky nevypadaly dobře. Taky manipulace s plotnou a korkovrtem, případně lžičkou byla zdoluhavá a hrozilo, že se plotna různými zbytečnými zásahy zkontaminuje. Proto jsem zkusila vystříhnout z filtračního papíru kolečko, které jsem vložila do testované látky a poté se položila na plotnu. Tato metoda se mi osvědčila nejlépe – kolečka jsem pak dělala pomocí raznice z kreativní sady na tvoření s papírem (průměr kolečka je 12 mm). Zásobu koleček jsem zabalila do alobalu a sterilizovala společně s Petriho miskami.

### Testování různých přípravků

Testovala jsem postupně poměrně velké množství látek, které byly k dispozici u nás doma. Během jednoho z testování jsem zjistila, že velmi dobré antibakteriální účinky mají éterické oleje (silice), které se používají v aromaterapii. Rozhodla jsem se proto testovat asi 8 silic na jedné plotně, abych zjistila, která má antibakteriální účinky nejvyšší. Jaké však bylo mé překvapení, když na testované plotně nevyrostla téměř žádná kolonie. Silice jsou svou povahou těkavé látky, takže vytékaly z filtračních koleček do uzavřeného prostoru Petriho misky, kde se projeví jejich silné antibakteriální účinky, takže zřejmě proto byl nárůst kolonií na této plotně minimální.

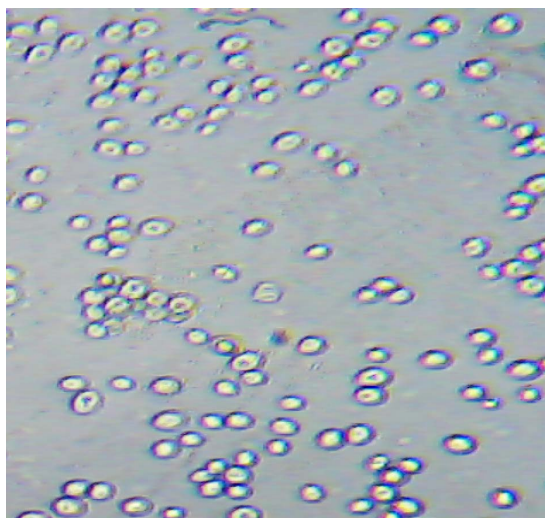
Nejvyššího antibakteriálního účinku lze samozřejmě dosáhnout, použijeme-li nějaké antibiotikum (nedobrané léčivo, např.), vysoce účinné jsou všechny přípravky na bázi chlornanu sodného, které eliminují růst nejen bakterií, ale i kvasinek.

### Dokumentace a hodnocení testovaných ploten

Antibakteriální účinek se dá zhodnotit (změřit) tak, že milimetrovým pravítkem měříme velikost inhibiční zóny od filtračního kolečka, kde nenarostly žádné kolonie. Toto měření lze provádět většinou již 24 hodin od začátku testování. Plotny se dají dobře fotit, nebo dají naskenovat (ze spodní strany, samozřejmě).

### Identifikace kolonií

Pro některé z těchto úloh je klíčové rozlišit, zda jde o kolonie bakteriální nebo kvasinkové. Pouze pozorováním kolonií a jejich morfologie bez použití mikroskopu nejsme schopni jednoznačně a spolehlivě určit, o jaký typ organismu se jedná (bakterie nebo eukaryota). V tomto případě je nejspolehlivější ověření pomocí nativního mikroskopického preparátu. Připravíme si dřevěné párátko a jeho koncem nabere malý kousek kolonie a dobře rozmícháme do malého množství vody. Na podložní sklíčko pak přeneseme kapku této suspenze (lépe ještě do kapky vody), přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme při běžném zvětšení (např. 45x). Pokud je kolonie bakteriální, tak na nebarveném preparátu při tomto zvětšení neuvidíme nic, pokud je kolonie kvasinková, měli bychom vidět přibližně tento obrázek:





# Sukcese mikroorganismů na plotně s bujónovým agarem

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Připravila jsem si agarové plotny s bujónem a nechala jsem na nich růst bakterie z okolního prostředí (nechala jsem je stát na vzduchu, poklepala na ně prsty nebo obtiskla celou ruku atd.). V následujících dnech jsem na této plotně pozorovala sukcesi.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Petriho misky
- Bujón (masox)
- Agar
- Voda

## POSTUP PRÁCE

---

Skleněné Petriho misky jsem zabalila do alobalu a sterilizovala jsem je v troubě přibližně 20 minut při 180°C. Misky jsem nechala v troubě zabalené zvolna vychladnout. Živné médium jsem připravovala následovně: Do 500 ml vody jsem dala jednu kostku bujónu, uvařila a nechala zchladnout. Následně jsem vývar přefiltrovala a tím jsem se zbavila drobných kousků koření a také části tuku. Vývar jsem znovu zahřála a přidala 5 g agaru, takže jsem vytvořila 1% roztok. Misky jsem vytáhla z trouby, vybalila z alobalu a nalila plotny. Živné médium jsem nechala zatuhnout a poté otřela vysráženou vodu ze svrchního víčka Petriho misky. Některé plotny jsem nechala cca 60 min otevřené, na jiné jsem obtiskla prsty, nebo celou ruku.

## VÝSLEDKY

---

Každý den jsem pořídila fotografii Petriho misky, a tak jsem mohla pozorovat průběh sukcese.

### 1. DEN

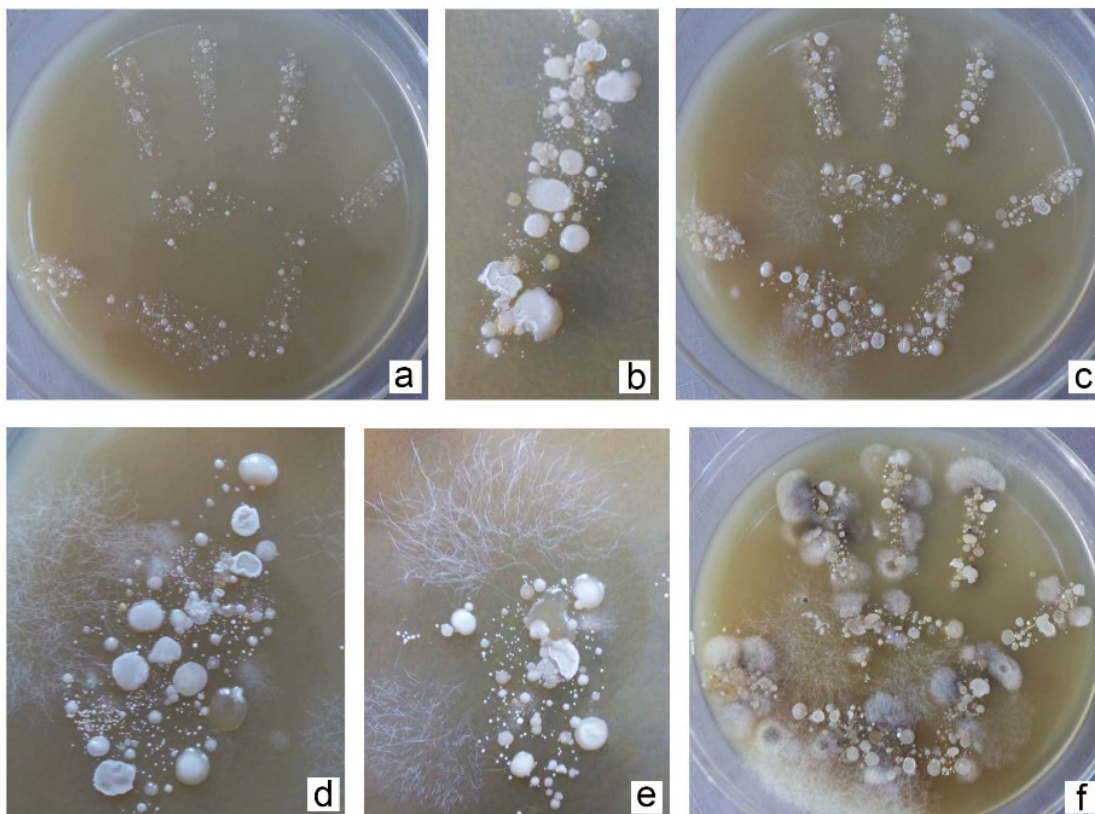
Již po 24 hodinách jsem na plotně zaznamenala nárůst kolonií – pravděpodobně bakteriálních. Kolonie byly menší, kulaté a spíše „matné“. Nárůst kolonií poměrně přesně kopíroval otisk ruky.

### 2. DEN

Druhý den se na plotně objevily další kolonie různých tvarů a barev, některé byly lesklé a vypouklé – pravděpodobně některé z nich byly kolonie kvasinek (Ascomycota). Mimo samotný otisk ruky také začaly růst plísňe.

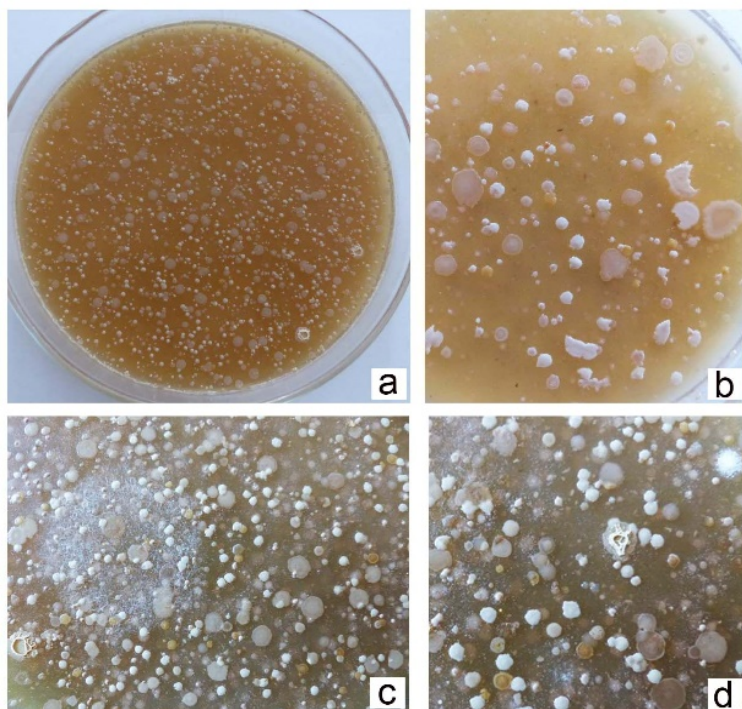
### 3. DEN

Třetí den jsem misku jen rychle otevřela a vyfotila a následně zlikvidovala kvůli sporám plísni, které přerostly ostatní kolonie.



**Obrázek 1:** Sukcese na plotně: **a)** plotna první den; **b)** detail nárůstu první den; **c)** plotna druhý den; **d-e)** detail nárůstu druhý den; **f)** plotna třetí den

Další misku jsem nechala dvě hodiny otevřenou na pracovním stole. Nárůst kolonií se objevilo již druhý den. Třetí den byl dobře patrný rozdíl v morfologii mezi jednotlivými koloniemi. Mohla jsem pozorovat morfologickou variabilitu jednotlivých kolonií (tvar, barva).



**Obrázek 2:** Morfologie kolonií: **a)** nárůst na plotně otevřené 2 hodiny na pracovním stole; **b-d)** morfologie kolonií po třech dnech růstu při pokojové teplotě

## DISKUZE

---

Tento experiment je demonstrační – pokoušela jsem se zviditelnit mikroorganismy, které nás bezprostředně obklopují. Zajímavá varianta tohoto pokusu by bylo testování umytých a neumytých rukou otiskem na plotnu. Je dobré si ale uvědomit, že mikroorganismů, které nás obklopují, je daleko více, než se mi jich podařilo zachytit na plotně s bujónem. Je to proto, že spoustu bakterií nebo archeí prostě kultivovat – pěstovat vůbec neumíme, že neumíme najít prostředí, ve kterém bychom je mohli nechat vyrůst natolik, aby se daly zkoumat a pozorovat např. pouhým okem.

Také přesnější určování kolonií pozorováním nárůstu na plotně je poměrně obtížné. Kolonie totiž nejsou jen miliardy bakterií nahloučených na jednom místě – bakterie v tomto malém ekosystému velmi pravděpodobně mezi sebou spolupracují a interagují. Tím se dá vysvětlit i pozorování, kdy stejný typ bakterie vytváří různé typy kolonií, podle toho, jestli je pěstován v teple/chladu nebo v kyselém/zásaditém prostředí nebo pokud jim chybí nějaká důležitá živina.

Takže například takové „kvasinky“ – lépe Ascomycota, mohou v běžných podmínkách tvořit klasické bílé vypouklé kolonie, které snadno zaměníme za bakteriální, za jiných podmínek, se ale budou naopak chovat jako „správné“ houby a vytvoří hyfy. Takže pokud chceme vědět, co přesně nám na plotně vyrostlo, určitě je potřeba zhotovit barvené preparáty a pozorovat pod mikroskopem.

Určitá vodítka, jak rozlišit, jestli je kolonie bakteriálního nebo houbového původu ale přece jen máme. Obecně by mělo platit, že bakterie mají teplotní optimum při 37°C, a zatímco kvasinky při 30°C. A dále – většina kvasinek preferuje kyselejší prostředí – s pH kolem 5, zatímco běžné bakterie mají rády pH neutrální. Takže pokud by se připravily nové bujónové plotny, u kterých by se upravilo pH (na 7 a 5, např.) a již narostlé kolonie by se pomocí sterilního párátko „přečárkovaly“ na oba typy ploten, dalo by se vyhodnotit (podle rychlosti růstu a velikosti kolonií), na které plotně rostou lépe (předpoklad – kvasinky by měly prosperovat na kyselé plotně, zatímco bakterie na neutrální plotně).

Ovšem nejrychlejší identifikaci kolonií provedeme pomocí rychlé mikroskopie. Dřevěným párátkem nebo špejlí nabere malý kousek kolonie a dobře rozmícháme v malém množství vody. Na podložní sklíčko pak přeneseme kapku této suspenze (lépe ještě do kapky vody), přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme při běžném zvětšení (např. 45x). Pokud je kolonie bakteriální, tak na nebarveném preparátu při tomto zvětšení neuvidíme nic, pokud je kolonie kvasinková, měli bychom vidět přibližně tento obrázek:

## ZÁVĚR

---

Na plotnách jako první vyrostly drobné bílé kolonie, velmi pravděpodobně bakteriální. V následujících dnech se začaly objevovat další kolonie různých tvarů i barev. Jako poslední (2–3 den) byly patrné plísňe, které poté přerostly celou plotnu.

# Testování účinnosti čisticích a dezinfekčních prostředků a dalších látek na růst mikroorganismů na plotnách s bujónem

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Testovala jsem vliv různých dezinfekčních prostředků, čisticích prostředků a léčiv na růst kolonií mikroorganismů na agarové plotně s bujónem. Na plotny jsem přikládala kolečka z filtračního papíru namočená v prostředcích a hodnotila jsem nárůst, resp. inhibici růstu kolonií v okolí těchto koleček.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Plotny s narostlými koloniemi z předchozí úlohy
- nepoužité plotny s živným médiem
- kolečka vystřižená (nebo vyražená pomocí raznice) z filtračního papíru
- dřevěná párátka s plochým koncem
- mikrobiologická „hokejka“ (skleněná zahnutá tyčinka)
- různé desinfekční a čisticí prostředky určené k testování
- léčiva (antibiotika)
- cibule a česnek (čerstvě vylisovaná šťáva ze stroužků a z cibule)
- pinzeta
- technický líh
- kahan (zapalovač)

## POSTUP PRÁCE

---

Na čerstvě nalitou plotnu jsem do středu kápala kapku převařené vody a do této kapky jsem párátkem přenesla a opatrně rozmíchala jednu dobře narostlou bakteriální kolonii z předchozí úlohy. Pak jsem provedla sterilizaci mikrobiologické hokejky – do misky jsem si nalila líh, namočila jsem do něj mikrobiologickou hokejku, zapálila ji a nechala zchladnout. Sterilní hokejkou jsem pak kapku dobře rozetřela po celé ploše plotny. Tuto plotnu jsem označila jako č. 1. Následně jsem opět sterilizovala hokejku a poté jemně rozetřela kolonie na plotně č. 2 – vybrala jsem jednu z ploten z předchozí úlohy – tu která obsahovala mikrobiální nárůst z otisků prstů (ale ne viditelné plísňe).

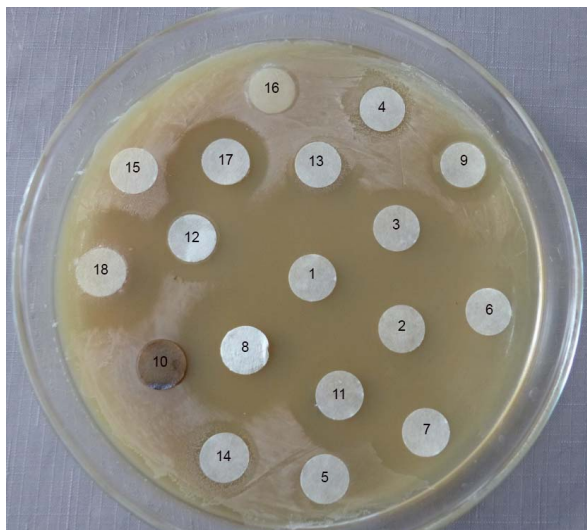
Z filtračního papíru jsem raznicí vyrobila kolečka o stejné velikosti, která jsem předem sterilizovala v troubě zabalené v alobalu. Pinzetou jsem vzala sterilní kolečko, namočila jsem ho do testovaného prostředku a opatrně položila na plotnu. Na papír jsem si sepsala a očíslovala všechny látky, které jsem k testování použila. Petriho misky jsem si označila lihovým fixem ze spodní strany (každému kolečku jsem přiřadila příslušné číslo).

Plotny jsem nechala růst asi 3 dny a postupně jsem vše dokumentovala fotoaparátem nebo jsem skenovala spodní stranu Petriho misky s čísly.

# VÝSLEDKY

## NÁRŮST KOLONIÍ NA PLOTNĚ Č. 1

Plotna č. 1 byla připravena tak, že na ní byly zaočkovány mikroorganismy pocházející z jedné konkrétní kolonie, o které jsem se domnívala, že je bakteriální. Takže vlastně všechny buňky, které mi na této plotně vyrostly, byly identické. Testování mi ukázalo, že tato původní kolonie byla skutečně bakteriální. Testovala jsem celkem 18 různých látek.



Obrázek 1: Plotna s bakteriemi a testovanými látkami

### Seznam látek, které byly testovány

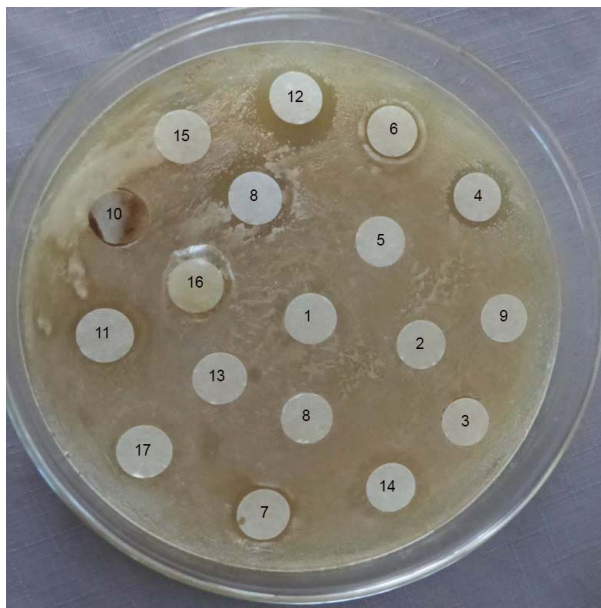
- |                             |                                     |                          |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Antibiotikum Duomox      | 7. Levandule esenciální olej        | 13. Alpa (60% ethanol)   |
| 2. Peroxid vodíku 3%        | 8. SAVO Perex- NaClO                | 14. Roztok na čočky      |
| 3. Borová voda              | 9. JAR čistící prostředek           | 15. Běžné toaletní mýdlo |
| 4. Jódová tinktura          | 10. Hypermangan – KMnO <sub>4</sub> | 16. Roundup herbicid     |
| 5. Acylpyrin                | 11. Antibakteriální mýdlo           | 17. Česnek extrakt       |
| 6. Tea Tree esenciální olej | 12. Domestos – čistič WC – NaClO    | 18. Cibule extrakt       |

Testovaná látka	Velikost inhibiční zóny v milimetrech
1 – Antibiotikum Duomox	25
6 – Tea tree esenciální olej	18
8 – SAVO perex	16
18 – Cibule extrakt	12
17 – Česnek extrakt	11
7 – Levandule esenciální olej	10
3 – borová voda + 11 - antibakt. mýdlo + 12 – Domestos čistič WC	6
9 – Jar detergent	5
4 – Jódová tinktura	4
14 – Roztok na čočky	3
16 - Roundup herbicid	1
5 – Acylpyrin + 10 – Hypermangan + 13 – Alpa + 15 – Běžné mýdlo	0
2 – peroxid vodíku 3%	nehodnoceno



## NÁRŮST KOLONIÍ NA PLOTNĚ Č. 2

Plotna č. 2 byla připravena tak, že jsem na ni náhodně otiskla prsty. Takže jsem vlastně kultivovala mikroorganismy, které se běžně vyskytují na mých rukou. Na plotně vyrostlo několik desítek kolonií, a kromě bakteriálních byly některé z nich i kvasinkové. Tyto kolonie jsem rozetřela po celé ploše misky a následně jsem na misku vyskládala kolečka s testovanými látkami. Hodnotila jsem růst mikroorganismů v prostředí testovaných látek. Výsledkem tohoto experimentu ovšem bylo, že kvasinkové kolonie pokryly celou plotnu a většina přípravků určených k likvidaci bakterií na nárůst těchto kolonií neměla žádný vliv. Některé z těchto přípravků však dokázaly zlikvidovat i kolonie kvasinek (měly tudíž i antimykotický účinek).



*Obrázek 2: Plotna s mikroorganismy z otisku prstů a testovanými látkami*

Na fotografii je patrné, která kolečka byla ponořena do látek s antimykotickým účinkem. Jedná se o tyto látky:

- 4 Jodová tinktura
- 6 Tea Tree – esenciální olej
- 7 Levandule – esenciální olej
- 8 SAVO perex – na bázi chlornanu sodného
- 12 Domestos – WC gel na bázi chlornanu sodného
- 14 Roztok na čočky

Že se bude jednat o směs bakteriální a kvasinkové kultury mi napověděl zejména fakt, že centrální kolečko, které bylo napuštěno roztokem antibiotika, kolem sebe nevytvořilo žádnou inhibiční zónu. Antibiotikum primárně cílí na bakteriální (prokaryotickou) stěnu, zatímco eukaryotická buňka kvasinek zůstala nedotčena.

## DISKUZE

Testování na plotně č. 1 naplnilo všechny mé předpoklady. I když hodnocení bylo do jisté míry nepřesné, protože antibiotikum Duomox, které bylo na kolečku 1 umístěném uprostřed plotny mělo tak velký dosah účinku, že nebylo možné zhodnotit, jak na bakterie působí jiné látky v blízkosti kolečka 1. Jednalo se zejména o testování peroxidu vodíku (kolečko 2), které bylo ovlivněno z jedné strany antibiotikem a z opačné strany esenciálními oleji Levandule a Tea tree, takže to na první pohled vypadá, jako by peroxid vodíku také vykazoval vysoké antibakteriální vlastnosti, ale zřejmě to nebude úplně pravda. Při dalších podobných experimentech by se měly látky s nejvyšším antibakteriálním účinkem testovat na samostatných plotnách.

Testování na plotně č. 1 se poněkud vymklo mému očekávání. Předpokládala jsem, že na rukou budu mít zejména bakterie, které by měly reagovat na použité antibakteriální látky. Na plotně ale vyrostly mimo bakterií i kvasinkové kolonie, takže jsem vlastně zkoumala, které z testovaných látek inhibují růst mikroorganismů, které se běžně vyskytují na rukou. Jednalo se o tyto látky (seřazeno od nejvyšší účinnosti): Domestos (WC gel na bázi chlornanu sodného), SAVO, jodová tinktura a v omezené míře i esenciální oleje tea tree a levandule.

### Látky s antimikrobiálními účinky:

**Duomox** – amoxicillinum trihydricum,  $\beta$ -laktamové antibiotikum, blokuje proteosyntézu buněčné stěny

**Tea tree** – esenciální olej z čajovníku *Melaleuca alternifolia*, obsahuje mj. monoterpeny, monoteprenoly a 1,8 cineol

**SAVO** perex – čistící a bělicí prostředek na bázi chlornanu sodného NaClO a hydroxidu sodného NaOH

**Cibule** – čerstvá šťáva z cibule kuchyňské *Allium cepa*, obsahuje diallyldisulfomonooxid allicin

**Česnek** – čerstvá šťáva z česneku kuchyňského *Allium sativum*, obsahuje diallyldisulfomonooxid allicin

**Levandule** – esenciální olej z levandule úzkolisté *Lavandula angustifolia*, obsahuje mj. ester linylnacetát, monoterpenol linalool a stejně jako tea tree 1,8 cineol

**Borová voda** – kyselina boritá  $H_3BO_3$  - 3% roztok

**Antibakteriální mýdlo** – obsahuje benzalkonium chlorid jako antibakteriální přísadu

**Domestos** – čistič WC, obsahuje chlornan sodný NaClO, hydroxid sodný NaOH, cetrimonium-chlorid a alkyl(dimethyl)aminoxidy

**Jar** – přípravek na nádobí, detergent obsahující aniontové povrchově aktivní látky a neiontové povrchově aktivní látky

**Jódová tinktura** – desinfekční přípravek, jod a jodid draselný rozpuštěné v ethanolu

**Roztok na čůčky** – obsahuje EDTA, polyhexanid a proteázy

**Roundup** – gel, totální herbicid, účinná látka je glyfosát



## ZÁVĚR

---

Z těchto experimentů vyplynulo, že látky, u kterých se na obalech nebo příbalových letácích udává, že mají antibakteriální účinky, takto skutečně fungují. Navíc se mi podařilo vyzkoumat, které z testovaných látek vykazují také antimykotické účinky, protože vytvářeny inhibiční zóny i na plotnách s kvasinkami (č. 2). Jde hlavně o esenciální oleje – levandule a tea tree a čisticí prostředky na bázi chlornanu sodného a hydroxidu sodného – SAVO a Domestos. Kromě těchto kvasinkám v růstu alespoň částečně brání i použití jódové tinktury.

Na bakteriální plotně (č. 1) se nejvíce antibakteriální „překvapivě“ ukázalo být antibiotikum – Duomox, které vytvořilo inhibiční zónu o velikosti více než 25 mm.

Poměrně překvapivé bylo zjištění, jak silné antibakteriální účinky vykazují tzv. přírodní antibiotika – česnek a cibule. Zde se s největší pravděpodobností uplatnila účinná látka – allicin.

Stejně jako u kvasinkových kolonií i zde měly výrazný antibakteriální potenciál čisticí prostředky na bázi chlornanu sodného (Domestos a SAVO), dobře fungovalo také antibakteriální mýdlo, jar a borová voda (slabá kyselina boritá).

Slabé, ale detekovatelné účinky měly přípravky jako je Roundup (herbicid), roztok na čočky a jódová tinktura.

A žádné nebo jen minimální antibakteriální vlastnosti vykazovalo běžné toaletní mýdlo, hypermangan, acylpyrin a Alpa (60% denaturovaný Ethanol).

# 1. ENZYMOLOGICKÁ LABORATOŘ

## 2.1 Úvod do problematiky

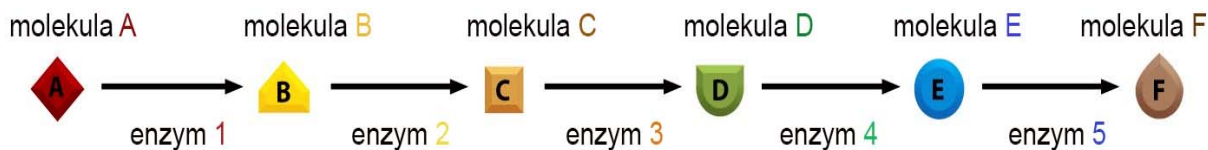
Z hodin chemie víme, že katalyzátor je látka, která ovlivňuje průběh chemické reakce. Katalyzátor působí tak, že snižuje počáteční aktivační energii (EA), a tím dochází k ovlivnění chemické reakce. Katalyzátor vstupuje do chemické reakce, urychluje ji (nebo zpomaluje) do rovnovážného stavu, a potom z ní vystupuje v nezměněné formě.

Obecně platí, že:

- katalyzátory **snižují aktivační energii** chemické reakce
- katalyzátory **zvyšují rychlost** chemické reakce
- katalyzátory **nemění energetickou bilanci reakce** (jestli je reakce exergonická nebo endergonická)
- katalyzátory **nemění rovnovážnou konstantu** chemické reakce

Je dobré si uvědomit, že v živých organismech – tedy v biochemii – má katalýza **zcela zásadní význam**. Katalyzátory biochemických reakcí se nazývají **enzymy**. Zprostředkovávají v buňce (organismu) takový průběh chemických reakcí, které by za fyziologických podmínek vůbec nemohly probíhat (protože by např. potřebovaly mnohem vyšší teplotu). Enzymy urychlují chemické reakce až  $10^{14}$ krát.

Organismus není statický systém, neustále v něm probíhají miliony chemických reakcí, které jsou cíleně řízeny a koordinovány – a právě enzymatická katalýza v těchto dějích hraje klíčovou roli. Reakce, které enzymy katalyzují, jsou většinou **spřažené**, takže produkt jedné reakce je reaktantem v druhé reakci a produkt, druhé reakce je reaktantem v třetí reakci atd.



Obrázek upraven podle:

[https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/BB1P/BB1-4PR\\_2018.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/BB1P/BB1-4PR_2018.pdf)

Enzymy jsou ve většině případů proteinové povahy. Výjimkou jsou tzv. **ribozymy**, kde má katalytickou funkci ribonukleová kyselina – tedy RNA.

Pro lepší orientaci v této problematice si zopakujeme základní pojmy, které se vztahují k enzymatickým reakcím.

**Substrát** – látka, kterou enzym zpracovává

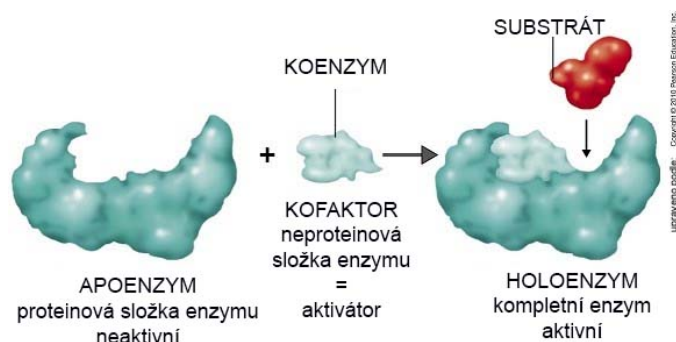
**Produkt** – látka, která během reakce vznikne

Enzym jako **katalyzátor** je často složen z několika částí.

**Apoenzym** – je část enzymu, která je proteinové povahy a sama o sobě nemá katalytickou aktivitu. K tomu, aby apoenzym správně fungoval, potřebuje na svou molekulu navázat ještě nebiřkovinnou část, která se nazývá **kofaktor**. Apoenzym s navázaným kofaktorem se označuje jako **holoenzym**.

**Kofaktor**, aby to nebylo tak jednoduché, může být dvojího typu. Buď je kovalentně navázán na apoenzym jako tzv. **prostetická skupina** (např. hem u hemoglobinu) nebo je kofaktorem tzv. **koenzym**, který je na apoenzym navázán jen dočasně, a zodpovídá např. za přenosy elektronů při redoxních reakcích (NAD, FAD, ...). Jako koenzymy přímo vystupují také některé vitamíny.

Většina enzymů však ke své funkci kofaktor nepotřebuje.



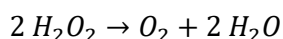
Obrázek upraven podle:  
<https://lovingubiology.wordpress.com/2015/12/13/enzymes-and-functions/>

Samotná enzymatická reakce probíhá obvykle v tzv. **aktivním centru enzymu**. V aktivním centru se vyskytují reaktivní skupiny aminokyselin ( -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH). Tvar aktivního centra odpovídá tvaru substrátu. Na tyto skupiny se váže molekula substrátu za vzniku komplexu enzym – substrát. **Substrát zapadá do aktivního centra jako klíč do zámku**. Po průběhu reakce se komplex rozpadá a z aktivního centra enzymu se uvolní produkty reakce.

Enzymy jsou obvykle **velmi specifické** a obvykle katalyzují jednu **konkrétní chemickou reakci**, při které dochází k přeměně substrátu na produkt. Za enzymatickou specifitu je zodpovědný především komplementární (vzájemně si odpovídající) tvar substrátu a aktivního místa enzymu – princip **zámku a klíče**.

## Enzym kataláza

Jedním z enzymů, kterým se budu ve svých úlohách zabývat, je **kataláza**. Základní funkcí tohoto enzymu je rozklad peroxidu vodíku v buňce na vodu a kyslík. Kataláza je jeden z nejrychlejších enzymů vůbec. Jediná molekula katalázy může převést na vodu a kyslík miliony molekul peroxidu vodíku za sekundu.



Kataláza se nachází téměř v každé buňce, v některých buňkách je její koncentrace vysoká, v některých naopak nízká – záleží zejména na tom, jak je buňka metabolicky aktivní. Peroxid vodíku vzniká v organismu činností rychle reagujících volných radikálů, které se uvolňují při různých metabolických procesech (fotosyntéza, dýchání, rozklad lipidů...). Radikálovými reakcemi vznikne peroxid vodíku, který pro buňku představuje rovněž nežádoucí reaktivní látku, a proto se buňka snaží převést jej na kyslík a neškodnou vodu. A k tomuto účelu slouží buňce právě enzym kataláza, který rozloží peroxid vodíku ještě rychleji, než by mohl stihnout reagovat s jinými látkami a dále tak poškozovat vnitřní prostředí buňky.

Je dobré si uvědomit, že i když katalázu obsahují téměř všechny buňky každého organismu, pro každý organismus je jeho enzym (tedy kataláza) specifický. To znamená, že každý organismus bude mít jiné teplotní nebo pH optimum, při kterém bude jeho kataláza nejlépe fungovat.

Z běžného života víme, že se kataláza hojně vyskytuje v krvi – pokud použijeme peroxid vodíku jako desinfekční činidlo na krvácející ránu, vidíme, jak peroxid při styku s krví „bublá“ – uvolňuje se kyslík.

Pokles katalázy ve stáří ve vlasových buňkách způsobí, že se přestane odbourávat peroxid vodíku, který je ve vlasech přirozeně přítomen a vlasy v důsledku toho šediví. [4]

A konečně – poměrně známá je nemoc vitiligo – je neinfekční kožní porucha, kdy dochází ke ztrátě melanocytů – buněk tvořících kožní pigment. Vitiligo rovněž mimo jiné vykazuje omezené působení katalázy. [5]

### 2.2.1 Testování různých druhů potravin na přítomnost katalázy

**Časová dotace:**

20–30 minut – podle množství testovaných potravin

**Cíl:**

Prokázat, že enzym kataláza je přítomen téměř ve všech testovaných potravinách. Zhodnotit, ve kterých typech látek (potravin), je aktivita katalázy nejvyšší a kde naopak nejnižší.

**Pomůcky a materiál:**

Nejrůznější typy potravin (ovoce, zelenina – doporučeno je otestovat mj. pekařské droždí, hlízu bramboru a syrová kuřecí játra)  
sada zkumavek ve stojánku

**Chemikálie:**

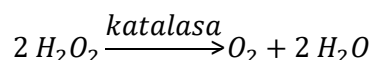
Peroxid vodíku (dobře poslouží 3% roztok prodáváný v lékárně)  
detergent (např. Jar nebo Pur)  
sacharóza

**Postup práce:**

Jednotlivé potraviny nakrájíme na drobné kousky – obecně platí, že čím větší je povrch reagujících látek, tím bude reakce probíhat rychleji. Nadrcené potraviny umístíme do zkumavek tak, aby objem ve všech zkumavkách byl přibližně stejný (cca 2 ml drti) a do každé zkumavky přidáme kapku detergentu. Pokud máme v experimentu i pekařské droždí, předem k němu přidáme trochu cukru (sacharóza), abychom buňky kvasinek metabolicky aktivovali. Pak do každé zkumavky přidáme přibližně 2,5 ml 3% roztoku peroxidu vodíku. Pozorujeme a zapisujeme průběh reakce v jednotlivých zkumavkách.

**Výsledky a závěr:**

Protože funkcí katalázy je rozklad peroxidu vodíku, můžeme pozorovat uvolňování kyslíku, který je produktem této enzymatické reakce:



Protože jsme do reakční směsi přidávali i kapku detergentu, vznikající kyslík vytváří pěnu, jejíž výšku ve zkumavce lze přibližně změřit. Detergent rovněž zvyšuje reakční rychlost, protože rozbíjí buněčné membrány a enzymy se v důsledku lyze buněk uvolňují přímo do roztoku.

### 2.2.2 Mechanismus účinku katalázy

#### Časová dotace:

cca 10 minut

#### Cíl:

V praktické úloze ověřit mechanismus účinku enzymu

#### Pomůcky a materiál:

hlíza bramboru nebo čerstvá kuřecí játra  
zkumavky  
stojánek

#### Chemikálie:

Peroxid vodíku (3%)

#### Postup práce:

Vybereme potravinu, která v předchozím experimentu vykazovala nejvyšší aktivitu katalázy – tedy hlízu bramboru nebo kuřecí játra. Celou potravinu (nepodrcenou – proužek jater nebo hranolek bramboru) umístíme do zkumavky (označíme 1). Tentokrát nebudeme přidávat detergent. Do zkumavky přilijeme peroxid vodíku tak, aby byl v nadbytku (cca 4–5 ml). Reakci necháme proběhnout do rovnováhy. Po několika minutách (když se přestane vyvíjet kyslík) opatrně přelijeme supernatant (horní vodnou fází) do nové zkumavky (označíme jako 2). Sediment (kousek jater, bramboru) ponecháme v původní zkumavce (1).

Zjišťujeme, co se stalo s enzymem katalázou. Ve které zkumavce se enzym aktuálně nachází? Je funkční nebo se již vyčerpal? Jak bychom to mohli ověřit?

Provedeme následující experimenty: Připravíme si novou čerstvou potravinu (játra, brambor) a tu přidáme k obsahu zkumavky 2. Popíšeme reakci. Jaká chemická látka se nacházela ve zkumavce č. 2?

Do zkumavky č. 1 přidáme znovu cca 5 ml čerstvého peroxidu vodíku. Popíšeme reakci. Zdůvodníme.

#### Výsledky a závěr:

Zopakovali jsme experiment, při kterém kataláza z jater (bramboru) rozkládala přidaný peroxid vodíku. Poté co reakce proběhla do vyčerpání substrátu ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), z reakční směsi se uvolnil kyslík (do ovzduší) a ve zkumavce zůstal druhý produkt reakce ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Takže supernatant, který jsme převedli do zkumavky 2 je voda. V této vodné fázi už nezůstal žádný aktivní enzym, což jsme ověřili přidáním obsahu zkumavky 2 ke zkumavce 3 (čerstvá potravinu) – reakce neproběhla.

Aktivní enzym se nachází stále ve zkumavce č. 1, což jsme dokázali tím, že jsme k obsahu zkumavky 1 přidali čerstvý peroxid vodíku. Přítomna kataláza peroxid rozložila na vodu a kyslík.

### 2.2.3 Závislost aktivity katalázy na pH

#### Časová dotace:

cca 30 minut

#### Cíl:

Prokázat, že kataláza z různých organismů nejlépe funguje v určitém rozmezí pH. Porovnat pH optimum pro katalázy z různých druhů potravin

#### Pomůcky a materiál:

Čerstvá hlíza brambor  
čerstvé kuřecí játra  
pekařské droždí  
sada zkumavek ve stojánku  
pH indikátorové papírky

#### Chemikálie:

Peroxid vodíku (3%),  
kyselina: ocet (kvasný, lihový) kyselina octová – 8% roztok (nebo 5% kyselina sírová)  
zásada: prací soda – uhličitan sodný- 5% roztok (nebo 5% roztok hydroxidu sodného)

#### Postup práce:

Připravíme si 5 zkumavek a do nich namícháme řadu roztoků od nejnižšího pH po nejvyšší. Pracujeme podle následujícího schématu:

- 1- 5 ml 8% kyseliny octové
- 2- 0,5 ml 8% kyseliny octové + 4,5 ml vody
- 3- 5 ml vody
- 4- 0,5 ml 5% uhličitanu sodného + 4,5 ml vody
- 5- 5 ml 5% uhličitanu sodného

Všechny zkumavky zamícháme a pomocí indikátorového papírku stanovíme přibližné pH. Poté do každé zkumavky přidáme 3 ml peroxidu vodíku. Ze syrové oloupané brambory ukrojíme plátek silný přibližně 0,5 cm a z tohoto plátku ukrojíme 5 stejně velkých hranolků a umístíme je po jednom do každé zkumavky. Pozorujeme reakce v jednotlivých zkumavkách a zaznamenáme výsledky.

Stejně postupujeme i s dalšími materiály (kuřecí játra, pekařské droždí)

#### Výsledky a závěr:

Tímto experimentem jsme prokázali, jak aktivita katalázy v bramboru, játrech a droždí závisí na pH reakčního prostředí. Zároveň se ukázalo, že kataláza z brambor má jiné pH optimum než kataláza v pekařském droždí.

## 2.2.4 Závislost aktivity katalázy z bramboru na teplotě

### Časová dotace:

cca 60 minut

### Cíl:

Prokázat, že kataláza z bramborové hlízy funguje v určitém rozmezí teplot. Najít teplotní hranici, při které dochází k denaturaci enzymu

### Pomůcky a materiál:

Bramborová hlíza  
odměrný válec  
teploměry, které pokryjí teplotní rozhraní 0 – 100°C  
vodní lázeň (polystyrenová nádoba)  
ledová drť  
stopky

### Chemikálie:

Peroxid vodíku 3%  
detergent (přípravek na nádobí, např. Jar)

### Postup práce:

Kousek bramborové hlízy jemně nastrouháme a rozmělníme ve vodě. Definované množství této suspenze (např. 2 ml) převedeme do odměrného válce (objem 50 ml), přidáme kapku detergentu a cca 2 ml 3% peroxidu vodíku. Kataláza přítomná v bramboru rozkládá peroxid, což pozorujeme jako uvolňování kyslíku, který je produktem této enzymatické reakce. A protože u plynu lze snadno měřit jeho objem, není problém u této reakce přímo stanovit rychlost enzymatické reakce. Ta je definována jako počet molů produktu vzniklých za sekundu. U plynu nám pak poslouží jednoduchý vztah mezi látkovým množstvím (v molech) a jeho objemem (v litrech) dle stavové rovnice ideálního plynu. Objem vzniklého plynu určíme tak, že měříme výšku sloupce pěny, kterou vyvíjí uvolňující se kyslík. Objem zjistíme měřením výšky pěny a průměru nádoby podle vztahu

$$V = v\pi r^2$$

Objem dosadíme do stavové rovnice

$$n = RT/pV$$

$p$  - 101 325 Pa (atmosférický tlak)

$T$  – teplota lázně v Kelvinech ( $1\text{ K} \cong 1\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} = 273,15\text{ K}$ )

$V$  – objem v  $\text{m}^3$

$R$  - 8,314  $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  (molární plynová konstanta)

Získané látkové množství vydělíme měřeným časem.

Provedeme reakce bramboru s peroxidem vodíku ve vodních lázních s různými teplotami. Začneme s nulovou teplotou (voda s ledem) a skončíme vařící vodou. V každé teplotní variantě změříme rychlost reakce na základě vznikající pěny. Potom vyneseme rychlosti do grafu spolu s teplotou lázně a popíšeme, jak se mění rychlost reakce při různých teplotách.

### Výsledky a závěr:

Obecným pravidlem je, že enzymatické rychlosti bývají nejnižší při nulové teplotě, poté se zvyšují, až náhle prudce klesnou v okamžiku, kdy je protein denaturován vysokou teplotou. To se stává při teplotách nad 40°C. Protože bramborová hlíza v půdě roste při relativně nízkých teplotách (zejména na jaře), měla by být její kataláza poměrně aktivní již při nižších teplotách. Z grafu je patrné, že při nejnižších teplotách je aktivita katalázy poměrně nízká, poté se zvyšuje a při teplotě vyšší než 40 °C nastává razantní pokles aktivity katalázy, protože dochází k tepelné denaturaci enzymu.



## 2.3 Jak vznikaly tyto úlohy – praktická doporučení

Jak se přesvědčíme v úloze 1. kataláza se nachází téměř ve všech materiálech rostlinného a živočišného původu. Čím se však jednotlivé vzorky budou diametrálně lišit – množstvím a aktivitou katalázy. Z toho můžeme odvodit, že čím je buňka metabolicky aktivnější, tím lépe a více v ní lze katalázu detekovat. Úloha č. 1 se dá provádět i bez použití detergentu – efekt v tomto případě není tak výrazný, jako když vzniká pěna, ale zase je možné pozorovat uvolňování jednotlivých bublinek kyslíku přímo z materiálu, a to i u vzorků, které s detergentem žádnou pěnu netvořily (např. oves – kataláza se v semenech ovsa nachází, ale ve srovnání s ostatními vzorky jí tam je velmi málo – bublinky kyslíku na zrnu jsou patrné, ale je jich velmi málo a začínají se uvolňovat až po delší době).

Pokud tedy použijeme k detekci kyslíku detergent (doporučuji), pak je vhodné místo klasických zkumavek (já jsem používala zkumavky o délce 12 cm) použít vyšší zkumavky, případně odměrné válečky, protože u vzorků, jako jsou pekařské droždí, vejce nebo drůbeží játra bude reakce s peroxidem velmi bouřlivá a rychlá, takže pokud chcete měřit výšku sloupce „kyslíkové pěny“, je potřeba na to mít dostatečně vysokou měřicí nádobu (mě to ze zkumavek během okamžiku vyteklo ven, takže měření výšky sloupce pěny bylo bezpředmětné).

Při pokusech s katalázou bych navrhovala, aby si studenti nejprve otestovali, ve kterých vzorcích je kataláza nejvíce aktivní a s těmito vzorky potom dále pracovali při testování optimálních podmínek pro funkci katalázy (teplota, pH).

V úloze č. 4 doporučuji nejprve stanovit nějakou jednu hodnotu objemu vznikající pěny, které bude přiřazen časový interval. Já jsem při vypracovávání této úlohy zvolila zbytečně složitý postup, kdy jsem postupně zaznamenávala velikost objemu kyslíkového sloupce – a k tomu dobu (čas) za kterou byl tento objem dosažen. Nakonec jsem z velkého množství získaných dat stejně musela zvolit pro všechny testované teploty jednu hodnotu objemu vzniklého kyslíku. Ve všech provedených měřeních jsem se rozhodla zpracovat dvě hodnoty rychlosti reakce – za jak dlouhý časový interval vzniklo 30 ml a 40 ml kyslíkové pěny a tyto dvě hodnoty jsem zprůměrovala (viz. Protokol).

Studentům se také může stát, že aktivita katalázy se bude lišit i u stejných vzorků za stejných reakčních podmínek - např. při stanovování aktivity katalázy z bramborové hlízy. Může být pozorován rozdíl mezi novými (čerstvými) bramborami a starými (nebo nevhodně skladovanými) bramborami – ukazuje se, že u čerstvých brambor je aktivita katalázy vyšší.

# Testování různých druhů potravin na přítomnost katalázy

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Cílem této úlohy bylo otestovat různé druhy rostlinných a živočišných tkání na přítomnost enzymu katalázy. Enzym byl detekován reakcí jednotlivých vzorků s peroxidem vodíku. Hodnotila jsem míru vznikajícího kyslíku.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Nejrozličnější typy potravin (banán, brambor, zázvor, pekařské droždí, kuřecí játra, jablko, hruška, mrkev, hřib pravý, rajče, kuřecí maso, maliny, oves – zrna, kivi, ananas, cibule, vejce)
- sada zkumavek ve stojánku
- Peroxid vodíku (3% roztok prodáváný v lékárně), sacharóza (cukr)
- detergent (např. Jar nebo Pur)

## POSTUP PRÁCE

---

Vybrala jsem si potraviny, které jsem chtěla otestovat na přítomnost enzymu katalázy. Tyto potraviny jsem nakrájela, rozmačkala, podrtila a do každé zkumavky dala přibližně stejný objem směsi (2 ml). Tento experiment jsem prováděla ve dvou variantách. V prvním případě jsem k podrcené směsi testovaných přidávala přímo peroxid vodíku, ve druhé variantě jsem nejprve ke každému vzorku přidala kapku detergentu (Jar) a teprve poté jsem přidala peroxid. Ke kvasinkám jsem v obou případech předem přidala trochu cukru (sacharóza), abych je aktivovala.

Zkumavky jsem si postavila do stojánku vedle sebe a pak k nim postupně přilévala 2,5 ml 3% peroxidu vodíku. Průběh reakcí jsem dokumentovala fotoaparátem a po cca 5 min jsem si zapsala pořadí vzorků podle aktivity katalázy.

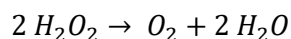
## VÝSLEDKY

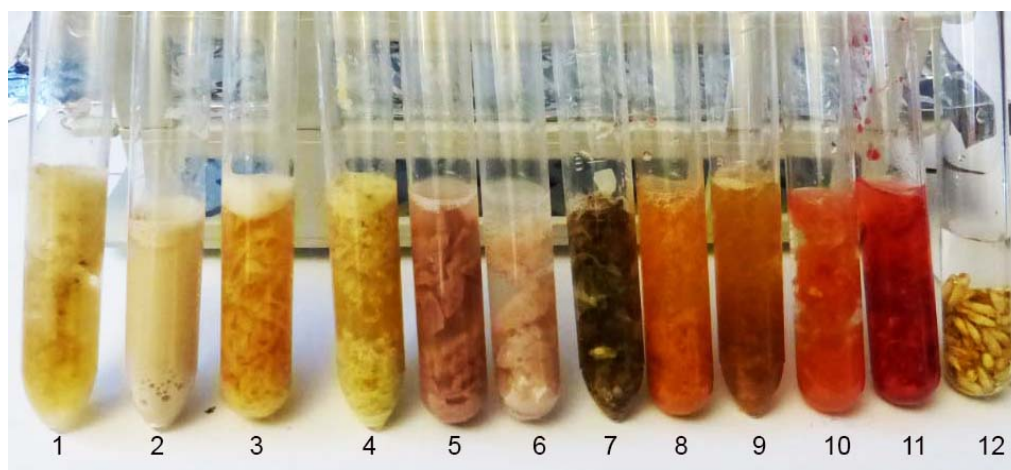
---

### VARIANTA POKUSU BEZ DETERGENTU

V této variantě jsem chtěla otestovat, zda se kataláza nachází ve všech testovaných vzorcích a dále jsem chtěla vyhodnotit, ve kterých látkách je aktivita katalázy nejvyšší. Testovala jsem 12 potravin – banán, zázvor, droždí, kuřecí játra, jablko, mrkev, hřib, rajče, kuřecí maso, maliny a semena ovsa.

Ihned po přidání peroxidu se v některých zkumavkách začaly vytvářet bublinky unikajícího kyslíku – v přítomnosti enzymu katalázy zde probíhala reakce rozkladu peroxidu vodíku na kyslík a vodu:





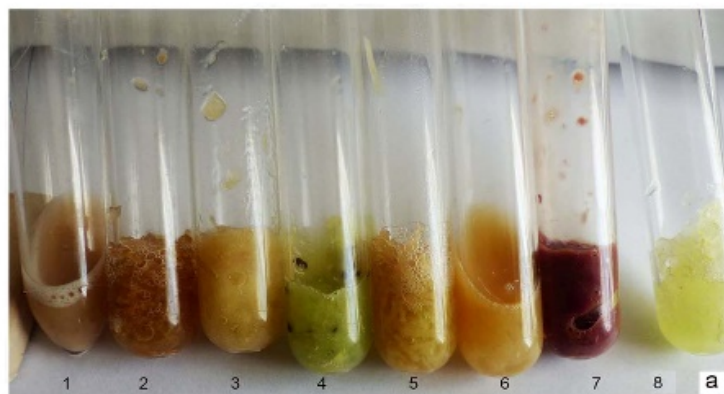
1. banán
3. brambor
4. zázvor
2. droždí
5. játra
9. jablko
8. mrkev
7. hřib
10. rajčata
6. maso
11. maliny
12. oves

**Obrázek 1:** Testování vzorků na přítomnost katalázy - bez detergentu

Aktivitu katalázy jsem v tomto případě hodnotila pozorováním – porovnávala jsem množství bublinek kyslíku, které vznikaly v jednotlivých zkumavkách (bublínky přitom vynášely kousky testovaných látek vzhůru ke hladině). Nejvyšší aktivita katalázy byla detekována v těchto vzorcích: brambor, banán, droždí, játra, poměrně aktivní byl i zázvor a hřibek. Nejnižší aktivitu vykazovaly semena ovesa.

## VARIANTA POKUSU S DETERGENTEM

Do tohoto pokusu jsem vybrala vzorky z předcházejícího experimentu, které vykazovaly nejvyšší aktivitu katalázy a doplnila jsem je o další látky, které jsem chtěla také otestovat. Testované vzorky jsem rozkrájela a podrtila a převedla do zkumavek. Ještě před přidáním peroxidu jsem do každé zkumavky přidala kapku detergentu.



Legenda:

1. pekařské droždí
2. hruška
3. banán
4. kiwi
5. brambor
6. vajíčko
7. kuřecí játra
8. cibule

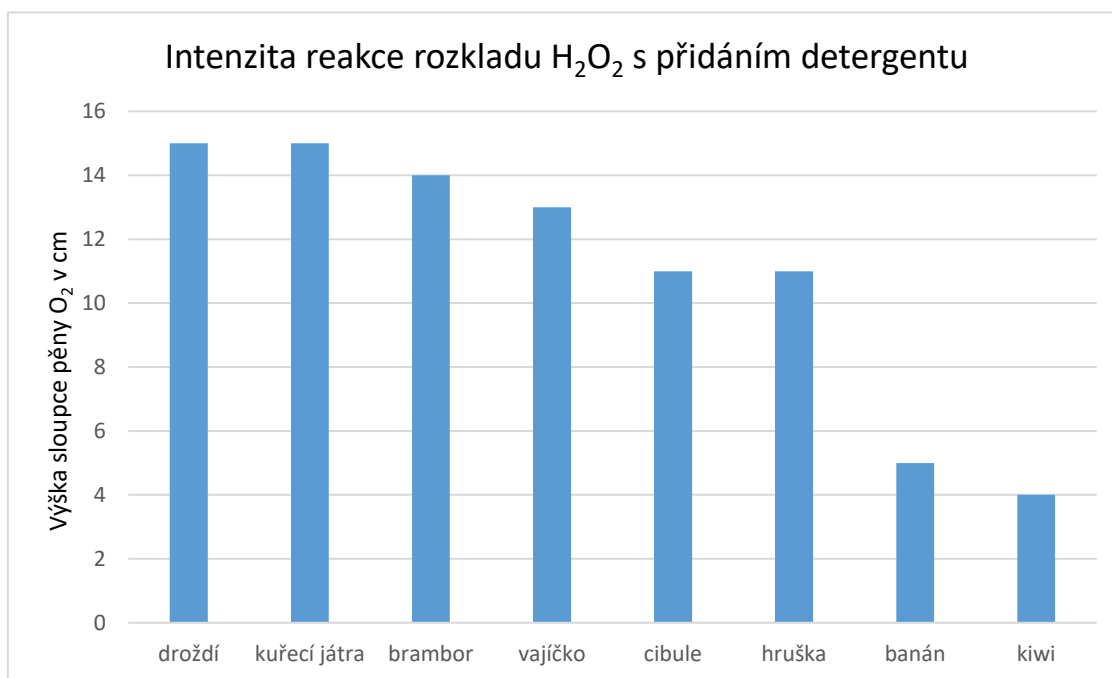


**Obrázek 2:** Testování vzorků na přítomnost katalázy - varianta s detergentem:  
a) vzorky 1-8 před přidáním peroxidu; b) vzorky 1-8 po přidání peroxidu

Po přidání peroxidu byla probíhající reakce mnohem lépe pozorovatelná, protože vznikající kyslík, který se uvolňoval, vytvořil s detergentem pěnu, která stoupala ve zkumavkách vzhůru.

Zhodnocení rychlosti reakce a výšky pěnového sloupce, který vznikal uvolňováním kyslíku:

1. pekařské droždí + 7. kuřecí játra – nejrychlejší reakce, nejvyšší sloupec pěny
5. brambor
6. křepelčí vajíčko (žloutek smíchaný s bílkem)
2. hruška + 8. cibule
3. banán
4. kiwi



## DISKUZE

V první verzi experimentu jsem do směsi nepřidávala detergent. Reakce probíhaly slaběji a pomaleji, navíc se kyslík uvolňoval přímo do vzduchu a nebylo tím možné přesněji určit, ve kterém ze vzorků je aktivita katalázy nejvyšší.

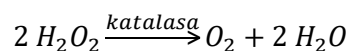
V druhé verzi experimentu jsem detergent přidala a experiment se podařilo mnohem lépe popsat a zdokumentovat. Detergent totiž mimo vytvoření pěny s kyslíkem také násobně reakci zrychlil. Je to logické, protože detergent rozbíjí membrány a lyzuje buňky, takže enzym se ve větší míře uvolňuje do roztoku.

Zajímavé chování vykazovala kataláza v banánu – když jsem srovnala výsledky v obou pokusech. V první verzi patřil banán mezi vzorky s nejvyšší aktivitou katalázy, zatímco v druhém pokusu byla aktivita jeho katalázy (mezi ostatními testovanými) jedna z nejnižších. Domnívám se, že rozpor vznikl tím, že v prvním pokusu jsem použila čerstvý banán a v druhém zralý banán s téměř hnědou slupkou a velmi měkkou dužninou. Z toho vyplývá, že se „stárnutím“ potravin aktivita katalázy v jejích buňkách klesá.

## ZÁVĚR

---

Enzym kataláza, jehož přítomnost a aktivitu jsem v tomto protokolu testovala, rozkládá peroxid vodíku za průběhu této reakce:



Ve verzi experimentu bez detergentu byla nejvíce aktivní kataláza v banánu, bramboru, zázvoru a kvasinkách. Naopak nejméně aktivní (nebo vůbec žádná) byla v malinách a ovsu. Po několika minutách ovšem i na semenech ovsa byly patrné drobné bublinky, znamená to, že i tyto buňky obsahují enzymy katalázu, ale ve srovnání s ostatními testovanými vzorky jen velmi málo.

V pokusu s detergentem byla nejaktivnější kataláza v pekařském droždí (kvasinkách), játrech a bramboru. Nejméně aktivní byla v banánu a kiwi.

Pokud bych měla srovnat oba typy experimentů, pro demonstrační pokusy rozhodně doporučuji přidat k testovaným vzorkům detergent.

# Demonstrace mechanismu účinků katalázy

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Cílem této úlohy bylo demonstrovat mechanismus, kterým enzym kataláza působí při katalýze rozkladné reakce peroxidu vodíku v buňkách kuřecí jaterní tkáně.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Čerstvá kuřecí játra
- sada zkumavek ve stojánku
- Peroxid vodíku (3% roztok prodáváný v lékárně)

## POSTUP PRÁCE

---

Z čerstvých kuřecích jater jsem vyřízla malý kousek (celistvý, nekrájený) a umístila jsem ho do zkumavky, kterou jsem označila jako č. 1. Ke vzorku jater jsem přidala 4 ml peroxidu vodíku a nechala jsem reakci proběhnout do rovnováhy (do spotřebování reaktantu). Průběh reakce jsem zdokumentovala. Po několika minutách (když se přestal vyvíjet kyslík) jsem opatrně přelila supernatant (horní vodnou fázi) do nové zkumavky, kterou jsem označila č. 2. Sediment (kousek jater) jsem ponechala v původní zkumavce (1).

Připravila jsem si nový (čerstvý) kousek jater a ten jsem přidala k obsahu zkumavky 2. Průběh reakce jsem zdokumentovala.

Do zkumavky č. 1 (obsahuje sediment – játra) jsem znovu přidala 4 ml čerstvého peroxidu vodíku. Reakci, která proběhla ve zkumavce 1, jsem opět zdokumentovala.

## VÝSLEDKY

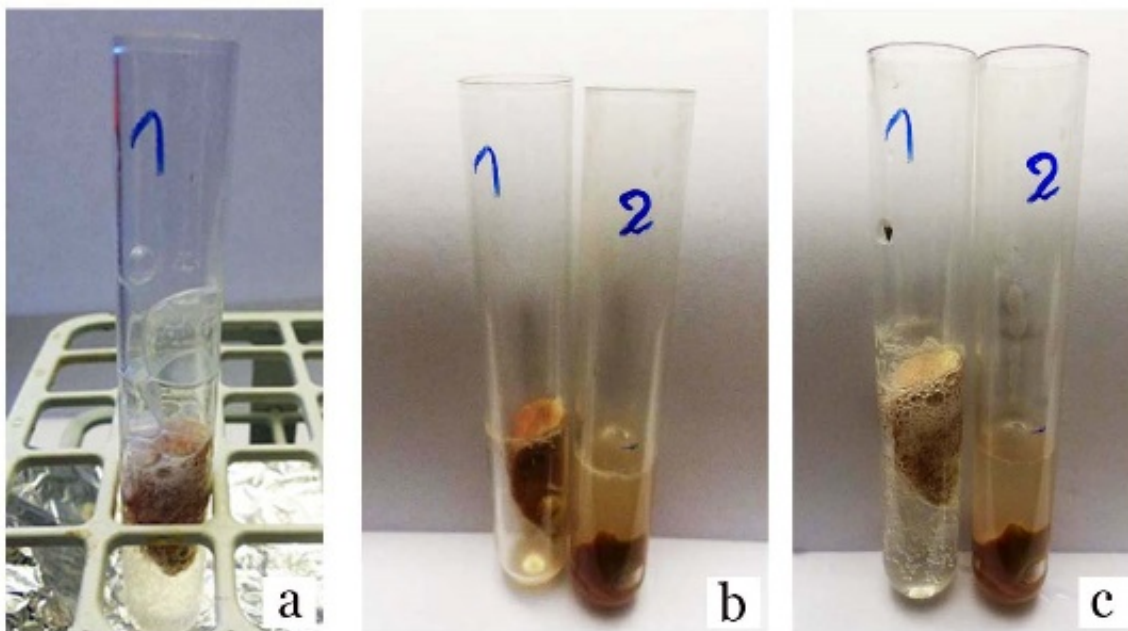
---

Po přidání peroxidu vodíku do první zkumavky s kouskem kuřecích jater došlo ke katalytickému rozkladu peroxidu na kyslík a vodu, podle rovnice  $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{kataláza}} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Vznikající kyslík byl patrný ve velkém množství bublinek, které vynášel kousek jater k hladině. Reakce probíhala cca 5 minut, až do ustavení rovnováhy (spotřebování substrátu).

Supernatant ze zkumavky 1 byl převeden do prázdné zkumavky 2, do které byl poté vložen nový čerstvý kousek kuřecích jater.

Ve zkumavce 2 nebyla patrná žádná probíhající reakce, z jater se neuvolňoval žádný kyslík.

Přidáním peroxidu vodíku k původnímu kousku jater ve zkumavce 1 dojde opět ke katalytickému štěpení peroxidu a uvolňování kyslíku.



**Obrázek 1:** Mechanismus účinků katalázy: **a)** rozklad peroxidu v přítomnosti katalázy z jater; **b)** látka ve zkumavce 2 nevykazuje katalytickou aktivitu; **c)** přidáním peroxidu do zkumavky 1 se obnoví katalytická aktivita v játrech

## DISKUSE A ZÁVĚR

V tomto experimentu jsem prokázala, že zastavení reakce je dáno vyčerpáním substrátu, nikoli enzymu. Enzym se po skončení reakce uvolnil z komplexu a neporušený (intaktní) může znova katalyzovat tutéž reakci.

Supernatant ve zkumavce 2 je jeden ze vzniklých produktů –  $\text{H}_2\text{O}$ . Druhý produkt –  $\text{O}_2$ , se uvolnil do ovzduší. Enzym kataláza zůstává v játrech. Přidáním peroxidu vodíku k játrům ve zkumavce 1 dojde k celému katalytickému procesu znova.



# Závislost aktivity katalázy na pH

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

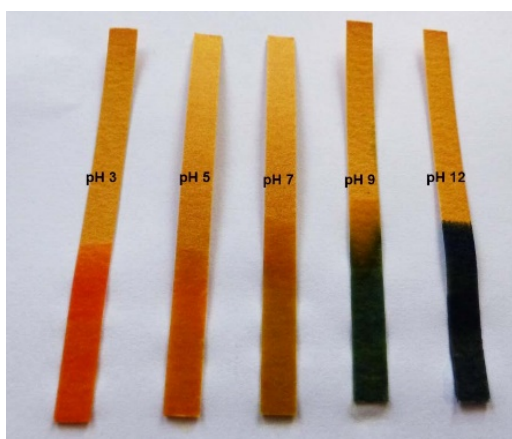
Testovala jsem aktivitu katalázy ve vytipovaných vzorcích (pekařské droždí, hlíza bramboru, kuřecí játra) v závislosti na pH roztoku. Připravila jsem si škálu roztoků, která pokrývala spektrum pH od kyselých do zásaditých hodnot. Hodnocení jsem prováděla na škále: kyselý – slabě kyselý – neutrální – slabě zásaditý – zásaditý.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

- čerstvá hlíza brambor
- čerstvé kuřecí játra
- pekařské droždí
- sada zkumavek ve stojánku
- pH indikátorové papírky
- Peroxid vodíku (3%),
- kyselina: ocet (kvasný, lihový) kyselina octová – 8% roztok (nebo 5% kyselina sírová)
- zásada: prací soda – uhličitan sodný- 5% roztok (nebo 5% roztok hydroxidu sodného)

## POSTUP PRÁCE

Nejprve jsem si připravila 4 roztoky s různým pH. Do první zkumavky jsem nalila 5 ml 8% kyseliny octové. Do další jsem smíchala 0,5 ml 8% kyseliny octové s 4,5 ml vody (výsledná koncentrace kyseliny octové byla 0,8%). Do třetí zkumavky jsem dala čistou vodu. Do následující jsem smíchala 0,5 ml 5% uhličitanu sodného s 4,5 ml vody (výsledná koncentrace  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  byla 0,5%). A do poslední zkumavky jsem nalila 5 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Roztoky jsem orientačně změřila indikátorovými pH papírkami.



Obrázek 1: Stupnice testovaných pH

8%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – pH 3

0,8%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – pH 5

$\text{H}_2\text{O}$  – pH 7

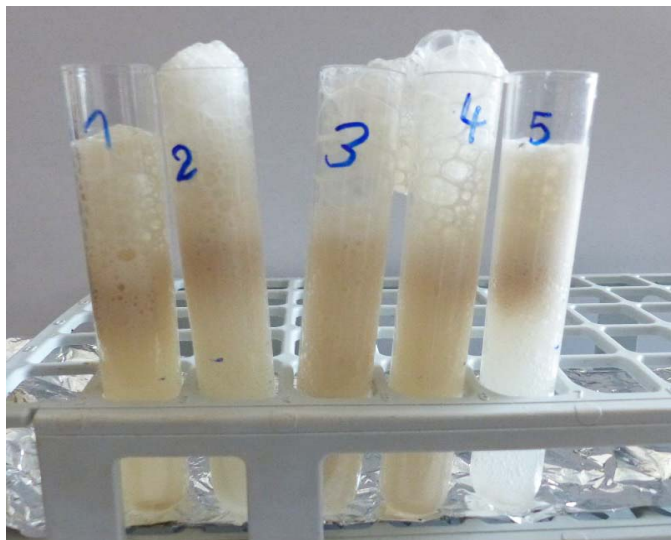
0,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – pH 9

5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – pH 12

Do každé z těchto zkumavek jsem nalila 3 ml peroxidu vodíku. Poté jsem postupně testovala jednotlivé vzorky. Z každého materiálu jsem připravila pět stejně velkých kousků. Ty jsem vložila do zkumavek s peroxidem a pozorovala probíhající reakce a porovnávala intenzitu katalytické aktivity v jednotlivých zkumavkách.

## VÝSLEDKY

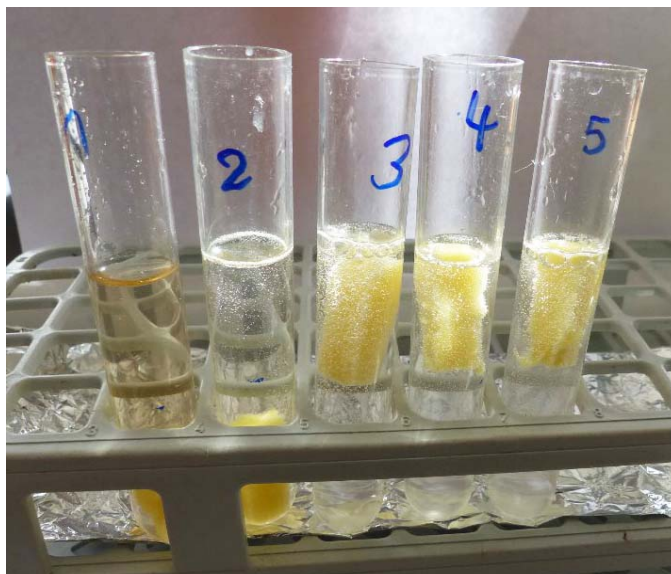
### TESTOVÁNÍ pH OPTIMA PRO KATALÁZU Z PEKAŘSKÝCH KVASINEK



Obrázek 2: Testování aktivity katalázy u kvasinek v závislosti na pH

Nejaktivnější byla kataláza při neutrálním pH. (vznikající kyslíková pěna vytekla ze zkumavky ven jako první). Dále kataláza velmi aktivní ve slabě zásaditém a slabě kyselém prostředí. Nejmenší aktivitu prokazovala při pH velmi zásaditém a velmi kyselém, ovšem i při tomto pH kataláza fungovala relativně dobře.

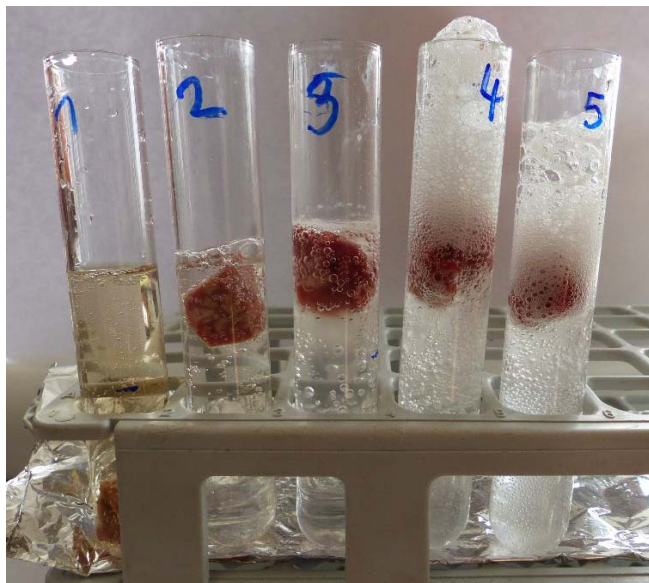
### TESTOVÁNÍ pH OPTIMA PRO KATALÁZU Z BRAMBOR



Obrázek 3: Testování aktivity katalázy u bramboru v závislosti na pH

Kataláza z hlízy bramboru má pH optimum v mírně zásaditém až zásaditém prostředí. Poměrně dobře rovněž fungovala v neutrálním prostředí a něco méně aktivní byla ve slabě kyselém prostředí. Žádnou aktivitu nevykazovala v prostředí kyselém.

## TESTOVÁNÍ pH OPTIMA PRO KATALÁZU Z KUŘECÍCH JATER



Obrázek 4: Testování aktivity katalázy u jater v závislosti na pH

Nejvíce aktivní byla kataláza ve slabě zásaditém prostředí, následně v zásaditém prostředí. Aktivní byla také v neutrálním prostředí. Méně aktivní byla ve slabě kyselém prostředí a pouze málo bublinek se objevovalo v kyselém prostředí.

## DISKUZE

Očekávala jsem, že pH optimum katalázy bude odpovídat pH, které je uvnitř buněk – čili kolem neutrální hodnoty 6-7. Ukázalo se však, že pH optimum pro katalázu se u různých organismů liší. Je to dáno tím, že kataláza se v cytosolu buněk nevykytuje volně, ale je lokalizována v peroxisomech, což jsou membránové organely, takže mohou mít uvnitř jiné pH než je v cytosolu. Zatímco jaterní kataláza nejlépe funguje při pH slabě zásaditém až zásaditém, kataláza z pekařských kvasnic má toleranci pro pH nejširší. Optimum má při neutrálním pH, ale spolehlivě funguje i při pH 3 nebo pH 12.

## ZÁVĚR

Zjistila jsem, že každá kataláza reaguje na pH prostředí jinak, takže pH optimum a obecně tolerance k pH se u těchto tří testovaných vzorků liší.

Kataláza v kvasinkách reaguje nejlépe při neutrálním pH.

Kataláza v bramboru je nejvíce aktivní v zásaditém prostředí.

Kataláza v játrech je neaktivnější taktéž v zásaditém prostředí.

# Testování rychlosti reakce rozkladu peroxidu vodíku pomocí katalázy z lilku brambor (*Solanum tuberosum*) v závislosti na teplotě

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Tato experimentální práce zkoumá, jak závisí rychlost rozkladu peroxidu vodíku enzymem katalázou na rekčních podmínkách, konkrétně na teplotě. Zkoumala jsem, jaká je optimální teplota pro katalázu, která se nachází v zásobní (oddenkové) hlíze lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Aktivitu katalázy jsem testovala v rozmezí teplot 0–100 °C.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Peroxid vodíku 3% roztok z lékárny
- Oddenkové hlízy lilku brambor (*Solanum tuberosum*)
- Voda (pitná voda z kohoutku)
- Detergent (Jar – přípravek na mytí nádobí)
- Bazénový teploměr pro měření teplot v rozmezí 0–50 °C
- Zavařovací teploměr pro měření teplot v rozmezí 40–100 °C
- Ručně kalibrovaná skleněná nádoba (vysoká a úzká sklenice od oliv)
- Vodná lázeň (vyrobena z polystyrenu, z krabice od počítače)
- Kuchyňské váhy
- Plastové kalibrované stříkačky nesterilní (0–10 ml)
- Stopky ke sledování času

## POSTUP PRÁCE

---

Funkce katalázy lze ověřit tak, že rozmělníme kousek brambory ve vodě a přidáme k ní peroxid vodíku. Okamžitě můžeme pozorovat vznikající kyslík, který poznáme jako šumění a bublání na povrchu brambory. Když k této směsi přidáme malé množství detergentu (přípravek na nádobí), vznikající kyslík se dá měřit jako pěna (výška pěnového sloupce v nádobě). Takto se dá zjistit objem kyslíku. Z této veličiny pak můžeme zjistit rychlost reakce (podle stavové rovnice ideálního plynu).

Abych zjistila, při které teplotě kataláza pracuje nejrychleji, připravila jsem si 8 typů vodných lázní (pro 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 a 100 °C). Sledovala jsem, jak rychle se kyslík vyvíjel a množství vzniklého plynu za různých teplot.

Nejprve jsem si celý experiment vyzkoušela nanečisto, abych zjistila, jaké je optimální množství nastrohaného bramboru, přidané vody a peroxidu vodíku. Rozhodla jsem se pro následující postup:

- Nastrouhala jsem bramboru a odvážíla 20 g nastrouhané směsi
- K této směsi jsem přidala stejné množství vody (tedy v poměru 1:1) a malé množství Jaru
- Touto směsí jsem naplnila kalibrovanou sklenici (po rysku ode dna – cca 20 ml)
- K této směsi jsem přidala peroxid vodíku (10 ml) – celkový objem směsi a peroxidu v nádobce byl označen jako bod 0, od tohoto bodu byla nádobka kalibrovaná po 10 ml až do 110 ml
- V okamžiku přidání peroxidu ke směsi a promíchání jsem pomocí stopek sledovala rychlost vznikajícího plynu.
- Vždy, když vzniklo 10 ml plynu, tak jsem zaznamenala čas
- Toto jsem prováděla za různých teplot, vždy před přidáním peroxidu jsem se snažila, aby stejnou teplotu měla lázeň, nastrouhaná brambora s vodou i peroxid vodíku.

## VÝSLEDKY

	V/ml									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
t/°C – T/°K	t /s									
0 - 273,15	19	34	54	67	89	117	185	277	-	-
10 - 283,15	5	17	20	29	42	54	70	86	117	198
20 - 293,15	5	15	20	28	37	50	65	80	110	170
30 - 303,15	8	14	20	27	35	44	50	70	93	135
40 - 313,15	8	12	18	25	38	40	43	54	68	95
50 - 323,15	6	12	20	30	40	45	50	60	85	-
60 - 333,15	10	12	20	45	60	120	-	-	-	-
80 - 353,15	10	60	-	-	-	-	-	-	-	-
100 - 373,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka:** Závislost rychlosti katalytické aktivity na teplotě; vlevo teplota; byl měřen nárůst objemu pěny o 10 ml za příslušný čas

Z těchto naměřených hodnot jsem si vybrala k dalšímu zpracování 2 hodnoty objemu vzniklé pěny - za jak dlouhý časový interval vzniklo 30 ml a 40 ml kyslíkové pěny, a tyto dvě hodnoty jsem zprůměrovala. Abych vypočítala rychlost enzymatické reakce (v  $\mu\text{mol/s}$ ) vypočítala jsem látkové množství  $n$  podle stavové rovnice:

$$n = \frac{RT}{pV}$$

$p$  – 101 325 Pa (atmosférický tlak)

$T$  – teplota lázně v Kelvinech ( $1 \text{ K} \cong 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C} = 273,15 \text{ K}$ )

$V$  – objem v  $\text{m}^3$

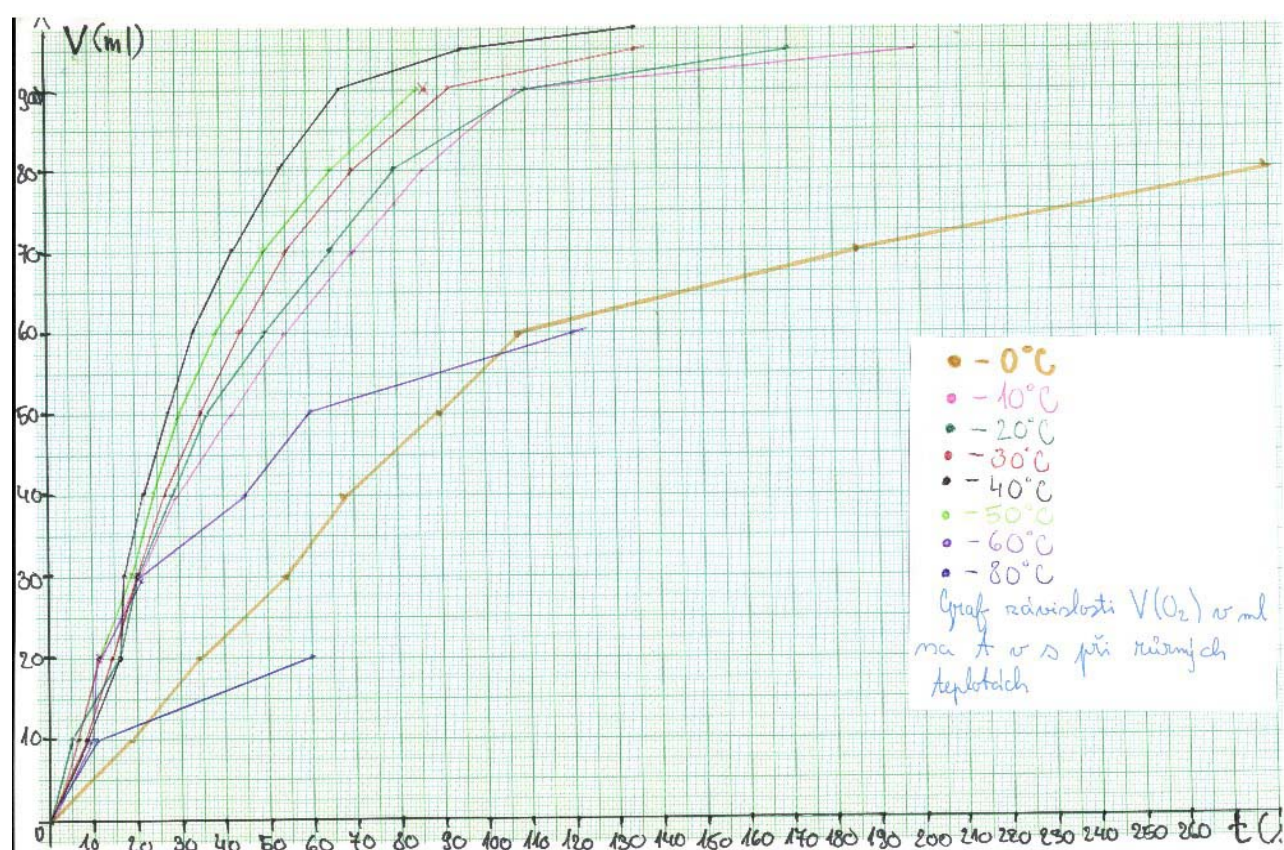
$R$  -  $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  (molární plynová konstanta)

Získané látkové množství jsem vydělila měřeným časem.





**Obrázek 1:** Závislost rychlosti vzniku kyslíku na teplotě



**Obrázek 2:** Závislost objemu vznikajícího kyslíku na čase při různých teplotách

## DISKUZE

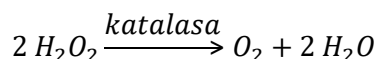
---

Z experimentu vyplynulo, že teplota, při které kataláza nejvíc urychluje rozklad peroxidu vodíku je v rozmezí 30-40°C. Při 50 °C je sice počáteční rychlost reakce srovnatelná s teplotou 30-40 °C, zhruba po 1 minutě dojde k denaturaci enzymu. Při teplotě 60 °C dojde k denaturaci enzymu ještě dříve, získaný kyslík dosahuje objemu pouze 60 ml. Při 80 °C enzym funguje pouze prvních pár sekund, získaný objem kyslíku je pouze 20 ml. Při 100 °C nefunguje vůbec (je okamžitě kompletně denaturován), žádný kyslík se neuvolní.

## ZÁVĚR

---

Enzym kataláza, jehož přítomnost a aktivitu jsem v tomto protokolu testovala, rozkládá peroxid vodíku za průběhu této reakce:



Obecným pravidlem je, že enzymatické rychlosti bývají téměř zanedbatelné při nulové teplotě, poté rostou, až náhle prudce klesnou v okamžiku, kdy je protein denaturován vysokou teplotou. To se stává při teplotách nad 40°C. Vzhledem k tomu, že bramborová hlíza se nachází v půdě a roste tam i při relativně nízkých teplotách (zejména na jaře), je její kataláza poměrně aktivní již při nižších teplotách.



### 3 FYTOHORMONÁLNÍ LABORATOŘ

#### 3.1 Úvod do problematiky

Z enzymologické laboratoře se teď přesuneme do laboratoře hormonů. O hormonech víme, že jsou to látky, které fungují u mnohobuněčných organismů jako chemický přenašeč – posel mezi jednotlivými buňkami, nebo tkáněmi, a tím řídí průběh a koordinaci všech reakcí v organismu. V enzymologické laboratoři jsme si ukázali, že enzymy mohou fungovat v jakémkoli vzorku rostlinné nebo živočišné tkáně, i když původní organismus už neexistuje. Hormony se však od enzymů liší i tím, že působí jen na živící buňky, potažmo organismus. Vzhledem k tomu, že teď budeme pracovat s celými organismy, nabízí se jako nejlepší modelový objekt využít právě rostliny a zkoumat působení fytohormonů.

**Fytohormony** se samozřejmě od živočišných hormonů v mnohém odlišují – což je dáno hlavně stavbou a fungováním rostlinného těla. Rostliny nemají ani nervy, ani specializované žlázy, a i celý jejich systém rozvodu signálních látek se ve srovnání s živočichy liší. Fytohormony vznikají u rostlin zpravidla v normálních nijak nespecializovaných buňkách a často chemicky ovlivňují své nejbližší okolí. Ale mohou být rozváděny cévními svazky i na větší vzdálenosti. Z tohoto důvodu mají všechny rostlinné hormony relativně malé molekuly, aby mohly snáze přecházet z buňky do buňky přes buněčnou stěnu (to je bariéra, přes kterou velké molekuly neprojdou).<sup>[6]</sup>

Dříve se dělily rostlinné hormony podle toho, jestli mají na rostlinu (její růst a vývoj) stimulační nebo inhibiční účinky. Dnes už se od této klasifikace pomalu upouští, a to proto, že spektrum účinků jednotlivých fytohormonů je poměrně velké (mnohem větší, než je tomu u živočišných hormonů).<sup>[7]</sup> Kromě toho fungují i tak, že nízká a vysoká koncentrace vedou k opačným efektům (např. vyšší hladina hormonu auxinu podporuje růst, ale další zvyšování koncentrace auxinu už růst zablokuje), takže se nedá úplně říct, že je fytohormon striktně stimulační nebo inhibiční. Navíc často působí několik fytohormonů dohromady a jejich účinky se mohou kombinovat, takže přítomnost dvou nebo více fytohormonů v rostlině vede k různým odezvám.<sup>[7]</sup>

Mezi fytohormony patří obrovské množství látek (a nové se neustále popisují). Ve středoškolských učebnicích se uvádí pět základních kategorií fytohormonů – auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. V posledních desetiletích se objevují další signální látky fytohormonálního charakteru – např. kyselina jasmonová, kyselina salicylová, brassinosteroidy, polypeptidy a oligopeptidy atd.<sup>[8]</sup>

V následujících experimentech se budu zabývat fytohormonem ethylenem.

#### **Ethylen**

je nejmenší rostlinný hormon, chemický vzorec ethylenu je  $C_2H_4$ . Bývá řazen mezi tzv. stresové hormony. Určitě je zajímavé zjistit, za jakých okolností byl ethylen pro vědu poprvé objeven a popsán. Zasloužil se o to ruský badatel Dimitrij Neljubov v roce 1901.<sup>[9]</sup> V té době byl k osvětlování ulic používán svítiplyn. Svítiplyn však často z potrubí unikal a u stromů, které rostly v blízkosti potrubí se svítiplynem, docházelo k nápadnému předčasnému opadávání listů. Neljubov si tohoto faktu všiml a jako první popsal účinnou látku v plynu – což byl právě ethylen – jako zodpovědnou za předčasný opad listů. To, že ethylen nějakým způsobem ovlivňuje rostliny a zejména plody, věděli již staří Číňané, kteří využívali pálení vonných tyčinek (uvolňuje se ethylen) k dozrávání ovoce.

Ethylen je produkován všemi částmi rostlin, ale nejvíce ho vyrábějí rostoucí části rostlin, a to hlavně během zrání plodů, stárnutí a opadu plodů a květů. Při stresu nebo poranění dochází během krátké doby (v řádu desítek minut) až k několikanásobnému nárůstu produkce ethylenu.

#### Funkce ethylenu jako fytohormonu:

- urychluje zrání těch plodů, u kterých se zintenzivňuje dýchání.
- na podzim urychluje opad listů (pomáhá vytvořit vrstvu buněk, v které se listy odlamují).
- u klíčících rostlin brání v růstu a reguluje růst semenáčku při klíčení pod zemí

#### **Zrání plodů**

Nezralé plody jsou zelené, tvrdé a nejdle. Při dozrávání se plody zabarví, změknou a stávají se chutnými, což je způsob rostliny, jak přilákat „konzumenty“ plodů, kteří zajistí rozšíření semen (zoochorie). Dozrávání je řízeno rostoucí koncentrací ethylenu. Jeho vlivem dojde k enzymatickému rozkladu komponent buněčné stěny a plody změknou. Dochází k rozkladu škrobu na jednoduché cukry a plody zesládnou. Vznikající barvy a vůně přilákají zvířata, která se budou podílet na dalším rozšiřování plodů. Vznikající ethylen má stimulační vliv na produkci dalšího ethylenu (regulace pozitivní zpětnou vazbou).

Tato chemická kaskáda má své využití v praxi:

Pomocí uměle navozené atmosféry s ethylenem se uměle dozrává ovoce, které se k nám dováží jako nezralé z exotických krajů (např. banány). A naopak, např. při dlouhodobém skladování jablek není žádoucí, aby jablka dozrávala, takže se skladují v atmosféře  $\text{CO}_2$ , který u jablek inhibuje syntézu nového ethylenu.

#### **Opad listů**

Shazováním listů (u stromů a bylin v mírném pásu) se rostliny chrání v zimním období, aby nedocházelo k odpařování vody a usychání v době, kdy rostlina nemůže ze zamrzlé půdy získat vodu. Na bázi řapíku se nachází specifická vrstva – tzv. **opadová vrstva buněk**, které vypadají jinak než okolní buňky (mají velmi tenké buněčné stěny a jsou bohaté na hydrolytické (rozkladné) enzymy). Působením hydrolytických enzymů dochází k rozkladu pektinu v buněčných stěnách, a ty jsou nakonec tak slabé a tenké, že působením větru a vlastní váhy nakonec samy odpadnou. Opad listů je řízen změnou v koncentracích hormonů auxinu a právě ethylenu. Jakmile se sníží produkce auxinu a zvýší produkce ethylenu, aktivují se hydrolázy v opadavé vrstvě buněk.

#### **Odpověď klíčících rostlin na ethylen**

Ethylen se při klíčení rostlin běžně uplatňuje. Jeho význam si můžeme popsat na příkladu klíčící rostlinky, která se nachází ještě v půdě a klíčí směrem nahoru k povrchu. Pokud při klíčení narazí na nějakou překážku (např. kámen), vnímá to jako mechanický stres – překážku a v důsledku toho se u ní začne produkovat ethylen, který vyvolá tzv. **trojitou odpověď**. Ta umožní rostlince vyhnout se překážce a překonat ji. Trojitá odpověď se skládá z těchto částí – **zpomalení růstu stonku, zesílení stonku a zkroucení apexu, tak aby meristém byl chráněn**. Pokud je překážka (kámen) překonána a obejita, produkce ethylenu ustane, stonek opět zeštíhlí a roste směrem nahoru. Čím vyšší koncentrace ethylenu se při klíčení vyskytuje, tím je trojitá odpověď zřetelnější.

### **3.2.1 Testování vlivu ethyleny na klíčení semen řeřichy a dozrávání plodů rajčat**

**Časová dotace:**

příprava experimentu cca 20–30 minut, pozorování 4 dny

**Cíl:**

v rámci jednoho experimentu prokázat vliv ethyleny na klíčení semen a dozrávání plodů

**Pomůcky a materiál:**

Sklenice s těsně přiléhajícím uzávěrem, vata, gázový obvaz, semínka řeřichy seté, zralé jablko (nebo zralý banán), nezralá rajčata

**Postup práce:**

V tomto experimentu chceme prokázat, že ethylen urychluje dozrávání plodů a zároveň způsobuje abnormality při klíčení semen. Jako zdroj ethyleny budeme používat zralé jablko, nebo zralý banán. Připravíme si sklenice s víčky, do kterých na dno dáme vrstvu vaty a tu dobře navlhčíme. Na vlhkou vatu vysejeme semínka řeřichy. Navrhne schéma pokusu:

**Sklenice 1** – bude kontrolní, vysejeme řeřichu a uzavřeme

**Sklenice 2** – do vaty vysejeme semínka řeřichy, do gázy vložíme zralé jablko a nezralé rajče, upevníme tak, aby oboje zůstalo v prostoru nad vatou, sklenici uzavřeme

**Sklenice 3** – do vaty vysejeme semínka řeřichy a do gázy vložíme jen nezralé rajče, gázu upevníme k víčku a sklenici uzavřeme

**Sklenice 4** – do vaty vysejeme semínka řeřichy, do gázy vložíme zralé jablko, které bude zbavené slupky a nezralé rajče, upevníme tak, aby oboje zůstalo v prostoru nad vatou, sklenici uzavřeme. V této sklenici testujeme hypotézu, zda produkce ethyleny probíhá i v plodu, který je zbaven slupky.

**Výsledky:**

Již druhý den po založení experimentu vidíme, že semena řeřichy začínají klíčit. Třetí den je patrné, že klíčení řeřichy ve sklenici 2 je výrazně pomalejší a klíčící rostlinky se od kontroly ve sklenici 1 morfologicky odlišují – rostou jakoby rovnoběžně s povrchem. Zároveň pozorujeme, že zelené rajče ve sklenici 2 začíná jako první dozrávat. Čtvrtý den je možné experiment ukončit, protože rajče ve sklenici 2 již dozrálo, a zároveň jsou patrné rozdíly v naklíčených rostlinkách mezi jednotlivými sklenicemi. Ve sklenici 4 se podařilo prokázat, že ethylen se produkuje mnohem více, pokud je plod celistvý, nezbavený pokožky.

Vedle sebe položíme rostlinky ze sklenice 1 a 2 a porovnáme, zda je patrná trojitá odpověď.

### **3.2.2 Testování vlivu ethyleny na opad listů**

#### **Časová dotace:**

Příprava experimentu – cca 10–20 minut, pozorování – přibližně 1 týden

#### **Cíl:**

Prokázat, že produkce ethyleny má vliv na předčasný opad listů

#### **Pomůcky a materiál:**

Sklenice s těsně přiléhajícím víčkem, větvičky stromů (např. třešeň, šeřík, lípa, vrba...), zkumavky, zralá jablka

#### **Postup práce:**

Připravíme si dvě větší sklenice s dobře přiléhajícím víčkem. Uřízneme dvě stejně velké větvičky ze stromu a počet listů na větvičce upravíme tak, aby byl v obou případech stejný. Do sklenice č. 1 umístíme větvičku vloženou do zkumavky s vodou a uzavřeme – tato sklenice bude kontrolní. Do sklenice č. 2 vložíme druhou větvičku, a navíc přidáme zralé jablko. Sklenici uzavřeme a pozorujeme.

#### **Výsledky a závěr:**

Vzhledem k tomu, že v přírodě se na opadu listů v součinnosti se vzrůstající koncentrací ethyleny podílí také klimatické faktory (hlavně vítr), je dobré tak 1x za den se sklenicemi opatrně zatřást nebo zakývat. V momentě, kdy ve sklenici s ethylenem po zatřesení dojde k opadu listů a v kontrolní sklenici ne, můžeme pokus ukončit. U většiny testovaných větviček došlo k opadu listů (vzhledem ke kontrole) do 7-8 dnů od započetí pokusu. Nejlépe v pokusu reagovaly větvičky vrby bílé, šeříku nebo broskvoně. Naopak nejdéle trval opad listů (u stromů, které jsem testovala) u jabloně a javoru babyka.

### **3.3 Jak vznikaly tyto úlohy – praktická doporučení**

#### Experiment s potlačením klíčení a dozráváním plodů

K sestavení tohoto experimentu jsem použila „retro“ zavařovací sklenice – mají několik výhod, buclatý tvar, takže se s nimi dobře manipuluje a skleněná (čili průsvitná) víčka, kterými může lépe procházet světlo, a které také velmi těsně přiléhají na sklenici. Pokud by se použily normální 0,7 l zavařovací sklenice, doporučila bych gázu s ovocem a rajčetem uchytit gumičkou u okraje sklenice a místo víčka použít např. potravinářskou folii, a upevnit jí tak, aby těsně přiléhala na sklenici (vznikající ethylen nebude unikat a zároveň bude procházet světlo). Semínka jsem vysévala na vlhkou vatu. V některých návodech se doporučuje vysévat semínka do zeminy, ale vzhledem k tomu, že ve sklenici vznikne uzavřený a poměrně vlhký a teplý ekosystém, při použití zeminy pro výsev často dojde k rychlému růstu plísni. V tomto směru se mi vata mnohem lépe osvědčila.

Ještě upozornění – sklenice byly umístěny na světle, ale ne na plném slunci (byly na severní straně okna) – tím jsem chtěla vyloučit fakt, že nezralé rajče dozraje samo i za oknem s plným sluncem (teplo a světlo).

Dále jsem testovala, zdali je lepší v pokusu použít zralé jablko nebo banán – experiment dobře vychází jak s jablkem, tak i s banánem. Literatura uvádí, že ethylen se nejvíce tvoří při zrání tzv. klimakterických plodů, kam se řadí např. rajčata, jablka, hrušky, broskve, olivy nebo mango. Pokus pravděpodobně nevyjde (nevím, netestovala jsem), pokud se použijí např. citrusy.

V experimentu s banánem jsem testovala, zda k produkci ethylenu stačí jen banánová slupka. Výsledkem bylo zjištění, že banánová slupka neprodukuje téměř žádný ethylen a ani neurychluje dozrávání rajčete. Aby byl experiment kompletní (což jsem zatím nestihla zopakovat) mělo by být rozvržení pokusu následující:

- 1- kontrola – samotná semínka řeřichy
- 2- semínka řeřichy + nezralé rajče
- 3- semínka řeřichy + nezralé rajče + zralý banán
- 4- semínka řeřichy + nezralé rajče + banánová slupka
- 5- semínka řeřichy + nezralé rajče + oloupaný banán

V ideálním případě bychom měli dojít ke zjištění, že nejvíce ethylenu vyprodukuje neporušený zralý banánový plod, ani samotná slupka, ani oloupaný banán nemají na dozrávání rajčete a ovlivňování klíčení takový vliv, jako neporušený banán.

Vzhledem k tomu, že jsem v rámci jednoho experimentu testovala dva fenomény – zároveň dozrávání i potlačení klíčení, ukončila jsem experiment již po 4 dnech, kdy dozrálo rajče v prostředí s nejvyšší koncentrací ethylenu. Pokud by experiment pokračoval, došlo by k postupnému dozrávání rajčat i v dalších sklenicích, takže by se hůře hodnotilo, které je více červené.

Pokud by se tento experiment rozdělil na dva pokusy – testovalo by se zvlášť dozrávání plodů a zvlášť vliv na klíčení – lze v případě klíčení experiment protáhnout i na 10–14 dní. Poté by bylo možné lépe porovnat klíčivost semen a dosaženou výšku a vývojové stadium semenáčků v různých variantách a výsledky vynést do grafu.

### Experiment s opadem listů

Při přípravě tohoto pokusu jsem se snažila co nejvíce napodobit podmínky, jaké panují venku (v přírodě). Chtěla jsem, aby na testované větvičky působil sluneční svit a změny teplot (ve dne – v noci), proto jsem experimentální sklenice postavila na terasu. Zároveň jsem se snažila napodobit působení větru, takže jsem každý den s uzavřenými sklenicemi trochu „zatřepala“ a pozorovala jsem, jaký to bude mít vliv na opad listů.

Tento pokus se dá dělat v několika variantách:

- prokazujeme vliv ethylenu na opad listů – použijeme větvičku ze stromu, o kterém víme, že je pro tento experiment vhodný (vrba, šeřík, broskvoň). Testujeme dvě sklenice – jedna je experimentální – obsahuje větvičku ve zkumavce s vodou a jablko (příp. více jablek), druhá sklenice je kontrolní a obsahuje pouze větvičku ve zkumavce s vodou. Experiment ukončíme ve chvíli, kdy po zatřesení se sklenicemi v pokusné sklenici opadnou listy z větvičky, ale v kontrolní sklenici nikoliv.
- Testujeme větvičky různých stromů a zjišťujeme, které z nich jsou k působení ethylenu náchylnější. Pokus se dá uspořádat stejně jako v předchozím případě – do jedné sklenice se umístí vždy jedna testovaná větvička + ke každé testované větvičce děláme kontrolu bez ethylenu.
- Testujeme více větviček najednou. K tomuto pokusu se dá použít velká (objem cca 3 l nebo 5 l) sklenice. Do této sklenice se vloží několik menších zralých jablek a mezi ně se postaví zkumavky s vodou a s testovanými větvičkami (dá se takto otestovat 4–5 vzorků). Sklenice se neprodyšně uzavře mikrotenovým sáčkem a gumičkou. Stejným způsobem se vyrobí i kontrolní sklenice bez jablek – místo jablka se použije koule z mokrého papíru – jako zdroj vlhkosti. Sklenice postavíme ven, tak aby na ně alespoň část dne svítilo slunce. Po uplynutí předem dohodnutého časového intervalu (např. 5 dnů) se obě sklenice otevřou a jednotlivé větvičky se vytáhnou a porovnají z hlediska opadaných listů.

Tyto experimenty jsem prováděla v podzimním období (na přelomu září a října). Dá se předpokládat, že v tomto období (blížíciho se vegetačního klidu) už jsou stromy k působení ethylenu citlivější. Nicméně vždy se podařilo prokázat, že větvičky v přítomnosti ethylenu shodily listy dříve než kontrolní větve bez ethylenu. Zajímavé by bylo udělat tento experiment na jaře nebo v létě, kdy předpokládám, že odolnost stromů vůči stresu způsobeného ethylenem by mohla být vyšší, než je tomu na podzim.

A ještě doporučení k výběru stromů v tomto experimentu. Já jsem testovala větve těchto stromů:

Jabloň, třešeň, broskvoň, šeřík, zlatice převislá (*Forsythia*), lípa, vrba bílá, bříza a javor babyka.

Nejvhodnější k tomuto experimentu jsou **broskvoň, šeřík a vrba** (v pokusné sklenici listy opadaly již po 4 dnech), naopak nejodolnější vůči ethyleny se ukázala být **jabloň a javor klen** (neopadaly ani po 10 dnech). U jabloně by se to dalo vysvětlit i tím, že tam je zřejmě geneticky nastavená poměrně vysoká odolnost vůči ethyleny, protože na podzim na jabloních dozrávají jablka, která ethylen samy produkují a stejně stromy neshazují listy, protože je pro ně výhodné v tomto období ještě fotosyntetizovat. Tyto experimenty se dají provádět i v zimním období, doporučuji použít větvičky z břečťanu (*Hedera helix*) nebo ptačího zobu (*Ligustrum*).

A ještě důležité upozornění. Jako zdroj ethylenu je nejvhodnější použít jablka, protože jablka produkují ethylen v delším časovém intervalu než např. banány. Dále je důležité zohlednit zdroj jablek – nejlépe se k experimentům hodí jablka přímo ze zahrady, tj. neošetřené povrchovým voskem, který má právě sloužit ke snížení produkce ethylenu a ke zpomalení dozrávání u komerčně skladovaných a prodávaných jablek.

# Testování vlivu ethylenu na klíčení semen řeřichy a dozrávání plodů rajčat

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Cílem této úlohy bylo prokázat vliv ethylenu na dozrávání nezralých plodů (zde konkrétně zelených bobulí rajčete) vliv na klíčící rostlinky řeřichy seté.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Sklenice s těsně přiléhajícím uzávěrem
- vata, gázový obvaz
- semínka řeřichy seté
- zralé jablko (nebo zralý banán)
- nezralá rajčata

## POSTUP PRÁCE

---

V tomto experimentu jsem chtěla prokázat, že ethylen urychluje dozrávání plodů a zároveň způsobuje abnormality při klíčení semen. Jako zdroj ethylenu jsem použila v prvním pokusu zralé jablko, v druhém pokusu jsem pak testovala zralý banán.

Připravila jsem si zavařovací sklenice se skleněnými víčky. Na dno jsem dala vrstvu vaty, kterou jsem dobře navlhčila. Na vlhkou vatou jsem vysela semínka řeřichy.

Pokus 1 jsem prováděla podle následujícího schématu:

**Sklenice 1)** – kontrolní, vysela jsem řeřichu a uzavřela

**Sklenice 2)** – do vaty jsem vysela řeřichu, do gázy jsem vložila zralé jablko a nezralé rajče a upevnila tak, aby rajče i jablko zůstaly viset v prostoru nad vatou, sklenici jsem uzavřela.

**Sklenice 3)** – do vaty jsem vysela řeřichu, do gázy jsem vložila nezralé rajče, gázu jsem upevnila stejně jako u sklenice 2 a sklenici jsem uzavřela.

**Sklenice 4)** – do vaty jsem vysela řeřichu, do gázy jsem vložila zralé jablko zbavené slupek a nezralé rajče, upevnila tak, aby oboje zůstalo v prostoru nad vatou, a sklenici jsem uzavřela. V této sklenici jsem zjišťovala, zda je ethylen produkován probíhá i v plodu, který je zbaven slupky.

Pokus 2 jsem založila podle tohoto schématu:

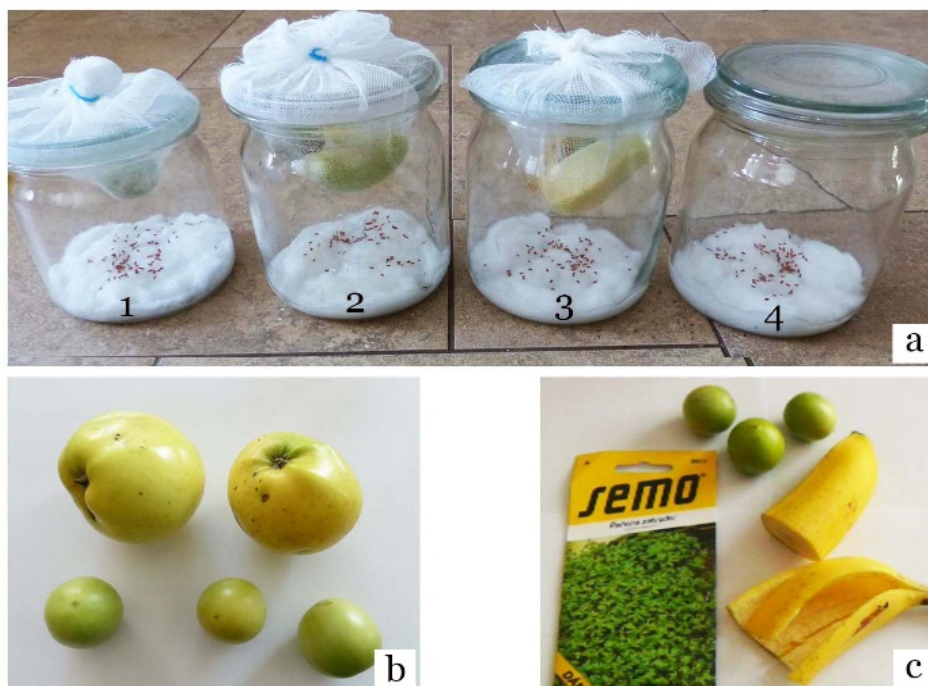
**Sklenice 1)** – kontrolní (pouze řeřicha)

**Sklenice 2)** – řeřicha + nezralé rajče + celý banán

**Sklenice 3)** – řeřicha + nezralé rajče

**Sklenice 4)** – řeřicha + nezralé rajče + banánová slupka





**Obrázek 1:** Vliv ethyleny na klíčení a dozrávání – rozvržení experimentu: **a)** 1-nezralé rajče + řeřicha, 2-jablko + nezralé rajče + řeřicha, 3-oloupané jablko + nezralé rajče + řeřicha, 4-řeřicha; **b)** jablka a nezralá rajčata na začátku experimentu ; **c)** banány a nezralá rajčata na začátku experimentu

## VÝSLEDKY

### TESTOVÁNÍ VLIVU ETHYLENU ZE ZRALÝCH JABLEK

Již druhý den po založení experimentu bylo vidět, jak semena řeřichy začínají klíčit. Třetí den bylo patrné, že klíčení řeřichy ve sklenici 2 je výrazně pomalejší a klíčící rostlinky se od kontroly ve sklenici 1 morfologicky odlišují – rostou jakoby rovnoběžně s povrchem. Zelené rajče ve sklenici 2 začalo jako první dozrávat. Čtvrtý den jsem experiment ukončila, protože rajče ve sklenici 2 již dozrálo, a zároveň jsem mohla pozorovat jednoznačné rozdíly v naklíčených rostlinkách mezi jednotlivými sklenicemi. Ve sklenici 4 se mi podařilo prokázat, že ethylen se produkuje v mnohem větším množství, pokud je plod celistvý, nezravený pokožky.

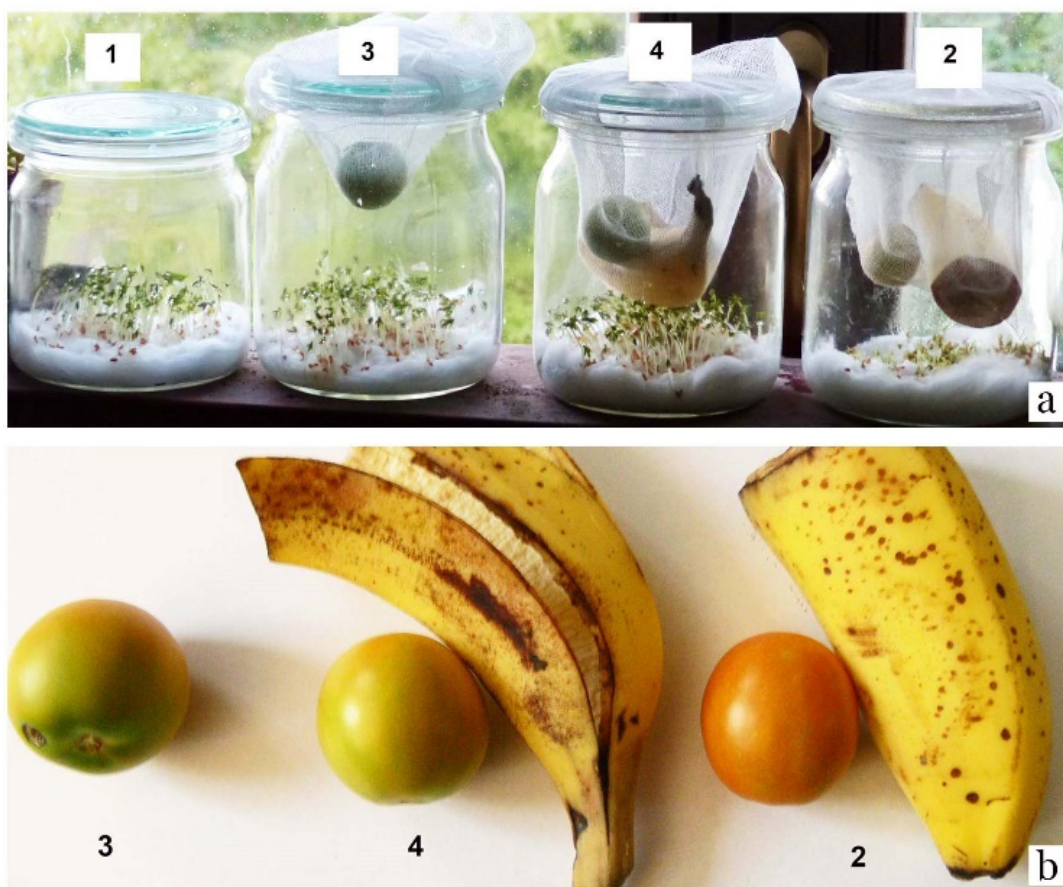


**Obrázek 2:** Zhodnocení experimentu po čtyřech dnech

## TESTOVÁNÍ Vlivu ETHYLENU ZE ZRALÉHO BANÁNU

V tomto experimentu jsem testovala, zda zralý banán produkuje ethylen v natolik dostačující koncentraci, aby se dal použít při demonstračních pokusech s ethylenem místo jablka. Na rozdíl od pokusu 1 jsem ve sklenici 4 použila ne celý banán, ale jen banánovou slupku, protože jsem chtěla otestovat, zda i v tomto případě bude docházet k produkci ethyleny.

Pokus 2 byl ukončen (stejně jako pokus 1) po čtyřech dnech, kdy došlo k dozrání (zčervenání) rajčete ve sklenici 2. Klíčící řeřicha vykazovala největší anomálie rovněž ve sklenici 2. Zralost rajčete i klíčení řeřichy ve sklenici 4, kde se nacházela pouze banánová slupka, byly srovnatelné s kontrolami ve sklenicích 1 a 3.



**Obrázek 3:** Zhodnocení vlivu ethyleny z banánu na dozrávání rajčat po 4 dnech: **a)** rozvržení experimentu – 1– řeřicha (kontrola), 2– řeřicha + nezralé rajče, 3– řeřicha + nezralé rajče + banánová slupka, 4– řeřicha + nezralé rajče + celý banán; **b)** porovnání míry zralosti rajčat po ukončení experimentu

Po skončení experimentu jsem vedle sebe položila rostlinky ze sklenice 1 a 2, porovnávala jsem je a zjišťovala jsem, zda je patrná tzv. trojitá odpověď.



**Obrázek 4:** Trojitá odpověď klíčící rostliny na přítomnost ethylenu (vpravo): zkrácení stonku, zpomalení růstu, zatočení a růst v horizontálním směru vlevo kontrola (bez ethylenu)

## DISKUZE

Oba experimenty (1 i 2) naplnily mé předpoklady, že ethylen, který se uvolňuje ze zralého ovoce, urychluje dozrávání nezralých rajčat a zároveň zpomaluje a deformuje růst klíčících rostlin řeřichy. Zjistila jsem, že jak jablko, tak i banán lze používat při demonstračních pokusech s ethylenem. V pokusu s jablkem jsem navíc prokázala, že pokud je jablko zbavené slupky, produkce ethylenu je výrazně nižší.

V experimentu s banánem jsem testovala, zda k produkci ethylenu stačí jen zralá banánová slupka. Výsledkem bylo zjištění, že banánová slupka neprodukuje téměř žádný ethylen, neurychluje dozrávání rajčete, ani nemá vliv na klíčení. Aby byl ovšem experiment kompletní (což jsem zatím nestihla zopakovat) mělo by být rozvržení pokusu následující:

- 1- kontrola – samotná semínka řeřichy
- 2- semínka řeřichy + nezralé rajče
- 3- semínka řeřichy + nezralé rajče + zralý banán
- 4- semínka řeřichy + nezralé rajče + banánová slupka
- 5- semínka řeřichy + nezralé rajče + oloupaný banán

V ideálním případě bych tímto měla dokázat, že nejvíce ethylenu vyprodukuje neporušený zralý banánový plod, ani samotná slupka ani oloupaný banán nemají na dozrávání rajčete a ovlivňování klíčení takový vliv, jako neporušený banán.

## ZÁVĚR

V tomto experimentu jsem prokázala, že ethylen ze zralých jablek a zralých banánů podporuje dozrávání nezralých rajčat. A zároveň ovlivňuje klíčení semen řeřichy. U klíčících rostlin v přítomnosti ethylenu byla patrná tzv. trojitá odpověď – zpomalení růstu stonku, zesílení stonku a zatočení a růst v horizontálním směru.

# Testování vlivu ethylenu na opad listů

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Cílem této úlohy bylo prokázat vliv fytohormonu ethylenu na opad listů. Byly testovány olistěné větvičky různých druhů stromů v cíleně navozené atmosféře s vyšší koncentrací ethylenu.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Sklenice s těsně přiléhajícím uzávěrem, velké sklenice (dózy o objemu 3l nebo 5l)
- Zkumavky nebo malé odměrné válečky
- Větvičky různých druhů stromů (jabloň, třešeň, broskvoň, šeřík, zlatice převislá, lípa, vrba bílá, bříza a javor babyka)
- zralá jablka
- koule z mokrého papíru (jako kontrola)
- mikroténové sáčky, gumičky

## POSTUP PRÁCE

---

V tomto experimentu jsem chtěla prokázat, že ethylen má vliv na opad listů. Jako zdroj ethylenu jsem použila zralá jablka. Vliv ethylenu na opad listů jsem testovala na vzorcích 9 větviček z různých druhů stromů.

## TESTOVÁNÍ Vlivu ETHYLENU NA OPAD LISTŮ

Připravila jsem si zavařovací sklenice se skleněnými víčky. Na dno jsem dala 2 malá zralá jablka a mezi ně jsem umístila zkumavku s vodou, do které jsem vložila olistěnou větvičku testovaného stromu. Podobně velkou větvičku (stejný počet listů, ze stejného stromu) jsem vložila do kontrolní sklenice bez jablka (místo jablka jsem použila kouli z mokrého papíru). Obě sklenice jsem neprodyšně uzavřela a umístila do venkovního prostředí (terasa, západní strana, odpolední a večerní slunce)

V tomto experimentu jsem testovala větve těchto stromů:

- Jabloň domácí - (*Malus domestica*)
- Třešeň obecná – ptačí (*Prunus avium*)
- Lípa srdčitá – (*Tilia cordata*)
- Šeřík – (*Syringa*)
- Bříza bělokorá – (*Betula pendula*)





**Obrázek 1:** Uspořádání experimentu - vlevo sklenice s větvíčkou a jablkem, vpravo kontrola - bez ethylenu

Každý den jsem všemi sklenicemi opatrně zatřásla (abych tím imitovala působení větru). V momentě, kdy po zatřesení došlo v některé ze sklenic k opadu listů, pokus jsem pro tento určitý druh stromu ukončila a zaznamenala jsem si, jaký byl časový interval od založení pokusu do opadu listů.

## TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI VŮČI ETHYLENU U RŮZNÝCH DRUHŮ STROMŮ

V tomto experimentu jsem použila jednu velkou skleněnou láhev (objem 3 l). Na dno láhve jsem dala několik menších zralých jablek a mezi ně jsem postavila zkumavky s vodou a s těmito testovanými větvíčkami:

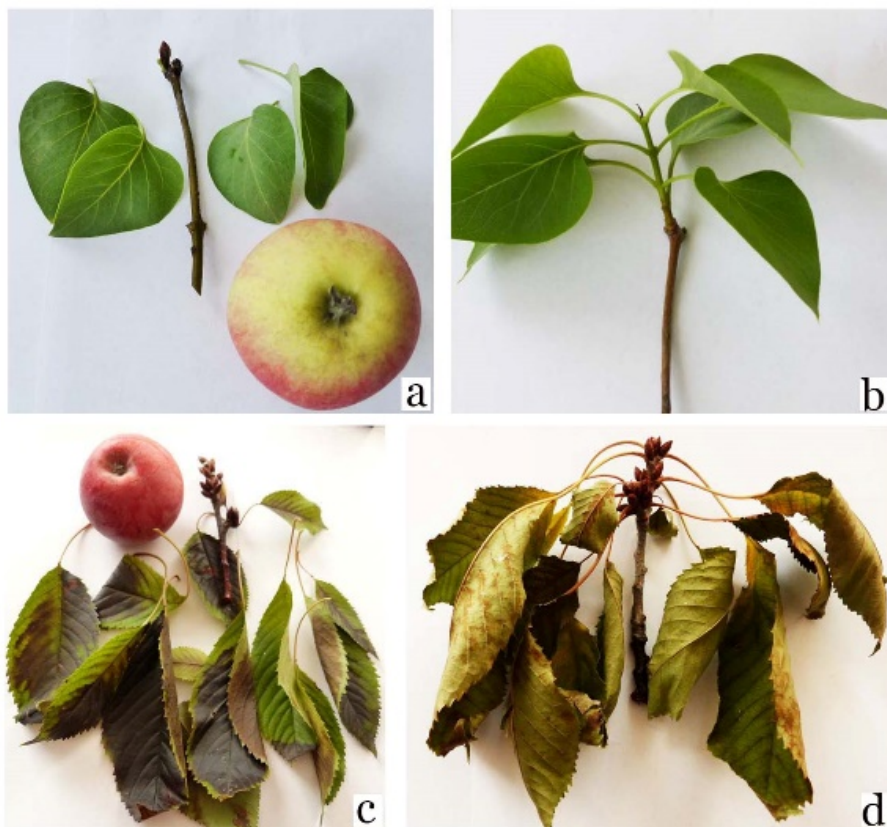
- Vrba bílá – (*Salix alba*)
- Broskvoň obecná – (*Prunus persica*)
- Zlatice převislá – (*Forsythia suspensa*)
- Javor babyka – (*Acer campestre*)

K této pokusné sklenici jsem připravila sklenici kontrolní, která obsahovala větvíčky stejných stromů jako experimentální sklenice, místo jablek však byly použity koule z mokrého papíru. Obě sklenice jsem neprodyšně uzavřela (pomocí mikrotenového sáčku a gumiček) a umístila jsem je do venkovního prostředí (východní strana, ranní a dopolední slunce). S těmito velkými sklenicemi jsem během experimentu netřásla. Pokus jsem ukončila po pěti dnech, kdy jsem otevřela obě sklenice a postupně jsem vytahovala jednotlivé větvíčky a porovnávala je (pokusná x kontrolní) podle počtu opadaných listů.

# VÝSLEDKY

## TESTOVÁNÍ VLIVU ETHYLENU NA OPAD LISTŮ

V prvním experimentu na přítomnost ethylenu nejlépe reagovala větvička šeříku – opad listů jsem zaznamenala již po 4 dnech. Dále listy opadávaly v tomto pořadí: lípa srdčitá (6 dnů), bříza bělokorá (6 dnů), třešň obecná (7 dnů) a jabloň domácí (po 10 dnech upadl pouze jeden list). Ve všech případech opadaly listy pouze ve sklenicích s jablky (tj. v přítomnosti ethylenu). V kontrolních sklenicích jsem opad listů nepozorovala ani u jednoho druhu stromu.



**Obrázek 2:** Srovnání kontrolních větví a větví pod vlivem ethylenu: **a)** větev šeříku po čtyřech dnech ve sklenici s ethylenem; **b)** kontrolní větev šeříku po čtyřech dnech bez přítomnosti ethylenu; **c)** větev třešně po 7 dnech v atmosféře ethylenu; **d)** kontrolní třešňová větev po sedmi dnech

## TESTOVÁNÍ PRAHU CITLIVOSTI VŮČI ETHYLENU U RŮZNÝCH DRUHŮ STROMŮ

Tento experiment jsem ukončila přesně po pěti dnech. V průběhu pokusu jsem se sklenicemi netrásla, ale pouhým pozorováním jsem zaznamenala, že již po 4 dnech došlo k opadu několika listů u větvičky broskvoně a u větvičky vrby bílé.

Když jsem po pěti dnech vytahovala všechny testované větvičky, u experimentální sklenice (s jablky) mi listy z větví opadávaly již během manipulace s nimi. U kontrolní sklenice jsem nezaznamenala žádné opadané listy.



**Obrázek 3:** Srovnání experimentálních a kontrolních větviček po 5 dnech pokusu: a) javor babyka; b) vrba bílá; c) zlatice převislá; d) broskvoň obecná; experimentální větve pod vlivem ethylenu jsou označeny jablkem (vždy vlevo)

## DISKUZE

Oba experimenty (1 i 2) naplnily mé předpoklady, že ethylen, který se uvolňuje ze zralého ovoce, má vliv na opadávání listů. Ovšem citlivost jednotlivých stromů vůči etylenové atmosféře se lišila. Jako nejcitlivější – a tedy k demonstračním pokusům nejvhodnější – se nabízí použití šeríku, broskvoně nebo vrby bílé. Nejméně vhodné (z mnou testovaných vzorků) k tomuto účelu jsou větve jabloně a javoru babyky.

U jabloně by se to dalo vysvětlit i tím, že tam je geneticky nastavená poměrně vysoká odolnost vůči ethylenu, protože na podzim na jabloních dozrávají jablka, která ethylen samy produkují a stejně stromy neshazují listy, protože je pro ně výhodné v tomto období ještě fotosyntetizovat.



**Obrázek 4:** Olistěná jabloň s jablky (říjen 2018), bezlistá jabloň s plody (listopad 2018)



Tyto experimenty jsem prováděla v podzimním období (na přelomu září a října). Dá se předpokládat, že v tomto období (blížíciho se vegetačního klidu) už jsou stromy k působení ethyleny citlivější. Nicméně vždy se podařilo prokázat, že větvičky v přítomnosti ethyleny shodily listy dříve než kontrolní větve bez ethyleny. Zajímavé by bylo udělat tento experiment na jaře nebo v létě, kdy předpokládám, že odolnost stromů vůči stresu způsobeného ethylenem by mohla být vyšší, než je tomu na podzim.

## ZÁVĚR

---

V tomto experimentu jsem prokázala, že větve z různých stromů v atmosféře ethyleny ze zralých jablek shazují své listy dříve, než větve týchž stromů v kontrolním experimentu bez ethyleny (bez jablek). Podařilo se mi vytipovat několik druhů stromů, které lze dobře použít při demonstračních pokusech tohoto jevu. Jde zejména o větve šeríku (*Syringa*), broskvoně (*Prunus persica*) a vrby bílé (*Salix alba*). Naopak nevhodné k demonstraci jsou větve jabloně (*Malus domestica*).

Tato experimentální data – mají-li být tyto pokusy reprodukovány, byla získána v podzimních měsících (přelom září a října). Pokud budou pokusy prováděny v jiném ročním období (jaro nebo léto) nemohu zaručit, že výsledky experimentu budou totožné.

## 4 FOTOSYNTETICKÁ LABORATOŘ

### 4.1 Úvod do problematiky

Téměř všechn život na Zemi funguje na sluneční pohon. Bez slunce by život nebyl. Sluneční energie musí překonat vzdálenost přibližně 160 milionů kilometrů, aby mohla být zachycena v chloroplastech zelených rostlin a v procesech, které se označují jako **FOTOSYNTÉZA**, přeměněna na energii chemickou.

Fotosyntéza tedy zajišťuje výživu pro téměř celý svět. A to jak přímo – jako autotrofní výživa organismů (tedy hlavně zelených rostlin), které dokáží pomocí fotosyntézy přeměnit sluneční energii a  $\text{CO}_2$  do organických sloučenin, tak i nepřímo – heterotrofní organismy využívají uhlíkatý organický materiál, který primárně pochází právě z autotrofních organismů. Téměř všechny heterotrofní organismy jsou na autotrofech závislé, a to nejen svou výživou, ale také spotřebou kyslíku, který vzniká jako vedlejší produkt fotosyntézy.

Fotosyntéza je fascinující kaskáda procesů, ale jako učivo nebývá pro svou náročnost a komplexitu u studentů příliš oblíbená. V této kapitole bych ráda nabídla trochu jiný způsob teoretické výuky, a sice zábavné vyučování formou komiksu. Autorem tohoto velmi zdařilého dílka je prof. Jay Hosler z Juniata College v Pensylvánii,<sup>[2]</sup> s jehož svolením jsem komiks přeložila do češtiny.

V úlohách, které jsem vybrala, budeme ověřovat vliv různých parametrů na průběh fotosyntézy. Vzhledem k tomu, že nemáme k dispozici žádné sofistikované přístroje, kterými bychom stanovovali koncentrace plynů v ovzduší, budeme pracovat s vodními rostlinami a ve vodním prostředí. V tomto uspořádání je možné i pouhým okem pozorovat, jak se z rostlinných pletiv uvolňuje do vody kyslík a unikající plyny je možné jímat. Je ale dobré předem si zopakovat, jaká je rozpustnost plynů ve vodě a jak ji ovlivňuje např. teplota a další faktory.

Teplota vody °C	Oxid uhličitý mg.l <sup>-1</sup>	Teplota vody °C	Oxid uhličitý mg.l <sup>-1</sup>
0	1,10	12	0,65
1	0,97	13	0,63
2	0,92	14	0,61
3	0,90	15	0,59
4	0,84	16	0,57
5	0,83	17	0,55
6	0,81	18	0,54
7	0,78	19	0,52
8	0,75	20	0,51
9	0,72	25	0,44
10	0,70	30	0,38
11	0,67	35	0,31

Tabulka upravena podle: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C4680/um/2457585/CO2\\_ve\\_vode.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C4680/um/2457585/CO2_ve_vode.pdf)

Z tabulky je zřejmé, že se stoupající teplotou vody rozpustnost oxidu uhličitého ve vodě klesá, na rozdíl od ostatních pevných či kapalných látek, kde je tomu naopak.

### 4.2.1 Fotosyntéza, kyslík a oxid uhličitý

#### Cíl:

Zjistit, jaké podmínky jsou nutné k tomu, aby fotosyntéza probíhala. Jak můžeme dokázat vznikající kyslík, jak můžeme dokázat spotřebu oxidu uhličitého

#### Časová dotace:

60–120 minut

#### Pomůcky a materiál:

Uzavíratelné sklenice nebo Erlenmeyerovy baňky  
gumové balónky  
vodní rostlina např. vodní mor (*Elodea*)  
zdroj světla

#### Chemikálie:

destilovaná voda  
0,5% roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{NaHCO}_3$   
sifonová voda

#### Postup práce:

Nejprve si rozvrhneme experiment. Chtěli bychom dokázat, že fotosyntéza probíhá v zelených rostlinách na světle, že k tomu, aby probíhala, potřebuje kromě světla ještě  $\text{CO}_2$ , a že jako vedlejší produkt fotosyntézy se uvolňuje kyslík.

Připravíme si 3 sklenice nebo baňky a tři, pokud možno stejné snítky vodního moru.

**Sklenice 1** – 4/5 objemu destilované vody + 1/5 objemu sifonové vody + vodní mor

**Sklenice 2** – 0,5% roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{NaHCO}_3$  + vodní mor

**Sklenice 3** – převařená destilovaná voda + vodní mor

Do sklenic vložíme snítky vodního moru, naplníme je až po okraj a uzavřeme je nasazením gumového balónku, který bude jímat vznikající plyny. Sklenice postavíme na světlé místo za oknem (nejlépe plné slunce) nebo pod intenzivní zdroj osvětlení (žárovka). Experiment necháme běžet cca 2 hodiny a průběžně pozorujeme bublinky kyslíku, které se vyvíjejí na listech vodního moru, a zaznamenáváme narůstající velikost gumových balónků.

#### Výsledky a závěr:

Během asi 20–30 minut po založení pokusu jsou už dobře patrné bublinky uvolňujícího se kyslíku na listech. Jako první se začne nafukovat balónek u sklenice č. 1, což je dáno do jisté míry i tím, že kromě vznikajícího kyslíku se ze sifonové vody uvolňují také bubliny  $\text{CO}_2$ . Srovnatelná se sklenicí 1 bude zhruba za 60 minut také sklenice 2 – což nám dokazuje, že zelené vodní rostliny si dokáží vytáhnout  $\text{CO}_2$  i z jiné sloučeniny (zde  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pokud nemají k dispozici plynný  $\text{CO}_2$ .

Ve sklenici 3 nejsou pozorovatelné žádné změny – takže tam fotosyntéza neprobíhá. Tím, že jsme destilovanou vodu převařili, došlo k odstranění všechny plynů ve vodě rozpuštěných, takže rostlina ve sklenici 3 neměla k dispozici žádný  $\text{CO}_2$  ani zdroj, ze kterého by si jej mohla vyrobit, a proto fotosyntéza v tomto uspořádání neprobíhala.

### 4.2.2 Fotosyntéza a dýchání

#### Cíl:

srovnat oba procesy z hlediska produkce a spotřeby  $O_2$  a  $CO_2$

#### Časová dotace:

60–120 minut

#### Pomůcky a materiál:

Vodní rostlina např. vodní mor (*Elodea*), plody (např. šípek, ptačí zob), uzavíratelné zkumavky, plastové brčko, zdroj světla, alobal na zatemnění

#### Chemikálie:

Voda z kohoutku, indikátor bromthymolová modř - BTB (zásobní roztok - koncentrace:  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> - navážka 30,9 mg BTB do 500 ml destilované vody)

#### Postup práce:

Nejprve se seznámíme s indikátorem bromthymolová modř. Tato chemikálie se používá jako indikátor pH. V zásaditém prostředí (pH vyšší než 7), se barví modře, ale když pH klesne pod 7, postupně se odbarvuje až do žlutého zbarvení. Nyní si ukážeme, jak bude BTB fungovat v našem experimentu. Do kádinky nalejeme vodu (obyčejnou z kohoutku) tak, aby byla do  $\frac{3}{4}$  plná. Pak přidáme indikátor tak, aby se voda zbarvila modře. Doporučuji přidat cca 4 – 4,5 ml zásobního roztoku BTB na 200 ml vody. Poté necháme studenty foukat brčkem do vody tak dlouho, než se odbarví (stačí 2–3 nádechy). Popíšeme děj, který nastal: Foukáním do vody v ní rozpouštíme  $CO_2$  takže vzniká slabá kyselina uhličitá  $H_2CO_3$ , která sníží pH vody tak, že dojde k jejímu odbarvení. Můžeme si také udělat řadu zkumavek, do kterých budeme přidávat kyselé nebo zásadité látky a budeme pozorovat, jak se indikátor BTB barví. Dále máme několik možností, jak postavit experiment.

**Varianta 1** – necháme studenty pracovat podle předem daného protokolu:

Připravíme si 6 zkumavek:

1. Voda z kohoutku obarvená BTB (modrá barva) - kontrola
2. Voda z kohoutku + BTB – odbarvená přítomností  $CO_2$  (foukáním pomocí brčka) - kontrola
3. Voda obarvená BTB + snítka vodního moru – umístěno na světle
4. Voda obarvená BTB + snítka vodního moru – umístěno ve tmě (zkumavku obalit alobalem)
5. Voda obarvená BTB + plody (2 zralé šípky) – umístěno na světle
6. Voda obarvená BTB + plody (2 zralé šípky) – umístěno ve tmě (zkumavku obalit alobalem)

Již po 20 minutách můžeme pozorovat, jak se ve zkumavce 5 začíná modrý roztok odbarvovat. Po ukončení experimentu odbalíme zkumavky, které byly ve tmě a srovnáme barvu roztoku. Modrá barva by měla zůstat zachovaná pouze u zkumavky 3 (zelená rostlina na světle) a samozřejmě v 1 (kontrola), ostatní zkumavky by měly být odbarvené. Necháme studenty samostatně interpretovat výsledek experimentu.

**Varianta 2** – necháme studenty samostatně navrhnout a sestavit experiment:

- Chceme dokázat, že fotosyntéza probíhá jen na světle, ne ve tmě
- Chceme dokázat, že ve tmě rostlina dýchá
- Chceme dokázat, že nezelené části rostlin neprovádějí fotosyntézu, ale dýchají, a to jak na světle, tak i ve tmě.

Studenti mají k dispozici všechny pomůcky a materiály z této úlohy, sami si navrhnou experiment (včetně kontrol) a zhodnotí výsledky. Lze rozdělit i do skupin – jedna skupina dokazuje fotosyntézu na světle, jiná dýchání rostlin ve tmě apod.

### 4.3 Jak vznikaly tyto úlohy – praktická doporučení

Pokusy se dají provádět s většinou vodních rostlin, během jarních nebo letních měsíců můžeme prozkoumat přirozené vodní nádrže v okolí a vodní rostliny k experimentům nasbírat tam. Já jsem otestovala mimo vodního moru také stolítek klasnatý *Myriophyllum spicatum* a růžkatec ostnitý *Ceratophyllum demersum*. Obě tyto rostliny se ukázaly jako vhodný materiál k experimentování.

V zimních měsících doporučuji zakoupit vodní mor kanadský *Elodea* nebo rostlinu podobného typu v akvaristických potřebách.

Co se týká úlohy s bromthymolovou modří – vyzkoušela jsem a optimalizovala ředění zásobního roztoku. Opravdu nejvíce se mi osvědčilo smísit 4,2 ml zásobního roztoku BTB do 200 ml vody. V podstatě mi fungovalo rozmezí 4 – 4,5 ml BTB do 200 ml vody. Aby indikátor správně fungoval, musíme být schopni foukáním (brčkem) do modrého roztoku BTB tento roztok odbarvit (mělo by stačit pár výdechů). Pokud roztok BTB zůstává i po probublávání modře zbarvený, znamená to, že je potřeba udělat větší ředění zásobního roztoku BTB.

Když jsem testovala, které nezelené části rostlin (plody) spolehlivě odbarví roztok BTB, lepší výsledky dávaly plody ptačího zobu (*Ligustrum*) než plody růže šípkové (*Rosa canina*).

V mých experimentech došlo k odbarvení indikátoru BTB již po jedné hodině od začátku pokusu – jako zdroj světla jsem použila jižní okno s plným dopadem slunečních paprsků. Pokud se bude používat jako zdroj světla lampa, doporučuji experiment uspořádat tak, aby nešlo k přehřátí vody ve zkumavkách s testovaným rostlinným materiálem.

# Pozorování průběhu fotosyntézy u vodních rostlin za různých podmínek

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

---

V tomto experimentu jsem testovala průběh fotosyntézy u rostliny vodní mor (*Elodea*). Cílem bylo prokázat, že fotosyntéza probíhá v zelených rostlinách na světle, že k tomu, aby probíhala, potřebuje kromě světla ještě  $\text{CO}_2$ , a že jako vedlejší produkt fotosyntézy se uvolňuje kyslík. Sestavila jsem experimentální systém, ve kterém jsem měnila podmínky a pozorovala jsem, jaký vliv to bude mít na průběh fotosyntézy.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Čtyři sklenice s úzkým hrdlem (objem cca 250 ml)
- Několik snítek růžkatce ostnitého (*Ceratophyllum*)
- Gumové balónky
- Světelný zdroj

## POSTUP PRÁCE

---

Připravila jsem si čtyři sklenice a čtyři stejně velké snítky růžkatce.

**Sklenice 1** – kohoutková voda + růžkatec

**Sklenice 2** – převařená destilovaná voda + růžkatec

**Sklenice 3** – 4/5 objemu destilované vody + 1/5 objemu sifonové vody + růžkatec

**Sklenice 4** – 0,5% roztok  $\text{NaHCO}_3$  (uhličitan byl rozpuštěn do destilované vody) + růžkatec

Do sklenic jsem vložila snítky růžkatce, naplnila je až po okraj a uzavřela jsem je nasazením gumového balónku, který jímá vznikající plyny. Sklenice jsem na venkovní místo, kde v dobu experimentu svítlo plné slunce. Experiment jsem průběžně pozorovala, zapisovala uvolňování bublinek na listech rostliny, sledovala jsem, jak a které gumové balónky se naplňují plynem a vše jsem dokumentovala fotografiemi. Po cca 2 hodinách jsem experiment ukončila.

## VÝSLEDKY

---

### PŘI FOTOSYNTÉZE SE UVOLŇUJE KYSLÍK

Asi po 20–30 minutách od zahájení pokusu jsou dobře pozorovatelné bublinky uvolňujícího se kyslíku na listech. Množství uvolňovaného plynu odráží objem gumového balónku na sklenici. Jako první se začal nafukovat balónek u sklenice č. 3, což je dáno do jisté míry i tím, že kromě vznikajícího kyslíku se ze sifonové vody uvolňují také bubliny  $\text{CO}_2$ .

Přibližně za 60 minut se srovná velikost balónků u sklenic 3 a 4, poté se začne nafukovat také balónek ve sklenici 1. Ve sklenici 2 se až do skončení experimentu žádný plyn nevyvíjel – nebyly patrné bublinky na listech a ani objem balónku se nezvětšil.





**Obrázek 1:** Sklenice 1 - 4 po dvou hodinách na intenzivním slunečním světle - velikost balónku odráží intenzitu fotosyntézy (produkci kyslíku)

## PŘI FOTOSYNTÉZE JE NEZBYTNÝ $\text{CO}_2$

Podle očekávání fotosyntéza nejdříve začala probíhat ve sklenici 3, protože prostředí, které jsem rostlině vytvořila, poskytovalo dostatek  $\text{CO}_2$  rozpuštěného ve vodě. Asi po hodině bylo možné pozorovat stejně velkou intenzitu fotosyntézy (množství vznikajících bublinek) také ve sklenici 4 (roztok hydrogenuhličitanu sodného). Z toho vyplynulo, že rostlina – pokud nemá k dispozici  $\text{CO}_2$  rozpuštěný ve vodě, dokáže využít  $\text{CO}_2$  vázaný v hydrogenuhličitanu.

Ve sklenici 3 nejsou pozorovatelné žádné změny, protože převařením vody došlo k odstranění všech plynů rozpuštěných ve vodě. Rostlina ve sklenici 2 nemá k dispozici  $\text{CO}_2$  a proto u ní fotosyntéza neprobíhá.



**Obrázek 2:** Zhodnocení experimentu - srovnání velikosti balónků/množství uvolněného plynu: **a)** Sklenice 1 - voda z kohoutku - obsahuje rozpuštěné plyny ( $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$ ); **b)** Sklenice 2 - převařená destilovaná voda, nedochází k uvolňování kyslíku; **c)** Sklenice 3 - směs destilované a sifonové vody; **d)** Sklenice 4 - roztok  $\text{NaHCO}_3$ , dochází k uvolňování kyslíku



## DISKUZE

---

**Sklenice 1** – obsahovala snítku vodní rostliny ve vodě z kohoutku. Pitná voda z kohoutku by měla obsahovat od 150 do 400 mg rozpuštěných minerálních látek v jednom litru. Často bývá přítomen  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ , který může rostlina využít jako další zdroj  $\text{CO}_2$ . Mimo to, ve studené pitné vodě jsou rozpuštěny i plyny, takže v této sklenici mohla probíhat fotosyntéza, protože  $\text{CO}_2$  byl k dispozici, i když zřejmě nebyl v nadbytku. Bublínky kyslíku na listech jsem u sklenice 1 detekovala ve srovnání se sklenicemi 3 a 4 nejpozději.

**Sklenice 2** – obsahovala snítku vodní rostliny v převařené destilované vodě. Destilovaná voda neobsahuje žádné rozpuštěné minerální látky, tedy ani uhličitany. Navíc převařením vody došlo k odstranění všech plynů ve vodě rozpuštěných ( $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$ ). Rostlina ve sklenici 2 tedy nemohla fotosyntetizovat (nebyl k dispozici  $\text{CO}_2$ ) a pravděpodobně ani asimilovat (nebyl k dispozici  $\text{O}_2$ ). V této sklenici také nedocházelo k žádné tvorbě bublinek.

**Sklenice 3** – obsahovala snítku vodní rostliny a pitnou vodu z kohoutku smíchanou se sifonovou vodou. V této sklenici byly patrné bublinky na listech ihned po zahájení experimentu, ale s největší pravděpodobností se jednalo hlavně o  $\text{CO}_2$ , kterým byla voda nasycena. Nicméně v této sklenici fotosyntéza probíhala.

**Sklenice 4** – obsahovala roztok  $\text{NaHCO}_3$  který byl připraven rozpuštěním jedlé sody do převařené destilované vody. Ve sklenici 4 fotosyntéza probíhala, dokonce po dvou hodinách při zhodnocení experimentu bylo patrné, že gumový balónek na sklenici 4 byl ve srovnání s ostatními největší. Tímto pokusným uspořádáním jsem prokázala, že vodní rostliny umí využívat  $\text{CO}_2$  z hydrogenuhličitanů, pokud nemají dostatek  $\text{CO}_2$  rozpuštěného ve vodě.

## ZÁVĚR

---

V této úloze jsem pomocí několika experimentů prokázala, že fotosyntéza probíhá na světle pouze v přítomnosti  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  nemusí být pouze ve formě plynu rozpuštěného ve vodě, vodní rostliny si jej dokáží obstarat i z dostupných uhličitánů a hydrogenuhličitanů v roztoku.

# Fotosyntéza a dýchání

Autor: Magdalena Ambrozková

## ABSTRAKT

Experimentálně jsem prokazovala dva významné metabolické děje u rostlin – fotosyntézu a dýchání. Využila jsem indikačních vlastností bromthymolové modři. Použila jsem zelené a nezelené části rostlin, abych fotosyntetické děje lokalizovala.

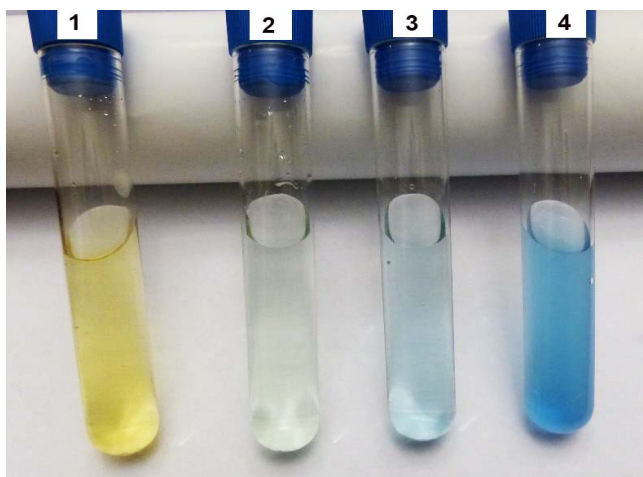
## POMŮCKY A MATERIÁLY

- Vodní rostlina, např. vodní mor (*Elodea*)
- Zralé plody (např. šípek, ptačí zob)
- uzavíratelné zkumavky
- plastové brčko
- zdroj světla
- alobal na zatemnění
- Voda z kohoutku
- indikátor bromthymolová modř - BTB (zásobní roztok - koncentrace:  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> - navážka 30,9 mg BTB do 500 ml destilované vody)
- ocet kvasný (CH<sub>3</sub>COOH) 8 %, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%

## POSTUP PRÁCE

Nejprve jsem si otestovala, za jakých podmínek mi bude fungovat acidobazický indikátor bromthymolová modř (BTB). Tato chemikálie se běžně používá jako indikátor pH. V zásaditém prostředí (pH vyšší než 7), se barví modře, ale když pH klesne pod 7, postupně se odbarvuje až do žlutého zbarvení.

Roztok s bromthymolovou modří jsem si připravila smísením 4,5 ml zásobního roztoku (koncentrace:  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>) do 200 ml pitné vody z kohoutku. Barva roztoku byla světle modrá. Poté jsem si část odlila do zkumavky a plastovým brčkem jsem do tohoto modrého roztoku ve zkumavce foukala tak dlouho, dokud se neodbarvil (stačily 2–3 výdechy) – viz zkumavka 2.



Obrázek 1: pH škála roztoku s indikátorem bromthymolová modř

1. 5 ml roztoku BTB + 1 ml 8% CH<sub>3</sub>COOH
2. 6 ml roztoku BTB odbarveného Foukáním
3. 6 ml roztoku BTB
4. 5 ml roztoku BTB + 1 ml 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Foukáním do vody v ní rozpouštíme  $\text{CO}_2$  takže vzniká slabá kyselina uhličitá  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , která sníží pH vody tak, že dojde k jejímu odbarvení. Udělala jsem si řadu 4 zkumavek. Do první jsem k roztoku bromthymolové modři (BTB) přidala kyselinu octovou, druhou zkumavku s roztokem BTB jsem odbarvila foukáním, třetí zkumavka je roztok BTB (kontrolní) a ve čtvrté zkumavce jsem k tomuto roztoku přidala 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Viz obrázek 1.

Dále jsem prováděla experiment podle následujícího schématu:

Připravila jsem si 6 zkumavek:

1. Voda z kohoutku obarvená BTB (modrá barva) - kontrola
2. Voda z kohoutku + BTB – odbarvená přítomností  $\text{CO}_2$  (foukáním pomocí brčka) - kontrola
3. Voda obarvená BTB + snítka vodního moru – umístěno na světle
4. Voda obarvená BTB + snítka vodního moru – umístěno ve tmě (zkumavku obalit alobalem)
5. Voda obarvená BTB + plody (2 zralé šípky) – umístěno na světle
6. Voda obarvená BTB + plody (2 zralé šípky) – umístěno ve tmě (zkumavku obalit alobalem)
7. Voda obarvená BTB + plody (plody ptačího zobu) – umístěno na světle
8. Voda obarvená BTB + plody (ptačí zob) – umístěno ve tmě (zkumavku obalit alobalem)

Všechny zkumavky jsem postavila ve stojánku na slunečné a teplé místo za oknem. Pokus jsem ukončila přibližně po 60 minutách.

## VÝSLEDKY

---

Zkumavka 1 – kontrolní – během experimentu se barva nezměnila

Zkumavka 2 – kontrolní – během experimentu se barva nezměnila

Zkumavka 3 – zelená rostlina na světle – probíhala fotosyntéza, barva se nezměnila

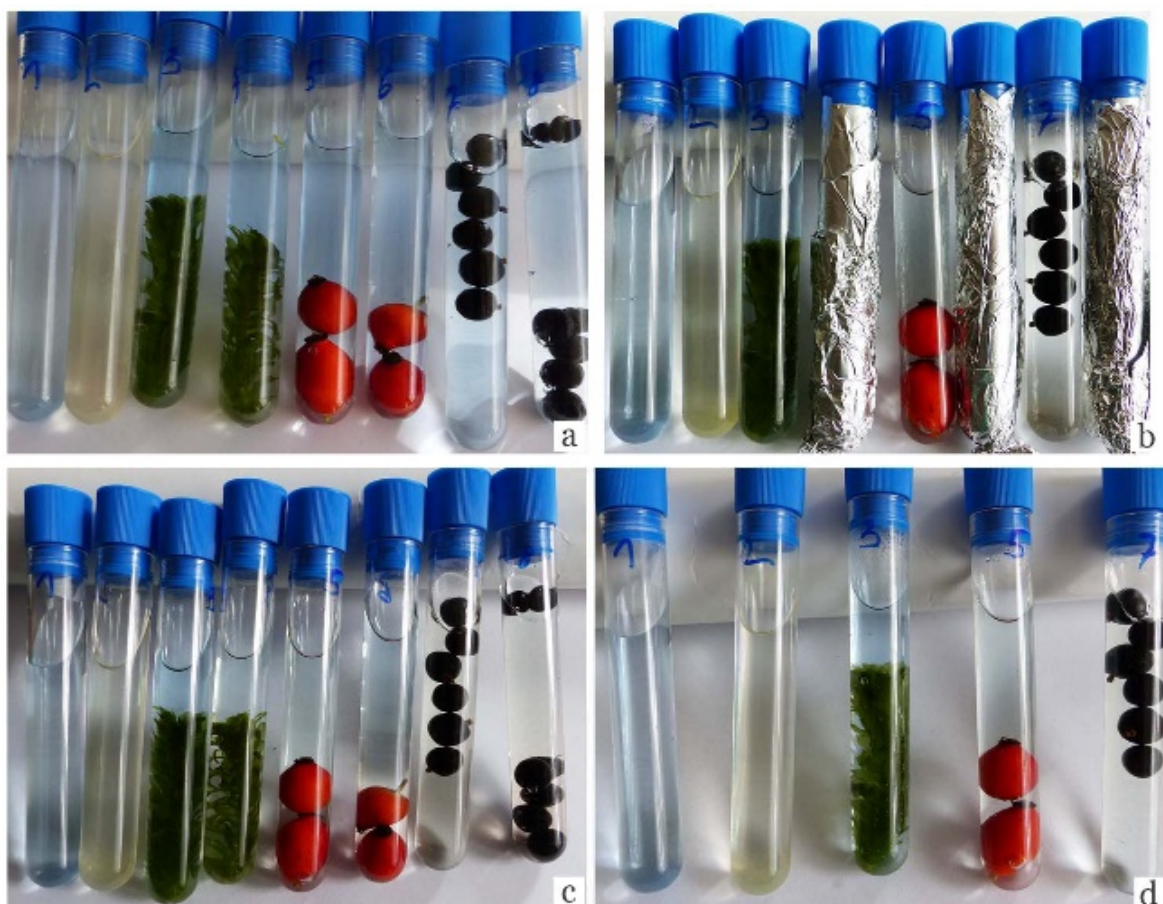
Zkumavka 4 – zelená rostlina ve tmě – neprobíhala fotosyntéza, jen dýchání, roztok se odbarvil

Zkumavka 5 – nezelené plody na světle – probíhalo dýchání, roztok se odbarvil

Zkumavka 6 – nezelené plody ve tmě – probíhalo dýchání, roztok se odbarvil

Zkumavka 7 - nezelené plody na světle – probíhalo dýchání, roztok se odbarvil

Zkumavka 8 - nezelené plody ve tmě – probíhalo dýchání, roztok se odbarvil



**Obrázek 2:** Průběh experimentu s BTB: **a)** začátek experimentu - zkumavky 4, 6 a 8 budou zabaleny do alobalu; **b)** konec experimentu po 60 minutách; **c)** ze zkumavek 4, 5 a 8 byl odstraněn alobal; **d)** Srovnání zabarvení roztoku na konci experimentu ve zkumavkách na světle - 3, 5 a 7

## DISKUZE A ZÁVĚR

V tomto experimentu se mi podařilo pomocí indikátoru bromthymolové modři prokázat, že fotosyntéza probíhá na světle – důkazem je zkumavka 3. Během fotosyntézy docházelo ke spotřebě  $\text{CO}_2$ , takže roztok se neokyseloval, a proto ani neodbarvoval. Ve zkumavce 3 kromě fotosyntézy samozřejmě docházelo také k dýchání (spotřebě  $\text{O}_2$  a produkci  $\text{CO}_2$ ) – ovšem vzniklý  $\text{CO}_2$  byl obratem spotřebován v procesu fotosyntézy, proto nedocházelo k okyselení (odbarvování) roztoku.

Zkumavka 3 představuje jediný systém, ve kterém docházelo k fotosyntéze. V ostatních zkumavkách (4–8) docházelo pouze k dýchání čili produkci  $\text{CO}_2$ , který ve formě slabé kyseliny uhličitě okyseloval roztok a tím ho odbarvil.

Celý experiment trval přibližně 60 minut a vzhledem k dobrým světelným podmínkám bylo možné již po této době udělat jednoznačné závěry.

## 5. MOLEKULÁRNĚ – BIOLOGICKÁ LABORATOŘ

### 5.1 Úvod do problematiky

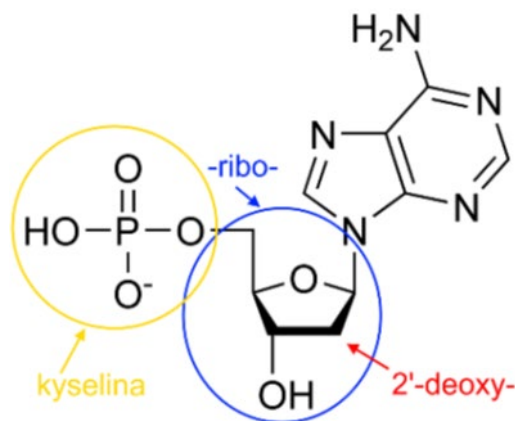
Ze všech přírodních molekul jsou nukleové kyseliny v mnoha ohledech jedinečné. Nesou dědičnou informaci, která kóduje životní program všech buněk. Tato informace je uložena v DNA ve speciálním „chemickém“ jazyce a reprodukována (kopírována) ve všech buňkách organismu. Tento zápis v DNA je program, který určuje vývoj všech biochemických, anatomických, fyziologických a dalších znaků organismu.

Nejprve si stručně připomeňme chemickou strukturu DNA. Už název této substance nám může hodně napovědět. DNA je deoxyribonukleová kyselina (z anglického **D**eoxyribo **N**ucleic **A**cid). Je to **kyselina (acid)**, protože ve své molekule obsahuje zbytek kyseliny fosforečné. Přízvisko nukleová je odvozeno od jejího hlavního výskytu – nachází se v jádrech buněk (**n**ucleus). Dále ve své molekule obsahuje cukr – pětiuhlíkatou molekulu (takže pentózu) - **ribózu**, ovšem bez kyslíku na uhlíku 2' – tedy **2'-deoxy**.

Nukleové kyseliny jsou biopolymery, což znamená, že se skládají z mnohonásobného opakování základních strukturních jednotek a podobně jako např. u proteinů je můžeme popisovat pomocí jejich primární, sekundární a terciární struktury.

#### Primární struktura DNA

Základní strukturní jednotka DNA je **mononukleotid** – přesněji - 2'-deoxyribonukleotid (zcela konkrétně pak 2'- deoxyadenosin monofosfát, dAMP). Každá tato jednotka je tvořena dusíkatou bází (A, T, C nebo G), sacharidem deoxyribózou a fosfátovou skupinou.

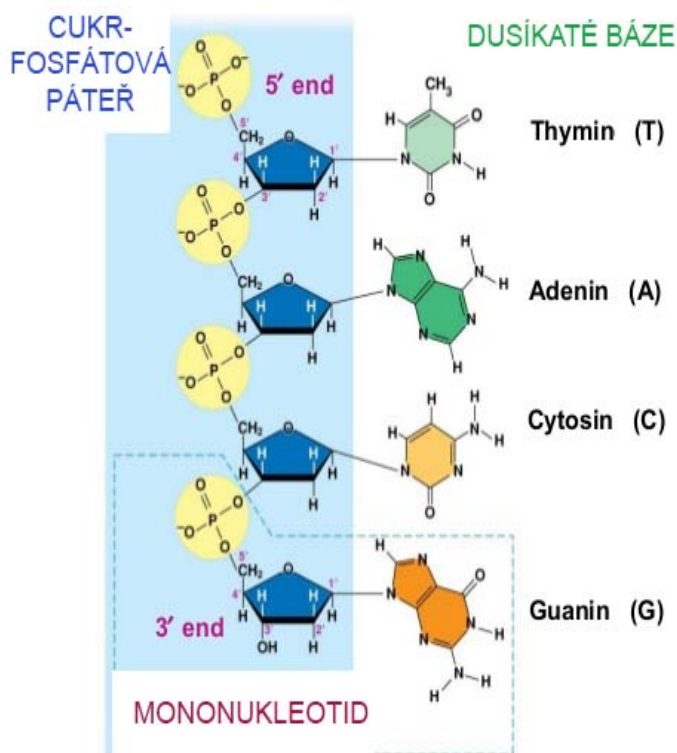


Obrázek upraven podle:

<https://www.wikiwand.com/cs/Deoxyribonukleotid>

Mononukleotidy jsou **fosfodiesterovými vazbami** spojovány v oligonukleotidy a polynukleotidy.

Co znamená termín fosfodiesterová vazba (někdy se česky označuje také jako cukr-fosfátová vazba) - opět – napoví nám již název – **fosfo** – hlavní roli tam bude hrát fosfát čili zbytek od kyseliny fosforečné. Ten spojuje ribózu svého nukleotidu s ribózou následujícího nukleotidu, takže páteří celého polynukleotidu je řetězec, ve kterém se střídá ribóza a fosfát. **Di-ester** – pak už konkrétně chemicky popisuje charakter této vazby (ester – vazba přes kyslík, fosfát váže uhlík C5' jedné ribózy s uhlíkem C3' následující ribózy).



Obrázek upraven podle Campbell Biology

Primární struktura nám určuje pořadí (**sekvenci**) jednotlivých nukleotidů, jak jsou v řetězci DNA seřazeny za sebou.

Nukleotidy se mezi sebou budou lišit právě tím, kterou bázi obsahují. Podle toho je taky popisujeme (adenosin-monofosfát, guanosin-monofosfát atd.).

Pokud tedy popisujeme nějakou část DNA, např. sekvenci genu, zkráceně tím označujeme pořadí dusíkatých bází, jak jsou řazeny v molekule DNAS za sebou – např. TAGCAACCGTA

## Sekundární struktura

DNA sice může existovat jako samostatná jednovláknová molekula (tzv. ssDNA), nicméně velmi často vytváří dvouvláknové struktury, které jsou složené ze dvou řetězců DNA spojených vodíkovými můstky.

Základní sekundární strukturou DNA je tedy dvoušroubovice (anglicky double-helix). Historie objevu sekundární struktury DNA je opravdu fascinující, a určitě stojí za zpracování do referátu. Podílelo se na ni více fenomenálních vědců, přičemž jen někteří z nich nakonec za svůj objev obdrželi Nobelovu cenu.

Jen perlička na okraj – strukturu DNA jako dvoušroubovici objevili vědci James Watson a Francis Crick. Unikátem (na dnešní poměry ve vědě) tohoto objevu je také rychlost, s jakou byl objev publikován: Vlastní model, znázorňující správnou strukturu DNA, sestavili Crick s Watsonem dne 28. 3. 1953 a již dne 25. 4. 1953 byl článek o 900 slovech publikován v prestižním vědeckém časopise Nature.

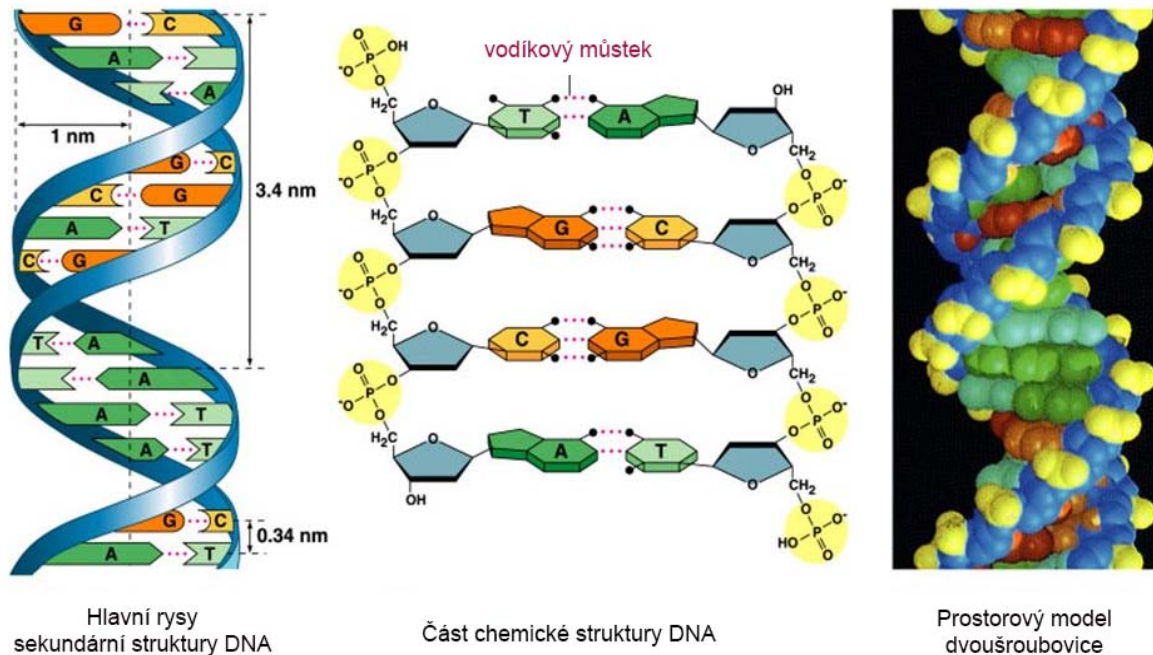
Dvoušroubovice DNA je tvořená dvěma lineárními řetězci, které se navzájem pojí pomocí vodíkových můstků. Přitom je důležité, aby se naproti sobě vyskytovaly vždy určité nukleové báze, které spolu ve správném prostorovém uspořádání vytváří několik vodíkových můstků. V typickém případě se nukleové báze spojují navzájem podle jednoduchého klíče:

**Adenin se páruje s Thyminem** (vzájemně jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky)

**Guanin se páruje s Cytosinem** (vzájemně jsou spojeny třemi vodíkovými můstky)

Tomuto uspořádání se říká **komplementarita bází**.



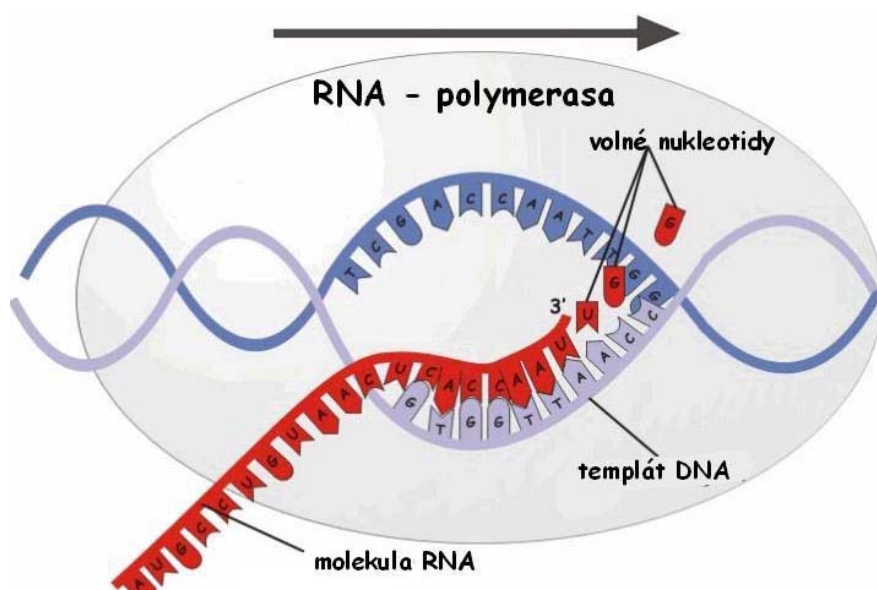


Obrázek upraven podle Campbell Biology

## Genetická informace

Jako **genetická informace** se označuje sekvence (pořadí) jednotlivých nukleotidů v DNA. Jak jsme si popsali výše, na každé pozici se v DNA nachází jedna ze čtyř bází (A, C, G nebo T). Jejich sled v řadě za sebou (úsek na DNA) označujeme jako sekvenci DNA. Ne všechny sekvence v DNA však mají stejnou informační hodnotu. Úseky na DNA, které označujeme jako **geny**, jsou tvořeny sledem nukleotidů, který se stává předlohou pro tvorbu mRNA. Každý gen se v procesu zvaném **transkripce** přepíše do odpovídající kratší molekuly **mRNA**, která slouží jako přenašeč informace od DNA k ribozómům – buněčným strukturám, na kterých probíhá **translace** (tvorba primární struktury bílkovin podle záznamu v mRNA). Zjednodušeně se to dá připodobnit situaci, kdy máme k dispozici velkou knihu návodů a tuto knihu doslovně čteme. Většina textu ale nedává žádný smysl (nekódující DNA). V určitém okamžiku však můžeme narazit na text, který smysl má – půjde o nějaký konkrétní návod. Tento návod bude z textu celé té knihy zkopírován (**transkripce**) a podle něj bude vyroben konkrétní výrobek (**translace**).

## Transkripce – přepis úseku DNA do molekuly mRNA

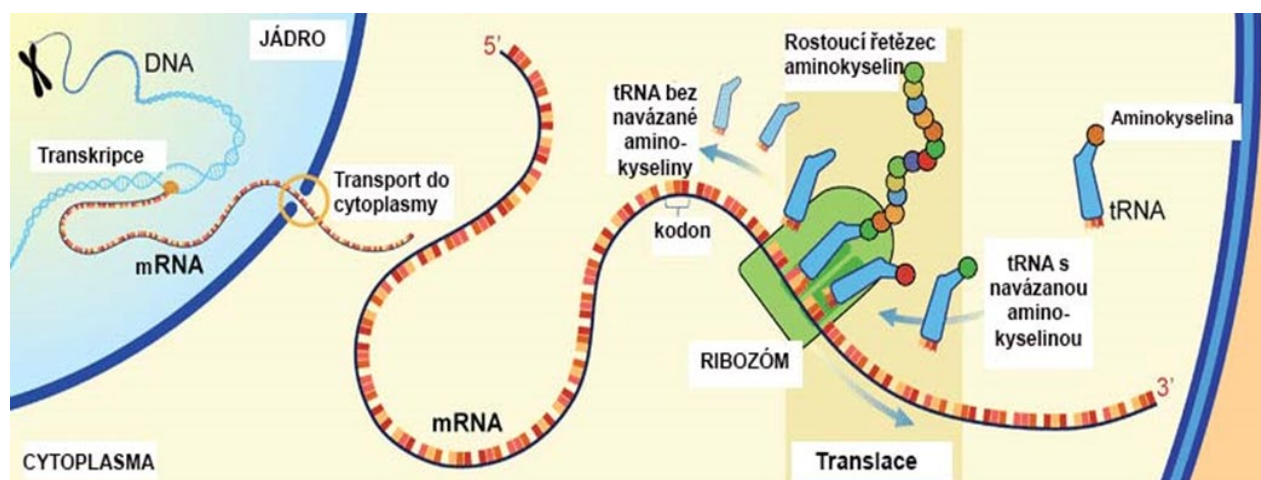


Obrázek upraven podle: <https://www.gutefrage.net/frage/warum-ist-die-rna-polymerase-so-dargestellt>

Na obrázku je znázorněno místo na DNA, které nese sekvenci genu – což je kódující oblast na DNA, která se bude přepisovat (transkribovat). V tomto místě dvoušroubovice nejprve dojde k rozvolnění vodíkových můstků a ve vzniklé „bublině“ se podle jednoho z vláken DNA – tzv. **templátového** (předlohového) vlákna přepíše jeho informace do molekuly mRNA. Jde o informační (messenger) jednovláčkovou molekulu RNA, která po transkripci opustí (jaderným pórem) buněčné jádro a vydá se do cytoplasmy, bude na organelách zvaných ribozomy přeložena do proteinu.

## Translace – překlad informace z molekuly mRNA do proteinového řetězce

Informace pro tvorbu proteinů je zašifrována pomocí třípísmenného kódu, kterému se říká **genetický kód**. Každé **trojici bází** v DNA totiž u genové sekvence **odpovídá určitá aminokyselina**. Aminokyseliny jsou základní stavební kameny proteinů, takže je vlastně genetická informace jakýmsi návodem na výrobu proteinů.<sup>[12]</sup>



Obrázek upraven podle Campbell Biology

## 5.2.1 Kreativní dílna – DNA origami

### Cíl:

Osvojit si znalosti o primární a sekundární struktuře DNA.  
Na základě těchto znalostí sestavit prostorový model DNA

### Časová dotace:

cca 15–20 minut

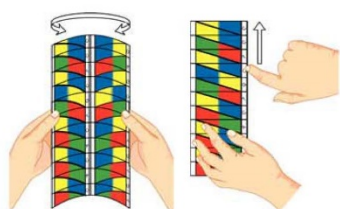
### Pomůcky a materiál:

Origami prostorová skládanka DNA<sup>[10]</sup> + návod (v češtině)

Staženo ze stránky: <https://www.yourgenome.org/activities/origami-dna>

## ORIGAMI DNA

Folding instructions



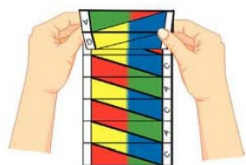
- 1 V polovině podélně přeložte. Všechny záhyby dělejte co nejpevněji (obtáhněte nehtem).



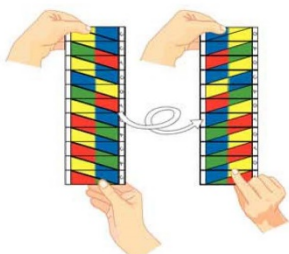
- 2 Papír uchopte tak, aby silné čáry byly diagonální a tenké čáry horizontální. První segment sklopte dolů, přehněte a zase narovnejte.



- 3 Pokračujte ohýbáním dalších segmentů podél vodorovných čar. Ohnuté segmenty zpátky narovnávejte.



- 4 Totéž udělejte u všech segmentů až do konce papíru.



- 5 Papír narovnejte a otočte tak, aby tenké čáry byly diagonální a silné čáry horizontální.



- 6 Ohněte roh podél první tenké diagonální čáry a opět narovnejte. Toto opakujte pro všechny segmenty až do konce papíru.



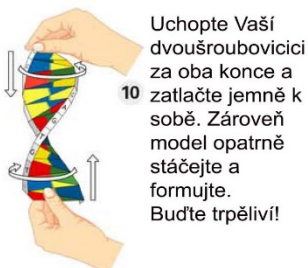
- 7 Ohněte bílou hranu bez popisu písmen směrem nahoru.



- 8 Druhý okraj (s písmeny) ohněte směrem od sebe.



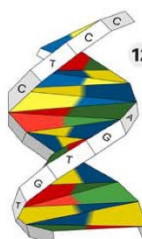
- 9 Nyní by se Váš model měl začít otáčet.



- 10 Uchopte Vaši dvoušroubovici za oba konce a zatlačte jemně k sobě. Zároveň model opatrně stáčejte a formujte. Buďte trpěliví!



- 11 Teď zatlačte k sobě a pusťte!



- 12 Model je dokončen! Obdivujte svůj double helix!

### 5.2.2 Šifra v DNA

#### Cíl:

Pochopit princip genetického kódu, osvojit si a procvičit překlad z nukleotidové sekvence do proteinové sekvence na konkrétních příkladech

#### Časová dotace:

cca 30 minut

#### Pomůcky a materiály:

schéma genetického kódu, šifra DNA, křížovka, legenda pro kontrolu

#### Postup práce:

Pro snadné vyřešení šifry je dobré si ujasnit základní pojmy a princip translace z mRNA do proteinů.

**mRNA** – messengerová RNA, která vznikla přepisem z DNA, nese informaci z genu pro stavbu proteinu

**KODON (triplet)** – je trojice za sebou jdoucích nukleotidů, které se nachází na mRNA

**INICIAČNÍ KODON** – kodon, od kterého se začíná v ribozomu překládat z mRNA do proteinu – začíná u něj translace, většinou jde o triplet ATG (resp. AUG, protože v mRNA jsou všechny thyminové báze T nahrazeny uracilem U)

**STOP KODON** – jakmile ribozom narazí na tyto typy tripletů, je to pro něj signál proteosyntézu ukončit. Jedná se o tyto triplety TAA, TAG a TGA (resp. UAA, UAG, UGA – na mRNA)

**tRNA – transferová RNA**, která se nachází v cytoplasmě, má poměrně složitou prostorovou strukturu, na jednom konci nese triplet nukleotidů (antikodon) a na druhém konci má navázanou aminokyselinu (typ aminokyseliny je určen typem antikodonu)

**ANTI KODON** – je trojice nukleotidů, kterou nese tRNA a která označuje příslušný typ aminokyseliny. Antikodonem se tRNA váže ke kodonu na mRNA podle principu komplementarity

**AMINOKYSELINA** – základní stavební jednotka proteinů. Až na nepatrné výjimky jsou všechny proteiny ve všech živých organismech sestaveny z 20 druhů tzv. proteinogenních aminokyselin. Každá tato aminokyselina odpovídá určitému antikodonu na molekule tRNA.

**RIBOZOM** – je struktura tvořena proteiny a ribozomální RNA – rRNA. Uplatňuje se při translaci, kdy je z řetězce mRNA syntetizován protein.

**GENETICKÝ KÓD** – soubor pravidel, podle kterých se genetická informace uložená v DNA (respektive mRNA) převádí na primární strukturu proteinů. K jednotlivým kodonům na mRNA náleží odpovídající tRNA se příslušným antikodonem a příslušnou aminokyselinou. Máme tedy 64 ( $4^3$ ) možných kombinací, 64 odlišných kodonů.



### Příklad:

Máme k dispozici tuto nukleotidovou sekvenci:

TTG GGA ATG AGC ATA TTT AGA GCG GTA GAT AAT GCT TAG

Použijeme tabulku genetického kódu a postupně odhalujeme zašifrovaný vzkaz:  
Jako první hledáme Iniciační kodon – **ATG**, až když ho v sekvenci najdeme, teprve pak můžeme začít překládat. Iniciační kodon kóduje aminokyselinu Methionin (M), ale na začátku translace ho nepřekládáme.

TTG-GGA-**ATG**-AGC-ATA-TTT-AGA-GCG-GTA-GAT-AAT-GCT-TAG

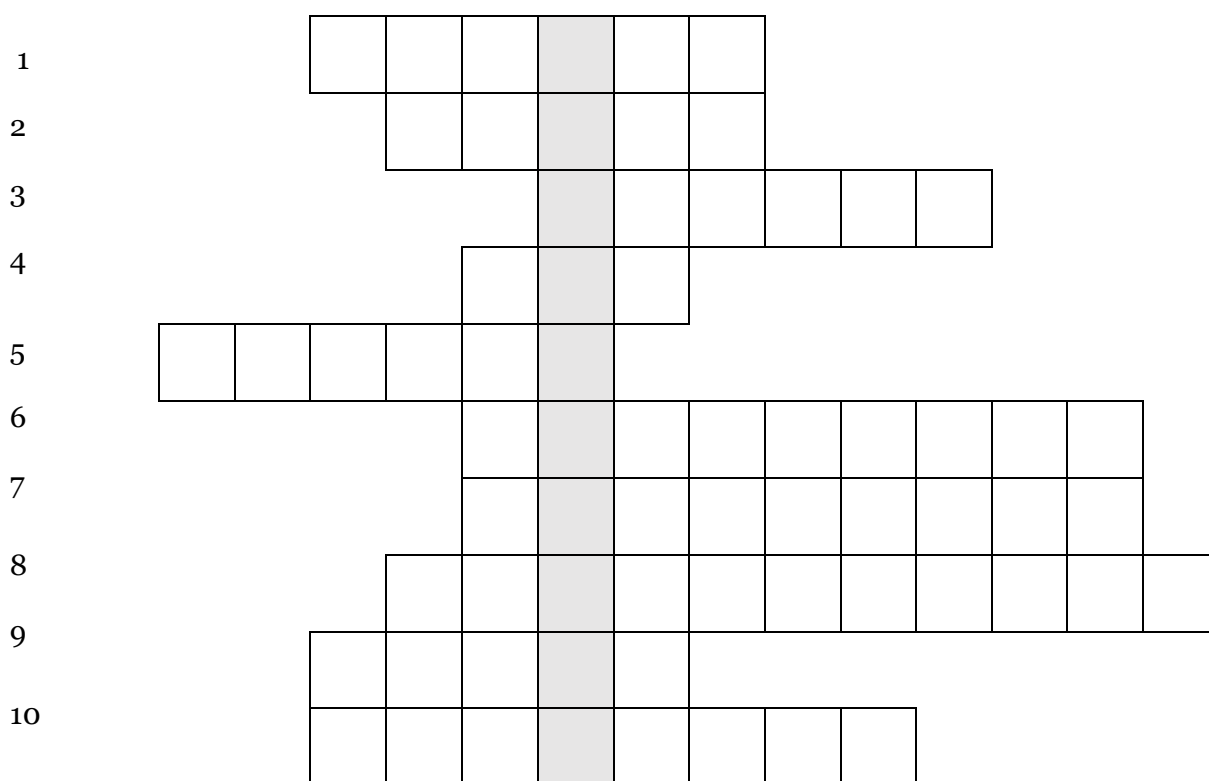
Dále dekódujeme jednotlivé tripletty a přiřazujeme jim velká tiskací písmena, která označují jednotlivé aminokyseliny.

TTG-GGA-**ATG**-AGC-ATA-TTT-AGA-GCG-GTA-GAT-AAT-GCT-**TAG**  
                  **S I F R A V D N A**

Poslední kodon jsme identifikovali jako **STOP** kodon TAG, takže zde překlad skončí.

### Legenda

- 1- GTT CAT ATA ATG ATG GAA AAC GAT GAG TTG TAA TTT CCT
- 2 - GGG ATG GCG GTC GAA AGG TAC TAG
- 3 - ATG GGA TGA GCC AAC ATC AAT TAA TGG TTA CAC
- 4 - ATT CAT TGC GCA ATG GGA GAA AAC TAG
- 5 - GTT ACT ATG ACA CAC TAT ATG ATT AAC TAA CCA TGC
- 6 - CAT ATG CGT GAA CCG CTT ATA AAA GCG TGT GAG TAA
- 7 - TTT GTC TCA ATG ACG CGA GCC AAC AGT CTA GCT TGT GAA TAG
- 8 - ATG ACA CGT GCA AAT TCT AAA CGA ATA CCC TGT GAG TAA CAA TGG
- 9 - TTC GAT ATG TGC AGA ATC TGT AAG TAG GTA TCG TCA GAA ACT
- 10 - ATA ATG GGC GAA AAT GAG ACC ATT AAA GCT TAA



### Kontrola + doplňková legenda ke křížovce:

- 1 – zakladatel moderní genetiky, brněnský kněz a středoškolský profesor
- 2 – vědec, který v roce 1944 jako první prokázal, že nositelkou dědičnosti je DNA
- 3 – dusíkatá báze, která se v DNA páruje třemi vodíkovými můstky s cytosinem
- 4 – úsek na DNA nesoucí informaci, která se bude přepisovat RNA a překládat do proteinů
- 5 – dusíkatá báze, která je v RNA nahrazena uracilem a v DNA se páruje s adeninem
- 6 – proces, při kterém se vytvářejí identické kopie molekuly DNA
- 7 – proces, ve kterém se sestavuje primární struktura proteinů podle mRNA
- 8 – proces, při kterém se podle genetické informace v DNA syntetizuje řetězec mRNA
- 9 – vědec – spoluobjevitel sekundární struktury DNA, Nobelova cena v roce 1962
- 10 – biologická věda zabývající se dědičností

### Tajenka – **DEGENERACE**

#### Degenerace genetického kódu

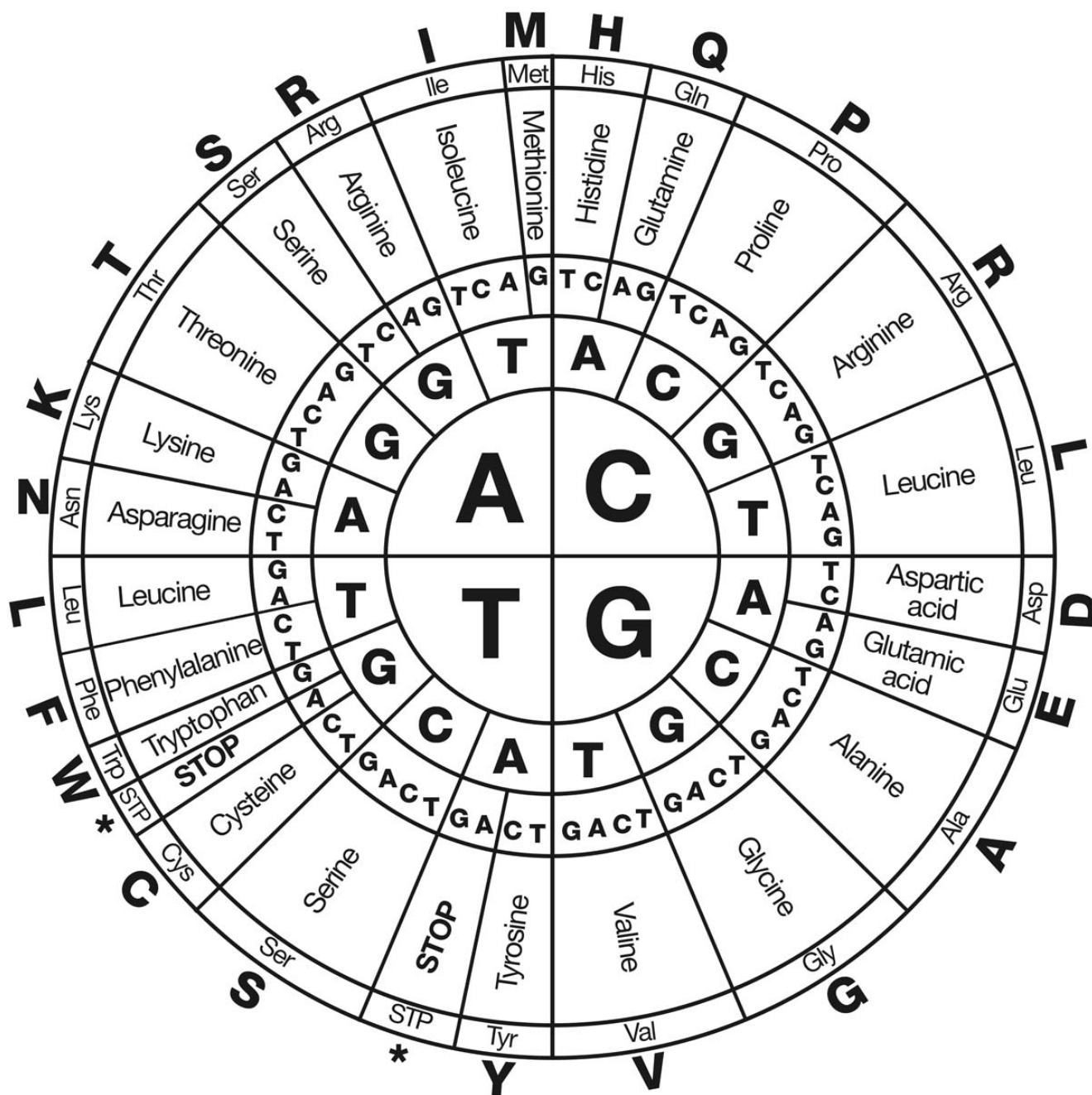
Vzhledem k tomu, že každý kodon je vždycky tvořen trojicí bází, a těch jsou čtyři druhy (A, G, C, T), kodonů je celkem 64 ( $=4^3$ ). Z toho tři kodony (tzv. **stop-kodony**) nekódují žádnou aminokyselinu, ale určují konec tvorby proteinu. Aminokyselin kódovaných zbývajících 61 kodonů je ale jen 20 – takže – jak jste si určitě všimli během luštění šifry – některé aminokyseliny jsou kódovány více kodony. A právě v tom spočívá degenerace genetického kódu. Například aminokyseliny leucin, arginin a serin jsou kódovány každý hned šesti kodony. Dvě aminokyseliny jsou určovány pouze jediným kodonem. Jedna z nich je **metionin** a označuje **začátek transkripce**. Kodony pro stejnou aminokyselinu se liší zpravidla **jen ve třetí pozici kodonové trojice**, a tak mnohé mutace v této pozici vůbec nezpůsobí záměnu aminokyseliny.



## Příloha k úkolu 2

**Genetický kód** – staženo ze stránky:

[https://cz.clipartlogo.com/image/genetic-code-bw\\_236505.html](https://cz.clipartlogo.com/image/genetic-code-bw_236505.html)



*Poznámka – správně by měl být použit genetický kód pro překlad z mRNA – tzn. ve všech pozicích, kde se nachází Thymin (T) by byl uveden Uracil (U). Pro zjednodušení úkolu jsem však použila překlad z DNA do proteinu.*

## Izolace DNA – úvod do problematiky

DNA je poměrně stabilní molekula, do jisté míry je rezistentní vůči většině chemických reakcí, protože její hlavní funkcí je udržet stabilitu genetické informace. Tento fakt krásně dokumentují objevy z posledních let, kdy byly (v roce 2008) nalezeny kosterní pozůstatky denisovanů – vyhynulých příslušníků rodu Homo. Stáří těchto kosterních nálezů bylo určeno na 41 000 let. Přesto bylo možné provést molekulární analýzu mitochondriální DNA. Čili po více než 40 000 letech byla izolována nepoškozená molekula DNA, která mohla být dále zkoumána.<sup>[11]</sup> Není to fantastické??

Kde všude v buňkách můžeme DNA nalézt? Tak určitě hlavně v jádře. U (téměř) všech eukaryotických buněk se DNA dále vyskytuje v mitochondriích, které jsou podle endosymbiotické teorie potomky bakterie (alfa-proteobakterie), která se při vzniku eukaryotické buňky určitým způsobem přeměnila v semiautonomní organelu. Dokazuje to fakt, že mitochondrie má dvě membrány (většina buněčných organel má jen jednu) a právě také svou vlastní cirkulární DNA.

U rostlin mimo jádra a mitochondrií DNA obsahují ještě plastidy, což jsou potomci endosymbiotických sinic (mají dvě membrány), v několika málo případech u některých řas jsou jejich plastidy potomky eukaryotických symbiontů typu řas (tzv. sekundární endosymbióza – tyto plastidy mají tři i více membrán).

Takže – pokud chceme DNA z buněčného materiálu, ať živočišného nebo rostlinného získat, musíme zákonitě překonat několik různých buněčných bariér.

Při izolaci **DNA z živočišných buněk** musíme nejprve překonat cytoplazmatickou membránu (skládá se z proteinů a dvojvrstvy fosfolipidů). Uvnitř cytoplasmy se bude nacházet jádro, které má jadernou membránu (dvě dvojvrstvy fosfolipidů a proteiny). Podaří-li se nám překonat i tuto překážku, dostaneme se ke zdroji DNA – chromozomům.

Při izolaci **DNA z rostlinné buňky** nebo z hub musíme navíc ještě překonat buněčnou stěnu (u rostlin je tvořena celulózou, u hub chitinem).

Jak jsem již zmiňovala výše, DNA ovšem není jen v jádře. Takže pokud chceme izolovat DNA z buněčných organel, u mitochondrií musíme překonat další dvě membrány a u plastidů také dvě membrány nebo někdy i více.

Průnik přes membrány však není tím hlavním úskalím. Abychom získali Nukleovou kyselinu v co nejčistější formě, je třeba NA „osvobodit“ od nosičových proteinů – histonů.

Návodů na izolaci DNA existuje celá řada, liší se použitím výchozího materiálu a různými mezikroky, díky kterým může na konci experimentů stát buď neporušená, vyčištěná DNA nebo DNA vysrážená společně s proteiny a RNA, která se svými chemickými vlastnostmi DNA podobá.

Obecný protokol pro izolaci DNA by měl obsahovat tyto kroky:

1) **Mechanické zpracování materiálu** (homogenizace) – rozrušení struktury tkáně/pletiva, uvolnění jednotlivých buněk z mezibuněčné hmoty. Pokud pracujeme s rostlinnou tkání tak samozřejmě ještě navíc porušení buněčných stěn (např. mražením).

2) **Přidání detergentu** – (např. JAR, mýdlo, šampon, prací prášek), který rozpustí fosfolipidové membrány (a další lipofilní látky). Tím se uvolní DNA z cytoplazmatické a jaderné membrány, případně z mitochondrií a plastidů (např. ...).

3) **Přidání alkoholu** – vysokoprocenní alkohol odebere vodu asociovanou s DNA a ta se potom vysráží. Při opatrném přilévání využíváme vzniku ostrého rozhraní, kde se DNA sráží. Pokud bychom alkohol nepřidali, DNA se nevysráží a zůstane rozpuštěna ve vodném roztoku.

### 5.2.3 Izolace DNA z různých biologických materiálů

#### Cíl:

Prakticky si vyzkoušet izolaci nukleových kyselin v běžném prostředí bez laboratorních přístrojů

#### Časová dotace:

cca 60 minut

#### Pomůcky a materiály:

libovolný biologický materiál (např. zelený hrášek, cibuli, špenát, kuřecí játra atp.)

mixér

zkumavky

skleněná tyčinka nebo špejle na míchání

kádinky

ledová lázeň

#### Chemikálie:

Kuchyňská sůl (NaCl)

kapalný detergent (Jar, Pur, šampón)

roztok na kontaktní čočky nebo čerstvá šťáva z ananasu

vysokoprocentní alkohol (např. denaturovaný líh – 96%)

#### Postup práce:

K biologickému materiálu v množství asi 100 ml, přidáme špetku kuchyňské soli (stačí méně než 1/8 lžičky), asi 200 ml studené vody a dobře rozmixujeme. Mixer oddělí jednotlivé buňky biologického materiálu od sebe.

Vzniklou směs přelijeme do kádinky a přidáme kapalný detergent v objemu asi 1/6 celkového množství (asi 2 polévkové lžíce). Dobře rozmícháme a necháme v klidu asi 5–10 minut. Ze směsi si část odlijeme do zkumavky, do cca 1/3 výšky.

Do zkumavky přidáme pár kapek enzymu – proteázy, který rozloží proteiny ve směsi. Potřebný enzym se nachází např. v roztoku na kontaktní čočky nebo v ananasové šťávě. Zamícháme velmi jemně a opatrně – nyní už máme ve zkumavce vlákna DNA a hrubým mícháním by se mohla polámat. Enzym rozruší nukleoproteinové komplexy a oddělí DNA od ostatního buněčného materiálu.

Opatrně po skle přilijeme do zkumavky vychlazený alkohol – 70–95% isopropyl nebo etylalkohol (stačí denaturovaný líh nebo vysokoprocentní pálenka) tak, aby vytvořil nad směsí vrstvu o přibližně stejné tloušťce. Nemícháme! Po chvíli se začne do alkoholové vrstvy oddělovat DNA. Opatrně pinzetou nebo háčkem můžeme pomoci vytahovat vlákna do horní čiré vrstvy.

#### Závěr a diskuse:

Pokud se experiment vydařil, do alkoholu se vysrážel bělavý chuchvalec DNA. Nebude úplně čistá, protože na přečištění by bylo potřeba další chemikálie (např. fenol) a další přístroje zejména centrifugy. DNA izolovaná tímto způsobem bude obsahovat zbytky proteinů a RNA.

### **5.3 Jak vznikaly tyto úlohy – praktická doporučení**

Izolace nukleových kyselin je myslím velmi atraktivní téma, ostatně po zadání tohoto hesla do internetových vyhledavačů můžete vybírat z velkého množství nejrozličnějších protokolů a návodů. Studenty tato témata obvykle velmi baví, protože je to možnost, jak si „vlastnoručně sáhnout“ na něco tak imaginárního, jako je DNA.

Při dodržení základních postupů v obecném protokolu izolace DNA je možné ji izolovat z nejrozličnějších biologických materiálů.

Materiál, který si nakonec k izolaci zvolíte, by měl mít zejména tyto vlastnosti:

snadná dostupnost

nízké finanční náklady

jednoduchá homogenizovatelnost

čerstvost, protože i DNA se po čase rozpadá, stejně tak se znehodnotí vlivem extrémních fyzikálních a chemických podmínek

V neposlední řadě musí pokusný materiál DNA obsahovat (což třeba neplatí např. pro červené krvinky člověka).

Pokud vycházíme z rostlinného materiálu, vyplatí se vzorek předem zamrazit – z již výše diskutovaných důvodů lepšího rozrušení buněčných stěn.

Použití proteázy (čerstvá ananasová šťáva, šťáva z kiwi nebo roztok na kontaktní čočky) je pro školní pokusy velmi didaktické, nicméně tento krok není k izolaci DNA nezbytně nutný. Pokud ho použijeme, je třeba si uvědomit, že i ananasová šťáva obsahuje vlastní DNA.

Na vysrážení DNA je vhodné používat ethanol vychlazený na 0 °C, který se s vodou tolik nemísí. Ethanol lze rychle zchladit v kádince v ledové lázni, ve které je ledová tříšť smíchaná s kuchyňskou solí (NaCl). Teplota v kádince tak může klesnout až k –30°C. Kuchyňská sůl se použije z důvodu zachování osmotického tlaku roztoku.

# DNA ORIGAMI

Autor: staženo ze stránek: <https://www.yourgenome.org/activities/origami-dna>

Překlad návodu do češtiny M. Ambrozková

## ABSTRAKT

---

Cílem této praktické úlohy je hravou a zábavnou formou pochopit sekundární strukturu molekuly DNA a vytvořit si vlastní prostorový model dvoušroubovice.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Papírový model origami skládačky
- Návod na skládání v češtině

## POSTUP PRÁCE

---

Podle principu komplementarity (a podle návodu) jsem poskládala prostorový model dvoušroubovice DNA.

## PŘÍLOHY

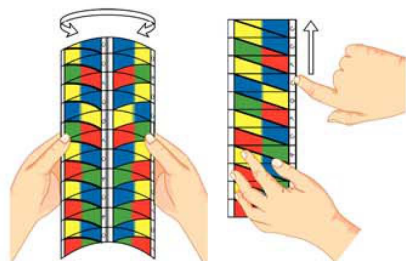
---

- Papírový model origami skládačky
- Návod na skládání v češtině



# ORIGAMI DNA

## Folding instructions



- 1 V polovině podélně přeložte. Všechny záhyby dělejte co nejpevněji (obtáhněte nehtem).



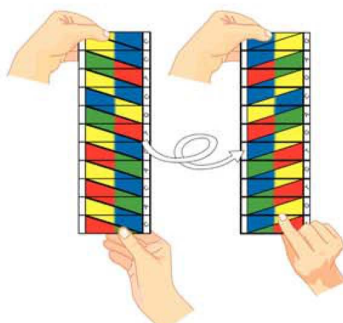
- 2 Papír uchopte tak, aby silné čáry byly diagonální a tenké čáry horizontální. První segment sklopte dolů, přehněte a zase narovnejte.



- 3 Pokračujte ohýbáním dalších segmentů podél vodorovných čar. Ohnuté segmenty zpátky narovnávejte.



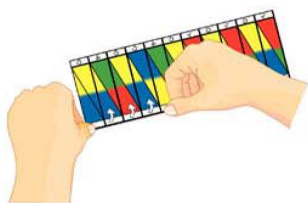
- 4 Totéž udělejte u všech segmentů až do konce papíru.



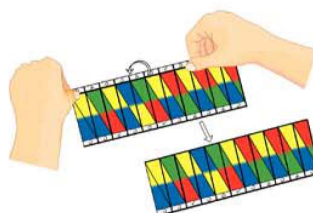
- 5 Papír narovnejte a otočte tak, aby tenké čáry byly diagonální a silné čáry horizontální.



- 6 Ohněte roh podél první tenké diagonální čáry a opět narovnejte. Toto opakujte pro všechny segmenty až do konce papíru.



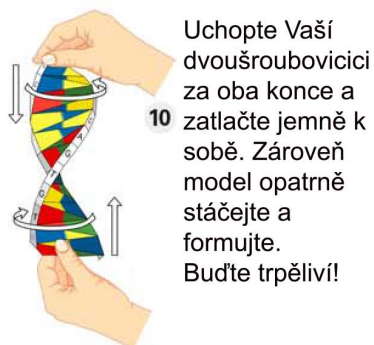
- 7 Ohněte bílou hranu bez popisu písmen směrem nahoru.



- 8 Druhý okraj (s písmeny) ohněte směrem od sebe.



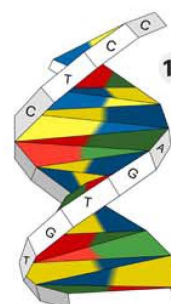
- 9 Nyní by se Váš model měl začít otáčet.



- 10 Uchopte Vaší dvoušroubovici za oba konce a zatlačte jemně k sobě. Zároveň model opatrně stáčejte a formujte. Buďte trpěliví!


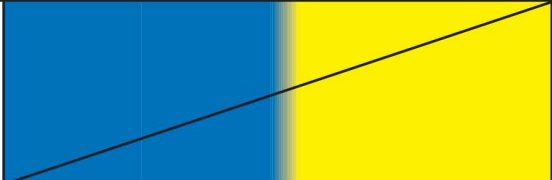
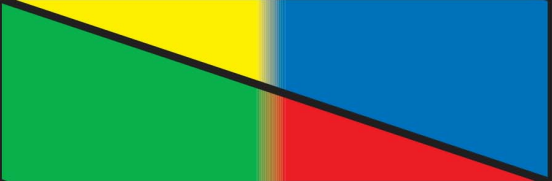
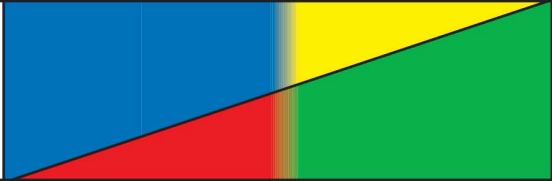
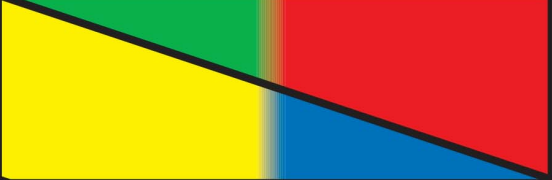
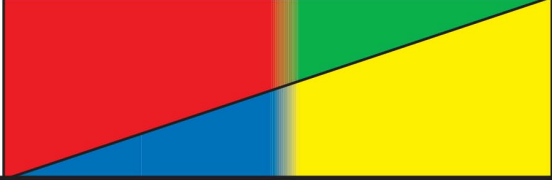


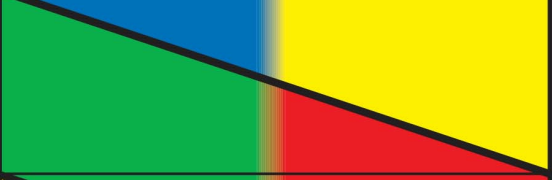
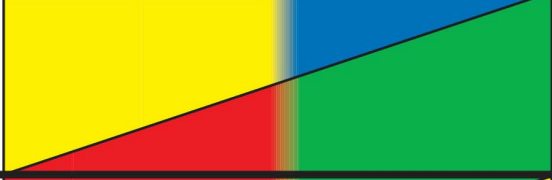
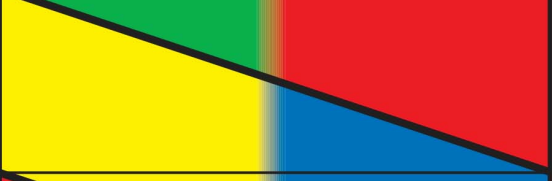

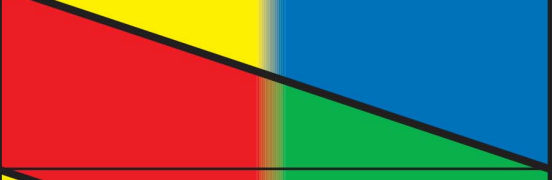
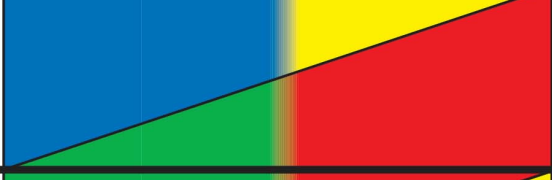
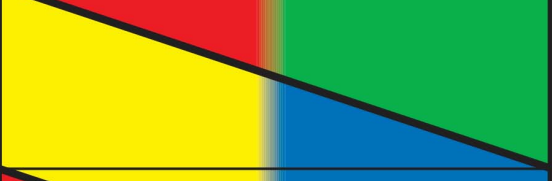

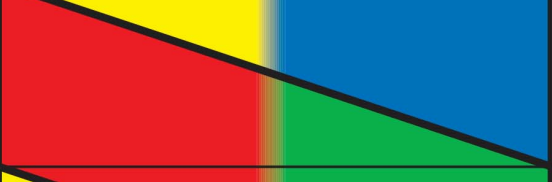
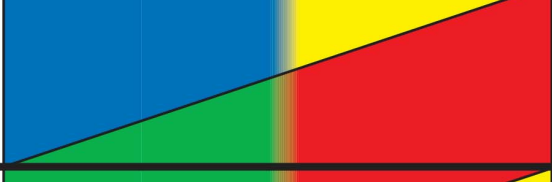

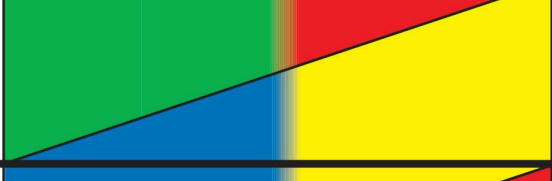
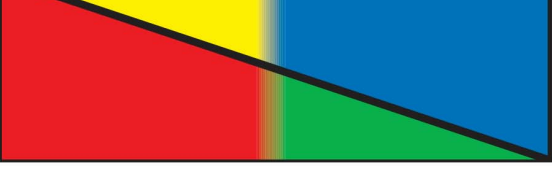
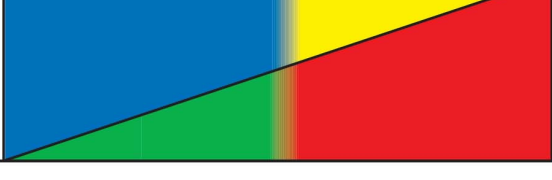


- 11 Teď zatlačte k sobě a pusťte!



- 12 Model je dokončen! Obdivujte svůj double helix!



		C		G
		C		A
		T		G
		C		C
		G		A
		T		G
		C		T
		A		G
		C		T
		A		G
		C		T

# DNA ŠIFRA

Autor: Magdalena Ambrozková – zpracováno volně dle workshopy z Noci vědců 2018 na MU v Brně

## ABSTRAKT

---

Cílem této praktické úlohy je hravou a zábavnou formou pochopit princip genetického kódu a umět jej aplikovat v praxi.

## POMŮCKY A MATERIÁLY

---

- Tabulka s genetickým kódem
- Pracovní list s křížovkou a legendou

## POSTUP PRÁCE

---

Pro snadné vyřešení šifry je dobré si ujasnit základní pojmy a princip translace z mRNA do proteinů.

**mRNA** – messenger RNA, která vznikla přepisem z DNA, nese informaci z genu pro stavbu proteinu

**KODON (triplet)** – je trojice za sebou jdoucích nukleotidů, které se nachází na mRNA

**INICIAČNÍ KODON** – kodon, od kterého se začíná v ribozomu překládat z mRNA do proteinu – začíná u něj translace, většinou jde o triplet ATG (resp. AUG, protože v mRNA jsou všechny thyminové báze T nahrazeny uracilem U)

**STOP KODON** – jakmile ribozom narazí na tyto typy tripletů, je to signál proteosyntézu ukončit. Jedná se o tyto triplety TAA, TAG a TGA (resp. UAA, UAG, UGA – na mRNA)

**tRNA – transferová RNA**, která se nachází v cytoplasmě, má poměrně složitou prostorovou strukturu, na jednom konci nese triplet nukleotidů (antikodon) a na druhém konci má navázanou aminokyselinu (typ aminokyseliny je určen typem antikodonu)

**ANTI KODON** – je trojice nukleotidů, kterou nese tRNA a která označuje příslušný typ aminokyseliny. Antikodonem se tRNA váže k mRNA podle principu komplementarity

**AMINOKYSELINA** – základní stavební jednotka proteinů. Až na nepatrné výjimky jsou všechny proteiny ve všech živých organismech sestaveny z 20 druhů tzv. proteinogenních aminokyselin. Každá tato aminokyselina odpovídá určitému antikodonu na molekule tRNA.

**RIBOZOM** – je struktura tvořena proteinem a ribozomální RNA – rRNA. Uplatňuje se při translaci, kdy je z řetězce mRNA syntetizován protein.

**GENETICKÝ KÓD** – soubor pravidel, podle kterých se genetická informace uložená v DNA (respektive mRNA) převádí na primární strukturu proteinů. K jednotlivým kodonům na mRNA náleží odpovídající tRNA se příslušným antikodonem a příslušnou aminokyselinou. Máme tedy 64 ( $4^3$ ) možných kombinací, 64 odlišných kodonů.

### Příklad:

Máme k dispozici tuto nukleotidovou sekvenci:

TTG GGA ATG AGC ATA TTT AGA GCG GTA GAT AAT GCT TAG

Použijeme tabulku genetického kódu a postupně odhalujeme zašifrovaný vzkaz:

Jako první hledáme Iniciační kodon – ATG, až když ho v sekvenci najdeme, teprve pak můžeme začít překládat. Iniciační kodon kóduje aminokyselinu Methionin (M), ale na začátku translace ho nepřekládáme.

TTG-GGA-**ATG**-AGC-ATA-TTT-AGA-GCG-GTA-GAT-AAT-GCT-TAG

Dále dekódujeme jednotlivé triplety a přiřazujeme jim velká tiskací písmena, která označují jednotlivé aminokyseliny.

TTG-GGA-**ATG**-AGC-ATA-TTT-AGA-GCG-GTA-GAT-AAT-GCT-**TAG**  
                  **S I F R A V D N A**

Poslední kodon jsme identifikovali jako STOP kodon, takže zde překlad skončí.

### **Legenda ke křížovce**

1- GTT CAT ATA ATG ATG GAA AAC GAT GAG TTG TAA TTT CCT

2 - GGG ATG GCG GTC GAA AGG TAC TAG

3 - ATG GGA TGA GCC AAC ATC AAT TAA TGG TTA CAC

4 - ATT CAT TGC GCA ATG GGA GAA AAC TAG

5 - GTT ACT ATG ACA CAC TAT ATG ATT AAC TAA CCA TGC

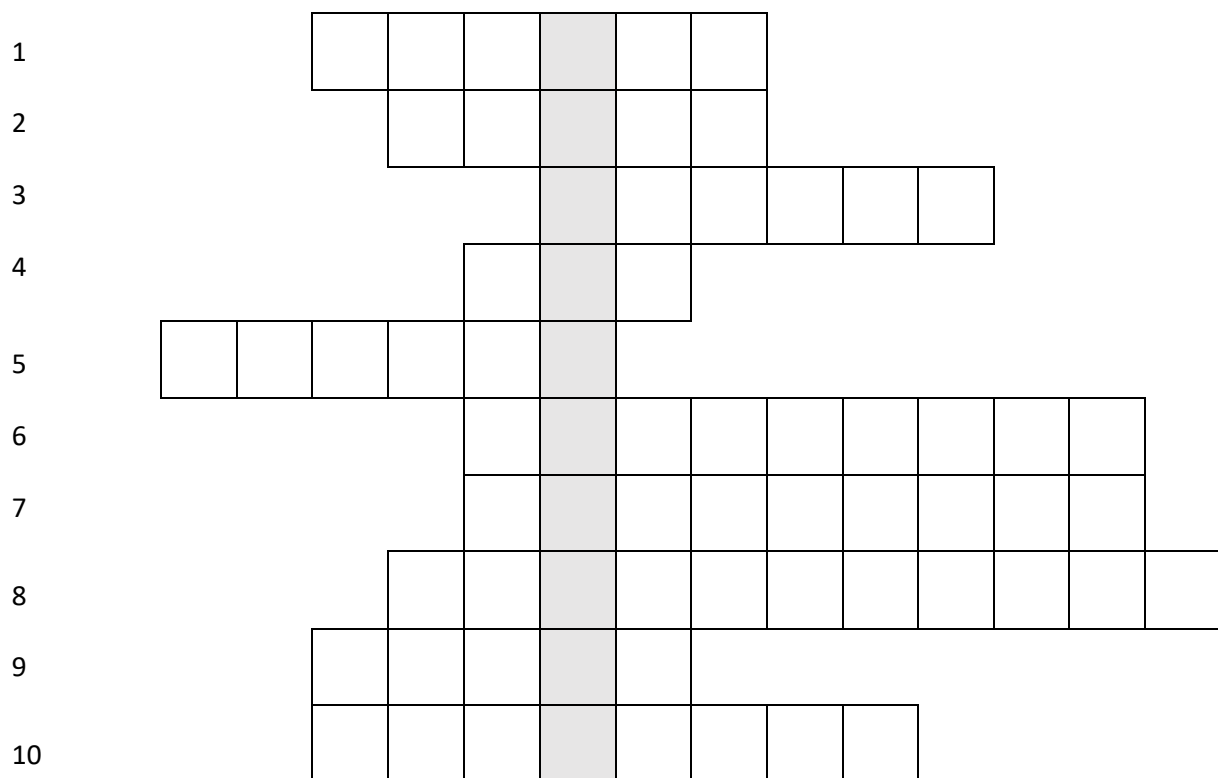
6 - CAT ATG CGT GAA CCG CTT ATA AAA GCG TGT GAG TAA

7 - TTT GTC TCA ATG ACG CGA GCC AAC AGT CTA GCT TGT GAA TAG

8 - ATG ACA CGT GCA AAT TCT AAA CGA ATA CCC TGT GAG TAA CAA TGG

9 - TTC GAT ATG TGC AGA ATC TGT AAG TGA GTA TCG TCA GAA ACT

10 - ATA ATG GGC GAA AAT GAG ACC ATT AAA GCT TGA



### Kontrola + doplňková legenda ke křížovce:

- 1 – zakladatel moderní genetiky, brněnský kněz a středoškolský profesor
- 2 – vědec, který v roce 1944 jako první prokázal, že nositelkou dědičnosti je DNA
- 3 – dusíkatá báze, která se v DNA páruje třemi vodíkovými můstky s cytosinem
- 4 – úsek na DNA nesoucí informaci, která se bude přepisovat RNA a překládat do proteinů
- 5 – dusíkatá báze, která je v RNA nahrazena uracilem a v DNA se páruje s adeninem
- 6 – proces, při kterém se vytvářejí identické kopie molekuly DNA
- 7 – proces, ve kterém se sestavuje primární struktura proteinů podle mRNA
- 8 – proces, při kterém se podle genetické informace v DNA syntetizuje řetězec mRNA
- 9 – vědec – spoluobjevitel sekundární struktury DNA, Nobelova cena v roce 1962
- 10 – biologická věda zabývající se dědičností

## VÝSLEDKY

V legendě jsem vyznačila **iniciační kodony** a od těchto tripletů jsem začala dekódovat jednotlivé aminokyseliny. Jakmile jsem došla ke **stop kodonu**, zaznačila jsem ho a dále už jsem nepřekládala.

1- GTT CAT ATA **ATG** ATG GAA AAC GAT GAG TTG **TAA** TTT CCT

2 - GGG **ATG** GCG GTC GAA AGG TAC **TAG**

3 - **ATG** GGA TGA GCC AAC ATC AAT **TAA** TGG TTA CAC

4 - ATT CAT TGC GCA **ATG** GGA GAA AAC **TAG**

5 - GTT ACT **ATG** ACA CAC TAT ATG ATT AAC **TAA** CCA TGC

6 - CAT **ATG** CGT GAA CCG CTT ATA AAA GCG TGT GAG **TAA**

7 - TTT GTC TCA **ATG** ACG CGA GCC AAC AGT CTA GCT TGT GAA **TAG**

10 - ATA **ATG** GGC GAA AAT GAG ACC ATT AAA GCT **TGA**

		M	E	N	D	E	L						
			A	V	E	R	Y						
					G	U	A	N	I	N			
					G	E	N						
T	H	Y	M	I	N								
					R	E	P	L	I	K	A	C	E
					T	R	A	N	S	L	A	C	E
			T	R	A	N	S	K	R	I	P	C	E
C	R	I	C	K									
G	E	N	E	T	I	K	A						

**Genetický kód** – staženo ze stránky:

The circular genetic code chart (codon wheel) displays the mapping from mRNA codons to amino acids. The chart is organized into concentric rings:

- Center:** The four bases A, C, G, and T are arranged in a circle.
- First Ring:** The second base of the codon is indicated by the letters A, C, G, and T.
- Second Ring:** The third base of the codon is indicated by the letters A, C, G, and T.
- Outer Edge:** The amino acids are listed in three-letter codes around the perimeter.
- Stop Codons:** Marked with an asterisk (\*).

The chart shows that there are 64 possible codons, which code for 20 different amino acids and 3 stop codons. The chart is a circular representation of the genetic code, where the sequence of bases in a codon determines the specific amino acid it codes for.



# **Srovnání několika metod izolace DNA z různých materiálů v prostředí bez speciálního laboratorního vybavení**

Autor: Magdalena Ambrozková

## **ABSTRAKT**

---

V podmínkách běžné školní laboratoře nebo domácnosti – tj. bez laboratorního vybavení a s pomocí běžně dostupných surovin lze izolovat DNA. V této práci jsem vyzkoušela čtyři protokoly izolace DNA, k izolaci jsem použila jak rostlinné, tak živočišné tkáně a chemické látky, které se běžně vyskytují v domácnosti.

## **ÚKOL Č. 1**

---

### **Izolace DNA z buněk lidské bukalní sliznice**

#### **POMŮCKY A MATERIÁL**

Roztok NaCl (2%)  
Detergent (čisticí prostředek Jar)  
Etanol (96 %)

Ledová lázeň  
Plastová uzavíratelná zkumavka o objemu 50 ml  
Plastová mikrozukavka  
Plastová pipeta

#### **POSTUP PRÁCE**

- Ze zásobního roztoku NaCl (2%) se odlije cca 15 – 20 ml slaného roztoku do plastové zkumavky
- tento objem jsem použila k výplachu ústní dutiny (tekutina se v ústech převaluje cca 2 min.)
- Poté jsem výplach převedla zpět do zkumavky a přidala „kapku“ (malé množství) detergentu (Jar)
- Opatrným převrácením jsem uzavřenou zkumavky promíchávala za pokojové teploty cca 5 minut.
- Poté jsem roztok opatrně převrstvila stejným objemem vychlazeného vysokoprocentního alkoholu
- pár minut jsem vyčkala, než se DNA vysrážela do horní – alkoholové fáze ve zkumavce
- plastovou pipetou jsem opatrně odebrala bílou sraženinu (DNA) a převedla ji do plastové mikrozukavky

## VÝSLEDKY ÚKOLU Č. 1

Podařilo se mi izolovat DNA z buněk, které se odlouply ze sliznice v ústní dutině, když byla promývána roztokem NaCl. Bílá sraženina bude obsahovat nejen DNA, ale i RNA a zbytky proteinů z nukleohistonového komplexu, protože během pokusu jsem neprováděla přečištění směsí fenolem a chloroformem, což by se v laboratoři správně při této metodice mělo udělat.



*Obrázek 1: Vysrážená DNA - izolace DNA z buněk lidské bukové sliznice*

## DISKUZE K ÚKOLU Č. 1

Tento experiment jsem dělala již několikrát, naposledy letos v říjnu na Noci vědců na MU v Brně. Je to poměrně jednoduchý pokus, který trvá 10 až 15 minut a při dodržení postupu můžeme skoro vždy pozorovat DNA jako bílou sraženinu. Problém může nastat, když se koncentrovaný alkohol přidává neopatrně, rychle, případně když se zkumavka s reakční směsí neopatrně protřepává. Pak se sraženina většinou neobjeví, nebo je jen slabě viditelná. Další problém může nastat, když alkohol není dostatečně vychlazený.

## ÚKOL Č. 2

---

### Izolace DNA z banánu

#### POMŮCKY A MATERIÁLY

Zralý banán

Extrakční pufr (5 g NaCl + 25 g citronanu sodného do 568 ml destilované vody)

Kyselina citronová

NaOH

Čistící prostředek Jar

Destilovaná voda

Denaturovaný ethanol (96%)

Ledová lázeň

Talířek, vidlička

Sklenice

Jednorázové injekční stříkačky (5 ml, 20, ml)

Plastové uzavíratelné zkumavky (20 ml)

Stojánek

Nálevka s filtračním papírem

## POSTUP PRÁCE

- Nejprve jsem si připravila extrakční pufr. Vzhledem k tomu, že jsem neměla k dispozici citronan sodný, rozhodla jsem se, že si ho vyrobím z doma dostupných surovin, a sice reakcí kyseliny citrónové s hydroxidem sodným. Navážku NaOH jsem vypočítala pomocí rovnice:

$$m(\text{NaOH}) = \frac{3}{1} \cdot \frac{39,997}{258,06} \cdot 25 = 11,624 \text{ g}$$

Množství kyseliny citrónové:

$$m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = \frac{1}{1} \cdot \frac{192,13}{258,06} \cdot 25 = 18,613 \text{ g}$$

- Navážku NaOH a kyseliny citrónové jsem rozpustila ve 20 ml destilované vody (každou zvlášť) a pak jsem oba roztoky smíchala dohromady. Touto reakcí jsem získala 40 ml roztoku citronanu sodného, k tomuto roztoku jsem přidala 5 g NaCl a doplnila 528 ml destilované vody, čímž jsem si připravila extrakční pufr, který jsem uložila v lednici.
- Na talířku jsem vidličkou dobře rozmačkala malý kousek banánu přibližně 2–3 cm dlouhý (mechanické rozrušení tkáně)
- do sklenice jsem nalila 12 ml extrakčního pufru a přidala cca 3 ml detergentu (Jar)
- rozmačkaný banán jsem převedla do sklenice a dobře vše promíchala (lyze buněk a uvolnění DNA a ostatních látek do roztoku) nechala jsem působit asi 5 minut
- připravila jsem si stojánek s nálevkou a s navlhčeným filtračním papírem a směs banánu v extrakčním pufru jsem přefiltrovala do čisté sklenice (tím se oddělí proteiny, lipidy a zbytky membrán od DNA)
- asi 1 ml filtrátu jsem převedla do plastové zkumavky a přidala jsem stejný objem vychlazené destilované vody a vše jsem promíchala
- opatrně jsem přidala cca 10 ml dobře vychlazeného ethanolu – je třeba opatrně vrstvit po stěně zkumavky
- po 2–3 minutách lze pozorovat bílou sraženinu (DNA), která se nachází na rozhraní vodné a alkoholové fáze.
- Vysráženou DNA jsem opatrně namotala na tyčinku a převedla do nové plastové zkumavky



Obrázek 2: Izolace DNA z banánu: a) pomůcky a materiály; b) homogenizace banánu; c) DNA vysrážená v alkoholové fázi

## DISKUZE K ÚKOLU Č. 2

Tento postup jsem upravila podle návodu CeeBT- TeachingBASE

<http://www.ceebt.embo.org/projects/project8/project8.html>

Pokus je dobře proveditelný v jednoduchých podmínkách, DNA byla dobře patrná. Stejně jako v předchozím pokusu bude sraženina obsahovat kromě DNA také RNA a zbytky proteinů. Na tomto postupu mě nejvíce bavilo, že jsem si sama mohla připravit potřebné chemikálie (zvláště reakce kyseliny citronové s hydroxidem sodným byla zábavná...)

## ÚKOL Č. 3

---

### Izolace DNA z mražených meruňek pomocí ananasové šťávy

#### POMŮCKY A MATERIÁL

Mražená meruňka  
Denaturovaný ethanol (96%)  
Čerstvě vymačkaná ananasová šťáva  
Cukr  
Samouzavíratelný sáček  
odměrka  
Sítko  
Lžička  
Plastová uzavíratelná zkumavka (20 ml)  
Vysoká a úzká sklenice  
Ledová lázeň

#### POSTUP PRÁCE

- z čerstvého ananasu jsem připravila cca 100 ml ananasové šťávy
- meruňku jsem nechala rozmrazit, lehce jsem ji rozmačkala vidličkou a posypala cukrem (cca 20 g) – zmrazením byla porušena buněčná stěna a cukr udělá na povrchu meruňky hypertonické prostředí
- směs meruňky a cukru jsem převedla do uzavíratelného sáčku a přidala cca 80 ml ananasové šťávy
- směs v sáčku jsem důkladně rozmačkala rukou (ananas obsahuje proteázu Bromelain, která odstraní proteiny z nukleohistonů a uvolní tak DNA) nechala působit několik minut při pokojové teplotě
- obsah sáčku jsem precedila přes jemné sítko do úzké a vysoké sklenice
- s pomocí lžičky jsem obsah ve sklenici opatrně převrstvila cca 40 ml vychlazeného ethanolu
- během několika minut bylo možné pozorovat, jak se DNA sráží do horní alkoholové fáze
- díky bublinám vzduchu jsou chomáčky vysrážené DNA dopraveny až k hladině, kde jsem je mohla odebrat do čisté plastové zkumavky

### VÝSLEDKY K ÚKOLU Č. 3

Podařilo se mi úspěšně izolovat DNA z mražené meruňky. Stejně jako v předchozích postupech, ani při tomto postupu není takto získaná DNA čistá, je s příměsí RNA.



**Obrázek 3:** Izolace DNA z meruňek: **a)** pomůcky a materiály; **b)** DNA se sráží do alkoholové fáze; **c)** vysrážená DNA na špejli; **d)** vysrážená DNA ve zkumavce

### DISKUZE K ÚLOZE 3

Tento postup jsem upravila podle návodu Jana Havlíka v magazínu TechNet [https://technet.idnes.cz/jak-izolovat-dna-doma-ananas-jahody-koktejl-fkk-/veda.aspx?c=A160201\\_145450\\_veda\\_pka](https://technet.idnes.cz/jak-izolovat-dna-doma-ananas-jahody-koktejl-fkk-/veda.aspx?c=A160201_145450_veda_pka)

Místo jahod, jak bylo doporučeno v návodu, jsem použila meruňky a místo konzumního alkoholu jsem použila denaturovaný 96% líh, takže výsledný produkt už nemohl být dále používán (tedy – konzumován). Na tomto postupu je zajímavé, že se k buněčné lyzi nepoužívají detergenty (Jar, Pur, šampóny...) – to je nahrazeno zmrazením a rozmrazením a přidáním proteázy z ananasové šťávy. Díky těmto úpravám (pokud by se k vysrážení použil konzumní vysokoprocenní alkohol) by se výsledek pokusu mohl po demonstraci vysrážené DNA vypít. Experiment se mi povedl, vysrážená DNA byla dobře patrná. Díky bromelainu by měla výsledná sraženina obsahovat hlavně DNA, asi i RNA, ale proteiny z nukleohistonového komplexu by tam už být neměly.

## ÚKOL Č. 4

---

### Izolace DNA z čerstvých kuřecích jater

#### POMŮCKY A MATERIÁLY

Čerstvá kuřecí játra

NaCl

Destilovaná voda

Šampón na vlasy Palmolive s obsahem EDTA

96 % denaturovaný ethanol

Roztok na kontaktní čočky Opto soak plus

Tyčový mixér

Sklenice

Jednorázové injekční stříkačky

Sítka

Plastové uzavíratelné zkumavky (20 ml)

#### POSTUP PRÁCE

- kuřecí játra jsem nakrájela nadrobno a odměřila jsem objem přibližně 100 ml. Játra jsem převedla do velké sklenice, přidala cca 2 g NaCl a dva objemy (cca 200 ml) destilované vody. Pořádně jsem vše rozmixovala tyčovým mixérem (dojde k rozbití buněčných stěn a sůl vytvoří hypertonické prostředí)
- k rozmixované směsi jsem přidala 1/6 objemu detergentu (cca 2 polévkové lžíce) – jako detergent byl použit šampón s obsahem EDTA (chelatační činidlo, které vychytá dvojmocné kationty, tím destabilizuje membránu a zároveň působí jako inhibitor DNáz)
- vše jsem promíchala a nechala působit 5–10 minut. Detergent naruší buněčné stěny a stěny buněčných jader, DNA a další sloučeniny přejdou do roztoku.
- ze směsi jsem odlila část do plastové zkumavky (cca 10 ml) a přidala pár kapek roztoku na kontaktní čočky. Roztok na kontaktní čočky obsahuje proteázy a oddělí DNA od ostatních složek ve směsi.
- směs ve zkumavce jsem opatrně převrstvila vychlazeným denaturovaným alkoholem
- DNA se za nějakou dobu vysrážela na rozhraní obou fází

#### VÝSLEDKY K ÚKOLU Č. 4

DNA z kuřecích jater pomocí roztoku na kontaktní čočky se podařilo izolovat, ale vysrážená DNA nevytvořila dlouhá souvislá vlákna, jako v minulých pokusech, ale byla tvořena drobnými sraženinami, které se nedaly namotat na špejli.





**Obrázek 4:** Izolace DNA z kuřecích jater: **a)** pomůcky a materiály; **b)** vysrážená DNA ve zkumavce na rozhraní fází

## DISKUZE K ÚKOLU Č. 4

Tento experiment jsem nedělala, podle žádného konkrétního návodu, ale zkombovala jsem při něm různé postupy. Kuřecí játra jsem zvolila proto, že jsem si chtěla vyzkoušet, jak se bude pracovat s živočišnou tkání. Také jsem v tomto pokusu poprvé použila detergent (šampon) s obsahem chelatačního činidla (EDTA) a vyzkoušela jsem působení proteáz z roztoku na kontaktní čocky. Díky tomu by výsledná sraženina neměla obsahovat proteiny. U tohoto experimentu se mi nepodařilo izolovat vysráženou DNA tak, aby se dala namotat na špejli. To jsem pravděpodobně způsobila tím, že jsem DNA po přidání enzymu v roztoku na čocky neopatrně zamíchala – v tomto kroku asi došlo k polámání vláken DNA, která se působením enzymu uvolnila z nukleohistonů.

## ZÁVĚR

Vyzkoušela jsem si čtyři různé způsoby izolace DNA v domácích podmínkách. Všechny provedené pokusy byly úspěšné, DNA byla pozorovatelná jako hustá bílá sraženina v alkoholové fázi. Nejvíce mě bavily úkoly č. 2 a 3. Při izolaci DNA z banánu jsem uplatnila své „chemické dovednosti“ a doma jsem si připravila extrakční pufr z dostupných chemikálií – reakce hydroxidu s kyselinou byla docela dosti exotermická... Při izolaci z meruněk jsem si v mezikroku před přidáním denaturovaného líhu odebrala směs meruněk s ananasem, která byla moc dobrá!

## 6. BIOINFORMAČNÍ LABORATOŘ

### 6.1 Úvod do problematiky

V molekulárně-biologické laboratoři jsme podrobně prozkoumali sekundární strukturu DNA a naučili jsme se pomocí genetického kódu překládat informaci z nukleových kyselin do proteinů. Svépomocně jsme dokázali izolovat DNA a po namotání na špejli jsme si na ni mohli dokonce i sáhnout.

Ale izolaci DNA to celé rozhodně nekončí, naopak – teprve začíná. Izolovanou DNA je možné vzít a začít s ní experimentovat. Například oddělovat její jednotlivé frakce elektroforézou, barvit ji, štěpit, klonovat nebo sekvenovat. Ale všechny tyto experimenty už bohužel v domácí (a většinou ani ve školní) laboratoři nebudeme schopni provádět, protože vyžadují speciální laboratorní vybavení. Ale pozor – na konci většiny těchto supermoderních laboratorních postupů stojí konkrétní nukleotidová nebo proteinová **sekvence v digitální podobě**, a práce na ní se přesouvá ze specializovaných laboratoří klidně i domů – k pracovnímu stolu s počítačem.

Je to tak – pokud jsme pracovali s živými organismy v jejich přirozených podmínkách, prováděli jsme experimenty *in vivo*. V momentu, kde jsme přenesli své pokusné objekty do laboratoře, prováděli jsme experimenty *in vitro*. A nyní máme všechna data v počítači – pracujeme tedy *in silico* – vyhledáváme a srovnáváme v databázích nukleových kyselin, proteinů a dalších makromolekulárních struktur.

**Bioinformatika** je poměrně mladý vědní obor, který se zpracováním a analýzou sekvencí (pořadí monomerických jednotek) biologických makromolekul (tedy hlavně nukleových kyselin a proteinů) zabývá. Všechna data, se kterými bioinformatičtí pracují, jsou dostupná v databázích.

Tento obor postupuje kupředu mílovými kroky, a asi není den, aby někde na světě (v laboratoři) nevznikla nová sekvence ať už DNA nebo proteinu.

My si nyní sami vyzkoušíme, jakým způsobem bioinformatik pracuje.

V molekulárně biologické laboratoři jsme izolovali DNA z různých materiálů, například já jsem prováděla izolaci ze čtyř různých biologických tkání. Teď si představte, že jsem oslovila čtyři spřátelené molekulárně-biologické laboratoře s prosbou, aby mé izoláty DNA vyčistili a sekvenovali (určili pořadí nukleotidů v úseku DNA, který jsem izolovala). Do každé laborky jsem poslala jeden vzorek DNA – ve formě sraženiny v mikrozkuhavce s vysokoprocenním lihem. Bohužel jsem si jednotlivé vzorky s izoláty špatně popsala, takže teď si nejsem úplně jistá, co a do které laboratoře jsem vlastně posílala.

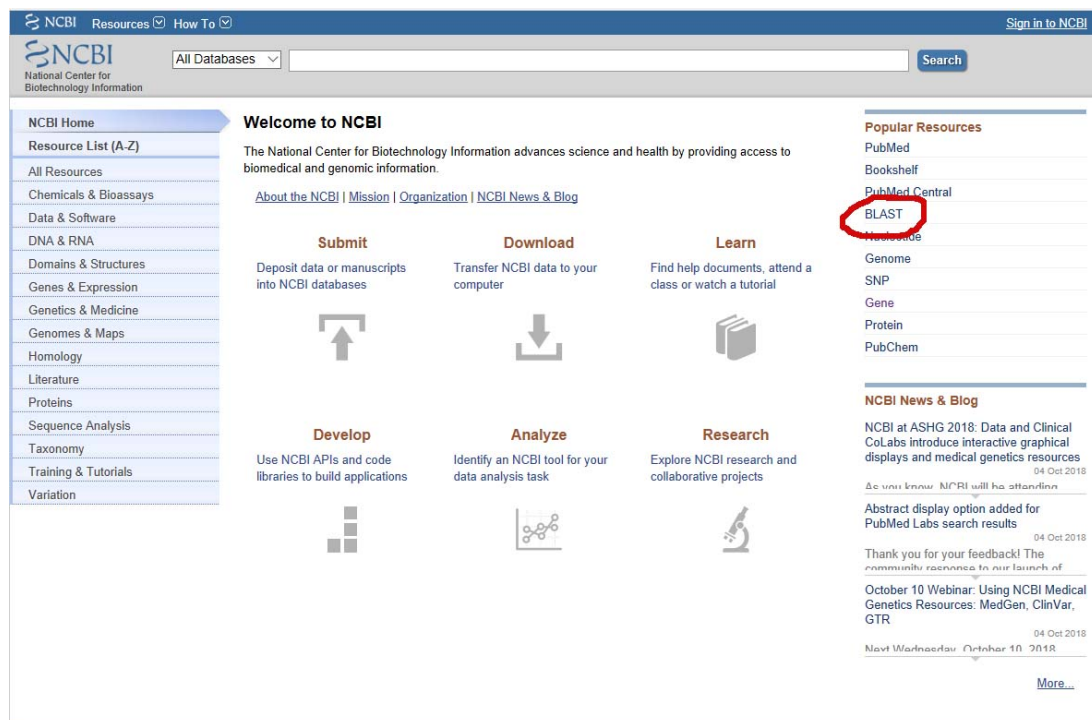
Čekání na výsledky kupodivu vůbec netrvalo dlouho, a jako první mi v mailové poště přistála zpráva z laboratoře na JU v Českých Budějovicích s touto informací:

```
CATTCCCCGCATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCTTCTTCTCTACTAGCCTCATCTACCGTA
GAAGCTGGGGCCGGCACAGGATGGACAGTTTACCCCCCTTTAGCCGGCAACCTAGCCCACGCTGGCGCATCAT
AGACCTAGCCATCTTTCTTACTTAGCAGGTGTTTCTCCATTCTAGGAGCCATCACTTTATCACTACCATCATC
AACATAAAACCCCCGCACTGTCACAATACCAACACCCCTATTCGTATGATCCGTCCTCATTACTGCCATCCTA
CTACTCCTCTCCTTACCCGTCCTAGCAGCTGGGATTACCATACTACTTACCGACCGCAACCTTAACACCACATTCT
TCGACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCAATCCTATACCAACACCTATTCTGATTCTTCGGTCACCCCGAAGTTTAC
ATCCTCATCTCTCCAGGTTTCGGAATAATTTCCCACGT
```

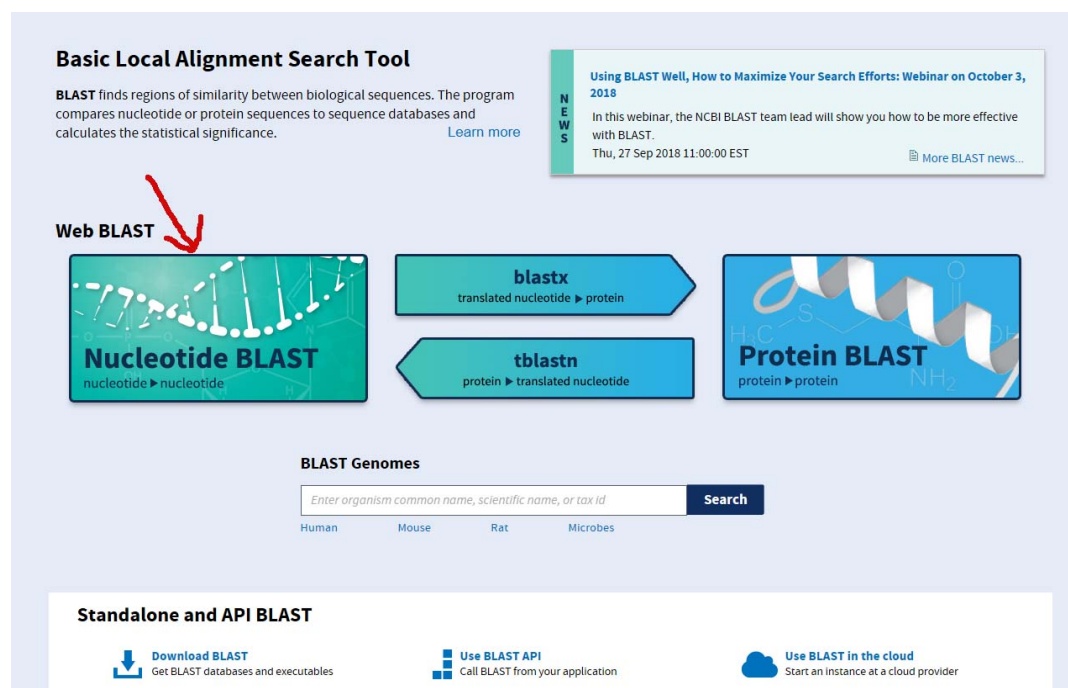
Takže teď mám v ruce (v počítači) nějakou sekvenci – došla mi ve formátu, ve kterém si vědci mezi se informace o genech posílají. Funguje i uchovávání sekvencí ve Wordu, zpravidla se doporučuje používat prostý textový editor, kde není žádné formátování, např. notepad.

A nyní si potřebuji v databázi vyhledat, o jakou sekvenci se vlastně jedná. Budu vyhledávat v **databázi GenBank**, která je běžně dostupná na stránkách institutu **NCBI** - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Co budu vlastně databázi zjišťovat? Mám k dispozici svou (neznámou) nukleotidovou sekvenci a chci najít identickou nebo co nejpodobnější sekvenci, která se v databázi GenBank už nachází. Proto na hlavní stránce ve sloupečku vpravo zvolím odkaz na **BLAST**.



**BLAST** je nejčastěji používaný program, který umí vyhledávat podobnost mezi sekvencemi.



Na této stránce vyberu ikonku **Nucleotide BLAST**, protože chci mezi sebou porovnávat nukleotidové sekvence.

**BLAST** » blastn suite

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

Query subrange [From](#) [To](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Or, upload file [Procházet...](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):  
Nucleotide collection (nr/nt)

Organism [Optional](#)  
Enter organism name or id—completions will be suggested ☐ Exclude [+](#)  
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude [Optional](#)  
☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to [Optional](#)  
☐ Sequences from type material

Entrez Query [Optional](#)  
Enter an Entrez query to limit search [You Tube](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Optimize for ☒ Highly similar sequences (megablast)  
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  
☐ Somewhat similar sequences (blastn)  
[Choose a BLAST algorithm](#)

**BLAST** Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)  
☐ Show results in a new window

Na tomto rozhraní zkopíruji do rámečku **Enter Query Sequence** svou sekvenci a kliknutím na modrou ikonku **BLAST** vlevo dole na obrazovce odešlu svá data ke zpracování

Již během několika sekund se dozvím výsledek!

**NIH** U.S. National Library of Medicine **NCBI** National Center for Biotechnology Information

**BLAST** » blastn suite » RID-VVTVH2F015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Job title: Nucleotide Sequence (490 letters)

RID [VVTVH2F015](#) (Expires on 10-11 19:49 pm)

Query ID Id|Query\_198053

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 490

Když budu rolovat stránku dolů, ukáže se, že moje sekvence vykazovala 100% shodu s částí mitochondriální DNA z buněk **kura domácího (*Gallus gallus*)**.  
Výborně – to by souhlasilo – jeden z mých vzorků DNA skutečně pocházel z kuřecích jater.

#### Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results
<input type="checkbox"/> <a href="#">Gallus gallus isolate 5210 mitochondrion, partial genome</a>				
<input type="checkbox"/> <a href="#">Gallus gallus isolate 5280 mitochondrion, partial genome</a>				



### 6.2.1 Čárové kódy života

Tato úloha byla publikována v Biologickém korespondenčním semináři Biozvěst (ročník 4 - série 3) – viz: <http://biozvest.arach.cz/index.html> autorkou je Magdalena Gajdošová

#### Cíl:

Vyzkoušet si v praxi porovnávání nukleotidových sekvencí v databázi GenBank pomocí programu BLAST

#### Časová dotace:

20–30 minut

#### Legenda:

Stejně jako přečtením čárového kódu lze přesně určit typ zboží, přečtením určité sekvence DNA lze určit druh organismu i bez hledání v určovacích klíčích. Proto se tomuto modernímu přístupu k určování druhů dal název **DNA barcoding** (barcode = čárový kód). Jako „čárový kód života“ byl pro živočichy zvolen úsek genu kódujícího **cytochrom oxidázu I (COXI)**. Představme si, že by existoval jakýsi katalog, v němž by ke každému existujícímu druhu živočicha na světě byla uvedena jeho unikátní sekvence genu pro COXI (pro jednoduchost budeme dále psát jen „sekvence COXI“). Pokud bychom pak chtěli jakékoliv pro nás neznámé zvíře určit do druhu, stačilo by osekvenovat jeho COXI a nechat počítač, aby nám k získané sekvenci v katalogu našel druh se shodnou (či téměř shodnou) sekvencí. Takové „katalogy“ skutečně existují, ač zatím samozřejmě nejsou kompletní. Každým dnem se ale rozšiřují o další a další sekvence zveřejňované vědci po celém světě, a už dnes se jedná o velmi užitečný nástroj. V současnosti není výjimkou, že vědci popisující nové druhy rovnou kromě morfologického popisu přidávají i sekvence umožňující barcoding, jako samostatný určovací znak.

**Na cestách po jihovýchodní Asii Ti zachutnaly některé pokrmy prodávané na tržnici, kvůli jazykové bariéře jsi ale celou dobu netušil, z čeho jsou vlastně vyrobené. Odebral jsi z nich tedy vzorky masa a po návratu domů jsi každý osekvenoval na přítomnost genu COXI. Získal jsi následující tři sekvence.**

#### >První\_sekvence

```
TAGGACAGCCCGGAAGCTCTTAGGAGACGATCAAATTTACAATGTAATCGTCACAGCCCATGCTTTCGTCATA
ATCTTCTTTATAGTTATACCCATCATGATCGGTGGCTTCGGAACTGACTAGTCCCGCTTATAATCGGTGCCCA
GACATAGCATTCCCCCGCATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCCTTCTCTCTACTAGCCTCAT
CTACCGTAGAAGCTGGGGCCGGCACAGGATGGACAGTTTACCCCCCTTTAGCCGGCAACCTAGCCCACGCTGG
CGCATCAGTAGACCTAGCCATCTTTTATTACACTTAGCAGGTGTTTCCTCCATTCTAGGAGCCATCAACTTTAT
CACTACCATCATCAACATAAAACCCCCCGCACTGTCACAATACCAAACACCCCTATTTCGTATGATCCCCCTCAT
TACTGCCATCCTACTACTCCTCTCCTTACCCGTCTCACAGCTGGGATTACCATACTACTTACCGACCGCAACCTT
AAA
```

### >Druhá\_sekvence

TCACAAGGATATCGGAACCTTTGTACTTTTTATTTCGGAATCTGGTCGGGAATAGTTGGTACAGCTCTAAGATGAT  
TAATCCGAATTGAACTGGGCCAACAGGATCTTTTATTGGAGATGATCAAATTTATAACGTAATTGTAACAGCA  
CATGCATTCATTATAATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAAATTGGGGGATTTCGGAACTGACTTCTACCCCTAA  
TAATTGGAGCACCAGATATGGCATTCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGATTGTTACCTCCATCACTAACAC  
TTCTTCTATCAAGAAGAATTGTTGAAAAAGGAGCAGGTACTGGTTGAACAGTGTACCCACCACTATCAACTAAT  
ATCTCACACAGAGGAGCATCAGTAGATCTTGCAATCTTCTCATTACATTTAGCAGGAGTGTCAATTCTAGG  
AGCAGTAACTTCATCTCTACAGTAATTAACATACGTAACCGGAATGACACCTGATCGAATACCACTATTTCGT  
ATGATCGGTATCAATTACAGCTTTACTACTACTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCAATCACCATACTATT  
AACAGACCGAAATTTCAATACATCATTCTTCGATCCTGCAGGAGGAGGTGACCAATTCTATACCAA

### >Třetí\_sekvence

TTCATAAACCGTTGACTCTTTTCAACTAACCACAAAGATATCGGAACCCCTCTACCTATTATTTGGGGCCTGAGCA  
GGAATAGTAGGGACAGCTTTAAGTATTCTAATTCGAGCTGAACTAGGGCAGCCAGGTGCACTCCTAGGAGAT  
GACCAAATCTATAATGTCATCGTCACAGCCCATGCATTCGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCTATAATAATT  
GGAGGCTTCGGAACTGACTTGTCCCACTAATAATTGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAAATAACAT  
AAGCTTTTGACTGCTTCCTCCATCGTTTCTACTCCTTTTAGCATCCTCCATAGTAGAAGCTGGAGCTGGAACAGG  
ATGAACAGTATATCCCCCTTAGCCGGAACCTAGCCCATGCTGGAGCATCCGTAGATTTAACTATTTTTCCCT  
CCACCTAGCCGGGGTGTCTTCTATCTTAGGAGCTATCAACTTTATCACCCTATCATTAAATATAAAACCCCTGC  
TATAACCAATATCAAACACCTCTCTTTGTATGATCCGTAATAATTACAGCCGTCTACTACTTCTCTCACTGCCA  
GTATTAGCAGCAGGTATCACTATACTCCTTACAGACCGAAATCTAAATACTACTTTCTTCGACCCCGCTGGAGG  
TGGAGACCAATTCTTTATCAACACCTATTC

### Z čeho byly pokrmu připraveny?

#### Postup práce:

Podle výše uvedeného návodu si otevřeme databázi GenBank a použijeme srovnávací program BLAST, konkrétně Nucleotide BLAST. Jednotlivé sekvence odesíláme k porovnávání a poté zaznamenáme původ – zdroj této neznámé DNA.

#### Výsledky:

Pod první sekvencí je ukryt **kur bankivský** (*Gallus gallus*).

Druhá sekvence – **ploštice** *Lethocerus indicus*

Třetí sekvence – **potkan** (*Rattus norvegicus*)

#### Diskuse a závěr:

Dobrou chuť ☺



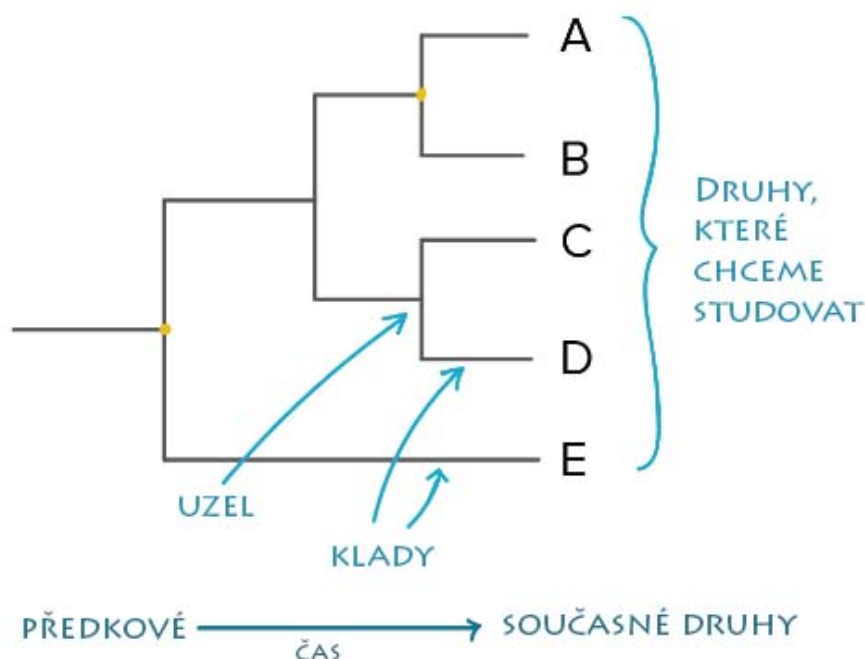
## Molekulární fylogenetika

Obrovské množství dat nacházejících se v genomových databázích umožnilo vznik několika dalších nových vědních oborů. Jedním z nich je i molekulární fylogenetika.

Pod termínem **fylogenetický strom** (z řeckého **fylé** – strom a **genesis** – zrození), si většina vybaví grafické znázornění příbuzenských vztahů mezi jednotlivými organismy (živočichy, rostlinami atd.), o kterých se předpokládá, že mají společného předka. Znázornění fylogenetického stromu se nazývá kladogram (termín **klad** je odvozen od řeckého výrazu pro výhonek – větvičku). Klad je skupina organismů obsahující všechny potomky společného předka – stejně jako větev oddělující se od kmene stromu nese všechny její další větve. Hlavní pravidlo konstrukce kladogramu je, že každá linie se může rozdělit na dvě dceřiné větve – štěpí se divergentně. Místo štěpení linie se nazývá uzel.

V klasickém fylogenetickém stromu se příbuzenské vztahy posuzují podle morfologické nebo genetické podobnosti. **Molekulární fylogenetika** však do svých stromů dosazuje místo jednotlivých organismů přímo jednotlivé geny těchto organismů. Princip spočívá v tom, že čím podobnější je genetická informace dvou organismů, tím jsou si příbuznější. Pokud srovnáváme dva stejné geny pocházející ze dvou různých organismů – porovnáváme množství mutací, kterými se od sebe tyto dva geny liší.

Dnes máme k dispozici řadu výpočetních nástrojů, které dokáží porovnat zadané genové sekvence mezi sebou a na základě tohoto srovnání umožní vytvořit vlastní fylogenetický strom – a to si právě teď vyzkoušíme.



## 6.2.2 Vytvoření fylogenetického stromu

### Cíl:

Procvičení práce s genomovými databázemi a vyhledávači, práce ve srovnávacím programu T-Coffee

### Časová dotace:

20–30 minut

### Postup práce:

Nejprve se musíme rozhodnout, které organismy chceme z hlediska evoluční příbuznosti srovnávat. Vysvětlíme si to na příkladu vzájemné příbuznosti mezi kočkovitými šelmami. Budeme zkoumat, jak jsou si vzájemně příbuzné tyto kočkovité šelmy:

**Lev pustinný** (*Panthera leo*)

**Tygr ussurijský** (*Panthera tigris*)

**Irbis** (*Panthera uncia*)

**Puma americká** (*Puma concolor*)

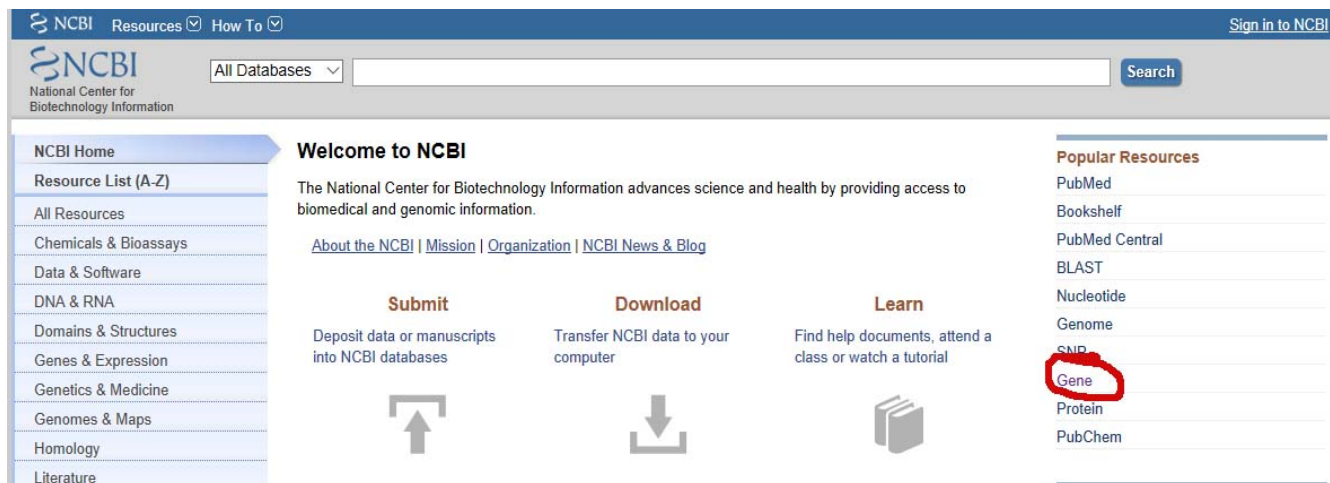
**Ocelot velký** (*Leopardus pardalis*)

**Kočka divoká** (*Felis silvestris*)

Z minulé úlohy už víme, k čemu se v molekulární fylogenetice používá srovnávání genu pro **cytochrom oxidázu C (COX1)**. Také v této úloze budeme u všech zkoumaných kočkovitých šelem porovnávat sekvence právě tohoto genu.

Otevřeme si Genbank ze stránky <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Protože budeme vyhledávat sekvence genů, v okně vpravo nahoře zvolíme záložku Gene



Do vyhledávače nahoře napíšeme název genu a latinský název organismu, u kterého gen hledáme. Napíšeme tedy **COX1 panthera leo** a odešleme tlačítkem search. Během několika sekund se zobrazí výsledek hledání.

GENE

Was this helpful?

COX1 – cytochrome c oxidase subunit I

Panthera leo (lion)

Also known as: ASR00\_gp11

GeneID: 26129530

RefSeq proteins (1)

Download

RefSeq proteins

**COX1** cytochrome c oxidase subunit I [ *Panthera leo* (lion) ]

Gene ID: 26129530, updated on 16-Jul-2016

98

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

Learn more about upcoming changes to the Nucleotide, EST, and GSS databases.

FASTA

Send to: Change region shown

Whole sequence  
Selected region  
from: 6033 to: 7577  
Update View

Customize view

Analyze this sequence  
Run BLAST  
Pick Primers  
Highlight Sequence Features  
Find in this Sequence

Related information  
BioProject  
Protein  
Taxonomy  
Gene  
PubMed (Weighted)

**Panthera leo isolate PLE mitochondrion, complete genome**

NCBI Reference Sequence: NC\_028302.1

GenBank Graphics

>6033-7577 Panthera leo isolate PLE mitochondrion, complete genome

ATGTTTCATAAACCGCTGACTATTTTCAACCAATCACAAAGACATTGGAACCTTTACCTTCTATTTGGTGCCTGG  
GCTGGTATGGTGGGGACTGCTCTCAGTCTCCTAATCCGAGCCGAACTGGGTCAACCTGGCACACTACTAGGGG  
ATGACCAAATTTATAATGTAGTCGTACCGCCCATGCTTTTGAATAATCTTCTTTATAGTAATACCTATCATGAT  
TGGAGGATTTCGAAACTGATTGGTCCCATTAAATAATTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATA  
TAAGCTTCTGACTTCTTCCCCCATCTTTCCTACTTTTGTCTGCATCGTCTATGGTAGAAGCTGGAGCAGGAAGT  
GGTGGACAGTATACCCGCCTCTAGCCGGCAACCTAGCTCACGCAGGAGCATCTGTAGATCTAACTATTTTTTCA  
CTACACCTGGCAGGTGTCTCCTCAATCCTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACTATTATTAATATAAAACCCCTG  
CTATATCCCAATACCAAACACCTCTATTTGTCTGATCGTTTTAATTACTGCTGTATTGCTACTCCTATCACTACC  
AGTTTTAGCAGCAGGCATCACTATGCTACTGACAGATCGAAATCTGAATACCACATTTTTTGACCCTGCCGGAG  
GAGGGGACCCTATCTTATACCAACATCTATTCTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTCTACATTTTAATTTTACCCG  
GGTTCGGAATAATTTACACATTGTCACCTATTATTCAGGTAAAAAAGAACCCTTTGGCTACATAGGAATAGTT  
TGAGCTATAATATCAATTGGTTTTCTAGGCTTTATTGTGTGAGCCCATCACATGTTTACTGTGGGGATAGATGT  
GGACACACGAGCATACTTTACATCTGCTACTATAATTATTGCTATTCCCACTGGAGTAAAAGTATTTAGCTGACT  
GGCACTCTTCATGGCGTAATGTCAAATGGTCTCCCGCTATGCTGTGAGCCCTAGGATTCATCTTCCTATTTAC  
TGTTGGGGGCTTAACAGGAATTGTACTAGCAAATTCCTCATTAGATATTGTCCTTCACGATACATACTATGTAG  
TAGCCCACTTCCACTATGTATTGTCGATAGGAGCAGTATTGCTATTATAGGGGGCTTCGTTTATTGATTCCCCC  
TATTCTCAGGGTATACTCTCGATAATACCTGGGCAAAAATTCATTTTACGATTATGTTCTGATAGGCGTCAATATA  
CGTTTTTCCCTCAGCATTTTCTAGGCTTGTCCGGAATGCCTCGACGTTATTCTGACTACCCAGACGCATATACAA  
CTTGAAACACAGTCTCCTCAATAGGCTCTTTTATTTTATTAAACAGCAGTAATATTAATGGTTTTTATAGTGTGAG  
AGGCTTTTGCATCAAAGCGAGAAGTGGCCATAGTGGAACCTAACACGACTAATCTTGAATGACTACATGGATG  
TCCCCCTCCATACCACACATTTGAAGAACCAACCTATGTGTTGCTAAAATAA

A celou genomovou sekvenci i s prvním řádkem (tam je právě název organismu) zkopírujeme do souboru ve Wordu.

Pro zřehlednění vymažeme kód pře dvojtečkou a sekvenci označíme vlastním popiskem LEV.

>LEV:6033-7577 Panthera leo isolate PLE mitochondrion, complete genome

ATGTTTCATAAACCGCTGACTATTTTCAACCAATCACAAAGACATTGGAACCTTTACCTTCTATTTGGTGCCTGG  
GCTGGTATGGTGGGGACTGCTCTCAGTCTCCTAATCCGAGCCGAACTGGGTCAACCTGGCACACTACTAGGGG  
ATGACCAAATTTATAATGTAGTCGTACCGCCCATGCTTTTGAATAATCTTCTTTATAGTAATACCTATCATGAT  
TGGAGGATTTCGAAACTGATTGGTCCCATTAAATAATTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATA  
TAAGCTTCTGACTTCTTCCCCCATCTTTCCTACTTTTGTCTGCATCGTCTATGGTAGAAGCTGGAGCAGGAAGT  
GGTGGACAGTATACCCGCCTCTAGCCGGCAACCTAGCTCACGCAGGAGCATCTGTAGATCTAACTATTTTTTCA  
CTACACCTGGCAGGTGTCTCCTCAATCCTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACTATTATTAATATAAAACCCCTG  
CTATATCCCAATACCAAACACCTCTATTTGTCTGATCGTTTTAATTACTGCTGTATTGCTACTCCTATCACTACC  
AGTTTTAGCAGCAGGCATCACTATGCTACTGACAGATCGAAATCTGAATACCACATTTTTTGACCCTGCCGGAG  
GAGGGGACCCTATCTTATACCAACATCTATTCTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTCTACATTTTAATTTTACCCG  
GGTTCGGAATAATTTACACATTGTCACCTATTATTCAGGTAAAAAAGAACCCTTTGGCTACATAGGAATAGTT  
TGAGCTATAATATCAATTGGTTTTCTAGGCTTTATTGTGTGAGCCCATCACATGTTTACTGTGGGGATAGATGT  
GGACACACGAGCATACTTTACATCTGCTACTATAATTATTGCTATTCCCACTGGAGTAAAAGTATTTAGCTGACT  
GGCACTCTTCATGGCGTAATGTCAAATGGTCTCCCGCTATGCTGTGAGCCCTAGGATTCATCTTCCTATTTAC  
TGTTGGGGGCTTAACAGGAATTGTACTAGCAAATTCCTCATTAGATATTGTCCTTCACGATACATACTATGTAG  
TAGCCCACTTCCACTATGTATTGTCGATAGGAGCAGTATTGCTATTATAGGGGGCTTCGTTTATTGATTCCCCC  
TATTCTCAGGGTATACTCTCGATAATACCTGGGCAAAAATTCATTTTACGATTATGTTCTGATAGGCGTCAATATA  
CGTTTTTCCCTCAGCATTTTCTAGGCTTGTCCGGAATGCCTCGACGTTATTCTGACTACCCAGACGCATATACAA  
CTTGAAACACAGTCTCCTCAATAGGCTCTTTTATTTTATTAAACAGCAGTAATATTAATGGTTTTTATAGTGTGAG  
AGGCTTTTGCATCAAAGCGAGAAGTGGCCATAGTGGAACCTAACACGACTAATCTTGAATGACTACATGGATG  
TCCCCCTCCATACCACACATTTGAAGAACCAACCTATGTGTTGCTAAAATAA

Stejným způsobem vyhledáme i další sekvenční pro další kočkovité šelmy – sekvenční (s upravenou hlavičkou) zkopírujeme všechny do jednoho wordového souboru pod sebe.

Vlastní fylogenetický strom vypracujeme v programu T-Coffee, který je k dispozici na stránce <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>

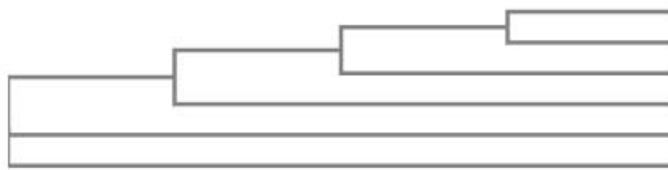
Nejprve vybereme z nabídky **DNA**

Celý obsah wordového souboru, kde jsme ukládali sekvence genu COX 1 pro různé kočkovité šelmy, nyní zkopírujeme do okna v sekci STEP1 a odešleme tlačítkem Submit. Za několik minut program T-Coffee zobrazí výsledky – uvidíme jednotlivé sekvence srovnané po sebou. Po rozkliknutí záložky Guide Tree, se nám zobrazí fylogenetický strom.



## Phylogram

Branch length: ☒ Cladogram ☐ Real

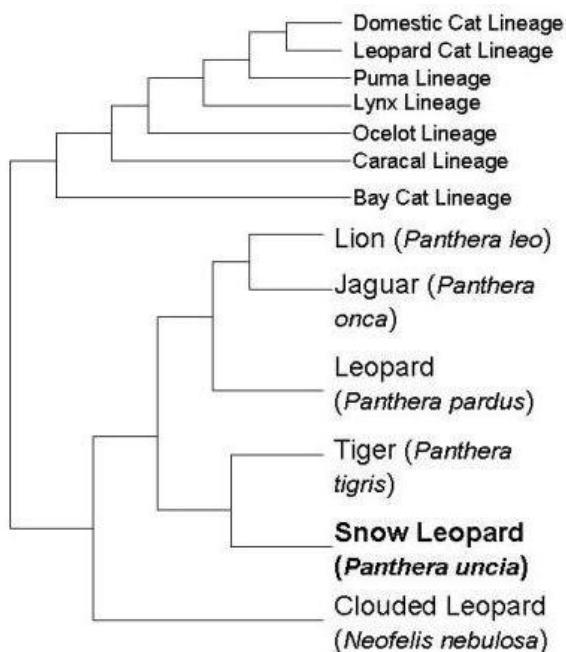


IRBIS\_6099-7643 0.045  
LEV\_6033-7577 0.045  
TYGR\_6280-7824 0.06333  
OCELOT\_6014-7558 0.0625  
KOČKA\_6011-7555 0.06375  
PUMA\_6263-7807 0.06625

### Diskuze a Závěr:

V programu T-Coffee jsme vyrobili ze zadaných organismů (zde kočkovitých šelem) fylogenetický strom. Připodobníme-li získaný obrázek ke skutečnému stromu, pak společní předkové budou odpovídat bodům, kde se strom rozvětňuje.

Od tohoto společného předka se oddělují další druhy tak, že předpokládají vývoj bifurkací, to znamená tak, že ze společného předka vzniknou vždy dva nové druhy. Na každém větvení je tak společný předek dvou druhů.



A zde srovnání mého vlastního fylogramu s odbornou literaturou.

Zdroj: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/bishop\\_kayl/classification.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/bishop_kayl/classification.htm)



## 7. Seznam použité literatury

- [1] HONZÁK, Radkin. Psychosomatická prvouka. Praha: Vyšehrad, 2017. ISBN 987-80-7429-912-4
- [2] HOSLER Jay [online]. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <http://jayhosler.com/index.html>
- [3] BIOZVĚST - návody [online]. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/navody.html>
- [4] OVERALL, Rupert W a Christiane LIEZMANN. Towards a "free radical theory of graying": melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage. The FASEB Journal [online]. 2006, 20(9) [cit. 2019-01-10].
- [5] SCHALLREUTER, Karin U. a John M. WOOD. Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. J Invest Dermatol. [online]. 1991, 97(6) [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1748819>
- [6] TAIZ, Lincoln a Eduardo ZEIGER. Plant physiology and development. Sixth edition. Oxford: Oxford University press. ISBN 978-160-5357-45-4.
- [7] PROCHÁZKA, Stanislav a Jiří ŠEBÁNEK. Regulátory rostlinného růstu. Academia, 1997. ISBN 80-200-0597-8.
- [8] PODLEŠÁKOVÁ, Kateřina, Danuše TARKOWSKÁ a Aleš PĚNČÍK. Nové trendy v analýze fytohormonů. Chemické listy [online]. 2012, (106) [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_05\\_373-379.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_373-379.pdf)
- [9] KENDRICK, Mandy. The Origin of Fruit Ripening. Scientific American [online]. 2009 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/origin-of-fruit-ripening/>
- [10] Origami DNA [online]. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/activities/origami-dna>
- [11] WARREN, Matthew. Mum's a Neanderthal, Dad's a Denisovan: First discovery of an ancient-human hybrid. Nature [online]. 2018, (560) [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-06004-0>
- [12] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. Biologie. Brno: Computer Press, 2008. ISBN 80-251-1187-4.

## **Seznam literatury a odkazy k jednotlivým experimentům:**

### **1. Mikrobiologická laboratoř**

BAER, Heinz Werner. Biologické pokusy ve škole. Praha, 1965. ISBN 14-927-65.

COLLEN, Alanna. 10 % člověka. Praha: Dobrovský, 2015. ISBN 978-80-7390-280-3.

JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. Úvod do biologie kvasinek. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.

KAPRÁLEK, František. Mikrobiologické praktikum. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-927-8.

KAPRÁLEK, František. Základy bakteriologie. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-811-5.

ŠILHÁNOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře. Praha: SNTL, 1983. ISBN 04-824-83.

VOSOLSOBĚ, Stanislav. Biozvěst - Lysozym [online]. 2018 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik5/5-2.pdf>

### **2. Enzymologická laboratoř**

BAER, Heinz Werner. Biologické pokusy ve škole. Praha, 1965. ISBN 14-927-65.

ČINČALOVÁ, Lucie, Tereza TICHÁ a Lenka LUHOVÁ. Laboratorní cvičení z biochemie [online]. Olomouc, 2015 [cit. 2019-01-11].

Enzymy jako biokatalyzátory [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: [https://chemicke-pokusy-pro-gymnazia.webnode.cz/files/200000093-3a16a3bofd/M\\_3\\_9\\_enzymy.pdf](https://chemicke-pokusy-pro-gymnazia.webnode.cz/files/200000093-3a16a3bofd/M_3_9_enzymy.pdf)

STANĚK, Miroslav. Kataláza, aktivita enzymů. Experimentujeme [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://www.experimentujeme.cz/material/katalaza-aktivita-enzymu>

VOSOLSOBĚ, Stanislav. Biozvěst - Enzymy a teplota [online]. 2016 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik4/4-1.pdf>

### **3. Fytohormonální laboratoř**

GRDIČOVÁ, Bosiljka. Praktikum z fyziologie rostlin. Praha: SPN, 1975. ISBN 14-613-76.

PROCHÁZKA, Stanislav a Marie HUDEOVÁ. Fyziologie rostlin - návody na cvičení. Praha: SPN, 1980.

PROCHÁZKA, Stanislav a Jiří ŠEBÁNEK. Regulátory rostlinného růstu. Academia, 1997. ISBN 80-200-0597-8.

VOSOLSOBĚ, Stanislav. Biozvěst - ethylen jako fytohormon [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik3/3-2.pdf>

#### **4. Fotosyntetická laboratoř**

BAER, Heinz Werner. Biologické pokusy ve škole. Praha, 1965. ISBN 14-927-65.

GRDIČOVÁ, Bosiljka. Praktikum z fyziologie rostlin. Praha: SPN, 1975. ISBN 14-613-76.

HOSLER Jay [online]. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <http://jayhosler.com/index.html>

KINCL, Miroslav. Letní praktikum fyziologie rostlin. Praha: SPN, 1955.

MOLISH, Hans a Richard BIEBL. Botanická pozorování a pokusy s rostlinami bez přístrojů. Praha: SPN, 1975. ISBN 14-320-75.

STŘIHAVKOVÁ, Hana. Praktikum z botaniky. Praha: SPN, 1978. ISBN 14-692-78.

#### **5. Molekulárně biologická laboratoř**

BOČAN, Václav. Biozvěst - Izolace DNA [online]. 2017 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik5/5-1.pdf>

DUFKOVÁ, Marie. Pokus: Jak získat DNA z čehokoliv živého? [online]. 2004 [cit. 2020-02-11]. Dostupné z: <https://www.3pol.cz/cz/rubriky/navody-na-pokusy/938-pokus-jak-ziskat-dna-z-cehokoliv-ziveho>

Genetický kód [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: [https://cz.clipartlogo.com/image/genetic-code-bw\\_236505.html](https://cz.clipartlogo.com/image/genetic-code-bw_236505.html)

How to extract DNA at home [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <https://learning-center.homesciencetools.com/article/how-to-extract-dna-at-home/>

HAVLÍK, Jan a Petr HOLZHAUSER. Jak si izolovat DNA doma v kuchyni. [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: [https://www.idnes.cz/technet/veda/jak-izolovat-dna-doma-ananas-jahody-koktejl.A160201\\_145450\\_veda\\_pka](https://www.idnes.cz/technet/veda/jak-izolovat-dna-doma-ananas-jahody-koktejl.A160201_145450_veda_pka)

Origami DNA [online]. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/activities/origami-dna>

#### **6. Bioinformační laboratoř**

GenBank [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Bioinformatické databáze [online]. [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: [https://loschmidt.chemi.muni.cz/bioinf/bioinf\\_01.htm](https://loschmidt.chemi.muni.cz/bioinf/bioinf_01.htm)

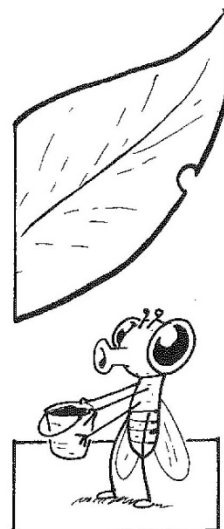
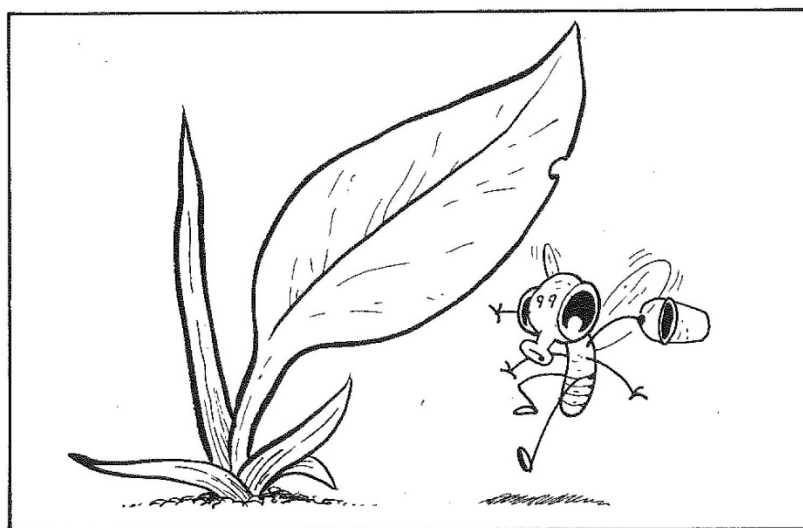
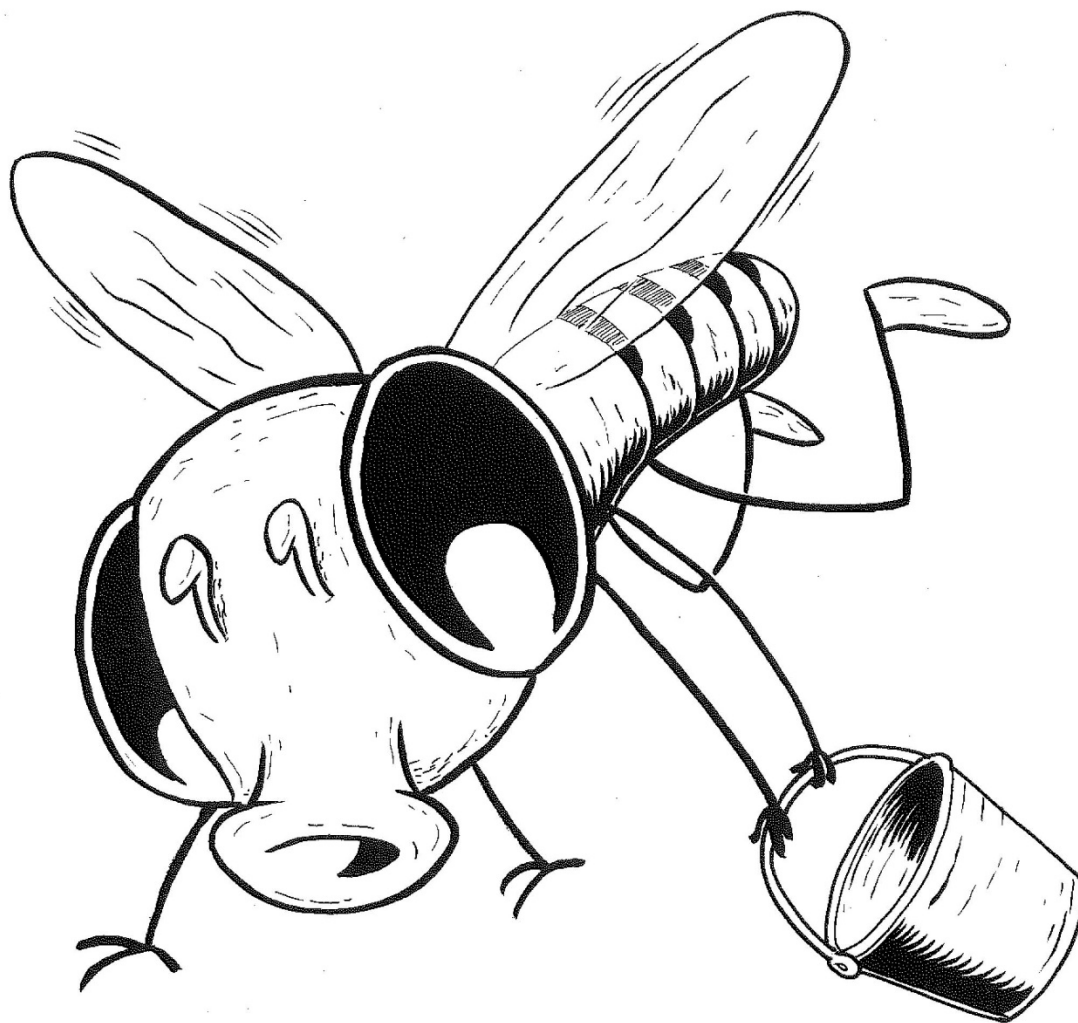
VOSOLSOBĚ, Stanislav. Biozvěst - Zmrzlinový pohár [online]. 2013 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik1/1-1.pdf>

GAJDOŠOVÁ, Magdalena. Biozvěst - Barcoding čárové kódy života [online]. 2017 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <http://biozvest.arach.cz/Rocnik4/4-3.pdf>

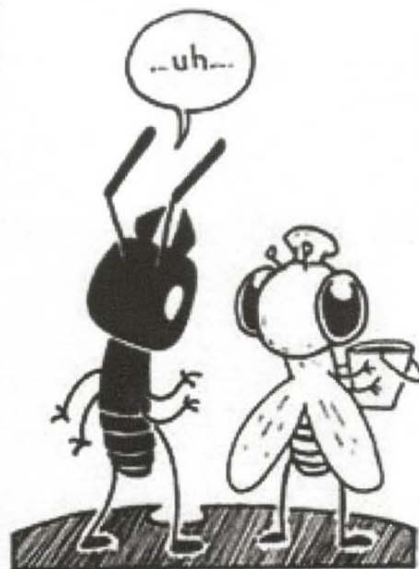
## Příloha I

### Jay Hosler Photosynthesis (or Gimme Some Sugar)

Přeložila Magdalena Ambrozková



# Photosynthesis OR "Gimme Some Sugar"





COO ??  
CO MYSLÍŠ TÍM  
NO POTĚŠ...?



TÍM MYSLÍM, ŽE MĚ  
FAKT NEZAJÍMÁ, JAK  
SE VYRÁBĚJÍ FOTKY !!

VŽDYT ANI  
NEMÁM  
FOTÁK !!!

JÁ JSEM NEMLUVIL O  
"SYNTEZE FOTEK",  
MLUVIL JSEM O PROCESU,  
KTERÝ ZACHYTÁVÁ  
ENERGII ZE SLUNCE A  
PŘEVADÍ JI DO MOLEKUL  
GLUKOZY, COŽ NAM  
VLÁSTNĚ UMOŽŇUJE  
**EXISTENCI**



JÁŮVAJS  
TAHAŠ MĚ ZA  
NOHU...

NE,  
MYSLÍM TO  
NAPROSTO  
VÁŽNĚ

aaa  
TAHAŠ MĚ  
ZA NOHU !!!

oh

sorry

PROŠTÍM,  
JEN TI TO  
VYSVĚTLÍM,  
JO ???

**PLEASE?**

MYSLÍM,  
ŽE NA TOHLE  
JSEM FAKT  
ODBOBNÍK.



fine

SKVĚLE !!  
ZAČNĚME S  
TAKOVÝM  
JEDNODUCHÝM  
SCHEMATEM

ČEMU  
ŘÍKÁŠ  
JEDNODUCHÉ  
SCHEMA?

POČKEJ,  
VYSVĚLÍM TI  
TO..



REACTANTS



**Photosynthesis!**



PRODUCTS

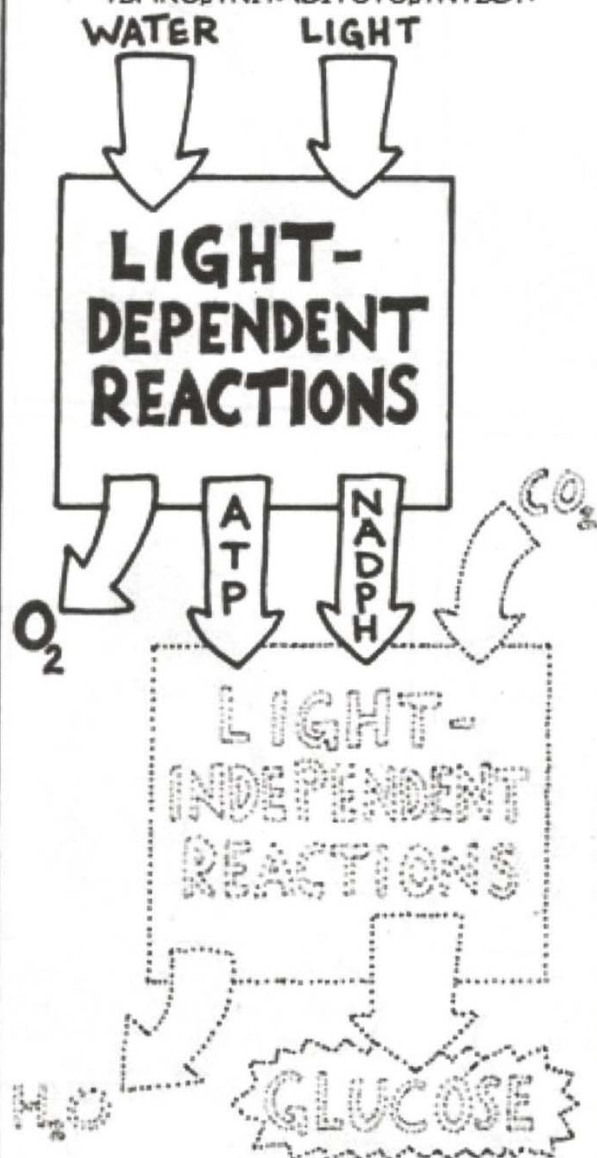
NO, A TADY VIDÍŠ, ŽE VODA, SVĚTLO A OXID UHLÍČITÝ  
VSTUPUJÍ DO FOTOSYNTETICKÝCH DĚJŮ A VÝSLEDKEM JE  
KYSLIK, VODA A GLUKOZA



FOTOSYNTÉZA SE SKLÁDÁ ZE DVOU ODDĚLENÝCH FÁZÍ:  
 1. SVĚTELNÁ FÁZE - CHEMICKÉ DĚJE ZÁVISLÉ NA SVĚTLE  
 2. TEMNOSTNÍ FÁZE - CHEMICKÉ DĚJE NEZÁVISLÉ NA SVĚTLE

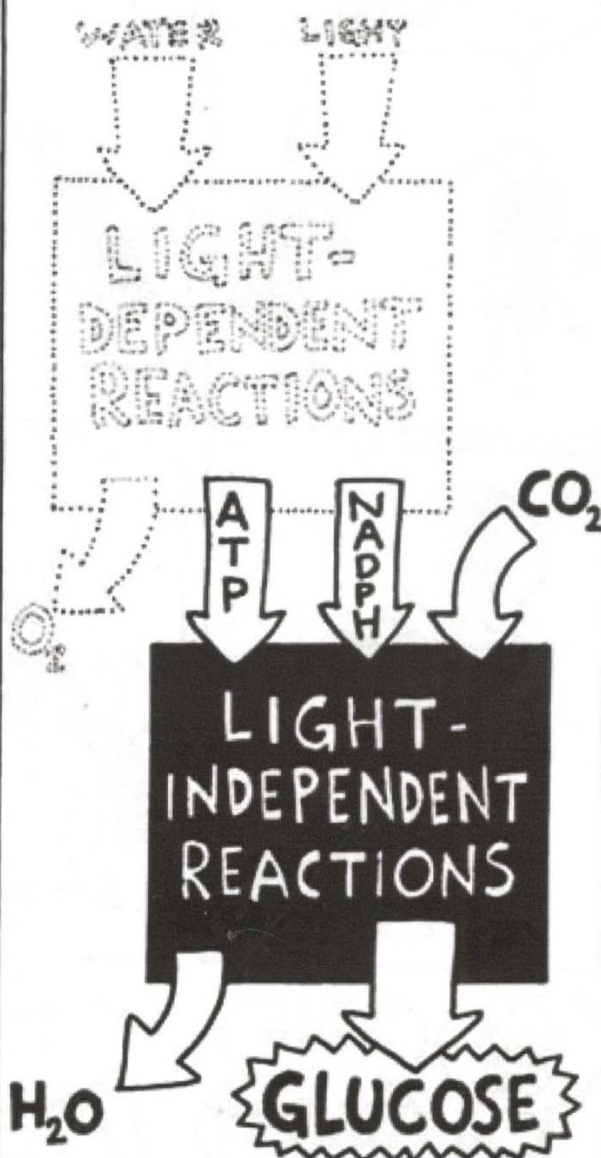
CHEMICKÉ REAKCE ZÁVISLÉ NA SVĚTLE VYUŽÍVAJÍ VODU A ENERGII Z FOTONU ZE SLUNEČNÍHO ZÁŘENÍ K TOMU, ABY BYLA VYROBENA MOLEKULA ATP A MOLEKULA NADPH.

KYSLÍK SE VOLNĚ JAKO ODPADNÍ PRODUKT. ATP A NADPH BUDOU POUŽITY JAKO "PALIVO" NEBOLI ZDROJ ENERGIE V TEMNOSTNÍ FÁZI FOTOSYNTÉZY.

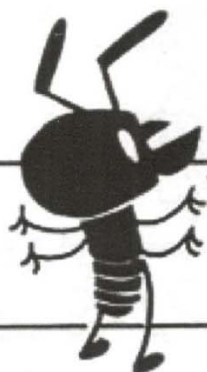


NA SVĚTLE NEZÁVISLÉ REAKCE NEPOTŘEBUJÍ SVĚTELNOU ENERGII. V TĚCHTO REAKCÍCH JE OXID UHLÍČITÝ VYCHYTÁVÁN ZE VZDUCHU A NAVAZÁN NA UŽ EXISTUJÍCÍ MOLEKULU RUBP.

PAK ZA SPOTŘEBY ATP A NADPH JSOU VYRÁBĚNY TŘÍUHLIKATE MOLEKULY, KTERÉ POSLOUŽÍ K SYNTÉZE GLUKOZY.



DOKONALĚ,  
COO??



Hmm...  
JSOU VŠICHNI  
MRAVENCI  
ODBOŘNICI NA  
FOTOSYNTÉZU!



NO, A JAK  
MOHOU ROSTLINY  
ZACHYTIT FOTON  
ZE SVĚTLA?



CHYTAJÍ HO DO  
KLECE NEBO  
VYKOPOU PAST A  
TU ZAKRYJÍ  
LISTEM ???

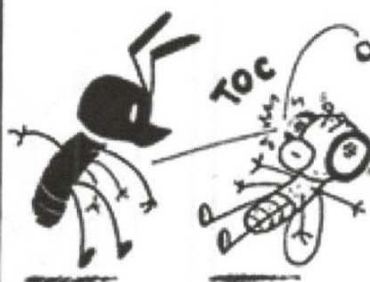
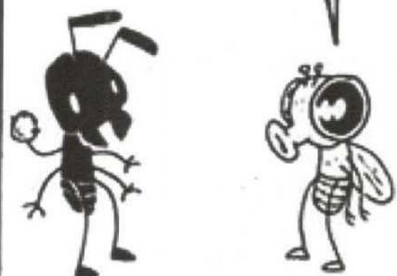
CHJO...  
ANI  
JEDNO ANI  
DRUHE



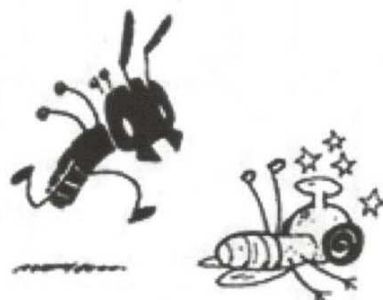
KOUKEJ,  
UKÁŽU TI  
JAK TO  
DĚLÁJÍ

PŘEDSTAV SI, ŽE  
TENTO KAMEN JE FOTON  
ZE SVĚTLA  
A TY BUDEŠ LIST

a.k.



Oh...  
DOUFAM,  
ŽE TO  
FUNGUJE...



RAZ,  
DVA,  
RAZ,  
DVA



JO!



NO,  
A KDE  
JSME  
NYNÍ?

CO TY TADY  
DĚLÁŠ ???

TO SE MI SNAD  
JENOM ZDÁ !!!



POČKEEEJ,  
A CO JA ???

Grrr...

whoop!

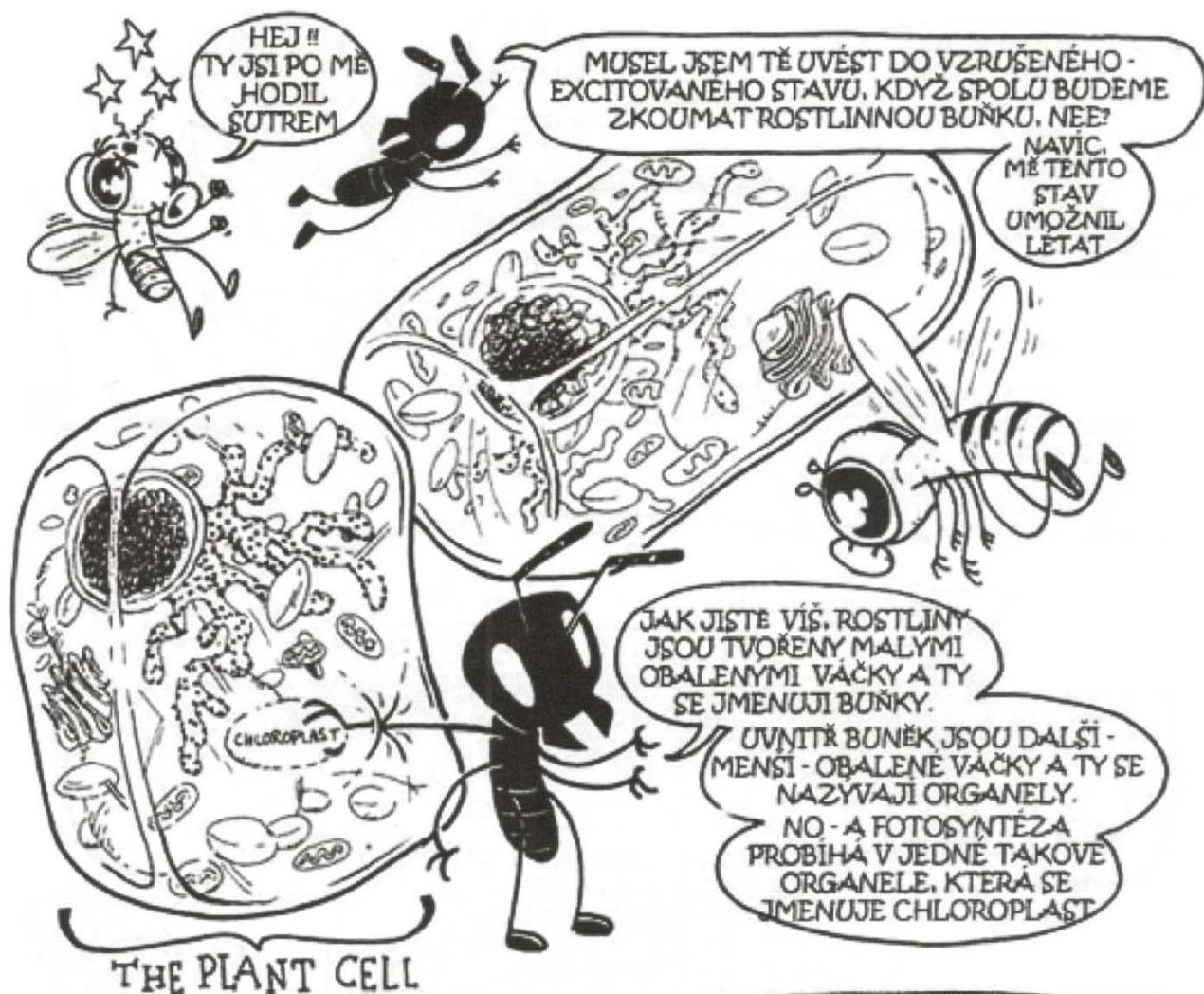


-sigh-

NECH JI, BUDE TO  
TAK LEPŠÍ... ASPŇ SE  
MŮŽEME PORÁDNĚ  
ZAMĚRIT NA  
FOTOSYNTÉZU











TYLAKOIDNÍ MEMBRÁNA  
ODDĚLUJE VNITŘNÍ PROSTOR  
- tzv. LUMEN, OD STROMATU,  
COŽ JE PROSTOR NAPLNĚNÝ  
TEKUTINOU, KTERA  
OBKLOPUJE TYLAKOID.



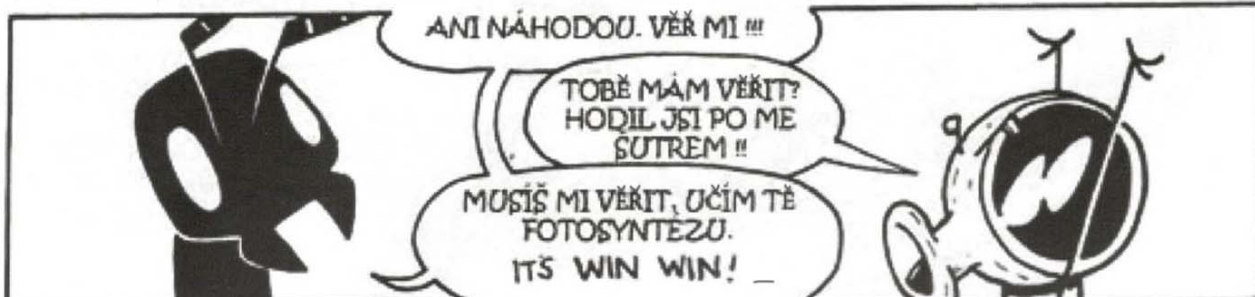
NĚKOLIK PROTEINŮ A DALŠÍ  
MOLEKULY JSOU PŘICHYCENY K  
TYLAKOIDNÍ MEMBRÁNE.  
SVĚTLO SE ZACHYČUJE DO MOLEKUL  
CHLOROFYLU V MEMBRÁNE A TATO  
MÍSTA SE OZNAČUJÍ JAKO FOTOSYTEMY.



U ROSTLIN ROZLIŠUJEME DVA  
FOTOSYTEMY:  
FOTOSYTEM I - PS I A  
FOTOSYTEM II - PS II.

PRO VYSVĚTLENÍ ZAČNEME  
S FOTOSYTEMEM II

PROČ NEZAČNEME  
PO PORÁDKŮ - OD  
FOTOSYTEMU I.  
KDYŽ MÁ  
PORADOVÉ ČÍSLO 1?



ANI NÁHODOU. VĚŘ MI !!!

TOBĚ MÁM VĚŘIT?  
HODIL JSI PO ME  
ŠUTREM !!

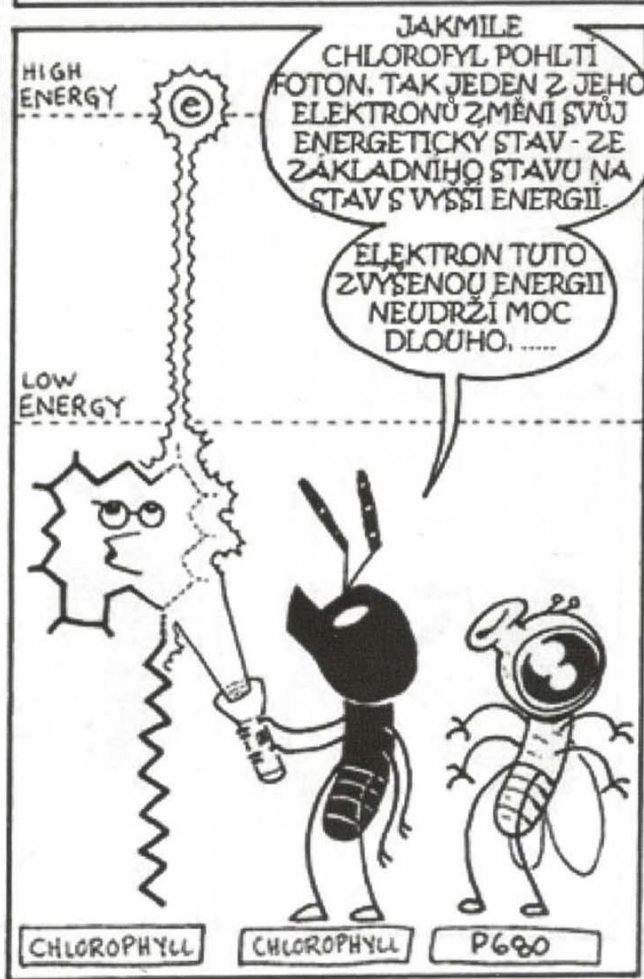
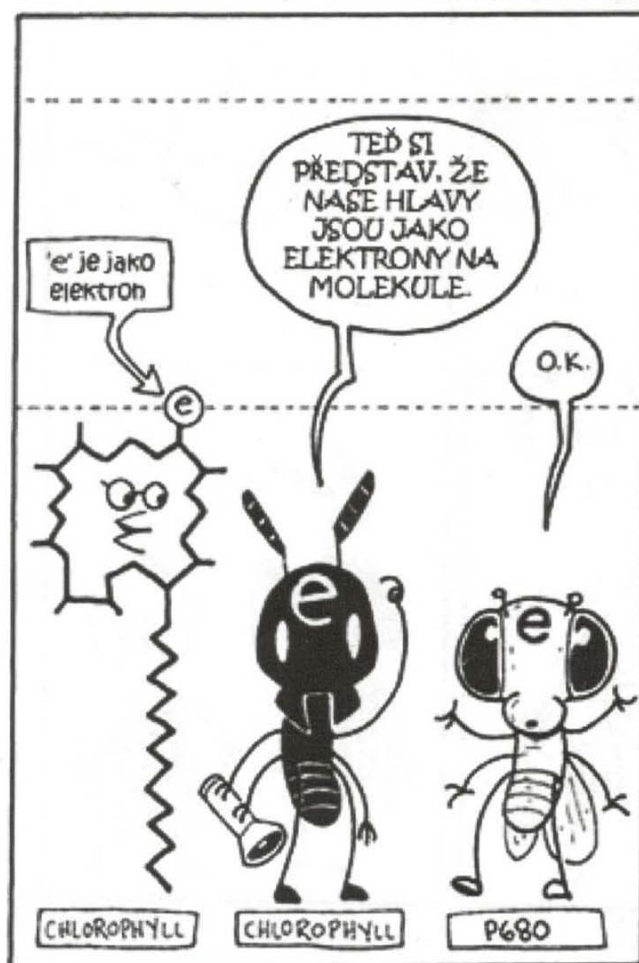
MUSÍŠ MI VĚŘIT, UČÍM TĚ  
FOTOSYNTÉZU.  
IT'S WIN WIN! -



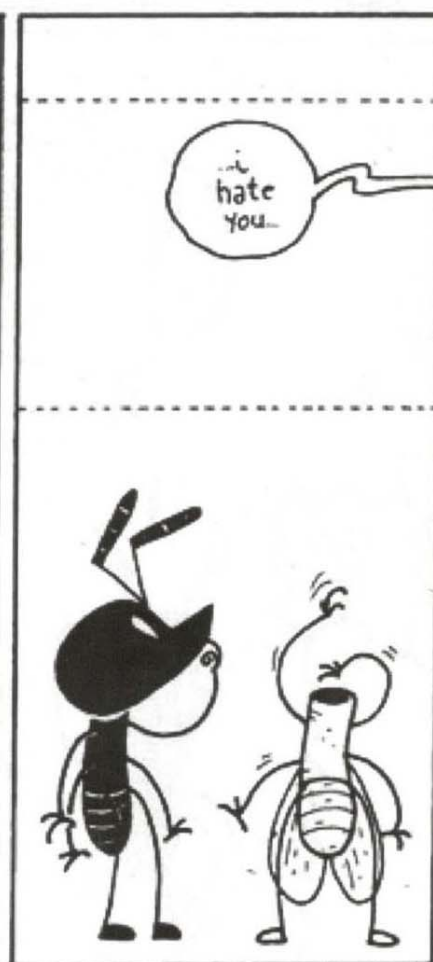
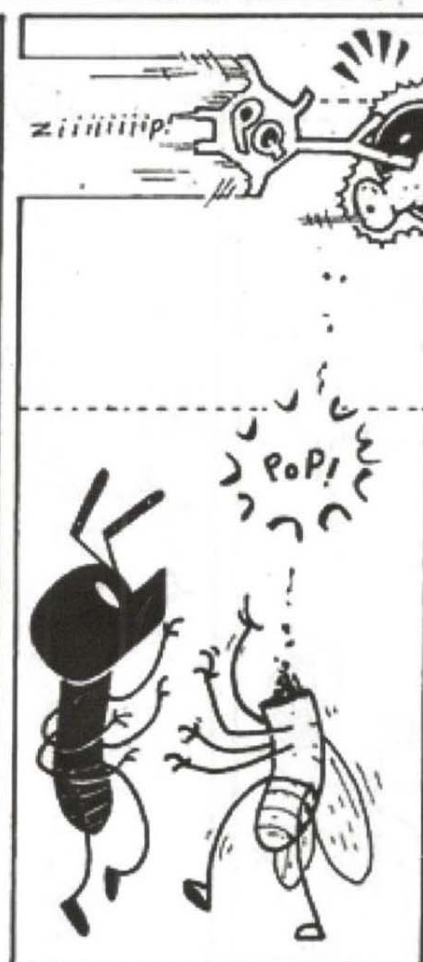
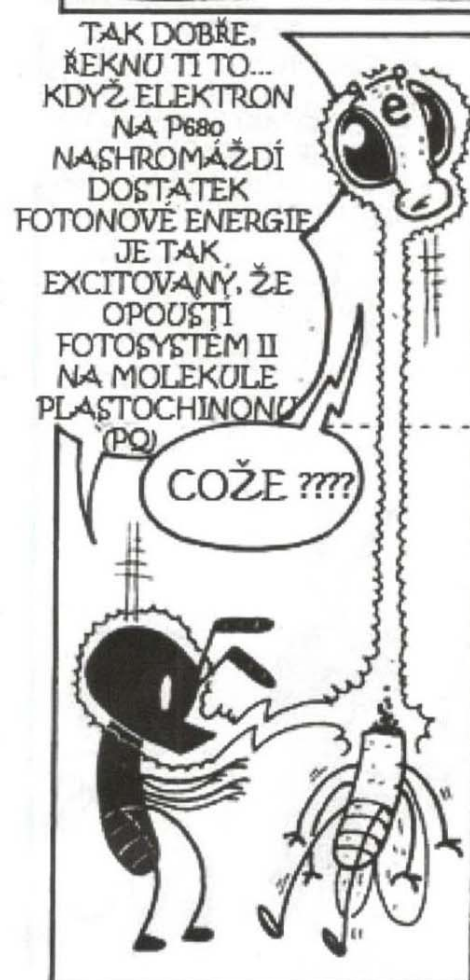
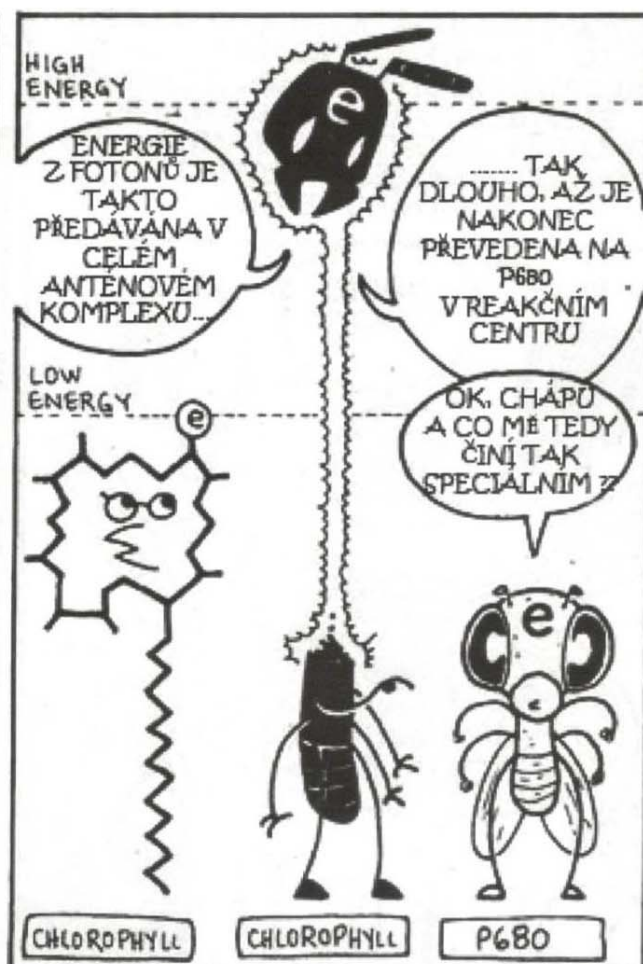
FOTOSYSTÉM II MÁ DVĚ HLAVNÍ OBLASTI:  
VĚTŠÍ - Tzv. ANTĚNOVÝ KOMPLEX, KTERÝ  
OBKLOPUJE MENŠÍ - Tzv. REAKČNÍ CENTRUM.  
ENERGIE Z FOTONU (ZE SVĚTLA) JE  
POHLČENA CHLOROFYLEM V ANTĚNOVÉM  
KOMPLEXU A NÁSLEDNĚ PROPUSTĚNA DO  
REAKČNÍHO CENTRA.



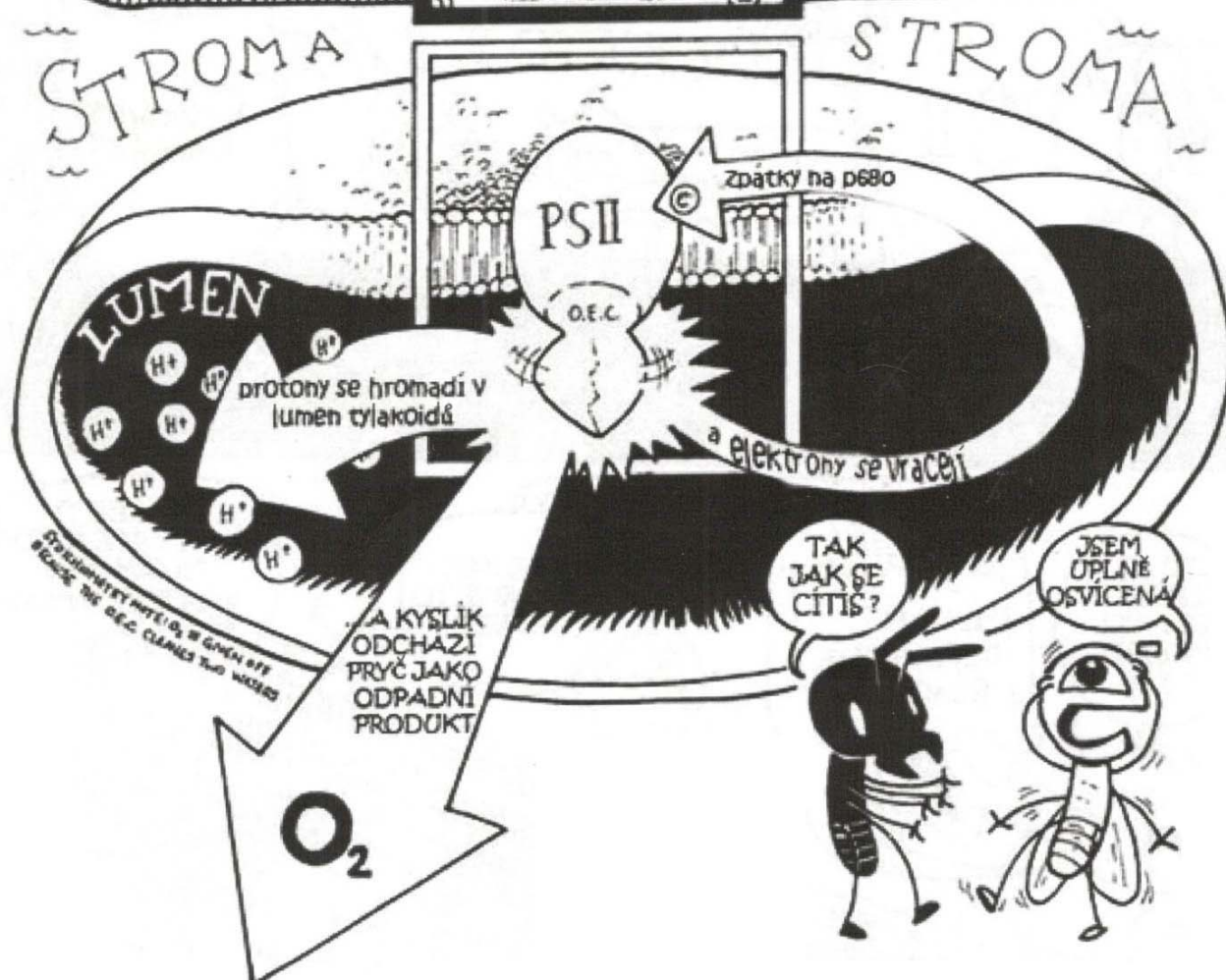
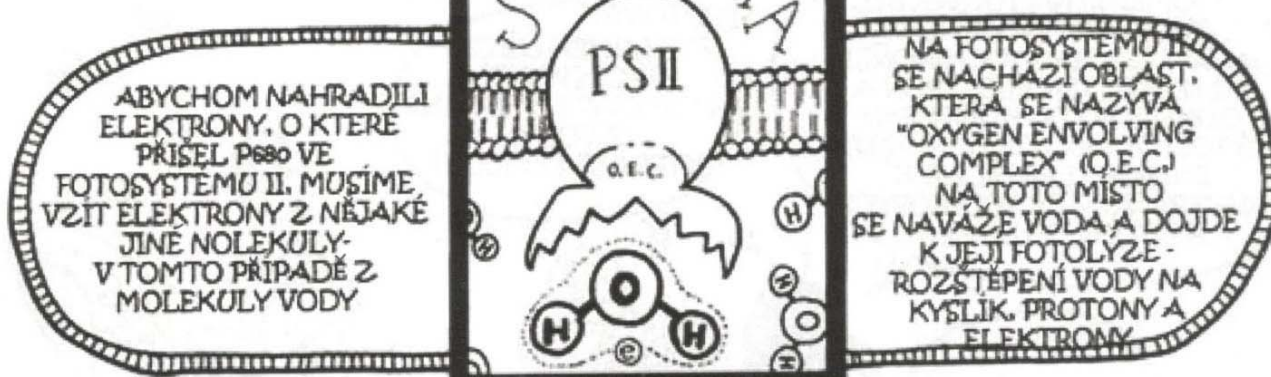
PŘEDSTAV SI, ŽE JÁ JSEM CHLOROFYL,  
A TY BŮDEŠ SPECIÁLNÍ PÁR MOLEKUL  
V REAKČNÍM CENTRU,  
KTERÝ SE NAZYVÁ P680.









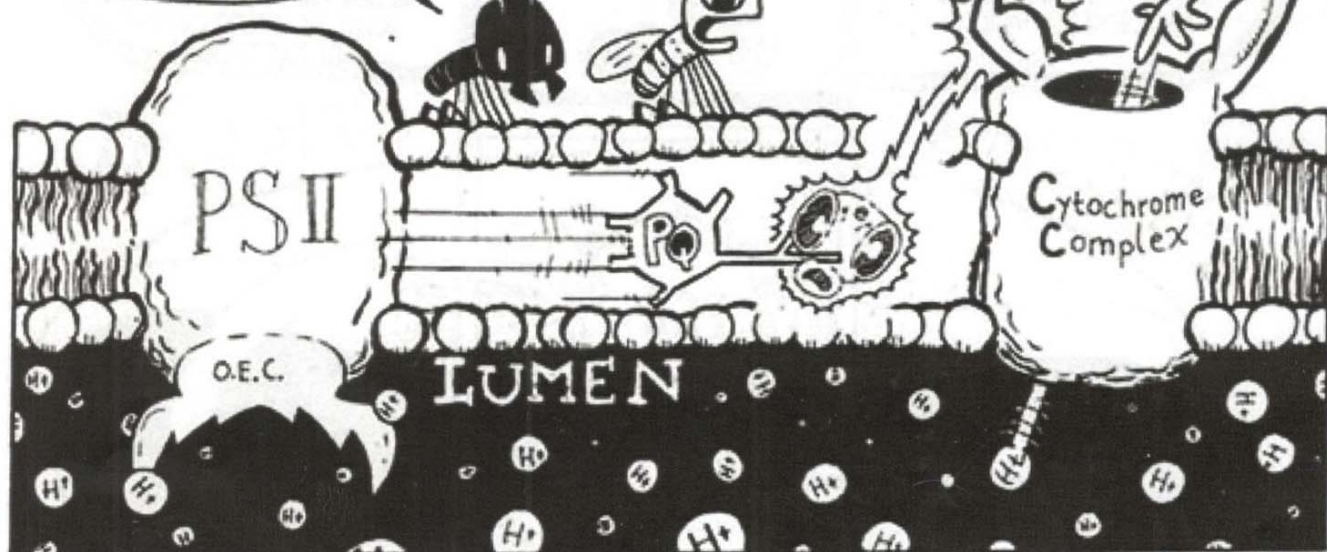






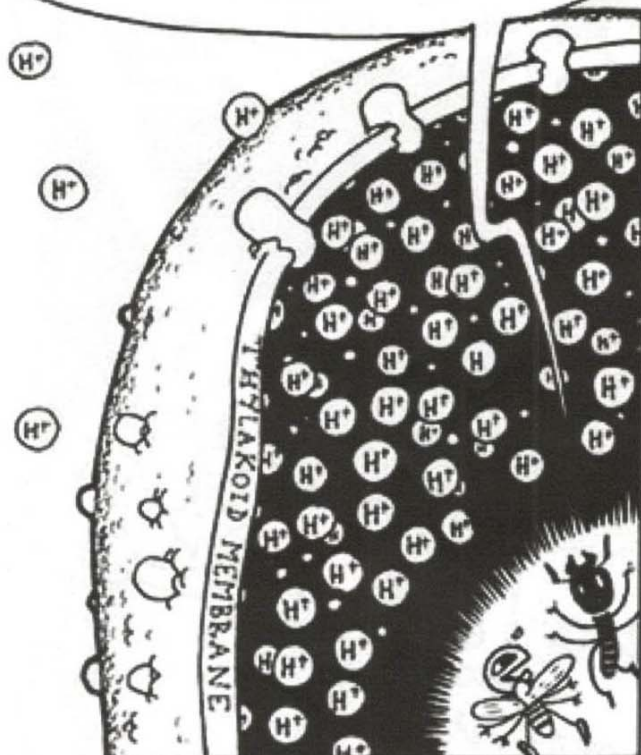
VZPOMEN SI NA TO, JAK BYL  
ELEKTRON, resp. TVOJE HLAVA, Z  
P680 UNÁSEN PLASTOCHINONEM.  
PQ SEBERE TEN ELEKTRON A  
ODNESE HO DO KOMPLEXU  
CYTOCHROMU, KTERÝ VYUŽÍJE  
ENERGII ELEKTRONŮ K  
PŘECERPÁNÍ VÍCE VODÍKOVÝCH  
PROTONŮ DO LUMEN...

VÍCE  
PROTONŮ?  
V LUMEN UŽ JE  
PŘECE SPOUSTA  
VODÍKOVÝCH PROTONŮ  
Z VODY,  
KTERÁ SE ROZLOŽÍ





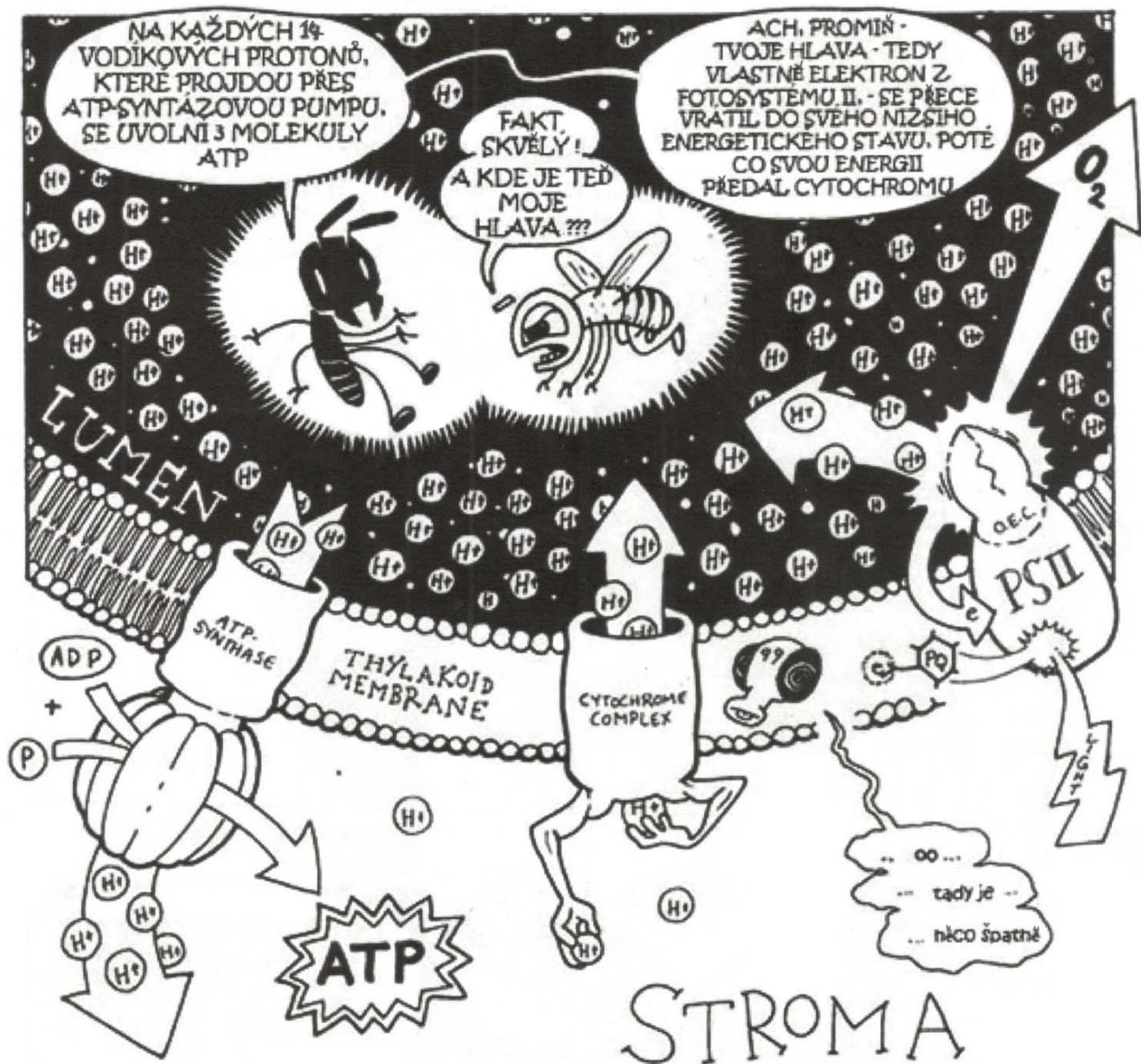
UVNITŘ LUMEN JE SPOUSTA VODÍKOVÝCH PROTONŮ, ALE V OKOLNÍM STROMATU UŽ JICH TOLIK NENÍ. ROZDÍL V KONCENTRACI PROTONŮ MEZI LUMEN A STROMATEM SE NAZYVÁ KONCENTRAČNÍ GRADIENT.



CYTOCHROM MÁ TĚŽKOU PRÁCI. MUSÍ UDRŽET KONCENTRAČNÍ GRADIENT PROTONŮ NA OBOU STRANÁCH MEMBRÁNY. V PŘÍRODĚ MÁ KAŽDÝ TENDENCI NĚKAM EXPANDOVAT A CÍLEM VODÍKOVÝCH PROTONŮ JE DOSTAT SE Z LUMEN DO STROMATU PO KONCENTRAČNÍM SPADU.







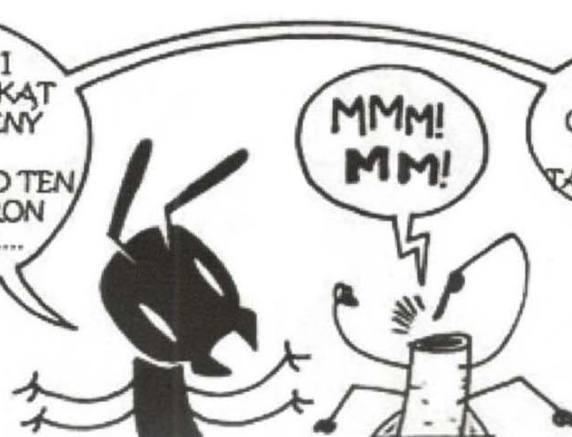




FEREDOXIN PŘEBÍRÁ ELEKTRON Z P700 A PŘENÁŠÍ HO NA ENZYM, KTERÝ SE JMENUJE NADP+ REDUKTÁZA. TENTO ENZYM VYUŽÍVÁ ENERGII Z ELEKTRONU K VYTVOŘENÍ MOLEKULY NADPH Z MOLEKULY NADP+



SAMOZŘEJMĚ, ŽE FOTOSYTEM I TEĎ POTŘEBUJE ZÍSKAT ZPĚT SVŮJ ZTRACENÝ ELEKTRON. ZKUŠ HADAT, ODKUD TEN NAHRADNÍ ELEKTRON BUDE POCHÁZET....



PROŠIM?? MOC TI NEROZUMÍM, CO ŘÍKÁŠ. ŘÍKALAS, ŽE Z FOTOLYZY VODY ??? TAK TO TĚ MŮŽU UJISTIT ŽE TOHLE NENÍ SPRÁVNÁ ODPOVĚD!







CO  
TEB??

NYNÍ SE ATP A NADPH  
POUŽIJÍ V TEMNOSTNÍ  
FÁZI FOTOSYNTÉZY K  
VYROBĚ GLUKOZY

TAKŽEEE,  
ODKUD  
ZAČNEME??

TÁMHLE !!!  
VŠECHNO  
ZAČINA  
TAM, KDE  
JE...

JEHO  
VÝSOŠT

**RUBISCO!**

whoa

CO JE  
ZASE  
TOHLE ???

TO BUDE  
PRAV-  
DĚPODOBNĚ  
NEJHOJNĚJŠÍ  
ENZYM NA  
ZEMĚKOULI

A CO  
TO  
DĚLÁ?

RUBISCO KOMBINUJE  
CO<sub>2</sub> S PĚTIUHLIKATOU  
SLOUČENINOU, KTERÁ  
SE OZNAČUJE JAKO  
RuBP. TENTO DĚJ JE  
ZNÁMÝ POD NÁZVEM  
FIXACE CO<sub>2</sub>.

PROČ



PROTOŽE  
ČUKR JE VLASTNĚ  
SESTIUHLIKATÝ KRUH.  
TAKŽE ABY V TEMNOSTNÍ  
FÁZI ČUKR MOHL VZNIKAT,  
MŮSTI BYT K DISPOZICI  
ZÁKLADNÍ STAVEBNÍ  
UHLIKATE KAMENY.

AHA, TAKŽE,  
ROSTLINY SI VŠE  
POTŘEBNÉ K TVORBĚ  
ČUKRU VYTAHNOU  
ZE VZDUCHU

A.K.  
THAT'S  
COOL.



RUBISCO

CO<sub>2</sub>

MEH.

TAK POČKEJ, KDYŽ RUBISCO VYTAHNE CO<sub>2</sub> ZE VZDUCHU, CO S NÍM PAK PROVEDE RUBP?

DOBRA OTÁZKA! ODPOVĚĎ NAJDEŠ V GENIÁLNÍM CALVIN CYCLE!

RIBULOZO BIS FOSFÁT  
RuBP

pomooooo  
WE'RE BREAKING UP!

SNAP!

JAKMILE RUBISCO ZKOMBINUJE CO<sub>2</sub> S RUBP, VZNIKNE NESTABILNÍ 6-C MOLEKULA, KTERÁ SE ROZPADNE NA 2 MOLEKULY 3-FOSFOGLYKERATU

the Calvin Cycle

RuBP  
MOLEKUL G-3-P, KTERÉ MOHOU VYKONAT CALVINOVÝ CYKLUS, SE JICHA REGENERACI

ZAP!

BZZT!

ATP

ADP P

NADPH

NADP<sup>+</sup>

GLYCER ALDEHYD 3 FOSFÁT

SWEET!

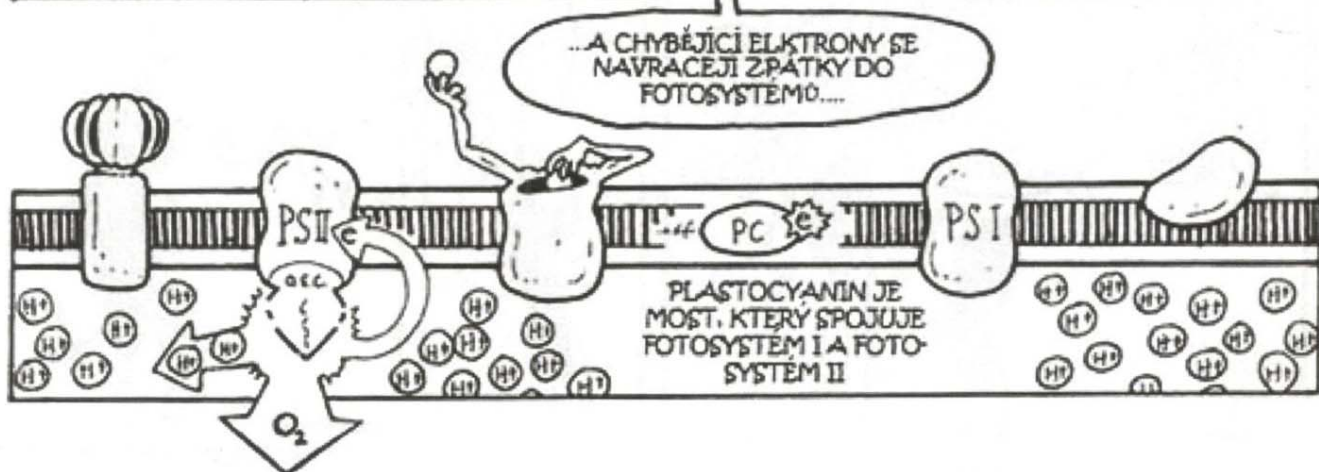
G3P

Z KAŽDÉ ŠESTICE VZNIKLYCH G3P VŽDY JEDNA MOLEKULA G3P OPOUŠTÍ CALVINOV CYKLUS, ABY SE STALA V BUDOUCNÍ CUKREM

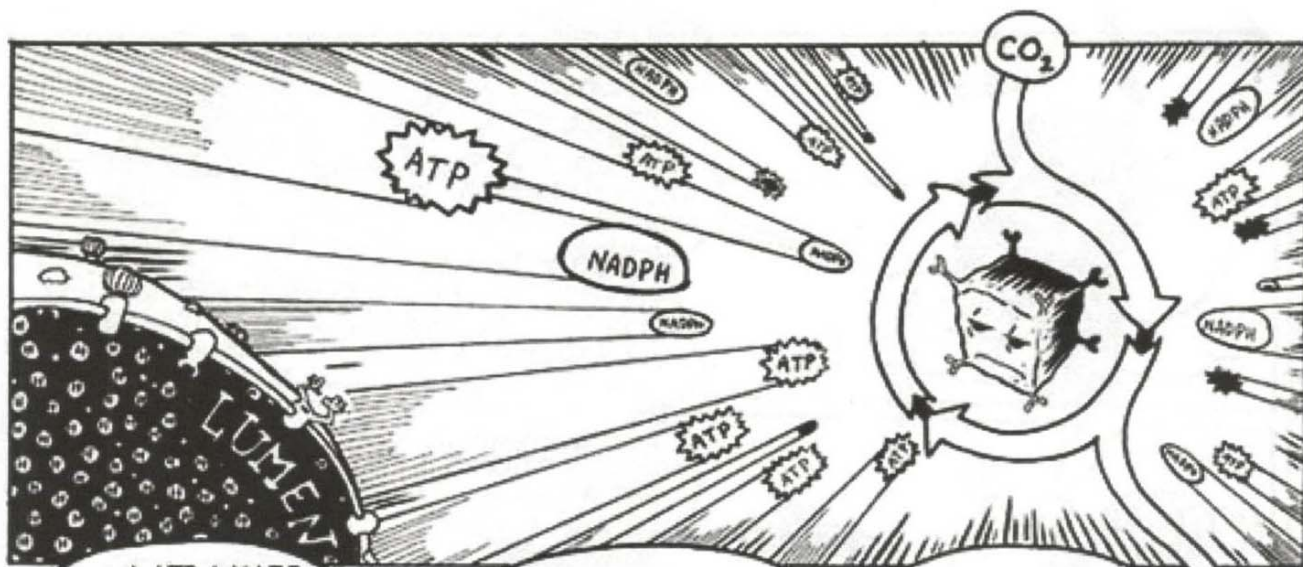
JEN OCHTŮNEJ !!!







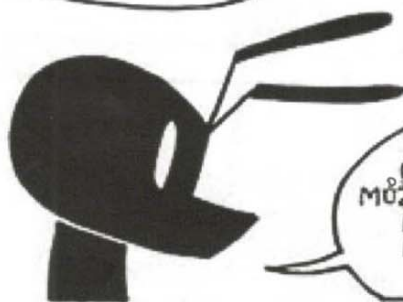




... A ATP A NADP  
SE VE STROMATU  
PŘESOUVAJÍ DO  
CALVINOVA CYKLU...

...KDE RUBISCO CHYTÁ  
ZE VZDUCHU  $\text{CO}_2$  A  
PŘÍPEVŇUJE JEJ NA RUBP A  
NAKONEC Z NEJ UDĚLÁ  
G-3-P...

... A TY MI PO TOM  
VSEM ŘEKNEŠ, ŽE  
STALE JEŠTĚ NEMÁME  
ŽADNOU GLUKÓZU...?



OPRAVA

PO OPUŠTĚNÍ  
CALVINOVA CYKLU  
MŮŽE BYT G-3-P PŘEMĚNĚN  
NA ŘADU DALŠÍCH  
MOLEKUL, VČETNĚ  
GLUKÓZY



SUPER,  
TAKŽE  
MŮŽEME  
POKRAČO-  
VAT...

NOO,  
JÁ NEVIM...

Z  
TECHNICKÉHO  
HLEDISKA JE G-3-P  
PROSTĚ KONEČNÝM  
RODUKTEM  
FOTOSYNTÉZY...

NAVÍC SI  
SKROMNĚ  
MYSLÍM, ŽE  
NEJSEM TAK  
DOBRY BIOCHE-  
MIK, ABYCH TI  
DOKAZAL  
VYSVĚTLIT, JAK  
SE KONVERTUJE  
G-3-P NA  
GLUKÓZU



ALE JÁ  
JSEM CHTĚLA  
NĚCO  
SLADKÉHO !!

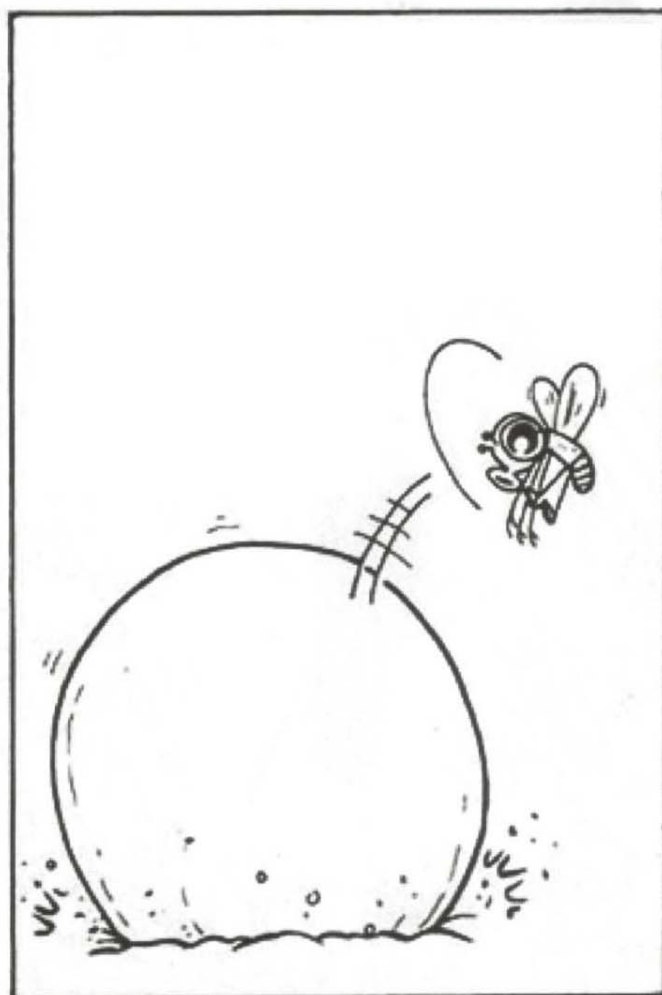
VŽDYT  
JSI TO  
DOSTALA

TA SLADKÁ,  
SLADKÁ CHŮT  
NOVĚ NABÝTÝCH  
ZNALOSTÍ  
:-)









... I  
WOULDN'T  
DREAM OF  
IT.

