

že dostupná data zdaleka neobsahují všechny existující druhy, a lze proto předpokládat, že počet druhů (v současnosti mluvíme o desítkách tisíc) ještě poroste.

To však není jediný problém. Další se týká množení celých genomů jednotlivých buněk diplomem metodou SCS. Přes všechnu snahu kalifornské expedice neproběhl tento krok ideálně. Studentům z Vancouveru a jejich kolegům z amerických, britské a také české laboratoře se podařilo získat pouze nenavazující úseky jaderných genomů. Navíc se většinu genomů nepovedlo téměř vůbec zmnožit (počet sekvenovaných bází kolísá mezi 16 a 303 miliony,

což představuje jen část genomů; Gawryluk a kol. 2016). I přesto mezinárodní tým dokázal analyzovat více než 4 000 genů, které poskytují první vhled do metabolizmu a životních strategií diplomem.

Závěrem lze konstatovat, že se nám sice podařilo objevit pravděpodobně poslední velkou a téměř neznámou skupinu organismů na této planetě, na druhou stranu jsme nuceni si přiznat, že o této zřejmě druhově nejbohatší skupině mořských organismů stále nevíme skoro nic. Získané výsledky ale naznačují cesty, jak přijít na kloub ekologické funkci diplomem a jak studovat jejich molekulární zvláštnosti.

Jak už to v současném světě bývá, nárůst významu těchto dosud přehlížených prvků snad pomůže přilákat více finančních zdrojů a více vědců se nadchne pro studium záhad pozoruhodných, převážně hlubokomořských bičíkovců patřících do skupiny diplomem.

Tento výzkum je financován z projektu ERC CZ (LL1601), nadací Gordona a Betty Mooreových a Kanadským ústavem pro pokročilý výzkum (CIFAR).

Seznam citované literatury najdete na webové stránce Živy.

Martin Kolísko

K výuce

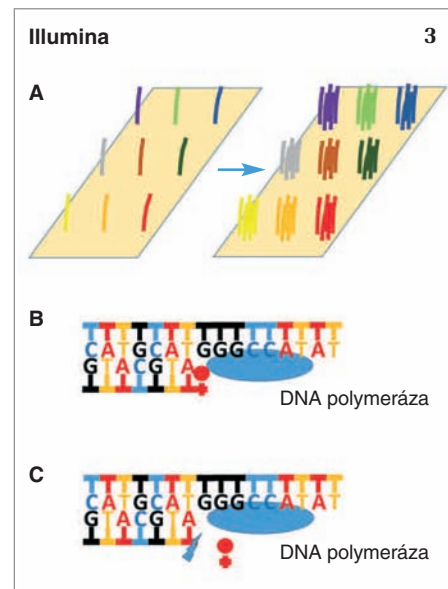
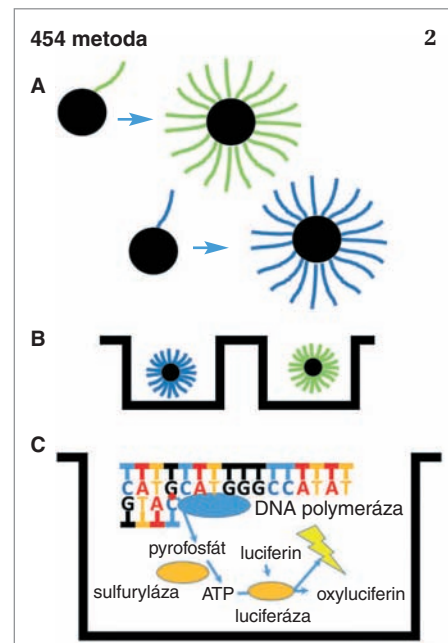
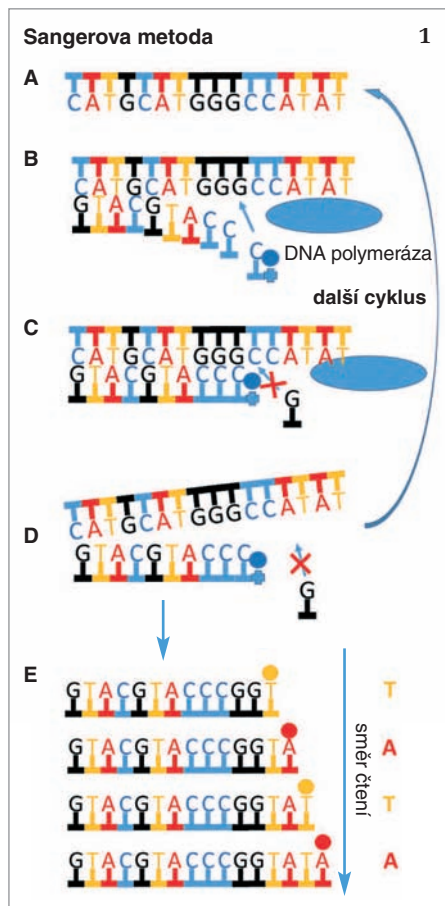
Principy sekvenování DNA vybranými moderními metodami

Sekvenování, které určuje pořadí nukleotidů („písmen“ – A, C, T, G) v molekule DNA, se stalo nedílnou součástí moderní biologie. Jeho metodika i využití jsou popsány v článku na str. LXXIII kuléru této Živy. Následující schémata ukazují základní principy, na nichž stojí jak tradiční Sangerova metoda, při které sekvenujeme jedinou molekulu DNA, tak i dvě vybrané metody tzv. druhé generace – 454 a Illumina sekvenování, kdy dochází ke čtení milionů molekul DNA najednou.

1 Sangerova metoda. Templátová DNA (A); DNA polymeráza přidává nukleotidy k rostoucímu řetězci DNA podle předlohy – templátu (B). Přidáním dideoxynukleotidu, který je označen fluorescenční značkou, dojde k zastavení syntézy nového řetězce DNA (C). Zahřátím se dva řetězce DNA oddělí (D) a proces syntézy nového řetězce polymerázou se může opakovat. Výsledné molekuly se seřadí podle velikosti a podle fluorescenčního značení se odvodí výsledná sekvence (E).

2 Mezi metody druhé generace patří 454 sekvenování. DNA se naváže na mikrokuličku, na níž je posléze enzymatickou reakcí namnožena (A). Mikrokuličky se vloží do komůrek na sekvenační destičce (B). Vždy jeden typ nukleotidu je přidán do reakční směsi. Jestliže DNA polymeráza zařadí daný nukleotid do nového řetězce, dojde k uvolnění pyrofosfátu (PPI), který je převeden sulfurylázou na adenosintrifosfát (ATP). Luciferáza pak za použití ATP převede luciferin na oxyluciferin, přičemž dojde k vyzáření světla, které zachytíme kamerou (C).

3 Další pokročilá metoda – Illumina. DNA je navázána na destičku a lokálně namnožena (A). Tím se vytvoří skupiny identických molekul, které jsou poté sekvenovány. DNA polymeráza přidá do rostoucího řetězce jeden modifikovaný



nukleotid značený fluorescenčním barvivem, jenž zároveň reverzibilně blokuje navázání dalšího nukleotidu (B). Kamera pak zachytí fluorescenční signál pro každou skupinu DNA molekul na destičce. Fluorescenční označení a blokáce jsou odbourány a může dojít k připojení dalšího nukleotidu (C).
Všechny orig. M. Kolísko, některé části obrázků upraveny podle: J. M. Heather a B. Chain (2016)