

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA FILOZOFICKÁ

ZÁVĚREČNÁ PRÁCE

2019

Mgr. Gabriela KOBLÁSOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta filozofická

**Návrh učebního textu z Biologie pro studenty středních zdravotnických
škol**

Mgr. Gabriela Koblášová

Závěrečná práce

2019

Univerzita Pardubice

Fakulta filozofická

ZADÁNÍ

tématu závěrečné písemné práce doplňujícího pedagogického studia

Jméno a příjmení studenta: Gabriela Koblásová

titul: Mgr.

název absolvované VŠ: UPCE FChT

rok ukončení VŠ: 2015

rok zahájení DPS: 2017

Práce je svým obsahem zaměřena převážně do oblasti: **psychologie, pedagogika, obecná didaktika, oborová didaktika, metodologie, sociologie.** (podtrhni)

Téma práce: Návrh učebního textu z Biologie pro studenty středních zdravotnických škol

Obsah práce:

Cílem této práce je vytvoření návrhu učebního textu do předmětu Biologie pro studenty studijního oboru Zdravotní laborant na VOŠZ A SZŠ Hradec Králové. Navrhovaný učební text je zaměřen na Metody molekulární biologie. Účelem je studentům poskytnout základní přehled těchto metod a jejich principů, protože se v současné době tyto metody rychle rozšiřují v nových technologiích. Studenti tím získají snazší přehled pro své budoucí povolání. Závěrečná práce bude rozdělena do tří oddílů. V první části se budu zabývat charakteristikou uvedeného předmětu. Následně se budu snažit vymezit funkce, strukturu, základní rysy při tvorbě učebních textů apod. Ve druhé části se zaměřím na samostatný učební text Metody molekulární biologie a ve třetí části bude proveden didaktický rozbor učebního textu.

Základní literatura dle ISO 690:

- 1) JANÍK, Tomáš. Didaktické znalosti obsahu a jejich význam pro oborové didaktiky, tvorbu kurikula a učitelské vzdělávání. Brno: Paido, 2009. Pedagogický výzkum v teorii a praxi. ISBN 978-80-7315-186-7.
- 2) PRŮCHA, Jan. Moderní pedagogika. Šesté, aktualizované a doplněné vydání. Praha: Portál, 2017. ISBN 978-80-262-1228-7.
- 3) SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika: vyučovací proces, učivo a jeho výběr, metody, organizační formy vyučování. Praha: Grada, 2007. Pedagogika (Grada). ISBN 978-80-247-1821-7.

Termín odevzdání práce: do 15. dubna 2019

Vedoucí práce PhDr. Mgr. Ilona Ďatko, PhD. Podpis vedoucího.....

Prohlašuji, že jsem se seznámil(a) se zásadami pro vypracování závěrečné písemné práce v rámci DPS.

v Pardubicích dne:..... **Podpis studující(ho):**

Prohlášení

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 5. 4. 2019

Gabriela Koblášová

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat vedoucí mé závěrečné práce, PhDr. Mgr. Iloně Ďatko, PhD. za ochotu, vstřícnost a trpělivost při konzultacích, cenné rady a podporu

Anotace

Závěrečná práce je zaměřena na návrh učebního textu do předmětu Biologie pro studenty studijního oboru Zdravotní laborant na VOŠZ A SZŠ v Hradci Králové. Navrhovaný učební text se specializuje na Metody molekulární biologie. Účelem je studentům poskytnout základní přehled těchto metod a jejich principů, protože se v současné době tyto metody rychle rozšiřují v nových technologiích. Studenti tím získají snazší přehled pro své budoucí povolání.

Klíčová slova

Metody molekulární biologie, didaktika, učební text, DNA, střední odborná zdravotnická škola

Annotation

The theme of this final thesis is suggestion of new learning text. It focuses on students of biology, laboratory technicians of Secondary medical school in Hradec Králové. This new learning text is specialized in methods of molecular biology. Since there is a lot of new technologies, the main aim of this thesis is to provide a basic summary of these methods and principles. It provides students a better overview for their future job.

Keywords

Methods of molecular biology, didactics, learning text, DNA, Secondary medical school

Obsah

ÚVOD.....	1
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1.1 Stav problematiky metod ve speciálních předmětových metodikách.....	2
1.2 Edukace zprostředkovaná mediem.....	3
1.3 Vyučovací metody.....	3
1.4 Struktura a funkce učebnic.....	6
1.5 Základní funkce a komponenty učebnice.....	6
1.6 Učebnice v multimediálním systému didaktických prostředků.....	9
1.7 Učení z textu.....	10
1.8 Didaktické zásady ve výuce biologie.....	11
2 Téma: Základní metody v molekulární biologii.....	14
2.1 Tematický celek - Izolace nukleových kyselin.....	14
2.2 Tematický celek - Centrifugační metody.....	18
2.3 Tematický celek - Elektroforéza NK.....	20
2.4 Tematický celek - Hybridizace.....	26
2.5 Tematický celek - Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
3 DIDAKTICKÝ ROZBOR.....	36
3.1 Informace o škole.....	38
3.2 Komentář vlastního učebního textu.....	40
4 ZÁVĚR.....	41
5 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ.....	42

SEZNAM ILUSTRACÍ A PŘÍLOH

Obrázek č. 1	Vzájemné vztahy prvků ve vyučovacím procesu	4
Obrázek č. 2:	Rozdělení vodné a organické fáze po centrifugaci vzorku s fenolem.....	15
Obrázek č. 3:	Centrifugační zkumavky – eppendorfky.....	18
Obrázek č. 4:	Schéma průběhu	19
Obrázek č. 5:	Elektroforetická technika	20
Obrázek č. 6:	Princip elektroforézy s velikostním standardem	21
Obrázek č. 7:	Výsledek elfo při odečítání - elektroforeogram	22
Obrázek č. 8:	Princip hybridizace.....	27
Obrázek č. 9:	Princip PCR - denaturace a připojení primerů	31
Obrázek č. 10:	Princip PCR - Elongace.....	31
Příloha č. 1	Laboratorní cvičení	44
Příloha č. 2	HYBRIDIZACE	47
Příloha č. 3	Schéma průběhu diferenciální centrifugace.....	49
Příloha č. 4	Princip PCR – denaturace, připojení primerů a elongace.....	50
Příloha č. 5	Správné odpovědi	51

SEZNAM ZKRATEK

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELFO – elektroforéza

EtBr – ethidiumbromid

GC – guanin (pyrimidinová) /cytosin (purinová) báze

HS – hmotnostní standard

IgG – imunoglobulín G

kb – 1000 pb (velikost genu)

Mr – relativní molekulová hmotnost

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

pb – jednotka páru báze

PCR – polymerázová řetězová reakce

rDNA – rekombinantní deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecylsulfát sodný

SDS – PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Taq polymeráza – termostabilní enzym pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*

UV záření – ultrafialové záření

ÚVOD

Molekulární biologie je rozvíjející se vědní obor, kdy se s jejími metodami setkáváme i v každodenním životě.¹ Netýká se to jen např. geneticky modifikovaných organismů, jako jsou kukuřice, sója, rajčata, tabák, řepka, bavlna atd., ale také geneticky upravených léků např. vakcína proti hepatitidě B, léky na hemofilii atd. Je tedy důležité, aby se studenti s touto vědní disciplínou seznámili už ve výuce Biologie na středních odborných zdravotnických školách.

Závěrečná práce je rozdělena do třech oddílů, kde se v první části zaměřuji na charakteristiku učebnic a na didaktické zásady. Druhý oddíl zahrnuje vlastní učební text, který je určen všem studentům Biologie, jež chtějí získat základní informace o současných metodách molekulární biologie. Cílem tohoto návrhu učebního textu pro studenty střední odborné zdravotnické školy je přiblížit metodické přístupy v oblasti molekulární biologie a poskytnout přehled jednotlivých vybraných metod pomocí vizuálních pomůcek a to s důrazem na vysvětlení jednotlivých principů. Na konci každé kapitoly je několik otázek, které shrnují důležité poznatky vhodné např. ke zkoušce nebo pro sebehodnocení vyučujícího a celkové shrnutí dané metody. V poslední třetí části teoreticky analyzuji didaktický rozbor. Na závěr v tomto oddílu ve vlastním komentáři zmiňuji charakteristiku školy a studijního oboru.

¹ JANŠTOVÁ, Vanda a Martin JÁČ. Scientia in educatione. *SCIED: Výuka molekulární biologie na gymnáziích: analýza současného stavu a možnosti její podpory*. 2015, 6(1), 14 - 39. ISSN 1804-7106.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Kvalitou vzdělávání rozumíme souhrn jeho užitných a pro společnost významných vlastností. Postoj ke kvalitě vzdělání je determinován požadavky společnosti na přípravu lidí pro život. Proto by měl každý „zkvalitnit vzdělání na všech stupních a typech škol“, respektovat jako východisko svých rozhodnutí pojetí kvality vzdělávání pro 21. století.

Za užitečné a pro společnost významné vlastnosti pokládáme shodu mezi dosaženým vzděláním každého jedince a požadavky společnosti na přípravu člověka pro konkurenceschopnost v současných životních podmínkách. Dále odpovídající míru rozvoje vybraných prvků psychiky jednotlivých studentů, korelující s požadavky společnosti na vnitřní vybavenost každého člověka. Klíčové prvky reprezentující vnitřní vybavenost člověka pro jeho uplatnění v 21. století jsou voleny z kognitivní a nekognitivní sféry psychiky.²

1.1 Stav problematiky metod ve speciálních předmětových metodikách

Didaktický systém metod je vzorem norem činnosti při výuce a tím má podobu teoretické představy. Systém metod je realizován ve výuce a jednotlivé metody jsou kombinace postupů v určitém systému. V rovině speciálně didaktické, která zahrnuje prvky procesu výuky ve všech předmětech (př. opakování, upevňování, kontrola, domácí úkoly, kombinace postupů vzhledem k jejich rozmanitosti).

Na úrovni učebních předmětů vznikají systémy postupů, zajišťující výuku danému předmětu. V rovině zkoumání učiva ve skutečném procesu vystupují jednotlivé kroky sledující dílčí cíle, vstupující do širšího cíle výuky podmíněnou metodou. Zde mohou pevná spojení jednotlivých kroků chybět, ale i tyto kroky podléhají interpretaci v didaktickém systému metod.

V metodické rovině může být mnoho metod, ale v didaktické rovině je počet metod omezen. Speciálně didaktických cílů je dosahováno specifickými metodami, kdy má každá vztah k systému obecně didaktických metod. Domácí úkoly lze chápat z hlediska konkrétního metodického cíle (opakovat učivo, osvojit si výklad nové látky, dělat cvičení, řešit úlohy). Z hlediska způsobu jeho plnění (s detailní nebo zkrácenou instrukcí, bez instrukce, ale s uvedením oblasti reproduktivní či tvůrčí činnosti).

² NAVRÁTIL, Stanislav a Jan MATTIOLI. *Vyučování, učení a kvalita vzdělání pro 21. století*. Praha: Univerzita Jana Amose Komenského, 2013. ISBN 978-80-7452-034-1.

Tímto způsobem je organizovaná i samostatná práce: dle instrukcí různého stupně úplnosti, který předpokládá různý stupeň samostatnosti.

Sestavovat tyto dílčí metody je důležité pouze při respektování obecně didaktického hlediska jako východiska. Problém dílčích metod může být řešen neúplně a neefektivně, pokud není splněna tato podmínka. Není např. náhoda, že v teorii a praxi vyučování byla přiřazována k upevňování učební látky dlouhou dobu výlučně cvičení a opakování (tj. reproduktivní metoda). Zatímco upevňování lze realizovat pomocí heuristické nebo výzkumné metody. Při testu vědomostí dosud převládá reproduktivní způsob dotazování, zatímco tvůrčí úlohy různých typů a rozsahu jsou nepostradatelným prostředkem testu nejen vědomostí, ale úspěšnosti celé výuky.³

1.2 Edukace zprostředkovaná mediem

„Nejdůležitějším médiem ve vzdělání je jazyk.“ M. Ahlberg (1991)

Učebnice patří k nejstarším výtvorům lidské kultury. Používaly se už dávno před vynálezem knihtisku. První učebnicové texty byly vyryty klínovým písmem do hliněných destiček či byly psány na pergamenové svitky. Vztahovaly se na náboženské rituály, pro astronomická měření a byly objeveny v archeologických nálezích po národech starověké Asýrie, Babylonu, Egypta a Číny, již několik tisíc let př. Kr.

V 15. st. po Gutenbergově vynálezu knihtisku nastal masový rozvoj školních učebnic. Jeden ze zakladatelů teorie tvorby moderních školních učebnic byl Jan Amos Komenský. Nejznámější učebnice jazyků jsou Dveře jazyků otevřené a Svět v obrazech. Komenský byl také teoretik, viz Velká didaktika.

Lze konstatovat, že výzkum učebnic se ve světě ustavičně rozvíjí a starají se o něj zvláštní centra v jednotlivých zemích. Bohužel Česká republika takovéto centrum nemá.⁴

1.3 Vyučovací metody

Pro dosažení cílů v uvědomělé činnosti je rozhodujícím prostředkem metoda. Pod pojmem vyučovací metoda v didaktice rozumíme různé způsoby záměrného uspořádání činností učitele tak i studentů, směřující ke stanoveným cílům.

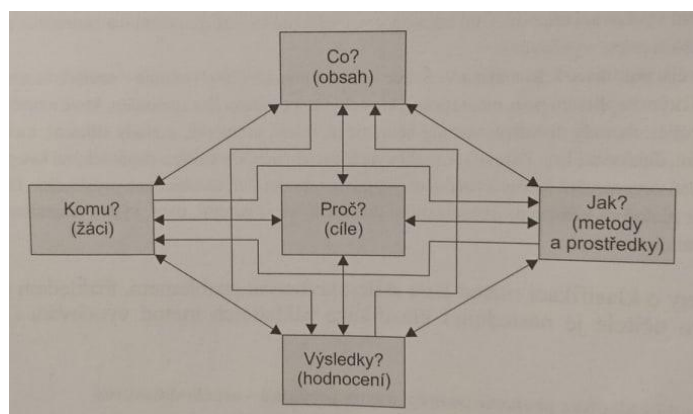
³ LERNER, I. J. Didaktické základy metod výuky. *Didaktické základy metod výuky*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, s. 5-165. ISBN 14-485-86.

⁴ PRŮCHA, Jan. *Moderní pedagogika*. 5., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Portál, 2013. ISBN 978-80-262-0456-5.

Dříve převládaly metody založené na napodobování činností dospělých, na nácviku pohybových a pracovních dovedností. Metody přednášek a rozhovorů dominovaly v období antického Řecka. Metody slovní převládaly ve středověkém školství. V 19. stol Herbart založil didaktické postupy na analýze psychických procesů, realizující při osvojování učiva. Od 70. let vznikaly inovační didaktické teorie a koncepce soustřeďující pozornost k metodické kompetenci vyučujícího, ale také kladly důraz na aktivní spoluúčast studentů. Ve 20. století se hledají různé tzv. alternativní metody, které umožní aktivitu studentům při formulaci cílů a plánování procesu učení, podpoří strategie učení, získávání osobních zkušeností atd.

Pomocí metod se uskutečňuje vazba cíle a obsahu pedagogického procesu s jeho výsledkem. Ten je dán změnami v dovednostech, osobnostních vlastnostech studentů, postojích a vědomostech. Metody vyučování jsou spjaté se specifikou vyučovacího předmětu, s přesnými didaktickými úlohami.^{5,6}

Proces výuky je sled vzájemné součinnosti učitele a studentů. Metody se nedají realizovat bez cílevědomé spolupráce, proto není správnou volbou hovořit o metodách vyučování a metodách učení izolovaně. Student je současně i subjektem když k němu učitel směřuje. Také se uplatňují i zkušenosti učitele, kdy uvažuje o pozici metod ve vzájemných vztazích základních prvků ve struktuře, dynamice vyučovacího procesu. Tyto vztahy lze vyjádřit následovně (viz obrázek).



Obrázek č. 1 Vzájemné vztahy prvků ve vyučovacím procesu⁷

⁵ SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: ROTH, Leo. *Pädagogik: Handbuch für Studium und Praxis*. München: Ehrenwirth, 1991, s. 181-183. ISBN 9783431030242.

⁶ SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: SKATKIN, Michail Nikolajevič a Michail Aleksandrovič DANILOV. *Didaktika střední školy: vysokoškolská příručka pro posluchače fakult připravujících učitele*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1982. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).

⁷ SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: MIALARET, G. *Pédagogie générale*. Paris, PUF 1991.

Otevřeným problémem jsou neustále pokusy o klasifikaci metod. Maňák klasifikuje základní metody vyučování do šesti aspektů:

- 1) **didaktický** – metody slovní, názorně demonstrační a praktické
- 2) **psychologický** – metody sdělovací, samostatné práce studentů, badatelské, problémové, výzkumné
- 3) **logický** – postup srovnávací, induktivní, deduktivní, analyticko-syntetický
- 4) **procesuální** – metody motivační, expoziční, fixační, diagnostické a aplikační
- 5) **organizační** – kombinace metod s vyučovacími formami a pomůckami
- 6) **interaktivní** – metody diskuzní, situační, inscenační, specifické a didaktické hry

Vyučující se rozhoduje o nejvhodnějších metodách při plánování a promýšlení výuky. Cílem je vyučovací jednotka, předpokládaný charakter procesu učení studentů a jejich znalostí, charakter obsahu učiva a následná analýza.⁸ Práci s učebnicí a knihou, textovým materiálem, písemné práce patří do didaktického aspektu, konkrétně do metody slovní, kdy zdrojem poznání je především slovo. Patří k jedné z nejdůležitějších metod jak získávání nových poznatků, tak jejich upevňování. Pro správné rozvíjení dovedností studentů je úkolem učitele, aby je naučil pracovat samostatně s učebnicí. Dobré čtenářské dovednosti, plynulé čtení s porozuměním jsou nezbytným základem.

Učitel by měl tvořit takové otázky a úkoly, aby student lépe pronikl do hloubky čteného textu. Postupem času učitel může stimulovat náročnější úkoly a otázky, ale musí předvídat obtíže, se kterými se studenti mohou setkat. Tak, aby předešel situaci, že studenti text pouze mechanicky reprodukuje. Vyčleňování hlavních myšlenek usnadní grafická úprava učebnice (např. vnitřní členění textu, barevné tištění hlavních myšlenek, označování významných úseků látky svislými čarami po straně textu, zvýrazňování důležitých pojmů atd.). Je potřeba, aby studenti ve všech předmětech uměli pracovat s učebnicí a knihou a to především samostatně. Hlavní myšlenky textu si mohou označovat přímo v textu nebo si mohou dělat výpisky do sešitu, kdy se učí dělat poznámky. Strategie aktivního učení z textu podněcuje ke konstruování nového koncepčního systému s použitím starých prekonceptů.

⁸ SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: BABANSKIJ, J.K.: *Optimalizace vyučovacího procesu*. Praha, SPN 1979.

Starší žáci jsou směřováni k samostatné práci s textem, tj. excerpování – výpisky ze zajímavých pasáží pro čtenáře; zpracování osnovy; myšlenek; konspektu – nejpodrobnější excerpování; příprava referátu).

Interdisciplinární „teorie učení z textu“ byla vyvinuta v oblasti výzkumu učebnic a využívá poznatky nejen z psychologie učení, psycholingvistiky, psychodidaktiky aj. Podle Gavora je tak pohled učitele na funkci jazykově prezentovaných poznatků ve vyučování více prohlouben.

1.4 Struktura a funkce učebnic

Dobře zpracovaná školní učebnice je důmyslné medium s bohatě členěnou strukturou a s velmi funkčně konstruovanými komponenty. V pedagogické teorii je učebnice chápána buď jako zdroj obsahu vzdělávání pro žáky nebo kurikulární projekt. Kdy je brán jako nějaký model nebo scénář, s jehož pomocí společnost reguluje edukační procesy v prostředí školy. Učebnice jsou značně vázány na ideologické a politické zákonitosti jednotlivých zemí. Obsahy učebnic mohou ovlivňovat vytváření různých postojů, resp. vytvářet i nežádoucí předsudky u mladé generace.

Nebo je učebnice chápána jako didaktický prostředek. Tento pojem lze vymezit shodně jako „vše, co vede ke splnění výchovně-vzdělávacích cílů“ (J. Maňák, 1994, s. 52). Jsou to prostředky nemateriální (např. vyučovací metody), ale i materiální (= učební pomůcky). J. Maňák (1994) uvádí taxonomii zahrnující osm druhů učebních pomůcek (např. obrazy, projekce, přístroje atd.) a za jeden z nich považuje literární pomůcky, jako jsou učebnice, příručky, atlasy a jiné.⁹

1.5 Základní funkce a komponenty učebnice

Průcha vymezuje tři základní funkce učebnice:

1. Prezentace učiva – soubor informací, které musí předkládat uživatelům různými formami (verbální, obrazovou, kombinovanou).
2. Řízení učení a vyučování – didaktický prostředek, řídící studentovo učení (např. pomocí otázek a úkolů) a učitelovo vyučování (např. udává proporce učiva vhodné pro určitou časovou jednotku výuky).

⁹ PRŮCHA, Jan. *Moderní pedagogika*. 5., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Portál, 2013. ISBN 978-80-262-0456-5.

V průběhu 20. stol. výzkum zaměřený na učitele a vyučování prošel bouřlivým vývojem a dominovala tzv. osobnostní paradigma. Zkoumaly se, jaké osobnostní charakteristiky učitele pozitivně ovlivňují žáky. Lepší učitel byl ten, který byl otevřený, vřelý a lépe uměl povzbudit žáka k učení.¹⁰

3. Funkce organizační (orientační) – informuje uživatele o způsobech svého využívání (např. pomocí obsahu, rejstříku nebo pokynů).

Tato klasifikace je základem pro praktické evaluační analýzy, kterými lze přesně vyhodnocovat didaktickou vybavenost učebnic. Kvalitu učebnice vzhledem k jejímu využití pro učení studentů určuje didaktická vybavenost.¹¹

Změny obsahu témat učiva jednotlivých vyučovacích předmětů

Rychlé stárnutí stávajících informací a jejich nahrazování novými je jedním z charakteristických vlastností společenského života v 21. století.

Chceme-li zajistit, aby obsah vzdělávání korespondoval s nároky společnosti, musí pravidelně docházet v určitých časových intervalech k vytěšňování již zastaralých informací z obsahu a nahradit je novými. Pokud toto nebude respektováno, nutně se sníží kvalita dosaženého vzdělání a nebudou se tak žáci moc připravovat na nejbližší budoucnost, ale na minulost.¹²

Změny zpracování obsahu učebnic

Učebnice by se měly stát prostředkem, který bude vytvářet předpoklady pro činnosti a řídit činnost studentů při samostatné konstrukci vědomostí. Také při nábízení intelektových a senzomotorických dovedností. Dále při využívání vědomostí, dovedností jako např. instrumentů řešení ve škole, ale zejména při domácí přípravě.

Didaktická vybavenost učebnic, která odpovídá současným požadavkům na kvalitu vzdělání, zahrnuje dva aparáty:

1. Aparát prezentace učiva

¹⁰ JANÍK, Tomáš. *Didaktické znalosti obsahu a jejich význam pro oborové didaktiky, tvorbu kurikula a učitelství vzdělávání*. Brno: Paido, 2009. Pedagogický výzkum v teorii a praxi. ISBN 978-80-7315-186-7.

¹¹ PRŮCHA, Jan. *Moderní pedagogika*. 5., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Portál, 2013. ISBN 978-80-262-0456-5.

¹² NAVRÁTIL, Stanislav a Jan MATTIOLI. *Vyučování, učení a kvalita vzdělání pro 21. století*. Praha: Univerzita Jana Amose Komenského, 2013. ISBN 978-80-7452-034-1.

Výkladový text, který by měl především obsahovat klíčové informace reprezentující identifikační znaky pojmů, postupů, zákonů, dějů atd., jejichž model budou žáci konstruovat. Text by měl sloužit jako pracovní materiál (pramen poznání).

Doplňkové texty popisující další příklady vztahující se k novým pojmům, postupům, zákonům, pravidlům atd., i doplňující texty by měly být využity jako pracovní materiál.

Naukové ilustrace (grafické modely, schematické kresby, náčrtky) fotografie, další názorné podoby pracovního materiálu, které musí zahrnovat všechny elementy reprezentující identifikační znaky zákonů, pojmů, postupů atd., jejichž vnitřní obrazy si budou moci studenti konstruovat.

Slovníky cizích slov.

Operováním s naukovými ilustracemi, texty a dalším materiálem si studenti rozvíjí vědomosti, dovednosti a také konvergentní myšlení.

2. Aparát řídicí činnosti

V úvodu ke každému tématu učiva stanovení nových pojmů, pravidel atd., o nichž si má student operováním s texty, obrazovými komponenty vytvořit vnitřní obrazy. Uvádí se alternativní pokyny k práci pod každým textem, které pobídnou studenty při samostatném operování s pracovním materiálem. Předkládají se otevřené a uzavřené úkoly, otázky přesahující rámec školy, tzn. vztahující se k jednotlivým oblastem společenského života, jejichž řešením s využitím dříve i nově konstruovaných vnitřních obrazů učiva si studenti rozvíjejí konvergentní myšlení, divergentní myšlení, získají osobní zkušenost a také intelektuální dovednosti. Prezntují se zpětnovazebné informace o správnosti řešení předložených úkolů a otázek. Mezi další komponenty patří pokyny, kam se obrátit když student bude muset opravit chybné řešení. Grafické znázornění důležitých částí obsahu textů ve vztahu ke konstrukci vnitřních obrazů prostřednictvím např. stínováním slov, dáním slov do rámečků, proložení písma, velikosti písma u důležitých slov, stínování slov, užití stejné barvy pro úkoly, otázky a části textu, jenž souvisí s řešením úkolů a otázek.

3. Aparát řídicí činnosti

Mezi tyto komponenty lze zařadit obsah učebnice, členění učebnice na tematické celky, marginálie a rejstřík (věcný, jmenný, smíšený).

Změny v učebních textech a struktura se mohou týkat jak klasických tištěných učebnic, tak i elektronických učebnic (tj. e-knihy, e-learning atd.).¹³

1.6 Učebnice v multimediálním systému didaktických prostředků

Učebnice představuje významnou etapu, která se včleňuje do každodenní činnosti učitele a učení studentů při vyučování i mimo ně. Z těchto hledisek se v průběhu vývoje zformovaly různé přístupy k tvorbě učebnic. Na didaktické koncepci závisí způsob výkladu učiva a jeho didaktická organizace.

Od komplexního pojetí učebnice se předpokládá, že bude také prostředkem řízení učení studentů, založeného na jejich vlastní aktivní činnosti. To vede k tomu, že se například nově utvářejí vztahy mezi texty a mimotextovými komponentami učebnice (ilustrace, tabulky, schémata atd.). Také se ve větším počtu zařazují některé prvky cvičebnic, úkoly pro samostatnou práci, laboratorní práce s instruktáží cvičebnicového typu, úkoly předpokládající různé druhy praktických cvičení a další. Inovační impulzy vedou vyučujícího pro využití nových organizačních forem výuky.

Didakticky zpracované učebnice by měly plnit poznávací a systemizační funkci, upevňovací a kontrolní funkci, motivační a sebevzdělávací, koordinační, rozvíjející a v neposlední řadě i funkci výchovnou.

Z didaktického hlediska je podstatné sledovat složitosti a obtížnosti učebnic, neboť existující výzkumy poukazují na jejich přetěžování. Z hlediska kvantitativního (množství pojmů, faktů aj. i z hlediska kvalitativního (náročnost výkladu, složité vyjadřování aj.). Někteří učitelé navrhují na optimalizaci učebnic a pro zvýšenou motivaci studentů k učení např. kdyby se zařadily otázky a úkoly blízké praxi nebo se snížilo celkové množství učiva v učebnicích a text byl více srozumitelný. Dále by upřednostňovali více testů do učebnic, větší počet zajímavostí a přitažlivosti učiva, více otázek, úkolů a cvičení. Odlišit povinné učivo od nepovinného nebo snížit počet odborných termínů a pojmů.

Multimediální systém didaktických prostředků a pomůcek by se měl používat promyšleně tak, aby každá pomůcka plnila ve vyučování tu funkci, pro kterou má nejlepší předpoklad. Ovšem záleží na podmínkách školy a možnostech učitele.

¹³ NAVRÁTIL, Stanislav a Jan MATTIOLI. *Vyučování, učení a kvalita vzdělání pro 21. století*. Praha: Univerzita Jana Amose Komenského, 2013. ISBN 978-80-7452-034-1.

1.7 Učení z textu

Na mnoha školách studenti nenavštěvují knihovny a některé učebnice vrací bezmála jako nové, ale je to případ od případu. V současné době je oblíbená projektová metoda, které se dostává širší využití. Podle Martona a Salja se diferencují dva přístupy ke studiu formou čtení:

1) Povrchový přístup

- Studenti jsou pasivní a chtějí zvládnout celé téma.
- Chtějí se naučit co nejvíce stran.
- Chtějí najít správné odpovědi.
- Potřebují vstřebat přesně dané vědomosti.
- Vyžadují se naučit látku doslova.

2) Hlubkový přístup

- Studenti jsou duševně aktivní a chtějí znát hlavní myšlenky. Bývají všestranní a úspěšnější při zkouškách.
- Vyžadují téma jako celek.
- Potřebují vidět souvislosti.
- Chtějí logiku argumentace.
- Požadují smysl určitých nejasných částí učiva a oprávněnost závěrů.
- Chtějí znát na čem je argumentace postavena
- Chtějí znát význam obsahu textu v svých důsledcích.

Petty (2004) uvádí i třetí nulový přístup, kdy si studenti jen mechanicky pročítají text s nadějí, že jim automaticky naskáče do hlavy a chtějí ho mít rychle za sebou.

Četba by měla především studenty upoutat svým textem

Ukázka různých způsobů a činností, jak podnítit studenty ke čtení:

- zajímavá čtecí činnost
- poznámky z četby
- přepracování tématu
- hledání informací
- kritika textu
- referát

Velkou výhodou je, že umožní každému studentovi pracovat vlastním tempem. Např. bystřejší žák pracuje rychleji a do hloubky a naopak pomalejší studenti si zvolí jednodušší text a mají více času. Učení z textu umožňuje rozvíjet osvojování přečtené informace, což není možné docílit bez praxe. Dále rozvíjí dovednost umět se lépe orientovat v knize i v knihovně. Seznamuje studenty s důležitými texty v učebnicích a role pedagoga je naučit každého studenta vyhledávat informace.¹⁴

1.8 Didaktické zásady ve výuce biologie

„Kdo neumí žákům vědecké poznatky vysvětlit, je buď neschopný, anebo podvodník“.

Albert Einstein

V současnosti je didaktika chápána jako samostatná vědní disciplína, kterou nelze oddělovat a izolovat od ostatních součástí pedagogiky, především teorie výchovy. Na to už v minulosti poukazovali pedagogové jako např. J. F. Herbart, J. A. Komenský aj.

Podpora oborových didaktik předpokládá nejen dobré znalosti v oboru pedagogiky, psychologie, ale také příslušných vědních oborů, ke kterým se oborová didaktika vztahuje. Obecně lze říci, že didaktika poskytuje oborovým didaktikám obecný teoretický základ. A oborové didaktiky jsou důležité pro didaktické výzkumy, uskutečňujících se prostřednictvím jednotlivých předmětů.¹⁵

Didaktické zásady považujeme za obecné principy, jejichž respektování umožňuje zajistit úspěšný a bezproblémový průběh vzdělávacího procesu a cílů, tedy efektivní výuku. Nelze je aplikovat šablonovitě, bez hlubší analýzy úrovně studentů, vzdělávacích cílů, metod, prostředků, forem výuky atd. Tyto zásady se mění s dobou v závislosti na měnících se společenských požadavcích na výsledky vzdělávání a profil absolventa.

Nejvýznamnější didaktické zásady ve výuce biologie:

- Zásada vědeckosti

Obsah učiva odpovídá moderním poznatkům vědy. Sledují se nové informace po patřičné didaktické transformaci a zařazujeme je do výuky, výsledky biologického výzkumu. Při sporných poznacích je důležité studenty upozornit na tuto skutečnost. Také můžete poukázat na množství falešných pověr (např. sýček přivolávající smrt), vyvarujte se antropomorfismů (např. hloupá husa).

¹⁴ PETTY, Geoffrey. *Moderní vyučování*. Vyd. 3. Praha: Portál, 2004. ISBN 80-7178-978-x.

¹⁵ SKALKOVÁ, Jarmila. *Obecná didaktika: vyučovací proces, učivo a jeho výběr, metody, organizační formy vyučování*. Praha: Grada, 2007. Pedagogika (Grada). ISBN 978-80-247-1821-7.

Nebo antropocentrismu (např. kráva má mléko, aby se člověk mohl napít). Problémem může být i deformace vědeckých poznatků daná ideologií doby (např. O. B. Lepešinská – buňky nevznikají dělením z jiných buněk, ale z „živé hmoty“).

- Zásada přiměřenosti a srozumitelnosti

Respektujte věkové rozdíly studentů a nezahlcujte je fakty, odlišujte podstatné od nepodstatného. K chybám vede příliš obtížné učivo a přemíra učiva a naopak. Se zásadou přiměřenosti vede k diskuzi používání odborných latinských termínů a odborných latinských jmen organismů. Nové učivo vysvětlujte srozumitelně a jednoduše.

- Zásada názornosti

Až 87 % informací přijímá člověk nejefektivněji a v největším množství zrakem. Názorné pomůcky využívat jen v přiměřené míře, neboť přeceňování této zásady může zpomalit rozvoj kreativního a abstraktního myšlení studentů. Podle J. A. Komenského: „proto budiž učitelům zlatým pravidlem, aby všechno bylo předváděno všem smyslům, kolika možno“.

- Zásada soustavnosti a posloupnosti

Všeobecně lze říci, že nové poznatky se mají opírat o předcházející, již dříve osvojené poznatky a ty se pak stanou vhodnou základnou pro poznatky následující.

Např. studenti vyjmenují detailně všechny jednotlivé meziprodukty různých biologických cyklů a nedokážou však stručně shrnout význam těchto procesů. Někdy je výhodnější začít od celku k jednotlivostem a až pak probírat jednotlivá dílčí témata. To umožňuje studentům rychlejší vhled a porozumění studovaným jevům v širokých vzájemných souvislostech.

- Zásada trvalosti

Opakování je matka moudrosti, takže pořád opakujte základní učivo, jež představuje soubor poznatků o klíčových biologických jevech a jejich zákonitostech. Z didaktického hlediska umožňuje znalost základního učiva, detailní a hlubší studium biologických oborů. Učivo předkládejte ve vzájemných souvislostech a využijte aktivní učení.

- Zásada spojení školy se životem a spojení teorie s praxí

Jde o to, jak přesvědčit studenty o smysluplnosti výuky, o praktickém významu i mimo školní prostředí. Je vhodné sestavit např. katalog praktických příkladů aplikací vědeckých poznatků pro jednotlivé biologické obory a průběžně jej doplňovat.

- Zásada výchovného vyučování

Výuka biologie by měla naplňovat i afektivní cíle výuky, měla by ovlivnit postoj a hodnoty studenta.

- Zásada individuálního přístupu ke studentům

Je důležité, aby učitel uměl diferencovat mezi studenty, např. nadaný × méně nadaný; chce jít studovat biologický obor a naopak; studenti s psychickým, sociálním handicapem atd.).

- Zásada respektování mezipředmětových vztahů

Připravit si výukové moduly integrující poznatky z příbuzných kontaktních vzdělávacích oborů.

- Zásada hygieny a bezpečnosti výuky, Zásada rovného přístupu ke vzdělání
- Zásada uvážlivé volby vzdělávací strategie

Prioritou by mělo být splnění výukových cílů, a nikoliv naplnění formálního předpokladu „být inovativní za každou cenu“.¹⁶

¹⁶ VINTER, Vladimír a Ivo KRÁLÍČEK. *Začínající učitel biologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016, s 44 - 48. ISBN 978-80-244-5021-6.

2 Téma: Základní metody v molekulární biologii

Cíl: Seznámit studenty se základními molekulárními metodami. Student bude schopen ovládat izolaci nukleových kyselin a používat centrifugační metody. Naučí se provádět elektroforézu nukleových kyselin a zrealizovat hybridizaci. V poslední řadě se naučí definovat polymerázovou řetězovou reakci. Tyto výchozí metody umožní optimální vzdělání pro práci v laboratořích základního i aplikovaného výzkumu.

Klíčová slova: izolace NK, centrifugace, elektroforéza, hybridizace, PCR

Odborná literatura:

- KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*, 2007; Š
- MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*, 2005;
- ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*, 2002.

2.1 Tematický celek - Izolace nukleových kyselin

Izolace (extrakce) NK nebo jejich přečištění = získání DNA (RNA) z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu.

Cílem je získat NK v *nativním stavu*, v *dostatečném množství* a především v *čistotě*.

Typy postupů metod extrakce NK:

- 1) Rozdílná rozpustnost biologických makromolekul
- 2) Adsorpce na pevný podklad
- 3) Ultracentrifugace v gradientním roztoku

Zdroj DNA:

- Genetický materiál, který obsahuje BUŇKY (všeho druhu – např. leukocyty, lymfocyty, amniocyty, vlasové kořínky, buňky z mozkomíšního moku a z bukalní sliznice, krevní skvrny, parafinové bločky, bioptický materiál, kultivované buňky, mikrobiologický a virologický kultivovaný a nekultivovaný materiál, zuby, tkáně fixované v lihu, kosterní pozůstatky) a také, kde je JÁDRO A MITOCHONDRIE.

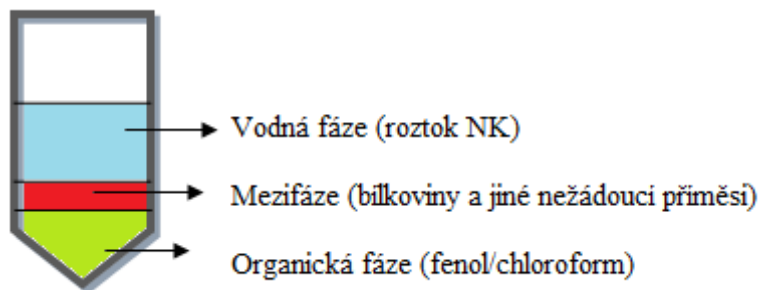
Princip izolace NK:

- 1) Shromáždit potřebný materiál → dezintegraci a homogenizaci buněk (tkáň)
- 2) Rozrušit buněčné stěny/virové kapsidy pomocí enzymů (LYZOZYM, CELULÁZA) či detergentů (DODECYLSULFÁT SODNÝ). Detergenty rozpouští cytoplazmatickou membránu.
- 3) Odstranění kontaminantů pomocí PROTEINÁZY K, PROTEINÁZY E nebo SPECIFICKÝCH NUKLEÁZ (ty odstraňují nežádoucí typy NK - RNázy, DNázy).
Př. RNáza je termostabilní → odstraní nežádoucí RNA při purifikaci DNA a naopak
- 4) Purifikace

podle různé rozpustnosti

✓ fenolová extrakce / fenol-chloroformová extrakce / izopropanolová precipitace

- používá se při izolaci velkého množství NK, jejichž čistota není vysoká
- *fenol* = organické rozpouštědlo, oddělující proteiny od NK
- *chloroform* = denaturuje proteiny, rozpouští lipidy a odděluje fáze v dalších krocích
- *izopropanol* = vysráží NK



Obrázek č. 2: Rozdělení vodné a organické fáze po centrifugaci vzorku s fenolem¹⁷

✓ adsorpce NK na silikátový povrch

- nejnovější technika
- je rychlejší a bezpečnější, ale dražší
- zajišťuje získání velmi čisté DNA
- přítomnost chaotropních solí (např. NaI) → připojení (adsorpce) molekul DNA na povrch silikátu (drobné skleněné kuličky či jako

¹⁷ vlastní zdroj

fritový filtr) → ↓ iontová síla roztoku a DNA se opět uvolní → nakonec precipitace DNA alkoholem

Izoluje se **genomová DNA, totální RNA (mRNA; nejčastěji)** nebo **plazmidová DNA z bakterií.**

Izolace RNA

Od extrakce DNA se liší v několika bodech:

- RNA je náchylnější na degradaci působením ribonukleáz → pracovat sterilně a přidávat inhibitory RNáz (př. 0,1 % diethylpyrokarbonát).
- pro narušení stěn makromolekul se používají se guanidinové soli
- fenol musí být mírně kyselější než u DNA
- selektivní srážení pomocí LiCl

Izolace plazmidové DNA

plazmidy = slouží jako vektory pro klonování NK; jsou to malé dvouřetězcové kružnicové molekuly

- 1) kultivují se buňky v přítomnosti antibiotika
- 2) pomocí lysozymu se odstraní buněčná stěna
- 3) přidá se NaOH → denaturuje se bakteriální chromozom a částečně i plazmid
- 4) pak se přidá neutralizační roztok, který obsahuje octan draselný → vysráží se chromozomální DNA s proteiny a denaturuje se plazmidová DNA
- 5) centrifugací se odstraní bakteriální DNA
- 6) nakonec se purifikuje plazmidová DNA

V praxi se pro určení koncentrace DNA se využívá dvou metod:

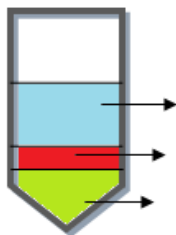
- **spektrofotometrie** (tj. přímé spektrofotometrické stanovení v UV světle) – používá se, pokud je *koncentrace DNA dostatečná* a vzorek neobsahuje významné množství nečistot (bílkoviny, fenol atd.)
- **fluorimetrie** - předpokládá se **velmi nízká koncentrace DNA, vzorek obsahuje významné množství nečistot**
 - před měřením se dává do roztoku **ethidiumbromid (EtBr)**

Cvičení:

1) Co patří mezi zdroj DNA, správnou odpověď zakroužkuj:

biotický materiál	H ₂ SO ₄	zuby	krev	voda
kosterní pozůstatky	plast	nehet	ponožka	mobil

2) Doplň popis k obrázku:



3) Přiřaď k sobě správné dvojice:

CHLOROFORM	organické rozpouštědlo, odděluje proteiny od NK
IZOPROPANOL	malé dvouřetězcové kružnicové molekuly
FENOL	denaturuje proteiny, rozpouští lipidy a odděluje fáze v dalších krocích
PLAZMIDY	vysráží NK

4) Označ správné tvrzení:

- Pomocí enzymů lysozymu a celulózy se dají rozrušit buněčné stěny a virové kapsidy.
- Dodecylsulfát lithný slouží k odstranění kontaminantů.
- Detergenty rozpouští cytoplazmatickou membránu.

Shrnutí:

Izolace NK je získání DNA (RNA) z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu. Cílem je získat NK v **nativním stavu, v dostatečném množství a především v čistotě**. Principem je homogenizace buněk a využití enzymů **lysozymu, celulózy, detergentu dodecylsulfátu sodného, proteinázy K i E, nukleáz**. Izoluje se **genomová DNA, totální nebo plazmidová DNA**.

Pro více informací nebo zájem lze použít odbornou literaturu:

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*, 2007; Š
MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*, 2005;
ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*, 2002.

Seznam zkratk

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EtBr – ethidiumbromid

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

UV záření – ultrafialové záření

.....
Otázky pro zapamatování:

1. *Co může být zdrojem DNA?*
2. *Jakými enzymy se rozruší buněčná stěna?*
3. *Jaký enzym použijeme k odstranění DNA, abychom získali čistou RNA?*
4. *Jaké metody použijete k určení koncentrace DNA?*

2.2 Tematický celek - Centrifugační metody

Centrifugace = separační proces, rozdělující částice pomocí odstředivé síly.

V molekulární biologii slouží k izolaci, purifikaci, charakterizaci biomolekul a buněčných struktur.

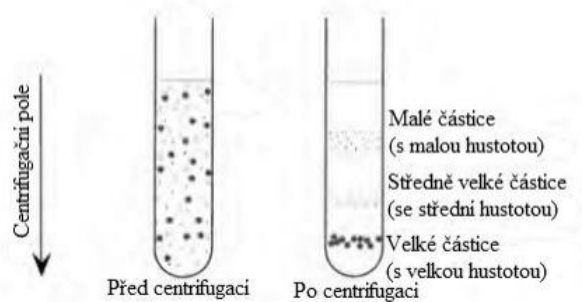
Sedimentační koeficient (hodnota S) = veličina charakterizující rychlost pohybu částice (př. biomakromolekuly, buněčné organely a jejich struktury) při centrifugaci

Princip:

- pohyb částic v tekutém mediu pod vlivem odstředivého pole, vznikajícím otáčením rotoru centrifugy
- rychlost sedimentace závisí na velikosti, tvaru a hustotě částic, ale také na vlastnostech prostředí a podmínkách centrifugace



Obrázek č. 3: Centrifugační zkumavky - eppendorfky¹⁸



Obrázek č. 4: Schéma průběhu diferenciální centrifugace¹⁹

Cvičení:

1) Doplň chybějící slova do věty:

Centrifugace slouží v molekulární biologii k, a biomolekul a buněčných struktur.

Centrifugačním zkumavkám říkáme

..... veličina charakterizující rychlost pohybu částice při centrifugaci.

Rychlost sedimentace závisí na, částic a také na vlastnostech a centrifugace.

Po centrifugace jsou velké částice a malé částice najdeme

Shrnutí:

Centrifugace je separační proces, který rozděluje částice pomocí odstředivé síly. Slouží k **izolaci, purifikaci, charakterizaci biomolekul a buněčných struktur. Hodnota S** je veličina charakterizující rychlost pohybu částice při centrifugaci. Rychlost sedimentace závisí na **velikosti, tvaru a hustotě částic**, ale také na **vlastnostech prostředí a podmínkách centrifugace**.

Pro více informací nebo zájem lze použít odbornou literaturu:

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*, 2007; Š

MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*, 2005;

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie*,

¹⁸ In: *LAB MARK a. s.* [online]. Praha 6, 2019 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://www.labmark.cz/protein-lobind-tubes-0-5ml-pcr-clean>

¹⁹ CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 9788024439518.

.....
Otázky pro zapamatování:

1. Definujte pojem centrifugace.
2. Na čem závisí rychlost sedimentace?
3. Jak se jmenuje veličina charakterizující rychlost pohybu částic?

2.3 Tematický celek - Elektroforéza NK

Nejpoužívanější separační technika při izolaci a analýze bílkovin.

Princip:

- pohyb nabitých molekul v elektrickém poli
- hlavní nositel náboje NK – negativně nabitě fosfátové skupiny → proto se NK v elek. poli pohybují k opačně nabitě elektrodě (anodě)
- pohyblivost je určena velikostí molekuly (molekuly DNA do velikosti cca 50 kbp, platí u KONVENČNÍ GELOVÉ ELFY)

Větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí, ale nerozdělí se, neboť uvíznou v síťovité struktuře gelu. Pak v takovém to případě se jedná o PULZNÍ GELOVOU ELFU.

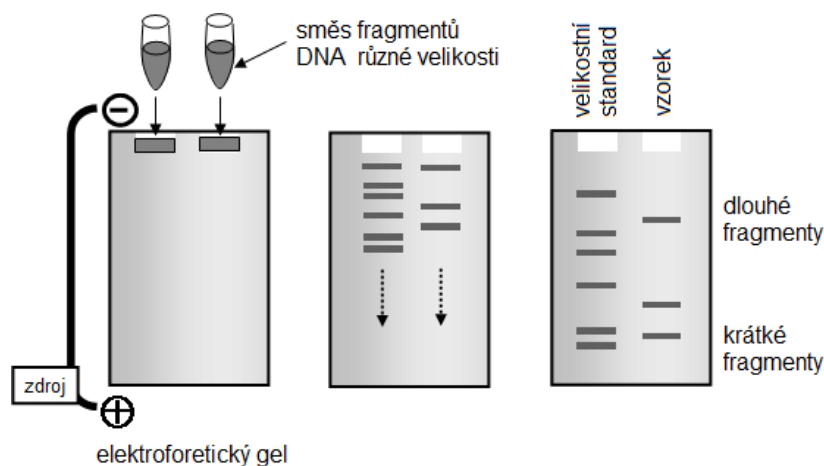
Nosičem pro NK jsou **gely**, které se připravují s takovou koncentrací, aby bylo možné separovat různé velikosti molekul.

Po skončení elfy se zviditelní fragmenty v gelu pomocí **ethidiumbromidu** (= fluorescenční barvivo, které se váže na DNA a v UV světle jasně září).



Obrázek č. 5: Elektroforetická technika²⁰

²⁰ In: *Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. Eva Bártová, 2011 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz



Obrázek č. 6: Princip elektroforézy s velikostním standardem²¹

Elektroforetické gely

jsou tvořeny z:

polyakrylamidu	}	vytváří síťovitou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením Θ a koncentrací polymeru
agarózy		

Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozdělujeme:

- A. HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELFA – gel je na vodorovné podložce; u agarózové elfo
- B. VERTIKÁLNÍ GELOVÁ ELFA – gel je mezi dvěma skly; u polyakrylamidových gelů

Pokud máme neznámou velikost fragmentu DNA tak srovnáme jeho elektroforetickou pohyblivost s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů o známé velikosti tzv. HMOTNOSTNÍ STANDARD (HS).

Typy gelů:

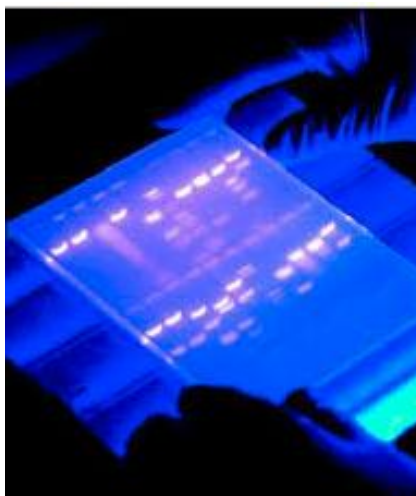
- agarózové gely (separace molekul NK o velikosti 100 – 50 000 bp)
- polyakrylamidové gely (o velikosti 10 – 1000 bp)
- gely pro sekvenování
- nanášecí pufry
- elektroforetické pufry

²¹ In: *Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. Eva Bártová, 2011 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz

Faktory ovlivňující rychlost migrace:

- molekulová hmotnost DNA
- koncentrace gelu
- konformace DNA
- aplikované napětí (↓ napětí = lineární migrace DNA)
- směr elek. pole
- zastoupení bází a teplota (platí v polyakrylamidových gelech a na rychlosti GC obsahu; standardně při pokojové teplotě od 4 – 30 °C)
- přítomnost interkalačních barviv (interkalací EtBr se prodlužuje délka molekul DNA)
- složení elektroforetických pufrů (bez iontů je rychlost migrace velmi nízká nebo žádná)

Při ukončení elfy je nutné identifikovat pozici separačních molekul. Fragmenty lze zviditelnit buď přímým barvením, koncovým značením izotopu nebo hybridizací se značenou sondou.



Obrázek č. 7: Výsledek elfo při odečítání - elektroforeogram²²

KAPILÁRNÍ ELFA

Separace částic probíhá v **kapiláře** (délka až 1 m), která spojuje dvě nádoby naplněné základním **elektrolytem** (vodivý roztok). V 1. nádobce je anoda a ve 2. nádobce katoda. Do jednoho konce kapiláry se aplikuje menší množství vzorku a poté aplikujeme

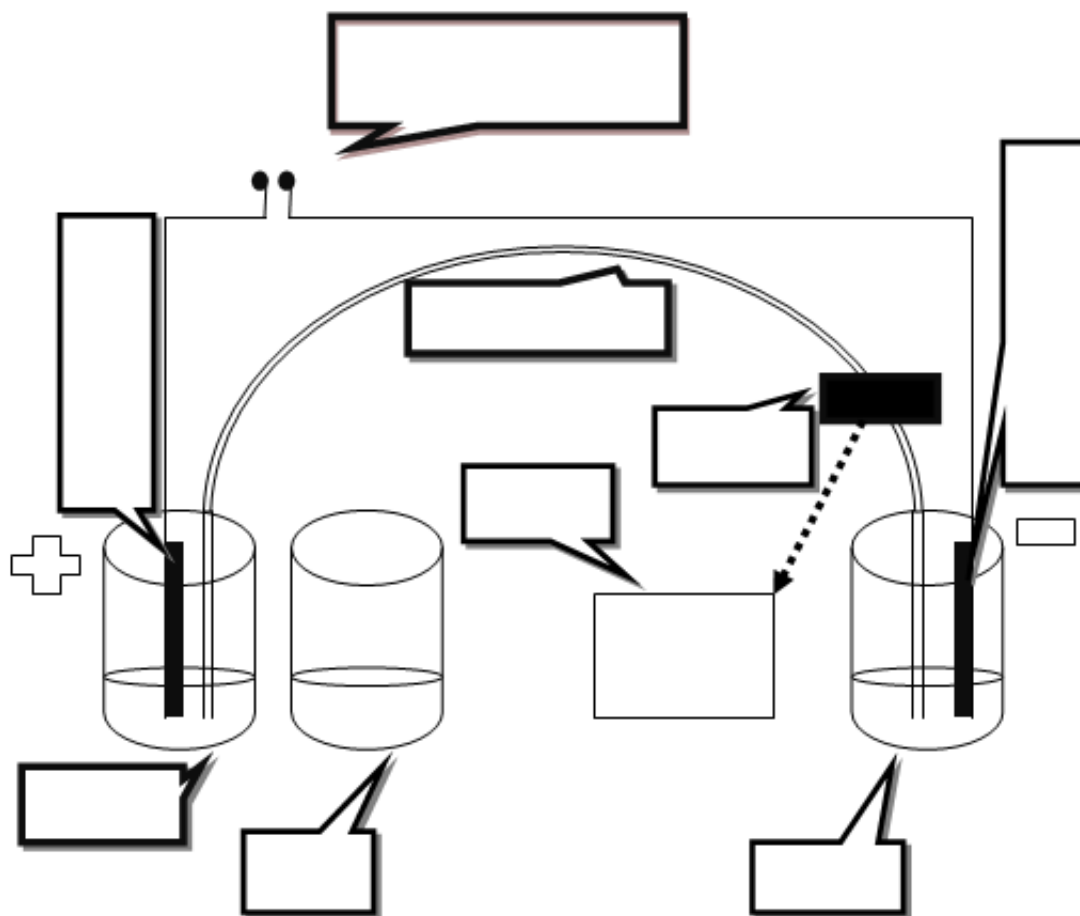
²² In: *Technická univerzita* [online]. Liberec, 2018 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://nanoed.tul.cz/course/view.php?id=52>

stejnoseměrný proud → částice o ↓ molekulové hmotnosti se v elek. poli pohybují k opačnému pólu rychleji než částice s ↑ molekulovou hmotností.

Na konci kapiláry se nachází **detektor** (= registruje průchod jednotlivých molekul i změny koncentrace; je spojen s počítačem → výsledkem je **graf**: šířka a výška píku vypovídá o účinnosti separace) → spektrofotometrické stanovení.

Cvičení:

1) Doplň schéma kapilární elfy podle výkladu:



anoda

katoda

detektor

vzorek

separační kapilára

zdroj vysokého napětí

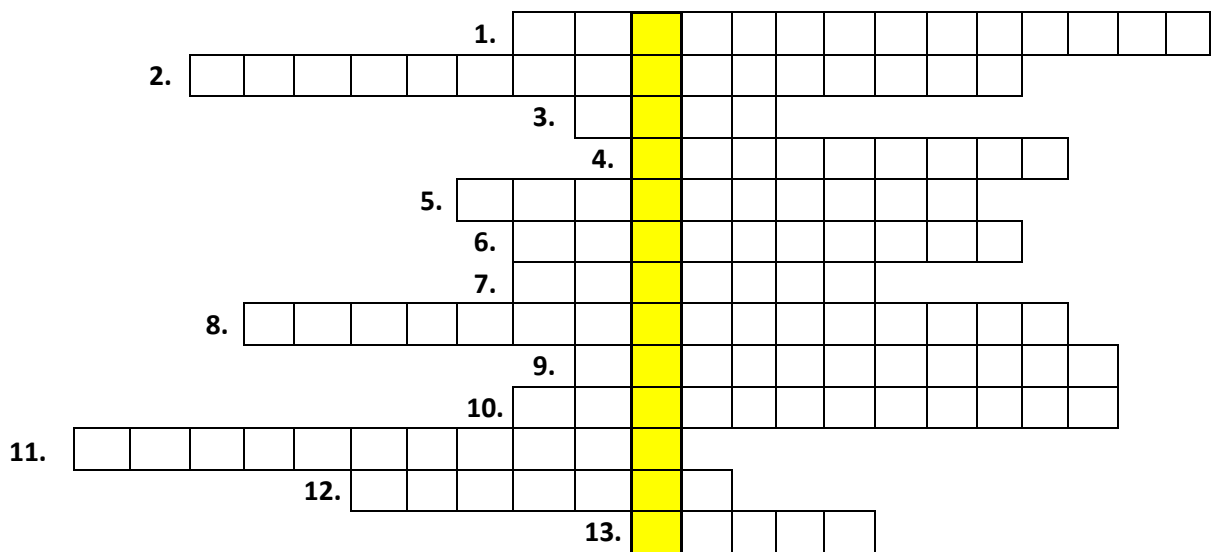
výstupní nádobka

vstupní nádobka

zapisovač

2) Doplň křížovku:

1. V čem se pohybují nabitě molekuly
2. Typ elektroforetického gelu
3. Nosič pro NK
4. U které gelové elfy se rozdělují molekuly do velikosti 50 kbp
5. S jakým standardem se porovnává neznámá velikost DNA fragmentu
6. Typ elfy, kdy je gel mezi 2 skly
7. Využití elfy
8. Výsledek elfy
9. Faktor ovlivňující rychlost migrace (souvisí s gelem)
10. Typ gelové elfy
11. Jaký druh napětí ovlivňuje rychlost migrace
12. Typ elektroforetického gelu
13. K jaké elektrodě se pohybují NK v elektrickém poli



3) Nakreslete elektroforeogram, ve kterém vyznačte HS a vzorek neznámého fragmentu DNA:

Shrnutí:

Elektroforéza je nejpoužívanější separační technikai. Principem je pohyb nabitých molekul v **elektrickém poli**. NK se pohybují k **anodě**. **Nosičem** jsou **gely z polyakrylamidu** nebo **agarózy**. Důležitá je velikost molekuly. **Pulzní gelová elfa** je charakteristická pro větší molekuly, pohybující se stejnou rychlostí, uvíznou v síťovité struktuře gelu. Podle polohy gelu rozlišujeme **horizontální gelovou elfu** a **vertikální gelovou elfu**. **Hmotnostní standard (HS)** o známé velikosti slouží k porovnávání neznámé velikosti fragmentu DNA.

Pro více informací nebo zájem lze použít odbornou literaturu:

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*, 2007; Š

MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*, 2005;

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*, 2002.

Seznam zkratek:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELFO – elektroforéza

GC – guanin (pyrimidinová) /cytosin (purinová) báze

HS – hmotnostní standard

IgG – imunoglobulín G

kb – 1000 pb (velikost genu)

Mr – relativní molekulová hmotnost

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

pb – jednotka páru báze

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecylsulfát sodný

SDS – PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

UV záření – ultrafialové záření

.....
Otázky pro zapamatování:

1. *Vysvětli stručně princip elektroforézy nukleových kyselin.*
2. *Vyjmenuj elektroforetické gely.*
3. *Vyjmenuj alespoň 5 faktorů, které ovlivní rychlost migrace.*

4. *Definuj hmotností standard.*
5. *Čím se identifikují separační molekuly?*

2.4 Tematický celek - Hybridizace

Hybridizace = vytváření dvouřetězcových molekul z jednořetězcových DNA/RNA za podmínkou, že se jejich sekvence vyznačí úplnou nebo částečnou komplementaritou bází.

Denaturace = reverzibilní pochod oddělení 2 řetězců dvoušroubovicové molekuly DNA

Lze ji navodit: vysokou teplotou (nad 90 °C), vysokým pH (př. roztok NaOH) a denaturačními činidly (př. formamid, močovina)

Renaturace = vznik dvouřetězcových struktur sloučením jednořetězcových polynukleotidů (tzv. **ANNEALING**) za vhodných podmínek

Lze ji navodit: pomalým ochlazováním (zahájení na 65°C) a rychlým ochlazováním
Vznikají **homoduplexy** (= úplná komplementarita řetězce), ale i **heteroduplexy** (= částečná komplementarita řetězce) a nespárované úseky (tzv. **MISMATCHES**), které snižují stabilitu hybridu.

Ovlivňuje ji: teplota, koncentrace solí, míra komplementarity, délka fragmentů, koncentrace sondy, komplexita sondy, nukleotidové složení sondy, přítomnost denaturačních činidel, viskozita roztoku a pH roztoku

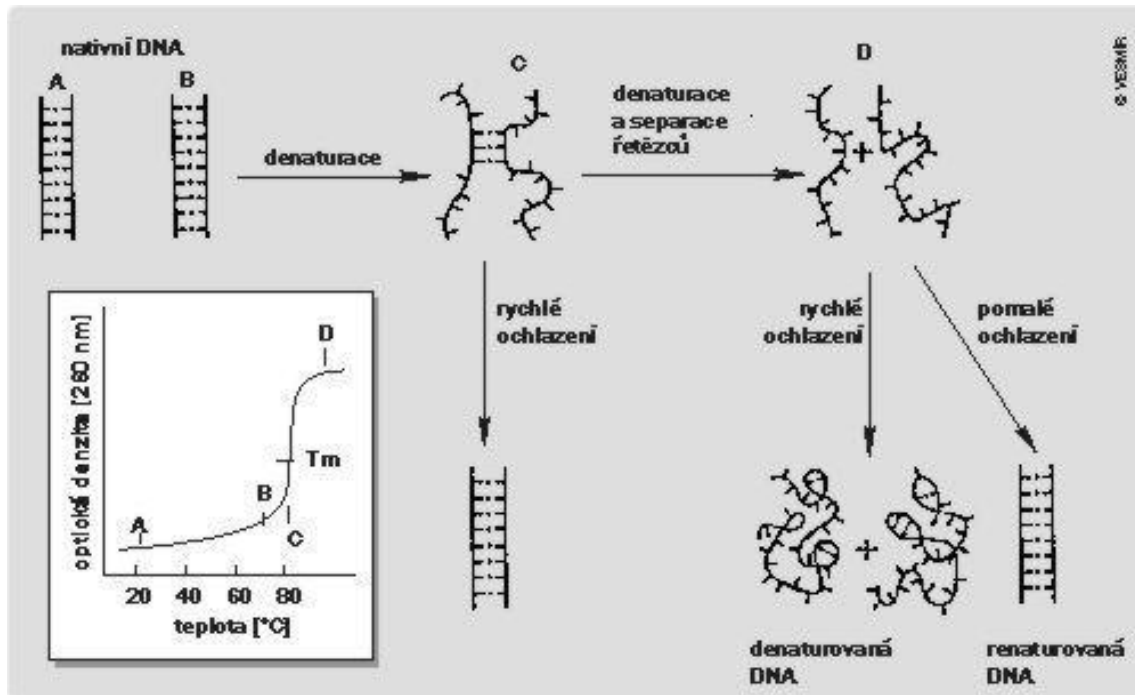
Cvičení:

- 1) Rébus – doplň informace místo otazníků:

?	?	RENATURACE
vznik dvouřetězcových molekul	?	?
-	lze ji navodit např. teplotou nad 90 °C, NaOH, močovinou	vznik homoduplexů i heteroduplexů

Princip:

- denaturace a renaturace DNA, závisící na specifickém párování bází mezi definovanou DNA (tzv. sonda) a zkoumaným vzorkem
- lze i hybridizovat DNA s RNA za vzniku dvouřetězcové hybridní molekuly DNA/RNA
- vznikají různě stabilní hybridy



Obrázek č. 8: Princip hybridizace²³

Hybridní molekuly = denaturované molekuly, ve kterých se spojily řetězce z DNA různých zdrojů. Hybridizovat mohou různé typy molekul např. DNA/DNA hybridy, DNA/RNA hybridy atd.

Postup:

Podle způsobu:

- V roztocích** (sleduje se spektrofotometricky)
- Na filtrech** (jedna z NK se imobilizuje)

Nejjednodušší je *tečkovaná hybridizace*, kdy vzorek testované NK je nanesen na membránu ve formě kapek. *Southernův* + *northernův* + *westernový přenos* je možný z gelu. Dále je přenos *pomocí bakteriálních kolonií*, *přenos otisku plaku*

²³ In: *Časopis VESMÍR: Renaturace a hybridizace DNA* [online]. E. Paleček, 1996 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1996/cislo-9/renaturace-hybridizace-dna.html>

a *zpětná hybridizace DNA* (soubor neznačených sond je imobilizován na pevném podkladu).

C. **V elektronovém mikroskopu** (př. analýza malých molekul – plazmidy, virová DNA)

D. **IN SITE** (přímo v cytologických preparátech)

Využití:

- Testy komplementarity sekvencí
- Testy genové exprese
- Amplifikace nukleových kyselin pomocí PCR
- Vyhledávání klonů nesoucích rDNA
- Testy paternity
- Identifikace osob
- Čipové technologie
- Prenatální diagnostika genetických chorob

Z praxe: Pokud chceme najít konkrétní sekvenci pomocí hybridizace, musíme obstarat NK (komplementární k hledané sekvenci) tzv. **DNA sondu** (= krátká jednořetězcová DNA – oligonukleotid o délce 10 – 1000 nukleotidů). ALE díky pokroku v chemii nukleotidů mohou být DNA sondy syntetizovány v laboratoři bez použití enzymů. Pomocí přístroje velikosti mikrovlnné trouby se dá vše naprogramovat tak, aby se spojily nukleotidy v určitém pořadí. Tato chemická syntéza vytváří jednořetězcové molekuly DNA libovolné sekvence do délky maximálně 120 nukleotidů.

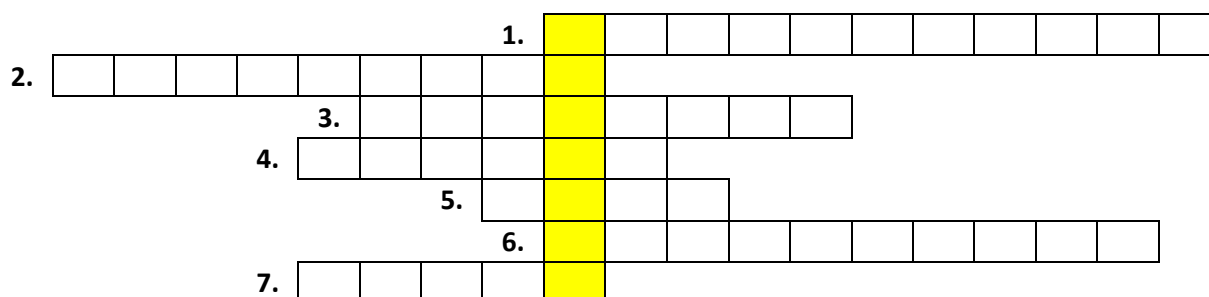
Cvičení:

2) Přiřaď k sobě správné dvojice:

annealing	úplná komplementarita řetězce
mismatches	částečná komplementarita řetězce
homoduplexy	nespárované úseky
hybridní molekuly	vznik dvouřetězcových struktur sloučením jednořetězcových polynukleotidů
heteroduplexy	denaturované molekuly, ve kterých se spojily řetězce z DNA různých zdrojů

3) Doplň křížovku

1. Nespárované úseky
2. Odborně „testy otcovství“
3. Jaké hybridy vznikají při hybridizaci
4. Kde se izoluje jedna z NK (množné číslo)
5. Forma technologie využití
6. Oddělení dvou řetězců dvoušroubovice DNA
7. Ovlivní denaturaci (složením, koncentrací, komplexitou, nukleotidovým složením)



Shrnutí:

Hybridizace je proces vytváření dvouřetězcových molekul z jednořetězcových DNA/RNA (úplná nebo částečná komplementarita bází). **Denaturace** je reverzibilní pochod, kdy dojde k oddělení 2 řetězců dvoušroubovicové molekuly DNA. Při **renaturaci** vznikají dvouřetězcové struktury sloučením jednořetězcových polynukleotidů (tzv. **ANNEALING**).

Vznikají **homoduplexy** i **heteroduplexy** a tzv. **MISMATCHES**. Hybridizovat můžou různé typy molekul např. DNA/DNA hybridy, DNA/RNA hybridy atd. Hybridizovat můžeme v roztocích, na filtrech, v elektronovém mikroskopu a v poslední řadě *in site*.

Pro více informací nebo zájem lze použít odbornou literaturu:

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*, 2007; Š

MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*, 2005;

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*, 2002.

Seznam zkratk:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

rDNA – rekombinantní deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

.....
Otázky pro zapamatování:

1. *Jaký je rozdíl mezi denaturací × hybridizací × renaturací?*
2. *Kde všude se může provádět hybridizace?*
3. *Nakresli hybridizační křivku a popiš ji.*
4. *Vyjmenuj alespoň 5 příkladů využití v praxi.*

2.5 Tematický celek - Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR = amplifikace (mnohonásobná replikace) relativně krátkých úseků specifické DNA

Základní nástroj molekulární biologie se vzrůstajícím významem i v dalších oborech (botanika, kriminalistika)

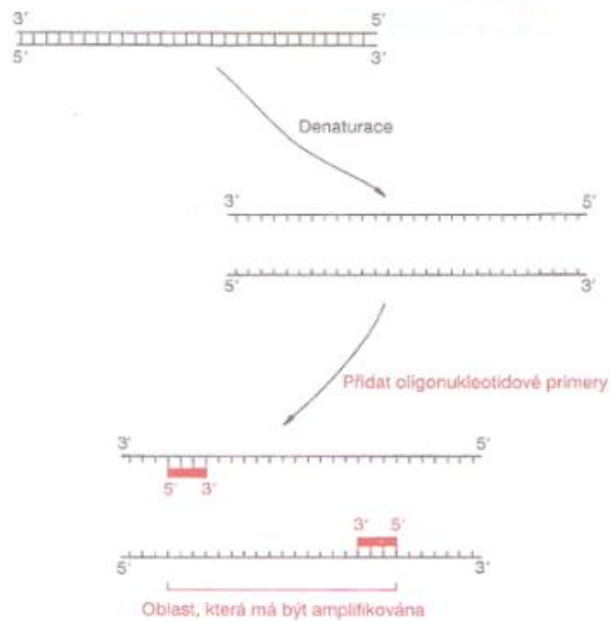
Primer = krátký specifický úsek DNA zaručující specifitu amplifikace

Princip:

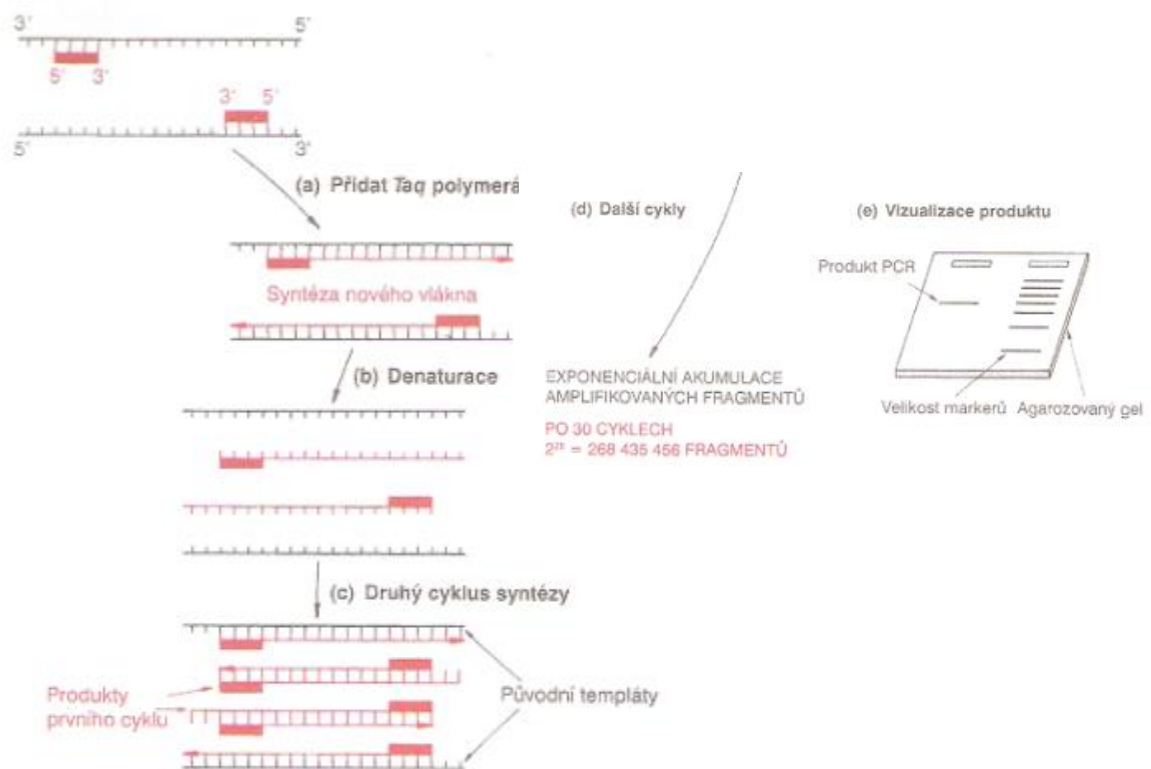
Reakční podmínky nejsou univerzální a délka trvání závisí na komplexnosti a délce specifického templátu.

Průběh reakce – teplotní cyklování

1. vysoká teplota (95 °C) → denaturace řetězců templátové DNA
2. snížení teploty (60 °C) → annealing primerů
3. teplota 72 °C → elongace prostřednictvím termostabilní *Taq* polymerázy



Obrázek č. 9: Princip PCR - denaturace a připojení primerů²⁴



Obrázek č. 10: Princip PCR - Elongace²⁵

²⁴ BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vydání V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

Cyklus se cca 40krát opakuje a množství amplifikované sekvence se exponenciálně zvyšuje.

DNA se vždy zapisuje ve směru od 5'ku 3'konci.

PCR se provádí v *termocyklerech*.

Cvičení:

1) Označ správné tvrzení:

PCR je:

- amplifikace relativně dlouhých úseků specifické DNA
- templátová DNA
- denaturace řetězců templátové DNA
- amplifikace relativně krátkých úseků specifické DNA

Krátký specifický úsek DNA zaručující specifitu amplifikace je:

- termocykler
- primer
- elongace

DNA se vždy zapisuje ve směru:

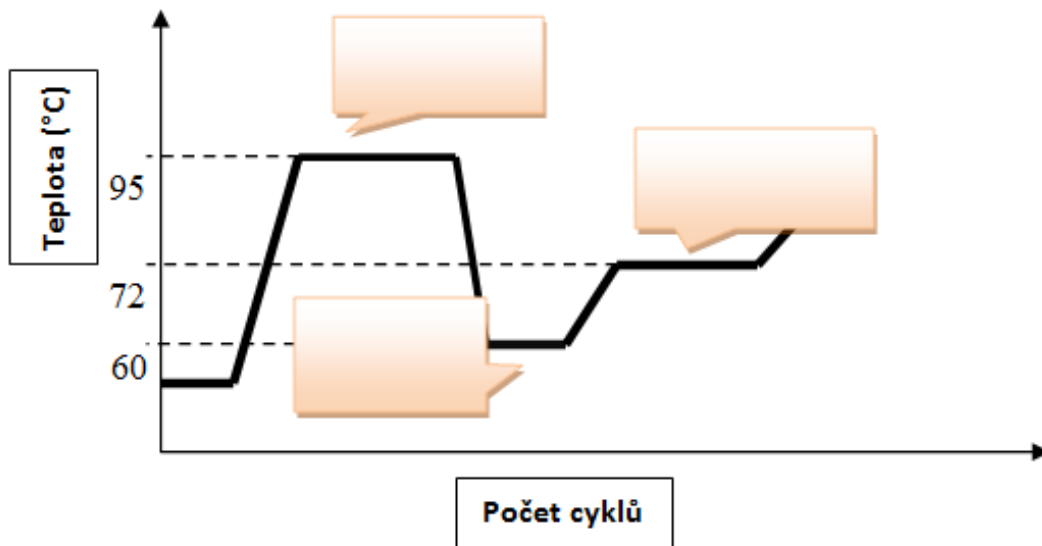
- od 1'ku 4'konci
- od 3'ku 5'konci
- od 5'ku 3'konci

PCR se provádí v:

- eppendorfkách
- termocyklerech
- kádinkách

²⁵ BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vydání V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

2) Doplň schéma:



Reakční směs obsahuje:

- ✓ templátová DNA (její kvalita ovlivní celkový výsledek PCR)
- ✓ 2 oligonukleotidové primery (ohraničují amplifikovanou sekvenci)
- ✓ termostabilní DNA polymeráza (*Taq*)
- ✓ volné dNTPs (2'-deoxyribonukletid-5'-trifosfát)
- ✓ reakční pufr s Mg^{2+} (kofaktor)
- ✓ aditiva (pro snadný průběh reakce)

Aplikace PCR a její využití v praxi:

- izolace genů, sekvence DNA, mutagenese in vitro, příprava značených sond
- prenatální diagnostika, detekce mutací v genech, studium genových polymorfizmů, populační genetika
- detekce patogenních mikroorganismů, identifikace onkogenů, nádorová typizace, určení pohlaví
- archeologie, soudnictví, kriminalistika^{26,27}

²⁶ ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

²⁷ KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.

Výhody PCR

- vysoká specifita a citlivost
- rychlost
- bezpečnost práce
- návaznost na ostatní vyšetření
- dobrá rozlišovací schopnost
- možnost automatizace

Nevýhody PCR

- délka amplifikovaného úseku
- nutnost znát sekvence ohraničující amplifikovaný úsek
- nepřesnost replikace (zdvojení)
- možnost kontaminace cizorodou molekulou DNA
- obtížnost kvantitativního stanovení

Shrnutí:

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je amplifikace relativně krátkých úseků specifické DNA. Průběh této reakce spočívá v teplotním cyklování. Nejdříve dochází k **denaturaci** řetězců templátové DNA při 95 °C. Následuje **annealing** primerů a v poslední fázi dojde k **elongaci** prostřednictvím termostabilní **Taq polymerázy**. DNA se zapisuje ve směru od 5'ku 3'konci. Cyklus se cca 40krát opakuje a provádí se v **termocyklerech**.

Pro více informací nebo zájem lze použít odbornou literaturu:

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně, 2007; Š*

MARDA, Jan. *Metody molekulární biologie, 2005;*

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie, 2002.*

Seznam zkratk:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

Taq polymeráza - termostabilní enzym pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*

Otázky pro zapamatování:

- 1. Definuj polymerázovou řetězovou reakci.*
- 2. Co je to primer?*
- 3. V jaké zařízení se PCR provádí a kolikrát?*
- 4. Napiš obsah reakční směs.*
- 5. Uveď alespoň 4 příklady využití v praxi.*

3 DIDAKTICKÝ ROZBOR

Na VOŠZ A SZŠ v Hradci Králové zatím není samostatný předmět Metody molekulární biologie, pouze je pár metod okrajově zmíněno v jiných odborných předmětech. Podle mě je to škoda, protože pokud by chtěl student po vystudování Laboratorního asistenta pracovat např. ve výzkumu, na genetice apod. tak by neměl dostatečné znalosti a musel by se nechat proškolit na příslušném pracovišti v řádu několika měsíců a možná let. Do budoucna bych navrhla alespoň 1 vyučovací hodinu týdně tohoto předmětu. Pokud by škola neměla vhodného kandidáta na výuku tohoto předmětu, navrhovala bych proškolení učitelů biologie nebo zajistila externistu pro kvalitní výuku.

Jelikož nejsem pedagog, nemám bohužel žádné zkušenosti s výukou. Proto jsem se snažila v didaktické části dodržet výukové cíle – afektivní, psychomotorické a kognitivní. Usilovala jsem o to, aby výukový text byl chronologicky uspořádaný, držel se hlavní myšlenky. Mnohé výzkumy poukazují na fakt, že informace do našeho mozku vstupují z 87 % očima, 9 % ušima a 4 % jinými smysly. Proto je důležité prezentovat informace více vizuálně než verbálně a tím upoutat pozornost studentů v dnešním digitálním světě.

Do výkladu bych zakomponovala animace, obrázky atd. pro lepší pochopení dané látky a také pro pestrost vyučovací hodiny. Zároveň bych tím chtěla aktivizovat studenty a podnítit je v dalším zájmu o tento předmět. Pokusila bych se zajistit i realistická videa a pomůcky z běžné praxe pro lepší názornost. Nebo bych zvolila vyučovací metodu typu exkurze do příslušného pracoviště, protože tím si žáci nejvíce zapamatují a motivují se. Třeba by to některé studenty zaujalo natolik, že by si zvolili praxi přímo v laboratoři, kde se tyto metody používají běžně a mohli by své zážitky a zkušenosti sdělit svým spolužákům.

V porovnání s učebnicemi, jsem vybrala podle mě jen ty nejdůležitější informace vhodné k odbornému zaměření a věku studentů 4. ročníku tohoto oboru. Kdyby někteří studenti jevíli zájem o více informací k výkladovému textu, odkázala bych je na odbornou literaturu (viz kniha Metody molekulární biologie a bioinformatiky, Zvárová, 2012 nebo kniha Speciální metody molekulární biologie, Mazura, 2001), kde by své znalosti mohli více prohloubit.

V úvodu jsem metodu izolaci nukleových kyselin stručně definovala a určila jaký je její cíl. Dále jsem krátce vyjmenovala typy postupů a již je dál nerozebírala. Jinak je tomu v jiných učebnicích, kde jsou nadbytečné podrobné poznámky, vhodné při studiu na vysoké škole. Nejpodstatnější je, aby studenti znali princip izolace NK. Kroky této metody jsem očíslovala a důležité pojmy k zapamatování odlišila v textu.

Pro fenol-chloroformovou extrakci jsem vytvořila názorný barevný obrázek s popisem. Na konci této kapitoly jsem se zmínila, co vše se dá izolovat.

Kdybych tuto metodu měla vykládat studentům 4. ročníku, na začátku vyučovací hodiny bych na tabuli vypsala složitější chemické názvosloví, enzymy, detergenty, extrakce, aby si studenti do svých sešitů zapsali přesné správné názvy místo „zkomolenin“. K mé interpretaci bych využila kombinaci videa a mluveného výkladu. Den předem bych si na internetovém serveru našla video s principem izolace nukleových kyselin, aby se studentům lépe osvojil výklad. A při výkladu bych jim zdůraznila, který pojmy si mají zapamatovat k písemnému nebo ústnímu zkoušení. Ke konci výuky bych studentům položila čtyři kontrolní otázky, zda pochopili danou látku a tím se ujistila v sebehodnocení. Případně bych se zamyslela nad tím, co bych při další výkladu změnila.

Velice krátce jsem se zmínila o centrifugačních metodách, kde jsem uvedla definici metody a její princip včetně obrázku schéma průběhu. Pro výuku těchto metod bych studentům přinesla ukázat eppendorfy, aby si je mohly „osahat“ a měli představu o její reálné velikosti. A po výkladu, by si studenti překreslili do svých sešitů schéma průběhu diferenciální centrifugace. Na konci hodiny bychom si společně zopakovali, co si z této hodiny odnesly za cenné informace v podobě třech kontrolních otázek.

Třetí nepoužívanější zmíněnou metodou je elektroforéza NK. Tuto obsáhlou kapitolu bych rozdělila do dvou vyučovacích hodin. První hodina by zahrnovala teoretický výklad, kde bych opět zdůraznila důležité pojmy, postupy, princip, elektroforetické gely, typy elektroforetických aparatur a na závěr faktory ovlivňující rychlost migrace. Pomocí interaktivní tabule bych jim ukázala, jak budou na konci druhé vyučovací hodiny vyhodnocovat elektroforeogram, který jim vznikne při laboratorním cvičení.

A ve druhé vyučovací hodině by si studenti vyzkoušeli ve skupinkách sami elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). V úvodu bych seznámila studenty s pravidly bezpečnosti a ti co by se chtěli zúčastnit pokusu, tak by si přinesli laboratorní plášť. Dále bych rozdělila studenty do skupin (např. při počtu 20 studentů na 1 třídu, se vytvoří 4 skupinky po 5 studentech) a rozdala bych jim zadání laboratorního cvičení (viz Příloha č. 1). Poté bych seznámila studenty s laboratorním cvičením, vysvětlila bych jim krátce princip a postup této elektroforézy a rozdala do jednotlivých skupin vybavení na daný pokus. Po provedení pokusu, by každá skupinka vyhodnotila celou jejich laboratorní práci s výsledky a shrnula to do závěru a protokol mi odevzdala ke kontrole.

Čtvrtou metodou je hybridizace, která je v učebnicích a odborných knihách psaná složitě a velmi odborně, tak jsem se jí snažila heslovitě a pomocí obrázku zjednodušit. Obsahuje opět definice pojmů, princip, postup a využití. Na konci kapitoly se opět nacházejí 4 kontrolní otázky, zda studenti výkladu porozuměli a zda se v učebním textu umí lehce orientovat.

Při výkladu této látky, bych každému studentovi na začátku hodiny rozdala natištěný obrázek a text neúplného výkladu (pracovní list). Poté bych na tabuli napsala cizí odborné a složitější názvy, aby si student správně napsal daný výraz do pracovního listu. Studenti by můj výklad měli bedlivě poslouchat a doplňovat slova do prázdných mezer v textu (viz Příloha č. 2). Pro zvýšení pozornosti mého odborného výkladu, bych hromadně studenty během výuky vyvolávala a zkontrolovala, zda mají správně doplněné pracovní listy.

U poslední páté molekulárně biologické metody, polymerázové řetězové reakce jsem opět kladla důraz na definici metody, princip, obsah reakční směsi a využití v praxi. Tato kapitola je hodně podrobně popsána v odborných publikacích, proto jsem usilovala o základním přehledu s nejdůležitějšími informacemi. V pedagogické praxi bych k výkladu principu použila opět názorně video z internetového serveru, které bych si den předem zkontrolovala. Také bych rozdala každému studentovi natištěný obrázek s průběhem polymerázové řetězové reakce. Zbytek výkladu by byl ústní a studenti by si dělali poznámky do svých sešitů. Opět bych na tabuli vypsala cizí a složitější pojmy, chemické názvy a enzymy. Na konci hodiny bych si ověřila pomocí interaktivní tabule jejich znalosti z probíhající hodiny. Znovu jako u předešlých molekulárních metod by ke konci výuky museli studenti odpovědět na 5 kontrolních otázek na konci kapitoly, neboť tato metoda je složitější na pochopení.

3.1 Informace o škole

Vytvořený učební text jsem zvolila pro Vyšší odbornou školu zdravotnickou a Střední zdravotnickou školu v Hradci Králové. Tuto školu jsem si zvolila, protože jsem tady sama studovala, ale bohužel jiný obor.

Podle internetového zdroje školy počátek této školy byl 1. září 1949, kdy se sloučila škola pro ženská povolání s ošetrovatelskou školou řádu Šedých sester. Tím vznikla vyšší sociálně-zdravotní škola se dvěma čtyřletými obory v centru Hradci Králové. V roce 2004 byla ke škole připojena jako odlučené pracoviště Střední zdravotnická škola Nový Bydžov a letos škola oslaví 70. výročí své existence.

Tato škola nabízí budoucím studentům studijní obor Laboratorní asistent. Po úspěšném složení maturitní zkoušky je absolvent oboru připraven k výkonu práce jako zdravotnický pracovník s odbornou způsobilostí, ale pod odborným dohledem. Což znamená, že v praxi identifikuje vzorky biologického materiálu, hodnotí jejich kvalitu pro daná laboratorní vyšetření. Pracuje s laboratorními chemikáliemi a sety a kontroluje jejich expiraci. Zdravotní laborant používá ke své práci laboratorní analyzátoři, laboratorní techniku a umí ji jak zabezpečit, tak i zajistit její běžnou údržbu. Také provádí na základě indikace doktora neinvazivní odběry biologického materiálu a odběry žilní a kapilární krve (např. v biochemické laboratoři provádí kapilární odběr z prstu u novorozenců dětí nebo kapilární odběr z prstu u diabetických pacientů při diabetické prohlídce). Dále poskytuje laboratorní měření a vyšetření.

Nebo může student pokračovat přímo zde na škole na Diplomovaného laboratorního asistenta, kdy dosáhne titulu Dis. za jménem. Pokud si student nezvolí Vyšší odbornou školu, tak by mohl studovat vysokou školu např. Univerzitu Pardubice, Fakultu Chemicko-technologickou a zde studovat bakalářský studijní program Zdravotní laborant, kde dosáhne titulu Bc. před jménem. Tito absolventi pracují bez odborného dohledu a dosáhnou uplatnění zejména v laboratořích klinické biochemie, hematologie a krevní transfuze, mikrobiologie, imunologie, patologie, histologie, genetiky a genetické cytologie, toxikologie a v dnešní době nejvíce nejžádanější reprodukční medicíny. Ale také najdou uplatnění i v jiných laboratorních zařízeních jako jsou např. laboratoře hygienických stanic, potravinářské stanice, vodohospodářské stanice, anebo ve výzkumu.

Studium na Střední zdravotnické škole je čtyřleté, kdy v prvním a ve druhém ročníku převládají jazykové, společenskovední a přírodovědné předměty. S odbornými předměty se studenti setkávají až ve třetím a čtvrtém ročníku buď formou praktické výuky v odborných učebnách, anebo navštěvují odborná pracoviště, se kterými má škola smlouvu. Mnou vytvořený učební text bych doporučila právě studentům třetího ročníku, kteří mají v sylabu předmětů Cvičení z mikrobiologie, Imunologie a epidemiologie zahrnuté kromě zpracování biologického materiálu, laboratorní diagnostické postupy atd. i molekulárně biologické metody. V těchto cvičeních by si studenti mohli prakticky vyzkoušet základní molekulární metody, které jim popisují i s obrázky pro snazší pochopení. I když vhodnější by bylo využití těchto cvičení až ve čtvrtém ročníku, kdy budoucí „maturanti“ mají v sylabech předmětů Biochemie, Vybrané laboratorní metody, Cvičení z histologie a histologické techniky osnovy navazující na Molekulární biologické metody. Tím by se jim informace z jednotlivých předmětů propojily a studenti by mezitím viděli souvislosti a lépe by se jim učivo pamatovalo.

Závěrem o škole lze říci, že podle jejich informačních zdrojů spolupracuje s mnoha partnery, jako jsou např. Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Oblastní nemocnice v Náchodě a dalšími státními či soukromými zdravotnickými zařízeními v Královéhradeckém kraji.

3.2 Komentář vlastního učebního textu

Vlastní učební text Metody molekulární biologie jsem se snažila zjednodušit oproti ostatním obtížnějším textům v učebnicích. Tato disciplína integruje znalosti z chemie, biologie i z fyziky. Je určen studentům 4. ročníků oboru Laboratorní asistent. Mým cílem bylo vytvořit zjednodušeně postupy, principy, praktické využití atd. jednotlivých metod, aby se studenti lépe orientovali v textu a zapamatovali si jen to podstatné k dané kapitole. K tomu jsem využila možnosti Microsoft Word, kdy jsem nejčastěji používala k označení důležitého pojmu kurzívu, tučný text, podtržení, velikost písma aj. Snažila jsem se pro lepší zapamatování číslovat i postupy.

Pro úplnost je uveden na začátku učebního textu seznam zkratk odborných výrazů. Součástí předkládaného textu jsou obrázky, které mají studentům usnadnit představu o fungování jednotlivých metod.

Základní myšlenkou bylo zdůraznit kapitolu Metody molekulární biologie (izolace NK, centrifugační metody, hybridizace, PCR) a nově ji zařadit do kurikula středoškolského systému, proto jsem si toto téma vybrala. Podle mě tyto metody patří k nejzákladnějším kamenům molekulární biologie a je dobré se s nimi seznámit už na středních odborných školách. V dnešní době mají široké využití nejen v aplikovaném genetickém výzkumu, kdy se už umí detekovat mutace v genech nebo se připravit geneticky modifikovaný organismus, ale také uplatnění najdeme v genovém inženýrství. V archeologii umožní poznat evoluční historii a zkonstruovat fylogenetické mapy. V oboru zoologie dochází k testování identity jedinců vzácných zvířat, rodokmenů zvířat. Klinická medicínská diagnostika detekuje patogenní mikroorganismy, identifikuje onkogeny, určí pohlaví a především diagnostikuje dědičné choroby. A také v botanice, kriminalistice, v soudním lékařství. V dnešní moderní době, jde věda neustále dopředu a právě tyto metody se optimalizují a to pro nás znamená, že je umožněna včasná a především přesná diagnostika a stačí k tomu pouze minimální množství biologického materiálu.

4 ZÁVĚR

Komenského přísloví „škola bez kázně – mlýn bez vody“ platí i v dnešní moderní době při aplikaci moderních přístupů. Jakožto možná budoucí pedagog mám asi naivní představy o kázni studentů při vyučování, o vztahu mezi učitelem a studentem nebo o zájmu o předmět Molekulární biologie. V této závěrečné práci bych chtěla ukázat studentům, jak lze „osvěžit“ novými přístupy výuku a předat jim zkušenosti z vlastní odborné praxe.

Navrhovaný učební text je vytvořený pro studenty 4. ročníků na VOŠZ A SZŠ v Hradci Králové, pro budoucí předmět Molekulární biologie. Hlavní motivací bylo seznámit studenty se specifickými metodami molekulární biologie již na středních školách, aby v navazujícím studiu buď na Vyšší odborné zdravotnické škole příp. bakalářském programu na tyto vybrané metody nabalovali další nové informace a tím byli úspěšnější ve svém budoucím povolání. Molekulární biologie je bouřlivě se rozvíjející se obor, proto je povinností pedagoga neustále doplňovat nové poznatky, sledovat novinky a sebevzdělávat se, což zabere mnoho energie a volného času. Z tohoto důvodu jsem se pokusila didakticky transformovat, tzn. převést odborný výklad do zjednodušené a srozumitelné formy.

Dnes pedagogové využívají ve svých výukách hodně prezentace v Power Pointu a některé studenty to už nudí. Také to může ovlivnit i nechuť koupit si učebnici, protože informace se dají stáhnout kdekoli na internetu a není to tolik finančně náročné. V jednom pro mě zajímavém článku jsem se dočetla poutavou radu, kterou bych jednou ráda využila i ve své pedagogické praxi. A to, že didaktické možnosti se dají najít i na Facebooku. Stačí jen založit skupinu studentů, jednoho praktika kroužku a pak např. vyhlásit soutěž za nejlepší snímek elektroforeogramu pomocí mobilu či tabletu. V on-line světě se dají hrát i orientované výukové hry zaměřené na biologii. Takovou dobře hodnocenou hrou je Foldit nebo ještě nedokončená hra Cellival, kdy její hráč může získat i spoluautorství v časopise Nature.

Další tip přínosu bych viděla v exkurzích na jednotlivá specifická pracoviště nebo možnost vyzkoušet si molekulární biologická praktická cvičení na Univerzitě Karlově na Přírodovědecké fakultě v Praze. Tyto cvičení obvykle vede kvalifikovaný odborník a učitel by se tak mohl začlenit mezi studenty a vyzkoušet si práci na speciálních analyzátoch. Nebo lze si i lektora s odborným programem objednat na školu. Úspěšní studenti by se mohli kromě zájmových kroužků zúčastnit i olympiád z molekulární biologie, což má pozitivní dopad na školu.

5 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ

- [1] NAVRÁTIL, Stanislav a Jan MATTIOLI. *Vyučování, učení a kvalita vzdělání pro 21. století*. Praha: Univerzita Jana Amose Komenského, 2013. ISBN 978-80-7452-034-1.
- [2] PRŮCHA, Jan. *Moderní pedagogika*. 5., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Portál, 2013. ISBN 978-80-262-0456-5.
- [3] NAVRÁTIL, Stanislav a Jan MATTIOLI. *Vyučování, učení a kvalita vzdělání pro 21. století*. Praha: Univerzita Jana Amose Komenského, 2013. ISBN 978-80-7452-034-1.
- [4] VINTER, Vladimír a Ivo KRÁLÍČEK. *Začínající učitel biologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016, s 44 - 48. ISBN 978-80-244-5021-6.
- [5] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [6] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [7] JANŠTOVÁ, Vanda a Martin JÁČ. Scientia in educatione. *SCIED: Výuka molekulární biologie na gymnáziích: analýza současného stavu a možnosti její podpory*. 2015, 6(1), 14 - 39. ISSN 1804-7106.
- [8] SKALKOVÁ, Jarmila. *Obecná didaktika: vyučovací proces, učivo a jeho výběr, metody, organizační formy vyučování*. Praha: Grada, 2007. Pedagogika (Grada). ISBN 978-80-247-1821-7.
- [9] JANÍK, Tomáš. *Didaktické znalosti obsahu a jejich význam pro oborové didaktiky, tvorbu kurikula a učitelské vzdělávání*. Brno: Paido, 2009. Pedagogický výzkum v teorii a praxi. ISBN 978-80-7315-186-7.
- [10] PETTY, Geoffrey. *Moderní vyučování*. Vyd. 3. Praha: Portál, 2004. ISBN 80-7178-978-x.
- [11] SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: ROTH, Leo. *Pädagogik: Handbuch für Studium und Praxis*. München: Ehrenwirth, 1991, s. 181-183. ISBN 9783431030242.
- [12] SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: SKATKIN, Michail Nikolajevič a Michail Aleksandrovič DANILOV. *Didaktika střední školy: vysokoškolská příručka pro posluchače fakult připravujících učitele*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1982. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).

[13] SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: MIALARET, G. *Pédagogie générale*. Paris, PUF 1991.

[14] SKALKOVÁ, Jarmila. Obecná didaktika. In: BABANSKIJ, J.K.: *Optimalizace vyučovacího procesu*. Praha, SPN 1979.

ZDROJ OBRÁZKŮ

[1] In: *LAB MARK a. s.* [online]. Praha 6, 2019 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://www.labmark.cz/protein-lobind-tubes-0-5ml-pcr-clean>

[2] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 9788024439518.

[3] In: *Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. Eva Bártová, 2011 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz

[4] In: *Technická univerzita* [online]. Liberec, 2018 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://nanoed.tul.cz/course/view.php?id=52>

[5] In: *Časopis VESMÍR: Renaturace a hybridizace DNA* [online]. E. Paleček, 1996 [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1996/cislo-9/renaturace-hybridizace-dna.html>

[6] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vydání V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

Příloha č. 1 *Laboratorní cvičení*

Laboratorní cvičení z Metod molekulární biologie

Jméno:

Datum:

Skupina:

**Úkol: Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) - separace bílkovin
Analýza frakcí Imunoglobulinu G (IgG) získaných izolací ze séra různými
technikami**

Princip metody:

Širokého uplatnění se SDS-PAGE dočkala v kombinaci s užitím aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS se váže pevně k proteinům, mění jejich tvar do válcovité podoby a denaturuje je, aby získaly podobný tvar a hustotu náboje. SDS-PAGE je rychlá, jednoduchá, reprodukovatelná metoda pro kvalifikovanou charakterizaci a srovnání bílkovin. SDS se váže na bílkovinný řetězec v poměru 1,4 g SDS na 1g bílkoviny, kde délka komplexu SDS-bílkovina je úměrná jeho Mr. Určení relativní molekulové hmotnosti (Mr) je pak možné na základě srovnání relativních mobilit neznámé bílkoviny a standardů. Detekce separovaných látek je pak pomocí barvení Coomassie brilliant blue.

Potřeby:

- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad)
- mikropipety, mikrozkuřavky, Hamiltonova stříkačka
- roztok A: 30% směs akrylamidu a bisakrylamidu
- roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8
- roztok C: 1,0M Tris-Hcl pufr pH 6,8
- roztok D: 10% roztok SDS
- roztok E: 10% roztok persíranu amonného
- TEMED (N,N,N,N-tetramethylenethyldiamin)
- roztok F: 100mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 200mM merkaptoethanolem, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- roztok G: 100mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- elektrodový pufr: 0,025M Tris, 0,192M glycin s 0,1% SDS pH 8,3 – 8,6

Postup:

- 1) Před vlastní prací vyleštíte skla etanolem. Do stojánku umístěného na rovné ploše umístíte skla tak, aby kratší sklo bylo směrem dopředu a svorky rámečku mířily do stran.
- 2) Přípravte **10% dělicího gelu**: Podle tabulky napipetujte do zkumavky destilovanou vodu, roztok A, B a D. Po odvzdušnění membránovou vývěvou přidejte roztok E a TEMED. Roztok promíchejte a ihned napipetujte mezi skla, až roztok dosáhne horního okraje svorek rámečku. To celé převrste destilovanou vodou. Během 20-30 minut “dělicí gel” polymeruje a vytvoří se ostré rozhraní mezi gelem a vrstvou vody. Po zpolymerování gelu destilovanou vodou opatrně vodu odsajte filtračním papírem.
- 3) Přípravte **5% zaostřovacího gelu**: Podle tabulky napipetujte destilovanou vodu, roztok A, C a D a po odvzdušnění membránovou vývěvou přidejte roztok E a TEMED. Směs promíchejte a napipetujte na zpolymerovaný dělicí gel až k okraji skel. Mezi skla vložte šablonu s 10 jamkami. Během 15 minut směs polymeruje. Skla vyjměte ze stojánku, otevřte svorky a skla přemístěte do speciálního držáku tak, že kratší skla mířila dovnitř aparatury proti sobě. Opatrně upevněte zářezky a celé to umístíte do elektroforetické vany. Z gelů odstraňte šablonu a vytvořené jamky pro vzorek propláchněte elektrodovým pufrům a do elektroforetické vany nalijte elektrodový pufr po vyznačené rysky.

Schéma přípravy polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE:

	5% zaostřovací gel (ml)	10% dělicí gel (ml)
Destilovaná voda	1,4	2,0
Roztok A (odvzd. v ultrazvuku)	0,33	1,65
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
Roztok E	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

- 4) **Příprava vzorků pro elektroforetickou separaci:** (pro přípravu použijte mikrozkušavky)

- vždy příprava 10 μ l určitého vzorku (popřípadě navíc i ředění) + 10 μ l roztoku G nebo F

jamka	vzorek/roztok
1	molekulový marker 10-250 kDa
2	odsolené sérum zředěné fosfát. pufrem 1:10/G
3	Ig G z kolony/G
4	zbytkové bílkoviny z vazebné frakce z kolony řed. 1:4/G
5	IgG z magnetu/G
8	zbytkové bílkoviny z vazebné frakce z magnetu řed. 1:1/G
9	rozvolněné IgG/F
10	původní vzorek IgG/G

Směsi promíchejte a 3 minuty je povařte v blokovém termostatu.

- 5) Připravené jamky vypláchněte 3x elektrodoým pufrem. Do každé jamky napipetujte 15 μ l připravených vzorků a 8 μ l molekulového markeru pomocí Hamiltonovy pipety.
- 6) Poté proběhlo elektroforetické dělení při napětí 180 V a proudu 120 mA. Pro barvení gelu použijte techniku barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue.

Závěr:

Příloha č. 2 *HYBRIDIZACE*

Hybridizace = vytváření DNA/RNA za podmínkou, že se jejich sekvence vyznačí nebo komplementaritou bází.

..... = reverzibilní pochod oddělení 2 řetězců dvoušroubovicové molekuly DNA

Lze ji navodit: vysokou teplotou (nad °C), (př. roztok NaOH)

a činidly (př. formamid, močovina)

Renaturace = vznik dvouřetězcových struktur sloučením (tzv.) za vhodných podmínek

Lze ji navodit: pomalým (zahájení na 65°C) a rychlým ochlazováním

Vznikají (= úplná komplementarita řetězce), ale i **heteroduplexy** (=) a nespárované úseky (tzv. **MISMATCHES**), které stabilitu hybridu.

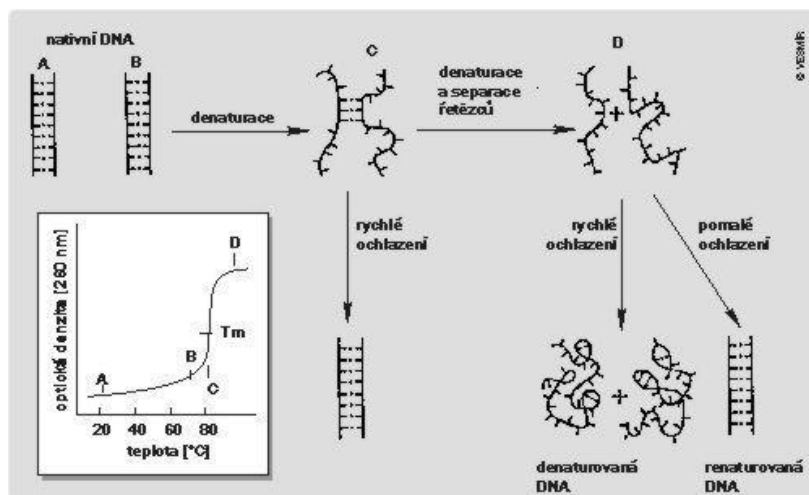
Ovlivňuje ji:

.....

Princip:

..... a DNA, závisející na specifitě párování bází mezi (tzv. sonda) a

Ize i hybridizovat DNA s RNA za vzniku dvouřetězcové hybridní molekuly DNA/RNA vznikají různě stabilní hybridy



..... = denaturované molekuly, ve kterých se spojily řetězce z DNA různých zdrojů. Hybridizovat můžou různé typy molekul např. DNA/DNA hybridy, DNA/RNA hybridy atd.

Postup:

Podle způsobu:

..... (sleduje se spektrofotometricky)

..... (jedna z NK se imobilizuje)

Nejjednodušší je *tečkovaná hybridizace*, kdy vzorek testované NK je nanesen na membránu ve formě kapek. *Southernův + northernův + westernový přenos* je možný z gelu. Dále je přenos *pomocí bakteriálních kolonií, přenos otisku plaku a zpětná hybridizace DNA* (soubor neznačených sond je imobilizován na pevném podkladu).

..... (př. analýza malých molekul – plazmidy, virová DNA)

IN SITE (přímo v cytologických preparátech)

Využití:

Testy komplementarity sekvencí

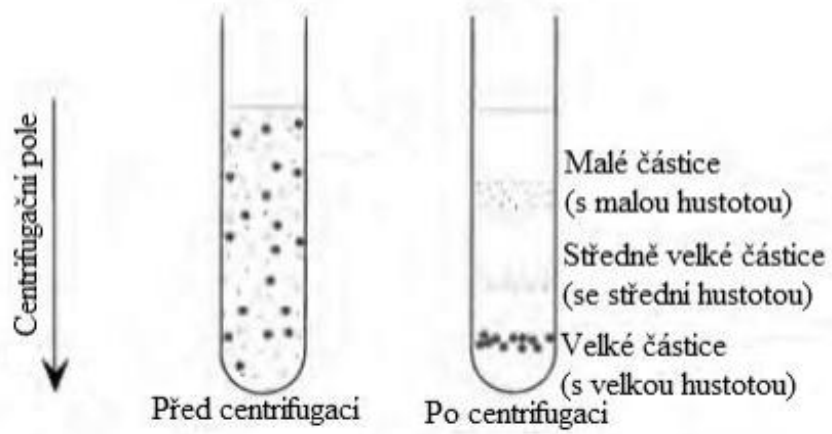
.....
.....

Vyhledávání klonů nesoucích rDNA

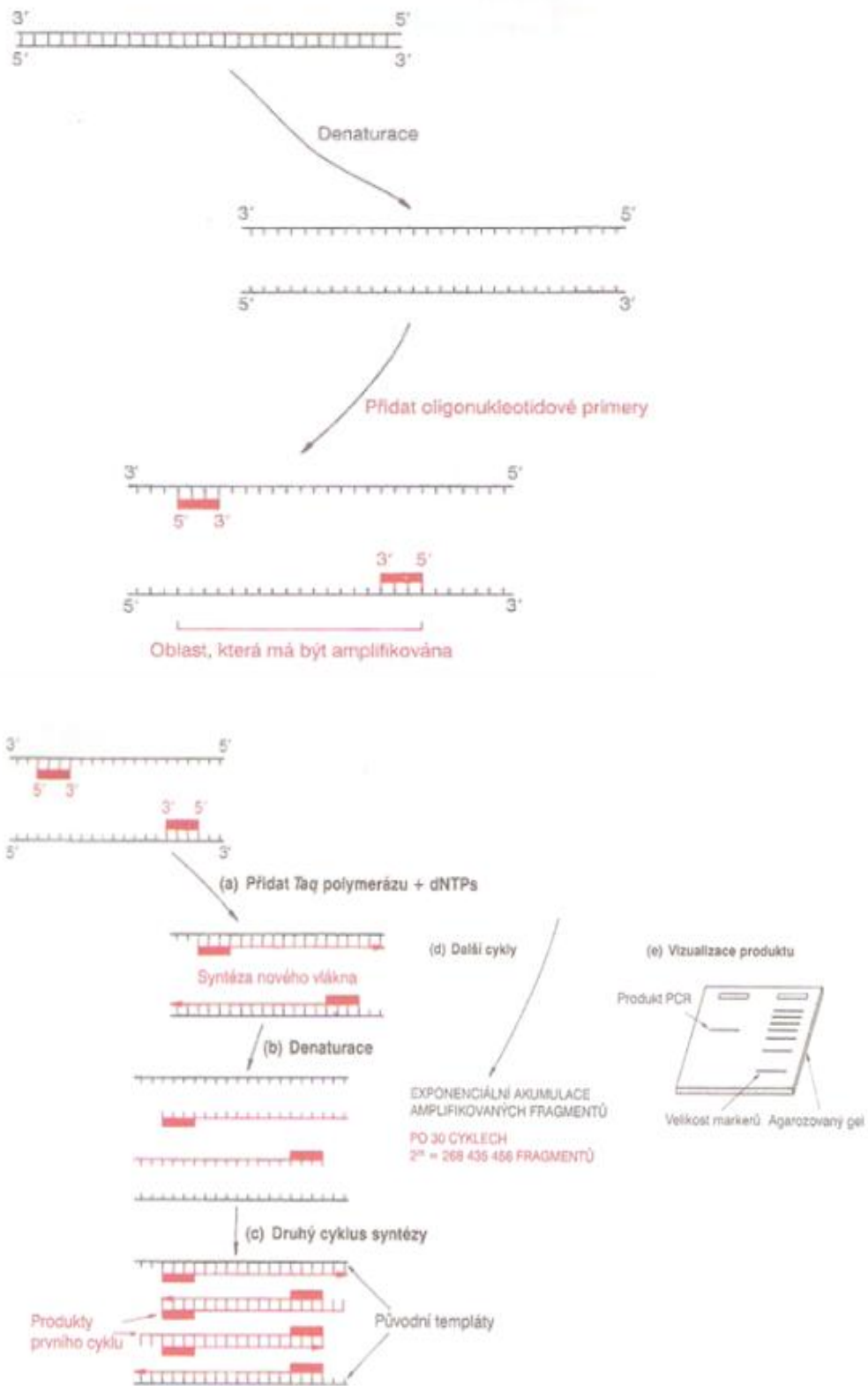
Testy paternity

.....
.....

Příloha č. 3 Schéma průběhu diferenciální centrifugace



Příloha č. 4 Princip PCR – denaturace, připojení primerů a elongace



Příloha č. 5 Správné odpovědi

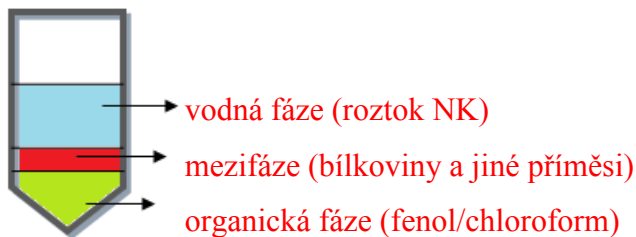
1. Izolace NK

Cvičení:

1) Co patří mezi zdroj DNA, správnou odpověď zakroužkuj:

bioptický materiál	H ₂ SO ₄	zuby	krev	voda
kosterní pozůstatky	plast	nehet	ponožka	mobil

2) Doplň popis k obrázku:



3) Přiřad' k sobě správné dvojice:

CHLOROFORM	organické rozpouštědlo, odděluje proteiny od NK
IZOPROPANOL	malé dvouřetězcové kružnicové molekuly
FENOL	denaturuje proteiny, rozpouští lipidy a odděluje fáze v dalších krocích
PLAZMIDY	vysráží NK

4) Označ správné tvrzení:

- Pomocí enzymů lysozymu a celulózy se dají rozrušit buněčné stěny a virové kapsidy.
- Dodecylsulfát lithný slouží k odstranění kontaminantů.
- Detergenty rozpouští cytoplazmatickou membránu.

2. Centrifugační metody

Cvičení:

1) Doplň chybějící slova do věty:

Centrifugace slouží v molekulární biologii k izolaci, purifikaci a charakterizaci biomolekul a buněčných struktur.

Centrifugačním zkumavkám říkáme eppendorfky .

Hodnota S veličina charakterizující rychlost pohybu částice při centrifugaci.

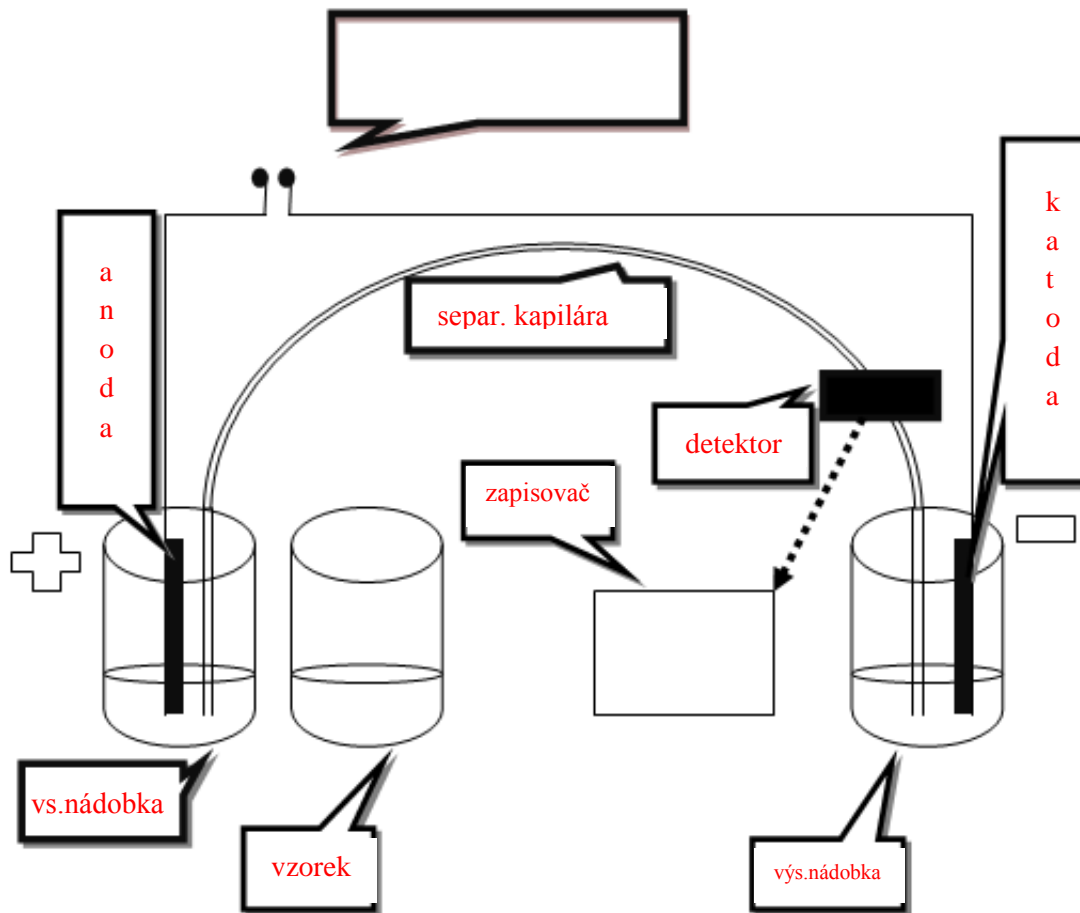
Rychlost sedimentace závisí na **velikosti**, **tvaru**, **hustotě** částic a také na vlastnostech **prostředí** a **podmínkách** centrifugace.

Po centrifugace jsou velké částice **dole** a malé částice najdeme **nahore**.

3. Elektroforéza NK

Cvičení:

1) Doplň schéma kapilární elfy podle výkladu:



2) Doplň křížovku:

1.	e	l	e	k	t	r	i	c	k	é	p	o	l	e		
2.	p	o	l	y	a	k	r	y	l	a	m	i	d	o	v	é
3.	g	e	l	y												

hybridizace	denaturace	RENATURACE
vznik dvouřetězcových molekul	reverzibilní pochod oddělení 2 řetězců molekuly DNA	vznik dvouřetězcových struktur
-	lze ji navodit např. teplotou nad 90 °C, NaOH, močovinou	vznik homoduplexů i heteroduplexů

2) Přiřad' k sobě správné dvojice:

annealing	úplná komplementarita řetězce
mismatches	částečná komplementarita řetězce
homoduplexy	nespárované úseky
hybridní molekuly	vznik dvouřetězcových struktur sloučením jednořetězcových polynukleotidů
heteroduplexy	denaturované molekuly, ve kterých se spojily řetězce z DNA různých zdrojů

4) Doplň křížovku

	1.	h	o	m	o	d	u	p	l	e	x	y
2.	p	a	t	e	r	n	i	t	y			
	3.	s	t	a	b	i	l	n	í			
	4.	f	i	l	t	r	y					
	5.	č	i	p	y							
	6.	d	e	n	a	t	u	r	a	c	e	
	7.	s	o	n	d	y						

1. Nespárované úseky
2. Odborně „testy otcovství“
3. Jaké hybridy vznikají při hybridizaci
4. Kde se izoluje jedna z NK (množné číslo)
5. Forma technologie využití
6. Oddělení dvou řetězců dvoušroubovice DNA
7. Ovlivní denaturaci (složením, koncentrací, komplexitou, nukleotidovým složením)

3) PCR

Cvičení:

1) Označ správné tvrzení:

PCR je:

- amplifikace relativně dlouhých úseků specifické DNA
- templátová DNA
- denaturace řetězců templátové DNA
- amplifikace relativně krátkých úseků specifické DNA

Krátký specifický úsek DNA zaručující specifitu amplifikace je:

- termocykler
- primer
- elongace

DNA se vždy zapisuje ve směru:

- od 1'ku 4'konci
- od 3'ku 5'konci
- od 5'ku 3'konci

PCR se provádí v:

- eppendorfkách
- termocyklerech
- kádinkách

2) Doplň schéma:

