

OBSAH

PŘEDMLUVA	6
1. ČÁST TEORETICKÁ.....	7
1.1 Molekulární ekologie mikroorganismů a její přístupy	8
1.1.1 Úvod do problematiky molekulární ekologie	8
1.1.2 Mikrobiální ekologie.....	9
1.1.3 Molekulární mikrobiální ekologie	10
1.1.4 Úvod do taxonomie mikroorganismů	11
1.1.5 Abundance a diverzita prokaryot a eukaryot	23
1.1.6 Struktura společenstva mikroorganismů.....	26
Použitá a doporučená literatura	31
1.2 Metody molekulární ekologie mikroorganismů	35
1.2.1 Výběr vhodného markeru.....	36
1.2.2 Struktura a diverzita společenstva.....	37
1.2.3 Abundance a denzita mikroorganismů	37
1.2.4 Analýza funkčních genů.....	38
1.2.5 Metody založené na PCR.....	41
1.2.6 Molekulární techniky, které nezahrnují PCR.....	49
1.2.7. Příklad použití molekulárních technik v mikrobiální ekologii	51
Použitá a doporučená literatura	55
2. ČÁST METODOLOGICKÁ.....	58
2.1 Úvod	59
2.1.1 Problematika nukleových kyselin	59
Použitá a doporučená literatura	63
2.2 Mikroskopické metody	64
2.2.1 Principy fluorescenční mikroskopie.....	64
2.2.2 Stanovení přímých počtů (mikrobiální abundance).....	65
2.2.3 Stanovení životaschopnosti buněk	66
2.2.4 Fluorescenční „ <i>in situ</i> “ hybridizace	67
Použitá a doporučená literatura	73
2.3 Extrakční metody.....	74
2.3.1 Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin.....	74

2.3.2 Adsorpce na silikát.....	75
2.3.3 Izolace RNA.....	75
2.3.4 Kontrola izolace nukleových kyselin.....	76
Použitá a doporučená literatura	77
2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	78
2.4.1 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR).....	81
2.4.2 Asymetrická PCR.....	84
2.4.3 Touchdown PCR.....	84
2.4.4 Multiplex PCR	85
2.4.5 Nested PCR.....	85
2.4.6 RT-PCR.....	85
Použitá a doporučená literatura	86
2.5 Fingerprinting společenstva mikroorganismů	87
2.5.1 Separační metody.....	87
2.5.2 Restrikční metody	90
Použitá a doporučená literatura	96
2.6 Klonování přírodní DNA.....	97
Použitá a doporučená literatura	99
2.7 Sekvenování DNA.....	100
2.7.1 Sangerova enzymatická metoda.....	100
2.7.2 Metody sekvenování nové generace (NGS).....	101
Použitá a doporučená literatura	103
2.8 Základy fylogenetiky a bioinformatiky	104
2.8.1 Fundamentální podstata fylogenetiky	104
2.8.2 Sekvenační data.....	104
2.8.3 Konstrukce fylogenetického stromu	106
2.8.4 Metody konstrukce fylogenetického stromu.....	106
Použitá a doporučená literatura	108
3. ČÁST PRAKTICKÁ.....	109
3.1 Stanovení mikrobiální abundance s využitím sonikace a hustotní centrifugace	110
3.2 Stanovení podílu živých a mrtvých buněk pomocí metody LIVE/DEAD	112
3.3 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	114

3.4 Izolace DNA	121
3.4.1 Izolace DNA pomocí Power Water DNA Isolation Kit.....	121
3.4.2 Izolace DNA pomocí Power Soil DNA IsolationKit.....	122
3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	124
3.6 Gelová elektroforéza.....	127
3.7 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	129
3.8 Klonování genů.....	134
3.9 Práce s programy	138
3.9.1 Práce s analýzou obrazu – NIS Elements.....	138
3.9.2 Práce s programem Gel2k.....	140
Použitá a doporučená literatura	143
4. SLOVNÍČEK POJMŮ	145