

# Obsah

<b>Předmluva</b> .....	9
<b>1. Historické mezníky v rozvoji molekulární biologie a genetiky</b> .....	10
<b>2. Lékařská genetika a dědičně podmíněné choroby</b> .....	14
2.1 Monogenně podmíněné choroby .....	14
2.1.1 Autosomálně dominantní choroby .....	14
2.1.2 Autosomálně recesivní choroby .....	15
2.1.3 Gonosomálně recesivní choroby .....	16
2.1.4 Gonosomálně dominantní choroby .....	17
2.2 Chromosomové aberace .....	18
2.3 Choroby s multifaktoriálním typem dědičnosti .....	18
2.4 Mitochondriální genetické choroby .....	19
<b>3. Struktura a funkce nukleových kyselin</b> .....	20
3.1 Základní informace o struktuře nukleových kyselin .....	20
3.2 Genofory jako nosiče genetické informace .....	21
3.3 Funkce molekul RNA v buňce .....	22
3.3.1 Kódující molekuly RNA .....	22
3.3.2 Malé nekódující molekuly RNA .....	23
3.3.3 Velké nekódující molekuly RNA .....	24
3.4 Gen jako základní jednotka genetické informace .....	24
3.5 Genové repetice .....	26
3.6 Genetický kód .....	26
<b>4. Variabilita lidského genomu</b> .....	28
4.1 Charakteristika genomu člověka .....	28
4.1.1 Jedinečné genomové sekvence .....	28
4.1.2 Repetitivní genomové sekvence .....	29
4.1.2.1 Tandemové repetice .....	29
4.1.2.2 Rozptýlené repetice .....	30
4.2 Faktory podmiňující variabilitu genomu .....	30
4.3 Koncepce pojmů mutace a genetický polymorfismus .....	31
4.4 Hardy-Weinbergova rovnováha a vazebná nerovnováha .....	32
4.4.1 Hardy-Weinbergův zákon .....	32
4.4.2 Faktory narušující Hardy-Weinbergovu rovnováhu .....	33
4.5 Typy genetického polymorfismu .....	33
4.6 Příčinné mutace .....	35
4.7 Názvosloví příčinných mutací .....	36
4.8 Vyšetření mutací a genetických polymorfismů .....	37
4.9 Epigenetické změny v lidském genomu .....	39

4.9.1	Methylace DNA	39
4.9.2	Methylace DNA a genetické choroby	40
<b>5.</b>	<b>Izolace nukleových kyselin</b>	<b>41</b>
5.1	Principy izolačních metod	41
5.1.1	Fenol-chloroformová extrakce	42
5.1.2	Vysolovací extrakční metoda	42
5.1.3	Guanidinová extrakční metoda	42
5.1.4	Extrakce pomocí separačních kolonek	42
5.1.4.1	Adsorpční extrakční mikrokolonky	42
5.1.4.2	Iontoměničové extrakční mikrokolonky	43
5.1.4.3	Mikroafinitní extrakční mikrokolonky	43
5.1.4.4	Extrakční kolonky na bázi ultrafiltrace a gelové filtrace	44
5.1.5	Extrakce NK pomocí separačních špiček	44
5.2	Specifické faktory ovlivňující účinnost extrakce molekul RNA	44
5.3	Purifikace molekul DNA a RNA	45
5.4	Charakteristika izolovaných a purifikovaných molekul NK	45
5.5	Archivace extraktů NK	47
5.6	Etické zásady při práci s nukleovými kyselinami	47
5.7	Nejčastější chyby při práci s NK a možnosti jejich prevence	48
<b>6.</b>	<b>Reverzní transkripce</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Elektroforéza nukleových kyselin</b>	<b>52</b>
7.1	Používaná separační média	52
7.1.1	Agarosové gely	52
7.1.2	Akrylamidové gely	53
7.2	Přístrojové vybavení pro elektroforézu NK	54
7.3	Vizualizace NK v elektroforetickém gelu	54
7.4	Aplikace vzorků NK do elektroforetických gelů	55
7.5	Kapilární elektroforéza v analýze nukleových kyselin	55
7.6	Klinické použití elektroforézy NK	56
<b>8.</b>	<b>Význam klonování pro molekulárně genetické laboratoře</b>	<b>58</b>
8.1	Přehled klonovacích technik	58
8.2	Inserty a vektory používané v molekulární genetice	59
8.3	Příprava rekombinantních molekul DNA	59
8.4	Techniky genového transferu	60
8.5	Testování úspěšnosti molekulárního klonování	60
8.6	Klinický význam molekulárního klonování	61
<b>9.</b>	<b>Hybridizační metody v molekulární genetice</b>	<b>63</b>
9.1	Klasifikace hybridizačních technik	64
9.2	Hybridizace na pevném podkladu	64
9.2.1	Southernův přenos	65
9.2.2	Alelově specifická hybridizace	66
9.2.3	Reverzní blotting	66
9.3	<i>In situ</i> hybridizace	68
9.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	69
9.3.2	Klinické aplikace FISH technologie	69
9.4	Výroba hybridizačních sond	70
<b>10.</b>	<b>Čipové technologie v molekulární genetice</b>	<b>72</b>
10.1	Dotykový tisk hotových sond ( <i>ink jet printing</i> )	73
10.2	Fotolitografická výroba sond na čipu	73
10.3	Bezdotykový tisk sond ( <i>ink jetting</i> )	74
10.4	Třídění čipů podle typu vyšetřované NK	74
10.4.1	Expresní čipy	74
10.4.2	Čipy pro vyšetření bodových mutací	74
10.4.3	Čipy pro komparativní genomovou hybridizaci	74



10.5	Trendy v oblasti čipové technologie	75
<b>11.</b>	<b>Polymerasová řetězová reakce</b>	<b>76</b>
11.1	Polymerasy a polymerasová řetězová reakce	76
11.1.1	Termolabilní polymerasy	76
11.1.2	Polymerasová řetězová reakce	77
11.1.3	Termostabilní polymerasy	78
11.1.4	Katalytické vlastnosti DNA polymeras	79
11.2	Reakční směs k provedení standardní PCR	81
11.3	Reakční prostředí pro PCR	82
11.4	Termocykléry	82
<b>12.</b>	<b>Modifikace PCR pro molekulární genetiku</b>	<b>84</b>
<b>13.</b>	<b>Real-time PCR</b>	<b>89</b>
13.1	Přístroje pro real-time PCR	90
13.2	Analýza pomocí hydrolyzačních sond	90
13.2.1	Hydrolyzační sondy (TaqMan sondy) a real-time PCR	90
13.2.2	Systém Universal ProbeLibrary	92
13.3	Analýza pomocí hybridizačních sond	93
13.3.1	Hybridizační FRET sondy	93
13.3.2	Hybridizační sondy Molecular Beacons	94
13.3.3	Analýza pomocí sond SimpleProbes	94
13.3.4	Analýza pomocí sond Scorpions	94
13.4	Kvantitativní analýza pomocí real-time PCR	95
13.5	COLD real-time PCR	98
<b>14.</b>	<b>Digitální PCR</b>	<b>100</b>
<b>15.</b>	<b>Amplifikační techniky založené na jiných enzymových reakcích</b>	<b>103</b>
15.1	Metoda LCR	103
15.2	Metoda MLPA	104
15.3	Metody NASBA a TMA	105
15.4	Metody SDA	106
15.5	Metoda <i>Q-beta</i> replikasové amplifikace	107
15.6	Metoda bDNA	108
15.7	Metoda molekulární inverzní sondy	108
15.8	Metoda LAMP	109
15.9	Metoda MDA	111
15.10	Metoda NEAR	111
<b>16.</b>	<b>Analýza restrikčních fragmentů</b>	<b>113</b>
16.1	Restrikční enzymy	113
16.2	Konstrukce restrikčních map	114
16.3	Restrikční analýza v molekulární genetice	115
16.4	Příprava restrikční směsi	117
<b>17.</b>	<b>Kontrola kvality v molekulární genetice</b>	<b>118</b>
17.1	Kontrolní vzorky pro vnitřní kontrolu kvality	118
17.1.1	Negativní amplifikační kontrola	118
17.1.2	Pozitivní amplifikační kontrola	119
17.1.3	Inhibiční amplifikační kontrola	119
17.1.4	Vnitřní standardy v molekulární genetice	120
17.1.4.1	Vnitřní standard jako přídavek exogenní NK	120
17.1.4.2	Vnitřní standard realizovaný bez přídavku NK	120
17.2	Referenční kontrolní vzorky pro EHK	121
<b>18.</b>	<b>Screeningové metody v molekulární genetice</b>	<b>123</b>
18.1	Analýza heteroduplexů na nedenačních elektroforetických gelech	124
18.2	Vyšetření heteroduplexů pomocí gradientové elektroforézy	124



18.3	Metoda jednořetězcového konformačního polymorfismu	126
18.4	Screeningová metoda založená na štěpení RNAsou A	126
18.5	HRM analýza	127
18.6	Přínos screeningových metod pro molekulární genetiku	127
<b>19.</b>	<b>Sekvenování DNA – přehled tradičních sekvenačních metod</b>	<b>129</b>
19.1	První pokusy o sekvenování fragmentů NK	130
19.2	Gilbertovo degradační sekvenování	131
19.3	Sangerovo syntetické sekvenování s dideoxynukleotidy	133
19.4	Automatizace Sangerova sekvenování	134
19.4.1	Sekvenační poloautomatické systémy	134
19.4.2	Automatické sekvenační systémy založené na kapilární elektroforéze	135
19.5	Metoda prodlužování primeru	137
19.6	Pyrosekvenování	137
19.7	Strategie sekvenování při analýze dlouhých úseků DNA	140
<b>20.</b>	<b>Technologie sekvenování druhé generace</b>	<b>142</b>
20.1	Příprava knihovny DNA	143
20.1.1	Fragmentace DNA	144
20.1.2	Oprava nezarovnaných konců fragmentů DNA	145
20.1.3	Připojení koncových adaptérů	146
20.1.3.1	Připojení adaptérů pomocí ligasy	146
20.1.3.2	Připojení adaptérů pomocí modifikovaných amplifikačních primerů	150
20.2	Klonální amplifikace sekvenovaných fragmentů	152
20.2.1	Klonální amplifikace pomocí <i>emulzní PCR</i>	153
20.2.2	Klonální amplifikace pomocí <i>bridge PCR</i>	155
20.3	Principy sekvenování druhé generace	157
20.3.1	Technologie <i>454</i>	157
20.3.1.1	Stručná historie technologie <i>454</i>	157
20.3.1.2	Proces sekvenování pomocí technologie <i>454</i>	157
20.3.1.3	Primární zpracování záznamu sekvenování <i>454</i>	158
20.3.1.4	Technologické možnosti sekvenování <i>454</i>	158
20.3.2	Technologie firmy Illumina	159
20.3.2.1	Stručná historie technologie Illumina	159
20.3.2.2	Průběh sekvenování pomocí technologie firmy Illumina	159
20.3.2.3	Primární zpracování záznamu sekvenování technologie Illumina	160
20.3.2.4	Technologické možnosti sekvenování systémů Illumina	160
20.3.3	Technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.1	Stručná historie technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.2	Průběh sekvenování pomocí technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.3	Primární zpracování záznamu sekvenování <i>Two Base Encoding</i>	164
20.3.3.4	Technologické možnosti sekvenování <i>Two Base Encoding</i>	164
20.3.4	Technologie <i>Ion Torrent</i>	164
20.3.4.1	Stručná historie technologie <i>Ion Torrent</i>	164
20.3.4.2	Průběh sekvenování pomocí technologie <i>Ion Torrent</i>	165
20.3.4.3	Technologické možnosti sekvenování <i>Ion Torrent</i>	165
20.3.5	Technologie fluorogenního pyrosekvenování	166
20.4	Analýza sekvenačních dat u zařízení NGS	166
20.4.1	Hodnocení dat a strategie celogenomového sekvenování	167
20.4.2	Hodnocení dat a strategie sekvenování obohacených fragmentů	169
20.4.2.1	Obohacení fragmentů pomocí <i>long-range PCR</i>	169
20.4.2.2	Obohacení fragmentů pomocí <i>microdroplet PCR</i>	170
20.4.2.3	Obohacení fragmentů pomocí hybridizačních sond	170
20.4.3	Hodnocení dat a strategie při sekvenování RNA transkriptů	170
20.4.4	Strategie a význam ampliconového sekvenování	170
20.4.5	Strategie a význam NGS v epigenomice	172
20.5	Nevýhody technologie sekvenování druhé generace	173
<b>21.</b>	<b>Technologie sekvenování třetí a vyšší generace</b>	<b>174</b>
21.1	Obecná charakteristika sekvenačních systémů třetí a vyšší generace	174

21.2	Sekvenační zařízení typu <i>True Single Molecule Sequencing</i> -----	174
21.3	Sekvenační zařízení typu <i>Single Molecule Real Time Sequencing</i> -----	176
21.4	Sekvenační zařízení založená na technologii nanopórů -----	178
21.5	Sekvenační zařízení na bázi <i>TIRF</i> mikroskopie -----	178
21.6	Sekvenační zařízení na bázi elektronové mikroskopie -----	180
<b>22.</b>	<b>Základy genomiky</b> -----	<b>181</b>
22.1	Mapování lidského genomu -----	181
22.2	LOD skóre -----	183
22.3	Genetická mapa člověka -----	184
22.4	Vazebná rovnováha a vazebná nerovnováha -----	185
22.5	Vazebná nerovnováha a asociační populační studie -----	185
22.6	Projekt <i>Lidský genom</i> a jeho význam pro molekulární genetiku -----	186
22.7	Další významné projekty týkající se lidského genomu -----	187
22.8	Haplotypová analýza -----	187
<b>23.</b>	<b>Vybrané fyzikální a biologické proměnné používané v molekulární genetice</b> -----	<b>188</b>
	<b>Seznam použitých zkratk</b> -----	<b>191</b>