

# Obsah

Předmluva	9
<b>1 Struktura nukleových kyselin</b>	<b>13</b>
1.1 Stavební bloky nukleových kyselin	14
1.1.1 Chemické složení	14
1.1.2 Struktura stavebních bloků	15
1.1.3 Konformační prostor nukleotidu	20
1.1.4 Párování dusíkatých bází	21
1.2 Konformace nukleových kyselin	23
1.2.1 Dvoušroubovicové helikální formy	24
1.2.2 Další typy konformací nukleových kyselin	32
1.2.3 Modifikované nukleové kyseliny	34
1.2.4 Nukleové kyseliny s definovaným skladem	36
1.2.5 Transferová RNA, tRNA	37
1.2.6 Ribozymy	38
1.3 Nukleové kyseliny v komplexech	40
1.3.1 Rozpoznávání nukleových kyselin malými molekulami	42
1.3.2 Rozpoznávání nukleových kyselin proteiny	46
<b>2 Metody analýzy molekul DNA</b>	<b>55</b>
2.1 Úvod do izolace DNA	55
2.1.1 Izolace DNA z celé krve organickými činidly	57
2.1.2 Izolace DNA z celé krve vysolením	60
2.1.3 Izolace DNA z celé krve – adsorpce DNA	60
2.1.4 Izolace DNA z buněk bukové sliznice	61
2.1.5 Izolace DNA z parafinových bločků	63
2.2 Stanovení kvality a kvantity DNA	63
2.2.1 Rutinní měření koncentrace DNA	65

2.2.2	Rutinní měření čistoty DNA . . . . .	66
2.2.3	Měření koncentrace a čistoty DNA . . . . .	67
2.2.4	Stanovení celistvosti (integrity) izolované DNA . . . . .	68
2.3	Elektroforéza molekul DNA . . . . .	68
2.3.1	Fyzikální principy elektroforézy nukleových kyselin . . . . .	70
2.3.2	Agarózová elektroforéza . . . . .	72
2.3.3	Elektroforéza v akrylamidu . . . . .	78
2.4	Hybridizace . . . . .	82
2.4.1	Fyzikální principy hybridizace . . . . .	82
2.5	Štěpení DNA restričními enzymy – RFLP, AFLP . . . . .	84
2.6	Metoda MLPA . . . . .	88
2.7	Metody screeningu . . . . .	92
2.7.1	Analýza heteroduplexů . . . . .	92
2.7.2	Metoda detekce SSCP . . . . .	100
2.8	Amplifikace DNA . . . . .	102
2.8.1	Asymetrická PCR . . . . .	103
2.8.2	Diferenciální amplifikace (Diferenciální PCR) . . . . .	105
2.8.3	Alelicky specifická amplifikace nukleové kyseliny . . . . .	105
2.8.4	Amplifikace pomocí Alu-repetitivních sekvencí . . . . .	106
2.8.5	Amplifikace pomocí „nested“ primerů . . . . .	107
2.8.6	Amplifikace více oblastí nukleové kyseliny . . . . .	109
2.8.7	Amplifikace pomocí inverzní PCR . . . . .	110
<b>3</b>	<b>Metody analýzy molekul RNA</b> . . . . .	<b>113</b>
3.1	Metody izolace RNA . . . . .	114
3.1.1	Obecné strategie pro izolaci RNA ze vzorku . . . . .	114
3.1.2	Metoda izolace RNA pomocí jemné lýze buněk . . . . .	117
3.1.3	Metoda izolace RNA hrubou lýzí buněk . . . . .	118
3.1.4	Paralelní izolace RNA a DNA . . . . .	120
3.1.5	Izolace RNA pomocí komerčních souprav . . . . .	120
3.1.6	Izolace RNA pomocí SDS . . . . .	121
3.1.7	Metody purifikace mRNA . . . . .	121
3.2	Zásady pro uchovávání RNA vzorků . . . . .	122
3.3	Stanovení kvality a kvantity izolované RNA . . . . .	123
3.3.1	Měření koncentrace RNA pomocí UV spektroskopie . . . . .	124
3.3.2	Stanovení čistoty RNA . . . . .	125
3.3.3	Další metody měření koncentrace a čistoty vzorku . . . . .	126
3.3.4	Stanovení integrity izolované RNA . . . . .	126
3.3.5	Problematika ribonukleáz . . . . .	127
3.4	Elektroforéza RNA . . . . .	130
3.4.1	Elektroforéza RNA za denaturačních podmínek . . . . .	130

3.4.2	Elektroforéza RNA za nedenaturujících podmínek . . .	132
3.4.3	Vizualizace RNA v gelu . . . . .	133
3.5	Metoda přenosu RNA – tzv. Northern blot . . . . .	136
3.6	Hybridizace RNA . . . . .	140
3.6.1	Vhodný výběr a značení próby . . . . .	141
3.6.2	Vlastní hybridizace molekul nukleových kyselin . . . . .	143
3.7	Metody amplifikace RNA . . . . .	149
3.7.1	RT-PCR . . . . .	149
3.7.2	Speciální metody amplifikace RNA, tzv. RACE . . . . .	156
3.7.3	Další metody amplifikace RNA . . . . .	159
3.8	Metoda syntézy cDNA a přípravy cDNA knihoven . . . . .	160
3.8.1	Použití cDNA . . . . .	165
3.9	Morfolinové oligonukleotidy . . . . .	165
<b>4</b>	<b>Čipová analýza („microarrays“)</b>	<b>169</b>
4.1	Historie . . . . .	169
4.2	DNA čip . . . . .	170
4.2.1	Tištěné čipy („spotted arrays“) . . . . .	171
4.2.2	<i>In situ</i> syntetizované čipy . . . . .	173
4.2.3	Kuličkový čip . . . . .	176
4.3	Mikročipy v laboratoři . . . . .	178
4.3.1	Příprava vzorku . . . . .	178
4.3.2	Značení a amplifikace vzorku . . . . .	181
4.3.3	Hybridizace na DNA čip . . . . .	184
4.3.4	Promývání DNA čipu . . . . .	184
4.3.5	Získání obrazu čipu (skenování) . . . . .	184
4.4	Aplikace DNA čipů . . . . .	186
4.4.1	Genová exprese . . . . .	187
4.4.2	Chromatinová imunoprecipitace . . . . .	187
4.4.3	Methylační čipy – epigenetika . . . . .	187
4.4.4	Genotypovací čipy . . . . .	187
4.4.5	Tilling čipy . . . . .	188
4.4.6	Exonové čipy . . . . .	188
<b>5</b>	<b>Sekvenace DNA</b>	<b>189</b>
5.1	Metody první generace (elektroforetické) . . . . .	193
5.1.1	Sanger . . . . .	193
5.1.2	Maxam-Gilbert . . . . .	195
5.2	Metody druhé generace (masivní paralelní sekvenování) . . . . .	195
5.2.1	Pyrosekvenace (Roche/454) . . . . .	198
5.2.2	Reversibilní terminátorová sekvenace . . . . .	202

5.2.3	Sekvenace ligací (SOLiD) . . . . .	203
5.3	Aplikace sekvenačních metod . . . . .	206
5.3.1	<i>De novo</i> sekvenace . . . . .	206
5.3.2	Resekvenace a cílená sekvenace . . . . .	207
5.3.3	Transkriptomika a RNA-Seq . . . . .	208
5.3.4	ChIP-Seq a studium interakcí DNA a proteinů . . . . .	209
5.3.5	Methyl-Seq a epigenetické regulace . . . . .	209
5.3.6	Metagenomika . . . . .	210
<b>6</b>	<b>Databáze biomolekulárních struktur</b>	<b>211</b>
6.1	Protein Data Bank, PDB . . . . .	213
6.1.1	Depozice dat, jejich zpracování a validace . . . . .	213
6.1.2	Validace struktur biomolekul . . . . .	215
6.1.3	Obsah PDB . . . . .	216
6.1.4	Hledání v PDB . . . . .	218
6.1.5	Vytváření zpráv o výsledcích hledání . . . . .	220
6.2	Nucleic Acid Database, NDB . . . . .	220
6.2.1	Funkce NDB . . . . .	221
6.2.2	Atlasy struktur . . . . .	221
<b>7</b>	<b>Zpracování genetických dat</b>	<b>223</b>
7.1	Molekulární data a medicína . . . . .	223
7.2	Předpoklady úspěšnosti experimentu . . . . .	228
7.3	RT-qPCR data . . . . .	230
7.3.1	Amplifikační křivka . . . . .	230
7.3.2	Prahový cyklus . . . . .	231
7.3.3	Kontrolní body . . . . .	232
7.3.4	Sumarizace prahových cyklů technických replikátů . . . . .	234
7.3.5	Kvantifikace transkripčních intenzit . . . . .	234
7.3.6	Normalizace . . . . .	235
7.3.7	Schéma pro typickou analýzu . . . . .	237
7.4	Technologie DNA mikročipů . . . . .	237
7.4.1	Předzpracování čipových genetických dat . . . . .	239
7.4.2	Design experimentu a využití randomizace . . . . .	241
7.4.3	Typy výstupů na DNA mikročipech . . . . .	241
7.4.4	Zpracování obrazové informace . . . . .	242
7.4.5	Stochastické modely pro čipová data . . . . .	246
7.4.6	Rovnováha mezi vychýlením a rozptylem . . . . .	249
7.4.7	Senzitivita a specificita sond . . . . .	249
7.4.8	Metody odstraňování šumu na pozadí . . . . .	250
7.4.9	Kontrola kvality dat . . . . .	255

7.4.10	Metody normalizace dat . . . . .	259
7.4.11	Stabilizace rozptylu . . . . .	265
7.4.12	Sumarizace intenzitních dat . . . . .	266
7.4.13	Pravděpodobnost detekce . . . . .	268
7.5	Vysoce výkonné sekvenování . . . . .	268
7.5.1	Design experimentu . . . . .	269
7.5.2	Zpracování obrazové informace . . . . .	270
7.5.3	Kontrolní body . . . . .	270
7.5.4	Mapování čtení na referenční transkriptom/genom . . . . .	271
7.5.5	Četnosti čtení . . . . .	272
7.5.6	Chybový model pro četnosti čtení . . . . .	274
7.5.7	Diferenciální exprese . . . . .	275
7.6	Statistické zpracování dat . . . . .	278
7.6.1	Exploratorní analýza dat . . . . .	278
7.6.2	Lineární modely pro čipová data genové exprese . . . . .	280
7.6.3	Problém mnohonásobnosti testů . . . . .	283
7.6.4	Klasifikační metody . . . . .	285
7.6.5	Regresní metody . . . . .	291

## **A Purifikace DNA a izolace RNA 295**

A.1	PureLink Kity . . . . .	296
A.2	ChargeSwitch Genomic DNA kity . . . . .	297
A.3	High Pure kity . . . . .	300
A.4	Genopure Plasmid kity . . . . .	301
A.5	DNA Isolation kity . . . . .	302
A.6	NucleoSpin kity . . . . .	303
A.7	NucleoBond kity . . . . .	306
A.8	NucleoMag kity . . . . .	307
A.9	QIAamp kity . . . . .	309
A.10	MagAttract kity . . . . .	312
A.11	Obecný popis RNA . . . . .	313
A.12	Stabilita a zásady manipulace s RNA . . . . .	313
A.13	Stabilizace RNA v biologických vzorcích . . . . .	315
A.13.1	Princip izolace: Technologie . . . . .	316
A.13.2	Technologie izolace RNA . . . . .	317
A.13.3	Komerční izolační soupravy . . . . .	318

## **Literatura 321**