

1.	Teoretická část	9
1.1.	Úvod (V.V.)	9
1.2.	Principy izolace DNA (V.V.)	10
1.3.	Principy izolace RNA (V.V.)	11
1.4.	Úprava DNA in vitro (V.V.)	11
1.4.1.	Fragmentace DNA	11
1.4.2.	Spojování fragmentů	15
1.4.3.	Úprava konců DNA	15
1.4.4.	Syntéza DNA podle DNA matrice	18
1.4.5.	Syntéza cDNA podle RNA a DNA matrice	20
1.4.6.	Chemická syntéza oligonukleotidů	21
1.4.7.	Denaturace DNA	21
1.4.8.	Reasociace a hybridizace	22
1.5.	Vybrané metody pro analýzu DNA (V.V.)	23
1.5.1.	Spektrofotometrická analýza (V.V.)	24
1.5.2.	Elektroforetická analýza (F.P. + V.V.)	26
1.5.3.	Izopyknická centrifugace (V.V.)	31
1.5.4.	Izokinetická centrifugace (V.V.)	33
1.5.5.	Mapování DNA pomocí restričních endonukleáz (V.V.)	34
1.5.6.	Reasociační analýza (V.V.)	36
1.5.7.	Elektronová mikroskopie (V.V.)	39
1.5.8.	Sekvenování DNA (V.V.)	42
1.6.	Rekombinace DNA in vitro (V.V.)	44
1.7.	Vektory (V.V.)	47
1.8.	Metody vnášení cizorodé DNA do buněk (V.V.)	51
1.9.	Izolace genu nebo sekvence DNA (V.V.)	52
1.9.1.	Konstrukce genomových knihoven	52
1.9.2.	Hledání určité sekvence v genomové knihovně	55
1.9.3.	Klonování DNA	58
1.10.	Expresce cizorodé DNA (V.V.)	62
1.11.	Cílená mutagenese (V.V.)	63
1.12.	Genové inženýrství u kvasinek (Z.P. + V.V.)	64
1.12.1.	Vnášení DNA do kvasinek	64
1.12.2.	Zajištění replikace vnesené DNA	65
1.12.3.	Stabilita transformovaných buněk	66
1.12.4.	Kvasinkové vektory	67
1.12.5.	Příklady manipulací kvasinkovým genomem	69
2.	Procvičení teorie (V.V.)	76
2.1.	Termíny	76
2.2.	Centrální dogma molekulární genetiky	77
2.3.	Matematické vzorce	77
2.4.	Enzymy v genovém inženýrství	77
2.5.	Příklady	78

3.	Návody	81
3.1.	Izolace DNA (V.V.)	81
3.1.1.	Izolace DNA z <i>E. coli</i> dle Marmura a Dotyho (V.V.)	82
3.1.2.	Izolace DNA z 10 ml stacionární kultury <i>E. coli</i> (Z.P.)	83
3.1.3.	Izolace DNA z bakteriofága lambda (I) (Z.P.)	85
3.1.4.	Izolace DNA z bakteriofága lambda (II) (V.V.)	86
3.1.5.	Izolace ssDNA z bakteriofága M 13 (Z.P.)	87
3.1.6.	Izolace plazmidů z kultury <i>E. coli</i> (500 ml) (Z.P.)	88
3.1.7.	Izolace plazmidů z kultury <i>E. coli</i> (25 ml) (F.P.)	89
3.1.8.	Izolace plazmidů z kultury <i>E. coli</i> (10 ml) (Z.P.)	91
3.1.9.	Mikroizolace plazmidů z kultury <i>E. coli</i> (1,5 ml) (F.P.)	92
3.1.10.	Mikroizolace plazmidů z kolonie <i>E. coli</i> (Z.P.)	93
3.1.11.	Izolace plazmidu ze <i>S. cerevisiae</i> (Z.P.)	94
3.1.12.	Izolace lineárních plazmidů z <i>K. lactis</i> (Z.P.)	96
3.1.13.	Izolace DNA ze <i>S. cerevisiae</i> (Z.P.)	97
3.1.14.	Izolace NA z živočišné tkáně (F.P.)	99
3.1.15.	Přečištění DNA (Z.P.)	101
3.2.	Analýza (frakcionace) DNA (V.V.)	102
3.2.1.	Přibližné stanovení koncentrace DNA (Z.P.)	102
3.2.2.	Spektrofotometrická analýza DNA (V.V.)	103
3.2.3.	Elektroforetická analýza DNA (Z.P. + F.P.)	104
3.2.4.	Elektroeluce z agarózového gelu (Z.P.)	106
3.2.5.	Fotografování elektroforetogramů (Z.P.)	107
3.2.6.	Izopyknická centrifugace DNA (F.P.)	108
3.3.	Úpravy DNA in vitro (V.V.)	109
3.3.1.	Testování aktivity EcoRI (Z.P.)	109
3.3.2.	Restrikce DNA pomocí EcoRI (Z.P.)	110
3.3.3.	Doplňování 5' přechýlujících kchezlivních konců DNA (Z.P.)	110
3.3.4.	Ligace fragmentů DNA (Z.P.)	111
3.4.	Vnásení DNA do buněk (V.V.)	112
3.4.1.	Transformace <i>E. coli</i> (Z.P.)	113
3.4.2.	Zabalování DNA do kapsid fága λ in vitro (Z.P.)	114
3.4.3.	Infekce pseudovirovými partikulami fága λ (Z.P.)	116
3.4.4.	Transformace protoplastů <i>S. cerevisiae</i> (Z.P.)	116
3.4.5.	Transformace buněk <i>S. cerevisiae</i> (Z.P.)	118
3.4.6.	Fúze kvasinkových protoplastů s bakteriálními sféroplasty (Z.P.)	119
3.5.	Pomocné metody (V.V.)	121
3.5.1.	Amplifikace plazmidu pBR322 v <i>E. coli</i> (Z.P.)	121
3.5.2.	Příprava bakteriofága λ (Z.P.)	122
3.5.3.	Plaková titrace (Z.P.)	123
3.5.4.	Čištění a zahušťování bakteriofága λ (V.V.)	123
4.	Dodatky	125
4.1.	Kultivační média a roztoky (Z.P. + V.V.)	125
4.1.1.	Média	125
4.1.2.	Roztoky	126
4.1.3.	Konečné koncentrace antibiotik pro selekci	130
4.1.4.	Reakční pufrý (10x koncentrované) pro restrikci	131

4.2.	Přehled restriktáz	132
4.2.1.	Restriktázy rozeznávající čtyřnukleotidové sekvence	132
4.2.2.	Restriktázy rozeznávající pětinnukleotidové sekvence	133
4.2.3.	Restriktázy rozeznávající šestinnukleotidové sekvence	133
4.2.4.	Restriktázy rozeznávající přerušené palindromické sekvence ...	134
4.2.5.	Restriktázy rozeznávající více než šestinnukleotidové sekvence	135
4.2.6.	Restriktázy rozeznávající nepalindromické sekvence	135
4.3.	Přehled nejdůležitějších exonukleáz	136
4.4.	Přehled nejdůležitějších endonukleáz	136
4.5.	Přehled nejdůležitějších DNA polymeráz	137
4.6.	Přehled nejdůležitějších topozomeráz	137
4.7.	Přehled vybraných vektorů	139
5.	Doporučená literatura	140