

OBSAH

1.	Specializované typy polymerázové řetězové reakce (PCR)	7
1.1	Preparativní PCR	9
1.2	Asymetrická PCR	10
1.3	Alelicky-specifická PCR (AS-PCR)	11
1.4	„Nested“-PCR	12
1.5	„Multiplex“-PCR	13
1.6	Diferenciální PCR	14
1.7	Kompetitivní PCR	14
1.8	Amplifikace neznámé sekvence DNA	15
1.8.1	Inverzní PCR	15
1.8.2	„Alu-repetitivní“-PCR	17
1.8.3	„Gene walking“-PCR	18
1.8.4	„Bublinová“-PCR	19
1.8.5	Amplifikace cDNA-konců	21
1.8.6	Amplifikace s konsenzuálními primery	23
1.8.7	Expresní PCR	23
1.9	Ostatní metody amplifikace nukleové kyseliny	24
1.9.1	Ligázová řetězová reakce	24
1.9.2	Metoda NASBA	24
1.9.3	Metoda detekce „větvené“ DNA	25
2.	Identifikace rozměrových změn v nukleové kyselině	27
2.1	Identifikace změn velikosti fragmentu	28
2.1.1	Elektroforetické dělení v agarózovém gelu	28
2.1.2	Elektroforetické dělení fragmentů v polyakrylamidovém gelu	31
2.1.3	Separace radioaktivně značených fragmentů	32
2.1.4	Separace neradioaktivně značených fragmentů	33
2.1.5	Molekulární hybridizace	33
2.1.5.1	Southern-blotting	33
2.1.5.2	Northern-blotting	36
2.1.5.3	Techniky „dot blot“ a „slot blot“	37
2.1.5.4	Molekulární hybridizace neradioaktivní	38

3.	Identifikace jednonukleotidových změn v nukleové kyselině	41
3.1	Metoda detekce jednořetězcových konformačních změn	41
3.2	Metoda analýzy heteroduplexů	42
3.3	Metoda denaturační gradientové gelové elektroforézy	43
3.4	Metoda chemického štěpení nepárujících se nukleotidů	45
3.5	Metoda štěpení nepárujících se nukleotidů v duplexu RNA:DNA pomocí ribonukleázy	45
4.	Mapování genomu	49
4.1	Buněčné hybridy, izolace chromozómů a krátké sekvence	50
4.2	Získávání sekvencí – knihovny	51
4.3	Plazmidy	51
4.4	Lambda vektory	53
4.5	Kosmidy	54
4.6	Umělé chromozómy	55
4.7	Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA-RAPD	57
5.	Molekulární cytogenetika	59
5.1	Hybridizace in situ	61
5.1.1	Princip metody	62
5.1.2	Sondy	64
5.1.3	Značení sond	66
5.1.4	Hybridizace	66
5.1.5	Detekce a vizualizace značených sond	68
5.1.6	Simultánní znázornění několika DNA sond in situ hybridizací	71
5.2	Komparativní genomová hybridizace (CGH), spektrální karyotypování (SKY) a mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH)	72
5:2.1	Komparativní genomová hybridizace (CGH)	73
5.2.2	Spektrální karyotypování (SKY) a mnohobarevná FISH (mFISH)	75
5.3	Metoda mnohobarevného pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND)	80
5.4	12-barevná mnohočetná FISH (M-TEL)	82
5.5	Rx metoda mnohobarevné FISH	82
5.6	In situ hybridizace s vysokou rezolucí	83
5.7	Metody MikroFISH a PRINS	83
5.8	Výhody molekulárně genetických metod v klinické cytogenetice a při diagnostice maligních onemocnění	85
6.	Nové technologie v diagnostice	89
6.1	Úvod	89
6.1.1	Konstrukce a „typy“ laboratoří na dlani	89
6.2	Hybridizační Mikropřístroje	90

6.2.1	Pasivní „biočipy“	90
6.2.1.1	Membránové šíky (array)	90
6.2.1.2	Skleněné „biočipy“	91
6.2.2	Aktivní „biočipy“	94
6.2.3	Detekce a vyhodnocení výsledků	95
6.3	Separáční a izolační mikropřístroje	97
6.4	Amplifikační mikropřístroje	97
6.5	Možnosti a způsoby užití	98