

OBSAH

1. ÚVOD
 - 1.1. Čím se zabývá molekulární biologie?
 - 1.2. Vztah molekulární biologie k ostatním vědním oborům a ke klinické praxi
 - 1.3. Jaký je význam studia molekulární biologie pro studující lékařství?
 - 1.4. Účel skript a základní používané zkratky
2. ZÁKLADNÍ POPIS STRUKTURY A FUNKCE DNA A RNA A METODY MANIPULACE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI
 - 2.1. Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - 2.1.1. Struktura DNA
 - 2.1.2. Isolace čisté DNA z biologického materiálu
 - 2.2. Ribonukleová kyselina (RNA)
 - 2.2.1. Struktura a typy RNA
 - 2.2.2. Metody izolace RNA z buněk a tkání
 - 2.3. Základní manipulace s nukleovými kyselinami
 - 2.3.1. Fenolová extrakce a alkoholová precipitace
 - 2.3.2. Denaturace, renaturace a hybridizace nukleových kyselin
3. GENY V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH A JEJICH EXPRESE
 - 3.1. Struktura a organizace lidského genomu
 - 3.1.1. Geny a jejich regulační sekvence
 - 3.1.2. Sekvenční repetice
 - 3.1.3. Methylace genomu
 - 3.1.4. Organizace DNA v chromosomu
 - 3.2. Replikace DNA
 - 3.3. Transkripce
 - 3.3.1. Transkripční systém RNA-polymerasy II
 - 3.3.1.1. Cis-regulační elementy a trans-regulační faktory transkripce
 - 3.3.1.2. Tkáňově specifická transkripce
 - 3.3.2. Transkripční systém RNA-polymerasy I a III
 - 3.3.3. Interakce DNA-protein a protein-protein při transkripci

- 3.4. Sestřih a další úpravy primárního transkriptu
 - 3.4.1. Tvorba mRNA z hnRNA
 - 3.4.2. Tvorba rRNA a tRNA
- 3.5. Translace, genetický kód
- 3.6. Posttranslační modifikace proteinů

4. CO UMOŽNILO DNEŠNÍ PRUDKÝ ROZVOJ MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE?

5. ZÁKLADNÍ PRINCIPY TECHNIKY KLONOVÁNÍ GENŮ
 - 5.1. Co je klonování genů?
 - 5.2. Plasmidy a bakteriofágy jako základní genetické elementy umožňující klonování DNA
 - 5.2.1. Plasmidy
 - 5.2.1.1. Plasmid pBR322 a odvozené plasmidy
 - 5.2.1.2. Plasmidy řady pUC
 - 5.2.2. Bakteriofágy
 - 5.2.2.1. Bakteriofág lambda
 - 5.2.2.2. Fág M13
 - 5.2.3. Fágmidy
 - 5.3. Stručný popis purifikace plasmidové a fágové DNA
 - 5.3.1. Purifikace plasmidové DNA
 - 5.3.2. Purifikace fágové DNA
 - 5.4. Restrikční endonukleasy používané při klonování DNA
 - 5.5. Analýza fragmentů DNA vzniklých po restrikcích RE a izolace fragmentů
 - 5.6. Ostatní důležité enzymy používané při klonování DNA
 - 5.7. Ligace fragmentů DNA
 - 5.8. Transformace bakterií a selekce rekombinantů
 - 5.8.1. Transformace
 - 5.8.2. Selekcce rekombinantů
 - 5.8.3. Infekce fágem
 - 5.9. Příklad rekombinace a "subklonování" úseku DNA

6. APLIKACE METOD KLONOVÁNÍ GENŮ V BIOLOGICKÉM VÝZKUMU EUKARYOTICKÝCH BUNĚK
 - 6.1. Značené sondy jako nástroje identifikace specifických genů
 - 6.2. Typy sond a způsob jejich značení
 - 6.3. Jak izolovat určitý gen z eukaryotických buněk a klonovat

jej do plasmidu?

- 6.3.1. Syntéza cDNA a konstrukce cDNA knihovny
- 6.3.2. Selekcce klonů z cDNA knihovny
- 6.3.3. Konstrukce a screening genomové knihovny
- 6.3.4. Kosmidy

7. JAK SE STUDUJE STRUKTURA KLONOVANÉ DNA?

- 7.1. Restrikční mapy klonovaných genů
- 7.2. Lokalizace úseku DNA v genomu
 - 7.2.1. Metoda "Southern blotting"
 - 7.2.2. Lokalizace genu na chromosomu
 - 7.2.2.1. Hybridizace *in situ*
 - 7.2.2.2. Lokalizace na chromosom pomocí buněčné hybridizace
 - 7.2.2.3. Postupné mapování chromosomu
- 7.3. Sekvenování DNA
 - 7.3.1. Sangerova metoda
 - 7.3.2. Sekvenování DNA metodou Maxam & Gilbert
 - 7.3.3. Sekvenační strategie pro dlouhé úseky DNA a další efektivní způsoby sekvenování
 - 7.3.4. Vyhodnocení sekvence DNA a pomoc počítačové techniky při analýze sekvence DNA

8. JAK SE STUDUJE EXPRESE GENŮ?

- 8.1. Isolace mRNA
- 8.2. Detekce transkriptů pomocí "Northern blotting"
- 8.3. Zjišťování intronových a exonových sekvencí v genu
 - 8.3.1. Elektronoptická analýza duplexů DNAXRNA
 - 8.3.2. Mapování pomocí S1 nukleasy
- 8.4. Zjišťování místa počátku a ukončení transkripce
- 8.5. Sekvenování RNA
- 8.6. Metody studia interakce DNA-protein
 - 8.6.1. Purifikace DNA-vázajících proteinů afinitní chromatografií
 - 8.6.2. "Gel retardation"
 - 8.6.3. "DNase footprinting" a "methylation interference"
- 8.7. Metody studia transkripce
 - 8.7.1. Metoda "CAT assay" a analogické metody
 - 8.7.2. Transkripce *in vitro*

- 8.8. Metody identifikace proteinů
 - 8.8.1. "Western blotting"
 - 8.8.2. Značení proteinů v buněčných kulturách
 - 8.8.3. Translace *in vitro*

- 9. MODERNÍ METODY MANIPULACE S DNA
 - 9.1. Chemická syntéza oligodeoxyribonukleotidů a jejich použití
 - 9.2. Mutagenese *in vitro*
 - 9.2.1. Delece
 - 9.2.2. Inzerce
 - 9.2.3. Bodové mutace
 - 9.3. Polymerasová řetězová reakce (PCR)

- 10. ZÁKLADNÍ PRINCIPY TECHNIKY BUNĚČNÝCH KULTUR
 - 10.1. Co jsou buněčné kultury?
 - 10.2. Typy buněčných linií
 - 10.3. Základní charakteristiky růstu buněk v kultuře
 - 10.4. Přenos genů do eukaryotických buněk v kultuře
 - 10.5. Hybridizace buněk, buněčné inženýrství, monoklonální protilátky

- 11. VEKTORY PRO PŘENOS DNA DO EUKARYOTICKÝCH BUNĚK A EXPRESE CIZORODÉ DNA
 - 11.1. Co jsou expresivní vektory?
 - 11.1.1. Expresce klonovaných genů v bakteriích
 - 11.1.2. Expresce v eukaryotických buňkách
 - 11.2. Retroviróvé vektory a příprava rekombinantních retrovirů
 - 11.3. Vektory s inducibilními promotery
 - 11.4. Virové vektory pro eukaryotické buňky, kyvadlové vektory
 - 11.5. Transgenická zvířata

- 12. GENOVÁ DIAGNOSTIKA A JEJÍ VYUŽITÍ V LÉKAŘSTVÍ
 - 12.1. Co je DNA diagnostika?
 - 12.2. Detekce malých změn ve struktuře DNA
 - 12.2.1. Bodové mutace
 - 12.2.2. Rozdílná methylace alel
 - 12.3. Polymorfie v lidském genomu
 - 12.3.1. "RFLP"

- 12.3.2. "VNTR"
 - 12.4. Delece a amplifikace částí chromosomů
 - 12.5. DNA "fingerprinting"
 - 12.6. Aplikace DNA diagnostiky
13. PERSPEKTIVY MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉHO VÝZKUMU LIDSKÝCH GENŮ
A POMOC BIOTECHNOLOGIÍ VE FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU
- 13.1. Onkogeny a supresorové geny
 - 13.2. Projekt mapování a sekvenování lidského genomu
 - 13.3. Genová terapie
 - 13.4. Genomový "imprinting"
 - 13.5. Rekombinantní proteiny pro terapii
14. VYBRANÁ ZÁKLADNÍ DATA PRO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII
- 14.1. Tabulka vybraných restrikčních enzymů a jejich rozpoznávacích sekvencí
 - 14.2. Tabulka fyzikálních konstant nukleosidtrifosfátů
 - 14.3. Základní údaje o DNA
 - 14.4. Tabulka genetického kódu
 - 14.5. Zkratky a molekulární hmotnosti aminokyselin
15. JAK PRACOVAT V OBORU MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE?
- 15.1. Molekulárně biologická laboratoř
 - 15.2. Firmy vyrábějící sortiment pro molekulární biologii ve světě a u nás