

OBSAH

1	Bezpečnost práce v laboratoři (Marián Hajdúch)	11
1.1	Ochranné pomůcky a bezpečné postupy	11
1.2	Chemikálie a reagenty	13
1.3	Zpracovaný materiál	15
1.4	Kontaminace a dekontaminace	16
1.5	Použité přístroje	16
1.6	Nápravy škod	17
2	Zpracování biologického materiálu (Marta Khoylou)	19
2.1	Úkol cvičení	19
2.2	Teoretický úvod	19
2.2.1	Fixační činidla	19
2.2.2	Zalévání	20
2.2.3	Krájení na mikrotomech	22
2.2.4	Barviva a barvení	23
2.2.5	Přístroje a zařízení	25
2.2.6	Materiál a reagenty	25
2.2.7	Příprava roztoků	25
2.3	Metodika	26
2.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	26
2.4	Vlastní pracovní postup	26
2.4.1	Fixace	26
2.4.2	Parafinizace a zalévání do parafínu	26
2.4.3	Krájení preparátů v mikrotomu	27
2.4.4	Deparafinizace preparátů	27
2.4.5	Barvení preparátů	28
2.4.6	Odvodnění a montování	28
2.5	Hodnocení výsledku	29
2.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	29
2.6	Literatura	30
3	Izolace RNA fenol-chloroformovou metodou a reverzní transkripce (Josef Srovnal)	31
3.1	Úkol cvičení	31
3.2	Teoretický úvod	31
3.2.1	Přístroje a zařízení	32
3.2.2	Materiál a reagenty	32
3.2.3	Příprava roztoků	33
3.3	Metodika	33
3.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	33
3.4	Vlastní pracovní postup	34
3.4.1	Izolace RNA z buněčných lyzátů	34
3.4.2	Izolace RNA z tkání – homogenizace	35

3.4.3	Izolace RNA z formalínem fixovaných tkání archivovaných v parafínových bločcích	35
3.4.4	Reverzní transkripce	35
3.5	Hodnocení výsledku	36
3.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	37
3.6	Literatura	37
4	Izolace DNA (Marcela Staňková, Jitka Berkovcová)	39
4.1	Úkol cvičení	39
4.2	Teoretický úvod	39
4.2.1	Přístroje a zařízení	41
4.2.2	Materiál a reagentie	41
4.3	Metodika	41
4.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	41
4.4	Vlastní pracovní postup	41
4.4.1	Izolace DNA z čerstvých nebo zamražených tkání	41
4.4.2	Izolace DNA z buněčných kultur nebo separovaných leukocytů	42
4.4.3	Izolace DNA z formalínem fixovaných tkání archivovaných v parafínových bločcích	42
4.5	Hodnocení výsledku	42
4.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	43
4.6	Literatura	44
5	Design primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) (Jiří Drábek)	45
5.1	Úkol cvičení	45
5.2	Teoretický úvod	45
5.2.1	Délka primerů	45
5.2.2	Teplota tání primeru	46
5.2.3	Podíl GC	46
5.2.4	Distribuce G a C	46
5.2.5	Sekundární struktura	46
5.2.6	Repetice	47
5.2.7	Sekundární struktura templátu	47
5.2.8	Křížová reaktivita	47
5.2.9	Skrytá variabilita templátu	47
5.2.10	Přístroje a zařízení – softwarové nástroje	48
5.3	Vlastní pracovní postup	49
5.3.1	Kritické body metody	55
5.4	Literatura	56
6	End-point PCR (Marcela Staňková, Jitka Berkovcová)	57
6.1	Úkol cvičení	57
6.2	Teoretický úvod	57
6.2.1	Varianty end-point PCR	58
6.2.2	Přístroje a zařízení	58

6.2.3	Materiál a reagentie	59
6.3	Metodika	59
6.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	59
6.4	Vlastní pracovní postup	59
6.5	Hodnocení výsledku	60
6.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	60
6.6	Literatura	62
7	Real-time PCR (Josef Srovnal)	63
7.1	Úkol cvičení	63
7.2	Teoretický úvod	63
7.2.1	Přístroje a zařízení	65
7.2.2	Materiál a reagentie	65
7.3	Metodika	66
7.3.1	Vývojový diagram s časovými odhady	66
7.4	Vlastní pracovní postup	66
7.5	Metody záznamu a hodnocení výsledků	68
7.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	68
7.6	Literatura	69
8	Sekvenování (Marcela Staňková, Jitka Berkovcová)	71
8.1	Úkol cvičení	71
8.2	Teoretický úvod	71
8.2.1	Sangerova vs. Maxam-Gilbertova metoda	71
8.2.2	Nové sekvenční metody	73
8.2.3	Přístroje a zařízení	74
8.2.4	Materiál a reagentie	74
8.2.5	Příprava roztoků	74
8.3	Metodika	75
8.3.1	Vývojový diagram s časovými odhady	75
8.4	Vlastní pracovní postup	75
8.5	Hodnocení výsledku	76
8.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	76
8.6	Literatura	78
9	Gelová elektroforéza (Marcela Staňková)	79
9.1	Úkol cvičení	79
9.2	Teoretický úvod	79
9.2.1	Přístroje a zařízení	80
9.2.2	Materiál a reagentie	80
9.2.3	Příprava roztoků	80
9.3	Metodika	81
9.3.1	Vývojový diagram s časovými odhady	81
9.4	Vlastní pracovní postup	81
9.5	Hodnocení výsledku	82
9.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	82

9.6	Literatura	82
10	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) (Radek Trojanec)	83
10.1	Úkol cvičení	83
10.2	Teoretický úvod	83
10.2.1	Přístroje a zařízení	86
10.2.2	Materiál a reagensy	86
10.2.3	Příprava roztoků	86
10.3	Metodika	88
10.3.1	Vývojový diagram s časovými odhady	88
10.4	Vlastní pracovní postup	88
10.4.1	Deparafinizace tkáňového řezu	88
10.4.2	Příprava parafinového řezu (pretreatment) pro FISH	88
10.4.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	89
10.5	Hodnocení výsledku	91
10.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	91
10.5.2	Řešení obtíží	91
10.6	Literatura	94
11	SDS-page elektroforéza – separace proteinů (Petr Džubák)	95
11.1	Úkol cvičení	95
11.2	Teoretický úvod	95
11.2.1	Přístroje a zařízení	96
11.2.2	Materiál a reagensy	96
11.2.3	Příprava roztoků	96
11.3	Metodika	97
11.3.1	Vývojový diagram s časovými odhady	97
11.4	Vlastní pracovní postup	97
11.4.1	Sestavení elektroforetických skel	97
11.4.2	Příprava gelů a vlastní elektroforéza	98
11.4.3	Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue	99
11.5	Hodnocení výsledku	100
11.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	100
11.6	Literatura	101
12	Western blot (Petr Džubák)	103
12.1	Úkol cvičení	103
12.2	Teoretický úvod	103
12.2.1	Přístroje a zařízení	105
12.2.2	Materiál a reagensy	105
12.2.3	Příprava roztoků	105
12.3	Metodika	106
12.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	106
12.4	Vlastní pracovní postup	106
12.4.1	Western blot	106
12.4.2	Barvení a značení protilátkami	107

12.5	Hodnocení výsledku	108
12.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	108
12.6	Literatura	109
13	Práce s plazmidy (Vladimíra Koudeláková)	111
13.1	Úkol cvičení	111
13.2	Teoretický úvod	111
13.2.1	Přístroje a zařízení	114
13.2.2	Materiál a reagenty	115
13.2.3	Složení roztoků	115
13.3	Metodika	116
13.3.1	Vývojový diagram	116
13.4	Vlastní pracovní postup	116
13.4.1	Kultivace bakteriální kultury	116
13.4.2	Izolace plazmidu (miniprep)	116
13.4.3	Fluorescenční značení izolovaného plazmidu	117
13.4.4	Štěpení restrikčními endonukleázami	118
13.4.5	Agarózová elektroforéza	119
13.5	Hodnocení výsledku	119
13.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	120
13.6	Literatura	122
14	Imunohistochemie (Her2/NEU) (Marta Khoylou)	123
14.1	Úkol cvičení	123
14.2	Teoretický úvod	123
14.2.1	Přístroje a zařízení	124
14.2.2	Materiál a reagenty	124
14.2.3	Příprava roztoků	125
14.3	Metodika	126
14.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	127
14.4	Vlastní pracovní postup	127
14.5	Hodnocení výsledku	130
14.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	130
14.6	Literatura	132
15	Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie (Petr Džubák)	133
15.1	Úkol cvičení	133
15.2	Teoretický úvod	133
15.2.1	Přístroje a zařízení	135
15.2.2	Materiál a reagenty	135
15.2.3	Příprava roztoků	135
15.3	Metodika	136
15.3.1	Vývojový diagram metody s časovými odhady	136
15.4	Vlastní pracovní postup	136
15.5	Hodnocení výsledku	137
15.5.1	Kritické kontrolní body metody a řešení obtíží	137

15.6	Literatura	138
16	Summary	139
17	Seznam vyobrazení	141