

	ÚVOD	6
1	HOSTITELSKÉ KMENY <i>Escherichia coli</i>	8
1.1	Některé běžně užívané kmeny <i>E. coli</i>	8
1.2	Fenotypový projev některých mutací	9
1.3	Vyhodnocování nárůstu	9
2	UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	11
2.1	Příprava zmražené kultury	11
2.2	Příprava kultur inokulovaných vpichem	11
2.3	Příprava kultur s vrstvou parafinového oleje	12
3	BAKTERIÁLNÍ PLASMIDOVÉ VEKTORY	13
3.1	Plasmidová inkompatibilita	14
3.2	Běžně používané plasmidové vektory	14
3.2.1	pBR322	14
3.2.2	pUC18 a pUC19	15
3.2.3	pUC118 a pUC119	16
3.2.4	pSP64, pSP65 a řada plasmidů pGEM	16
4	IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA	17
4.1	Lyze bakteriálních buněk	17
4.2	Preparace plasmidové DNA	17
4.2.1	Minipreparace alkalickou lyzí	17
4.2.2	Izolace DNA z velkého objemu	19
4.3	Purifikace plasmidové DNA	19
4.3.1	Purifikace plasmidové DNA rovnovážnou centrifugací v CsCl	20
4.3.2	Izolace plasmidové DNA na komerčním nosiči	22
5	VNESENÍ PLASMIDOVÉ DNA DO BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	24
5.1	Příprava kompetentních buněk pomocí CaCl_2	24
5.2	Transformace	25
5.3	Příprava elektrokompetentních buněk	25
5.4	Elektroporace	26
6	IDENTIFIKACE KOLONIÍ OBSAHUJÍCÍCH REKOMBINANTNÍ PLASMID	27
6.1	Restrikční analýza plasmidové DNA po minipreparaci	27
6.2	Inzerční inaktivace	27
6.3	α -komplementace	30
6.4	Hybridizace kolonií	30
7	BAKTERIOFÁGOVÉ VEKTORY	35
7.1	Bakteriofág λ	35
7.2	hfl ⁻ selekce	36
7.3	spi ⁻ selekce	36
7.4	λ gt11	36
7.5	Tvorba bakteriofágových plaků	36
7.6	Příprava lyzátu bakteriofága λ	37
7.7	Izolace DNA z lyzátu bakteriofága λ pomocí stupňové a rovnovážné	38

	centrifugace v gradientu CsCl	
7.8	Vláknitý bakteriofág M13 a od něj odvozené vektory	39
7.8.1	Izolace kolonií obsahujících vektory odvozené od bakteriofága M13	41
7.8.2	Příprava jednořetězcové bakteriofágové DNA	41
7.8.3	Příprava replikativní (dvojřetězcové) formy DNA	43
8	MANIPULACE A ANALÝZA DNA	44
8.1	Specifické štěpení DNA	44
8.1.1	Restrikční endonukleasy	44
8.1.2	Podskupiny restrikčních endonukleas	44
8.1.3	Štěpení DNA restrikčními endonukleasami	45
8.1.4	Parciální štěpení restrikčními endonukleasami	48
8.2	Modifikace fragmentů DNA	50
8.2.1	Oprava 3' nebo 5' přečnávajících konců na tupé konce	50
8.2.2	Oprava přečnávajících konců na tupé konce pomocí Klenowova fragmentu	50
8.2.3	Oprava přečnávajících konců na tupé konce pomocí T4 DNA polymerasy	50
8.2.4	Oprava přečnávajících konců na tupé konce pomocí exonukleasy	51
8.3	Ligace - spojení fragmentů DNA	51
8.3.1	Ligace fragmentů s komplementárními konci	52
8.3.2	Ligace fragmentů s tupými konci	52
8.3.3	Defosforylace linearizované plasmidové DNA	53
8.4	Elektroforéza v agarosovém gelu	53
8.5	Izolace a purifikace fragmentů DNA z agarosového gelu	58
8.5.1	Elektroeluce fragmentů DNA v elektroelučním přístroji	58
8.5.2	Elektroeluce fragmentů DNA v dialyzační membráně	59
8.5.3	Purifikace fragmentů DNA z agarosy pomocí komerčního purifikačního kitu	60
8.6	Southern blot	60
9	ZNAČENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN	65
9.1	Extense primeru	65
9.2	Příprava sond RNA	66
9.3	Koncové značení nukleových kyselin	66
9.4	Příprava značené sondy posunem jednořetězcového zlomu: („nick translation“)	66
9.5	Zjištění inkorporace radioaktivity do DNA sondy kyselou precipitací	68
10	AMPLIFIKACE DNA IN VITRO POMOCÍ POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	69
11	SEKVENOVÁNÍ DVOJŘETĚZCOVÉ DNA	72
11.1	Chemická metoda sekvenování	72
11.2	Enzymová (dideoxy) metoda sekvenování	73
12	PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V <i>E. COLI</i>	82
12.1	Promotory	83
12.2	Translačně iniciační sekvence	84
12.3	pGEMEX - příklad vektoru pro expresi proteinů v <i>E. coli</i>	84
12.4	Expresí genů pod kontrolou promotoru bakteriofága T7	85
12.5	Purifikace rekombinantních proteinů	85
12.5.1	Izolace nerozpustného proteinu z inkluzních tělísek <i>E. coli</i> a renaturace produktu	87

12.5.2	Izolace rozpustného proteinu z <i>E. coli</i>	90
12.5.3	Purifikace fúzních rekombinantních proteinů	92
13	DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	94
13.1	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)	94
13.2	Imunochemická detekce proteinů v gelu	99
13.3	Metabolické značení proteinů	102
13.4	Imunoprecipitace značeného proteinu	104
14	MÉDIA	105
15	ZÁSOBNÍ ROZTOKY	109
16	DODATKY	110