

Obsah

1. Stručný průvodce skriptem	5
2. Vnášení DNA do buněk	12
2.1. Jak poznáme buňku transformovanou vektorem?	13
2.2. Jak odlišit klon transformovaný rekombinantní DNA?	14
2.2.1. Příklad rozlišení na základě možnosti detekce rekombinantního kmene	14
2.2.2. Příklad rozlišení rekombinantního kmene na základě negativní selekce	15
2.2.3. Příklad pozitivní selekce	16
3. Metody genetických modifikací <i>Escherichia coli</i>	17
3.1. Příklady mutantů <i>E. coli</i> , užívaných v genovém inženýrství	18
3.2. Vektory plazmidového typu u <i>E. coli</i>	19
3.2.1. Klonovací vektory	19
3.2.2. Ostatní typy plazmidových vektorů	20
3.3. Vektory odvozené od bakteriofága λ	22
3.3.1. Balení DNA do bakteriofágových partikulí <i>in vitro</i>	23
3.3.2. Příprava rekombinantní DNA a selekce rekombinantních klonů	24
3.3.2.1. Selekce pomocí <i>E. coli hfl</i>	25
3.3.2.2. Detekce pomocí genu <i>lacZ</i>	25
3.3.2.3. Selekce pomocí <i>spi</i> kmenů	25
3.3.2.4. Selekce u substitučních vektorů	26
3.3.3. Bakteriální kmeny pro práci s λ -vektory	26
3.3.4. Izolace bakteriofága λ	26
3.3.5. Využití λ vektorů	26
3.4. Vektory odvozené od DNA bakteriofága M13	27
3.4.1. Zvláštnosti izolace M13-DNA	27
3.4.2. Využití vektorů typu M13	27
3.5. Kosmidy	28
3.6. Kombinované a skupinové vektory	28
4. Metody genetických modifikací u kvasinek	30
4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> je mikrobiálním modelem eukaryotického organismu	30
4.2. Klasifikace vektorů a zdroje důležitých sekvencí	33
4.2.1. Využití integrativních vektorů	35
4.2.2. Využití replikativních vektorů	37
4.2.3. Využití arteficiálních chromozómů	37
4.3. Transformace kvasinkových buněk	37
5. Cesta od sekvence nukleotidů k funkční analýze genomu	39
5.1. Příklad <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
5.1.1. Historie projektu sekvencování	39
5.1.2. Počítačová analýza sekvenčních dat	40
5.1.3. Funkční analýza genomu	42

6. Izolace genů aj. genetických elementů z DNA knihoven	44
6.1. Způsoby přípravy a uchovávání knihoven	45
6.2. Hledání v DNA knihovnách	46
6.3. Další možnosti získání genů a jiných sekvencí	47
6.4. Charakterizace izolátů	48
7. Sekvencování	49
8. Identifikace genů a regulačních sekvencí	50
8.1. Lokalizace genu na klonovaném fragmentu	50
8.2. Lokalizace 3' a 5' konců genové sekvence a intronů	50
8.2.1. Test nukleázové protekce DNA	50
8.2.2. Metoda prodlužování primerů	51
8.3. Analýza regulačních oblastí	51
8.4. Procházka po chromozómu	52
9. Mutagenese <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	53
9.1. Chemická mutagenese	53
9.2. Metody pro cílené zavádění delecí.	54
9.3. Příprava malých inzercí	55
9.4. Náhodná mutagenese substitučního typu	55
9.5. Oligonukleotidem řízená mutagenese	55
9.6. Cílená mutagenese <i>in vivo</i> u kvasinek	58
9.7. Použití mutagenese	60
10. Expres cizorodých genů	62
10.1. Expres v <i>E. coli</i>	62
10.1.1. Komponenty pro výstavbu expresní kazety	63
10.1.2. Strategie přípravy rekombinantní DNA	64
10.2. Kvasinkové expresní systémy	66
11. Metody pro charakterizaci genové exprese	68
11.1. „Northern blotting“	68
11.2. Titrační analýza	69
11.3. Transkripce <i>in vitro</i>	69
11.4. Hybridizace <i>in situ</i>	70
11.5. Sledování na úrovni translace	70
11.6. RT PCR v reálném čase	71
11.7. Expresní profily na úrovni mRNA	71
11.8. Hromadné porovnávání zastoupení proteinů	71
12. Sledování interakcí proteinů s DNA	72
12.1. Vazba na filtr (Filter binding assays)	72
12.2. Zpomalovací test (gel retardation assays)	72
12.3. Stopování <i>in vitro</i> (footprinting)	72
12.4. Stopování <i>in vivo</i>	73
12.5. Jednohybridní systémy	73
13. Sledování vzájemné interakce proteinů	74
13.1. Fyzikální metody sledování interakce proteinů	74
13.2. Dvojhybridní systémy	74
14. Doporučená literatura	76