

Obsah

1. Úvod	7
2. Chemická syntéza DNA	9
2.1. Zakotvení na pevném nosiči	9
2.2. Syntéza dinukleotidů	10
2.3. Syntéza oligonukleotidů	10
2.4. Skládání dsDNA ze syntetických oligonukleotidů	11
2.5. Závěr	12
3. Biochemická syntéza nukleových kyselin	14
3.1. Klasifikace a charakterizace enzymů, katalyzujících syntézu polynukleotidových řetězců	14
3.2. DNA dependentní DNA polymerasy	15
3.2.1. Charakteristiky termolabilních DNA dependentních DNA polymeras	15
3.2.1.1. Syntéza DNA metodou posunu utajeného přerušení (nick translation)	16
3.2.1.2. Metoda prodlužování primerů	16
3.2.1.3. Úpravy a značení konců molekul DNA pomocí DNA dependentních DNA polymeras	17
3.2.2. Termostabilní DNA dependentní DNA polymerasy	18
3.3. Reverzní transkripce	18
3.3.1. Reverzní transkriptasy	19
3.3.2. Příprava dvojřetězcové cDNA	19
3.3.2.1. Syntéza využívající vlásenkovou strukturu na konci 1. řetězce cDNA	20
3.3.2.2. Syntéza využívající RNA primery	20
3.3.2.3. Prodloužení 3' konce řetězce cDNA usnadňuje volbu druhého primeru	20
3.3.2.4. Využití specifických primerů	20
3.4. DNA dependentní RNA polymerasy	21
3.5. Terminální deoxynukleotidyltransferasy	21
3.6. Závěr	21
4. Polymerasová řetězová reakce (PCR)	22
4.1. Princip a bilancování PCR	22
4.2. Problémy spojené s realizací PCR	25
4.3. Základní varianty standardního postupu	30
4.3.1. Možnosti amplifikace delších sekvencí	30
4.3.2. Techniky „horkého“ startu	30
4.3.3. Inverzní PCR	31
4.3.4. Asymetrická PCR	31
4.3.5. Multiplex PCR	31
4.3.6. Mutageneze pomocí PCR	31
4.3.7. Příprava značené DNA	32
4.3.8. PCR s degenerovanými primery	32
4.3.9. PCR a klonování	33
4.3.10. RT PCR	34
4.3.11. Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE)	35

4.3.12. PCR in situ	35
4.3.13. PCR ELISA	36
4.4. Purifikace produktů PCR	36
4.5. Detekce a kvantifikace produktů PCR a RT PCR	36
4.5.1. Zařízení pro sledování průběhu PCR, respektive RT PCR	37
4.5.2. Kvantitativní PCR – principy stanovení koncentrace produktu na základě fluorescence	37
4.5.3. Závěr	38
5. Dodatky	40
5.1. Metrické předpony	40
5.2. Zkratky pro skupiny bazí	40
5.3. Přehled vzorců pro výpočet relativní molární hmotnosti $M(g/mol)$ u fosforylovaných a defosforylovaných oligonukleotidů	41
5.4. Velikosti DNA u modelových organismů	41
5.5. Obsah GC (mol %) v různých genomech	41
5.6. Údaje o stabilní RNA v <i>Escherichia coli</i>	42
5.7. Převodní vztahy o množství DNA	42
5.8. Vzorce pro výpočet teploty denaturace $T_m^{\circ}C$	42
5.9. Separační rozsahy lineárních dsDNA fragmentů při elektroforéze v agarosových gelech	43
5.10. Separační rozsahy lineárních dsDNA fragmentů při elektroforéze v polyakrylamidových gelech (poměr akrylamid/bisakrylamid 29:1)	43
5.11. Genetický kód	43
5.12. Kódované aminokyseliny	44
5.13. Vlastnosti vybraných radioizotopů	44
5.14. Jednotky aktivity	44
5.15. Přibližný obsah nukleových kyselin a proteinů v bakteriální buňce	45
5.16. Přibližný obsah nukleových kyselin v průměrné lidské buňce	45
5.17. Antibiotika užívaná pro selekci	45
5.18. Účinné koncentrace a zásobní roztoky antibiotik	46
5.19. Důležitá čísla pro odhady výtěžků	46
5.20. Upozornění	46
6. Průvodce literaturou	47
6.1. Základní učebnice molekulární biologie	47
6.2. Obecné základy genového inženýrství	47
6.3. Literatura o chemické syntéze DNA	48
6.4. Literatura o biochemické syntéze DNA včetně PCR a RT PCR	48