

Obsah

ÚVOD	7
1. FRAKCIONACE BUNĚKY A IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	8
1.1. Dezintegrace buněk a tkání	8
1.2. Izolace a frakcionace subcelulárních částic	9
1.3. Izolace nukleových kyselin	9
1.3.1. Izolace DNA	10
1.3.2. Izolace RNA	10
1.4. Čistota a koncentrace nukleových kyselin	11
2. CENTRIFUGAČNÍ METODY	13
2.1. Chování makromolekul a subcelulárních částic v odstředivém poli	13
2.2. Využití centrifugačních technik v molekulární biologii	14
2.2.1. Preparativní centrifugace	14
2.2.1.1. Diferenciální centrifugace	14
2.2.1.2. Gradientové centrifugace	15
2.2.1.2.1. Rychlostní zonální centrifugace	15
2.2.1.2.2. Izopyknnická gradientová centrifugace	16
2.3. Přístrojové a materiálové vybavení	17
2.3.1. Frakcionace gradientu	18
3. ÚPRAVY MOLEKUL DNA	19
3.1. Fragmentace DNA restrikčními endonukleasami	19
3.1.1. Restrikční endonukleasy typu I	19
3.1.2. Restrikční endonukleasy typu II	20
3.1.2.1. Výběr restrikčních endonukleas	21
3.1.2.2. Reakční podmínky pro restrikční štěpení	21
3.1.3. Restrikční endonukleasy typu III	21
3.2. Sekvenčně nespecifická enzymová fragmentace	22
3.3. Mechanická fragmentace	22
3.4. Úprava konců DNA	22
4. HYBRIDIZAČNÍ TECHNIKY	24
4.1. Denaturace nukleových kyselin	24
4.1.1. Teplota tání	24
4.2. Reasociace DNA	25
4.2.1. Sekvenční komplexita genomu	25
4.3. Molekulární hybridizace	27
4.3.1. Hybridizace v roztocích	27
4.3.1.1. Mapování RNA pomocí RNA-sond: RNase protection assay	27
4.3.2. Hybridizace na nosičích	28
4.3.2.1. Hybridizace tečková (dot hybridization) a šterbinová (slot hybridization)	29
4.3.3. Hybridizace in situ	29
4.4. Hybridizační sondy a jejich značení	29
4.4.1. Značení DNA sond	30
4.4.2. Značení RNA sond (SP6/T7 transkripce)	32

4.5. Využití hybridizačních technik v klinické diagnostice	32
5. ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN A PROTEINŮ V GELECH	33
5.1. Elektroforéza nukleových kyselin	33
5.1.1. Elektroforéza nukleových kyselin v agarosovém gelu	33
5.1.1.1. Extrakce DNA z agarosových gelů	34
5.1.2. Separace nukleových kyselin polyakrylamidovou gelovou elektroforézou	34
5.1.3. Pulsní gelová elektroforéza (pulsed-field gel electrophoresis – PFGE)	35
5.1.4. Elektroforetické techniky používané pro detekci mutací	35
5.2. Elektroforéza proteinů	36
5.2.1. Separace proteinů polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	36
5.2.2. Izoelektrická fokusace proteinů	37
5.2.3. Dvourozměrná elektroforéza	37
5.3. Detekce radioaktivně značených vzorků rozdělených pomocí gelové elektroforézy	37
5.4. Elektroforetické blotovací metody nukleových kyselin a proteinů	38
5.4.1. Southern blotting (Southernova hybridizace)	38
5.4.1.1. Přenos restrikčních fragmentů na nitroceluloseové filtry	38
5.4.1.2. Hybridizace radioaktivních sond k imobilizovaným nukleovým kyselinám	39
5.4.2. Northern blotting	40
5.4.3. Elektrobloťování proteinů (Western blotting)	40
6. MAPOVÁNÍ GENOMU	41
6.1. Restrikční mapování	41
6.1.1. Mapování jedním restrikčním enzymem	41
6.1.2. Mapování dvěma a více restrikčními enzymy	42
6.1.3. Mapování pomocí restrikty a dalších specifických nukleas	42
6.2. Mapování sekvencí DNA asociujících s proteiny – „footprinting“	43
6.3. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů – RFLP	44
6.4. DNA fingerprinting	45
7. KLONOVÁNÍ KYSELINY DEOXYRIBONUKLEOVÉ	47
7.1. Klonování v plazmidových vektorech	47
7.1.1. Selektce transformovaných bakterií	48
7.1.2. Charakterizace plazmidových vektorů používaných při klonování DNA	48
7.1.3. Příprava rekombinantních plazmidů a izolace specifických klonů DNA	49
7.1.3.1. Linearizace vektoru	49
7.1.3.2. Ligace inzerntu s linearizovaným vektorem	49
7.1.3.3. Příprava kompetentních bakterií a jejich transformace	50
7.1.3.4. Detekce specifických DNA-klonů v plazmidových vektorech pomocí hybridizace	51
7.2. Klonování ve fágových vektorech	51
7.2.1. Bakteriofág lambda jako klonovací vektor	51
7.2.2. Genetické markery vkládané do vektorů	52
7.2.3. Klonování eukaryotní DNA v bakteriofágu lambda	53
7.2.3.1. Namnožení bakteriofága lambda; příprava vektorové DNA pro klonování	54
7.2.3.2. Příprava genomové DNA pro klonování	54
7.2.3.3. Ligace fragmentované eukaryotní DNA s raménky vektorové DNA	55
7.2.3.4. Inkorporace rekombinantní DNA do fágových partikulí a namnožení bakteriofága ve vhodných hostitelských buňkách	55
7.2.3.5. Detekce specifických DNA-klonů a jejich analýza	55
7.3. Klonování v kosmidových vektorech	55
7.3.1. Charakterizace kosmidových vektorů	56
7.3.2. Metody používané při klonování v kosmidových vektorech	56
7.4. Procházení chromosomem (chromosome walking)	57
8. SYNTÉZA cDNA A JEJÍ KLONOVÁNÍ V BAKTERIÁLNÍCH BUŇKÁCH	58
8.1. Příprava dvouřetězcové cDNA	58
8.1.1. Izolace a frakcionace eukaryotní mRNA	58

8.1.1.1. Analýza purifikované mRNA	59
8.1.1.2. Testování translační aktivity izolované mRNA	59
8.1.1.2.1. Translace izolované mRNA v retikulocytárním lyzátu	59
8.1.1.2.2. Detekce specifických produktů translace imunoprecipitací	59
8.1.1.3. Frakcionace izolované mediátorové RNA	60
8.1.1.4. Izolace mRNA s polyribosomů získaných specifickou imunoprecipitací	60
8.1.2. Syntéza prvního řetězce cDNA	60
8.1.3. Syntéza druhého řetězce cDNA	61
8.2. Klonování cDNA	61
8.2.1. Úprava konců cDNA-molekul	61
8.2.2. Methylace cDNA	62
8.2.3. Purifikace a frakcionace cDNA-molekul podle délky řetězců; ligace s DNA vektoru	63
8.2.4. Klonování cDNA podle Okayamy a Berga	63
8.2.5. Použití bakteriofága lambda při klonování cDNA	64
8.2.5.1. Konstrukce cDNA-knihovny	66
8.2.6. Detekce specifických cDNA-klonů pomocí nukleotidových sond	66
8.2.7. Detekce cDNA-klonů pomocí specifických protilátek	67
9. SEKVENOVÁNÍ DNA	69
9.1. Strategie sekvenování	69
9.1.1. Subklonování DNA ve fágových vektorech	69
9.1.2. Příprava klonů pro sekvenování	71
9.1.2.1. Náhodný způsob fragmentace DNA	71
9.1.2.2. Systematické neboli řízené sekvenování	71
9.2. Techniky sekvenování	72
9.2.1. Sangerova enzymová dideoxynukleotidová metoda	72
9.2.2. Maxam-Gilbertova metoda	74
10. MUTAGENEZE IN VITRO	76
10.1. Náhodná mutagenese	76
10.1.1. Techniky náhodné mutagenese	77
10.2. Místně cílená mutagenese	78
11. AMPLIFIKACE NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ IN VITRO	80
11.1. Polymerasová řetězová reakce	80
11.1.1. DNA-PCR	80
11.1.1.1. Podmínky klasické PCR	81
11.1.2. RNA-PCR (RT-PCR)	82
11.1.3. Nested PCR	83
11.1.4. Uplatnění PCR v molekulární biologii a medicíně	83
11.1.4.1. Amplifikace templátu pro sekvenování	83
11.1.4.2. MOPAC a Anchored PCR	83
11.1.4.3. Uplatnění PCR v klinické diagnostice	83
11.2. Ostatní amplifikační metody	85
11.2.1. LCR – Ligase Chain Reaction	85
11.2.2. TMA – Transcription Mediated Amplification	86
11.2.3. SDA – Strand Displacement Amplification	88
11.2.4. Zesílení signálu sondy	88
12. PŘENOS HETEROLOGNÍ DNA DO SAVČÍCH BUNĚK	90
12.1. Techniky zavádění cizí genetické informace do buněk	90
12.1.1. Přímý přenos genetické informace – transfekce	91
12.1.1.1. Fyzikální techniky transfekce	91
12.1.1.1.1. Elektroporace	91
12.1.1.1.2. Mikroinjekce DNA	91
12.1.1.1.3. Ostřelování buněk mikročásticemi s navázanou DNA	91
12.1.1.2. Fyzikálně-chemické transfekční techniky	91
12.1.1.2.1. Transfekce komplexu DNA s DFAE-dextranem	92

12.1.1.2.2. Koprecipitace s kalciumfosfátem	92
12.1.1.2. 3. Transfekce v přítomnosti polybrenu a DMSO	93
12.1.1.2.4. Transfekce pomocí liposomů – lipofekce	93
12.1.1.3. Biologické techniky	93
12.1.1.3.1. Protoplastová (sféroplastová) fúze	93
12.1.1.3.2. Receptorově řízená transfekce	93
12.1.2. Nepřímý přenos genetické informace – transdukce	93
12.1.2.1. Regulační a markerové sekvence vkládané do vektorů	93
12.1.2.1.1. Selekční markerové geny	94
12.1.2.1.2. Reportérové geny	95
12.1.2.2. Vektory určené pro genovou expresi v eukaryontích buňkách	95
12.1.2.2.1. Virové vektory	95
12.1.2.2.1.1. Bakulovirové vektory	95
12.1.2.2.1.2. Papovavirové vektory	96
12.1.2.2.1.2.1. Vektory odvozené od viru SV40	97
12.1.2.2.1.3. Papilomavirové vektory	98
12.1.2.2.1.4. Vektory odvozené od viru vakcinie	98
12.1.2.2.1.4.1. Konstrukce vektorů odvozených od viru vakcinie	99
12.1.2.2.1.5. Adenovirové vektory	100
12.1.2.2.1.5.1. Konstrukce adenovirových vektorů	100
12.1.2.2.1.6. Herpesvirové vektory	101
12.1.2.2.1.6.1. Konstrukce herpesvirových vektorů	101
12.1.2.2.1.7. Retrovirové vektory	102
12.1.2.2.1.7.1. Charakteristika retrovirů	103
12.1.2.2.1.7.2. Replikační cyklus retrovirů	103
12.1.2.2.1.7.3. Konstrukce retrovirových vektorů	105
13. TECHNIKY GENOVÉ TERAPIE	109
13.1. Somatická genová terapie	109
13.1.1. Genová terapie geneticky podmíněných chorob	109
13.1.2. Genová terapie nádorových chorob	110
13.1.3. Genová terapie infekčních chorob	111
13.2. Přenos genetického materiálu při genové terapii	112
13.2.1. Virové vektory používané v humánní genové terapii	112
13.2.1.1. Retrovirové vektory	112
13.2.1.1.1. Úpravy retrovirových vektorů pro genovou terapii	113
13.2.1.2. Ostatní virové vektory	114
13.2.2. Přímý přenos DNA do eukaryontních buněk	114
13.3. Perspektivy genové terapie	114
PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	115
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	116