

Obsah

Predhovor	17
1 Úvod	19
Základy molekulovej genetiky	21
2 Vývoj molekulovej genetiky	23
2.1 Prenosy genetického materiálu v baktériách	30
2.2 Zloženie a vlastností génov a ich organizácia	33
2.3 Prenos genetickej informácie medzi bunkami	39
2.4 Molekulová genetika v súčasnosti	41
3 Mutagenita, karcinogenita a vplyv chemizácie na životné prostredie	42
3.1 DNA ako nositeľ genetickej informácie.	42
3.1.1 Štruktúra DNA.	43
3.1.2 Schopnosť DNA realizovať genetickú informáciu	46
3.2 Odovzdávanie informácie z DNA na proteíny.	48
3.2.1 Štruktúra buniek	48
3.2.2 Informačný oznam od génu k znaku	53
3.2.3 Genetický kód	53
3.2.4 Hypotéza jeden gén — jeden enzým	56
3.3 Chromozómy — nositele génov	59
3.3.1 Rekombinácia časti chromozómu — molekulový mechanizmus prekríženia chromozómov	61
3.3.2 Alely — mnohonásobná alélia	63
3.3.3 Vzájomné interakcie génov — letálny účinok alel	66
3.3.4 Cistrón	67
3.4 Mutagény a mutagenéza	68
3.4.1 Klasifikácia mutácií	68
3.4.2 Frekvencia mutácií	75
3.4.3 Indukcia mutácií — účinok mutagénov.	75
3.4.3.1 Fyzikálne mutagénne činitele	76
3.4.3.2 Chemické mutagény — spôsob ich účinku	79
3.5 Určovanie mutagénneho účinku chemických látok	87
3.5.1 Transformácia DNA.	88

3.5.2	Systémy používajúce bakteriofágy	88
3.5.3	Baktériové testovacie systémy	90
3.5.4	Askomycéty	91
3.5.5	<i>Drosophila melanogaster</i>	92
3.5.6	Cytologická kontrola chromozómov	93
3.5.7	Testy na bunkách cicavcov	94
3.5.7.1	Somatické bunky cicavcov pestované v tkanivovej kultúre	94
3.5.7.2	Pokusy na myšiach	95
3.5.7.3	Test sprostredkovaný hostiteľom	96
3.6	Karcinogenéza a karcinogénne látky	97
3.6.1	Všeobecná teória karcinogenézy	97
3.6.2	Chemická karcinogenéza a jej molekulový mechanizmus	100
3.6.3	Chemické karcinogény	103
3.6.4	Chemoterapia nádorových ochorení	108
3.7	Možnosti úpravy genómu poškodeného chemickými látkami a ionizujúcim žiarením	109
3.7.1	Oprava genetického poškodenia — reparačné mechanizmy	109
3.7.1.1	Molekulová podstata reparačných mechanizmov DNA v prokaryotických organizmoch	109
3.7.2	Patobiológia reparačných procesov v DNA	113
3.7.2.1	Reparačné procesy v DNA a karcinogenéza.	113
3.7.2.2	Ochorenie podmienené nedostatočnými reparačnými procesmi.	114
3.8	Aplikovaný výskum mutagénnych účinkov	116
3.8.1	Význam génových a chromozómových mutácií pre fylogézu	116
3.8.2	Pozitívne aspekty mutagénnych účinkov	117
3.8.3	Negatívne aspekty pôsobenia mutagénnych činiteľov	118
3.8.3.1	Genetické riziko ionizujúceho žiarenia	118
3.8.3.2	Pôsobenie chemických mutagénov v životnom prostredí	120
4	Objavy chemoterapie antibiotík a vývoj plazmidov <i>R</i>	123
4.1	Vývoj chemoterapeutického myslenia	123
4.2	Objav sulfónamidov	126
4.3	Antibiotiká — protimikrobiálne látky biologického pôvodu	129
4.4	Príprava penicilínu ako lieku a objavenie ďalších antibiotík	131
4.5	Nedostatky a tienisté stránky účinkov antibiotík a chemoterapeutík — rezistencia baktérií.	133
4.6	Získaná rezistencia proti antibiotikám.	134
4.7	Vývoj a základné vlastnosti prenosnej rezistencie — plazmidy <i>R</i>	135
5	Fágy, plazmidy, transpozóny, integrácia externého genetického materiálu do genómu baktérií	138
5.1	Niektoré externé špecificky integratívne systémy molekúl DNA v baktériách	139
5.1.1	λ -fág	139
5.1.2	Mutačný fág — <i>Mu</i> -fág	142
5.2	Nešpecifické interne prijaté replikóny v baktériách — plazmidy, inzerčné sekvencie, transpozóny	145
5.2.1	Bakteriálne plazmidy — <i>R</i> , <i>F</i> a <i>Col</i> -plazmidy	145

5.2.2	Niektoré rozdielne vlastnosti plazmidov	148
5.3	Funkcie a vlastnosti plazmidov <i>R</i>	149
5.4	Vývoj plazmidov <i>R</i>	153
5.5	Štruktúra a význam transpozónov	154
6	Génová expresia niektorých plazmidov <i>R</i>	162
6.1	Mechanizmy rezistencie proti antibiotikám	162
6.1.1	Zmena miesta zásahu antibiotika	162
6.1.2	Ovplyvnenie transportu liečiva do bunky baktérií	164
6.1.3	Enzymová detoxifikácia antibiotík	164
6.1.4	Okľukové mechanizmy	165
6.1.5	Znížená požiadavka na určitý metabolit	166
6.2	Enzymy inaktivujúce (modifikujúce) aminoglykozidové antibiotiká	167
6.2.1	Enzymy acetyľujúce aminoglykozidové antibiotiká	173
6.2.1.1	3-N-acetyltransferázy	174
6.2.1.2	2'-N-acetyltransferázy	174
6.2.1.3	6'-N-acetyltransferázy	175
6.2.2	Enzymy nukleotidylujúce aminoglykozidové antibiotiká	176
6.2.2.1	3''-O-nukleotidyltransferázy	176
6.2.2.2	6-O-nukleotidyltransferázy	176
6.2.2.3	2''-O-nukleotidyltransferázy	177
6.2.2.4	4'-O-nukleotidyltransferázy	177
6.2.3	Enzymy fosforyľujúce aminoglykozidové antibiotiká	177
6.2.3.1	3''-O-fosfotransferázy	177
6.2.3.2	2''-O-fosfotransferázy	178
6.2.3.3	6-O-fosfotransferázy	178
6.2.3.4	3'-O-fosfotransferázy	178
6.2.4	Mechanizmus enzymovej modifikácie aminoglykozidových antibiotík	179
6.2.5	Pôvod enzýmov modifikujúcich aminoglykozidové antibiotiká	181
6.3	Možnosti syntézy nových antibiotík odolávajúcich mikrobiálnej inaktivácii	183
6.3.1	Nové účinné deriváty aminoglykozidových antibiotík	183
6.3.2	Nové účinné deriváty β -laktámových antibiotík	185
7	Regulácia expresie génov	190
7.1	Transkripcia	190
7.1.1	RNA-polymerázy	190
7.1.2	Promótoary	193
7.2	Operóny a mechanizmy regulácie ich expresie	195
7.2.1	Laktózový operón	196
7.2.1.1	Vplyv glukózy na aktivitu <i>lac</i> -operónu	200
7.2.1.2	Represor blokujúci transkripciu	201
7.2.2	Galaktózový operón	202
7.2.3	Tryptofánový operón	202
7.2.3.1	Atenuácia a spôsob regulácie génovej expresie	204
7.2.3.2	Regulácia viacerých operónov <i>trp</i> -reprezorom	205
7.2.4	Operón využitia histidínu — <i>hut</i> -operón	205
7.2.5	Arabinózový operón	206

7.2.6	Autogénna kontrola translácie ribozomálnych proteínov	208
7.2.7	<i>RecA</i> -operón	208
7.2.8	Regulácia počtu kópií <i>ColEI</i> -plazmidov	209
7.3	Regulácia génovej expresie v bakteriofágoch	211
7.3.1	Niektoré spoločné vlastnosti bakteriofágov	211
7.3.2	Regulácia transkripcie <i>T4</i> -fága	213
7.3.2.1	<i>T4</i> -fág mení špecifickosť hostiteľskej RNA-polymerázy	214
7.3.3	Regulácia transkripcie <i>T7</i> -fága	215
7.3.4	λ -bakteriofág	218
7.3.4.1	Regulácia transkripcie pri lytickom cykle λ -fága	219
7.3.4.2	Regulácia transkripcie pri lyzogénnom vývoji λ -fága	222
7.3.5	Regulácia lytického a lyzogénneho cyklu <i>Mu</i> -fága	224
8	Vírusové a celulárne onkogény	228
8.1	Úvod	228
8.2	Nádorotvorné RNA-vírusy a ich onkogény	230
8.3	Objav bunkových onkogénov (<i>c-onc</i>).	237
8.4	Nádorotvorné DNA vírusy	237
8.5	Génové manipulácie vo výskume onkogenézy	238
8.5.1	Mechanizmus vírusovej onkogenézy	238
8.5.2	Niektoré regulačné funkcie LTR onkogénov. Konštrukcia retrovírusových vektorov.	239
8.5.3	Klonovanie onkogénov	240
8.5.4	LTR ako enhancery	242
8.6	Produkty <i>onc</i> -génov — enzýmy (proteínkinázy) a iné proteíny	244
8.7	Nádorové ochorenia a <i>c-onc</i>	245
8.8	Biologické funkcie onkogénov	247
8.8.1	Vplyv <i>c-onc</i> na malignitu	249
8.9	Onkogény pri štúdiu genetických ochorení	251
8.9.1	Úvod	251
8.9.2	Onkogén <i>c-abl</i> a lokus <i>bcr</i> pri chronickej myelogennej leukémii	255
8.9.3	Onkogény <i>c-sis</i> a <i>c-fes</i>	256
8.9.4	Onkogény <i>v-fms</i> a <i>c-fms</i>	257
8.9.5	Deléčna teória onkogenézy	258
8.9.6	Burkittove lymfómy (<i>BL</i>) a <i>c-myc</i>	258
8.9.7	Iné neoplázie <i>B</i> -buniek.	260
8.9.8	Tumory <i>T</i> -buniek	260
8.10	Literatúra	261

Génové manipulácie a ich niektoré aplikácie v biotechnológii

9	Techniky rekombinantných DNA	265
9.1	Význam techník rekombinantných DNA	265
9.2	Základné etapy prípravy rekombinantných DNA	267
9.2.1	Izolácia DNA a <i>mRNA</i>	269
9.2.1.1	Izolácia vektorovej DNA.	269
9.2.1.2	Izolácia chromozómovej DNA	271

9.2.1.3	Izolácia <i>mRNA</i>	272
9.2.1.4	Štiepenie DNA	273
9.2.1.5	Restriktázy	273
9.2.1.6	Využitie restriktáz v technológii rekombinantných DNA	277
9.2.1.7	Úprava koncov fragmentov DNA	278
9.2.2	Tvorba rekombinantných DNA a ich prenos do bunky	283
9.2.3	Selekcia rekombinantov	286
9.2.3.1	Úprava plazmidových vektorov na zvýšenie tvorby rekombinantov.	287
9.2.3.2	Metódy selekcie rekombinantov v plazmidových vektoroch	287
9.2.3.3	Selekcia rekombinantov v chárónových vektoroch	291
9.2.4	Analýza rekombinantov	293
9.2.5	Analýza a úprava klonovanej DNA	298
9.2.5.1	Zostrojenie restriktčnej mapy rekombinantov a lokalizácia hľadaného génu	298
9.2.5.2	Reklonovanie do iných vektorov	299
9.2.5.3	Určenie nukleotidovej sekvencie DNA	299
9.2.5.4	Cielená mutagenéza	302
9.2.5.5	Expresia génov	306
10	Základy biotechnológií	313
10.1	Úvod	313
10.2	Získavanie produkčných mikroorganizmov a zlepšovanie ich vlastností	315
10.2.1	Mutagenéza	315
10.2.2	Rekombinácia	316
10.2.3	Génové inžinierstvo	317
10.3	Uchovávanie produkčných kultúr	318
10.3.1	Uchovávanie preočkovávaním	318
10.3.2	Uchovávanie v pieskovej konzerve.	319
10.3.3	Lyofilizácia baktérií	319
10.3.4	Uchovávanie mikroorganizmov pri nízkych teplotách	319
10.4	Suroviny fermentačného priemyslu.	320
10.4.1	Zloženie surovín fermentačného priemyslu	321
10.4.2	Likvidácia odpadov fermentačného priemyslu	322
10.5	Zariadenia a základné operácie fermentačného priemyslu	323
10.5.1	Fermentory	323
10.5.2	Izolácia produktov fermentácie	326
10.5.3	Izolácia bunkovej hmoty	326
10.5.4	Izolácia plyných produktov metabolizmu	328
10.5.5	Izolácia produktov metabolizmu s vyšším tlakom nasýtených pár	328
10.6	Antibiotiká.	329
10.6.1	Penicilín	330
10.6.2	Polosyntetické penicilíny	331
10.6.3	Polosyntetické cefalosporíny	333
10.6.4	Genetická manipulácia mikroorganizmov produkujúcich antibiotiká	333
10.6.5	Nové použitie produktov metabolizmu mikroorganizmov	333
10.6.6	Antiparazitárne látky	342
10.6.7	Bakteriálne insekticídy	342
10.6.8	Vírusové insekticídy	342
10.6.9	Fungálne insekticídy.	343

10.6.10	Médiá na produkciu antibiotík	343
10.7	Mikrobiálne polysacharidy	344
10.7.1	Xantánové gummy	346
10.7.2	Dextrán	346
10.7.3	Médiá na mikrobiálnu produkciu exopolysacharidov	347
10.8	Enzymy	347
10.8.1	Mikrobiálna produkcia enzýmov	349
10.8.2	Izolácia produktu	350
10.8.3	Proteolytické enzýmy	352
10.8.4	Kyslé proteázy	353
10.8.5	Amylolytické enzýmy	353
10.8.6	Médiá na mikrobiálnu produkciu enzýmov	354
10.9	Aminokyseliny	355
10.9.1	Kyselina glutámová	355
10.9.2	L-lyzín	357
10.9.3	L-izoleucín, L-leucín, L-valín	357
10.9.4	<i>L-tryptofán a ostatné aromatické aminokyseliny</i>	358
10.10	Vitamíny	358
10.10.1	Riboflavín (vitamín B ₂)	358
10.10.2	Kyanokobalamín (vitamín B ₁₂)	358
10.10.3	Médiá na mikrobiálnu produkciu vitamínov	361
10.11	Organické kyseliny	362
10.11.1	Kyselina citrónová	362
10.11.2	Izolácia produktu	363
10.11.3	Kyselina glukónová	363
10.11.4	Kyselina itakónová	364
10.11.5	Kyselina mliečna	365
10.11.6	Kyselina octová	366
10.11.7	Médiá na mikrobiálnu produkciu organických kyselín	366
10.12	Biotransformácia organických látok	367
10.13	Mikrobiálne proteíny	371
10.13.1	Kultivačné podmienky	373
10.13.2	Izolácia bunkovej hmoty	373
10.13.3	Riasy	375
10.13.4	Baktérie a aktinomycéty	375
10.13.5	Kvasinky	375
10.13.6	Vláknité huby	377
10.14	Etanol	377
10.15	Nápojový priemysel	379
10.15.1	Výroba piva	379
10.15.2	Bezalkoholové nápoje	381
10.15.3	Technologický postup	382
10.16	Biometalurgia	382
10.17	Produkčná kultivácia živočíšnych buniek	383
10.17.1	Optimalizácia kultivačných podmienok na kultiváciu živočíšnych buniek	386
10.18	Vakcíny	387
10.19	Interferóny	387
10.19.1	Ludské interferóny produkované kmeňmi baktérií a kvasiniek získané technikou rekombinácie	389

10.19.2	Produkcia ľudských interferónov pomocou kvasiniek	389
10.20	Inzulín.	389
10.21	Monoklonálne protilátky v biotechnológii	390
10.22	Pletivové kultúry rastlín	392
10.23	Význam biotechnológií pre priemyselnú chémiu	393
10.23.1	Perspektívy biotechnológie	395
10.24	Literatúra	396
11	Prehľad biotechnológií niektorých látok používaných v zdravotníctve	398
11.1	Úvod	398
11.2	Syntéza oligodeoxyribonukleotidov	403
11.3	Technológie rDNA pri príprave regulačných peptidov	408
11.3.1	Prehľad technológií biologicky aktívnych peptidov	408
11.3.2	Rekombinantné technológie niektorých hormónových preparátov	413
11.3.2.1	Somatostatín	413
11.3.2.2	Príprava inzulínu ako fúzaného proteínu	418
11.3.2.3	Príprava humánneho rastového hormónu (HGH)	421
11.3.2.4	Expresia peptidového hormónu tymozín $\alpha 1$	424
11.3.3	Génové technológie niektorých krvných derivátov	425
11.3.3.1	Trombolytické a fibrinolytické enzýmy. Tkanivový aktivátor plazminogénu (TPA)	425
11.3.3.2	Antihemofilický faktor (AHF) VIII	429
11.4	Prehľad biotechnológií interferónov	430
11.4.1	Úvod	430
11.4.2	Technológie interferónov klasickými metódami	433
11.4.2.1	Humánný leukocytový IFN- α	436
11.4.2.2	Humánný lymfoblastoidný IFN- α	438
11.4.2.3	Humánný fibroblastový IFN- β	439
11.4.2.4	Imúnny IFN- γ	440
11.4.2.5	Koncentrácia a purifikácia IFN	444
11.4.2.6	Príprava IFN- β v bezbunkovom systéme	445
11.4.3	Návody niektorých vybraných biotechnológií IFN	445
11.4.3.1	Príprava a čistenie leukocytového IFN (Hu IFN- α)	445
11.4.3.2	Produkcia IFN- α spolu s IFN- γ	447
11.4.3.3	IFN- α z lymfoblastoidných buniek (<i>NAMALWA</i>)	449
11.4.3.4	Produkcia Hu IFN- γ	449
11.4.3.5	Produkcia IFN- γ leukocytmi	450
11.4.4	Príprava a purifikácia rekombinantných interferónov.	452
11.4.4.1	História prípravy rekombinantného IFN- α (podľa WEISMANA, 1982)	452
11.4.4.2	Príprava rekombinantného IFN- α podľa PESTKU.	455
11.4.4.3	Použitie génových manipulácií na prípravu rekombinantného IFN- β	460
11.4.5	Niektoré biologické účinky interferónov	464
11.4.6	Klinické využitie interferónov.	466
11.4.7	Súčasná situácia v používaní a predaji rekombinantných IFN	466
11.5	Prehľad niektorých rekombinantných technológií vakcín	467
11.5.1	Úvod	467
11.5.2	Možnosti prípravy rekombinantnej vakcíny proti vírusu hepatitídy B (HBV)	468
11.5.3	Perspektívy prípravy vakcíny proti <i>HIV</i>	480

11.5.3.1	Biologické vlastnosti <i>HIV</i>	480
11.5.3.2	Genetická a antigénna štruktúra <i>HIV</i> 1 a <i>HIV</i> 2 a jej variácie	486
11.5.3.3	Aktivácia LTR vo vírusoch <i>HIV</i>	489
11.5.3.4	Enhancery vírusov <i>HTLV</i>	490
11.5.3.5	Funkcie génu <i>tat</i> — transaktivácia.	491
11.5.3.6	Perspektívy prípravy vakcíny proti <i>HIV</i>	493
11.5.4	Príprava subjednotkových vakcín proti malárii	496
11.5.5	Rekombinantná vakcína proti slintačke a krívačke.	503
11.5.6	Rekombinantné vakcíny proti besnote	505
11.6	Literatúra	507
12	Prehľad aplikácií <i>rDNA</i> v rastlinnej a živočíšnej výrobe a v potravinárstve	513
12.1	Smery výskumu génových manipulácií v rastlinnej výrobe.	513
12.1.1	Úvod	513
12.1.2	Fotosyntéza	514
12.1.2.1	Účinnosť fotosyntézy	514
12.1.3	Fixácia dusíka	515
12.1.3.1	Niektoré poznatky mikrobiológie fixácie dusíka a možnosti génových manipu- lácií	515
12.1.3.2	Stručný prehľad enzýmov zúčastňujúcich sa na fixácii dusíka	517
12.1.4	Tolerancia rastlín na stresy	518
12.1.4.1	Mikroorganizmy zvyšujúce odolnosť rastlín a potláčajúce ich choroby	518
12.1.4.2	Zvyšovanie odolnosti proti mrazu	519
12.1.5	Zlepšenie biologickej hodnoty rastlinných produktov	520
12.1.6	Pesticídy produkované mikroorganizmami	520
12.2	Techniky vsúvania génov do rastlín	522
12.2.1	Úvod	522
12.2.2	Plazmidové vektory <i>Ti</i>	523
12.2.3	Vírus mozaiky karfiolu (<i>CaMV</i>).	526
12.2.4	Elektroporácia	527
12.3	Projekty génových manipulácií v rastlinnej výrobe a ich súčasná realizácia	528
12.4	Niektoré aplikácie biotechnológií v živočíšnej výrobe.	530
12.4.1	Úvod	530
12.4.2	Rekombinantné vakcíny na imunizáciu zvierat	530
12.4.2.1	Vakcíny proti vírusovým chorobám zvierat	530
12.4.2.2	Vakcíny proti bakteriálnym chorobám zvierat	534
12.4.2.3	Vakcíny proti protozoárnym a parazitárnym chorobám zvierat	534
12.4.3	Látky podporujúce rast zvierat	535
12.4.4	Genetické zlepšovanie chovov — transféry génov, fúzia buniek	536
12.4.5	Komerčné aspekty biotechnológií a génových technológií v živočíšnej výrobe	537
12.5	Niektoré projekty biotechnológií a génových technológií v potravinárstve a kr- mivárstve	538
12.5.1	Biotechnológie a génové technológie niektorých enzýmov	538
12.5.2	Perspektívy biotechnológií a génových technológií niektorých aminokyselín	540
12.5.3	Možnosti biotechnológií niektorých vitamínov.	541
12.5.4	Biotechnológie jednobunkových proteínov	541
12.6	Niektoré projekty nových biotechnológií a investície farmaceutického priemys- lu v zahraničí do rastlinnej a živočíšnej výroby	542

12.7	Niektoré vybrané metódy génových manipulácií v rastlinách	545
12.7.1	Úvod	545
12.7.2	Systém <i>A. tumefaciens</i>	546
12.7.2.1	Príprava DNA z <i>A. tumefaciens</i>	546
12.7.2.2	Transformácia <i>A. tumefaciens</i> plazmidovou DNA	547
12.7.2.3	Prenášanie DNA na rastlinné bunky bunkami <i>A. tumefaciens</i>	547
12.7.2.4	Transformácia buniek spoločnou kultiváciou s <i>A. tumefaciens</i>	549
12.7.3	Izolácia protoplastov tabaku	549
12.7.4	Prenášanie izolovanej DNA do rastlín	550
12.7.5	Izolácia rastlinnej DNA a RNA.	551
12.7.5.1	Príprava celkovej rastlinnej DNA	551
12.7.5.2	Rýchla príprava DNA z transformovaných tkanív na Southernovu hybridizáciu	553
12.7.5.3	Stanovenie DNA difenylamínovou reakciou.	553
12.7.6	Dôkaz expresie cudzorodej DNA v rastlinných bunkách	554
12.8	Literatúra	555

Vybrané metódy skúmania a konštrukcie rekombinantných molekúl DNA

13	Vybrané techniky rekombinantných DNA	559
13.1	Úvod	559
13.2	Izolácia plazmidovej DNA	560
13.2.1	Izolácia plazmidovej DNA v mikromeradle	561
13.2.2	Izolácia plazmidovej DNA na restriktčnú analýzu	562
13.2.3	Izolácia v preparatívnom meradle	564
13.3	Preparatívne štiepenie DNA restriktázami	565
13.3.1	Defosforylácia DNA.	566
13.4	Ligácia DNA.	566
13.4.1	Úvod	566
13.4.2	Pracovný postup ligácie	568
13.4.3	Premena 5'-prečnievajúcich koncov na tupé	569
13.5	Transformácia	570
13.5.1	Úvod	570
13.5.2	Príprava buniek na transformáciu	571
13.5.3	Transformácia recipientných buniek plazmidovou DNA	572
13.6	Gélová elektroforéza nukleových kyselín	572
13.6.1	Úvod	572
13.6.2	Tlmivé roztoky	574
13.6.3	Príprava agarózového gélu	575
13.6.4	Vyfarbovanie DNA v agarózovom géle.	576
13.6.5	Elektroelúcia DNA z agarózového gélu	577
13.6.6	Izolácia DNA z ľahkotaviteľnej agarózy	580
13.7	Klonovanie v chárónoch	581
13.7.1	Úvod	581
13.7.2	Príprava sonikačného extraktu (donor pre hlavičky)	584
13.7.3	Príprava vbaľovacieho lyzátu zmrazovaním a rozmrazovaním (Freeze-Thaw lysate-FTL)	585
13.7.4	Vbaľovanie <i>in vitro</i>	585

13.7.5	Príprava chárónovej DNA	585
13.8	Príprava fragmentov z vysokomolekulovej DNA	587
13.8.1	Ligácia a amplifikácia	589
13.9	Izolácia λ -bakteriofága.	589
13.9.1	Teoretický úvod.	589
13.9.1.1	Postup.	591
13.9.2	Izolácia λ -fága <i>CI857 S7</i>	591
13.9.3	Určenie titra λ -fága	592
13.9.4	Izolácia cháróna EMBL3.	593
13.9.5	Izolácia fága v gradiente CsCl	593
13.10	Izolácia nukleových kyselín.	594
13.10.1	Teoretický úvod.	594
13.10.2	Izolácia DNA z telacieho týmusu	595
13.10.3	Izolácia λ -DNA.	596
13.11	Izolácia restriktázy <i>EcoR1</i>	597
13.11.1	Teoretický úvod.	597
13.11.2	Pracovný postup	599
13.12	Izotopové značenie DNA.	602
13.12.1	Teoretický úvod.	602
13.13	Hybridizácia DNA a autorádiografia.	604
13.13.1	Teoretický úvod.	604
13.13.2	Postup práce	605
13.14	Zloženie najčastejšie používaných kultivačných médií a reakčných zmesí	606
13.14.1	Kultivačné médiá	606
13.14.2	Reakčné zmesi	608
13.15	Vybrané metódy prípravy a štúdia rekombinantných DNA podľa MANIATISA A KOL. (1983).	609
13.15.1	Najčastejšie druhy klonovacích systémov	609
13.15.1.1	Klonovanie v plazmidoch	609
13.15.1.2	Cháróny	611
13.15.1.3	Kozmidy.	615
13.15.1.4	Vektory bakteriofága <i>M13</i>	615
13.15.2	Udržiavanie kultúr baktérií a fágov	616
13.15.3	Izolácia DNA z fága a plazmidov	617
13.15.3.1	Príprava λ -fága „vo veľkom“	617
13.15.3.2	Príprava plazmidovej DNA vo väčšom rozsahu	620
13.15.4	Enzýmy používané pri klonovaní	623
13.15.4.1	Strihanie DNA restriktázami (RE).	623
13.15.4.2	DNA-polymeráza I z <i>E. coli</i>	624
13.15.4.3	„Nick translation“ použitím Klenowovho (väčšieho) fragmentu DNA polyme- rázy I	625
13.15.4.4	Polymeráza DNA z <i>T6274</i> -fága	627
13.15.4.5	Značenie 5'-kocov DNA polynukleotidkinázou <i>T4</i> -fága (na sekvencovanie podľa MAXAMA, GILBERTA a i.)	628
13.15.4.6	Reverzná transkriptáza (polymeráza DNA závislá od RNA)	628
13.15.4.7	Alkalická fosfatáza. Defosforylácia DNA.	629
13.15.5	Elektroforéza v géloch	630
13.15.5.1	Elektroforéza v agarózovom géle	630
13.15.5.2	Získanie DNA z agarózy	635

13.15.5.3	Elektroforéza v polyakrylamidovom géle	636
13.15.6	Príprava <i>m</i> RNA z eukaryotických buniek	638
13.15.6.1	Úvod	638
13.15.6.2	Extrakcia RNA a súčasná inaktivácia RN-ázy. Guanidíniumizotiokyanát	639
13.15.6.3	Izolácia <i>m</i> RNA z eukaryotických buniek	640
13.15.6.4	Príprava bunkovej RNA. 1. Guanidíniová metóda	640
13.15.6.5	2. Guanidíniová metóda s centrifugovaním	641
13.15.6.6	Separácia poly(A) RNA	642
13.15.6.7	Gélová elfo RNA (na nitrocelulózoový filter alebo transláciu <i>in vitro</i>)	643
13.15.6.8	Prenos RNA denaturovanej formaldehydom na nitrocelulózu	644
13.15.6.9	Mapovanie RNA nukleázou <i>S</i> 1	645
13.15.7	Syntéza a klonovanie <i>c</i> DNA	646
13.15.7.1	Úvod	646
13.15.7.2	Syntéza prvého vlákna <i>c</i> 647DNA z <i>m</i> RNA ako templátu.	647
13.15.7.3	Syntéza dvojvláknovej <i>c</i> DNA.	647
13.15.7.4	Detekcia <i>m</i> RNA na prípravu <i>c</i> DNA.	650
13.15.7.5	Syntéza prvého vlákna DNA	651
13.15.7.6	Syntéza druhého vlákna	653
13.15.7.7	Štiepenie nukleázou <i>S</i> 6531	654
13.15.7.8	Klonovanie dvojvláknovej <i>c</i> DNA	654
13.15.7.9	Klonovanie dvojvláknovej <i>c</i> DNA postupným pridávaním linkerov	656
13.15.8	Transformácia <i>E. coli</i> plazmidovou DNA.	658
13.15.8.1	Transformácia s CaCl ₂	658
13.15.8.2	Transformácia s CaCl ₂ + RbCl	658
13.15.8.3	Transformácia kmeňa <i>E. coli</i> 1 776 (CURTISS) (prípadne C 600)	659
13.15.8.4	Vbalo vanie fágovej DNA	660
13.15.8.4.1	Príprava extraktov na vbalovanie	660
13.15.8.4.2	Vbalo vanie <i>in vitro</i>	660
13.15.8.4.3	Príprava vbalovacieho extraktu z indukovaného kmeňa BHB 2 690 ozvučováním alebo zmrazovaním	661
13.15.8.4.4	Vbalo vanie <i>in vitro</i> (postup II)	662
13.15.9	Konstruktoria eukaryotických genomických „knižníc“ v λ -fágoch	663
13.15.9.1	Úvod	663
13.15.9.2	Príprava vektorovej DNA	665
13.15.9.3	Centrifugovanie v gradiente sacharózy	665
13.15.9.4	Centrifugovanie v gradiente octanu draselného	666
13.15.9.5	Skúška ligácie ramien	667
13.15.9.6	Izolácia vysokomolekulovej eukaryotickej DNA z tkanivových kultúr a tkanív	667
13.15.9.7	Príprava 20 kb fragmentov eukaryotickej DNA (na prípravu knižníc v λ)	668
13.15.9.8	Príprava natrávanej DNA vo veľkom rozsahu	668
13.15.9.9	Ligácia a vbalovanie.	669
13.15.9.10	Koncentrácia rekombinantných fágov v stupňovom gradiente CsCl	671
13.15.9.11	Amplifikácie knižnice	671
13.15.9.12	Uchovávanie knižníc v kozmidoch na replikových filtroch	672
13.15.9.13	Amplifikácia kozmidových knižníc v kvapalnej kultúre	673
13.15.10	Identifikácia rekombinantných klonov	673
13.15.10.1	Hybridizácia „na mieste“	674
13.15.10.2	Skríning plakov λ -fága pomocou hybridizácie	675
13.15.10.3	Hybridizácia DNA alebo RNA na filtroch značkovanými sondami.	676

13.15.10.4	Hybridizačná selekcia špecifickej <i>m</i> RNA z celkovej bunkovej RNA	677
13.15.10.4.1	Viazanie DNA na NCF	677
13.15.10.4.2	Hybridizácia a elúcia RNA	677
13.15.10.5	Hybridizácia a elúcia RNA	679
13.15.11	Analýza klonov s rekombinantnou DNA	680
13.15.11.1	Izolácia plazmidovej DNA v malom rozsahu	680
13.15.11.2	Izolácia DNA λ -fága	682
13.15.11.3	Značenie fragmentov DNA na koncoch a mapovanie restriktázami.	683
13.15.11.4	Southernova metóda prenosu DNA z gélu na NCF (blot).	683
13.15.11.5	Subklonovanie fragmentov DNA v plazmidových vektoroch	686
13.15.11.6	Pripájanie syntetických linkerov	687
13.15.12	Určenie štruktúry DNA — sekvenovanie DNA	688
13.16	Literatúra	688