

OBSAH

Kapitola 1	<i>Pavel Beran</i>	
1.	PŘEDMLUVA	1
Kapitola 2	<i>Vladislav Čurn</i>	
2.	ENZYMY V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII	3
2.1.	Restrikční endonukleázy	4
2.1.1.	Restrikční endonukleázy třídy I	5
2.1.2.	Restrikční endonukleázy třídy II	6
2.1.3.	Restrikční endonukleázy třídy III	6
2.1.4.	Restrikční endonukleázy třídy IV	7
2.1.5.	Restrikční endonukleázy třídy V	7
2.1.6.	Využití restrikčních endonukleáz	7
2.2.	Ostatní nukleázy	9
2.2.1.	DNáza I (hovězí pankreatická DNáza)	10
2.2.2.	DNáza II	11
2.2.3.	Mikrokokální nukleáza (ze <i>Staphylococcus aureus</i>)	11
2.2.4.	Mung bean nukleáza	11
2.2.5.	Exonukleáza VII	12
2.2.6.	Exonukleáza III	12
2.2.7.	Bal31 exonukleáza	13
2.2.8.	Další používané nukleázy (DNázy)	13
2.2.9.	RNáza A (RNáza I, pankreatická RNáza)	13
2.2.10.	RNáza T1, U2 a jiné RNázy	14
2.2.11.	RNáza H	14
2.3.	Polymerázy	15
2.3.1.	DNA a RNA polymerázy	15
2.3.2.	DNA dependentní DNA polymerázy	16
2.3.3.	DNA polymeráza I z <i>E. coli</i> (DNAP I)	16
2.3.4.	Klenowův fragment	17
2.3.5.	T4 DNA polymeráza (T4 DNAP)	18
2.3.6.	T7 DNA polymeráza	18
2.3.7.	Taq DNA polymeráza (Taq DNAP)	18
2.3.8.	RNA dependentní DNA polymerázy	19
2.3.9.	Reversní transkriptáza z retrovirů	20
2.3.10.	Jiné reversní transkriptázy	20
2.3.11.	Netemplátové DNA polymerázy	21
2.3.12.	Terminální deoxyribonukleotidyl transferáza (TdT)	21
2.3.13.	DNA dependentní RNA polymerázy	21
2.3.14.	Bakteriofágové RNA polymerázy	21
2.3.15.	RNA dependentní RNA polymerázy	22
2.3.16.	Netemplátové RNA polymerázy	22
2.4.	Ligázy a topoizomerázy	22
2.4.1.	T4 DNA ligáza	23
2.4.2.	Jiné DNA ligázy	23
2.4.3.	T4 RNA ligáza	24
2.4.4.	Topoizomerázy	24
2.5.	Ostatní enzymy	24
2.5.1.	Fosfatázy	24
2.5.2.	CIP alkalická fosfatáza	25
2.5.3.	Bakteriální alkalická fosfatáza (BAP)	25
2.5.4.	Termosenzitivní fosfatázy	26
2.5.5.	Polynukleotid kinázy	26
2.5.6.	T4 polynukleotid kináza	26
2.5.7.	Proteázy	26
2.5.8.	Proteináza K	27
2.5.9.	Pronáza	27

2.5.10.	Vysoce specifické proteázy	27
2.5.11.	Další enzymy se vztahem k nukleovým kyselinám:	28
2.6.	Použitá literatura	28

Kapitola 3	<i>Eva Jozová, Irena Hoštičková</i>	
3.	IZOLACE A PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN	31
3.1.	Základní kroky izolace NK	31
3.2.	Odběr materiálu	31
3.3.	Homogenizace materiálu	32
3.4.	Lyze buněk	33
3.5.	Denaturace a vysrážení kontaminujících bílkovin	34
3.6.	Precipitace NK	34
3.7.	Přečištění a rozpouštění NK	34
3.8.	Uchovávání izolované NK	35
3.9.	Kontrola izolace	35
3.9.1.	Agarózový gel	36
3.9.2.	Spektrofotometrické měření	36
3.9.3.	Fluorimetrické měření	36
3.10.	Druhy izolací NK	37
3.10.1.	Fenol-chloroformová izolace	37
3.10.2.	Magnetické izolace	37
3.10.3.	Kolonkové izolace	38
3.10.4.	Izolace pomocí chelexu	39
3.11.	Porovnání metod izolace DNA	39
3.12.	Izolace a purifikace RNA	40
3.12.1.	Sběr a příprava vzorků	40
3.12.2.	Vlastní extrakční metody	40
3.12.3.	Úprava získané RNA	40
3.13.	Použitá literatura	41
Kapitola 4	<i>Eva Jozová</i>	
4.	ELEKTROFORÉZA	43
4.1.	Gelová elektroforéza	44
4.1.1.	Polyakrylamidový gel (PAGE, SDS-PAGE)	45
4.1.2.	SDS-PAGE	45
4.1.3.	Horizontální elektroforéza	46
4.1.4.	Vertikální elektroforéza	46
4.1.5.	Kontinuální pufrovací systém	47
4.1.6.	Diskontinuální pufrovací systém	47
4.1.7.	Elektroforetické pufrы	47
4.1.8.	Velikostní markery	48
4.1.9.	Způsoby vizualizace	49
4.1.10.	Vizualizace na agarózovém gelu	49
4.1.11.	Vizualizace polyakrylamidového gelu	49
4.1.12.	Použití a porovnání metod	50
4.2.	Další typy gelové elektroforézy	51
4.2.1.	Nativní gely	51
4.2.2.	Izoelektrická fokusace (IEF)	51
4.2.3.	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	52
4.2.4.	Teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE)	52
4.2.5.	Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)	52
4.3.	Kapilární elektroforéza	52
4.3.1.	Princip metody	53
4.3.2.	Použití	55
4.3.3.	Typy kapilární elektroforézy	55

4.4.	Čipová elektroforéza	57
4.4.1.	Princip metody	57
4.4.2.	Systém mikrofluidního čipu	57
4.4.3.	Systém využívající velikosti napětí	58
4.5.	Použití	59
4.6.	Porovnání metod	60
4.7.	Použitá literatura	60
Kapitola 5	<i>Pavel Beran, Vladislav Čurn</i>	
5.	HYBRIDIZAČNÍ METODY	63
5.1.	Základní principy hybridizačních metod	63
5.2.	Southern blot	66
5.3.	Dot Blot hybridizace	68
5.4.	Northern blot	69
5.5.	Reverzní northern blot	69
5.6.	Microarray	70
5.7.	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a primed in situ DNA synthesis (PRINS)	71
5.7.1.	Fyzické a cytogenetické mapování genomu	72
5.7.2.	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	73
5.7.3.	Primed in situ labelling (PRINS)	74
5.8.	Použitá literatura	75
Kapitola 6	<i>Vladislav Čurn</i>	
6.	KLONOVÁNÍ DNA A GENOVÉ KNIHOVNY	77
6.1.	Klonování DNA	77
6.2.	Klonovací vektory	79
6.3.	Plazmidové klonovací vektory a jejich selekční systémy	84
6.3.1.	Vektor pBR322 pro negativní selekci	84
6.3.2.	pUC vektory pro quasi-positivní galaktosidázovou selekci	85
6.3.3.	Analýza ligační směsi	87
6.3.4.	Další struktury plazmidových klonovacích vektorů	87
6.4.	Typy klonování	88
6.4.1.	Tradiční klonování (subklonování)	88
6.4.2.	PCR klonování	89
6.4.3.	TA klonování	89
6.4.4.	PCR klonování - In vitro DNA Assembly	90
6.5.	Expresní vektory	90
6.6.	Genové knihovny	91
6.7.	Konstrukce knihoven DNA	91
6.8.	Skríning knihoven DNA - důkaz přítomnosti klonu v knihovně	94
6.9.	Použitá literatura	95
Kapitola 7	<i>Irena Hoštičková</i>	
7.	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	97
7.1.	Princip metody PCR	98
7.1.1.	Složení reakční směsi	98
7.1.2.	Průběh PCR reakce	99
7.1.3.	Detekce amplifikovaných produktů	100
7.2.	Techniky založené na PCR reakci	100
7.2.1.	Multiplex PCR	100
7.2.2.	Nested PCR	101
7.2.3.	Touchdown PCR	101
7.2.4.	RACE	101
7.2.5.	DOP-PCR	102

7.2.6.	In situ PCR	102
7.2.7.	AP-PCR	103
7.3.	Real-time PCR	103
7.3.1.	Vývoj metody real-time PCR	103
7.3.2.	Specifika metody real-time PCR	104
7.3.3.	Používané systémy detekce	104
7.3.4.	Interkalační barviva	104
7.3.5.	Fluorescenčně značené oligonukleotidy	105
7.3.6.	Vyhodnocení získaných dat	106
7.3.7.	Absolutní kvantifikace	106
7.3.8.	Komparativní (relativní) kvantifikace	106
7.3.9.	Účinnost reakce	107
7.3.10.	Analýza křivky tání	107
7.3.11.	Aplikace metody	107
7.3.12.	Detekce genomické DNA	108
7.3.13.	Kvantifikace transkriptů	108
7.3.14.	HRM analýza	108
7.4.	Použitá literatura	108
Kapitola 8	Dagmar Stehlíková	
8.	IZOTERMÁLNÍ AMPLIFIKACE NK	111
8.1.	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	111
8.2.	Princip metody LAMP	112
8.3.	Primery	113
8.4.	Vizualizace	114
8.4.1.	Elektroforéza	114
8.4.2.	Turbidimetrie	115
8.4.3.	Fluorescence, kolorimetrie	115
8.4.4.	Real-time fluorescence	116
8.9.	Využití metody LAMP	116
8.10.	Použitá literatura	117
Kapitola 9	Ondřej Hejna, Pavel Beran	
9.	SEKVENOVÁNÍ DNA	119
9.1.	Sekvenování DNA – Sangerova metoda	119
9.2.	Nové technologie sekvenování	121
9.2.1.	Úvod	121
9.2.2.	Historie	122
9.2.3.	Limitace první generace sekvenačních technik	122
9.2.4.	Druhá generace sekvenačních technik	123
9.2.5.	Představení jednotlivých sekvenačních platform	130
9.2.6.	Třetí generace sekvenování	141
9.3.	Použitá literatura	146