

Metody molekulární biologie

1. Základní metody molekulární biologie

A. Izolace nukleových kyselin

- Metody využívající různé rozpustnosti
- Metody adsorpční
- Izolace RNA

B. Centrifugační techniky

- Princip separace částic při centrifugaci
 - diferenciální centrifugace
 - zonální ultracentrifugace, gradientní centrifugace, detekce biomakromolekul po separaci
 - izokinetická centrifugace, stanovení sedimentačního koeficientu, výpočty mol. hmotnosti biomakromolekul
 - izopyknická centrifugace, stanovení hustoty biopolymerů, obsahu GC v DNA, využití při odlišení DNA s různou konformací (EB/CsCl gradient)

C. Elektroforéza nukleových kyselin

- Princip separace částic při elektroforéze
 - a) Elektroforetická separace v gelech; agarozové a polyakrylamidové gely
 - Separace nukleových kyselin a restrikčních fragmentů DNA, detekce NK v gelech, barvení: EB, Ag, fluorescenční barviva, autoradiografie
 - Typy hmotnostních standardů, výpočet velikosti biomakromolekul
 - b) Pulzní gelová elektroforéza
 - Princip separace NK v pulzním poli
 - Jednotlivé typy PFGE a jejich využití
 - Hmotnostní standardy při PFGE
 - Využití PFGE při analýze genomů.

D. Elektronová mikroskopie

- Využití EM při analýze NK, princip EM
- Příprava vzorků pro EM
- Analýza heteroduplexů, mapování NK, identifikace oblastí bohatých AT páry, míst vazby proteinů apod.
- Analýza buněčných a molekulárních struktur v EM

2. Využití enzymů při manipulacích s NK *in vitro*

- přehled a dělení enzymů podle zdrojů, substrátů a aktivit
- restriční endonukleázy, charakteristika, definice jednotky, způsob využití
- vliv metylace na aktivitu restričních enzymů
- využití enzymů při značení NK
- zpětná transkriptáza: příprava cDNA
- využití enzymů při klonování
- řízené vytváření delecí nukleázami Bal31, ExoIII
- modifikace konců molekul DNA

3. Hybridizace NK

- rozdělení hybridizačních technik
- fyzikálně-chemická podstata hybridizace NK, faktory ovlivňující tvorbu hybridů
- radioaktivní a neradioaktivní značení NK
- způsoby značení DNA sond: - použití náhodných oligonukleotidů
- posunem jednořetězcového zlomu
- značení konců
- značení vektoru s naklonovanou sondou
- značení transkriptů *in vitro*
- hybridizace *in situ*
- hybridizace na filtrech: Southernův blotting, northern blotting, western blotting, south-western blotting
- hybridizace kolonií
- tečková hybridizace

4. Sekvencování NK

- chemická metoda (Maxam-Gilbert)
- enzymová metoda (Sanger)
- automatické sekvencování
- využití PCR pro sekvencování

5. Průtoková cytometrie

- princip
- využití

6. Přenos genů do živých buněk

- **základní transfekční techniky (precipitace fosforečnanem vápenatým, lipofekce, elektroporace, mikroinjekce, použitím virových vektorů)**
- **přenos genů do zárodečných myších buněk mikroinjekcí**
- **přenos genů do myši prostřednictvím embryonálních kmenových buněk**
- **přenos genů do rostlinných buněk**

7. Klonování DNA, genové knihovny

- **příprava rekombinantních molekul DNA, základní pojmy**
- **základní typy bakteriálních vektorů a jejich charakteristiky (klonovací vektory, expresivní vektory, bifunkční vektory)**
 - **plazmidové vektory (pBR322, pUC)**
 - **vektory odvozené od bakteriofágů (lambda, M13, P1)**
 - **kosmidy, fágemidy, fasmidy, pEMBL, umělé bakteriální a kvasinkové chromozomy**
- **selekce a analýza rekombinantních klonů, modrobílý test**
- **zakládání genových knihoven, typy genových knihoven (genomové, cDNA, expresní)**
- **vektory používané pro přenos genů do kvasinek, rostlin a živočichů (přehledně)**
- **transkripce a translace in vitro**

8. PCR

- **princip PCR, charakteristika reakčních složek, příprava primerů, detekce produktů**
- **typy PCR (asymetrická, inverzní, RT-PCR, RACE, in situ PCR aj)**
- **využití PCR pro detekci mutací a polymorfismů (obecné principy)**
- **využití PCR-fingerprintů v praxi (forenzní genetika, šlechtitelství, archeologie, aj)**

9. Analýza proteinů

- **polyakrylamidová gelová elektroforéza – princip, použití**
- **izoelektrická fokuzace**
- **dvourozměrná gelová elektroforéza**
- **imunoprecipitace proteinů**
- **příprava monoklonálních a polyklonálních protilátek a jejich využití**

○ Analýza interakcí protein – DNA

- „Footprinting“ princip a využití
- technika založená na změně pohyblivosti DNA v elektrickém poli po navázání proteinu („electrophoretic mobility shift assay“)
- použití reportérských genů při studiu aktivity transkripčních faktorů a při studiu struktury promotorů

10. Mapování genomů, restriční mapování, základy genomiky

- přístup shora dolů a zdola nahoru, konstrukce (makro)restričních map konstrukce kontigové mapy,
- strategie využití STS, ETS, STS-YAC a STS-BAC při mapování genomů
- klonování specifických genů, diferenciální skrínig
- vyhledávání a identifikace genů, poziční a funkční klonování

11. Diagnostika - Přehled používaných technik pro DNA fingerprinting a význam DNA typizačních metod

A. Genotypové typizační metody bez amplifikace DNA

- Restriční analýza celkové chromozomální DNA (analýza malých fragmentů)
- Makrorestriční analýza (izolace DNA pro PFGE, kritéria pro výběr vhodných restričních enzymů, faktory ovlivňující separaci DNA při PFGE, dvourozměrná PFGE, separace kružnicových molekul, interpretace výsledků PFGE u bakteriálních genomů)
- Analýza plazmidové DNA

B. Genotypové typizační metody využívající selektivní hybridizaci restričních fragmentů (SRFH)

- Základní metodické kroky pro SRFH
- Přehled a příprava sond používaných pro SRFH (náhodně klonované sondy, genově specifické sondy, sondy z vícekopiových elementů, sondy z ribozomální RNA)
- Ribotypizace (historie, charakteristika bakteriálního rrn operonu a princip metody, automatizované systémy)
- Metody pro DNA fingerprinting lidského genomu (používané sondy, stanovení paternity)

C. Genotypové typizační metody s amplifikací DNA

- AP-PCR
- interrepetitivní PCR
- ITS-PCR
- AFLP

12. Molekulární diagnostika genů nebo jejich částí

Amplifikační metody (PCR-RFLP, multiplex-PCR, ARMS)

Metody využívající elektroforetickou separaci DNA s rozdílnou konformací

- Konformační polymorfismus jednořetězců (SSCP)
- Dideoxy-fingerprinting (DDF)
- Denaturační gradientová elektroforéza (DGGE)
- Analýza konformace dsDNA (DCSA)
- Heteroduplexní analýza (HMA)

Typizační metody s použitím endonukleáz specifických pro RNA nebo ssDNA

- Polymorfismus délky restrikčních fragmentů vytvořených cleavasou (CFLP)
- RNázová protekční analýza
- Fingerprinting pomocí oligonukleotidů

Speciální amplifikační metody

- Amplifikace DNA pomocí transkripce (TAS, 3SR)
- Amplifikace s vytěsňováním řetězce (SDA)
- Ligázová amplifikační reakce (LAR, LCR)
- Amplifikace RNA sondy pomocí Q β replikázy