

Předpříprava

Šesté cvičení se bude skládat ze dvou nezávislých částí – kvantitativní PCR a izolace plazmidů. Pomocí qPCR budeme kvantifikovat množství DNA cytomegaloviru (CMV) v klinickém vzorku (již purifikovaná DNA, abychom se vyhnuli zdravotnímu riziku). Paralelně budeme izolovat plazmidovou DNA pomocí komerčního kitu; budeme podrobněji procházet jednotlivé kroky a probírat jeho možné modifikace.

Cytomegalovirus:

- Epidemiologie a patofyziologie CMV
 - https://www.youtube.com/watch?v=7HJZFRnVct8&ab_channel=macrophage
- Histopatologie – mikroskopický průkaz CMV infekce
 - https://www.youtube.com/watch?v=Daz7gH0kYY0&ab_channel=WashingtonDeceit
 - hlavně části v 2:22 a 3:22

qPCR:

- Princip metody
 - https://www.youtube.com/watch?v=1kvy17ugl4w&ab_channel=NewEnglandBiolabs
- Analýza dat
 - https://www.youtube.com/watch?v=vc823HKfYDI&ab_channel=ThermoFisherScientific
 - stačí po 1:15
- Zjistěte, prosím, rovnici pro výpočet efektivity qPCR reakce

Plazmid je malá, často kružnicová, molekula DNA převážně u bakterií. Replikace probíhá nezávisle na chromozomu. Pro hostitelskou buňku nejsou nezbytné, ale často přináší nějakou konkurenční výhodu, např. rezistenci k antibiotiku/ům. Nesou jen několik málo genů. Jsou často využívány pro laboratorní genovou manipulaci.

Plazmidy:

- Příprava k diskusi:
 - I v genomu se můžou nacházet elementy, které nejsou pro hostitelskou buňku nezbytné, ale můžou pro ni být výhodné. Jaké to jsou? Liší se nějak charakteristiky těchto genů v genomu a na plazmidu?
 - Který krok při izolaci plazmidové DNA je podle Vás nejkritičtější a proč? Jak bychom ho mohli vylepšit? Využijte zkušenosti s izolací bakteriální genomové DNA. Vyberte pouze jeden krok. (Tip – neexistuje jediná správná ani špatná odpověď.)
 - Co si myslíte o této modifikaci tradičního protokolu purifikace plazmidů? (jen abstrakt) <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160509>