

## Nový sylabus

### 1. Cytokinetické parametry buněk (prof. Hofmanová, BFU AV ČR, v.v.i.)

Teorie: Kultivace a využití buněčných kultur, typy plastů pro buněčné kultury, bezpečnost práce v laboratoři, obsluha flow boxu, pasážování buněk, cytokinetické parametry (proliferace, diferenciace, apoptóza) a metody jejich detekce. Experimenty: Stanovení počtu a viability buněk pomocí přístroje CASY, stanovení stupně diferenciace metodou ALP, detekce apoptotických buněk pomocí DAPI.

### 2. Hmotnostní spektrometrie a separační techniky (doc. Cigánek, VuVeL)

Teorie: Separační techniky, kapalinová chromatografie, HPLC, hmotnostní spektrometrie, kombinace se separačními technikami, vhodné analyty, princip ionizace vzorku, typy analyzátorů. Praktická ukázka v laboratoři: GC/MS a jeho využití pro biologické aplikace, LC/MS-MS a její využití pro metabolomiku a využití LC/HybridMS v lipidomice.

### 3. Izolace RNA (doc. Vondráček, BFU AV ČR, v.v.i.)

Teorie: Důvody izolace RNA, Rázy a ochrana před jejich působením, izolace RNA organickou extrakcí, afinitní purifikace RNA, izolace mRNA pomocí kitu, stanovení koncentrace a čistoty a stability izolované RNA. Experiment: Buňky hepatocelulárního karcinomu HepG2 ovlivněné a neovlivněné 10 nM TCDD po 24 hod, izolace celkové RNA pomocí kolonového kitu.

### 4. Průtoková cytometrie (Dr. Souček, BFU AV ČR, v.v.i.)

Teorie: Principy průtokové cytometrie a detekce fluorescenčního signálu, využití pro různé částice, příprava materiálu pro průtokovou cytometrii, sortování buněk, vícebarevné analýzy, analýza buněčného cyklu, fluorescenční proteiny. Praktická ukázka v laboratoři: Separace a následný sorting živých a mrtvých buněk na základě propustnosti barviva propidium jodid.

### 5. Transfekce (Dr. Medalová, FIŽ, MU)

Teorie: Principy transfekce, používané vektory, stabilní vs. transientní transfekce, nejčastěji používané metody transfekce, jejich výhody a nevýhody, specifické metody transfekce, možnosti využití transfekčních technik. Principy konfokální mikroskopie a výhody jejího použití ve srovnání s běžnou fluorescenční mikroskopií. Experiment: Transfekce buněk HEK293 plazmidem nesoucím eGFP protein pomocí nejčastěji používaných metod (kationické polymery, lipofekce, fugene, elektroporace, nukleofekce) a hodnocení účinnosti transfekce pomocí fluorescenčního mikroskopu a průtokovou cytometrií. Praktická ukázka snímání obrazu na konfokálním mikroskopu včetně optimalizace získaných výsledků.

### 6. Nukleární magnetická rezonance (NMR) (doc. Žídek, CEITEC)

Teorie: Princip NMR - interakce jádra s nenulovým spinem v magnetickém poli, magnetická pole v molekule a jejich interakce s ostatními jádry a elektrony, využití těchto interakcí a vztahů pro NMR, kvantifikace výsledků pomocí známých vzdáleností protonů, vzorky vhodné pro NMR, využití NMR pro analýzu struktury molekul. Praktická ukázka v laboratoři: konstrukce NMR spektrometru, nastavení základních experimentů, zpracování dat a ukázka spekter.

### 7. qRT-PCR (Dr. Medalová, FIŽ, MU)

Teorie: Zpětný přepis mRNA do cDNA, namnožení cDNA pomocí real time cyklu, metody kvantifikace produktu pomocí fluorescence snímání po každém proběhlém cyklu, typy qRT-PCR a jejich výhody, ověření specifity reakce pomocí tavné křivky, způsoby vyhodnocení výsledků, počítání koncentrací roztoků a ředění buněčných suspenzí, principy krájení řezů na kryostatu, výhody této metody vůči parafinovým vzorkům. Experiment: Přepis celkové RNA získané izolací v lekci 3 do cDNA. Získaná cDNA je použita pro kvantifikaci exprese proteinových transportérů rodiny ABC

(ABC A1, ABC B1, ABC C1, ABC G2) a house-keeping genu HPRT pomocí LightCycleru a inkorporace fluorescenční značky SYBR green. Krájení kryořezů na kryostatu.

#### 8. Genové inženýrství rostlin (doc. Hejátko, CEITEC)

Teorie: Struktura genů, regulace transkripce, metody kvantitativní i kvalitativní analýzy genové exprese, DNA a proteinové chipy, next generation transkripční profilování, příprava translační a transkripční fúze analyzovaného genu s reportérem, identifikace mutantů se změnou expresního profilu využití internetových databází.

## Starý sylabus

### 1. Buněčné kultury

Stanovení počtu a viability buněk: ukázka vybavení laboratoře, obsluha flow boxu, typy plastů pro buněčné kultury, bezpečnost práce, pasážování buněk, počítání částic na Coulter Counter, určení životnosti buněk barvením eosinem.

Detekce apoptotických buněk: stanovení apoptotického indexu - barvení pomocí DAPI (fluorescenční detekce buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem). Měření mitochondriálního membránového potenciálu apoptotických buněk pomocí barvení TMRE (tetrametyl rhodamin etylester) a detekce průtokovou cytometrií.

Stanovení stupně diferenciací leukemických buněk: detekce povrchových molekul CD11b a CD14 u buněk myeloidní linie HL-60 průtokovou cytometrií pomocí přímé imunocytochemie s protilátkami značenými fluorescenčními barvivami. Stanovení míry oxidativního vzplanutí jako ukazatele diferenciací u buněk HL-60 za použití různých aktivátorů fagocytózy (zymosan, forbol myristat acetat, Ca<sup>2+</sup> ionofor) na destičkovém luminometru.

Stanovení diferenciací buněk nádoru kolonu (linie HT-29): stanovení alkalické fosfatázy kolorimetricky (alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení).

### 2. Fluorescenční a konfokální mikroskopie:

Princip funkce fluorescenčního mikroskopu (výhody a limitace), rozdíly mezi konvenční a konfokální mikroskopií. Pozorování trojrozměrně fixovaných interfázních jader, ve kterých je fluorescenčně značený gen a jinou fluorescenční značkou obarven celý chromozom, na kterém se daný gen nachází.

### 3. Biochemické metody:

Příprava buněčného lyzátu pro Western blotting a izolaci RNA:

Metodika přípravy buněčného lyzátu pro detekci proteinů a pro izolaci RNA, stanovení koncentrace proteinů pomocí kitu Bio-Rad DC protein.

Elektroforéza a transfer proteinů na membránu: separace stanoveného množství proteinů připravených v rámci předchozího cvičení pomocí SDS-PAGE, přenos na PVDF membránu pomocí semidry electroblotting.

Imunodetekce:

Imunodetekce beta-aktinu pomocí primární neznačené protilátky (anti-beta-aktin) a sekundární protilátky značené křenuvou peroxidázou ve vzorcích zpracovaných a separovaných v rámci předchozích cvičení, vizualizace bude provedena pomocí kitu ECL Plus.

Izolace celkové RNA, stanovení koncentrace a kvality:

Izolace RNA z připraveného buněčného lyzátu pomocí komerčního kitu, stanovení koncentrace RNA a její čistota na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda:

Stanovení tumor nekrotizujícího faktoru alfa pomocí komerčního kitu od firmy R&D system Duoset v médiu získaného z diferencovaných myeloidních buněk THP-1 po aplikaci endotoxinu v různých koncentracích po dobu 24 hodin