

Obsah

<i>Předmluva k pátému vydání</i>	xiii
<i>Předmluva ke čtvrtému vydání</i>	xiv
<i>Předmluva ke třetímu vydání</i>	xv
<i>Předmluva ke druhému vydání</i>	xvi
<i>Předmluva k prvnímu vydání</i>	xviii

ČÁST 1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY KLONOVÁNÍ GENŮ A ANALÝZY DNA

1

1 Proč jsou klonování genů a analýza DNA důležité	3
1.1 Raný rozvoj genetiky	3
1.2 Počátky klonování genů a polymerázové řetězové reakce (PCR)	4
1.3 Co je klonování genů?	5
1.4 Co je PCR?	6
1.5 Proč jsou klonování genů a PCR tak důležité	8
1.5.1 Izolace genu klonováním.	8
1.5.2 Izolace genu pomocí PCR.	9
1.6 Jak se v knize orientovat.	12
Doplňující literatura	13
2 Vektory používané při klonování genů: plazmidy a bakteriofágy.	14
2.1 Plazmidy	14
2.1.1 Charakteristika plazmidů	14
2.1.2 Velikost a počet kopií	16
2.1.3 Konjugace a kompatibilita.	17
2.1.4 Klasifikace plazmidů	18
2.1.5 Plazmidy v jiných organizmech, než jsou bakterie	19
2.2 Bakteriofágy	19
2.2.1 Základní znaky bakteriofágů.	19
2.2.2 Lyzogenní fágy.	20
2.2.3 Viry jako klonovací vektory pro další organizmy.	27
Doplňující literatura	27
3 Purifikace DNA z živých buněk	28
3.1 Izolace celkové buněčné DNA	28

3.1.1	Růst bakteriální kultury a sedimentace bakteriálních buněk	29
3.1.2	Příprava bakteriálního extraktu	30
3.1.3	Izolace DNA z buněčného extraktu	33
3.1.4	Zahuštění vzorku DNA	36
3.1.5	Měření koncentrace DNA	37
3.1.6	Izolace celkové buněčné DNA z jiných organismů než bakterií	38
3.2	Izolace plazmidové DNA	39
3.2.1	Separace na základě velikosti	41
3.2.2	Separace na základě konformace	42
3.2.3	Amplifikace plazmidu	46
3.3	Izolace bakteriofágové DNA	47
3.3.1	Růst kultur k získání velkého množství částic bakteriofága λ	48
3.3.2	Příprava nelyzogenního fága λ	49
3.3.3	Sedimentace fága z infikované kultury	50
3.3.4	Izolace DNA z fágových částic λ	51
3.3.5	Obtíže spojené s purifikací DNA z M13	52
	Doplňující literatura	53
4	Manipulace s purifikovanou DNA	54
4.1	Enzymy používané k manipulacím s DNA	55
4.1.1	Nukleázy	55
4.1.2	Ligázy	57
4.1.3	Polymerázy	58
4.1.4	Enzymy modifikující DNA	60
4.1.5	Topoizomerázy	61
4.2	Enzymy specificky štěpící DNA – restrikční endonukleázy	61
4.2.1	Objev a funkce restrikčních endonukleáz	63
4.2.2	Restrikční endonukleázy typu II štěpí DNA ve specifických nukleotidových sekvencích	64
4.2.3	Tupé a kohezní konce	64
4.2.4	Frekvence rozpoznávacích sekvencí v DNA molekule	65
4.2.5	Provádění restrikční reakce v laboratoři	68
4.2.6	Analýza výsledku štěpení restrikční endonukleázou	70
4.2.7	Zjištění velikosti molekul DNA	74

4.2.8	Mapování pozic různých restrikčních míst na molekule DNA	76
4.3	Ligace – spojování molekul DNA	78
4.3.1	Působení DNA ligázy	78
4.3.2	Kohezní konce zvyšují účinnost ligace	78
4.3.3	Připojení kohezních konců na tupé konce molekuly ...	80
	Doplňující literatura	86
5	Přenos DNA do živých buněk	87
5.1	Transformace – příjem molekuly DNA bakteriálními buňkami ..	90
5.1.1	Ne všechny druhy bakterií jsou stejně schopné přijímat DNA.	90
5.1.2	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	90
5.1.3	Selekce transformovaných buněk	91
5.2	Identifikace rekombinantů	93
5.2.1	Výběr buněk transformovaných plazmidem pBR322 – inserční inaktivace genu pro rezistenci k antibiotiku ..	93
5.2.2	Inserční inaktivace nemusí být vždy spojena s rezistencí k antibiotiku	95
5.3	Přenos fágové DNA do bakteriální buňky	97
5.3.1	Transfekce	98
5.3.2	Příprava klonovacích vektorů λ <i>in vitro</i>	98
5.3.3	Fágová infekce se na agarovém médiu objeví ve formě plaků	99
5.4	Identifikace rekombinantních fágů	101
5.4.1	Inserční inaktivace genu <i>lacZ'</i> pomocí fágového vektoru	101
5.4.2	Inserční inaktivace genu <i>cI</i> fága λ	102
5.4.3	Selekce pomocí fenotypu <i>Spi</i>	103
5.4.4	Selekce na základě velikosti genomu λ	103
5.5	Přenos DNA do nebakteriálních buněk	103
5.5.1	Transformace jednotlivých buněk	103
5.5.2	Transformace celých organismů	106
	Doplňující literatura	106
6	Klonovací vektory pro <i>E. coli</i>	107
6.1	Klonovací vektory založené na plazmidech z <i>E. coli</i>	108
6.1.1	Názvosloví plazmidových klonovacích vektorů	108
6.1.2	Užitečné vlastnosti pBR322	108

6.1.3	Původ pBR322.	109
6.1.4	Důmyslnější plazmidové klonovací vektory z <i>E. coli</i> ..	110
6.2	Klonovací vektory založené na bakteriofágu M13	114
6.2.1	Vývoj klonovacích vektorů M13	115
6.2.2	Hybridní plazmidové vektory M13	120
6.3	Klonovací vektory založené na bakteriofágu λ	120
6.3.1	Segmenty genomu λ mohou být odstraněny bez narušení životaschopnosti	122
6.3.2	Přírodní selekce může být použita k izolaci modifiko- vaného λ , kterému chybí určitá restriční místa	123
6.3.3	Inserční a substituční vektory	123
6.3.4	Klonovací experimenty s λ inserčními nebo substitučními vektory	126
6.3.5	Velké fragmenty DNA mohou být klonovány pomocí kosmidu	127
6.4	λ a jiné velkokapacitní vektory umožňují konstrukci genomových knihoven	129
6.5	Vektory pro jiné bakterie	130
	Doplňující literatura	131
7	Klonovací vektory pro eukaryotní organizmy	132
7.1	Vektory pro kvasinky a jiné houby	132
7.1.1	Selekční markery pro 2 μ m plazmid	132
7.1.2	Vektory založené na 2 μ m plazmidu - kvasinkové epizomální plazmidy	133
7.1.3	YEp se může integrovat do chromozomální DNA kvasinky	135
7.1.4	Jiné typy kvasinkových klonovacích vektorů	135
7.1.5	Umělé chromozomy můžeme použít ke klonování velkých částí DNA v kvasinkách	138
7.1.6	Vektory pro jiné kvasinky a houby	140
7.2	Klonovací vektory pro vyšší rostliny	141
7.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> – nejmenší genový inženýr přírody	141
7.2.2	Klonování genů v rostlinách přímým přenosem genu ..	147
7.2.3	Pokusy s použitím rostlinných virů jako klonovacích vektorů.	150
7.3	Klonovací vektory pro živočichy	151
7.3.1	Klonovací vektory pro hmyz	151

7.3.2	Klonování u savců	153
	Doplňující literatura	156
8	Jak lze získat klon určitého genu	158
8.1	Otázka selekce	158
8.1.1	Požadovaný klon získáme pomocí dvou základních strategií	158
8.2	Přímá selekce	160
8.2.1	Možnosti přímé selekce rozšiřuje technika marker rescue.	162
8.2.2	Možnosti a omezení metody marker rescue.	163
8.3	Identifikace klonu z genové knihovny	163
8.3.1	Genomové knihovny	164
8.3.2	Všechny geny nejsou exprimovány současně	165
8.3.3	mRNA lze klonovat jako komplementární DNA	166
8.4	Metody identifikace klonu	166
8.4.1	Komplementární vlákna nukleových kyselin k sobě hybridizují	166
8.4.2	Hybridizační screening kolonií a plaků	168
8.4.3	Příklady praktického využití hybridizačního screeningu	172
8.4.4	Identifikační metody založené na detekci translačního produktu klonovaného genu	177
	Doplňující literatura	180
9	Polymerázová řetězová reakce.	181
9.1	Nástin polymerázové řetězové reakce	181
9.2	Detailní popis PCR.	184
9.2.1	Navržení oligonukleotidových primerů pro PCR.	184
9.2.2	Stanovení správné teploty	186
9.2.3	Studium produktů PCR.	189
9.3	Problémy spojené s chybováním <i>Taq</i> polymerázy	193
	Doplňující literatura	195

ČÁST 2 VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ GENU A ANALÝZY DNA VE VÝZKUMU 197

10	Studium polohy a struktury genu	199
10.1	Jak lze studovat polohu genu	199
10.1.1	Lokalizace genu na malé molekule DNA	199
10.1.2	Nalezení polohy genu na velké molekule DNA	202

10.2	Sekvenování DNA – zjišťování struktury genu	207
10.2.1	Sanger-Coulsonova metoda – nukleotidy ukončující řetězce	207
10.2.2	Automatizované sekvenování DNA	211
10.2.3	Sekvenování PCR produktů	213
10.2.4	Maxam-Gilbertova metoda – chemická degradace DNA	214
10.2.5	Tvorba dlouhých sekvencí DNA	216
10.2.6	Úspěchy v sekvenování DNA	218
	Doplňující literatura	218
11	Zkoumání exprese a funkce genu	220
11.1	Zkoumání transkriptů klonovaného genu	220
11.1.1	Elektronová mikroskopie molekul nukleových kyselin	221
11.1.2	Analýza DNA-RNA hybridů pomocí nukleázy	223
11.1.3	Analýza transkriptu pomocí prodloužení primeru.	224
11.1.4	Další techniky zkoumání RNA transkriptů	225
11.2	Zkoumání regulace genové exprese	230
11.2.1	Identifikace vazebných míst pro proteiny na molekule DNA	231
11.2.2	Identifikace kontrolní sekvence pomocí deleční analýzy	236
11.3	Identifikace a studium translačního produktu klonovaného genu.	239
11.3.1	Metody HRT a HART umožňují identifikovat translační produkt klonovaného genu	239
11.3.2	Analýza proteinů pomocí mutagenese <i>in vitro</i>	240
11.3.3	Studium interakcí protein-protein.	247
	Doplňující literatura	250
12	Studium genomů	252
12.1	Genomika – jak sekvenovat genom	253
12.1.1	Strategie „shotgun“ v sekvenování genomu	254
12.1.2	Strategie „kontigu“ klonů	257
12.1.3	Použití map k sestavení sekvence	261
12.2	Post-genomika – snaha porozumět sekvenci genomu	265
12.2.1	Identifikace genů v sekvenci genomu	265
12.2.2	Určení funkce neznámého genu	268
12.3	Studie transkriptomu a proteomu	269

12.3.1	Studium transkriptomu	270
12.3.2	Studium proteomu	271
	Doplňující literatura	274
ČÁST 3 VYUŽITÍ KLONOVÁNÍ GENŮ A ANALÝZY DNA V BIOTECHNOLOGII		275
13	Produkce proteinů z klonovaných genů	277
13.1	Speciální vektory pro expresi cizích genů v <i>E. coli</i>	279
13.1.1	Promotor jako rozhodující složka expresního vektoru	282
13.1.2	Kazety a genové fúze	285
13.2	Obecné problémy spojené s produkcí rekombinantních proteinů v <i>E. coli</i>	287
13.2.1	Problémy vyplývající ze sekvence cizího genu	288
13.2.2	Problémy způsobené <i>E. coli</i>	291
13.3	Produkce rekombinantního proteinu eukaryotními buňkami	292
13.3.1	Rekombinantní proteiny z kvasinek a filamentních hub	292
13.3.2	Využití živočišných buněk v produkci rekombinantních proteinů	295
13.3.3	Farming – rekombinantní protein z živočichů a rostlin	297
	Doplňující literatura	300
14	Klonování genů a analýza DNA v medicíně	302
14.1	Produkce rekombinantních léčiv	302
14.1.1	Rekombinantní inzulin	302
14.1.2	Syntéza lidských růstových hormonů v <i>E. coli</i>	305
14.1.3	Rekombinantní koagulační faktor VIII	306
14.1.4	Syntéza dalších rekombinantních lidských proteinů	309
14.1.5	Rekombinantní vakcíny	309
14.2	Identifikace genů zodpovědných za onemocnění lidského organismu	314
14.2.1	Jak identifikovat gen zodpovědný za genetickou chorobu	315
14.3	Genová terapie	319
14.3.1	Genová terapie dědičných chorob	319
14.3.2	Genová terapie a rakovina	321
14.3.3	Etické otázky spojené s genovou terapií	322
	Doplňující literatura	322

15	Klonování genů a analýza DNA v zemědělství.	323
15.1	Strategie přidání genu v rostlinném genovém inženýrství.	324
15.1.1	Rostliny vytvářející vlastní insekticidy	324
15.1.2	Plodiny rezistentní k herbicidům	331
15.1.3	Další projekty využívající strategie přidání genu	334
15.2	Odstranění genu	334
15.2.1	Podstata antisense technologie	335
15.2.2	Antisense RNA a regulace dozrávání plodů rajčat ...	336
15.2.3	Další příklady použití antisense RNA v rostlinném genetickém inženýrství.....	340
15.3	Problémy s geneticky modifikovanými rostlinami	341
15.3.1	Obavy spojené s bezpečností selekčních markerů	341
15.3.2	Technologie terminátoru.	342
15.3.3	Nebezpečí dopadu na životní prostředí	344
	Doplňující literatura	345
16	Klonování genů a analýza DNA ve forenzním lékařství.	346
16.1	Analýza DNA při identifikaci osob podezřelých ze spáchání trestného činu	346
16.1.1	Genetický fingerprinting pomocí hybridizačního screeningu	347
16.1.2	Zjištění profilu DNA pomocí PCR krátkých tandemových repetice	347
16.2	Vyšetřování příbuzenských vztahů zjišťováním profilu DNA .	350
16.2.1	Pokrevní příbuzní mají podobné profily DNA.....	350
16.2.2	Zjišťování profilu DNA a ostatky rodu Romanovců ..	350
16.3	Určení pohlaví pomocí analýzy DNA	353
16.3.1	PCR sekvencí specifických pro chromozom Y	353
16.3.2	PCR genu kódujícího amelogenin	354
16.4	Archeogenetika – využití DNA ke studiu evoluce člověka	356
16.4.1	Kořeny moderního člověka.....	356
16.4.2	DNA může být rovněž použito ke studiu prehistorických migrací lidstva	359
	Doplňující literatura	361
	Slovníček	363
	Rejstřík	381