

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
1.1 Základní vybavení laboratoře molekulární biologie.....	10
1.2 Spotřební materiál a chemikálie.....	10
2. <i>Escherichia coli</i> ZÁKLADNÍ ORGANISMUS GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	12
2.1 Hostitelské kmeny <i>E. coli</i>	12
2.2 Vyhodnocování nárůstu.....	13
2.3 Uchovávání bakteriálních kultur.....	14
2.3.1 Příprava zmrzačené kultury.....	15
2.3.2 Příprava kultur inokulovaných vpichem.....	15
2.3.3 Příprava kultur s vrstvou parafinového oleje.....	16
2.4 Oživení lyofilizované mikrobiální kultury.....	16
3. BAKTERIÁLNÍ PLASMIDOVÉ VEKTORY.....	17
3.1 Běžně používané plasmidové vektory pro amplifikaci DNA.....	19
3.1.1 pBR322.....	19
3.1.2 pUC18 a pUC19.....	20
3.1.3 pUC118 a pUC119.....	21
3.1.4 pSP64, pSP65 a řada plasmidů pGEM.....	22
3.2 Bakteriofágové vektory.....	22
3.2.1 Bakteriofág λ.....	22
3.2.2 hf ^r selekce.....	23
3.2.3 sp ^r selekce.....	23
3.2.4 λgt11.....	23
3.2.5 Tvorba bakteriofágových plaků.....	24
3.2.6 Vláknitý bakteriofág M13 a od něj odvozené vektory.....	25
3.2.7 Izolace kolonií obsahujících vektory odvozené od bakteriofága M13...	26
4. VNESENÍ PLASMIDOVÉ DNA DO BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK.....	27
4.1 Příprava kompetentních buněk pomocí CaCl ₂	27
4.2 Transformace.....	28
4.3 Příprava elektrokompetentních buněk.....	29
4.4 Elektroporace.....	29
4.5 Triparentální křížení.....	30
5. IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA.....	32
5.1 Preparace plasmidové DNA.....	32
5.1.1 Minipreparace alkalickou lyzí.....	32
5.1.2 Modifikovaná minipreparace alkalickou lyzí bez použití fenolu.....	34
5.1.3 Izolace DNA z velkého objemu.....	35
5.1.4 Purifikace plasmidové DNA rovnovážnou centrifugací v CsCl.....	36

5.1.5	Izolace malého množství plasmidové DNA na komerčním nosiči.....	38
5.1.6	Izolace velkého množství DNA pomocí komerčního kitu Qiagen.....	40
5.1.7	Příprava lyzátu bakteriofága λ.....	40
5.1.8	Izolace DNA z lyzátů bakteriofága λ	41
5.1.9	Příprava jednořetězcové bakteriofágové DNA	43
5.1.10	Příprava replikativní (dvojřetězcové) formy DNA bakteriofága	44
6.	ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE FRAGMENTŮ DNA.....	45
6.1	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	45
6.2	Izolace a purifikace fragmentů DNA z agarosového gelu.....	50
6.2.1	Elektroeluce fragmentů DNA v elektroelucním přístroji.....	50
6.2.2	Elektroeluce fragmentů DNA v dialyzační membráně.....	50
6.2.3	Purifikace fragmentů DNA pomocí komerčního kitu.....	51
6.3	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	52
7.	IDENTIFIKACE KOLONÍ OBSAHUJÍCÍCH REKOMBINANTNÍ PLASMID	53
7.1	Restrikční analýza plasmidové DNA po minipreparaci.....	53
7.2	Inzerční inaktivace.....	53
7.3	α-komplementace.....	56
7.4	Hybridizace kolonií.....	56
8.	ZÁKLADNÍ OPERACE S DNA.....	61
8.1	Specifické štěpení DNA.....	61
8.1.1	Štěpení DNA restrikčními endonukleasami.....	62
8.1.2	Parciální štěpení restrikčními endonukleasami.....	65
8.2	Modifikace fragmentů DNA.....	67
8.2.1	Oprava 3' nebo 5'-přečnívajících konců na tupé konce.....	67
8.2.2	Oprava přečnívajících konců na tupé konce pomocí Klenowova fragmentu	67
8.2.3	Oprava přečnívajících konců na tupé konce pomocí T4 DNA polymerasy	67
8.2.4	Oprava přečnívajících konců na tupé konce pomocí nukleas.....	68
8.2.5	Částečná oprava přečnívajících konců	69
8.2.6	Vytvoření přečnívajících konců.....	70
8.3	Ligace - spojení fragmentů DNA.....	71
8.3.1	Ligace fragmentů s komplementárními konci.....	71
8.3.2	Ligace fragmentů s tupými konci.....	72
8.3.3	Defosforylace linearizované plasmidové DNA.....	72
8.4	Polohově řízená mutageneze.....	73
8.4.1	Mutageneze pomocí <i>Pfu</i> DNA polymerasy.....	73
8.4.2	Mutageneze s použitím jednořetězcové DNA.....	76
8.4.2.1	Příprava uracilem značeného templátu.....	77
8.4.2.2	Extense mutantního primeru.....	78
9.	ZNAČENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN RADIOIZOTOPY.....	79
9.1	Extense primeru	80

9.2	Příprava sond RNA	80
9.3	• Koncové značení nukleových kyselin.....	80
9.4	• Příprava sondy posunem jednořetězcového zlomu („nick translation“) ..	81
9.5	Zjištění inkorporace radioaktivity do sondy DNA po kyselé precipitaci.	82
10.	POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	83
10.1	Požadavky kladené na primery.....	83
10.2	Termostabilní DNA polymerasy.....	84
10.3	Termocyklér	85
10.4	Průběh PCR.....	85
10.5	Klonování fragmentů PCR.....	90
10.5.1	„TA klonování“	90
10.5.2	Klonování nezávislé na ligaci - LIC	92
10.6	PCR-ELISA	93
11.	ANALÝZA SEKVENCE NUKLEOTIDŮ V DNA.....	95
11.1	• Sekvenování DNA.....	95
11.1.1	• Chemická metoda sekvenování.....	95
11.1.2	• Enzymová (dideoxy) metoda sekvenování.....	96
11.2	Southern blot	104
11.2.1	Štěpení DNA a separace fragmentů.....	106
11.2.2	Přenos DNA z gelu na nitrocelulosovou membránu.....	106
11.2.3	Hybridizace DNA imobilizované na nitrocelulosové membráně.....	108
11.3	Biočipy (angl. microarrays nebo arrays).....	108
12.	ZÁSADY PRÁCE S RNA.....	111
12.1	Inaktivace RNas pomocí DEPC.....	111
12.2	Příprava cytoplasmatické RNA z tkáňových buněk.....	111
12.3	Izolace RNA gramnegativních bakterií.....	112
12.4	Izolace RNA z kvasinek.....	113
12.5	Northern blot.....	113
12.5.1	Elektroforéza za denaturačních podmínek.....	114
12.5.2	Přenos RNA na membránu.....	115
13.	PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	116
13.1.	Exprese v <i>Escherichia coli</i>	116
13.1.1	Promotory.....	117
13.1.2	Translačně iniciační sekvence.....	118
13.1.3	pGEMEX - příklad vektoru pro expresi proteinů v <i>E. coli</i>	118
13.1.4	Exprese genů pod kontrolou promotoru bakteriofága T7.....	121
13.2	Exprese v kvasinkách.....	121
13.2.1	Kvasinkové systémy používané pro expresi.....	122
13.2.2	Kultivace kvasinek.....	123
13.2.3	Uchovávání kvasinek.....	124

13.2.4	Transformace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124
13.2.5	<i>Pichia pastoris</i>	125
13.2.5.1	Příprava kompetentních buněk.....	127
13.2.5.2	Transformace	127
13.2.5.3	Zkouška fenotypu kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33, Mut ⁺	128
13.2.5.4	Exprese v <i>P. pastoris</i>	128
13.2.5.5	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	129
13.2.5.6	Příprava sféroplastů (alternativní metoda).....	129
13.2.5.7	Izolace chromosomální DNA z kvasinek.....	129
14.	TKÁŇOVÉ KULTURY A JEJICH VYUŽITÍ PRO EXPRESI GENŮ.....	131
14.1	Uchovávání buněk.....	136
14.2	Pasážování adherentních buněk.....	137
14.3	Exprese v živočišných buňkách.....	138
14.4	Markery pro pozitivní selekci v živočišných buňkách.....	140
14.5	Příprava stabilně transformovaných buněk.....	141
14.5.1	Selekce klonů.....	143
14.6	Transfekce pomocí CA ₃ (PO ₄) ₂	144
14.6.1	Transfekce elektroporací.....	144
14.6.2	Transfekce tkáňových buněk pomocí LipoFECTAMINU.....	145
14.6.3	Transfekce pomocí DEAE dextranu.....	145
14.7	Exprese v tkáňových buňkách.....	146
14.7.1	Transientní exprese v COS-1 buňkách.....	146
14.7.2	Exprese pomocí systému s vakciniá virem.....	147
14.7.2.1	Kultivace vakciniá víru	148
14.7.2.2	Titrace vakciniá víru.....	148
14.7.2.3	Exprese pomocí vakciniá víru.....	148
14.7.3	Exprese proteinů v hmyzích buňkách použitím bakulovirových vektorů...	149
14.7.3.1	Životní cyklus bakuloviru.....	149
14.7.3.2	Bakulovirový expresní systém.....	150
14.7.3.3	Výběr bakulovirového přenosového vektoru.....	152
14.7.3.4	Příprava rekombinantní bakulovirové DNA.....	153
14.7.3.5	Udržování a kultivace hmyzích buněk.....	153
14.7.3.6	Kotransfekce hmyzích buněk linearizovanou bakulovirovou DNA.....	155
14.7.3.7	Příprava buněk a DNA.....	156
14.7.3.8	Transfekce buněk.....	156
14.7.3.9	Kontrola úspěšnosti transfekce.....	156
14.7.3.10	Příprava zásobní suspenze bakuloviru.....	157
14.7.3.11	Amplifikace víru z kultury rostoucí ve vrstvě.....	157
14.7.3.12	Amplifikace víru ze suspenzní kultury.....	158
14.7.3.13	Zjišťování titru bakulovirové zásobní suspenze.....	158
14.8	Metabolické značení a imunoprecipitace (Pulse/chase).....	159
14.8.1	Analýza metabolické přeměny proteinů	161
14.8.2	Příprava suspenze <i>Staphylococcus aureus</i> pro imunoprecipitaci.....	162
14.8.3	Testování imunoprecipitace pomocí <i>Staphylococcus aureus</i>	163
14.9	Použití reportérových genů pro zjištění aktivity promotorů.....	164
14.10	Infekce tkáňových buněk viriony M-PMV	166

14.10.1	Peletování virových částic uvolněných do média.....	167
14.10.2	Separace virionů v lineárním gradientu sacharosy.....	167
14.11	Příprava buněk pro mikroskopickou analýzu.....	168
14.11.1	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.....	168
14.11.2	Barvení jader pomocí DAPI.....	168
15.	PRINCIP PŘÍPRAVY TRANSGENNÍCH ROSTLIN	169
15.1	Promotory.....	171
15.2	Reportérové geny	171
16.	PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	173
16.1	Izolace proteinu z inkluzních tělisek <i>E. coli</i> a renaturace produktu.....	174
16.2	Izolace rozpustného proteinu z <i>E. coli</i>	178
16.3	Izolace proteinů z periplasmatického prostoru.....	180
16.4	Purifikace fúzních rekombinantních proteinů.....	181
16.5	Purifikace proteinů ve fúzi s hexahistidinovou kotvou.....	183
17.	DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	185
17.1	Stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové	185
17.2	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE).....	185
17.2.1	Příprava gelu.....	188
17.2.2	Příprava a aplikace vzorku:.....	189
17.3	Elektroforéza v Tris-tricinovém pufru.....	191
17.4	Nativní elektroforéza.....	192
17.5	Barvení gelů.....	193
17.6	Izoelektrická fokusace.....	194
17.7	Imunochemická detekce proteinů v gelu –western blot.....	196
17.8	Metabolické značení proteinů.....	200
17.9	Imunoprecipitace značeného proteinu.....	201
18.	STUDIUM VZÁJEMNÉ INTERAKCE PROTEINŮ.....	202
18.1	Dvojhybridový systém	203
18.2	Far western	206
18.3	Koprecipitace proteinů	206
18.4	Chemické prokřížení interagujících proteinů.....	208
18.5	Povrchová plasmonová rezonance (SPR – surface plasmon resonance)....	209
18.6	Fágový displej.....	209
19.	STUDIUM INTERAKCE PROTEINŮ S DNA.....	211
19.1	Příprava jaderných extractů.....	211
19.2	Změna mobility vazbou proteinu.....	213
19.3	Northwestern blot.....	215

13.2.4	Transformace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124	14.10.1	Peletování virových částic uvolněných do média.....	167
13.2.5	<i>Pichia pastoris</i>	125	14.10.2	Separace virionů v lineárním gradientu sacharosy.....	167
13.2.5.1	Příprava kompetentních buněk.....	127	14.11	Příprava buněk pro mikroskopickou analýzu.....	168
13.2.5.2	Transformace	127	14.11.1	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.....	168
13.2.5.3	Zkouška fenotypu kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33, Mut ⁺	128	14.11.2	Barvení jader pomocí DAPI.....	168
13.2.5.4	Expresce v <i>P. pastoris</i>	128	15.	PRINCIP PŘÍPRAVY TRANSGENNÍCH ROSTLIN	169
13.2.5.5	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	129	15.1	Promotory.....	171
13.2.5.6	Příprava sféroplastů (alternativní metoda).....	129	15.2	Reportérové geny	171
13.2.5.7	Izolace chromosomalní DNA z kvasinek.....	129	16.	PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	173
14.	TKÁNOVÉ KULTURY A JEJICH VYUŽITÍ PRO EXPRESI GENŮ	131	16.1	Izolace proteinu z inkluzních tělisek <i>E. coli</i> a renaturace produktu.....	174
14.1	Uchovávání buněk.....	136	16.2	Izolace rozpustného proteinu z <i>E. coli</i>	178
14.2	Pasážování adherentních buněk.....	137	16.3	Izolace proteinů z periplasmatického prostoru.....	180
14.3	Expresce v živočišných buňkách.....	138	16.4	Purifikace fúzních rekombinantních proteinů.....	181
14.4	Markery pro pozitivní selekci v živočišných buňkách.....	140	16.5	Purifikace proteinů ve fúzi s hexahistidinovou kotvou.....	183
14.5	Příprava stabilně transformovaných buněk.....	141	17.	DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	185
14.5.1	Selekce klonů.....	143	17.1	Stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové	185
14.6	Transfekce pomocí CA ₃ (PO ₄) ₂	144	17.2	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE).....	185
14.6.1	Transfekce elektroporací.....	144	17.2.1	Příprava gelu.....	188
14.6.2	Transfekce tkáňových buněk pomocí LipoFECTAMINU.....	145	17.2.2	Příprava a aplikace vzorku.....	189
14.6.3	Transfekce pomocí DEAE dextranu.....	145	17.3	Elektroforéza v Tris-tricinovém pufru.....	191
14.7	Expresce v tkáňových buňkách.....	146	17.4	Nativní elektroforéza	192
14.7.1	Transientní expresce v COS-1 buňkách.....	146	17.5	Barvení gelů	193
14.7.2	Expresce pomocí systému s vakciniá virem.....	147	17.6	Izoelektrická fokusace	194
14.7.2.1	Kultivace vakciniá víru	148	17.7	Imunochemická deteckce proteinů v gelu –western blot.....	196
14.7.2.2	Titrace vakciniá víru	148	17.8	Metabolické značení proteinů	200
14.7.2.3	Expresce pomocí vakciniá víru	148	17.9	Imunoprecipitace značeného proteinu	201
14.7.3	Expresce proteinů v hmyzích buňkách použitím bakulovirových vektorů.....	149	18.	STUDIUM VZÁJEMNÉ INTERAKCE PROTEINŮ	202
14.7.3.1	Životní cyklus bakuloviru	149	18.1	Dvojhybridový systém	203
14.7.3.2	Bakulovirový expresní systém	150	18.2	Far western	206
14.7.3.3	Výběr bakulovirového přenosného vektoru	152	18.3	Koprecipitace proteinů	206
14.7.3.4	Příprava rekombinantní bakulovirově DNA	153	18.4	Chemicke prokřížení interagujících proteinů	208
14.7.3.5	Udržování a kultivace hmyzích buněk	153	18.5	Povrchová plazmonová rezonance (SPR – surface plasmon resonance)	209
14.7.3.6	Kotransfekce hmyzích buněk linearizovanou bakulovirovou DNA	155	18.6	Fágový displej	209
14.7.3.7	Příprava buněk a DNA	156	19.	STUDIUM INTERAKCE PROTEINŮ S DNA	211
14.7.3.8	Transfekce buněk	156	19.1	Příprava jaderných extraktů	211
14.7.3.9	Kontrola úspěšnosti transfekce	156	19.2	Změna mobility vazby proteinu	213
14.7.3.10	Příprava zásobní suspenze bakuloviru	157	19.3	Northwestern blot	215
14.7.3.11	Amplifikace víru z kultury rostoucí ve vrstvě	157			
14.7.3.12	Amplifikace víru ze suspenzní kultury	158			
14.7.3.13	Zjištění titru bakulovirově zásobní suspenze	158			
14.8	Metabolické značení a imunoprecipitace (Pulse/chase)	159			
14.8.1	Analýza metabolické pěstěny proteinů	161			
14.8.2	Příprava suspenze <i>Staphylococcus aureus</i> pro imunoprecipitaci	162			
14.8.3	Testování imunoprecipitace pomocí <i>Staphylococcus aureus</i>	163			
14.9	Použití reportérových genů pro zjištění aktivity promotorů	164			
14.10	Infekce tkáňových buněk viriony M-PMV	166			

13.2.4	Transformace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	124	14.10.1	Peletování virových částic uvolněných do média.....	167
13.2.5	<i>Pichia pastoris</i>	125	14.10.2	Separace virionů v lineárním gradientu sacharosy.....	167
13.2.5.1	Příprava kompetentních buněk.....	127	14.11	Příprava buněk pro mikroskopickou analýzu.....	168
13.2.5.2	Transformace	127	14.11.1	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.....	168
13.2.5.3	Zkouška fenotypu kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33, Mut ⁺	128	14.11.2	Barvení jader pomocí DAPI.....	168
13.2.5.4	Expresy v <i>P. pastoris</i>	128			
13.2.5.5	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	129			
13.2.5.6	Příprava sféroplastů (alternativní metoda).....	129			
13.2.5.7	Izolace chromosomalní DNA z kvasinek.....	129			
14.	TKÁNOVÉ KULTURY A JEJICH VYUŽITÍ PRO EXPRESI GENŮ.....	131	15.	PRINCIP PŘÍPRAVY TRANSGENNÍCH ROSTLIN	169
14.1	Uchovávání buněk.....	136	15.1	Promotory.....	171
14.2	Pasážování adherentních buněk.....	137	15.2	Reportérkové geny	171
14.3	Expresy v živočišných buňkách.....	138			
14.4	Markery pro pozitivní selekci v živočišných buňkách.....	140			
14.5	Příprava stabilně transformovaných buněk.....	141			
14.5.1	Selekce klonů.....	143			
14.6	Transfekce pomocí CA ₃ (PO ₄) ₂	144			
14.6.1	Transfekce elektroporací.....	144			
14.6.2	Transfekce tkáňových buněk pomocí LipoFECTAMINU.....	145			
14.6.3	Transfekce pomocí DEAE dextranu.....	145			
14.7	Expresy v tkáňových buňkách.....	146			
14.7.1	Transientní expresy v COS-1 buňkách.....	146			
14.7.2	Expresy pomocí systému s vakciniá virem.....	147			
14.7.2.1	Kultivace vakciniá víru	148			
14.7.2.2	Titracie vakciniá víru	148			
14.7.2.3	Expresy pomocí vakciniá víru.....	148			
14.7.3	Expresy proteinů v hmyzích buňkách použitím bakulovirových vektorů.....	149			
14.7.3.1	Životní cyklus bakuloviru.....	149			
14.7.3.2	Bakulovirový expresní systém.....	150			
14.7.3.3	Výběr bakulovirového přenosového vektoru.....	152			
14.7.3.4	Příprava rekombinantní bakulovirovou DNA.....	153			
14.7.3.5	Udržování a kultivace hmyzích buněk.....	153			
14.7.3.6	Kotransfekce hmyzích buněk linearizovanou bakulovirovou DNA.....	155			
14.7.3.7	Příprava buněk a DNA.....	156			
14.7.3.8	Transfekce buněk.....	156			
14.7.3.9	Kontrola úspěšnosti transfekce.....	156			
14.7.3.10	Příprava zásobní suspenze bakuloviru.....	157			
14.7.3.11	Amplifikace víru z kultury rostoucí ve vrstvě.....	157			
14.7.3.12	Amplifikace víru ze suspenzní kultury.....	158			
14.7.3.13	Zjištění titru bakulovirových zásobní suspenz.....	158			
14.8	Metabolické značení a imunoprecipitace (Pulse/chase).....	159			
14.8.1	Analýza metabolické pěstění proteinů	161			
14.8.2	Příprava suspenze <i>Staphylococcus aureus</i> pro imunoprecipitaci.....	162			
14.8.3	Testování imunoprecipitace pomocí <i>Staphylococcus aureus</i>	163			
14.9	Použití reportérkových genů pro zjištění aktivity promotorů.....	164			
14.10	Infekce tkáňových buněk viriony M-PMV	166			
			16.1	Izolace proteinu z inkluzních tělisek <i>E. coli</i> a renaturace produktu.....	174
			16.2	Izolace rozpustného proteinu z <i>E. coli</i>	178
			16.3	Izolace proteinů z periplasmatického prostoru.....	180
			16.4	Purifikace fúzních rekombinantních proteinů.....	181
			16.5	Purifikace proteinů ve fúzi s hexahistidinovou kotvou.....	183
			17.	DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	185
			17.1	Stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové	185
			17.2	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE).....	185
			17.2.1	Příprava gelu.....	188
			17.2.2	Příprava a aplikace vzorku.....	189
			17.3	Elektroforéza v Tris-tricinovém pufru.....	191
			17.4	Nativní elektroforéza	192
			17.5	Barvení gelů	193
			17.6	Izoelektrická fokusace	194
			17.7	Imunochemická detekce proteinů v gelu –western blot.....	196
			17.8	Metabolické značení proteinů	200
			17.9	Imunoprecipitace značeného proteinu	201
			18.	STUDIUM VZÁJEMNÉ INTERAKCE PROTEINŮ.....	202
			18.1	Dvojhybridový systém	203
			18.2	Far western	206
			18.3	Koprecipitace proteinů	206
			18.4	Chemické prokřížení interagujících proteinů	208
			18.5	Povrchová plazmonová rezonance (SPR – surface plasmon resonance)	209
			18.6	Fágový displej	209
			19.	STUDIUM INTERAKCE PROTEINŮ S DNA.....	211
			19.1	Příprava jaderných extraktů	211
			19.2	Změna mobility vazby proteinu	213
			19.3	Northwestern blot	215

20.	GENOMOVÉ KNIHOVNY A JEJICH KONSTRUKCE.....	216
20.1	Příprava cDNA.....	217
21.	BIOINFORMATIKA (ZÁKLADNÍ NÁSTROJ GENOMIKY).....	218
21.1	Současný stav genomiky (rok 2002).....	218
21.2	Nejpoužívanější formáty a databáze.....	219
21.3	Porovnávání biologických sekvencí.....	222
21.4	„Scoring matrix“ a evoluční stromy.....	224
21.5	Nejpoužívanější programy bioinformatiky.....	226
21.6	Analýza genomů.....	228
22.	PŘÍLOHY.....	231
22.1	Kultivační média	231
22.2	Roztoky.....	237
23.	DODATKY.....	248
23.1	Dodatek 1 – Nukleové kyseliny.....	248
23.2	Dodatek 2 – Aminokyseliny a proteiny.....	256
23.3	Dodatek 3 – Užitečné tabulky a přepočty.....	260