

Obsah

odolnost proti výčerpce
DNK DNA hybridizace
Princip a počet stepů
Opakování v rozdílných množstvích
Laborník s výbavou pro PCR-DNA-DNA hybridizaci
Polymerázová reakce (PCR)
Citlivostní metody
Citlivost pro PCR
Pracovní a pomocného PCR
1. ANALÝZA FENOTYPU (J. ZIMA, M. MACHOLÁN)	9
Úvod	9
Signální fenotypy	10
Dědičnost zbarvení	10
Imunologické znaky	12
Epigenetické znaky	13
Kvantitativní znaky	15
Metody tradiční morfometrie	17
Data v tradiční morfometrii	18
Základní pojmy maticové algebry	19
Analýza hlavních komponent (<i>Principal components analysis, PCA</i>)	21
Faktorová analýza (<i>Factor analysis, FA</i>)	27
Analýza hlavních koordinát (<i>Principal coordinates analysis, PCOA</i>)	28
Analýza diskriminačních funkcí (<i>Discriminant function analysis, DFA</i>) a kanonická analýza (<i>Canonical variates analysis, CVA</i>)	28
Kanonické korelace (<i>Canonical correlations</i>) a parciální analýza nejmenších čtverců (<i>Partial least-squares</i>)	31
Mnohorozměrná klasifikace objektů (<i>Nonmetric multidimensional scaling, MDS</i>)	32
Korespondenční analýza (<i>Correspondence analysis, CA</i>)	32
Shliková analýza (<i>Cluster analysis</i>)	32
Kterou metodu použít?	34
Geometrická morfometrie	34
Analýza obrysů	34
Význačné body	38
Deformace ohebných pásů (<i>thin-plate spline</i>)	41
Fluktuační asymetrie	44
Software a důležité internetové adresy	47
Tradiční morfometrie	47
Geometrická morfometrie	47
2. CYTOGENETIKA (J. ZIMA)	51
Úvod	51
Stavba a morfologie chromosomů	52
Struktura chromatinu	52
Struktura chromosomu	53
Chromosomové mutace	54
Další informace na internetových stránkách	56
Příprava chromosomových preparátů	56
Studium somatických chromosomů v mitóze	57
Studium chromosomů zárodečných buněk v meioze	60
Cytogenetické testy mutagenních ltvů	62
Další informace na internetových stránkách	63
Barvení chromosomů	63
Diferenciální barvení	63

Barvení specifických frakcí chromatinu	66
Další informace na internetových stránkách	69
Hybridizací <i>in situ</i>	69
Další informace na internetových stránkách	70
Hodnocení karyotypu	70
Mikroskopování a fotografování	70
Sestavení karyotypu	71
Standardizace karyotypů	72
Další informace na internetových stránkách	72
Aplikace studia chromosomů	72
Populační studie	74
Vnitrodruhová struktura	74
Mezidruhové vztahy	75
Laboratorní vybavení	76
Přístroje	76
 3. ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ (M. MACHOLÁN)	87
Úvod	87
Obecné principy metody	88
Pufry	89
Základní předpoklady	89
Přehled základních metod	90
Elektroforéza na škrobovém gelu (SGE = Starch Gel Electrophoresis)	90
Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE = Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	92
Elektroforéza na acetylcelulózovém (celulózo-acetátovém) gelu (CAGE = Cellulose Acetate Gel Electrophoresis)	92
Elektroforéza na agarózovém gelu (AGE = Agarose Gel Electrophoresis)	93
Kontinuální elektroforéza	93
Diskontinuální (multifázická) elektroforéza	93
Izoelektrická fokusace (IEF)	94
Elektroforéza s SDS a močovinou	94
Dvoousměrná (2-D) elektroforéza	94
Imunoelektroforéza	94
Rozlišovací schopnost	95
Postup elektroforézy	95
Odebrání a uchovávání tkání	95
Příprava vzorků	95
Nanášení vzorků	96
Elektroforéza	97
Barvení	98
Interpretace gelů	103
Aplikace a omezení metody	106
Vnitrodruhové studie	107
Mezidruhové aplikace	109
Applikační omezení metody	111
Software	112
Laboratorní vybavení	112
SGE	112
PAGE	112
AGE	112
CAGE	112
 4. ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN (M. MACHOLÁN, P. MUNCLINGER)	117
Úvod	117
Všeobecné vybavení molekulární laboratoře	118

Izolace DNA	118
Postup izolace	118
Důležité internetové adresy	119
DNA-DNA hybridizace	119
Princip a postup metody	120
Aplikace a omezení metody	124
Laboratorní vybavení specifické pro DNA-DNA hybridizaci	125
Polymerázová řetězová reakce (PCR)	126
Princip metody	126
Primery pro PCR	128
Problémy a optimalizace PCR	129
RT-PCR a kvantitativní (Real-Time) PCR	131
Elektroforéza produktů PCR	131
Práce s neznámými genomy	133
Aplikace PCR	134
Důležité internetové adresy	136
Laboratorní vybavení specifické pro PCR	137
Restrikční analýzy	137
Southernova transferová hybridizace (<i>Southern blotting</i>)	137
Restrikční mapy	141
Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)	142
DNA fingerprinting	142
AFLP (polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů)	143
Aplikace a omezení restrikčních metod	145
Sekvencování DNA	145
Princip a postup sekvencování nukleových kyselin	146
Aplikace a omezení	150
Laboratorní vybavení specifické pro sekvencování DNA	152
Důležité internetové adresy	153
Sekvencování proteinů	153
Postup metody	153
Analýza mikrosatelitů	154
Princip, aplikace a omezení analýzy mikrosatelitů	154
Vzácné genomové události	157
SINE a LINE	157
Práce s internetem	159
Důležité internetové adresy	159
5. METODY ANALÝZY I: Populačně genetická data (J. PIÁLEK)	165
Úvod	165
Charakter genetických dat	165
Co je populační genetika?	166
Polymorfismus na úrovni bílkovin	166
Genové (alelové) a genotypové frekvence	166
Úroveň polymorfismu	167
Heterozygotnost	167
Formulace modelů a základy testování	169
Test dobré shody (χ^2 -test)	170
Polymorfismus na úrovni jáderné DNA	171
Polymorfismus na úrovni mitochondriální DNA	173
Test dobré shody (χ^2 -test)	173
Test: 2×2 G-test nezávislosti (kontingenční tabulky)	174
Analýza polymorfismu mtDNA: problém malých vzorků	174
Monte Carlo randomizační test kontingenčních tabulek	175
Odhad vlivu populační struktury na genetický make-up populace	176

Model: Wrightova F-statistika na jednom lokusu o dvou alelách	176
Polymorfismus na úrovni chromosomů	180
Logistická regrese	180
Software	188
6. METODY ANALÝZY II: Rekonstrukce fylogeneze (M. MACHOLÁN)	191
Úvod	191
Definice základních pojmu	191
Typy dat	192
Rozdělení metod fylogenetické analýzy	195
Algoritmy versus kritéria optimálnosti	195
Jak porovnávat jednotlivé fylogenetické metody?	196
Metoda maximální úspornosti (<i>Maximum parsimony, MP</i>)	196
Podstata metody	196
Parsimonie pro jiné typy dat	200
Výhody a nevýhody parsimonie	200
Metoda maximální pravděpodobnosti (<i>Maximum likelihood, ML</i>)	201
Podstata metody	202
Modely evoluce sekvencí	203
Heterogenita substitučních frekvencí v různých částech sekvence	207
Maximální pravděpodobnost pro jiné typy dat	208
Přednosti a zápory metody	208
Bayesovská analýza	209
Podstata metody	210
Distanční metody	210
Aditivní a ultrametrické stromy	210
Transformace sekvenčních dat	210
Transformace alozymových a restrikčních dat	212
Fitchova-Margoliashova metoda a metoda minimální evoluce	213
Algoritmické distanční metody – shluková analýza	214
Algoritmické distanční metody – připojení souseda (<i>neighbor-joining</i>)	215
Výhody a nevýhody distančních metod	215
Hledání optimálních stromů a stanovení jejich spolehlivosti	216
Hledání optimálních stromů	216
Spolehlivost fylogenetických stromů	217
Software	220
Použitá literatura	233
Rejstřík	235

Model: Wrightova F-statistika na jednom lokusu o dvou alelách 176
 Polymorfismus na úrovni chromosomů 180
 Logistická regrese 180
Software 188

6. METODY ANALÝZY II: Rekonstrukce fylogeneze (M. MACHOLÁN) 191
Úvod 191
 Definice základních pojmu 191
 Typy dat 192
Rozdělení metod fylogenetické analýzy 195
 Algoritmy versus kritéria optimálnosti 195
 Jak porovnávat jednotlivé fylogenetické metody? 196
Metoda maximální úspornosti (*Maximum parsimony, MP*) 196
 Podstata metody 196
 Parsimonie pro jiné typy dat 200
 Výhody a nevýhody parsimonie 200
Metoda maximální pravděpodobnosti (*Maximum likelihood, ML*) 201
 Podstata metody 202
 Modely evoluce sekvencí 203
 Heterogenita substitučních frekvencí v různých částech sekvence 207
 Maximální pravděpodobnost pro jiné typy dat 208
 Přednosti a zápory metody 208
Bayesovská analýza 209
 Podstata metody 210
Distanční metody 210
 Aditivní a ultrametrické stromy 210
 Transformace sekvenčních dat 210
 Transformace alozymových a restrikčních dat 212
 Fitchova-Margoliashova metoda a metoda minimální evoluce 213
 Algoritmické distanční metody – shluková analýza 214
 Algoritmické distanční metody – připojení souseda (*neighbor-joining*) 215
 Výhody a nevýhody distančních metod 215
Hledání optimálních stromů a stanovení jejich spolehlivosti 216
 Hledání optimálních stromů 216
 Spolehlivost fylogenetických stromů 217
Software 220

Použitá literatura 233
Rejstřík 235