

OBSAH

1 DNA	14
1.1 IZOLÁCIA DNA	15
1.1.1 Opakovanie – výskyt DNA v bunkách	16
1.1.2 Izolácia DNA	20
1.1.2.1 Princíp izolácie DNA	20
1.1.2.2 Špecifiká izolácie jednotlivých typov DNA	23
1.1.3 Protokoly	24
1.1.3.1 Izolácia plazmidovej DNA alkalickou lýzou	24
1.1.3.2 Izolácia plazmidovej DNA lýzou varom	25
1.1.3.3 Izolácia genómovej DNA z grampozitívnych baktérií	26
1.1.3.4 Izolácia genómovej DNA z gramnegatívnych baktérií	27
1.1.3.5 Izolácia genómovej DNA z lymfocytov periférnej krvi	28
1.1.3.6 Izolácia genómovej DNA z ľudského tkaniva	29
1.1.3.7 Izolácia mitochondriálnej DNA	30
1.1.4 Úlohy	31
1.1.4.1 Izolácia genómovej DNA z ovocia v kuchyni	31
1.1.4.2 Fenol-chloroformová izolácia genómovej DNA z pečene	32
1.1.4.3 Izolácia genómovej DNA z ľudského tkaniva komerčnou súpravou	33
1.2 KVALITA A KVANTITA DNA	34
1.2.1 Opakovanie – štruktúra DNA	35
1.2.2 Analýza kvality a kvantity DNA	43
1.2.2.1 Spektrofotometrické stanovenie množstva izolovanej DNA	43
1.2.2.2 Fluorometrické stanovenie množstva izolovanej DNA	46
1.2.2.3 Elektroforetické stanovenie kvantity a kvality DNA	47
1.2.3 Protokoly	58
1.2.3.1 Elektroforetická separácia v 1 % agarózovom géli	58
1.2.3.2 Elektroforetická separácia využívajúca natívny PAG a farbenie etídium bromidom	60
1.2.3.3 Elektroforetická separácia využívajúca denaturačný PAG a farbenie striebrom	62
1.2.3.4 Izolácia DNA fragmentu po vyrezaní z agarózového gélu	64

1.2.4 Úlohy	65
1.2.4.1 Elektroforetická separácia zložiek potravinárskeho farbiva	65
1.2.4.2 Sledovanie vplyvu koncentrácie agarózy a konštitúcie DNA na pohyblivosť DNA počas agarózovej elektroforézy	66
1.2.4.3 Určenie koncentrácie a čistoty DNA	67
1.3 AMPLIFIKÁCIA DNA	68
1.3.1 Opakovanie – replikácia DNA	69
1.3.1.1 Replikácia DNA v prokaryotickej bunke	70
1.3.1.2 Replikácia DNA v eukaryotickej bunke	71
1.3.1.3 Replikácia DNA semiautonómnych organel eukaryotov	72
1.3.2 Polymerázová reťazová reakcia PCR	73
1.3.2.1 Princíp PCR	73
1.3.2.2 Zložky reakčnej zmesi a požiadavky na ne kladené	75
1.3.2.3 Návrh optimálnych podmienok pre PCR	76
1.3.2.4 Najčastejšie problémy pri PCR	78
1.3.2.5 Typy a modifikácie PCR	79
1.3.2.6 Metódy založené na PCR	83
1.3.2.7 Využitie PCR a jej modifikácií	88
1.3.2.8 Prístrojové vybavenie	89
1.3.3 Protokoly	90
1.3.3.1 Návrh primerov na izoláciu a amplifikáciu génu <i>PTEN</i>	90
1.3.3.2 Návrh primerov pomocou programu <i>Primer BLAST</i>	92
1.3.3.3 PCR protokoly	97
1.3.4 Úlohy	100
1.3.4.1 Stanovenie sekvencie vlákna syntetizovaného počas replikácie DNA	100
1.3.4.2 Navrhnutie primerov pre exón 4 génu <i>TP53</i>	101
1.3.4.3 Navrhnutie podmienok PCR na amplifikáciu exónu 4 génu <i>TP53</i>	101
1.4 ČÍTANIE INFORMÁCIÍ ZAKÓDOVANÝCH V DNA	103
1.4.1 Opakovanie – genetický kód, mutácie, organizácia genómu I	105
1.4.2 Sekvenačné technológie	113
1.4.2.1 Maxamova-Gilbertova chemická degradačná metóda	113
1.4.2.2 Sangerova enzymatická dideoxy-terminátorová metóda	114
1.4.2.3 Sekvenačné technológie novej generácie	125

1.4.3 Protokoly	127
1.4.3.1 Purifikácia DNA po PCR pred sekvenačnou reakciou	127
1.4.3.2 Príprava vzoriek pre sekvenovanie Sangerovou metódou	129
1.4.3.3 Purifikácia DNA po sekvenačnej PCR pred sekvenovaním	130
1.4.4 Úlohy	131
1.4.4.1 Čítanie sekvencií DNA získaných rôznymi metódami sekvenovania	131
1.4.4.2 Interpretácia elektroferogramov	132
1.4.4.3 Identifikácia mutácií v sekvencii vedúceho reťazca DNA	134
1.5 MODIFIKÁCIA DNA	135
1.5.1 Opakovanie – reštrikčné enzýmy, organizácia ľudského genómu II	137
1.5.2 Metódy detekcie polymorfizmov a ich využitie v praxi	145
1.5.2.1 Metódy založené na hybridizácii komplementárnych vlákien nukleových kyselín	145
1.5.2.2 Konformačné metódy detekcie polymorfizmov	150
1.5.2.3 Metódy využívajúce reštrikčný enzým alebo DNA polymerázu	152
1.5.2.4 Ďalšie využitie DNA modifikácií v praxi	154
1.5.3 Protokoly	156
1.5.3.1 Reštrikčné štiepenie	156
1.5.3.2 Southernova hybridizácia s prenosom z gélu na membránu	158
1.5.3.3 Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	161
1.5.4 Úlohy	163
1.5.4.1 Výber enzýmov na reštrikčnú analýzu	163
1.5.4.2 Reštrikčná analýza na dôkaz polymorfizmu	164
1.5.4.3 Interpretácia gélu s fragmentami po reštrikčnej analýze	165
Nobelové ceny udelené za objavy súvisiace s DNA	166

2 RNA	168
2.1 IZOLÁCIA RNA	169
2.1.1 Opakovanie – typy RNA, ich výskyt a funkcia v bunkách	170
2.1.2 Princíp izolácie RNA	175
2.1.3 Protokoly	177
2.1.3.1 Izolácia celkovej RNA z buniek rastúcich <i>in vitro</i>	177
2.1.3.2 Ošetrovanie izolovanej RNA DNázou I	178
2.1.4 Úlohy	179
2.1.4.1 Izolácia RNA z pečárenského droždia	179
2.2 KVALITA A KVANTITA RNA	180
2.2.1 Opakovanie – transkripcia a posttranskripčné úpravy	181
2.2.1.1 Transkripcia	181
2.2.1.2 Posttranskripčné úpravy	183
2.2.1.3 Reverzná transkripcia	184
2.2.2 Analýza kvality a kvantity RNA	185
2.2.2.1 Absorpčná spektrofotometria a elektroforetická separácia	185
2.2.2.2 Metódy štúdia génovej transkripcie	186
2.2.3 Protokoly	192
2.2.3.1 Prepis izolovanej RNA na cDNA, reverzná transkripcia	192
2.2.3.2 Stanovenie miery génovej transkripcie pomocou sond TaqMan	193
2.2.4 Úlohy	194
2.2.4.1 Stanovenie sekvencie mRNA vzniknutej transkripciou DNA	194
2.2.4.2 Sledovanie miery transkripcie génov pomocou qPCR	195
2.3 REGULÁCIA TRANSKRIPCIE	197
2.3.1 Opakovanie – regulácia transkripcie, organizácia genómu III	198
2.3.1.1. Prokaryotické regulačné RNA	198
2.3.1.2 Eukaryotické regulačné RNA	199
2.3.1.3 Proteínová regulácia génovej transkripcie v prokaryotoch	200
2.3.1.4 Regulácia génovej expresie v eukaryotoch	201
2.3.1.5 Regulácia génovej expresie metyláciou DNA	202
Nobelové ceny udelené za objavy súvisiace s RNA	204

3	PROTEÍNY	206
3.1	IZOLÁCIA PROTEÍNOV	207
3.1.1	Opakovanie – štruktúra a vznik proteínov	208
3.1.1.1	Aminokyseliny	208
3.1.1.2	Translácia	211
3.1.1.3	Proteíny	214
3.1.2	Izolácia a purifikácia proteínov	217
3.1.3	Protokoly	221
3.1.3.1	Príprava lyzátu na stanovenie proteínov vo vzorke	221
3.1.4	Úlohy	223
3.1.4.1	Určenie primárnej štruktúry proteínu z úseku lineárnej mRNA	223
3.1.4.2	Určenie primárnej štruktúry proteínu z úseku cirkulárnej mRNA	224
3.1.4.3	Určenie primárnej štruktúry proteínu z úseku sekvencie DNA	225
3.1.4.4	Dôkaz bielkoviny vo vaječnom bielku	226
3.1.4.5	Izolácia bielkoviny z mlieka	226
3.2	STANOVENIE PROTEÍNOV NA ZÁKLADE ICH FYZIKÁLNOCHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ	227
3.2.1	Opakovanie – vlastnosti a funkcie bielkovín v ľudskom tele	229
3.2.1.1	Fyzikálnochemické vlastnosti aminokyselín a bielkovín	229
3.2.1.2	Funkcie a výskyt proteínov v ľudskom tele	230
3.2.2	Metódy stanovenia kvality a kvantity proteínov na základe ich fyzikálnochemických vlastností	235
3.2.2.1	UV spektrofotometria	235
3.2.2.2	Spektrofotometria vo viditeľnej oblasti	236
3.2.2.3	Elektroforéza v polyakrylamidovom géli	237
3.2.2.4	Hmotnostná spektroskopia proteínov	246
3.2.2.5	Sekvenovanie bielkovín	246
3.2.3	Protokoly	249
3.2.3.1	Stanovenie koncentrácie proteínov biuretovou metódou	249
3.2.3.2	Stanovenie koncentrácie proteínov Lowryho metódou	249
3.2.3.3	Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovej metódou	250
3.2.3.4	Stanovenie koncentrácie proteínov štandardnou BCA metódou	250
3.2.3.5	Stanovenie koncentrácie proteínov BCA <i>microassay</i> metódou	251
3.2.3.6	Stanovenie koncentrácie proteínov farbením striebrom	252

3.2.4 Úlohy	253
3.2.4.1 Stanovenie bielkovín biuretovou, Lowryho a Bradfordovej metódou	253
3.2.4.2 Stanovenie molekulovej hmotnosti bielkovín pomocou SDS-PAGE	254
3.3 STANOVENIE PROTEÍNOV IMUNOCHEMICKÝMI METÓDAMI	258
3.3.1 Opakovanie – protilátky a antigény	259
3.3.1.1 Antigény	259
3.3.1.2 Protilátky	260
3.3.1.3 Interakcia antigénu a protilátky	263
3.3.2 Imunoprecipitačné metódy	265
3.3.2.1 Jednoduchá radiálna imunodifúzia	266
3.3.2.2 Turbidimetria a nefelometria	268
3.3.3 Imunoanalytické metódy	269
3.3.3.1 Rádioimunoanalýza	270
3.3.3.2 Imunoenzýmové metódy	270
3.3.3.3 Imunofluorescenčné metódy	273
3.3.3.4 Western blot	275
3.3.3.5 Rýchlotesty	279
3.3.3.6 Proteínové čipy	281
3.3.4 Protokoly	282
3.3.4.1 Stanovenie konkrétnej bielkoviny vo vzorke metódou Western blot	282
3.3.4.2 Dôkaz antigénu A pomocou sendvičovej ELISA-metódy	284
3.3.5 Úlohy	286
3.3.5.1 Detekcia Ras proteínov metódou Western blot	286
3.3.5.2 Tehotenský test	287
3.3.5.3 Stanovenie protilátok triedy IgG proti <i>Toxoplasma gondii</i>	289
3.4 POSTTRANSLAČNÉ MODIFIKÁCIE A ICH VÝZNAM	290
3.4.1 Opakovanie – modifikácie proteínov a ich význam	291
3.4.2 Metódy sledovania posttranslačných modifikácií	297
3.4.2.1 Analýza posttranslačných modifikácií pomocou 2D PAGE	297
3.4.2.2 Mikroskopická analýza posttranslačných modifikácií	298
3.4.2.3 Analýza posttranslačných modifikácií využitím protilátok	303

3.4.3 Protokoly	304
3.4.3.1 Kultivácie eukaryotických buniek <i>in vitro</i>	304
3.4.3.2 Transfekcie eukaryotických buniek kultivovaných <i>in vitro</i>	305
3.4.3.3 Fixácia a farbenie eukaryotických buniek kultivovaných <i>in vitro</i>	306
3.4.4 Úlohy	307
3.4.4.1 Vplyv modelových situácií na signalizáciu v bunke	307
3.4.4.2 Vplyv mutácií v protoonkogénoch a v tumor-supresorových génoch na proliferáciu buniek	310
Nobelové ceny udelené za objavy súvisiace s proteínmi	313
Zoznam použitej literatúry	314