

Zkušební okruhy MBIO2 – 2017

1. DNA polymerázy, terminální transferázy – charakteristika, příklady použití
2. (Fágové) RNA polymerázy – charakteristika, příklady použití
3. Termostabilní DNA polymerázy – charakteristika, příklady použití
4. Reverzní transkriptázy – charakteristika, příklady použití
5. Kinázy, fosfatázy a ligázy – charakteristika, význam pro konstrukci rekombinantní DNA, klonování
6. Restrikční endonukleázy – charakteristika, příklady použití
7. DNázy a exonukleázy (štípající DNA) – charakteristika, příklady použití
8. RNázy a exonukleázy (štípající RNA) – charakteristika, příklady použití
9. Konstrukce rekombinantních molekul (enzymy, příprava lepivých konců, ligace tupých konců, linkery, adaptory, využití primerů)
10. Funkční sekvence vektorů, funkce a příklady
11. Skríníng a selekce transformovaných klonů (transformace bakterií/kvasinek), kontrola klonů (RFLP, PCR)
12. Klonovací a expresní systémy (vektory), charakteristika, schéma a jejich porovnání (plazmid, cosmid, fasmid, fág)
13. Klonovací a expresní systémy (vektory), charakteristika, schéma a jejich porovnání BAC, YAC, retrovirový vektor, adenovirový vektor
14. GATEWAY klonovací a expresní systém, principy
15. Transkripce a translace *in-vitro* – charakteristika, příklady použití.
16. Ti plazmid, transformace rostlin
17. Návrh primerů, jejich vlastnosti a modifikace
18. Optimalizace PCR reakce, odstranění problémů (podmínky, přídavky do PCR reakční směsi)
19. Nested PCR, PCR s degenerovanými primery
20. Inverzní PCR, asymetrická PCR, assemble PCR – charakteristika, příklady použití
21. RACE PCR, colony PCR – charakteristika, příklady použití
22. Nested PCR, multiplex PCR
23. Izotermická PCR
24. Chemistry používané v real-time PCR – princip
25. Kvantitativní (RT)PCR – metody absolutní kvantifikace
26. Kvantitativní (RT)PCR – metody relativní kvantifikace (Livak, Pfaffl)
27. PCR mutagenese, DNA shuffling (míchání), random mutagenese, error prone (náchylná) PCR
28. Místně cílená mutagenese – princip, přímá, nepřímá selekce mutantů
29. Metody studia interakcí NK-protein – příklady
30. Princip 'Phage Display' – příklady použití
31. Princip dvouhybridního kvasinkového systému – příklady použití
32. Princip dvouhybridního bakteriálního systému (BACTH)
33. Princip 'emulzní PCR' – příklady použití
34. Princip 'Bridge PCR' – příklady použití
35. Princip pyrosekvenování (Pyrosequencing, Roche, Helicos,)
36. Princip sekvenování syntézou (Sequencing by synthesis, Solexa/Illumina/ Pacific)
37. Princip sekvenování syntézou (Ion Torrent, Helicos, Oxford Nanopores)
38. ZNA primery a MGB proby – princip a využití
39. Proteináza K a inhibitory ribonukleáz – charakteristika a využití
40. Strategie sekvenování dlouhých fragmentů

1. Základní kroky izolace nukleových kyselin
2. Příkladové vybavení pro izolaci nukleových kyselin
3. Sterilní podmínky práce při izolaci nukleových kyselin
4. Fenol-chloroformová izolace nukleových kyselin
5. Izolace nukleových kyselin s pomocí chaotropních solí
6. Komerční kity pro izolaci DNA
7. Izolace DNA na magnetických částicích
8. Izolace DNA ultracentrifugací v koncentračním gradientu
9. Izolace RNA ultracentrifugací v koncentračním gradientu
10. Izolace DNA pomocí Chelexu
11. Izolace DNA pomocí FTA cards
12. Izolace celkové RNA a mRNA
13. Elektroforéza nukleových kyselin – princip a fyzikální a chemické parametry
14. Příprava a složení polyakrylamidových a agarozových gelů
15. Elektroforéza v agarozovém gelu
16. Elektroforéza v polyakrylamidovém (PAA) gelu
17. Vizualizace fragmentů nukleových kyselin v gelu
18. PAA elektroforéza v nativním a denaturujícím gelu
19. Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)
20. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)
21. Disková (diskontinuální) elektroforéza
22. Gelová zpomalovací retardační elektroforéza (EMSA)
23. Mikrosatelity (MS) – vlastnosti, princip studia, evoluce MS a homoplazie MS
24. Mikrosatelity (MS) – nulové alely, hledání nových MS a využití MS
25. Jednonukleotidové polymorfizmy a způsoby jejich studia – DHPLC, SSCP, ...
26. RFLP – princip, mechanismy vzniku variability, limity využití
27. DNA fingerprinting
28. RAPD – princip, reprodukovatelnost, využití
29. AFLP – princip, reprodukovatelnost, využití
30. Hybridizace a její faktory
31. Hybridizační sondy
32. Druhy a způsoby blottingu
33. Random priming a nick-translace
34. Radioaktivní značení a detekce sond
35. Neradioaktivní značení a detekce sond
36. Digoxigeninový systém
37. Fluoresceinový systém
38. Biotinový systém
39. PCR značení DNA sond, značení reverzní transkripce a fotolabeling DNA
40. Značení oligonukleotidů

Praktické úlohy + výpočty (příprava PCR reakční směsi, qPCR – Livak, Pfaffl)

1. Provedení 3'RACE PCR
2. Provedení 5'RACE PCR
3. Provedení RT-PCR
4. Provedení kvantitativní PCR
5. Provedení kvantitativní RT- PCR
6. Klonování PCR produktu s lepivými konci
7. Klonování PCR produktu s tupými konci
8. In-vitro syntéza RNA
9. Syntéza cDNA
10. Exprese cDNA na úrovni proteinů v *E. coli*
11. Místně specifická mutagenese
12. Izolace mRNA a syntéza cDNA, případně dsDNA
13. Stanovení intronů (velikost, hranice)
14. Proved' restriční a PCR analýzu klonů
15. Exprese cDNA na úrovni proteinů v kvasinkách
16. Provedení nested-PCR
17. Stanovení-prokázání interakce mezi molekulou DNA-a a proteinem-b
18. Stanovení interakce mezi dvěma proteiny
19. Fenol-chloroformová izolace DNA
20. Izolace DNA na silikátových částicích v prostředí chaotropních solí
21. Provedení RFLP
22. Provedení DGGE
23. Provedení PFGE
24. Provedení AFLP
25. Provedení SSCP
26. Provedení agarózové elektroforézy nukleových kyselin
27. Provedení polyakrylamidové elektroforézy nukleových kyselin za nativních podmínek
28. Provedení agarózové elektroforézy nukleových kyselin
29. Hybridizace DNA sondy s genomickou DNA
30. Příprava DNA sondy pomocí random primingu
31. Příprava DNA sondy pomocí nick translace
32. Označení oligonukleotidu na 3'konci
33. Označení oligonukleotidu na 5'konci
34. Navržení primerů na dané sekvenci
35. Analýza/výpočet kvantitativní PCR (absolutní kvantifikace)
36. Analýza/výpočet kvantitativní PCR (relativní kvantifikace)
37. Stanovení sekvence nt PCR produktu
38. Analýza klonů (plazmid, PCR produkt)
39. Bodová mutace (inverze) v PCR produktu
40. Inserce aminokyseliny do mRNA