

# Spis treści

<b>Przedmowa</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Laboratorium</b> .....	<b>9</b>
1.1. Pomieszczenia laboratoryjne .....	9
1.2. Podstawowe wyposażenie laboratorium .....	10
1.2.1. Zasady wyposażania laboratoriów .....	10
1.2.2. Drobnny sprzęt laboratoryjny .....	10
1.2.3. Urządzenia laboratoryjne .....	11
<b>2. Metody izolacji i oczyszczania DNA</b> .....	<b>13</b>
2.1. Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego .....	13
2.2. Izolacja całkowitego DNA – informacje ogólne .....	14
2.3. Metody ekstrakcji całkowitego DNA .....	14
2.4. Oznaczanie stężenia roztworu DNA .....	15
2.5. Oczyszczanie DNA po ekstrakcji .....	15
2.6. Procedury laboratoryjne .....	15
2.6.1. Izolacja DNA z krwi ssaków metodą fenolowo-chloroformową .....	15
2.6.2. Izolacja DNA z krwi ptasiej metodą fenolowo-chloroformową .....	16
2.6.3. Izolacja DNA z tkanek metodą solną .....	16
2.6.4. Izolacja DNA z włosów z cebulkami z wykorzystaniem substancji chelatujących .....	17
2.6.5. Izolacja DNA z krwi obwodowej (ptaków i ssaków) metodą kolumnową – zestaw QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) .....	17
2.6.6. Izolacja DNA z tkanek i włosów z cebulkami metodą kolumnową – zestaw QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) .....	18
2.6.7. Izolacja DNA z krwi lub innych wydzielin z kart FTA (Whatman Bioscience) .....	18
2.6.8. Oznaczanie ilości genomowego DNA w żelu agarozowym .....	19
2.6.9. Oczyszczanie DNA w roztworze metodą kolumnową – zestaw GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) .....	19
Literatura .....	19
<b>3. Elektroforeza</b> .....	<b>20</b>
3.1. Wiadomości ogólne .....	20
3.2. Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym .....	21
3.3. Elektroforeza pionowa w żelu poliakryloamidowym .....	22
3.4. Procedury laboratoryjne .....	23
3.4.1. Żel agarozowy jednoprocetowy .....	23
3.4.2. Żel poliakryloamidowy natywny .....	23
3.4.3. Barwienie srebrem fragmentów DNA w żelu poliakryloamidowym .....	24
Literatura .....	24
<b>4. Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR)</b> .....	<b>26</b>
4.1. Podstawowe wiadomości o reakcji PCR .....	26
4.2. Odczynniki wykorzystywane w reakcji PCR .....	29
4.3. Czynniki fizyczne i chemiczne wpływające na efektywność reakcji PCR i zakłócające jej prawidłowy przebieg .....	30
4.4. Wybrane modyfikacje reakcji PCR .....	30
4.4.1. Multipleks PCR .....	30
4.4.2. PCR w gradiencie temperatury .....	32

4.4.3. Nested PCR .....	32
4.4.4. Touchdown PCR .....	32
4.5. Oczyszczanie produktów PCR .....	33
4.6. Procedury laboratoryjne .....	34
4.6.1. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) .....	34
4.6.2. Multipleks PCR z wykorzystaniem Red Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) .....	34
4.6.3. Oczyszczanie produktu PCR przez wycięcie i elucję fragmentu DNA z żelu agarozowego z wykorzystaniem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) .....	35
Literatura .....	36
<b>5. Hybrydyzacja .....</b>	<b>37</b>
Literatura .....	39
<b>6. Klonowanie DNA .....</b>	<b>40</b>
6.1. Wiadomości ogólne .....	40
6.2. Wektory do klonowania DNA .....	40
6.2.1. Właściwości wektorów .....	40
6.2.2. Wektory plazmidowe .....	40
6.2.3. Wektor pGEM®-T Easy .....	41
6.3. Ligacja .....	41
6.4. <i>Escherichia coli</i> – przykład bakterii namnażającej plazmid .....	42
6.5. Transformacja .....	43
6.6. $\alpha$ -komplementacja .....	44
6.7. Hodowla transformantów na podłożu stałym .....	44
6.8. Hodowla transformantów na podłożu płynnym .....	45
6.9. Izolacja plazmidu z bakterii .....	45
6.10. Jak być pewnym, czy klonowanie się udało? .....	45
Literatura .....	46
<b>7. Sekwencjonowanie .....</b>	<b>47</b>
7.1. Sekwencjonowanie metodą enzymatyczną (Sanger 1977) .....	47
7.2. Bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR metodą Sangera .....	47
7.3. PCR sekwencyjny .....	48
7.4. Elektroforeza produktów sekwencjonowania .....	49
Literatura .....	49
<b>8. Polimorfizm wybranych markerów genetycznych .....</b>	<b>50</b>
8.1. Polimorfizm i mutacje .....	50
8.2. Klasyfikacja markerów genetycznych .....	50
Literatura .....	51
<b>9. Polimorfizm fragmentów tandemowo powtarzających się (Variable Number Tandem Repeats – VNTR) .....</b>	<b>52</b>
9.1. Mikrosatelitarny polimorfizm DNA .....	52
Literatura .....	54
<b>10. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) .....</b>	<b>55</b>
10.1. Wiadomości ogólne .....	55

10.2. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych .....	56
10.3. Przykładowa restrykcja eksonu 2 genu <i>Ovar</i> – DRB1 enzymami restrykcyjnymi: <i>RsaI</i> , <i>BsuRI</i> , <i>BstYI</i> .....	56
10.4. Procedury laboratoryjne.....	58
10.4.1. Przykładowe trawienie produktu PCR enzymami restrykcyjnymi .....	58
Literatura .....	58
<b>11. Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (Single Strand Conformation Polymorphism – SSCP) .....</b>	<b>59</b>
11.1. Wiadomości ogólne .....	59
11.2. Procedury laboratoryjne.....	60
11.2.1. Wykrywanie polimorfizmu metodą SSCP .....	60
Literatura .....	60
<b>12. Wykrywanie mutacji punktowych metodą heterodupleksów (Heteroduplex Analysis – PCR-HD) .....</b>	<b>61</b>
12.1. Wiadomości ogólne .....	61
12.2. Procedury laboratoryjne.....	62
12.2.1. Przykładowa analiza heterodupleksów .....	62
Literatura .....	62
<b>13. Metoda losowej amplifikacji DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA – RAPD) .....</b>	<b>63</b>
13.1. Wiadomości ogólne .....	63
13.2. Procedury laboratoryjne.....	64
13.2.1. Reakcja losowej amplifikacji na przykładzie różnic międzygatunkowych .....	64
Literatura .....	64
<b>14. Wykorzystanie informacji zawartych w internetowych bazach danych .....</b>	<b>65</b>
14.1. Informacje dostępne w bazie internetowej Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej .....	65
14.2. Przeszukiwanie baz internetowych pod kątem znanych sekwencji .....	68
14.3. Informacje dostępne w internetowej bazie ArkDB .....	73
<b>15. Wykorzystanie programów dostępnych online w analizach genetycznych .....</b>	<b>77</b>
15.1. Projektowanie starterów .....	77
15.2. Archiwizacja danych na przykładzie sekwencji mikrosatelitarnych .....	79
15.3. Podstawowa analiza danych .....	80
15.4. Analiza danych w programie Cervus 3.0 .....	81
15.5. Analiza danych w programie Popgen 32 .....	82
<b>16. Programy dostępne online umożliwiające przewidywanie miejsc restrykcyjnych .....</b>	<b>85</b>
16.1. Webcutter – wirtualne cięcie enzymami restrykcyjnymi .....	85
16.2. NEBcutter – wirtualne cięcie enzymami restrykcyjnymi .....	87
<b>17. Homologia sekwencji i ich wzajemne porównanie .....</b>	<b>90</b>
17.1. Wiadomości ogólne .....	90
17.2. Wykorzystanie programu BLAST do określania homologii sekwencji .....	90
17.3. Translacja sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową z wykorzystaniem BLAST (blastx) .....	94

17.4. Porównywanie dwóch sekwencji z wykorzystaniem BLAST (bl2seq) .....	96
17.5. Jednoczesne porównywanie wielu sekwencji .....	99
17.5.1. Importowanie sekwencji do programu GeneDoc .....	99
17.5.2. Porównywanie sekwencji na poziomie nukleotydów .....	100
17.5.3. Edycja sekwencji i wprowadzanie zmian .....	101
17.5.4. Porównanie sekwencji na poziomie aminokwasów .....	102
17.5.5. Formatowanie i zapis porównywanych sekwencji .....	102
<b>Skład buforów .....</b>	<b>103</b>