



Biotechnologický kurz

II. letní škola metod molekulární biologie nukleových kyselin a genomiky

17. - 21. 6. 2013

**Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
AF MENDELU v Brně**

Zemědělská 1, Budova A, 4. patro (učebny dle programu)

PROGRAM

**Projekt CZ.1.07/2.3.00/09.0037: Další odborné vzdělávání jako cesta ke zkvalitnění personálního zabezpečení
pracovníků pro biotechnologický výzkum a vývoj**

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



17. 6. 2013 IZOLACE A PCR AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN, SEPARACE DNA

Učebny: N4102 (Posluchárna J. Taufera) a N4104 (Výuková laboratoř molekulární genetiky) – 4. patro

8:00 – 8:05 Úvodní slovo – prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D. (učebna N4102)

8:05 – 12:00 Dopolední blok; lektor: Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D. (Ústav hygieny a technologie masa, VFU, Brno)

8:05 – 10:00 Přednáška - **IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN** (učebna N4102)

- typy metod izolace NK (fenol-chloroform, adsorbční metody, magnetické kity, automatické izolátory), izolace DNA, RNA, plazmidová DNA, si a miRNA, enzymy používané k úpravám NK (DNázy, RNázy, proteázy), stabilita a uchování NK

10:00 – 10:30 Praktická část - **Izolace genomové DNA z různých biologických vzorků** (učebna N4104)

10:30 – 11:30 Přednáška - **DETEKCE A KVANTIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN** (učebna N4102)

- gelová elektroforéza, faktory ovlivňující gelovou elektroforézu, varianty a modifikace elektroforézy, spektrofotometrické stanovení koncentrace a kvality NK

11:30 – 12:00 Praktická část – **Příprava gelu pro elektroforetickou kontrolu izolované DNA; Určení koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000** (učebna N4104)

12:00 – 12:30 Přestávka na oběd

12:30 – 17:30 Odpolední blok; lektor: Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D. (Ústav hygieny a technologie masa, VFU, Brno)

12:30 – 13:00 Praktická část - **Elektroforetické ověření izolované DNA** (učebna N4104)

13:00 – 14:00 Přednáška - **POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)** (učebna N4102)

- princip PCR, složení reakční směsi, kontaminace při PCR, PCR troubleshooting, modifikace a využití PCR

14:00 – 17:30 Praktická část – **Příprava PCR reakce; Návrh primerů pro PCR; Ověření výsledku PCR reakce pomocí gelové agarózové elektroforézy** (učebna N4104)



18. 6. 2013 SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

8:00 – 12:00 Dopolední blok; lektor: Mgr. Kristína Cíváňová, Ph.D. (Ústav botaniky a zoologie PřF MU v Brně) (učebna N4102)

8:00 – 9:30 Přednáška **TECHNOLOGIE SEKVENOVÁNÍ**

- Historie metodických přístupů (radioaktivita vs. fluorescence) a jejich vývoj (Maxam-Gilbert, Sanger, 454 pyrosekvenování); Historie a vývoj přístrojového vybavení a typy sekvenátorů, popis genetického analyzátoru ABI 3100-Avant a jeho funkce; Princip metodiky (Sanger), popis vybavení přístroje a reakční chemie (sestavy kapilár, separační medium, reagencie), příklady hodnocení (software) a výstupů; Aplikace a využití metody sekvenování

9:30 – 11:00 Přednáška **TECHNOLOGIE FRAGMENTAČNÍ ANALÝZY**

- Historie metodiky hodnocení (rodokmen-gel-píky); Mikrosatelity (MS), definice a využití; Typy MS panelů; Možnosti kvantitativní analýzy množství DNA; Princip metodiky (CE) – reagencie, PCR a analýza; Příklady hodnocení (software) a výstupů; Využití fragmentační analýzy

11:00 – 12:00 Přednáška **MOŽNOSTI GENETICKÝCH ANALYZÁTORŮ A PŘEHLED DALŠÍCH APLIKACÍ**

- Minisekvenování (aplikace SNaPshot); SSCP; AFLP; CSCE, LOH, MLPA; Příklady specializovaných aplikací

12:00– 12:30 Přestávka na oběd

12:30 – 17:30 Odpolední blok; lektor: Mgr. Kristína Cíváňová, Ph.D. (Ústav botaniky a zoologie PřF MU v Brně) (učebna N4102)

Praktická část - **Sekvenování PCR produktu a fragmentační analýza**

- příprava PCR produktu pro sekvenování - teoretický úvod – purifikace templátu (typy templátů pro sekvenování, proč templát purifikovat, typy postupů přečištění + princip QIAcube a kolonové purifikace) a kvantifikace templátu (možné způsoby kvantifikace, možné aplikace a princip postupu kvantifikace, výpočty množství templátu v reakci), příprava sekvenační reakce (typy sekvenačních kitů, popis reagentů, přístrojového vybavení a postupu přípravy reakční směsi, teplotní profil reakce, možnosti modifikací); Purifikace a kvantifikace PCR produktu připraveného předchozí den, míchání a spuštění sekvenační reakce

- v mezičase praktické ukázky k fragmentační analýze (příprava vzorků, možnosti hodnocení výstupů FA); Exkurze do laboratoře sekvenování - detailní představení přístrojů dle zájmu účastníků; V případě zájmu diskuze k probíraným aplikacím (např. ukázka práce s analytickými softwary...)

- seznámení s metodami purifikace sekvenační reakce (způsoby purifikace sekvenačních směsí (výhody a nevýhody), možné modifikace), způsoby přípravy vzorků pro analýzu v sekvenátoru, přípravou přístroje před runem, přehled postupu; Purifikace vlastní sekvenační směsi, příprava vzorků k analýze pomocí kapilárního sekvenátoru (poběží přes noc, výsledky budou vyhodnoceny den následující)



19. 6. 2013 REAL-TIME PCR

8:00 – 13:00 Teoretická část; Ing. Karel Bílek, Ph.D. (SÚJCHBO, v.v.i., Milín) (učebna N4102)

- Úvod (princip metody, terminologie, chemismy); Výběr a příprava assay (preanalytická příprava vzorků, výběr vhodné assay); Optimalizace metody (pravidla designu primerů a sond, výpočet efektivity reakce, úpravy podmínek reakce); Validace assay (požadavky, normy, standardy, správná laboratorní praxe, akreditace); Zpracování dat (workflow dat, interpretace dat, využití výsledků); Závěr a diskuse

13:00 – 13:30 Přestávka na oběd

13:30 – 17:30 Praktická část; Ing. Karel Bílek, Ph.D. (SÚJCHBO, v.v.i., Milín) (učebna N4104)

- Úvod do cvičení (seznámení se zadáním); Rozdělení úkolů (dle uvážení budou účastníci kurzu provádět AQ, RQ a AD); Praktické provedení úkolů (nastavení přístroje atd.); Diskuse; Vyhodnocení výsledků; Závěr



20. 6. 2013 CELOGENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ, MICROARRAYS, BIOINFORMATIKA: 1. ČÁST

Učebny: N4102 (Posluchárna J.Taufera, 4. patro) a N3016 (A24), 3. patro

8:00 – 10:00 Přednáška **ZÁKLADY MICROARRAY TECHNIK**; Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D. (Ústav hygieny a technologie masa, VFU, Brno) (učebna N4102)

10:00-12:00 Přednáška **POKROKY V CELOGENOMOVÉM SEKVENOVÁNÍ**; Mgr. Helena Pětrošová (Biologický ústav LF MU v Brně) (učebna N4102)

- Nové sekvenační metody (454 – Pyrosekvenace, Solexa, SOLiD, CGS – Comparative Genome Sequencing) – charakteristika, výhody a nevýhody; srovnání nových metod – přesnost, dostupné modifikace (barcoding, paired-end library), doba trvání sekvenace, vstupní materiál; základní aplikace nových metod – sekvenace de novo, resekvenace, detekce strukturálních změn, analýza transkriptomu; vyhodnocení přesnosti sekvenačních metod 454, Solexa a CGS; sekvenace de novo – sestavování celogenomové sekvence *Treponema pallidum* kmene Mexico A pomocí metody Solexa; budoucnost sekvenačních metod

12:00-12:30 Přestávka na oběd

12:30-14:00 Přednáška **PRAKTICKÁ BIOINFORMATIKA**; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR) (učebna N3016 / A24)

- Práce se sekvenčními daty – volba vhodného molekulárního markeru, vyhledávání a vkládání sekvencí do databáze GenBank, identifikace organismu podle podobnosti (algoritmus BLAST), uchovávání sekvenčních dat – různé formáty (.fas, .nex, .phy, .mas, atd.) a konverze formátů (sw, on-line nástroje), tvorba alignmentu (Clustal, specializovaný sw: MEGA, BioEdit, SeqMan) a jeho interpretace.

14:00 – 15:30 Přednáška **FYLOGENETIKA**; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR) (učebna N3016 / A24)

- Fylogenetický strom a veškerá terminologie (kořen, větve, uzel, topologie, typy stromů, atd.), evoluční modely (Modeltest, ProtTest), metody konstrukce fylog. stromu – dle kritéria optimality (MP, ML, BI) a dle výpočetního algoritmu (NJ), hodnocení kvality stromu (bootstrapping), ukázky formátu výstupních dat s ohledem na prezentaci výsledků na konferencích a v časopisech (stromy, haplotypové sítě, atd.).

15:30 – 17:30 Praktická ukázka a seznámení se s vybraným spektrem vyhodnocovacích programů – část 1; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR) (učebna N3016 / A24)

- MEGA, TCS, DnaSP, ModelTest, ProtTest, PAUP, MrBayes, PhyML, FigTree; demonstrace samotného sw i konkrétní ukázky příkladů.



21. 6. 2013 MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE, BIOINFORMATIKA 2. ČÁST

8:00 - 9:00 Praktická ukázka a seznámení se s vybraným spektrem vyhodnocovacích programů;
Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR) (učebna N3016 / A24)

- MEGA, TCS, DnaSP, ModelTest, ProtTest, PAUP, MrBayes, PhyML, FigTree; demonstrace samotného sw i konkrétní ukázky příkladů.

9:00 – 12:30 Bioinformatika – praktická část; Mgr. Zuzana Vykoukalová, Ph.D. (ÚMFGZ AF MENDELU v Brně) (učebna N3016 / A24)

- Práce s genomickými databázemi (EMBL; DDBJ; NCBI – Gene, Genome, OMIM; Ensembl aj.)

- Vyhodnocení sekvenace z předchozího dne (Sequence Scanner v1.0), sestavení kompletní sekvenace PCR produktu (ClustalW), identifikace sekvenace – gen, organismus (BLAST, GenBank, Ensembl), vyhledání sekvenace genu u jiných organismů a určení mezidruhové homologie (GenBank, ClustalW), detekce polymorfismů (ClustalW), nalezení vhodných restričních endonukleáz (RE) pro testování nalezených polymorfismů (Webcutter), grafické znázornění elektroforetické analýzy výsledku štěpení daného PCR produktu vybranými RE

12:30 – 13:00 Přestávka na oběd

13:00 – 14:00 Přednáška **ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE**; Doc. RNDr. Michal Tomšovský (ÚOLM LDF MENDELU, Brno) (učebna N3016 / A24)

14:00 – 16:00 Přednáška **PŘÍKLADY APLIKACE MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE U HUB A OOMYCETŮ**; Doc. RNDr. Michal Tomšovský (ÚOLM LDF MENDELU v Brně) (učebna N3016 / A24)

16:00 – 17:00 Závěrečný test a předávání certifikátů; (učebna N3016 / A24)

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ