



Biotechnologický kurz

III. letní škola metod molekulární biologie nukleových kyselin a genomiky

18. - 22. 6. 2012

**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



18. 6. 2011 IZOLACE A PCR AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN, SEPARACE DNA, IDENTIFIKACE POLYMORFISMŮ

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. Pavla Chalupová (ÚMFGZ AF MENDELU, 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 pomocí automatické izolační stanice QIAcube; 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. Pavla Chalupová (ÚMFGZ AF MENDELU, 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; Demonstrace automatické pipetování stanice QIAgility; Ověření výsledku PCR reakce pomocí gelové agaróze elektroforézy;** učebna N4104



19. 6. 2011 SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

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

8:00 – 12:00 – dopolední blok; lektor: Mgr. Kristína Civaňová, 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 funkcí; Princip metodiky (Sanger), popis vybavení přístroje a reakční chemie (sestavy kapilár, separační medium, reagenzie), 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) – reagenzie, 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 Civaňová, Ph.D. (Ústav botaniky a zoologie PŘF MU v Brně); učebna: N4104

Praktická část 1 – **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 reagenzií, 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).



20. 6. 2011 REAL-TIME PCR

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

8:00 – 13:00 – přednáška – **Real-Time PCR**; Ing. Karel Bílek, Ph.D. (SÚJCHBO, v.v.i., Milín); učebna N4102

Úvod (princip metody, terminologie, chemistry); 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, metodologie, 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 – **Real-Time PCR**; 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.



21. 6. 2011 CELOGENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ, MICROARRAYS, BIOINFORMATIKA: 1. ČÁST

Učebny: N4102 (Posluchárna J.Taufera, 4. patro) a N5008 (A416), 5. patro

8:00 – 10:00 – přednáška – **POKROKY V CELOGENOMOVÉM SEKVENOVÁNÍ**; Helena Pětrošová (Biologický ústav LF MU v Brně), učebna N4102

Nové sekvenační metody (454 – Pyrosequencing, 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.

10:00-12:00 – přednáška – **ZÁKLADY MICROARRAY TECHNIK**; Ing. Pavla Chalupová (ÚMFGZ AF MENDELU, Brno); učebna N4102

12:00-12:30 – přestávka

12:30-14:00 – přednáška – **PRAKTICKÁ BIOINFORMATIKA**; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR), učebna N5008 (A416)

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 – 17:30 – Bioinformatika – praktická část; Mgr. Zuzana Vykoukalová, Ph.D. (ÚMFGZ AF MENDELU v Brně), učebna N5008 (A416), 5. patro

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

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



22. 6. 2011 MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE, BIOINFORMATIKA 2. ČÁST

Učebna: N5008 (A416), 5. patro

8:00 - 9:00 – přednáška – **ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE**; Doc. RNDr. Michal Tomšovský (ÚOLM LDF MENDELU, Brno)

9:00 – 10:30 – přednáška – **FYLOGENETIKA**; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR)

Fylogenetický strom a veškerá terminologie (kořen, větev, 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.).

10:30 – 11:00 – přestávka na oběd

11:00 – 14:00 - **Praktická ukázka a seznámení se s vybraným spektrem vyhodnocovacích programů**; Mgr. Jan Mendel, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR)

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

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

16:00 – 17:00 – **závěrečný test a předávání certifikátů**

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

