

11173

## ODDĚLENÍ VÝZKUMU MODERNÍ IMUNOTERAPIE

**Vedoucí oddělení:** Mgr. Jan Frič, Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

---

Neprovádí se.

### VĚDECKÉ METODY

---

Metody buněčné imunologie:

- Aktivita cytotoxických buněk – průtoková cytometrie, LDH-Glo Cytotoxicity Assay (Promega), Calcein release assay (Calcein AM, Calcein Red-orange)
- Analýza buněčného metabolismu (různé assaye)
- Průtoková cytometrie – fenotypizace buněk, funkční assaye, degranulace, produkce cytokinů
- ELISA
- Western Blot
- Transgeneze elektroporací
- Analýza proliferace buněk
- Analýza cytotoxicity látek

Tkáňové kultury:

- Kultury primárních buněk (NK, MSC, HSC, T)
- Kultury buněčných linií, včetně 3D kultur
- Izolace PBMC z periferní i pupečnickové krve
- Izolace buněčných subtypů (NK, HSC, Monocyty)
- Protokoly dlouhodobé primárních kultivace buněk
- Imunomagnetická separace

11753

## ODDĚLENÍ VÝZKUMU GENOVÉ IMUNOTERAPIE

**Vedoucí oddělení:** MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

- Kvantifikace CAR T lymfocytů průtokovou cytometrií
- Určování fenotypu CAR T lymfocytů
- Kvantifikace počtu kopií vnesené DNA do CAR T lymfocytů
- Cytotoxické testy buněk NK a CAR T lymfocytů

### VĚDECKÉ METODY

- Izolace PBMC z krve
- Genová modifikace T-lymfocytů – vnesení chimérického antigenního receptoru (CAR), umělého T receptoru (TCR)
- Izolace buněk NK z krve
- Kultivace a expanze PBMC / buněk NK / T-lymfocytů
- Proliferační testy
- ELISA testy
- Charakterizace buněk průtokovou cytometrií
- Izolace DNA, RNA
- Transformace bakterií, kultivace bakterií a izolace plazmidu z bakterií
- Konstrukce plazmidů, ověřování jejich funkčnosti

13100

## ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY

**Vedoucí oddělení:** doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

- Kvalitativní PCR
- Kvalitativní multiplex PCR
- Real time RT PCR
- Digitální PCR
- Sangerovo sekvenování
- Sekvenování nové generace (NGS)
- Genotypování
- Multiplex real-time PCR pro detekci fúzí (Hemavision)
- Gradientová separace mononukleárních buněk
- Izolace nukleových kyselin z leukocytů, buňkách stěrů a dalších materiálů

### VĚDECKÉ METODY

- Kvalitativní PCR
- Kvalitativní multiplex PCR
- Real time PCR
- Real time RT PCR
- Digitální PCR
- ASO digitální dropletová PCR
- Sangerovo sekvenování
- Sekvenování nové generace(NGS) – panelové NGS, RNA Seq, Single cell RNA seq, detekce pacient specifické fúze
- Western Blot
- Transfekce – Bioruptor
- Měření viability, proliferace a apoptózy buněk
- Kultivace buněčných linií
- Kultivace primárních buněk v polotuhém mediu
- Klonování
- Měření genové exprese
- MLPA
- Pyrosekvenování
- Gradientová separace mononukleárních buněk
- Izolace nukleových kyselin z leukocytů, buňkách stěrů a dalších materiálů
- Magnetická separace CD34+ pozitivních buněk
- Koimunoprecipitace
- Fragmentační analýza

13200

## ODDĚLENÍ CYTOGENETIKY

**Vedoucí oddělení:** Mgr. Šárka Ransdorfová Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

---

- Klasická cytogenetická analýza (SOP1)
- FISH – fluorescenční in situ hybridizace (SOP2)
- mFISH - mnohobarevná FISH (SOP3)
- mBAND - metoda mnohobarevného pruhování FISH (SOP3)

### VĚDECKÉ METODY

---

- všechny metody, které jsou používány pro rutinní vyšetření (SOP1,2,3) jsou využívány i pro výzkum
- aCGH/SNP, MLPA (ve spolupráci s VFN)
- FISH na CD34+
- FISH pomocí BAC sond (pro přesnou identifikaci a mapování zlomových míst a lokalizaci genů)



13300

## ODDĚLENÍ BIOCHEMIE

**Vedoucí oddělení:** Ing. Jiří Suttnar, CSc.

### KLINICKÉ METODY

- Spektrofotometrické stanovení volného hemoglobinu v plasmě (akreditovaná metoda)
- Kvalitativní stanovení heparin-indukované trombocytopenie (HIT) pomocí metody Serotonin release assay (SRA) metodou HPLC-FL
- Stanovení 8-methoxypsoralenu metodou LC-MS/MS
- Stanovení busulfanu metodou LC-MS/MS
- Stanovení tyrozín kinázových inhibitorů (imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib) metodou LC-MS/MS
- Stanovení antimykotik metodou LC-MS/MS (IVDD metoda firmy Recipe)

### VĚDECKÉ METODY

**Spektrofotometrická/fluorimetrická stanovení** koncentrací bílkovin, NA, atd. Lze připravit různé metody pro využití komerčních kitů.

Spektrofotometrické vlastnosti látek (absorbance), rozsah 190-900 nm, absorpční spektra, měření koncentrace volného hemoglobinu, koncentrace bílkovin, koncentrace absorbujících nízkomolekulárních látek, kinetická měření (UV-2401PC (Shimadzu))

Spektrofotometrické vlastnosti látek (absorbance, 200-999 nm kontinuálně, fluorescence, ex: 360/40; 485/20; 530/25; 590/20 nm em:460/40; 540/25; 590/35; 645/40 nm, luminiscence 460/40; 540/25; 590/35; 645/40 nm), kinetická měření (Synergy HT (Bio-Tek))

Absorbance 190-840 nm /fluorescence (filtry v odkazu): Měření koncentrace peptidů, bílkovin, NK, ...

Možnost stanovení i v květě (DS-11FX (DeNovix) „nanodrop“)

[https://www.denovix.com/DeNovix\\_DS11\\_eBrochure.pdf](https://www.denovix.com/DeNovix_DS11_eBrochure.pdf)

Stanovení koncentrace celkového fibrinogenu

Stanovení koncentrace D-dimerů

Stanovení aktivity trombinu

Funkční testy posttranslačně modifikovaného fibrinogenu (vznik klotu, fibrinolýza)

**Skenovací elektronová mikroskopie** (spolupráce s VŠCHT): příprava vzorků probíhá částečně na VŠCHT (na ÚHKT není dostatečné přístrojové vybavení).

Sledování morfologie fibrinové sítě u pacientů

**Agregace krevních destiček:** PAP4; lze jak v plazmě, tak i s vyzolovanými krevními destičkami.

Sledování vlivu posttranslačních modifikací fibrinogenu na jeho interakci s krevními destičkami

### Počítačové modelování

Homologní modelování

Molekulárně-dynamické simulace (atomistické i coarse-grainové rozlišení)

Sekvenční analýza

Fylogenetická analýza

Vizualizace molekul

13300

ODDĚLENÍ BIOCHEMIE

**Vedoucí oddělení:** Ing. Jiří Suttnar, CSc.

## VĚDECKÉ METODY

### **Metody související se studiem fibrinogenu**

Genetické vyšetření všech exonů kódující fibrinogen – PCR, Sangerova sekvenace

Funkční testy mutovaného fibrinogenu – polymerace, fibrinolýza

Kinetika odštěpování fibrinopeptidů měřená RP-HPLC s UV detekcí

Skenovací elektronová mikroskopie fibrinových sítí – částečná příprava vzorku – zbytek VŠCHT

Konfokální mikroskopie fibrinových sítí – příprava vzorku – měřeno u dr. Kuželové

### **LC-MS/MS**

Analýza proteinů a post-translačních modifikací

Analýza koncentrací nízkomolekulárních látek (metabolitů) v plasmě/séru, buňkách, buněčných kulturách, a tkáních.

Metody pro stanovení:

fyziologických aminokyselin včetně methylovaných derivátů argininu

metabolitů glykolýzy a citrátového cyklu

metabolitů tryptofanu v kynureninové a serotoninové dráze

karnitinu a acetylkarnitinu

ATP, ADP, AMP, adenosinu

enantiomerů (R,S) 2-hydroxyglutarátu pomocí LC-MS/MS

markerů oxidačního stresu (malondialdehyd, allantoin, urát, 5-oxoprolin), a dalších

### **SPR senzor**

proteinové interakce, HSP Trap Assay

Elektroforéza 1D, 2D

Western blot

ELISA

Izolace, kvantifikace proteinů

Hmotnostní spektrometrie – identifikace proteinů

Vyhodnocování LC-MS dat

Vyhodnocování elektroforetických dat

13403

## ODDĚLENÍ PROTEOMIKY

**Vedoucí oddělení:** RNDr. Kateřina Kuželová, Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

Neprovádí se.

### VĚDECKÉ METODY

Upozorňuji, že vzhledem k velmi krátké lhůtě pro vypracování a nejasnému zadání (co je míněno "metodou"?; jde o aktuálně používané techniky, nebo i o techniky na pracovišti v minulosti zavedené a vyzkoušené, které ovládáme?) nemohu zaručit úplnost seznamu.

- Kultivace buněčných linií
- Separace různých typů krevních buněk v hustotním gradientu
- Tkáňové kultury primárních buněk (např. izolace kardiomyocytů metodou postupné enzymatické digesce)
- Analýza tvorby buněčných kolonií (CFU-C, BFU-E)
- Příprava mikroskopických preparátů na Cytospinu
- Ultrafiltrace
- Sonikace
- Izolace mRNA, přepis do cDNA
- Imunoprecipitace
- Western-blot, dot blot techniky pro analýzu epigenetických modifikací
- Nativní a seminativní elektroforéza (analýza proteinových komplexů)
- Nativní metalblotting – námi vyvinutá publikovaná technika
- Spektrofotometrie, fluorimetrie - různé aplikace
- Světelná a fluorescenční mikroskopie, včetně konfokální mikroskopie - různé aplikace včetně dlouhodobého monitorování živých buněk a interference v odraženém světle (IRM)
- Pokročilé techniky fluorescenční mikroskopie včetně FLIM (měření času dohasínání fluorescence), FRET (Foerstrův přenos rezonanční energie), FCS (fluorescenční korelační spektroskopie), anizotropie fluorescence, vybělování a fotokonverze (s využitím mikroskopů na jiných pracovištích)
- Průtoková cytometrie - různé aplikace, např. analýza buněčného cyklu, analýza povrchových i intracelulárních molekul, detekce fluorescenčně značených proteinů, měření příjmu glukózy buňkami
- Měření buněčného metabolismu (rychlost mitochondriální respirace a aerobní glykolýzy)
- Monitorování adherentních buněčných kultur pomocí měření mikroimpedance (lze použít např. pro sledování antiproliferačních nebo toxických účinků léčiv, testy cytotoxicity imunitních buněk)
- Sledování apoptózy, nekrózy a senescence (různé metody)
- Amplifikační a kvantitativní PCR
- Molekulární klonování (příprava plazmidů pro exogenní expresi proteinů v živých buňkách)
- Transfekce buněk chemickou cestou, elektroporací nebo nukleofekcí
- Analýza proteomu/fosfoproteomu (s využitím přístrojů na jiných pracovištích)
- Bio-plex – multiplexní analýza
- Enzymatické reakce a eseje
- Produkce rekombinantních proteinů
- Renaturace (refolding) proteinů a peptidů, (např. hormon hepcidin)
- Chromatografické separace proteinů - size exclusion, ion Exchange, FPLC, affinity
- Tenkovrstevná chromatografie
- Analýza velikosti a počtu částic v řádech nm (Tunable Resistive Pulse Sensing instrument qNano)
- Značení buněk radioizotopy a analýza radioizotopů na fosforimageru
- Charakterizace exosomů (velikost, povrchové markery, zastoupení proteinů, DNA i RNA)

zavádíme - Modifikace genomu pomocí genových nůžek (CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1)

13503

## ODDĚLENÍ GENOMIKY

**Vedoucí oddělení:** RNDr. Monika Belíčková, Ph.D.

**KLINICKÉ METODY**

**VĚDECKÉ METODY**

nelze od sebe jednoduše rozdělit

- Izolace leukocytů, MNCs, granulocytů
- Izolace specifických buněčných řad pomocí MACS
  
- Izolace nukleových kyselin
- Analýza nukleových kyselin – kvantita, kvalita (Nanodrop, Tapestation, Qubit, genová elektroforéza)
- Reverzní transkripce
  
- Klasické PCR
- RT-qPCR
- ddPCR
  
- Sangerovo sekvenování
- Pyrosekvenování
- NGS (RNA, DNA)
  
- Bioinformatické zpracování NGS dat
  
- Kultivace buněčných linií
- Transfekce buněk

13550

## ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ MIKROBIOLOGIE

**Vedoucí oddělení:** MUDr. Klára Labská, Ph.D.

### KLINICKÉ METODY

---

- Izolace nukleových kyselin – manuálně i na přístroji MagCore II plus, biohazard box třídy II
- Stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin na UV-VIS spektrofotometru
- Real-time PCR (CFX, ABI Step One, uzavřený systém GeneXpert)
- EIA (promývačky, ELISA-reader)

### VĚDECKÉ METODY

mimo akreditovaný režim

---

- end-point PCR
- Horizontální i vertikální ELFO
- Práce s tkáňovými kulturami (oddělený prostor, biohazard box třídy II a CO2 inkubátor)

13600

## ODDĚLENÍ IMUNOLOGIE

**Vedoucí oddělení:** RNDr. Šárka Němečková, DrSc

### KLINICKÉ METODY

Neprovádí se.

### VĚDECKÉ METODY

A) práce s nukleovými kyselinami:

- 1) izolace nukleových kyselin (DNA, RNA) v roztocích i na kolonkách
- 2) RT-PCR, Q-PCR
- 3) klonování a metody genového inženýrství v bakteriálních systémech, sekvenování
- 4) výroba in vitro mRNA
- 5) vnášení DNA/mRNA do buněk (transfekce, elektroporace) pro produkci studovaných proteinů
- 6) počítačová analýza sekvencí nukleových kyselin s využitím programu Snapgene.

B) práce s tkáňovými kulturami:

- 1) práce s buněčnými liniemi
- 2) práce s primárními kulturami (PBMC) a separace jejich subpopulací (dendritické buňky, lymfocyty)
- 3) výroba antigenně specifických lymfocytů, výroba CAR T buněk, výroba T buněk s umělým TCR, jejich expanze a stimulace
- 4) práce s viry – virus vakcinie, HCMV, genové inženýrství virů, ultracentrifugace, sonikace

C) imunologické analýzy:

- 1) ELISPOT - detekce funkčních antigenně specifických buněk podle produkce efektorových proteinů (cytokiny, granzymy)
- 2) FACS – multiparametrické analýzy lymfocytů a buněk po genových úpravách
- 3) Analýzy dat z průtokové cytometrie v programu FlowJo
- 4) ELISA testy pro stanovení protilátek, cytokinů a jiných látek v biologických materiálech
- 5) IGRA test – stanovení celkové buněčné imunity.
- 6) cytotoxické testy ke stanovení efektorových T buněk
- 7) reportérové eseje založené na luminiscenci, spektrofotometrii
- 8) predikce vazebných epitopů Th1 a Th2 pomocí veřejně dostupných inforatických zdrojů

D) práce s proteiny:

- 1) detekce exprese studovaných genů v buňkách pomocí imuno fluorescenční mikroskopie a western-blotů
- 2) dvourozměrná proteinová elektroforéza
- 3) separace buněčných kompartmentů, izolace a přečištění studovaných proteinů
- 4) predikce základních parametrů proteinů pomocí Expasy-tools.

E) publikační a vyhodnocovací postupy

- 1) Práce s programy GraphPadPRISM, RefWorks, Refman, Excell, Word, PowerPoint

13803

ODDĚLENÍ IMUNOMONITORINGU A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

**Vedoucí oddělení:** RNDr. Jan Musil, Ph.D.

## KLINICKÉ METODY

---

Neprovádí se.

## VĚDECKÉ METODY

---

### **Průtoková cytometrie:**

- detekce povrchového fenotypu buněk
- funkční testování - produkce cytokinů, aktivačních znaků, proliferace
- analýza buněčného cyklu
- stanování transfekční účinnosti
- detekce transkripčních faktorů
- cytokinové multiplexy

### **Datová analýza**

- počítačem asistovaná analýza – redukce dimenzionality a klastrování (EmedSOM, UMAP, tSNE)

### **Příprava buněčné suspenze z tkání GentleMACS**

**Ostatní metody – jsou k dispozici dle kvalifikace pracovníků, ale nejsou primárním cílem oddělení:**

- Molekulární klonování a návrh sekvencí
- ELISA, ELISPOT, Western-Blot
- Fluorescenční mikroskopie



13900

ODDĚLENÍ HLA

**Vedoucí oddělení:** Ing. Milena Vraná

## KLINICKÉ METODY

- Vyšetření buněčného chimerismu po alogenní HSCT analýzou sekvenčních polymorfismů pomocí elektroforézy a real-time PCR  
[Buněčný chimerismus]
- Vyšetření genotypu HLA (human leukocyte antigens) pro potřeby HSCT (hematopoietic stem cell transplantation)  
[MHC]
- Vyšetření genotypu HLA (human leukocyte antigens) pro vazbu HLA s chorobami  
[MHC]
- Vyšetření genotypu HLA (human leukocyte antigens) pro farmakogenetiku  
[MHC]
- Používané metodiky:  
PCR-SSP, real-time PCR, kvantitativní real-time PCR, Sangerovo sekvenování, fragmentační analýza, NGS