

Mendelova genetika v příkladech

Genetické markery



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Hodnocení genetické proměnlivosti

Fenotypový znak = dedičné vlohy + vliv prostředí

Markéry:

- znaky, které nejsou ovlivněny prostředím
- úplná genetická kontrola (fenotyp = genotyp)
- jejich pomocí lze analyzovat genetickou variabilitu

Druhy genetických markerů:

- **morfologické**
 - chlorofyloví mutanti
 - barevné varianty
 - tvarové varianty – také typ větvení
- **biochemické**
 - krevní skupiny a faktory vyšších živočichů
 - monoterpeny (Gymnosp.),
 - fenoly (Angiosp.)
- **molekulární**
 - proteinové (strukturní, zásobní proteiny SDS PAGE)
 - isoenzymové proteinové markery
 - DNA markery

Nejdříve se používali morfologické markery. Ovšem u rostlin i živočichů je jejich počet omezen na několik morfologických znaků, jako jsou např. tvarové nebo barevné mutace, výskyt zřídka nemocí nebo dědičných poruch v rodokmenech ... Z biochemických markerů se využíval systém krevních skupin a faktorů.

Od 50. letech 20. století se díky rozvoji chromatografie (jako analytické metody) objevili **nové biochemické markery:** bílkovinové markery rostlin i živočichů obecně, u lesních dřevin fenoly a terpeny/monoterpeny jehličnanů.

Isoenzymy, které jsou biochemickými i molekulárními markery, se začali využívat díky rozvoji elektroforetických separačních metod v kombinaci s biochemickým barvením od začátku 60-70. let 20. století.

Kolem r. 1990 se začali využívat DNA markery – díky PCR - Polymerázové řetězové reakci.

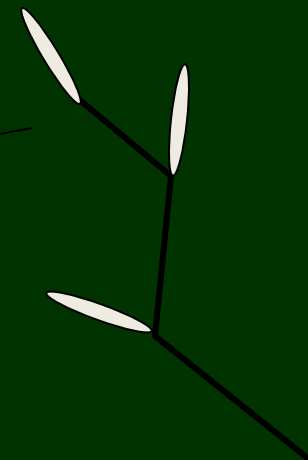
Přinesly kvalitativní skok v rozvoji genetiky a jsou dnes samozřejmým nástrojem v mnoha vědných oblastech mimo genetiky: fyziologii, lékařských vědách, systematické biologii... archeologii atd.

Používání genetických markerů v genetickém výzkumu bezezbytku prokázalo platnost základních genetických zákonů a v mnoha ohledech také evolucionistických teorií.

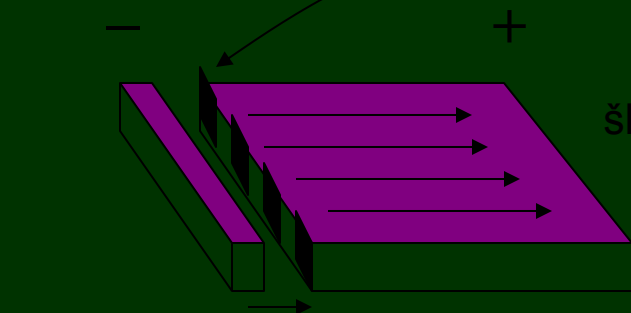
Genetické markery se stali se běžným nástrojem výzkumu a mají bezpočet aplikací ve zdravotnictví, biotechnologiích, zemědělství, péči o genetické zdroje, šlechtění...

Isoenzymové genové markery

Homogenizace tkáně



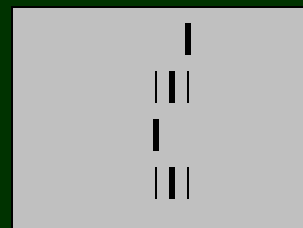
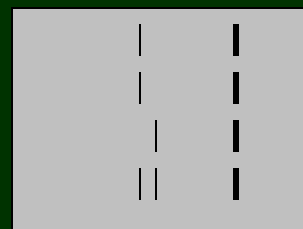
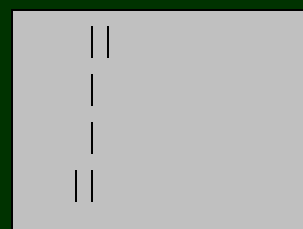
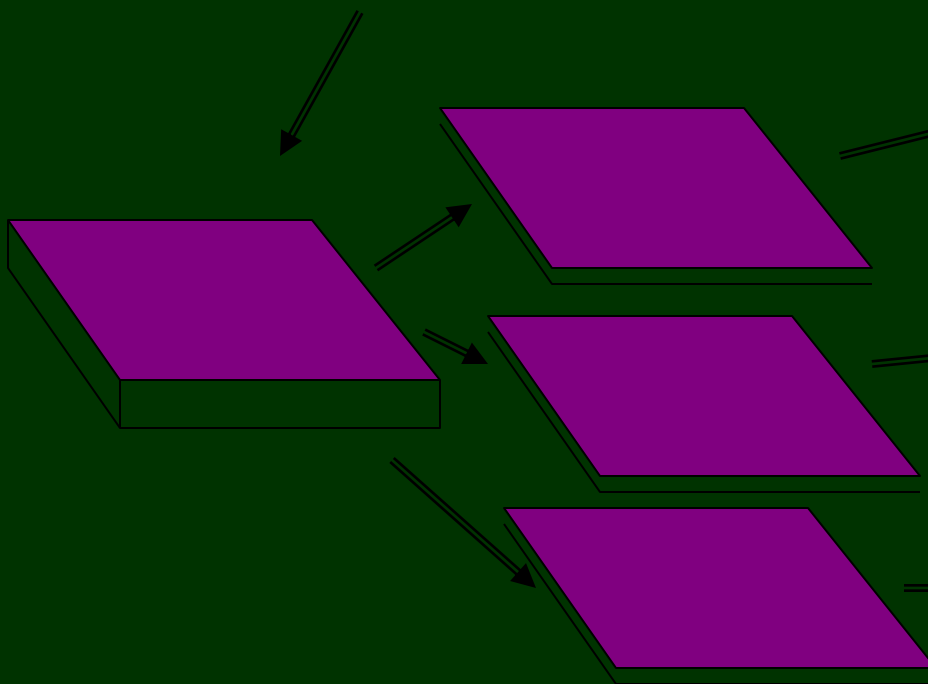
elektroforeza



škrobový nebo polyakrylamidový gél

Výstup: elektroforeogram

histochemické barvení = **zymogram**

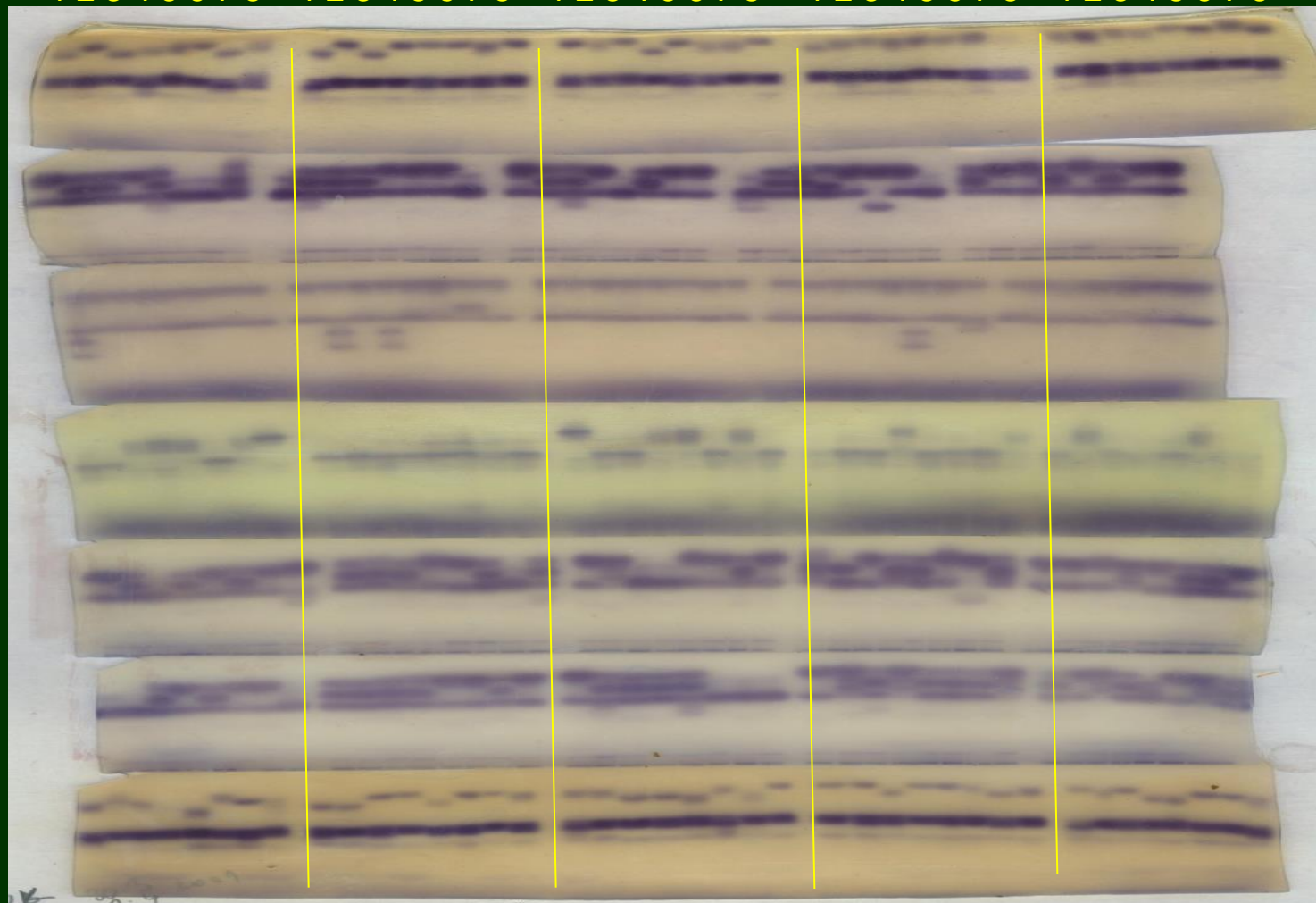


Výsledek isoenzymové analýzy:

- 7 enzymových systémů
- 13 izoenzymových lokusů
- genotypy 40 (5x 8 vodorovně) jedinců buku

1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13



Nástroje analýzy DNA

- PCR – polymerázová řetězová reakce

Navazující analýzy:

- RFLP – Restriction fragment length polymorphisms,
- VNTR – Variable number of tandem repeats
- RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA
- AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphisms
- SSR – Single Sequence Repeats DNA (mikrosatelity)
- ESTP - Expressed Sequence Tag Polymorphism

Restrikční endonukleázy

- Typ I* *vyhledávají sekvenci DNA/RNA
a stříhají náhodně*
- Typ II* *vyhledávají sekvenci DNA/RNA
a stříhají v její rámci (uvnitř)*
- Typ III* *vyhledávají sekvenci DNA/RNA
a stříhají ve vzdálenosti cca
20 – 25 báz od ní*

Vytvářejí hladký konec (blunt end)

Sma I CCC↓GGG
 GGG↓CCC

Vytvářejí převis (overhang, sticky end)

Xma I C↓CCGGG
 GGGCC↓C

Délka vyhledávané sekvence

4 bp	(Ø délka fragmentů 256 bp)
6 bp	(Ø délka fragmentů 4096 bp)
8 bp	(Ø délka fragmentů 65536 bp)

Polymerázová řetězová reakce

Polymerase Chain Reaction; PCR



Technika amplifikace (zmnožení, namnožení) DNA.

Principem je opakovaná řízená denaturace dvouřetěz-cové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy (primery) v reakční směsi.

Amplifikace (zmnožení) DNA probíhá v opakujících se cyklech v termocyklerech.

Cykly mají tři kroky:

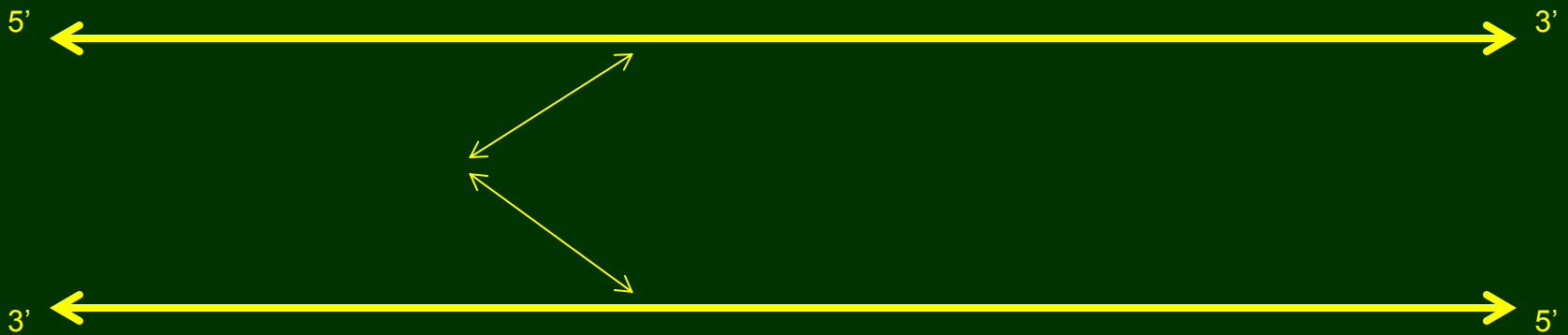
- 1) Denaturace vyextrahované DNA
- 2) Hybridizace jednořetězcové templátové DNA
- 3) Syntéza nových komplementárních řetězců

Pro PCR jsou jako vstupy potřebné:

- *Vyizolovaná DNA*
- Termocykler
- Primery
- *Taq* polymeráza
- volné nukleotidy (dNTP)
- reakční roztok, Mg^{2+}

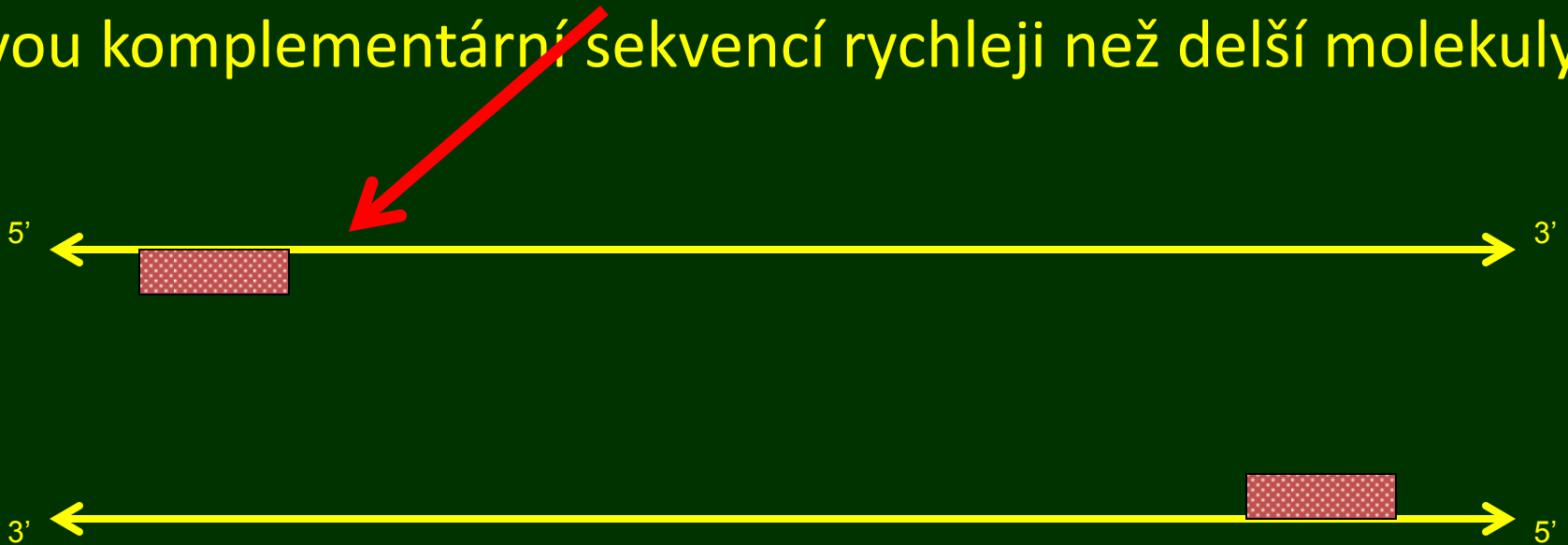
1. cyklus: Denaturace vyextrahované DNA

Při teplotě kolem 95 °C se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákny DNA, čímž se dvouřet. DNA rozdělí na dvě vlákna.



1. cyklus: Připojení primerů (annealing)

Hybridizace (dosednutí primerů) při 50–60 °C. Molekuly jednořet. DNA renaturují. Pokud jsou v roztoku v nadbytku primery (specifické oligonukleotidy), budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než delší molekuly.

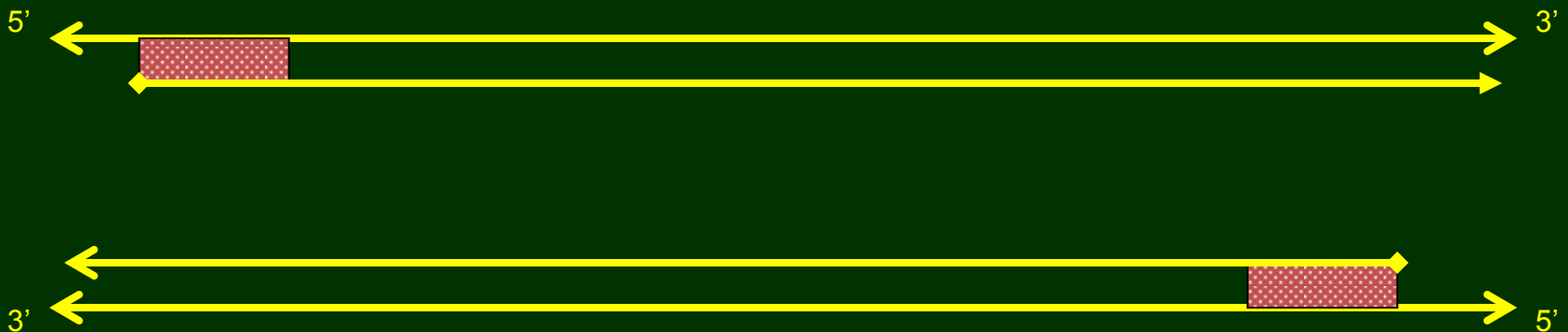


$16 \text{ bp} \approx 4^{16} = 4.29 \cdot 10^9$ kombinací

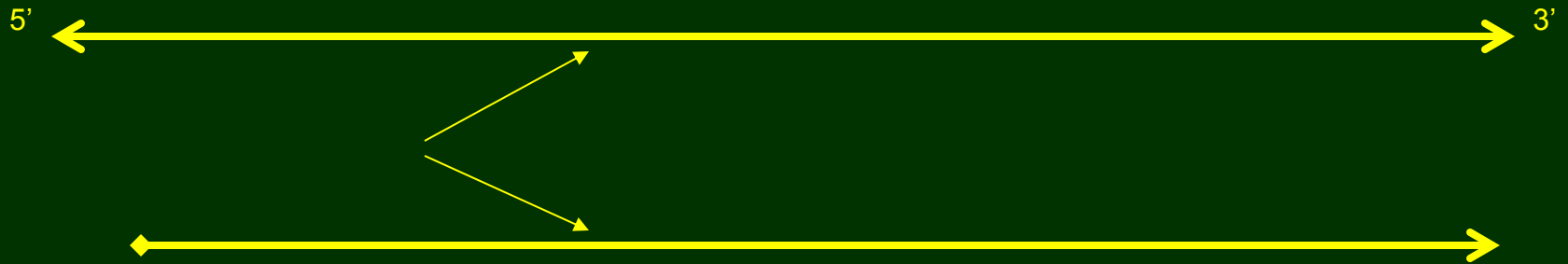
50 °C

1. cyklus: syntéza druhého řetězce (extension)

Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65–75 °C. Primery, které dosedly v předchozím kroku na jedno-řetězcovou DNA (templát), slouží v tomto kroku jako primery pro DNA polymerasu. Od jejich 3'-konce začíná syntéza nového řetězce komplementárního s templátem.



2. cyklus denaturace (denaturation)



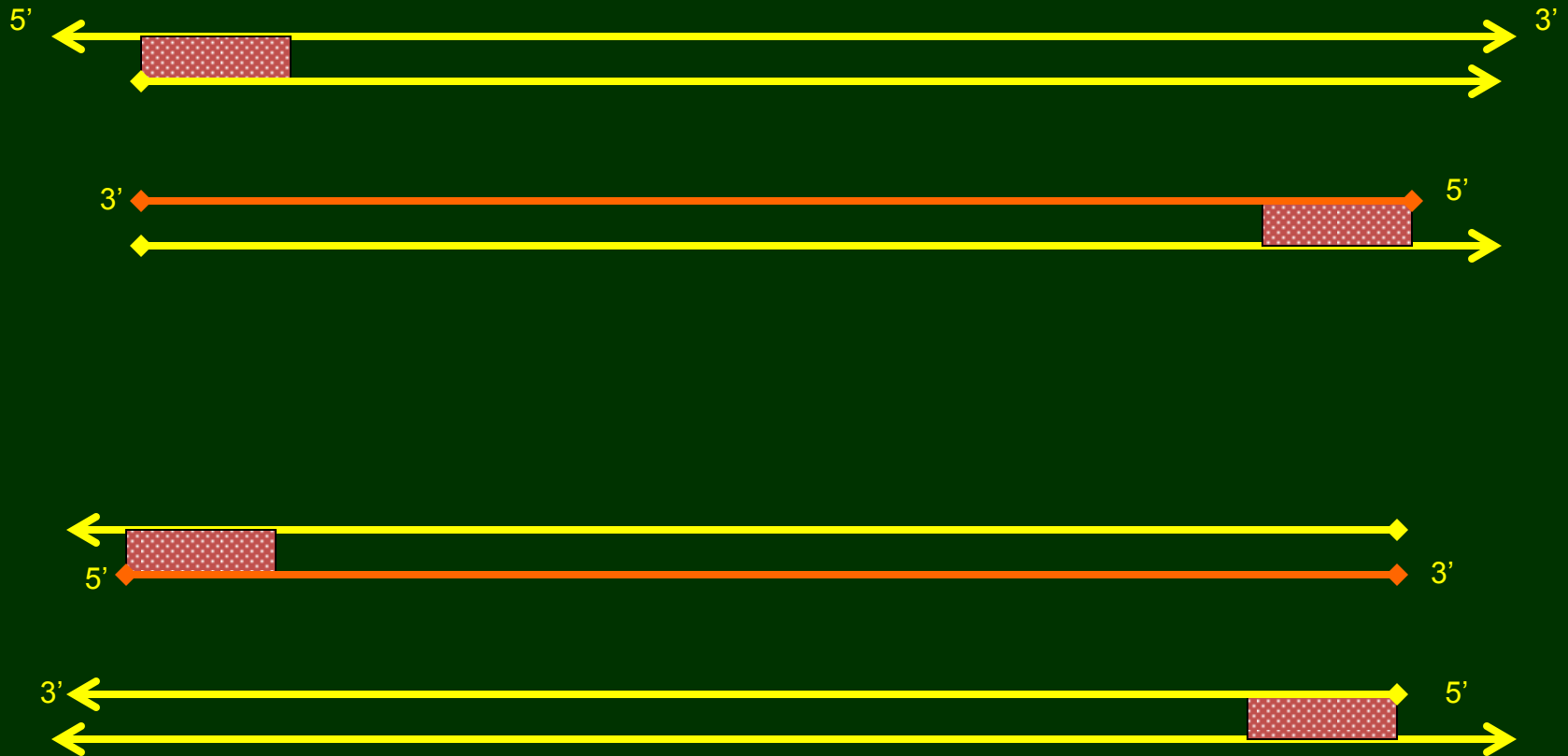
95 °C

2. cyklus připojení primerů (annealing)



50 °C

2. cyklus syntéza druhého řetězce (extension)



72 °C

PCR

Izolovaná DNA

3.cyklus

atd.

1.cyklus

denaturace

připojení primerů

elongace

2.cyklus

95 °C

~50 °C

72 °C

95 °C

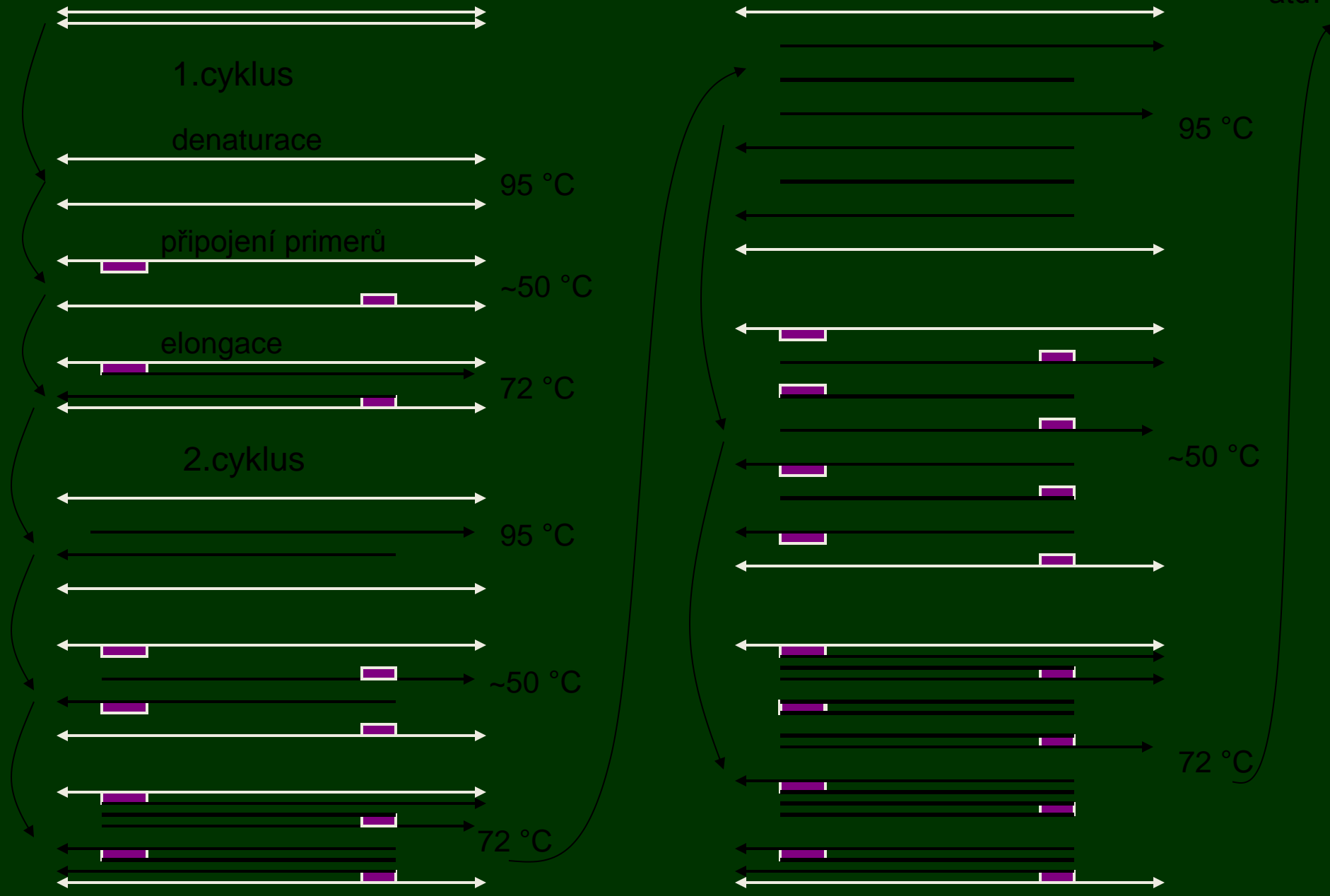
~50 °C

72 °C

95 °C

~50 °C

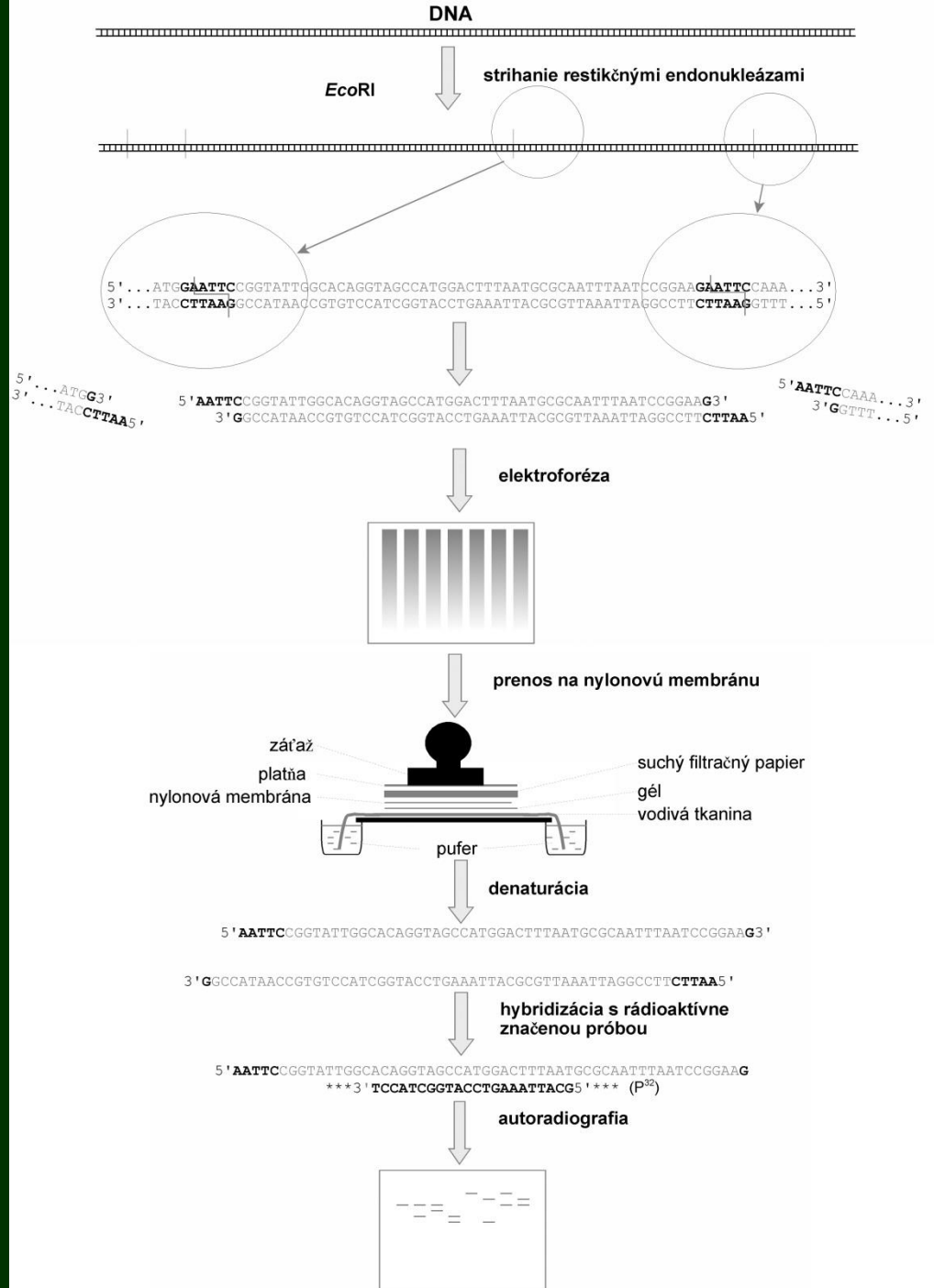
72 °C



RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphisms
Délkový polymorfismus restričních fragmentů

- stříhání restričními endonukleázami
- *elektroforeze*
- *denaturace*
- *přenos denaturované DNA na membránu (nylon, nitroceluloza)*
- *Southernova hybridizace (Southern blot) s radioaktivně značenou probou*
- *autoradiografie*



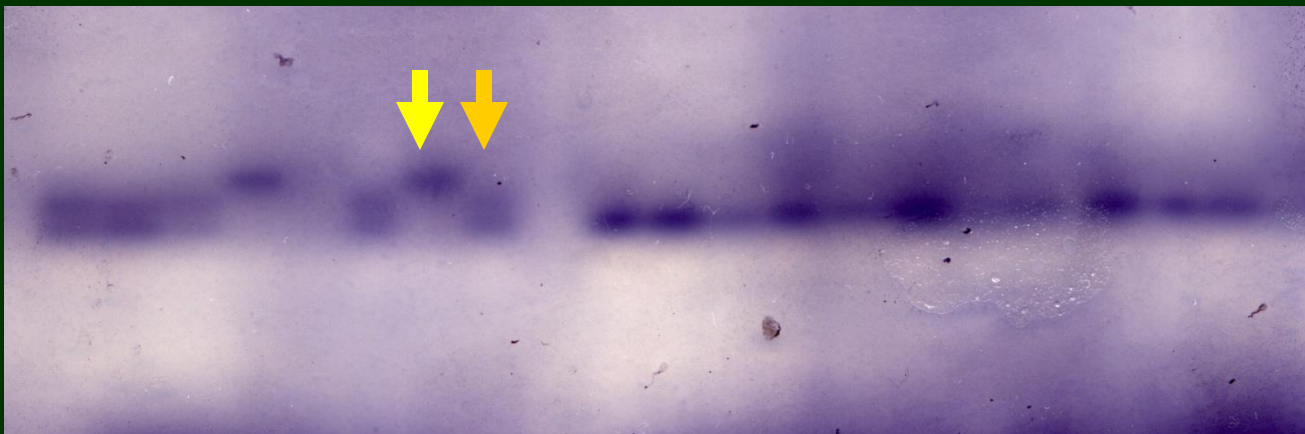
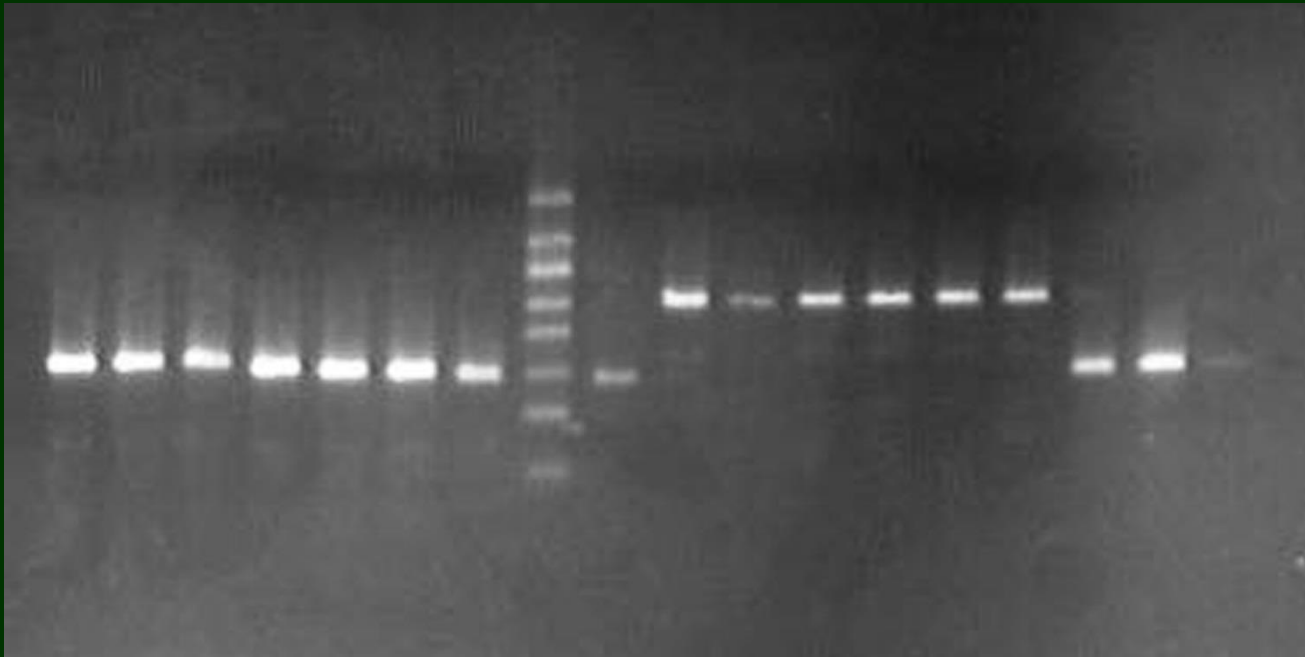
Výhody RFLP

- *vysoko polymorfní markery*
- *spravidla kodominantní*
- *možnost analýzy velkého počtu lokusů*
- *reprodukovatelnost = opakovatelnost*

Nevýhody

- *pracnost*
- *používají se radioaktivní izotopy*

Illustrate PCR-RFLP DNA



Mikrosatelity - SSR

Simple Sequence Repeats;

Opakované krátké, jednoduché, nekódující sekvence DNA.

1–6 bp

P1 ...CGTATATATATATGGCA...
...GCATATATATATACCGT...P2

P1 ...CGTATATATATATATGGCA...
...GCATATATATATATACCGT...P2

Výhody

- *v genomu jádra i cytoplazmatickém genomu*
- *vysoce variabilní, kodominantní, nekódující*
- *PCR, reprodukovatelné*

Nevýhody

- *finančně a technicky náročná identifikace*
- *nulové alely, homoplaze*

Minisatelite (VNTR)

Variable Number of Tandem Repeats;

9–40 bp, bohaté na GC

zvláště v oblasti centroméry a telomér

hypervariabilní, nekódující

RFLP

fingerprinting

mapování genomu

RAPD

Náhodně zmnožená polymorfní DNA
Randomly Amplified Polymorphic DNA;

Amplifikace náhodně zmnožených fragmentů

Primery ~10 bp

Teplota pre annealing cca 36 °C

Výhody

- *rychlá, levná, jednoduchá metoda*
- *nevyžaduje znalost sekvencí*
- *rychlá identifikace vysokého počtu lokusů*

Nevýhody

- *dominantné markéry*
- *nízká reprodukovatelnost, homoplazie*
- *neznámý původ fragmentů z genomu (n, cp, mt);*

AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism;

Amplifikace náhodných fragmentů

- *štěpení restriktivními enzymy, vytvářejícími převis (často + zřídka stříhající)*
- *ligace adaptérů se známou sekvencí*
- *víc fragmentů*
- *PCR s primermi = adaptér + převis*

Výhody

- *nevyžaduje znalost sekvencí*
- *vyšší reprodukovatelnost ve srovnání s RAPD*

Nevýhody

- *dominantní markery*
- *technická obtížnost*
- *patentová ochrana*

DNA

strihanie restikčnými endonukleázami



ligácia adaptérov

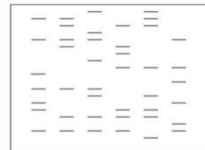


PCR s primermi zodpovedajúcimi sekvencii adaptérov + previsor

Primer 1 5'TCTAAGCGTTGGCTTT3'
Primer 2 5'AAAGCCAACGCTTAGAT3'



elektroforéza



Možná konverze RAPD a AFLP na Sequence-Characterized Amplified Regions (SCAR)

- *izolace fragmentu z gélu*
- *jeho osekvenování*
- *„naprojektování“ fragmentovo-špecifických primerů*

SSCP

Single Strand Conformation Polymorphisms

- *amplifikace jednořetězcových fragmentů asymetrickou PCR (nadbytok jednoho primeru)*
- *denaturace 5 min 55 °C*
- *elektroforeza za konstantní teploty*

Výhody

- *kodominantní markery*
- *velký počet lokusů*
- *možnost automatizace*

Nevýhody

- *bialelické markery*
- *polymorfizmus často specifický pro jednu populaci*
- *technická obtížnost*

Sekvenování DNA

PCR s radioaktivně značenými 2'3'-dideoxynukleotidy

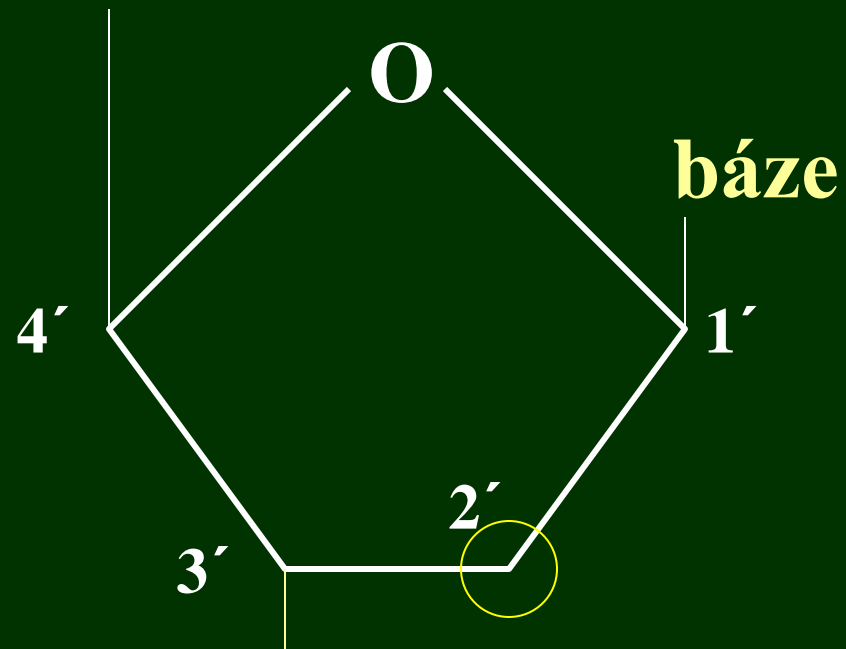
- elektroforeza
- autoradiografie

PCR s neznačenými 2'3'-dideoxynukleotidmi

- elektroforeza
- barvení stříbrem

PCR s fluorescenčně značenými 2'3'-dideoxynukleotidy

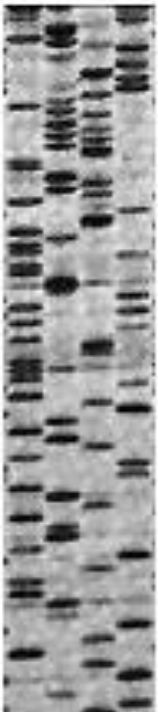
- elektroforeza v automatickém sekvenátoru
- vybudění barviva lezrem



~~nukleotid~~

Sekvenování DNA

- PCR s radioaktivně značenými 2'3'-dideoxynukleotidy
- elektroforeze
- autorádiografie



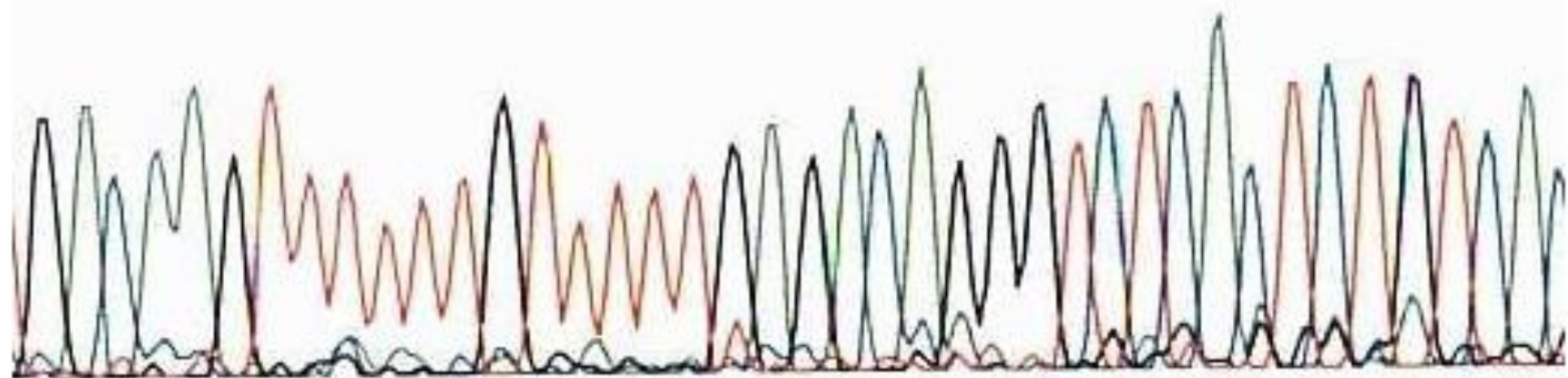
GACAAGTTTTT TGTTTTTGAGACAGG GICTCACTC TGTCAC

50

60

70

80



ESTP

Expressed Sequence Tag Polymorphisms
Polymorfizmus exprimovaných sekvencí

- *izolace mRNA*
- *reverzní transkripce – syntéza kódující DNA (AMV-RT, MMLV-RT)*
- *RT-PCR (Tth, Tfl)*
- *sekvenování*
- *identifikace homologických genů v databankách*
- *určení (dizajn) specifických sekvencí primerů*

Hodnocení variability úseků DNA exprimovaných genů