Obecná genetika

Genetické markery, markery DNA

Prof. Ing. Dušan GÖMÖRY, DrSc.
Ing. Roman LONGAUER, CSc.
Ústav zakládání a pěstění lesů
LDF MENDELU Brno

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

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 jejich počet je u rostlin i živočichů omezen na několik morfologických znaků, jako jsou tvarové nebo barevné mutanty, výskyt zřídkavých 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.

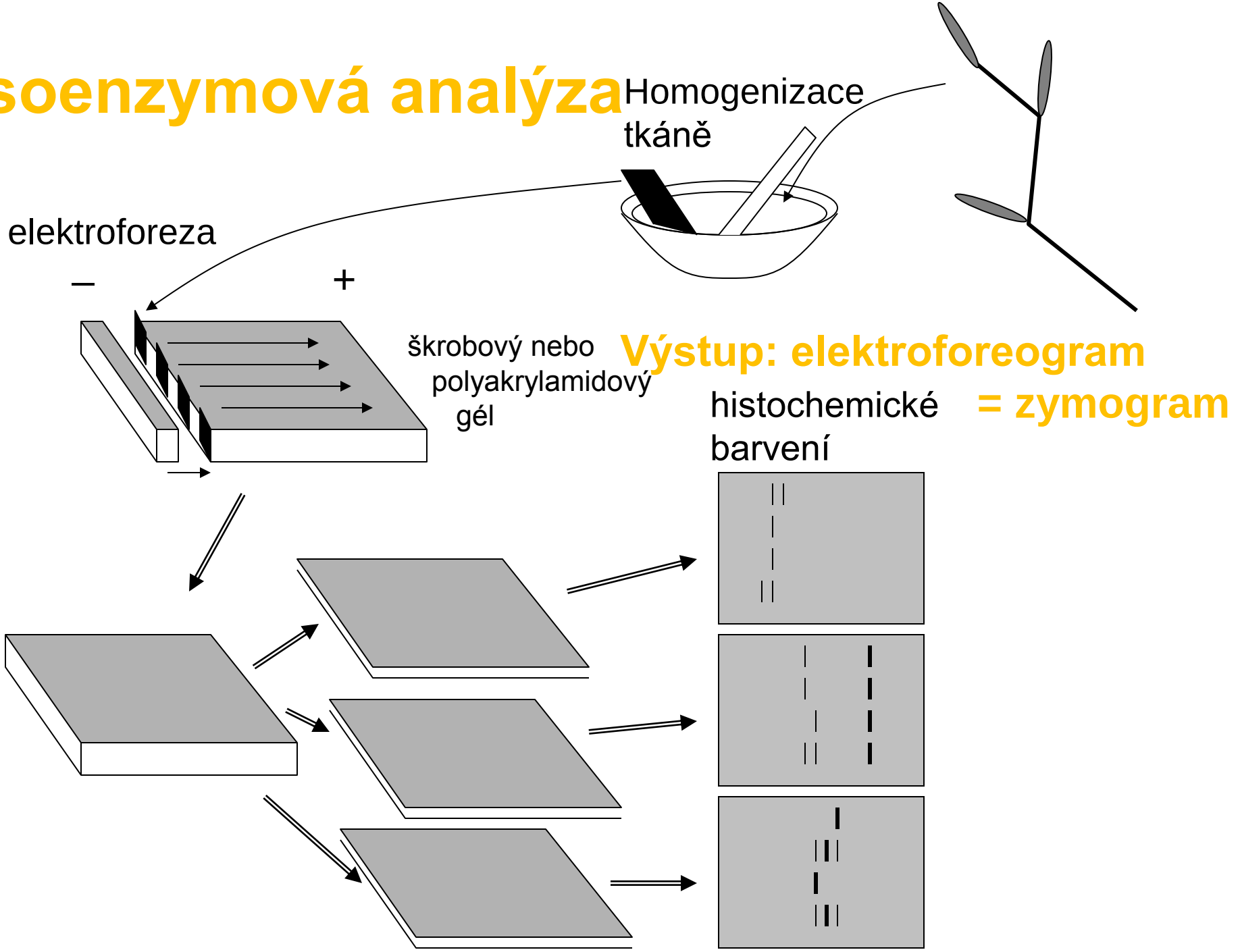
<u>Isoenzymy</u>, které jsou biochemickými i molekulárními markery, se začali využívat díky rozvoji elektroforetických separačních metod v kombinaci s biochemickým barvením od začátku 60-70. let 20. století.

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: fysiologii, lékařských vědách, systematické biologii… archeologii atd.

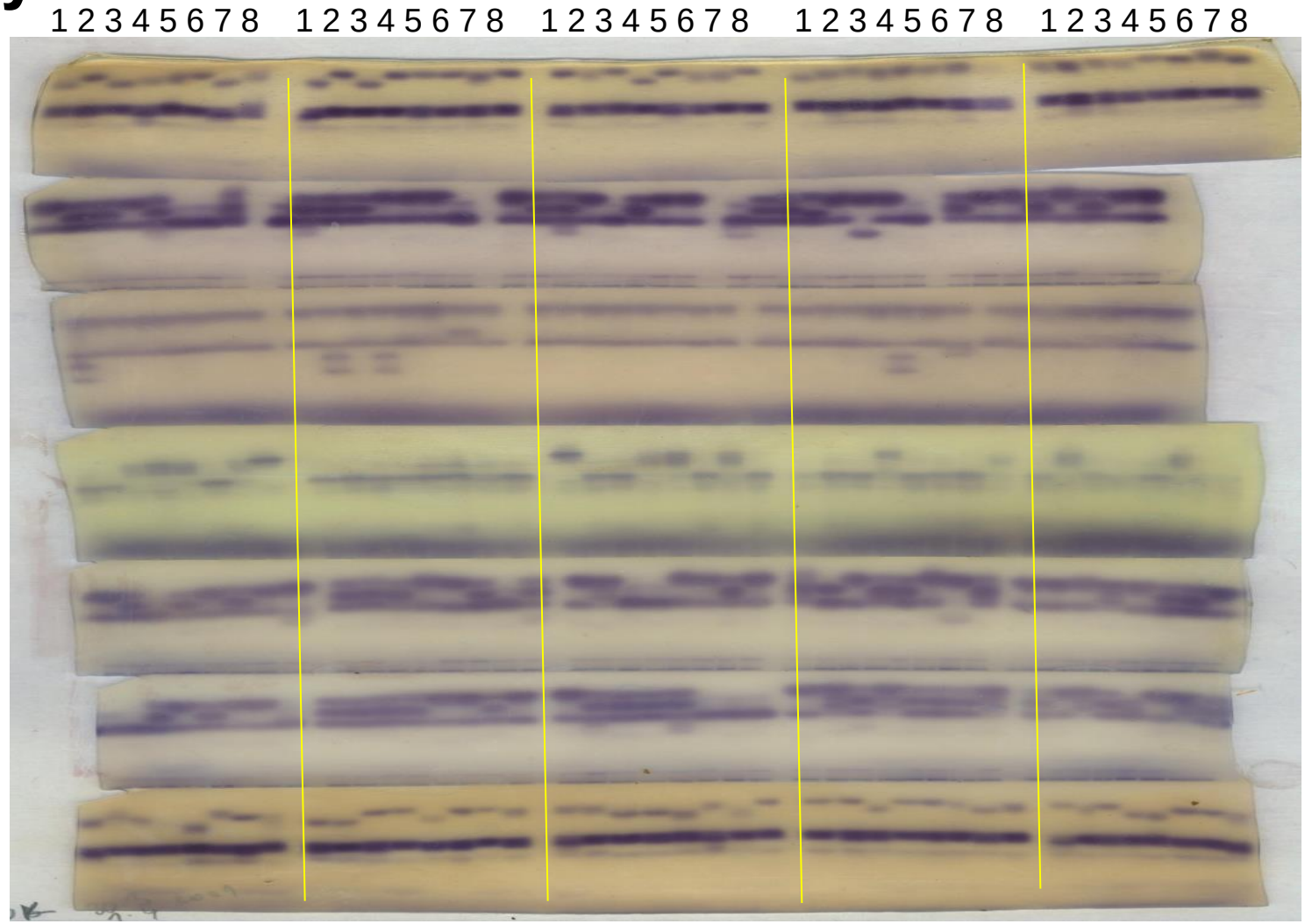
Používaní genetických markerů v genetickém výzkumu bezezbytku prokázalo platnost základních genetických zákonů a v mnoha ohledech také evolucionistických teorií. Stali se běžným nástrojem výzkumu, no mají také bezpočet komerčních aplikací.

Isoenzymová analýza



Výsledek isoenzymové analyzy:

- 7 zymogramů
- s genotypy 40 (5x 8 vodorovně) jedinců buku
- zjištěnými ve 13 lokusech



Nástroje analýzy DNA

- PCR – polymerázová řetězová reakce

Typy markerů DNA podle způsobu /typu analyzování:

- **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

1. cyklus
denaturace (denaturation)

94 °C

1. cyklus
připojení primerů (annealing)

16 bp ≈ 4^{16} = 4.29 . 10^{9} kombinací

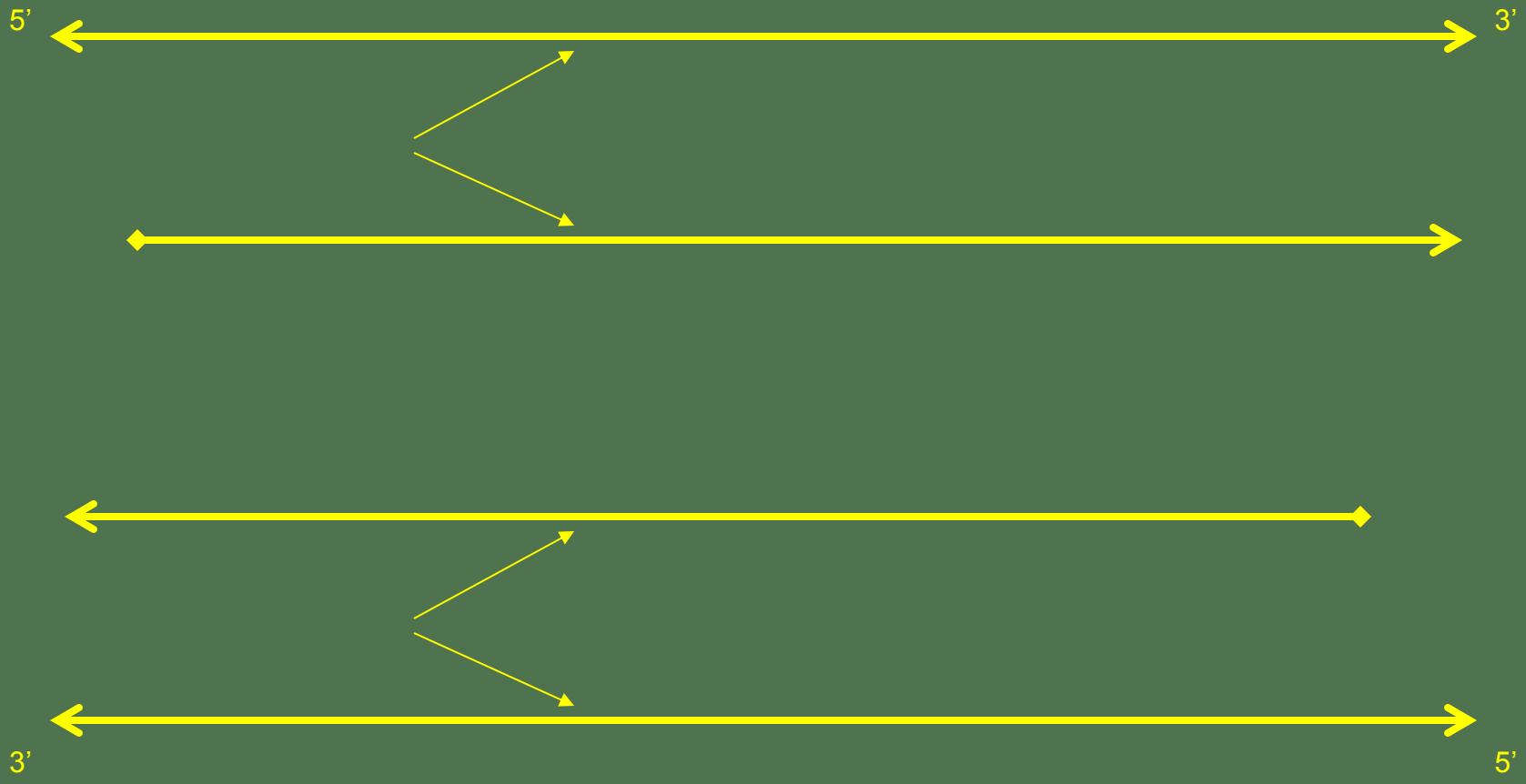
50 °C

1. cyklus
syntéza druhého řetězce (extension)

72 °C

Taq polymeráze
volné nukleotidy (dNTP)
Mg^{2+}

2. cyklus
denaturace (denaturation)



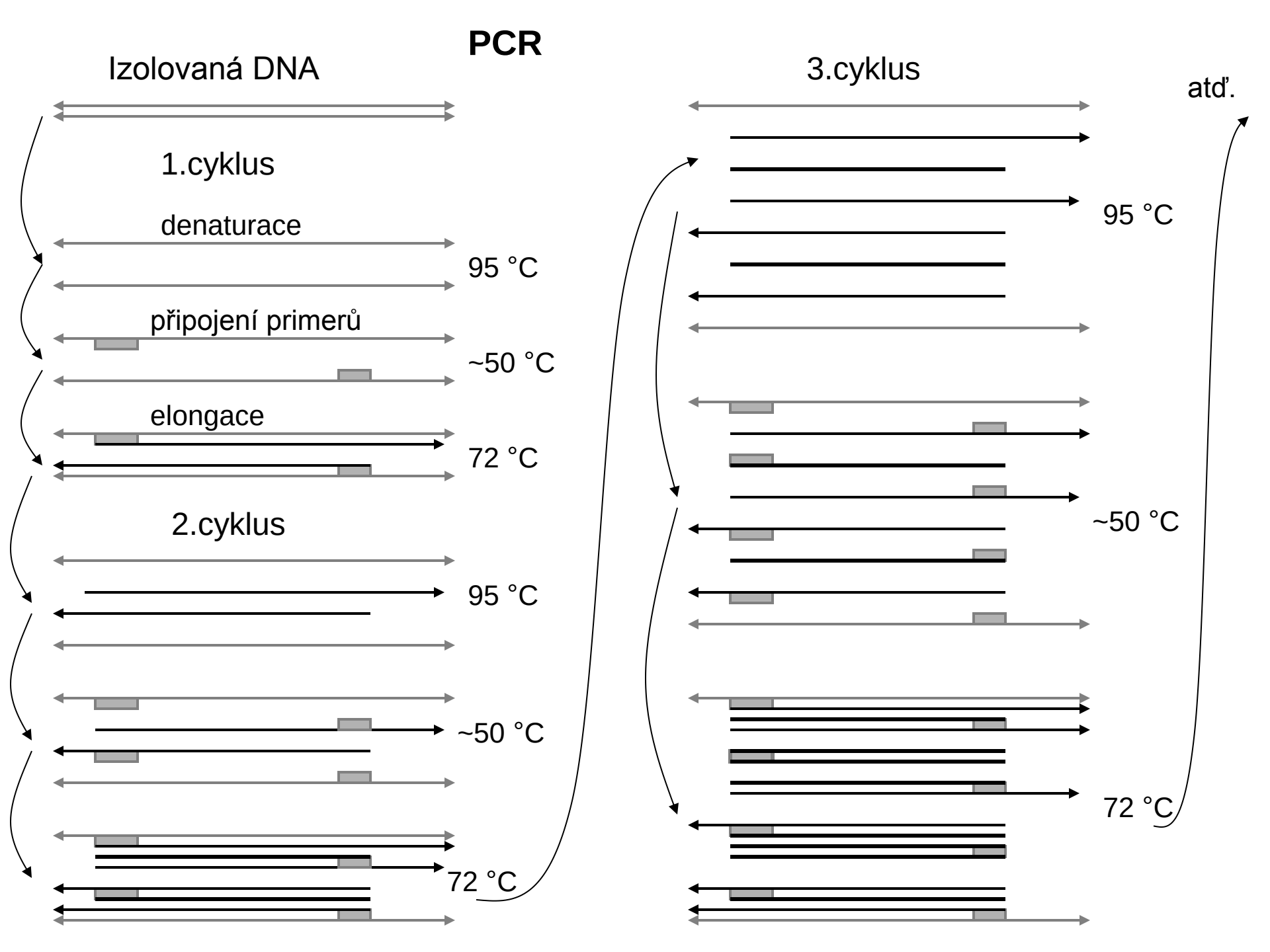
95 °C

2. cyklus
připojení primerů (annealing)

50 °C

2. cyklus
syntéza druhého řetězce (extension)

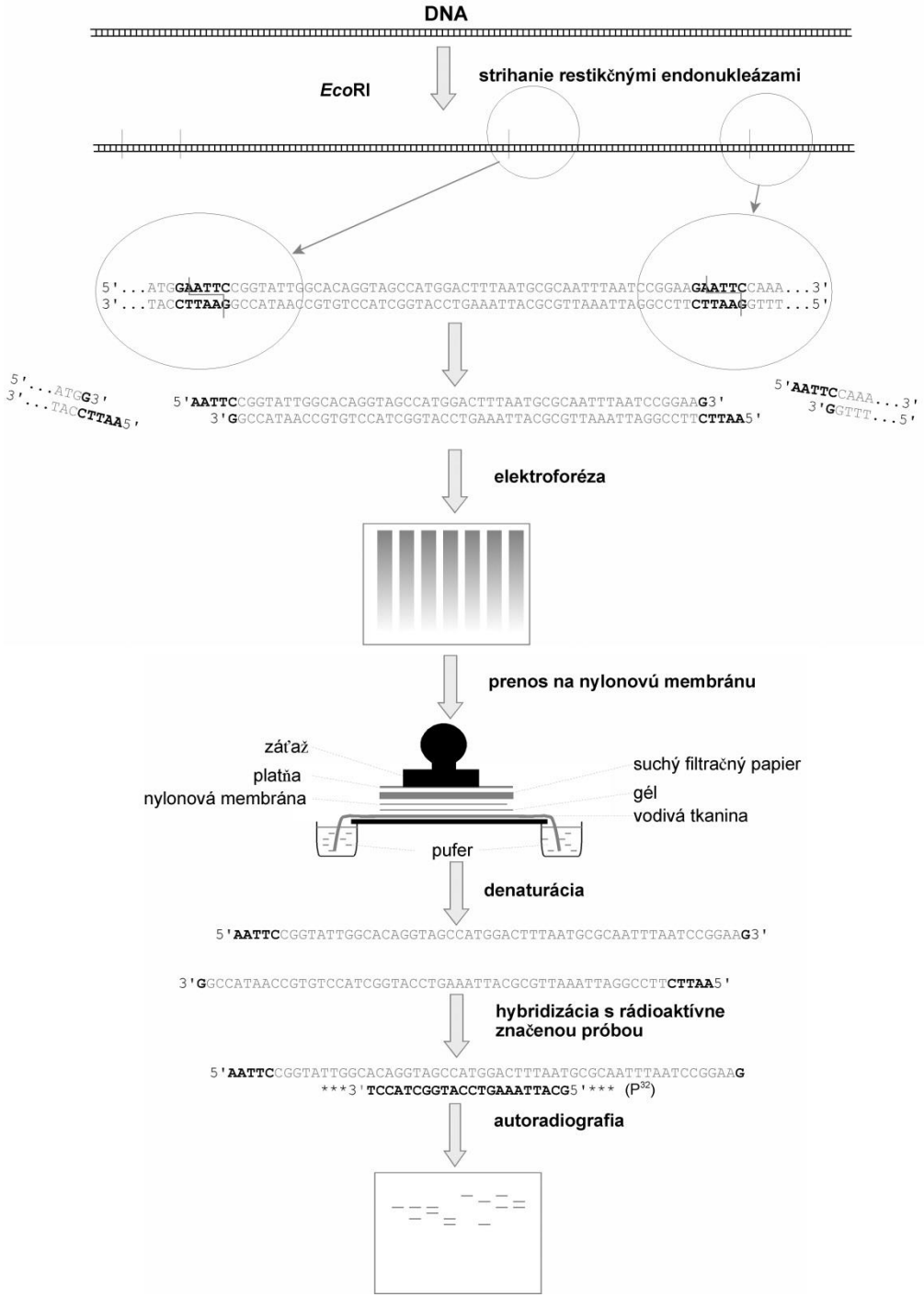
72 °C


PCR
Izolovaná DNA
1.cyklus
denaturace
95 °C
připojení primerů
~50 °C
elongace
72 °C
2.cyklus
95 °C
~50 °C
72 °C
3.cyklus
95 °C
~50 °C
72 °C
atď.

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphisms
Délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů

- stříhání restrikčními endonukleázami
- elektroforeze
- denaturace
- přenos denaturované DNA na membránu (nylon, nitroceluloza)
- Southernova hybridizace s rádioaktivně značenou probou
- autoradiografie


DNA
EcoRI
strihanie restikčnými endonukleázami
5'...ATGGAATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAAGAATTCCAAA...3'
3'...TACCTTAAGGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTCTTAAGGTTT...5'
5'...ATGG3'
3'...TACCTTAA5'
5'AATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAAG3'
3'GGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTCTTAA5'
5'AATTCCAAA...3'
3'GGTTT...5'
elektroforéza
prenos na nylonovú membránu
záťaž
platňa
nylonová membrána
suchý filtračný papier
gél
vodivá tkanina
pufer
denaturácia
5'AATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAAG3'
3'GGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTCTTAA5'
hybridizácia s rádioaktívne značenou próbou
5'AATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAAG
3'TCCATCGGTACCTGAAATTACG5' (P32)
autoradiografia

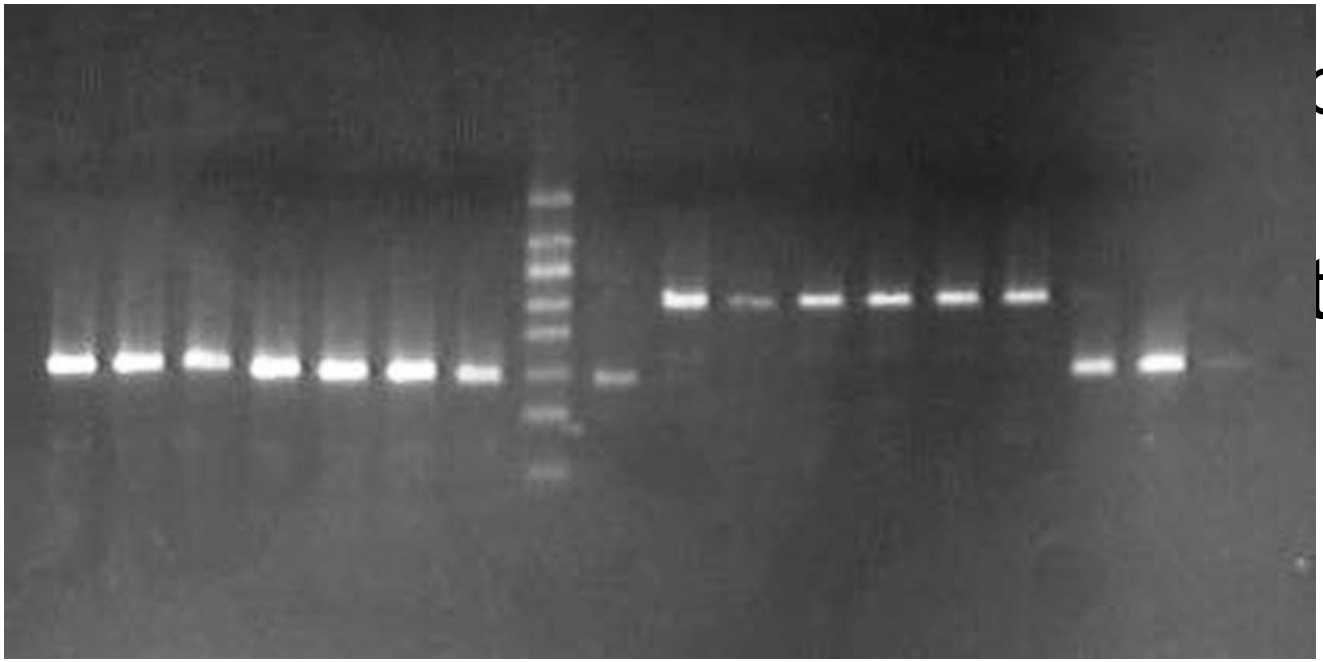
Výhody RFLP

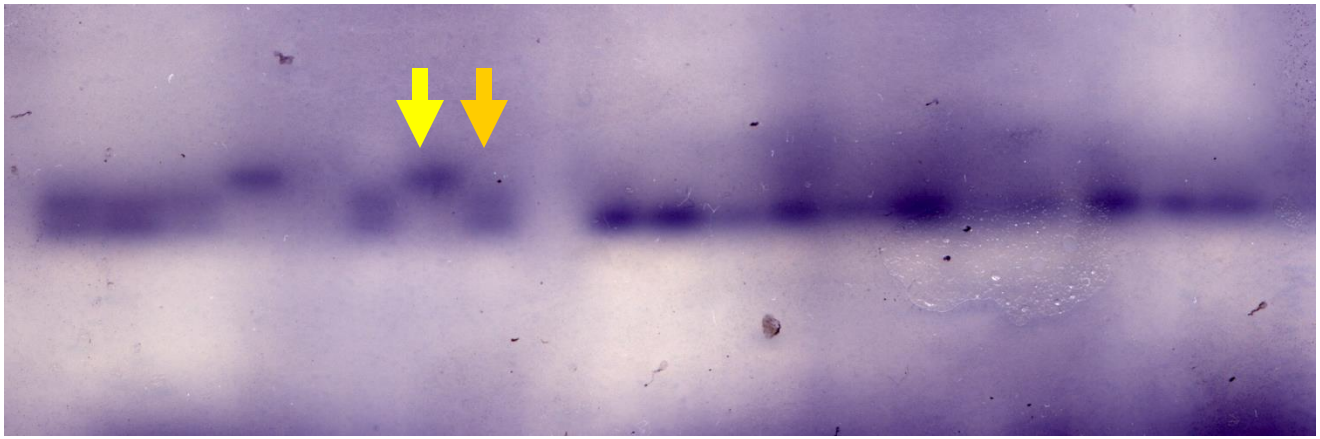
- vysoko polymorfní markery
- spravidla kodominantní
- možnost analýzy velkého počtu lokusů
- reprodukovatelnost = opakovatelnost

Nevýhody

- pracnost
- používají se rádioaktivní izotopy

PCR-RFLP cyDNA





Mikrosatelity - SSR

Simple Sequence Repeats;

Opakované jednoduché sekvence DNA

1–6 bp

P1....CGT**ATATATATAT**GGCA...
....GCA**TATATATATA**CCGT...P2

P1....CGT**ATATATATATATAT**GGCA...
....GCA**TATATATATATATA**CCGT...P2

Výhody

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

Nevýhody

- finančně a technicky náročná identifikace
- nulové alely, homoplaze

Minisatelity (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

Randomly Amplified Polymorphic DNA;
Náhodně zmnožená polymorfní 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 náhodních fragmentů DNA

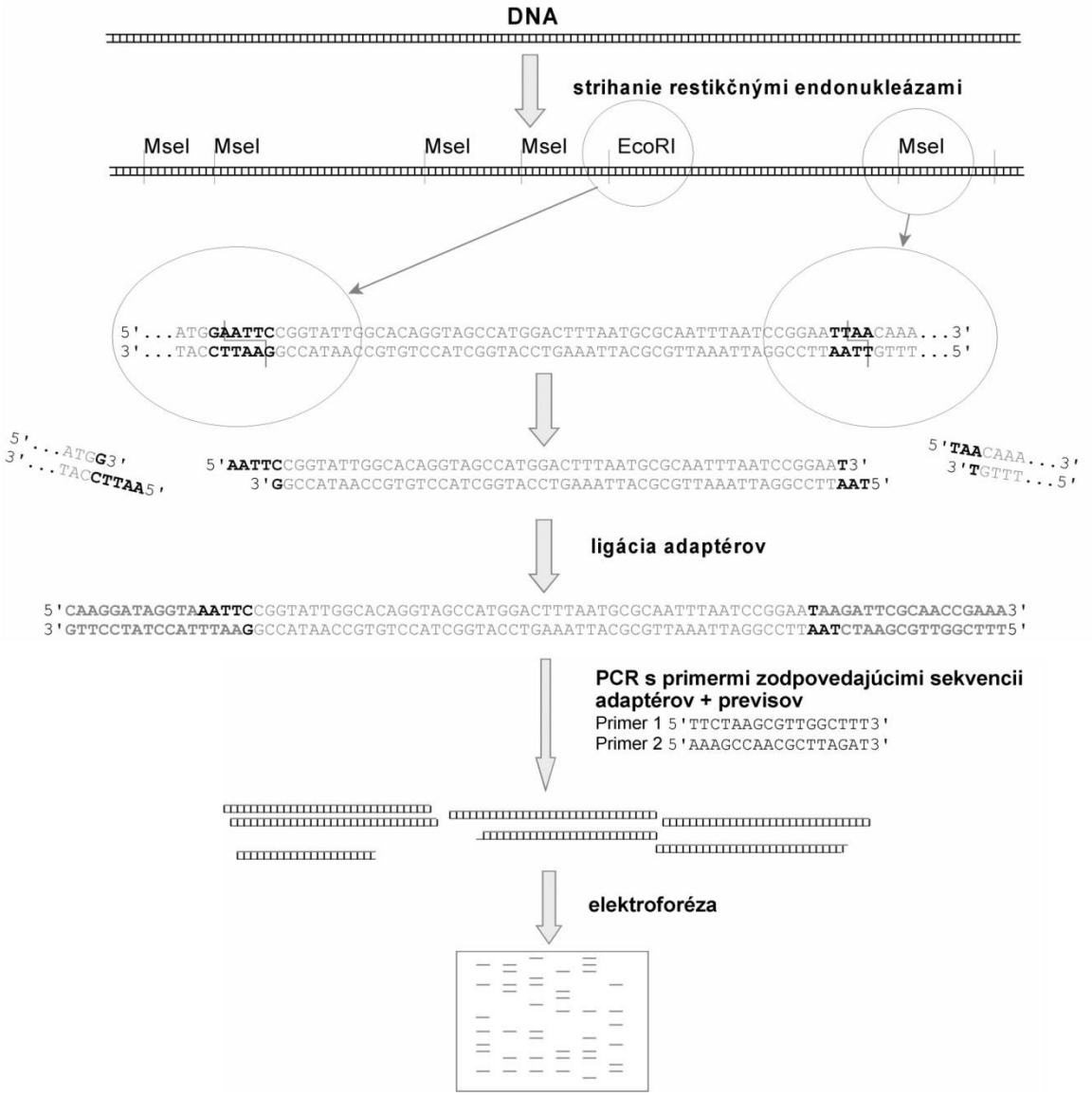
- štěpení restrikčnímy enzymy,vytvárejícími převis (často + zřídka stříhající)
- ligace adaptérů se známou sekvencí
- víc fragmentů
- PCR s primermi = adaptér + převis

Výhody

- nevyžaduje znalost sekvencí
- vyšší reprodukovatelnost ve srovnání s RAPD

Nevýhody

- dominantní markery
- technická obtížnost
- patentová ochrana


DNA
strihanie restikčnými endonukleázami
MseI
MseI
MseI
MseI
EcoRI
MseI
5'...ATGGAATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAATTAACAAA...3'
3'...TACCTTAAGGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTAATTGTTT...5'
5'...ATGG3'
3'...TACCTTAA5'
5'AATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAAT3'
3'GGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTAAT5'
5'TAACAAA...3'
3'TGTTT...5'
ligácia adaptérov
5'CAAGGATAGGTAAATTCCGGTATTGGCACAGGTAGCCATGGACTTTAATGCGCAATTTAATCCGGAATTAAGATTCGCAACCGAAA3'
3'GTTCCTATCCATTTAAGGCCATAACCGTGTCCATCGGTACCTGAAATTACGCGTTAAATTAGGCCTTAATCTAAGCGTTGGCTTT5'
PCR s primermi zodpovedajúcimi sekvencii adaptérov + previsov
Primer 1 5'TTCTAAGCGTTGGCTTT3'
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 jednořeťězcových fragmentů asymetrickou PCR (nadbytok jednoho primeru)
- denaturace 5 min 55 °C
- elektroforeza za konstantní teploty

Výhody

- kodominantní markery
- velký počet lokusů
- možnost automatizace

Nevýhody

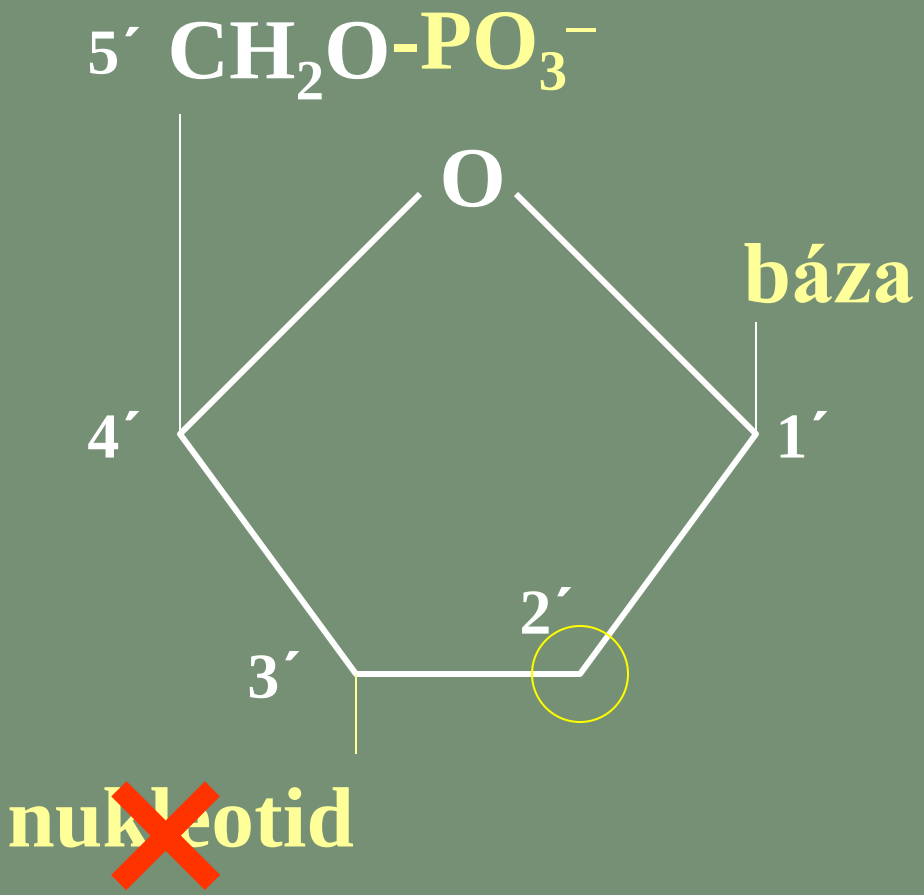
- bialelické markery
- polymorfizmus často špecifický pro jednu populaci
- technická obtížnost

Sekvenování DNA

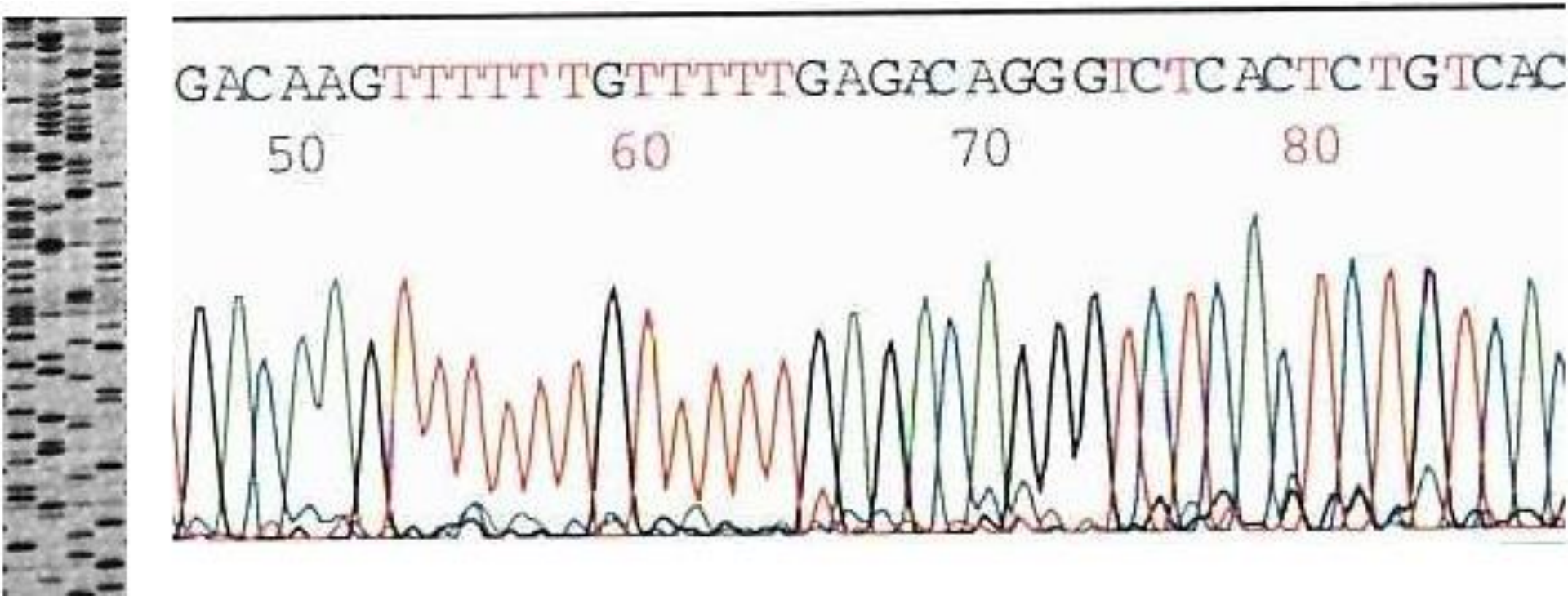
- PCR s rádioaktivně značenými 2´3´-dideoxynukleotidy
- elektroforeza
- autoradiografie

- PCR s neznačenými 2´3´-dideoxynukleotidmi
- elektroforeza
- barvení stříbrem

- PCR s fluorescenčně značenými 2´3´-dideoxynukleotidy
- elektroforeze v automatickém sekvenátoře
- vybudění barviva lejzrem


5´ CH2O-PO3–
O
báza
4´
1´
2´
3´
nukleotid

- PCR s rádioaktívně značenými 2´3´-dideoxynukleotidy
- elektroforeze
- autorádiografie



ESTP

Expressed Sequence Tag Polymorphisms
Polymorfizmus exprimovaných sekvencí

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

Hodnocení variability úseků DNA exprimovaných génů