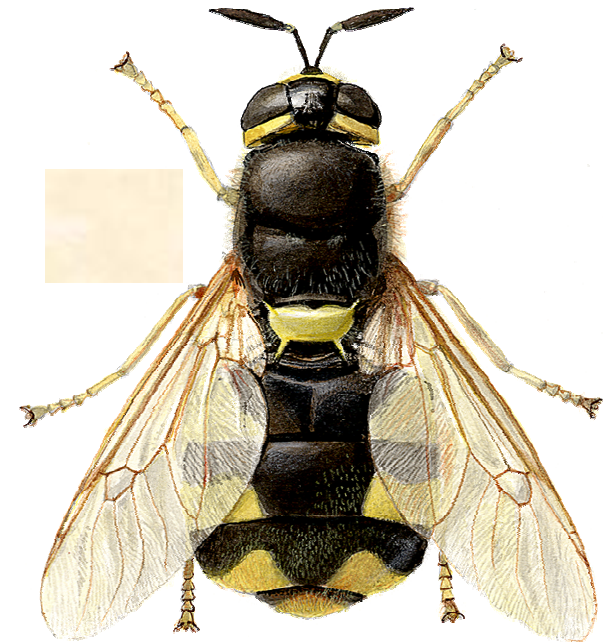
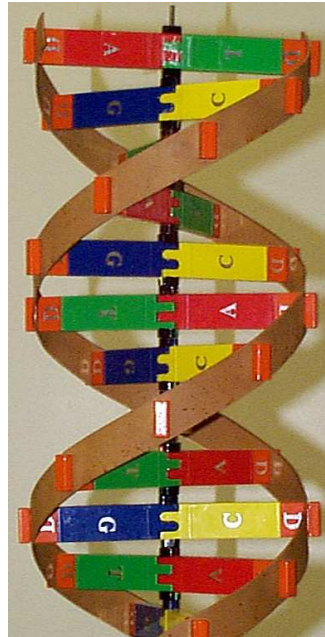
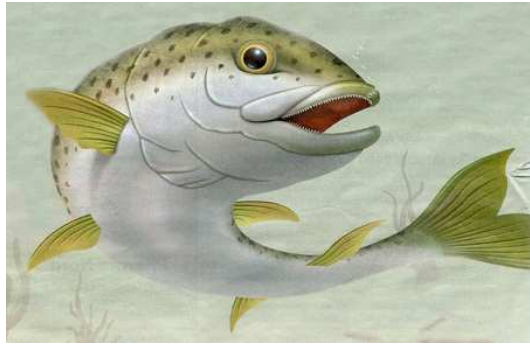


Molekulární taxonomie a fylogenetika I (metody aplikovatelné v molekulární taxonomii)



Andrea Tóthová

Elektroforeze proteinů

- Elektroforéze horizontální, vertikální, kapilárová

Prostředí pro elektroforézu – pufr s vysokou iontovou silou a pH co nejvíc odlišným od izoelektrického bodu zkoumaného proteinu (při pH pufru 8 – 9 má většina proteinů negativní náboj a migruje k anodě)

Základný předpoklad: změna v pohyblivosti proteinu je podmíněna změnami v sekvenci DNA

Vnitrodruhové studie – genetická proměnlivost v populacích

- genetická diferenciacce mezi populacemi
- genetická struktura populací
- vymezení druhů a hranic jejich areálu

Mezidruhové studie – rekonstrukce fylogenezy

- speciace a hybridné zóny

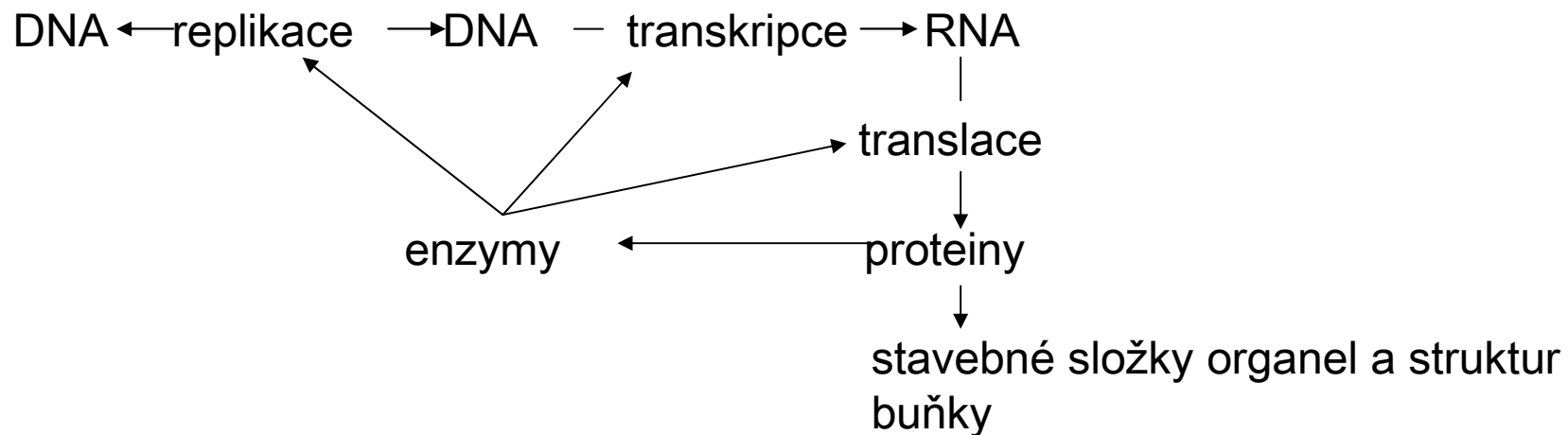
Omezení – detekovatelné jsou jen rozdíly, ne podobnosti

- rozdíly mohou být způsobeny posttranslačními modifikacemi
- použitelná jen úzka část genomu

Využití sekvencí nukleotidů – genetická informace

- o primární struktře polypeptidů (bílkovin),
- o primární struktře DNA nebo RNA

Funkčné vztahy mezi nukleovými kyselinami a proteiny





Atrichopogon sp.



Palpomyia sp.

Kolik najdete rozdílů?

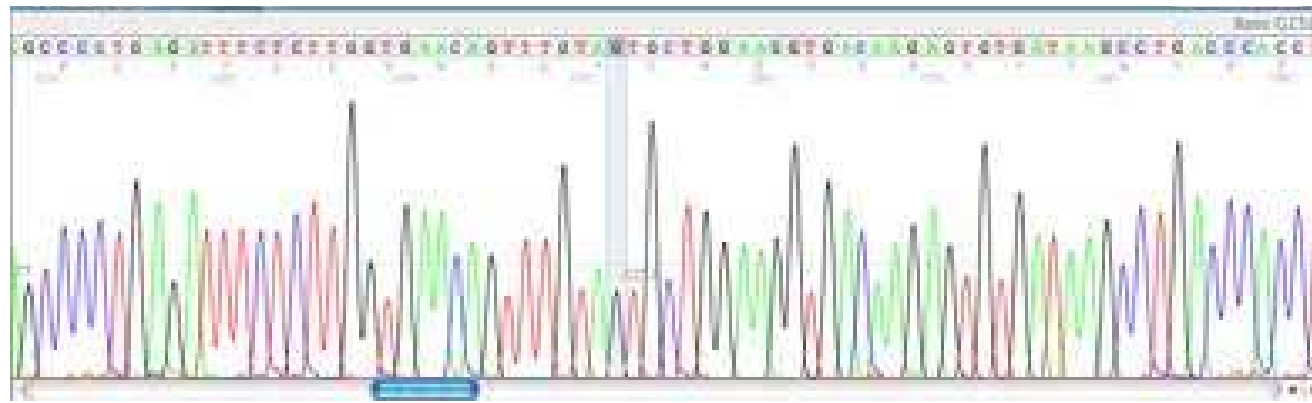


Tachina magnicornis

...a kolik tady???



Tachina fera



...TTAGTTCGAGAAAAATGTTGCGGTTACGTGCTGCATCTAAAGCCGATAAGAAATTTGCTGCCATTCTGGGGCAATTTGCTCGTAGCCATGCTGCCAAGGCTGCAAAGGCTGCAGCTGCCGAAATGAAAGA
TTGTGGCCGTAATTGGTGCAGTCGTCGATGTCCAGTTTGATGATAACTTACCGCCATTCTGAATGCCTTGGAAAGTAGACAACCGTTCTCCTCGGCTCGTGCTAGAGGTGGCCAGCACTTGGGAGAAAATAC
CGTGCCCACTATCGCCATGGATGGTACCGAAGGCTTGGTTCGCGGACAGAAGGTTCTCGATACTGGGTATCCTATCCGAATTCAGTTGGTGCCGAAACTAGGACGCATCATTAAATGTTATTTGGTAAGTAA
ATTATATTAACATAAGAAAGAAATTAAGAAATTTGAAACAGGTGAACCCATTGATGAGCGTGGACCAATTGATACAGACAAGACCGCTGCCATTATGCTGAGGCTCCTGAATTCGTTTCAGATGCTGTTGA
GCAAGAGATTCTGTCACTGGAATCAAAGTCGTCGATCTCCTGGCTCCATACGCCAAGGTGGTAAATTTGGTGTGTTGGAGGTGCCGGTGTGGGCAAACTGTGTTGATCATGGAGCTCATAACAACGTG
GCTAAAGCTCATGGTGGAATACTCGGTTTTCCGCGGAGTTGGTGAACGCACTCGTGAGGGAACGATTTATACAATGAGATGATCGAGGGTGGTGTATTTCACTAAAGGACAAGACCTCAAAGGTGGCTCTCG
TATATGGGCAATGAACGAGCCGCCAGGTGCTCGTGCCCGTGTGCTCTAACTGGAAGTACCGTTGCAGAGTACTCCGTGATCAAGAAGGACAGGATGTGTTGCTGTTTATCGACAACATTTCCGATTTACT
CAAGCTGGCTCAGAAGTGTCCGCTTTGTTGGTCTGATTTCCCTCAGCCGTCGGTTACCAGCCAACCTTGGCTACCGACATGGGTTCTATGCAGGAGCGTATTACCACCACCAAAAAGGGATCCATTACTTCTGT
TCAGGCCATATATGTCCCGCTGATGATTTGACCGATCCTGCTCCTGCTACTACATTGCTCATTGATGCCACCACTGACTCTCGCGTGCGATTGCCGAACTGGGTATTTACCTGCTGTGGATCCACTGG
ATTCGACTTCTCGAATCATGGATCCCAACATCATTGGCCAAGAACAATAACGTTGCCCGTGGTGTGCAGAAAATCTTGAAGACTACAAATCACTTCAGGATATAATAGCCATTCTCGGAATGGATGAGTTGT
CTGAGGAAGATAAGCTCACAGTCGCTCGTCTCGCAAGATTCAGCGTTTCTGTGCGCAGCCATTCCAAGTTGCTGAAGTCTTACCAGGCGATGCTGGTAAACTAGTGCCCTGGAGCAAATAAAAAGGTTTT
CAGCAATTCAGCTGGGACTACGACCATCTACCTGAAGTTGCTTTCTACATGCTCGGCCAATCGAAGAAGTTGTAGAAAAGGCTGACCGCCTGGCAAAGGAAGCTGCCTAGATAGGCGTACTGAAAAATC
TTCAAAGTCAGCAAATCTATCATTGAATTTATGCATTGAATTTGTAATAAATTTGTAAGATCAAATTAATTCATACAAGCGAAGAAAAAGTTAATAAAAACCTATTTAAACATTACGGTATGA...



Molekulární znaky mají oproti klasickým řadu výhod:

- Je jich libovolné množství
- Jsou vzájemně distinktní, kvalitativní, na sobě nezávislé
- Umožňují srovnávat i nepříbuzné organizmy
- Jsou selekčně neutrální



Základ všeho..



Nukleové kyseliny

DNA – objevená r. 1953 - James Watson, Francis Crick

Struktura: dvoušroubovice – pentózafosfátová kostra, na kterou jsou navázané dovnitř orientované purínové/pyrimidínové báze komplementárně spojené vodíkovými můstky

Purínové báze : A, G

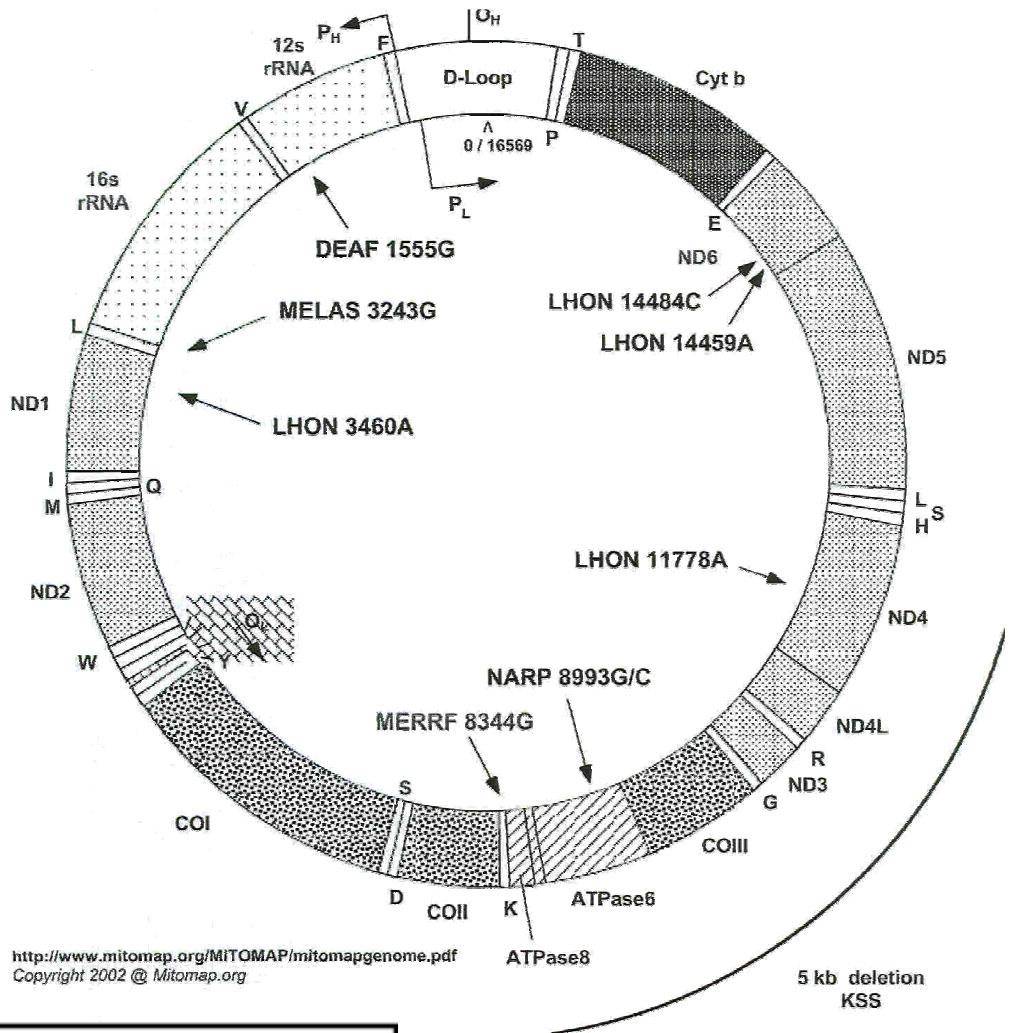
Pyrimidínové báze: C, T, U



- **Jaderná DNA**
- **Organelové NK**
 - **Mitochondriální, chloroplastová DNA**
 - vlastní kruhová DNA
 - mateřská dedičnost
 - molekulární evoluce mtDNA rychlejší než u jaderní DNA
 - **Ribozomální RNA**
 - LSU rRNA a SSU rRNA
 - evoluce LSU rRNA o 30% pomalejší jako SSU rRNA

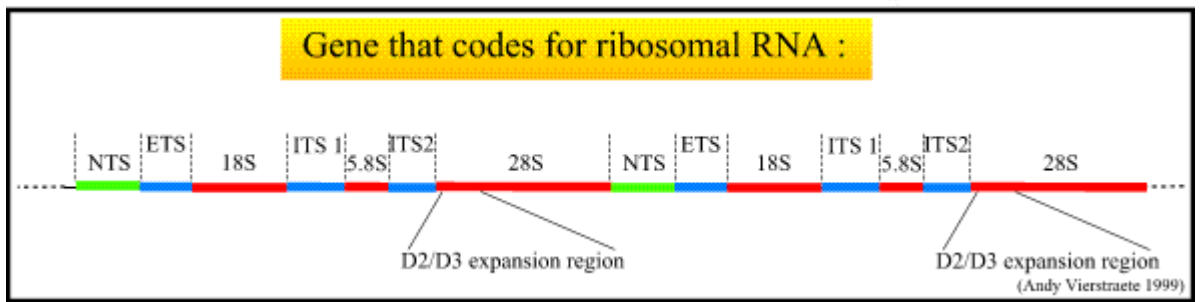
Type of DNA	Organism	size in base pairs
chromosomal DNA	mammals	6×10^9
	plants	$2 \times 10^8 - 2 \times 10^{11}$
	fungi	$2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$
mitochondrial DNA	animals	$16 \times 10^3 - 19 \times 10^3$
	higher plants	$150 \times 10^3 - 250 \times 10^4$
	fungi	$17 \times 10^3 - 78 \times 10^3$
	green alga	16×10^3
	protozoa	$22 \times 10^3 - 40 \times 10^3$
chloroplast DNA	higher plants	$120 \times 10^3 - 200 \times 10^3$
	green alga	180×10^3

mtDNA



<http://www.mitomap.org/MITOMAP/mitomapgenome.pdf>
 Copyright 2002 @ Mitomap.org

rRNA



Dva pohledy genomiky

- Vertikální: kompletné genomy, hluboké, ale omezené informace
 - několik druhů a jedinců
 - úspěšně ukončeno u člověka, Drosophily a některých plodin
- Horizontální: krátké cílené sekvence, plytké, ale široké informace
 - mnoho druhů a jedinců
 - např. DNA barcoding

Historické výzvy

- Problémy s konceptem druhu a jeho aplikacemi
- Problémy s druhovou identifikací
- Systém znaků – morfologie, genetika, atd.
- Přístup k existujícím informacím
- Snižování odbornosti
- Snižování dostupných služeb
- Genomika a Internet nabízí nové možnosti

Základné metody

- Štěpení NK
- Polymerase chain reaction
- Proby, hybridizace
- Vektory, molekulární klonování
- Microarrays
- DNA sequencing
- Elektroforetická separace NK

- Detekce genů:
 - *DNA: Southern blotting; inSitu hybridization; FISH
Technique
 - *RNA: Northern blotting
 - *Protein: Western blotting, immunohistochemistry

K purifikaci (extrakci) nukleových kyselin může být jako vstupní materiál použit:

- krev
- tkáň
- bakterie
- houby
- živočišné buňky
- rostliné buňky
- exkrementy, vývržky
- agarózové gely



Výběr použité techniky závisí pouze na nás...

- typ vstupného materiálu
- očekávaný výtěžek
- věk vzorků
- čas
- finance
- požadovaná kvalita

Všeobecný postup extrakce:

1. Digesce tkáně / lyze buněk
2. „chelátování“ a proteinázová fáze
3. Separace NK a proteinů
4. Pročištění

Odběr tkáně k získání NK

Odebrání tkáně – živý nebo usmrcený organismus



Přenos tkáně na parafilm a následné zjištění hmotnosti na analytických váhách



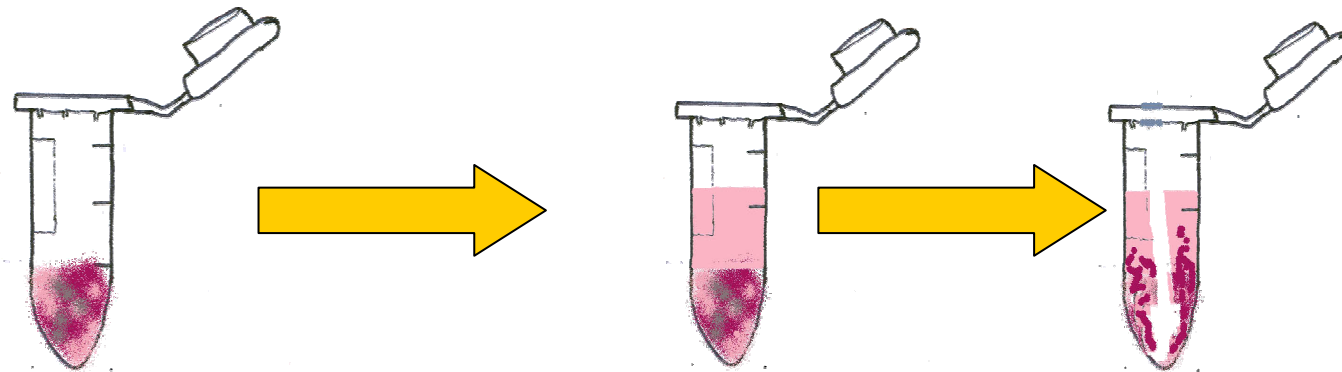
RNA

Přenos sleziny do 1,5ml mikrozskumavek

Přidání Trizolu

Homogenizace sleziny

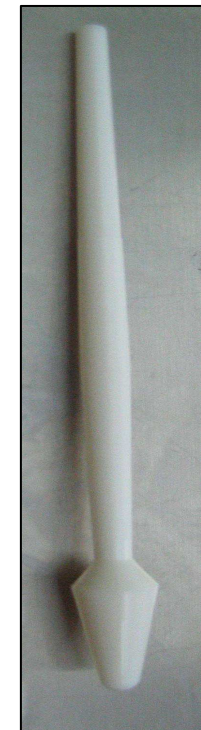
Skladování homogenizované sleziny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$



TRIZOL® Reagent

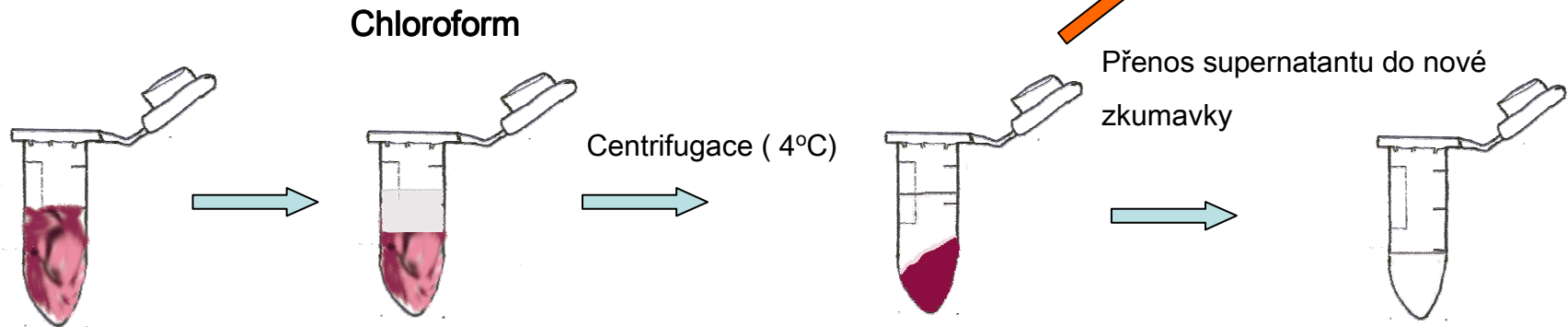
(Invitrogen) -

- monofázický roztok fenolu a guanidin izothiocyantu
- zlepšení prvního kroku metody izolace RNA vyvinuté Chomczynskim a Sacchim
- počas homogenizace vzorky udržuje integritu RNA



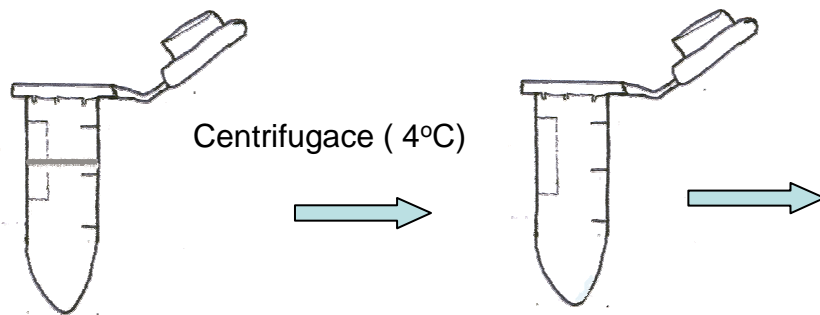
Extrakce RNA

Fáze separace:



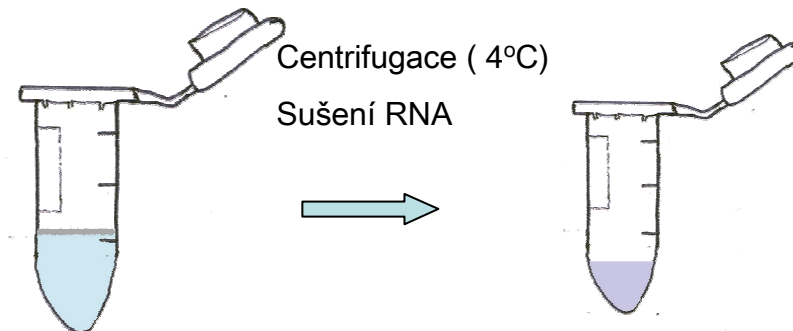
Fáze precipitace:

Isopropanol



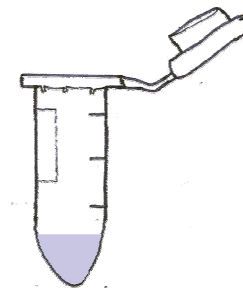
Promývání RNA:

75 % etanol



Znovurozpuštění RNA

RNA -free voda



Extrakce DNA

DNA – fixace v 70% nebo 90% EtOH

- Přenos tkáně do extrakčního pufru (Tris, EDTA, NaCl)
- Přidání Proteinázy K a SDS – odštěpují proteiny okolo DNA
- inkubace při 55-65°C počas několik hodin – degradace tkáně

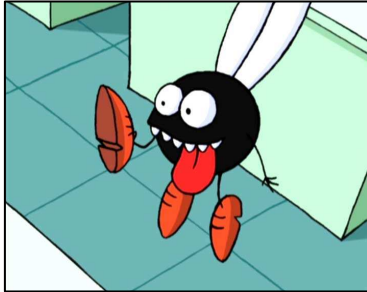
Fáze separace: phenol: chloroform: isoamylalcohol, chloroform
isoamylalcohol - odstanění organické fáze, bifenolů

Fáze precipitace: NaAc + EtOH 90%

Fáze promývání: EtOH 70%

Fáze rozpuštění: DNA free voda nebo pufr

Extrakce hmyzí DNA



Hmyz – Insecta – kutikula z chitinu

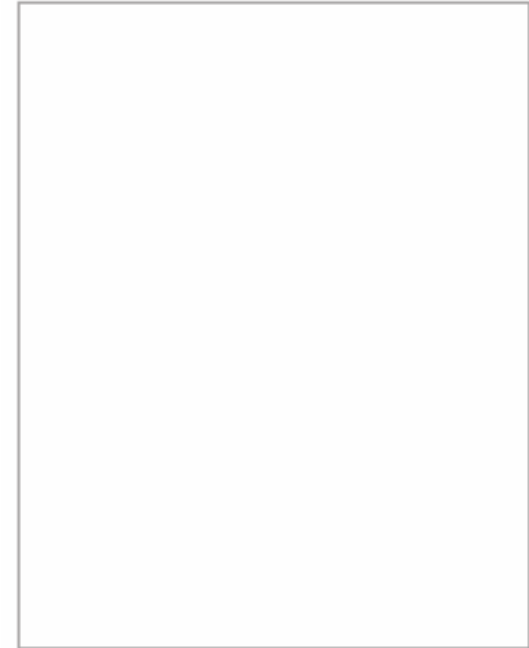
Nevhodná fixace materiálu – formalín

Klíčový krok extrakce – naborání exoskeletu

Několik způsobů:

fenol-chloroformová metoda – možno využít PLG zkumavky
výhody, nevýhody

extrakce pomocí komerčního kitu (Qiagen, Machery-Nagel, etc.)



PCR: Amplifikace DNA

- Často je k dispozici jen malé množství DNA
 - kapka krve
 - Vzácný typ buněk
- V současnosti existují dvě metody pro amplifikaci DNA nebo tvorbu kopií
 - Klonování—trvá dlouho, než dostatek klonů dosáhne požadovaného stupně kvality
 - PCR—funguje dokonce i na jediné buňce hned

PCR (polymerase chain reaction)

- polymerázová řetězová reakce umožňuje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA prakticky v neomezeném množství, přičemž množství původního vzorku DNA může být extrémě malé.

Historie PCR:

- 1955- objev TAQ DNA polymerázy - první myšlenky o možnosti umělé syntéze DNA
- 80. roky- rozvoj umělé syntéze oligonukleotidů
- 1983- Kary Mullis - princip metody
- 1984- Kary Mullis, Fred Faloon - dokončení metody a patentování
- 1993- Kary Mullis - Nobelova cena za chemii

Je život fair?

- 1983 - Kary Mullis, vědec pracující pro Cetus Corporation řídil podél US Route 101 v severní Californii, když ho napadla myšlenka polymerázové řetězové reakce
- 1985 - metoda PCR byla představena vědecké komunitě na kongresu

- Cetus odměnil Karyho Mullise \$10,000 bonusem za jeho nápad
- později, počas korporátní reorganizace Cetus prodává patent na PCR farmaceutické firmě Hoffmann-LaRoche za \$300 millionů

Život není fair!

RT-PCR (v případě práce s RNA)

RT-PCR: (reverse transcription polymerase chain reaction); PCR reverzná je určena k amplifikaci molekul RNA, která sa nejdřív přepíše enzymem reverzní transkriptázou do cDNA a ta sa pak amplifikuje standardním postupem (PCR):

Obsah mixu pro RT-PCR:

1.

-kvalitní redestilovanú voda

-Oligo(dT)- používá se při syntézách reverzní transkriptázou prvního řetězce cDNA

-dNTP

-RNA

Široké použití, hlavně k velmi přesné detekci a kvantifikaci konkrétní mRNA v různých tkáních

2.

-RT5X

-DTT(dithiothreitol;
Cleland's reagent)

-RNase OUT

3.

M-MLV RT –(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)-RNA závislá DNA polymeráza, používá se při syntéze cDNA použitím RNA jako templátu

Primery a PCR

Design vhodného primeru – specifický na různých úrovních, návrh podle sekvence z GenBanku, úprava vlastností vhodným SW (Oligo, GeneRunner)

PCR – namnožení požadovaného úseku DNA, ovlivňována mnohými faktory (kvalita DNA, T_m , kvalita primerů, koncentrace Mg^{2+} , přítomnost inhibitorů, typ eppendorfky, typ polymerázy – TAQ (*Thermus aquaticus*), Pfu (*Pyrococcus furiosus*))

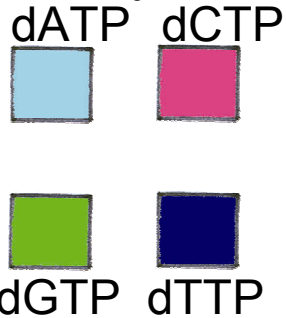
Volba primerů:

1. Délka 17-25 bází
2. Sekvence primerů co nejvíc shodná se sekvencí templátu v místě jejich vazby
3. **Pozor!!!** -sekvenční komplementarita uvnitř primerů
-neměli by být komplementární mezi sebou
4. Optimální obsah C-G bází se doporučuje 50-60%

Co potřebuje PCR?

- Templát (DNA, kterou testujeme)
- Specifické primery pro studovanou oblast, forward a reverz
- Polymeráza
- Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Magnesium chloride (enzyme cofactor)
- Buffer
- Enhancer
- Vysoce kvalitní DNA-free voda, minerální olej

dNTP: směs všech čtyř nukleotidů



- nižší koncentrace dNTP= vyšší specifita, nižší frekvence začlenění nesprávného nukleotidu

MgCl₂:

-správná funkce polymerázy, příliš vysoká koncentrace → aktivita Taq polymerázy klesá, proužky na gelu jsou rozmazané nebo zmnožené následkem amplifikace nespecifických fragmentů

-koncentrace vyšší než konc. dNTP

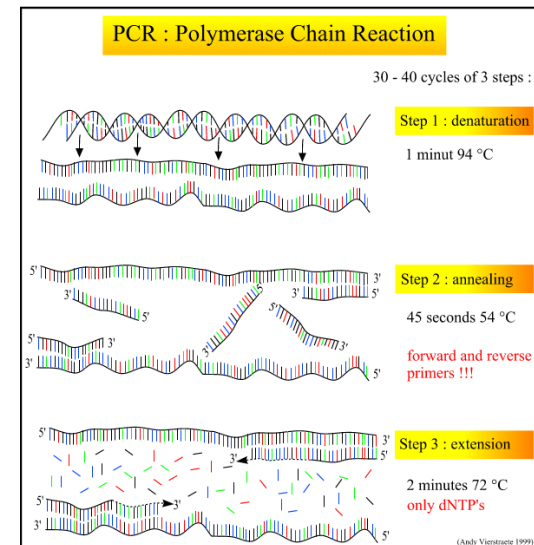
Kroky PCR

- Denaturace 93 - 95°C 1min
- Annealing 50 - 55°C 45sec
- Elongace 70 - 75°C 1-2min

Jak tedy probíhá PCR?

- Horko (94°C) k denaturaci DNA dvouvláken
- Zchlazení (54°C) k přisednutí primerů k templátu
- Teplo (72°C) k aktivaci *Taq* Polymerázy, která prodlužuje primery a replikuje DNA

- Opakování cyklu



PCR Primery

Primer je úsek NK, který slouží jako startovací místo replikace

Je potřeba mít jak forwardní, tak reverzní primer, aby byla cílová sekvence tvořena simultánně v obou směrech

Problémy s primery

- Primery by měly ohraničovat cílovou část DNA sekvenci
- Primery, které jsou komplementární k více místům, budou tvořit víc produktů
- Primer může tvořit dimér se sebou nebo s druhým primerem

5'-ACCGGTAGCCACGAATTCGT-3'

|||||||

3'-

TGCTTAAGCACCGATGGCCA-5'

Limitace PCR

- Jsou potřebné informace o cílové sekvenci design primerů pro neznámé známé hraničné oblasti

Chybovost při DNA replikaci

Taq Pol – Error 40% po 20 cyklech

- Krátka délka a omezené množství produktu
do 5kb je lehký amplifikovatelný produkt .
do 40kb je amplifikace s modifikacema možná
nelze amplifikovat geny >100kb
nelze použít v projektech sekvenování genomu

Design PCR primerů

- Sekvence primerů by měly být unikátní
- Sekvence primerů by měly být ~20 bází dlouhé
- Obsah G/C by měl být 45–55%.
- Annealingová teplota by měla být podobná
- Na 3'-konci by měly být G nebo C.
- Nesmí mít self-komplementární oblasti nebo vytvářet hairpiny
- Nesmí mít repetitivní oblasti

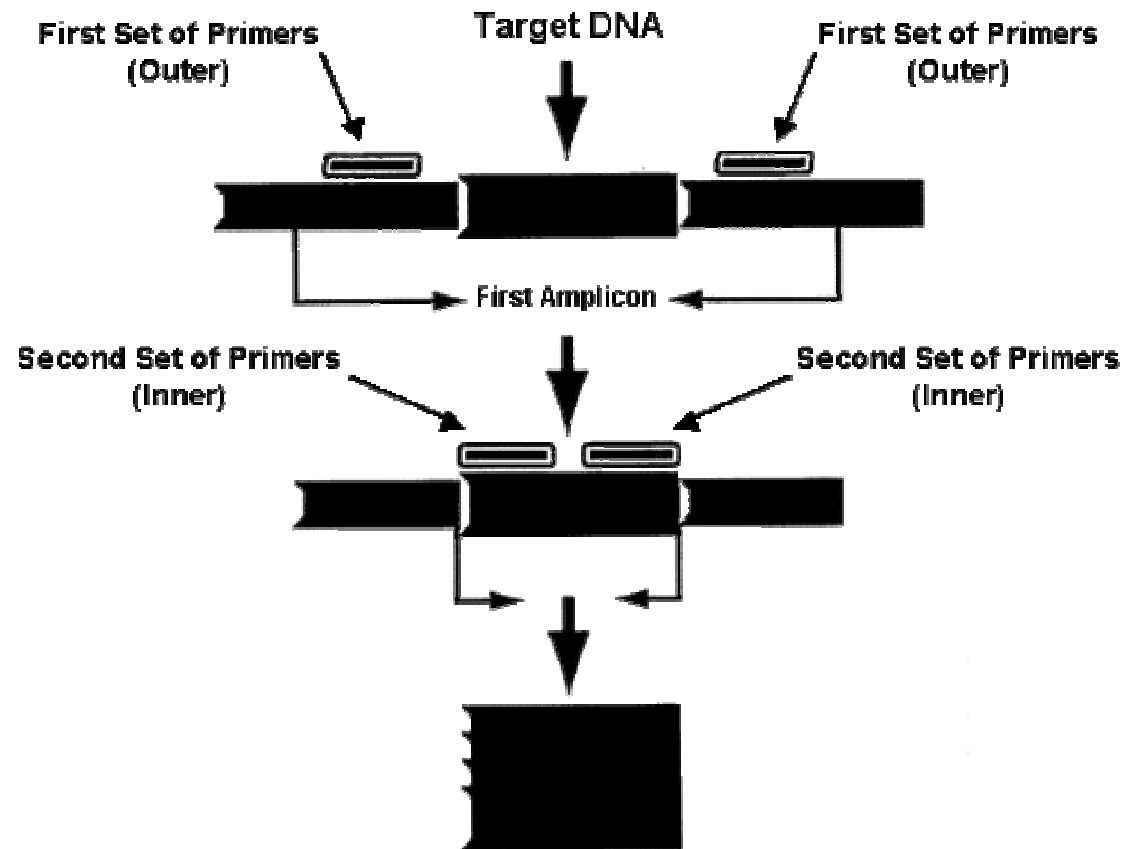
Výhody PCR

- Rychlost
- Snadné použití
- Citlivost
- Robustnost



Typy PCR reakce

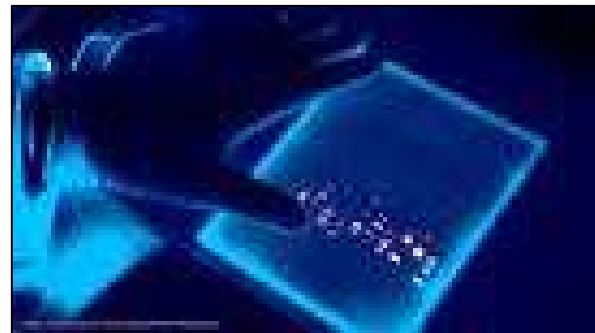
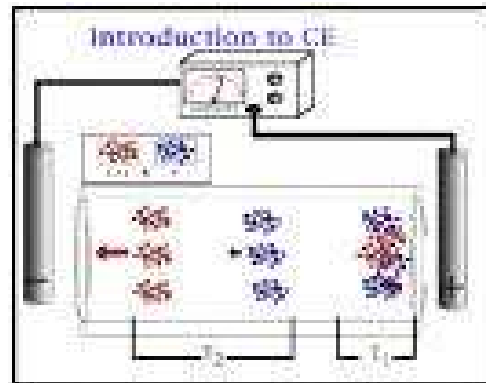
RT-PCR
„Nested“ PCR
Inverzní PCR
Multiplex PCR
Asymetrická PCR
RAPD PCR



Specific Amplification of the Target DNA

Vizualizace produktů v agarózovém gelu a purifikace PCR produktů

Agaróza
Pufr (TBE, TAE)
Etidium bromid
Nanášecí barva
(brómfenolová modř)



Horizontální elektroforéza

Kontrola výsledků po PCR:

- agarózový gél: agaróza- přírodní koloid extrahovaný z mořských řas
- pufr TBE- Tris-Borát-EDTA
- mikrovlnka



1. odměření agarózy



2. rozpuštění agarózy v TBE



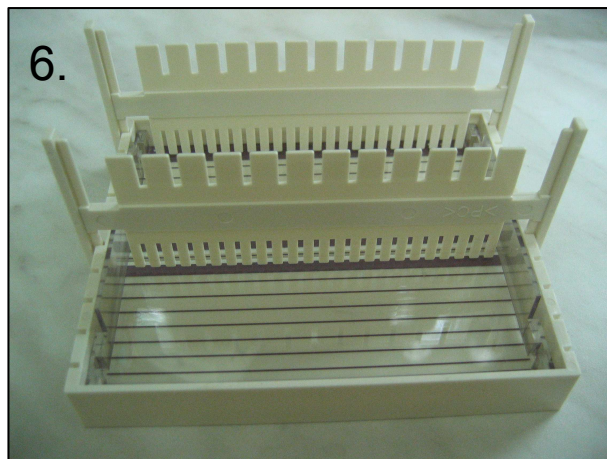
3. Povaření roztoku

4. Ochlazení roztoku agarózy na 55 °C

5. Fluorescenční barvivo EtBr! - silně mutagen
rukavice, 0,5µb/ml
- dochází k jeho implementaci do DNA

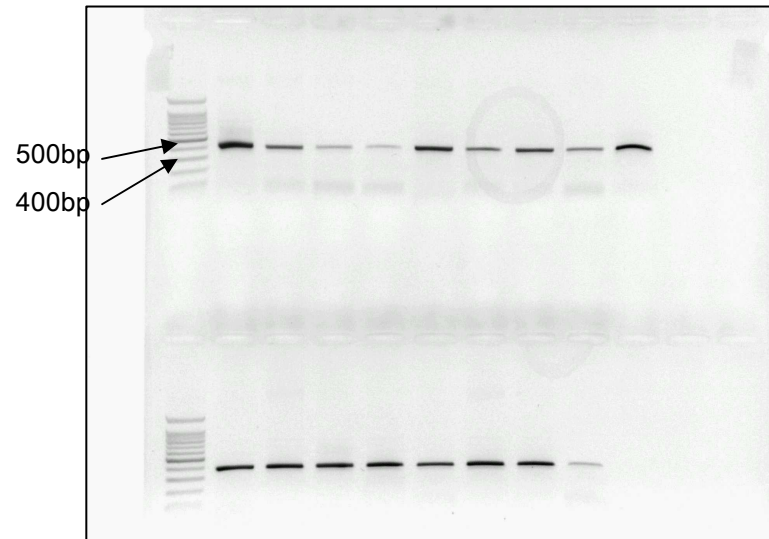
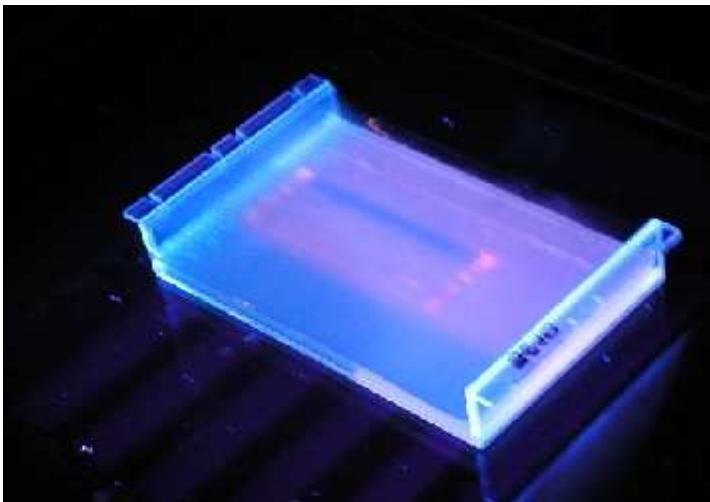
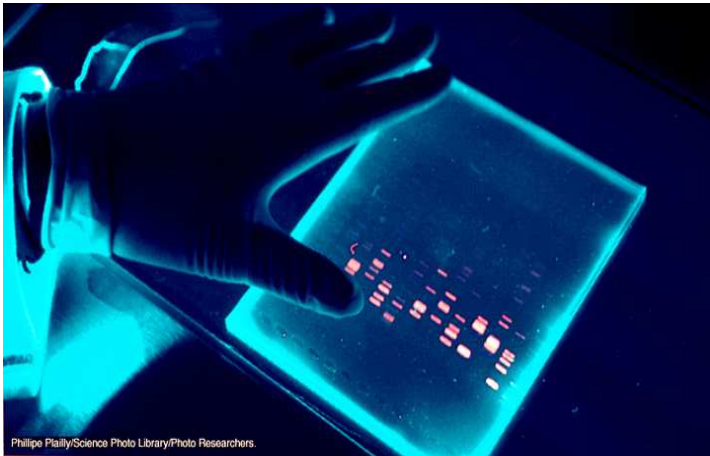
6. plastová forma na gél a hřeben: 30 min.

7. nanášecí pufr: obsahující barvivo
(brómfenolová modř) a glycerol (napomáhá
rychlejšímu klesání vzorku na dno jamky)

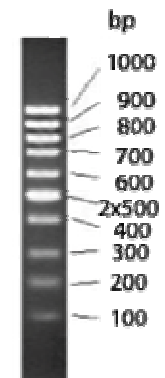


8. ladder- standard nebo „žebřík“, směs fragmentů známé délky

9. kontrola amplifikovaných fragmentů v UV světle pomocí transilluminátoru a dokumentace kamerou nebo digitálním fotoaparátem



100 bp Ladder



Purifikace PCR produktů – QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen), ExoSap, ethanolové pročištění

Po potvrzení pozitivního PCR vzorku – 1. přímé sekvenování produktu

2. klonování produktu do hostitel. vektora a jeho následné sekvenování použitím univerzálních primerů

Klonování DNA

Základné pojmy a principy klonování:

Klonování: proces tvorby klonů DNA vložením segmentu DNA do klonovacího vektoru za vzniku rekombinantní molekuly DNA a jejím následním pomnožením v hostitelském organizmu

Klon DNA: soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA

Klonovací vektor: nejčastěji se používají kruhové molekuly DNA schopné autonómní replikace, odvozené v našem případě z plazmidů= plazmidové vektory.

Vlastnosti vektorov:

- malá velikost, lehce se izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií
- schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci a uchování klonů
- schopnost lehkého a účinného přenosu do hostitelských buněk
- přítomnost selekčního markru (např. geny odpovědné za rezistenci na antibiotika)
- přítomnost vhodných klonovacích míst

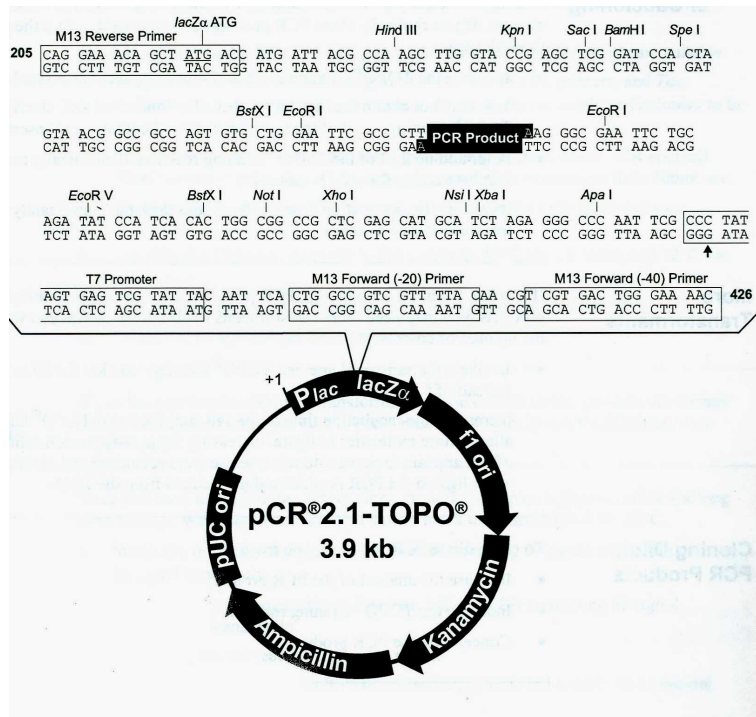
Přenos plazmidového vektoru do hostitelských buněk:

-transformace

-hostitelem plazmidových vektorů jsou buňky kmenů *E. coli*

Určení bakteriálních kolonií obsahujících rekombinantné plazmidy: - Alfa-komplementace

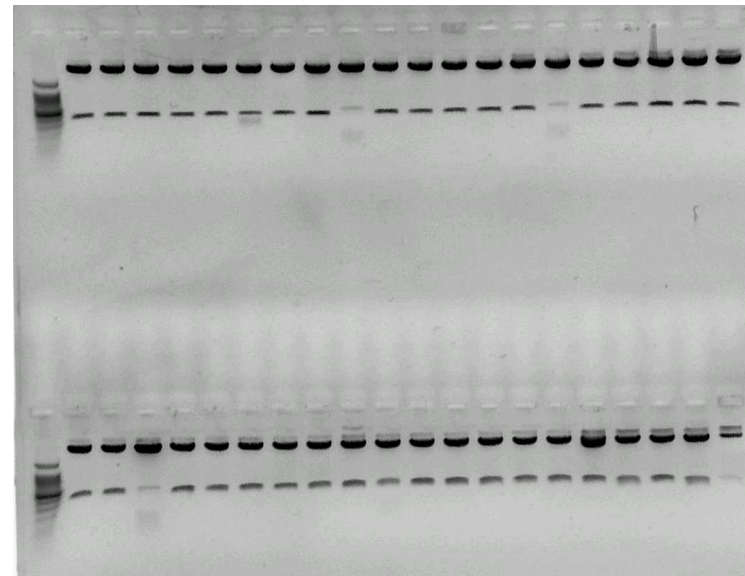
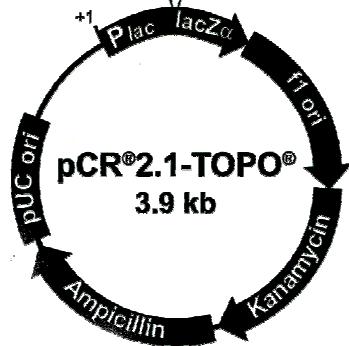
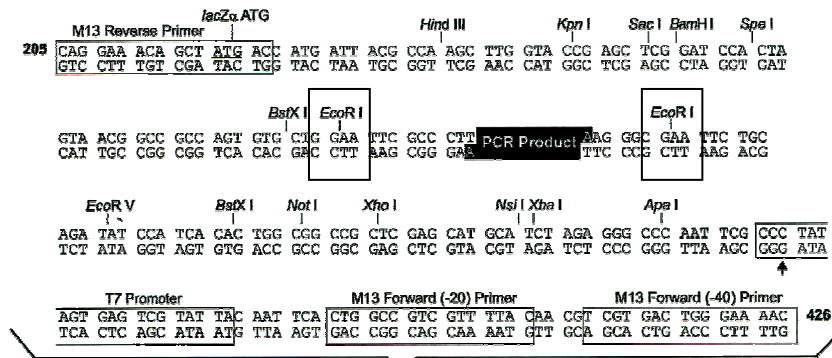
Mapa klonovacího vektoru:



Bílé kolonie bakteriálních buněk s včleněným rekombinantním plazmidem

Modré kolonie bakteriálních buněk bez inzertu. Tvorba aktivní β -galaktozidázy rozkladající chromogenný substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktozid)

Kontrola: štěpení enzymy (napr. Eco R1) a elektroforeze



Sekvenování DNA

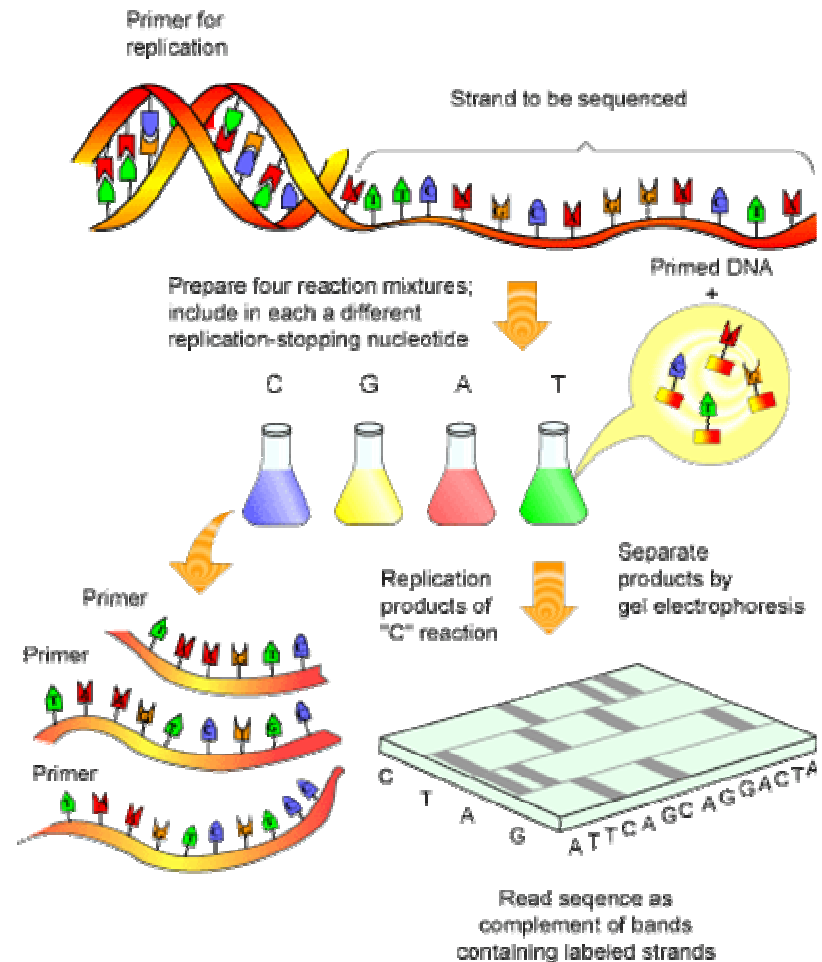
- od roku 1977

1. Chemická metoda (Maxam-Gillbertova)

- bázově specifická chemická modifikace + následné štěpení fragmentů DNA

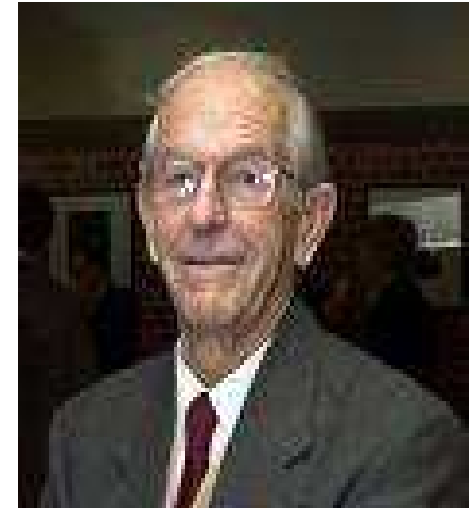
2. Enzymatická (Sangerova)

- terminace replikace nového řetězce podle matrice zkoumané sekvence ddNTP (na 3' uhlíku deoxyribózy chybí OH skupina)



SANGEROVA metoda

- Nejpoužívanější způsob sekvenování
- Objeveno Frederickem Sangerem - 1977
- Nobelova cena - 1980



Nahrazení radioaktivního značení fluorescenčními barvičkami

- Oligo – hybridizační sondy
- Radioaktivní nuklidy: ^3H , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I
- Detekce záření na scintilačním fotometru nebo autoradiografií na RTG filmu
- 3' i 5', celé fragmenty: DNA I pol, Klenowův fragment, T4 DNA pol, T4 polynukleotid kináza, alkalická fosfatáza (BAP, CIP)

- Fluorochromy – široké spektrum a využití v biologii
- 6-FAM, NED, PET, ROX, HEX, VIC, JOE, LIZ, BigDyes
- Detekce fluorescenčního záření: laser + indukční a emisní spektrum fluorochromu – excitace fluorochromu – detekce přes optický systém (CCD kamera; vzduchem chlazený CCD čip) – virtuální filtrování – vlnová délka se odečítá pouze v oblasti spektrálního maxima
- Ovlivnění mobility fragmentů



ABI PRISM®
310 Genetic

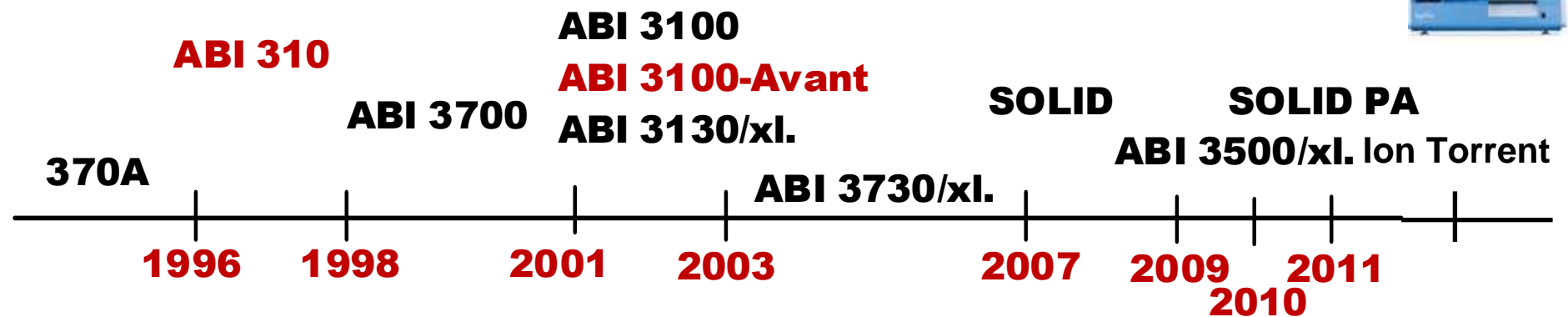
Applied Biosystems
3130 Genetic Analyzer

Applied Biosystems
3130xl Genetic Analyzer

Applied Biosystems
3730 DNA Analyzer

Applied Biosystems
3730xl DNA Analyzer

Key applications: *De novo* sequencing • Resequencing • Mutation/heterozygote detection
 SNP genotyping • Relative fluorescent quantitation • Microsatellite analysis • AFLP® analysis
 Methylation analysis • T-RFLP analysis • MLST • BAC fingerprinting • SAGE™

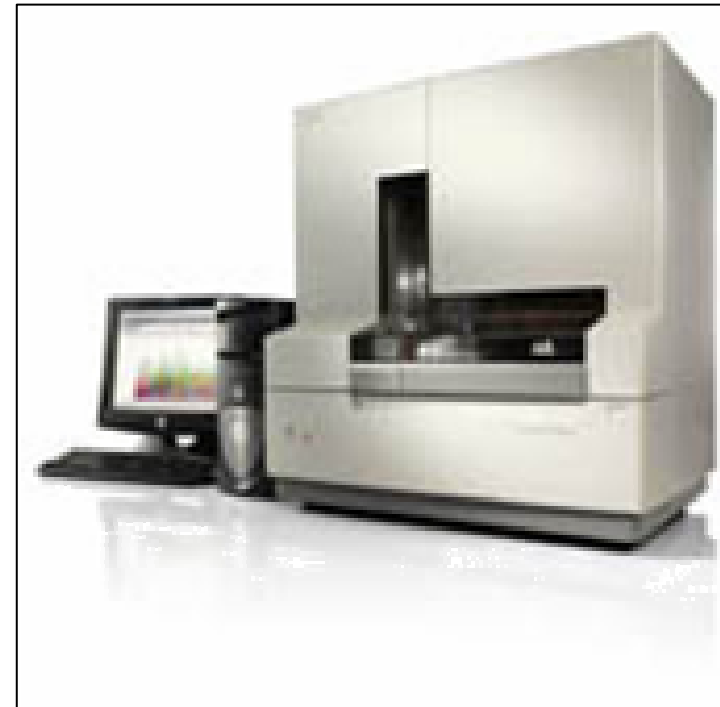


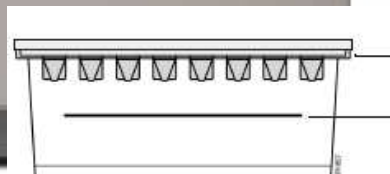
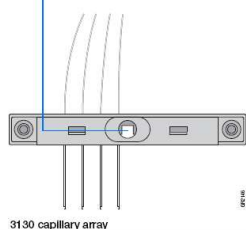
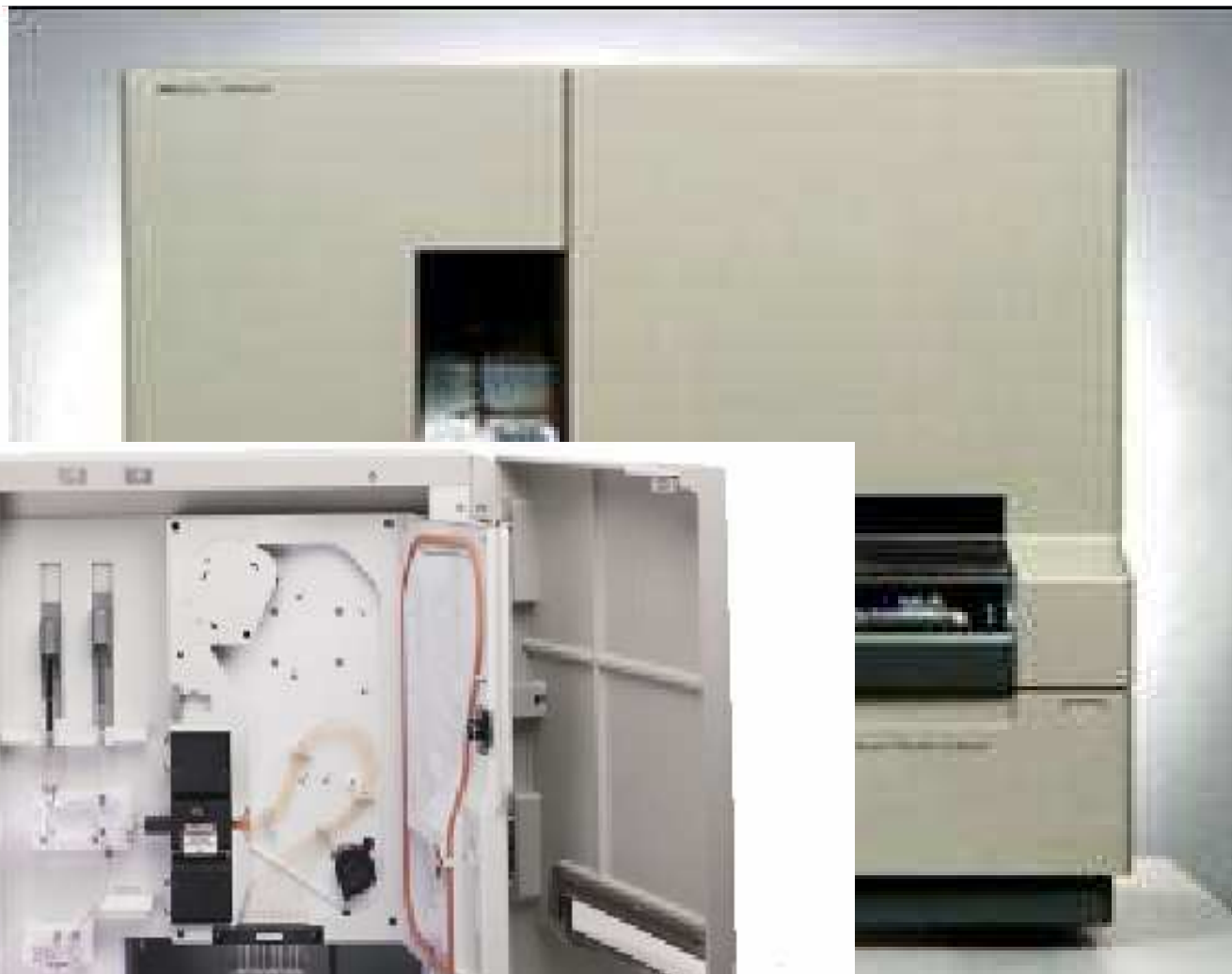
Sekvenování DNA

Automatické sekvenování DNA –

sekvenátor

- Modifikace Sangerovy metody
- Syntéza DNA probíhá metodou asymetrické PCR v termocykleru s využitím Taq-polymerázy
- Ke značení reakčních produktů se používají fluorescenčně značené primery nebo ddNTPs (odlišné barviva pro NTP) – rozdělení v jedné dráze gelu
- Detekce produktů – elektrická separace automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač (elektroforetická separace v kapilárách)





Zpracování sekvenačních dat

Manuální korekce sekvencí - Sequencher 5 (Gene Codes Corp.)

„Zalinení“ sekvencí – NCBI BLAST, ED program v MUST package (Philippe, 1993), Clustal W v BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999)

Fylogenetická analýza – MEGA 5 (Tamura et al., 2011)

PAUP* 4b10 (Swofford, 2001)

```
ATGCGTCGTT
|||||
ATGCGTCGT
```

```
ATG - - - CGTCGTT
|||      |||
ATGCGTCGT
```

```
ATGCGTCGTT
|| |||| |
ATCCGTCAT
```



MEGA v. 5

– úprava sekvencí (alignment)



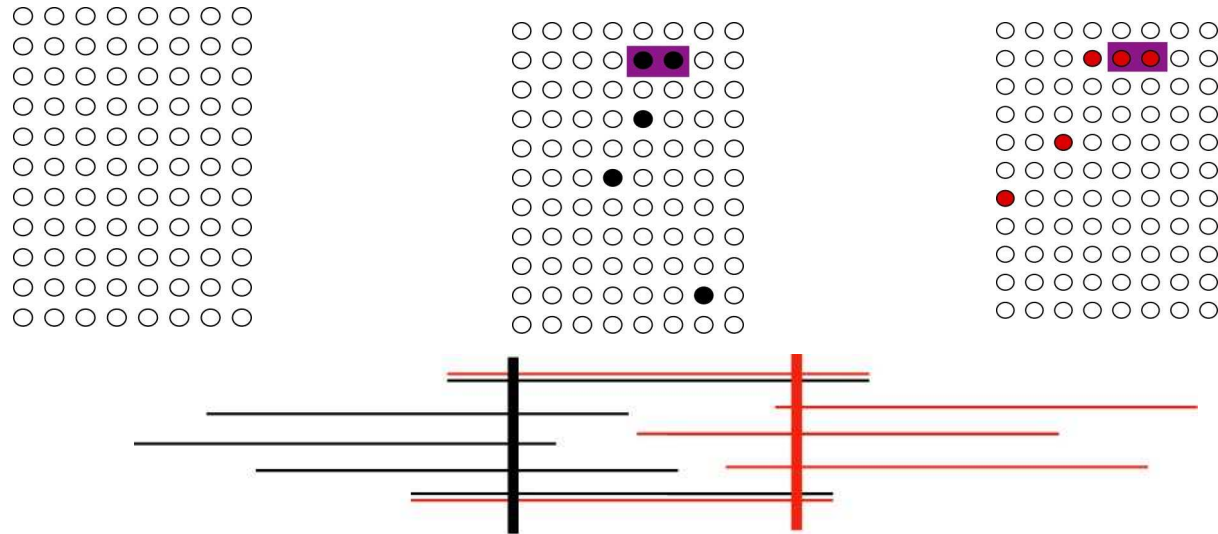
Další metody založené na NK

- **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**
 - náhodně zvolené primery, nízká teplota zchlazení
 - DNA → mnoho segmentů (na elfo – soubor druhově specifických proužků)
 - příbuzné vztahy mezi populacemi jednoho druhu nebo mezi blízce příbuznými druhy

Nevýhoda – velmi nízká opakovatelnost experimentů

- **Hybridizace DNA**
 - Zahřátí DNA – 2 samostatné řetězce
 - Ochlazení – vznik dvouzávitnice
 - Opakované zahřátí – rozpletení DNA – teplota, u které se rozplete 50% hybridizované DNA
 - Vyhledávání a charakterizace specifických nukleotidových sekvencí, porovnání DNA dvou druhů za pomoci hybridních úseků

- Východiskový krok – příprava hybridizační sondy
- jednořetězcová, radioaktivně nebo chemicky značená DNA nebo RNA sekvence vážoucí se komplementárně k cílové sekvenci



Restrikční analýzy – RFLP, DNA fingerprinting

Tvorba restrikčních map – zjištění polohy restrikčních míst na DNA

V zoologických výzkumech je namísto polohy restrikčních míst upřednostňována informace o délce restrikčních fragmentů

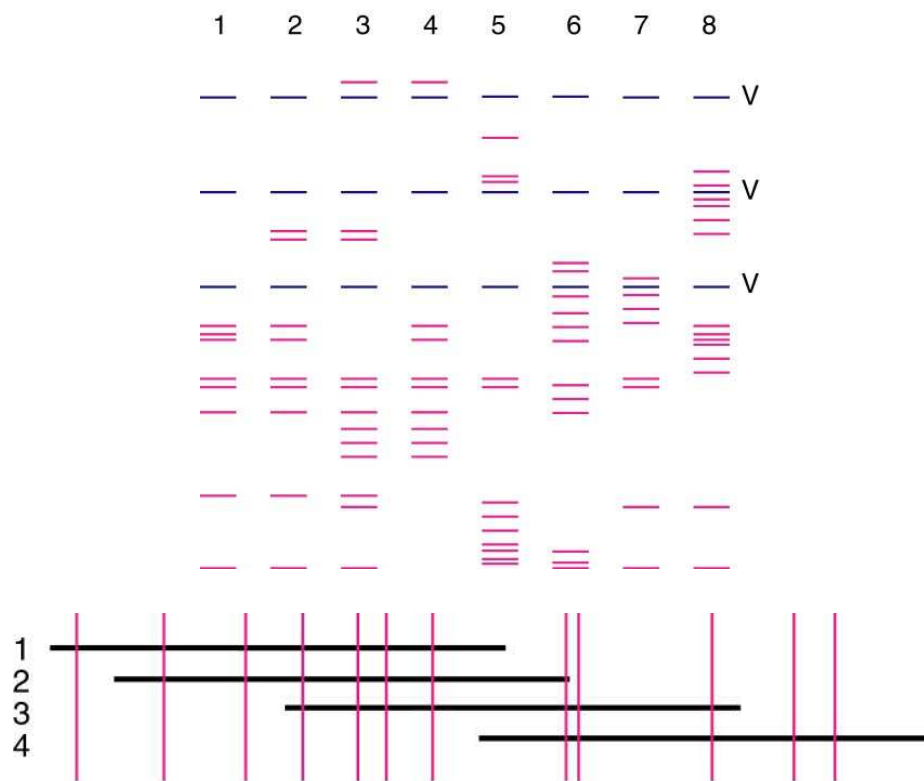
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)
 - restrikční endonukleázy
 - organelová DNA → fragmenty
 - porovnání geneticky totožných a odlišných jedinců na základě proměnlivosti velikostí restrikčních fragmentů

Otisk DNA (fingerprinting)

- analýza restrikčních fragmentů tzv. minisatelitní DNA

Princip – Southern blotting a hybridizace se značenou sondou

- analýzy na úrovni vnitropopulační, mezipopulační a mezidruhové



Analýza mikrosatelitů

Mikrosatelity – krátké tandemovitě se opakující jednoduché sekvenční motivy, 2-6bp

- výskyt ve všech genomech
- vysoká mutační rychlost

Analýza: PCR, 20-30 cyklů, primery komplementární se sekvencí kolem mikrosatelitového lokusu
automatický sekvenátor s fluorescenčně značenými primery – finančně nákladné

Použití: genotypování jedinců, určování paternity, velikosti a struktury populace, genetická proměnlivost, tok genů
specifické mikrosatelity: identifikace populací a druhů, dynamika hybridních zón