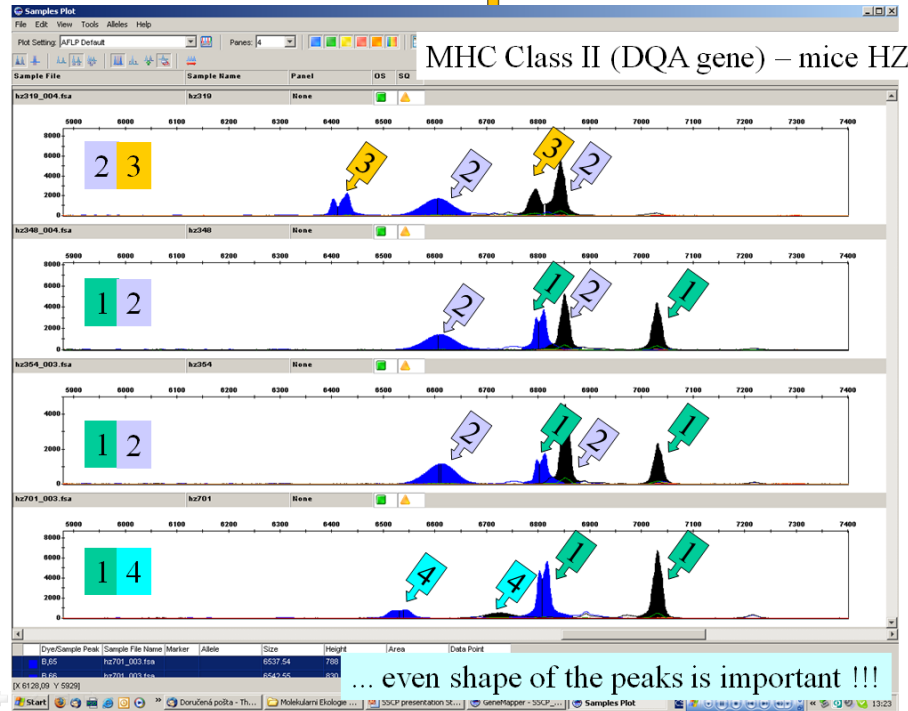
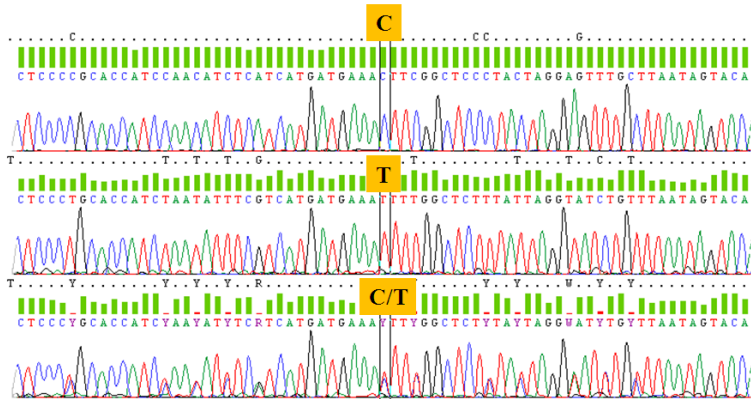


SNPs genotyping - sekvenování? Je drahé a nejasné u heterozygotů

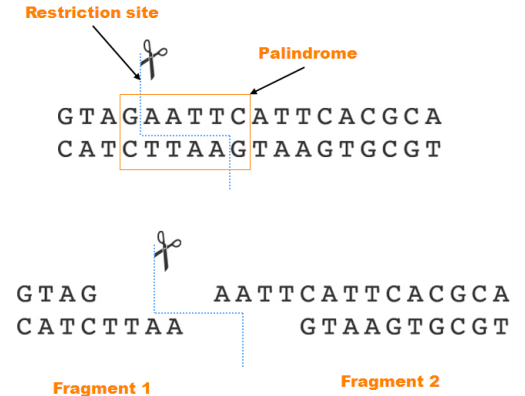


SNP genotyping - old standards

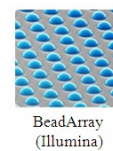
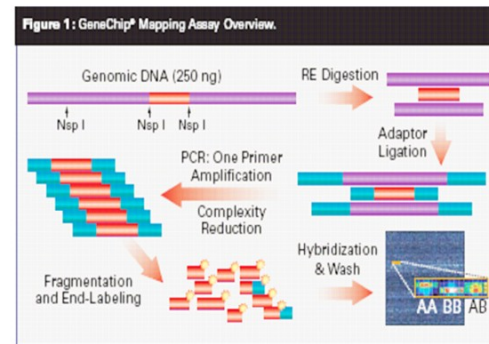
PCR-RFLP
(restriction fragments length polymorphism)

Enzyme Site Recognition

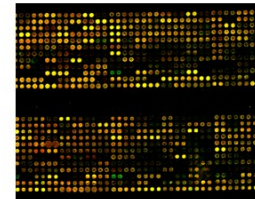
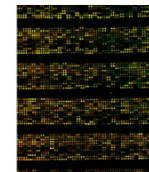
- Each enzyme digests (cuts) DNA at a specific sequence = restriction site
- Enzymes recognize 4- or 6- base pair, palindromic sequences (eg GAATTC)



Detekce: Affymetrix, Illumina



BeadArray (Illumina)



10 – 500 tisíc SNP znaků najednou – „chip technology“

Typy genetických markerů

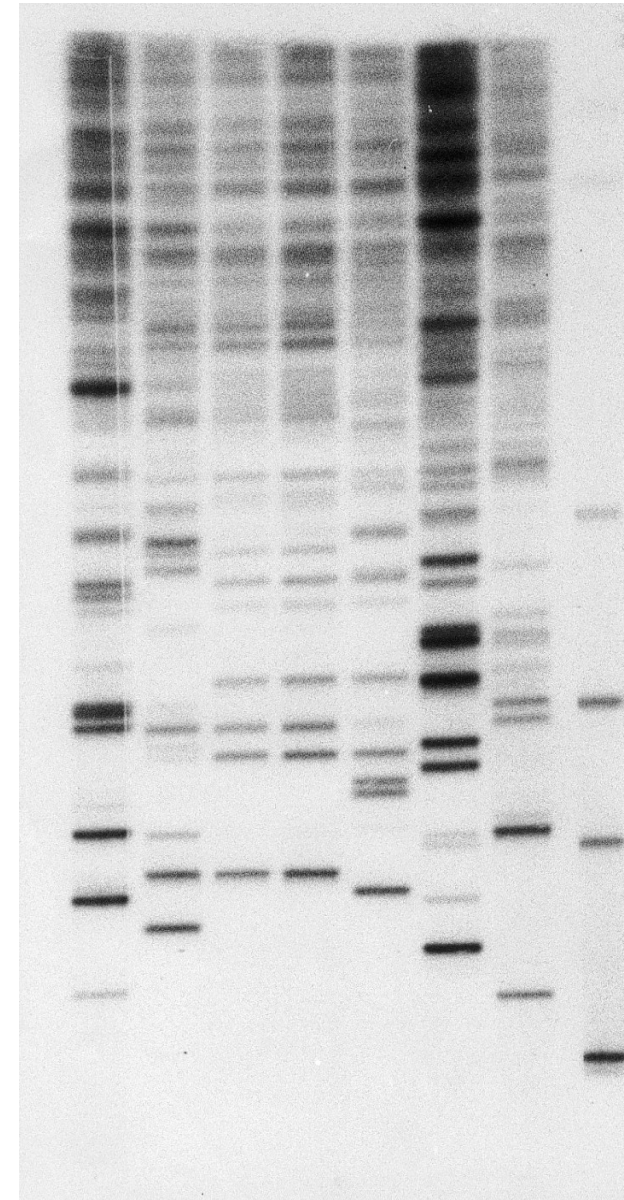
	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Nuclear multilocus				



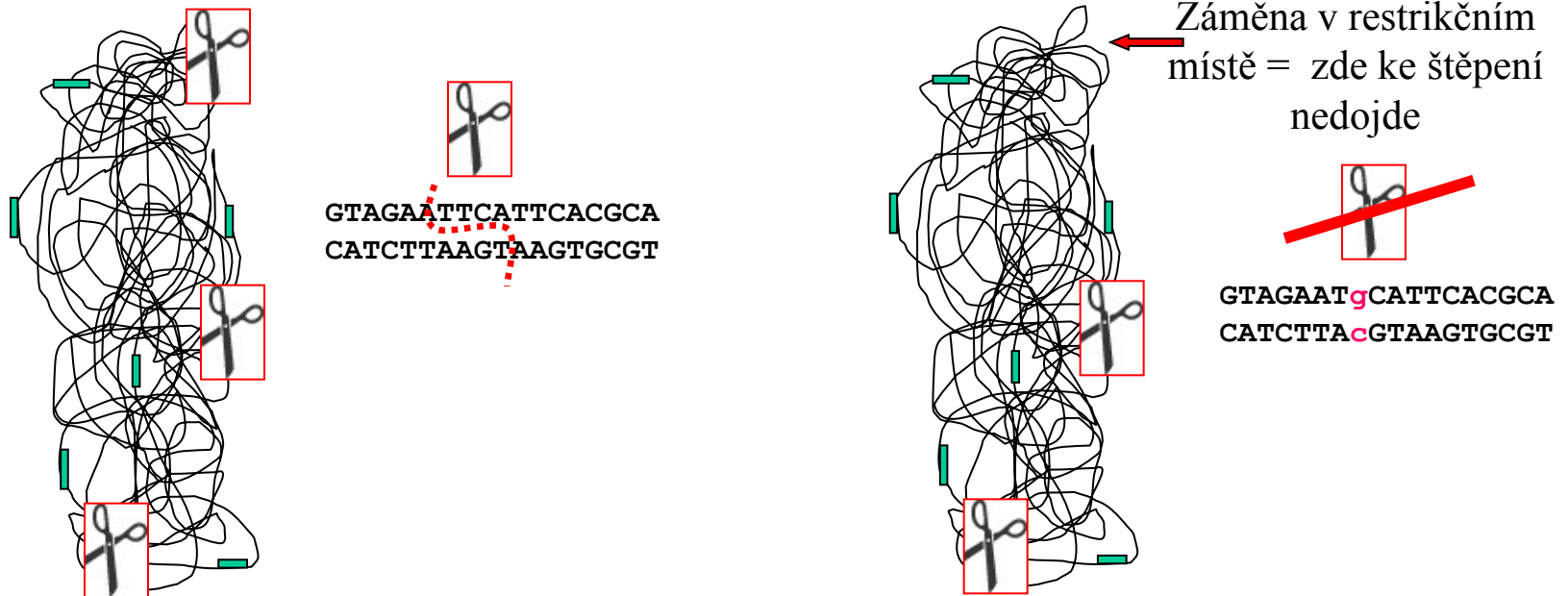
Nuclear single locus				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
Mikrosatelite	Yes	Yes	Yes	High
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
SNPs	Yes	Yes	Yes	Low-high

Multi-locus genetic markers

- Mnoho znaků náhodně rozmístěných v genomu - celogenomový scan
 - *minisatellite DNA fingerprinting*
 - *RAPD* (randomly amplified polymorphic DNA)
 - *AFLP* (amplified fragment length polymorphism)
- presence vs. absence **restrikčního místa** (*AFLP*) či **místa pro dosednutí primerů** (*RAPD*) = **dominantní znaky** (neodliší heterozygota - proužek na gelu buď je nebo není)
- není nutno znát předem genom studovaného druhu (tj. primery či sondy)



Každý jedinec má jedinečný genom



1. Ztráta nebo nabytí restričního místa

Enzyme Site Recognition

- Each enzyme digests (cuts) DNA at a specific sequence = restriction site
- Enzymes recognize 4- or 6- base pair, palindromic sequences (eg GAATTC)

Restriction site

Palindrome

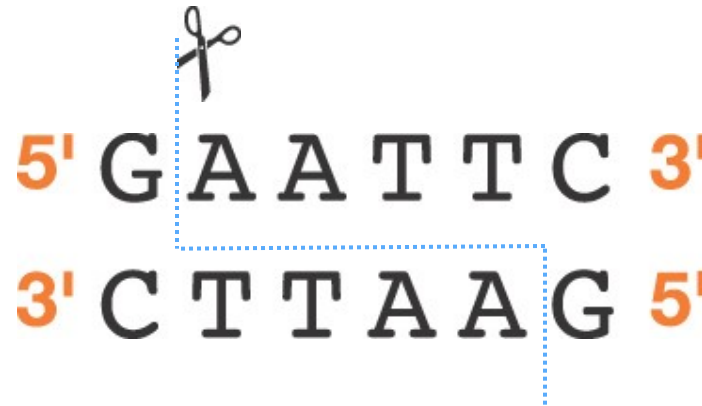
G T A G G A A T T C A T T T C A C G C A
C A T C T T A A G T A A G T G C G T

G T A G A A T T C A T T T C A C G C A
C A T C T T A A G T A A G T G C G T

Fragment 1

Fragment 2

Common Restriction Enzymes



EcoRI

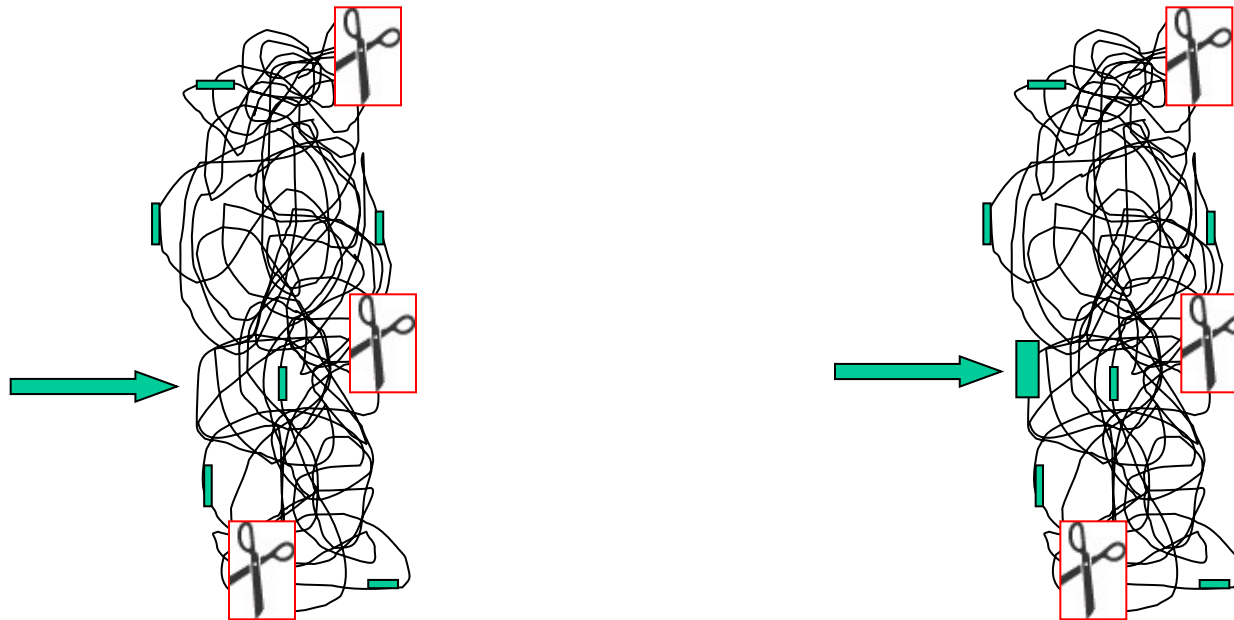
- Escherichia coli
- 5 prime overhang



PstI

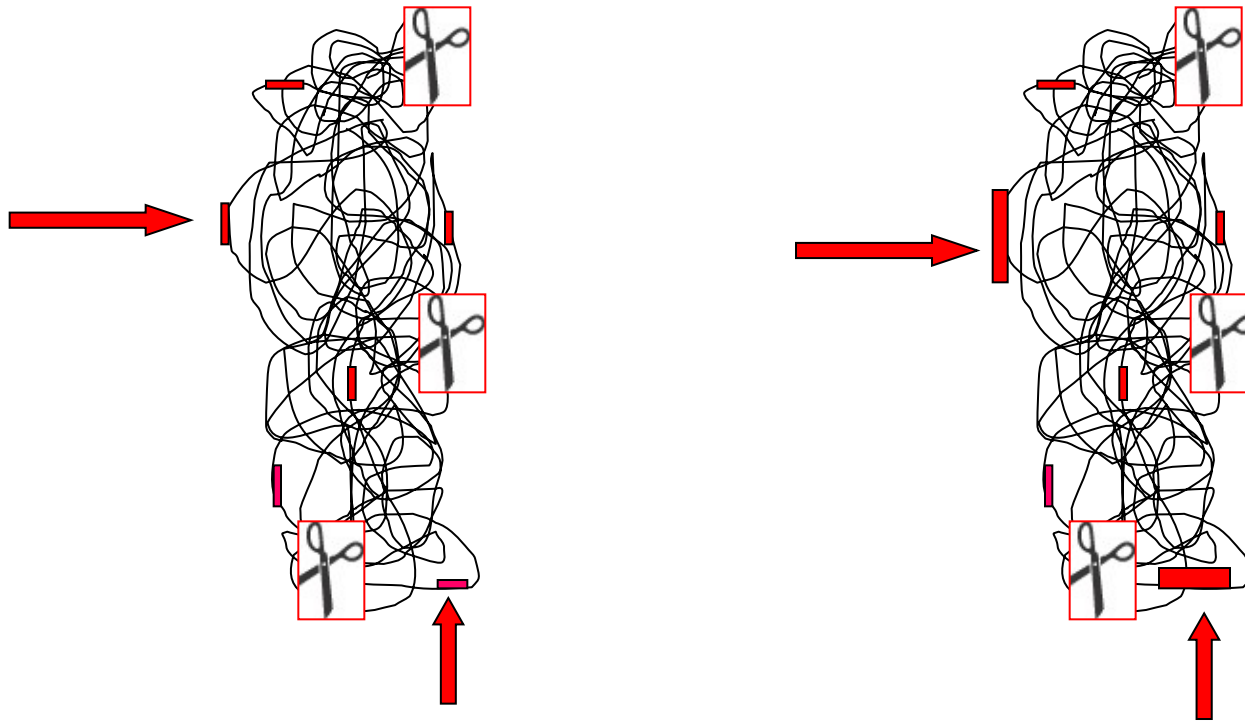
- Providencia stuartii
- 3 prime overhang

Každý jedinec má jedinečný genom



2. Ztráta nebo nabytí SINE (např. **Alu** sekvence) nebo LINE

Každý jedinec má jedinečný genom



3. Vysoká mutační rychlost **minisatelitů a mikrosatelitů** -
rozdíly v počtu repeticí, tj. v délce daného úseku

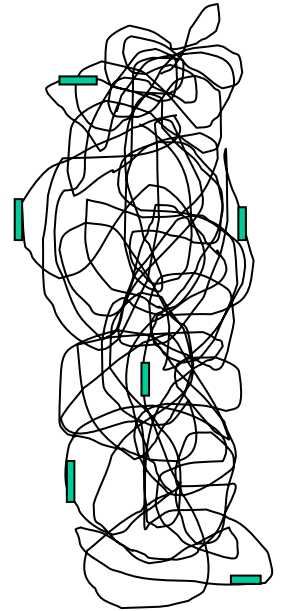
Repetitivní DNA

DNA	Typical sequence length (bp)	Location
Satellites ($>10^6$ repeats/genome)	5-100	Tandem arrays, scattered throughout the genome
Minisatellites ($>10^3$ loci/genome)	20-300	Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome
Microsatellites ($>10^4$ loci/genome)	1-6	Tandem arrays up to a few 100 bp in length, scattered throughout the genome
Telomeres	4-8	Tandem arrays up to 1kb in length, at the ends of each chromosome
SINEs ($>10^5$ /genome)	50-500 (100-300)	Interspersed throughout the genome
LINEs ($>10^3$ /genome)	1-5 k	Interspersed throughout the genome

(Minisatellite) DNA fingerprinting

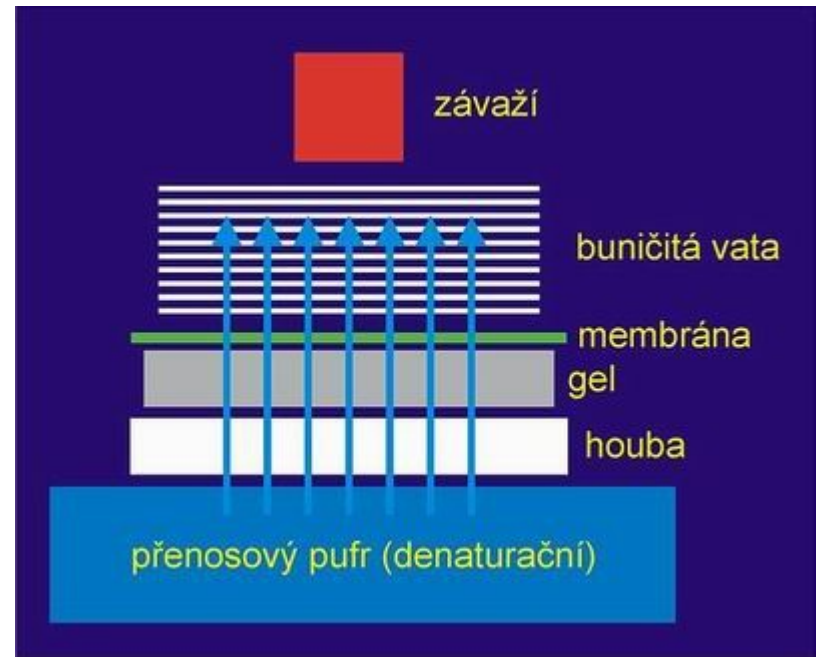
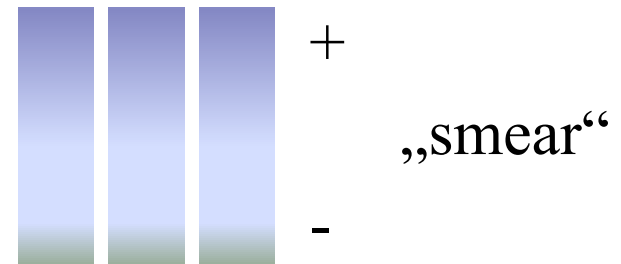
(Jeffreys et al. 1985)

- první celogenomový screening
- restriční štěpení kompletní DNA – sekvenčně specifické **restriční endonukleázy**



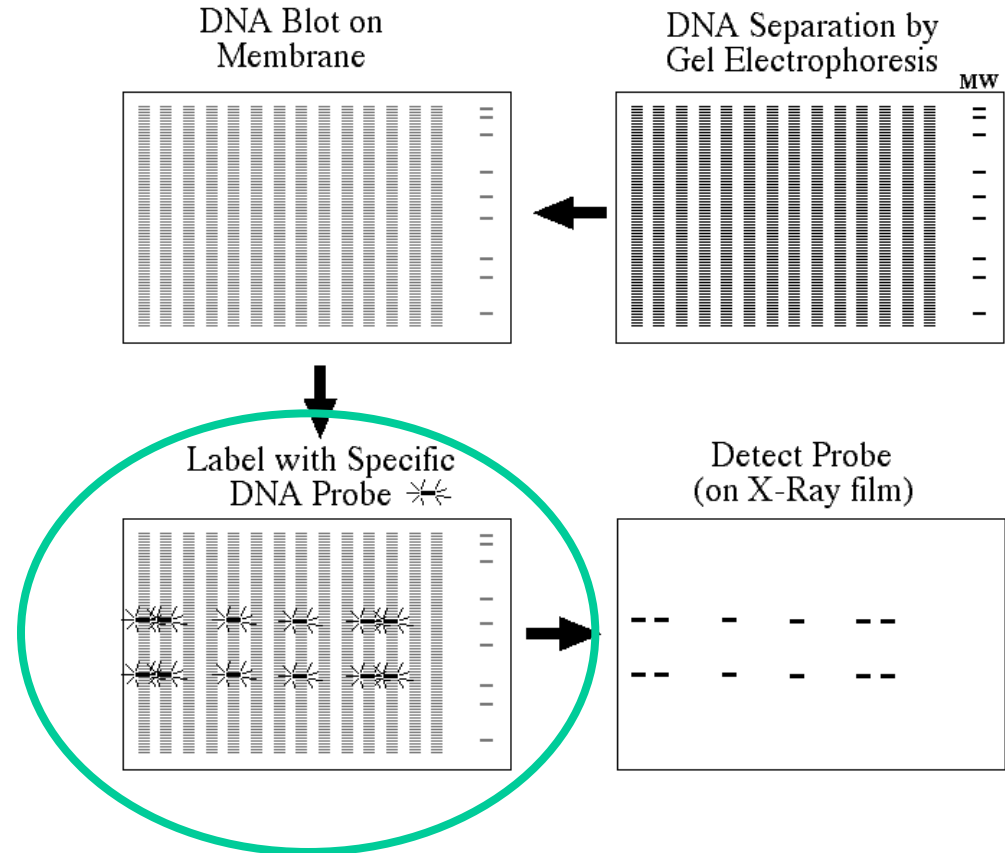
Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza rozštěpené DNA
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu



Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu
- hybridizace se značenou sondou (nejčastěji radioaktivní značení), tj. specifickou sekvencí odpovídající danému minisatelitu (popř. SINE)



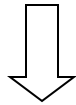
Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu
- hybridizace se značenou sondou, tj. specifickou sekvencí odpovídající danému minisatelitu
- zásadní objevy např. mimopárové paternity u ptáků
- v posledních cca 20 letech – přesun k PCR-based metodám (respektive NGS metodám)



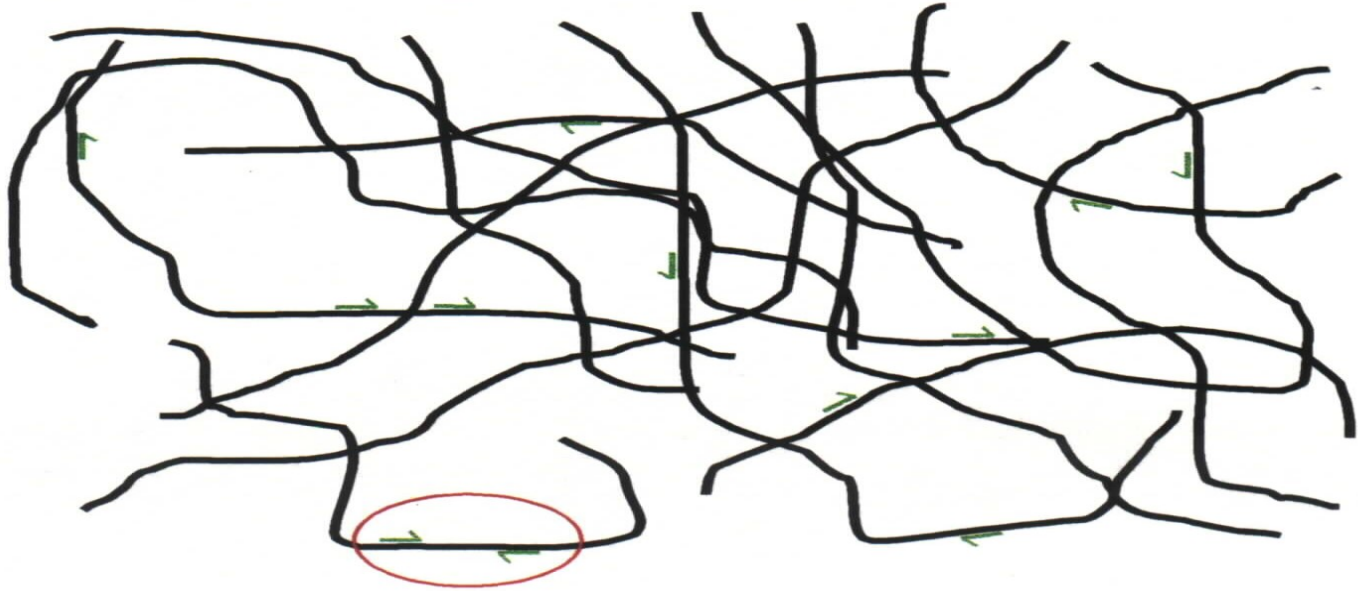
RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

Krátké náhodné oligonukleotidy
(~ 10 bp) jako primery

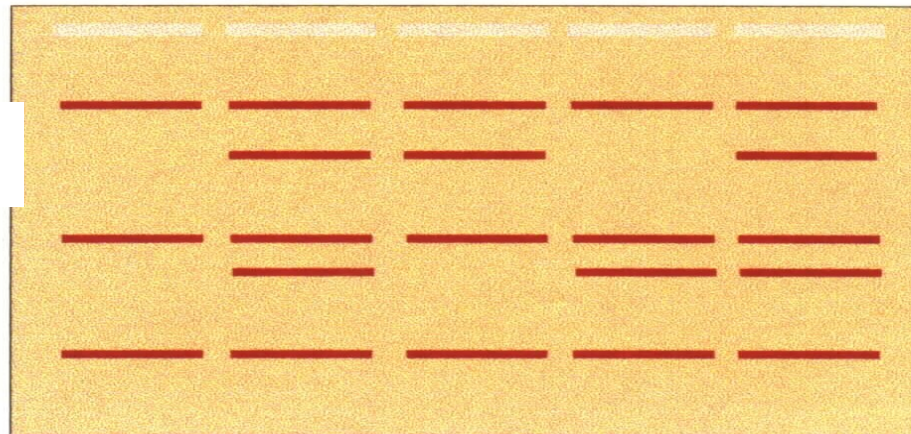


PCR za málo specifických podmínek

genomic DNA



- 1) PCR
- 2) Separation by size on agarose gel

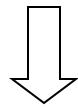


Variabilní DNA detekovaná metodou RAPD:

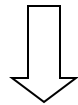
- a) Změna sekvence v místě nasedání primeru
- b) Delece místa nasedání primeru
- c) Velká inzerce mezi dvěma místy nasedání primeru

RAPD

Krátké náhodné oligonukleotidy
(~ 10 bp) jako primery

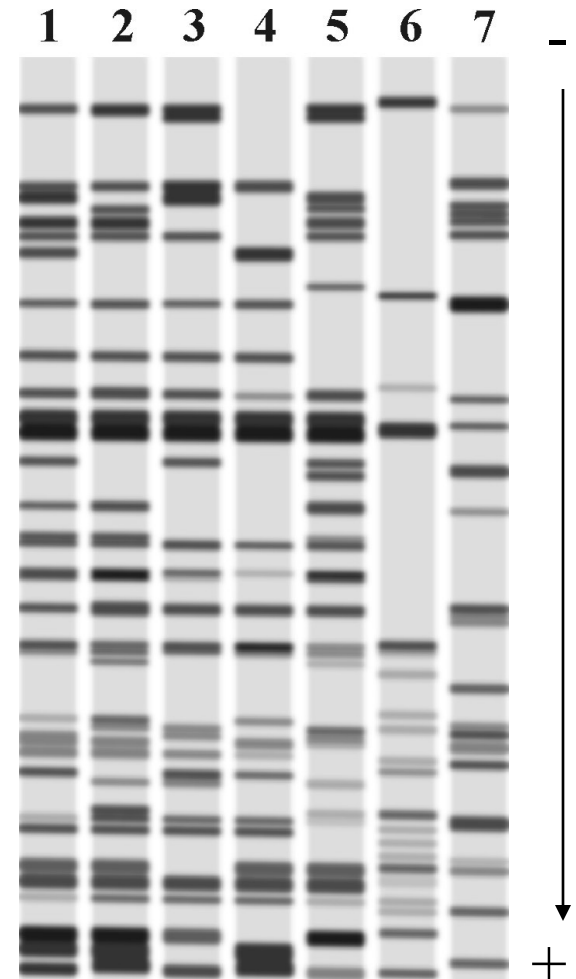


PCR za málo specifických podmínek



Detekce PCR produktů elektroforézou

Nízká opakovatelnost v důsledku mnoha faktorů
ovlivňujících PCR – dnes již není akceptována
jako metoda např. pro studium populační
struktury (ale třeba vhodná jednoduchá metoda k
odlišení příbuzných druhů)



AFLP (amplified fragments length polymorphism)

- levná, jednoduchá, rychlá a spolehlivá metoda na generování stovek informativních genetických markerů
- současný screening mnoha různých DNA oblastí distribuovaných náhodně v genomu
- lépe reprodukovatelná než RAPD – obsahuje krok se specifickou PCR
- „genome scan“ – hledání asociací s fenotypovými znaky

Princip AFLP metody („generating AFLP markers“)

(a) AFLP template preparation

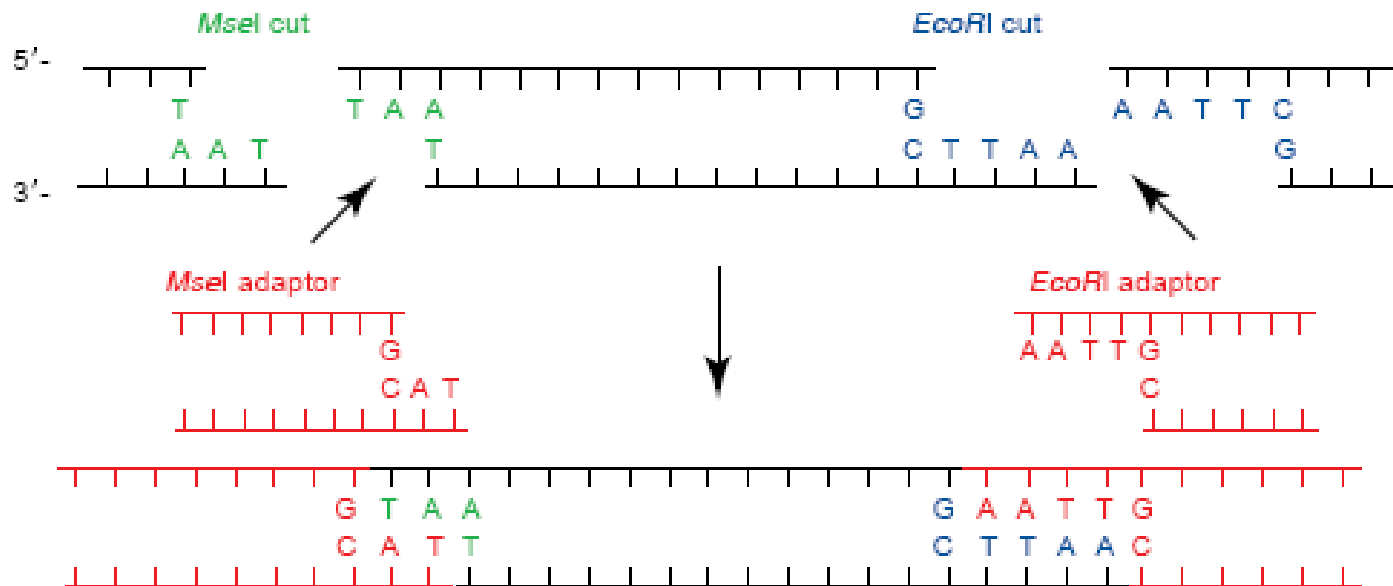
Whole genomic DNA



Restriction enzymes
(*MseI* and *EcoRI*)
and
DNA ligase



(b) Restriction and ligation

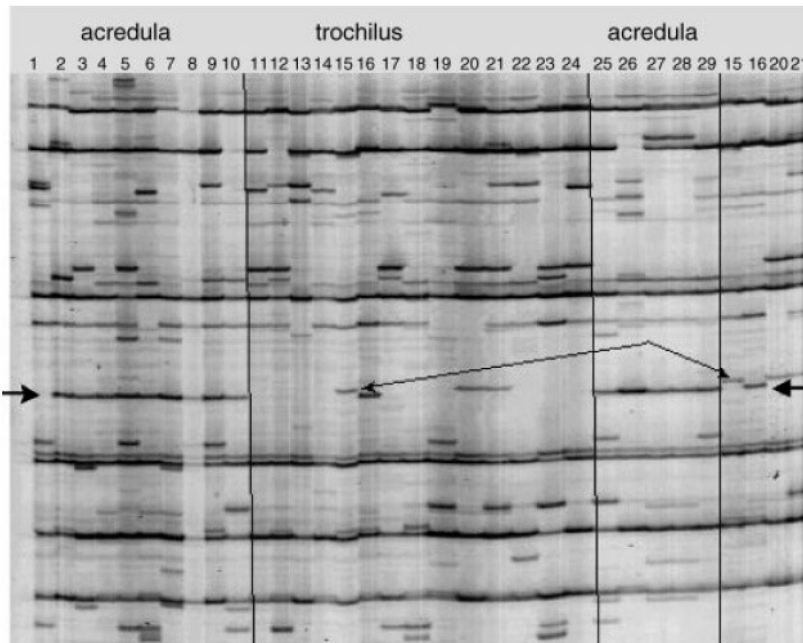
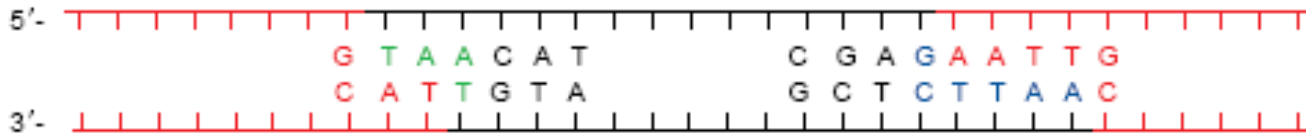


Generating AFLP markers

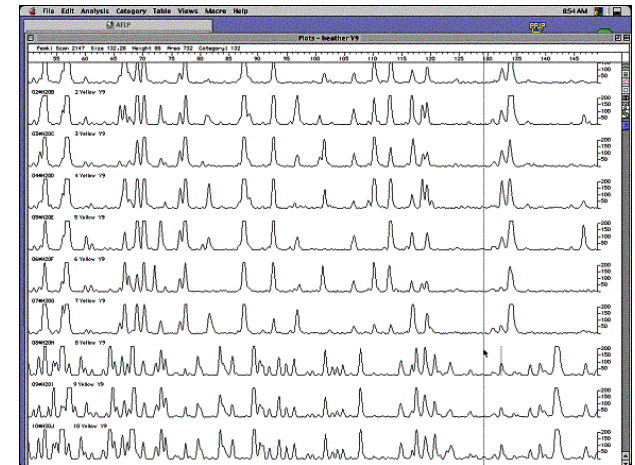
(c) Selective amplification (one of many primer combinations shown)



PCR with primers on adaptors



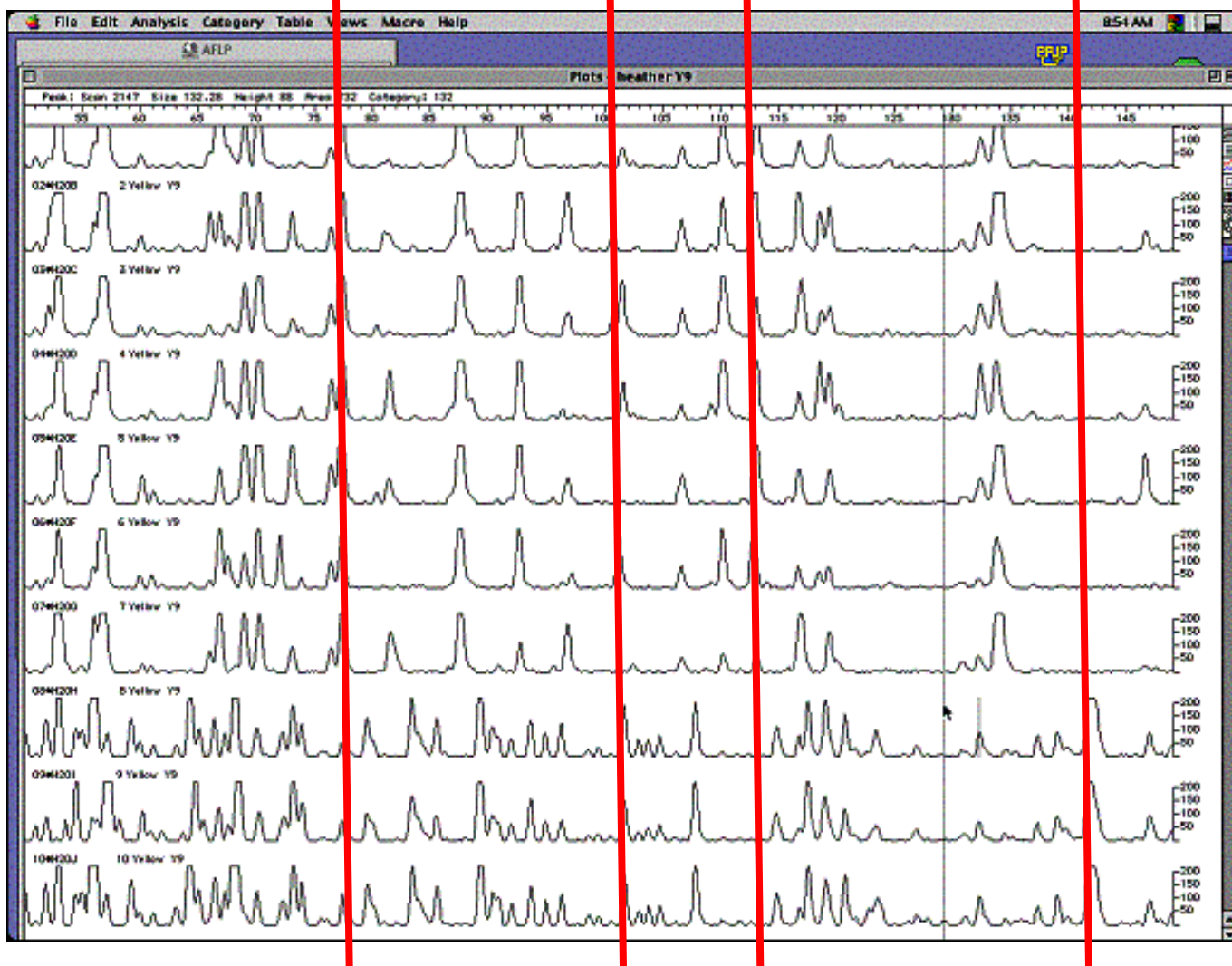
multi-locus genotype



„capillary version“

Ex.:
Combination
MseI + EcoRI

Automatizované čtení elektroforetogramu podle
zadaných kritérií (např. pozice a minimální výška píku)



Vyhodnocení dat - např. shluková analýza

