

# Genetické metody v zoologii

Josef Bryja (bryja@brno.cas.cz)

Miloš Macholán (macholan@iach.cz)

| Datum                                     | Přednášející          | Kde                 | Téma  |
|---|-----------------------|---------------------|---|
| 16.02.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Úvod (význam genetických metod v zoologii a evoluční biologii; základní přehled metod, atd.). Analýza DNA I (izolace DNA, genetické markery - jaderná vs. mimojaderná DNA, PCR, real-time PCR, Sangerovo sekvenování) |
| 23.02.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza DNA II ("single-locus" DNA markery: mikrosatelity, LINE, SINE)  |
| 02.03.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza DNA III (SNP a jejich analýza: RFLP, DGGE, TGGE, SSCP, klonování, nové techniky SNP genotypizace - SNP chipy atd.)  |
| 09.03.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza DNA IV ("multi-locus" DNA markery: minisatelitový fingerprinting, RAPD, AFLP)   |
| 16.03.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza DNA V (Úvod do "high-throughput sequencing" = NGS technologií)  |
| 23.03.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza DNA VI (Aplikace technologií NGS, např. metagenomika, hybrid enrichment, RADseq, ddRADseq, atd.)  |
| 30.03.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Analýza genové exprese, transkriptomika (qPCR, microarrays, RNAseq)   |
| 06.04.2023                                | M. Macholán           | UKB                 | Cytogenetika (analýza karyotypu, proužkování, FISH, „painting“). Elektroforéza proteinů   |
| 13.04.2023                                | M. Macholán           | UKB                 | Analýza fenotypu (signální fenotypy, epigenetické znaky, kvantitativní znaky, analýza landmarků)  |
| 20.04.2023                                | J. Bryja              | UKB                 | Základní manipulace s genetickými daty I (jaderná data založená na frekvencích - základní analýzy genetické variability a struktury populací, HWE, STRUCTURE, atd.)   |
| 27.04.2023                                | M. Macholán           | UKB                 | Základní manipulace s genetickými daty II (analýza sekvencí - datové formáty, alignování sekvencí, základní práce s databázemi - GenBank, NCBI, BLAST, Dryad, TreeBASE aj.)   |
| 04.05.2023                                |                       | UKB                 |   |
| 11.05.2023                                |                       | UKB                 |   |
| 18.05.2023                                |                       | UKB                 |   |
| celý den, termín domluvíme, ideálně pátek | J. Bryja + doktorandi | ÚBO AV ČR, Studenec | Analýza DNA v laboratoři (blokové cvičení) - izolace a elektroforéza DNA, PCR, real-time PCR, mikrosatelity, Sangerovo sekvenování, BLAST, ukázka NGS dat   |
|   |                       |                     |   |

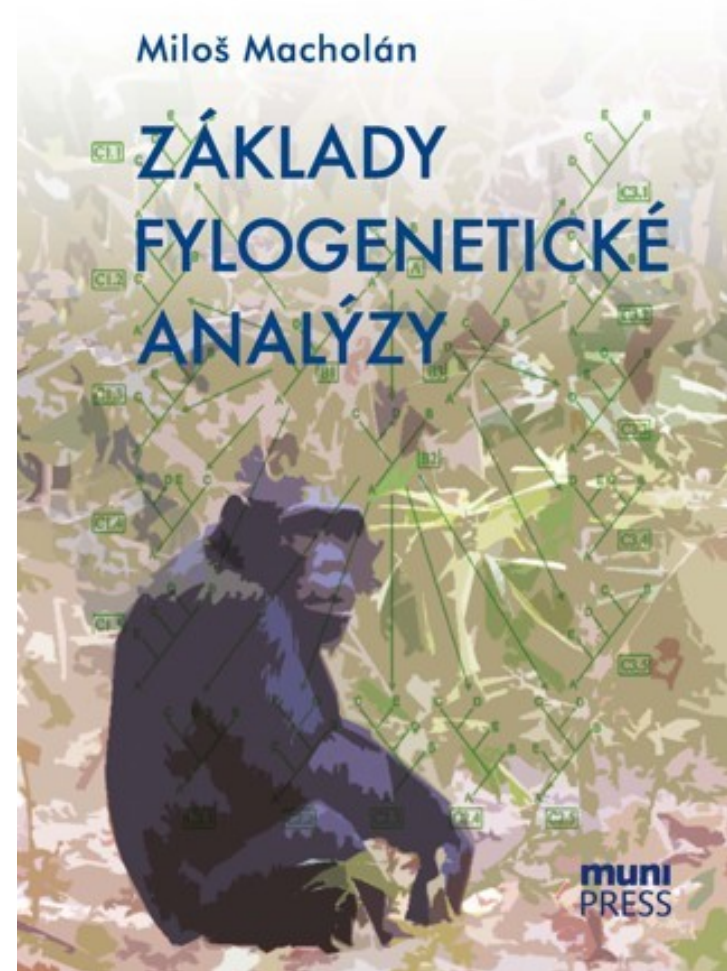
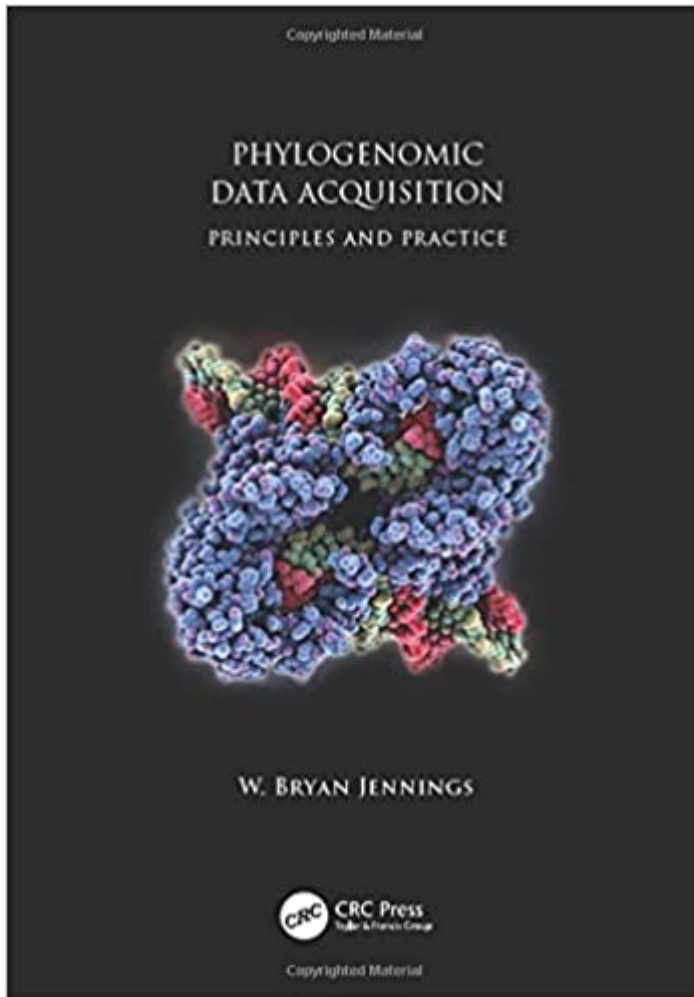
# Doporučená literatura (česká)

## Genetické metody v zoologii

Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

*Nakladatelství Karolinum 2004*





- M. Macholán
- Základy fylogenetické analýzy (2014)

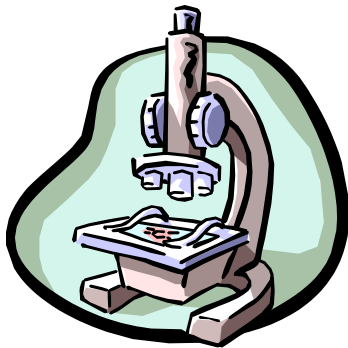
# Proč?

## Problém:

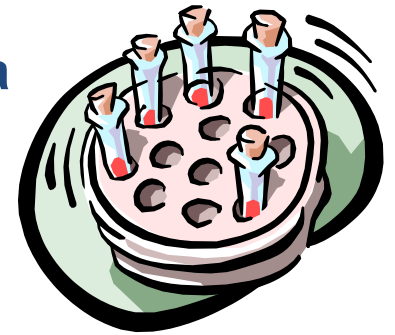
zoologie, taxonomie  
ekologie, evoluční biologie

## Genetické metody:

**klasické  
metody**  
morfologická,  
ekologická,  
bionomická  
data



**genetická data  
(nejčastěji  
DNA)**



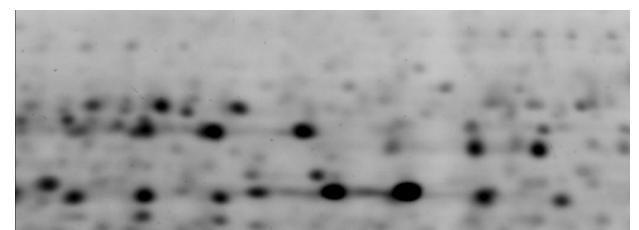
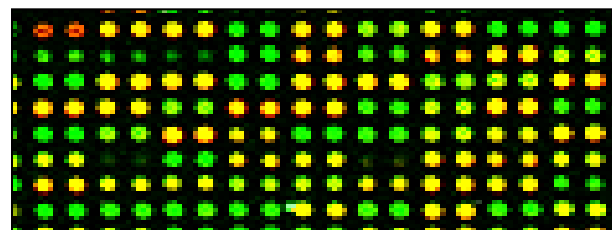
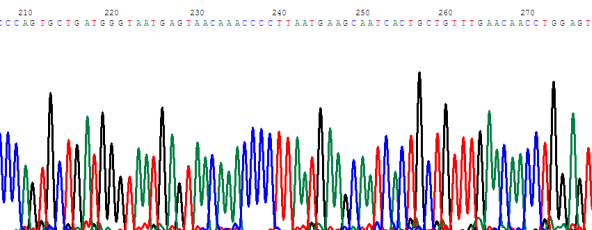
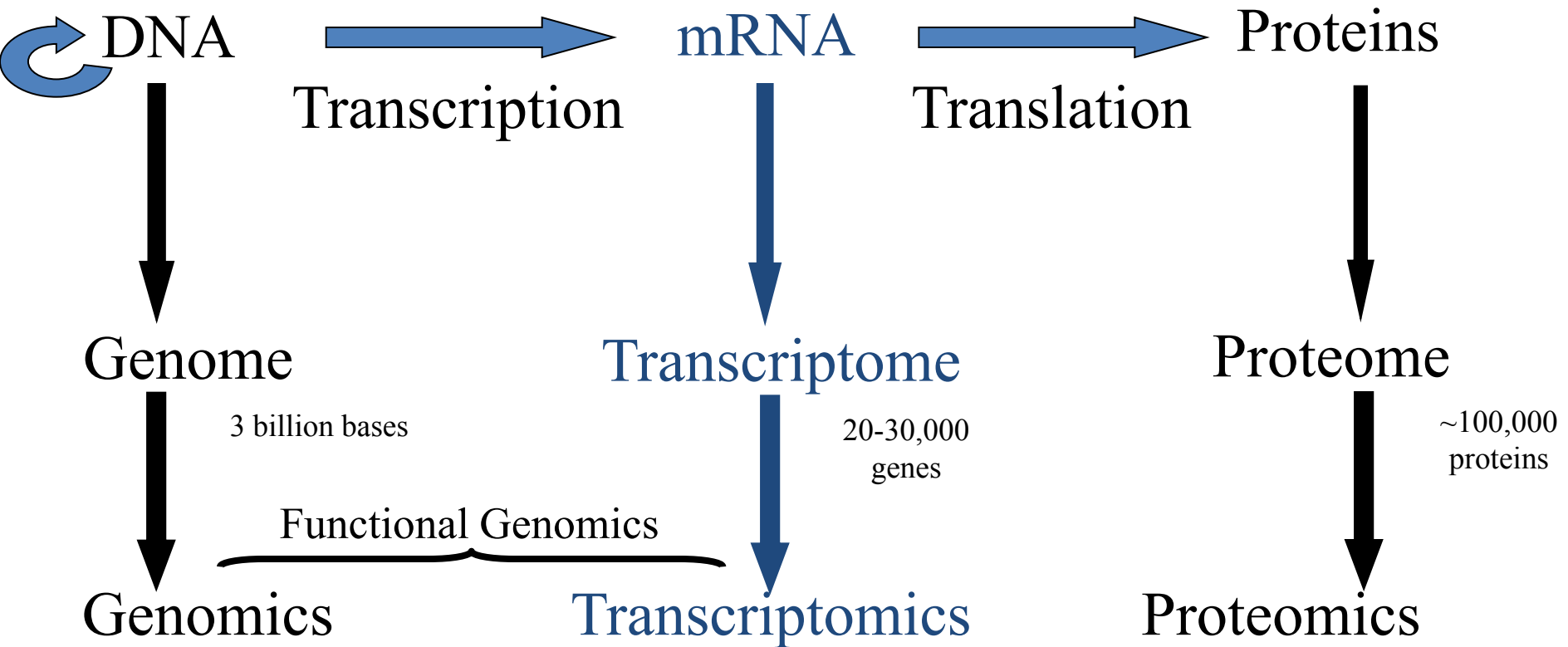
**Další úroveň poznání  
Odpovědi na nové otázky**

# Na které otázky lze nalézt odpověď nejlépe s využitím genetických metod?

- rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi populacemi, druhy či vyššími taxony (konvergence)
- kryptické druhy
- složení společenstev – metabarcoding („eDNA“)
- izolace populací (tj. počet migrantů) – nemusí být zřejmá
- identifikace z trusu, chlupů - pohyb jedinců skrytě žijících druhů
- paternita – páření často skryté a nemusí vést k oplození
- a mnoho dalších ...

# Genetické metody

= studium genetické variability

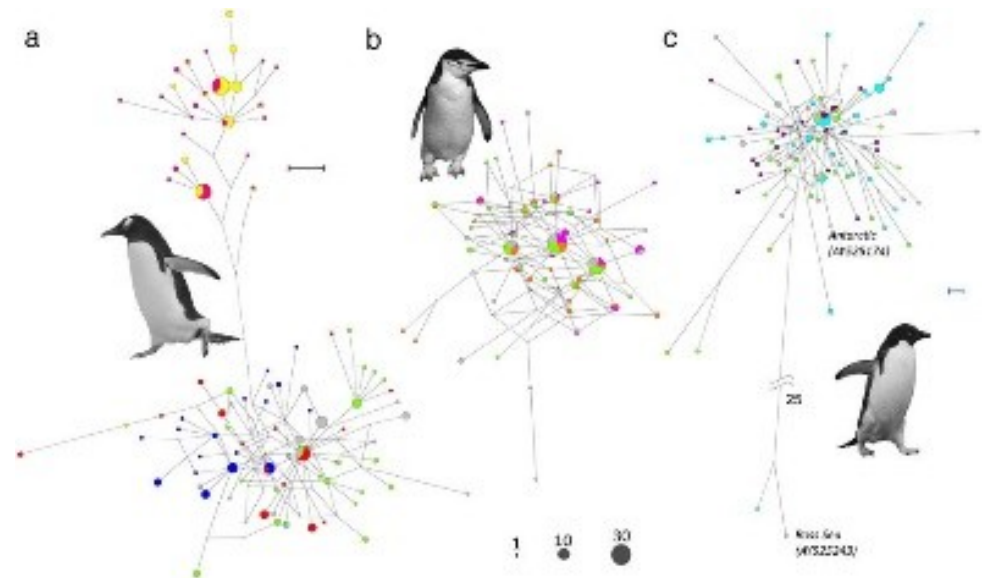
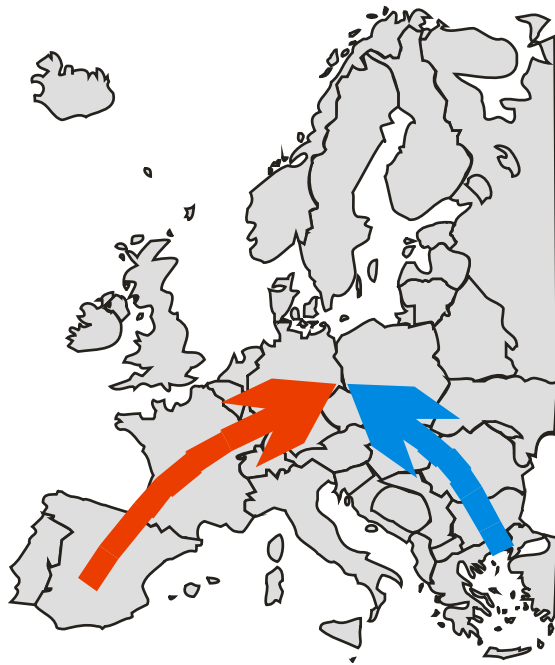






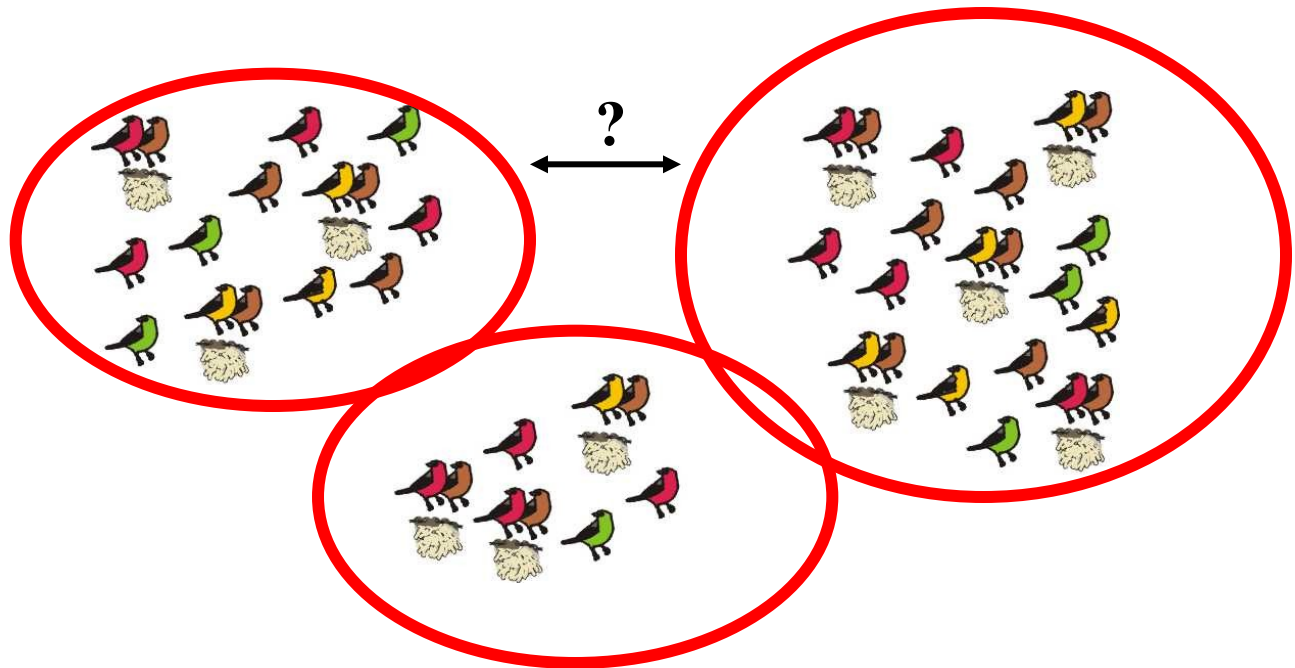
# Úrovně genetické variability

- **populace až druh** – studium speciace, fylogeografie, delimitace druhů, hybridizace



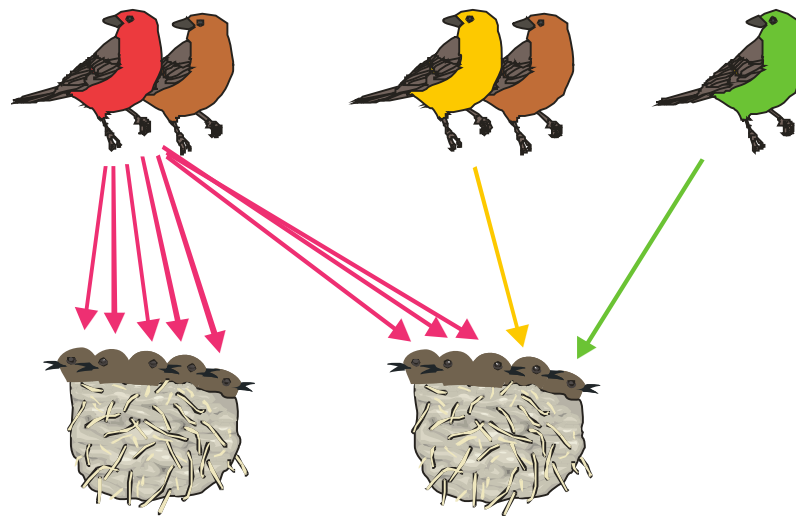
# Úrovně genetické variability

- **populace** – populační biologie, ochranářská genetik



# Úrovně genetické variability

- **jedinec** – analýzy příbuznosti (behaviorální ekologie, např. analýzy paternity)



# Genetické metody v zoologii

- jak genetická data získat, tj. které **techniky** použít
- **Mechanismy mikroevoluce** (jaro)
- základní typy a zpracování (editace) genetických dat
- **Molekulární ekologie** (podzim)

# Genetické DNA markery

- **kódující DNA (geny)**
- přepisované sekvence (cca 20-25 tisíc genů u obratlovců)
- genetický kód
- vytvářejí fenotyp
- podléhají přírodnímu výběru
- rostoucí význam v ekologickém výzkumu
- **nekódující DNA**
- nefunkční (neznámá funkce)
- neutrální k přírodnímu výběru
- většina DNA u eukaryot (až 95% u obratlovců)
- pseudogeny
- repetitivní DNA

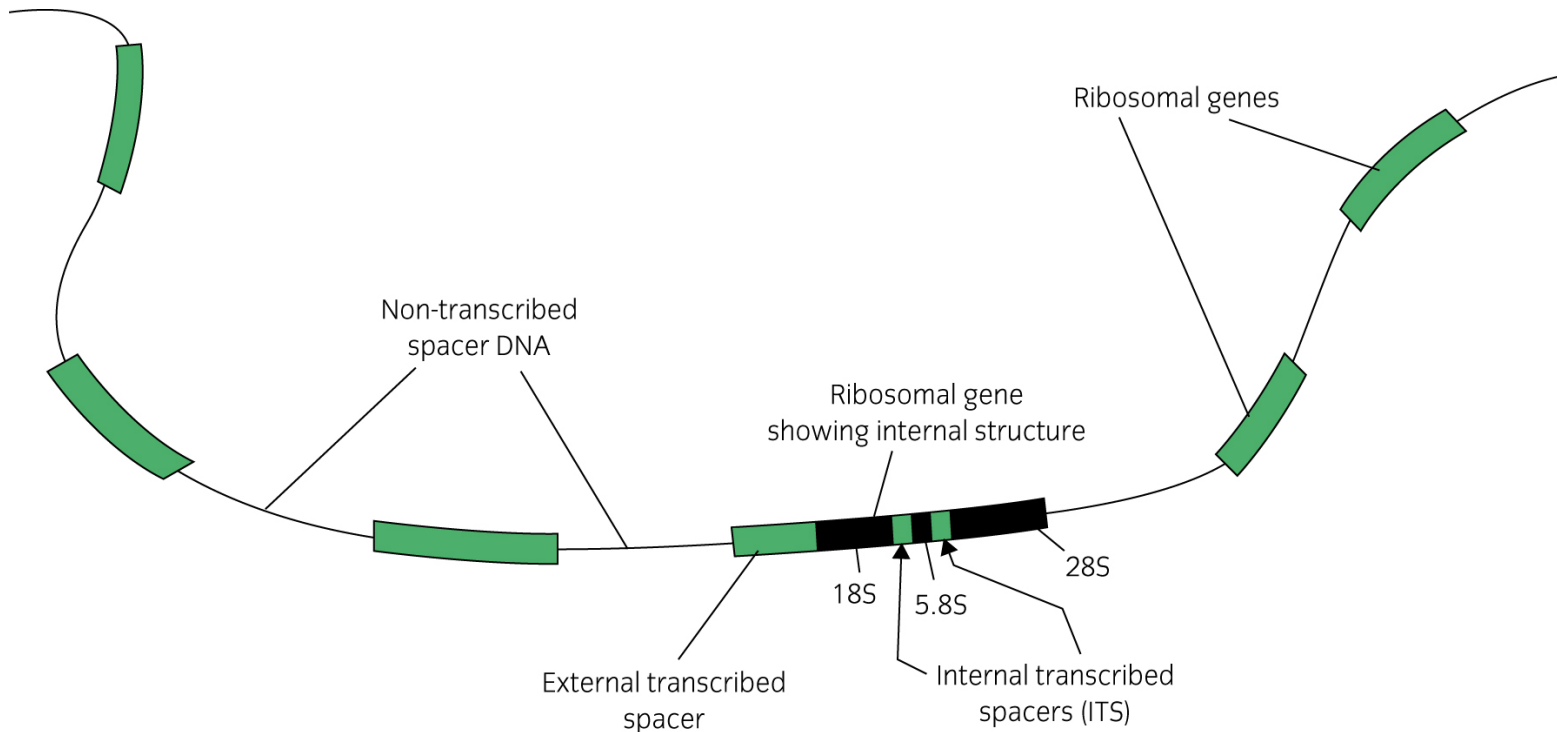
# Repetitivní DNA

| DNA   | Typická délka sekvencí (bp) | Lokalizace   |
|---|-----------------------------|--|
| Minisatелity (>10 <sup>3</sup> lokusů/genom)  | 20-300                      | Tandemové repetice o délce až 5 kb, rozmístěné po celém genomu           |
| Microsatelity (>10 <sup>4</sup> lokusů/genom) | 2-4                         | Tandemové repetice o délce až několik 100 bp, rozmístěné po celém genomu |
| Telomery                                      | 4-8                         | Tandemové repetice o délce až 1 kb, na koncích chromozómů                |
| SINEs (>10 <sup>5</sup> /genom)               | 50-500 (100-300)            | Rozmístěné po celém genomu   |
| LINEs (>10 <sup>3</sup> /genom)               | 1-5 k                       | Rozmístěné po celém genomu   |

# Kódující („funkční“) DNA

- 1) ribosomální DNA (+ geny pro miRNA)
- 2) jaderné strukturální geny (protein-coding genes)
- 3) mitochondriální DNA

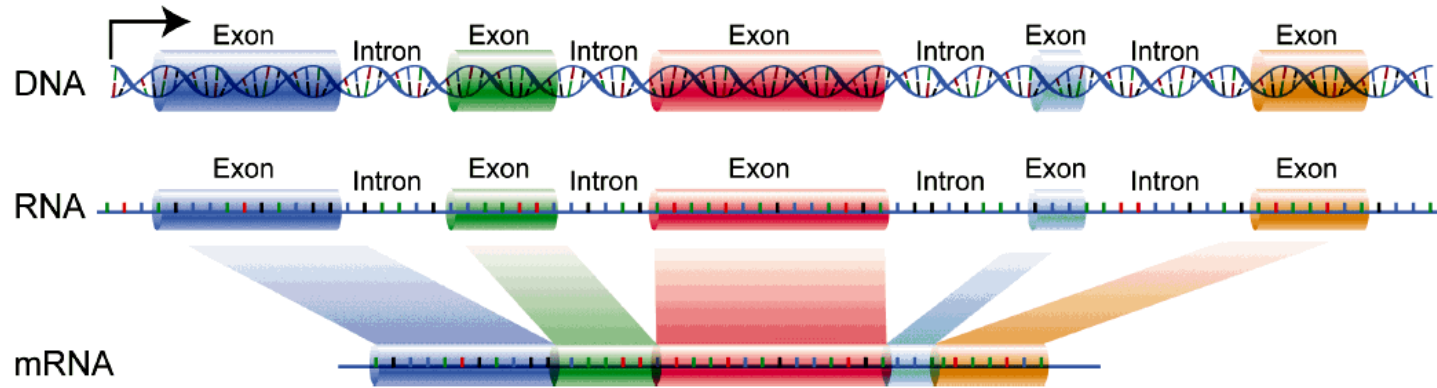
# 1. Ribosomální DNA



- geny pro ribosomální RNA – mnoho shluků (operonů) u eukaryot
- 16S, 23S, and 5S – málo kopií u prokaryot
- rDNAs – phylogenetické analýzy, ITS – populační struktura, barcoding (houby, helminti)

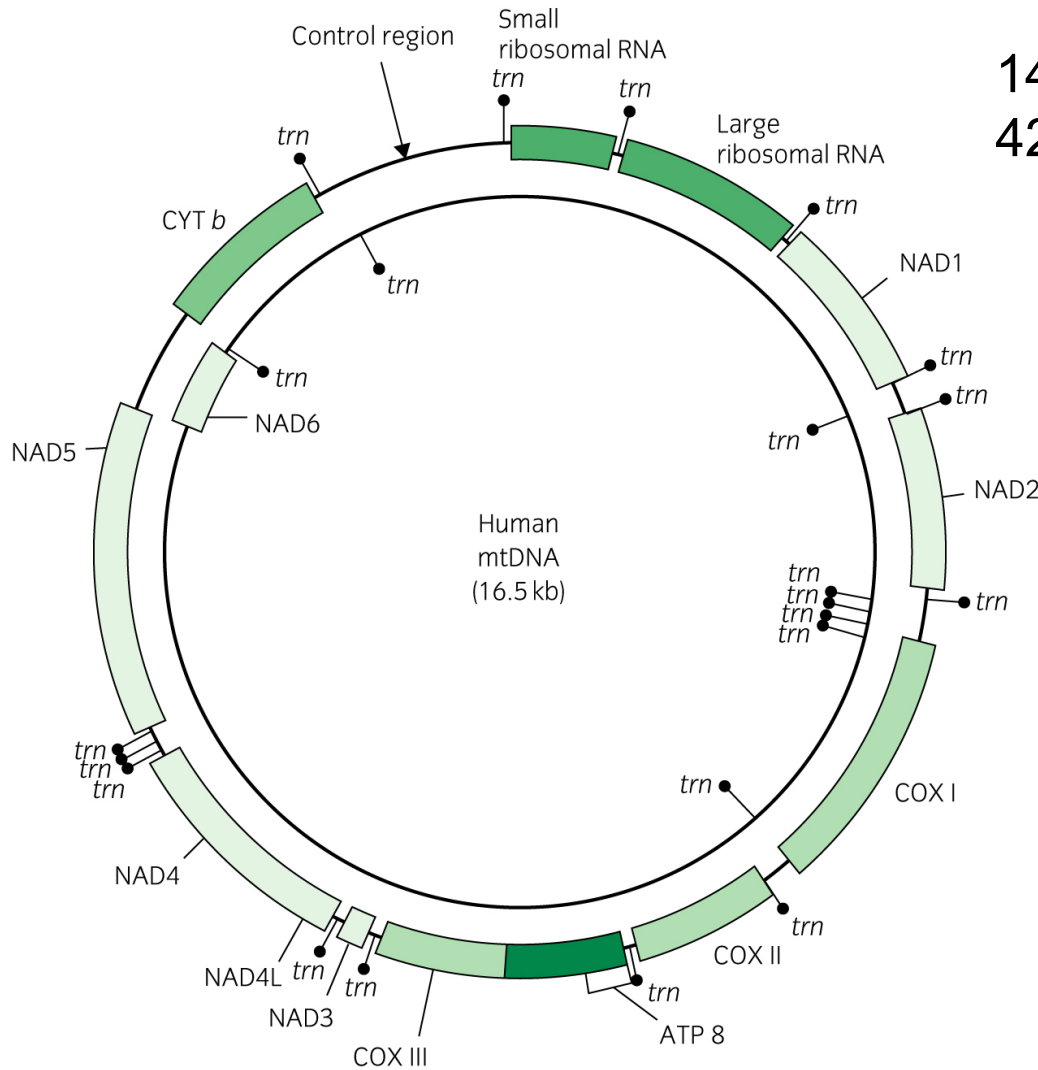


## 2. Jaderné geny



- nízká variabilita mezi jedinci – významná funkce, purifikující selekce (nejsou často používány jako genetické markery)
- introny – více variabilní než exony, často ve fylogenetických analýzách
- př. alozymy, MHC geny
- SNPs – narůstající význam (jednoduché mutace způsobují významnou funkční změnu)
- studium genové exprese - transkriptomika

# 3. Mitochondriální DNA



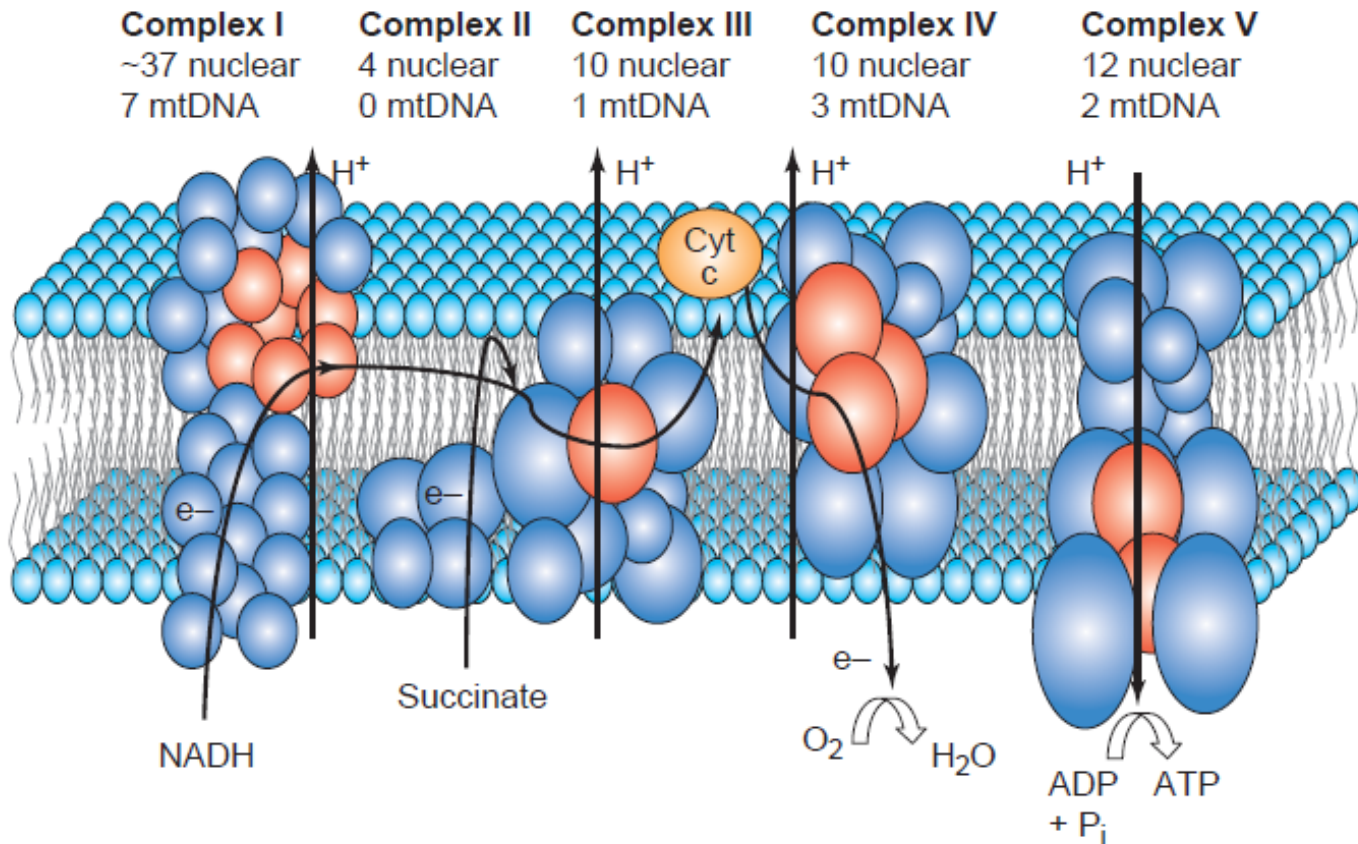
14 kbp (*Caenorhabditis*)

42 kbp (*Placopecten*)

- maternální dědičnost (?)
- absence rekombinace (?)
- žádné heterozygoti (?)
- mnoho kopií v každé buňce (ca. 8000 u člověka) – lépe se analyzuje
- « numts » = nuclear copies of mtDNA
- vhodná pro fylogenetické a fylogeografické analýzy

# Dýchací řetězec v mitochondriích

red = mtDNA    blue = nDNA



- koevoluce jaderné a mitochondriální DNA → DNA-barcoding, nejčastější marker pro určování druhů

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA (genetické markery)
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- **sekvenční polymorfismus:**

**CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA**

**CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA**

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA (genetické markery)
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- sekvenční polymorfismus
- **délkový polymorfismus**

**CGCACATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA**

**CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA**

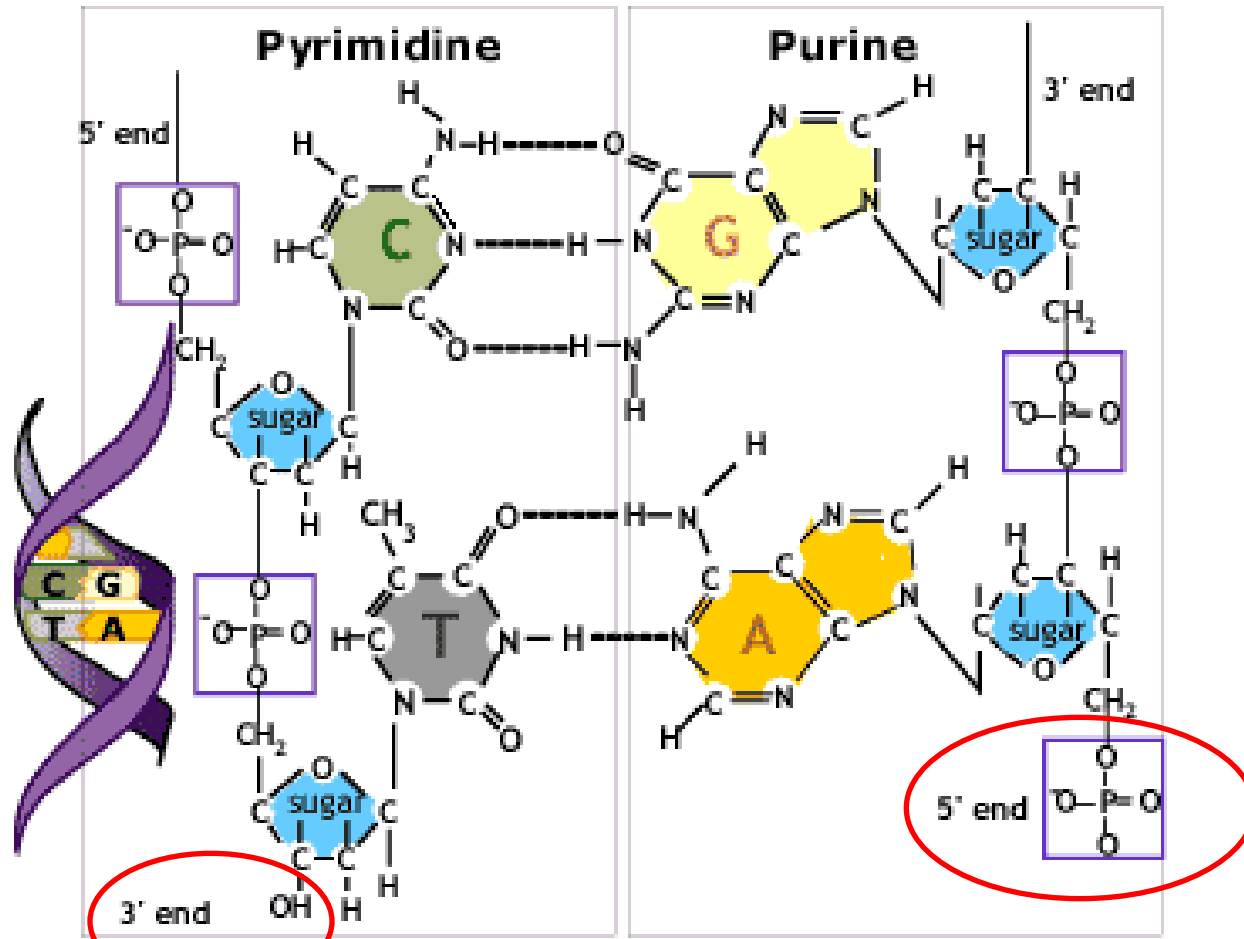
# Vznik DNA polymorfismu

- mutace (transice, transverze, inserce, delece)
- rekombinace (kombinace změn vzniklých mutacemi, duplikace a delece při rekombinačních chybách)
- transpozice
- ⇒ obecná molekulární genetika

# Genotypizace – stanovení genotypu

- stanovení formy určitého úseku DNA  
(**alely** =  $2n$ , **haplotypu** =  $1n$ )
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA  
(u metod založených na PCR)
  - 3) studium variability daného úseku  
(lokusu)

# Základní struktura molekuly DNA



3' - OH konec

(nutný k navázání dalšího nukleotidu při syntéze DNA)

5' - fosfátový konec

(ve vodném roztoku způsobuje záporný náboj)



# Enzymy používané při molekulárně-genetických manipulacích

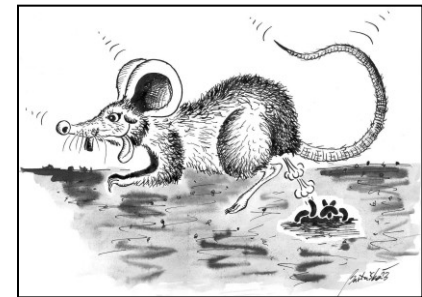
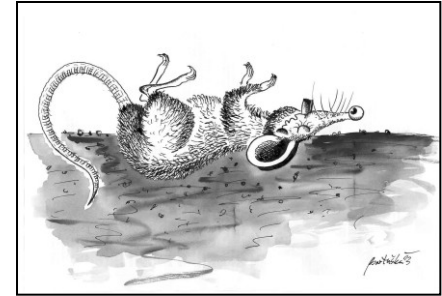
- DNA-polymeráza
- DNA-exonukleáza, DNA-endonukleáza
- DNA-ligáza
- DNA-transkriptáza
- RNA-reverzní transkriptáza

# Izolace DNA

- rozmanitý biologický materiál – musí obsahovat buněčná **jádra nebo mitochondrie** s nedegradovanou DNA
- dnes většinou komerční kity (cca 50-100 Kč/vzorek, ale pro některé aplikace i doslova „za pár korun“)
- Izolace RNA (např. pro expresi specifických genů) – dříve problém, dnes RNAlater

# Způsoby získání DNA z volně žijících živočichů:

- 1. destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy
- 2. nedestrukční (invazivní)** – živočich je odchycen a je mu odebrán vzorek tkáně nebo krve
- 3. neinvazivní** – zdroj DNA je „zanechán za živočichem“ a je získán bez potřeby odchyty, manipulace či dokonce pozorování



# Fixace materiálu

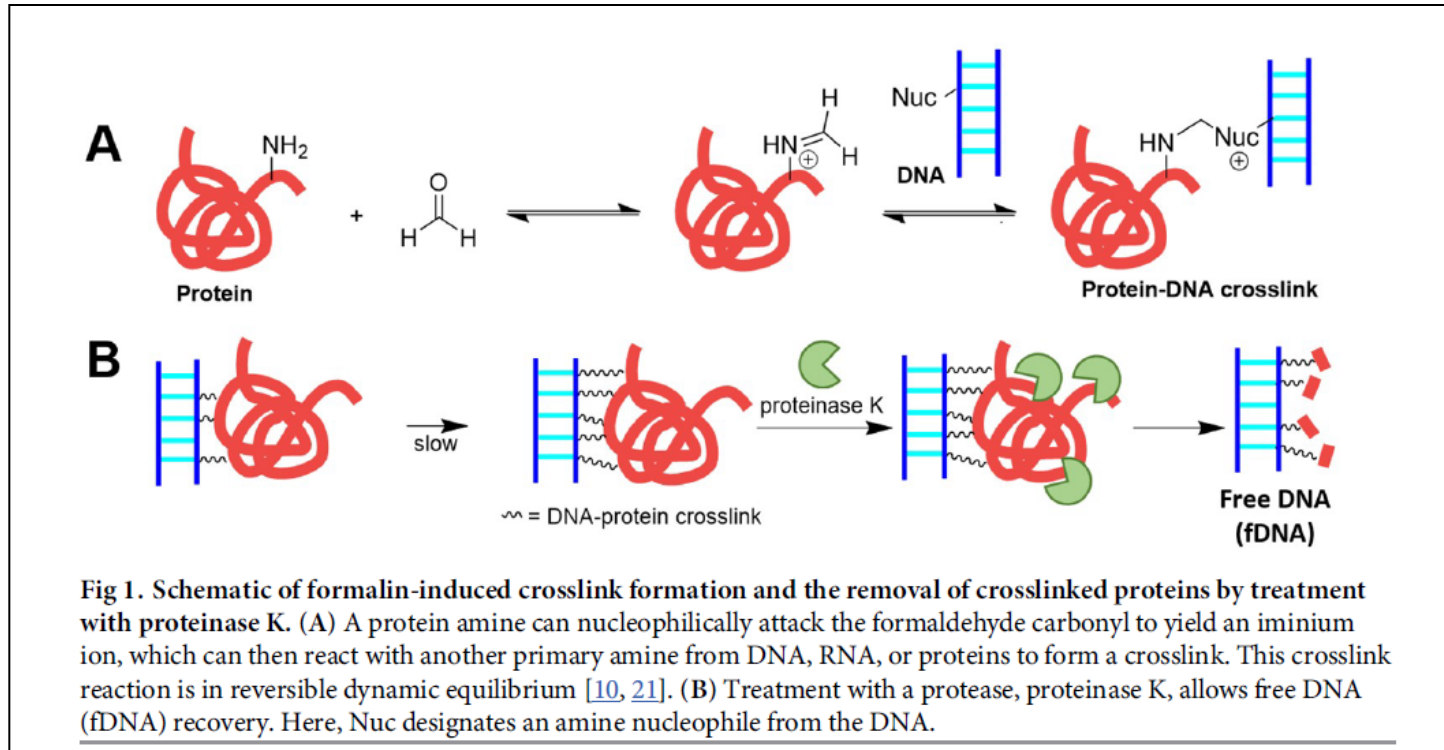
+

- čerstvá tkáň
- čistý EtOH
- rychlé vysušení
- speciální extrakční pufry
- zamražení (ideálně tekutý dusík)

-

- formaldehyd
  - opakované zamrazování
  - rozvlhčování sušeného materiálu
  - další fixační média
- 
- speciální metody pro izolaci ze subrecentního materiálu (mamuti, hmyz v jantaru, neandrtálci apod.)

# ... i z formalínu to dneska jde



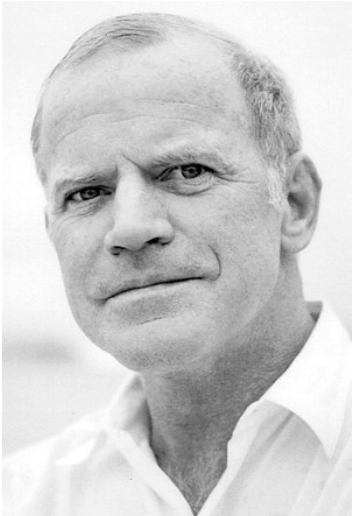
RESEARCH ARTICLE

## Vortex fluidics-mediated DNA rescue from formalin-fixed museum specimens

Christian A. Totoiu<sup>1\*</sup>, Jessica M. Phillips<sup>2</sup>, Aspen T. Reese<sup>3</sup>, Sudipta Majumdar<sup>1</sup>, Peter R. Girguis<sup>3</sup>, Colin L. Raston<sup>2</sup>, Gregory A. Weiss<sup>1,4,5\*</sup>

# PCR

## Polymerase chain reaction (jak z málo DNA udělat hodně)



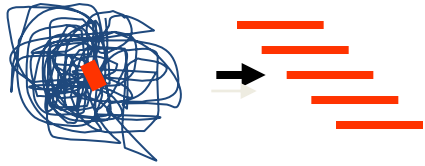
**Kary Mullis** (1983 – na dálnici ze San Francisca do Mendocina)

- odměna 10 000 USD
- patent pak prodán Roche za 300 000 000 USD)

1993 – Nobelova cena

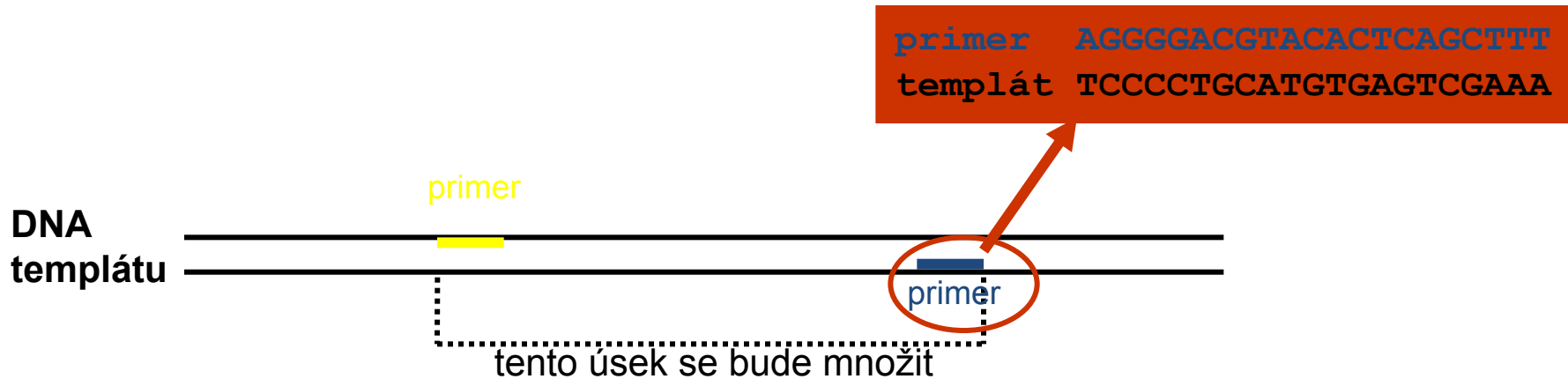
# Amplifikace DNA – PCR

| <b>Druh</b>                        | <b>Velikost genomu<br/>(bp)</b> | <b>Počet chromozómů<br/>(1n)</b> |
|------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>Caenorhabditis<br/>elegans</i>  | $8,0 \times 10^7$               | 4                                |
| <i>Drosophila<br/>melanogaster</i> | $1,65 \times 10^8$              | 4                                |
| <i>Xenopus laevis</i>              | $3,0 \times 10^9$               | 18                               |
| <i>Mus musculus</i>                | $3,0 \times 10^9$               | 20                               |
| <i>Homo sapiens</i>                | $3,0 \times 10^9$               | 23                               |



# PCR

- Z celkové DNA si namnožíme jen úsek, který nás zajímá.
- Co se bude množit? To určí **primery**.
- **Primery** – krátké oligonukleotidy komplementární k úsekům ohraničujícím místo našeho zájmu.





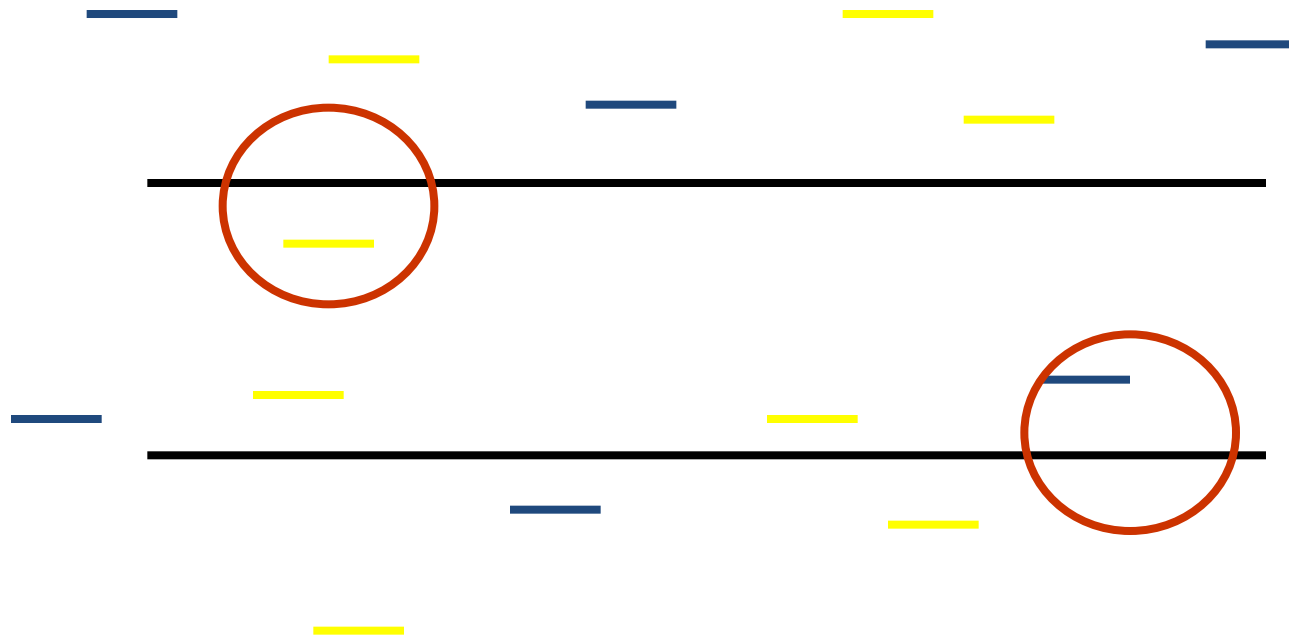
# Denaturace (obvykle 95 C)

při **zvýšení teploty** se oddělí komplementární vlákna DNA



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



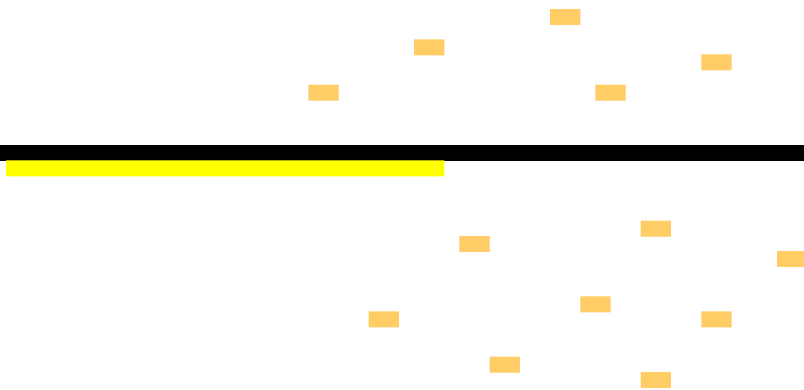
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

**Při ochlazení** primery přisednou rychleji než dojde k vzájemné reasociaci dlouhých vláken DNA (obvykle 50 - 65 C) – „annealing“ (= ochlazení)



V úseku mezi primery zůstanou vlákna DNA oddělena

**Primery jsou prodlužovány** přidáváním nukleotidů podle sekvence templátu (obvykle 72 C – optimum pro *Taq* polymerázu)

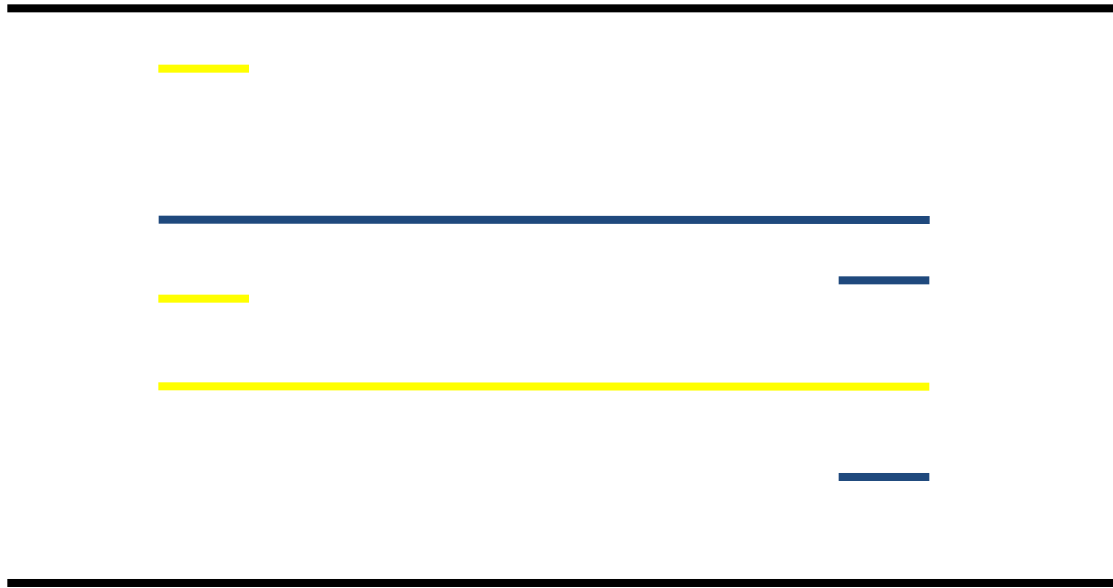


Primery poskytují volný 3 -OH konec, na který se mohou vázat další nukleotidy (podle principu komplementarity)

Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



Po ochlazení primery přisednou na templát i nově vzniklé fragmenty („annealing“)



Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií

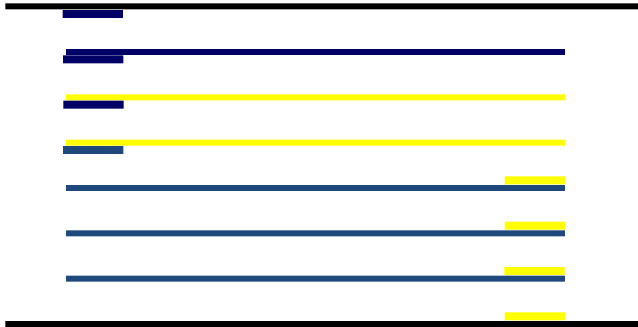


Při dalším zahřátí...





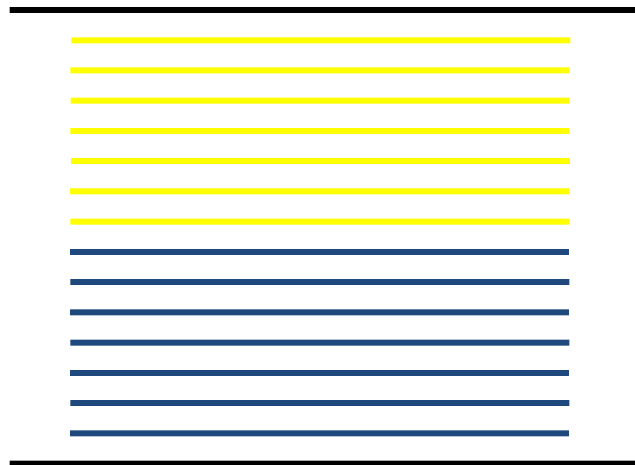
Ochlazení – nasednutí primerů



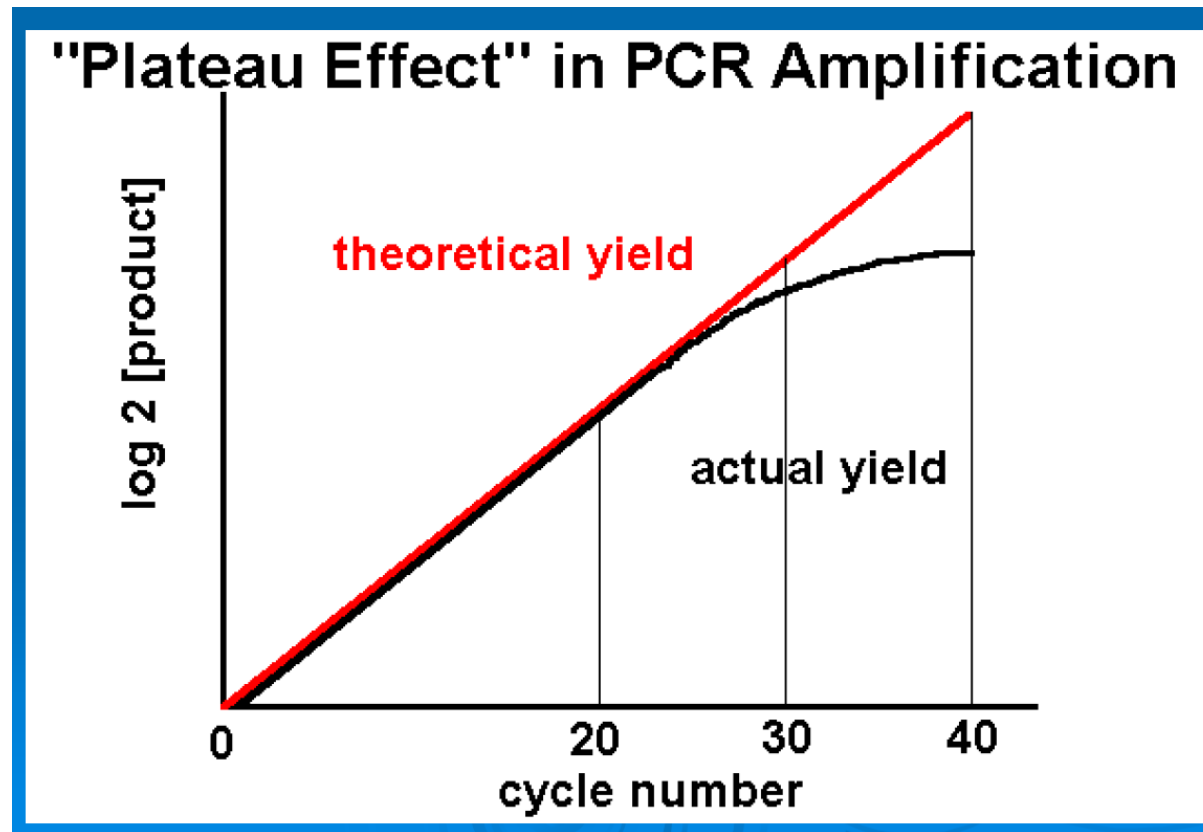
72 C vznik nových fragmentů



95 C denaturace



# Inhibice PCR vysokou koncentrací DNA





Cykly (obvykle 20-40):  
**denaturace (95°C )**  
**nasednutí primerů (50-65°C )**  
**elongace=polymerizace (72°C )**

Nejprve však často prodlužená denaturace celkové DNA

Nakonec prodloužená elongace

Příklad  
programu

95 C 3 min

95 C 30 s

60 C 30 s

72 C 1 min

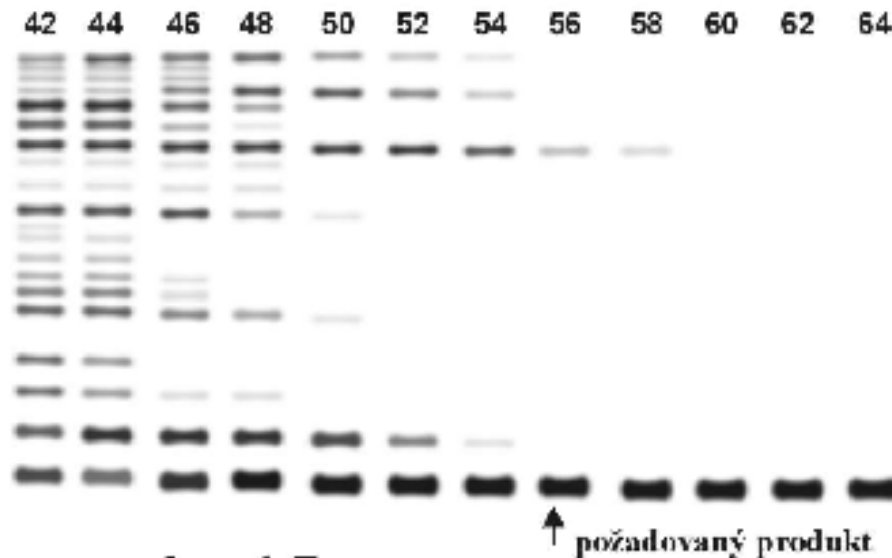
35x zpět

72 C 10 min



# Co když PCR nefunguje?

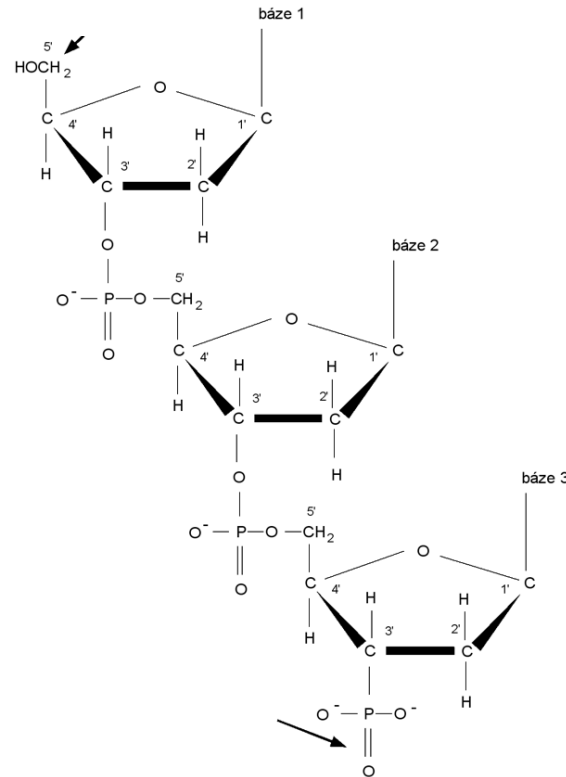
- Měníme teplotu „annealingu“ (nejlépe použijeme gradient teplot, pokud to náš cykler umí)  
Vyšší teplota=vyšší specificita
- Měníme koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů
- Navrhujeme nové primery



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

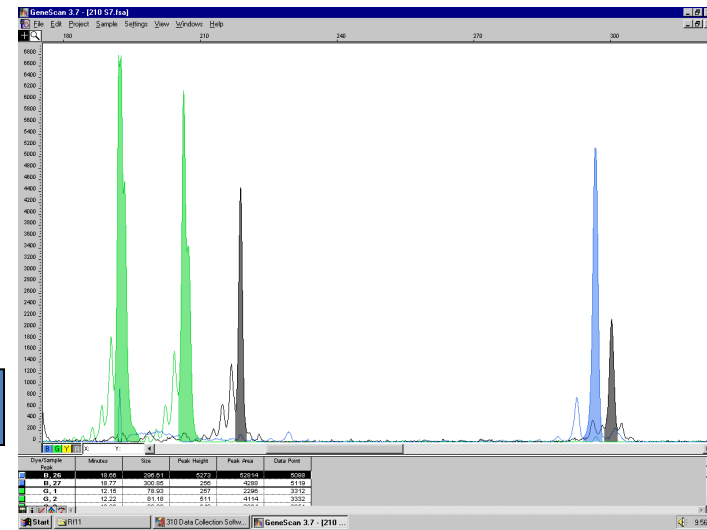
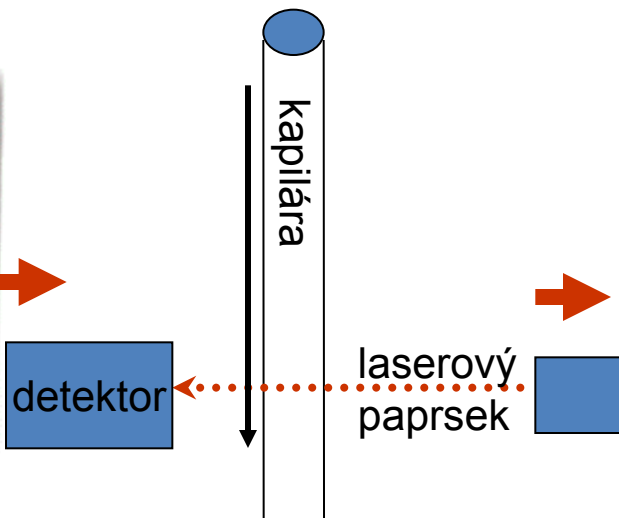
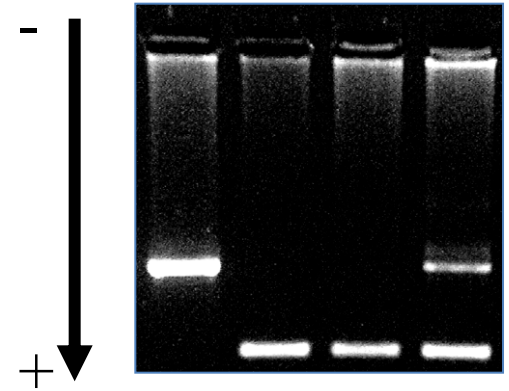
## 1) délkový polymorfismus

- elektroforéza DNA (DNA = záporný náboj)



# Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti („molekulové síto“)

- Agarosa - Hrubé rozdělení (do rozdílu 15 bp)
- Polyakrylamid – Přesnější rozdělení (4 bp)
- Sekvenátor, kapilární elektroforéza (fragmentační analýza) – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 2) sekvenční polymorfismus

- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza – mnoho různých metod (viz další přednášky)



**REAL TIME PCR**  
(= „kvantitativní PCR“)

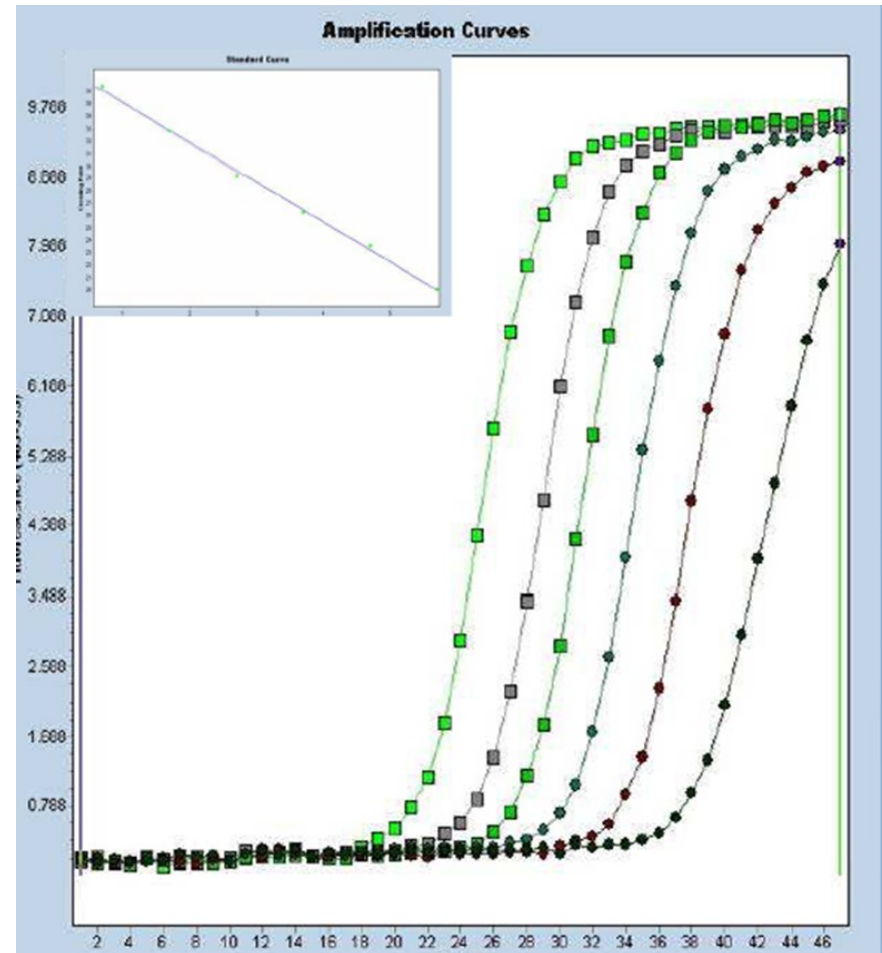


# Problém

- Kvantitativní rozdíly v expresi genů (tj. množství specifické mRNA určitého genu → reverzní transkripce → cDNA)
- Neinvazivní metody – nutnost stanovit, kdy je ještě ve vzorku dostatek DNA cílového druhu pro smysluplnou analýzu
- Genotypizace SNPs atd. (viz další přednášky)

# „Real-time PCR“

- fluorescence je měřena v každém cyklu (signál odpovídá množství PCR produktu)
- křivky se zvedají po určitém množství cyklů, které odpovídá **počátečnímu** množství DNA
- srovnání s kalibrační křivkou umožňuje kvantifikaci



# Fluorescenční strategie

## Nespecifická detekce

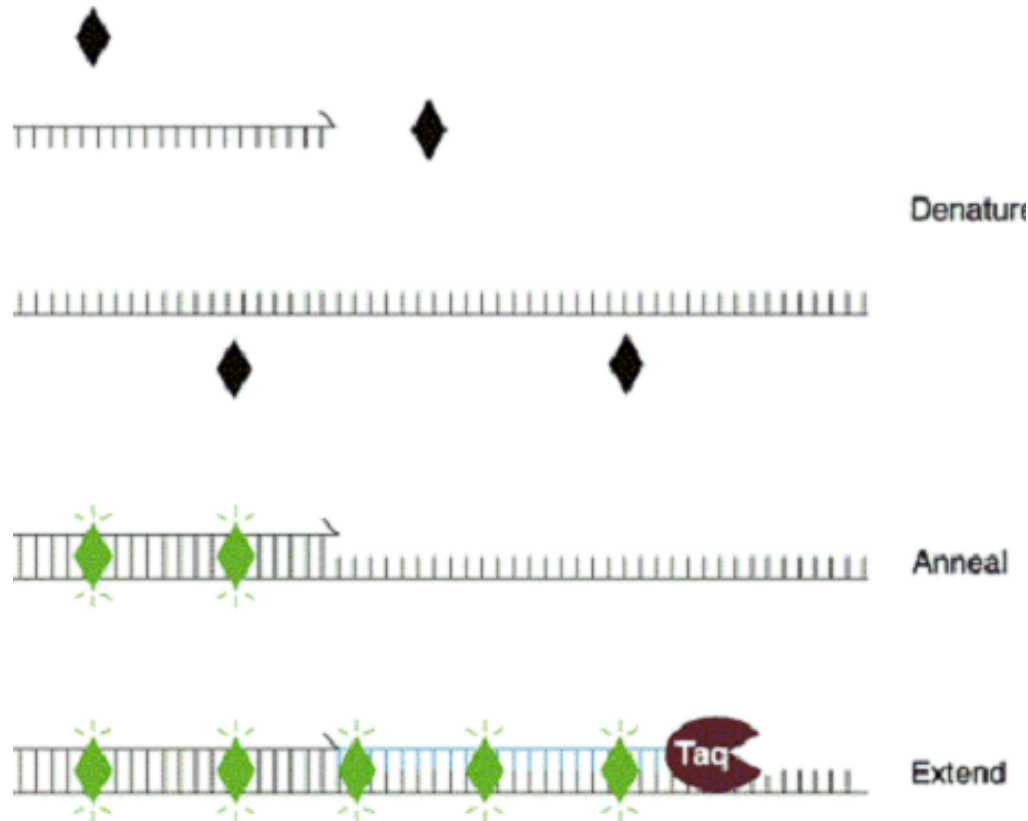
- SYBR Green, EVA Green, ...

## Specifická detekce (vyšší přesnost = specificita k amplifikovanému úseku)

- hydrolyzační sondy (TaqMan)
- hybridizační sondy (FRET, Molecular beacon)
- others ...

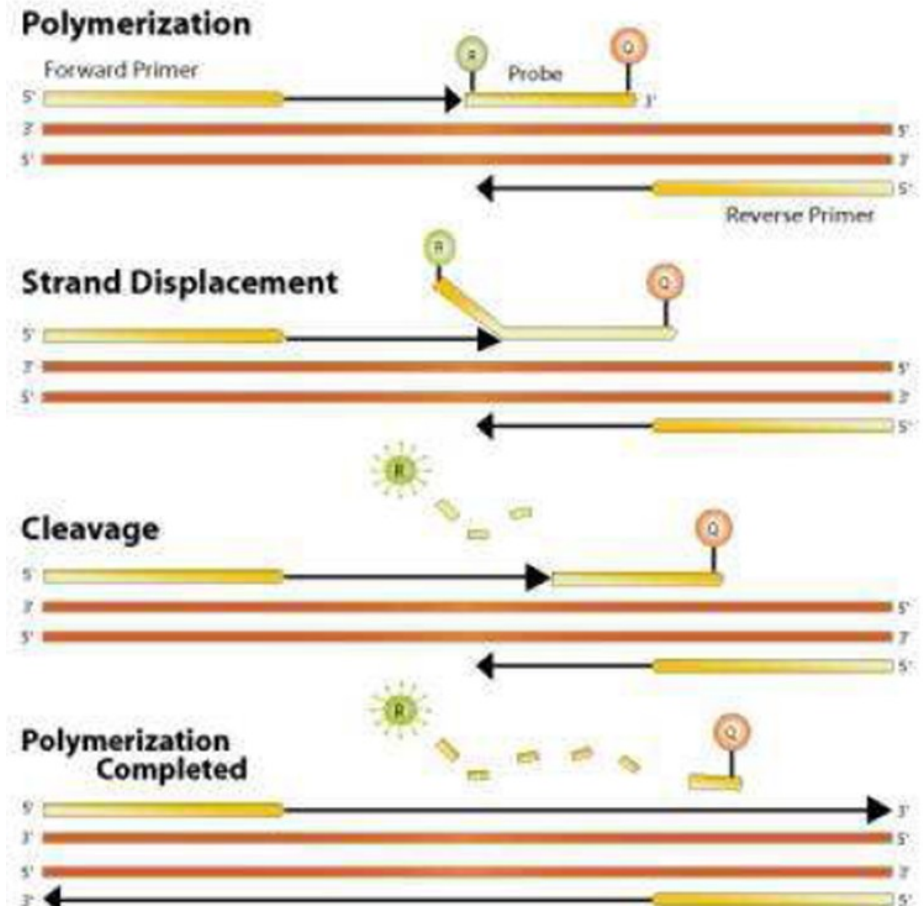
# SYBR Green / EVA Green

- „barvička“ po inkorporaci (interkalaci) do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci



# TaqMan hydrolyzační sondy

- intaktní sonda = žádná fluorescence („Quencher“ blokuje „Reporter“)
- 5'-exonukleázová aktivita DNA-polymerázy degraduje sondu → uvolnění fluorescence



# „Molecular beacon“ hybridizační sondy

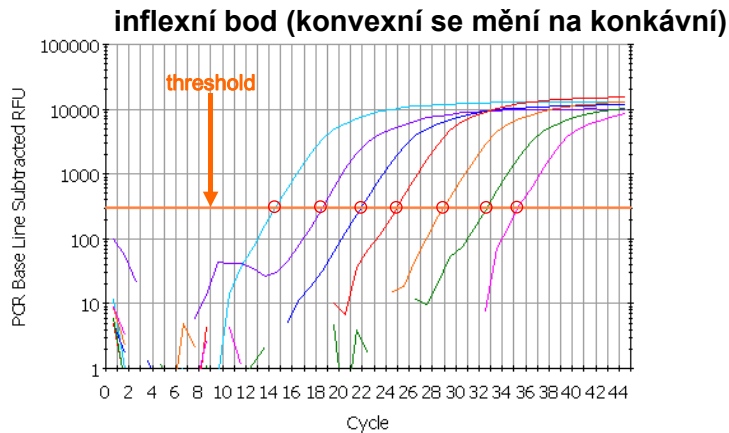
- specifická 3D struktura intaktní sondy („vlásenka“) – nevyzařuje žádnou fluorescenci
- „Quencher“ uvolní „Reporter“ po dosednutí na amplifikovaný úsek (v annealing fázi)



# Real-time PCR přístroje

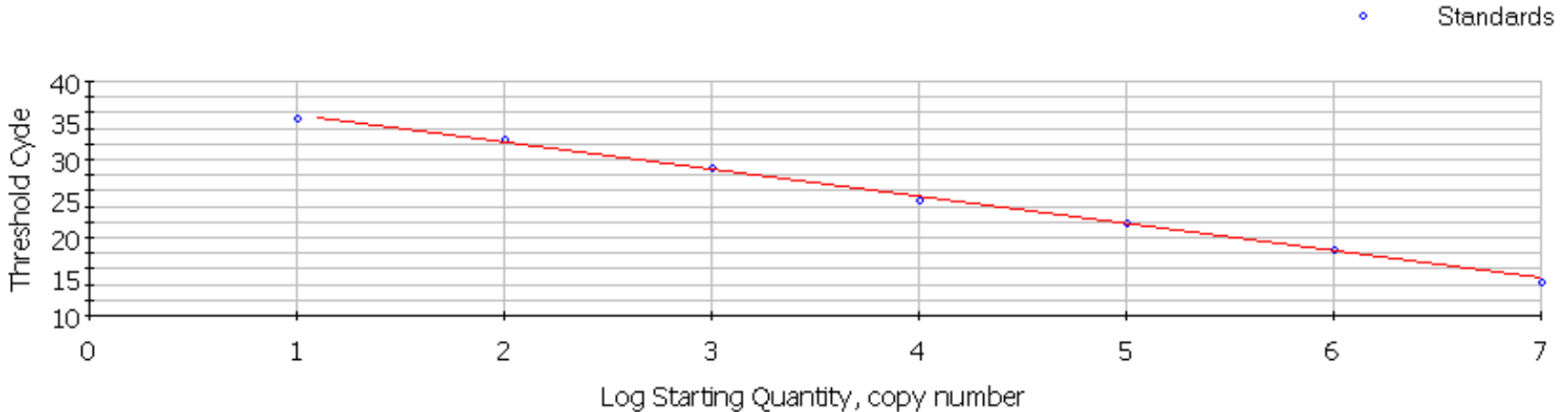


# Absolutní kvantifikace



- 1) Vytvoření kalibrační křivky (vzorky se známou koncentrací templátu)
- 2) Real-time PCR se vzorkem s neznámým množstvím DNA, např. z trusu

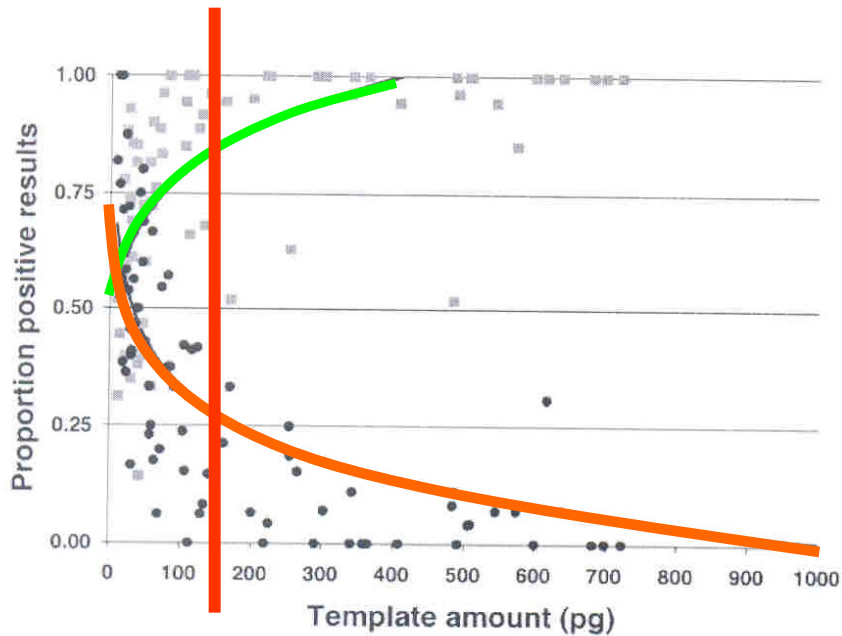
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$



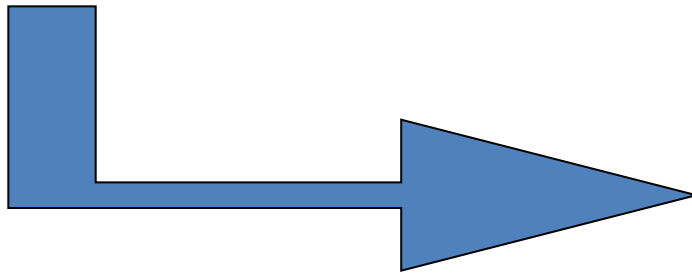
PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd



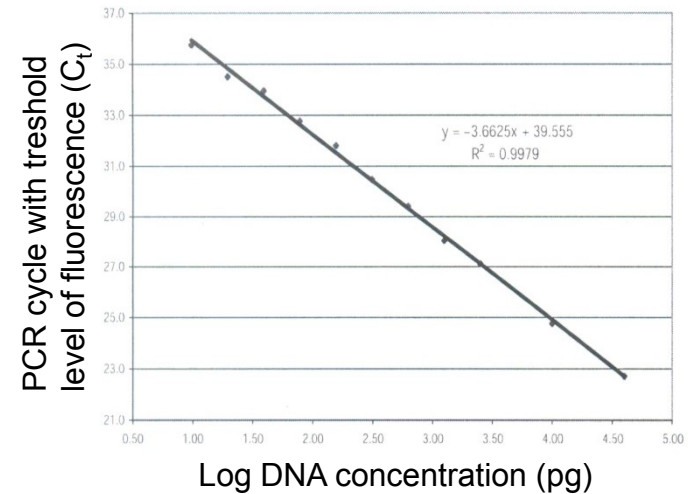
# Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Positive PCR Allelic dropout



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků



# Relativní kvantifikace - standardy

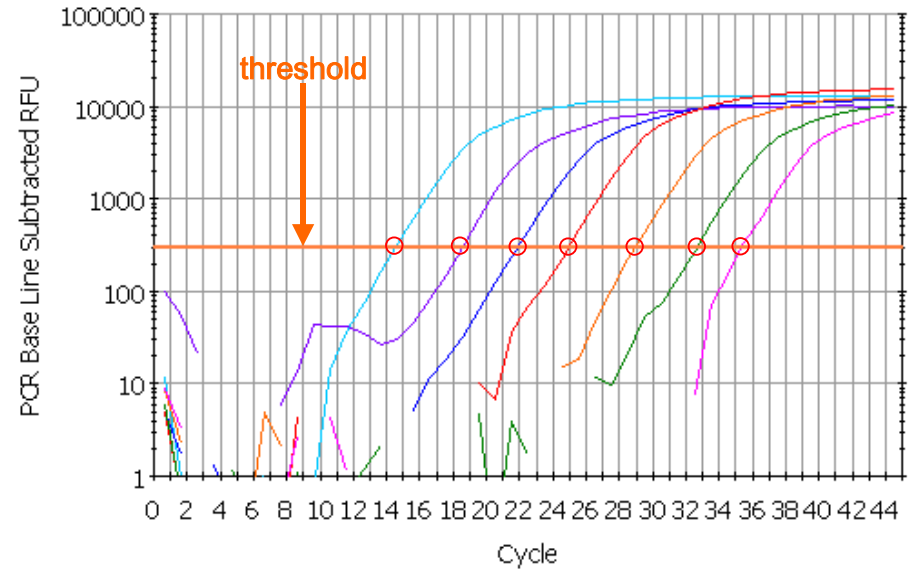
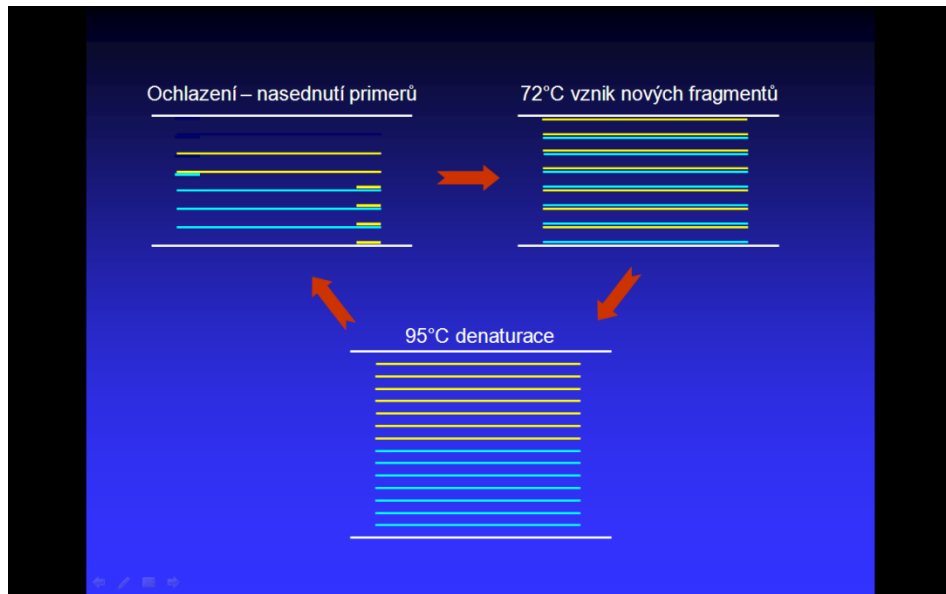
- Měření kvantity určité DNA, např. úroveň exprese (tj. určité RNA=cDNA) nebo množství mitochondrií (tj. mtDNA) (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.)
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách (např. geny kódující cytoskelet)
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu
- v různých systémech takto fungují různé geny – nutno vždy znovu ověřit a optimalizovat

## PCR a qPCR s hydrolyzační sondou - VIDEO

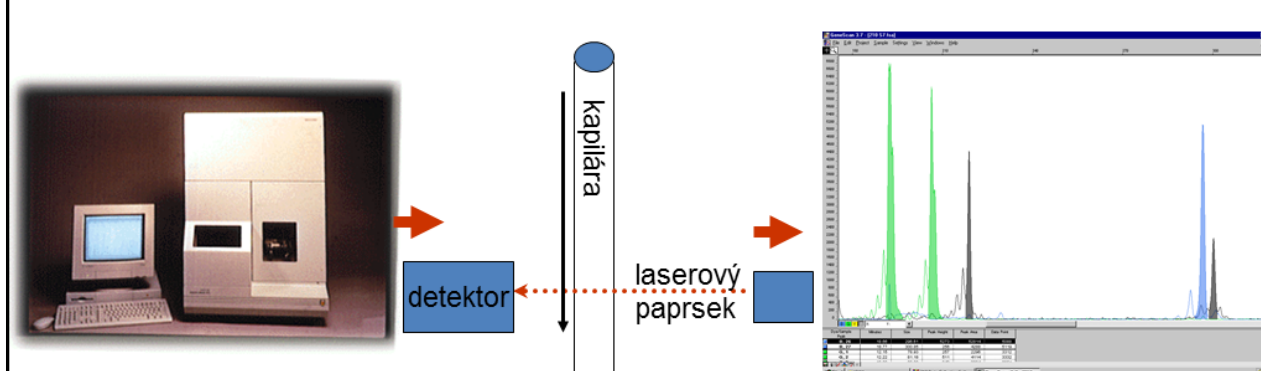
<https://www.youtube.com/watch?v=FIgGKkcLLuo>

# PCR

# qPCR



- Sekvenátor, fragmentační analýza – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



kapilární elektroforéza

# Sangerovo sekvenování

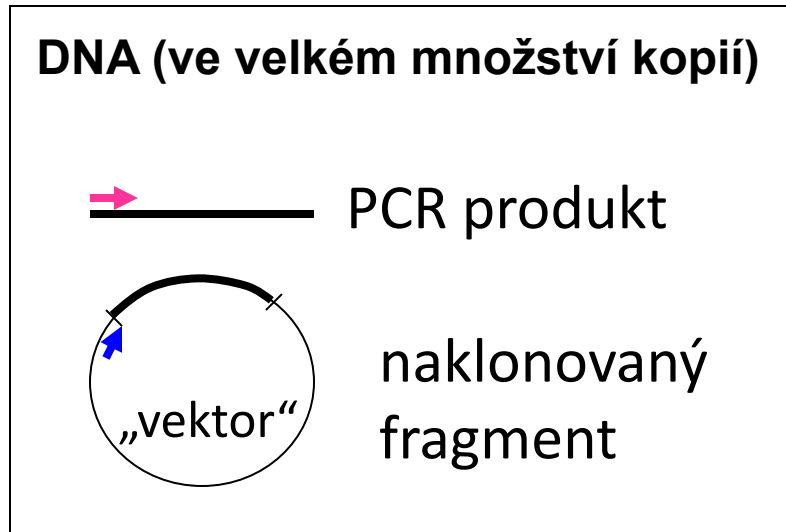
# Sekvencování DNA

- ~~Maxam-Gilbertova (chemická) metoda: bázově-specifická chem. modifikace a štěpení fragmentů DNA~~

- Sangerova (enzymatická) metoda: terminace replikace pomocí ddNTP

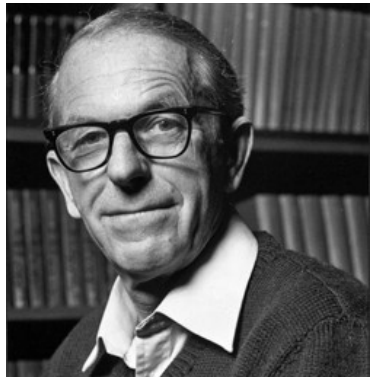
- paralelní „high-throughput“ sekvenování:  
= NGS („next-generation sequencing“)

# Sangerovo sekvenování DNA



## Sekvenační reakce:

- směs standardních nukleotidů a značených dideoxynukleotidů
- **jeden specifický** nebo **universální** primer – poskytuje volný 3 -OH konec



„dideoxy metoda“

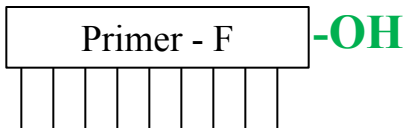
**Frederick Sanger (1918-2013)**

Nobel prize 1958 (struktura inzulinu) a 1980 (sekvenování bílkovin a nukleových kyselin)

- **jen jeden primer**

- vysoká koncentrace templátu (hodně kopií – buď PCR nebo klony v bakteriích)

- směs deoxynukleotidů a fluorescenčně značených dideoxynukleotidů



1. Denaturace - 96°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C



# Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer



## Přisedání deoxynukleotidů ...



1. Denaturace - 96°C

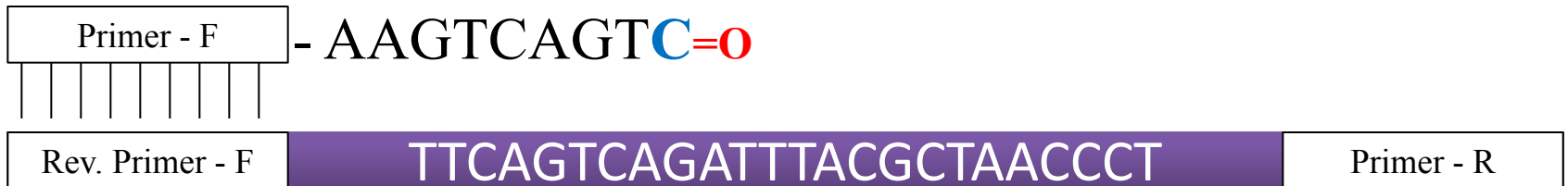
3. Polymerizace - 72°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C

# Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer



**Přisedání deoxynukleotidů ...**  
**... až narazí na dideoxynukleotid**



1. Denaturace - 96°C

3. Polymerizace - 72°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C

# Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer

Primer - F - AAGTCAGTC=O

Primer - F - AAGTCAGTCTAA=O

Rev. Primer - F

TTCAGTCAGATTACGCTAACCT

Primer - R

1. Denaturace - 96°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C

3. Polymerizace - 72°C

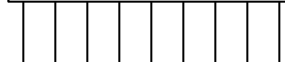
35 x

# Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer

Primer - F - AAGTCAGTC**C=O**

Primer - F - AAGTCAGTCTA**A=O**

Primer - F - AAG**T=O**



Rev. Primer - F **TTCAGTCAGATTACGCTAACCT** Primer - R

1. Denaturace - 96°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C

3. Polymerizace - 72°C

35 x

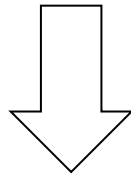
# Výsledek sekvenační „PCR“

Primer - F - AAGTCAGTC**C=O**

Primer - F - AAGTCAGTCTAA**A=O**

Primer - F - AAG**T=O**

... a řada dalších fragmentů, každý z nich označený fluorescenčním dideoxynukleotidem



## **Kapilární elektroforéza**

- seřazení fragmentů podle délky
- detekce barvy dideoxynukleotidů

# Detekce fragmentů - kapilární elektroforéza

Primer - F - AAGTCAGTCTAA**A**=0

Primer - F - AAGTCAGTCT**A**=0

Primer - F - AAGTCAGTCT**T**=0

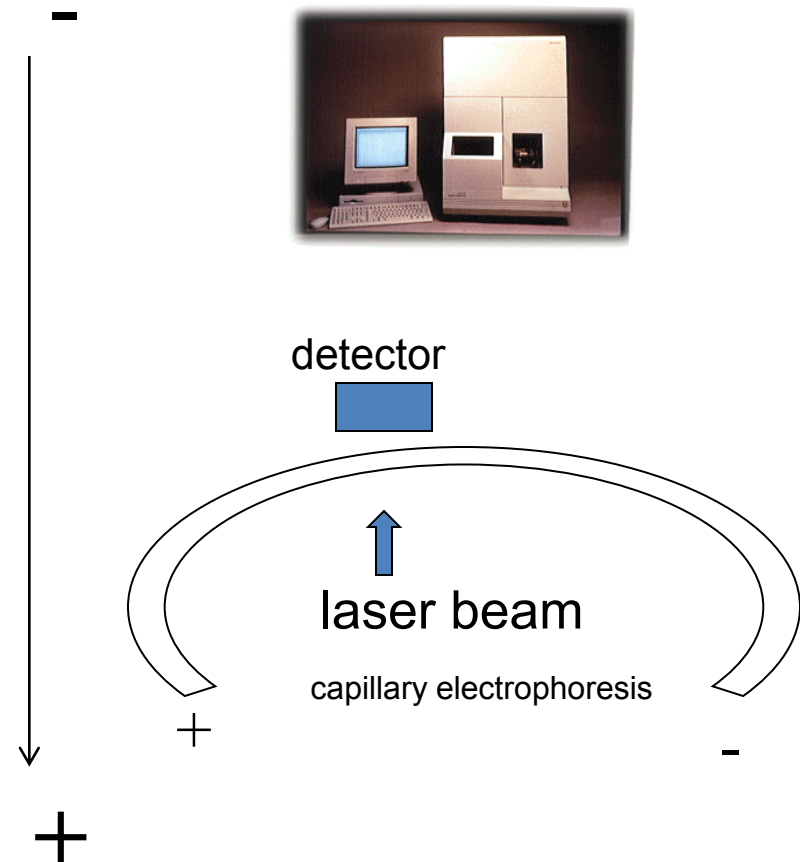
Primer - F - AAGTCAGT**C**=0

Primer - F - AAGTCAG**T**=0

Primer - F - AAGTCAG**G**=0

Primer - F - AAGTC**A**=0

Primer - F - AAGTC**C**=0

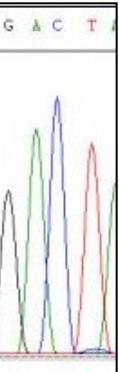


# Detekce fragmentů - kapilární elektroforéza

Primer - F - AAGTCAGTCTAA**A**=0 -

Primer - F - AAGTCAGTCT**A**=0

- Sekvence délky 500 – 1000 bp (cca 100 Kč za sekvenci, bez PCR a přečištění PCR produktu)
- 4 kapiláry - destička s 96 vzorky za noc
- Jsou i sekvenátory s 96 kapilárami



Primer - F - AAGTC**C**=0

+

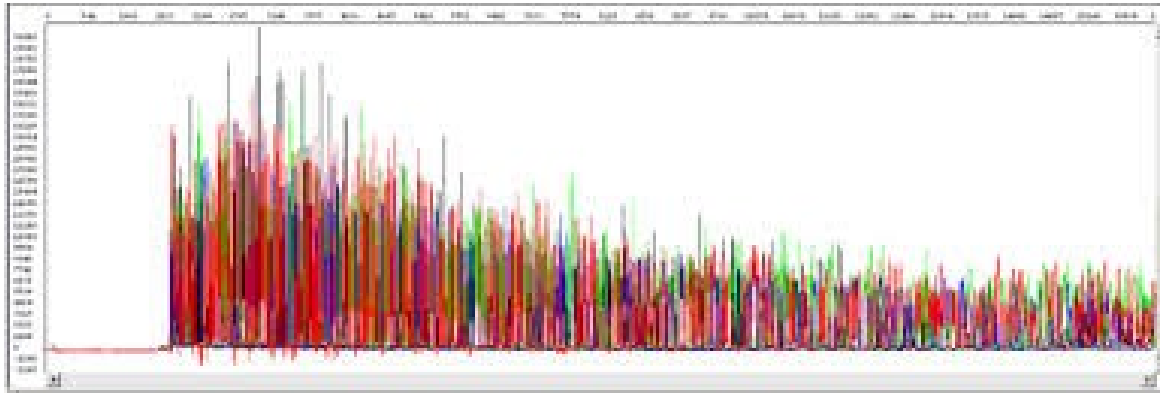
Primer - F - AAGTC**CAGTCTAA**ATGCGATTGGGA

Rev. Primer - R

Rev. Primer - F - TTCAGTCAGATTACGCTAACCT

Primer - R

# Editace sekvencí

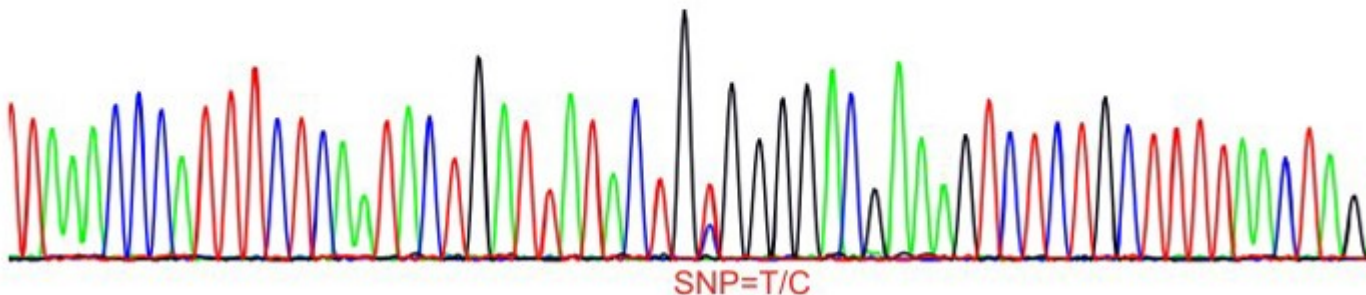


„raw data“ (.ab1 file)  
electrophoretogram



„basecalling“ (specializovaný software)

T T A A C C C A T T T C T C A A T A C T G A T T A T A C T G T G G G G A C G A A A G T C T C T G C T T T T A A C T A G  
145 157 169 181 193



„trimming“  
(ořezání konců  
s nízkou kvalitou)