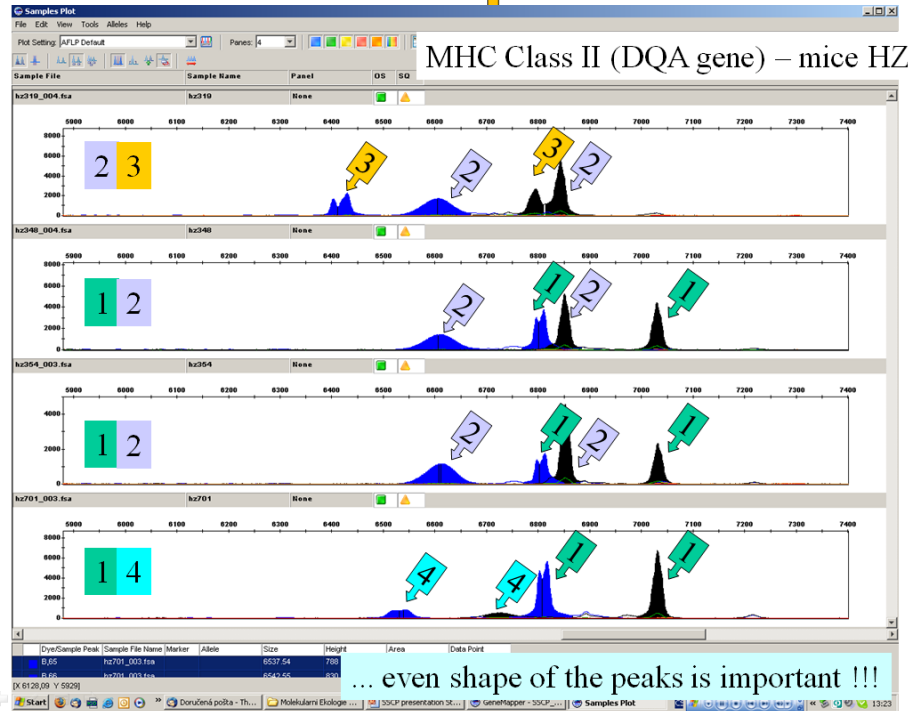
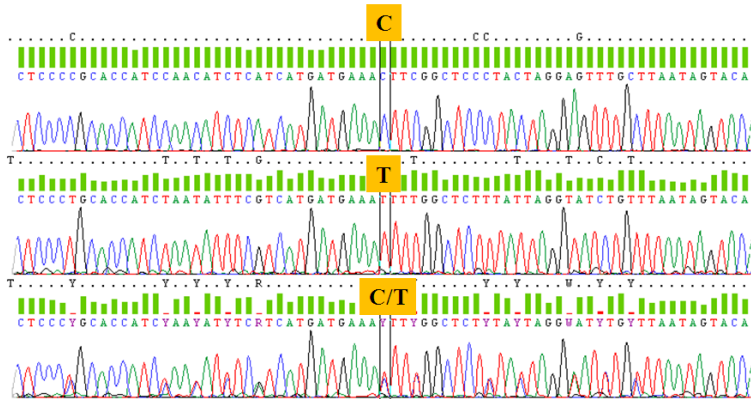


# SNPs genotyping - sekvenování? Je drahé a nejasné u heterozygotů

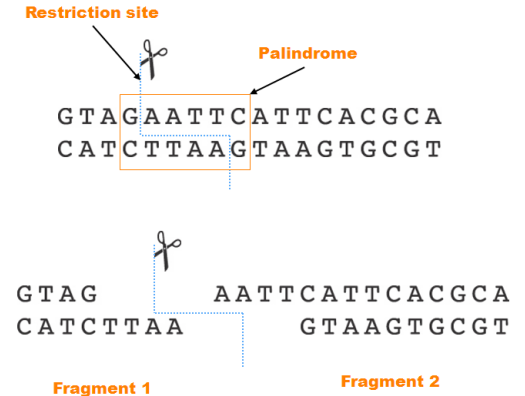


# SNP genotyping - old standards

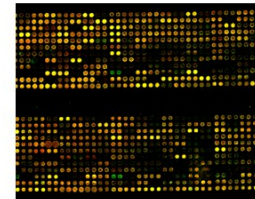
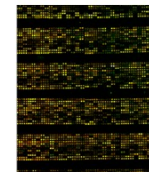
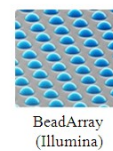
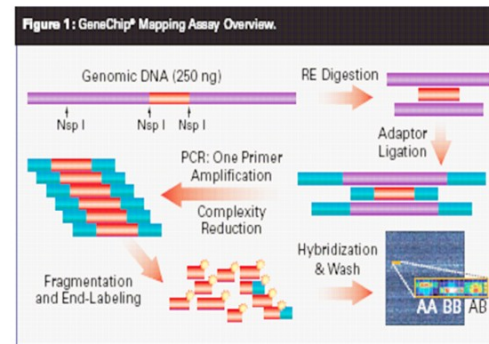
**PCR-RFLP**  
(restriction fragments length polymorphism)

**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



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

# Typy genetických markerů

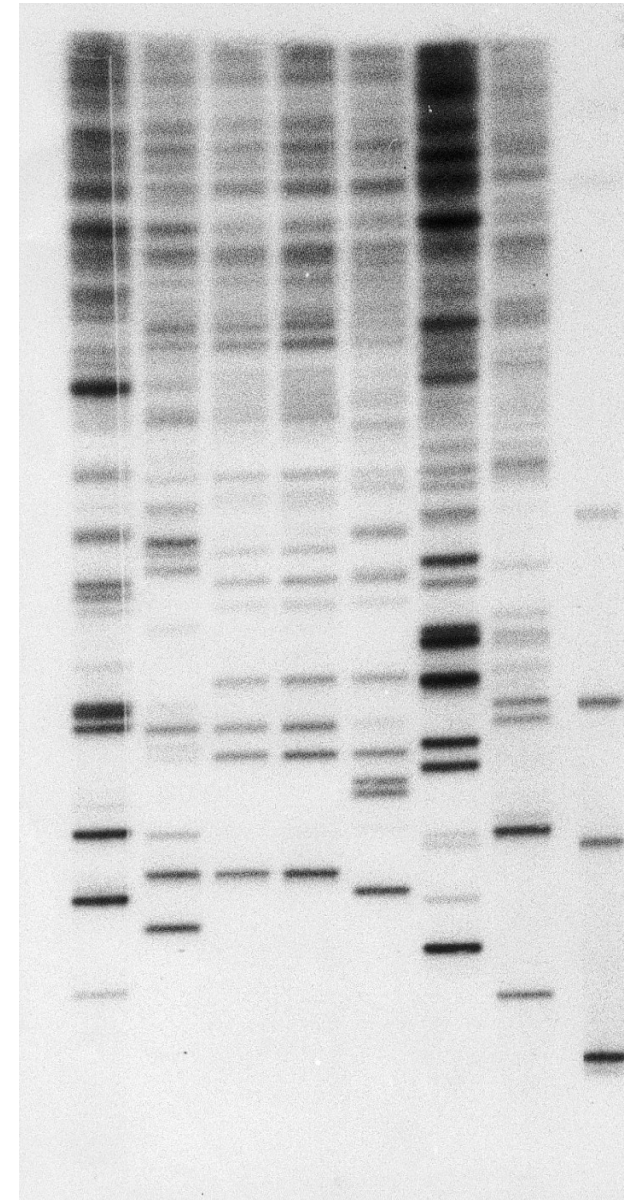
	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Nuclear multilocus				



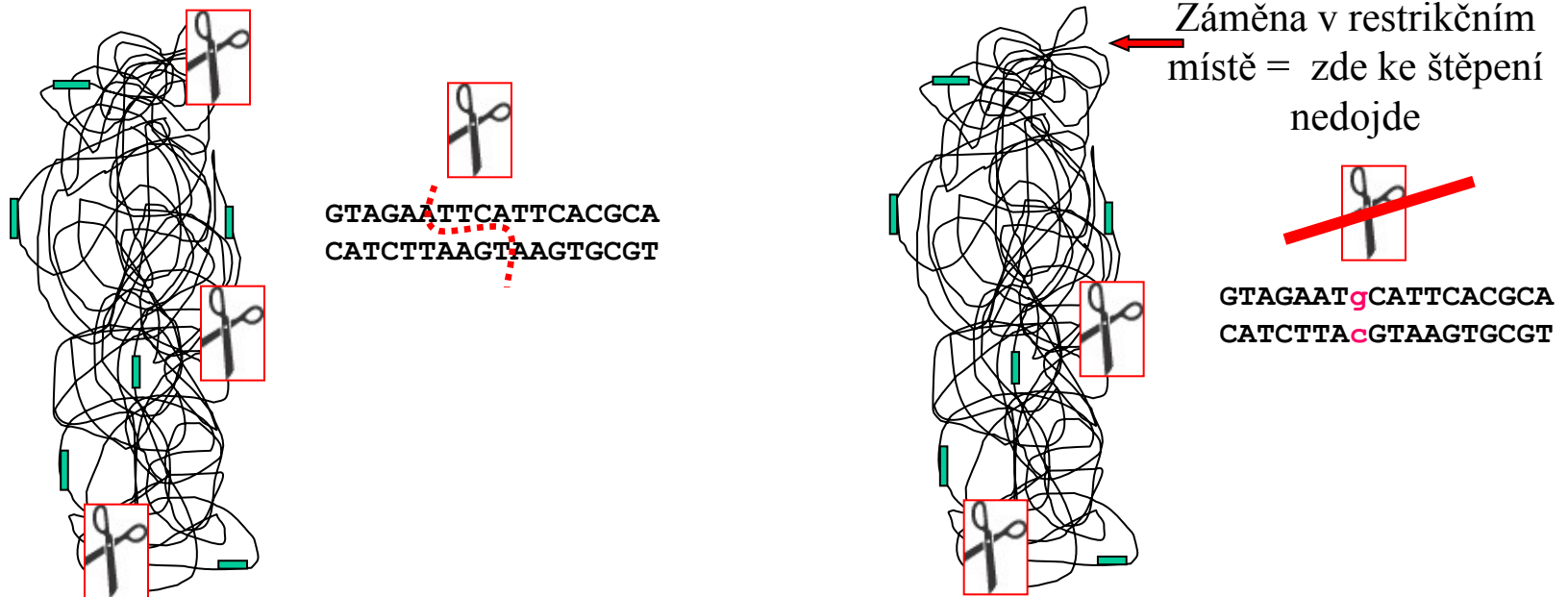
Nuclear single locus				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
Mikrosatelite	Yes	Yes	Yes	High
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
SNPs	Yes	Yes	Yes	Low-high

# 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***

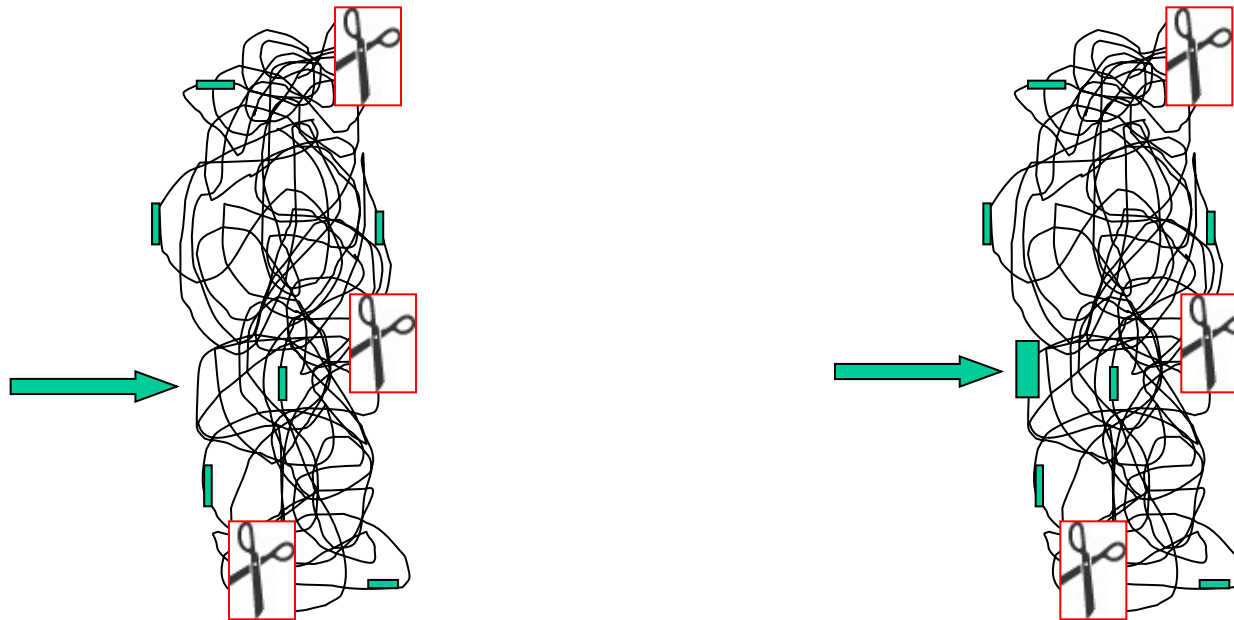
- *Escherichia coli*
- 5 prime overhang



***PstI***

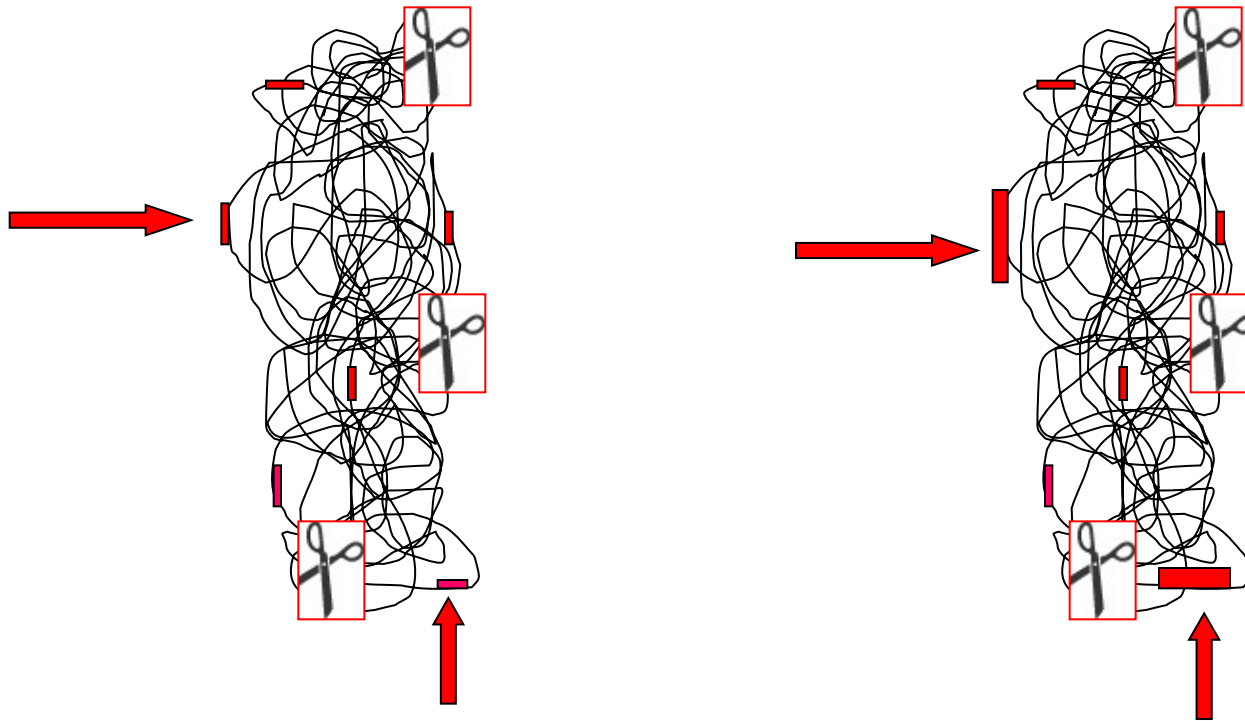
- *Providencia stuartii*
- 3 prime overhang

# 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



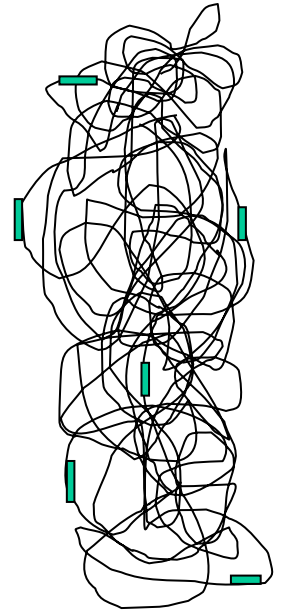
# Repetitivní DNA

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

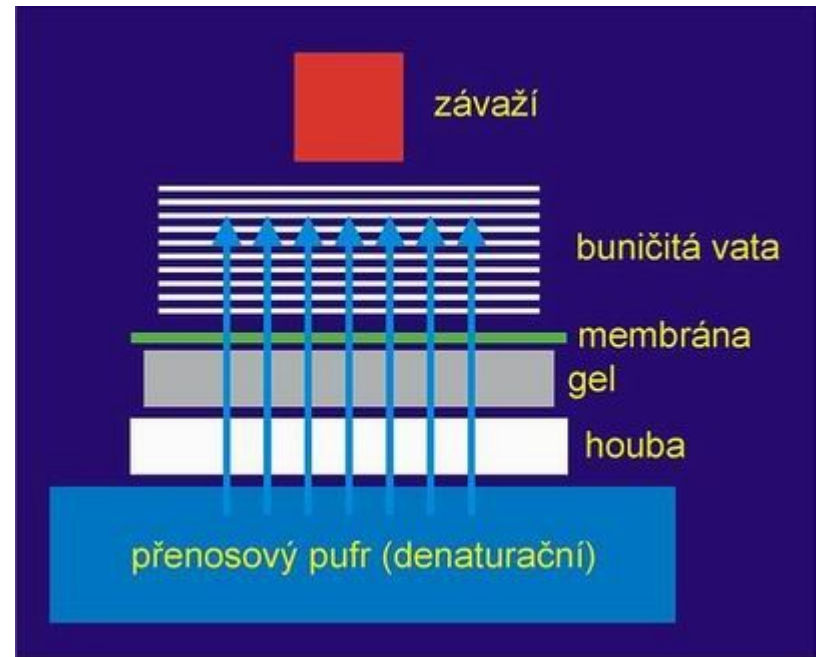
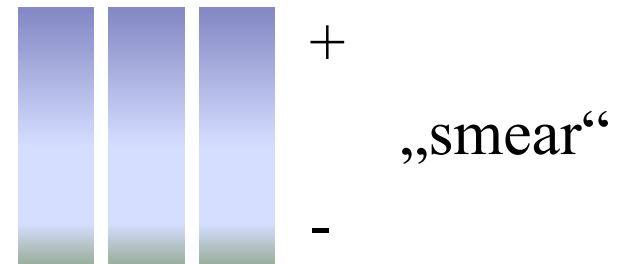
(Jeffreys et al. 1985)

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



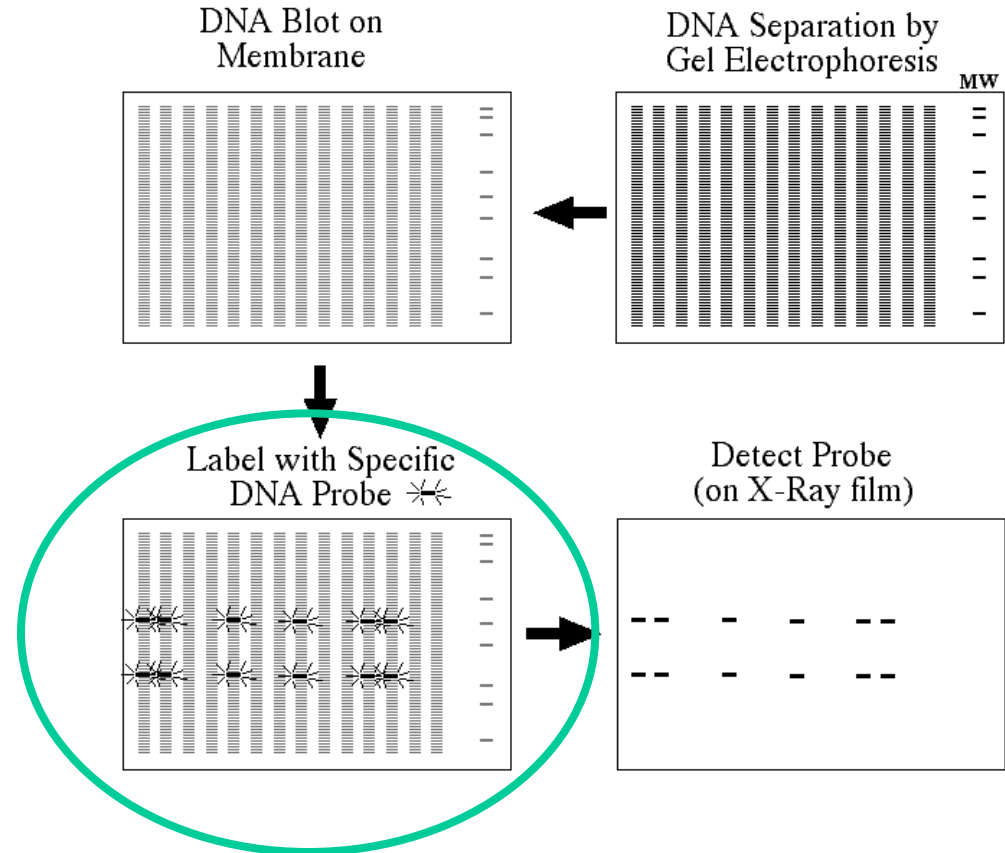
# Minisatellite DNA fingerprinting

- 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)



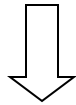
# Minisatellite DNA fingerprinting

- 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)



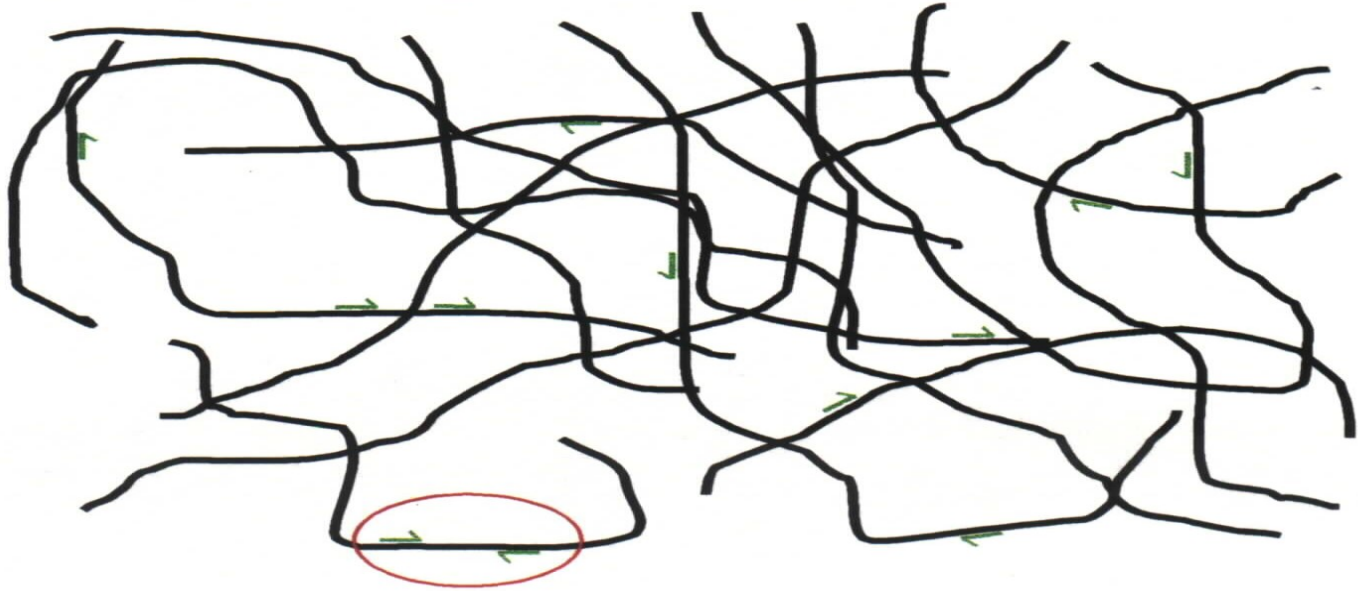
# RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

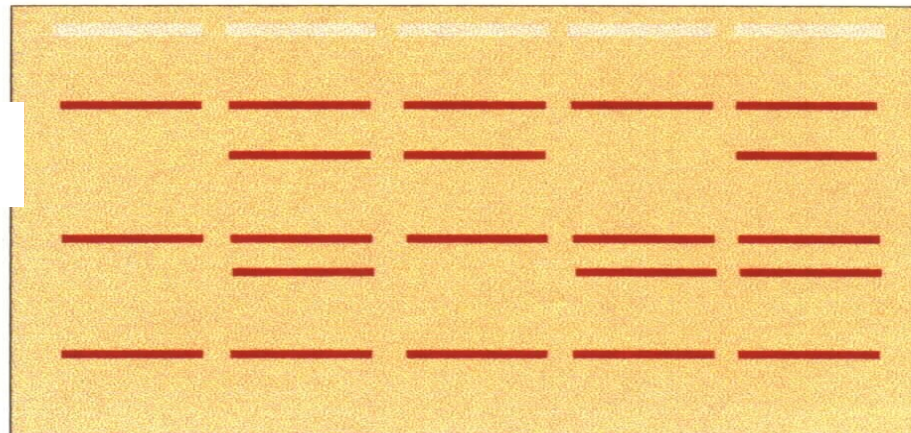


PCR za málo specifických podmínek

# genomic DNA



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



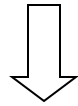
## Variabilní DNA detekovaná metodou RAPD:

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

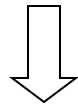


# RAPD

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

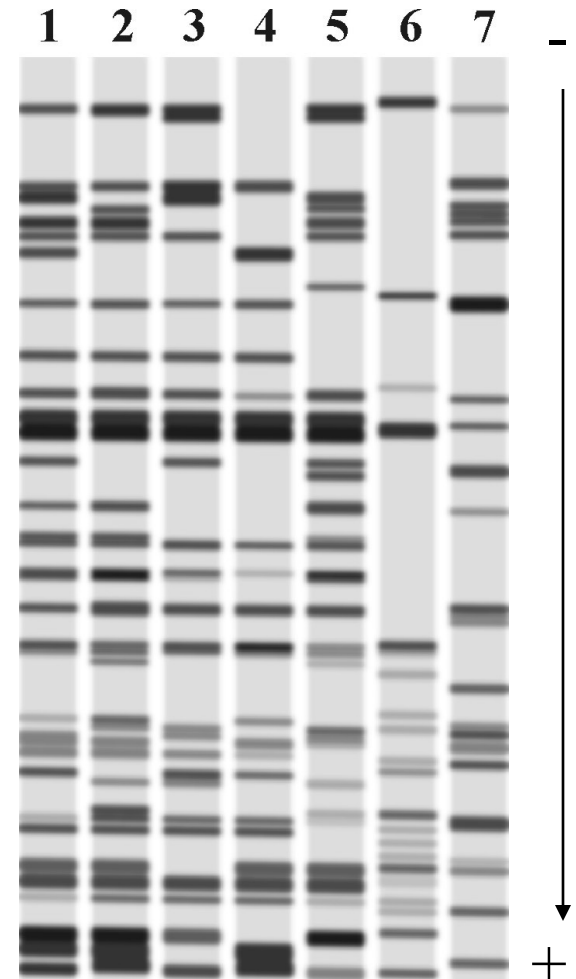


PCR za málo specifických podmínek



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

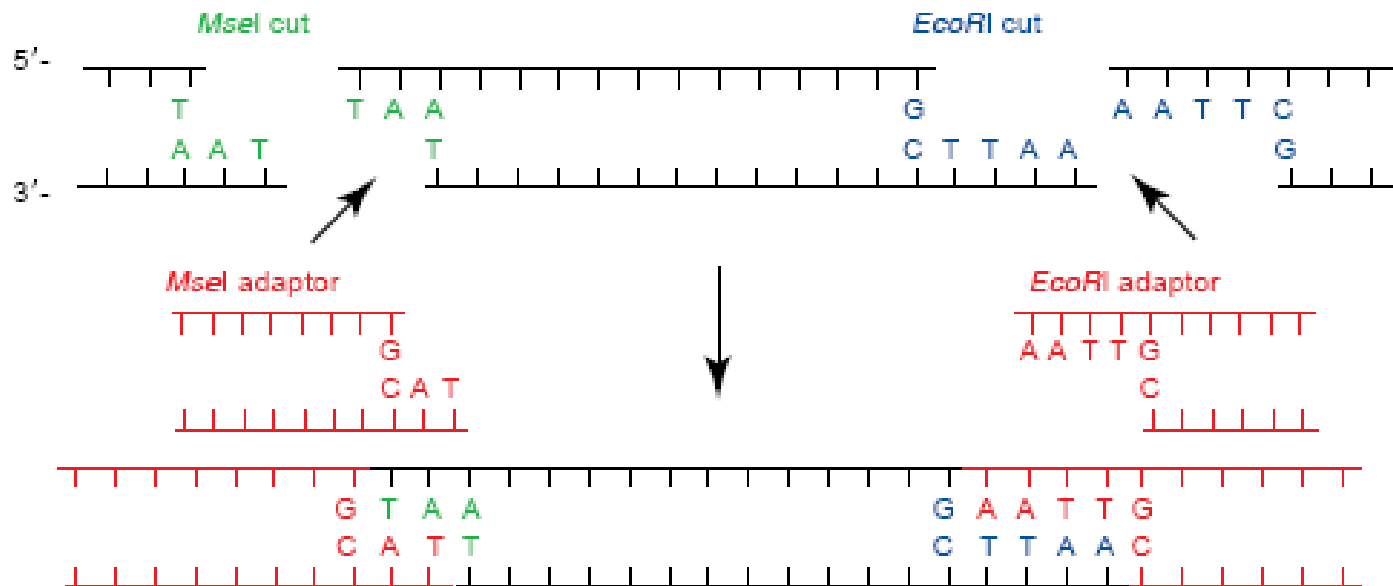
Whole genomic DNA



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

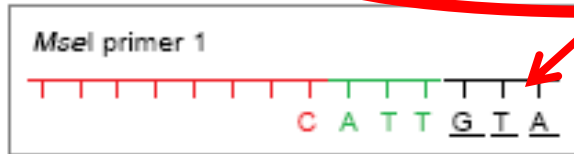


(b) Restriction and ligation

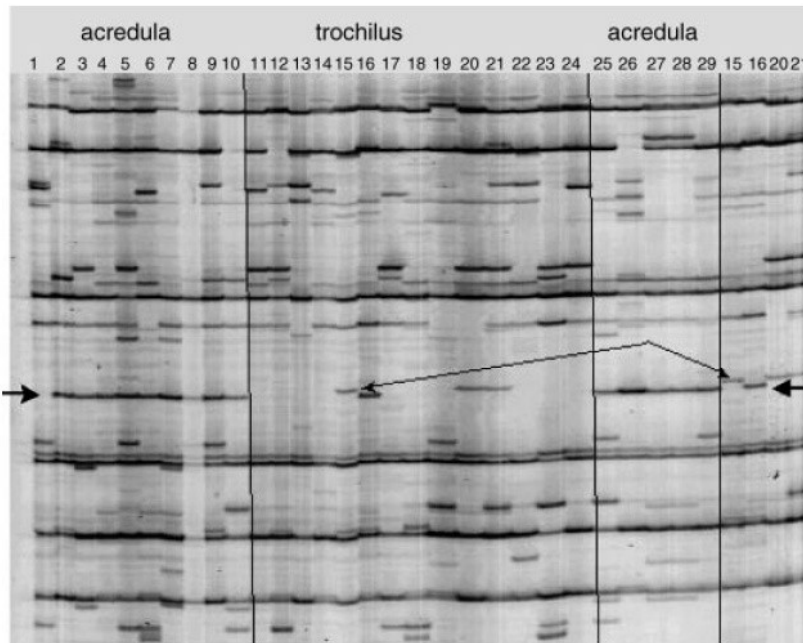
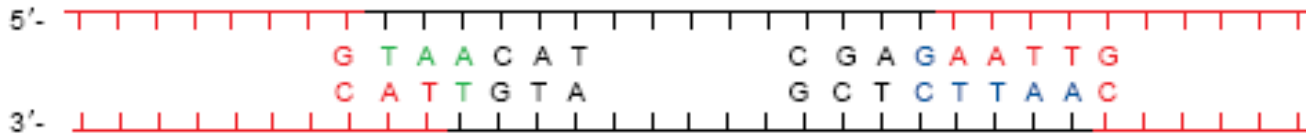


# Generating AFLP markers

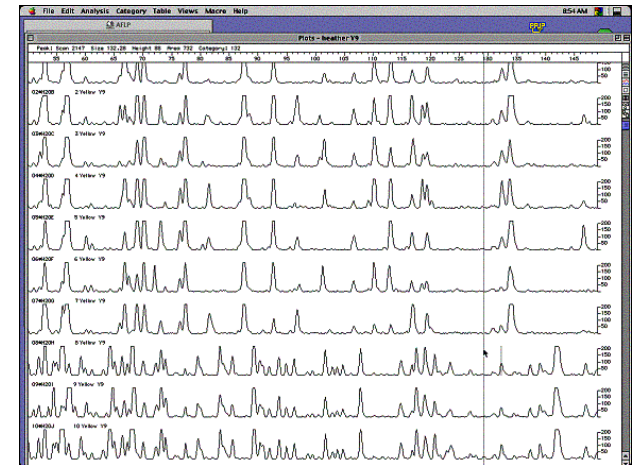
(c) Selective amplification (one of many primer combinations shown)



PCR with primers on adaptors



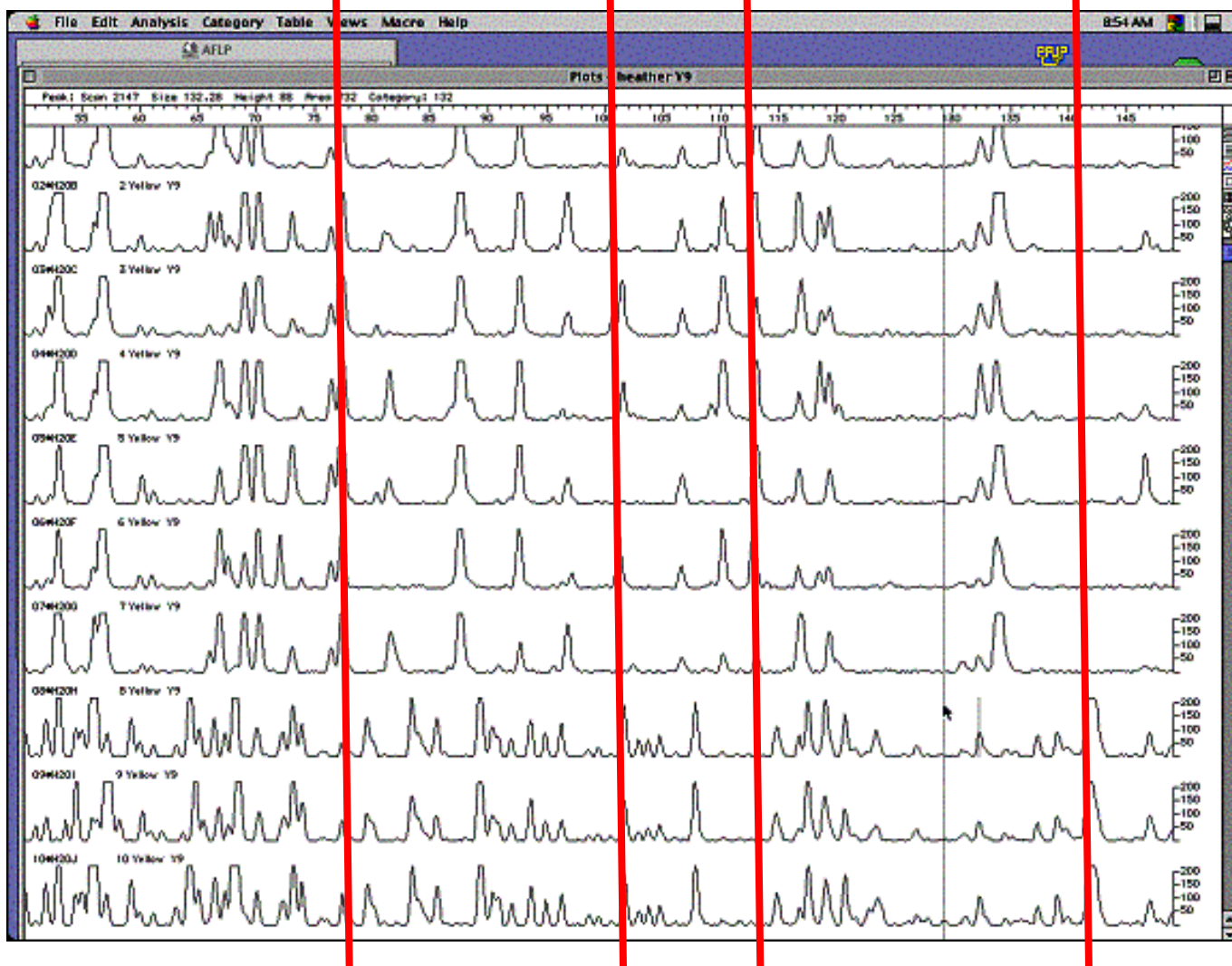
multi-locus genotype



„capillary version“

Ex.:  
Combination  
MseI + EcoRI

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



# Vyhodnocení dat - např. shluková analýza

