

Genetické metody v zoologii

Josef Bryja (bryja@ivb.cz)

Miloš Macholán (macholan@iach.cz)

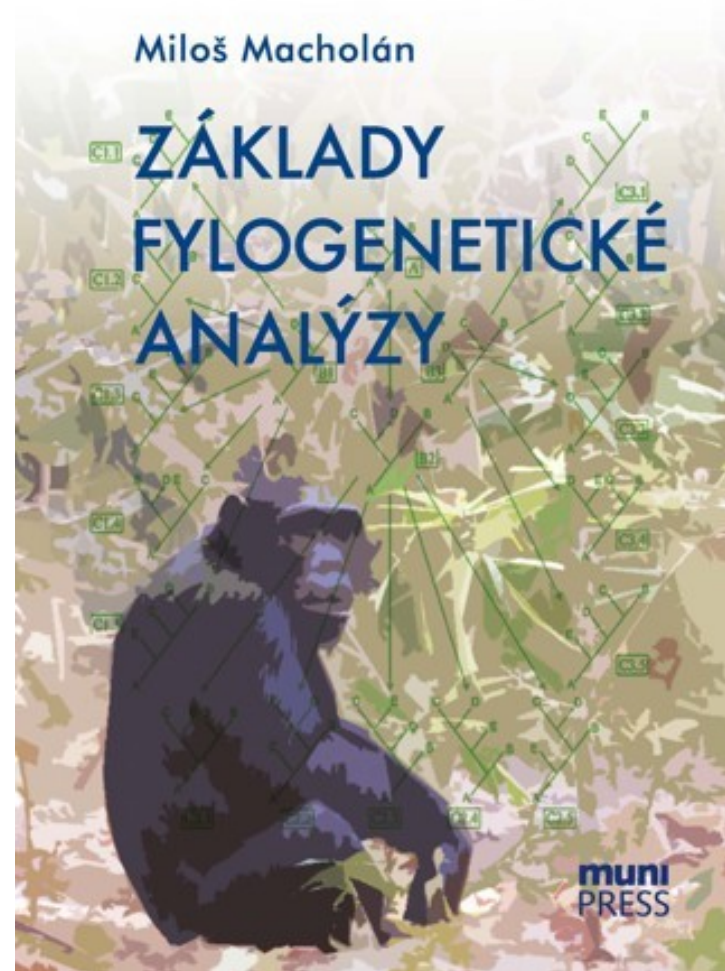
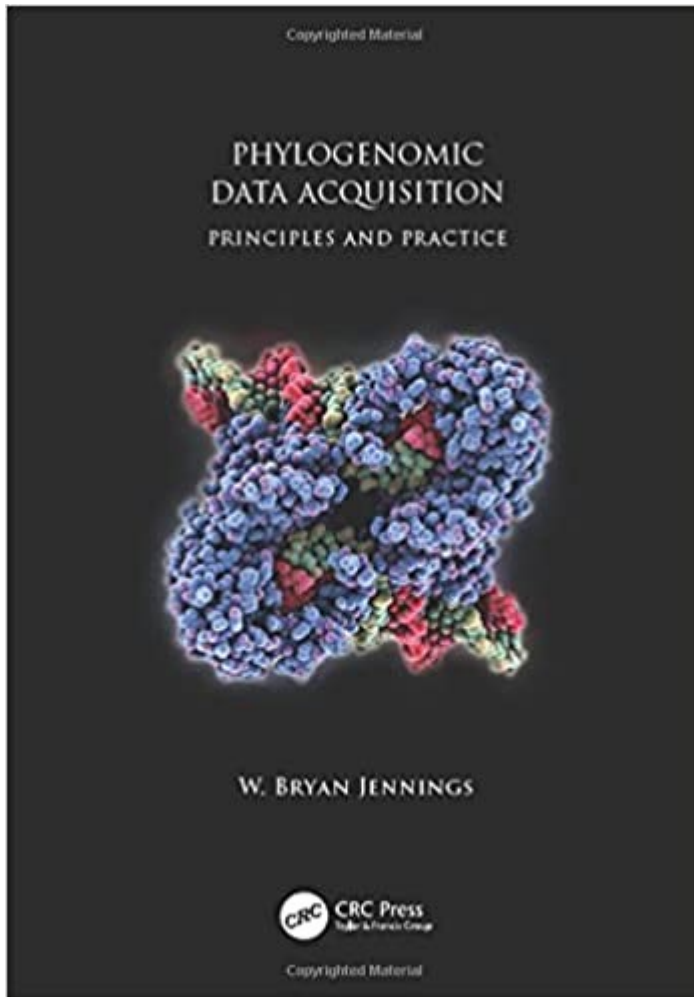
Doporučená literatura (česká)

Genetické metody v zoologii

Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

Nakladatelství Karolinum 2004



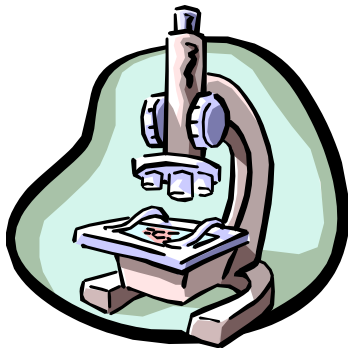


- M. Macholán
- Základy fylogenetické analýzy (2014)

Proč?

Problém:
zoologie, taxonomie
ekologie, evoluční biologie

Genetické metody:



klasické metody
morfologická,
ekologická,
bionomická
data

**genetická data
(nejčastěji
DNA)**



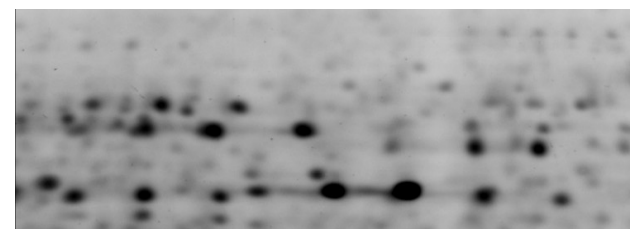
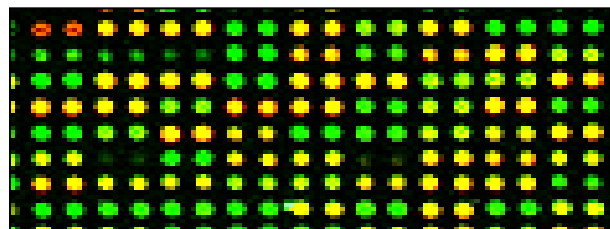
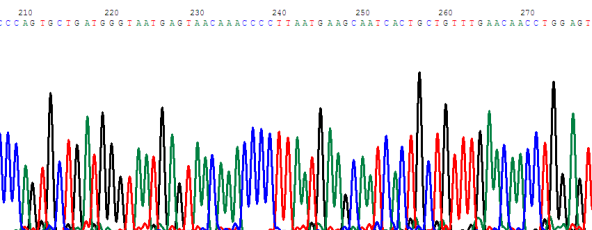
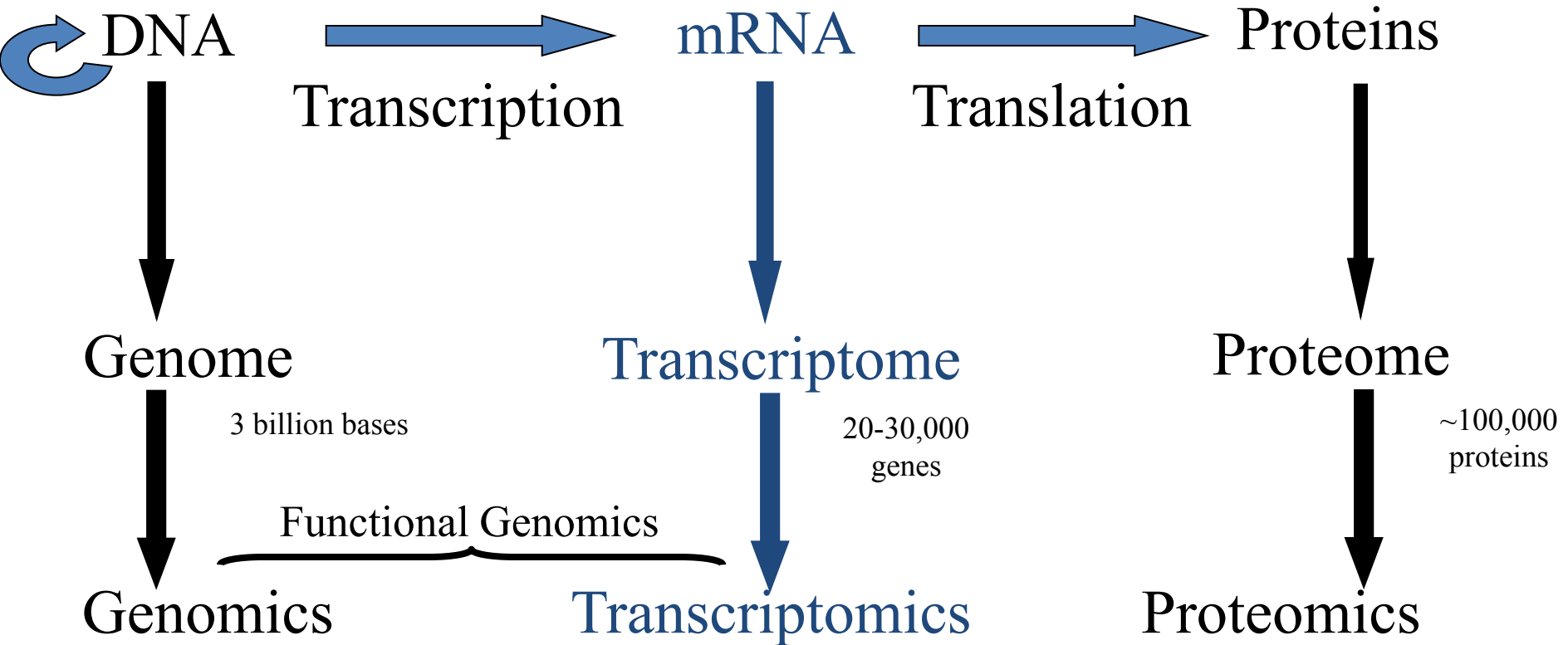
**Další úroveň poznání
Odpovědi na nové otázky**

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 ...

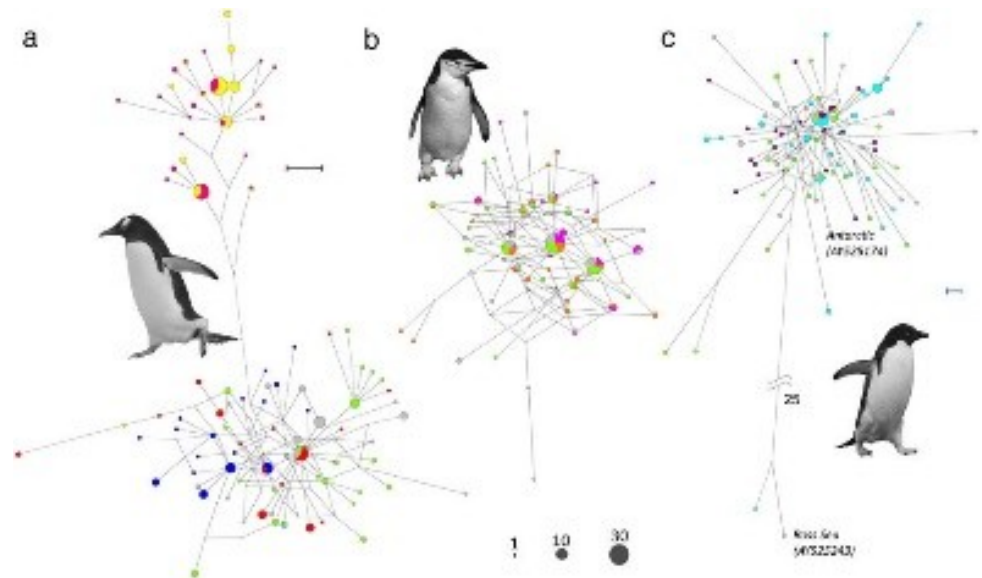
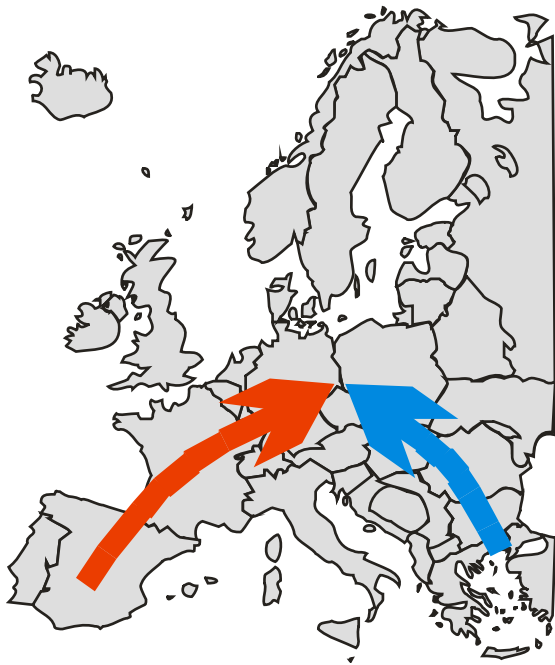
Genetické metody

= studium genetické variability



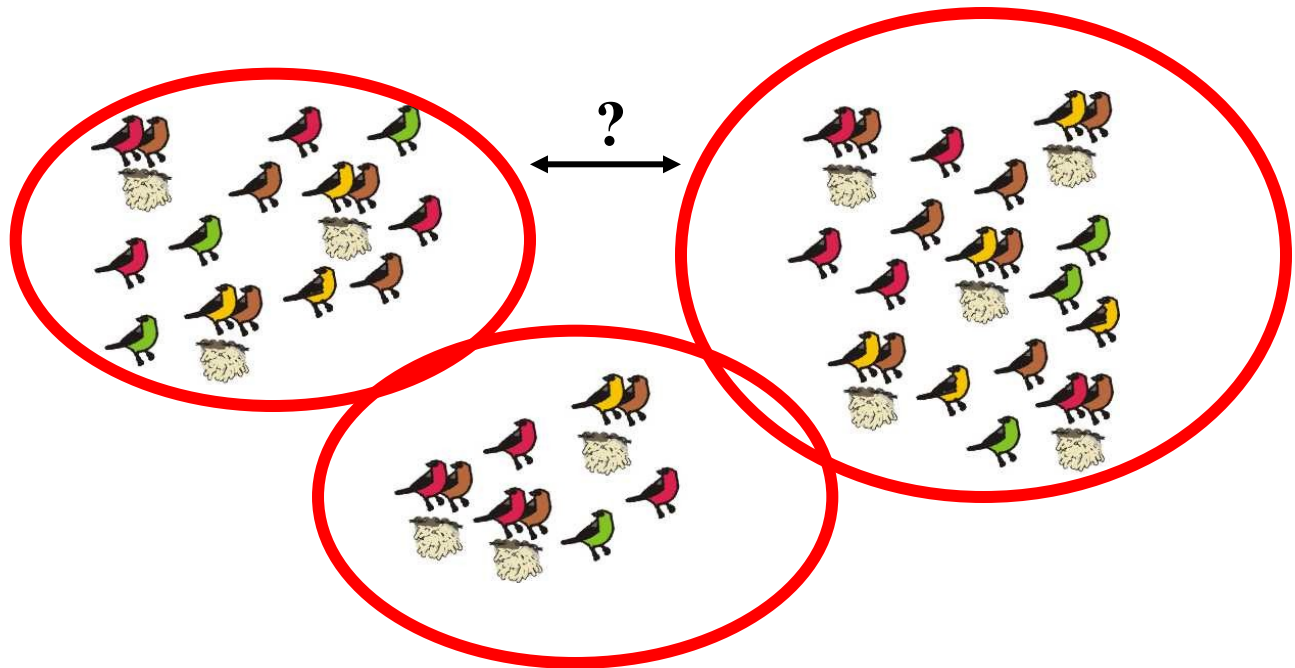
Úrovně genetické variability

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



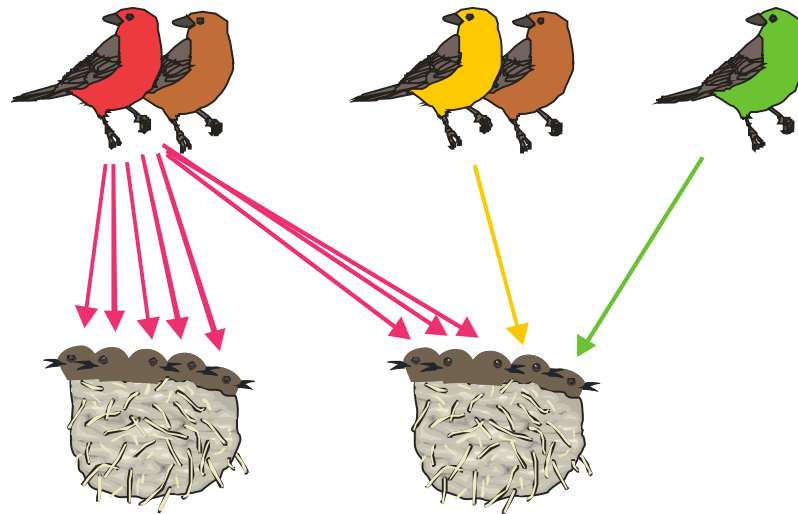
Úrovně genetické variability

- **populace** – populační biologie, ochránářská 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

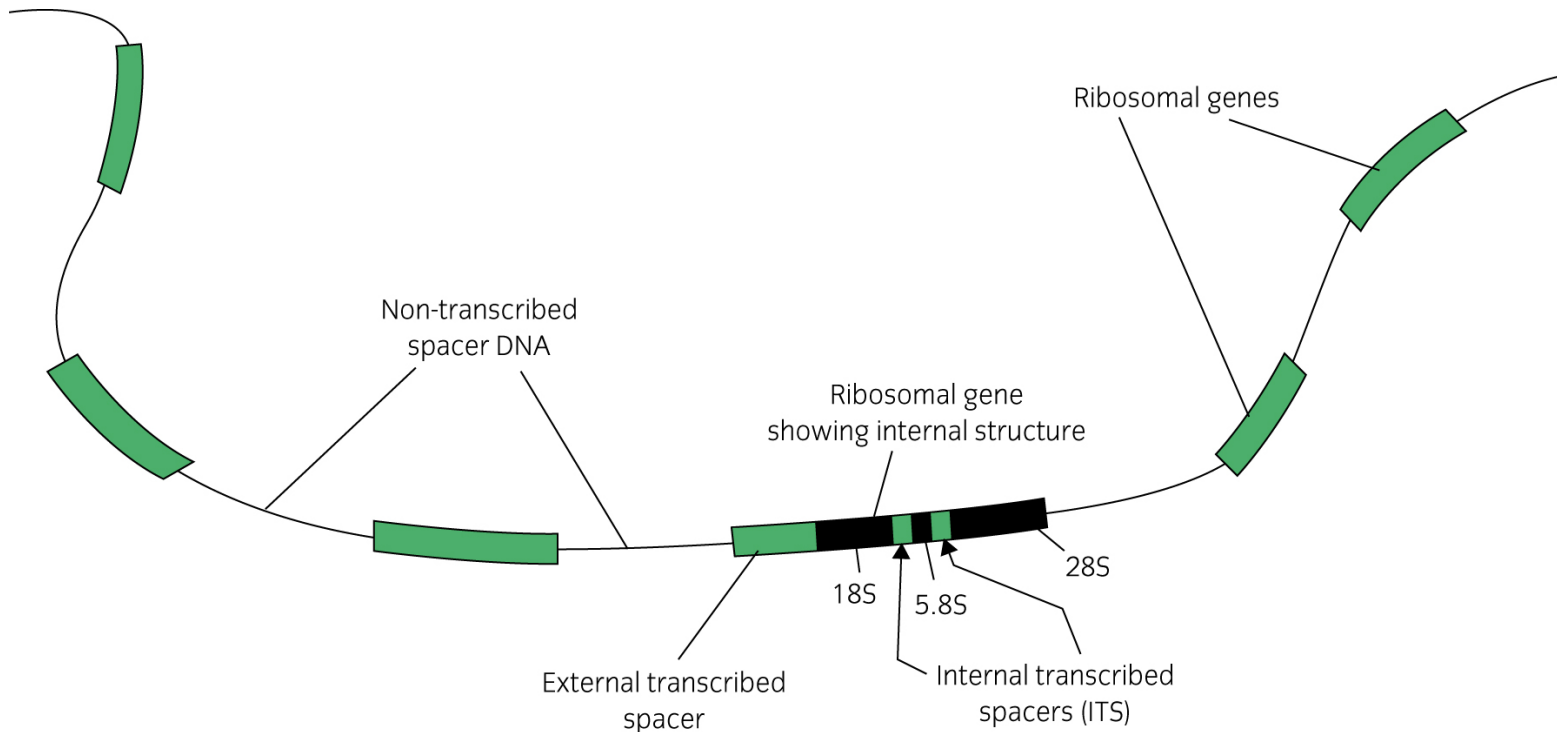
Repetitivní DNA

DNA	Typická délka sekvencí (bp)	Lokalizace
Minisatелity (>10 ³ lokusů/genom)	20-300	Tandemové repetice o délce až 5 kb, rozmístěné po celém genomu
Microsatelity (>10 ⁴ 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 ⁵ /genom)	50-500 (100-300)	Rozmístěné po celém genomu
LINEs (>10 ³ /genom)	1-5 k	Rozmístěné po celém genomu

Kódující („funkční“) DNA

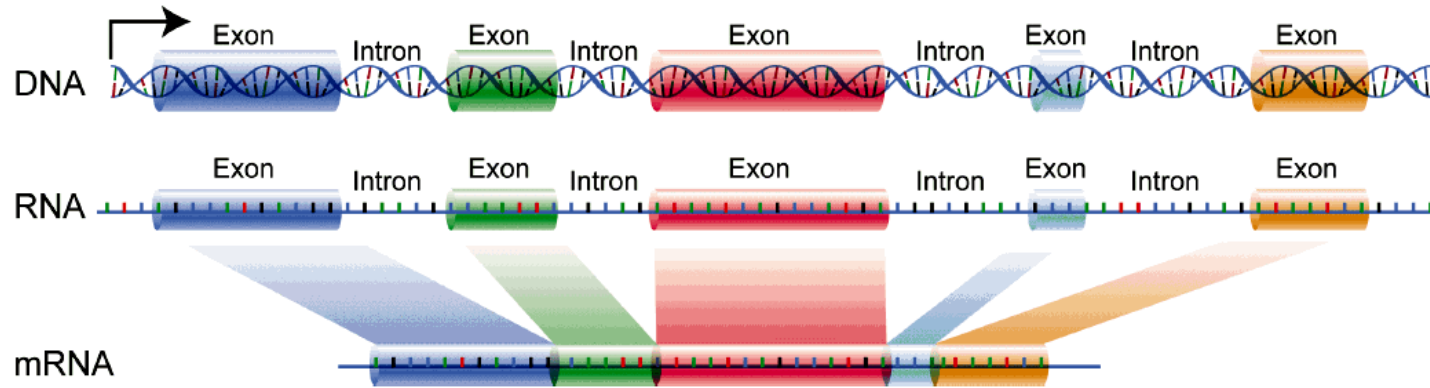
- 1) ribosomální DNA (+ geny pro miRNA)
- 2) jaderné strukturální geny (protein-coding genes)
- 3) mitochondriální DNA

1. Ribosomální DNA



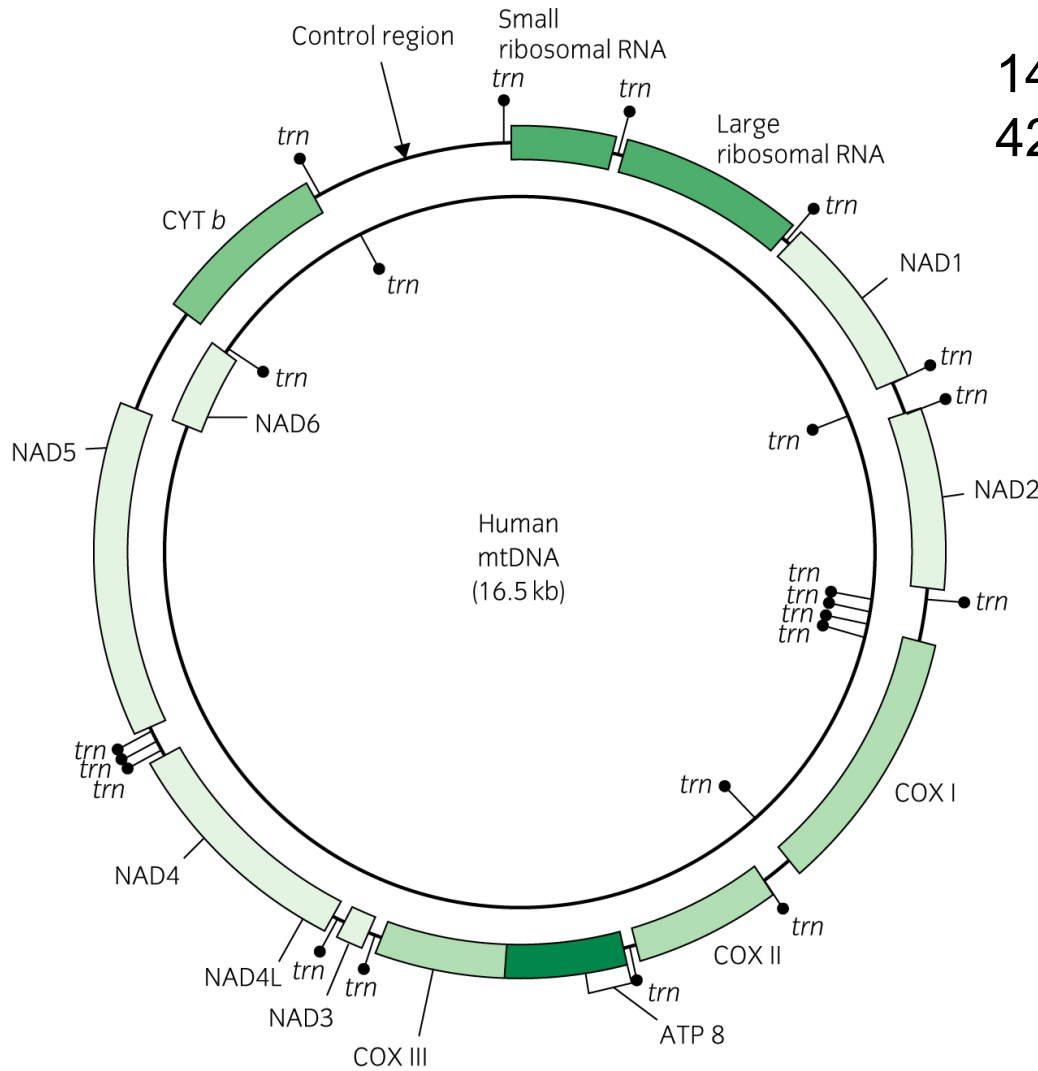
- geny pro ribosomální RNA – mnoho shluků (operonů) u eukaryot
- 16S, 23S, and 5S – málo kopií u prokaryot
- rDNAs – phylogenetické analýzy, ITS – populační struktura, barcoding (houby, helminti)

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



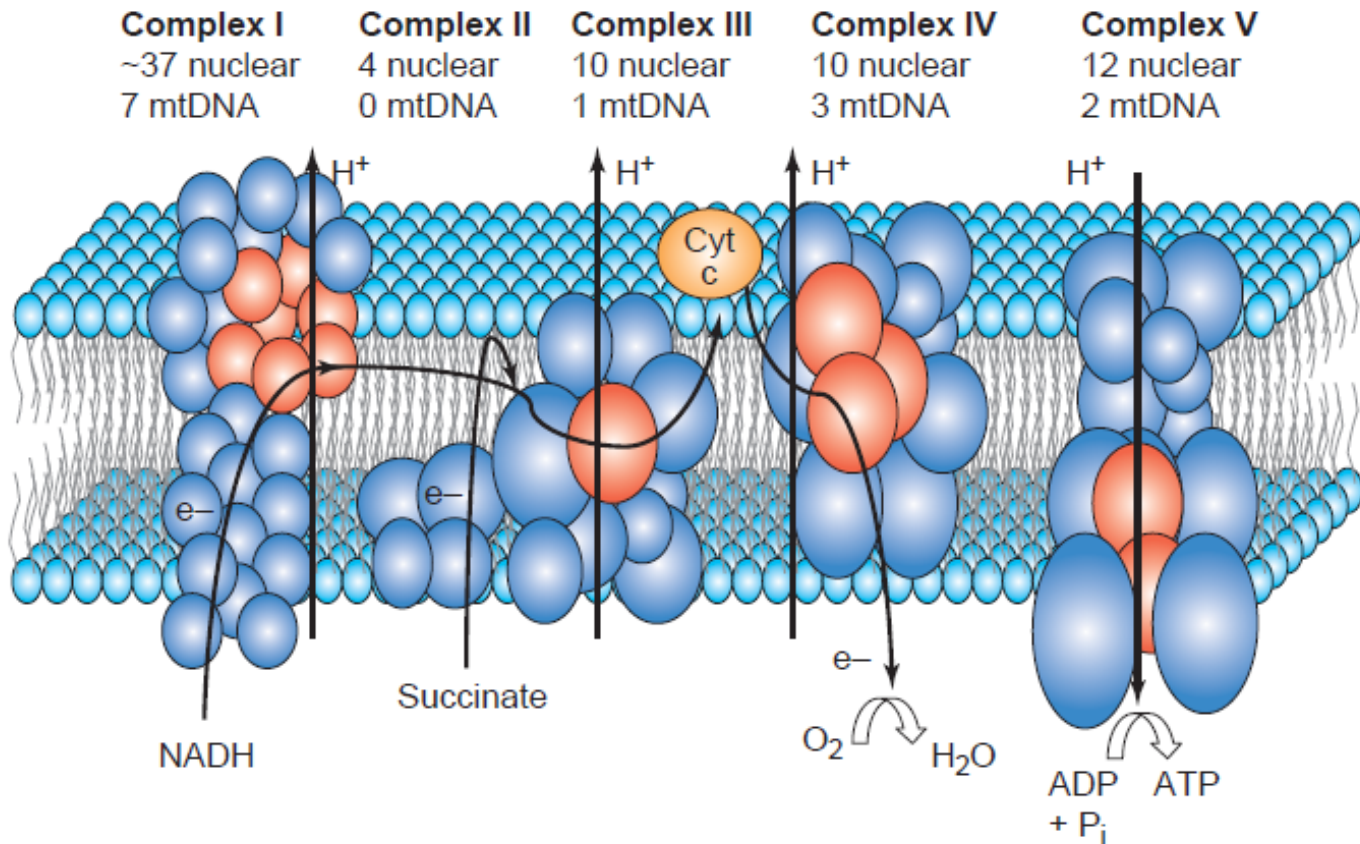
14 kbp (*Caenorhabditis*)

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:**

CGCATCTCTAGCTTC**GATTCAGGAA**

CGCATCTCTAGCTTT**GATTCAGGAA**

„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCACATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

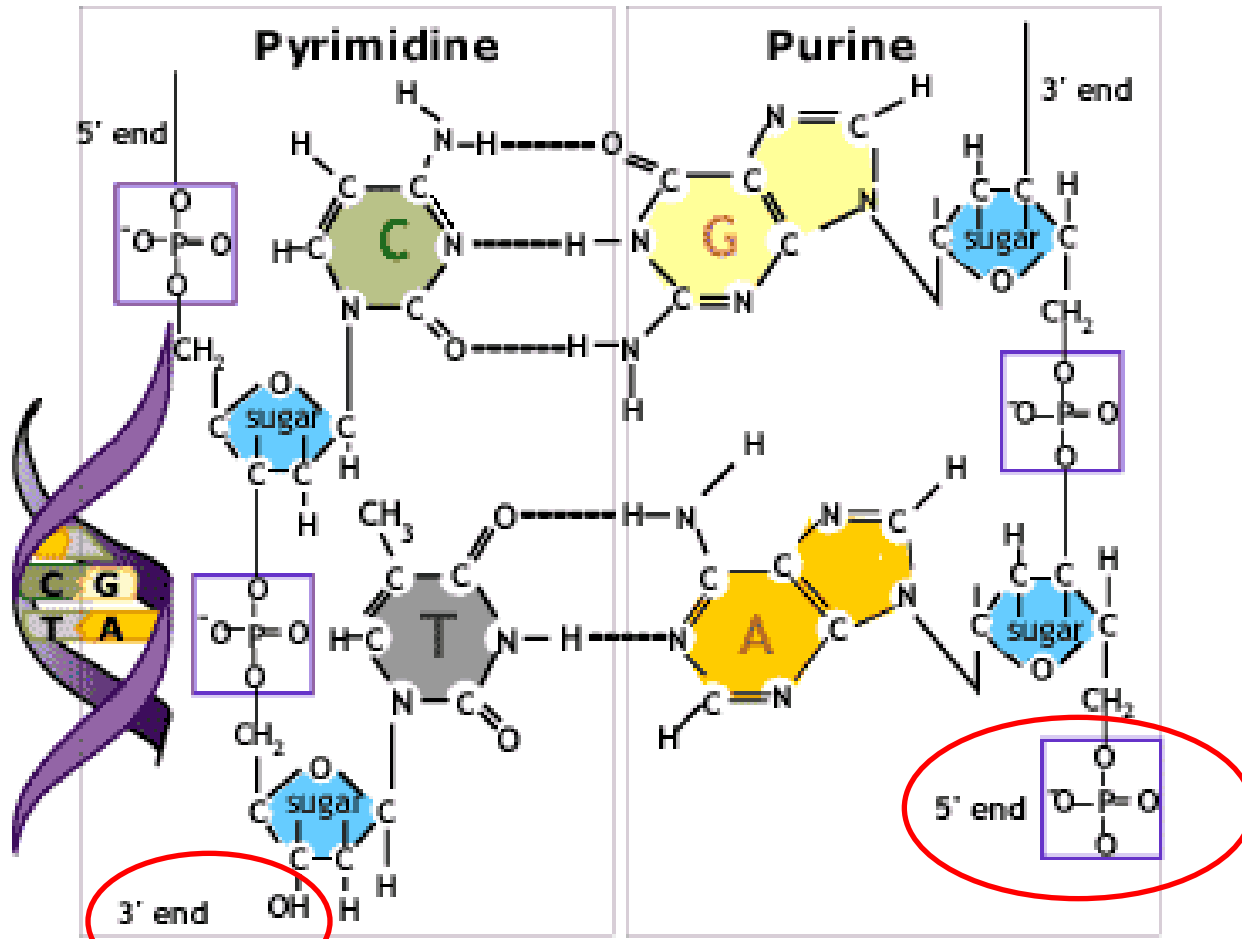
Vznik DNA polymorfismu

- 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

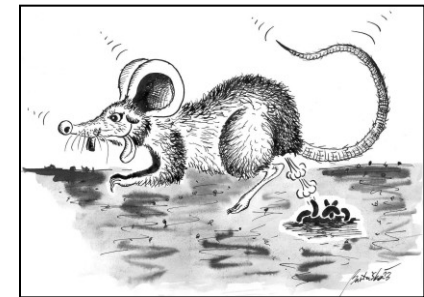
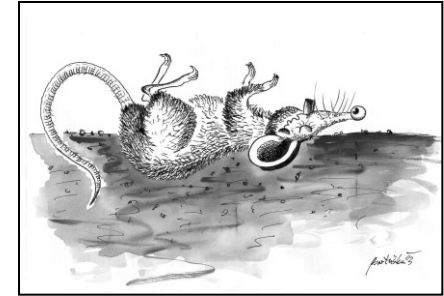
- DNA-polymeráza
- DNA-exonukleáza, DNA-endonukleáza
- DNA-ligáza
- DNA-transkriptáza
- RNA-reverzní transkriptáza

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

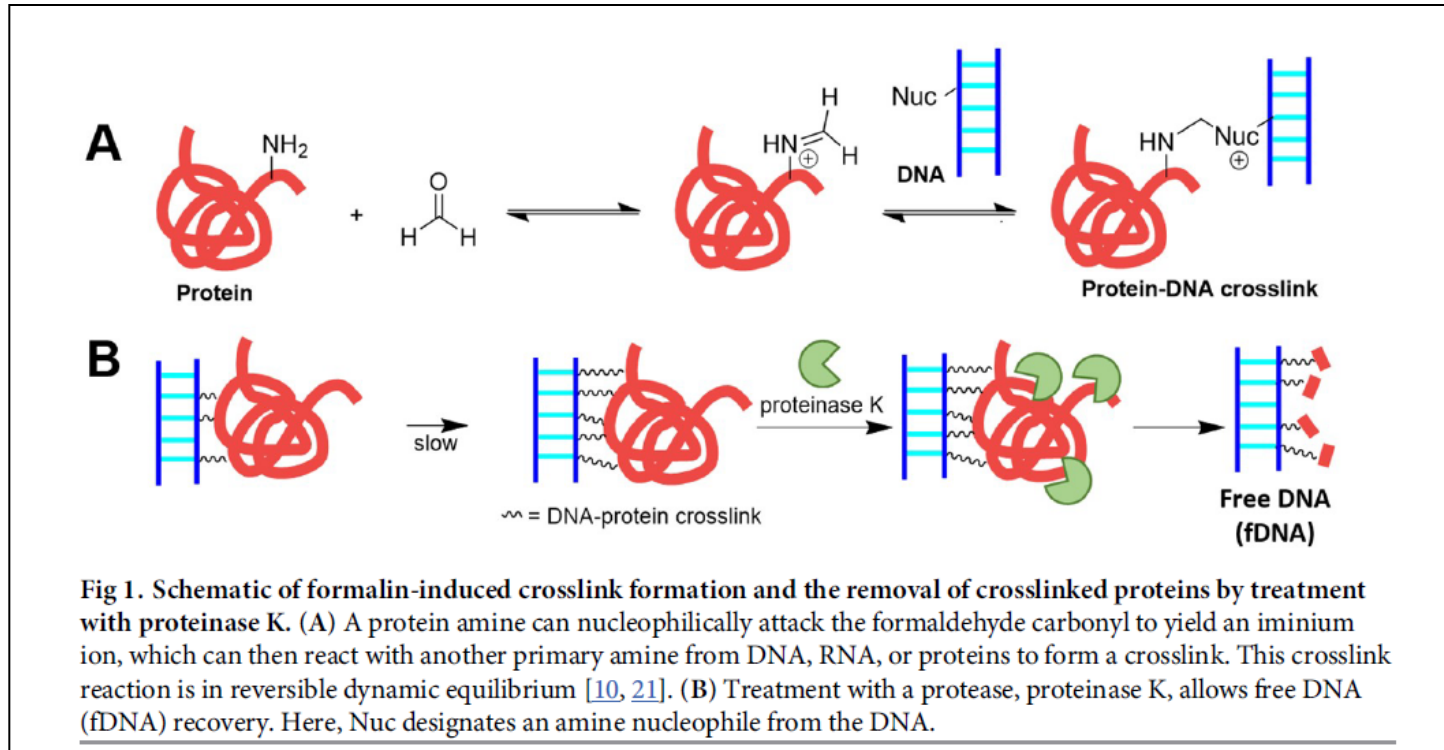
+

- 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^{1*}, Jessica M. Phillips², Aspen T. Reese³, Sudipta Majumdar¹, Peter R. Girgis³, Colin L. Raston², Gregory A. Weiss^{1,4,5*}

PCR

Polymerase chain reaction (jak z málo DNA udělat hodně)



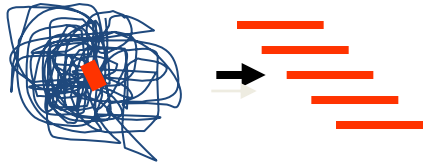
Kary Mullis (1983 – na dálnici ze San Francisca do Mendocina)

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

1993 – Nobelova cena

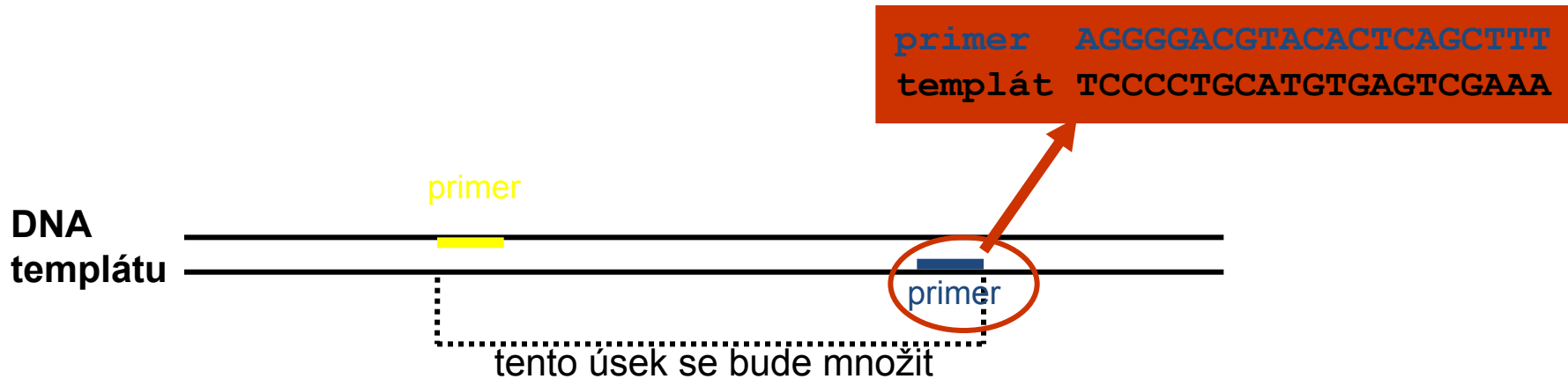
Amplifikace DNA – PCR

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozómů (1n)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila 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.



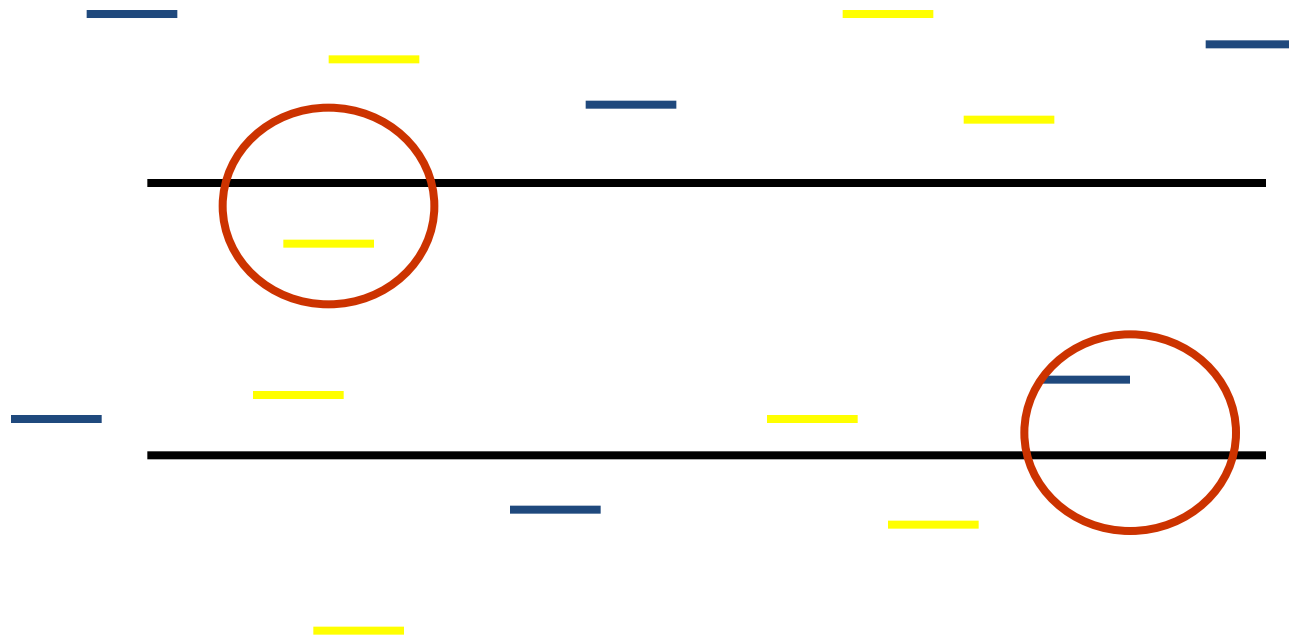
Denaturace (obvykle 95 C)

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



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



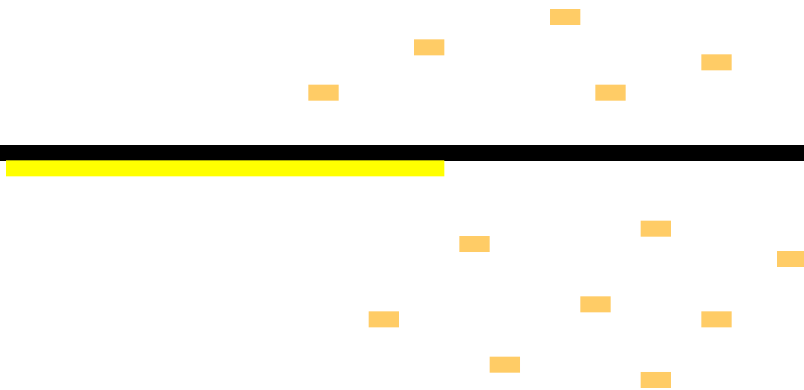
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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)

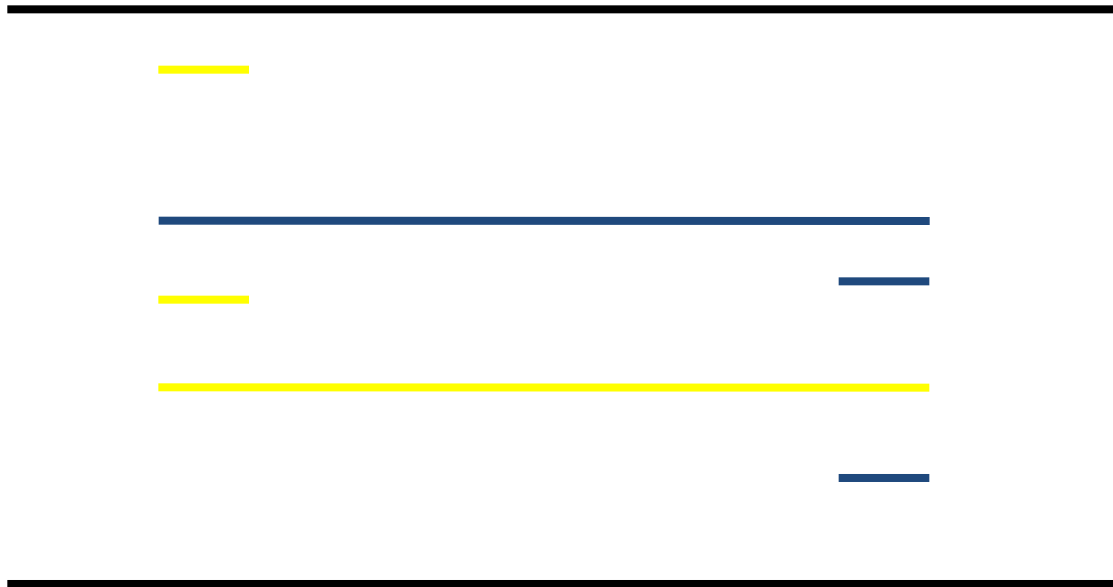


Primery poskytují volný 3 -OH konec, na který se mohou vázat další nukleotidy (podle principu komplementarity)

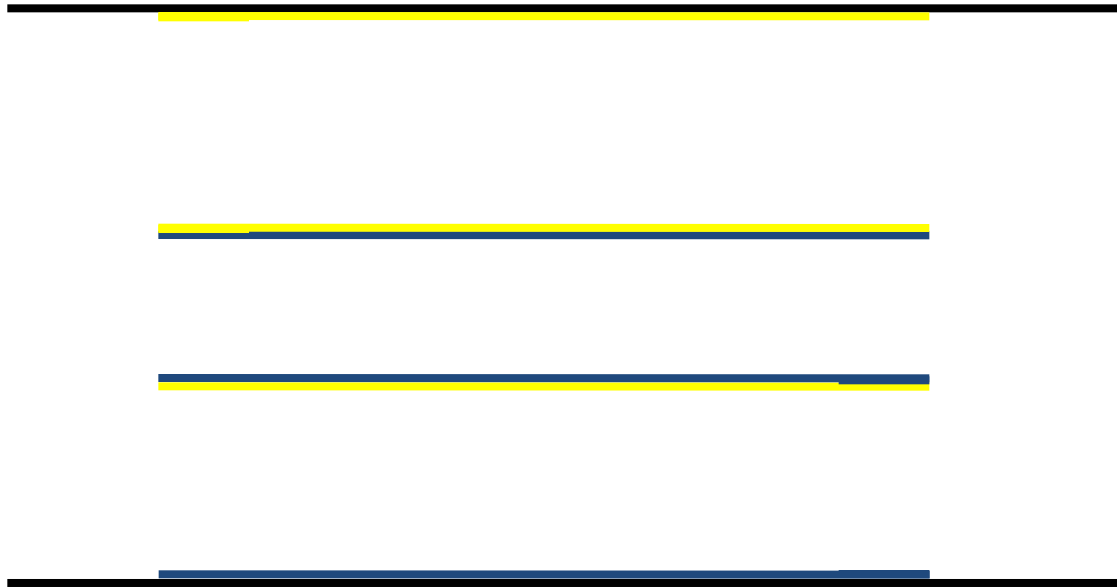
Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



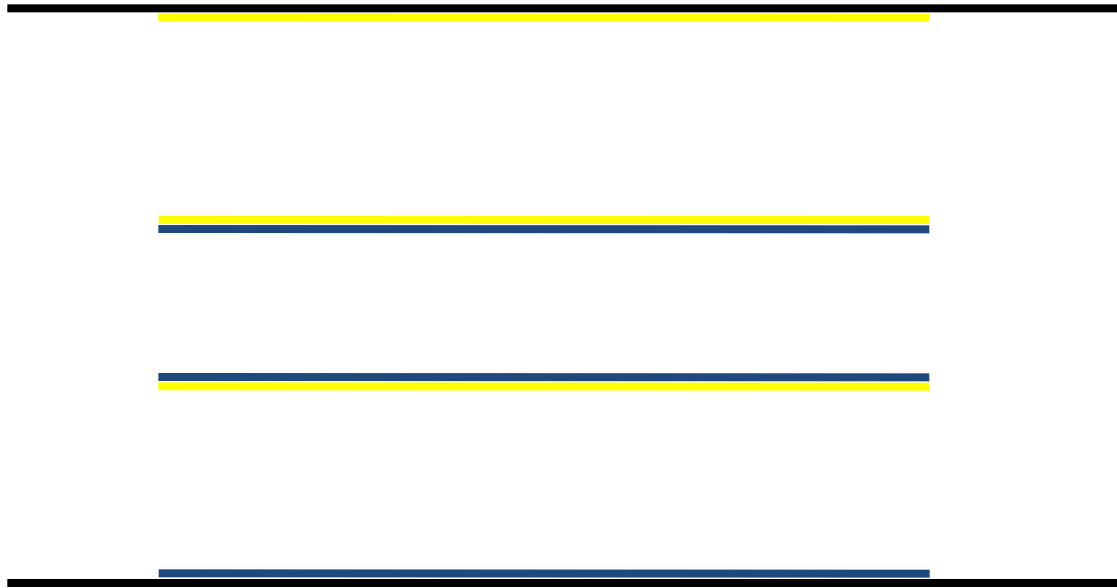
Po ochlazení primery přisednou na templát i nově vzniklé fragmenty („annealing“)



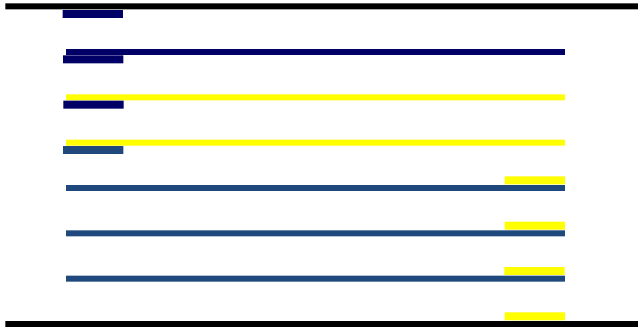
Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



Při dalším zahřátí...



Ochlazení – nasednutí primerů



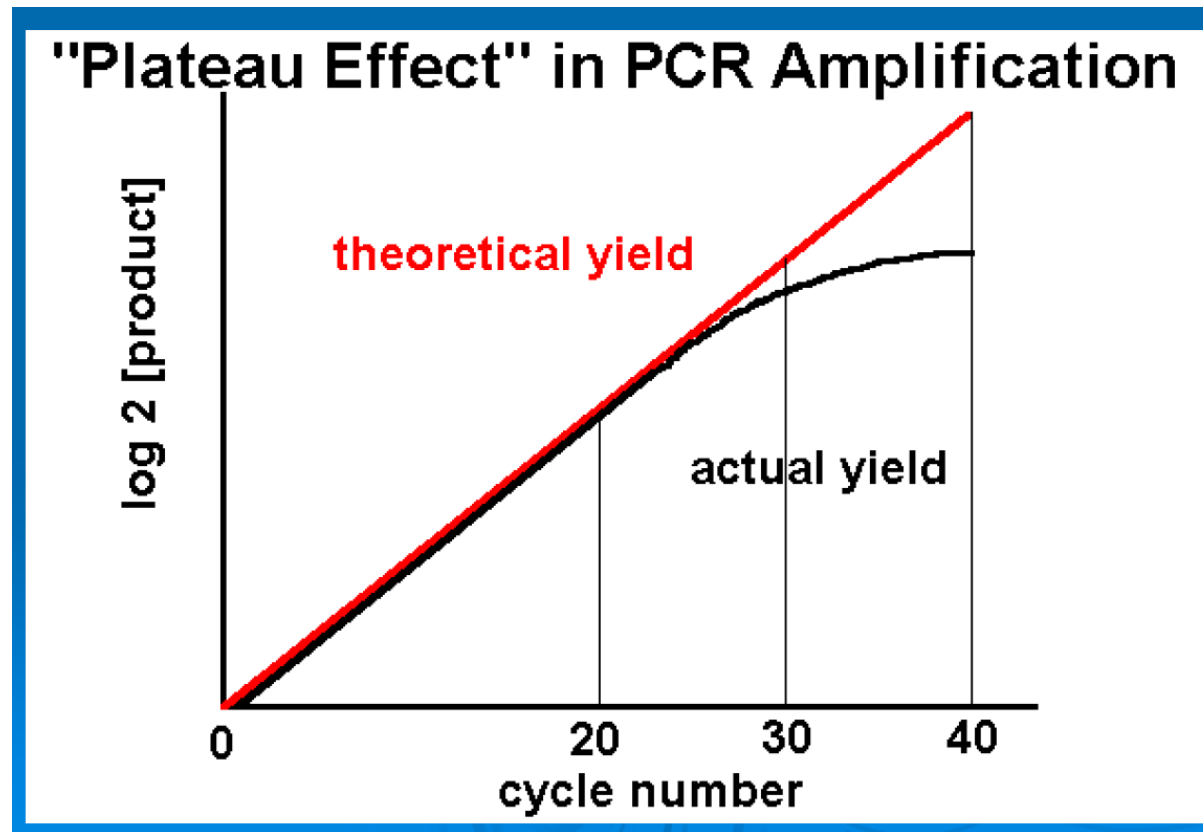
72 C vznik nových fragmentů



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

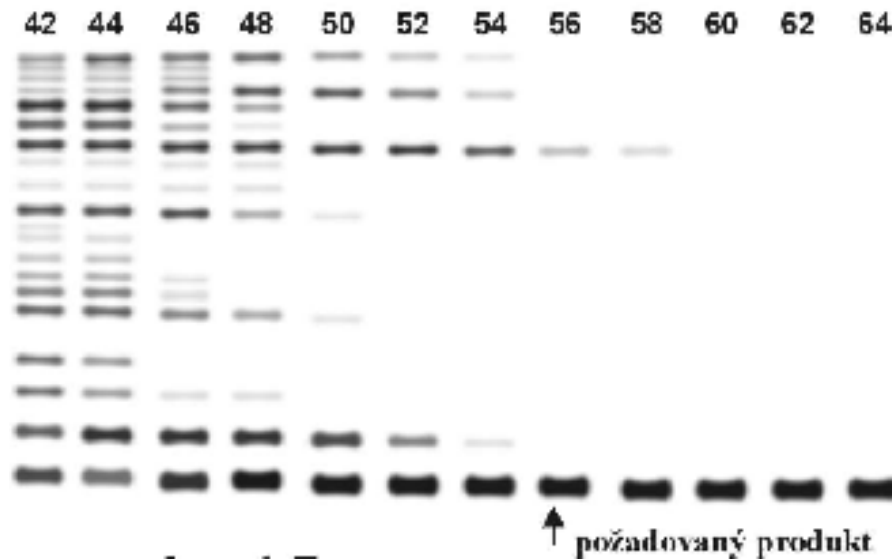
35x zpět

72 C 10 min



Co když PCR nefunguje?

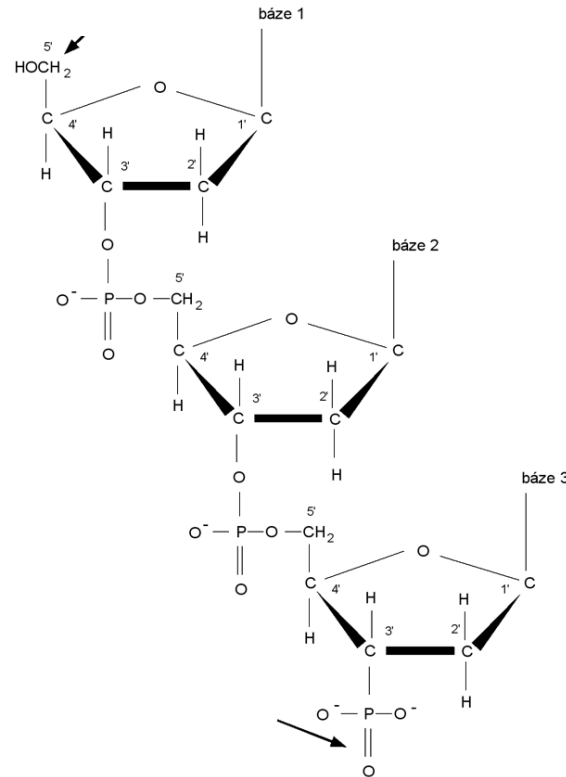
- Měníme teplotu „annealingu“ (nejlépe použijeme gradient teplot, pokud to náš cykler umí)
Vyšší teplota=vyšší specificita
- Měníme koncentraci Mg^{2+} iontů
- Navrhujeme nové primery



Studium variability nasyntetizovaného úseku

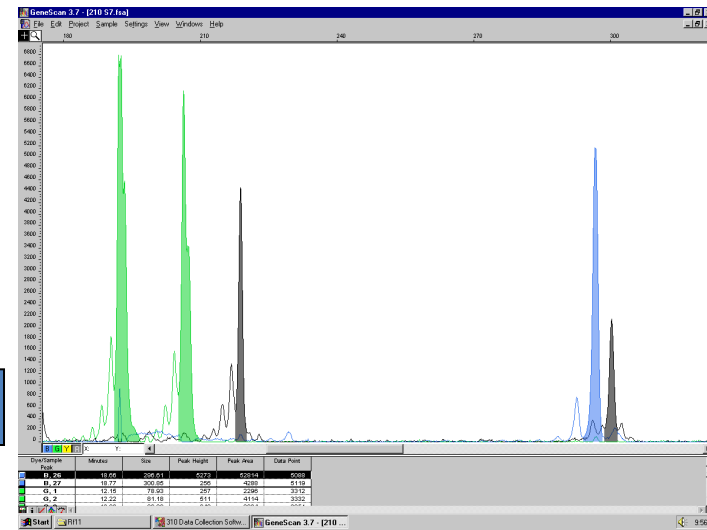
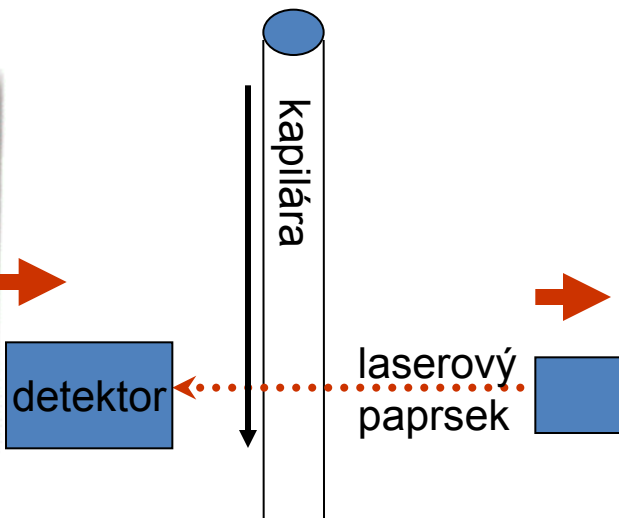
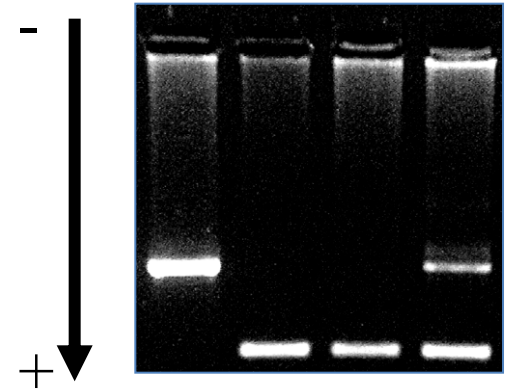
1) délkový polymorfismus

- 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)



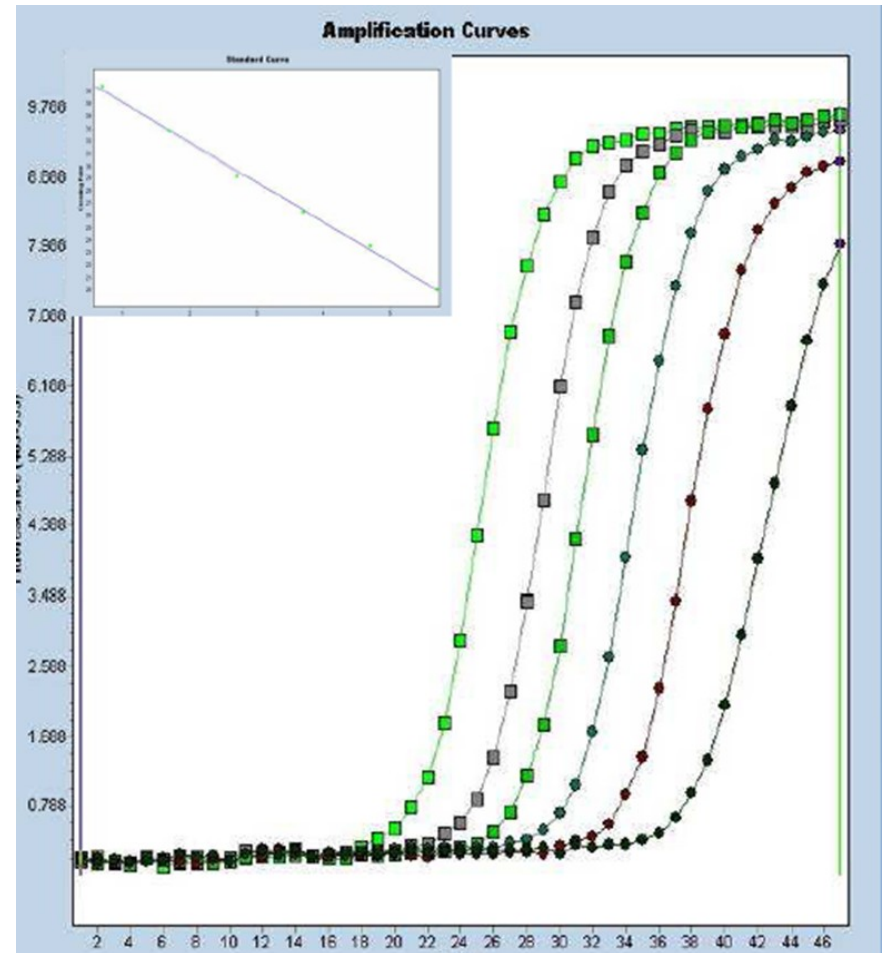
REAL TIME PCR
(= „kvantitativní PCR“)

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

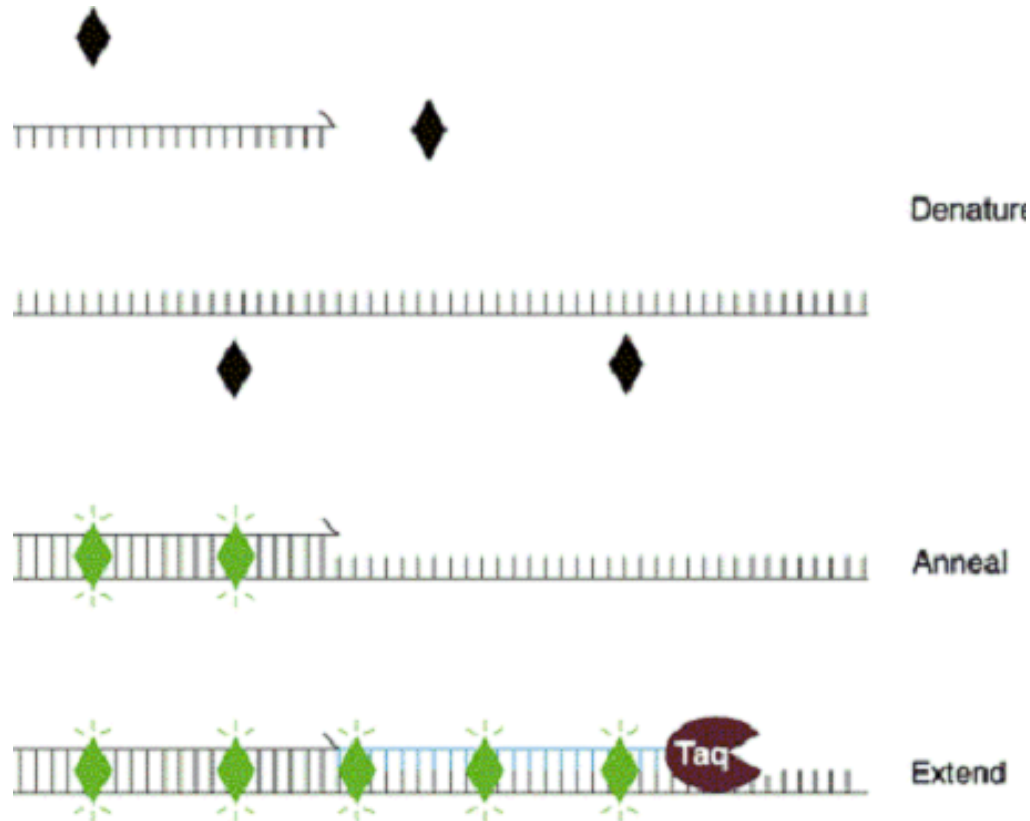
- SYBR Green, EVA Green, ...

Specifická detekce (vyšší přesnost = specificita k amplifikovanému úseku)

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

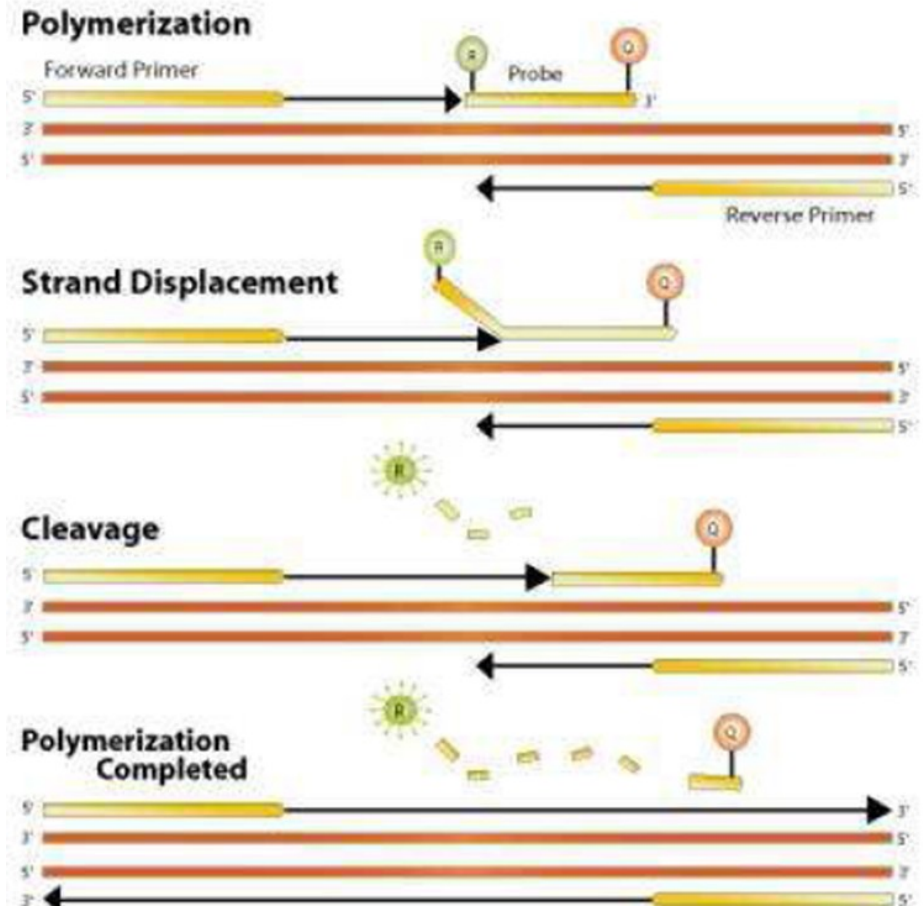
SYBR Green / EVA Green

- „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

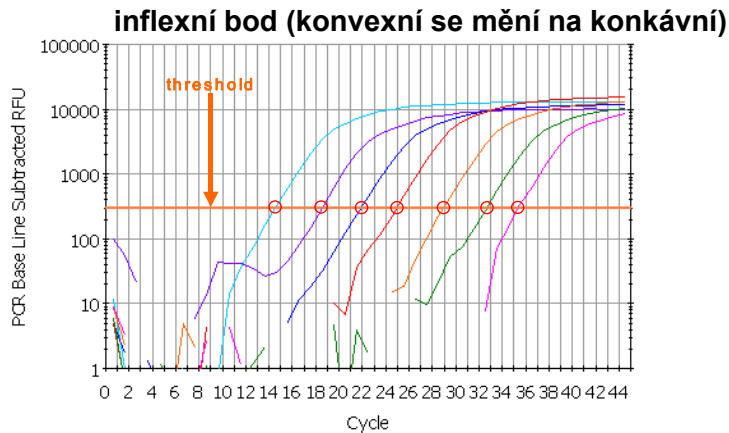
- specifická 3D struktura intaktní sondy („vlásenka“) – nevyzařuje žádnou fluorescenci
- „Quencher“ uvolní „Reporter“ po dosednutí na amplifikovaný úsek (v annealing fázi)



Real-time PCR přístroje

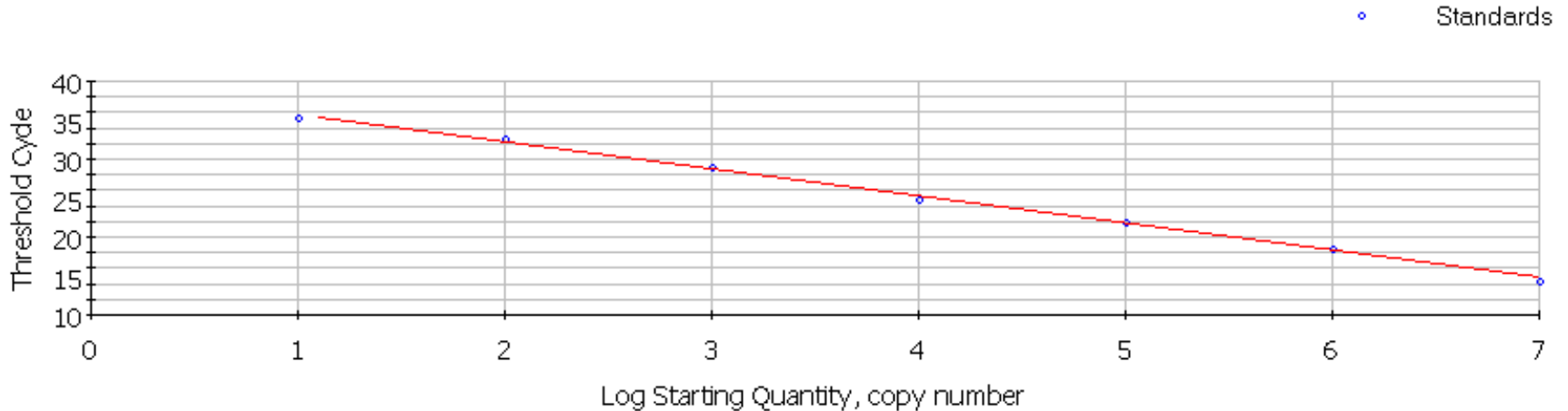


Absolutní kvantifikace



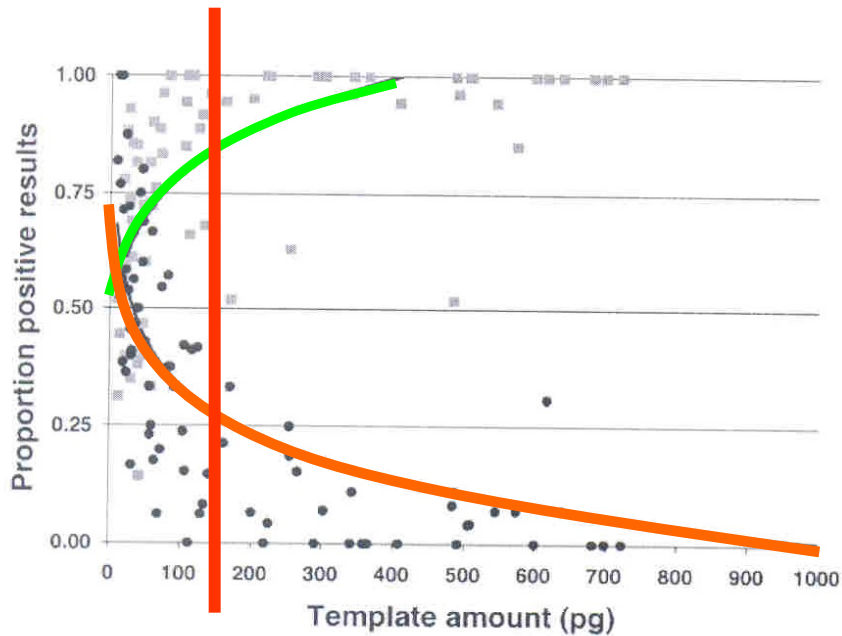
- 1) Vytvoření kalibrační křivky (vzorky se známou koncentrací templátu)
- 2) Real-time PCR se vzorkem s neznámým množstvím DNA, např. z trusu

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

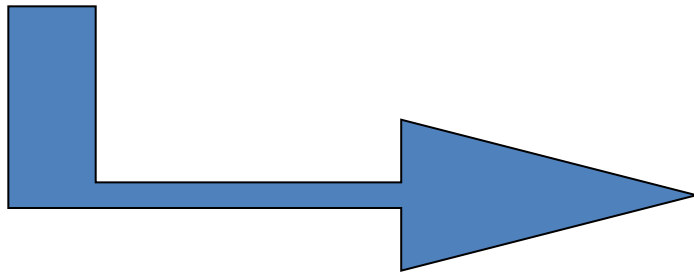


PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

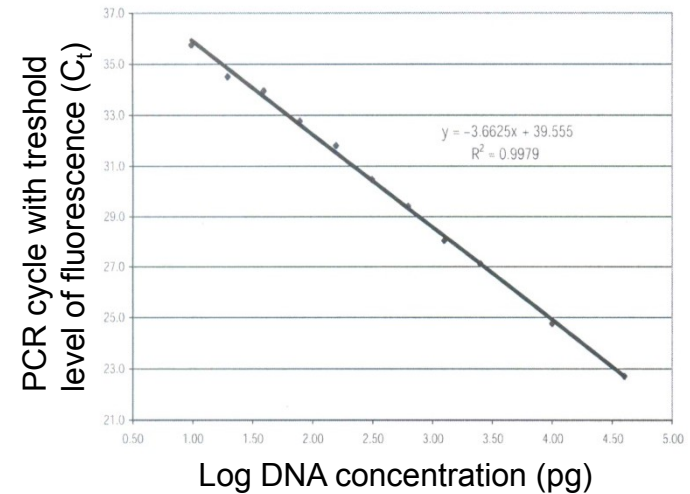
Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



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>

Sangerovo sekvenování

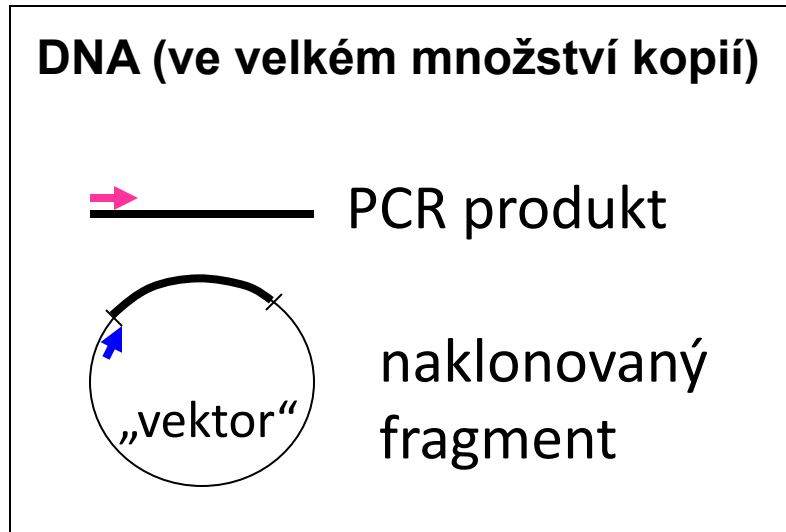
Sekvencování DNA

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

- Sangerova (enzymatická) metoda: terminace replikace pomocí ddNTP

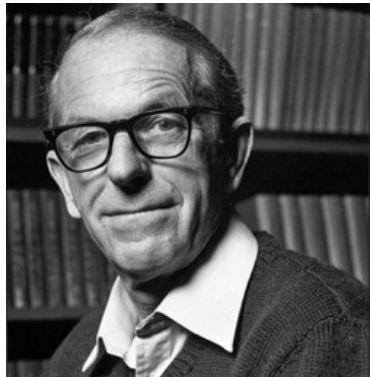
- paralelní „high-throughput“ sekvenování:
= NGS („next-generation sequencing“)

Sangerovo sekvenování DNA



Sekvenační reakce:

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



„dideoxy metoda“

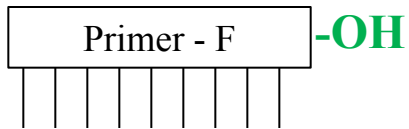
Frederick Sanger (1918-2013)

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

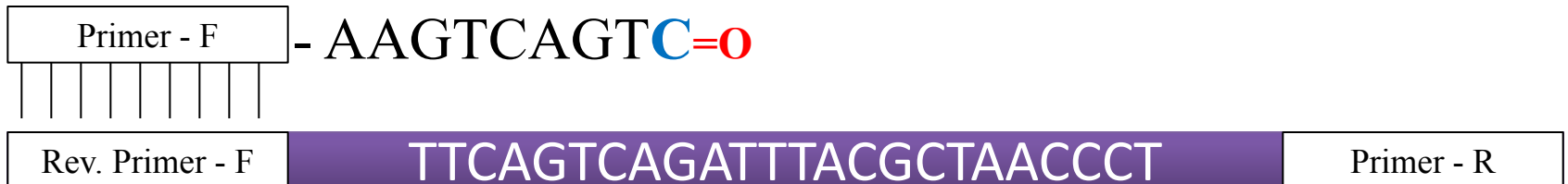
3. Polymerizace - 72°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°C

Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer



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



1. Denaturace - 96°C
2. Nasednutí primeru - 50-60°C
3. Polymerizace - 72°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 - AAGTCAGTCTAA**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

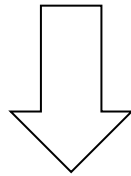
Výsledek sekvenační „PCR“

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

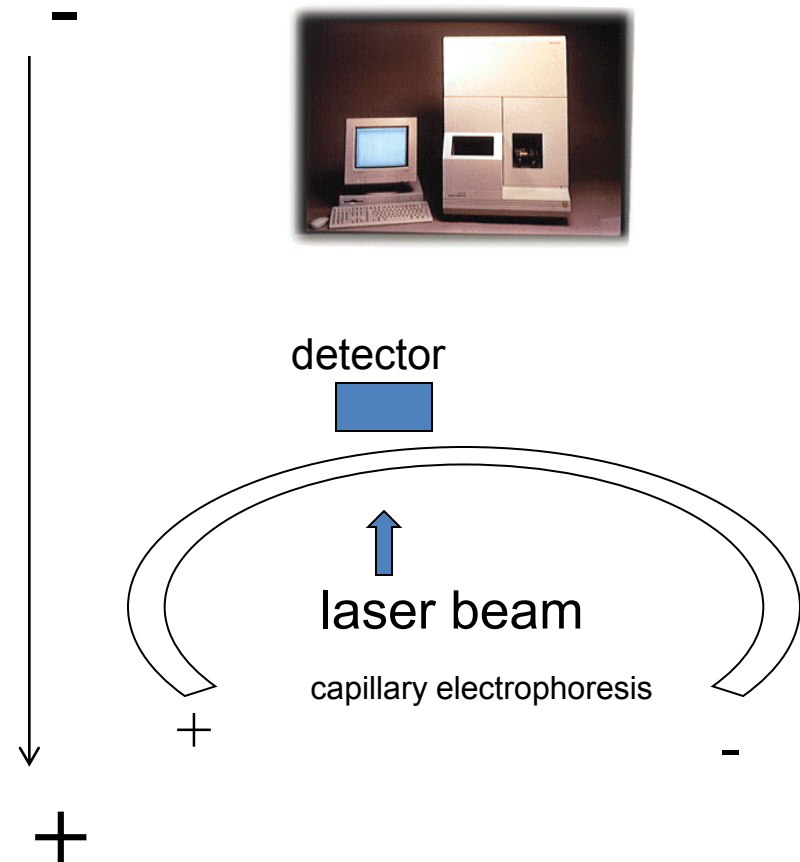
Primer - F - AAGTCAGT**C**=0

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

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

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

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



Detekce fragmentů - kapilární elektroforéza

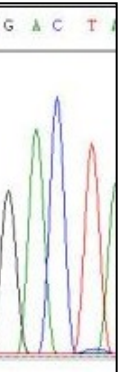
Primer - F

- 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

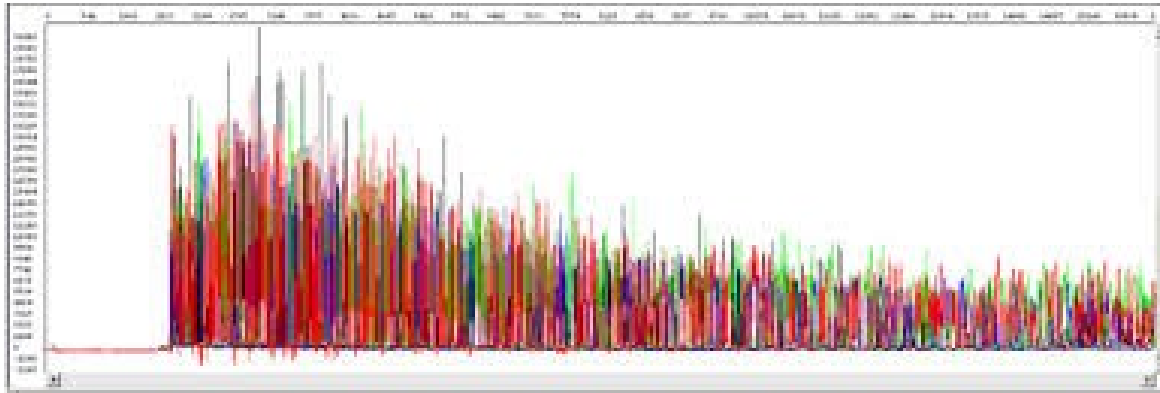
Rev. Primer - R

Rev. Primer - F

TTCAGTCAGATTACGCTAACCT

Primer - R

Editace sekvencí



„raw data“ (.ab1 file)
electrophoretogram



„basecalling“ (specializovaný software, např. Geneious)

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

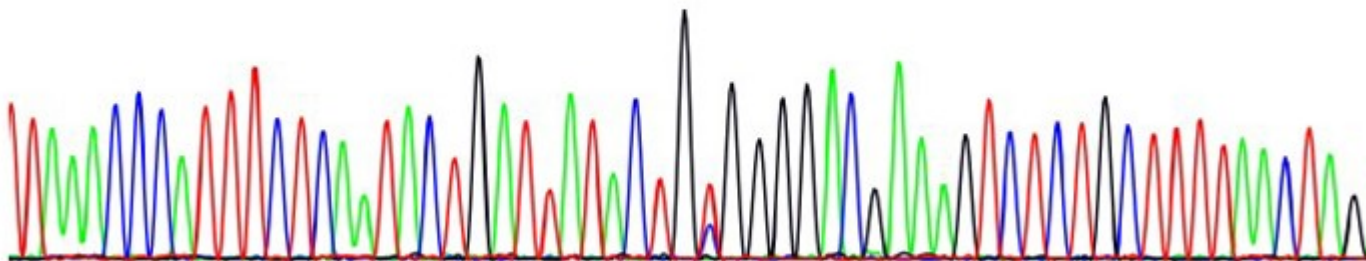
145

157

169

181

193



SNP=T/C

„trimming“
(ořezání konců
s nízkou kvalitou)