Základy genomiky

III. Přístupy reverzní a přímé genetiky

Jan Hejátko

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin

Základy genomiky III.

- Zdrojová literatura ke kapitole III:
  - Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
  - Mello, C.C. and Conte Jr., D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **43**1, 338-342.

Přístupy „klasické“genetiky *versus* „reversně genetický“ přístup ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

h x n

„Přímě genetický“přístup

EMS

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU

2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ

3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

1.IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA

2. IDENTIFIKACE FENOTYPU

3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - kosegregační analýza
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

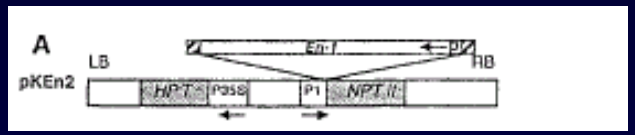
Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů

Typy inzerčních mutagenů

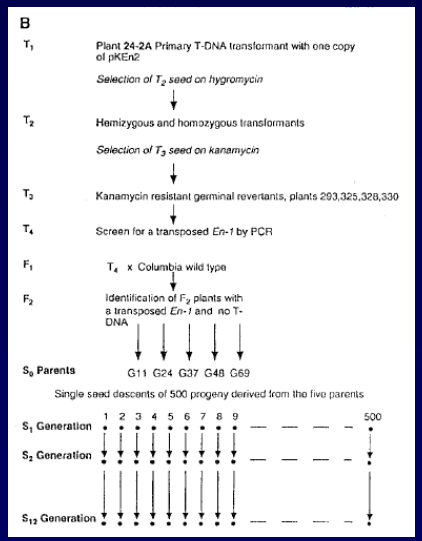
- Mobilní elementy
  - **autonomní transpozony (*En-1*)**
    - obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
    - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány
- Stabilní elementy
  - **neautonomní transpozony (*dSpm*)**
    - mutant En/Spm transpozonu, který mutací v genu pro transponázu ztratil autonomii
    - může být aktivován křížením s linií nesoucí En/Spm transpozon
  - **T-DNA**
    - zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)

Vytváření knihoven inzerčních mutantů

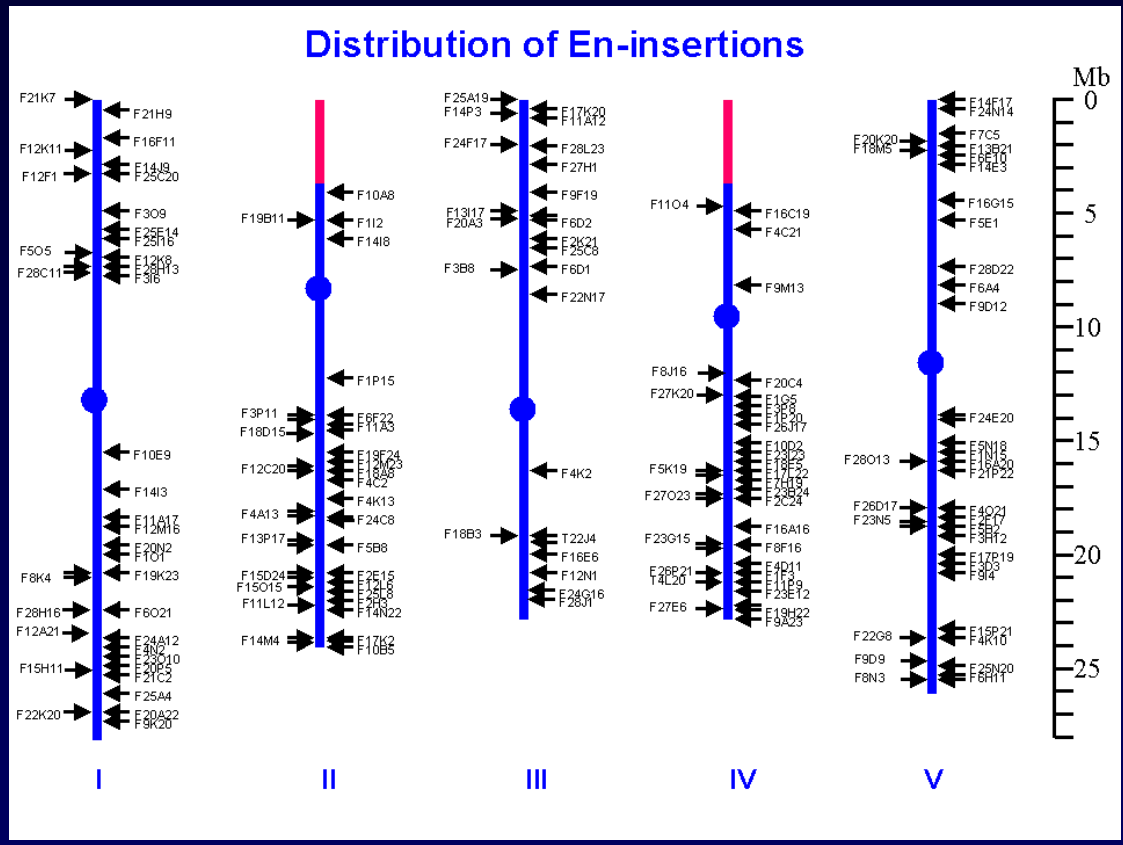


příprava transgenních rostlin

vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů
    - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
    - hybridizace s produkty iPCR na filtrech

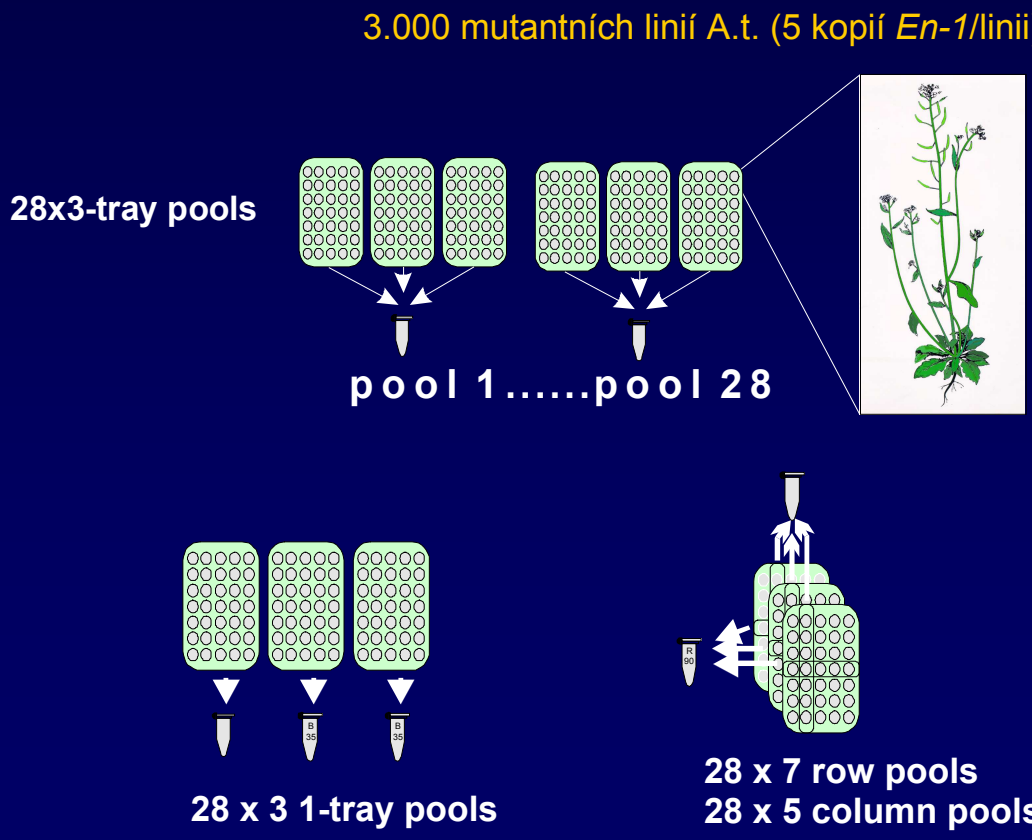
„Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR

1.Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

- autonomní En/Spm, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledáváni pomocí PCR

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)



Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

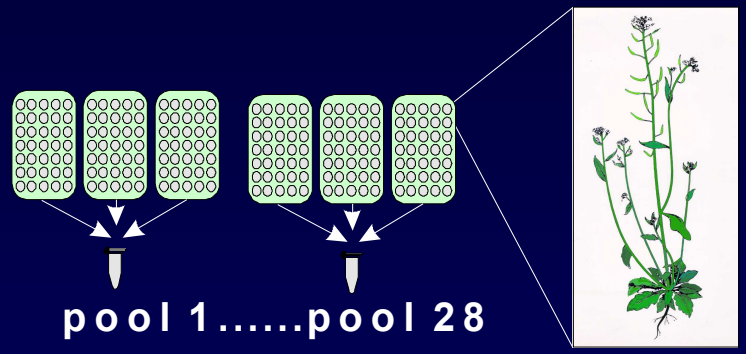
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
  - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou

„Třírozměrné“ vyhledávání v knihovně inzerčních mutantů pomocí PCR

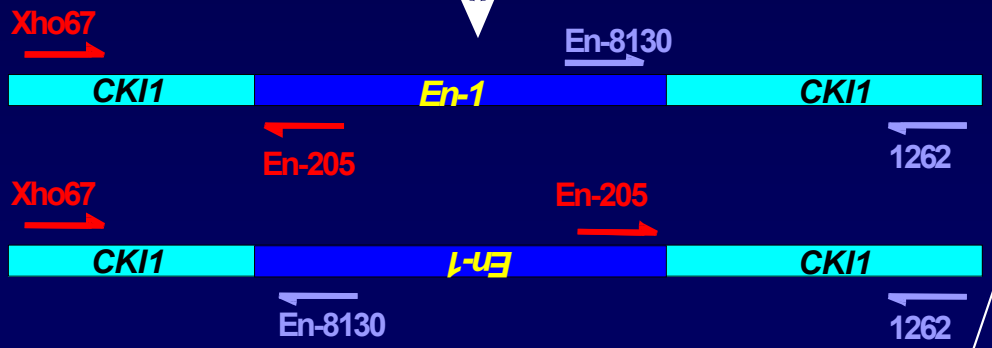
1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)

28x3-tray pools

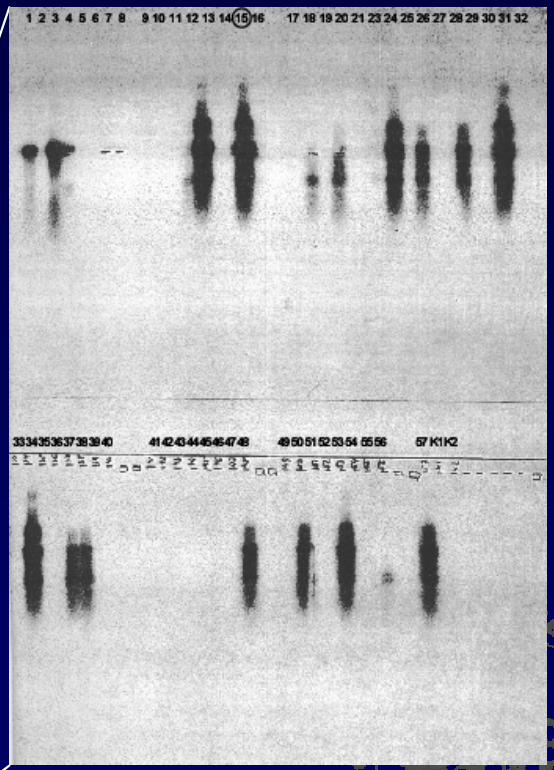


pool 1.....pool 28



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

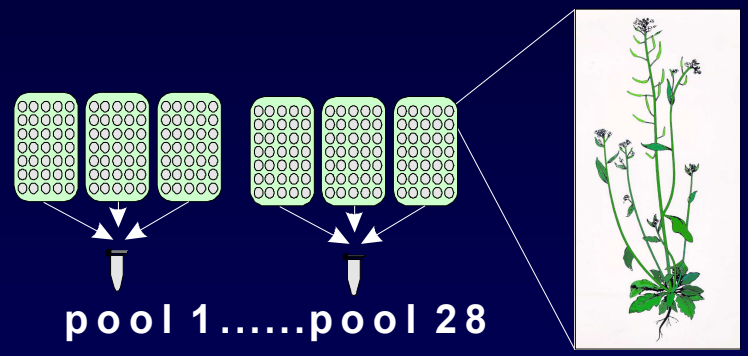
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
  - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou
  - identifikace pozitivní linie pomocí Identifikace pozitivního „tácu“, řady a sloupce

„Třírozměrné“ vyhledávání v knihovně inzerčních mutantů pomocí PCR

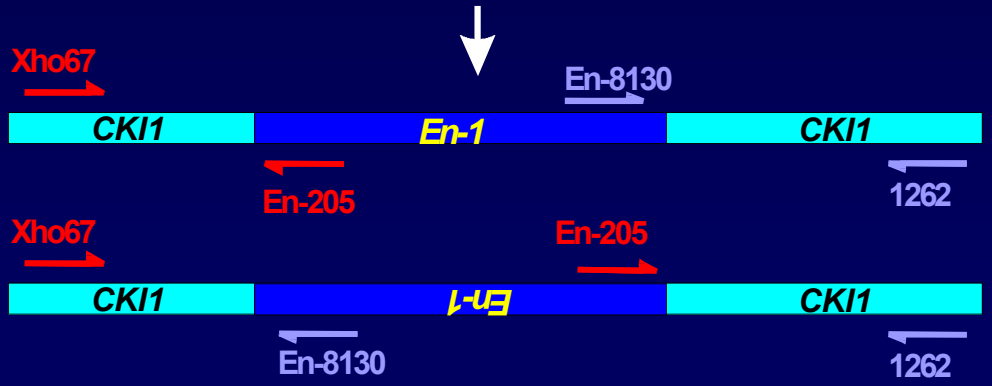
1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)

28x3-tray pools



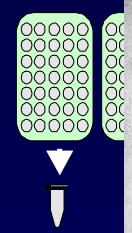
pool 1.....pool 28



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

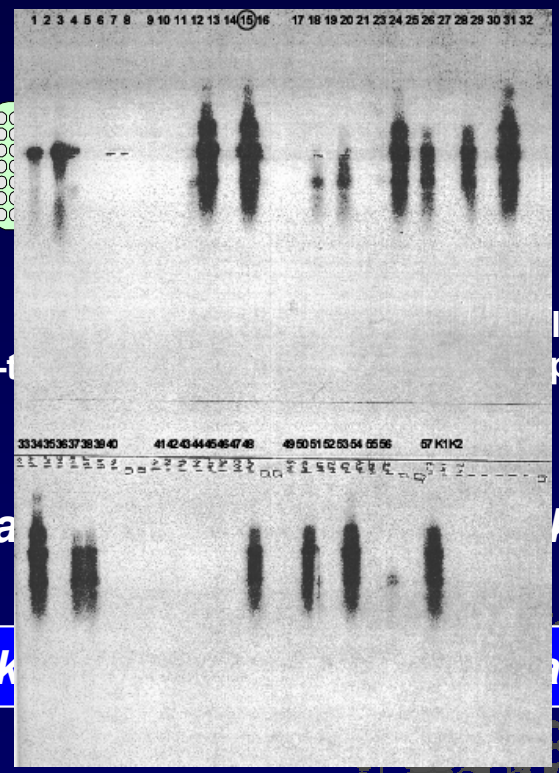
2. Identifikace linie nesoucí inzerci



3 x 1-t

ls

pools



(da

kcí)

Celk

akcí

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů
    - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
    - hybridizace s produkty iPCR na filtrech

Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

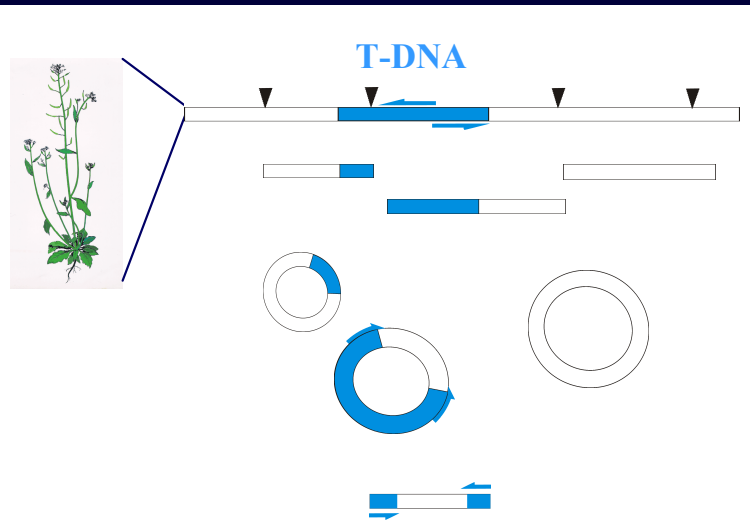
Inzerční knihovna dSpm mutantů

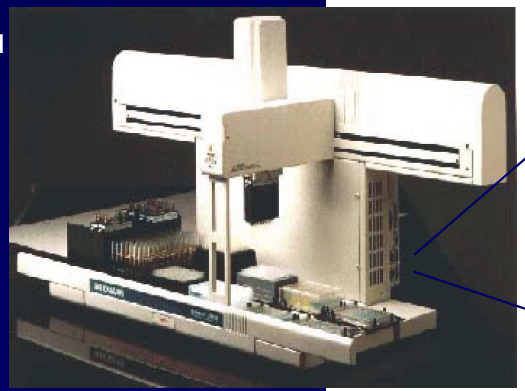
- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines), John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA a semena v Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 linií
- průměrně 1.2 izerce na linii
- neautonomní transposon
- PCR vyhledávání nebo hybridizace s iPCR filtry
- SINS (sequenced insertion sites) databáze

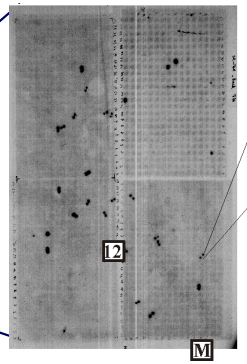
http://nasc.nott.ac.uk

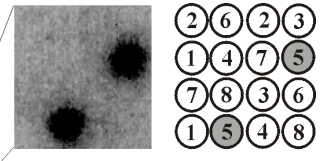
Přístupy reverzní genetiky
Identifikace sekvenčně specifických mutantů

- Hybridizace s produkty iPCR na filtrech
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace
  - štěpení restriční endonukleázou
  - ligace, vznik cirkulární DNA
  - inverzní PCR (iPCR) pomocí T-DNA specifických primerů
  - příprava nylonových filtrů s produkty iPCR v přesně daném vzorci (poloze) pomocí robota
  - hybridizace s genově specifickou sondou





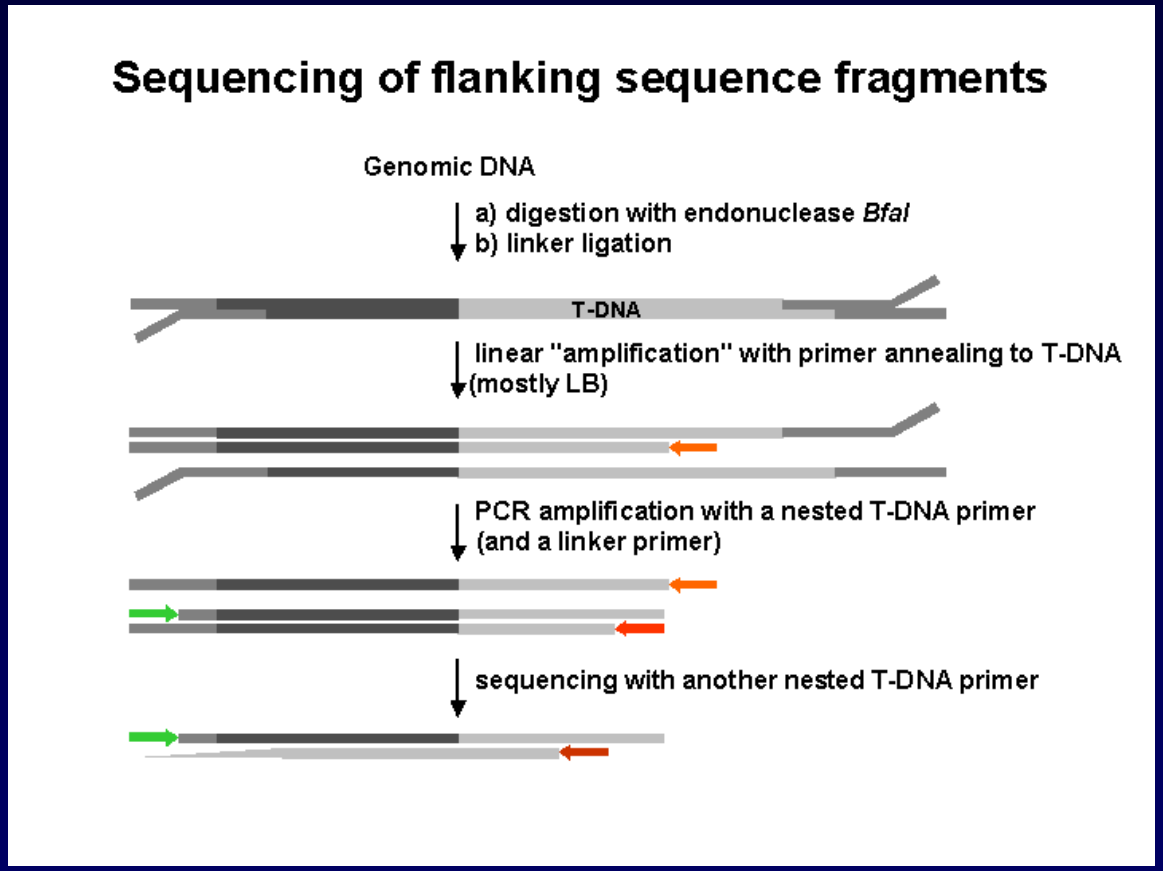




Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích

Příprava FST knihoven z populace *A. thaliana* mutované pomocí T-DNA



GABI-Kat (MPIZ, Köln)

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

Results of Blast search against sequenced inserts

>Insert_SALK:029311: Order line 029311 | View in AGR
Length = 460

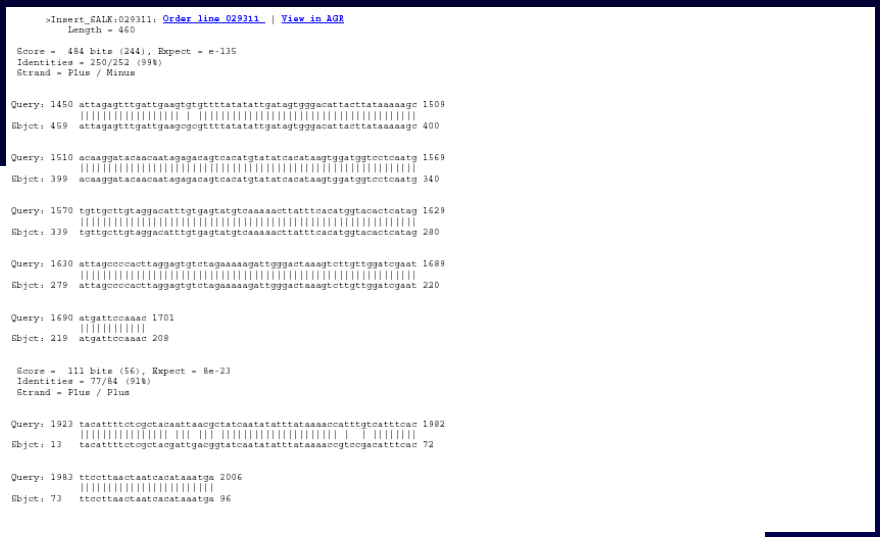
Score = 484 bits (244), Expect = e-135
Identities = 250/252 (99%)
Strand = Plus / Minus

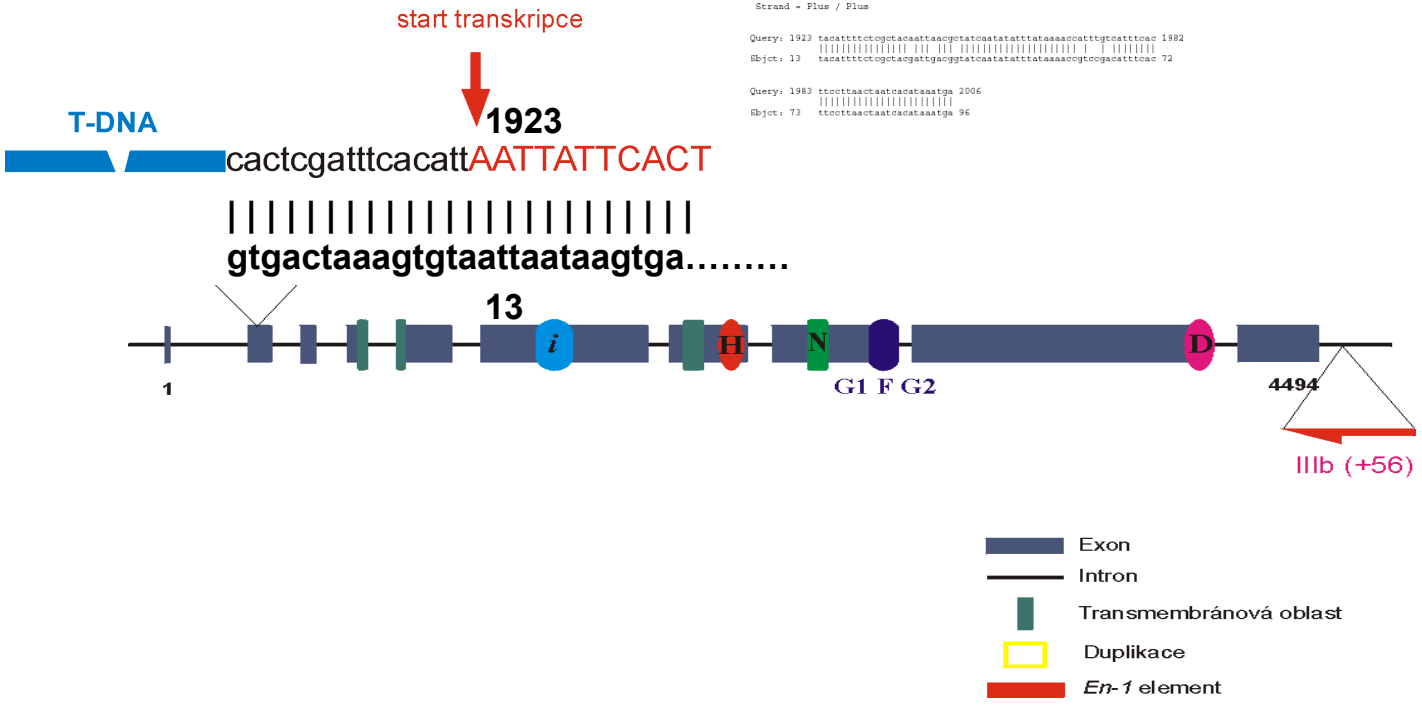
```
Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
            |||||||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 459  attagagtttgattgaagcgcgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400


Query: 1510 acaaggatacaacaatagagacagtcacatgtatatcacataagtggatggtcctcaatg 1569
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 399  acaaggatacaacaatagagacagtcacatgtatatcacataagtggatggtcctcaatg 340


Query: 1570 tgttgcttgtaggacatttgtgagtatgtcaaaaacttatttcacatggtacactcatag 1629
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 339  tgttgcttgtaggacatttgtgagtatgtcaaaaacttatttcacatggtacactcatag 280


Query: 1630 attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 1689
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 279  attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 220


Query: 1690 atgattccaaac 1701
            ||||||||||||
Sbjct: 219  atgattccaaac 208
```

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (91%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1923 tacattttctgctacaattaacgctatcaatatatttataaaaccatttgtcatttcac 1982
            ||||||||||||||| ||| ||| ||||||||||||||||||| |   | ||||||||
Sbjct: 13   tacattttctgctacgattgacggtatcaatatatttataaaaccgtccgacatttcac 72


Query: 1983 ttccttaactaatcacataaatga 2006
            |||||||||||||||||||||||
Sbjct: 73   ttccttaactaatcacataaatga 96
```

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů





Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

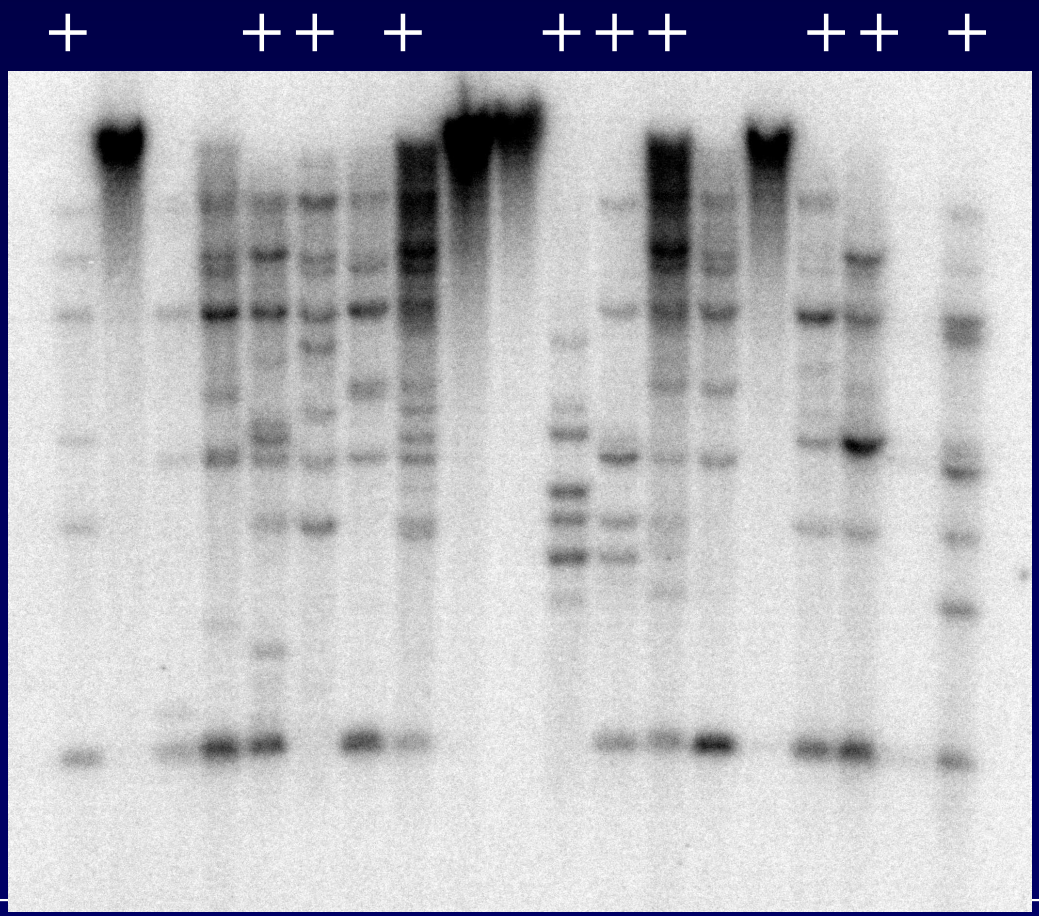
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - kosegregační analýza
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií

Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

- přítomnost více inzercí v jedné linii
- možnost vzniku nezávislé bodové mutace
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány chromozomové aberace a přestavby (duplikace, inverze, delece)

Genomika III.

- Kosegregační analýza
  - kosegregace specifického fragmentu např. po inzerci T-DNA (nebo působení EMS atd.) do genomu s pozorovaným fenotypem

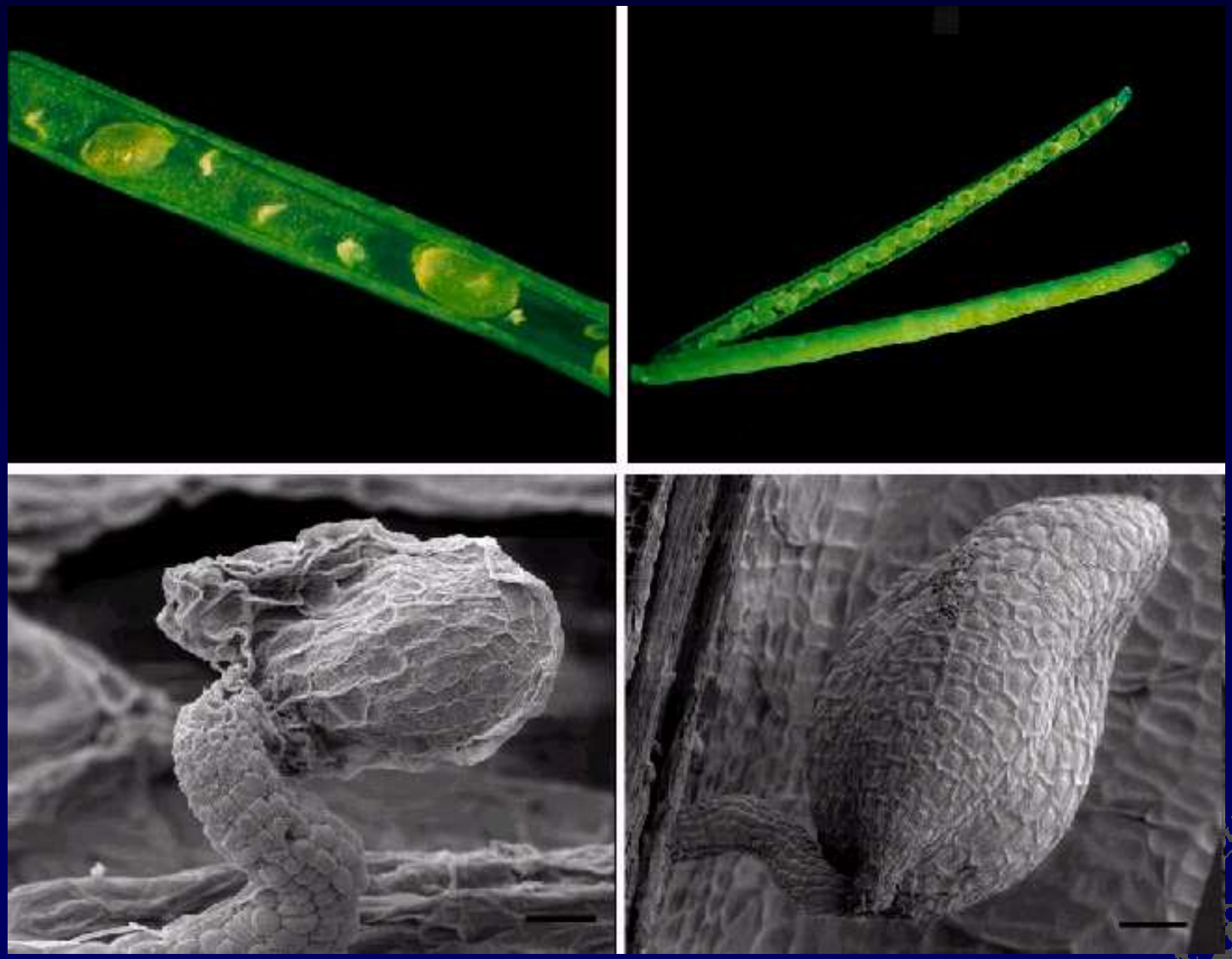


Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů

Fenotyp šešulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1 *CKI1/CKI1*



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

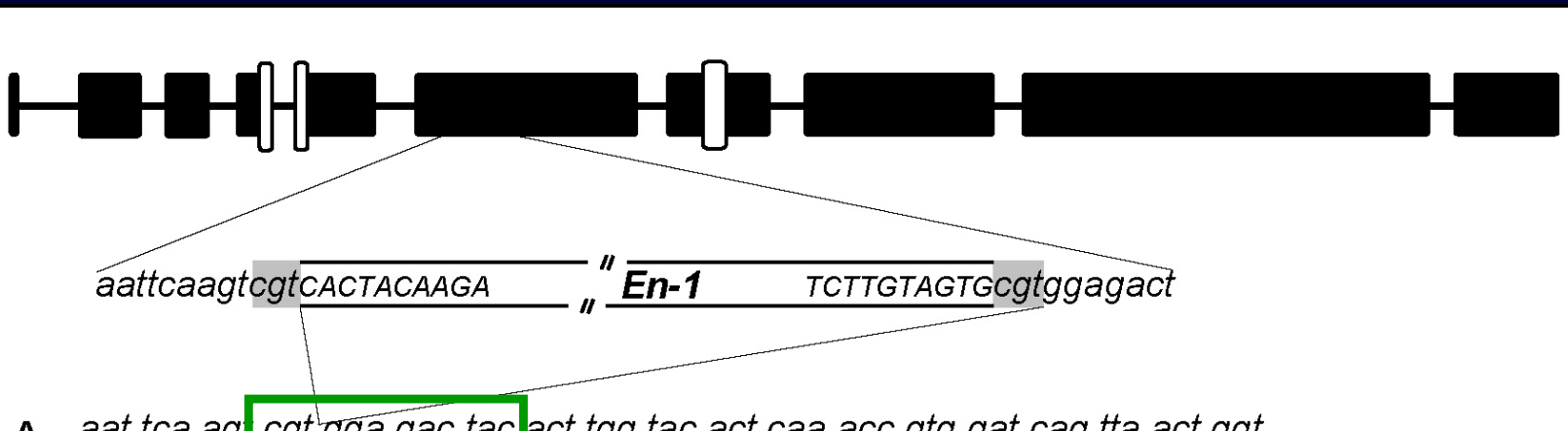
1. Izolace revertantních linií

- PCR vyhledávání ve 246 rostlinách segregující populace
- z 90 *cki1::En-1* pozitivních 9 rostlin mělo kromě šešulí standardního typu i šešule mutantní

Analýza potomstva

- potvrzení absence inzerce pomocí PCR
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



A. *aat tca ag cgt gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*

N S S R G D Y T W Y T Q T V D Q L T G

B. *aat tca ag **ggt acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*

N S S G T T W Y T Q T V D Q L T G

C. *aat tca agt cgt **ac**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*

N S S R T E T T L G T L K P W I S .

D. *aat tca agt cg**c** **g**tg gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*

N S S R V E T T L G T L K P W I S .

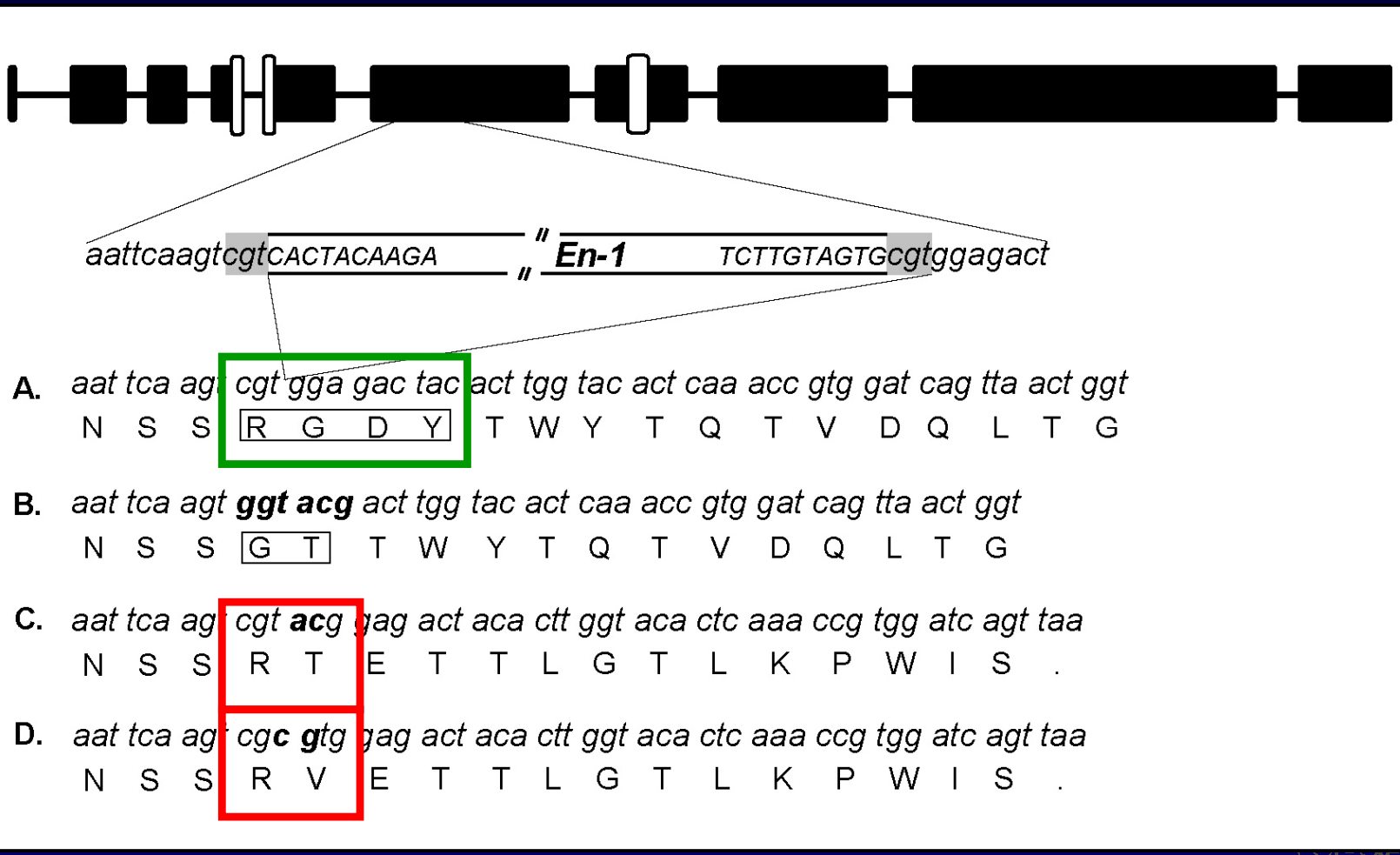
Molecular Physiology
MASARYK UNIVERSITY

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

- analýza fenotypu segregující populace (*CKI1/CKI1 CKI1/cki1::En-1)*
- PCR analýza rostlin s mutantním fenotypem-identifikace rostlin bez inzerce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvencování

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



Molecular Physiology
MASARYK UNIVERSITY

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

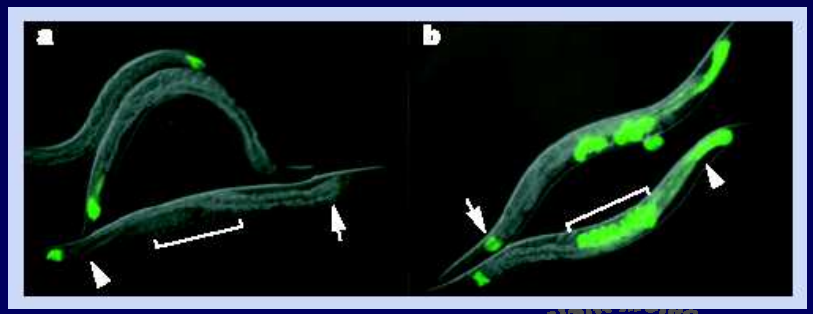
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

Genomika III.

mechanismus RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
    - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravď. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
    - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
    - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech-gen. vyhledávání

RNAi *rnai*



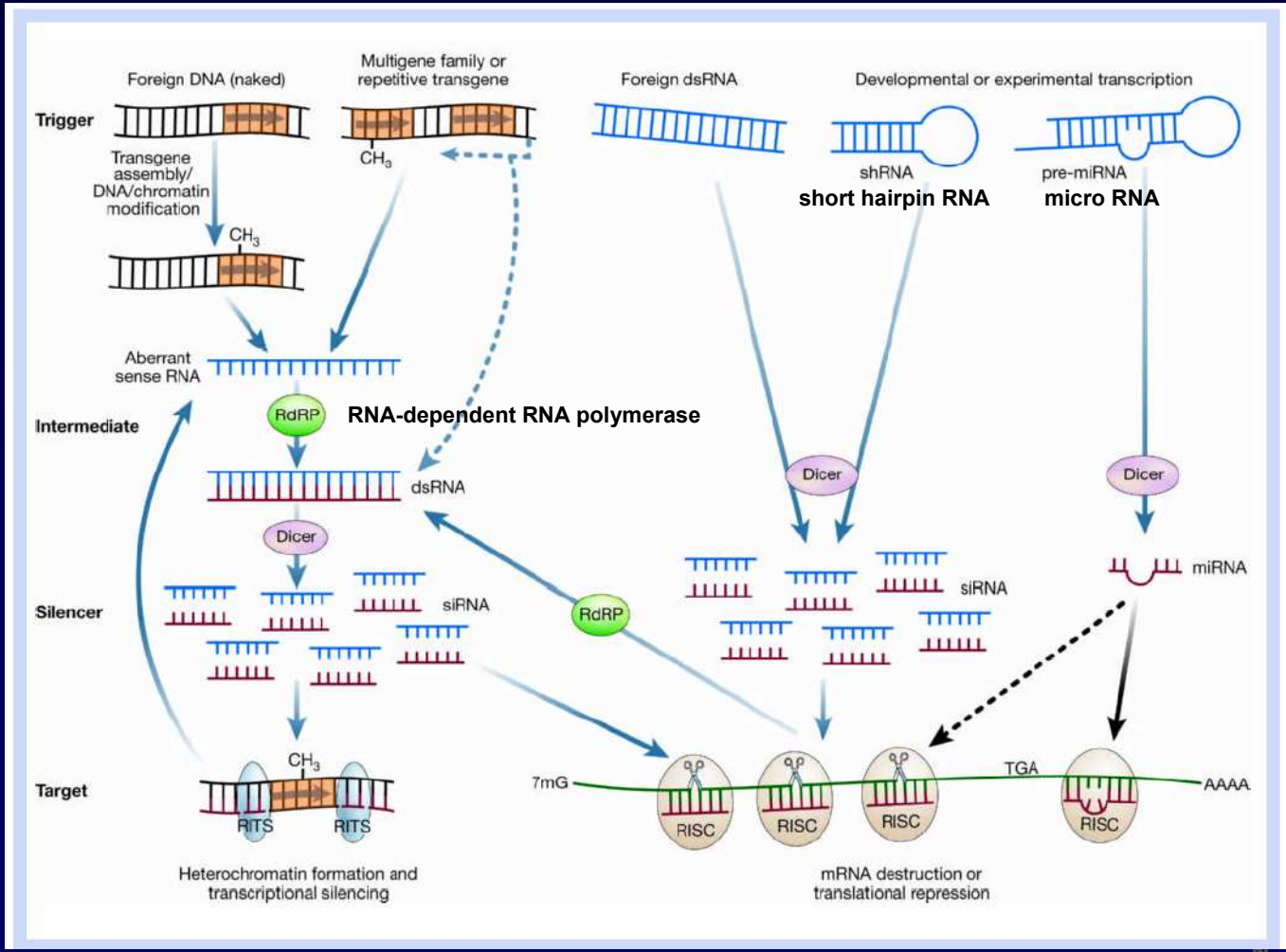
Genomika III.

mechanismus RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
  - je to přirozený mechanismus regulace genové exprese u všech eukaryot
  - podstatou je tvorba dsRNA, která může být spuštěna několika způsoby:
    - přítomnost cizí „aberantní“ DNA
    - specifické transgeny obsahující obrácené repetice částí cDNA
    - transkripce vlastních genů pro shRNA (short hairpin RNA) nebo miRNA (micro RNA, endogenní „vlásenková“ RNA)
  - dsRNA je procesována enzymovým komplexem (DICER), což vede k tvorbě siRNA (short interference RNA), která se pak váže buď na enzymový komplex RITS (RNA-induced transcriptional silencing complex) nebo RISC (RNA-induced silencing komplex)
  - RISC zprostředkovává buď degradaci mRNA (v případě úplné similarity siRNA a cílové mRNA) nebo vede pouze k zastavení translace (v případě neúplné homologie jako je tomu např. v případě miRNA
  - RITS zprostředkovává reorganizaci genomové DNA (tvorba heterochromatinu a inhibice transkripce)

Genomika III.

mechanismus RNA interference



Mello, 2004

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

Andrew Z. Fire

USA

Stanford University School of Medicine
Stanford, CA, USA

b. 1959

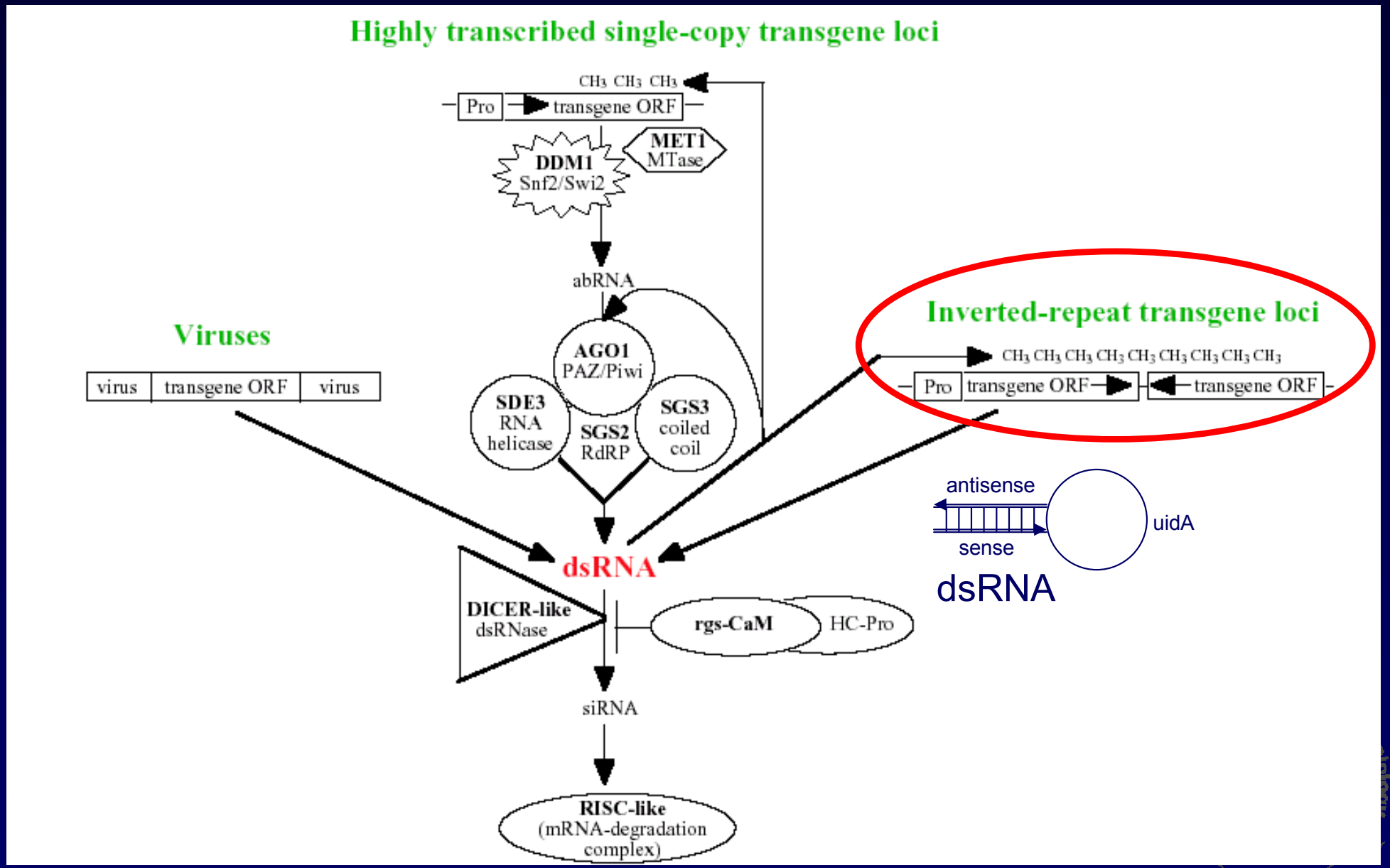
Craig C. Mello

USA

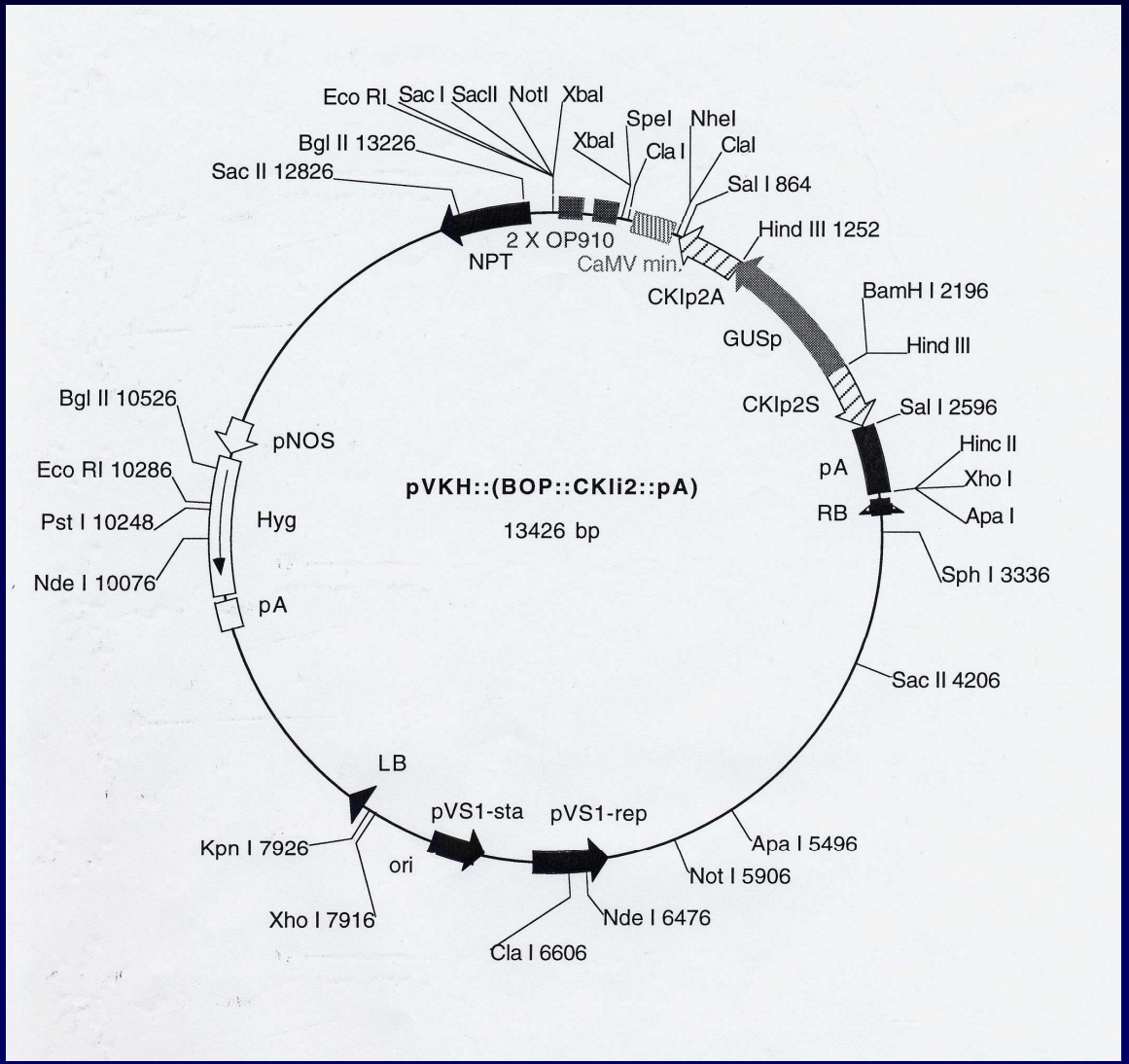
University of Massachusetts Medical School
Worcester, MA, USA

b. 1960

Mechanizmus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)



- 2. RNAi approach using regulated expression system



Základy genomiky

III. Přístupy reverzní a přímé genetiky

Jan Hejátko

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

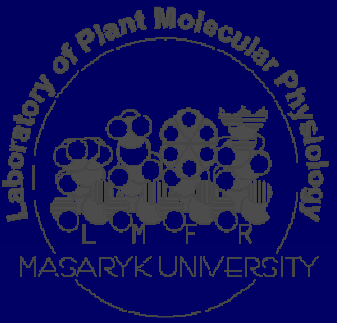
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - kosegregační analýza
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

Genomika III.
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů

Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů
  - identifikace mutovaného lokusu
    - plasmid rescue
    - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
  - fragmentační analýza a poziční klonování



Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika

Přístupy „klasické“genetiky *versus* „reversně genetický“ přístup ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

h x n

„Přímě genetický“přístup

EMS

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU

2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ

3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

1.IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA

2. IDENTIFIKACE FENOTYPU

3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

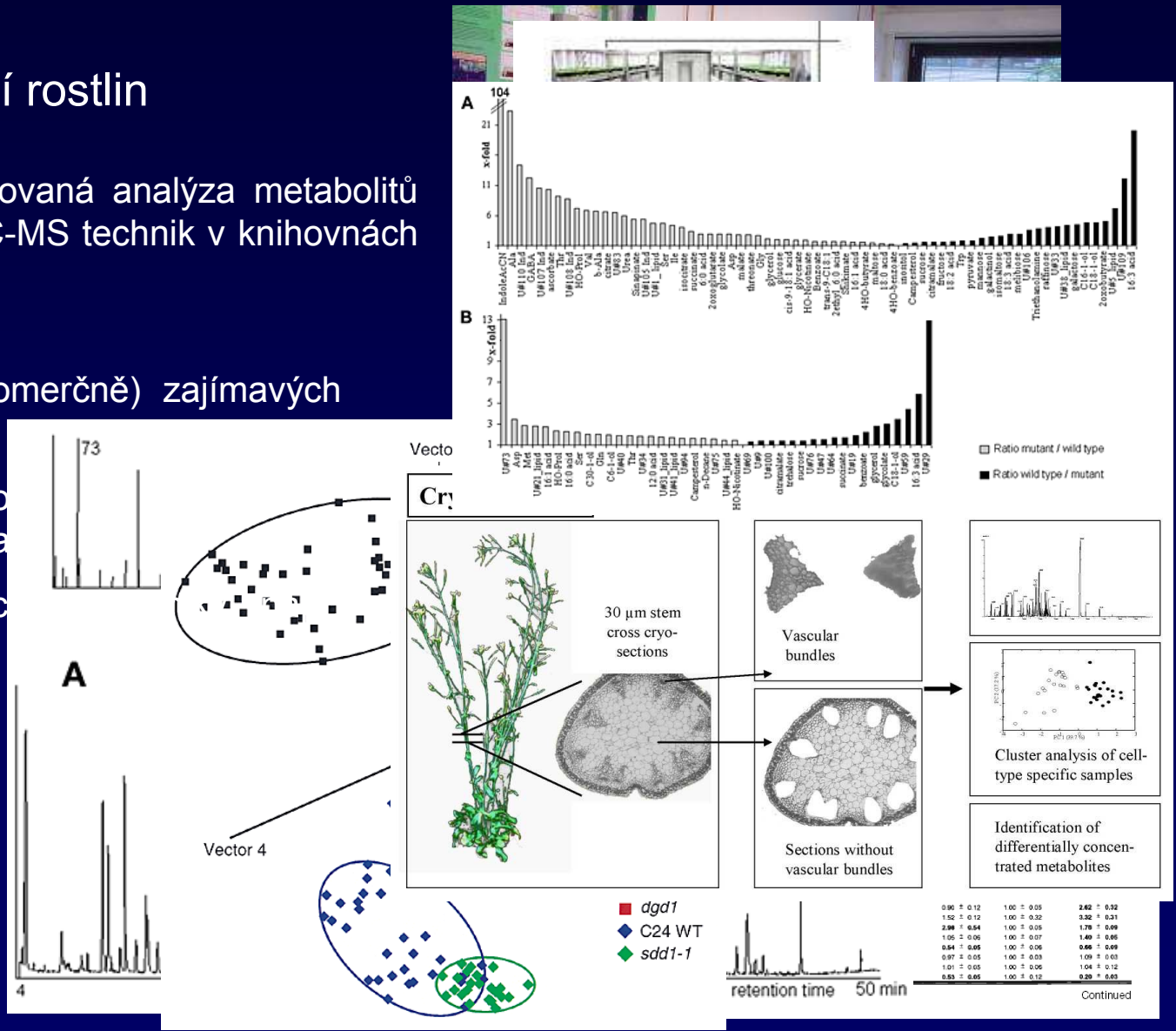
Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu

Genomika III.

Přístupy genetiky přímé-metabolomika a metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
  - hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů
  - identifikace (např. i komerčně) zajímavých mutantů
  - snadná a rychlá izo
    identifikace T-DNA zasa
  - možnost využít i spec
    mikrodisekce



Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

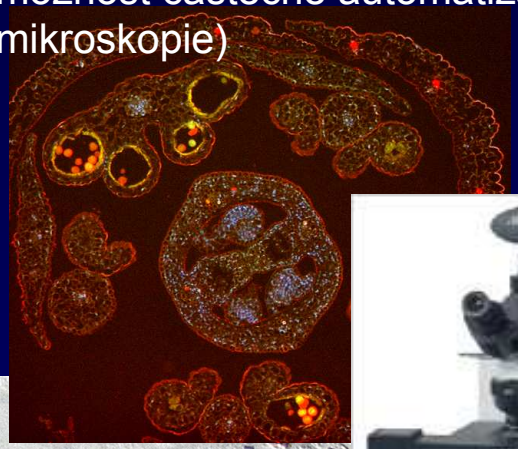
- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů a molekulárních markerů

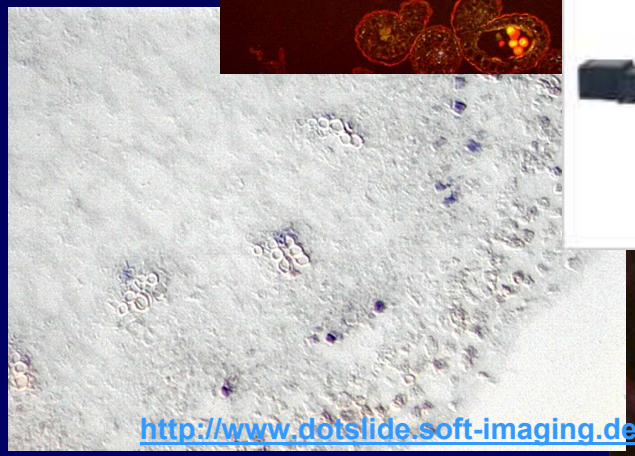
Genomika III.

Identifikace mutantů se změnou expresního profilu

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese
  - možnost částečné automatizace (virtuální digitální mikroskopie)

→ ?



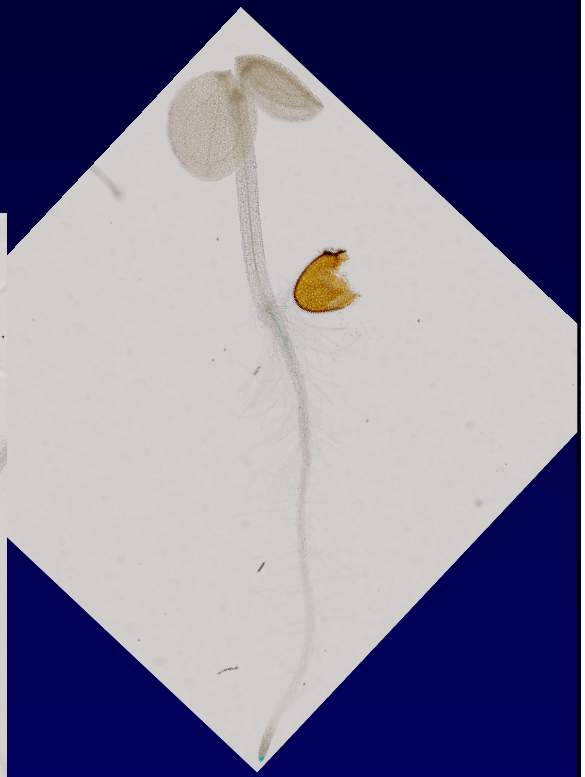


http://www.dotslide.soft-imaging.de/Young%20Mouse%2020x/index.html

.slide microscope

Genomika III.

Identifikace mutantů se změnou expresního profilu



Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů
  - identifikace mutovaného lokusu
    - plasmid rescue
    - iPCR

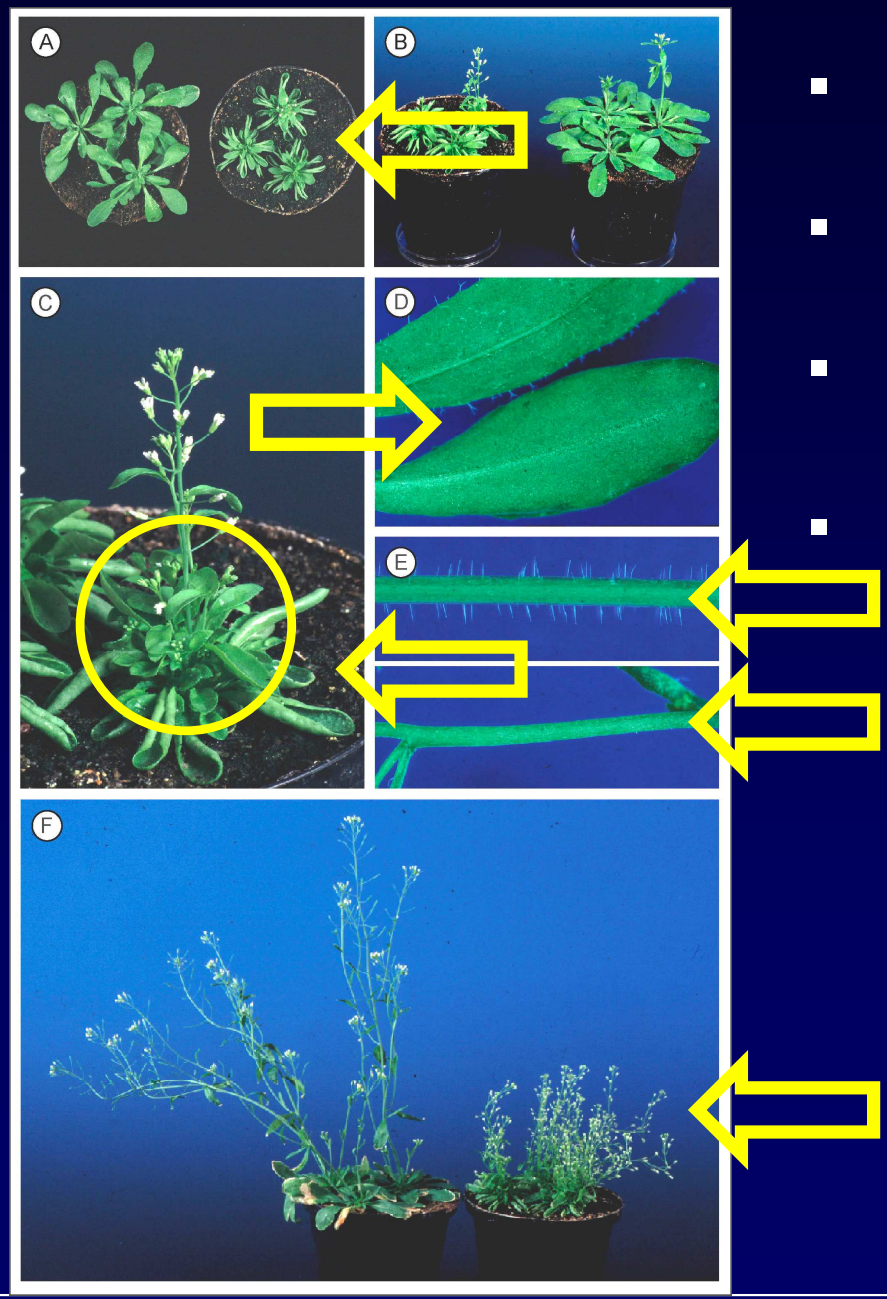
Genomika III.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

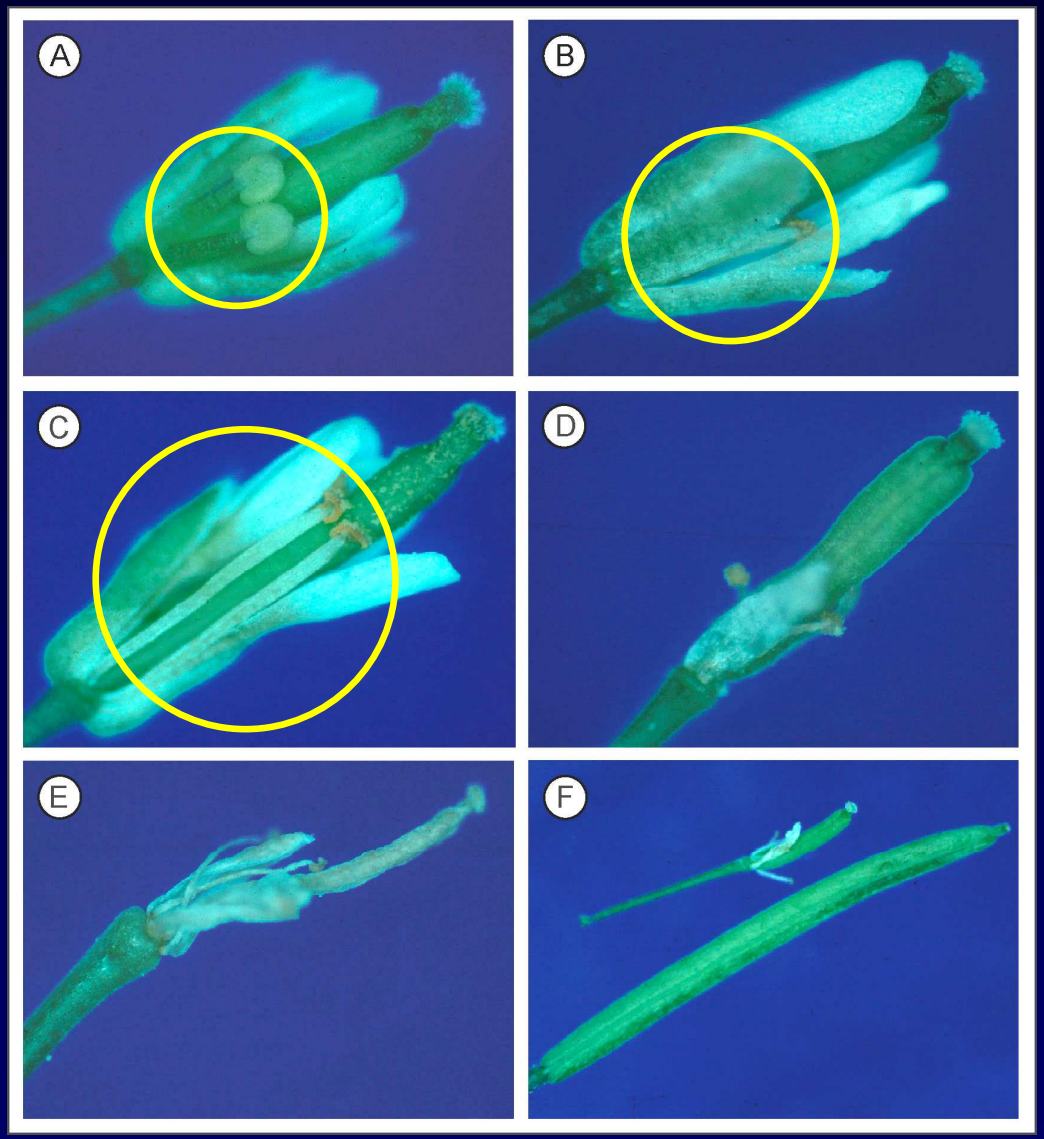
- popis fenotypu

Identifikace mutantního fenotypu



- zvlněné listy
- keříčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí

The Mutant Phenotype Identification



- Samčí sterilita, poruchy v prodlužování tyčinek (A,B) (porovnej se standardním typem C)

Genomika III.

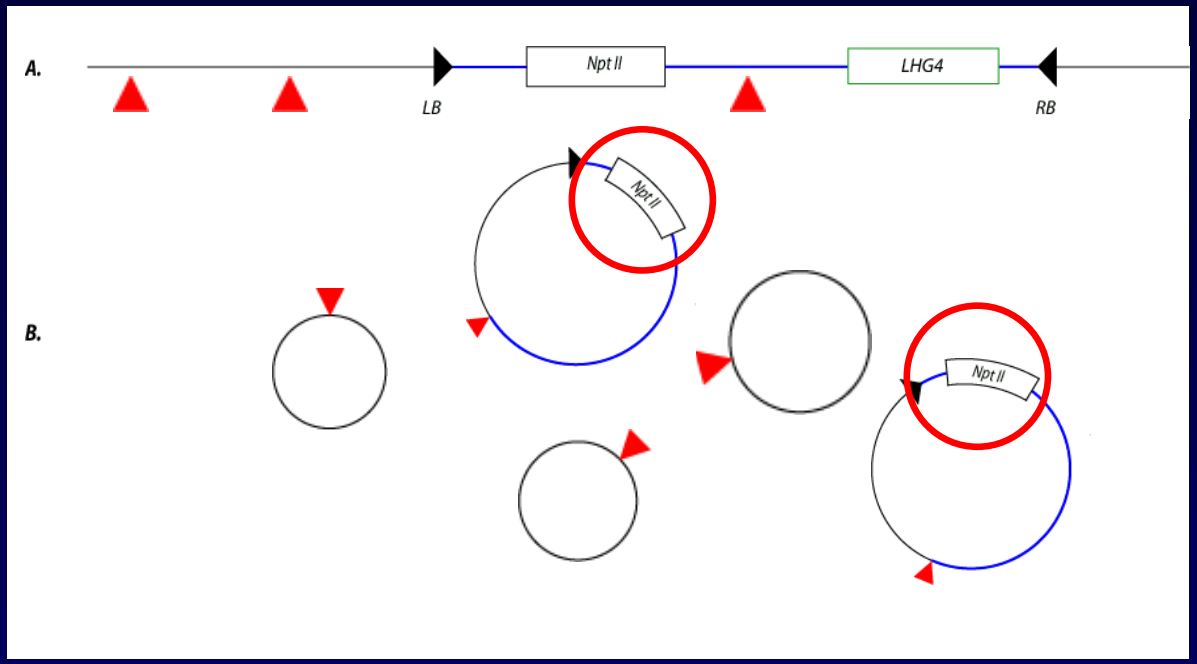
Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

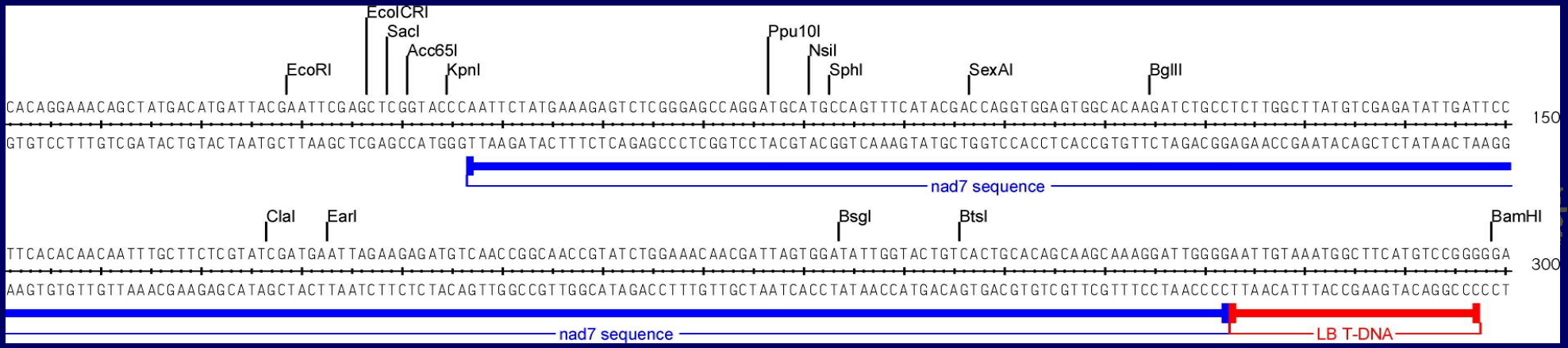
- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti

Mutant Locus Identification

1. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k ***levé hranici*** pomocí ***plasmid rescue***

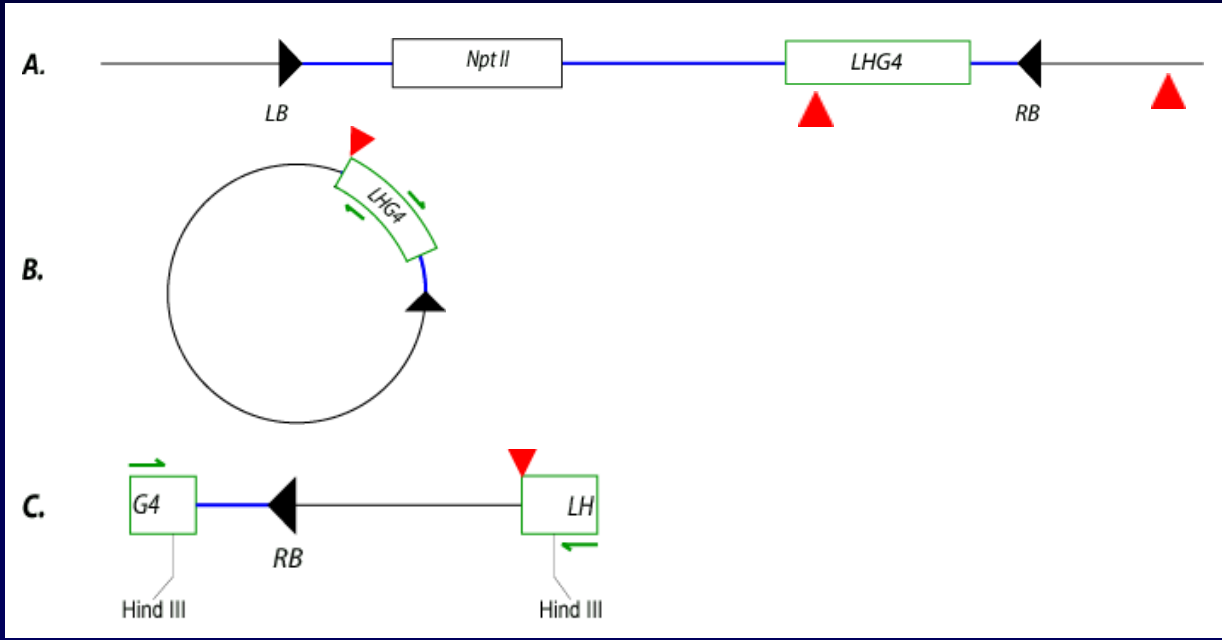


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence je identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

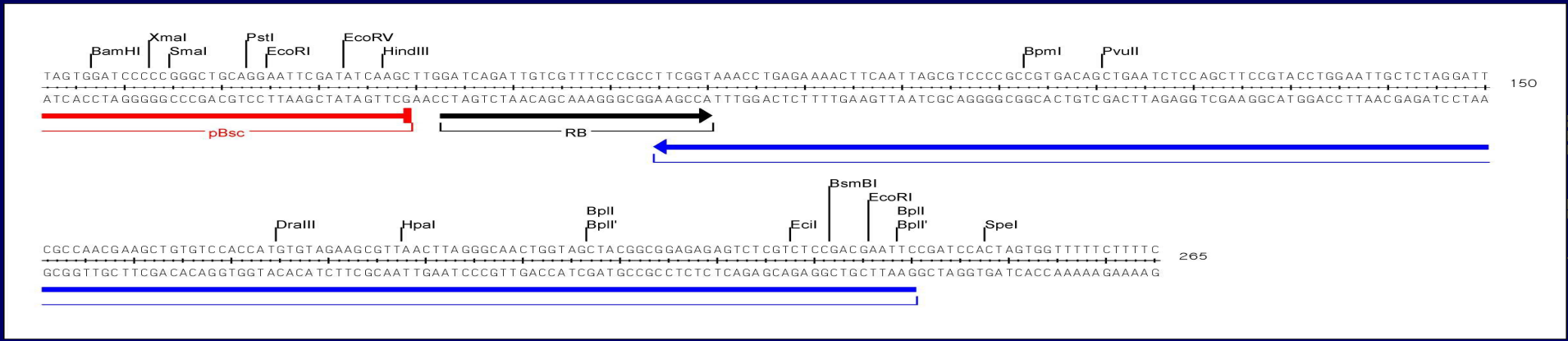


Mutant Locus Identification

2. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k ***pravé hranici*** pomocí ***inverzní PCR (iPCR)***



- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- purifikace, religace a PCR pomocí T-DNA specifických primerů
- klonování a sekvencování
- identifikovaná sekvence nebyla homologní k žádné sekvencí se známou funkcí



Genomika III.

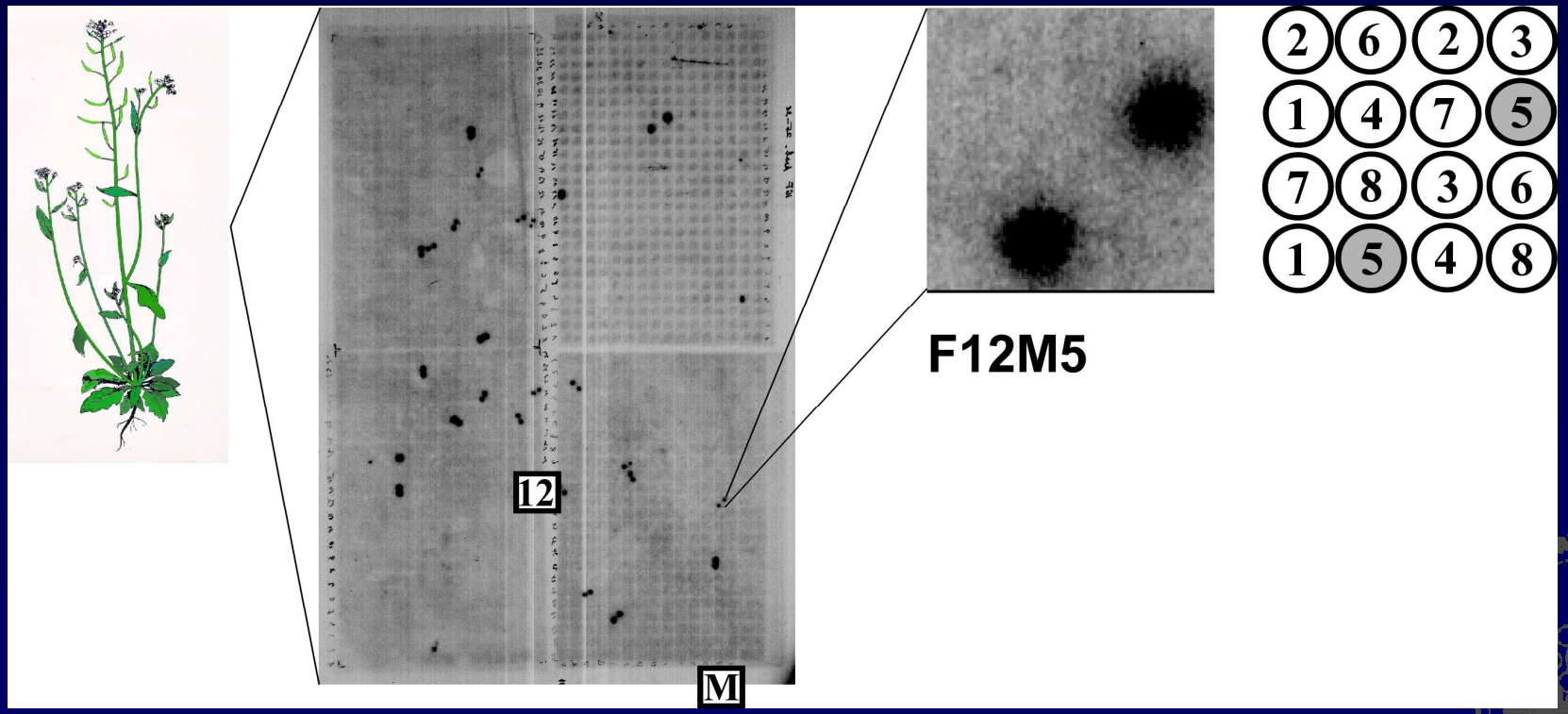
Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti
- lokalizace T-DNA inzerce v genomu *Arabidopsis*

Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

- genomová knihovna obsahující 10,752 klonů with s průměrnou velikostí inzertu 100 kb
- bakteriální klony uspořádané v mikrotitračních deskách
- knihovna nanesena na nylonové filtry pro hybridizaci s radioaktivně značenou sondou



Mapování pomocí IGF-BAC databáze

I. Sekvence přiléhající k levé hranici T-DNA

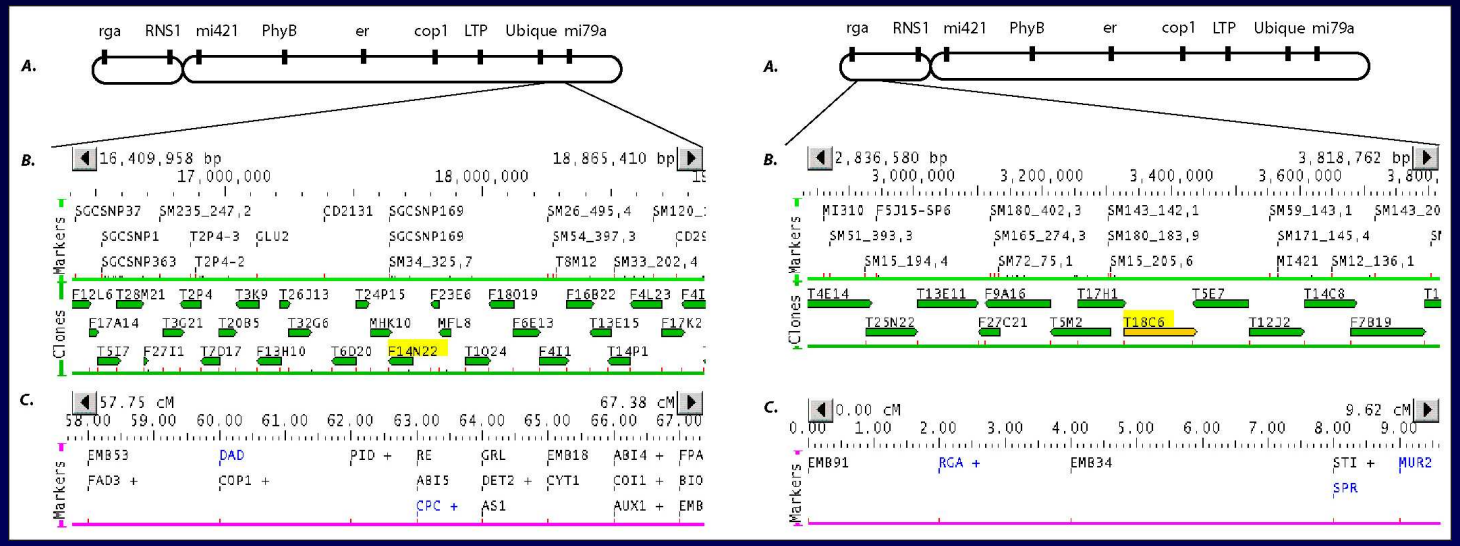
- celkem 28 pozitivně hybridizujících klonů
- 19 z nich lokalizováno na chromozomu 2
- 18 s podobností k mtDNA

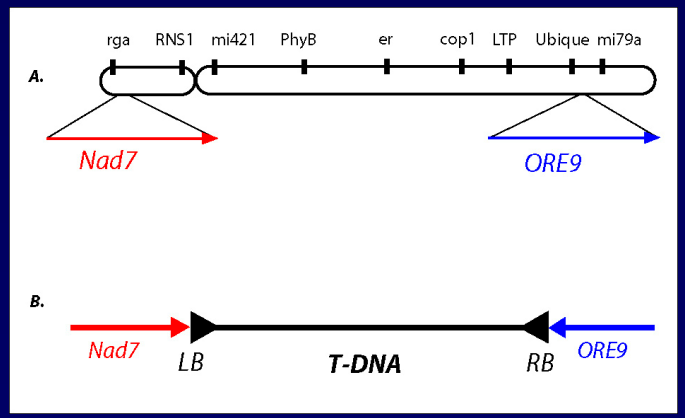
II. Sekvence přiléhající k pravé hranici T-DNA

- celkem 6 pozitivně hybridizujích klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2

Lokalizace genomové T-DNA přiléhající k levé i pravé hranici T-DNA na chromozomu 2

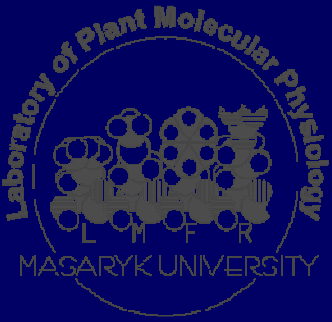
Sekvence přiléhající k pravé a levé hranici T-DNA





Genomika III.
Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů
  - identifikace mutovaného lokusu
    - plasmid rescue
    - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
  - poziční klonování

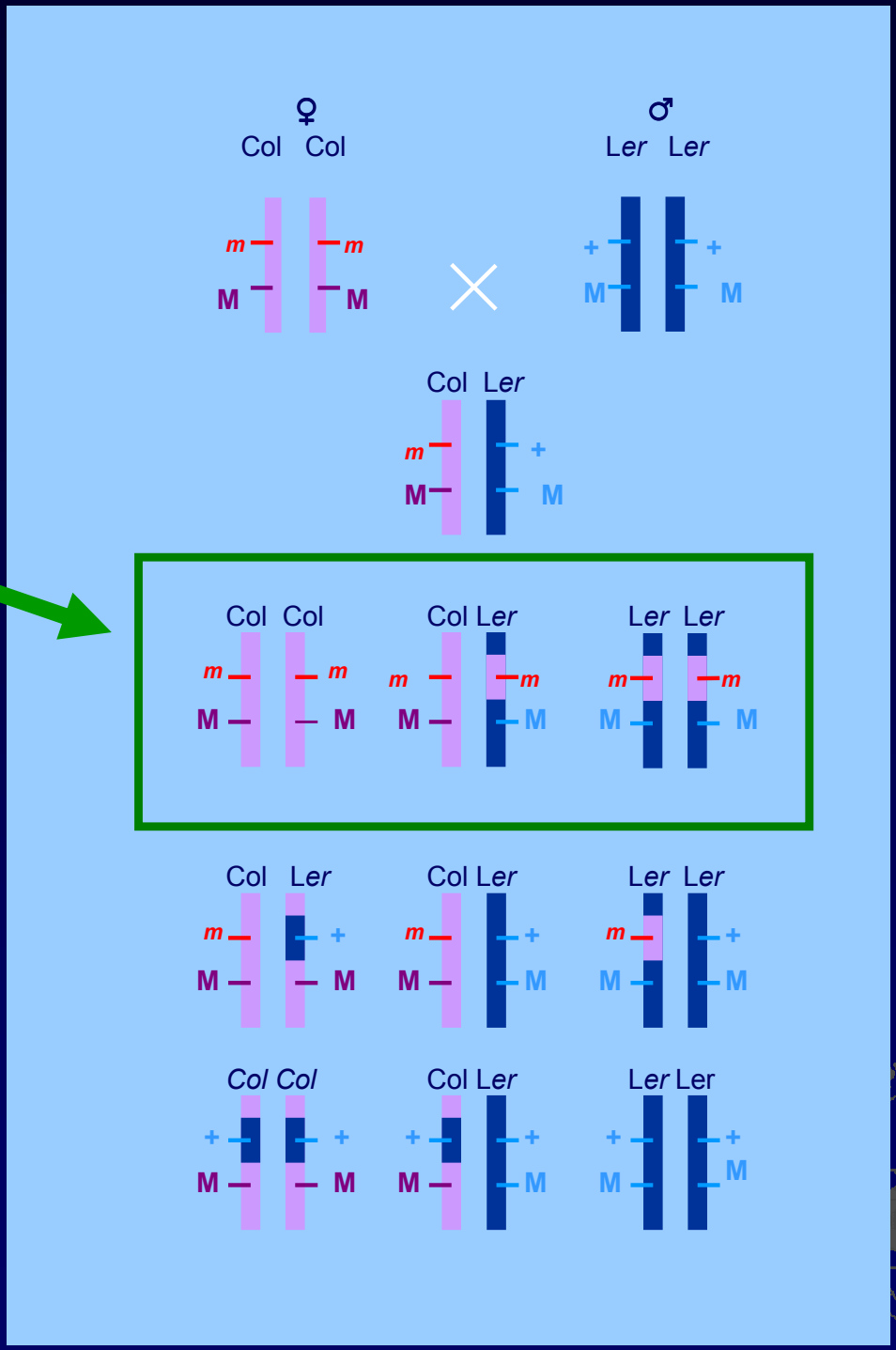


Genomika III.

Přístupy genetiky přímé-fragmentační analýza a poziční (map-based) klonování

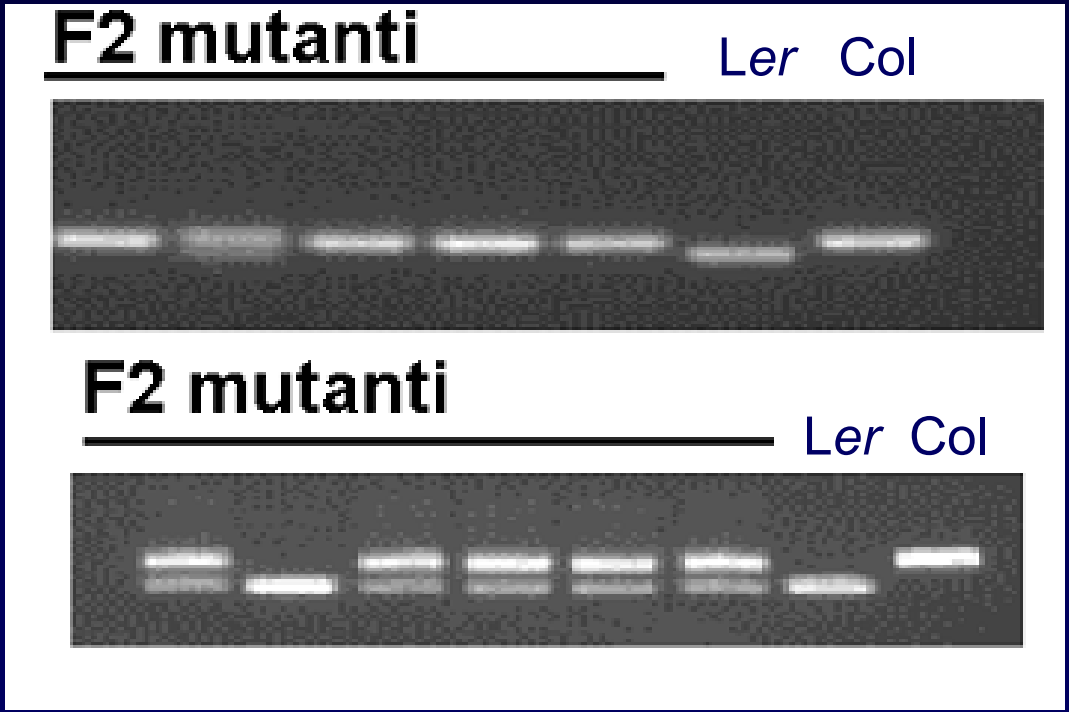
- Poziční klonování
  - podstatou je kosegregační analýza segregující populace (většinou potomstva informačního zpětného křížení) s molekulárními markery
    - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
    - RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
    - AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Příprava mapovací populace



Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

r [%] = počet chomozomů *Col* / počet všech chromozomů x 100

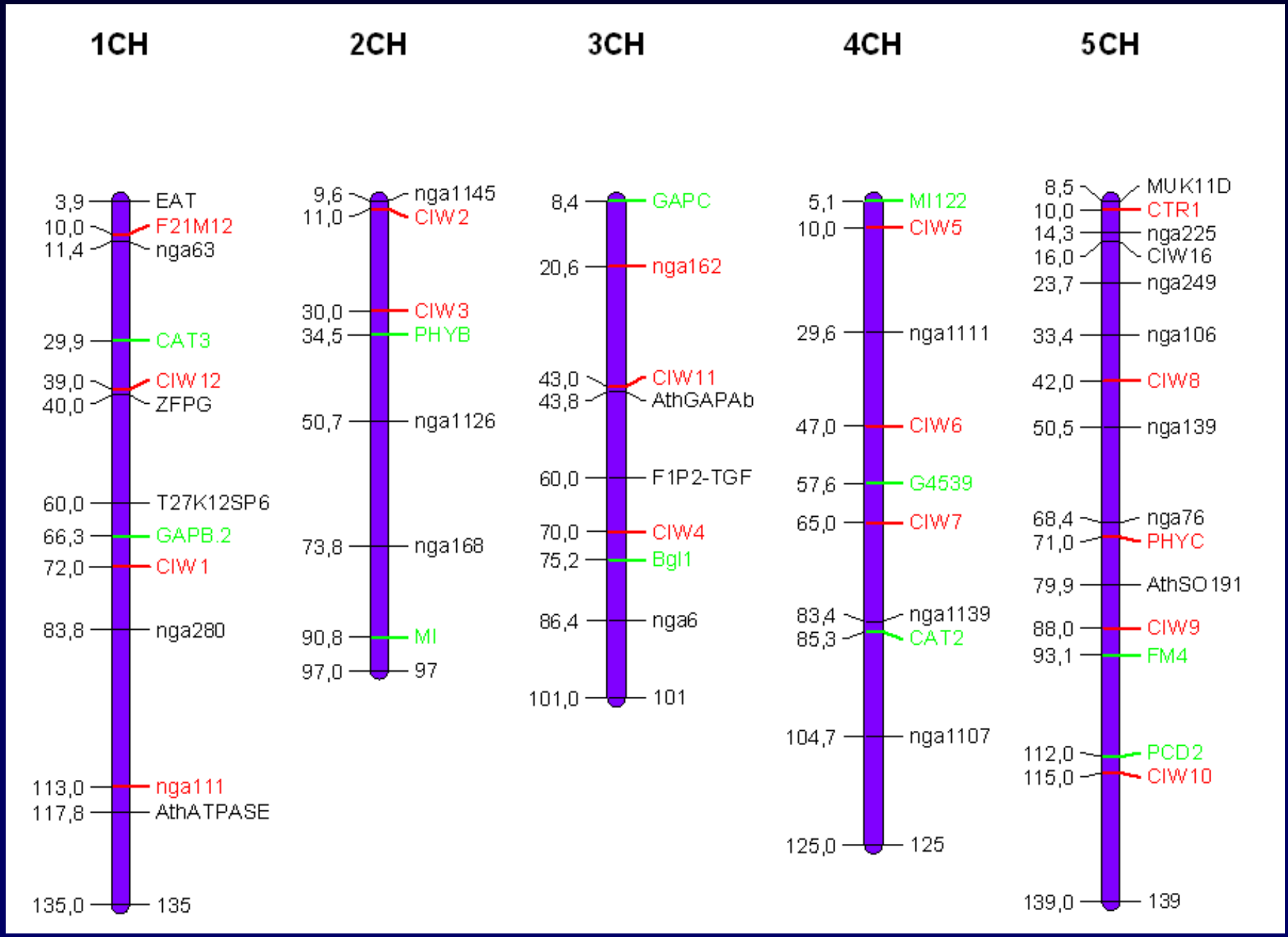


marker I – ve vazbě
5 mutantů
1/10x100 = 10%

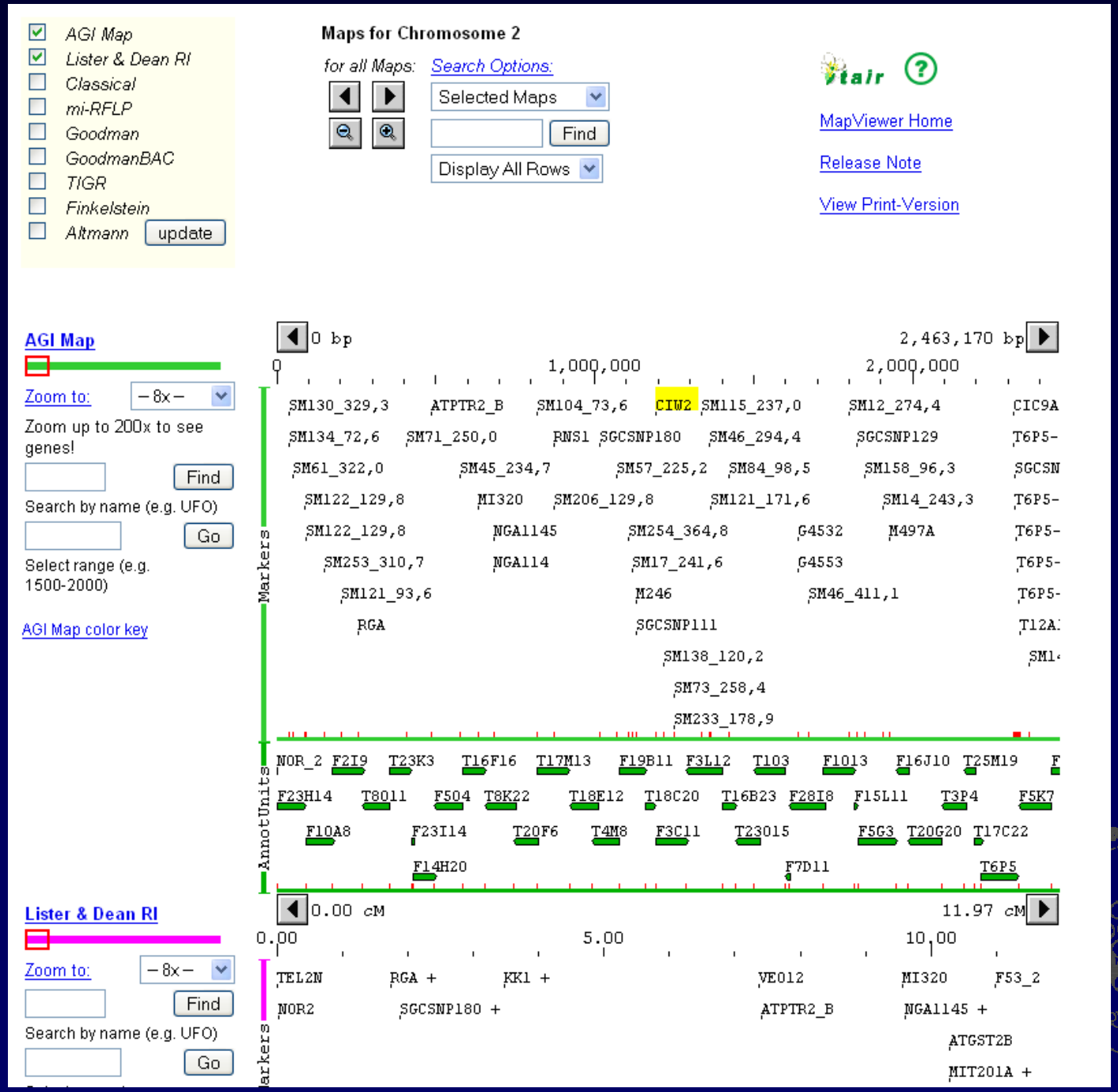
marker II - žádná vazba
6 mutantů
7/12x100 = 58%

- Analýza cca 2000 mutantních linií
- Určení nejbližšího (ještě) segregujícího markeru
- Identifikace mutace pomocí sekvenování

Mapa DNA molekulárních markerů



Markery pro jemné mapování



Genomika III.-shrnutí

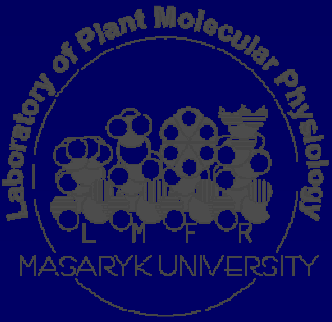
Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - kosegregační analýza
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

Genomika III.-shrnutí

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů
  - identifikace mutovaného lokusu
    - plasmid rescue
    - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
  - poziční klonování



Genomika III.

Diskuse