

Genetické metody v zoologii



J. Bryja

M. Macholán



Sylabus

1. Analýza fenotypu (signální fenotypy, epigenetické znaky, kvantitativní znaky, analýza landmarků) **MM**
2. Cytogenetika (analýza karyotypu, proužkování, FISH, „painting“) a elektroforetické metody (proteiny, DNA), DNA-DNA hybridizace **MM**
3. Analýza DNA I (izolace DNA, genetické markery - jaderná vs. mimojaderná DNA, PCR, real-time PCR, "multi-locus" DNA markery: fingerprinting, RAPD, AFLP) **JB**
4. Analýza DNA II ("single-locus" DNA markery: mikrosatelity, LINE, SINE, SNP) **JB**
5. Analýza DNA III (sekvencování - přehled metod, "next generation sequencing") **JB**
6. Analýza DNA IV (SNP a jejich analýza: RFLP, DGGE, TGEE, SSCP, klonování, microarrays) **JB**

Sylabus

7. Metody analýzy I (populačně-genetická data) - analýzy založené na frekvencích alel v populaci vs. "individual-based" modely **JB**
8. Metody analýzy II (fylogenetická data) **MM**
9. Praktické cvičení v laboratoři I (zhotovení chromozomálních preparátů, analýza karyotypu) **MM**
10. Praktické cvičení v laboratoři II (elektroforéza enzymů) **MM**
11. Praktické cvičení v laboratoři III (PCR, real-time PCR) **JB**
12. Praktické cvičení v laboratoři IV (analýza DNA fragmentů po PCR, elektroforéza, fragmentační analýza, SSCP v kapiláře) **JB**
13. Praktické cvičení v laboratoři V (sekvencování) **JB**

Doporučená literatura (česká)

Genetické metody v zoologii

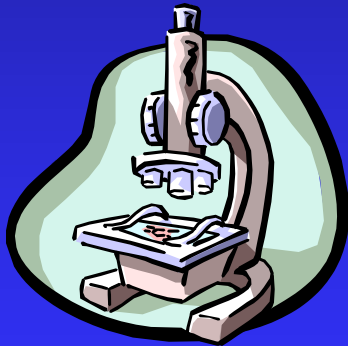
Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

Nakladatelství Karolinum 2004



Proč?

Problém:
zoologie, taxonomie
ekologie, evoluce



**klasické
metody**

morfologická,
ekologická,
bionomická
data

Genetické metody:

**genetická
data**



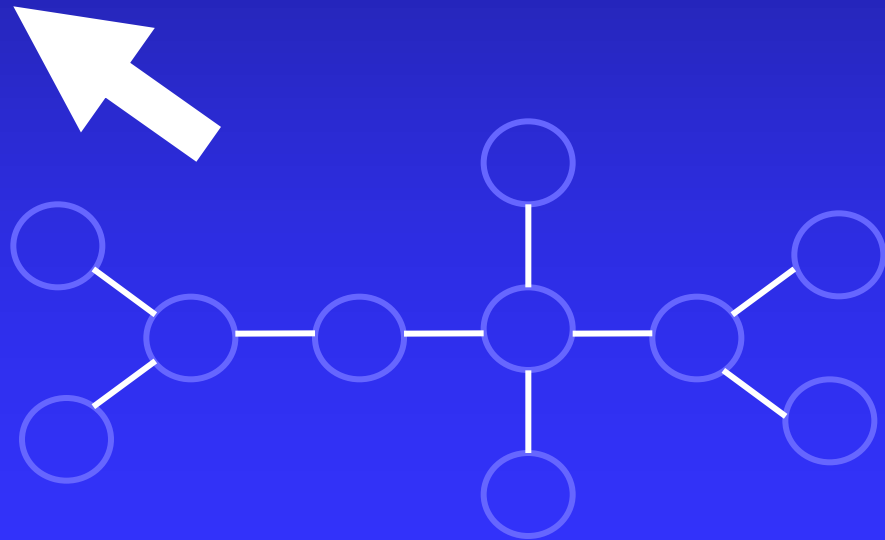
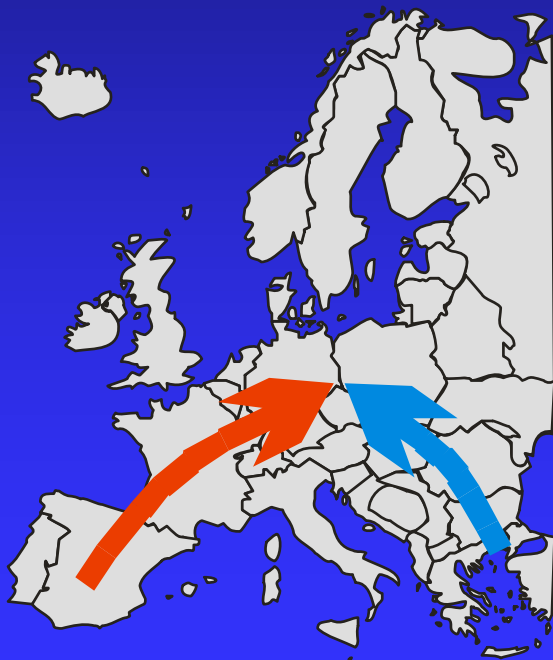
Nový rozměr poznání

Proč používat genetické metody v zoologii?

- Často nelze jinak
- fylogenetické vztahy mezi populacemi a druhy
- paternita – páření často skryté a nemusí vést k oplození
- identifikace z trusu, chlupů - pohyb jedinců skrytě žijících druhů
- izolace populací – nemusí být zřejmá
- počet migrantů – nelze sledovat naráz všechny jedince

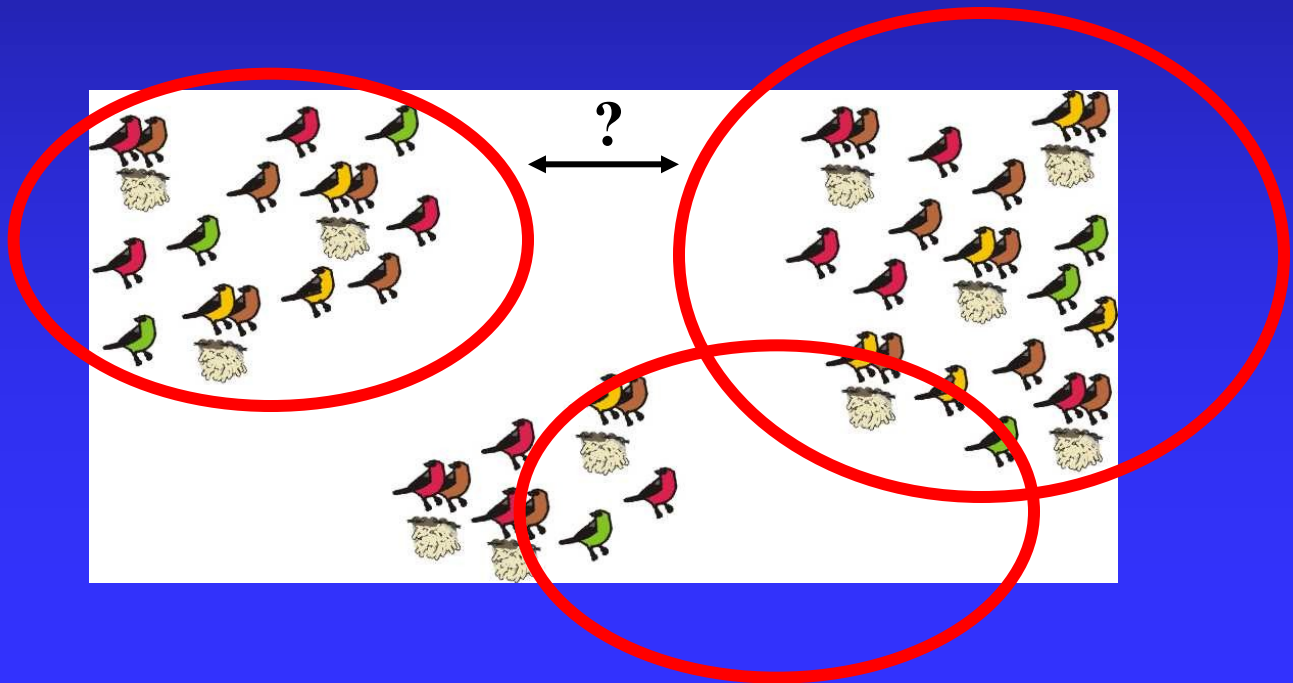
Úrovně genetické variability

- **populace** – studium speciace, fylogeografie



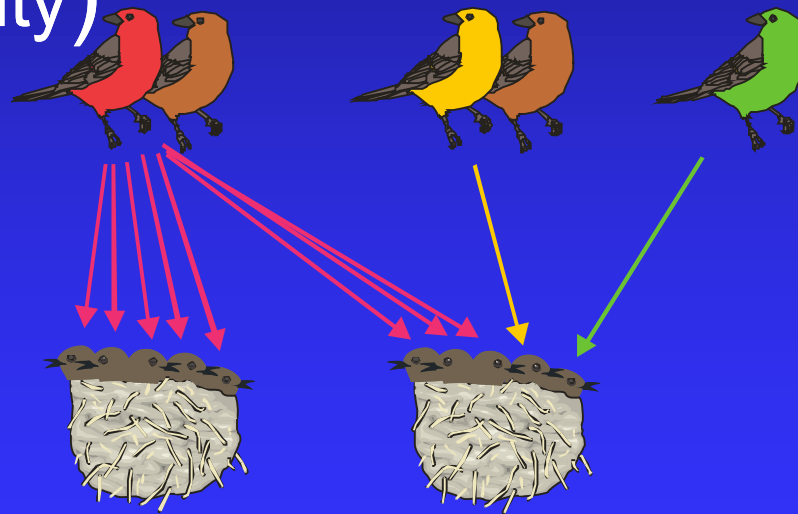
Úrovně genetické variability

- **populace** – populační biologie, ochranářská genetica)



Úrovně genetické variability

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



Genetické markery

- **kódující DNA (geny)**
- přepisované sekvence
- genetický kód
- vytvářejí fenotyp
- podléhají přírodnímu výběru
- rostoucí význam v přírodních vědách
- **nekódující DNA**
- nefunkční (neznámá funkce)
- neutrální k přírodnímu výběru
- většina DNA u eukaryot (až 95% u obratlovců)
- pseudogeny
- repetitivní DNA

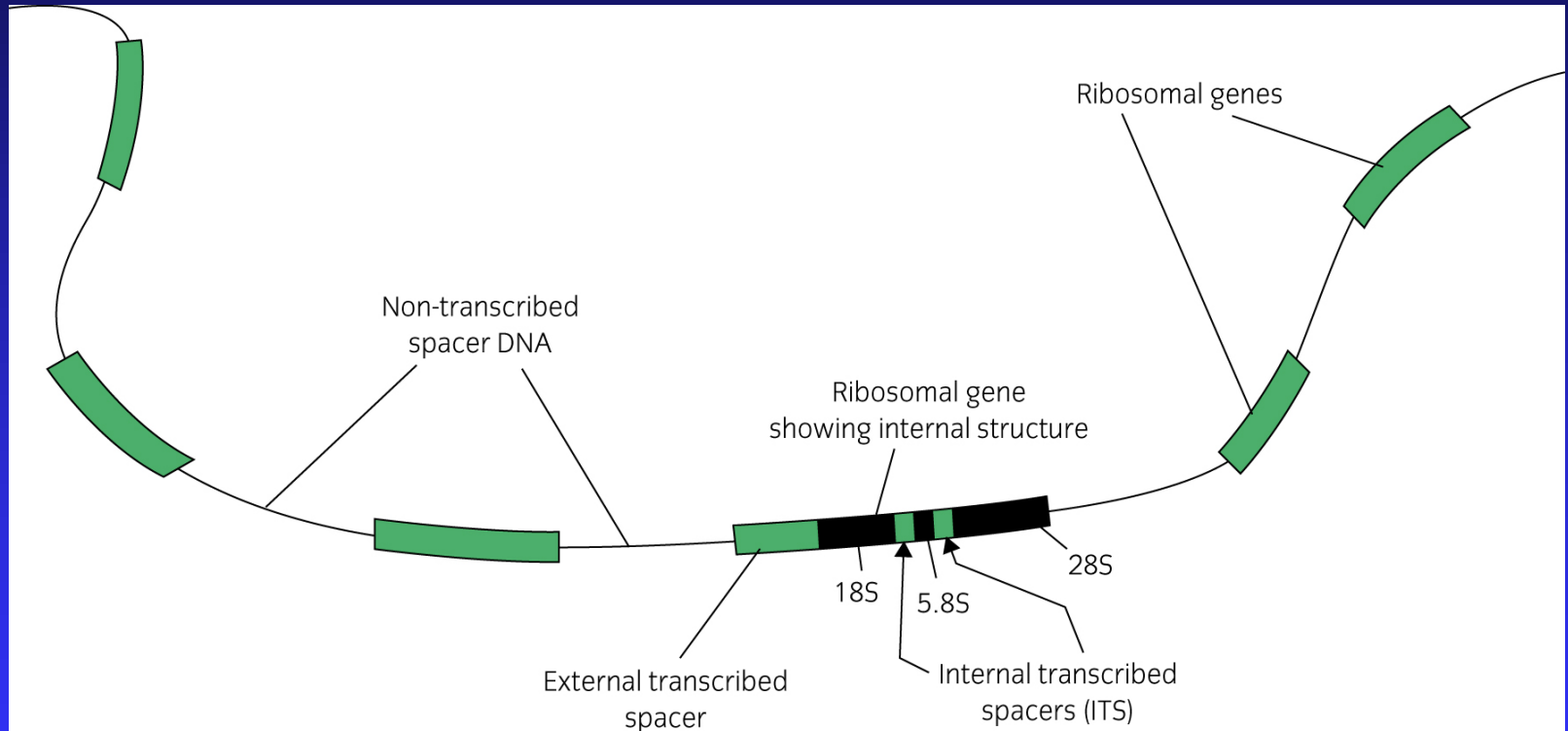
Repetitivní DNA

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

Kódující („funkční“) DNA

- studium selekce a funkční variability
- třetí pozice kodonů je vysoce redundantní a nepodléhá selekci
 - 1) ribosomal DNA
 - 2) nuclear structural (protein coding) genes
 - 3) mitochondrial DNA

1. Ribosomal DNA



- genes for ribosomal RNA – repeated clusters in eukaryotes
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster in prokaryotes
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

2. Nuclear structural genes

- nízká variabilita mezi jedinci – významná funkce, purifikující selekce (nejsou často používány jako genetické markery) – alozymy
- MHC geny
- SNPs – renewed interest in nuclear structural genes (jednoduché mutace způsobují významnou funkční změnu)
- studium transkripce - transkriptomika

„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA


„Molekulárně-genetické“ metody

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

CG**CACA**TCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CG**CA**TCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

Vznik DNA polymorfismu

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

Genotypizace – stanovení genotypu

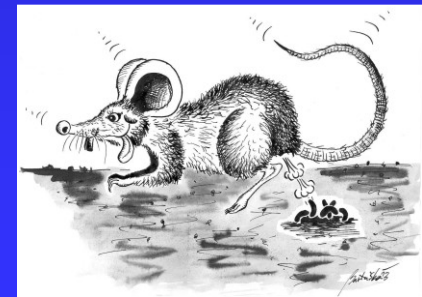
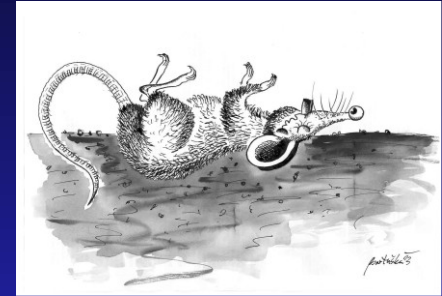
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
 - 1) izolace celkové DNA z tkání
 - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR)
 - 3) studium variability daného úseku (lokus)

Izolace DNA

- rozmanitý biologický materiál – musí obsahovat buněčná **jádra nebo mitochondrie** s nedegradovanou DNA
 - dnes většinou komerční kity
 - velký vliv **fixace** vzorků
-
- Izolace RNA (exprese 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

-

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

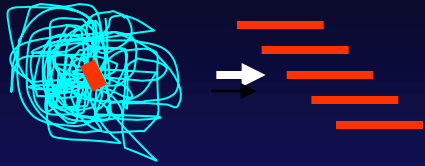
PCR

Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

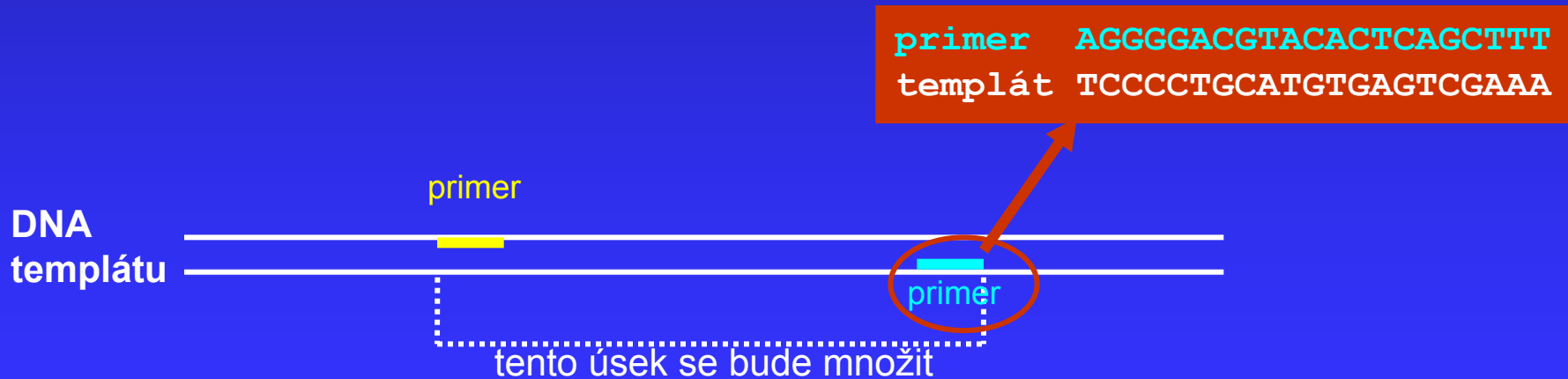
Amplifikace DNA – PCR

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



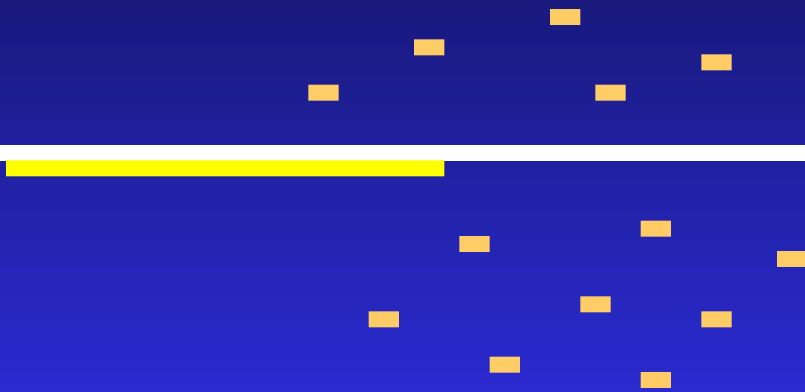
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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



V úseku mezi primery zůstanou vlákna DNA oddělena

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



Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



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



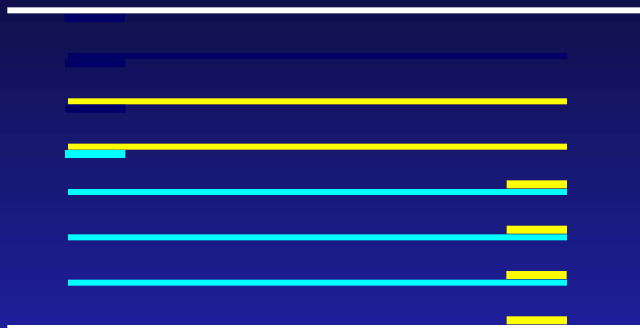
Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



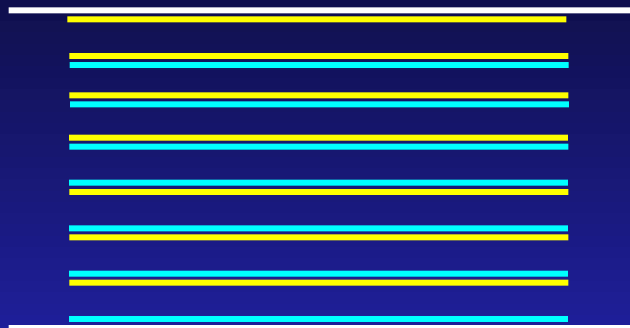
Při dalším zahřátí...



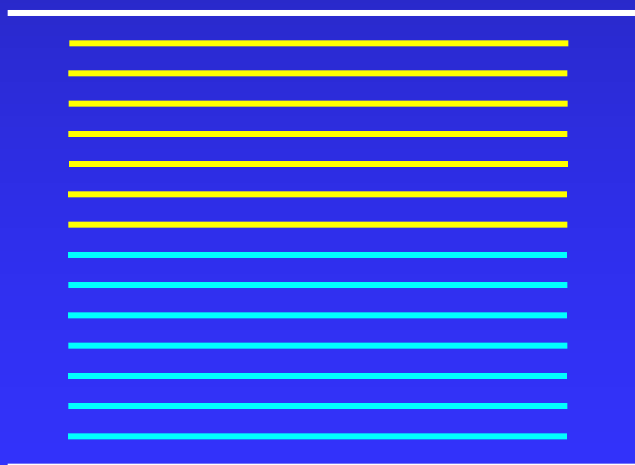
Ochlazení – nasednutí primerů



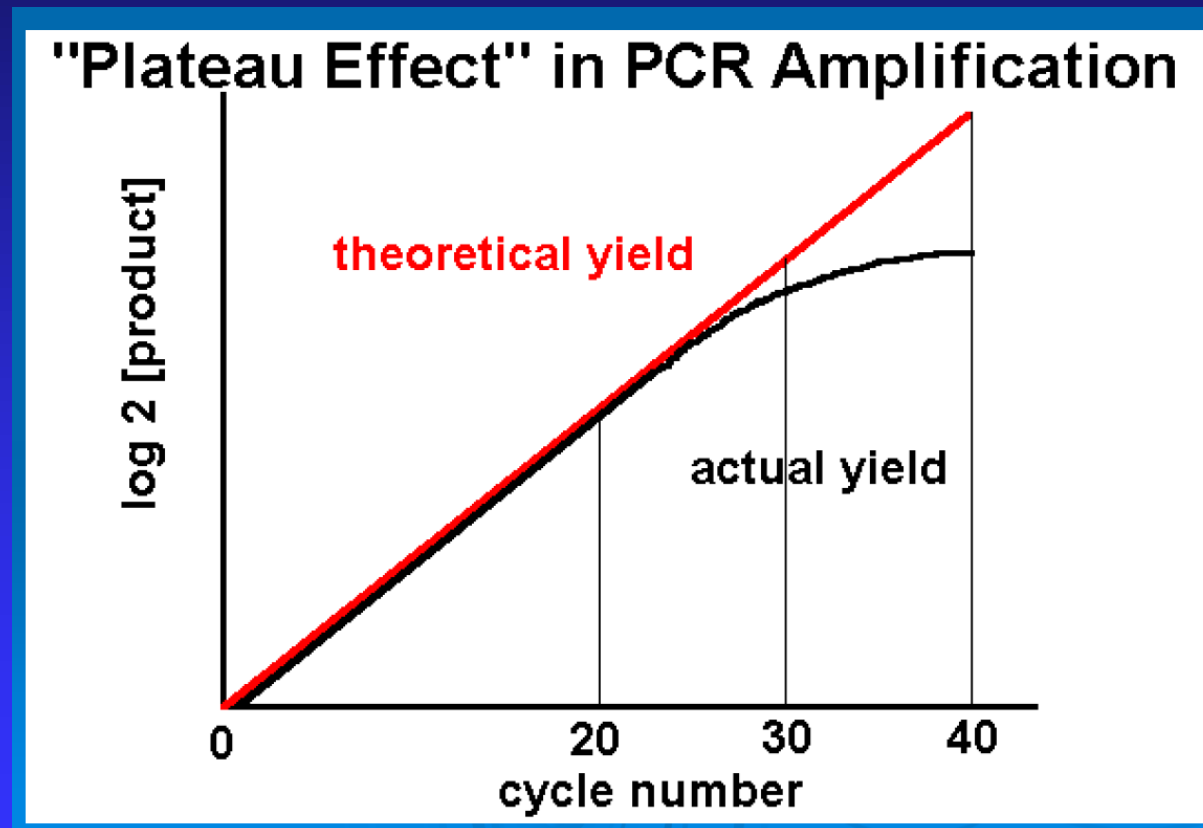
72 C vznik nových fragmentů



95 C denaturace



Inhibice PCR vysokou koncentrací DNA



PCR

Cycler MJ Research



Cycler Eppendorf



RoboCycler Stratagene



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

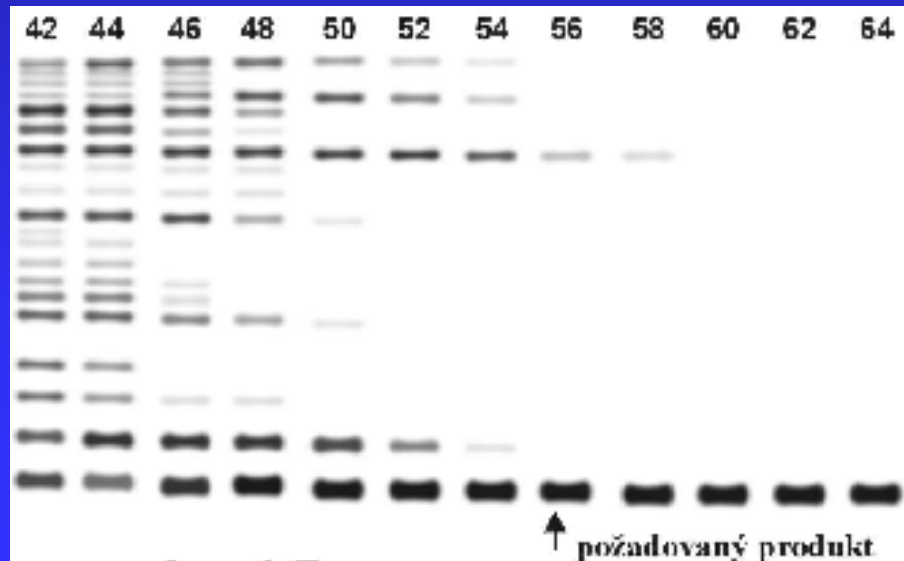
35x zpět

72 C 10 min



Co když PCR nefunguje?

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



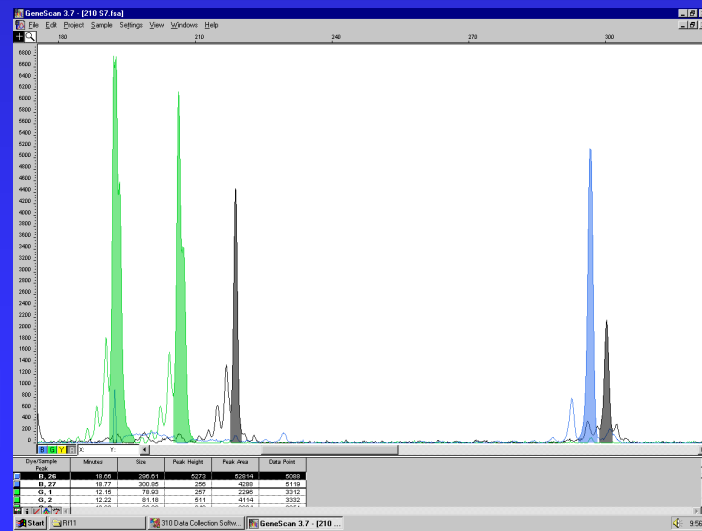
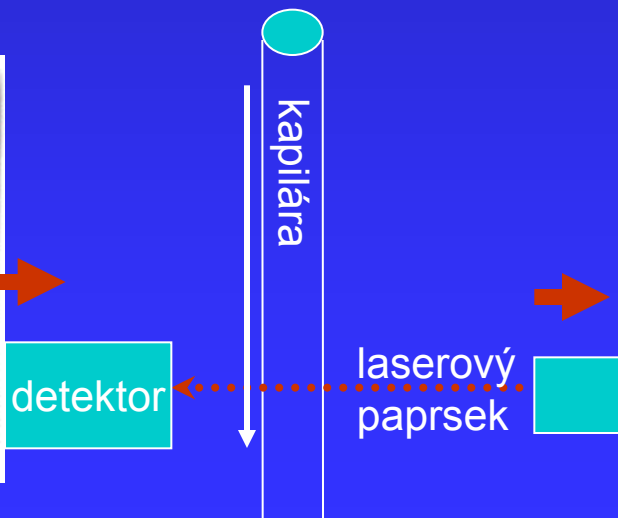
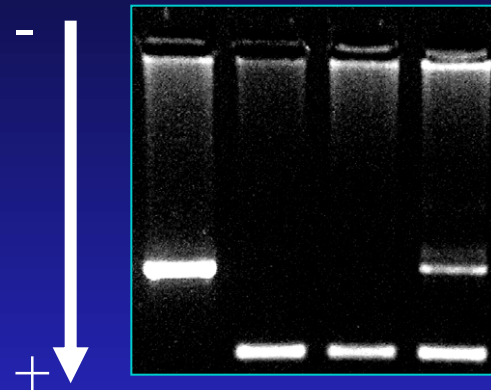
Studium variability nasyntetizovaného úseku

1) délkový polymorfismus

- elektroforéza

Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti

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



Studium variability nasyntetizovaného úseku

2) sekvenční polymorfismus

- +/- analýza (elektroforéza)
- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru



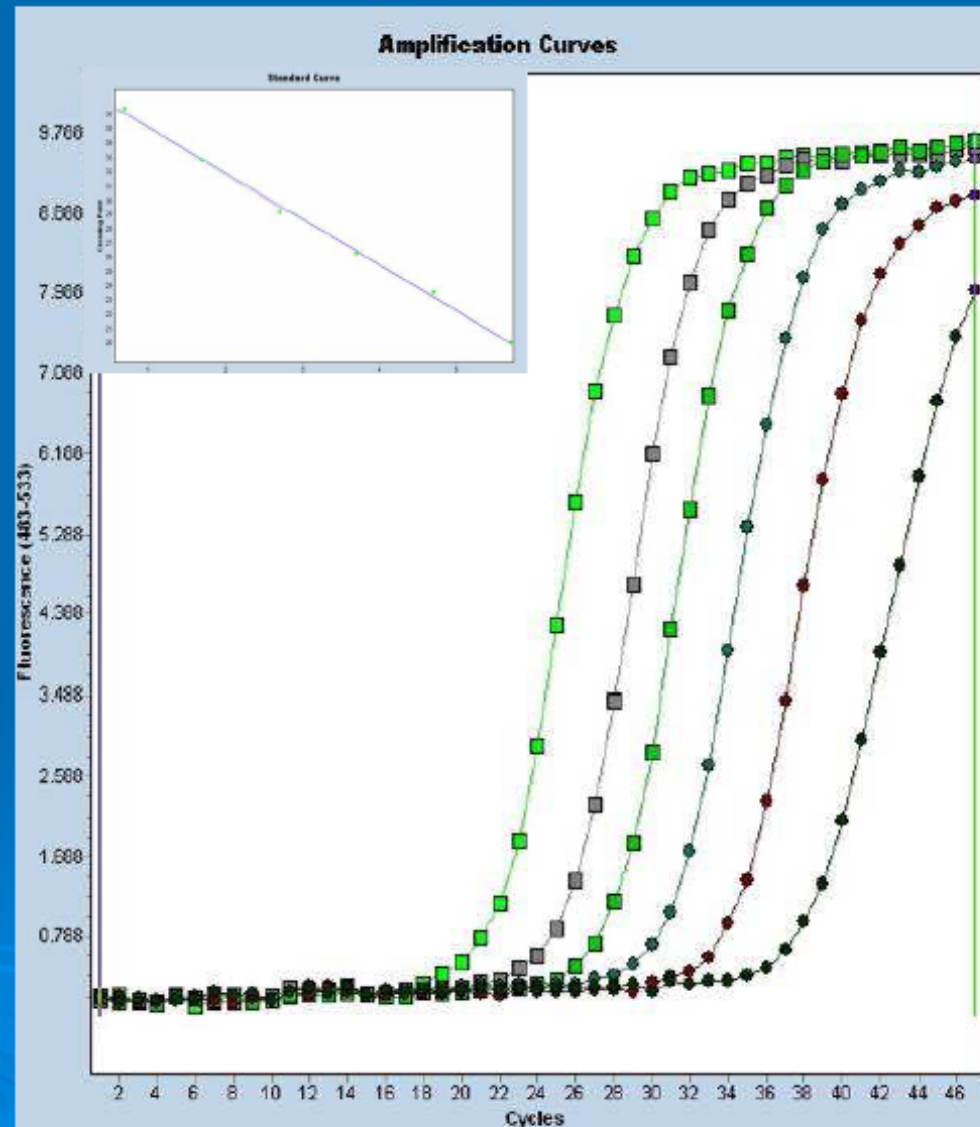
REAL TIME PCR
(= „kvantitativní PCR“)

Problém

- Kvantitativní rozdíly v expresi genů (tj. množství mRNA)
- Neinvazivní metody – nutnost stanovit, kdy je ještě ve vzorku dostatek DNA pro smysluplnou analýzu
- Genotypizace SNPs atd.

PCR vs. real time PCR

- » Fluorescence je měřena v každém cyklu (signál ~ 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

» (EtBr), SYBR Green, BEBO, BOXTO...

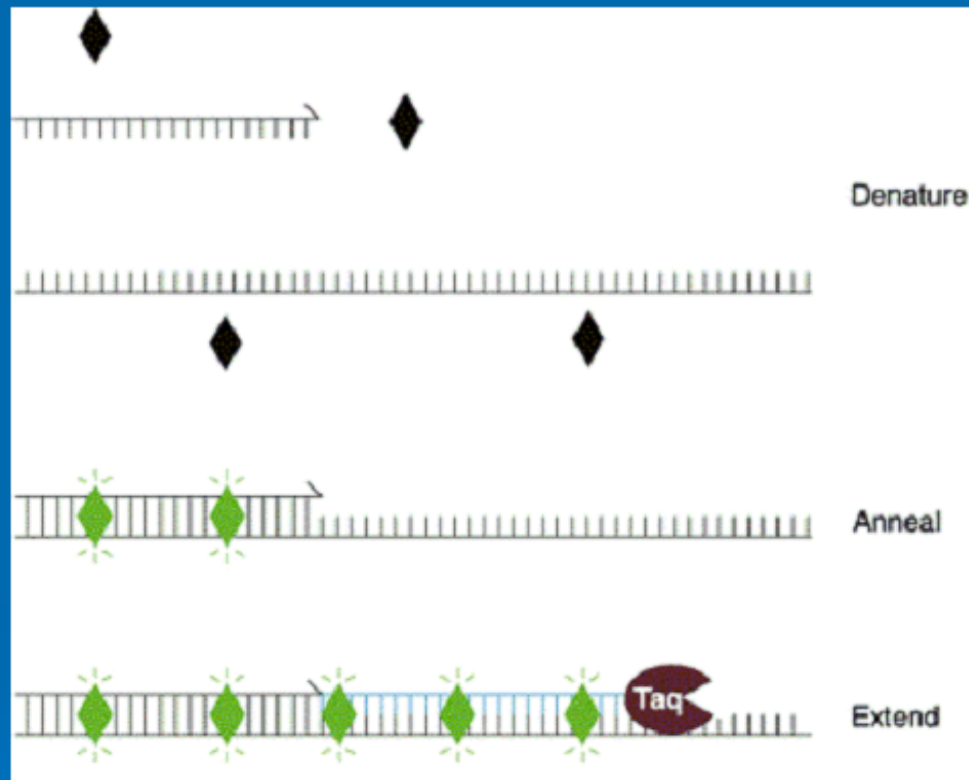
Specifická detekce

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

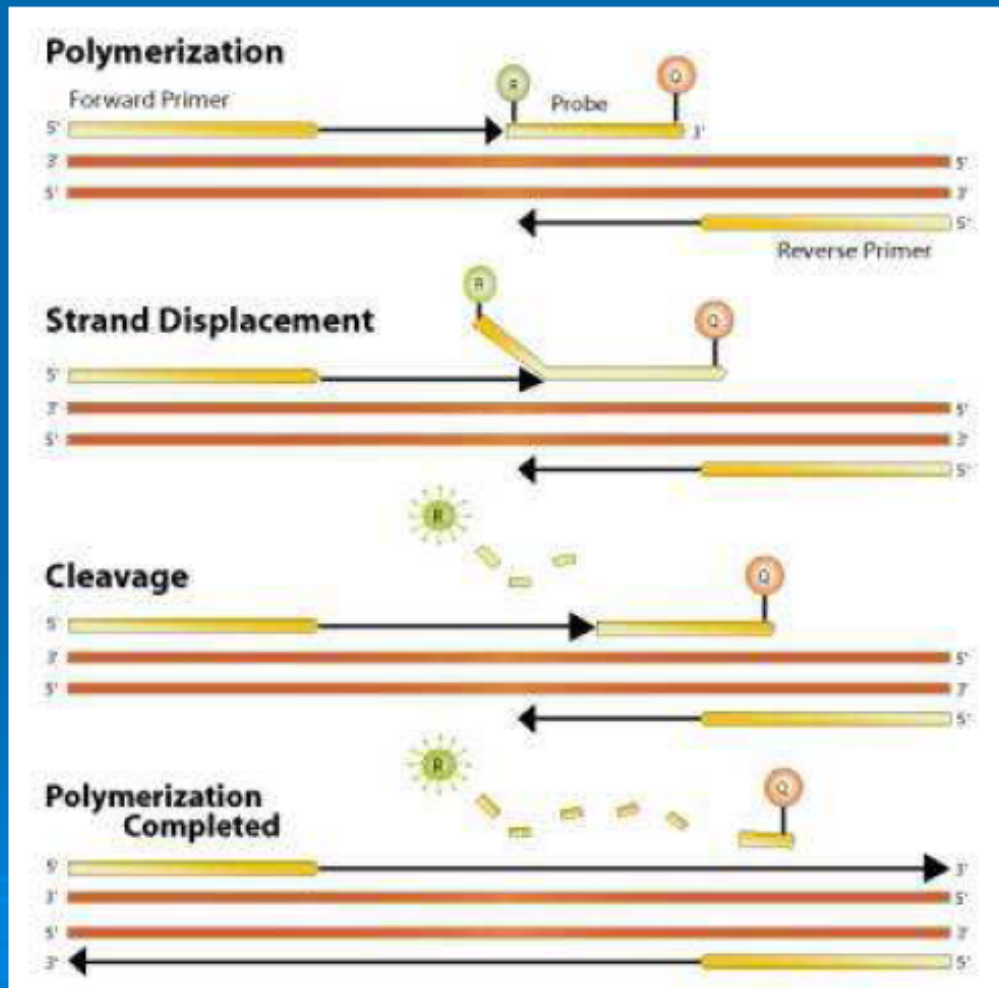
SYBR Green



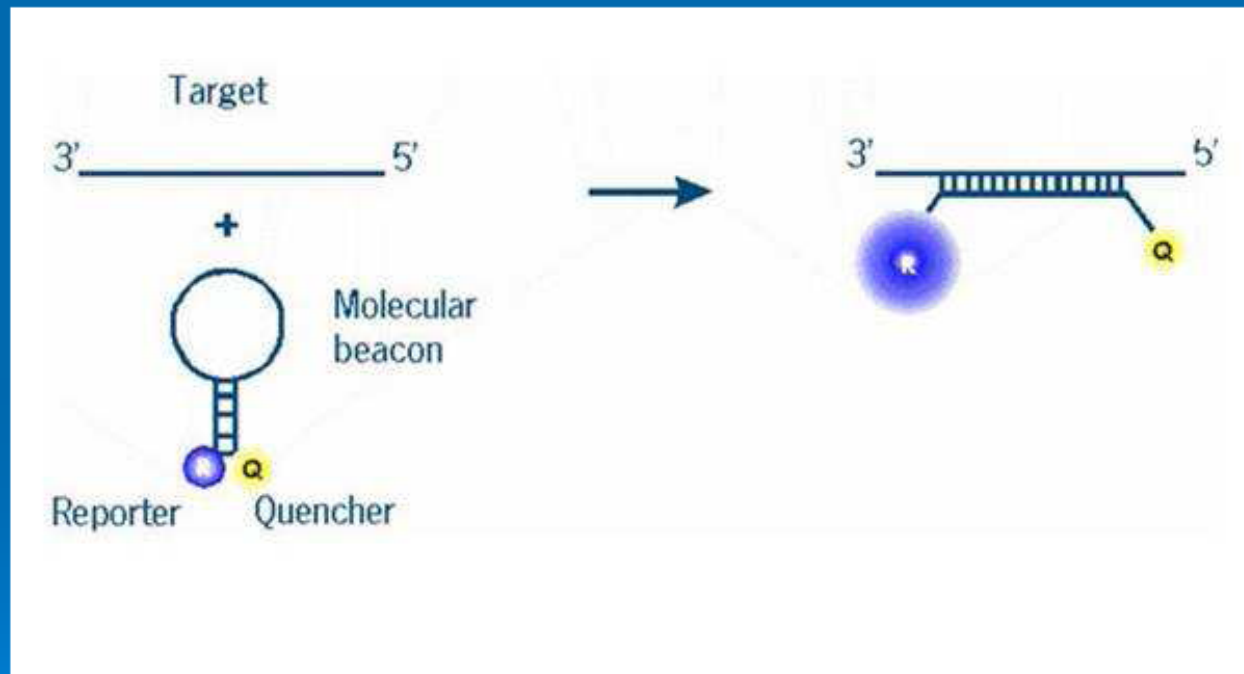
SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

TaqMan hydrolyzační sondy

- » Intaktní sonda – žádná fluorescence
- » 5' – 3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy degraduje sondu – uvolnění fluorescence



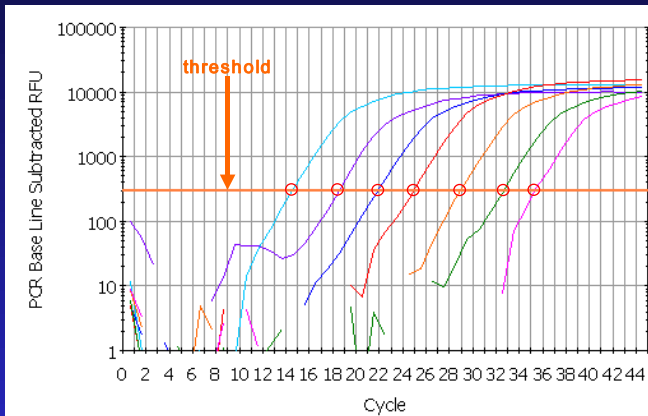
Molecular beacon hybridizační sondy



Real-time PCR přístroje



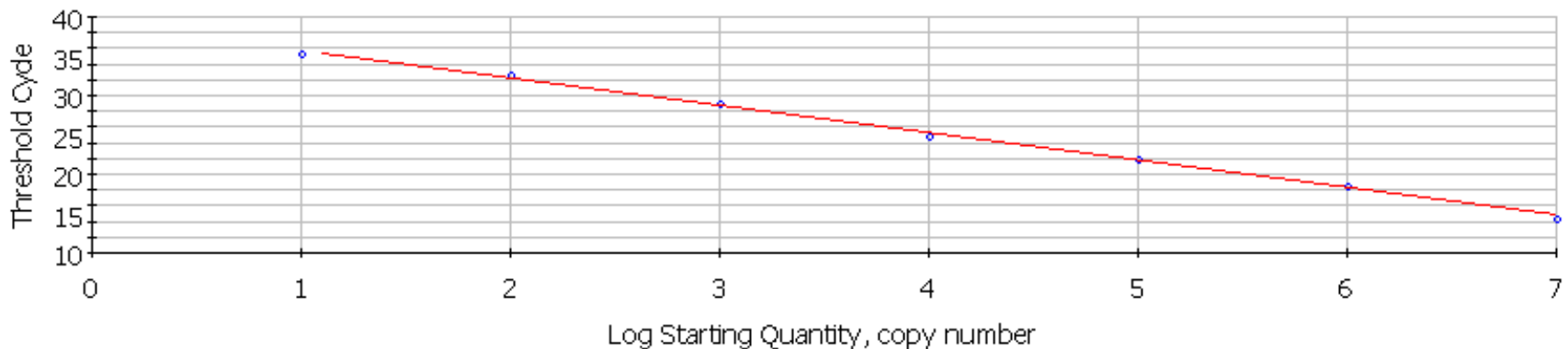
Absolutní kvantifikace



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

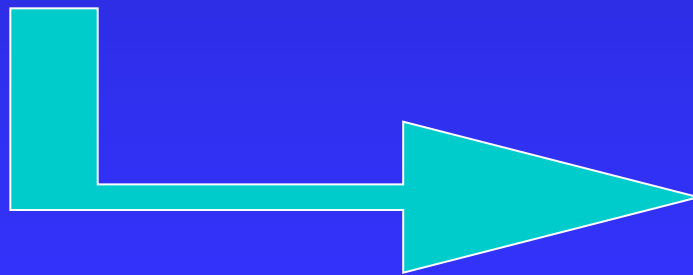
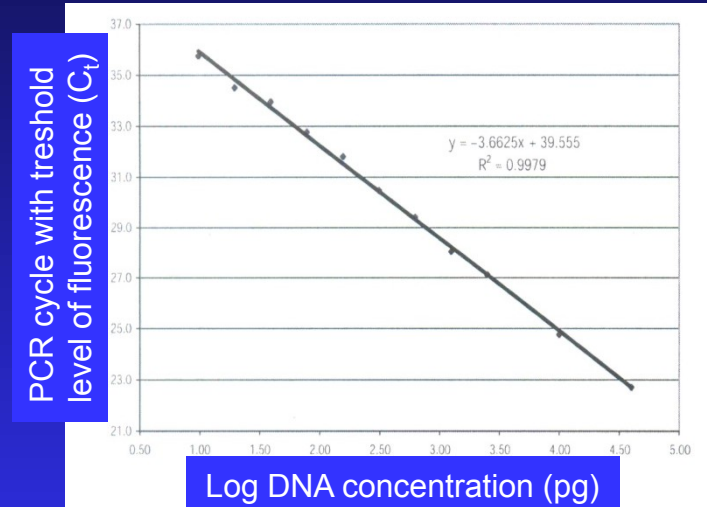
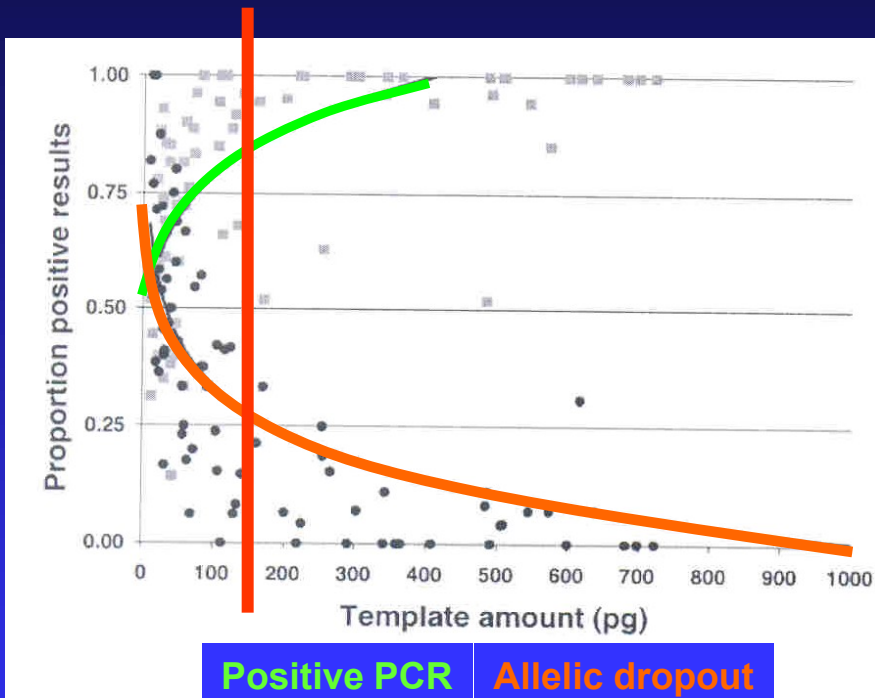
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns
○ Standards



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

Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků

Relativní kvantifikace - standardy

- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu