

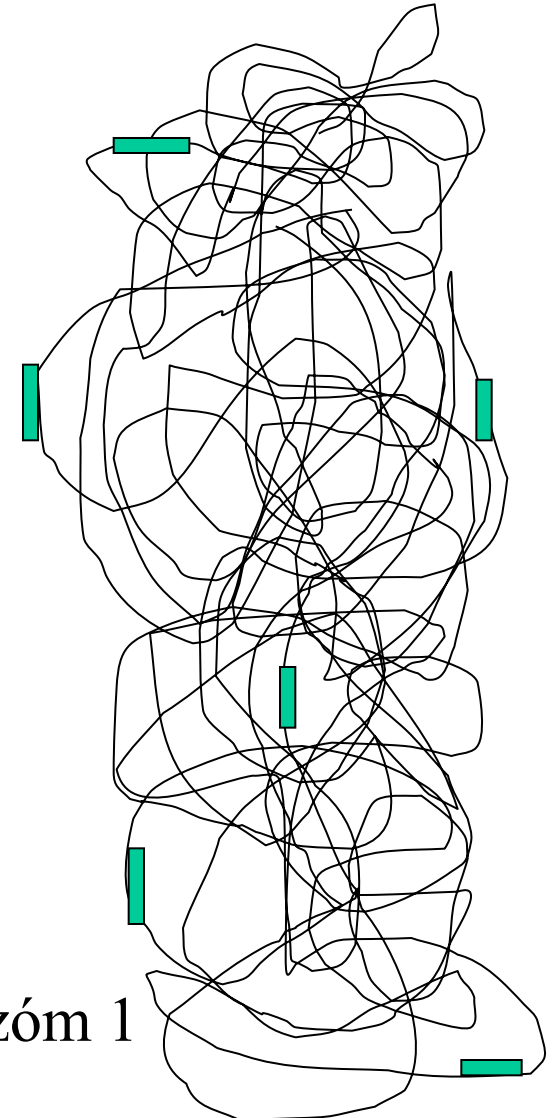


# Typy genetických markerů

	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
<b>Nuclear multilocus</b>				
Minisatellite DNA fingerprints	No	No	No	High
RAPD	No	No	Yes	High
AFLP	No	No	Yes	High
<b>Nuclear single locus</b>				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
Mikrosatelity	Yes	Yes	Yes	High
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
SNPs (sekvence)	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 = dominantní znaky (neodliší heterozygota)

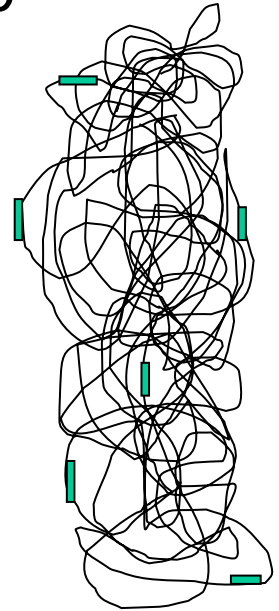


Př.: chromozóm 1

# (Minisatellite) DNA fingerprinting

(Jeffreys et al. 1985)

- náhodně rozmístěné repetice (např. SINE, LINE)
- různě dlouhé minisatelity (různá délka repetice, 10-15 bp „core sequences“)
- restriční štěpení kompletní DNA – sekvenčně specifické **restriční endonukleázy**



# 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**

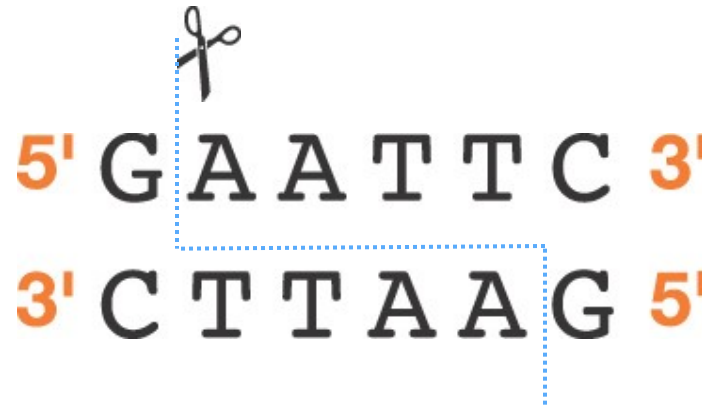
G T A G G A A T T C A T T T C A C G C A  
C A T C T T A A G T A A G T G C G T

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**

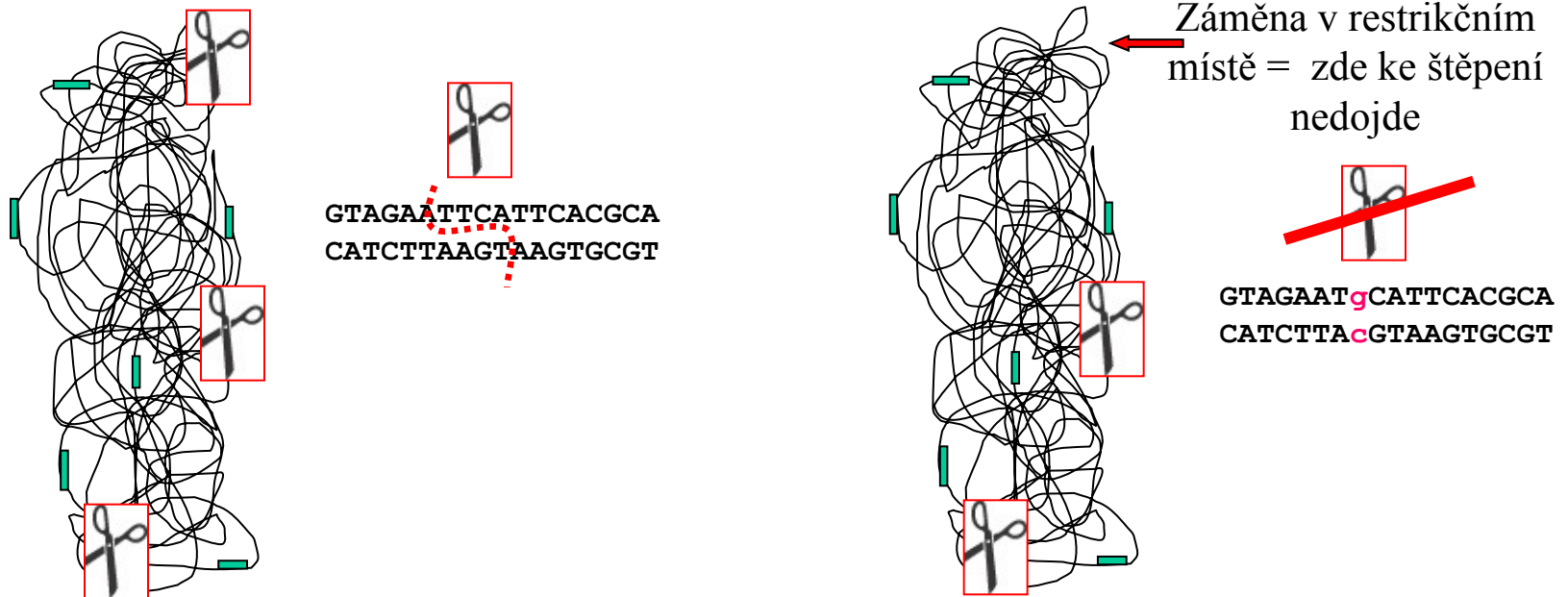
- Escherichia coli
- 5 prime overhang



**PstI**

- Providencia stuartii
- 3 prime overhang

# Každý jedinec má jedinečný genom



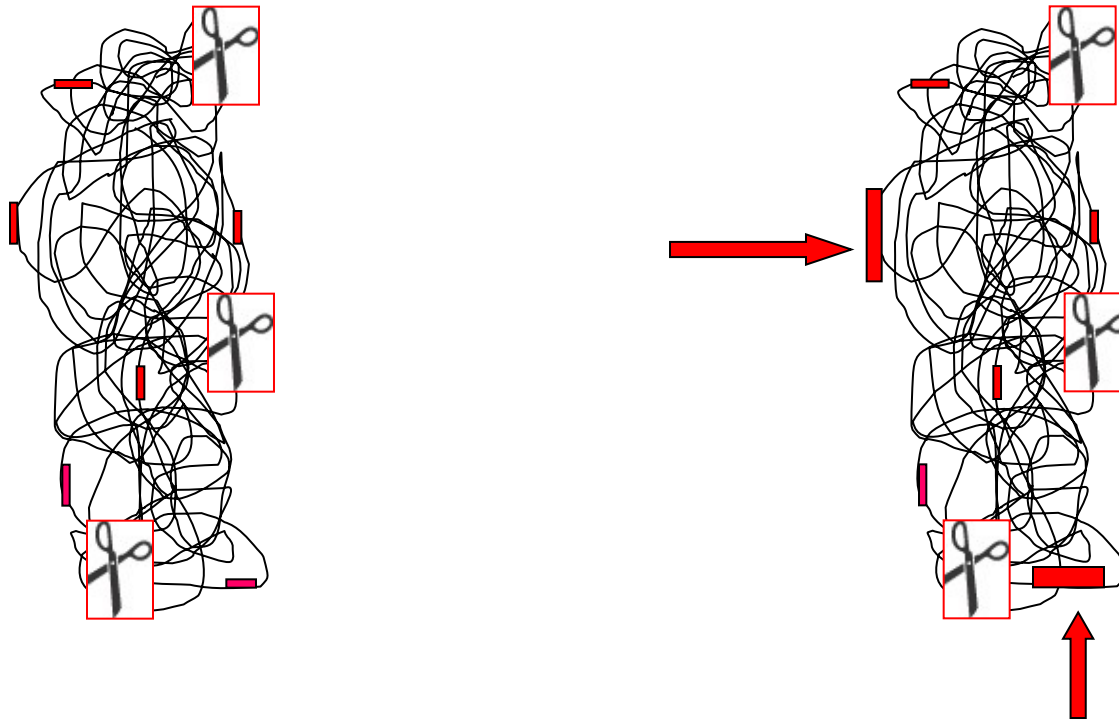
1. Ztráta nebo nabytí restričního místa

# Každý jedinec má jedinečný genom



2. Ztráta nebo nabytí SINE (např. **Alu** sekvence) nebo LINE

# Každý jedinec má jedinečný genom

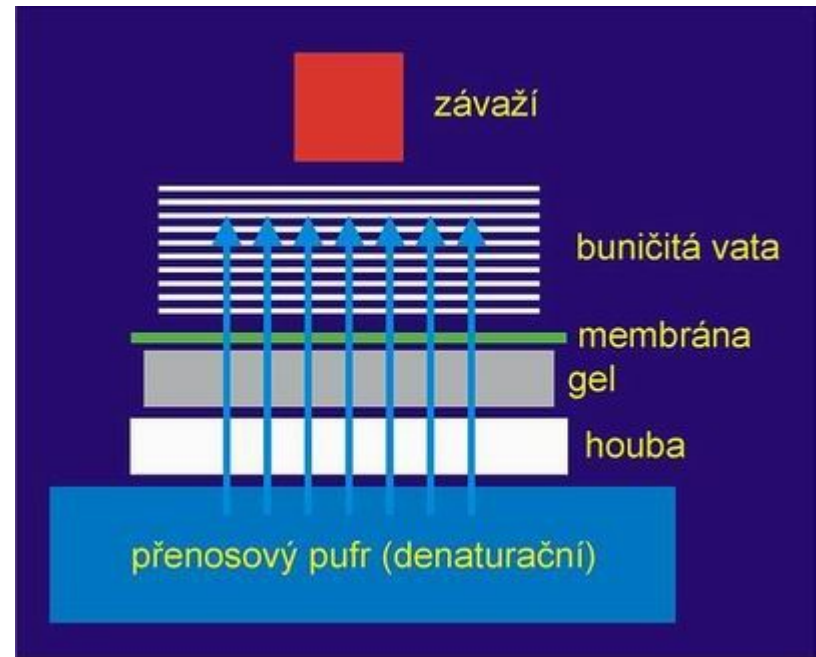
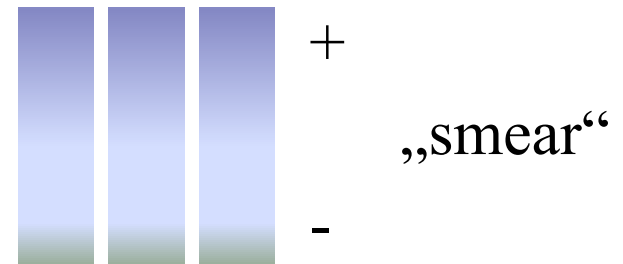


3. Vysoká mutační rychlost **minisatelitů** – rozdíly v počtu repeticí, tj. v délce daného úseku



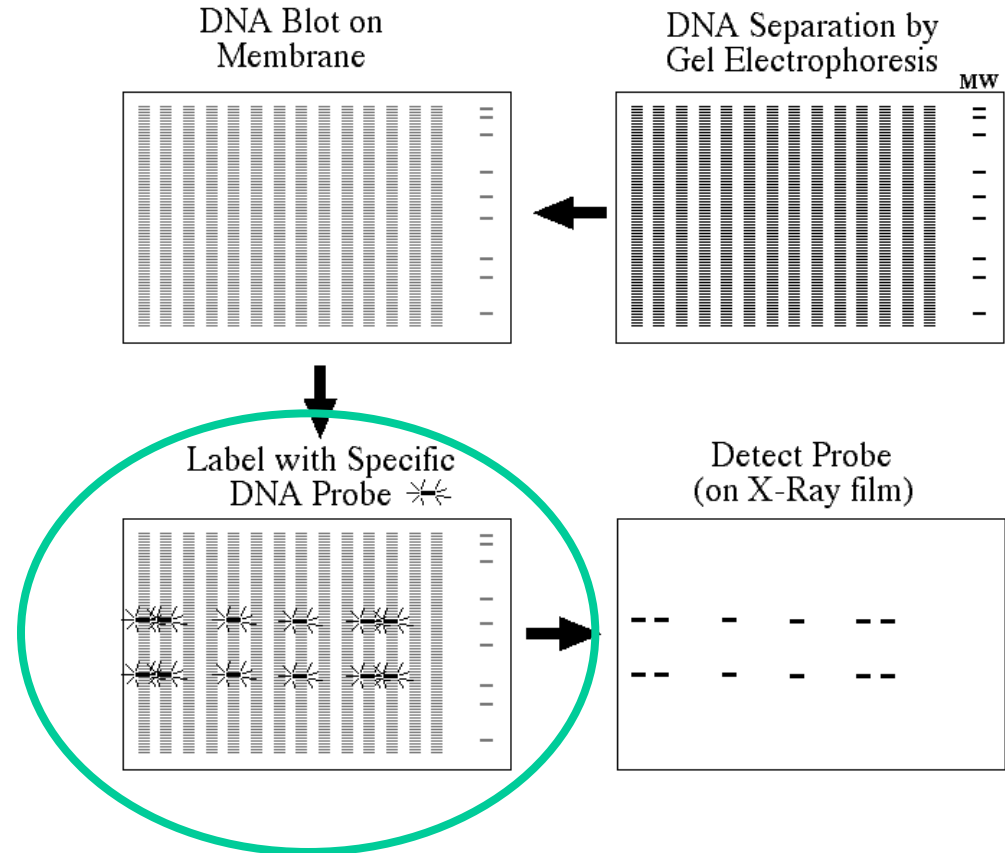
# Minisatellite DNA fingerprinting

- 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)



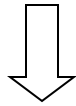
# Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu
- hybridizace se značenou sondou, tj. specifickou sekvencí odpovídající danému minisatelitu
- zásadní objevy např. EPC u ptáků
- v posledních 10-15 letech – přesun k PCR-based metodám



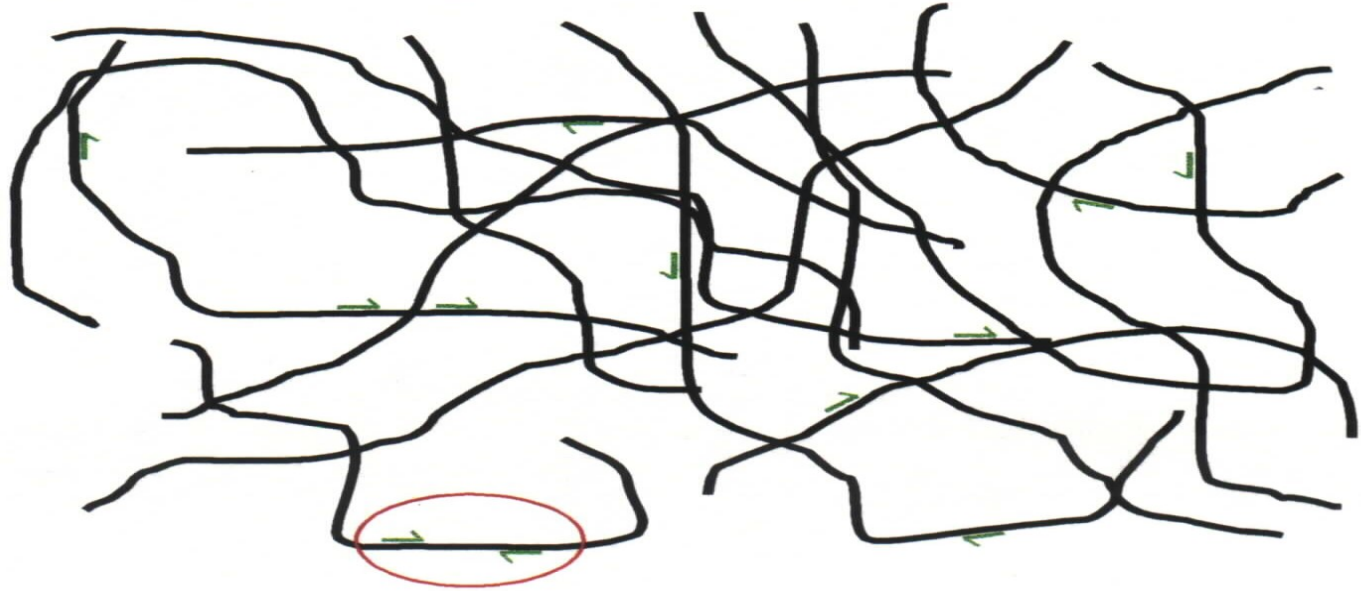
# RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

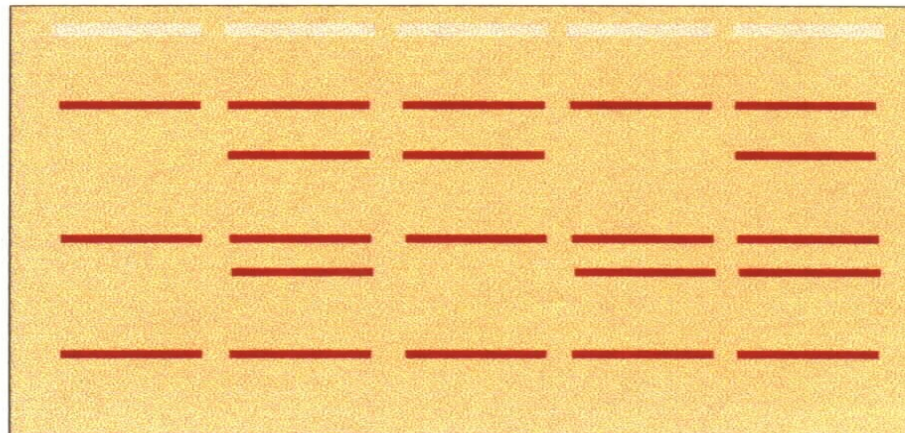


PCR za málo specifických podmínek

# genomic DNA



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

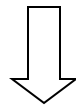


Variabilní DNA detekovaná metodou RAPD je důsledkem ztráty RAPD lokusů v důsledku:

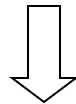
- a) Změna sekvence v místě nasedání primeru
- b) Delece místa nasedání primeru
- c) Velká inzerce mezi dvěma místy nasedání primeru

# RAPD - review

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

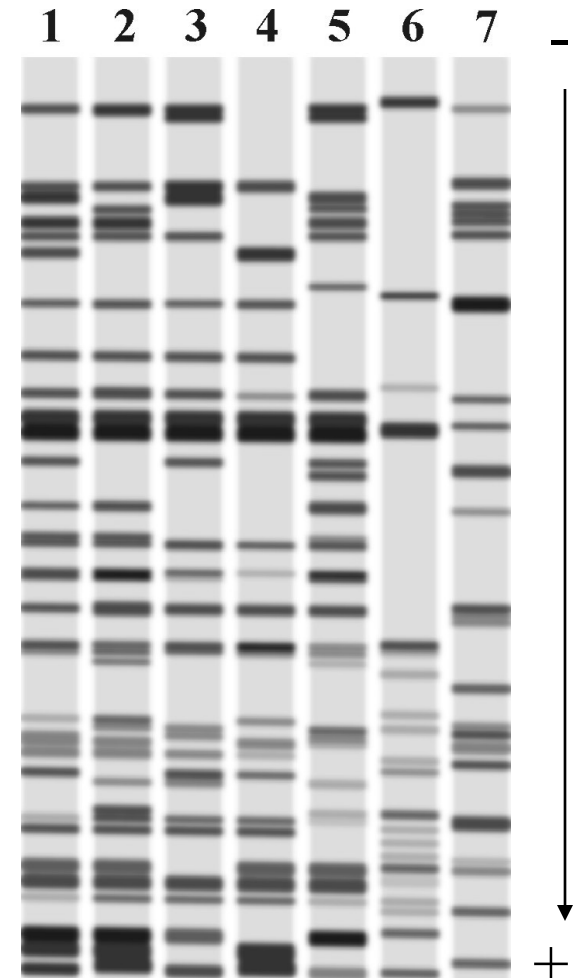


PCR za málo specifických podmínek



Detekce PCR produktů elektroforézou

Nízká opakovatelnost v důsledku  
mnoha faktorů ovlivňujících PCR –  
dnes již není akceptována jako  
metoda např. pro studium populační  
struktury



# AFLP (amplified fragments length polymorphism)

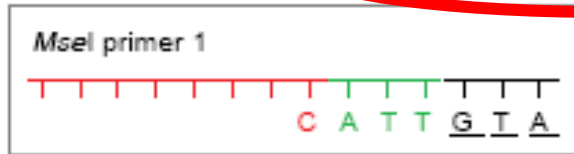
- levná, jednoduchá, rychlá a spolehlivá metoda na generování stovek informativních genetických markerů
- současný screening mnoha různých DNA oblastí distribuovaných náhodně v genomu
- lépe reprodukovatelná než RAPD
- založená zejména na polymorfismu v restričním štěpení
- „genome scan“ – hledání asociací s fenotypovými znaky



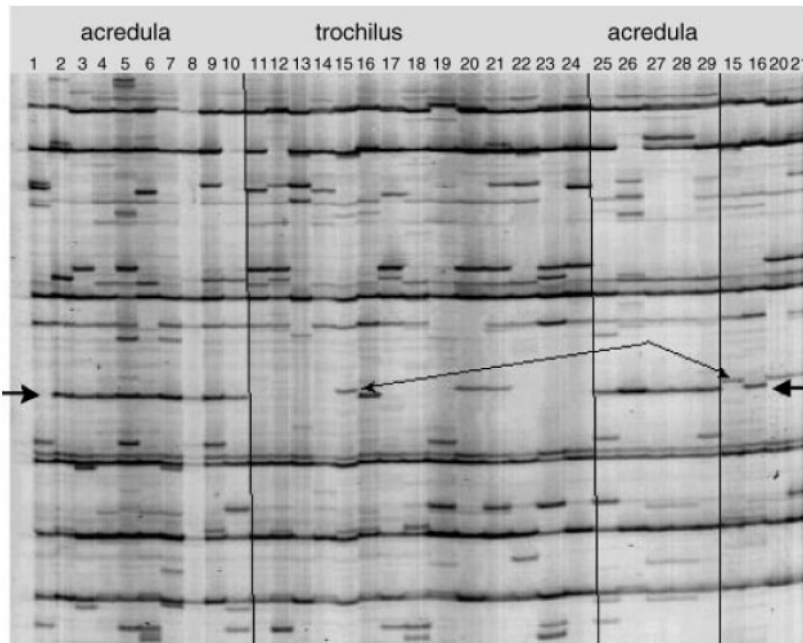
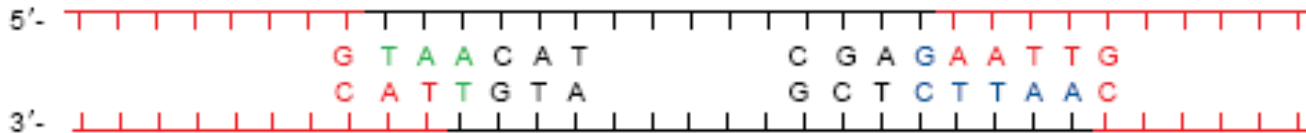


# Generating AFLP markers

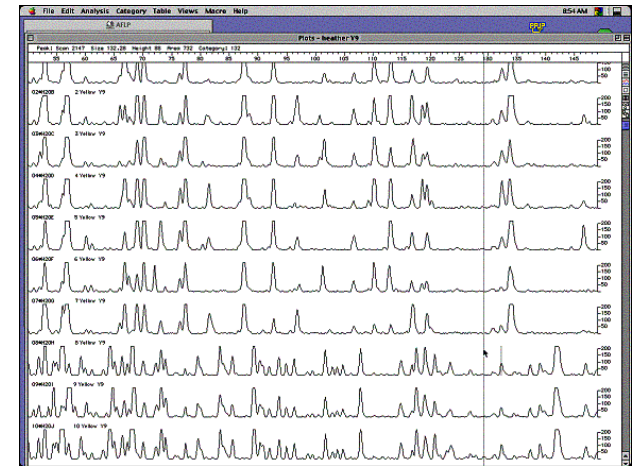
(c) Selective amplification (one of many primer combinations shown)



PCR with primers on adaptors



multi-locus genotype



„capillary version“