

# Genetické metody v zoologii

Miloš Macholán (macholan@iach.cz)

Josef Bryja (bryja@brno.cas.cz)

# Doporučená literatura (česká)

## Genetické metody v zoologii

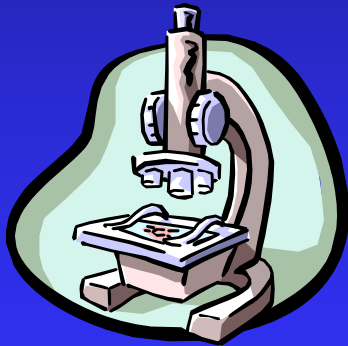
Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

*Nakladatelství Karolinum 2004*



# Proč?

**Problém:**  
zoologie, taxonomie  
ekologie, evoluce



**klasické  
metody**

morfologická,  
ekologická,  
bionomická  
data

**Genetické metody:**

**genetická  
data**



**Další úroveň poznání  
Odpovědi na nové otázky**

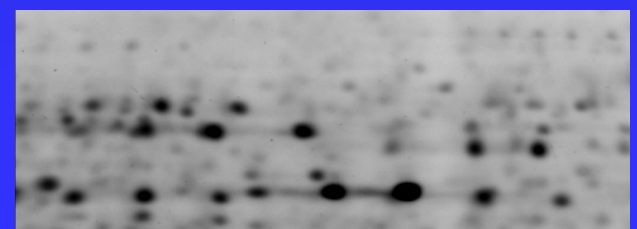
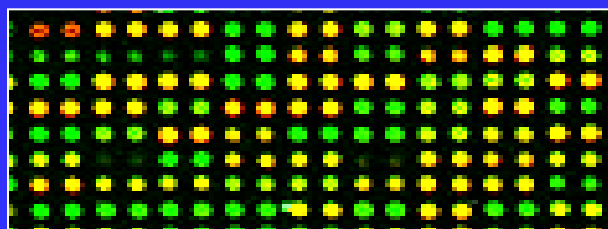
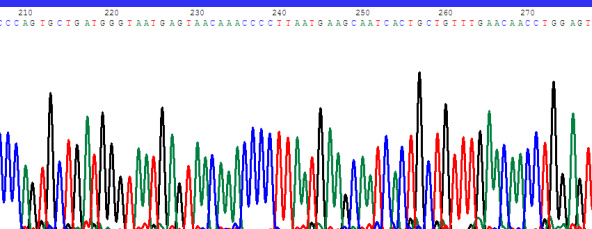
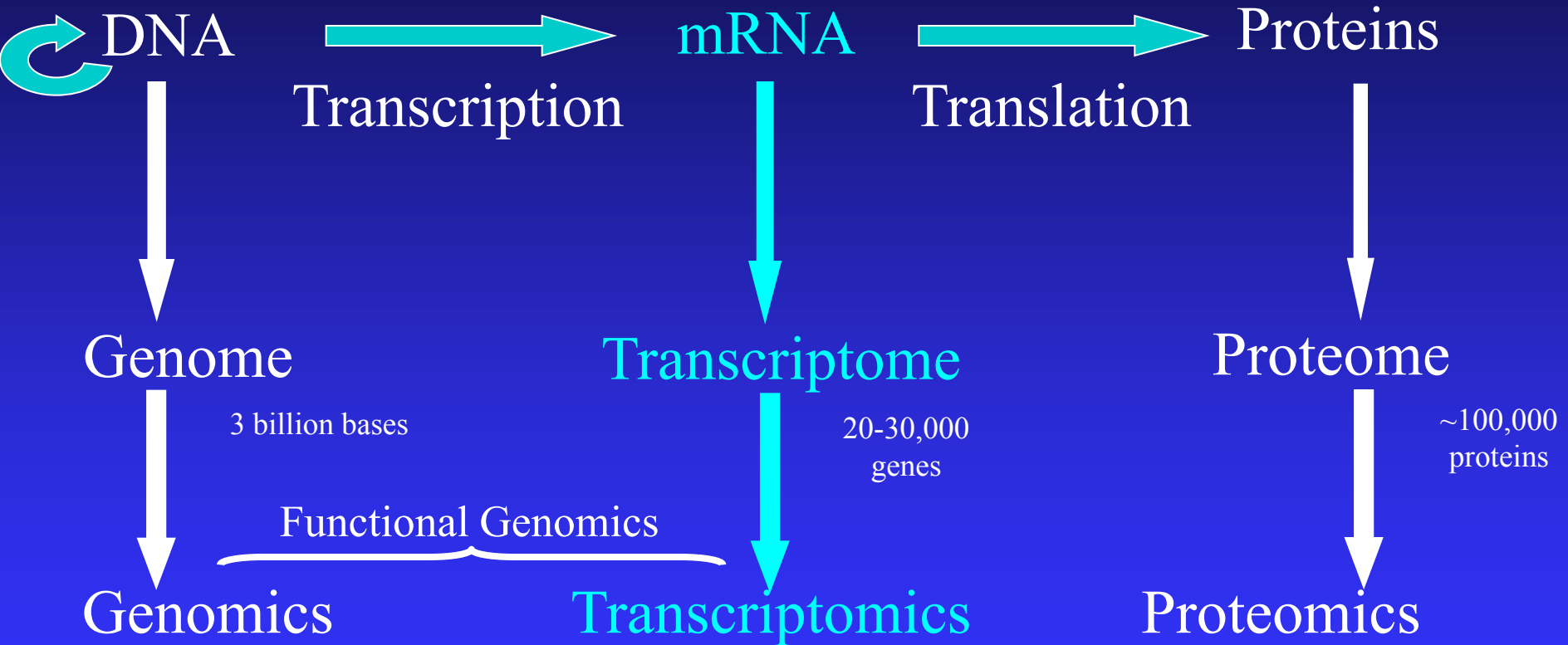
# Proč používat genetické metody v zoologii?

- Často nelze jinak či lépe:
- rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi populacemi , druhy či vyššími taxony (konvergence)
- 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

**viz Molekulární ekologie – letní semestr**

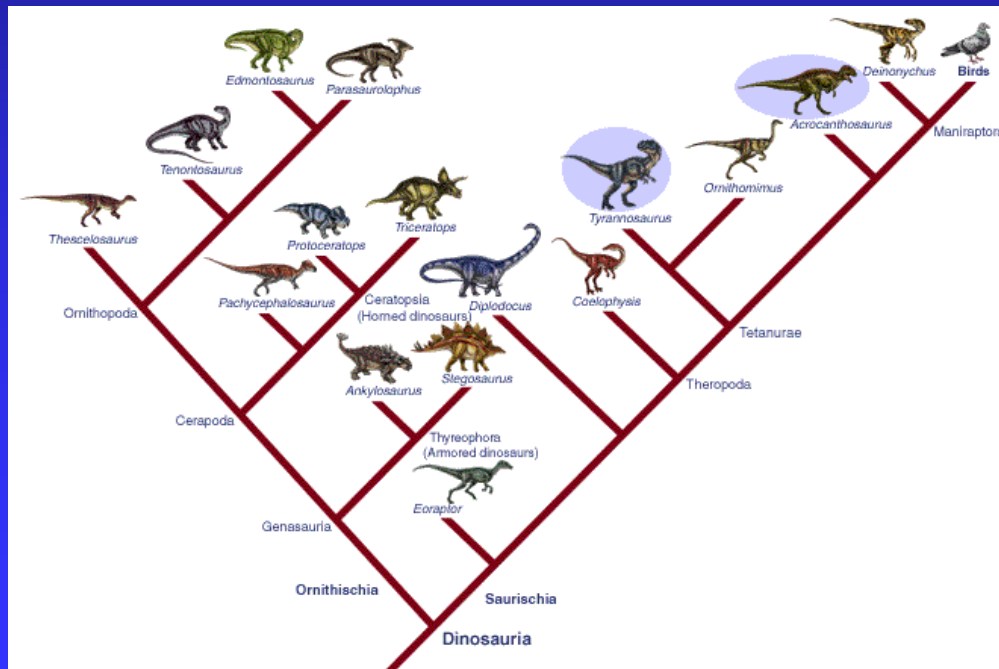
# Genetické metody

= studium genetické variability



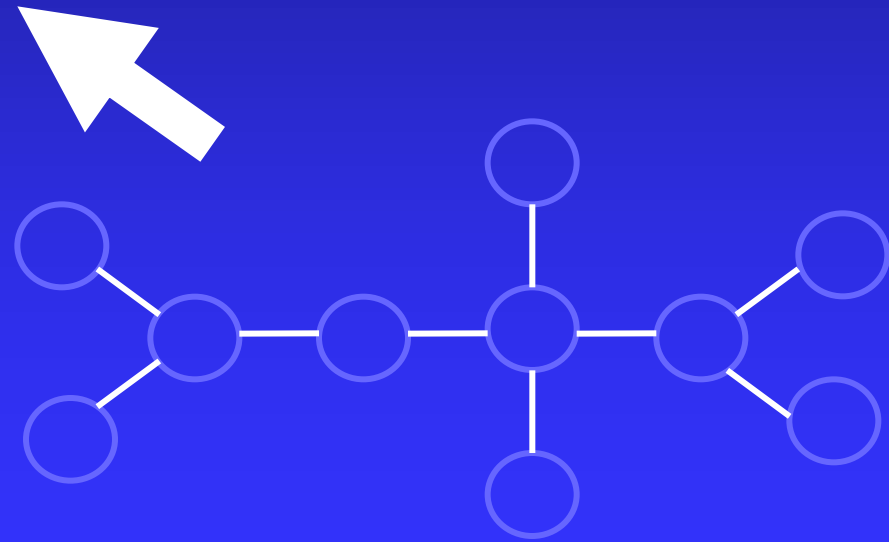
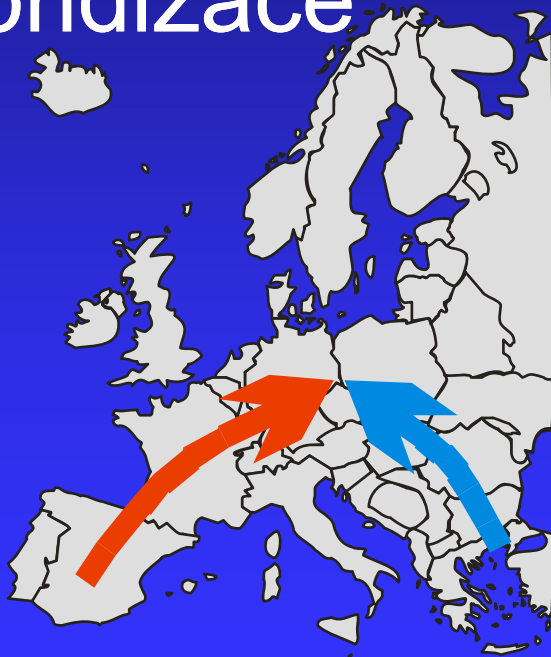
# Úrovně genetické variability

- druhy a vyšší taxony – fylogenetické analýzy (fylogenetická systematika)



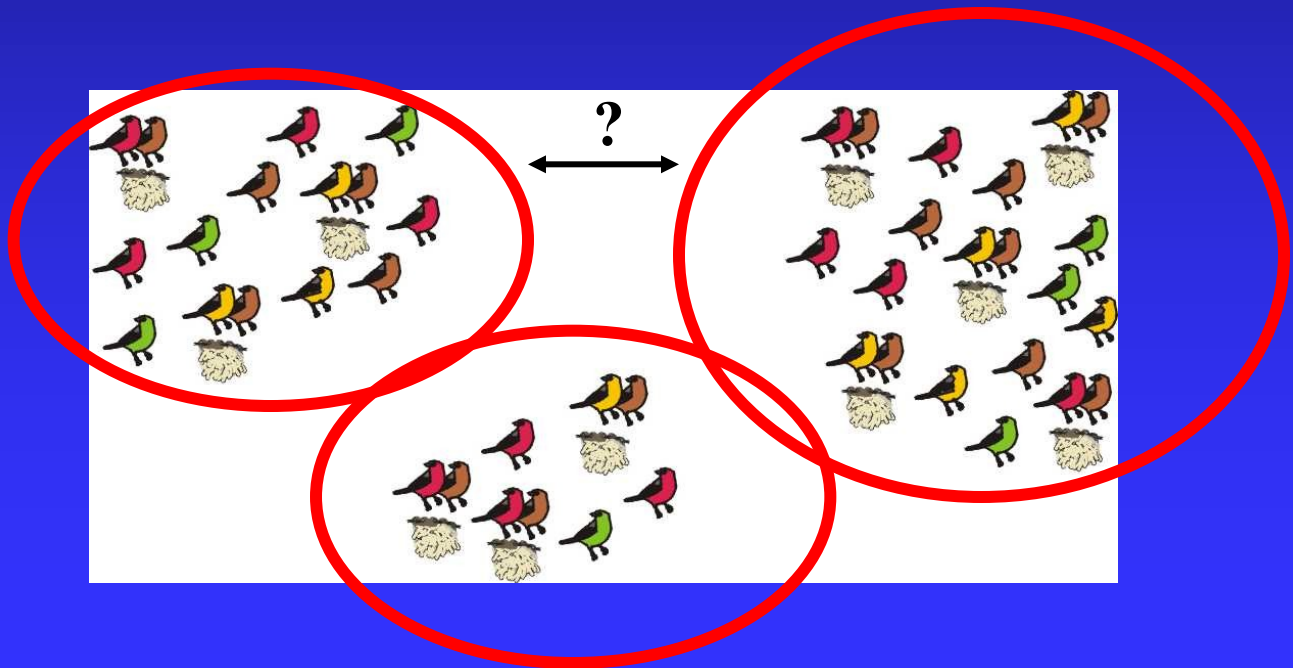
# Úrovně genetické variability

- populace až druh – studium speciace, fylogeografie, hybridizace



# Úrovně genetické variability

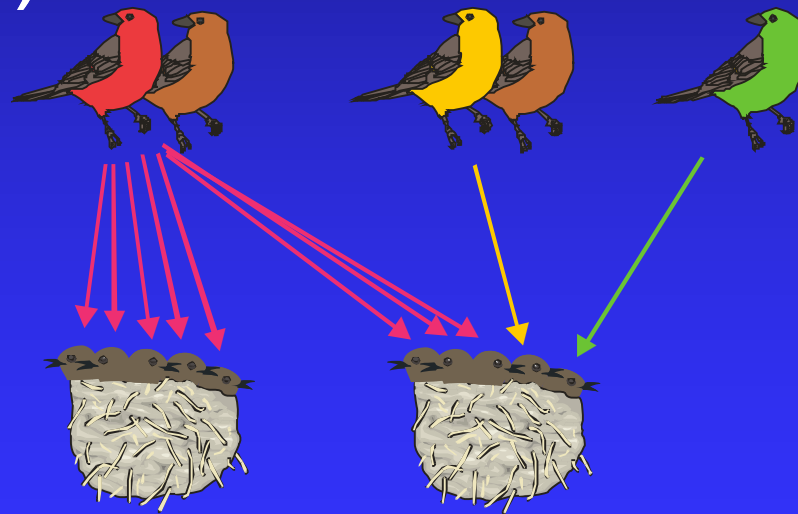
- **populace** – populační biologie, ochranářská genetica





# Úrovně genetické variability

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



# Genetické DNA 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

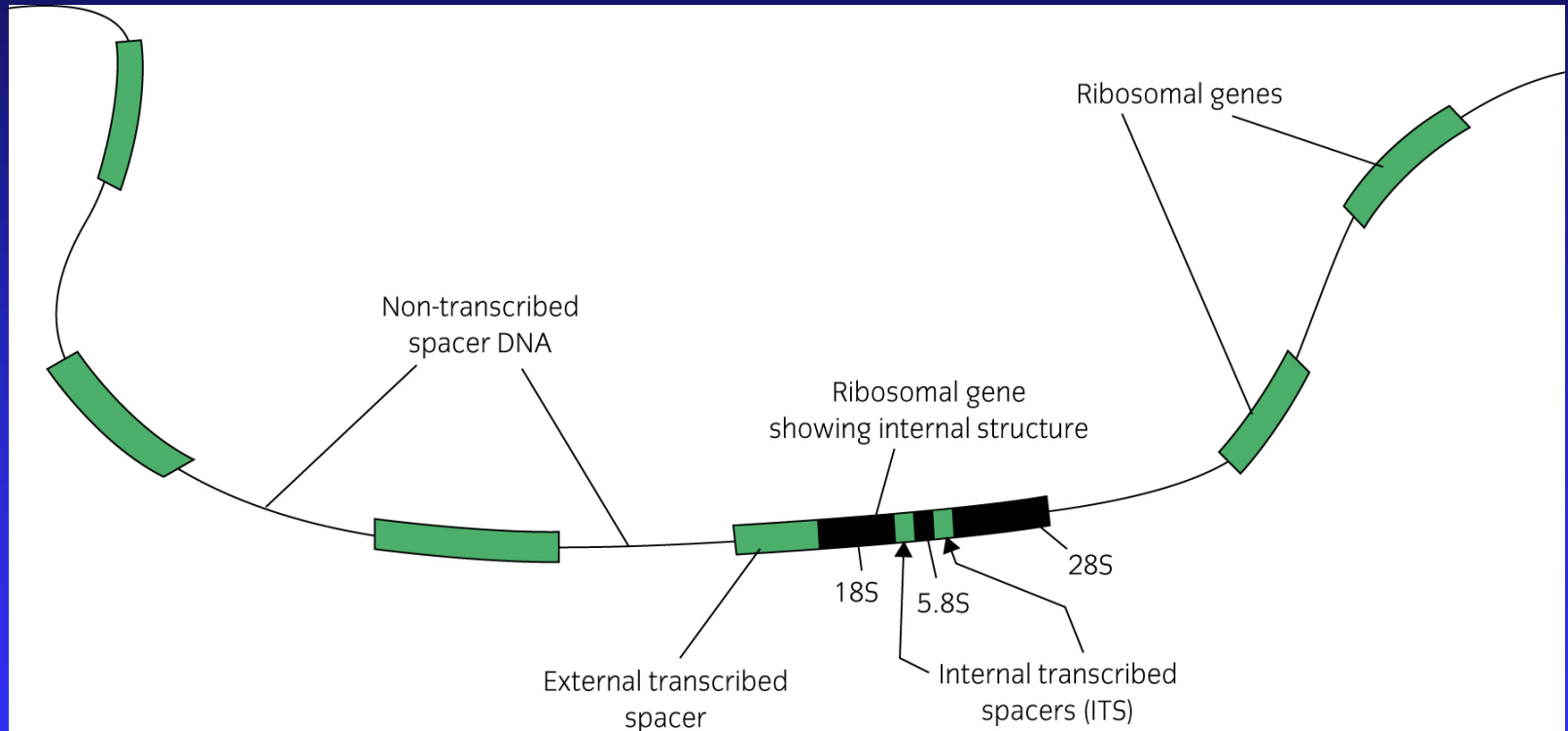
# Repetitivní DNA

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

- 1) ribosomal DNA
- 2) nuclear structural (protein coding) genes
- 3) mitochondrial DNA

# 1. Ribosomal DNA

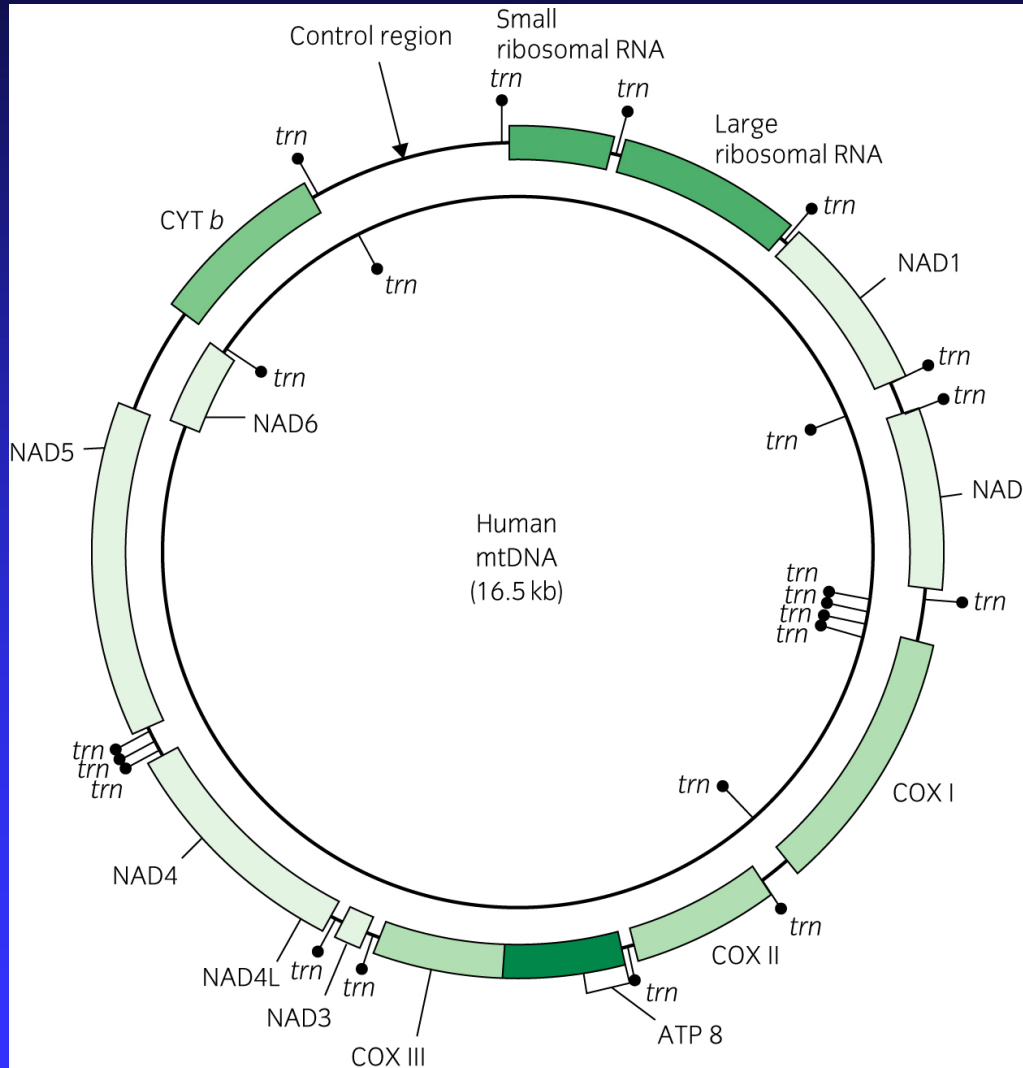


- geny pro ribozomální RNA – mnoho shluků u eukaryot
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster u prokaryot
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

## 2. Nuclear structural genes

- nízká variabilita mezi jedinci – významná funkce, purifikující selekce (nejsou často používány jako genetické markery)
- introny – více variabilní než exony
- alozymy
- MHC geny
- SNPs – narůstající význam (jednoduché mutace způsobují významnou funkční změnu)
- studium transkripce - transkriptomika

# 3. Mitochondrial DNA



14 kbp (*Caenorhabditis*)  
42 kbp (*Placopecten*)

- maternally inherited (?)
- no recombination (?)
- phylogeography
- « numts » nuclear copies of mtDNA
- multiple copies

Saccone et al. 2001

# „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, inserce, delece)
- rekombinace (kombinace změn vzniklých mutacemi, duplikace a delece při rekombinačních chybách)
- transpozice
- pecná molekulární genetika

# Genotypizace – stanovení genotypu

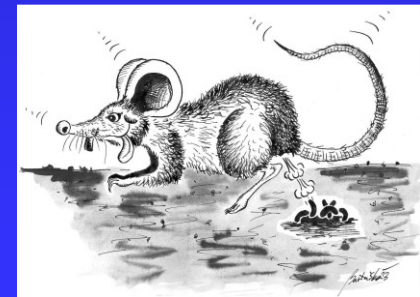
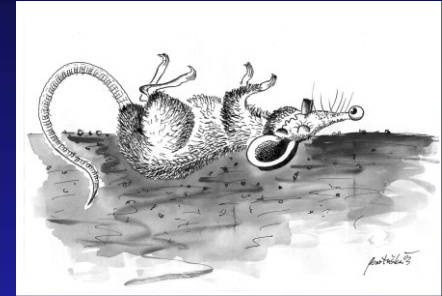
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR-based methods)
  - 3) studium variability daného úseku (lokus)

# 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 odchytu, 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

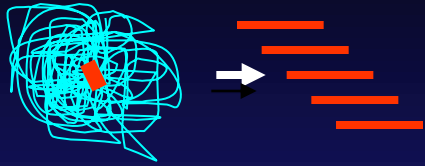
Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

# Amplifikace DNA – PCR

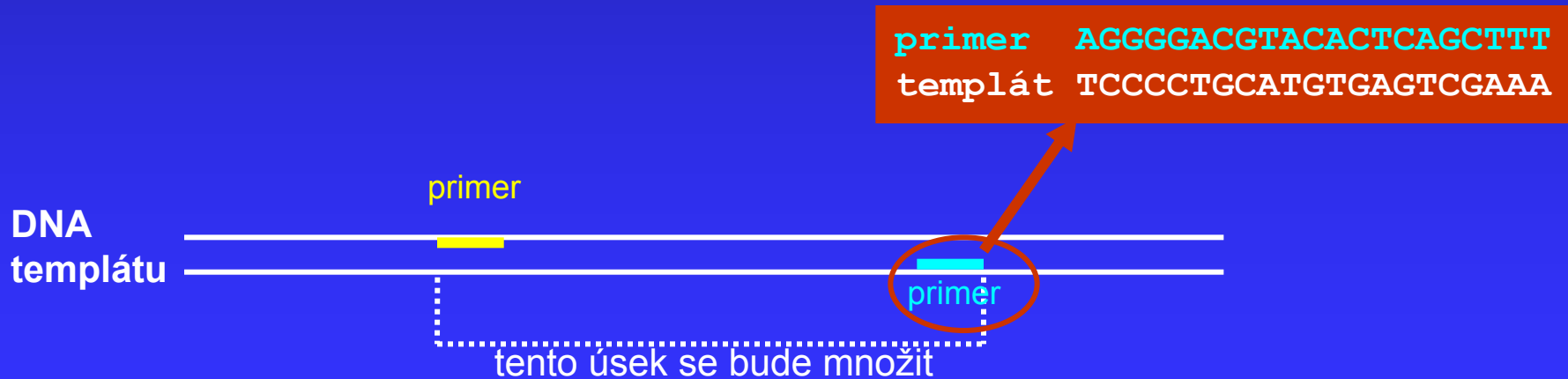
Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozómů (1n)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	$3,0 \times 10^9$	18
<i>Mus musculus</i>	$3,0 \times 10^9$	20
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	23





# 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.



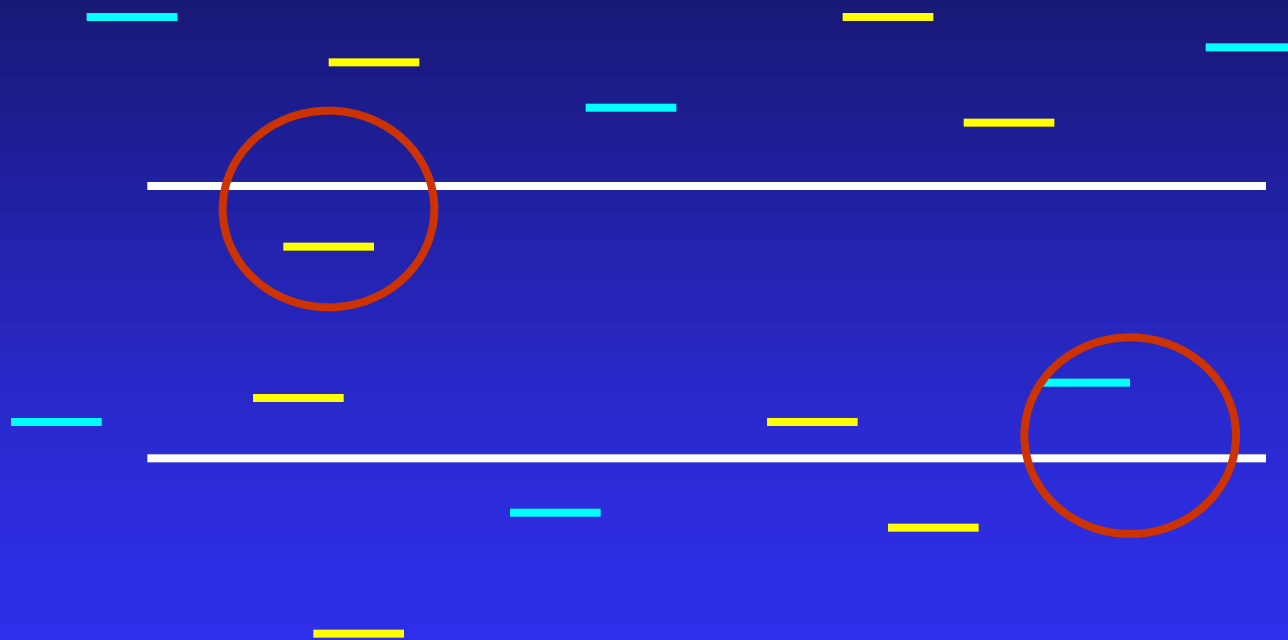
# Denaturace (obvykle 95 C)

při zvýšení teploty se oddělí komplementární vlákna DNA



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



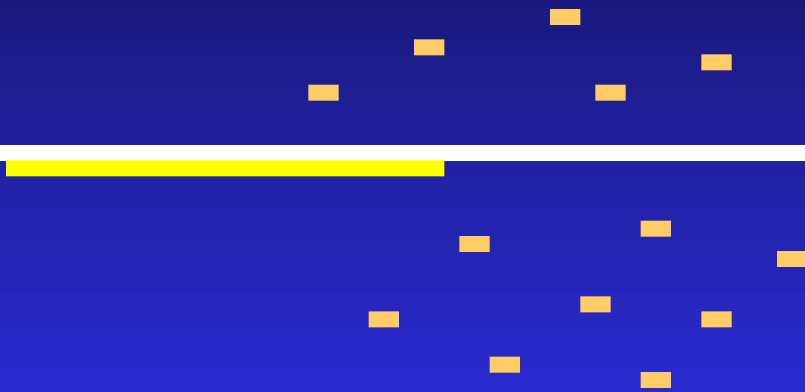
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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

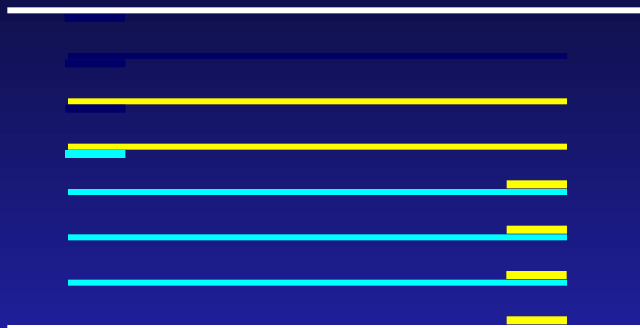




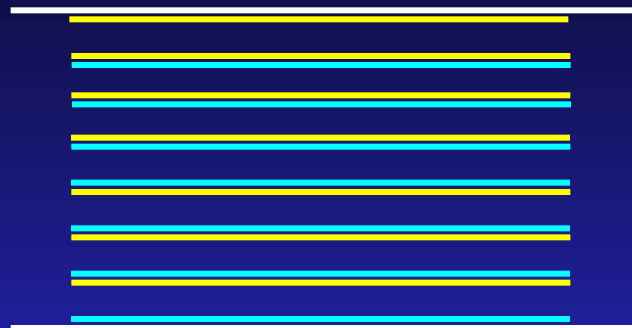
Při dalším zahřátí...



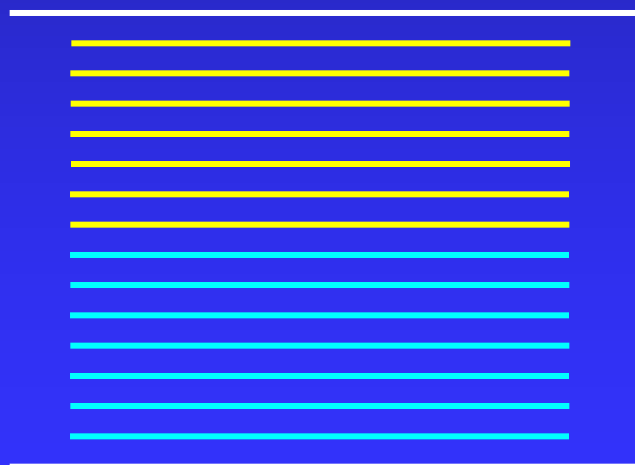
Ochlazení – nasednutí primerů



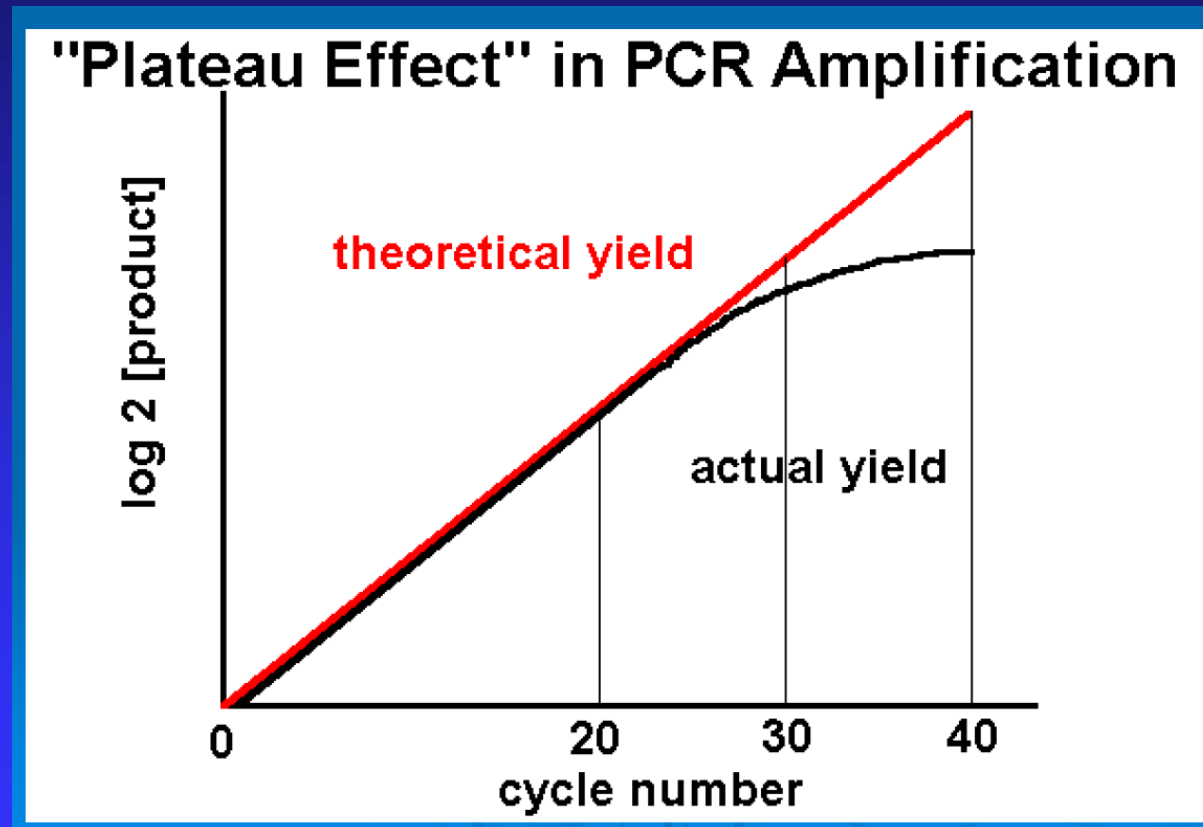
72 C vznik nových fragmentů



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

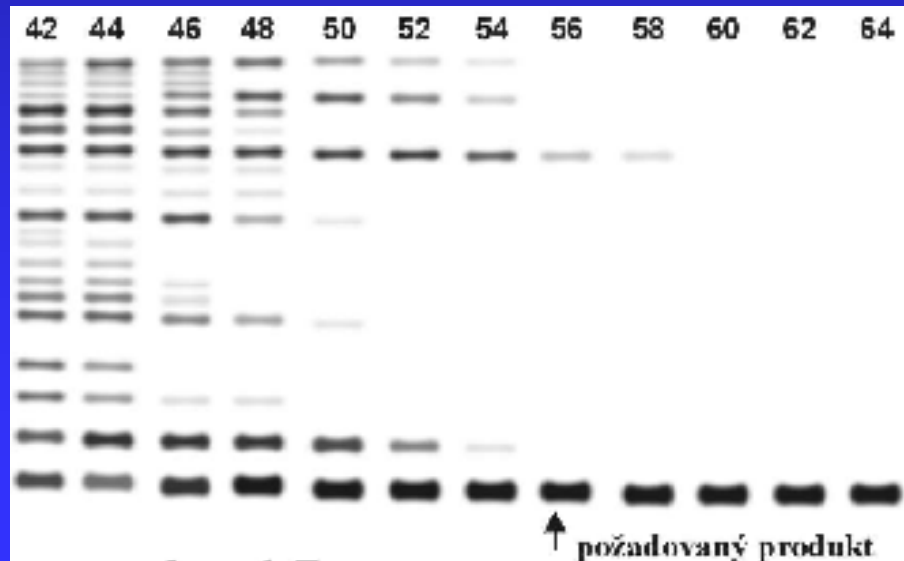
35x zpět

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

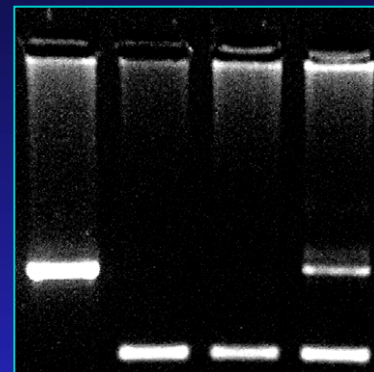


# Studium variability nasyntetizovaného úseku

- 1) **délkový polymorfismus**
  - elektroforéza

# Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti

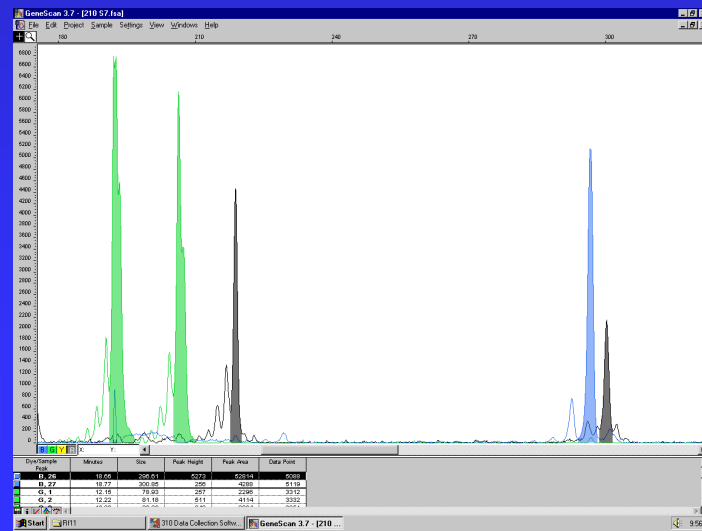
- Agarosa - Hrubé rozdělení (do rozdílu 15 bp)
- Polyakrylamid – Přesnější rozdělení (4 bp)
- Sekvenátor, fragmentační analýza – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



detektor

kapilára

laserový paprsek



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 2) sekvenční polymorfismus

- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“)  
analýza – mnoho různých metod

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru





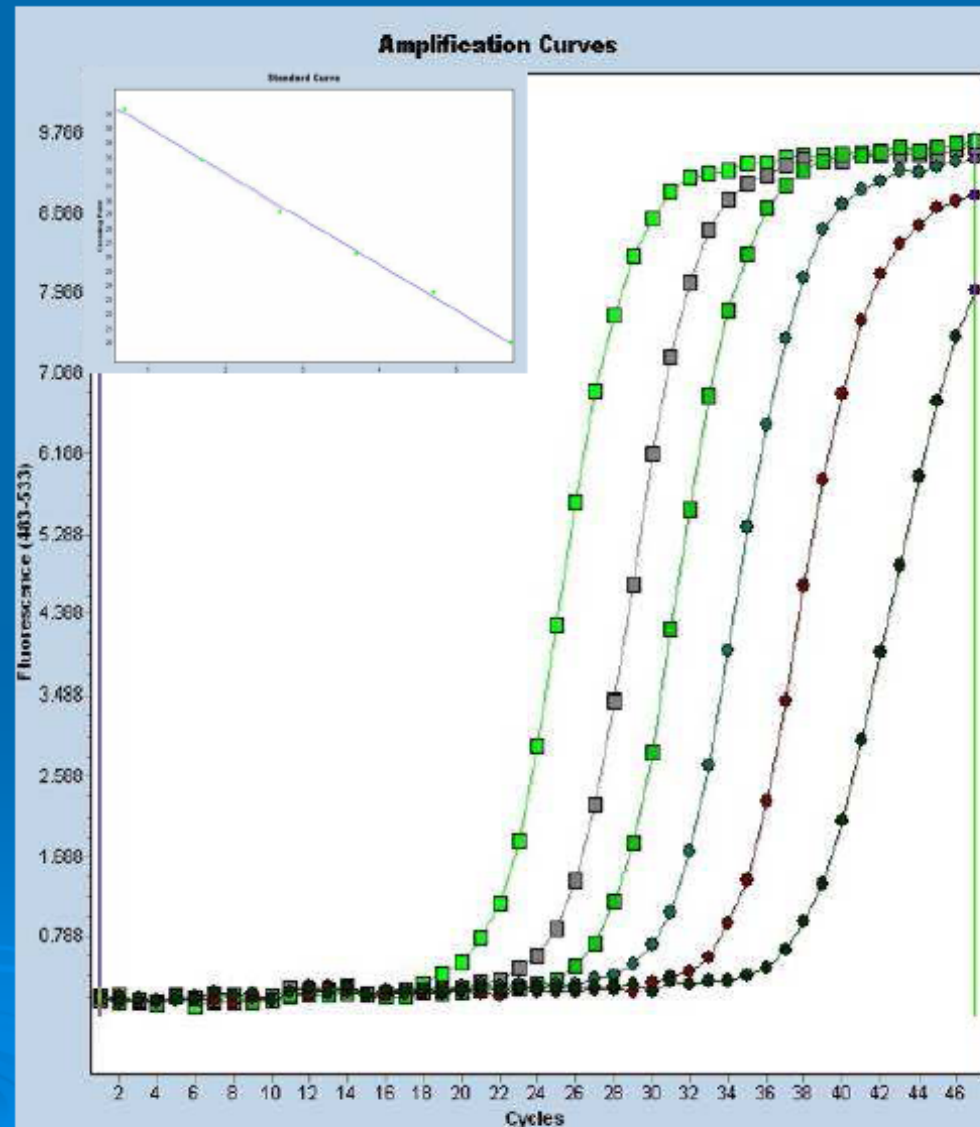
REAL TIME PCR  
(= „kvantitativní PCR“)

# Problém

- Kvantitativní rozdíly v expresi genů (tj. množství mRNA → reverzní transkripce → cDNA)
- 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...

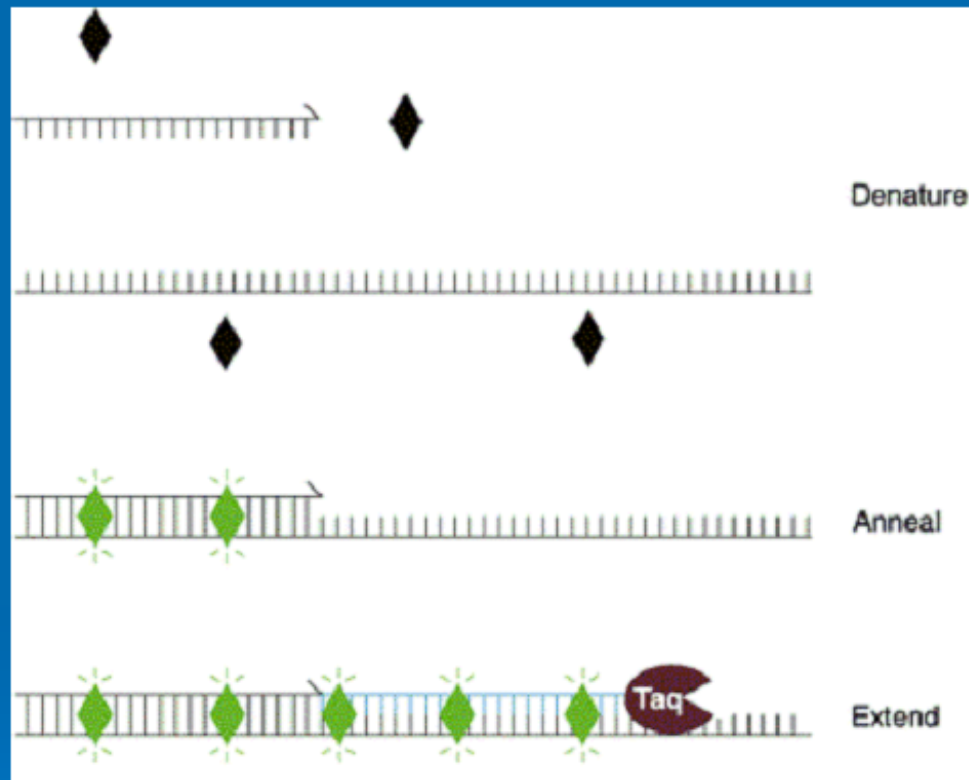
## **Specifická detekce**

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

# *SYBR Green*

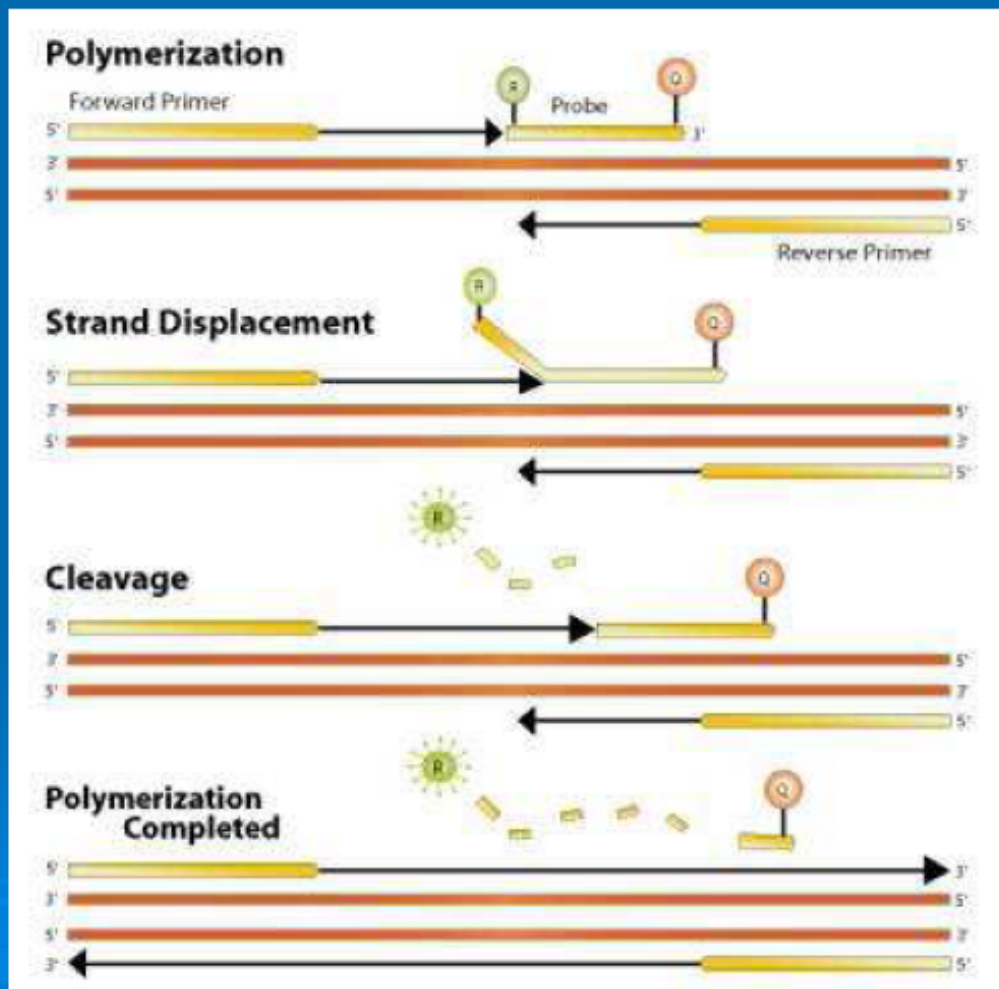


SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

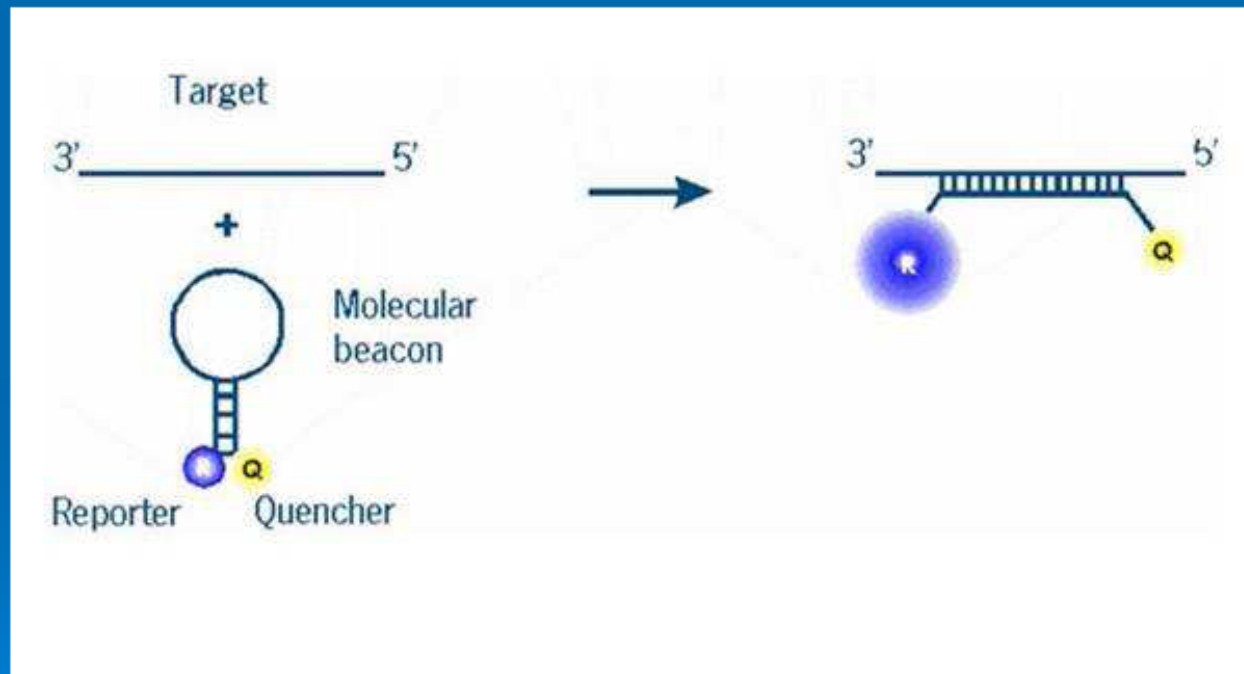


# TaqMan hydrolyzační sondy

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



# *Molecular beacon hybridizační sondy*

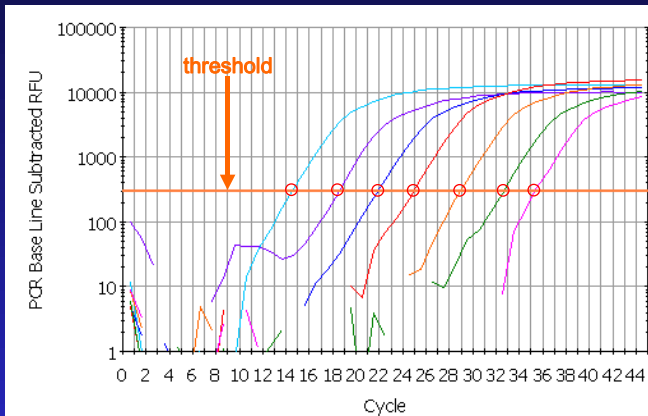


# Real-time PCR přístroje





# Absolutní kvantifikace



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

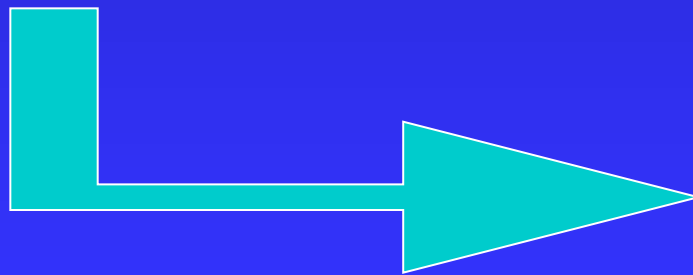
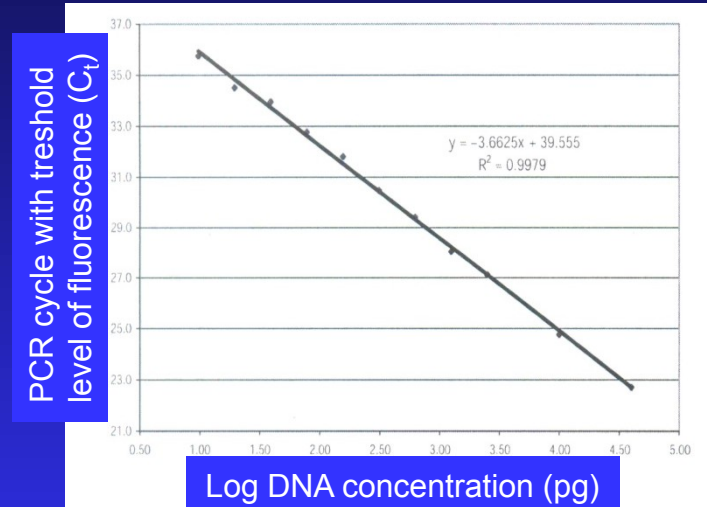
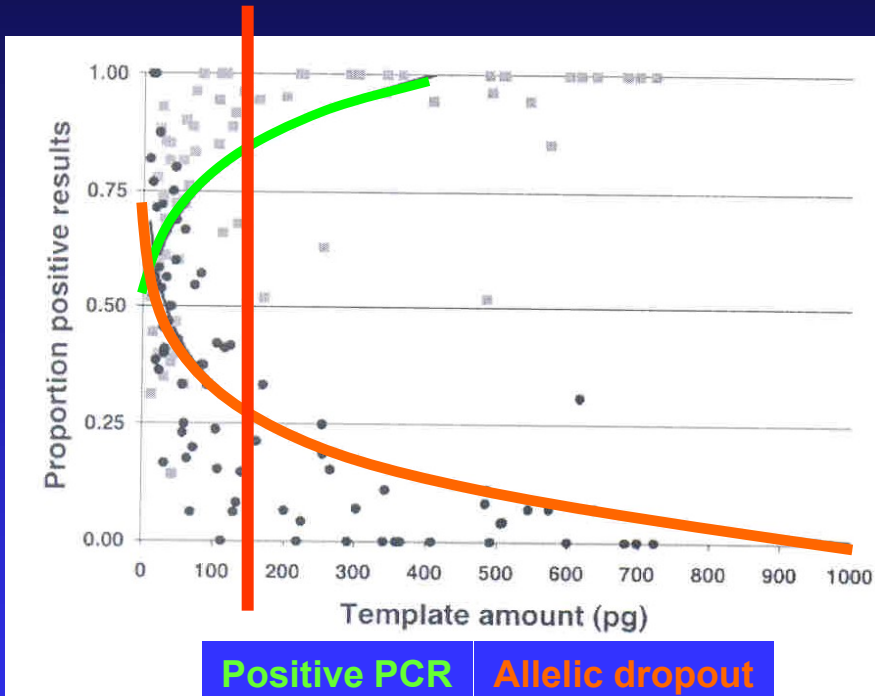
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns  
○ Standards



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

# Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků

# Relativní kvantifikace - standardy

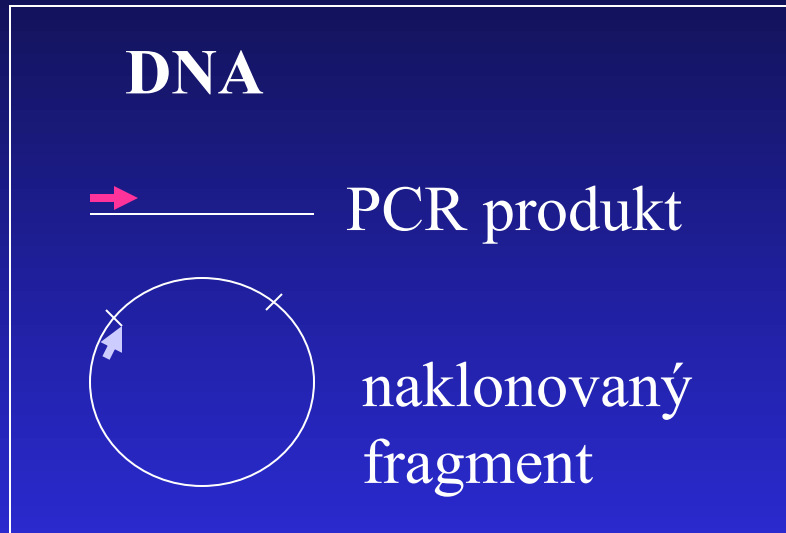
- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu

# Sekvenování

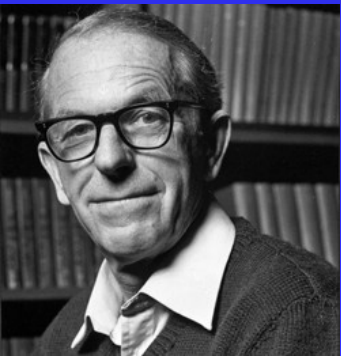
# Sekvencování DNA

- Maxam-Gilbertova (chemická) metoda:  
bázově-specifická chem. modifikace a štěpení fragmentů DNA
- Sangerova (enzymatická) metoda:  
terminace replikace pomocí ddNTP

# Sekvencování DNA

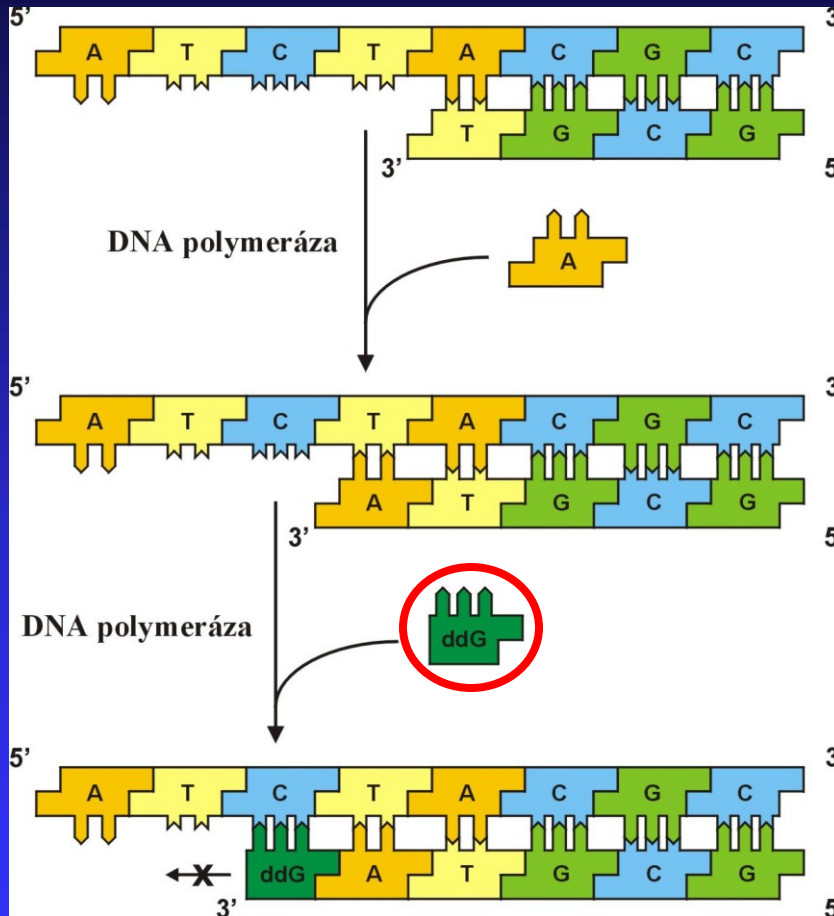


sekvenační reakce se  
značenými dideoxynukleotidy  
a jedním **specifickým** nebo  
universálním primerem

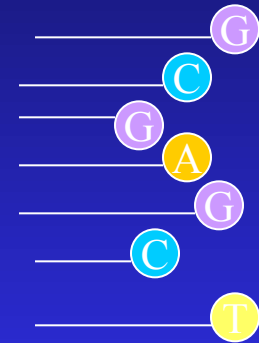


**Sangerova  
dideoxy metoda**

# Sekvencování DNA



after denaturation

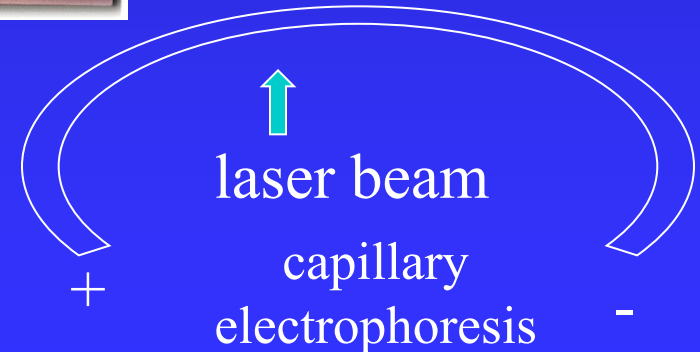
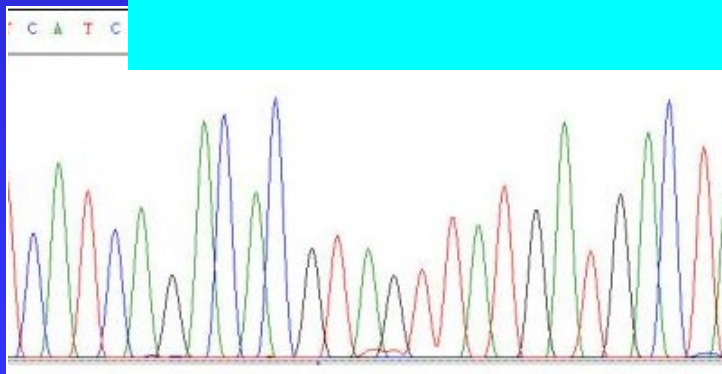


fluorescently-labelled dideoxynucleotide → end of polymerization

# Sekvencování DNA

DNA

- Sekvence délky 500 – 1000 bp
- 4 kapiláry - destička s 96 vzorky za noc
- Jsou i sekvenátory s 96 kapilárami





# Příště ...

- Single locus DNA markery – mikrosatelity, SINE, LINE atd....