

# 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

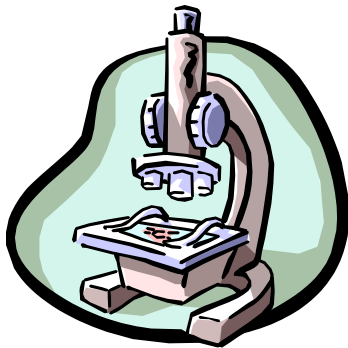
*Nakladatelství Karolinum 2004*



# Proč?

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

**Genetické metody:**



**klasické metody**  
morfologická,  
ekologická,  
bionomická  
data

**genetická  
data**



**Další úroveň poznání  
Odpovědi na nové otázky**

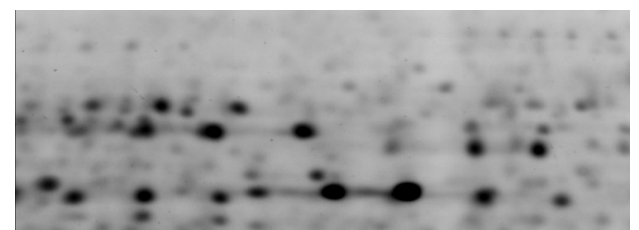
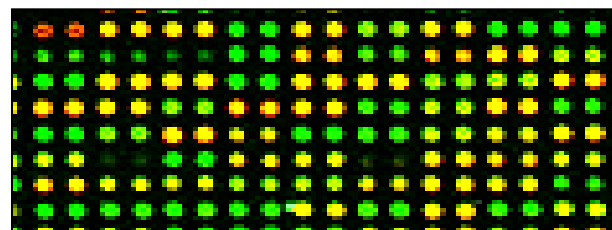
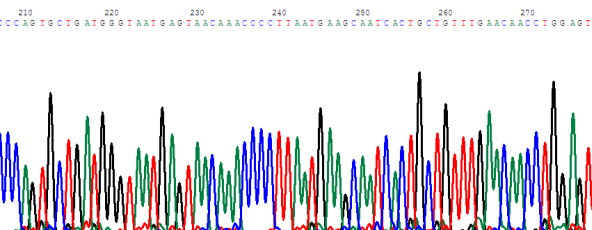
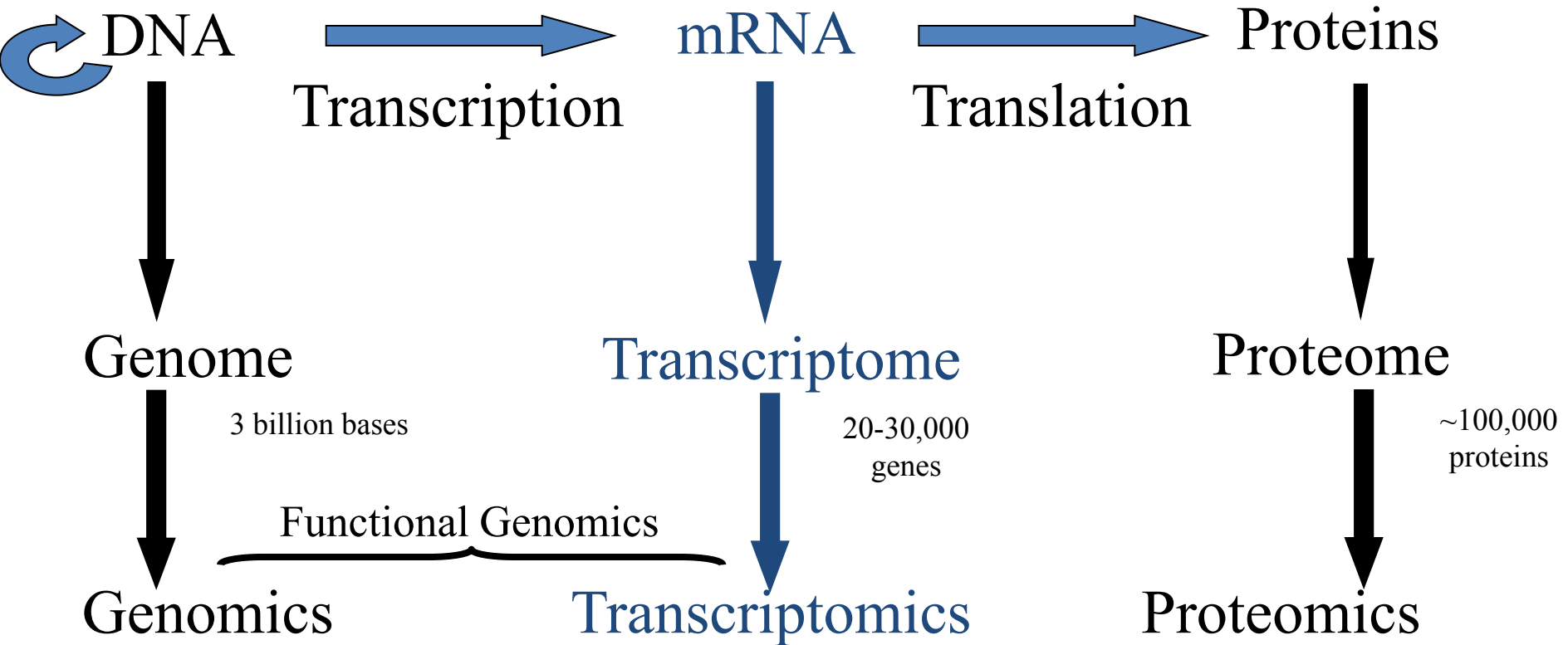
# Proč používat genetické metody v zoologii?

- **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**

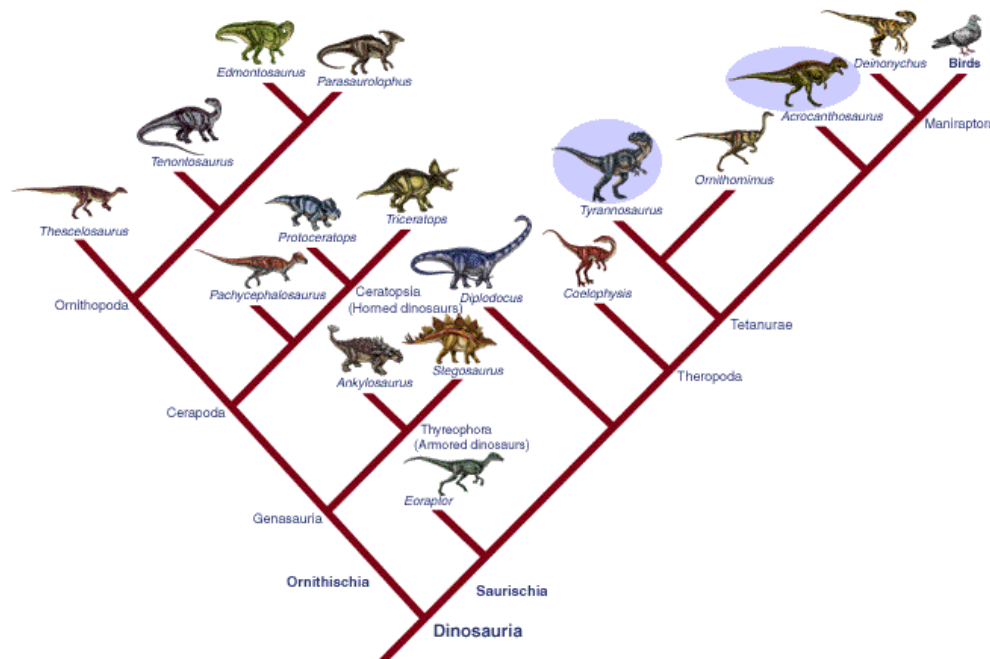
# Genetické metody

= studium genetické variability



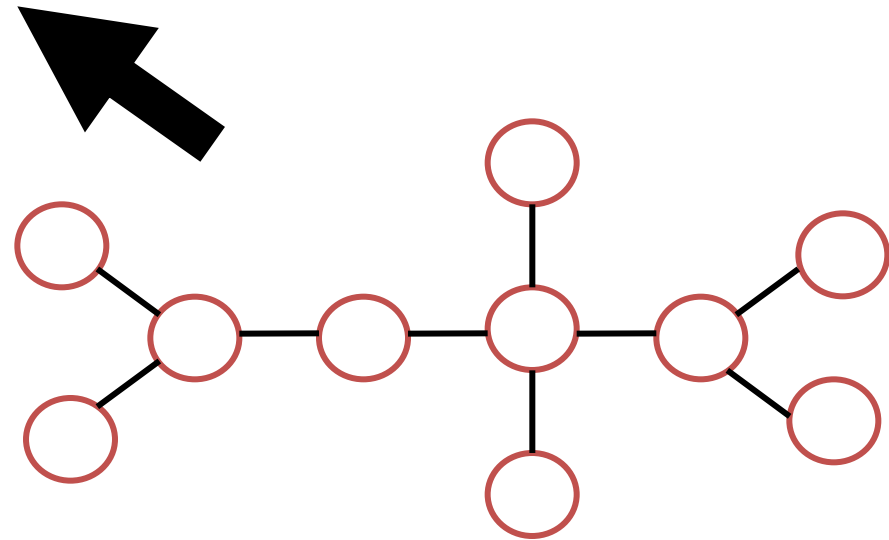
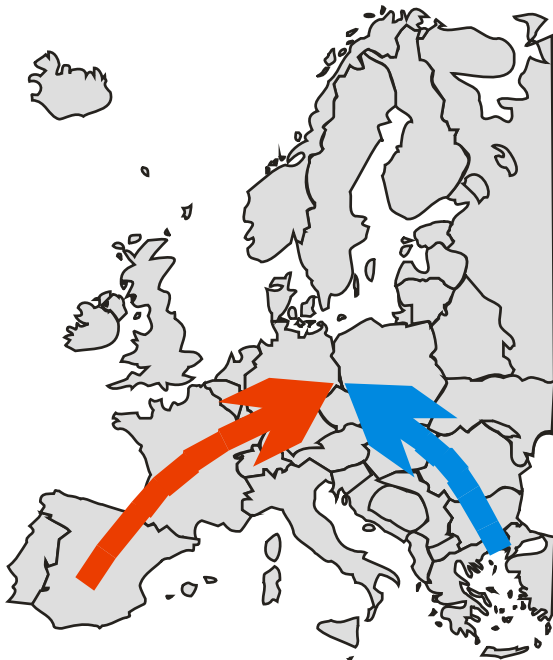
# Úrovně genetické variability

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



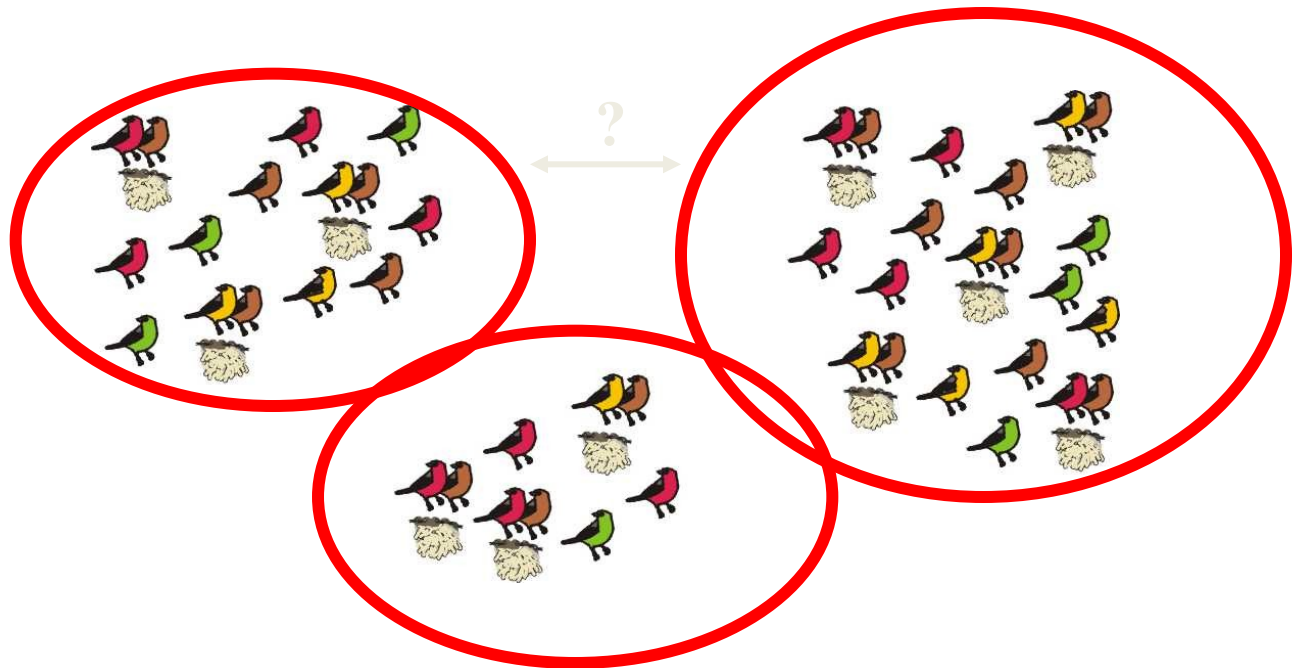
# Úrovně genetické variability

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



# Úrovně genetické variability

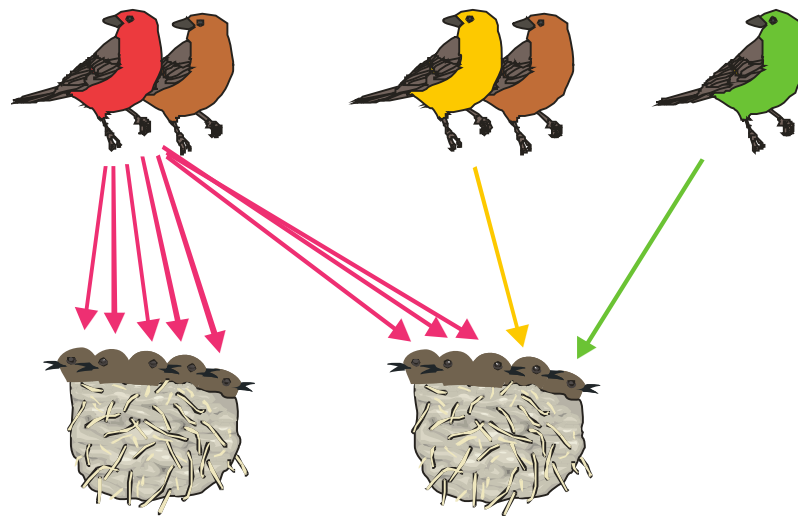
- **populace** – populační biologie, ochranářská genetik





# Úrovně genetické variability

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



# 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 přírodních vědách
- **nekódující DNA**
- nefunkční (neznámá funkce)
- neutrální k přírodnímu výběru
- většina DNA u eukaryot (až 95% u obratlovců)
- pseudogeny
- repetitivní DNA

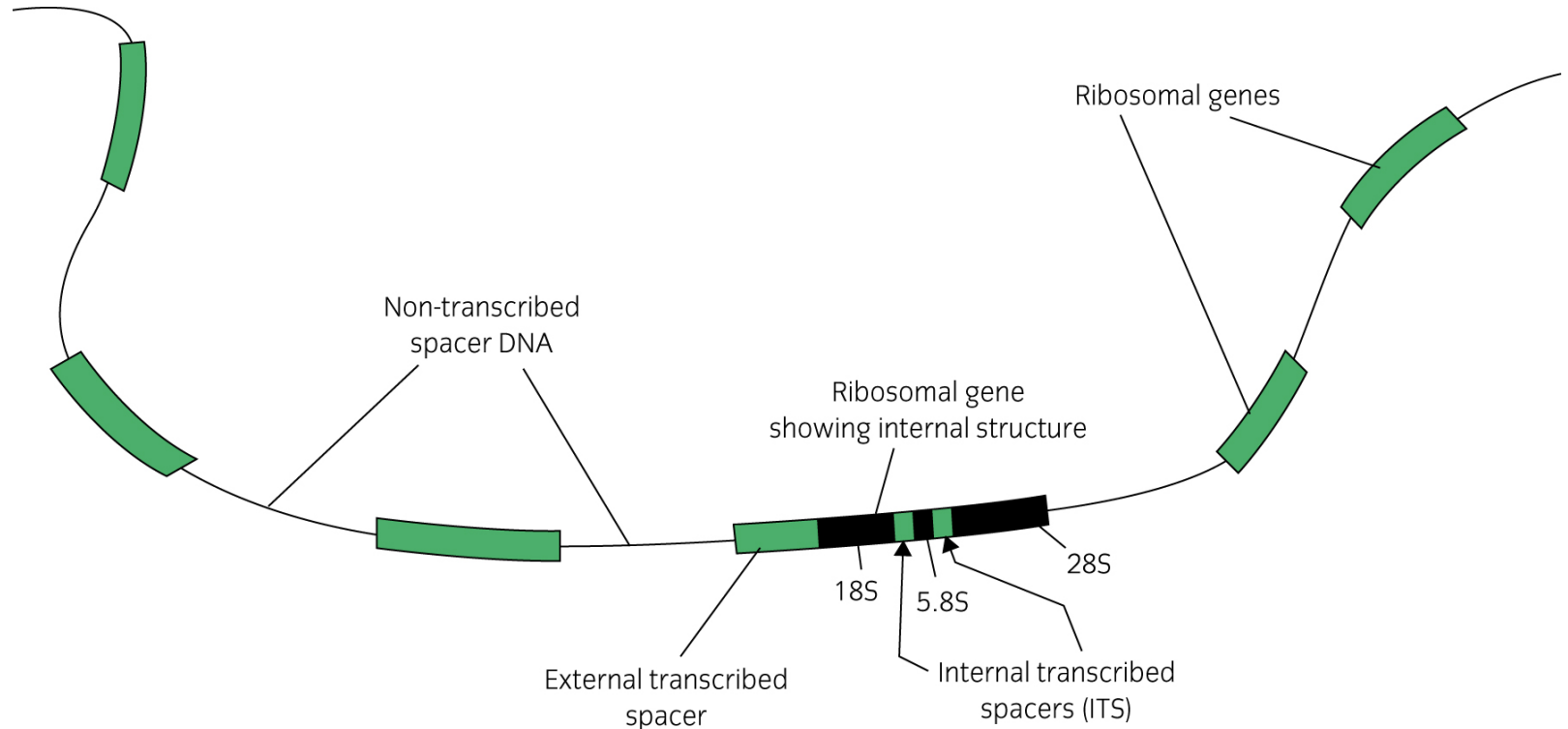
# Repetitivní DNA

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) ribosomální DNA
- 2) Jaderne strukturální geny (protein coding genes)
- 3) mitochondriální DNA

# 1. Ribosomální DNA



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

## 2. Jaderné geny

- nízká variabilita mezi jedinci – významná funkce, purifikující selekce (nejsou často používány jako genetické markery)
- introny – více variabilní než exony
- alozomy
- MHC geny
- SNPs – narůstající význam (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
- $\Rightarrow$  obecná molekulární genetika

# Genotypizace – stanovení genotypu

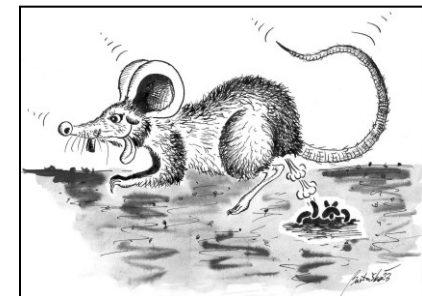
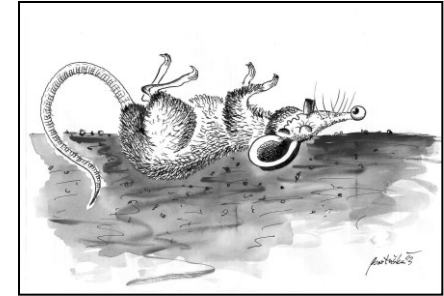
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR-based methods)
  - 3) studium variability daného úseku (lokus)

# 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 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

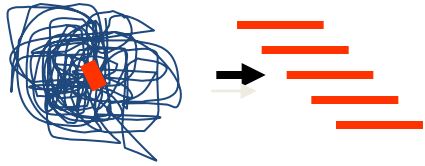
Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

# Amplifikace DNA – PCR

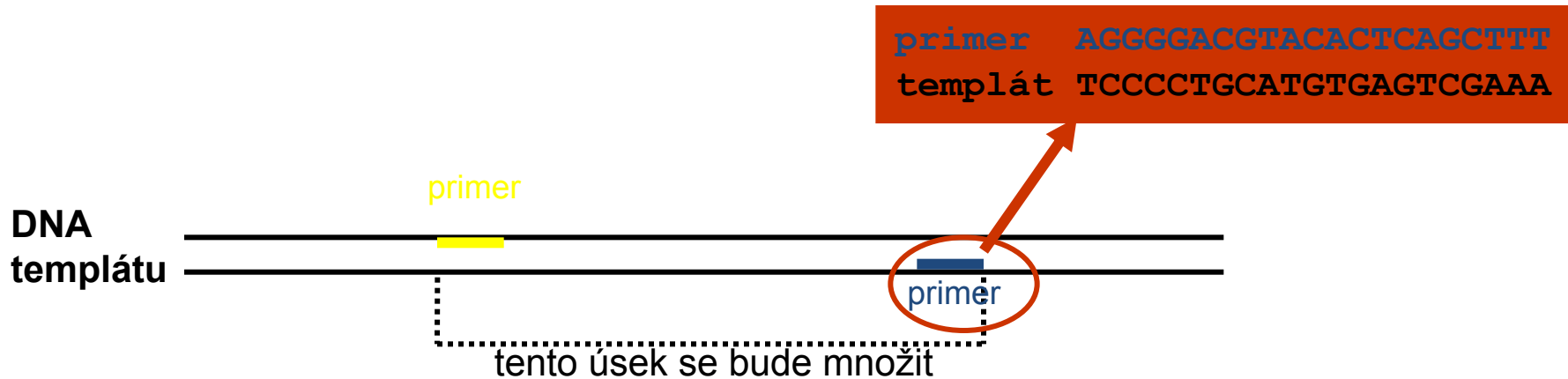
<b>Druh</b>	<b>Velikost genomu (bp)</b>	<b>Počet chromozómů (1n)</b>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	$3,0 \times 10^9$	18
<i>Mus musculus</i>	$3,0 \times 10^9$	20
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	23





# 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.



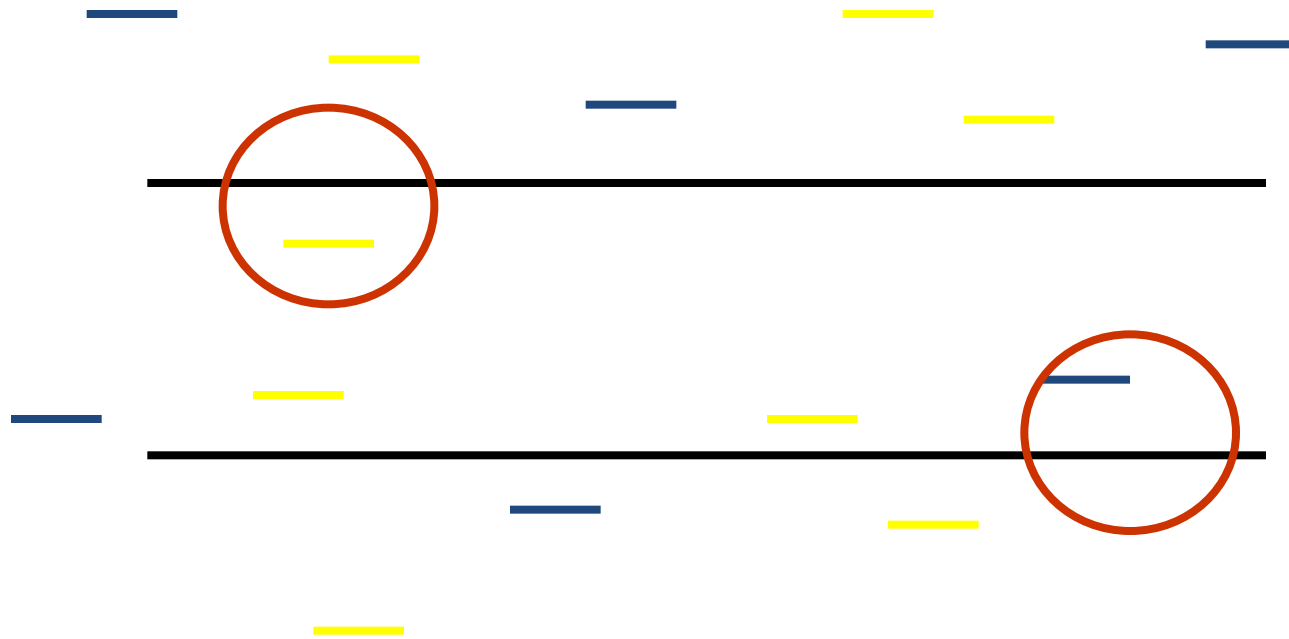
# Denaturace (obvykle 95 C)

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



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



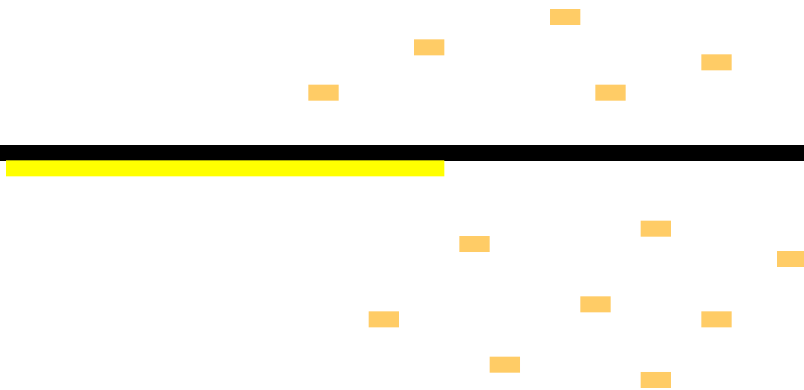
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

**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

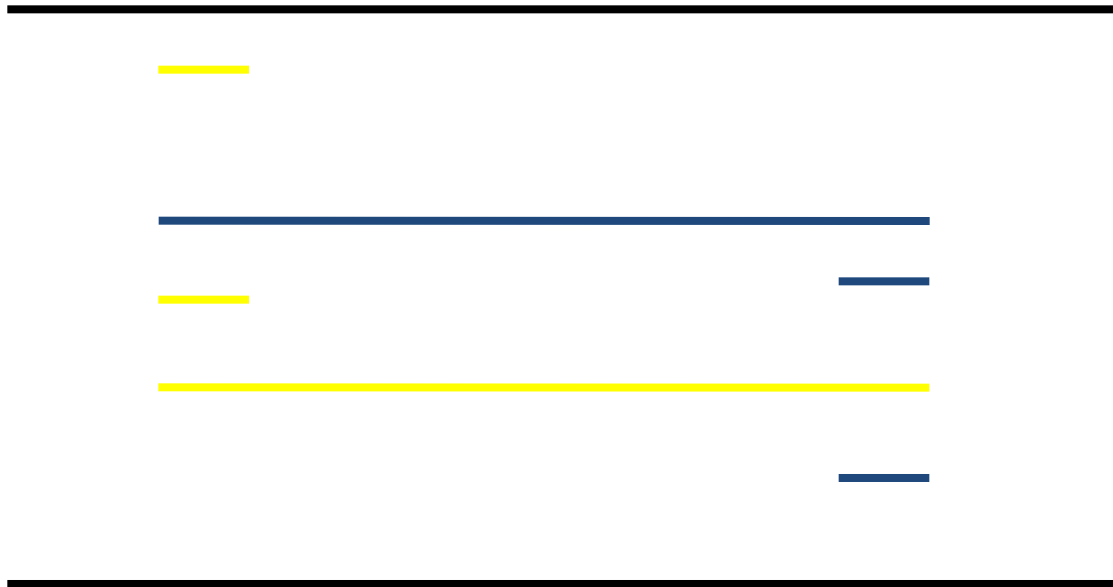
**Primery jsou prodlužovány** přidáváním nukleotidů  
podle sekvence templátu (obvykle 72 C – optimum pro *Taq* polymerázu)



Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



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

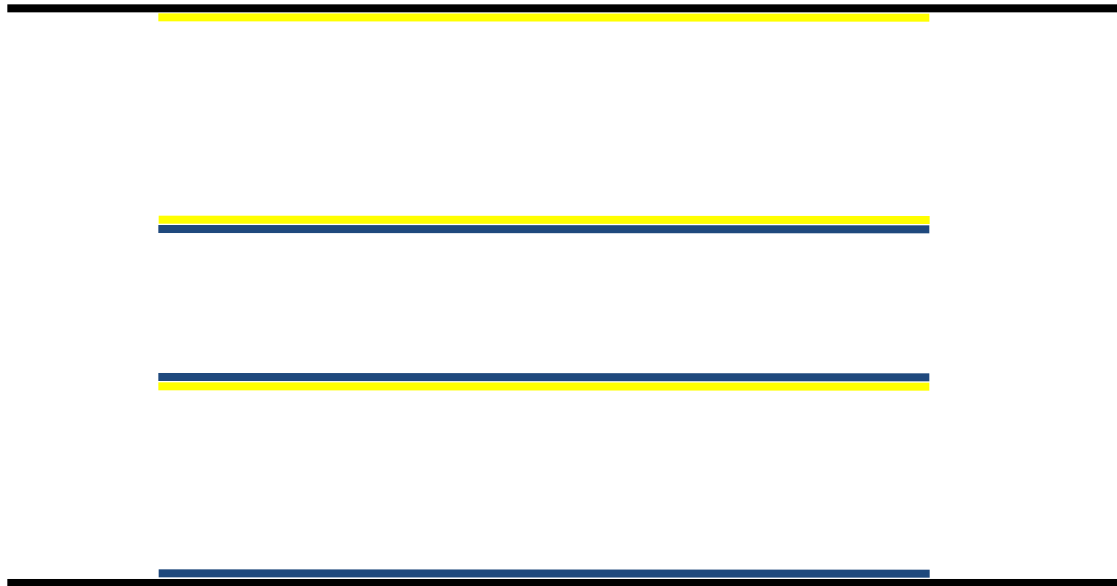


Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií

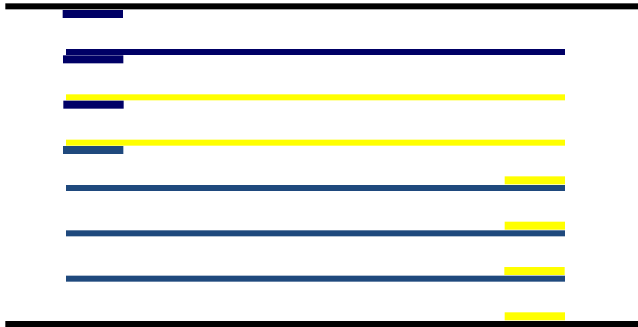




Při dalším zahřátí...



Ochlazení – nasednutí primerů



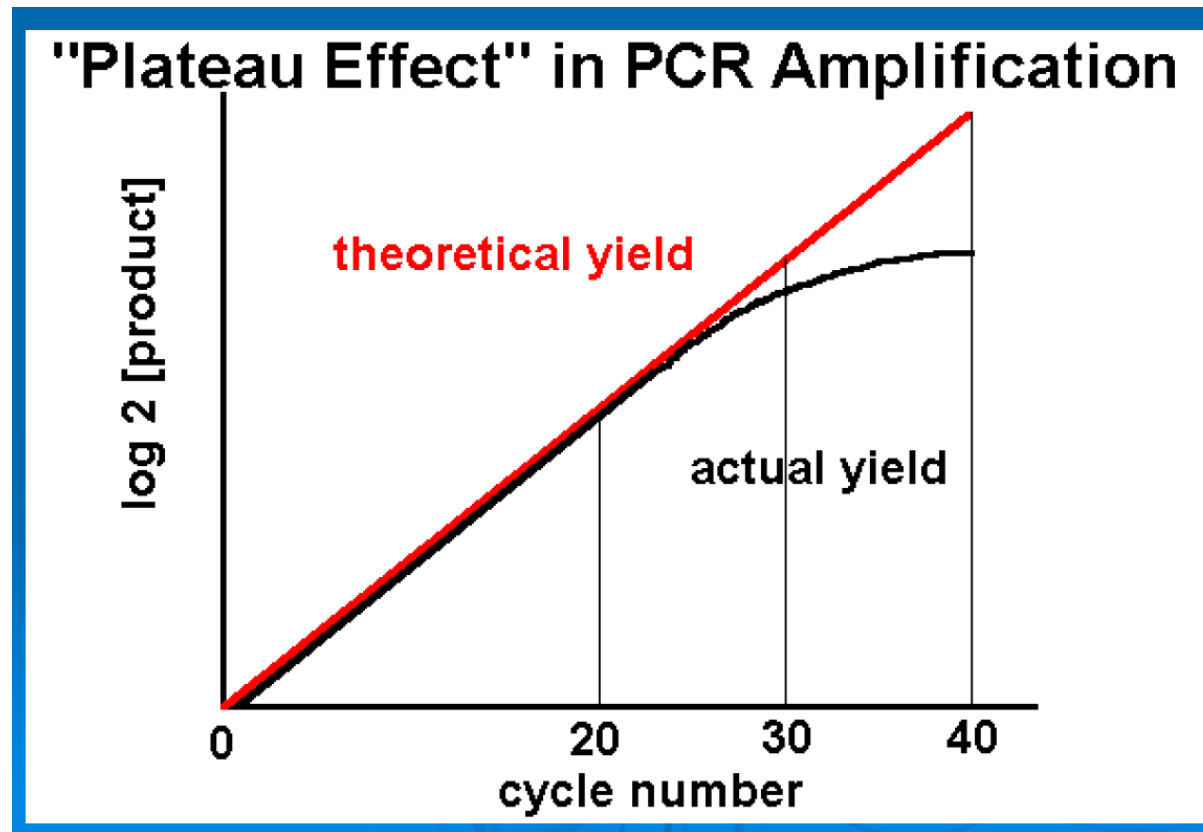
72 C vznik nových fragmentů



95 C denaturace



# Inhibice PCR vysokou koncentrací DNA



*Cycler MJ Research*



PC

*Cycler Eppendorf*



*RoboCycler Stratagene*



Cykly (obvykle 20-40):  
**denaturace (95°C )**  
**nasednutí primerů (50-65°C )**  
**elongace=polymerizace (72°C )**

Nejprve však často prodloužená denaturace celkové DNA

Nakonec prodloužená elongace

Příklad  
programu

95 C 3 min

95 C 30 s

60 C 30 s

72 C 1 min

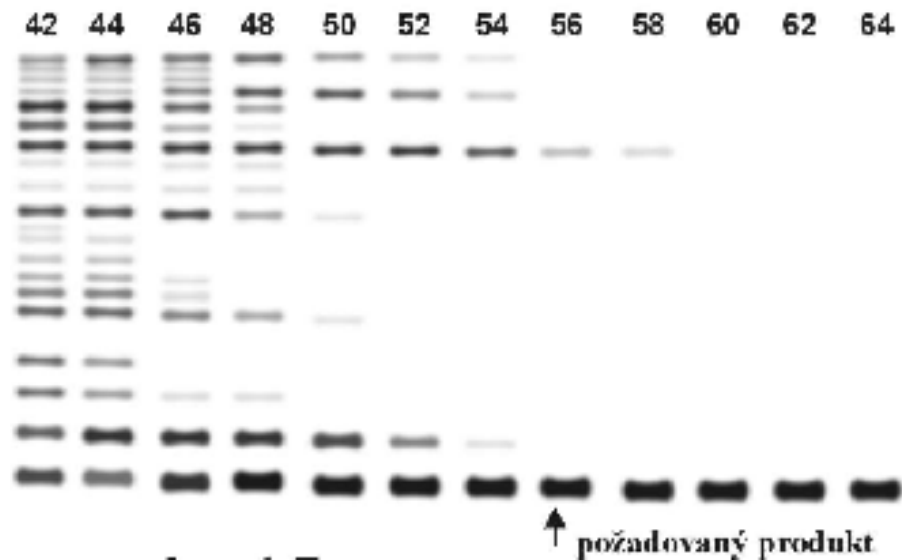
35x zpět

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



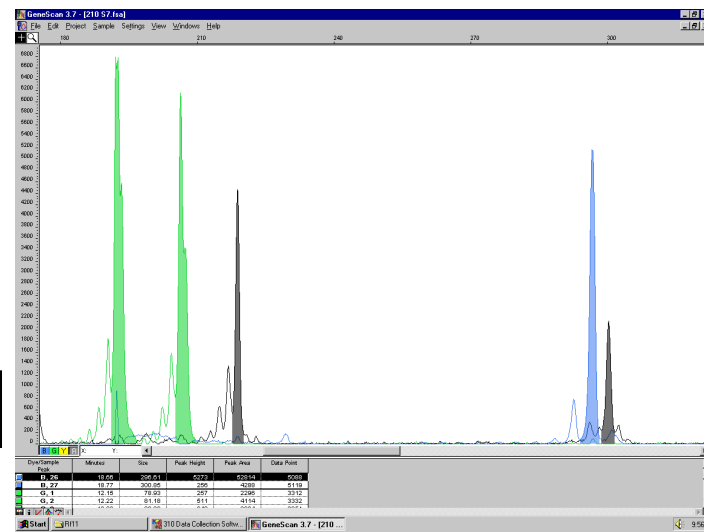
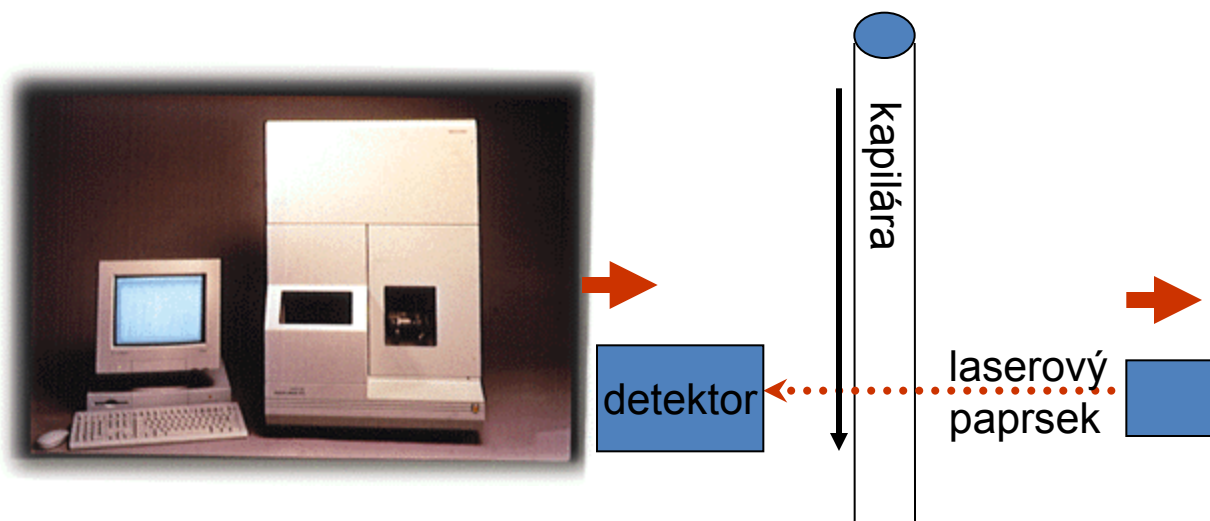
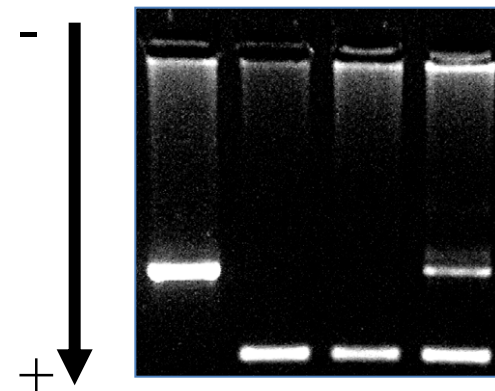
# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 1) délkový polymorfismus

- elektroforéza

# 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

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

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru





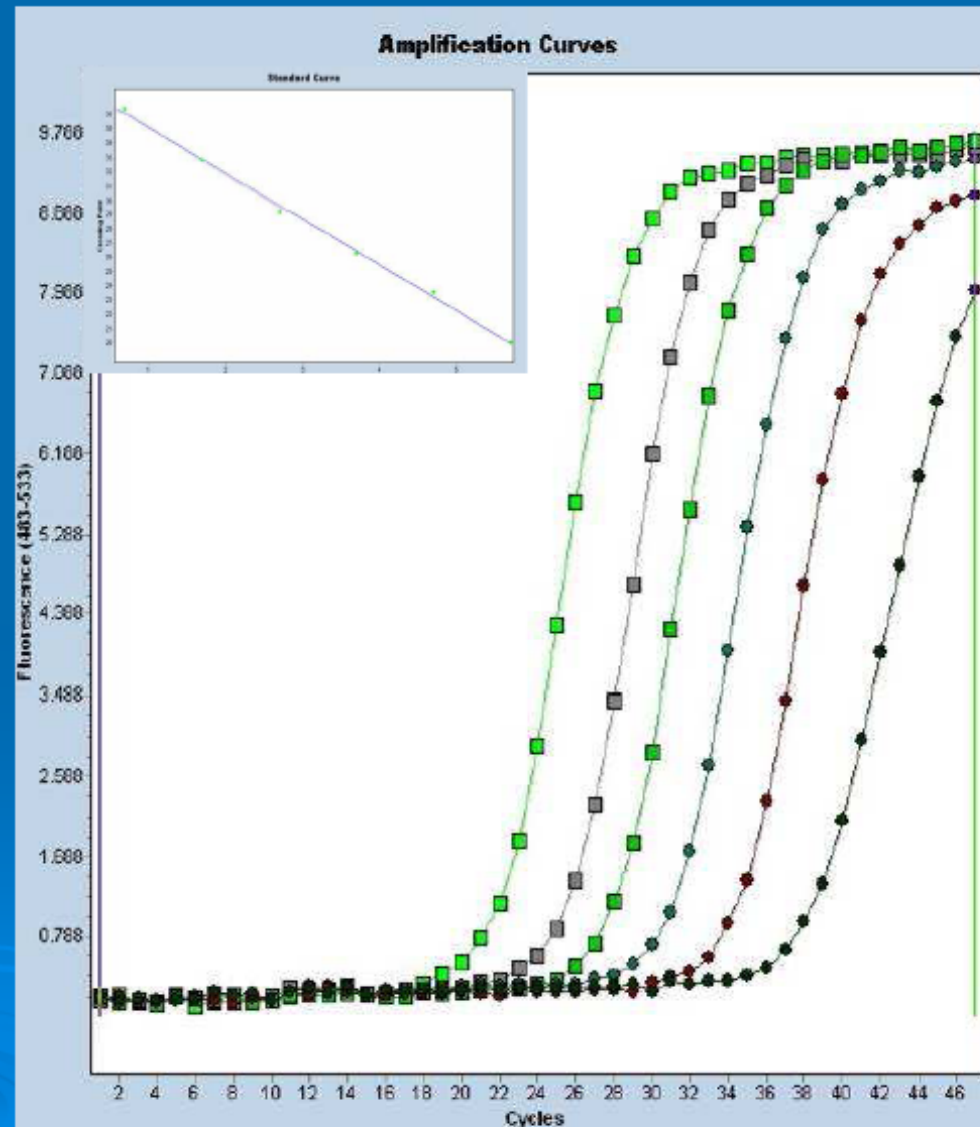
**REAL TIME PCR  
(= „kvantitativní PCR“)**

# 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...

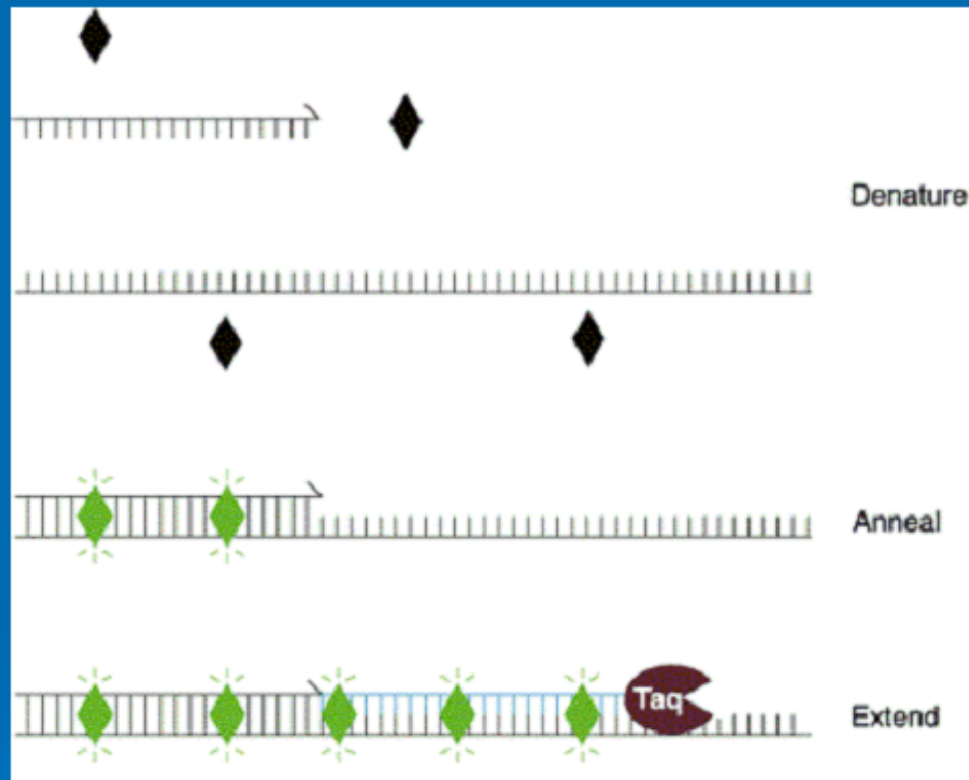
## **Specifická detekce**

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

# *SYBR Green*

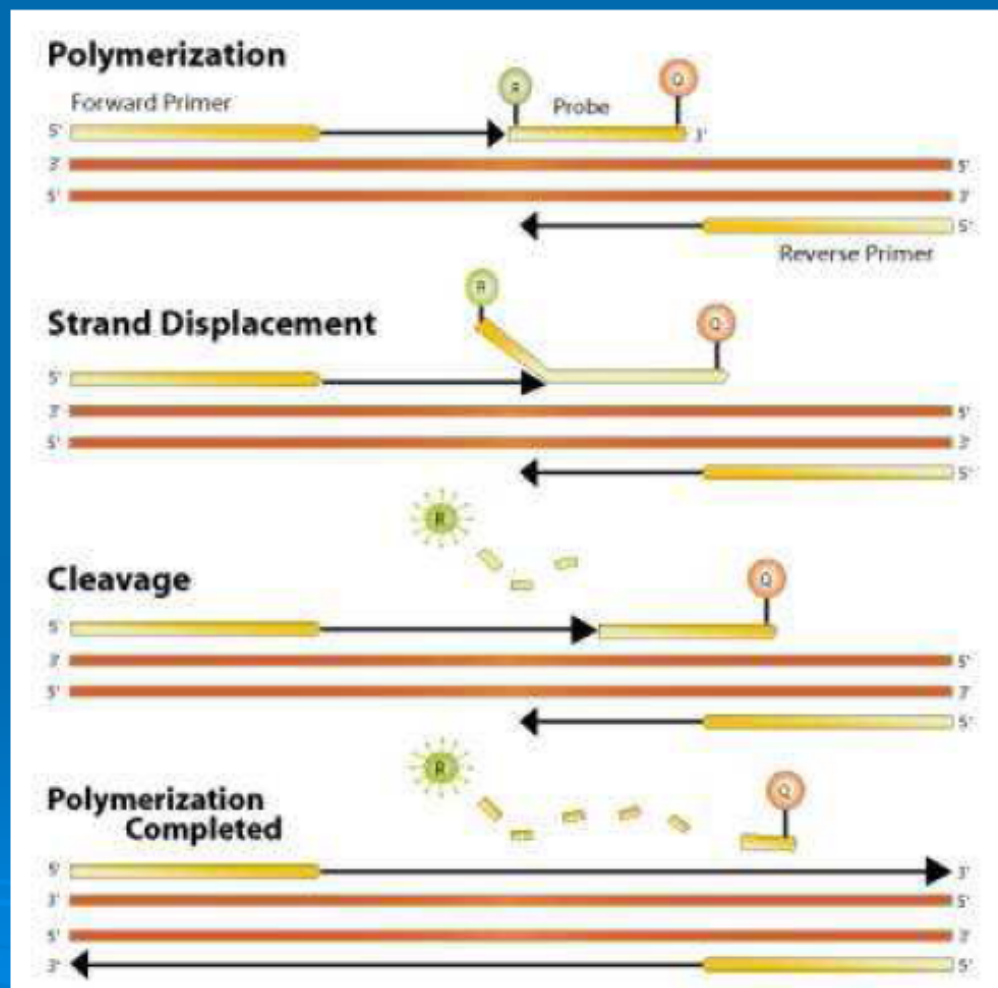


SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

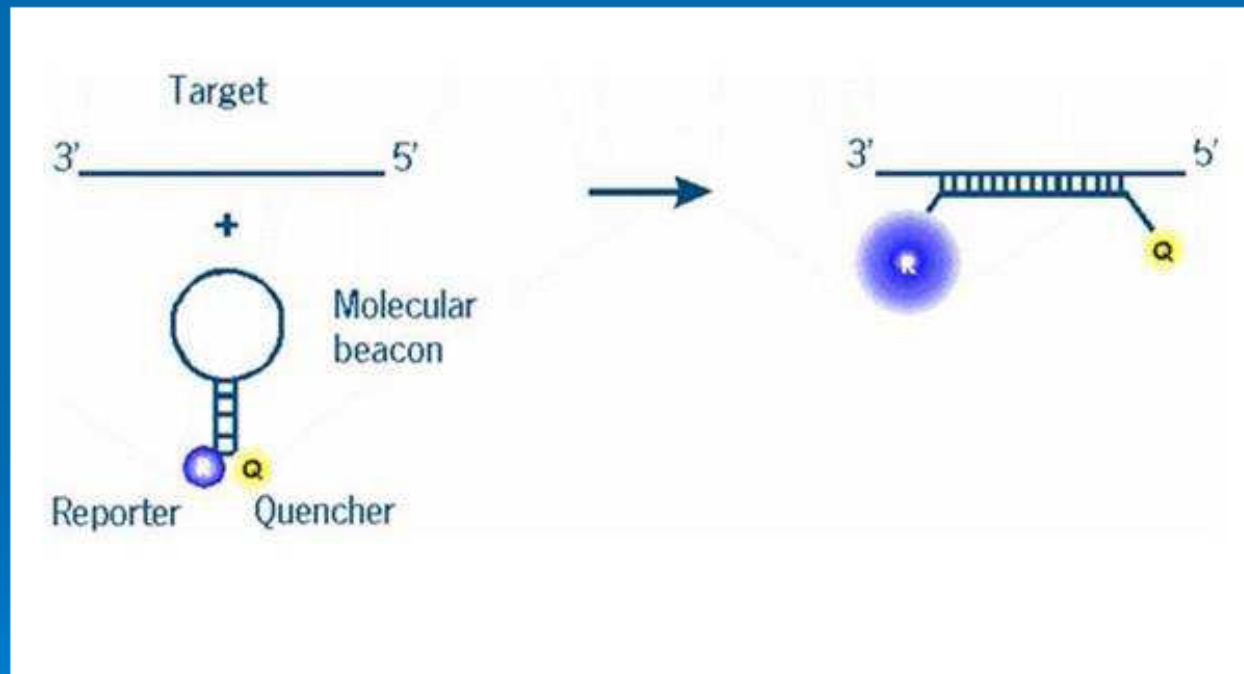


# TaqMan hydrolyzační sondy

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



# *Molecular beacon hybridizační sondy*

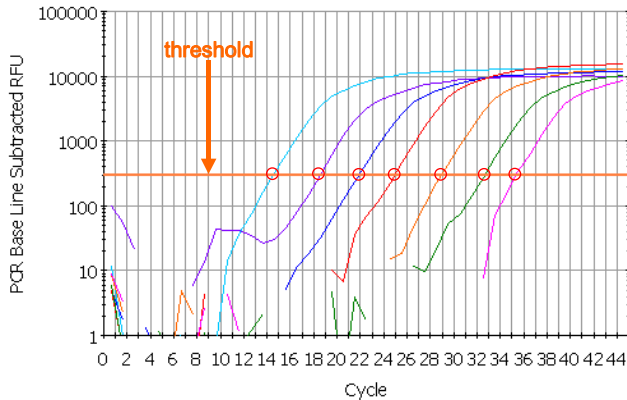


# Real-time PCR přístroje





# Absolutní kvantifikace



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

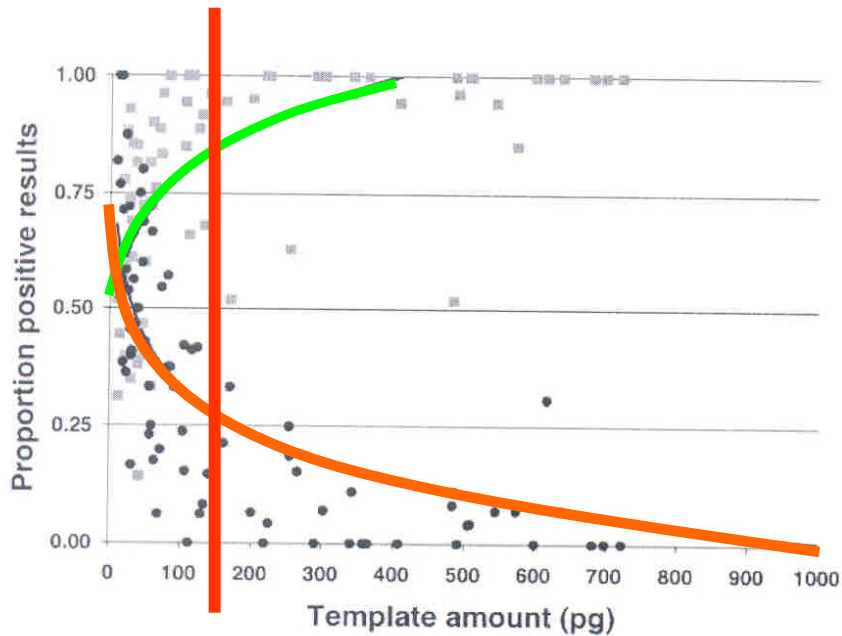
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns  
○ Standards

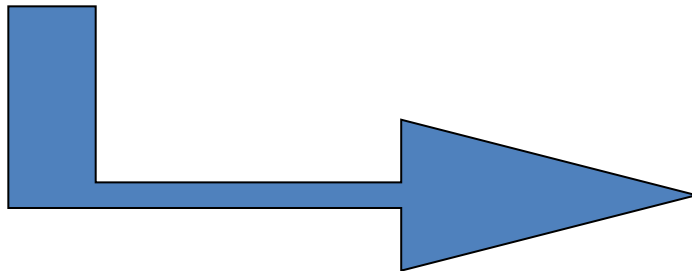


PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

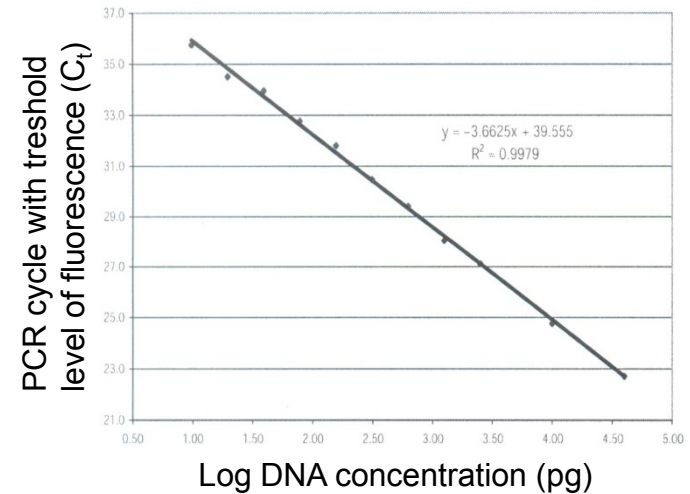
# Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Positive PCR Allelic dropout



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků



# Relativní kvantifikace - standardy

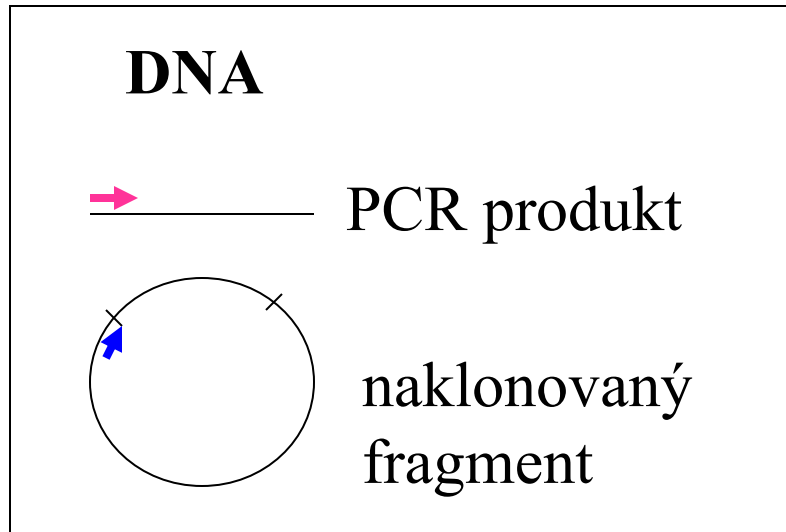
- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu

# Sekvenování

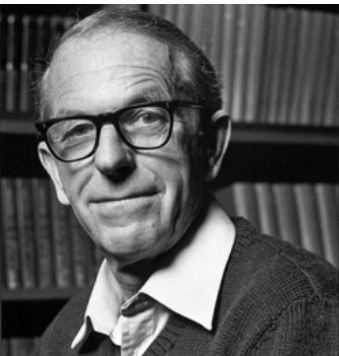
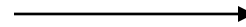
# Sekvencování DNA

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

# Sekvencování DNA



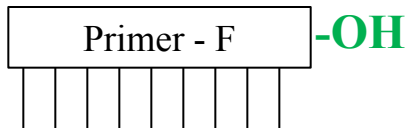
sekvenační reakce se  
značenými dideoxynukleotidy  
a jedním **specifickým** nebo  
**universálním** primerem



**Sangerova  
dideoxy metoda**

## Sekvenování PCR produktu:

- jen jeden primer
- vysoká koncentrace templátu (hodně kopií)



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

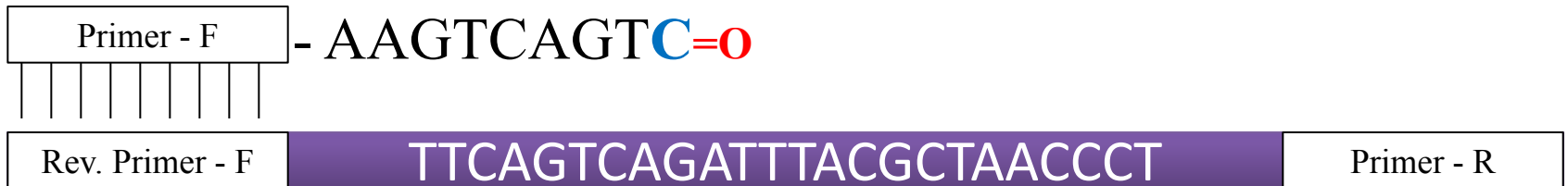
2. Nasednutí primeru - 50-60°C



# Sekvenační „PCR“ - jen jeden primer



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



1. Denaturace - 96°C

3. Polymerizace - 72°C

2. Nasednutí primeru - 50-60°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 - AAGTCAGTCTA**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

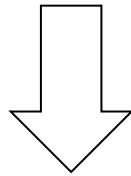
# Výsledek sekvenační „PCR“

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

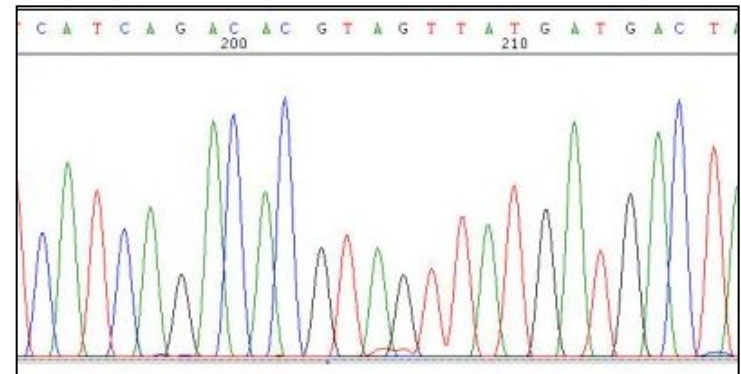
Primer - F - AAGTCAGT**C**=0

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

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

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

Primer - F - AAGT**C**=0



krátké ----- dlouhé  
(rychlé) ----- (pomalé)

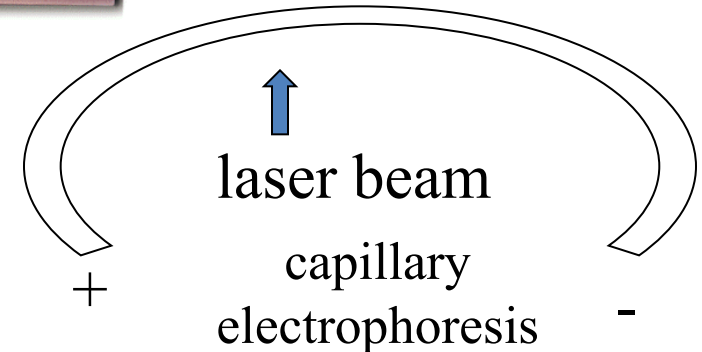
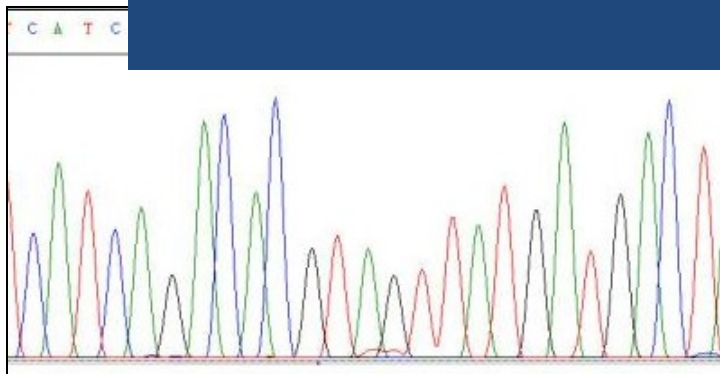
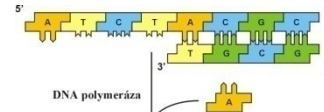
+

Primer - F	AAGT <b>CAGTCTAA</b> ATGCGATTGGGA	Rev. Primer - R
Rev. Primer - F	TTCAGTCAGATTACGCTAACCT	Primer - R

# 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....