

Genetické metody v zoologii

Miloš Macholán (macholan@iach.cz)
Josef Bryja (bryja@brno.cas.cz)

Doporučená literatura (česká)

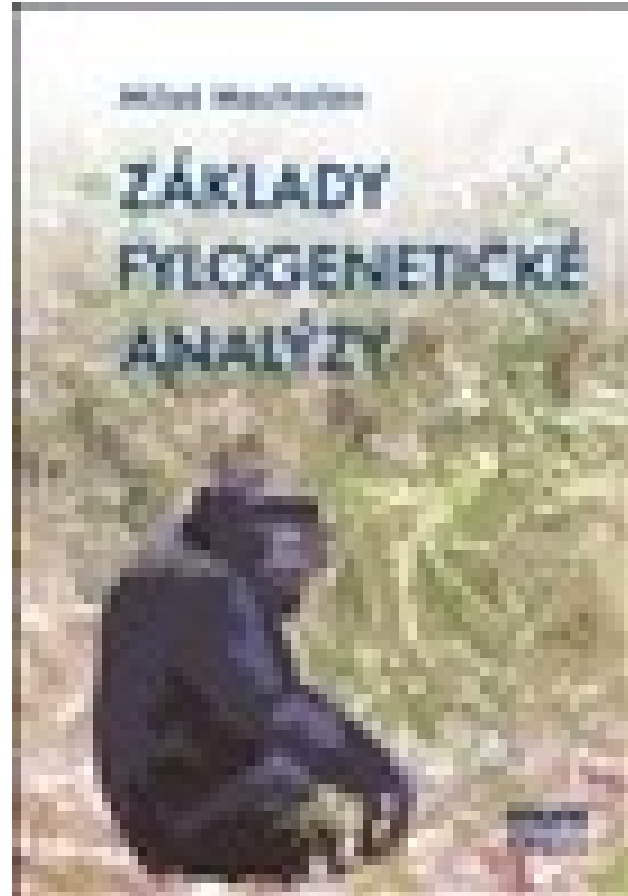
Genetické metody v zoologii

Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

Nakladatelství Karolinum 2004



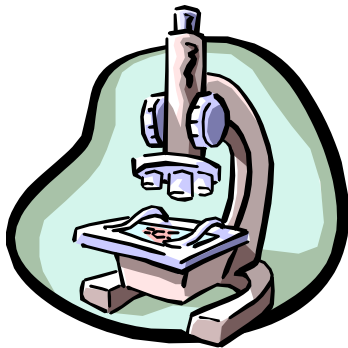
- M. Macholán
- Základy fylogenetické analýzy (2014)



Proč?

Problém:
zoologie, taxonomie
ekologie, evoluční biologie

Genetické metody:



klasické metody
morfologická,
ekologická,
bionomická
data

**genetická
data**



**Další úroveň poznání
Odpovědi na nové otázky**

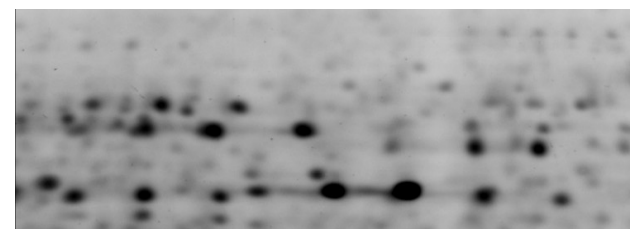
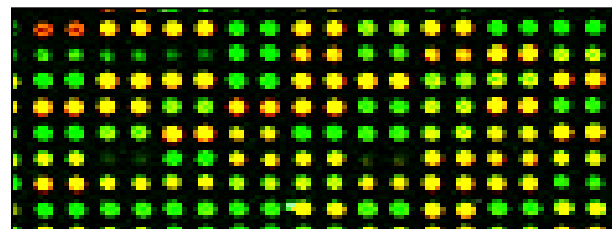
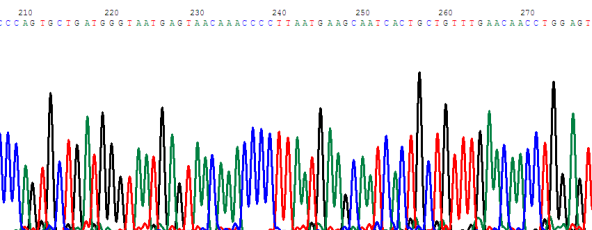
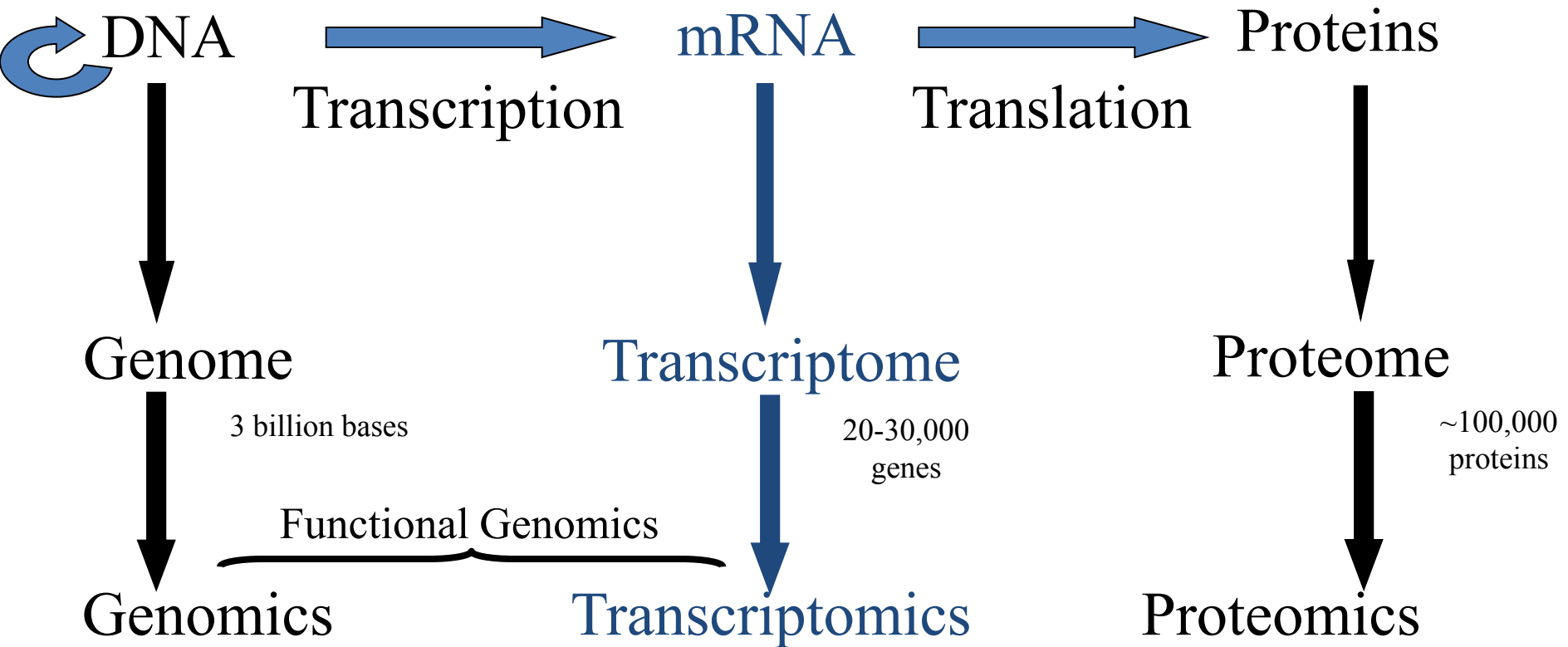
Proč používat genetické metody v zoologii?

- **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

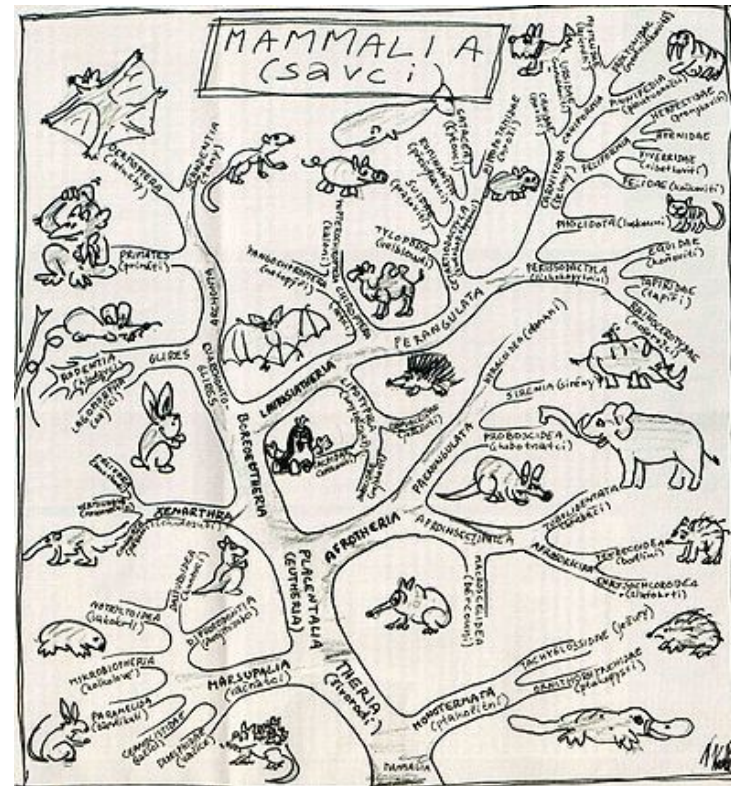
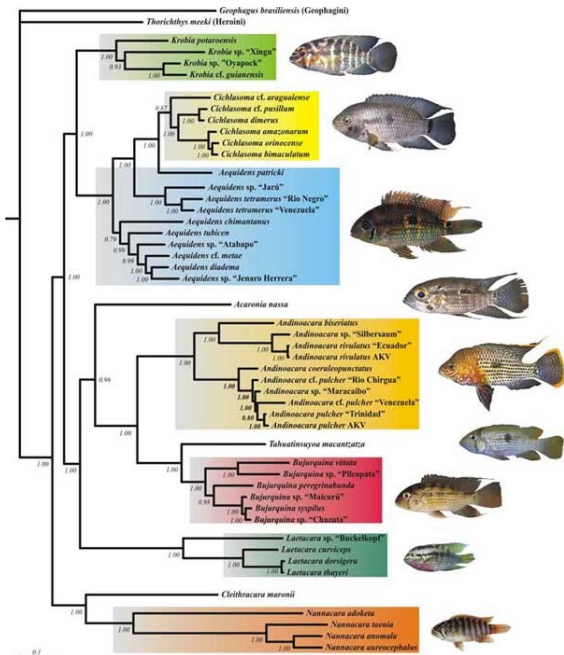
Genetické metody

= studium genetické variability



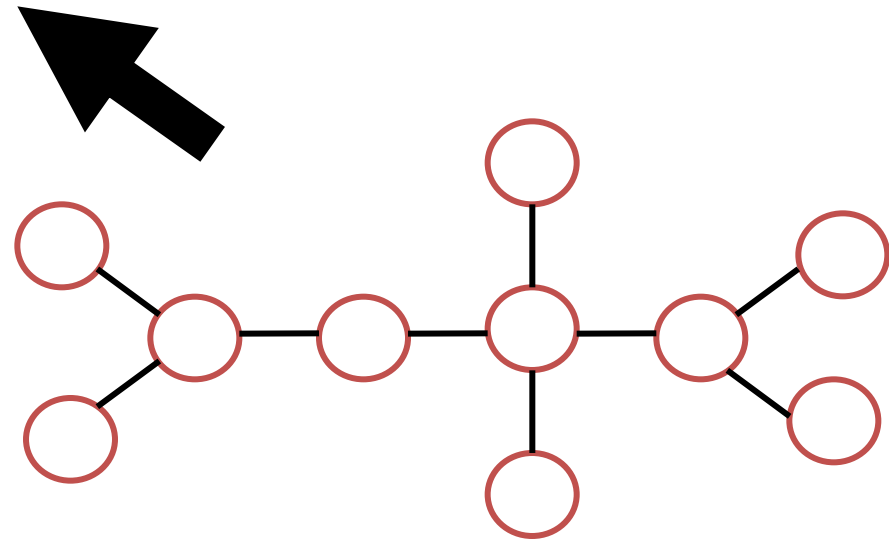
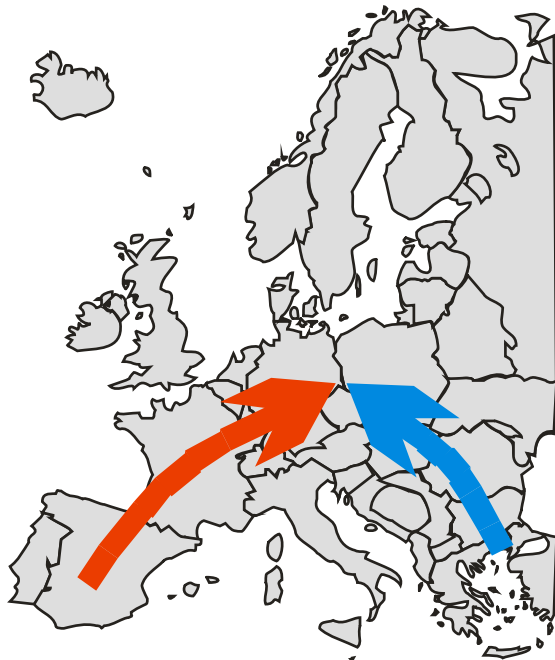
Úrovně genetické variability

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



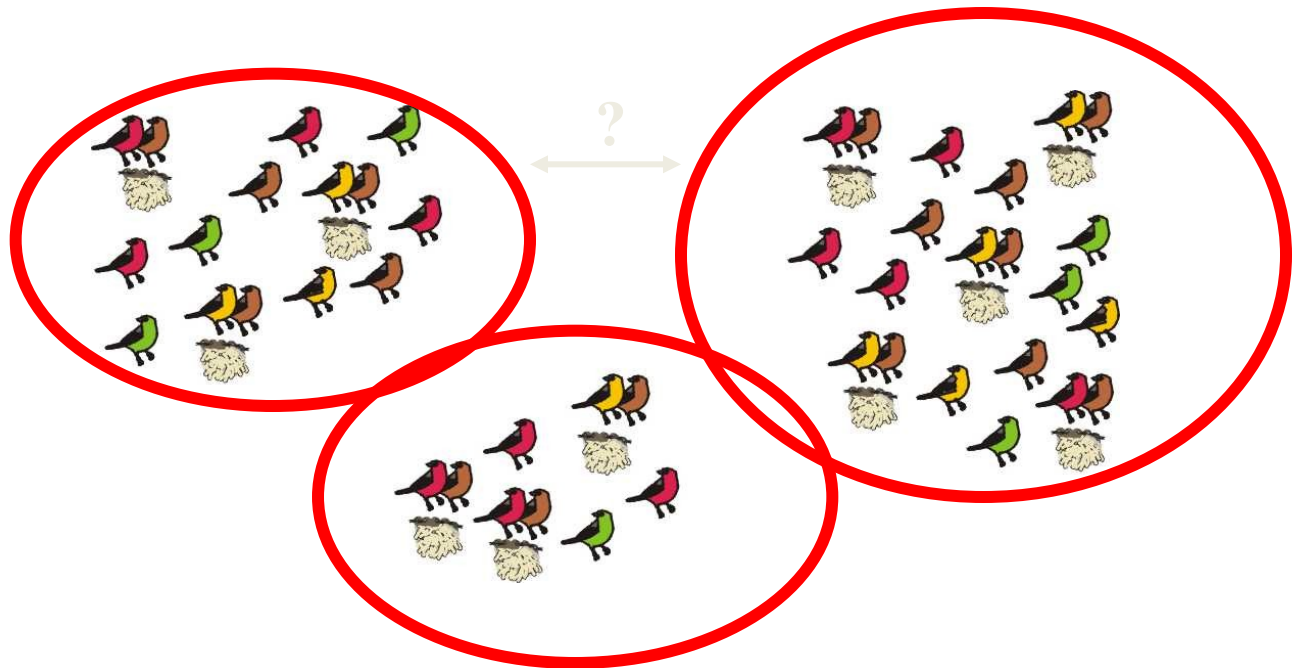
Úrovně genetické variability

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



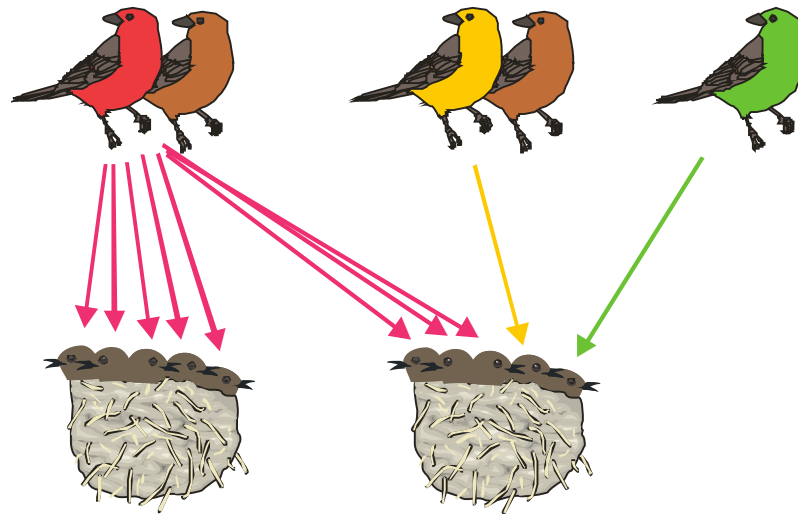
Úrovně genetické variability

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



Úrovně genetické variability

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



Genetické metody v zoologii

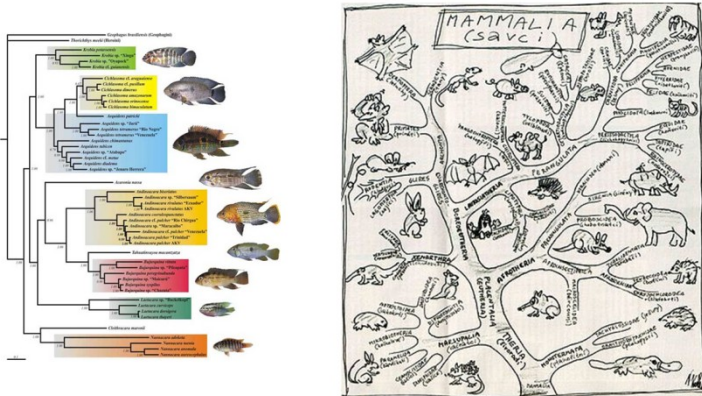
- jak genetická data získat, tj. které **techniky** použít
- **Mechanismy mikroevoluce** (podzim)
- základní typy a zpracování (editace) genetických dat
- **Molekulární ekologie** (jaro)

Dnešní přednášky – M. Macholán

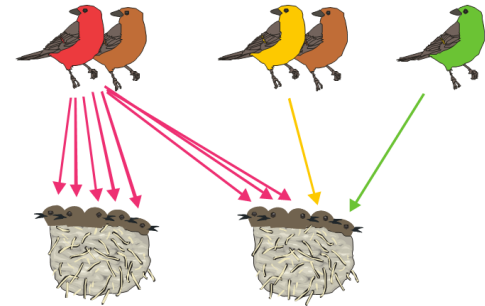
- Elektroforéza proteinů (alozymy aj.)
- Cytogenetika

Různé úrovně genetické variability

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



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



VS.

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

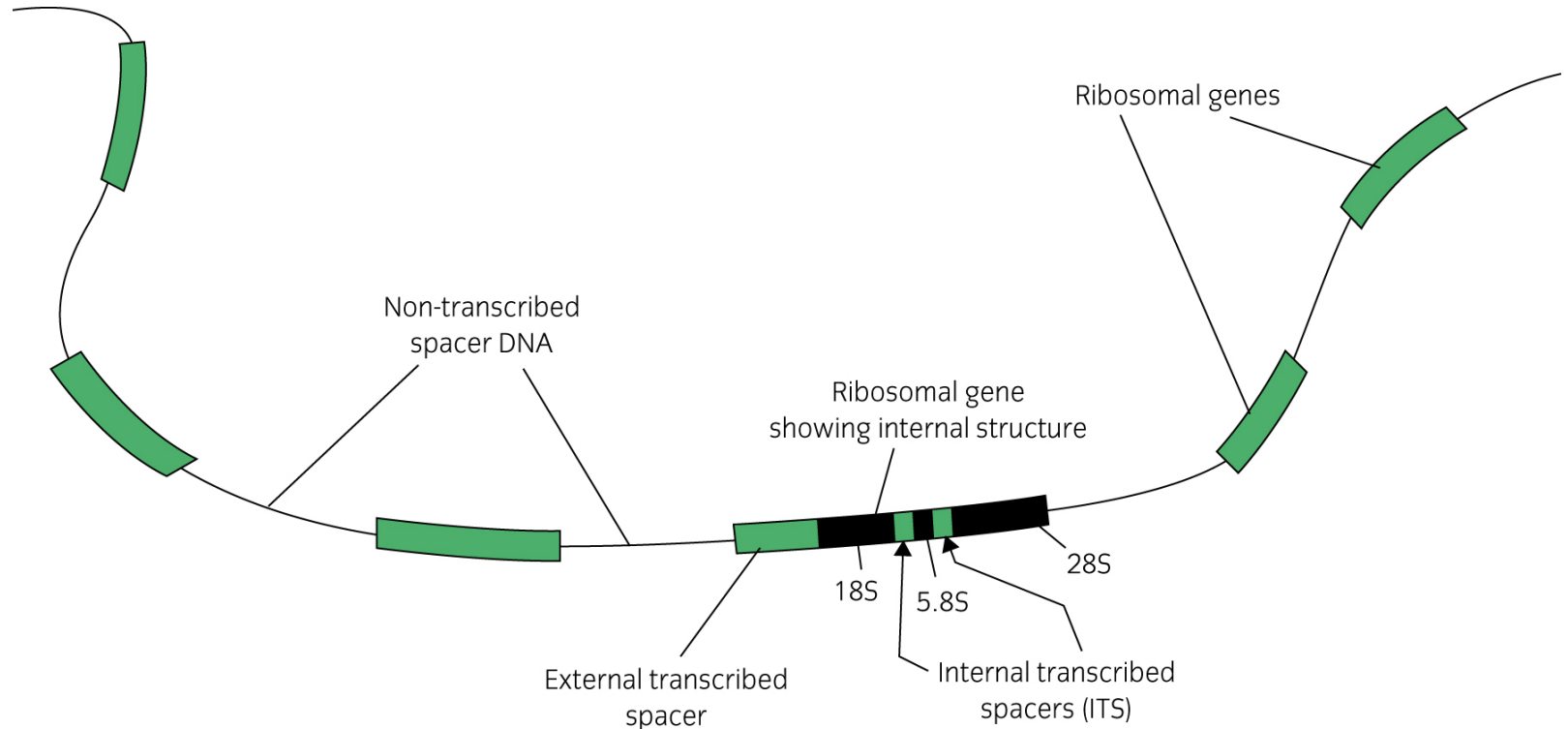
Repetitivní DNA

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) jaderné strukturální geny (protein-coding genes)
- 3) mitochondriální DNA

1. Ribosomální DNA

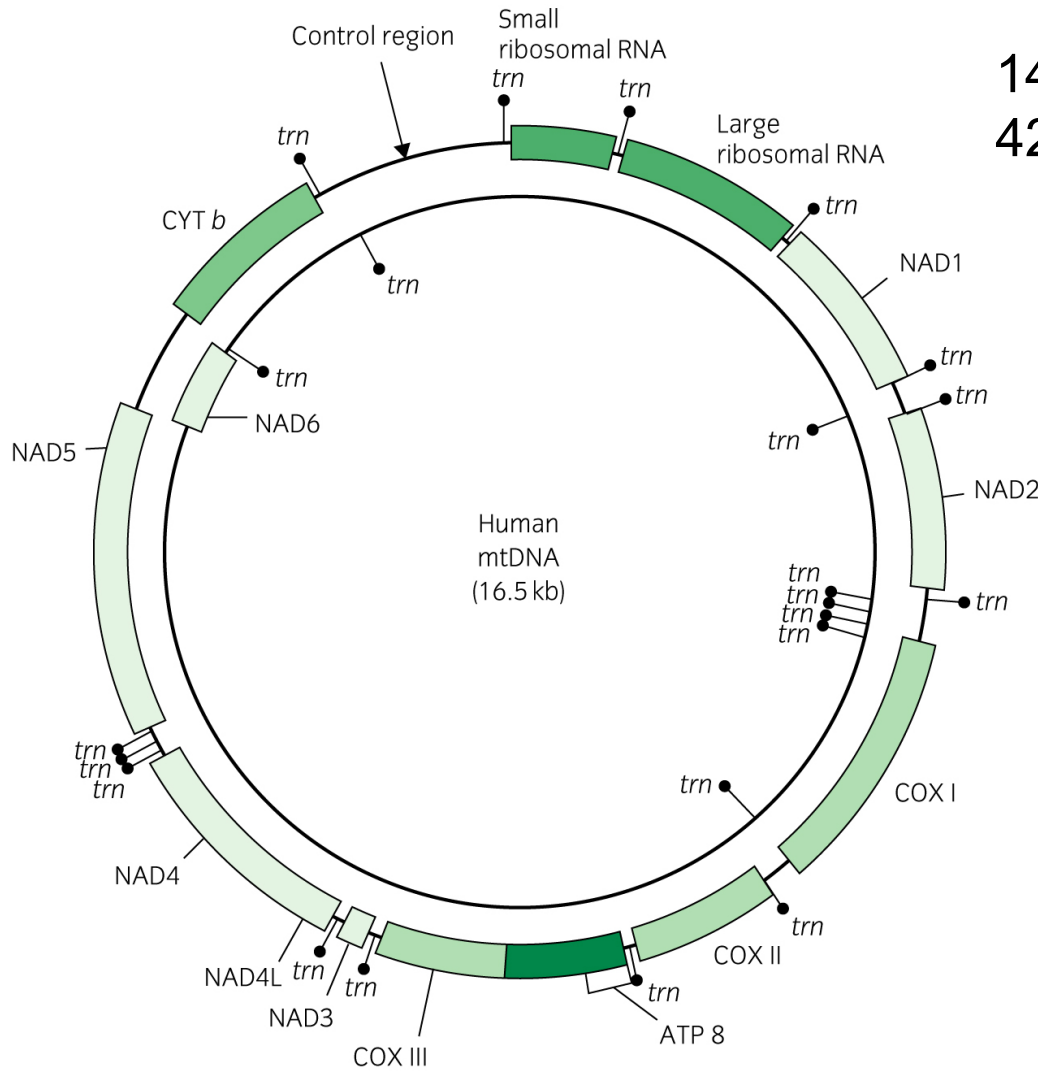


- geny pro ribozomální RNA – mnoho shluků u eukaryot
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster u prokaryot
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure, barcoding

2. Jaderné geny

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

3. Mitochondriální DNA



14 kbp (*Caenorhabditis*)

42 kbp (*Placopecten*)

- maternally inherited (?)
- no recombination (?)
- no heterozygotes (?)
- mnoho kopií v každé buňce
- « numts » nuclear copies of mtDNA
- vhodná pro fylogenetické a fylogeografické analýzy a DNA-barcoding

„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCATCTCTAGCTTC**GATTCAGGAA**

CGCATCTCTAGCTTT**GATTCAGGAA**

„Molekulárně-genetické“ metody

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

CG**CACA**TCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CG**CA**TCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

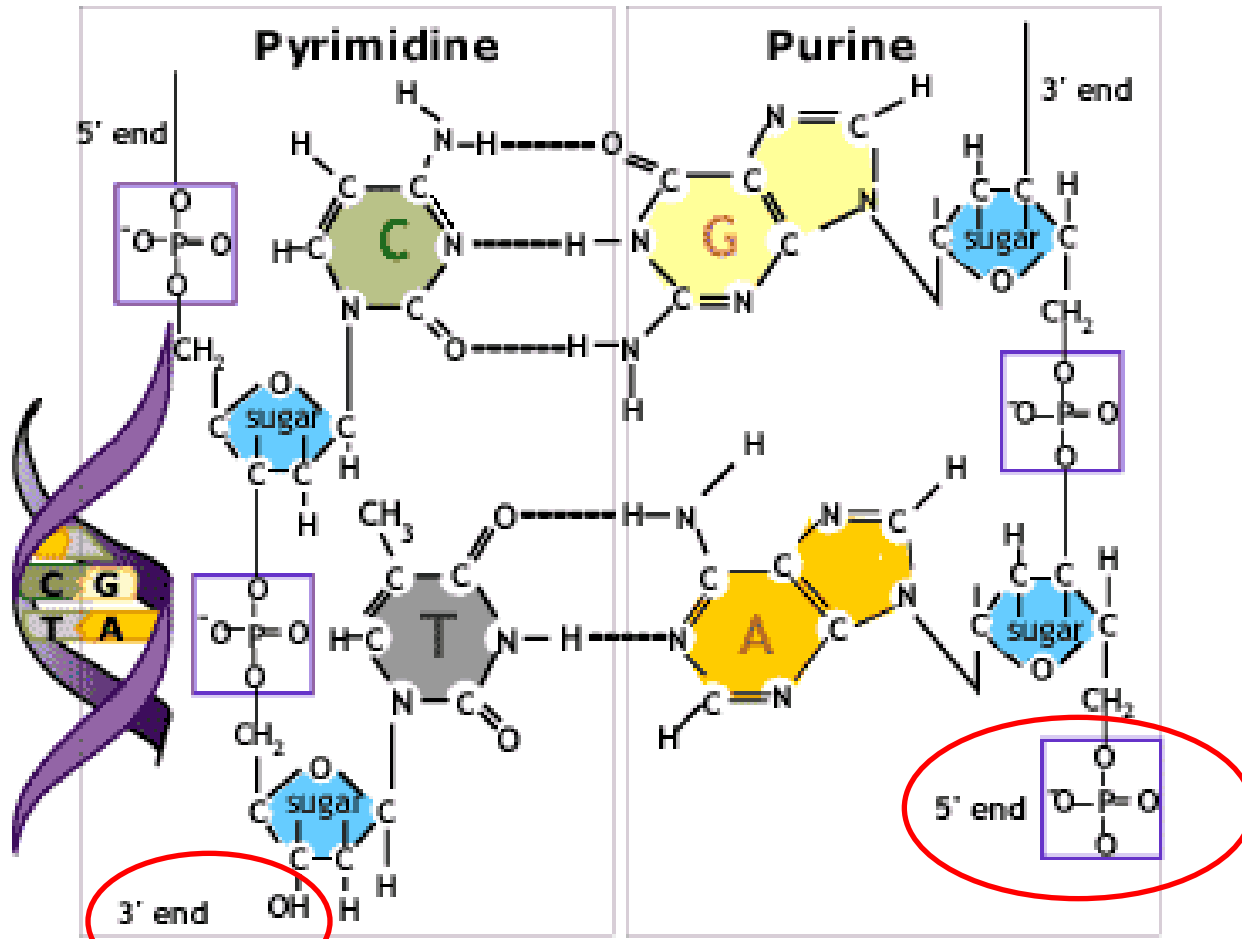
Vznik DNA polymorfismu

- 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)

Základní struktura molekuly DNA



3' - OH konec

(nutný k navázání dalšího nukleotidu při syntéze DNA)

5' - fosfátový konec

(ve vodném roztoku způsobuje záporný náboj)

Enzymy používané při molekulárně-genetických manipulacích

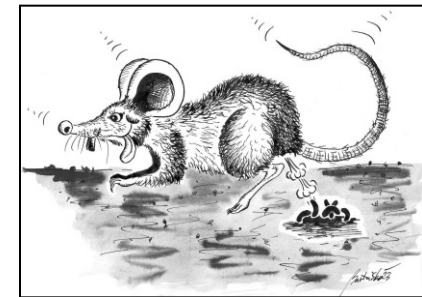
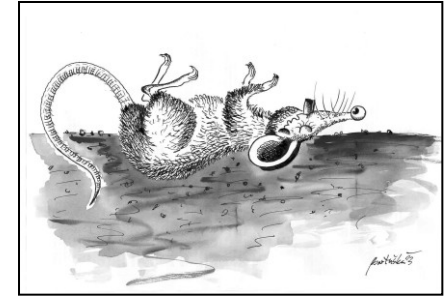
- DNA-polymeráza
- DNA-exonukleáza, DNA-endonukleáza
- DNA-ligáza
- DNA-transkriptáza
- RNA-reverzní transkriptáza

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

+

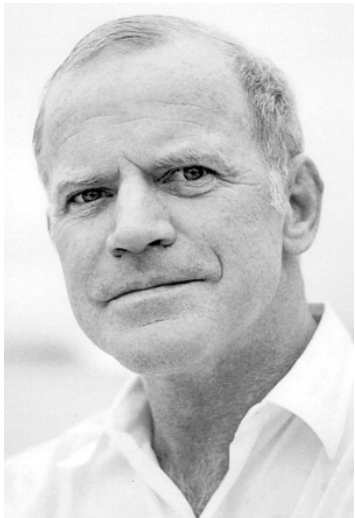
- čerstvá tkáň
- čistý EtOH
- rychlé vysušení
- speciální extrakční pufry
- zamražení

-

- 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)



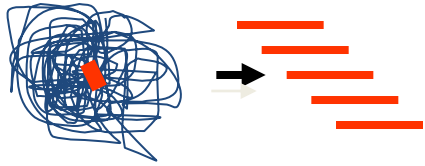
Kary Mullis (1983 – na dálnici ze San Francisca do Mendocina)

- odměna 10 000 USD
- patent pak prodán Roche za 300 000 000 USD)

1993 – Nobelova cena

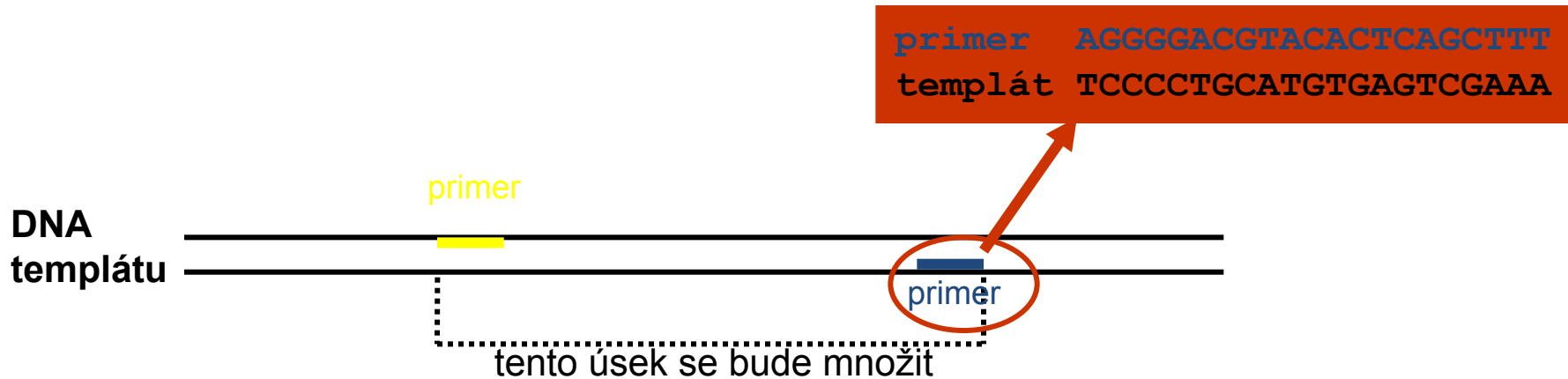
Amplifikace DNA – PCR

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.



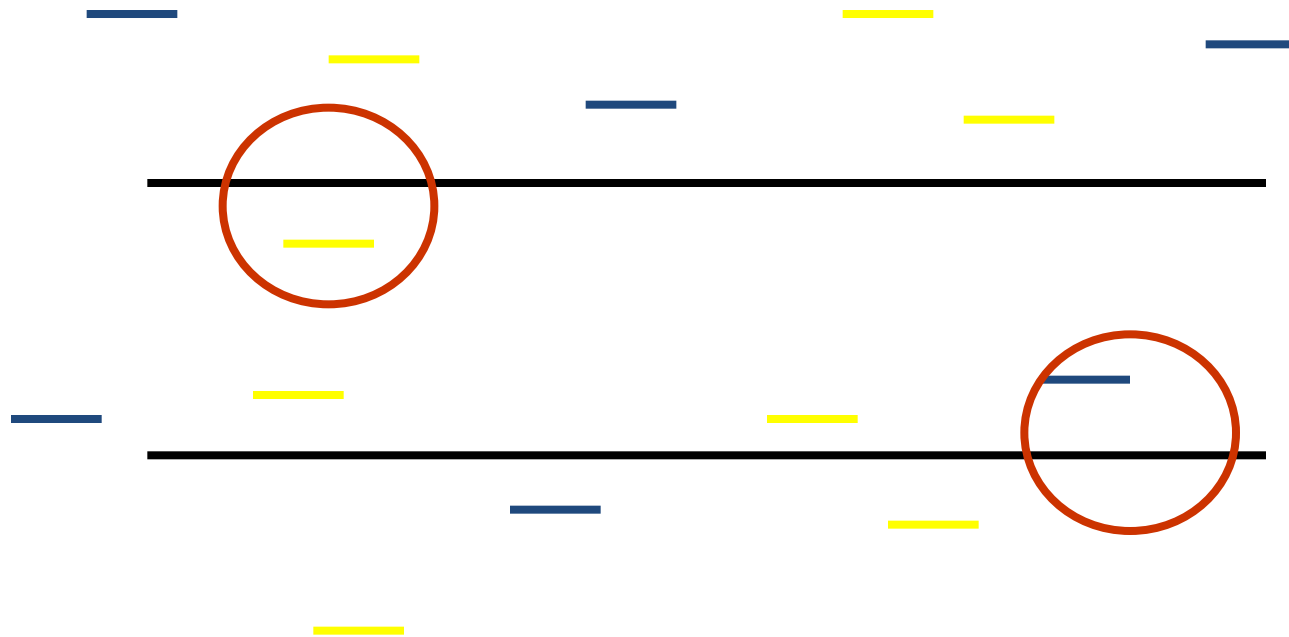
Denaturace (obvykle 95 C)

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



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



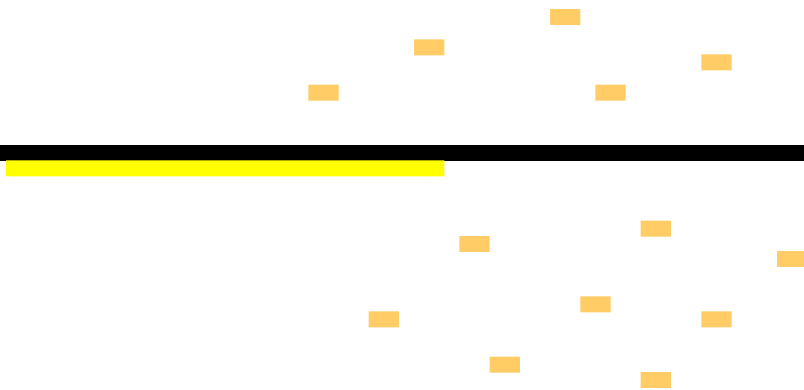
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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

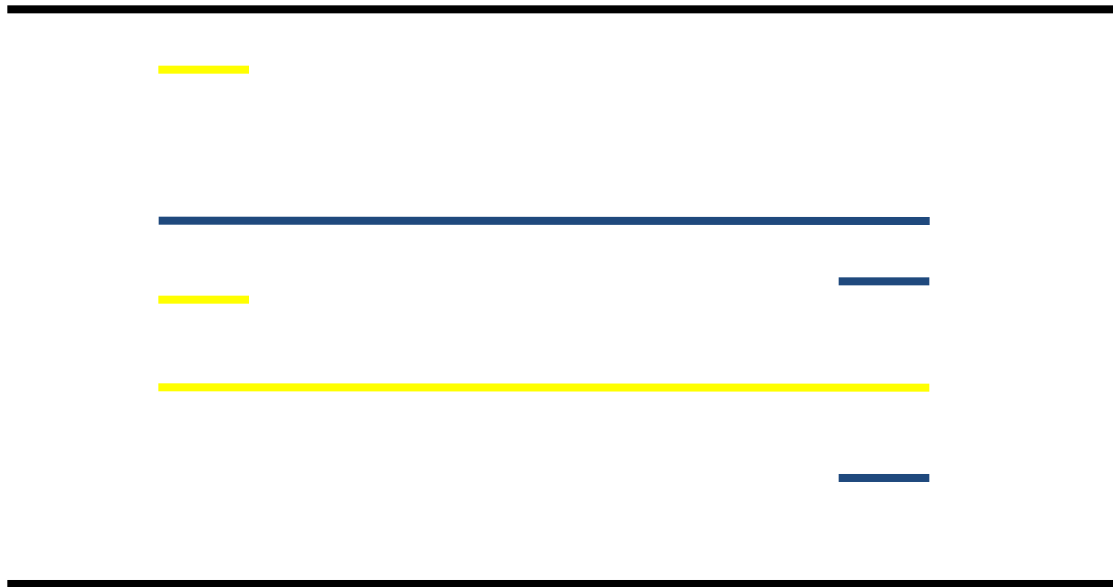
Primery jsou prodlužovány přidáváním nukleotidů
podle sekvence templátu (obvykle 72 C – optimum pro *Taq* polymerázu)



Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



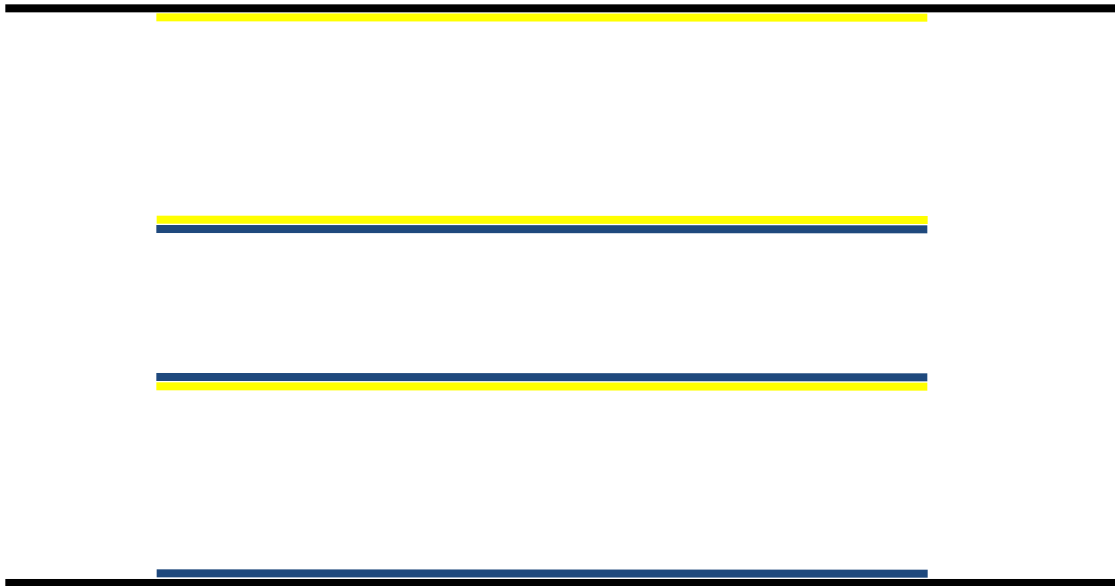
Po ochlazení primery přisednou na templát i nově vzniklé fragmenty („annealing“)



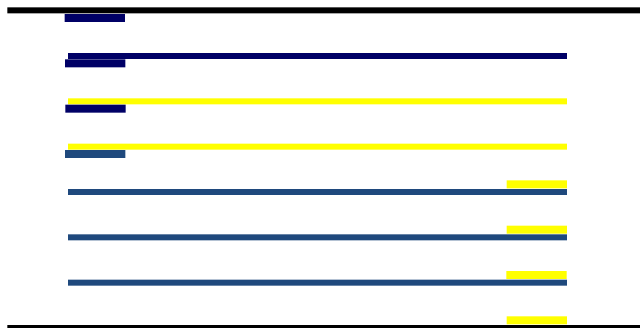
Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



Při dalším zahřátí...



Ochlazení – nasednutí primerů



72 C vznik nových fragmentů



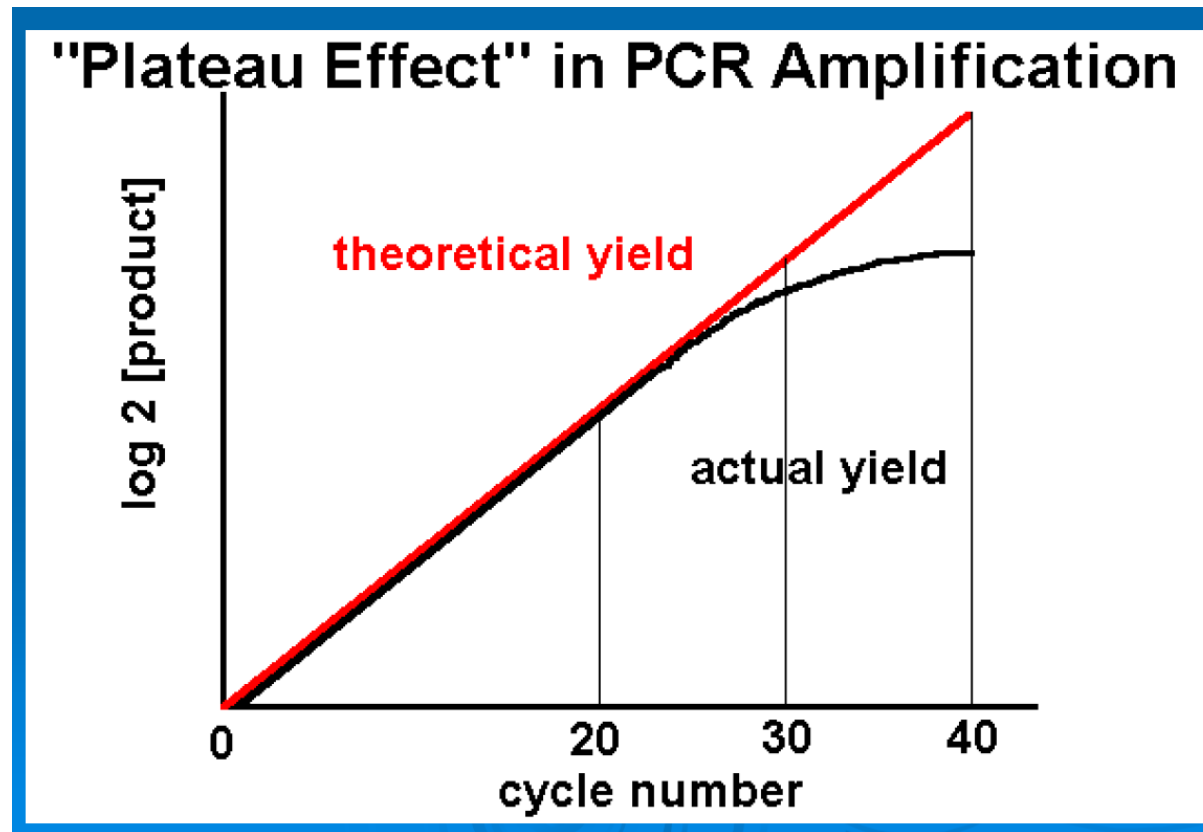
95 C denaturace



PCR - VIDEO

<https://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU>

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 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

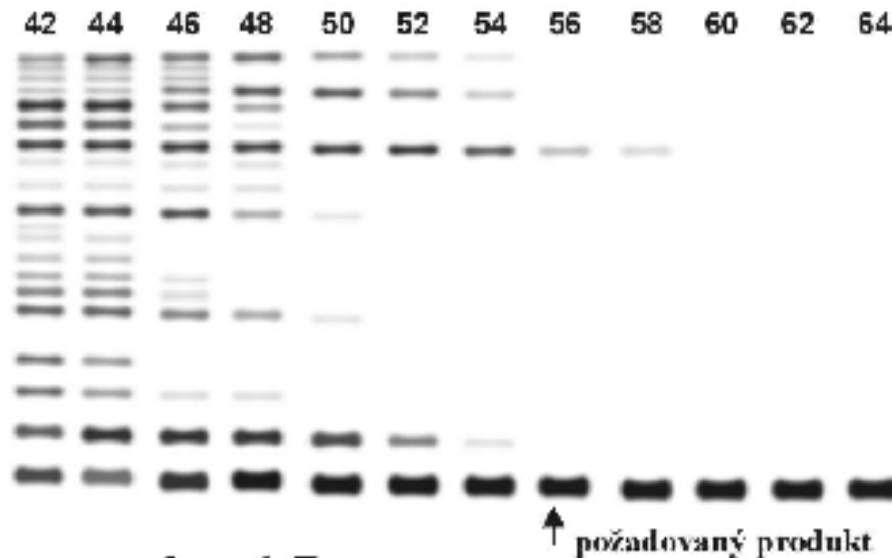
35x zpět

72 C 10 min



Co když PCR nefunguje?

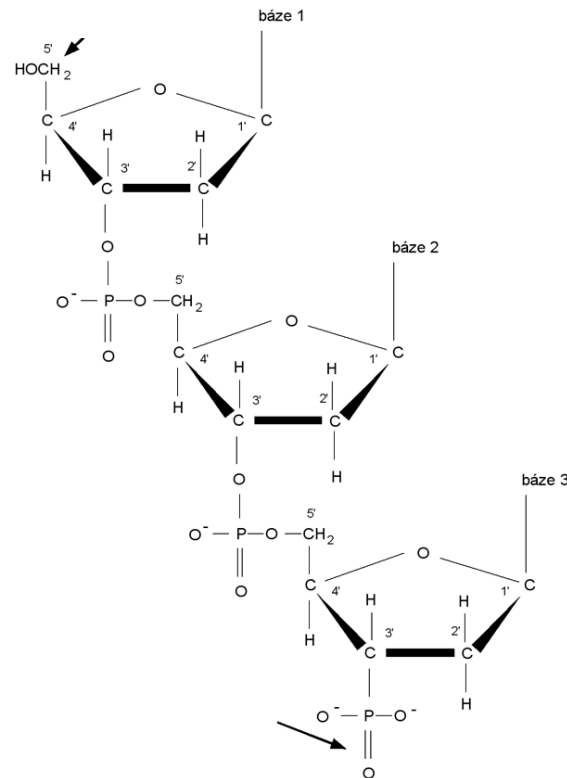
- Měníme teplotu „annealingu“ (nejlépe použijeme gradient teplot, pokud to náš cykler umí)
Vyšší teplota=vyšší specificita
- Měníme koncentraci Mg^{2+} iontů
- Navrhujeme nové primery



Studium variability nasyntetizovaného úseku

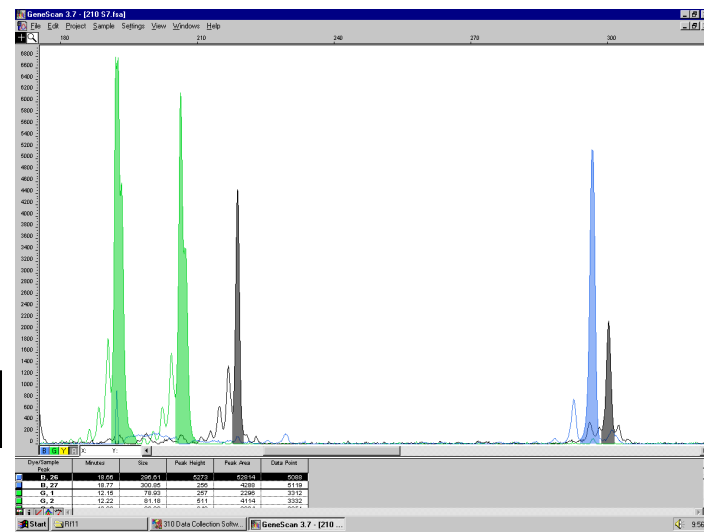
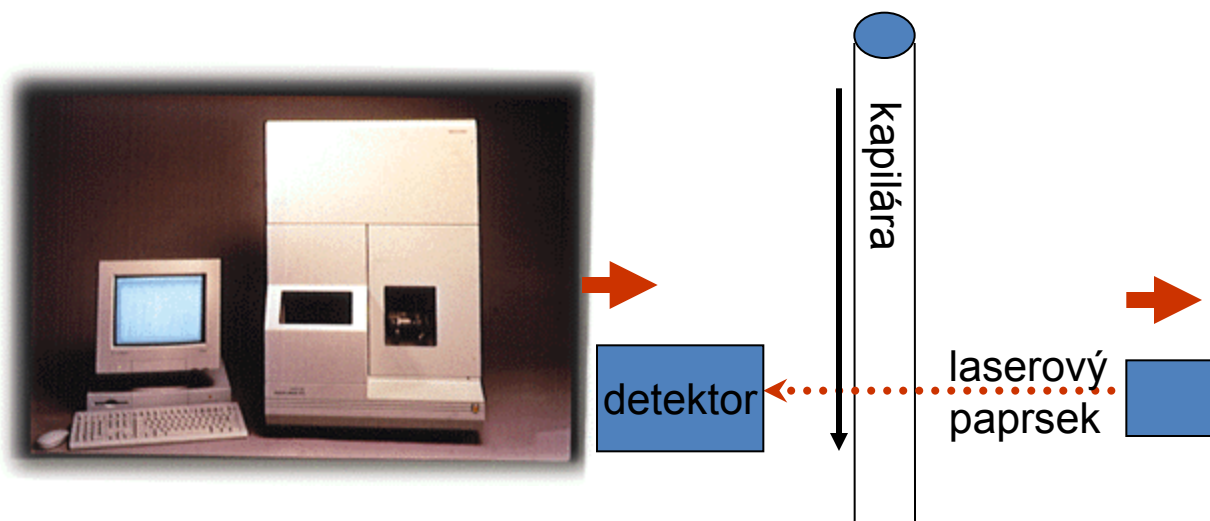
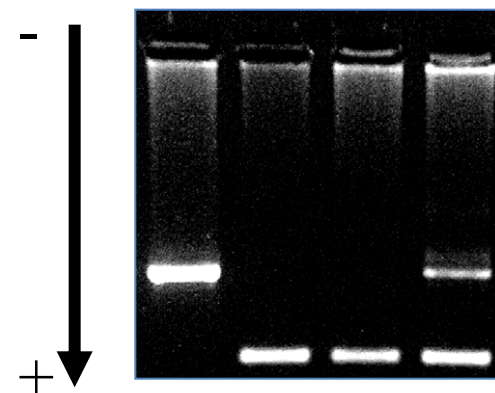
1) délkový polymorfismus

- elektroforéza DNA (DNA = záporný náboj)



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 (viz další přednášky)



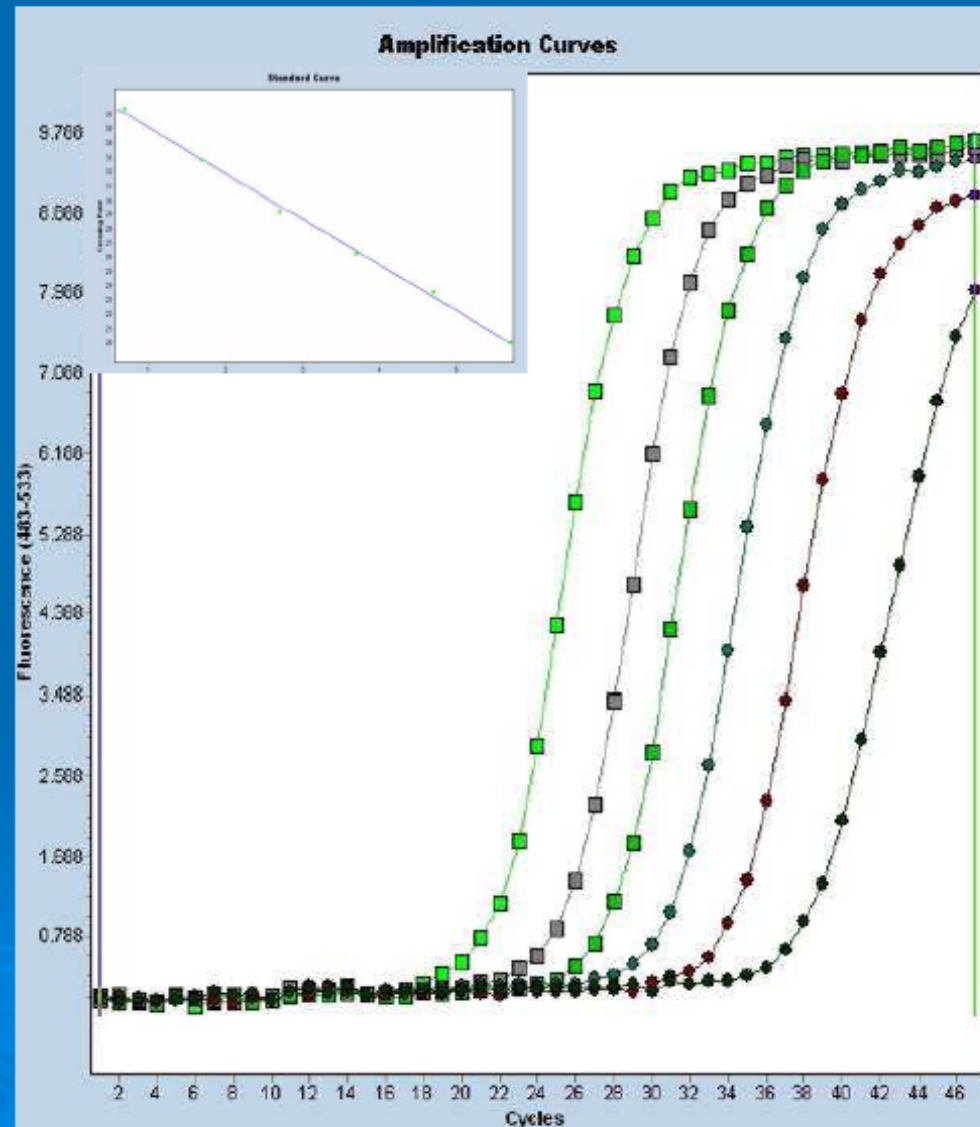
REAL TIME PCR
(= „kvantitativní PCR“)

Problém

- Kvantitativní rozdíly v expresi genů (tj. množství mRNA → reverzní transkripce → cDNA)
- Neinvazivní metody – nutnost stanovit, kdy je ještě ve vzorku dostatek specifické 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...

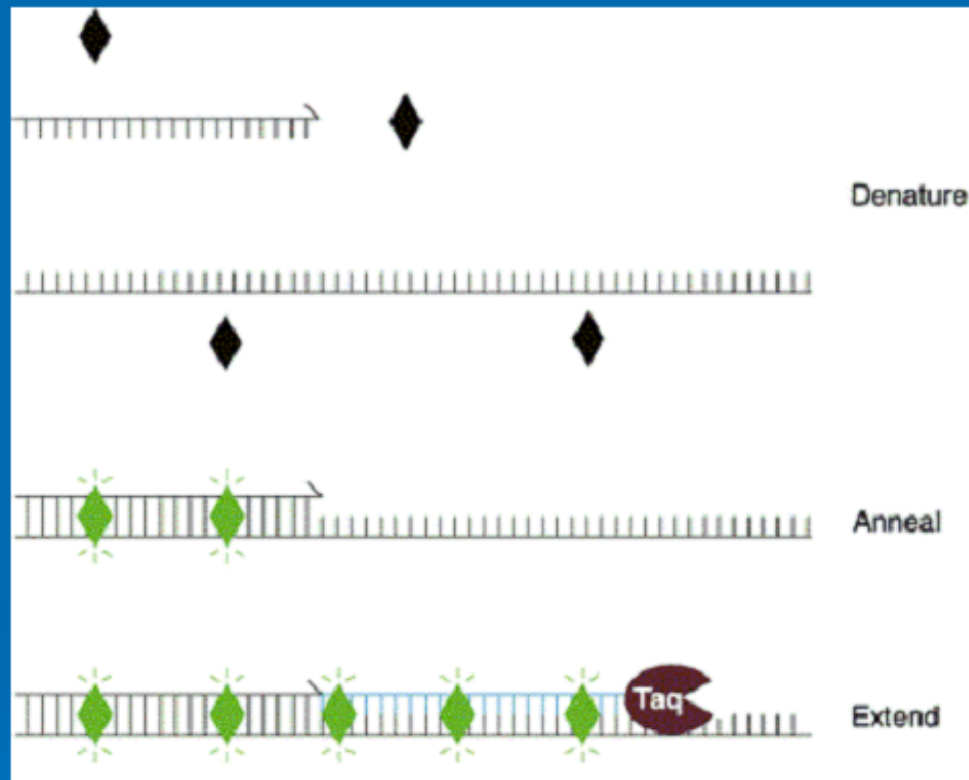
Specifická detekce

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

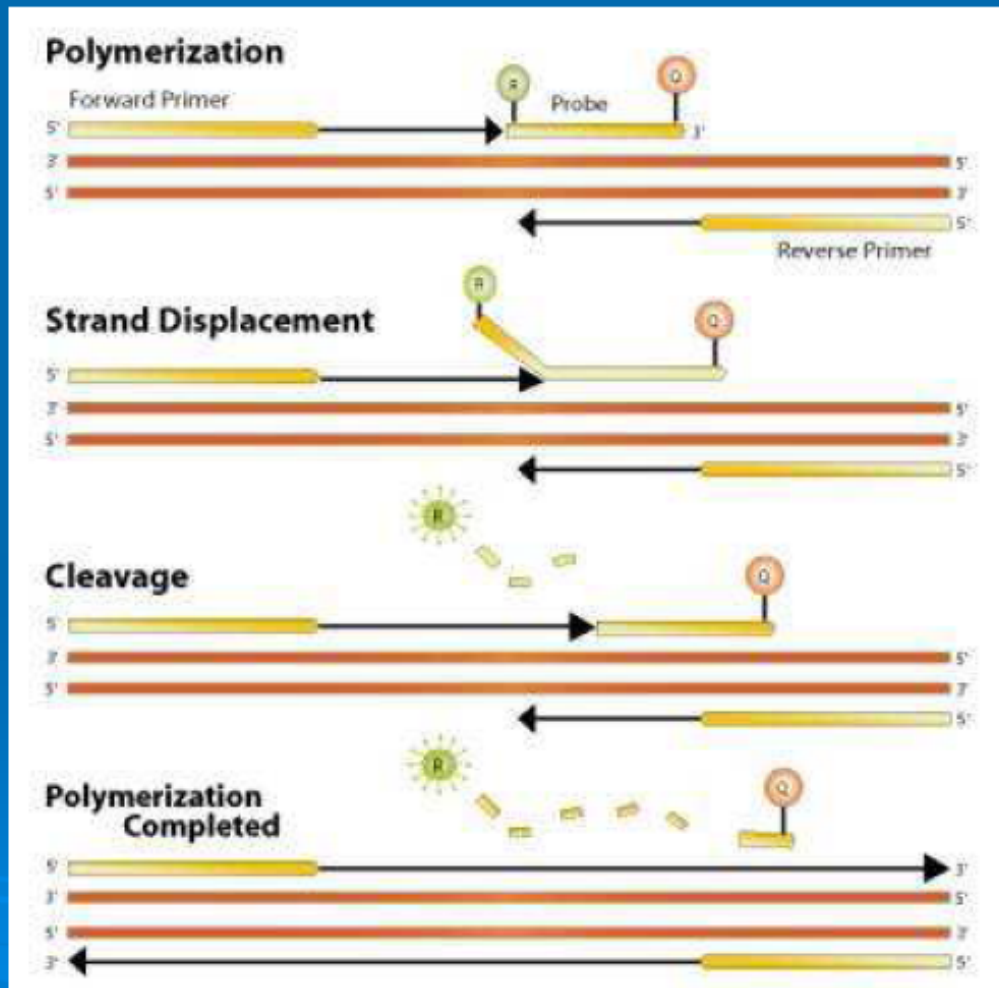
SYBR Green



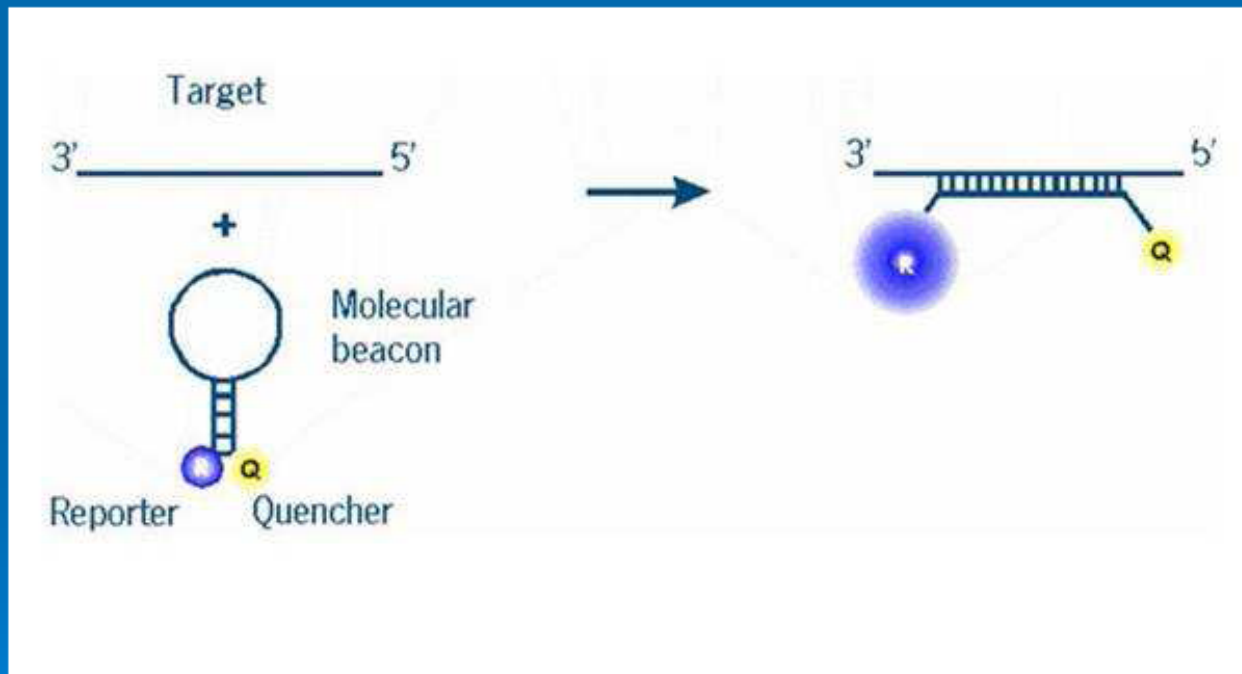
SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

TaqMan hydrolyzační sondy

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



Molecular beacon hybridizační sondy



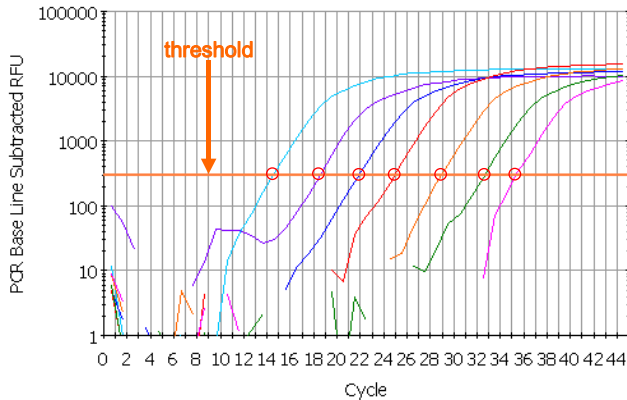
PCR a qPCR s hydrolyzační sondou - VIDEO

<https://www.youtube.com/watch?v=FIgGKkcLLuo>

Real-time PCR přístroje



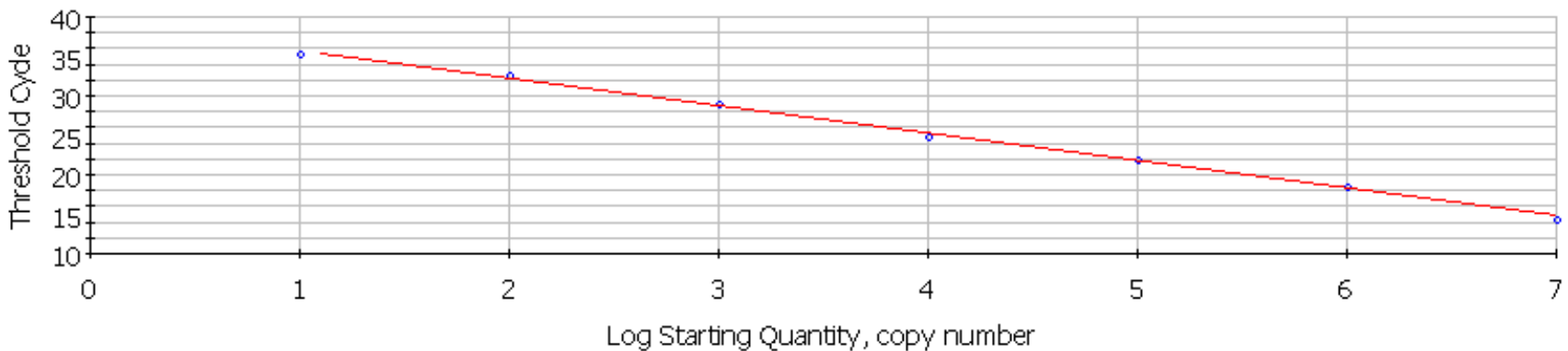
Absolutní kvantifikace



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

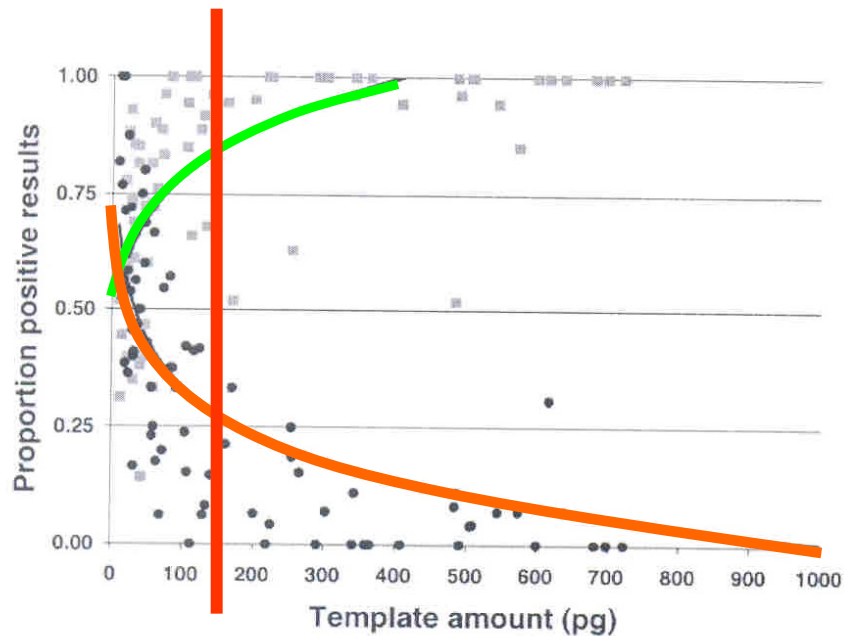
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns
○ Standards

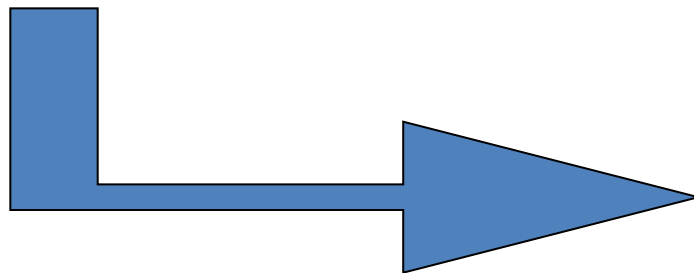


PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

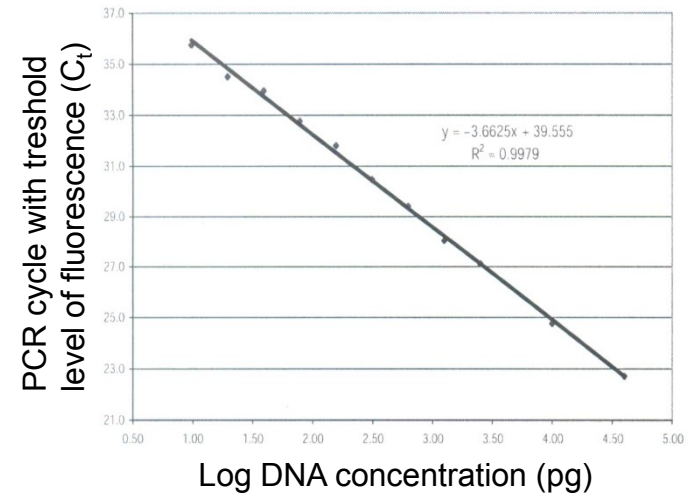
Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Positive PCR Allelic dropout



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků



Relativní kvantifikace - standardy

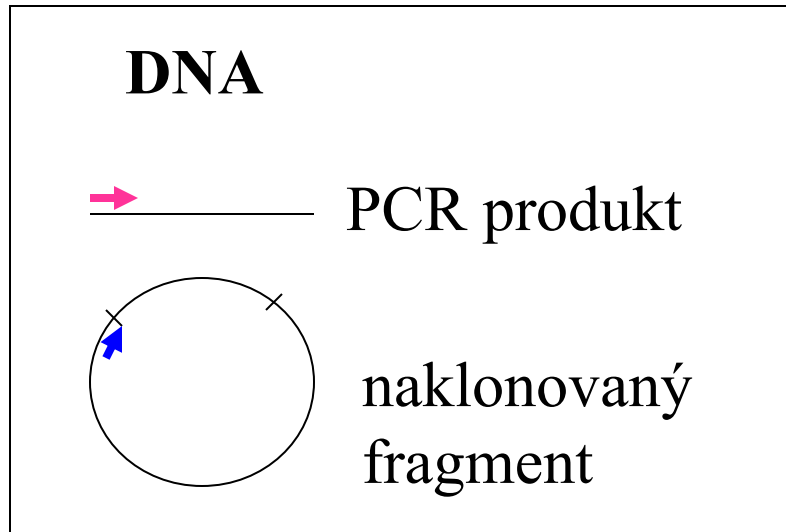
- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu

Sekvenování

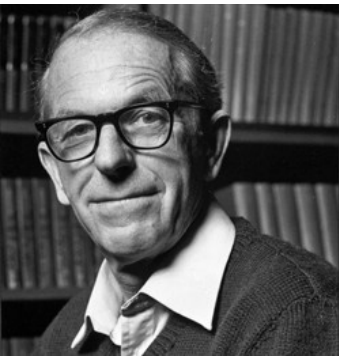
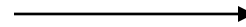
Sekvencování DNA

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

Sekvencování DNA



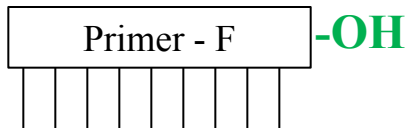
sekvenační reakce se značenými dideoxynukleotidy a jedním **specifickým** nebo **universálním** primerem – poskytují volný 3 -konec



**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

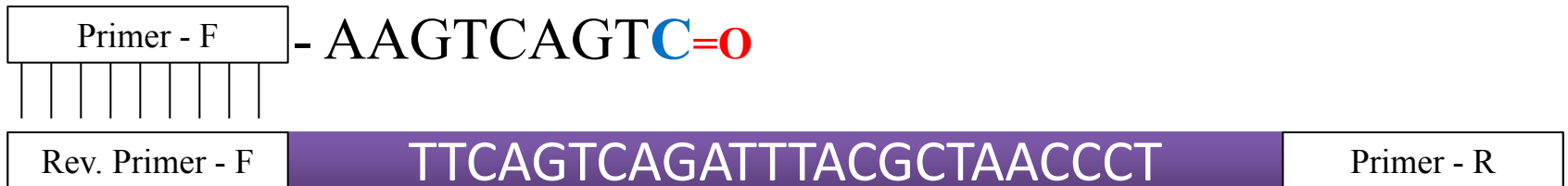
3. Polymerizace - 72°C

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

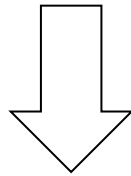
Výsledek sekvenační „PCR“

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

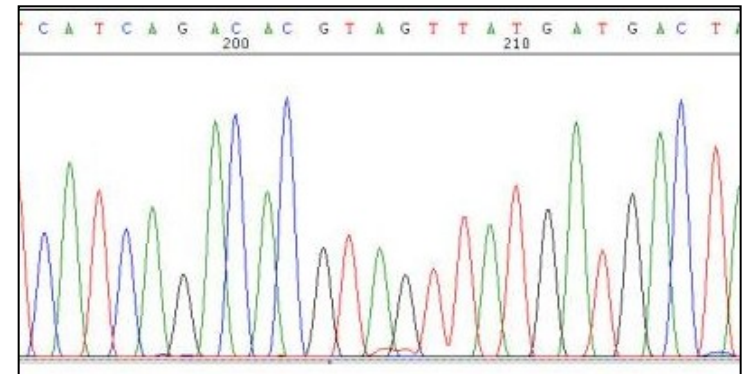
Primer - F - AAGTCAGT**C**=0

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

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

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

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



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

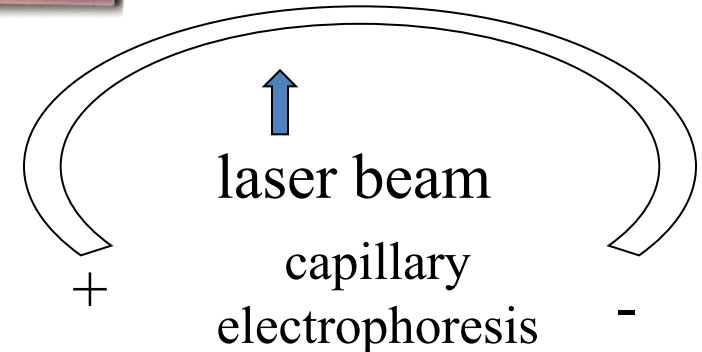
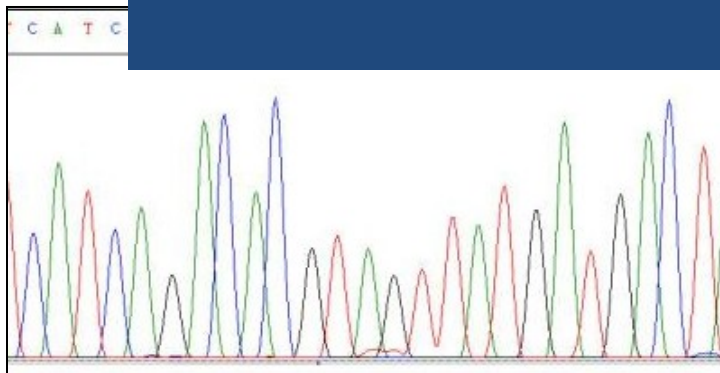
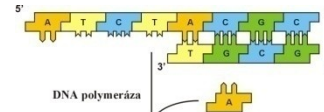
+

Primer - F	AAGT CAGTCTAA 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....