

CG020 Genomika Bi7201 Základy genomiky

Přednáška 4 Genetika přímá

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Přístupy „klasické“ genetiky versus „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU

2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ

3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

EMS



$h \times n$

„Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ
SPECIFICKÉHO MUTANTA

2. IDENTIFIKACE FENOTYPU

3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI
MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

T-DNA

(retro)transposons



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu

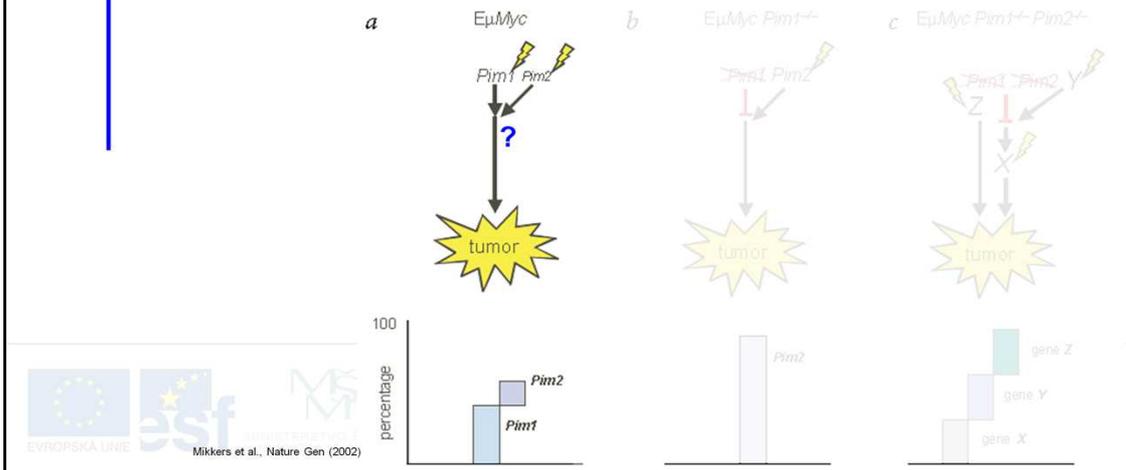


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

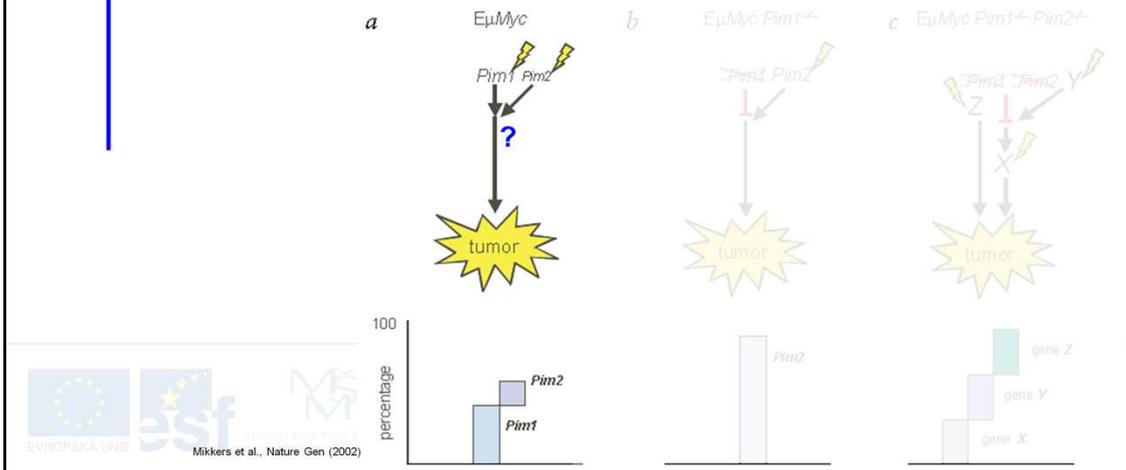
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce EμMyc myší retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které vznikly díky aktivaci Pim kináz (ve 40% aktivaci *Pim1* a v 15% aktivaci *Pim2*), molekulární cíle těchto kináz byly neznámé



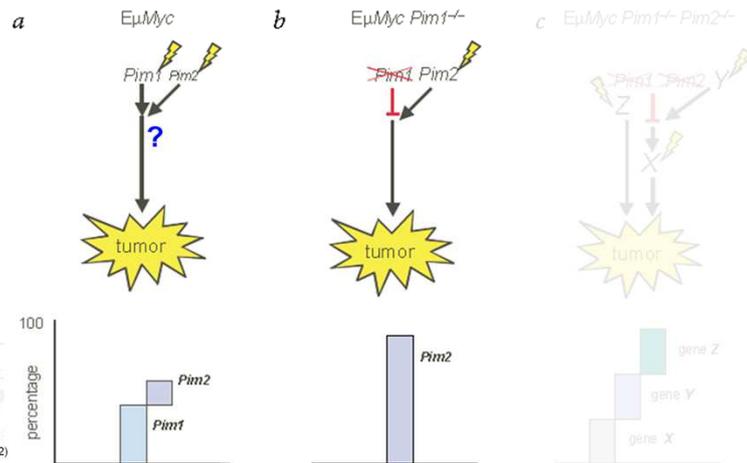
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce $E\mu$ Myc *pim1* mutantů retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které obsahují v 90% inzerci v blízkosti (aktivaci) *Pim2*



Inzerční mutagenese v přímé genetice

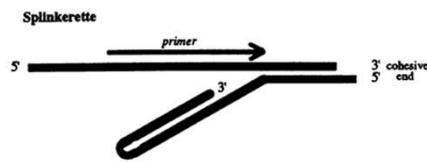
- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze signálních partnerů Pim proteinů (Y), některého z proteinů Pim signální dráhy (X) nebo k aktivaci některé z příbuzných drah vedoucích k lymfomagenezi (Z)



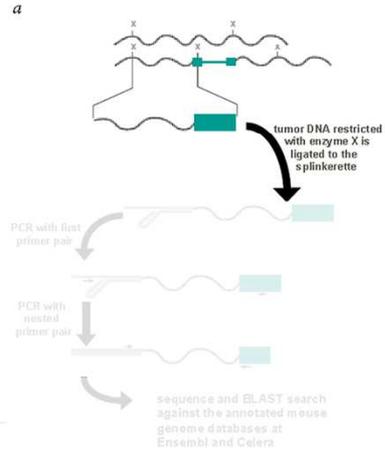
EVROPSKÁ UNIE
 esf
 Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přilehajících k místu inzerce proviru
 - Štěpení genomové DNA a ligace speciálních linkerů, tzv. *splinkerett* (zvýšení specificity amplifikace)



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



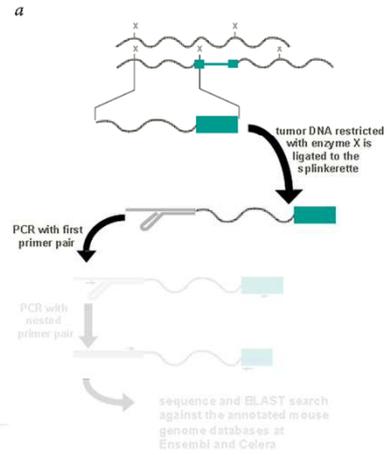
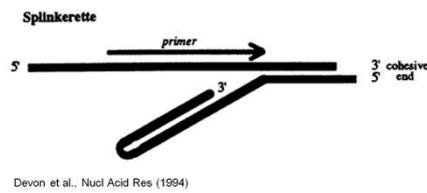
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
 - První amplifikace pomocí specifických primerů



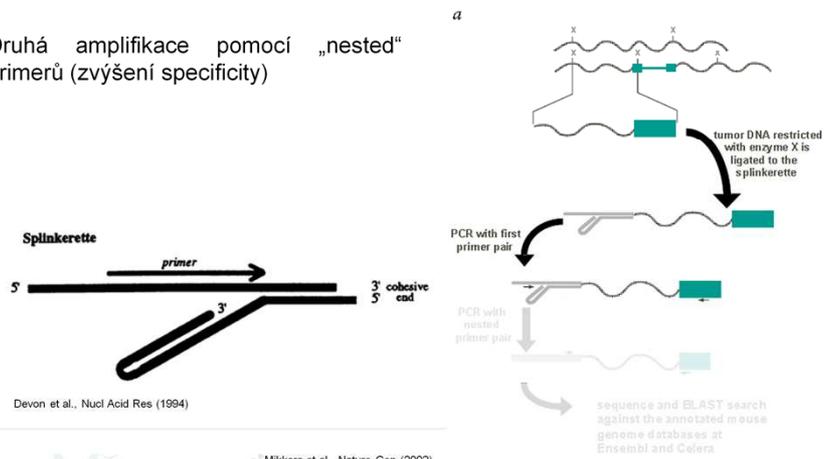
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
 - Druhá amplifikace pomocí „nested“ primerů (zvýšení specifity)



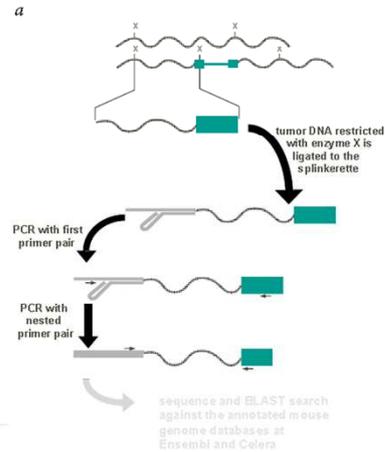
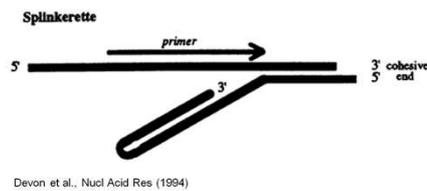
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
 - Sekvence a lokalizace oblastí přiléhajících k protoviru vyhledáváním v anotovaných databázích myšního genomu



VANI

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

In case of splinkerette, the primer is of the same sequence as the top strand and therefore it is unable to act as a primer until the complement of this strand has been synthesized (from the insert-specific primer at the right-hand side).

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - **metabolického profilu**

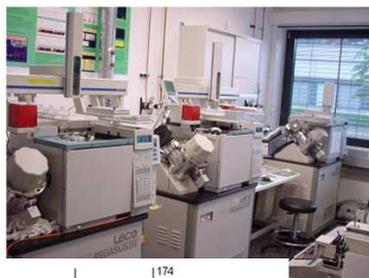


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

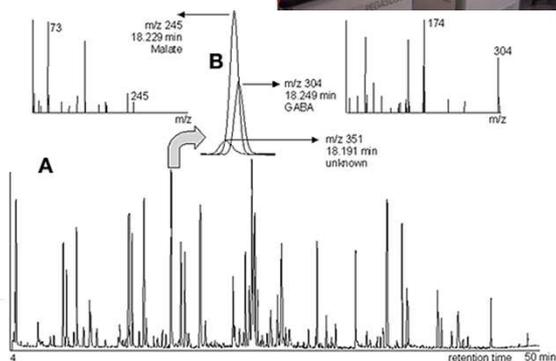
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
 - hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů



Retention Time (min)	m/z	Abundance	Reference
18.229	245	High	Malate
18.249	304	High	GABA
18.191	351	High	unknown



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



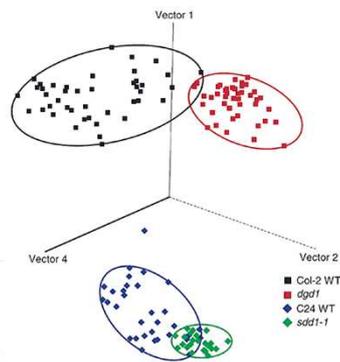
OJJE VZDĚLÁVÁNÍ

to je spolufinancováno Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Metabolické profilování

Metabolické profilování rostlin

- hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů
- identifikace (např. i komerčně) zajímavých mutantů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Metabolické profilování

Metabolické profilování rostlin

- hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů
- identifikace (např. i komerčně) zajímavých mutantů
- snadná a rychlá izolace genů pomocí identifikace T-DNA zasažených sekvencí

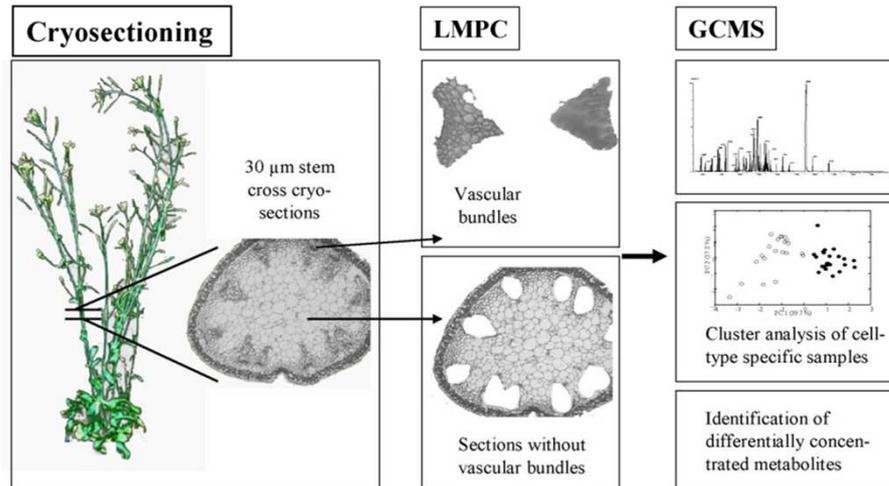


ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
i státním rozpočtem České republiky

Metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
 - možnost využít i speciální techniky, např. mikrodisekce



VANI
evropská
unie
quality

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů

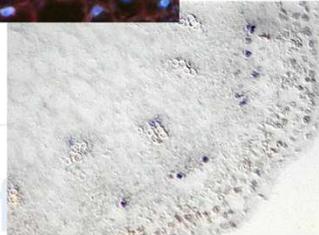
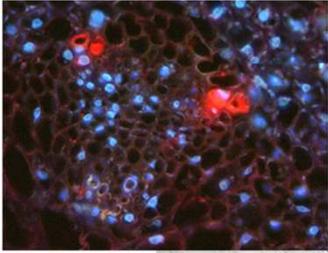


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Expresní profil

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
 - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese



© státním rozpočtem České republiky

Expresní profil

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
 - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese
 - možnost částečné automatizace (virtuální digitální mikroskopie)



EVROPSKÁ UNIE EVROPSKÉ STRUKTURNÍ NÁSTROJE pro konkurenceschopnost a růst zaměstnanosti



INVESTICE DO ROZVOJE V



Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Expresní profil



Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutovaného lokusu

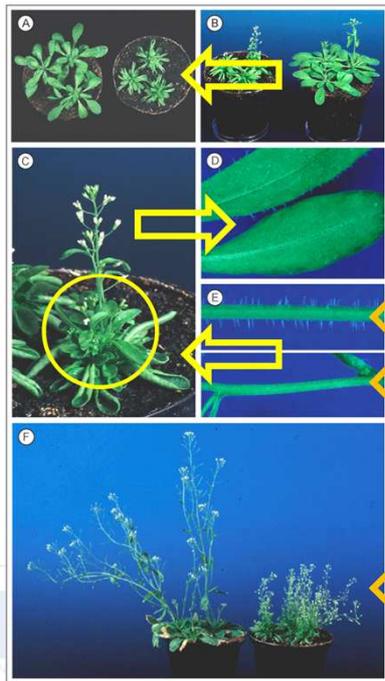
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutanta



- zvlňné listy
- keřčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí



EVROPSKÁ UNIE

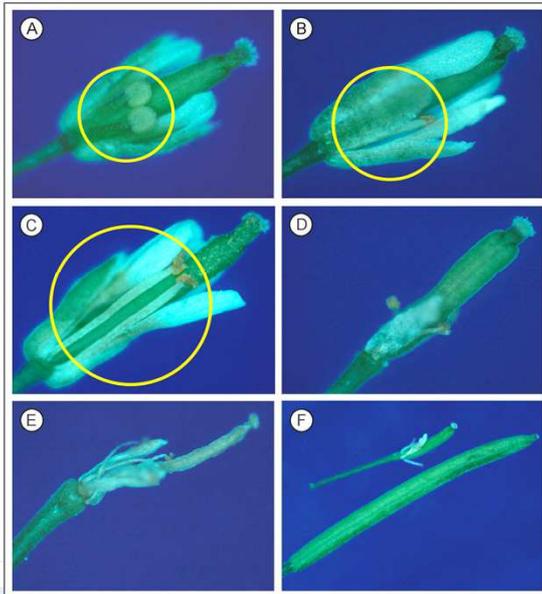


UNIVERZITA PAVLA DOBROŠE
BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutanta



- samčí sterilita, poruchy v prodlužování tyčinek (A,B) (porovnej se standardním typem C)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutovaného lokusu

- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti

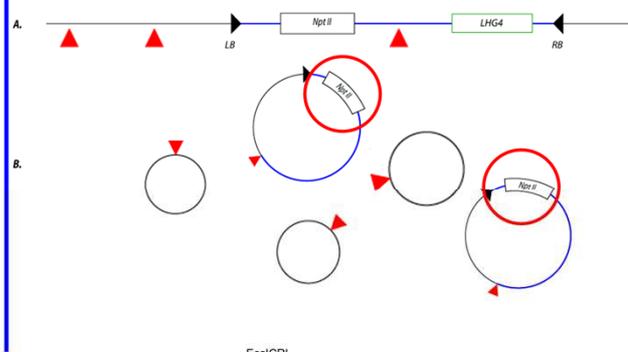


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

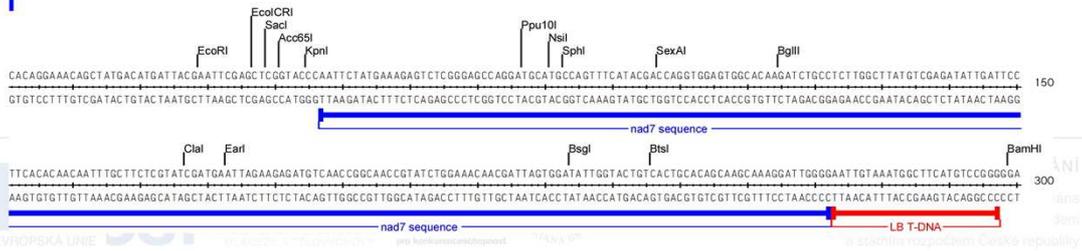
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutovaného lokusu

1. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k *levé hranici* pomocí *plasmid rescue*

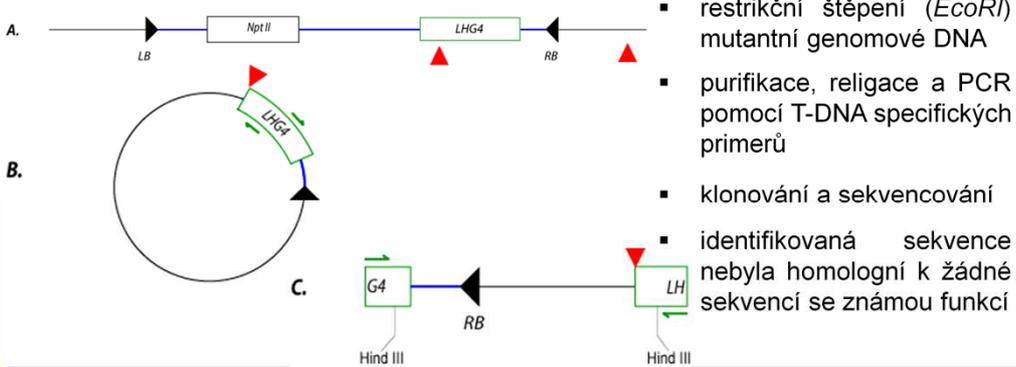


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E. coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

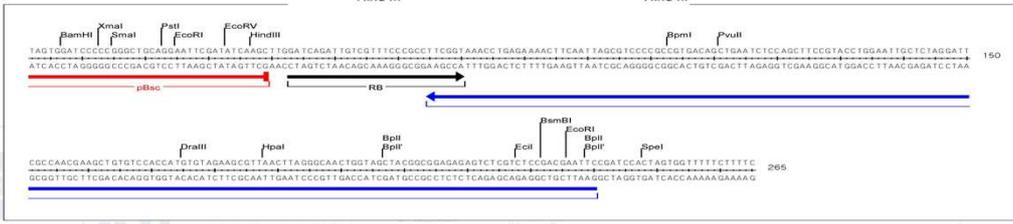


Identifikace mutovaného lokusu

2. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k pravé hranici pomocí inverzní PCR (iPCR)



- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- purifikace, religace a PCR pomocí T-DNA specifických primerů
- klonování a sekvencování
- identifikovaná sekvence nebyla homologní k žádné sekvenci se známou funkcí



Identifikace mutovaného lokusu

- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti
 - lokalizace T-DNA inzerce v genomu *Arabidopsis*

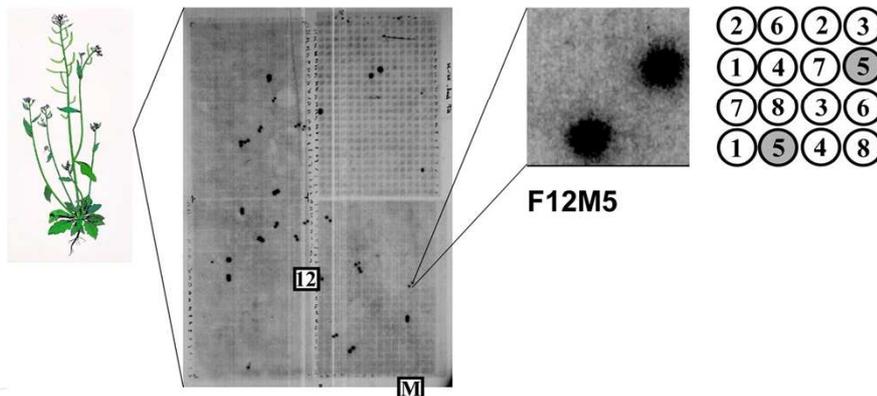


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

- genomová knihovna obsahující 10,752 klonů s průměrnou velikostí inzertu 100 kb
- bakteriální klony uspořádané v mikrotitračních deskách
- knihovna nanesena na nylonové filtry pro hybridizaci s radioaktivně značenou sondou



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Mapování pomocí IGF-BAC databáze

I. Sekvence přiléhající k levé hranici T-DNA

- celkem 28 pozitivně hybridizujících klonů
- 19 z nich lokalizováno na chromozomu 2
- 18 s podobností k mtDNA

II. Sekvence přiléhající k pravé hranici T-DNA

- celkem 6 pozitivně hybridizujících klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2

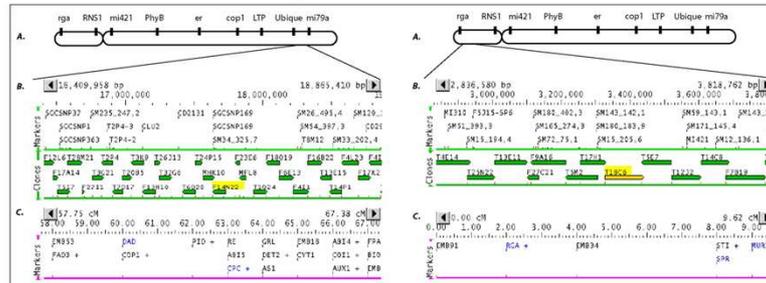


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

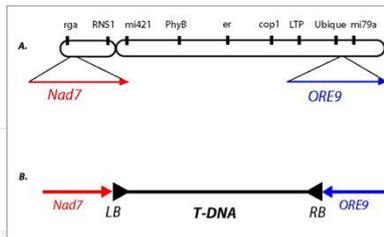
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Lokalizace genomové T-DNA přiléhající k levé i pravé hranici T-DNA na chromozomu 2

Sekvence přiléhající k *pravé* a *levé* hranici T-DNA



- pravděpodobně došlo k inverzi téměř celého chromozómu 2



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutovaného lokusu

▪ Poziční klonování

- podstatou je kosegregační analýza segregující populace (většinou potomstva informativního zpětného křížení) s molekulárními markery
- **SSLP** (Simple Sequence Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky genu (PCR produktů) amplifikovaného pomocí specifických primerů
- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky restričních fragmentů úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligací adaptorů)
- **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
 - polymorfismus délky restričních fragmentů úseků genu amplifikovaných pomocí PCR
- **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
 - polymorfismus délky náhodně (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) amplifikovaných úseků genu

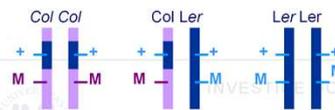
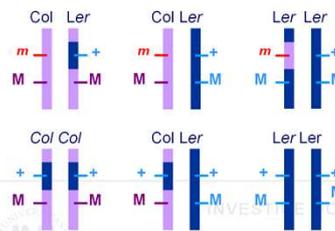
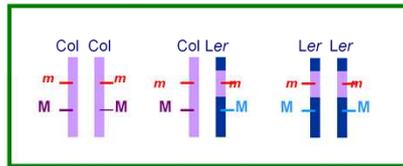
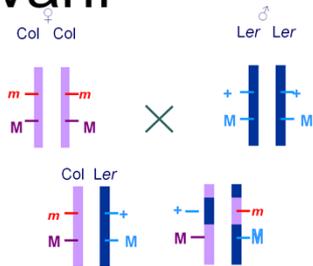


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Poziční klonování

Příprava mapovací populace



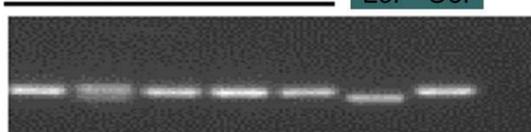
OP Vzdělávání pro konkurenceschopost

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

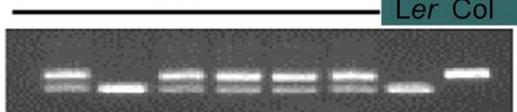
$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col I}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

F2 mutanti



marker I – ve vazbě
5 mutantů
 $1/10 \times 100 = 10\%$

F2 mutanti



marker II - žádná vazba
6 mutantů
 $7/12 \times 100 = 58\%$

- Analýza cca 2000 mutantních linií
- Určení nejbližšího (ještě) segregujícího markeru
- Identifikace mutace pomocí sekvenování



EVROPSKÁ UNIE
esf

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
MŠMT

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

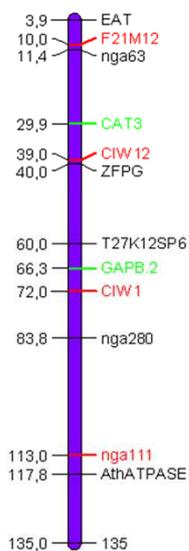


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

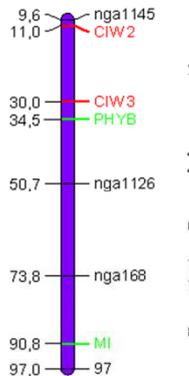
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Mapa DNA molekulárních markerů

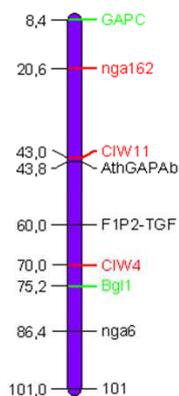
1CH



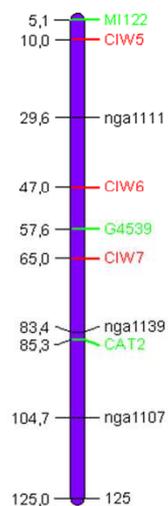
2CH



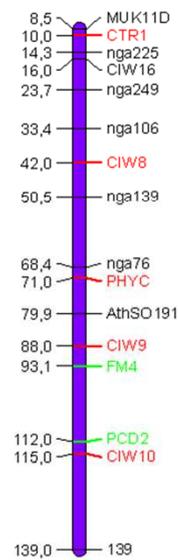
3CH



4CH



5CH



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ
VÝVOJE VENKOVSKÉHO
PROSTŘEDÍ A TĚŽBY PŘÍRODNÍCH
BOJHOVÝCH BOJHOVÝCH

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



EVROPSKÝ FOND PRO ROZVOJ VENKOVSKÉHO
PROSTŘEDÍ A TĚŽBY PŘÍRODNÍCH BOJHOVÝCH BOJHOVÝCH
a státním rozpočtem České republiky

Markery pro jemné mapování

- AGI Map
- Lister & Dean RI
- Classical
- mi-RFLP
- Goodman
- GoodmanBAC
- TIGR
- Finkelstein
- Altmann

Maps for Chromosome 2

for all Maps: [Search Options](#)

Selected Maps



[MapViewer Home](#)
[Release Note](#)
[View Print-Version](#)

AGI Map

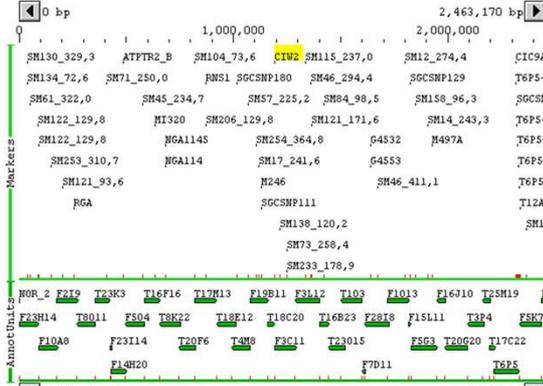
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

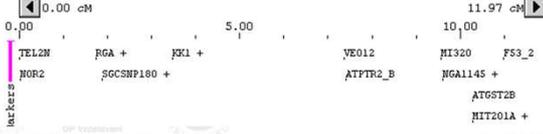
[AGI Map color key](#)



Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



IE VZDĚLÁVÁNÍ
 je spolufinancována
 evropským sociálním fondem
 a státním rozpočtem České republiky

Shrnutí

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky