

# 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](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://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 genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu

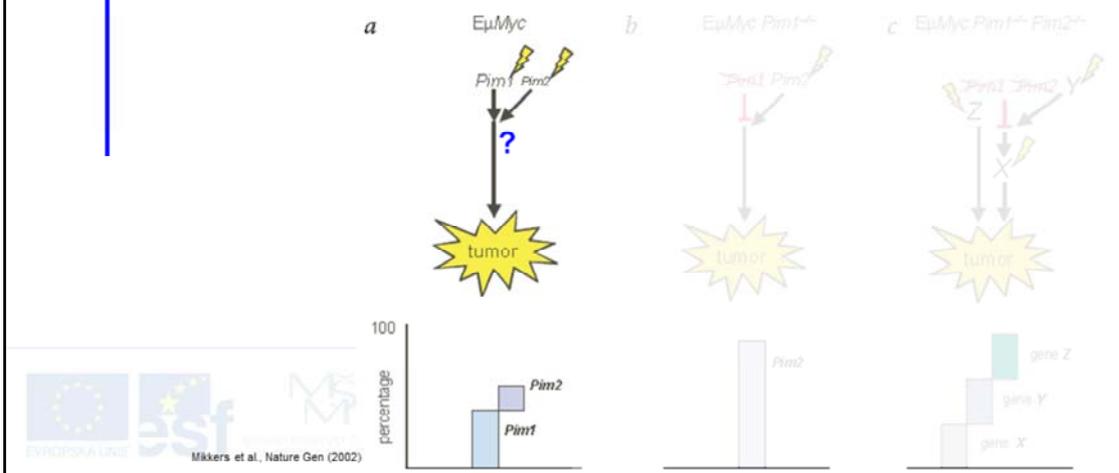


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

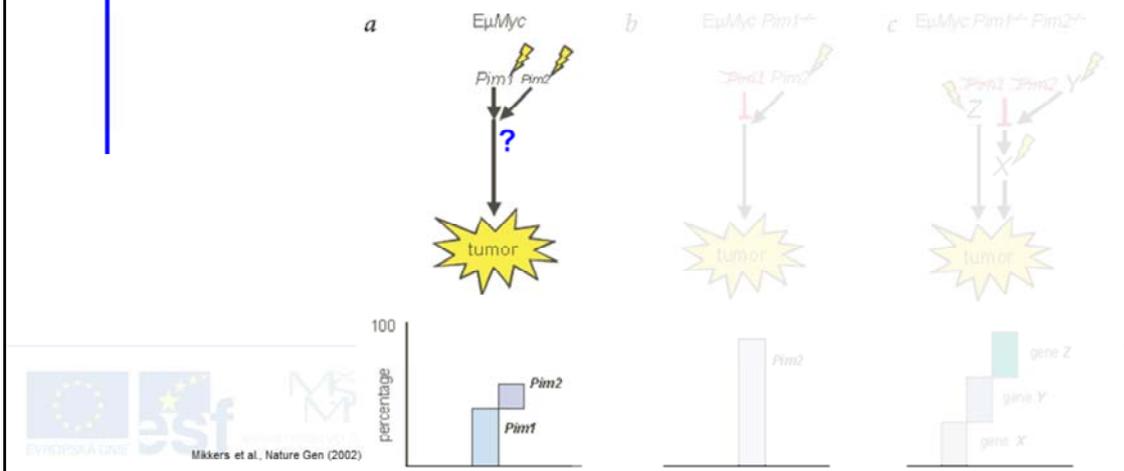
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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



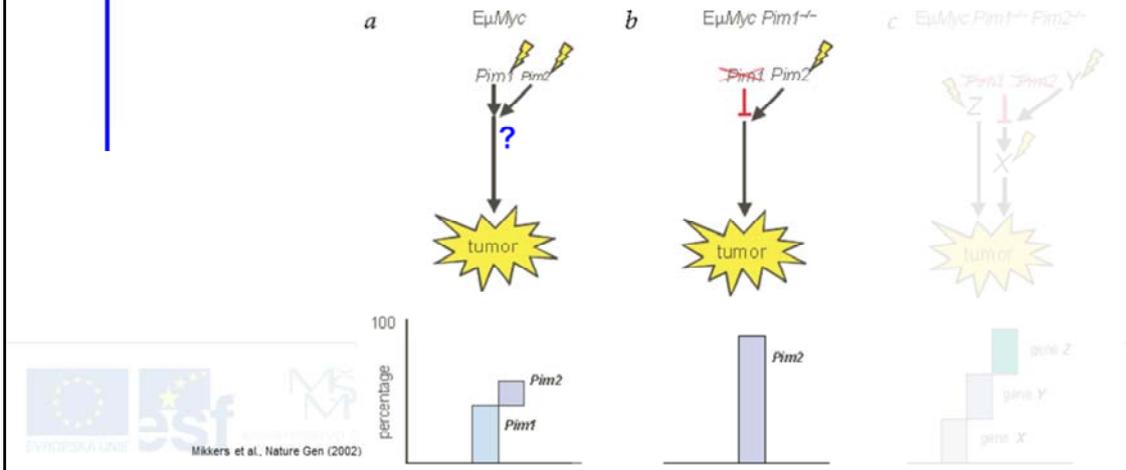
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



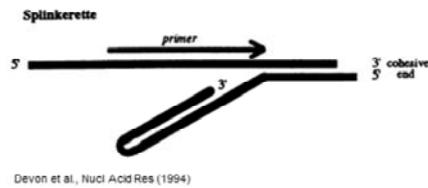
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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)

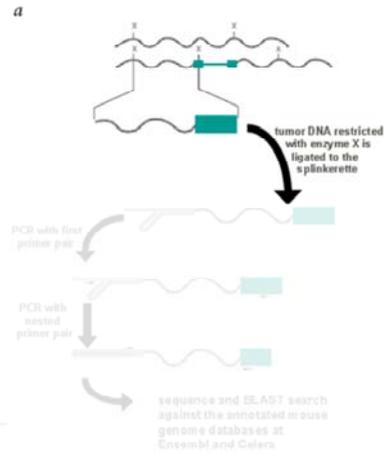


# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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)



a

tumor DNA restricted with enzyme X is ligated to the splinkerette

PCR with first primer pair

PCR with nested primer pair

sequence and BLAST search against the annotated mouse genome databases at Ensembl and Celera



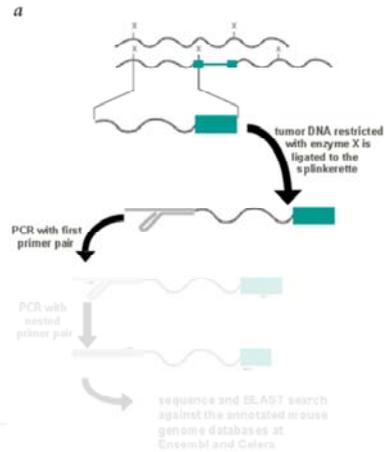
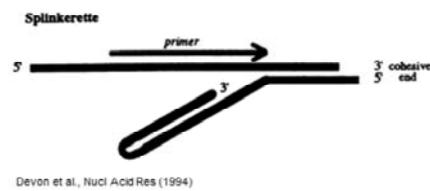
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je realizací projektu  
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



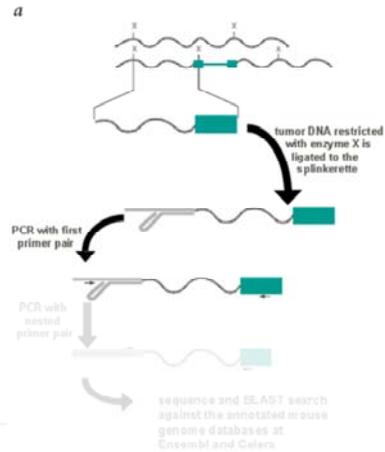
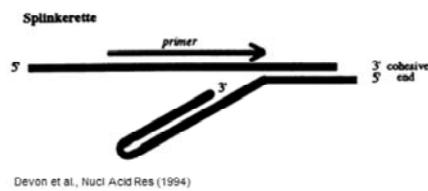
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

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

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



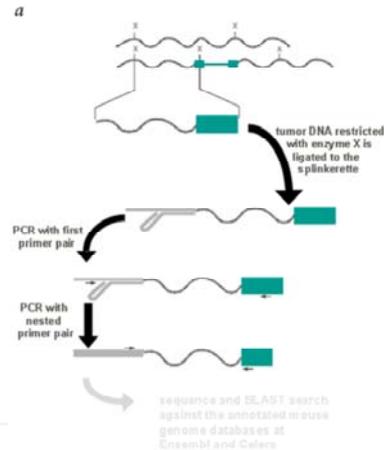
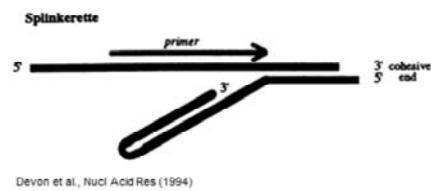
Mkkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je realizována za podpory Evropské sociální fondy 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



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**

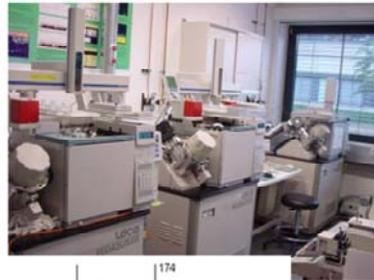


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

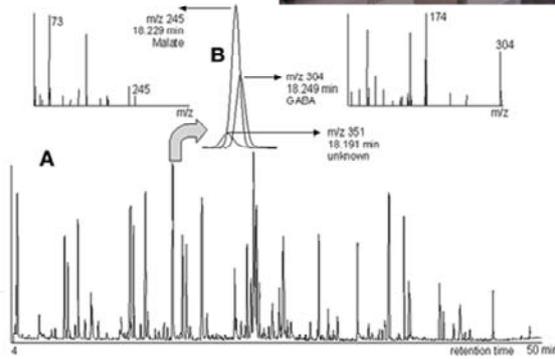
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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
4.123	73	100
4.123	245	100
18.229	345	100
18.229	304	100
18.249	304	100
18.249	174	100
18.191	351	100



EVROPSKA UNIE

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND  
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND  
MLÁDEŽ A TĚLOVÝCHOVA

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



ČESKÁ REPUBLIKA

OJĚ VZDĚLÁVÁNÍ

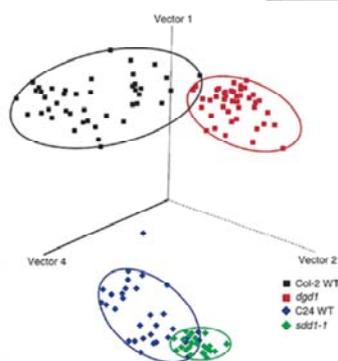
Operační program vzdělávání

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

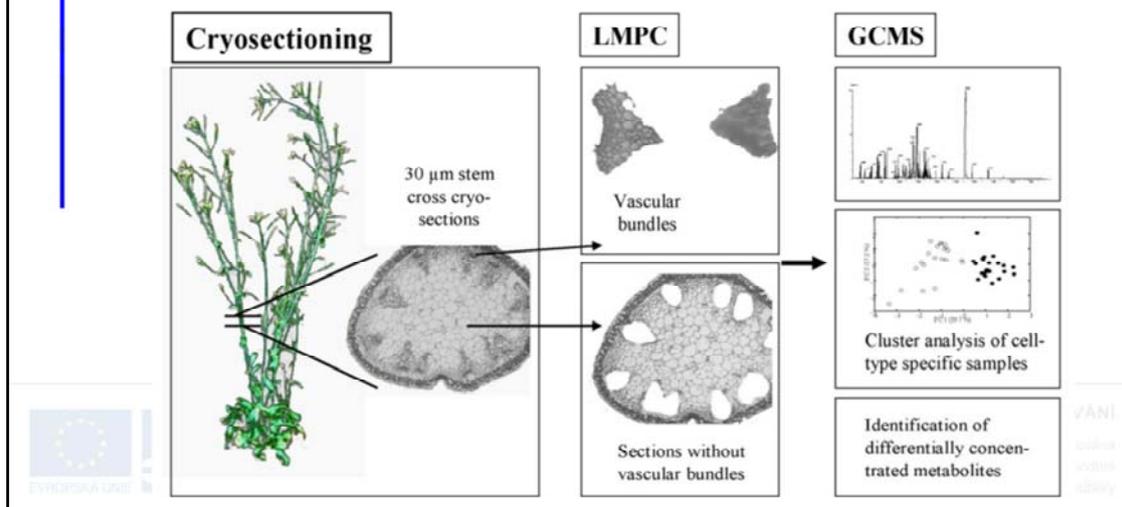


ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Metabolické profilování

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



# 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

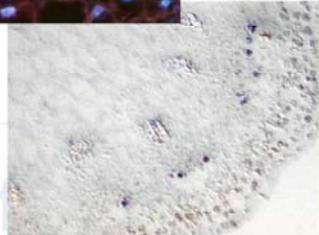
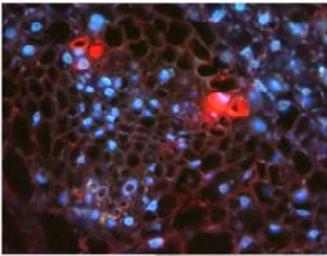


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



EVROPSKÁ UNIE

esf

© Ministerstvo zemědělství 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)



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

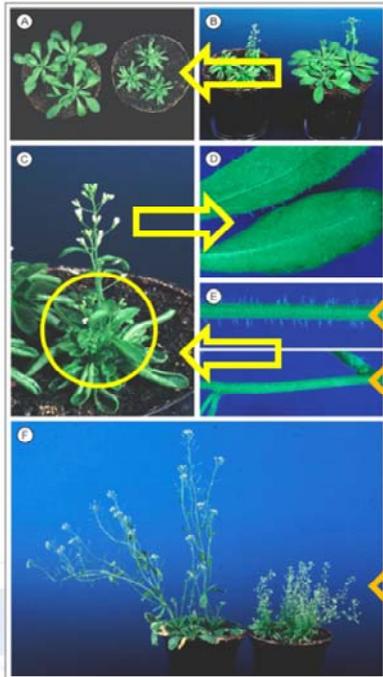
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Identifikace mutanta



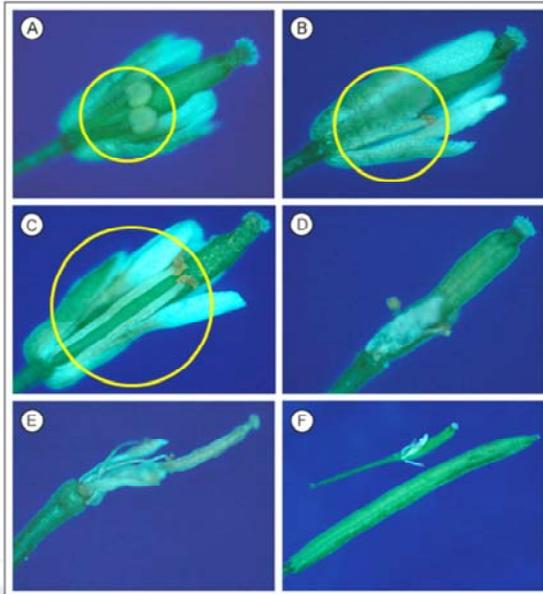
- zvlňné listy
- keříčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí



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

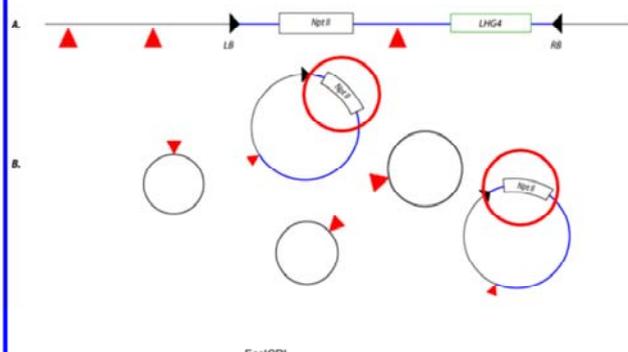


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

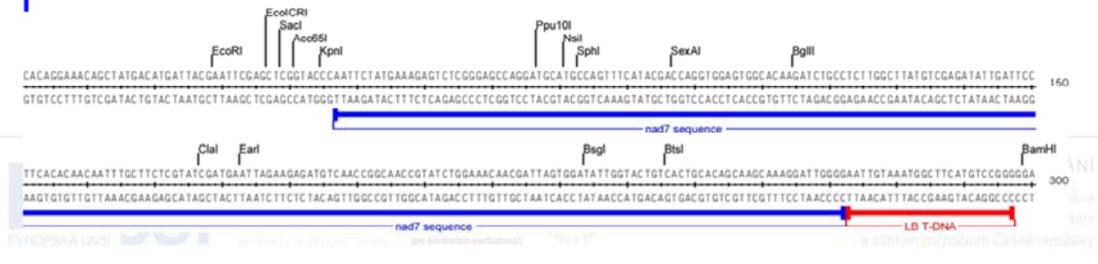
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

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

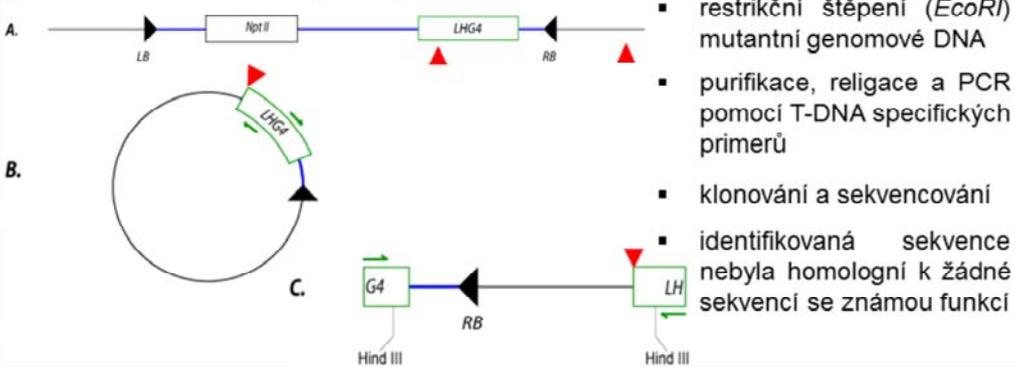


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

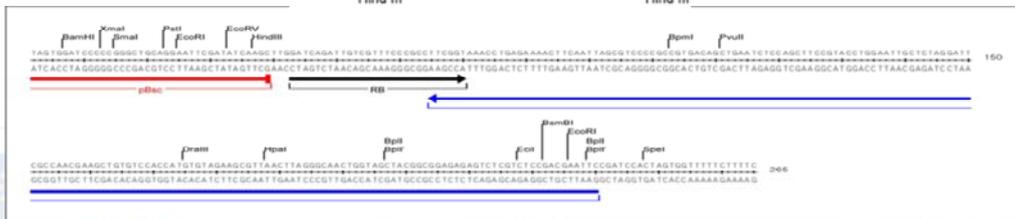


# Identifikace mutovaného lokusu

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



- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutanční 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*

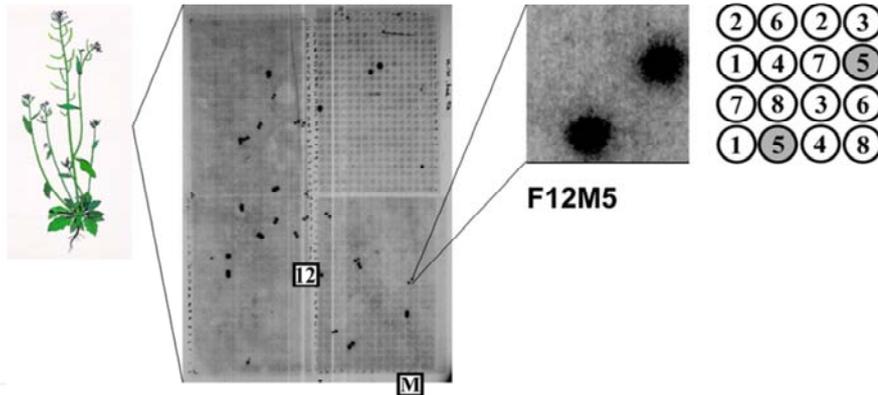


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

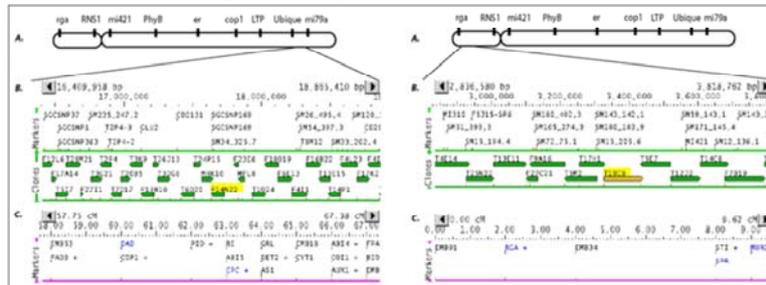


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

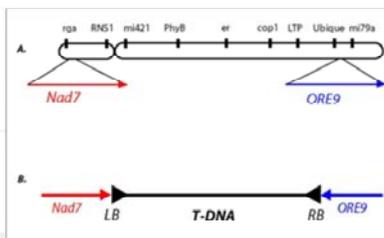
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## 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



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 restrikčních fragmentů úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligací adaptorů)
  - **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
    - polymorfismus délky restrikčních fragmentů úseků genu amplifikovaných pomocí PCR
  - **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
    - polymorfismus délky náhodně (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) amplifikovaných úseků genu

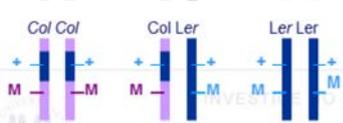
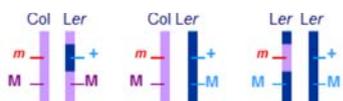
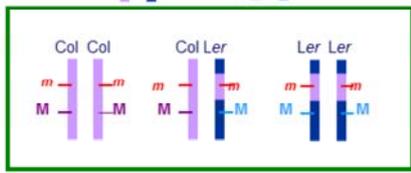
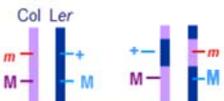


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Poziční klonování

Příprava mapovací populace



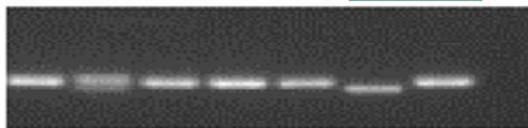
ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

**Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem**

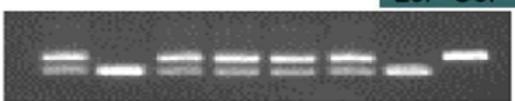
$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col I}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

**F2 mutanti**



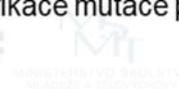
marker I – ve vazbě  
5 mutantů  
 $1/10 \times 100 = 10\%$

**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

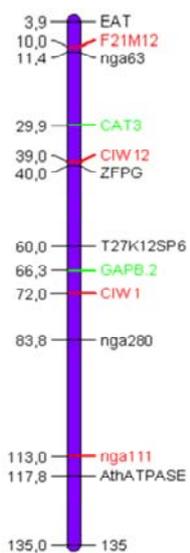


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

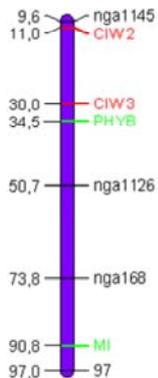
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Mapa DNA molekulárních markerů

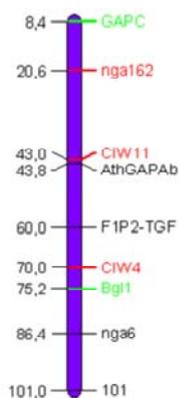
1CH



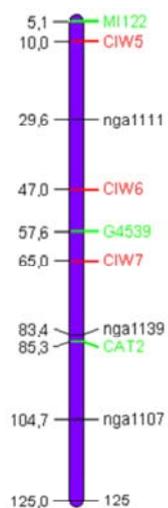
2CH



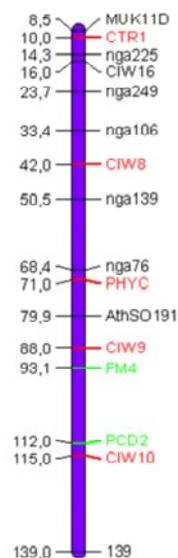
3CH



4CH



5CH



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



s státním rozpočtem České republiky

# Markery pro jemné mapování

**AGI Map**

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

**Maps for Chromosome 2**

for all Maps: [Search Options](#)

Selected Maps:

Display All Rows:

[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](#)

0 bp 2,463,170 bp

0 1,000,000 2,000,000

SM130_329,3	ATPTR2_B	SM104_73,6	<b>TIW2</b>	SM115_237,0	SM12_274,4	CIC9A
SM134_72,6	SM71_250,0	PKS1	SGCSNP180	SM46_294,4	SGCSNP129	76P5-
SM61_322,0	SM45_234,7	SM57_225,2	SM94_98,5	SM158_96,3		SGCSN
SM122_129,8	MI320	SM206_129,8	SM121_171,6	SM14_243,3		76P5-
SM122_129,8	NGA1145	SM254_364,8	04532	0497A		76P5-
SM253_310,7	NGA114	SM17_241,6	04553			76P5-
SM121_93,6		M246	SM46_411,1			76P5-
psa		SGCSNP111				712A
		SM130_120,2				SM1-
		SM73_258,4				
		SM233_178,9				

NOR\_2 F219 T2303 T16F16 T17M13 F18B11 F3112 T103 F1013 F16310 T25M19 F  
 F2M14 T8011 F504 T8022 T18F12 T18C20 T16B23 F2016 F15111 T14 T307  
 F10A8 F23114 T20F6 T20F T2015 F503 T20220 T17C22  
 F12H20 F7D11 T6P5

**Lister & Dean RI**

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)

0.00 cM 11.97 cM

0.00 5.00 10.00

TJL2M	psa +	PK1 +	VE012	MI320	F53_2
NOR2	SGCSNP180 +		ATPTR2_B	NGA1145 +	
				ATG5T2B	
				MIT201A +	

EVROPSKA UNIE EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND  
 OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost  
 Mládež a zaměstnanost

**IE VZDĚLÁVÁNÍ**  
 je realizováno z prostředků  
 veřejného rozpočtu  
 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