

# 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  
[hejatk@sci.muni.cz](mailto:hejatk@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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



MUNI  
MASARYKIANA BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



MUNI  
MASARYKŮVA UNIVERZITA BRNO

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



T-DNA

#### „Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

(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**



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



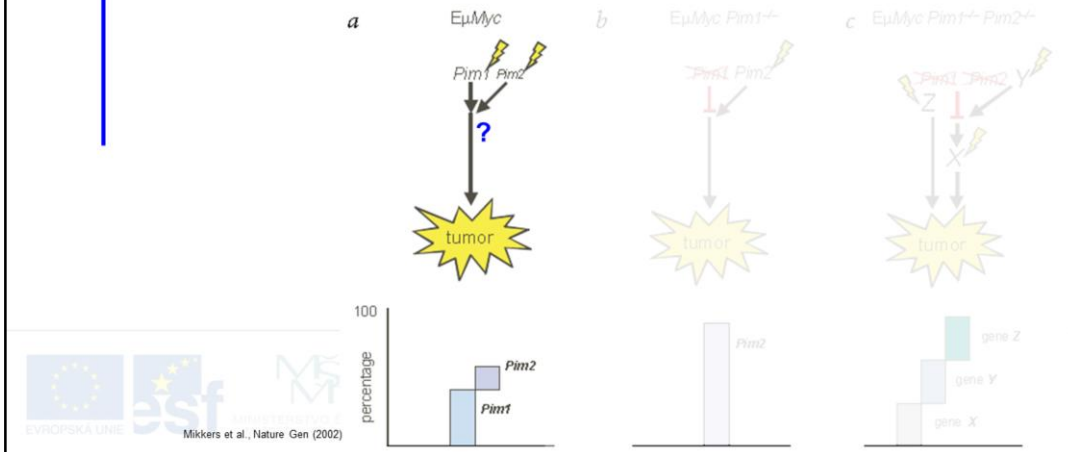
MASARYKŮVA UNIVERZITA  
BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

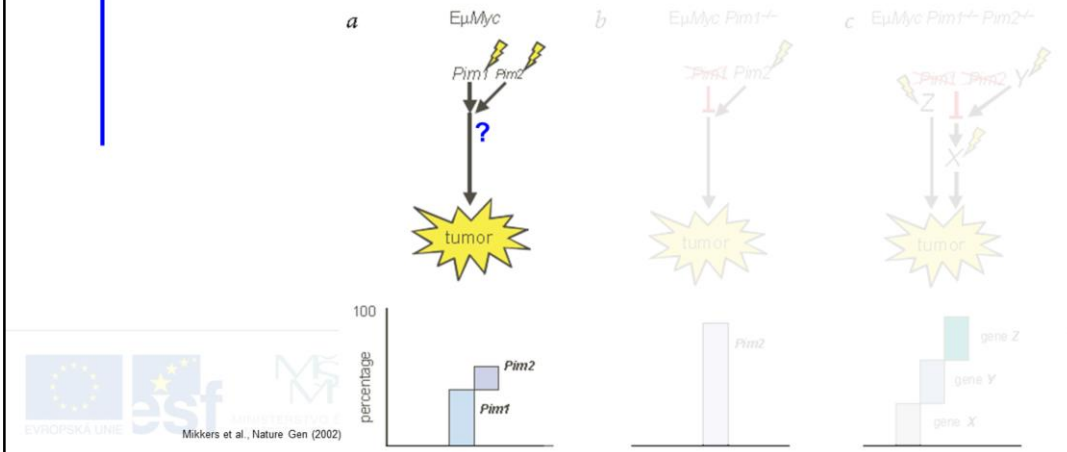
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce  $E\mu$ Myc myši **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**



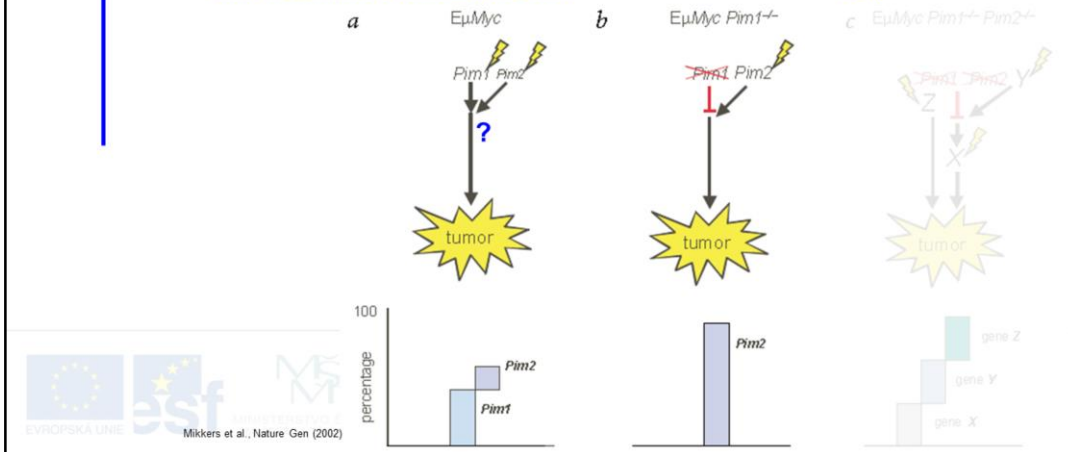
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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

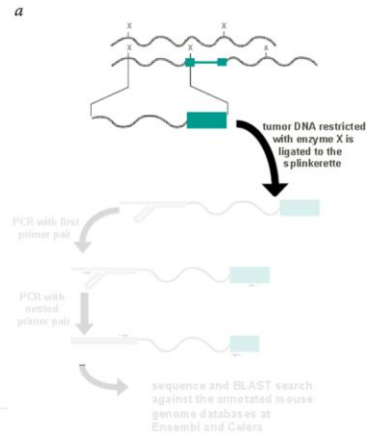
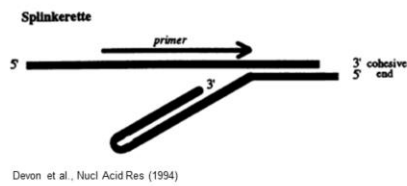
- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze **signálních partnerů Pim proteinů (Y)**, některého z **proteinů Pim signální dráhy (X)** nebo k **aktivaci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

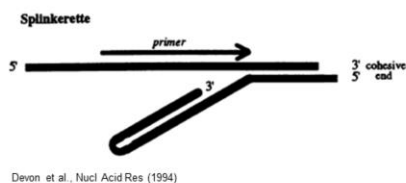


VÁNI

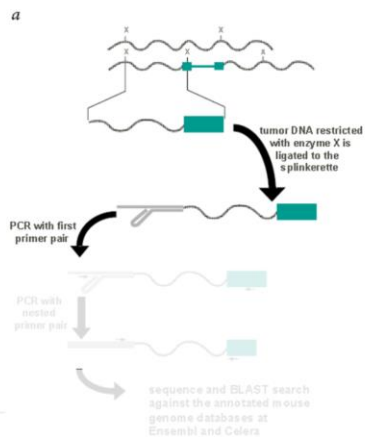
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)

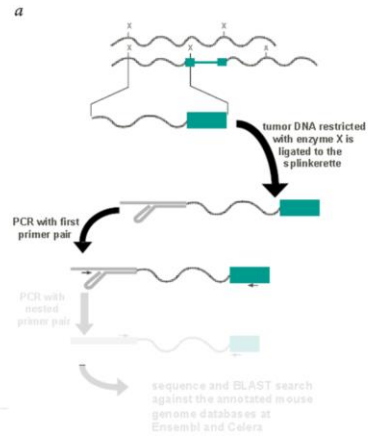
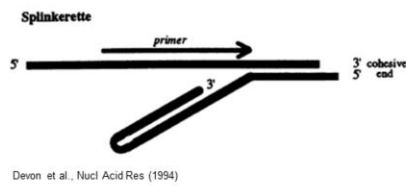


VÁNI

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

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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

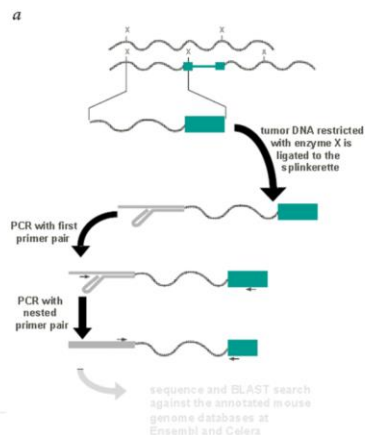
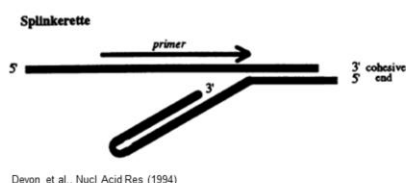


VÁNI

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

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



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

VÁNI

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**



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



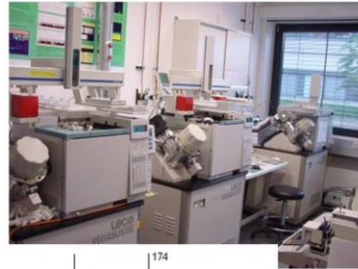
MUNI  
MASARYKŮVA UNIVERZITA BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

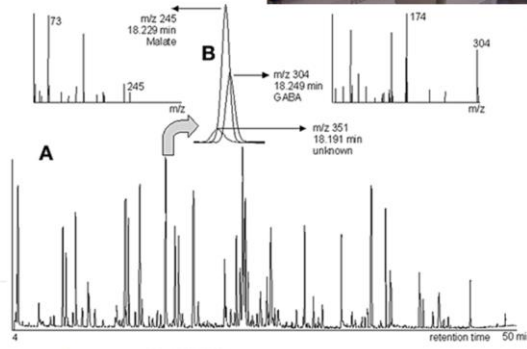
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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 | Identification |
|----------------------|-----|-----------|----------------|
| 18.229               | 245 | High      | Malate         |
| 18.249               | 304 | High      | GABA           |
| 18.191               | 351 | High      | unknown        |
| 17.3                 | 73  | Low       |                |
| 17.174               | 174 | Low       |                |
| 17.304               | 304 | Low       |                |



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO PŮDĚLNOSTI  
A ROZVOJE VÝVOJŮ

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



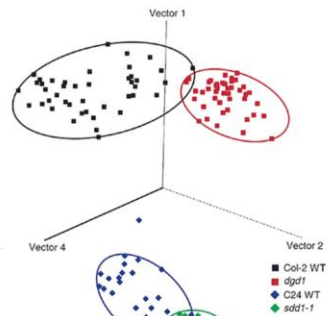
ČESKÁ REPUBLIKA

OJE VZDĚLÁVÁNÍ

toce 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



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



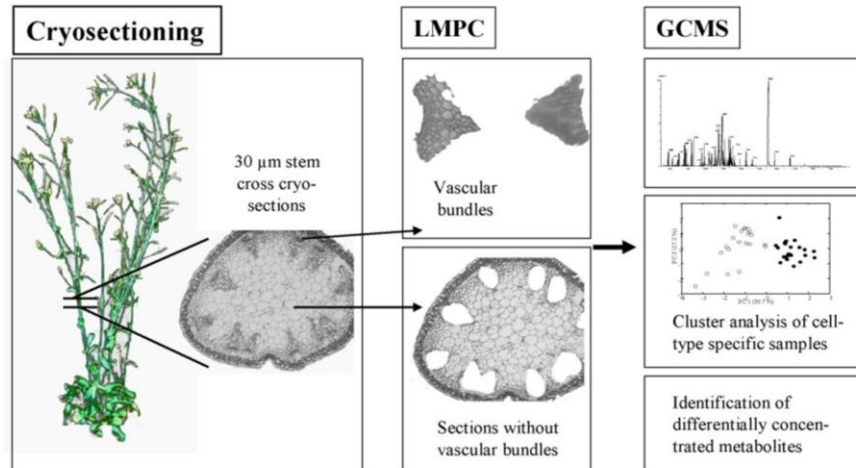
## ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

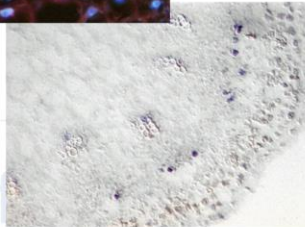
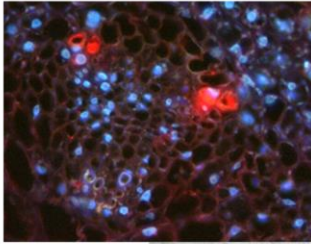


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# 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 ESF

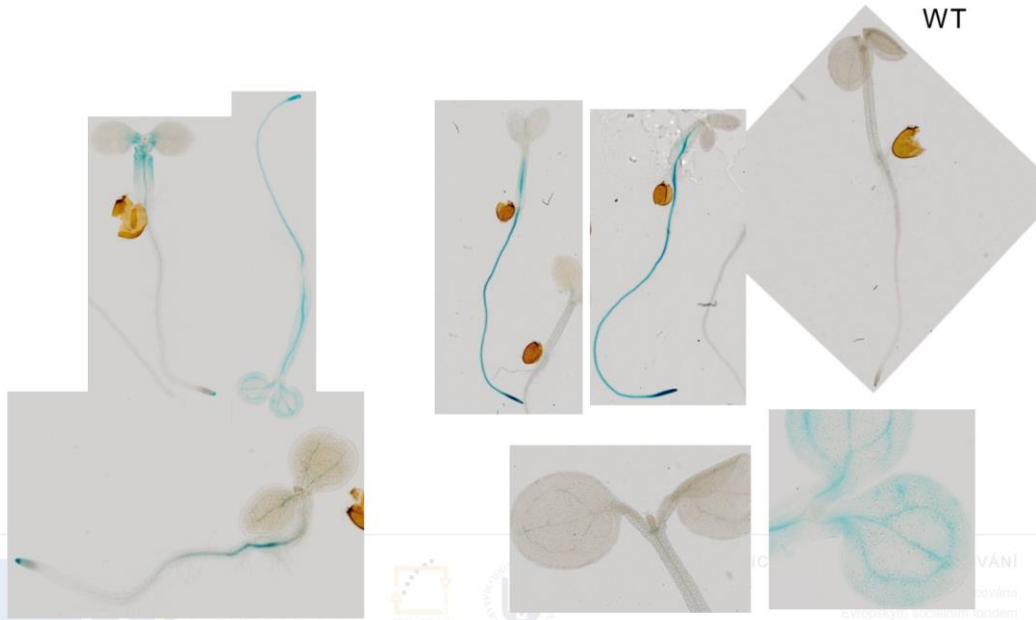


INVESTICE DO ROZVOJE



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

# Expresní profil



EVROPSKÁ UNIE

ČSFR

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy  
a vysoké školy České republiky

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

ČESKÁ REPUBLIKA

IC VÁNI  
organizována  
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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



MUNI  
MASARYKOVY UNIVERZITA BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Identifikace mutovaného lokusu

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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

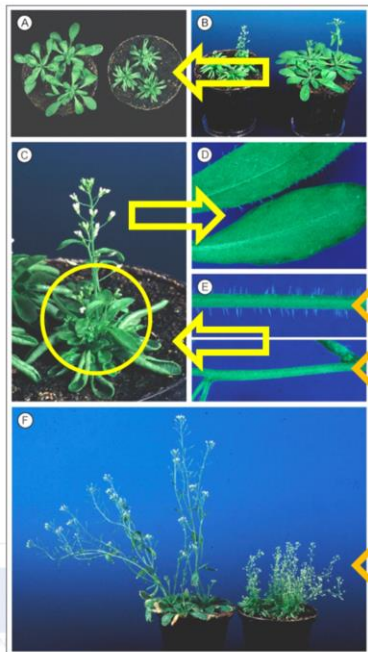


MUNI  
MASARYKIANA BRNO

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

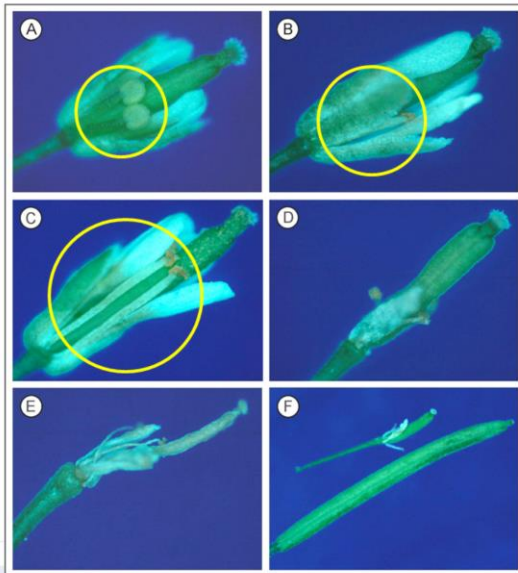


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



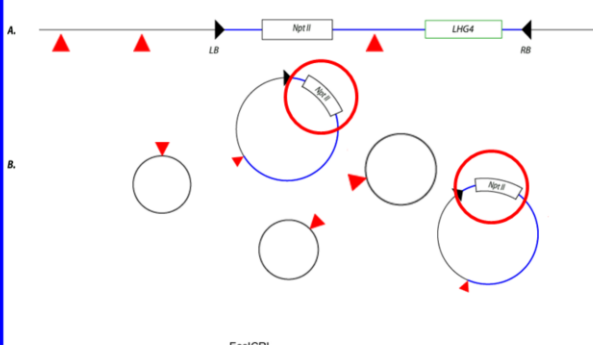
MUNI  
MASARYKIANA BRNO

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*

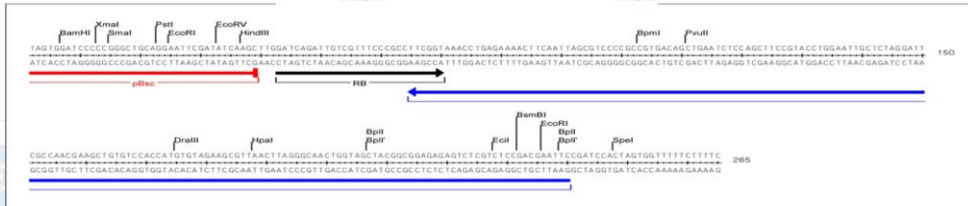
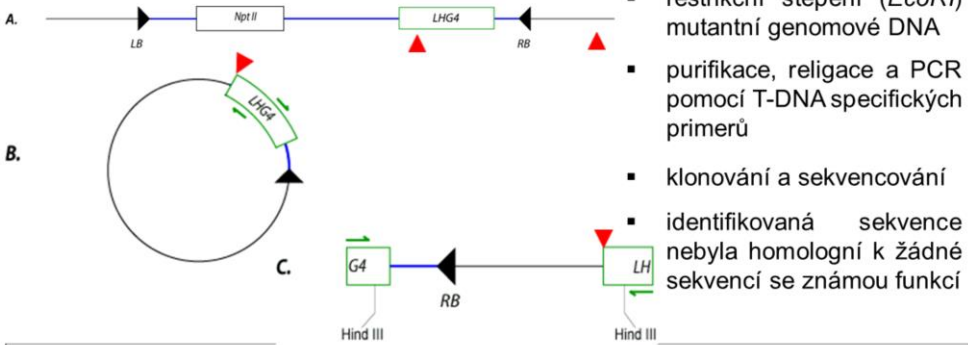


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA



# Identifikace mutovaného lokusu

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



# Identifikace mutovaného lokusu

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



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



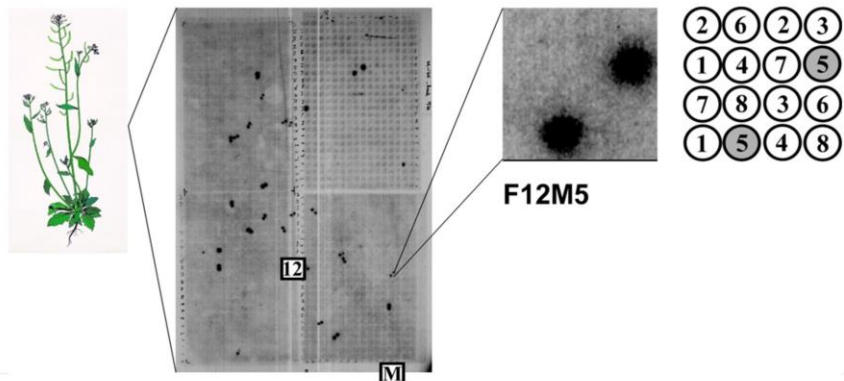
MASARYKŮVA  
UNIVERSITA  
BRNO

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

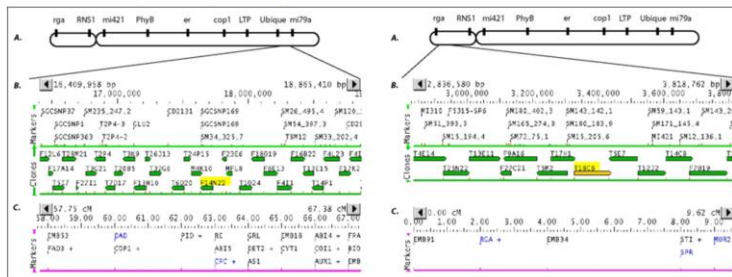


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

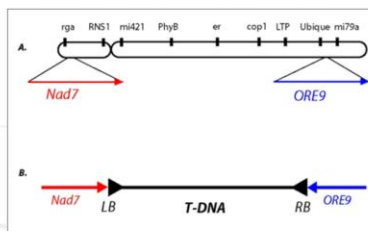
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

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

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



- pravidelně došlo k inverzi téměř celého chromozómu 2



EVROPSKÁ UNIE  
esf  
MINISTERSTVO ŠKOLNÍHO  
VÝCHOVY, 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 genomu** (PCR produktů) **amplifikovaného** pomocí specifických **primerů**
- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)
  - **polymorfismus délky restričních fragmentů** úseků genomu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)
- **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
  - **polymorfismus délky restričních fragmentů** úseků genomu amplifikovaných pomocí **PCR**
- **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
  - **polymorfismus délky náhodně** (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) **amplifikovaných úseků genomu**

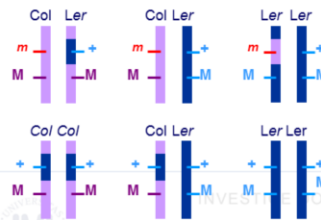
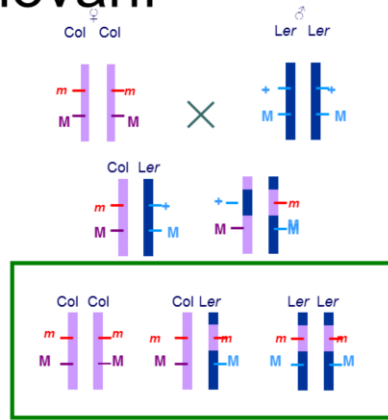


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Poziční klonování

Příprava mapovací populace



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

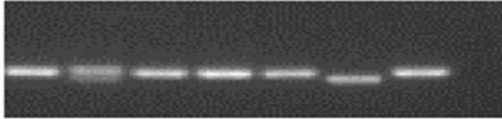
tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

**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**

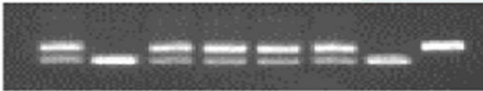
Ler Col



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

**F2 mutanti**

Ler Col



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

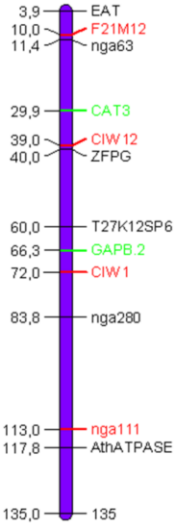


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

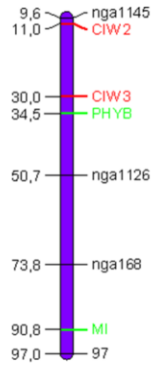
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Mapa DNA molekulárních markerů

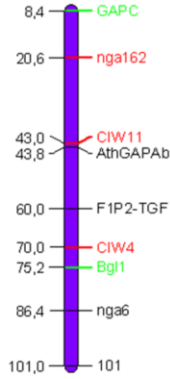
1CH



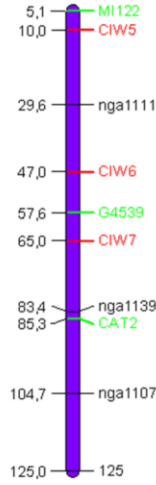
2CH



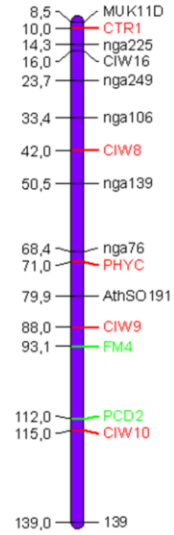
3CH



4CH



5CH



CSZ

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, Mládeží a tělovýchovy

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



s 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   
   
 Display All Rows



[MapViewer Home](#)

[Release Note](#)

[View Print-Version](#)

### AGI Map

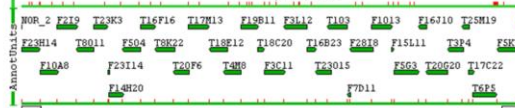
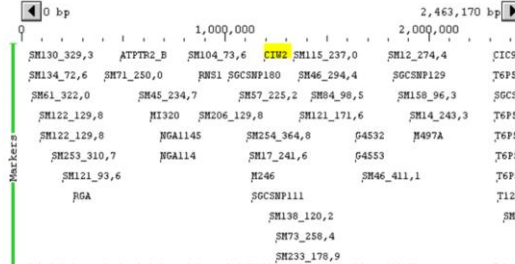
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

[AGI Map color key](#)



### Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



JE VZDĚLÁVÁNÍ  
je spolufinancováno  
tým 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



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



MASARYKOVA UNIVERZITA  
BRNO

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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