

Fyzikální mapování genomů

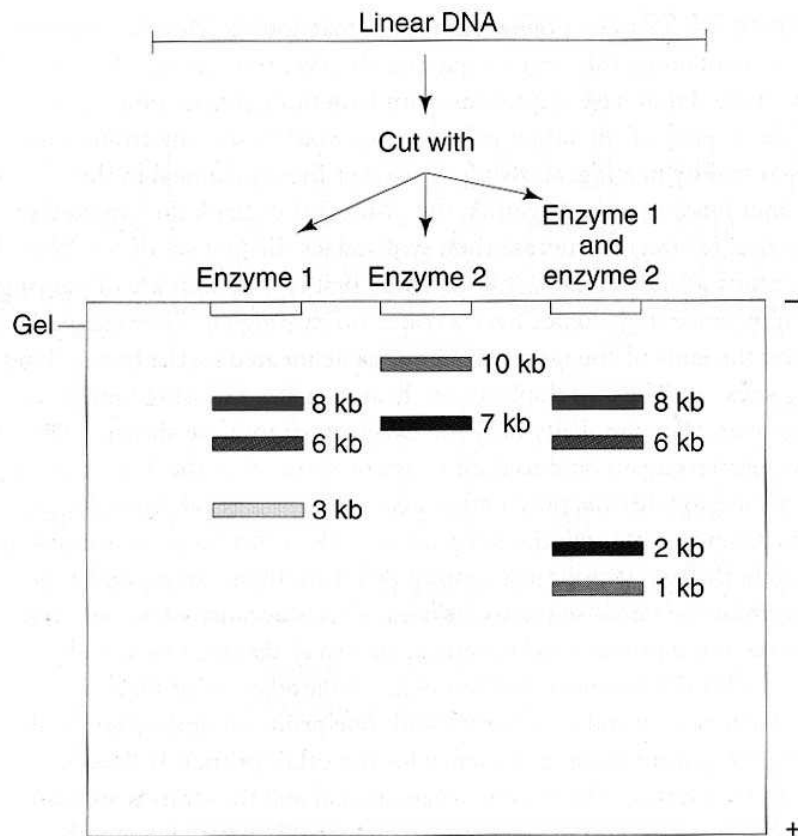
Cíl = konstrukce fyzikální mapy - stanovení sekvence genomu

- přístup volen podle velikosti a complexity genomu

Základní strategie

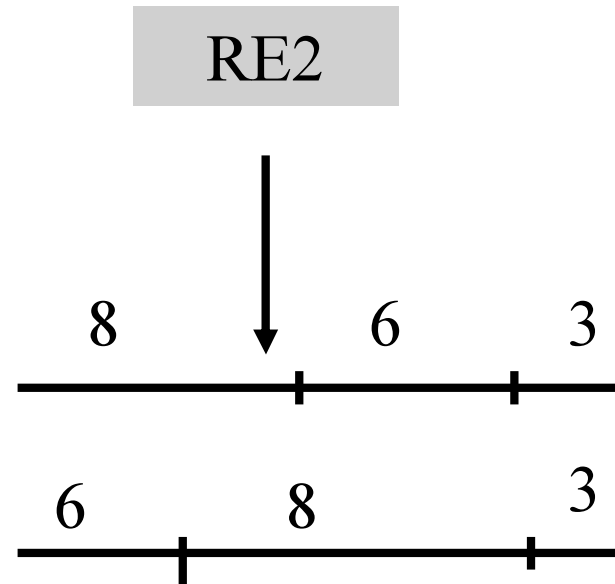
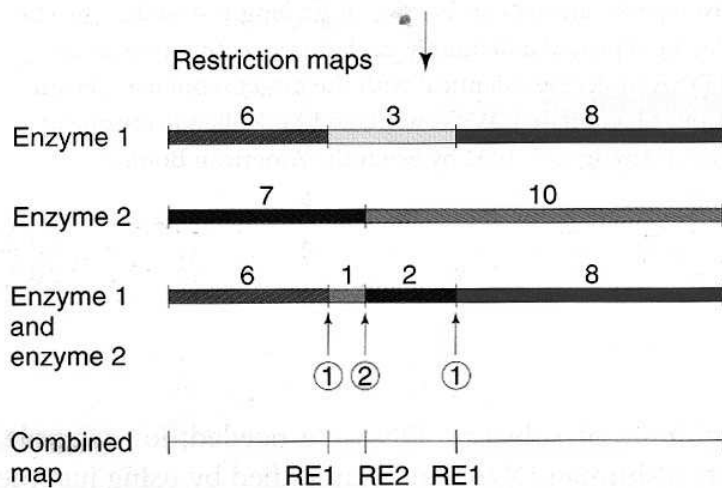
- * restriční (makrorestriční) mapování
- * kontigové mapování (seřazení souvislých sekvencí genomu)
- * přímé sekvencování DNA

Restrikční mapování srovnáním jednoduchého a dvojitého štěpení RE

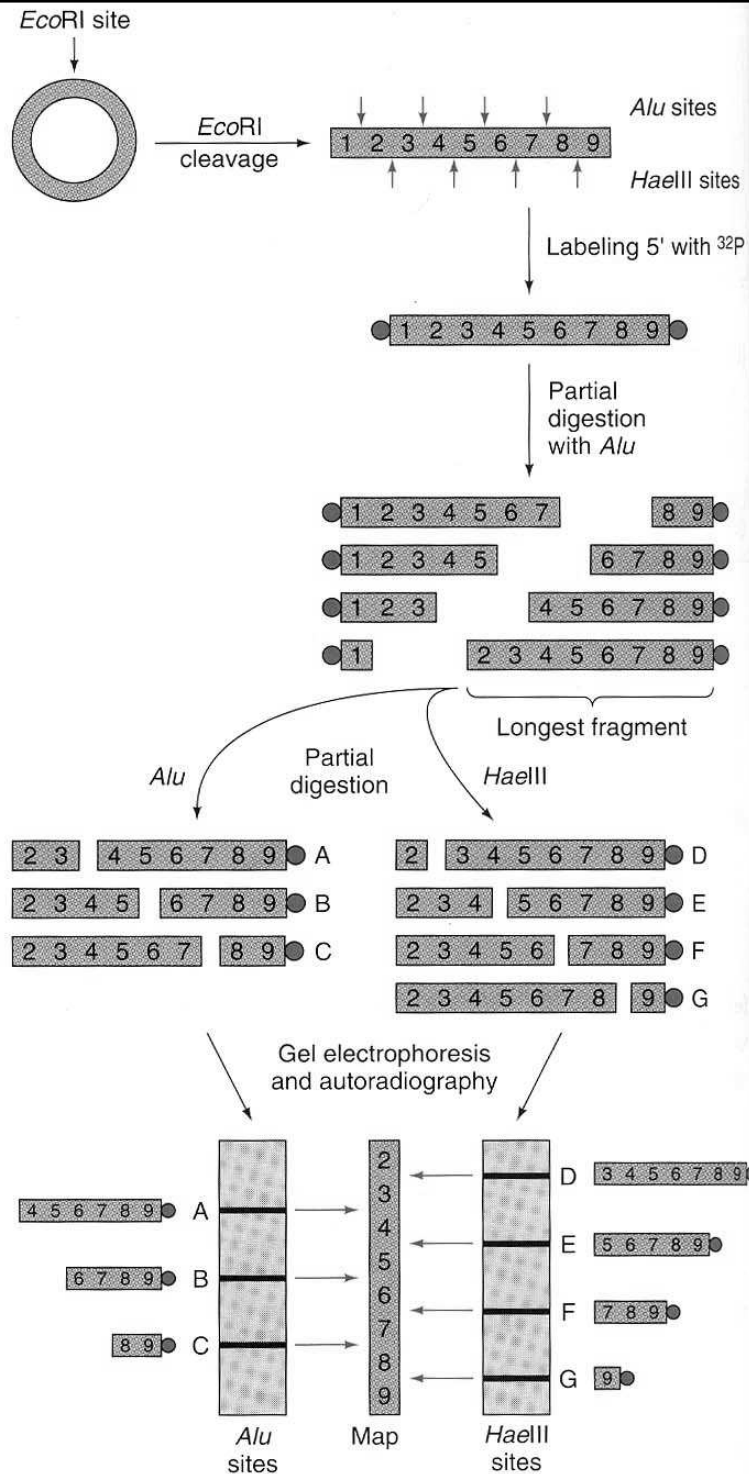


Předpoklady pro restrikční mapování:

- identifikace všech fragmentů
- vyloučení částečných štěpů
- přesné stanovení velikosti



Restrikční mapování koncově značené DNA



1. Linearizace molekuly

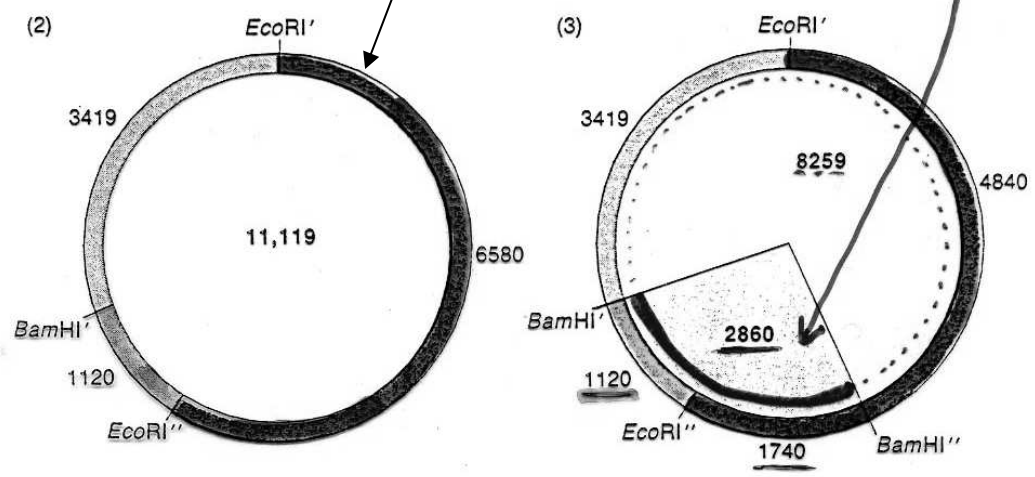
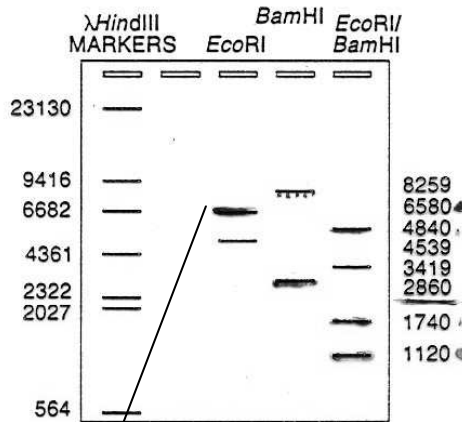
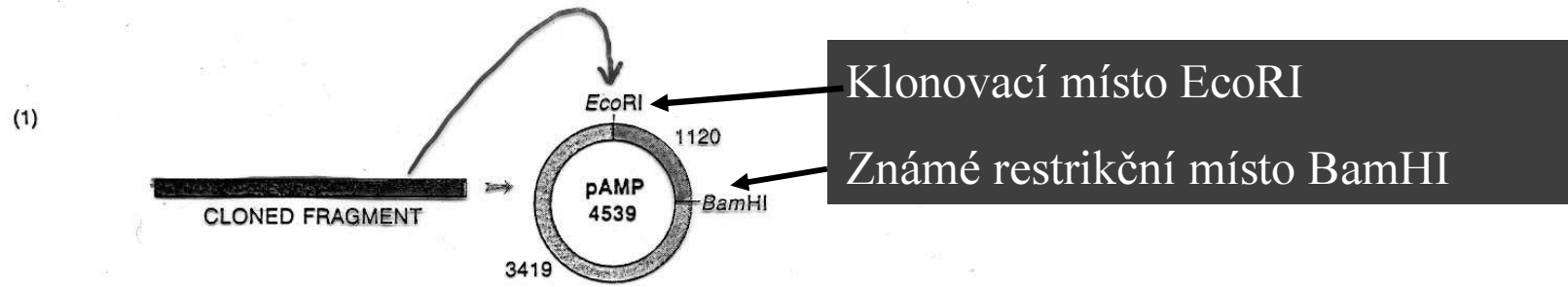
2. Značení na koncích

3. Izolace nejdelšího fragmentu a jeho částečné štěpení RE1 RE2

4. Elektroforéza, stanovení velikosti fragmentů a sestavení mapy

Na autoradiogramu jsou vidět jen značené fragmenty

Restrikční mapování klonovaného fragmentu



Poloha BamHI''

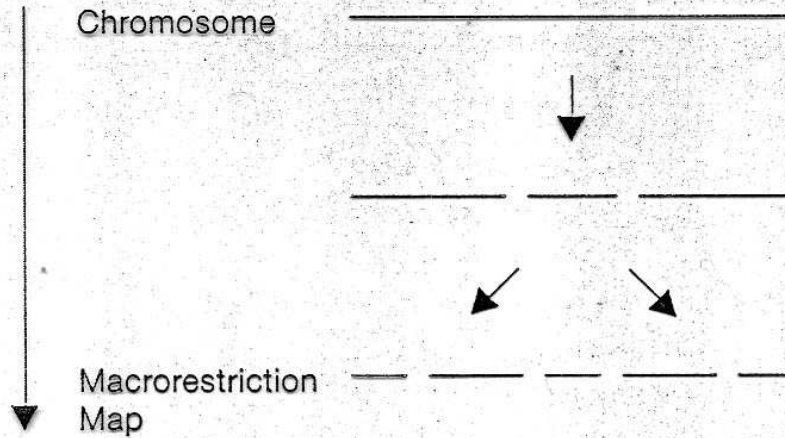
1120 + x = 2860 (nový fragment vzniklý štěpením BamHI)

x = 1740 = poloha BamHI v inzertu

Základní strategie pro mapování a sekvencování velkých genomů

Top-Down

Přístup shora dolů



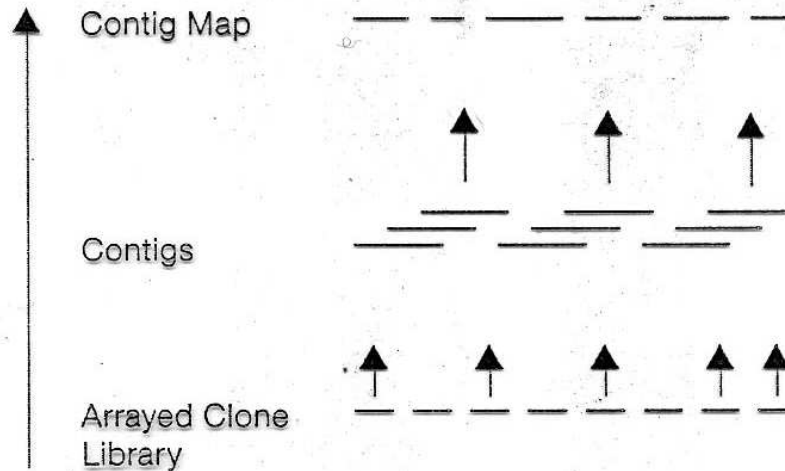
Štěpení RE

PFGE

hybridizace

Bottom-Up

Přístup zdola nahoru

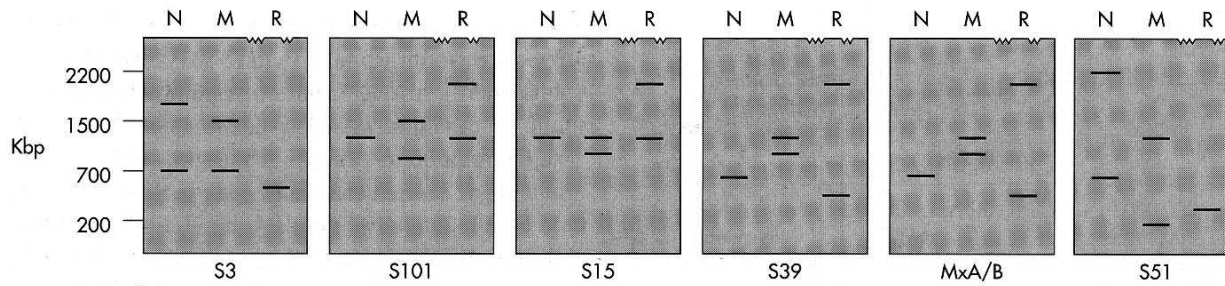


Uspořádání klonů

Srovnání klonů

Genomová knihovna

Mapování pomocí pulzní gelové elektroforézy

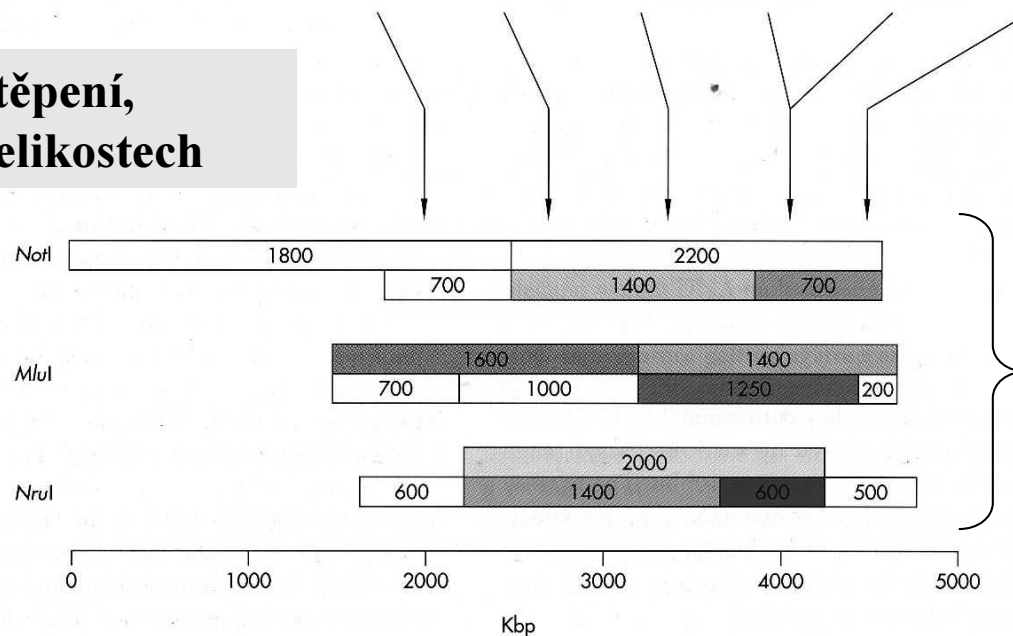


Enzyme	Probe					
	S3	S101	S15	S39	MxA/B	S51
<i>NotI</i>	700	1400	1400	700	700	700
	1800					2200
<i>MluI</i>	700	1000	1250	1250	1250	200
	1600	1600	1400	1400	1400	1400
<i>NruI</i>	600	1400	1400	600	600	500
		2000	2000	2000	2000	

Autoradiogramy po hybridizaci genomové DNA štěpené *NotI* (N), *MluI* (M) a *NruI* (R) se sondami (S...)

Restrikční fragmenty hybridizující k použitým sondám - barevně označené fragmenty hybridizují k více sondám

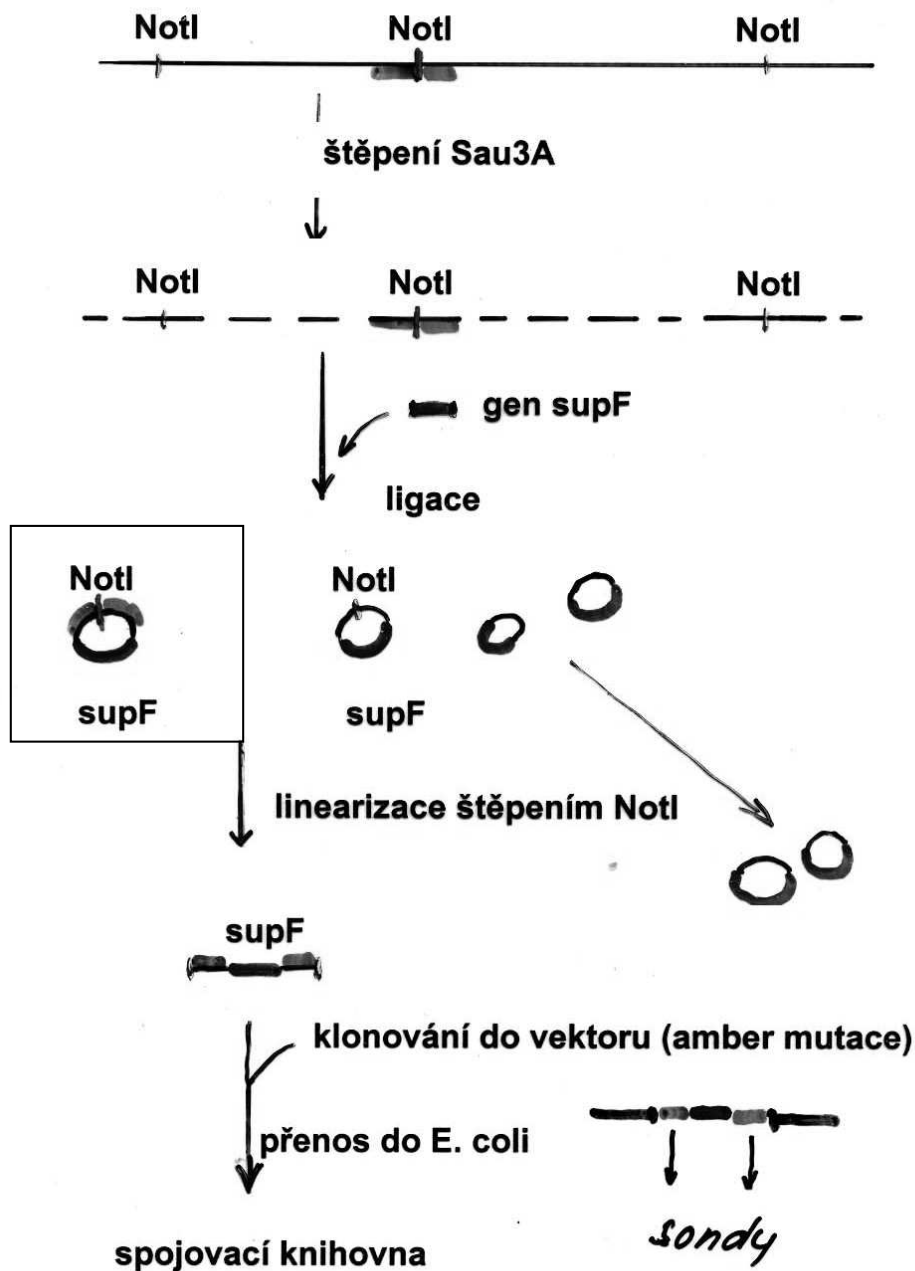
Částečné štěpení, chyby ve velikostech



Šipky naznačují místa na genomové DNA, kde se vážou sondy

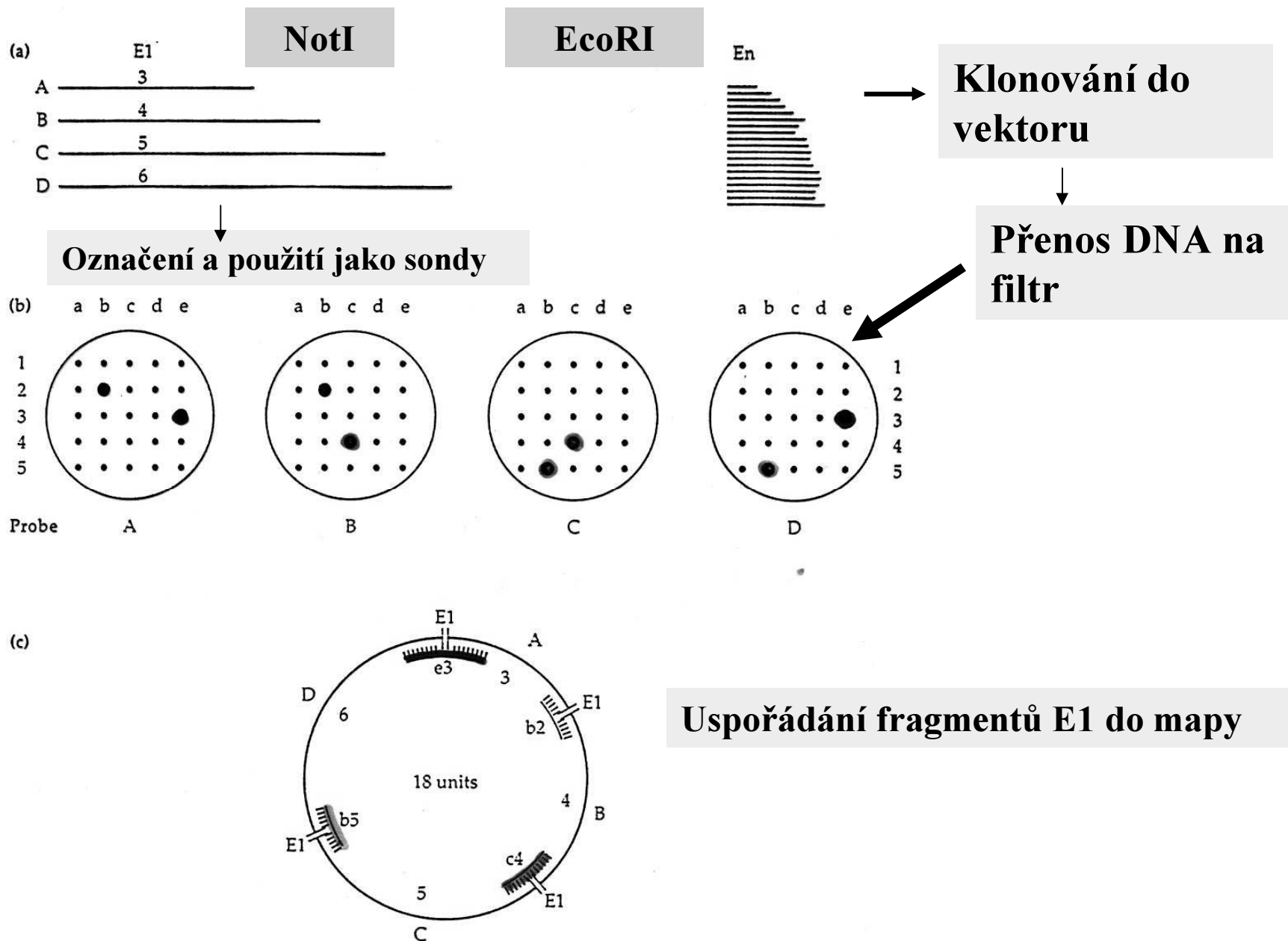
Makrorestrikční mapa

Příprava "spojovací" knihovny (linking library)



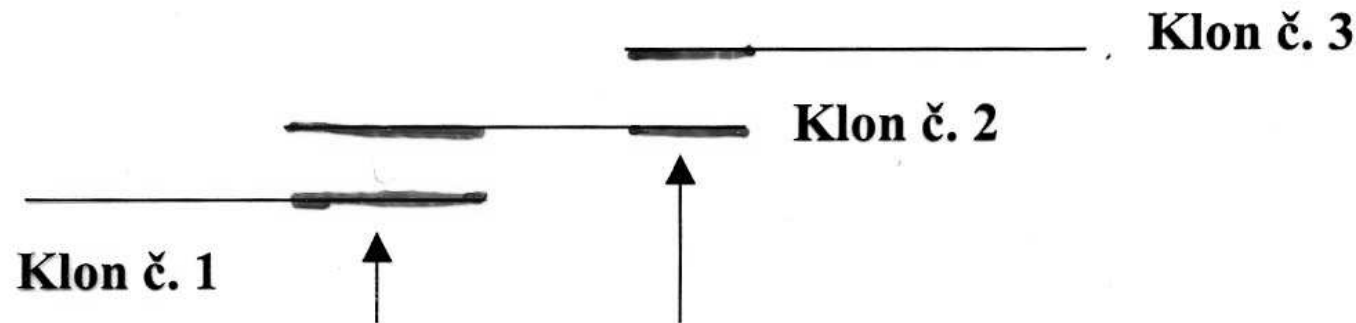
Vektor odvozený od fága lambda, který se množí jen v případě, že nese supresor

Mapování genomu s využitím spojovací knihovny



Kontigové mapování

Vyhledávání překrývajících se klonů



Shoda spektra restričních fragmentů

Shoda hybridizace se sondou

Shoda nukleotidové sekvence

- STS – sequence tagged sites

- STC – sequence tagged connection

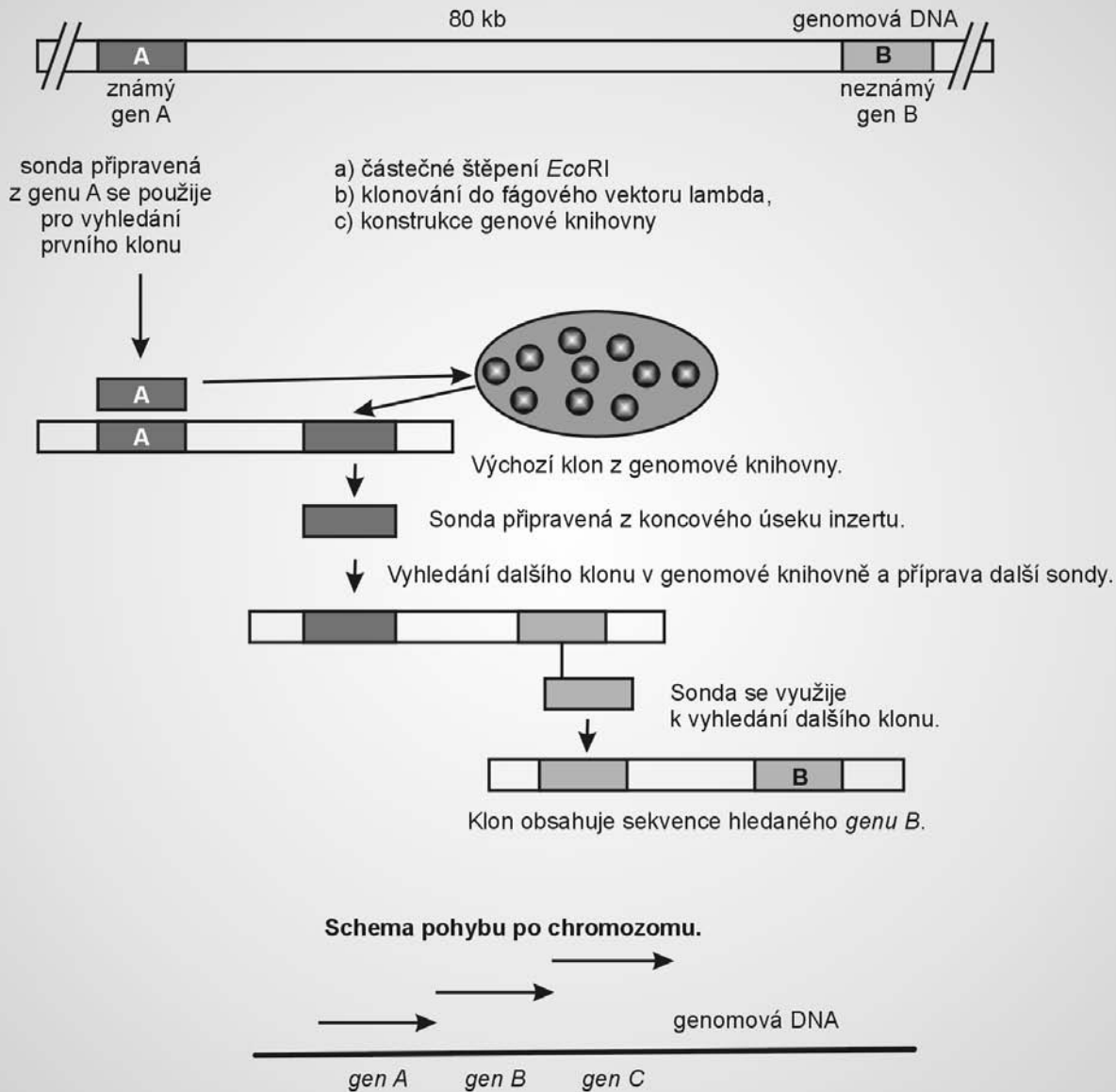


**Uspořádání klonů tak, aby se sekvence jejich
inzertů překrývaly – získání kontigů**

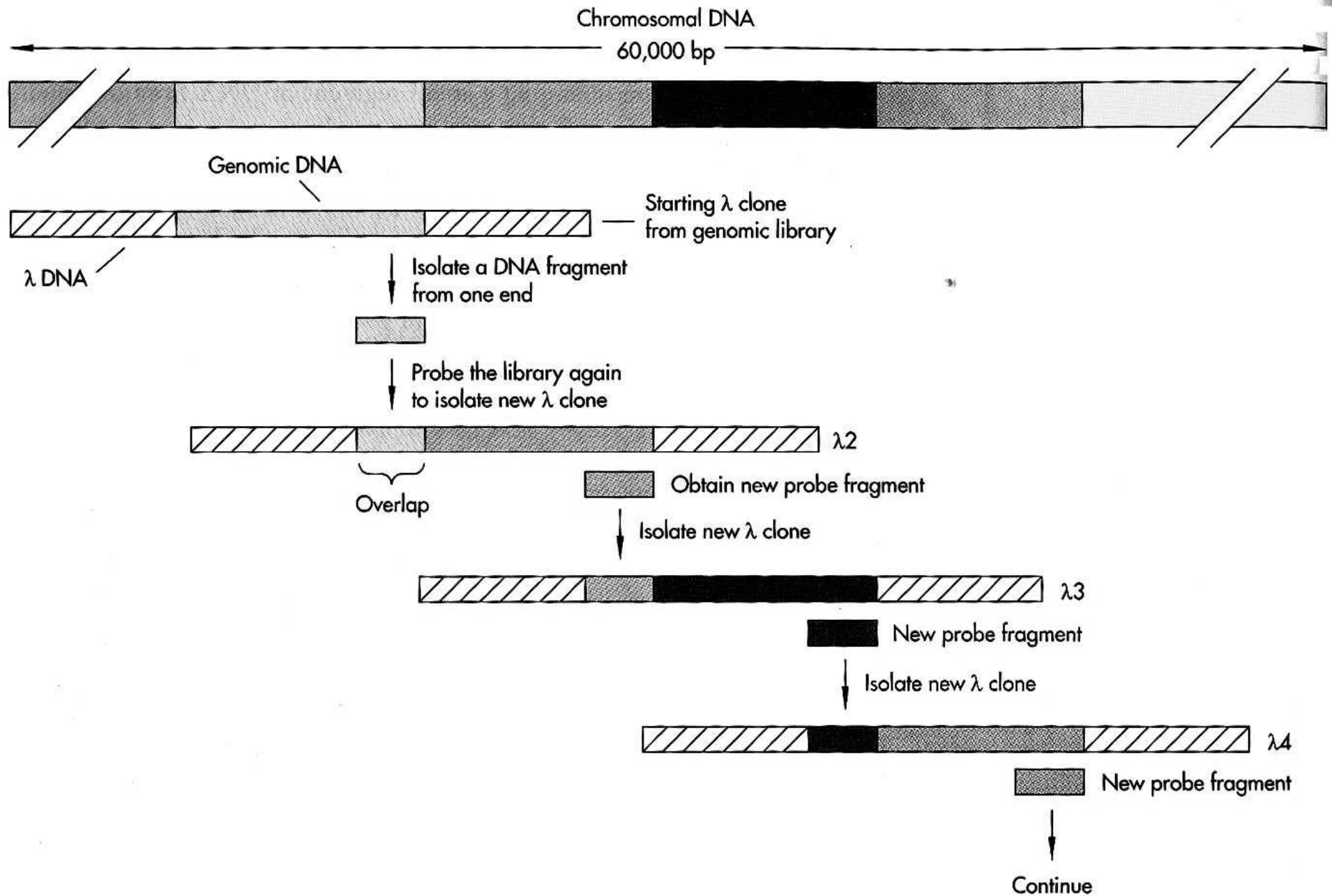
Metody přiřazování fragmentů do kontigů:

- **procházení po chromosomu (chromosome walking)**
- **skákání po chromosomu (chromosome jumping)**
- **procházení primerem (primer walking)**
- **porovnávání otisků DNA (cosmid fingerprinting)**
- **binární systém hybridizace s náhodnými oligonukleotidy**
- **použití markerů se sekvenční adresou (sequence tagged site – STS)**
- **exprimovatelné sekvenční markery cDNA (expressed sequence tags –ESTs)**
- **sekvenčně označené spojky (sequence tagged connectors – STC)**

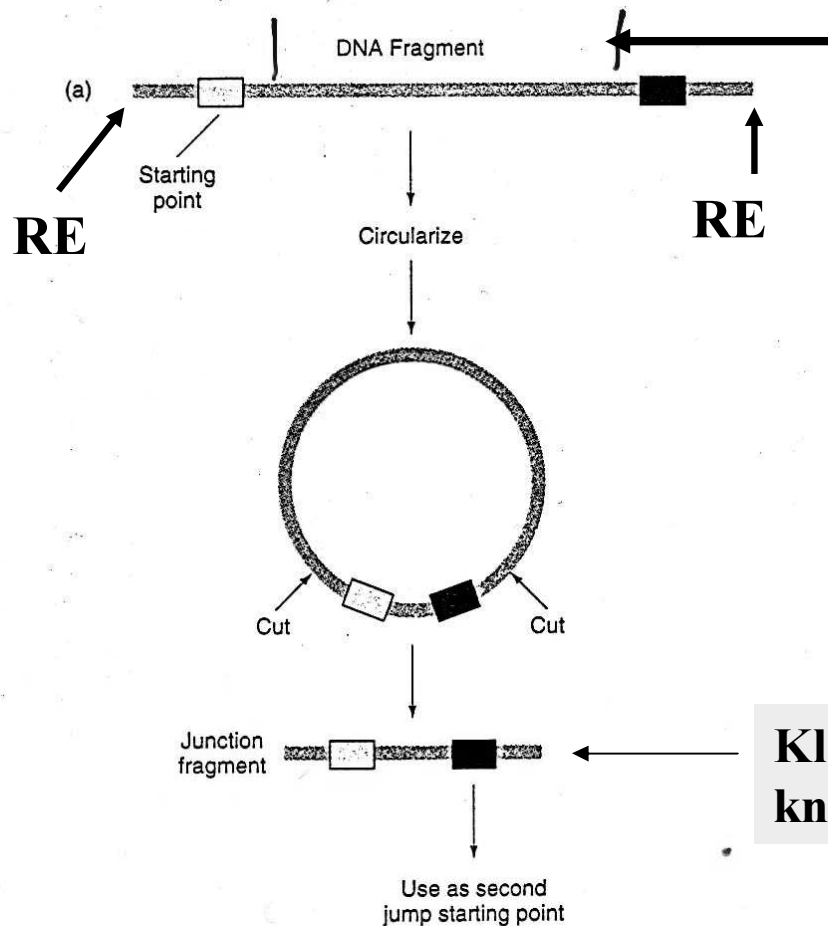
Procházení po chromozomu



Procházení po chromozomu (chromosome walking)

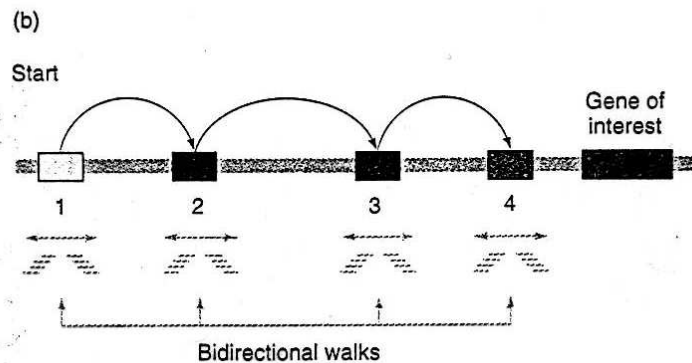


Příprava sond pro přeskokování po chromozomu

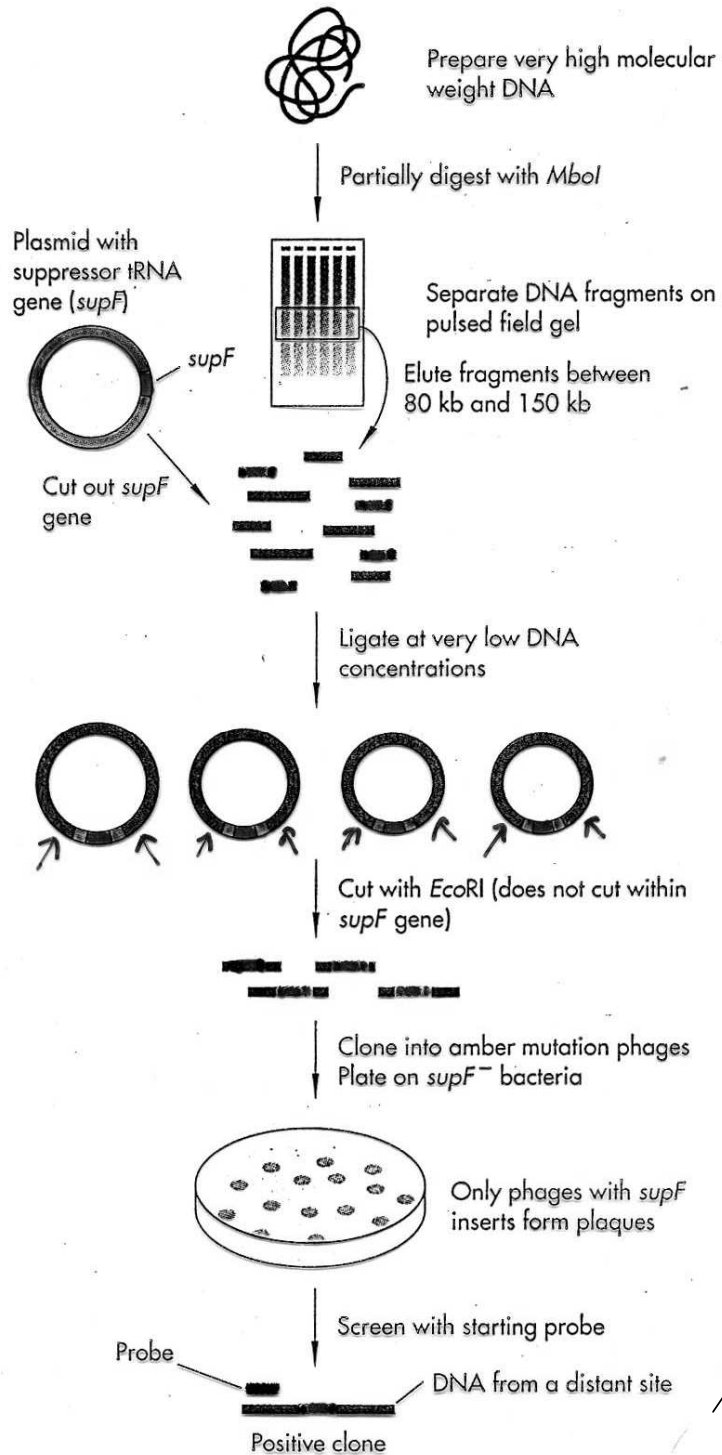


Úsek genomu, který není dosud zmapován (např. repetitivní DNA) = „mezera“ při procházení po chromozomu

Klonování do fágového vektoru - knihovna pro přeskokování



Příprava knihovny „přeskakovacích klonů“ („*jumping library*“)



Genomová DNA



~100 kb

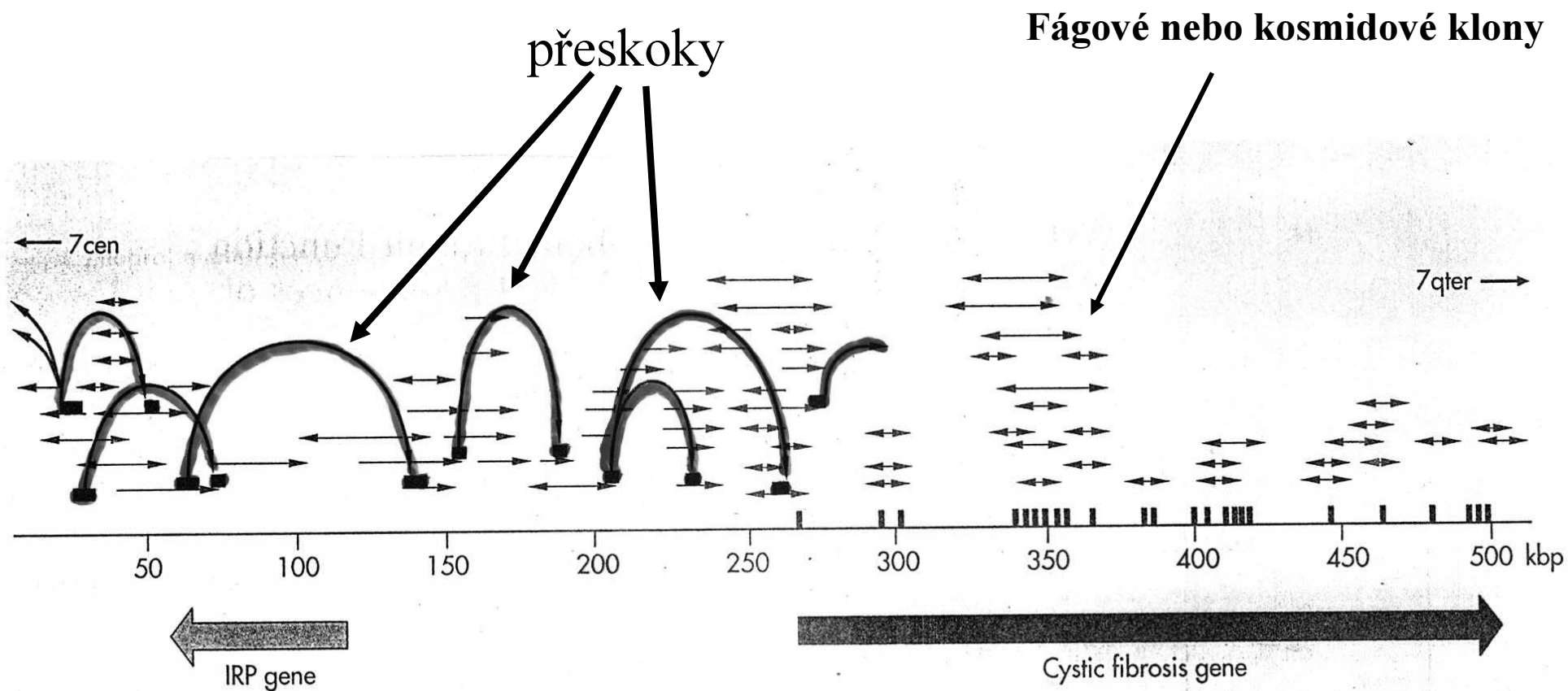


supF

10-20 kb

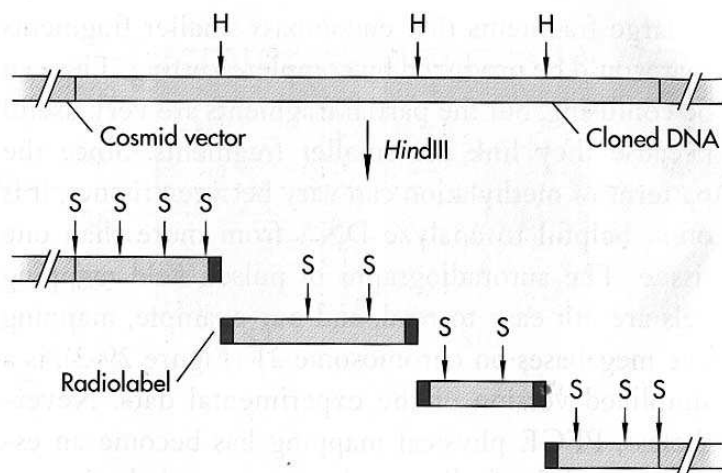


Kombinace procházení a přeskokování po chromozomu

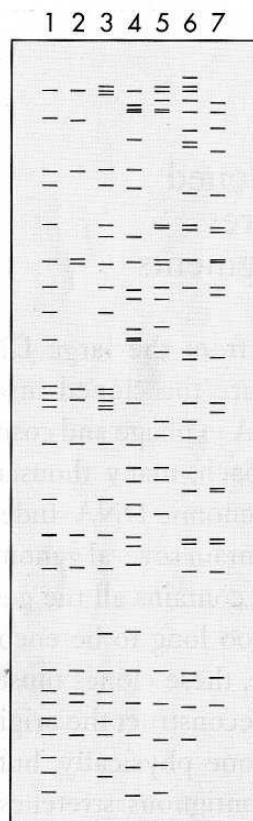


Uspořádání kosmidových klonů srovnáním restričních spekter

(srovnání fingerprintů)



1. Štěpení kosmidových klonů *Hind*III
2. Koncové značení restričních fragmentů
3. Štěpení značených fragmentů *Sau*3A1



← Autoradiogram jednoho inzertu

7 různých inzertů

srovnání délek fragmentů

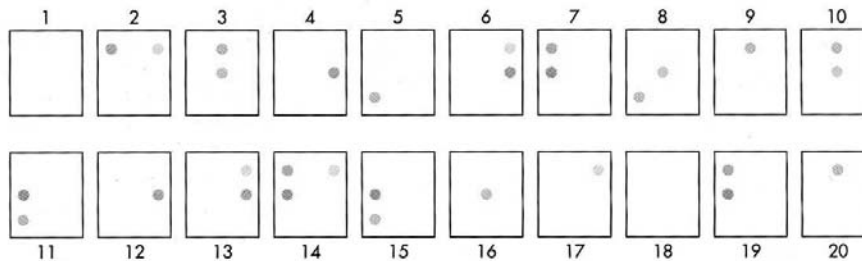
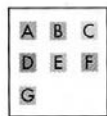
vyhledání překrývajících se inzertů

seřazení kosmidových klonů

*Fyzikální
mapa
E. coli*

Binární fingerprinting s náhodnými oligonukleotidovými sondami

Hybridization of probes



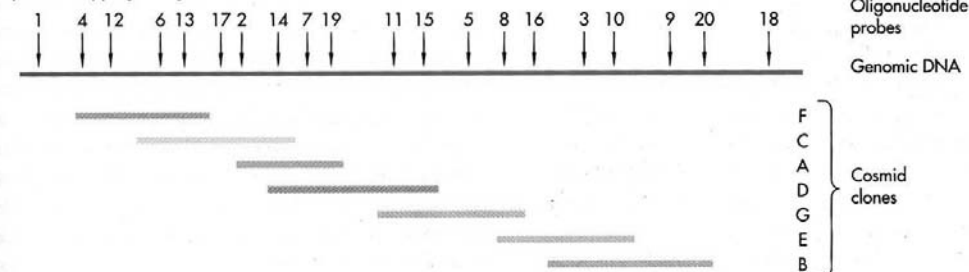
Binary pattern of hybridization

Clone	Oligonucleotide probe																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
B	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
C	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
E	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Data analyzed to determine overlaps

Clone	Oligonucleotide probe																			
	1	4	12	6	13	17	2	14	7	19	11	15	5	8	16	3	10	9	20	18
A	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
C	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
F	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

Map of overlapping contigs



20 replikových filtrů, každý se sedmi kosmidy. Každý filtr je hybridizován s oligonukleotidovou sondou (1-20)

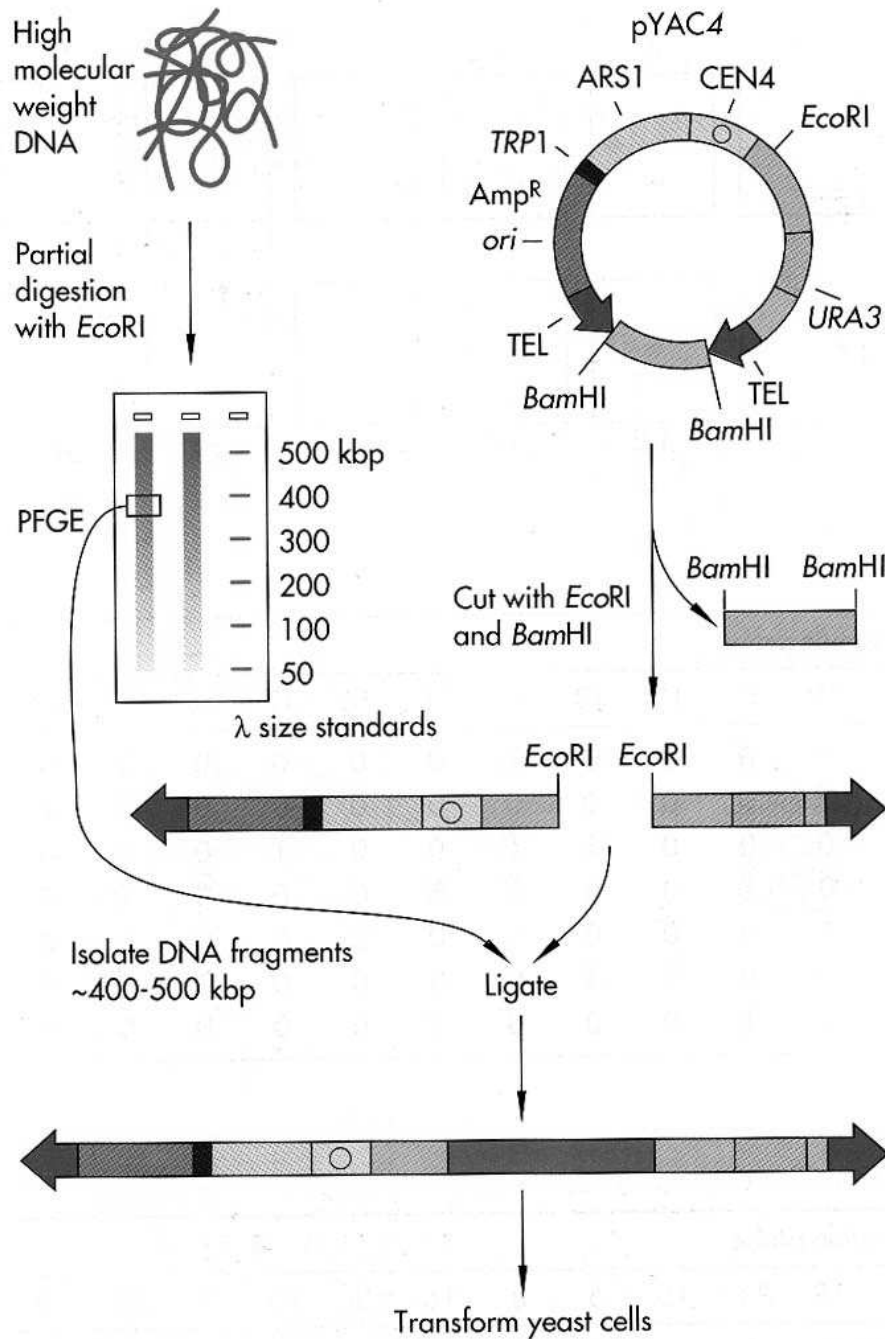
Kosmid A hybridizuje se sondami 2,7,14 a 19

Stanovení překryvů kosmidů (ty, které hybridizují se stejnými sondami)

Uspořádání kosmidů do kontigové mapy

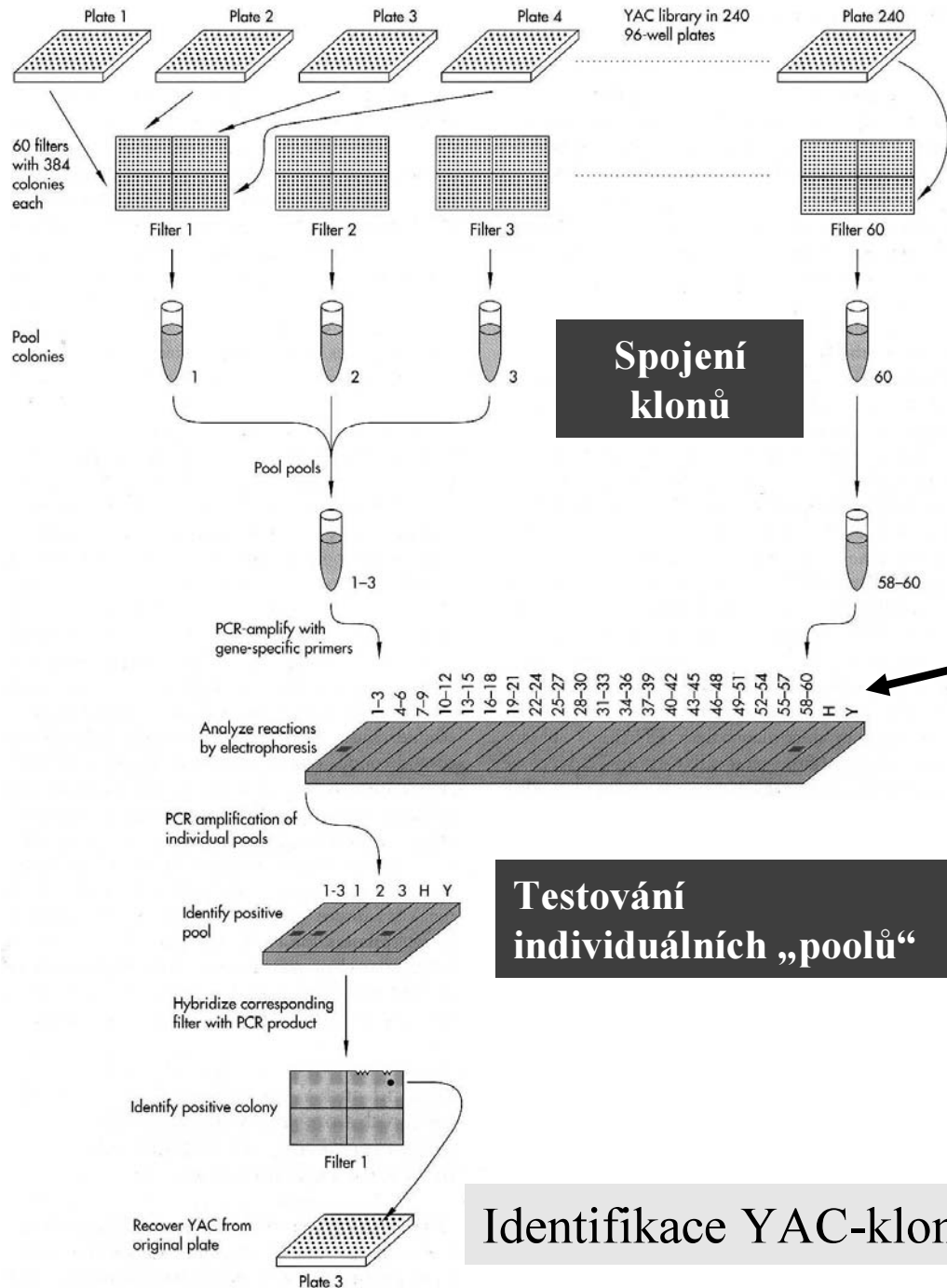
Modelově u HSV

Klonování ve kvasinkových umělých chromozomech (YACs)



Selekcce na TRP a URA

Vyhledání specifických genů v YAC-klonech pomocí PCR



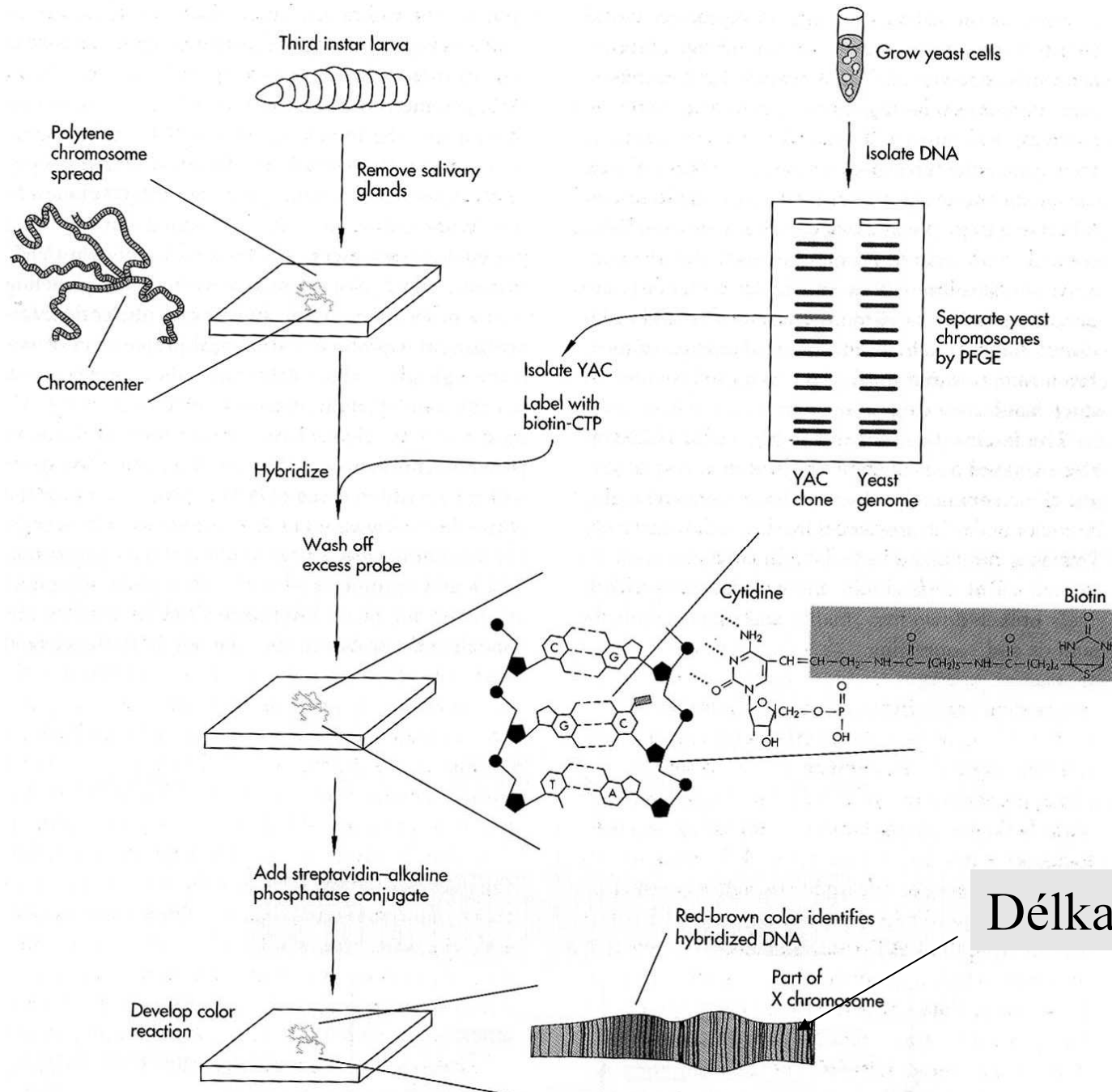
240 destiček po 96 komůrkách,
přenos 4 destiček na jeden filtr

Kontroly:

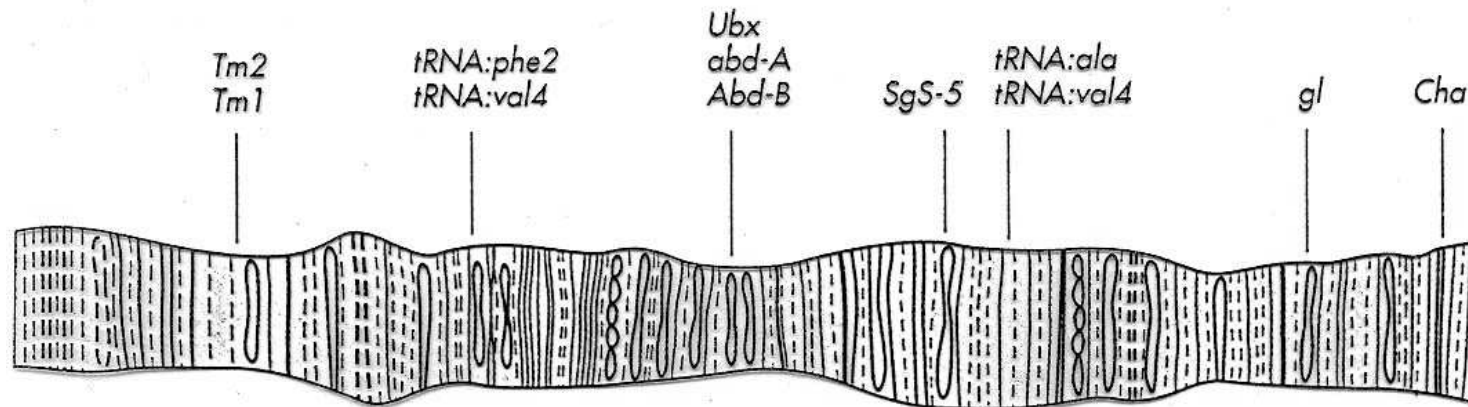
H = celková lidská DNA
Y = kvasinková DNA

Identifikace YAC-klonu obsahujícího hledaný gen

Mapování YAC-klonů na polyténických chromozomech drosofilu

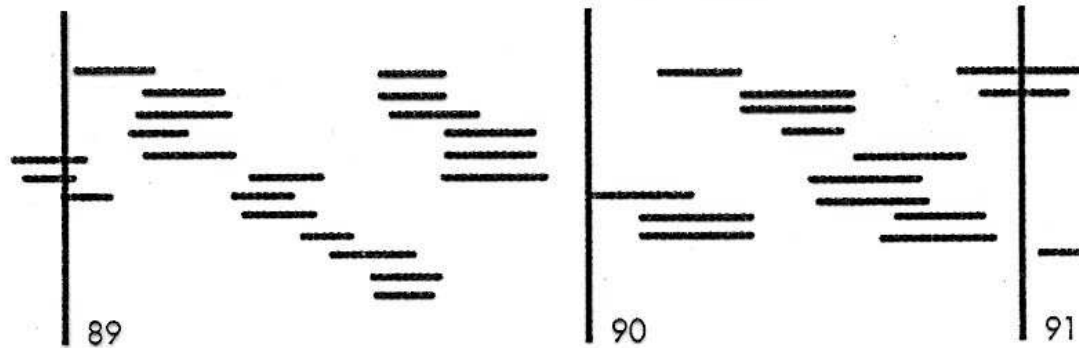


Polohy YAC-klonů drosofilu mapovaných na polytenním chromozomu



Genetická
mapa

polytenní
chromozom 3



polohy YAC-
klonů

Další možnosti

PCR *in situ*

restrikční mapování *in situ*

STS = místo se sekvenční adresou

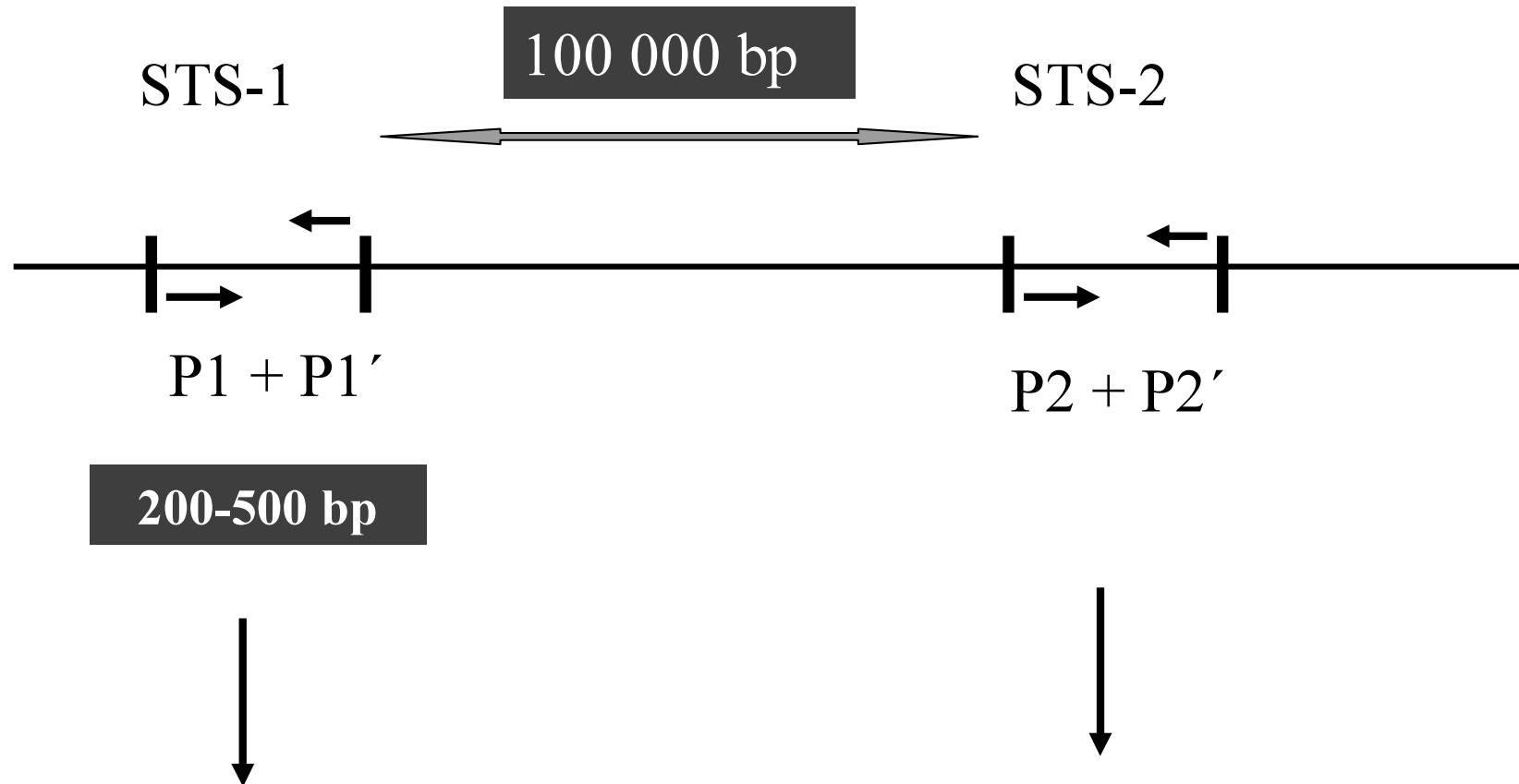
STS - jakákoliv jedinečná sekvence DNA, která splňuje tato kritéria:

1. Musí být známa její sekvence, aby mohly být připraveny primery pro PCR k testování přítomnosti STS na různých fragmentech.
2. Musí mít na chromozomu jedinečnou lokalizaci (případně v celém genomu)

Typy STS:

- A. **Expressed sequence tags (ESTs)**. Krátké sekvence získané analýzou klonů cDNA. Představuje sekvenci jedinečného genu (ne rodiny genů, v níž mají geny stejné nebo velmi podobné sekvence).
- B. **Mikrosatelity a další SSLP (single sequence length polymorphisms)** – skupiny repetice vykazující délkovou variaci (různé alely obsahují různý počet jednotek repetice). Patří mezi ně VNTR (minisatelity) a mikrosatelity neboli simple tandem repeats (STRs, di-, tri- nebo tetranukleotidové jednotky)
- C. **Náhodné genomové sekvence** získané sekvencováním náhodných úseků klonované genomové DNA, a nebo jednodušeji vyhledáváním sekvencí uložených v databázích.

Využití STS k mapování genomů

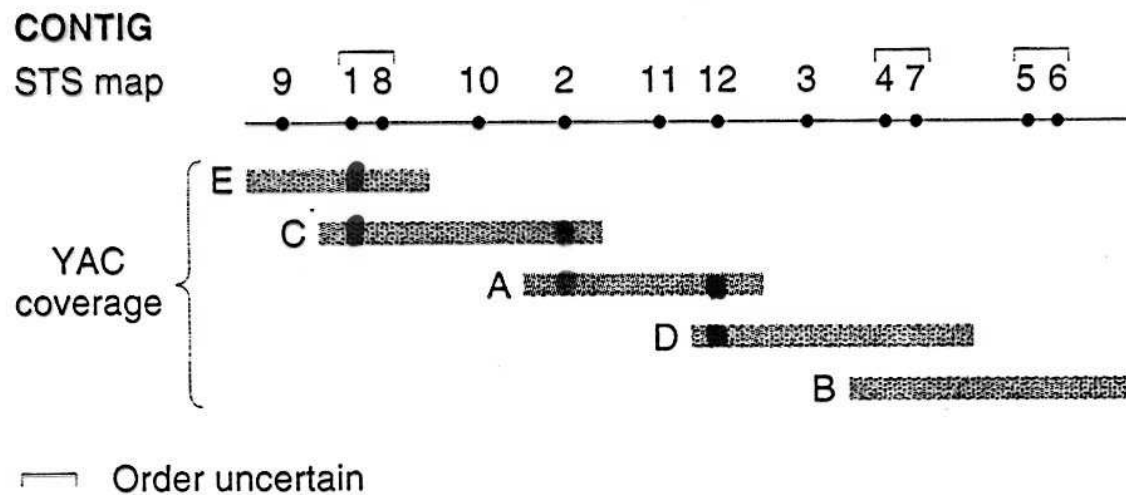


Identifikace STS v klonech, srovnání se sekvencí v databázích

Použití STS k uspořádání překrývajících se YAC-klonů

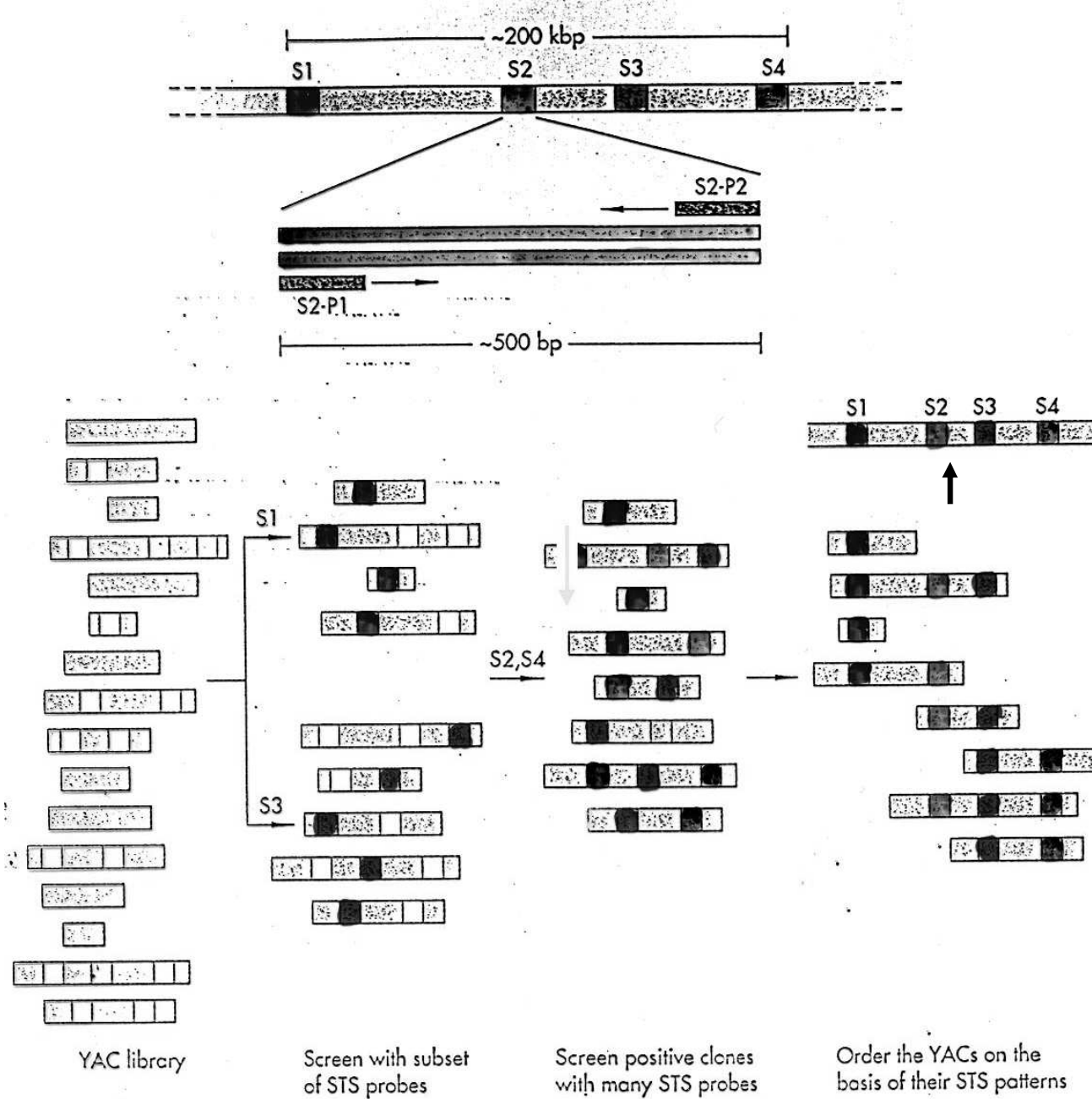
STs (Sequence-tagged sites)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
D	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
E	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

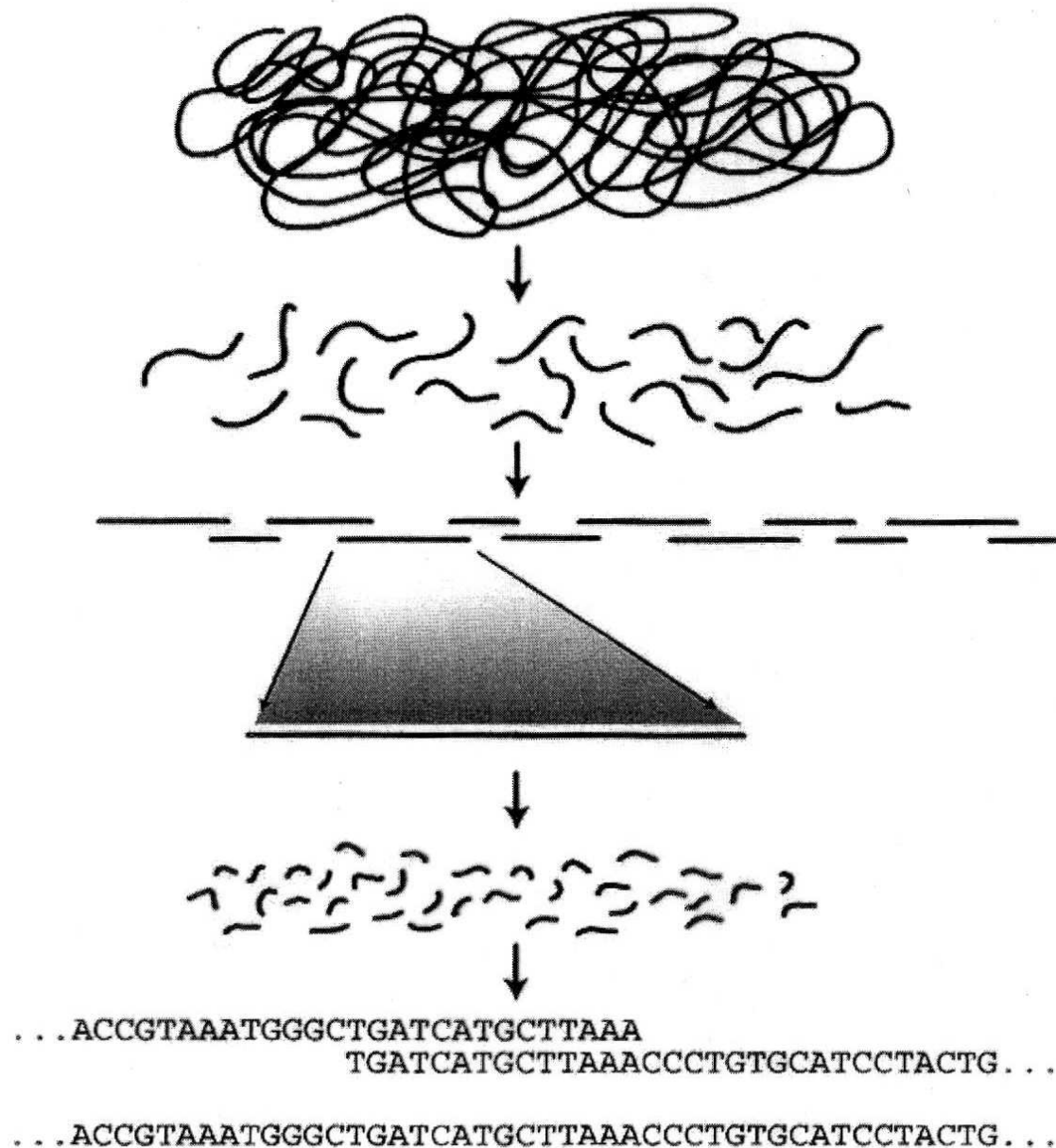


Nejasné pořadí

Uspořádání YAC klonů pomocí STS



Strategie sekvencování genomů



Genomová DNA



BAC knihovna



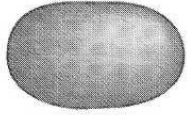
uspořádání do
kontigové mapy



příprava náhodných
klonů a stanovení
jejich sekvence

Postup použitý při stanovení sekvence genomu *H. influenzae*

Haemophilus influenzae



1,83 Mb

„shotgun approach“



Strategie mapování lidského genomu STC-BAC sekvencování

3000 Mb

lidský genom - DNA všech chromozomů



300 000 klonů v BAC vektorech po 150 kb
(15-ti násobná redundance klonů)



stanovení sekvence 500 bp obou konců inzertu každého klonu

STC = spojky se sekvenční adresou

STC = sequence tagged connectors

stanovení kompletní sekvence jednoho BAC klonu

Subklonování do vektoru
M13, uspořádání klonů

vyhledání překrývajících se BAC klonů



20 000 úsporně se překrývajících BAC klonů pokrývajících
celý lidský genom

stanovení sekvence jednotlivých BAC klonů

získání kompletní spojitě sekvence