

Molekulární identifikace

jedinec, pohlaví

Identifikace jedince - metody

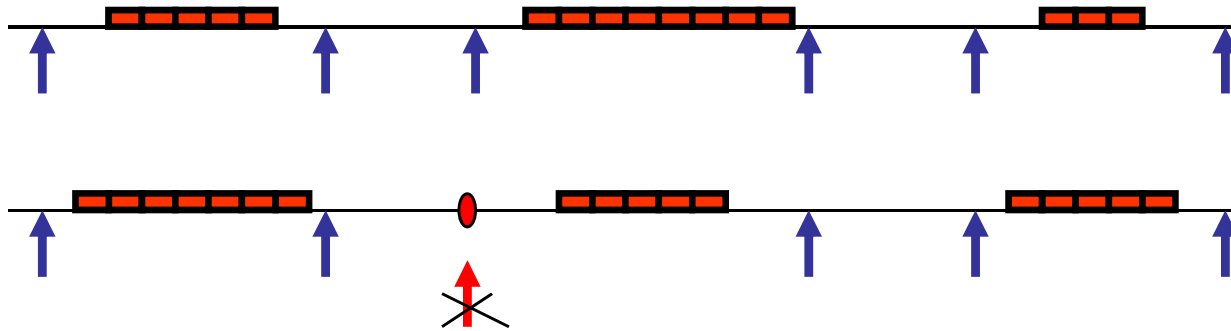
- **DNA fingerprinting (název dnes používán pro různé metody)**
 - velké množství kvalitní DNA
 - technická náročnost
 - +univerzalita
- **AFLP (RAPD)**
 - kvalitní nedegradovaná DNA
 - +univerzalita
- **Sekvenování, alozomy**
 - nemusí rozlišit jedince
- **Mikrosatelity**
 - + stačí malé množství nekvalitní DNA, **optimální pro neinvazivní přístupy**
 - je nutné znát konkrétní lokusy a sekvence specifických primerů

RFLP a AFLP

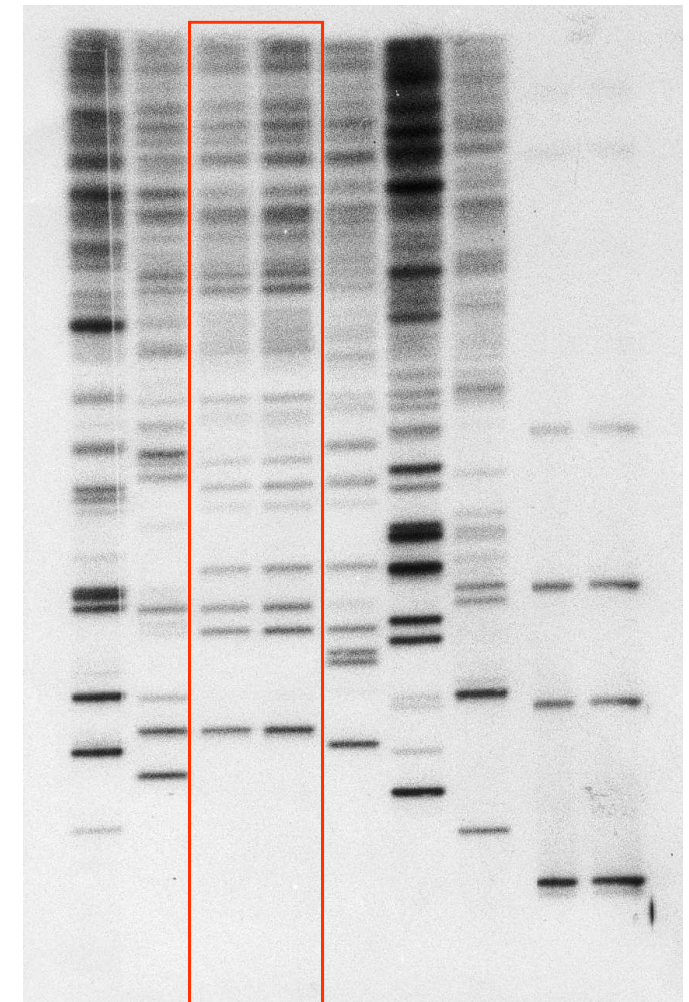
- Základem je naštípání DNA restrikčními enzymy
- → milióny fragmentů různé délky
- Rozdíly díky:
 - přítomnosti/absenci restrikčních míst
 - tandemovým opakováním (mikrosatelity, minisatelity)
 - delece a inzerce
- Zviditelnění jen určité části fragmentů

DNA fingerprinting

Sir
Alec Jeffreys

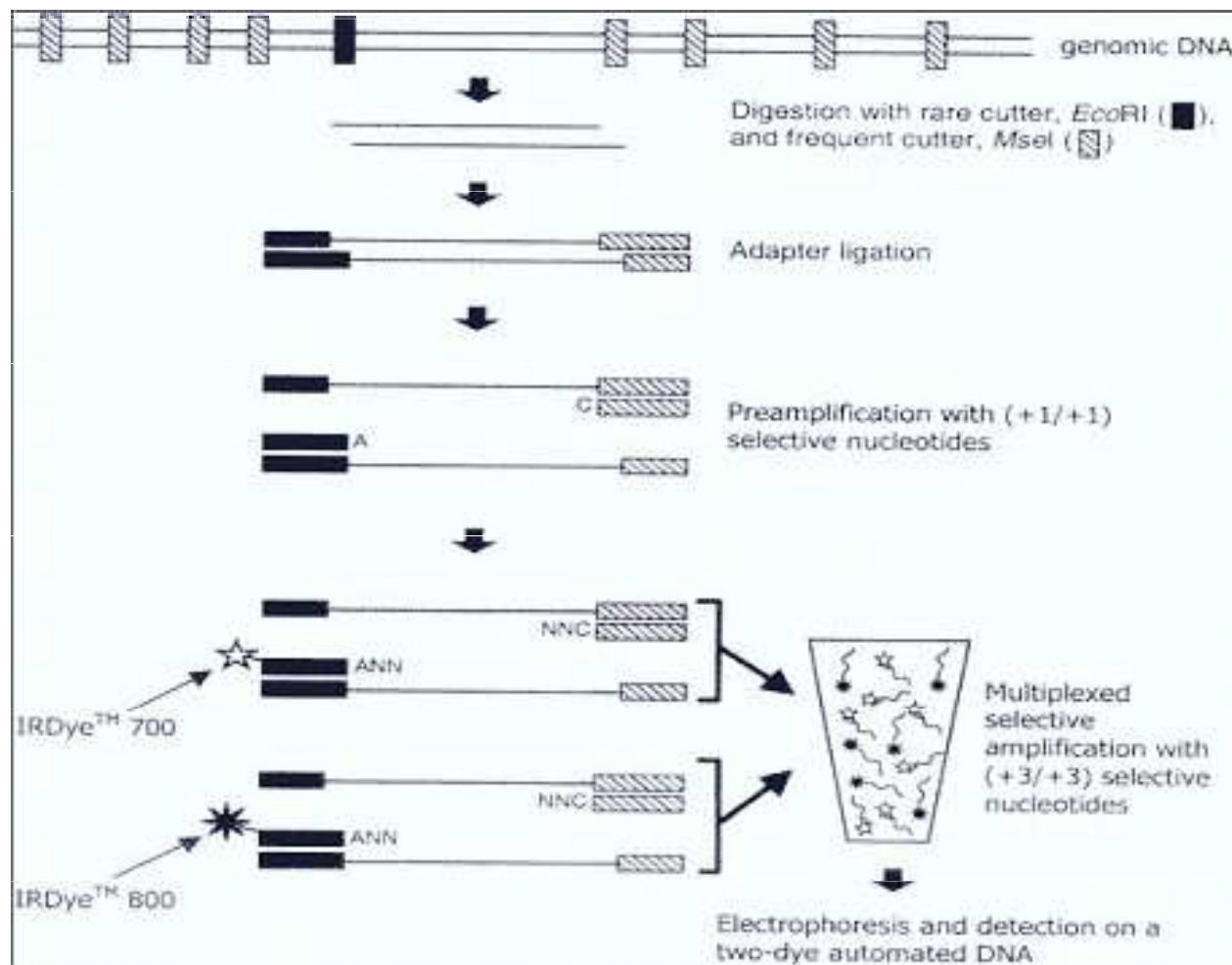


- Jeffreys et al. 1985
 - „naštípání“ DNA pomocí restričního enzymu
 - Rozdělení fragmentů pomocí elektroforézy
 - Hybridizace (jako sonda minisatelit, např. Alu)
- Dostatek kvalitní DNA
- Vše na jednom gelu
- Laboratorní náročnost



AFLP

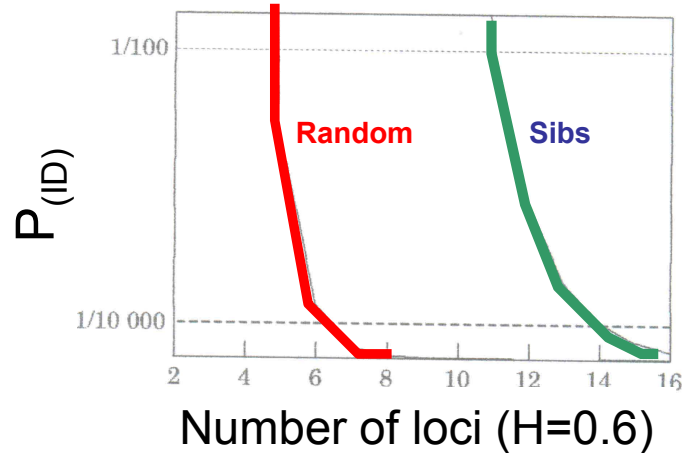
- Naštípání DNA restrikcími enzymy
- Navázání adaptérů
- Amplifikace primery o nukleotid delšími než je adaptér (jinak sekvence komplementární k adaptéru)
- Amplifikace primery o nukleotid delšími než je adaptér (jinak sekvence komplementární k adaptéru)
- Amplifikace značenými primery o 3 nukleotidy delšími než je adaptér
- Detekce – gely, sekvenátor



Identifikace jedinců závisí na stupni polymorfismu

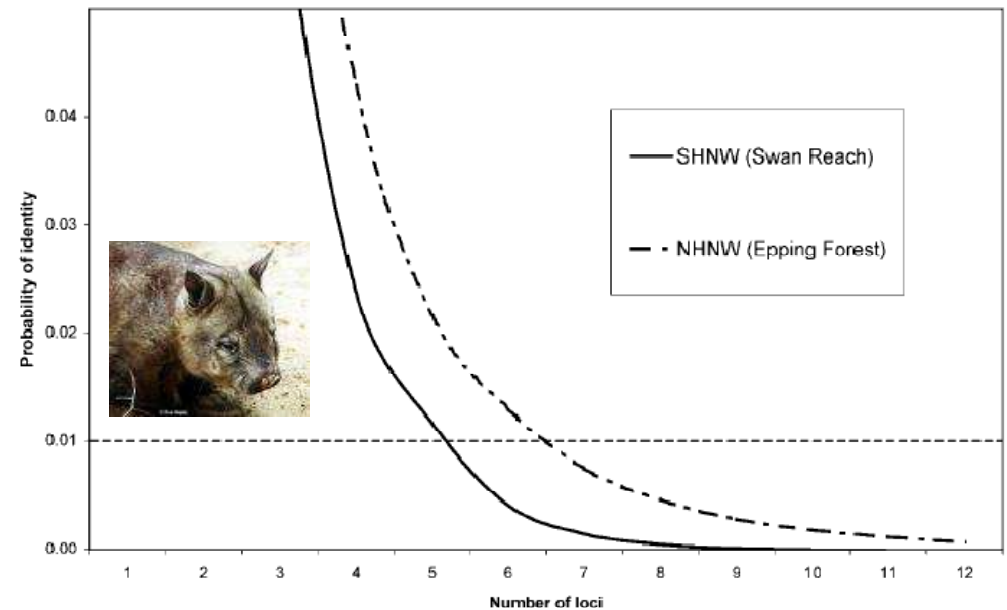
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ($P_{(ID)}$) (Waits et al. 2001)

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2 p_i p_j)^2$$



$$P_{(ID)sib} = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5(\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4)$$

- pilot studies with tissue samples are required to identify $P_{(ID)}$ in a studied population





Medvědi v Pyrenejích

Taberlet et al. 1997



- Trus a chlupy
- 24 mikrosatelitových lokusů
- 4 samci a jedna samice (o jednoho víc než podle stop a fotografií)
- Riziko „allelic dropout“ (u heterozygotů detekce jen jedné alely → falešní homozygoti)
- Multiple-tube approach, mnohonásobné opakování PCR reakcí

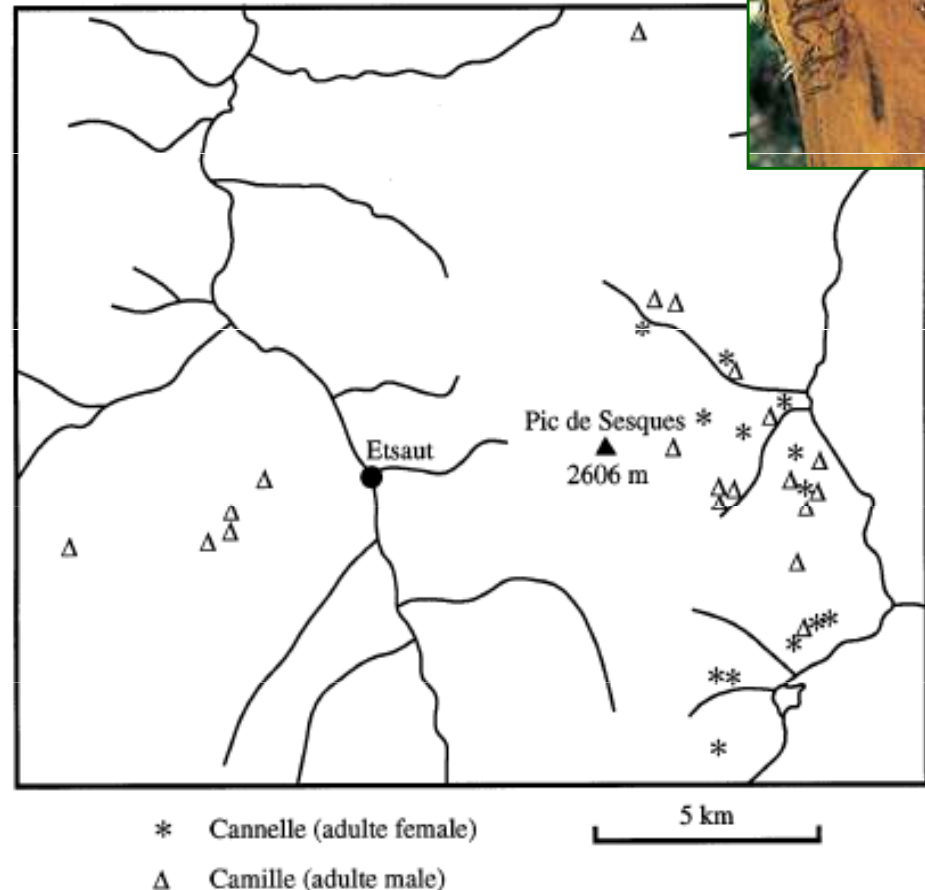


Fig. 3 Home range of two Pyrenean brown bears obtained by noninvasive genetic sampling and genotyping.

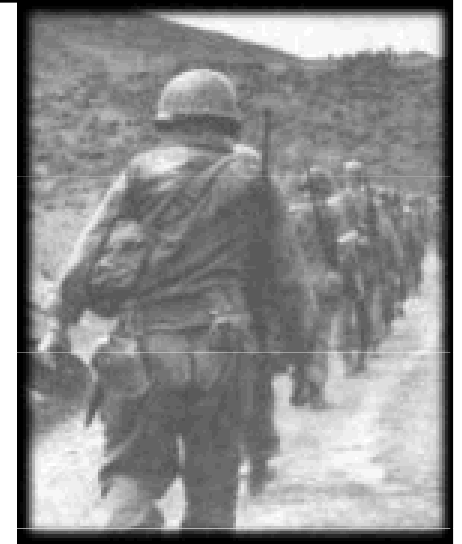
Lidská forenzní genetik

- **Pozůstatky vojáků z války** Vietnam a Korea

Identifikace na základě mtDNA příbuzných osob
(Ize jen někdy)

V současnosti: vzorek DNA (krve) při odvodu, jiné markery

Armed Forces Repository of Specimen Samples for the Identification of Remains



- **Soudní pře**
Clinton-Lewinská
Pozůstatky ruského cara Nikolaje II

- **Kriminalistika**

- **Oběti tragických událostí**



Klony

Bambus *Sasa senanensis*

- Suyama et al. 2000
- Plocha 10 hektarů
- AFLP
- 22 klonů
- Klon na ploše 300 m v průměru



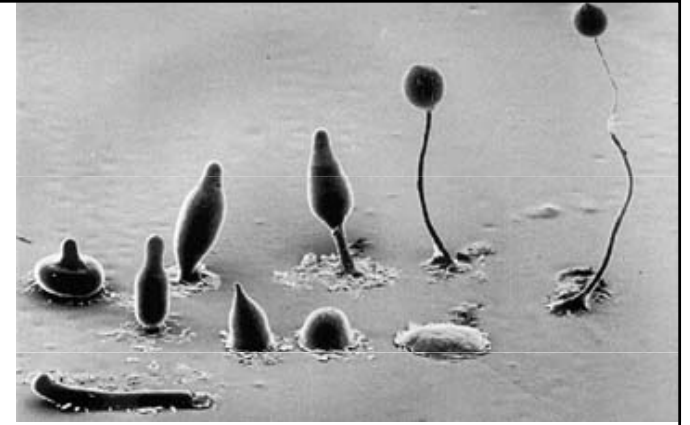
Slavní klonální bezobratlí

- Rotifera – Bdelloidea
- Ostracoda
(*Darwinula*)
- Partenogenetické
klony vysokého stáří
(milióny let)

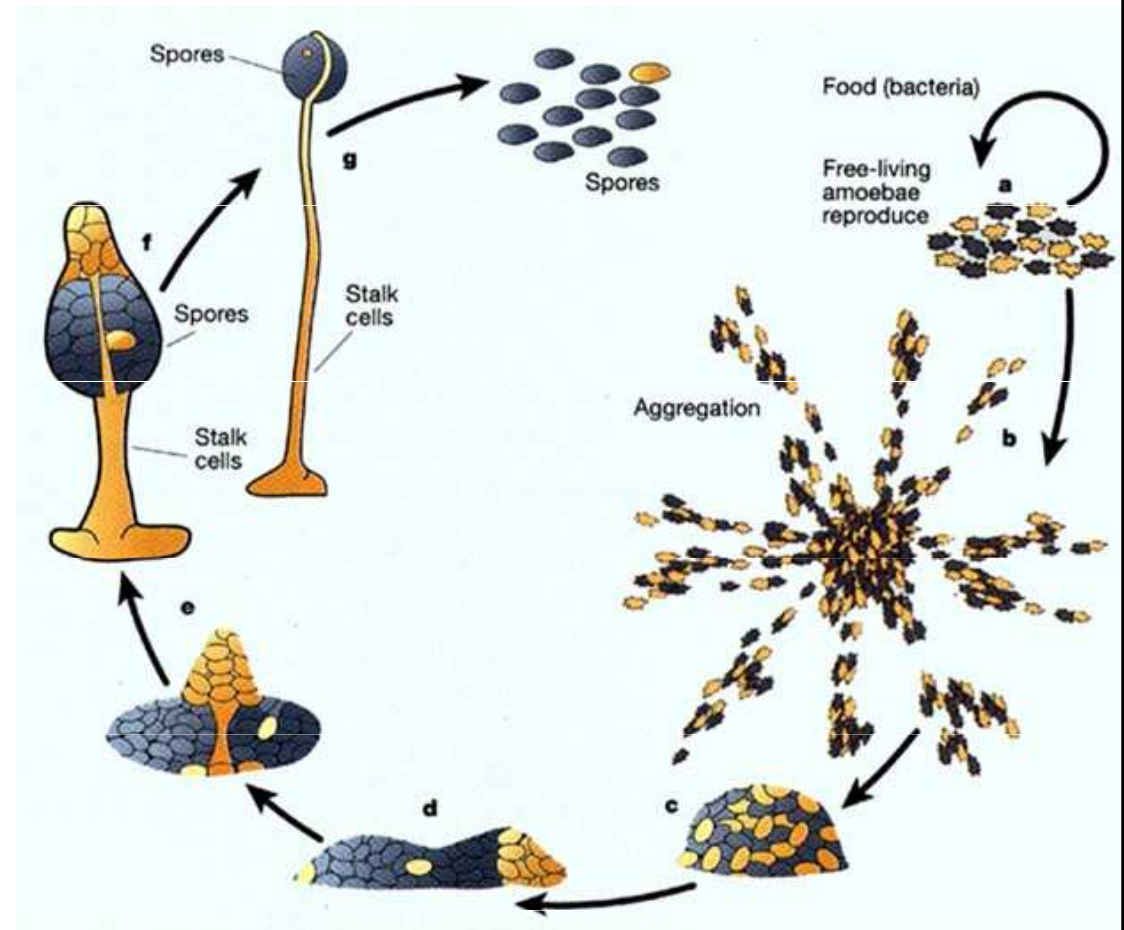


Darwinula stevensoni

Genetické chiméry

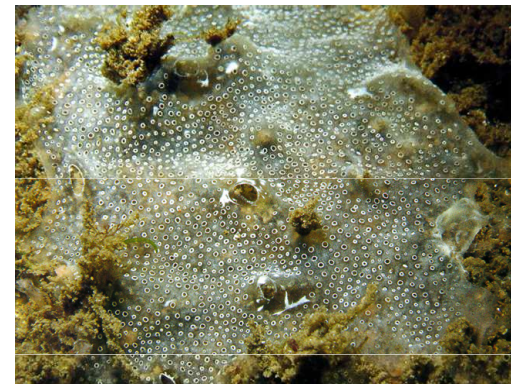
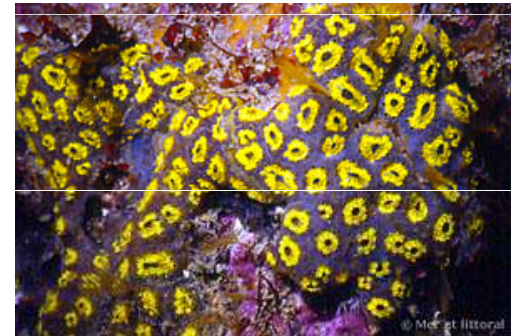


- organismy složené z buněk s různými genotypy
- *Dictyostelium discoideum*
chimérismus je pravidelná součást života



Genetické chiméry

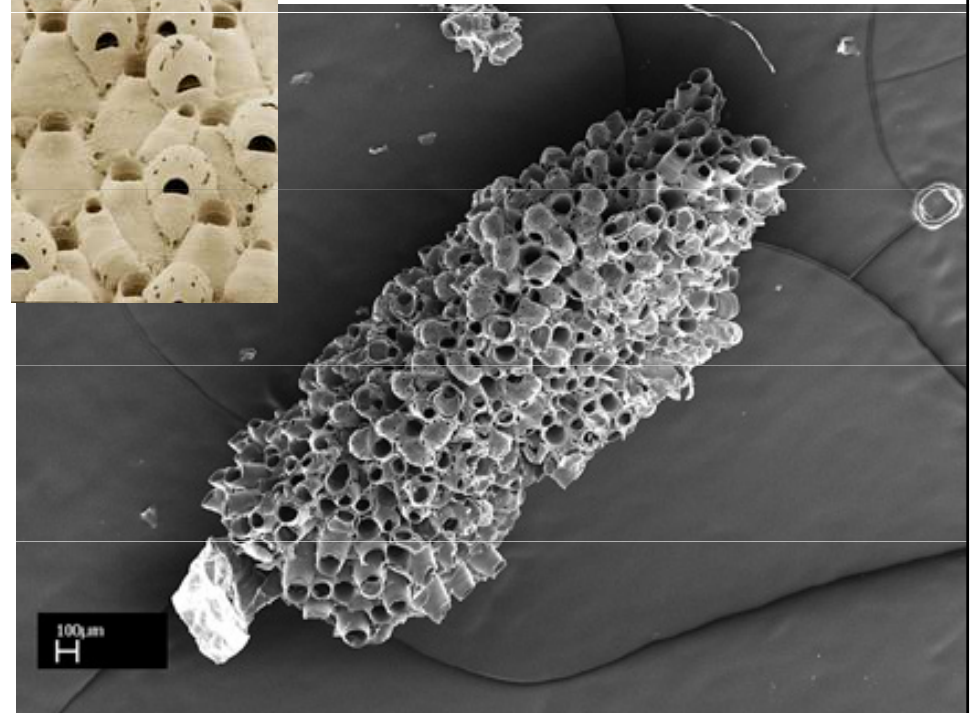
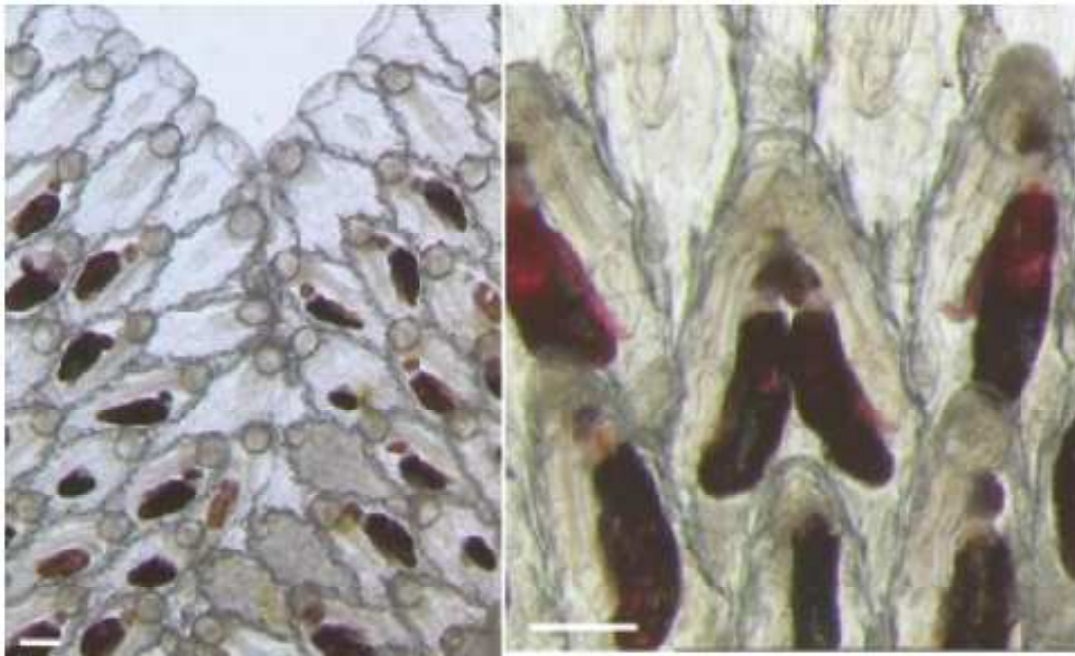
- *Ficus* srůst kořenů různých jedinců
- *Botryllus schlosseri*
chimérické kolonie
příbuzní jedinci
- *Diplosoma listerianum*
i nepřibuzní



Celleporella hyalina (Bryozoa)

Hughes et al. 2004

- Pravděpodobnost fúze koreluje s příbuzností
- Histokompatibilita
- Lepší rozpoznávání v pokročilejších fázích
→ dozrávání imunokompetence
- Speciální proteiny (spongikany...)



Genetické chiméry



- *Callithrix jacchus* (asi i *Saguinus*)
- Dizygotická dvojčata
- DNA fingerprinting krve
- Jsou to hematopoietické chiméry
- Během embryonálního vývoje vzájemná výměna buněk kostní dřeně
- Týká se to asi jen krve (neinvazivní metody – chlupy, trus → jeden genotyp)
- Průnik embryonálních erytroblastů a volné DNA přes placentu u člověka
- (pohlaví dítěte před narozením lze určit i pomocí PCR sekvencí typických pro Chr Y, jako templát periferní krev matky)

Genetická identifikace pohlaví

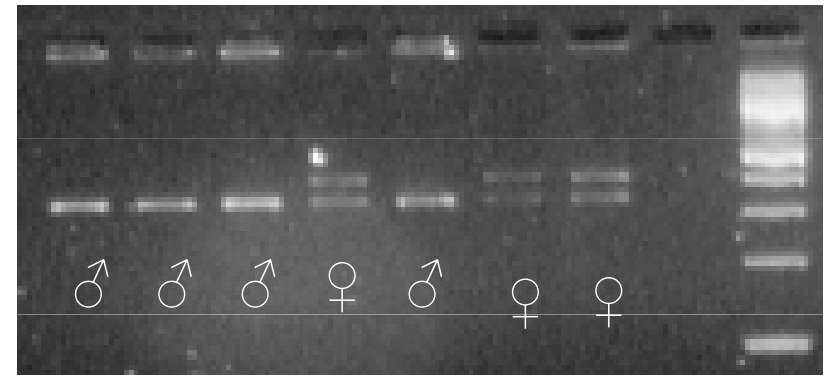
- 1) druhy s nevýrazným pohlavním dimorfismem (ptáci)
- 2) zárodky v ranném stádiu ontogeneze (embrya)
- 3) neinvazivní metody (trus, skořápky, šupiny)

Genetická identifikace pohlaví

- druhy s genetickou determinací pohlaví (tj. nejčastěji pohlavní chromozómy)
- ptáci ($\text{♂}=\text{ZZ}$, $\text{♀}=\text{ZW}$)
- savci ($\text{♂}=\text{XY}$, $\text{♀}=\text{XX}$)
- amplifikace DNA oblasti specifické pro heterogametické pohlaví
- W, Y – malé chromozómy

Určení pohlaví – ptáci

Griffith et al. 1998



- *CHD1W* a *CHD1Z*, geny na pohlavních chromosomech (chromobox-helicase-DNA-binding gene (CHD) – Griffiths & Tiwari 1995)
- Primery amplifikují introny obou genů
- Introny se mohou lišit délkou
- Existují už tři možnosti běžně používaných primerů
- Problematické druhy Struthioniformes



Manorina melanocephala

(Meliphagidae) *Arnold et al. 2001*

- Synové fungují jako pomocníci
- U adultů
2,31 samců na 1 samici
- Mláďata v hnízdě
poměr pohlaví 1:1 (57:57)
- První se líhnou samci
(v 17 hnízdech z 18)
Při opouštění hnízda jsou větší a těžší

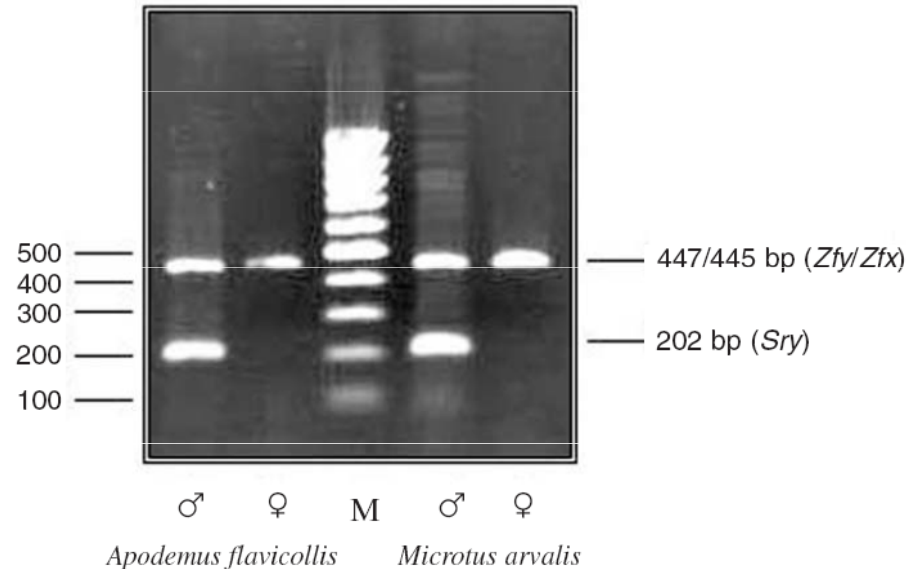


medosavka hlučná

Určení pohlaví - savci

- Amplifikace genu na Chr Y (*Sry*)
(nejlépe duplex PCR s genem na X nebo autosomech)

- *Sry* DNA-binding motif (HMG box)
velmi podobný u vačnatců i placentálů



Bryja a Konečný 2003

- *Microtus cabrerae*
Sry na Chr X
Ellobius, *Tokudaia*
Sry zcela chybí

M. cabrerae



Ellobius



Tokudaia osimensis



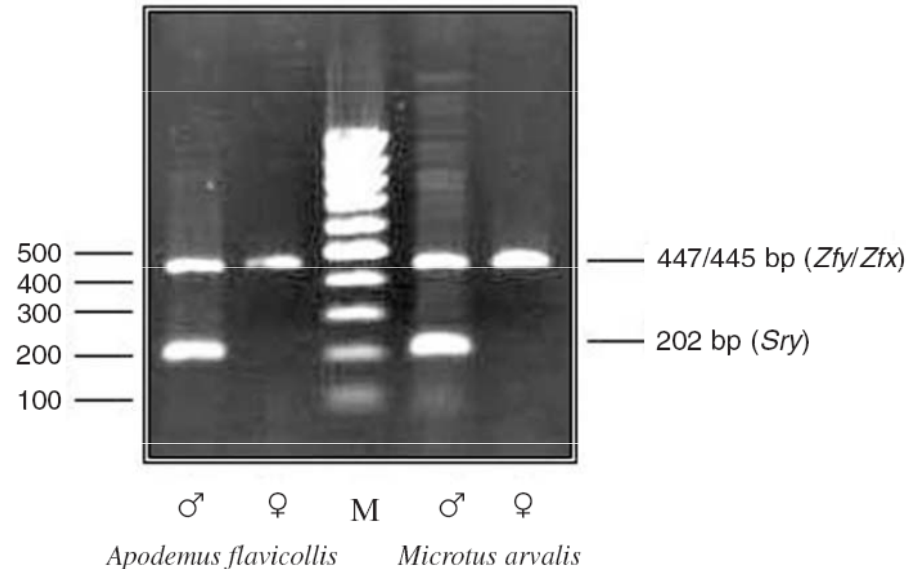
© 奄美野生生物保護センター

Určení pohlaví - savci

- Amplifikace genu na Chr Y (*Sry*)
(nejlépe duplex PCR s genem na X nebo autosomech)

- *Sry* DNA-binding motif (HMG box)
velmi podobný u vačnatců i placentálů

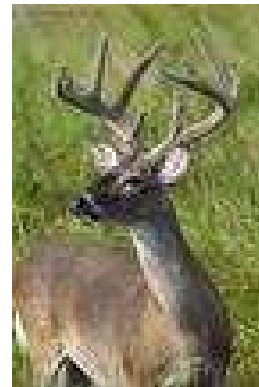
- Analýzy z trusu: nutno používat druhově specifické markery
(jinak cross-amplification s druhy tvořícími potravu)



Bryja a Konečný 2003



X



Murphy et al. 2003

Určení pohlaví – jiné skupiny

- Chr Y občas i u rostlin
Rumex
- Plazi
Calotes versicolor
Sry má i 50% samic!
- Hledání markerů pomocí nescifických metod (RAPD, AFLP)

