

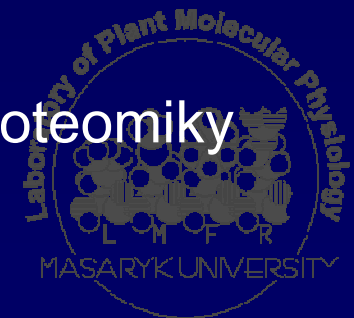
Základy genomiky

III. Přístupy reverzní a přímé genetiky



Jan Hejátko

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - fragmentační analýza a poziční klonování



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik



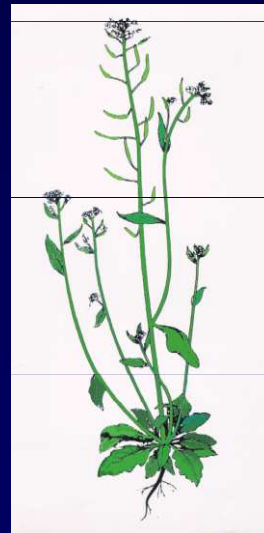
Přístupy „klasické“ genetiky *versus* „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

EMS

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU
2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ
3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování



hxn

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

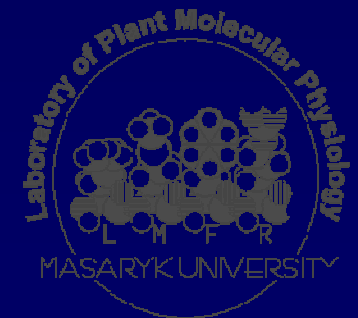
1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

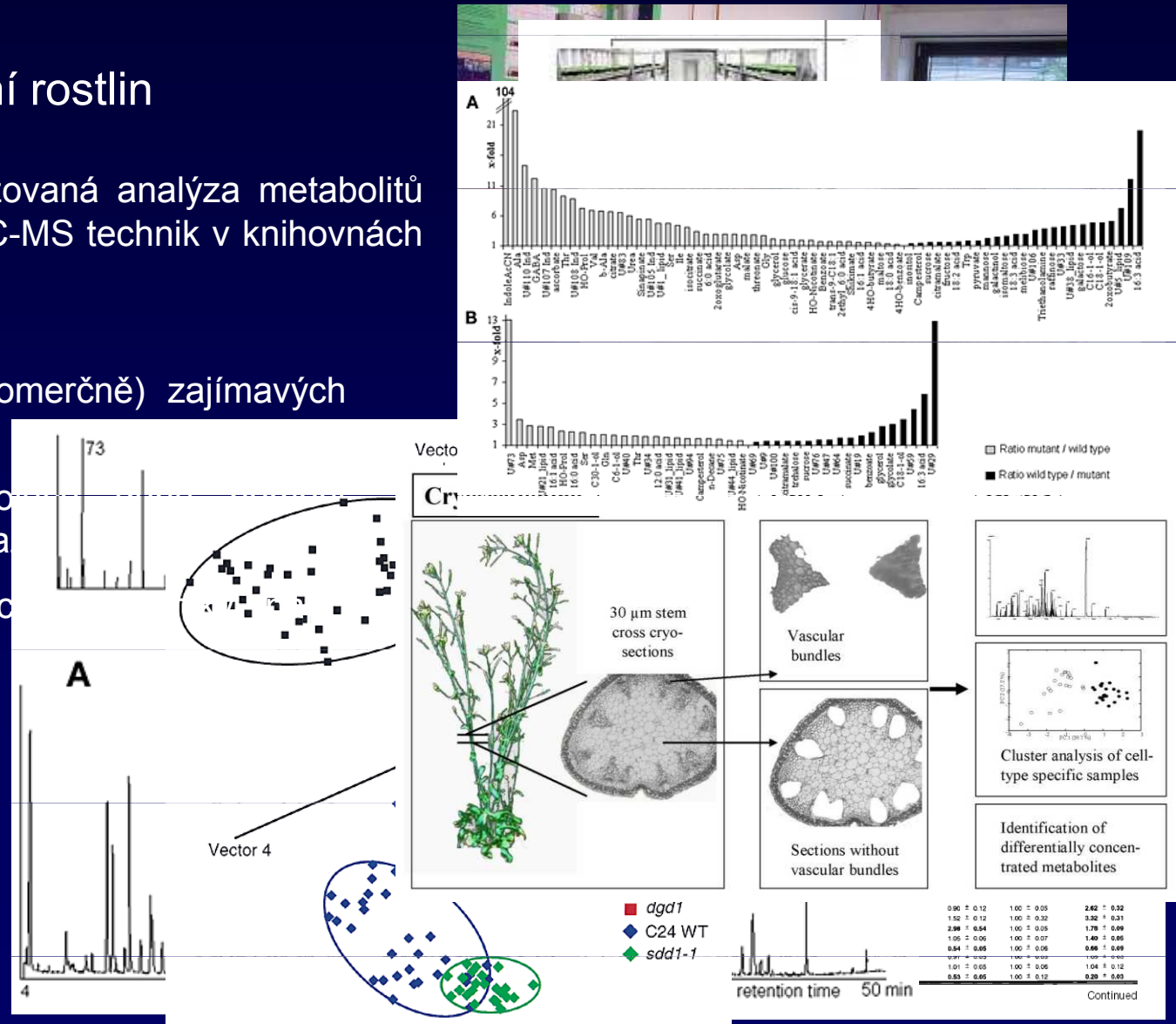
- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - fenotypu
 - metabolického profilu



Genomika II.

Přístupy genetiky přímé-metabolomika a metabolické profilování

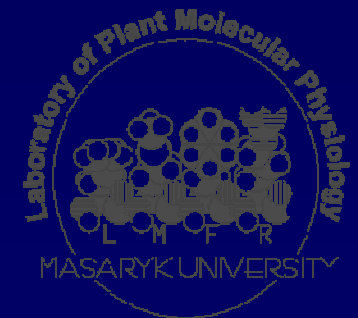
- Metabolické profilování rostlin
 - hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů
 - identifikace (např. i komerčně) zajímavých mutantů
 - snadná a rychlá izolace a identifikace T-DNA zasažených genů
 - možnost využít i speciální metody jako mikrodisekce



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

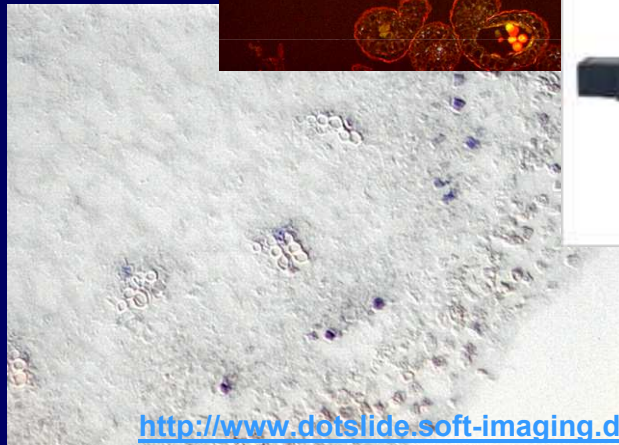
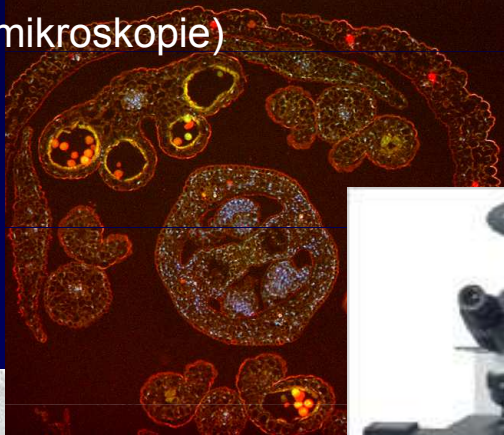
- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů a molekulárních markerů



Genomika II.

Identifikace mutantů se změnou expresního profilu

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

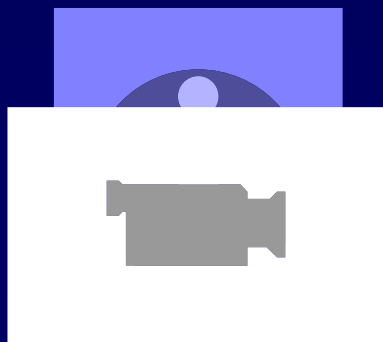


<http://www.dotslide.soft-imaging.de/Young%20Mouse%2020x/index.html>





.slide microscope



Genomika II.

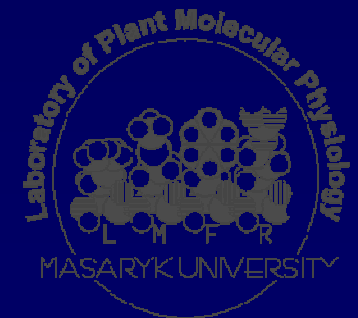
Identifikace mutantů se změnou expresního profilu



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

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

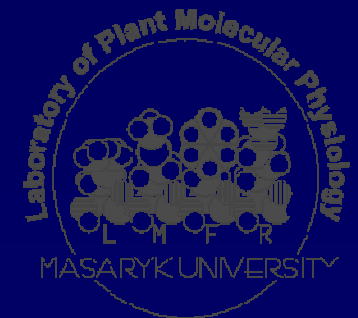


Genomika III.

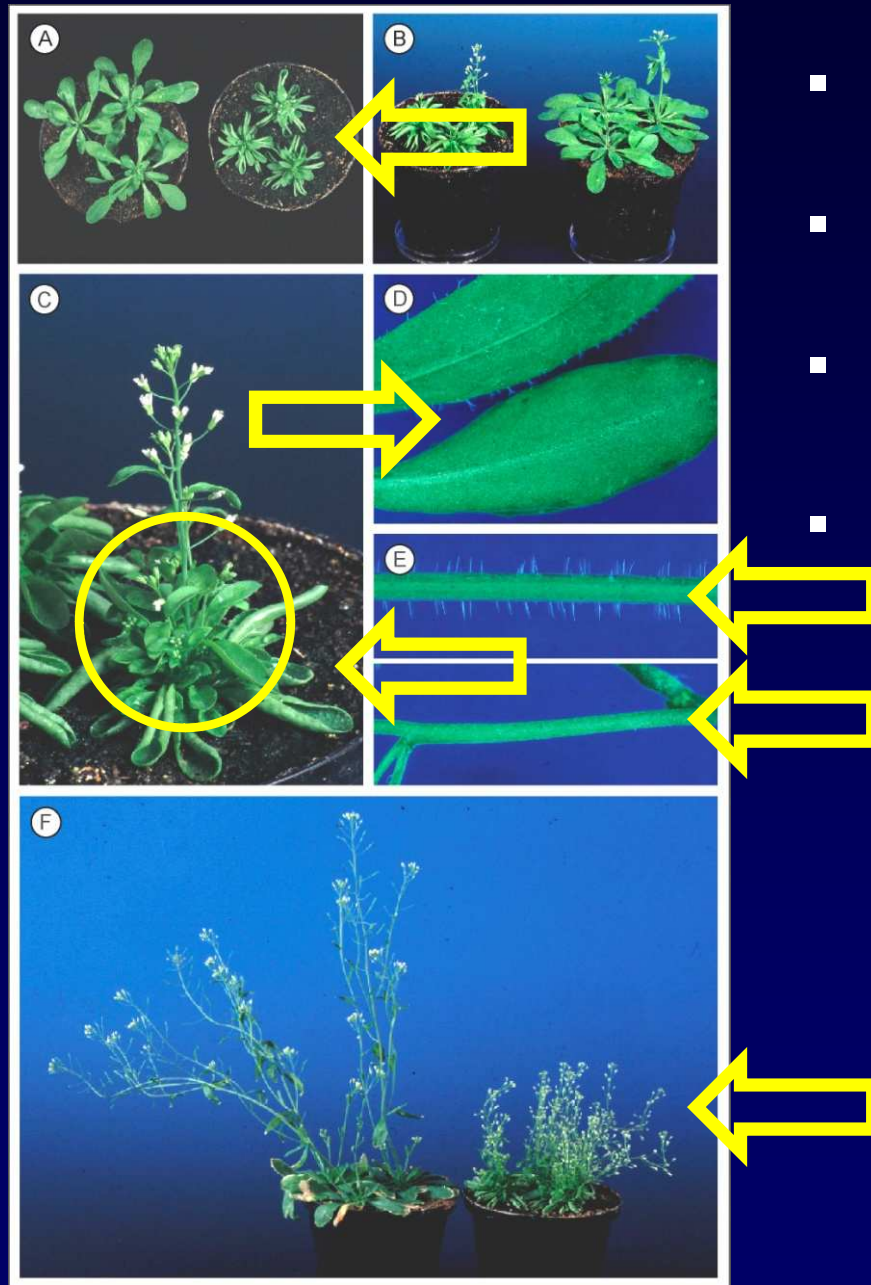
Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

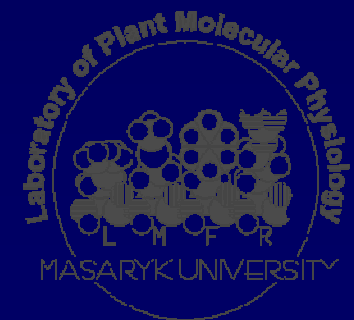
- popis fenotypu



Identifikace mutantního fenotypu

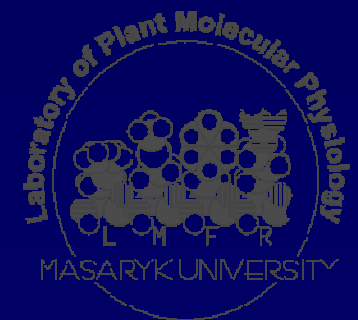
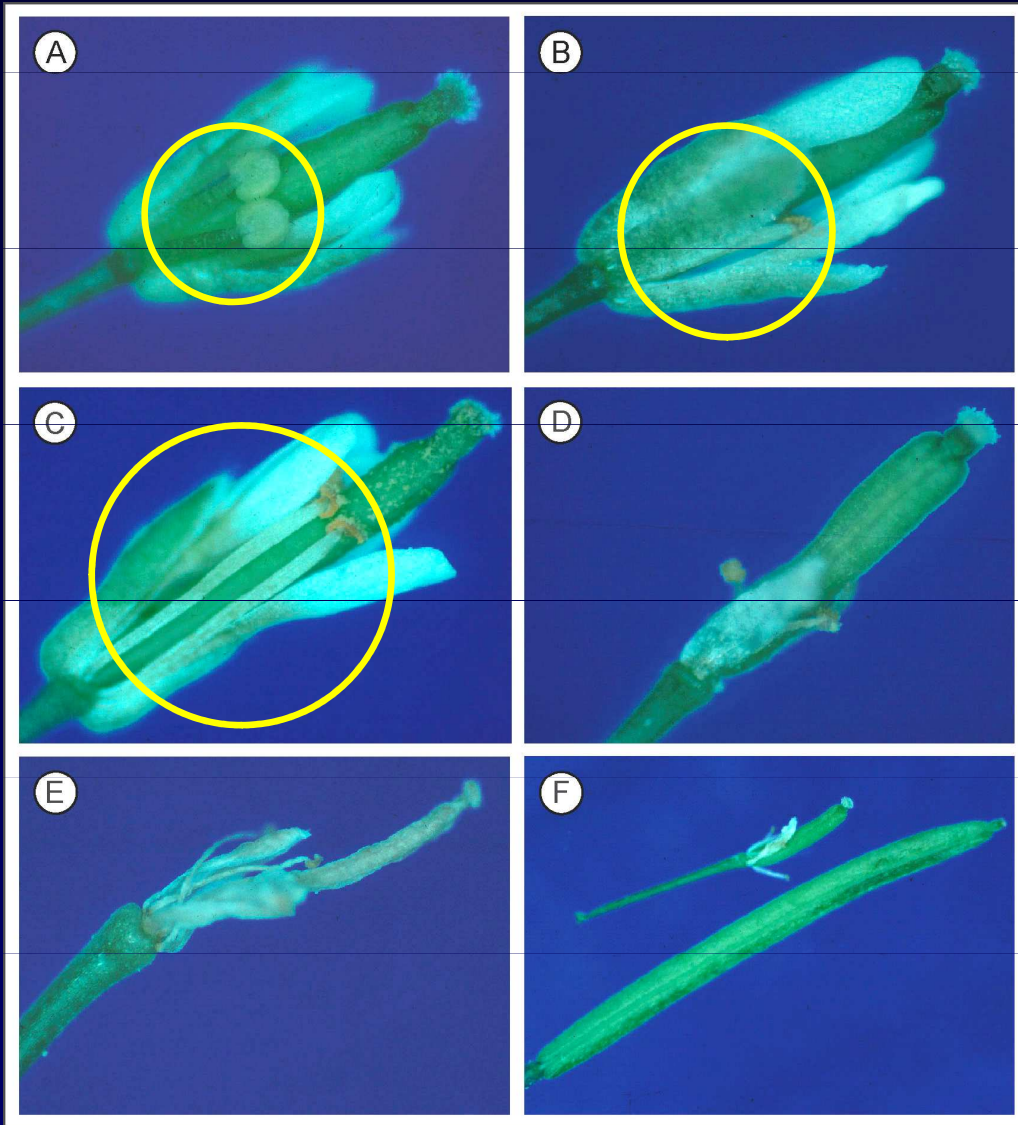


- zvlněné listy
- keříčkový fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí



The Mutant Phenotype Identification

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

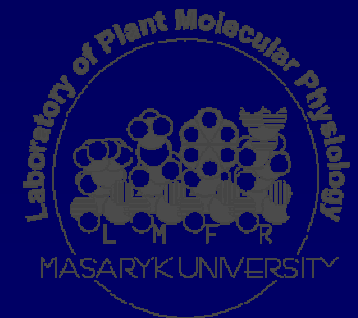


Genomika III.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutagenese

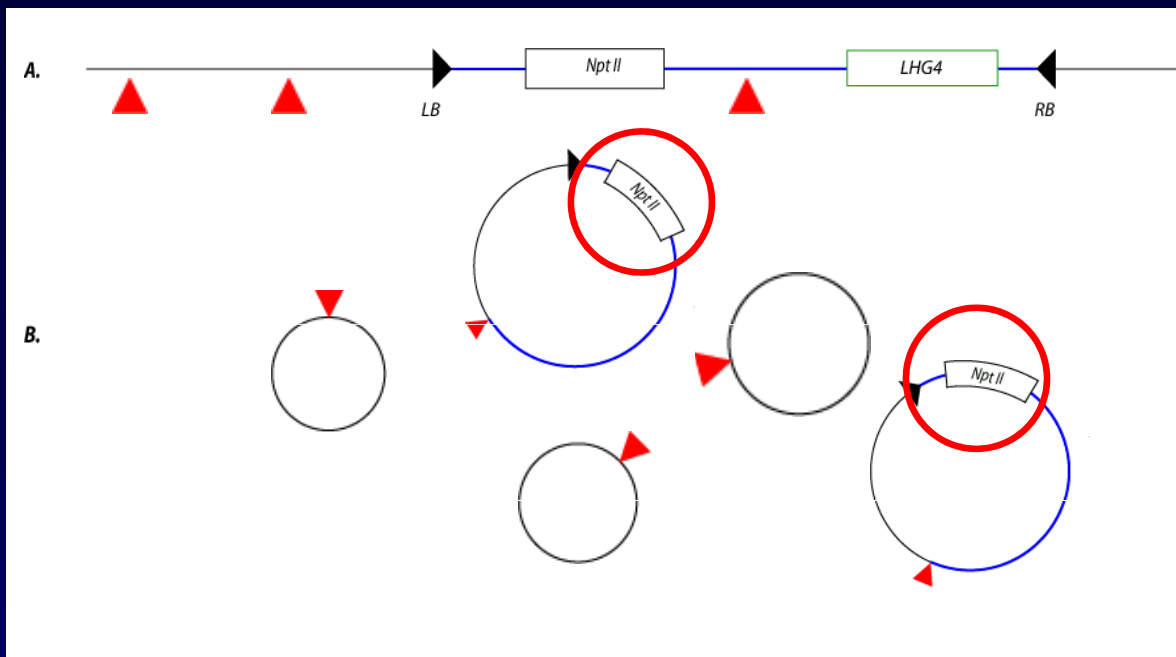
Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti

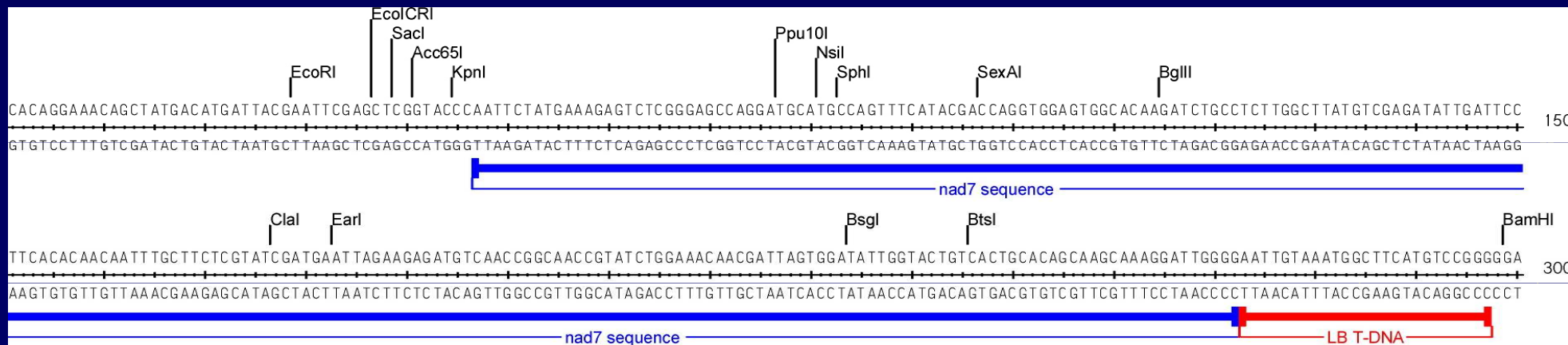


Mutant Locus Identification

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

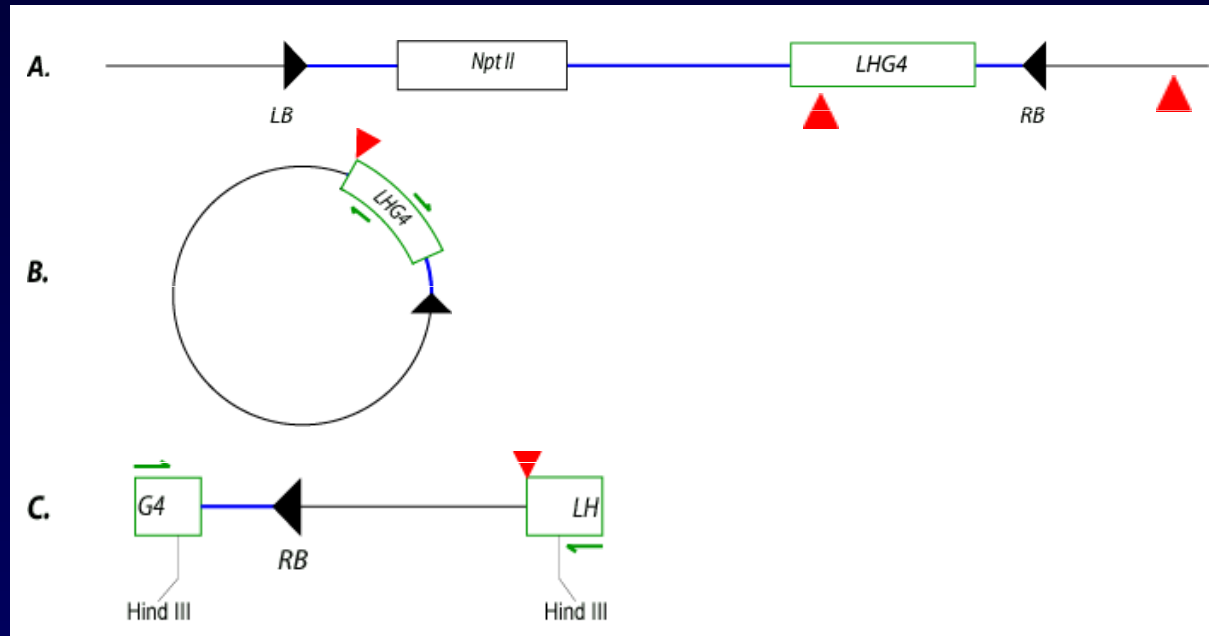


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence je identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

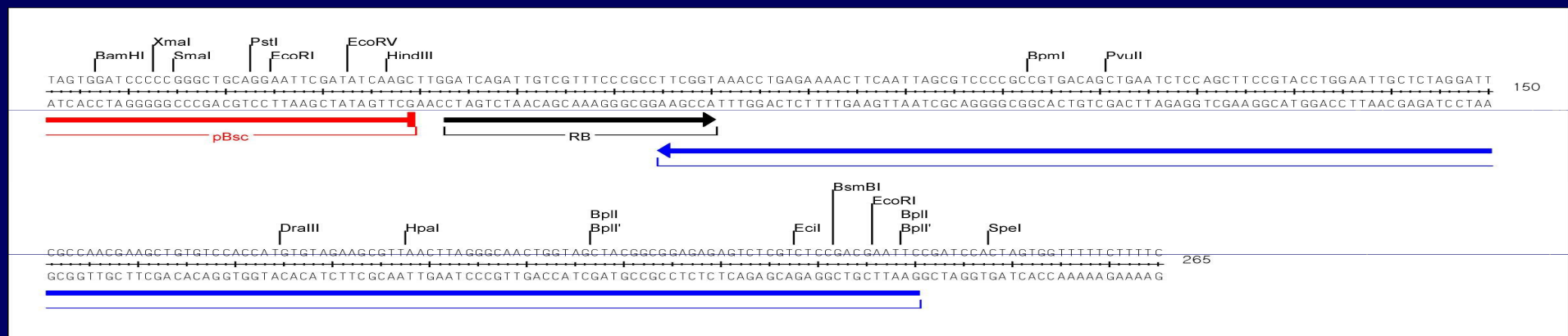


Mutant Locus Identification

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



Genomika III.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

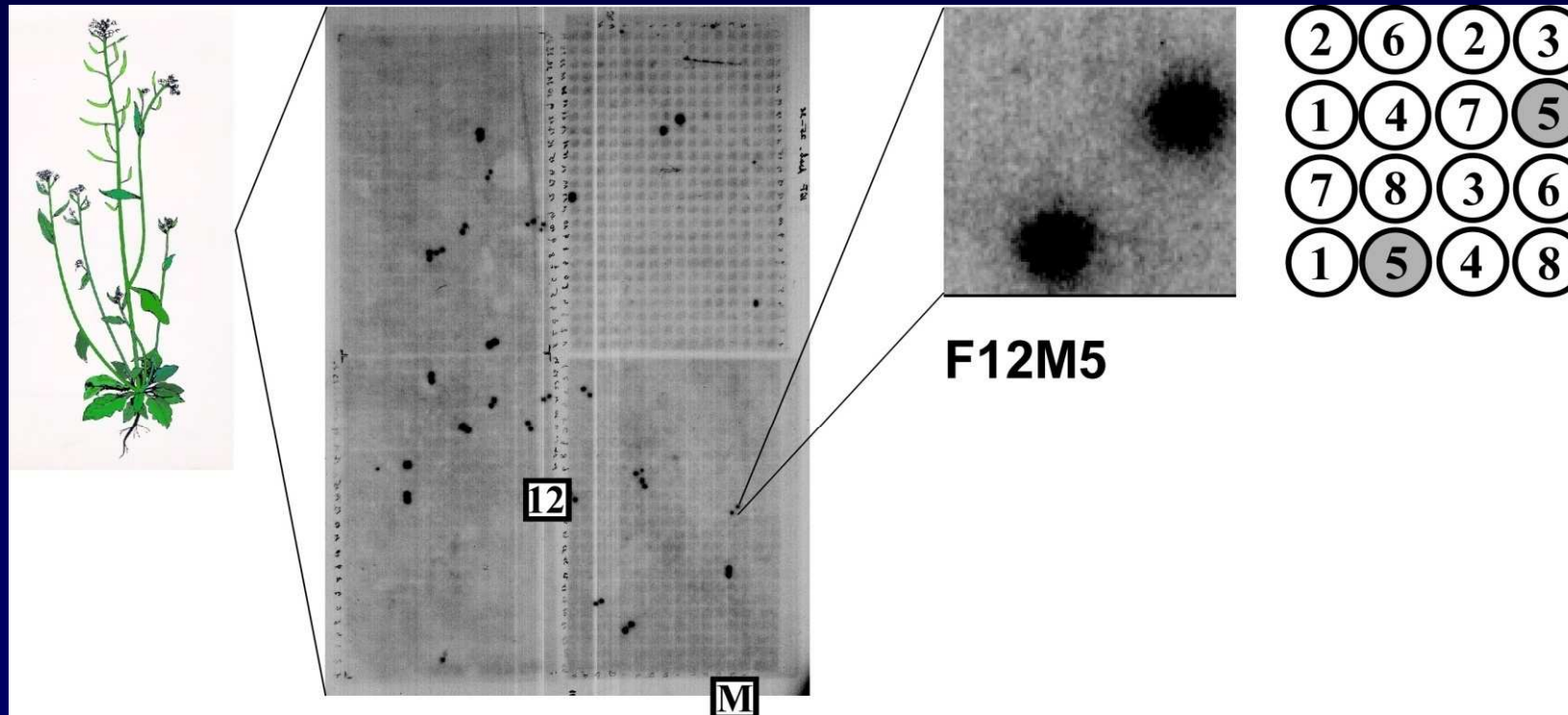
Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti
- lokalizace T-DNA inserce v genomu *Arabidopsis*



Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

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



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

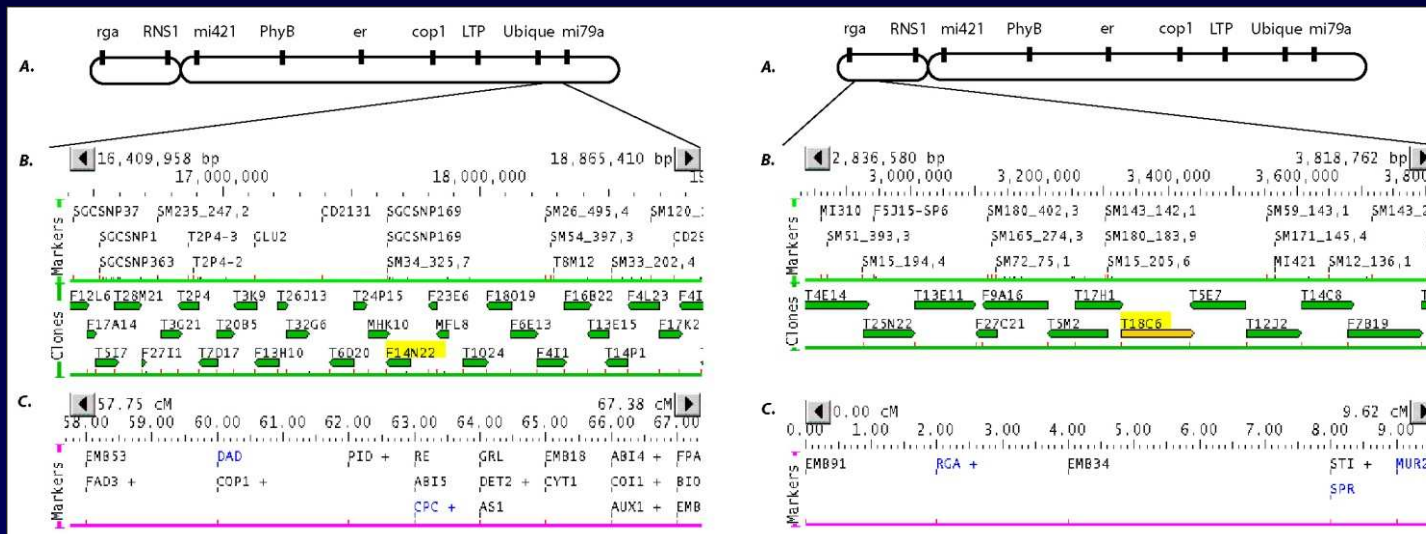
- celkem 6 pozitivně hybridizujících klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2



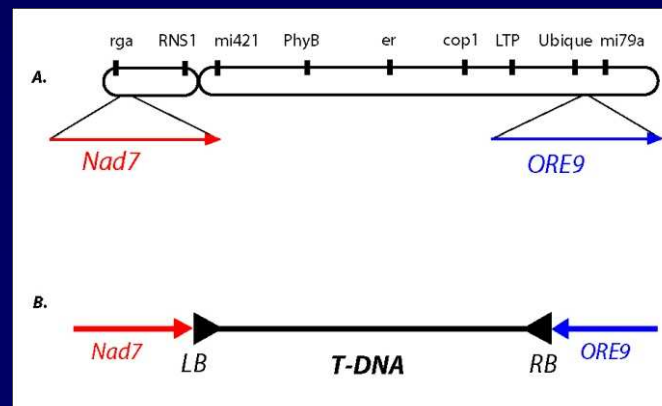
Lokalizace genomové T-DNA přiléhající k levé i pravé hranici T-DNA na chromozomu 2

Sekvence přiléhající k **pravé** a

levé hranici T-DNA



- pravděpodobně došlo k inverzi téměř celého chromozómu



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

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



Genomika II.

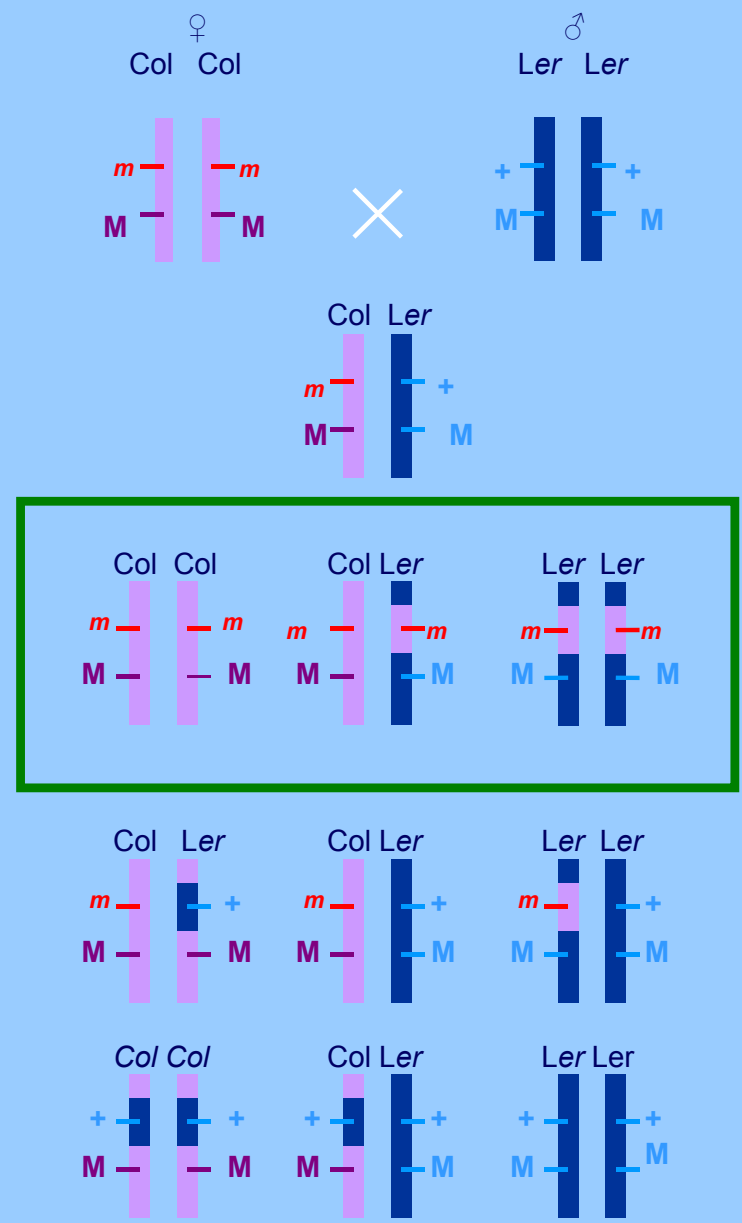
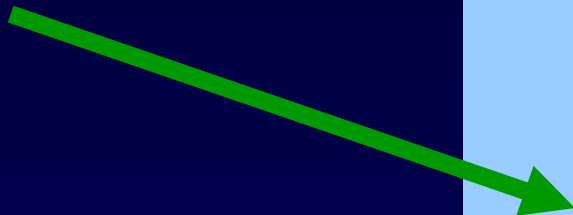
Přístupy genetiky přímé-fragmentační analýza a poziční (map-based) klonování

■ Poziční klonování

- podstatou je kosegregační analýza segregující populace (většinou potomstva informačního 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 ligaci 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
 - AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky fragmentů genu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)

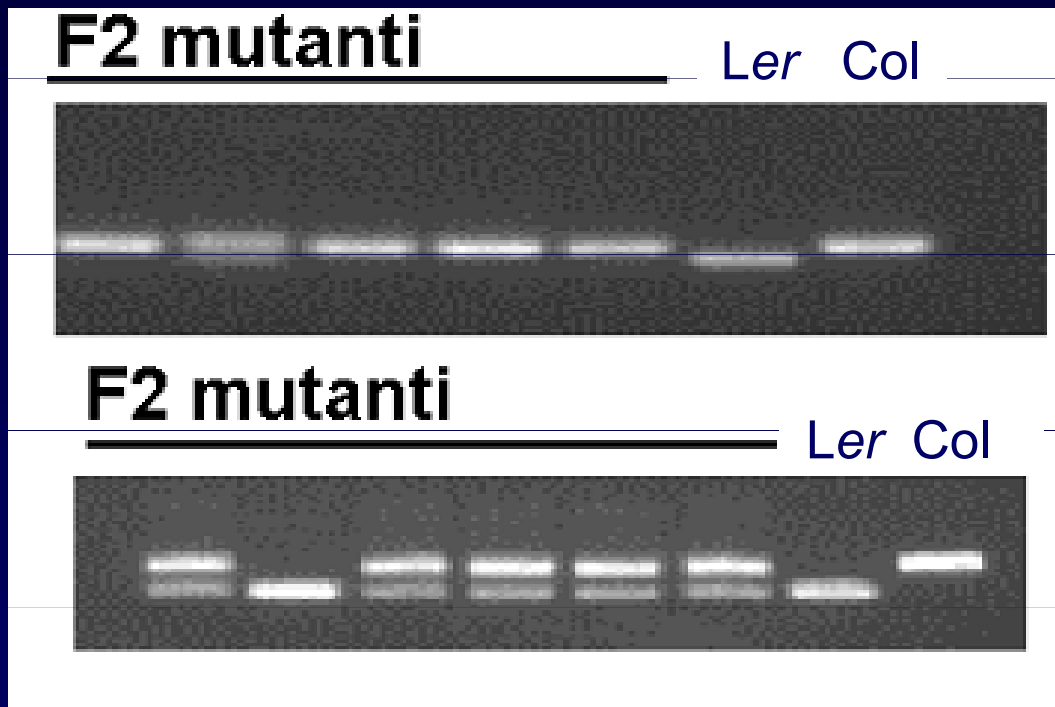


Příprava mapovací populace



Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

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



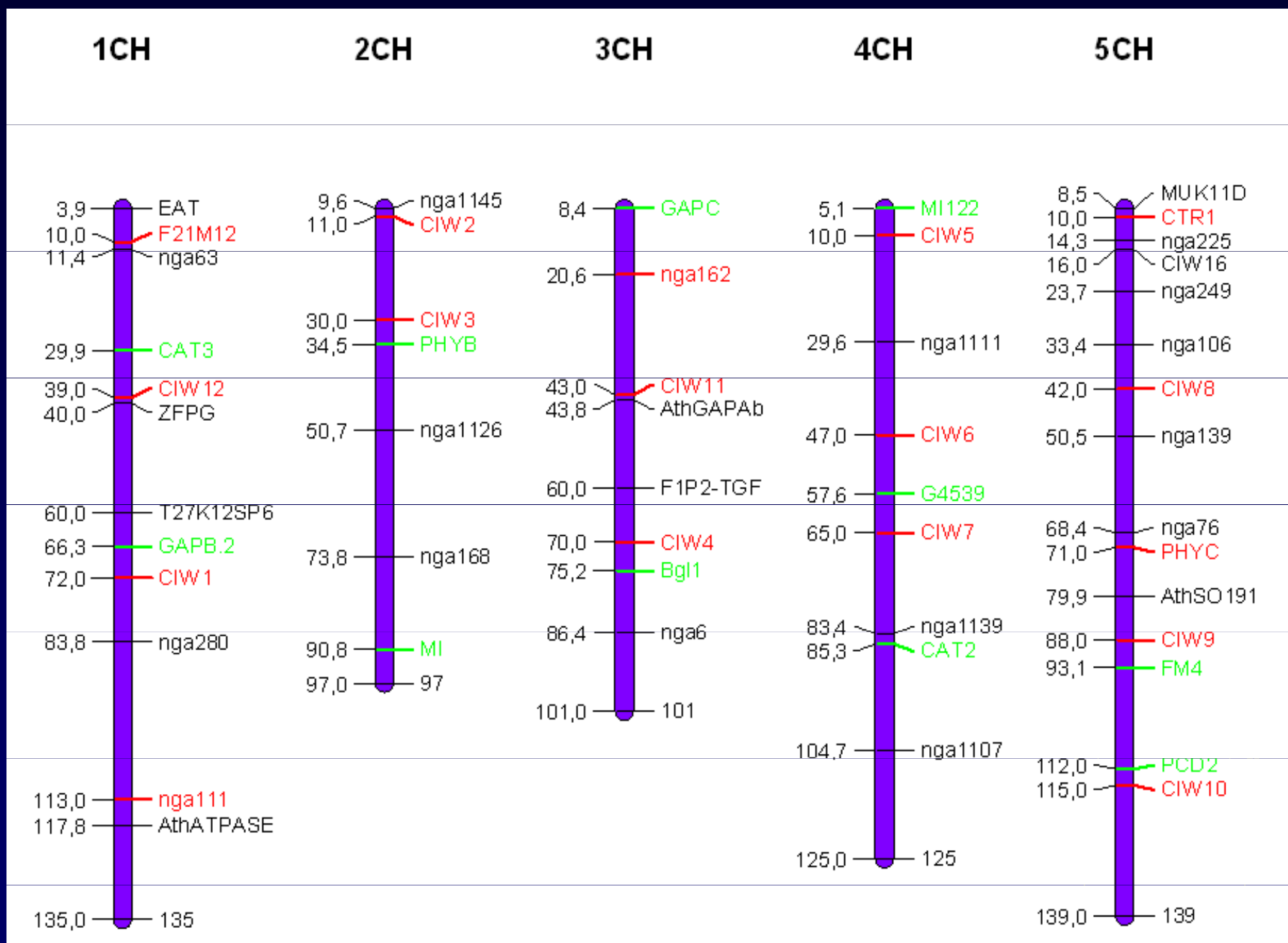
marker I – ve vazbě
5 mutantů
 $1/10 \times 100 = 10\%$

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




Mapa DNA molekulárních markerů



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 ▾
🔍 🔍 Find
Display All Rows ▾


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

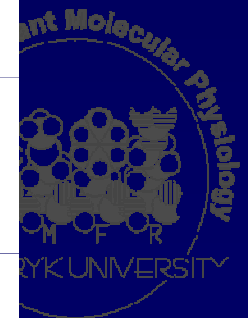
AGI Map 0 bp 2,463,170 bp
Zoom to: -8x-
Zoom up to 200x to see genes!
 Find
Search by name (e.g. UFO)
 Go
Select range (e.g. 1500-2000)
[AGI Map color key](#)

SM130_329,3	ATPTR2_B	SM104_73,6	CIW2	SM115_237,0	SM12_274,4	CIC9A
SM134_72,6	SM71_250,0	RNS1	SGCSNP180	SM46_294,4	SGCSNP129	T6P5-
SM61_322,0	SM45_234,7	SM57_225,2	SM84_98,5	SM158_96,3	SGCSN	
SM122_129,8	MI320	SM206_129,8	SM121_171,6	SM14_243,3	T6P5-	
SM122_129,8	NGA1145	SM254_364,8	G4532	M497A	T6P5-	
SM253_310,7	NGA114	SM17_241,6	G4553		T6P5-	
SM121_93,6		M246		SM46_411,1	T6P5-	
RGA		SGCSNP111			T12A:	
		SM138_120,2			SM1:	
		SM73_258,4				
		SM233_178,9				

AnnotUnits
NOR_2 F2I9 T23K3 T16F16 T17M13 F19B11 F3L12 T103 F1013 F16J10 T25M19 F
F23H14 T8011 F504 T8K22 T18E12 T18C20 T16B23 F28I8 F15L11 T3P4 F5K7
F10A8 F23I14 T20F6 T4M8 F3C11 T23015 F5G3 T20G20 T17C22
F14H20 F7D11 T6P5

Lister & Dean RI 0.00 cM 11.97 cM
Zoom to: -8x-
 Find
Search by name (e.g. UFO)
 Go

TEL2N	RGA +	KK1 +	VE012	MI320	F53_2
NOR2	SGCSNP180 +		ATPTR2_B	NGA1145 +	
				ATGST2B	
				MIT201A +	



Genomika III.-shrnutí

Přístupy genetiky přímé

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



Genomika III.

Diskuse

