

# Genetické metody v zoologii



J. Bryja

M. Macholán



M. Vyskočilová

# Sylabus

1. Analýza fenotypu (signální fenotypy, epigenetické znaky, kvantitativní znaky, analýza landmarků) **MM**
2. Cytogenetika (analýza karyotypu, proužkování, FISH, „painting“) a elektroforetické metody (proteiny, DNA), DNA-DNA hybridizace **MM**
3. Analýza DNA I (izolace DNA, genetické markery - jaderná vs. mimojaderná DNA, PCR, real-time PCR, "multi-locus" DNA markery: fingerprinting, RAPD, AFLP) **JB**
4. Analýza DNA II ("single-locus" DNA markery: mikrosatelity, LINE, SINE, SNP) **JB**
5. Analýza DNA III (sekvencování - přehled metod, "next generation sequencing") **JB**
6. Analýza DNA IV (SNP a jejich analýza: RFLP, DGGE, TGEE, SSCP, klonování, microarrays) **JB**

# Sylabus

7. Metody analýzy I (populačně-genetická data) - analýzy založené na frekvencích alel v populaci vs. "individual-based" modely **JB**
8. Metody analýzy II (fylogenetická data) **MM**
9. Praktické cvičení v laboratoři I (zhotovení chromozomálních preparátů, analýza karyotypu) **MM**
10. Praktické cvičení v laboratoři II (elektroforéza enzymů) **MM**
11. Praktické cvičení v laboratoři III (PCR, real-time PCR) **MV + JB**
12. Praktické cvičení v laboratoři IV (analýza DNA fragmentů po PCR, elektroforéza, fragmentační analýza, SSCP v kapiláře) **MV + JB**
13. Praktické cvičení v laboratoři V (sekvencování) **MV + JB**

# Doporučená literatura (česká)

## Genetické metody v zoologii

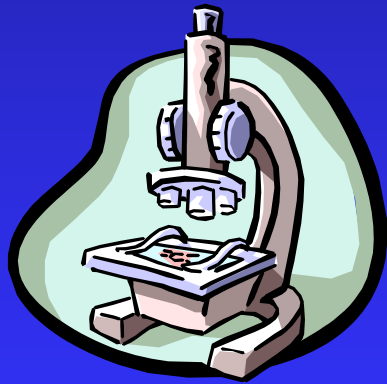
Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

*Nakladatelství Karolinum 2004*



# Proč?

**Problém:**  
zoologie, taxonomie  
ekologie, evoluce



**klasické metody**  
morfologická,  
ekologická,  
bionomická  
data

**Genetické metody:**

**genetická data**



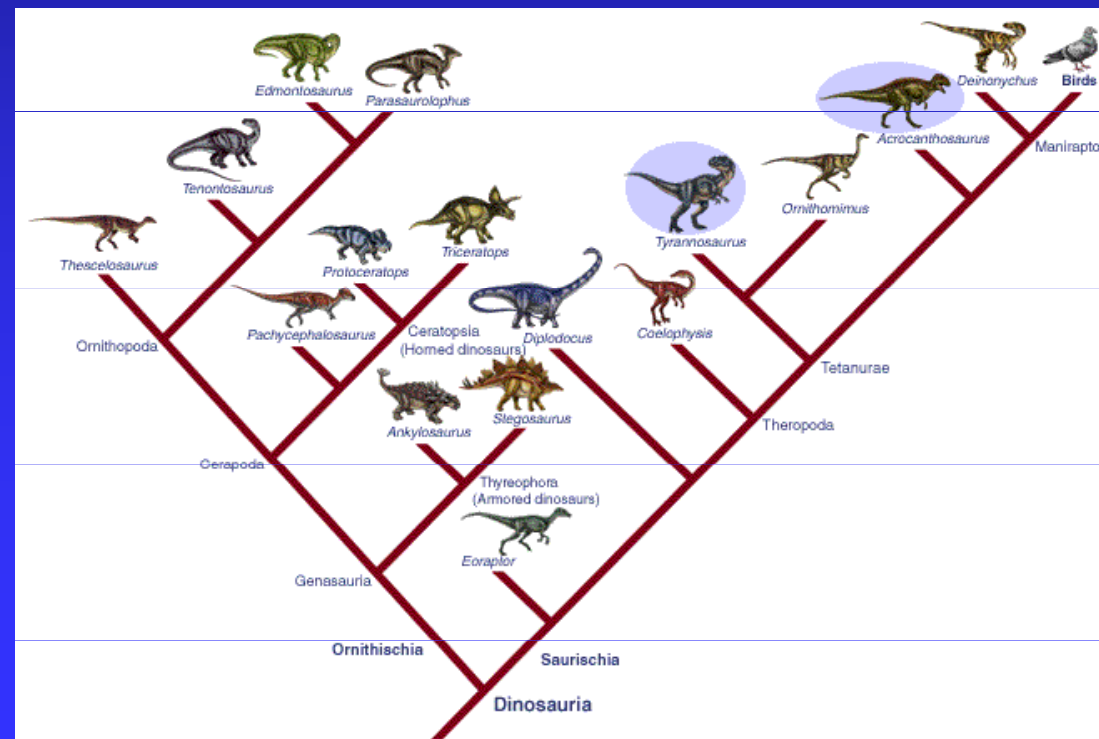
**Nový rozměr poznání**

# Proč používat genetické metody v zoologii?

- Často nelze jinak
- fylogenetické vztahy mezi populacemi a druhy
- paternita – páření často skryté a nemusí vést k oplození
- identifikace z trusu, chlupů - pohyb jedinců skrytě žijících druhů
- izolace populací – nemusí být zřejmá
- počet migrantů – nelze sledovat naráz všechny jedince

# Úrovně genetické variability

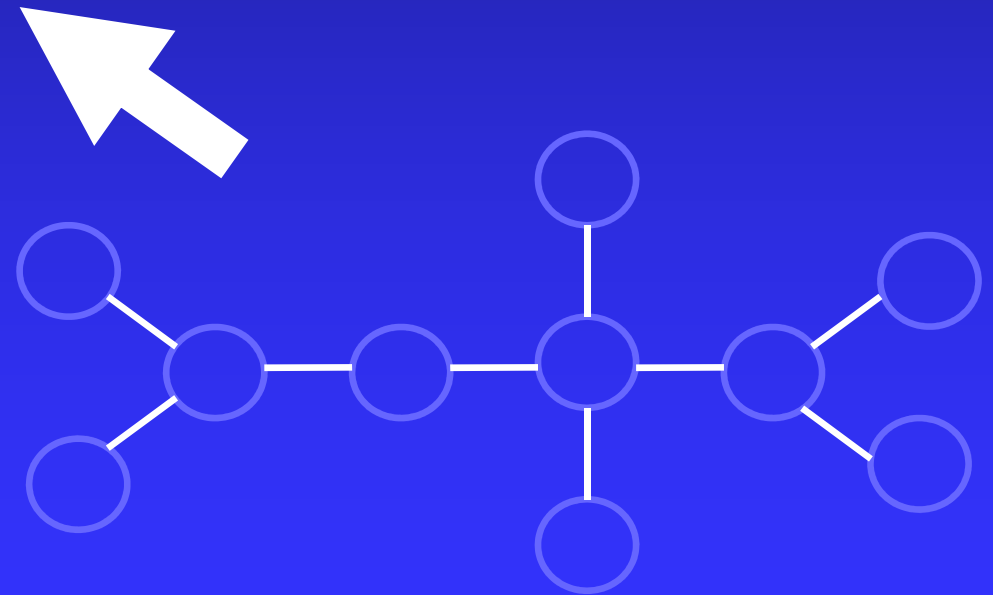
- **druh** – fylogenetické analýzy (fylogenetická systematika, identifikace druhů)





# Úrovně genetické variability

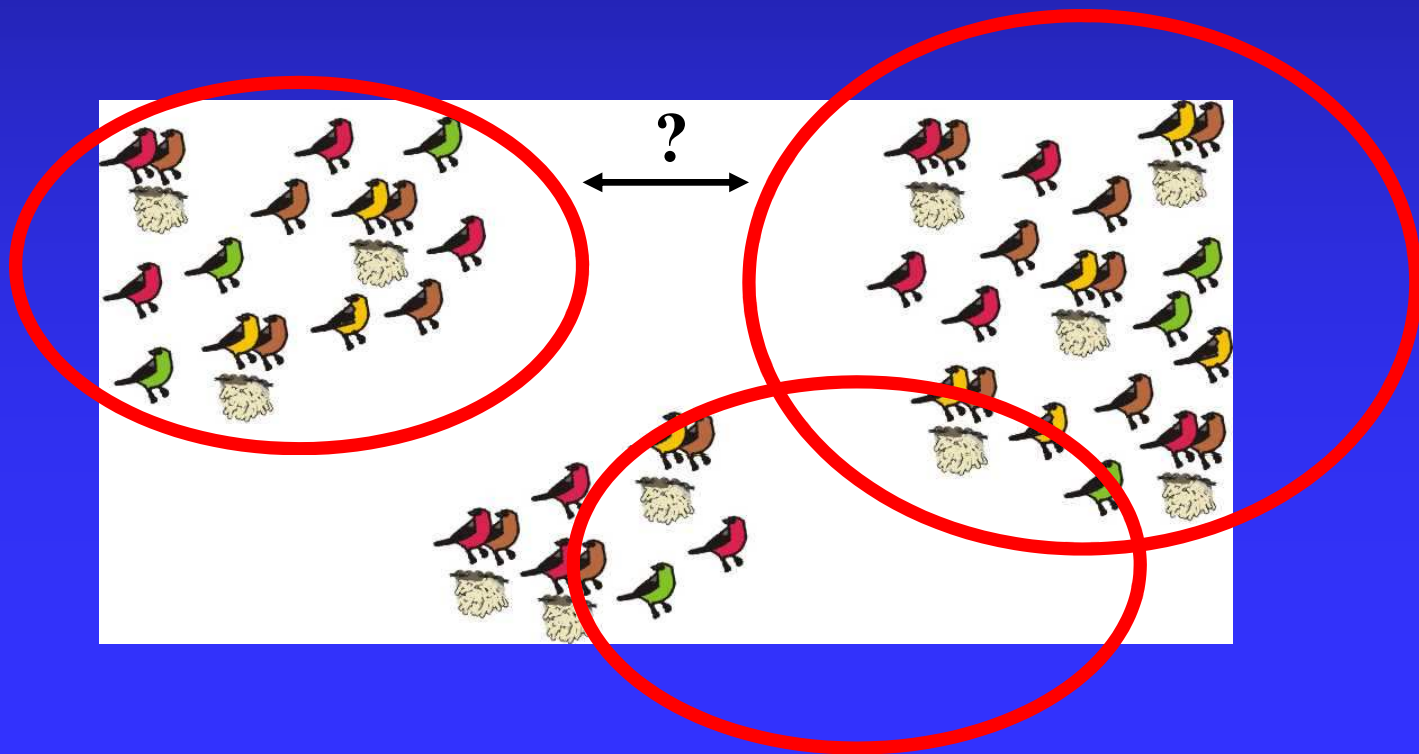
- **populace** – studium speciace, fylogeografie





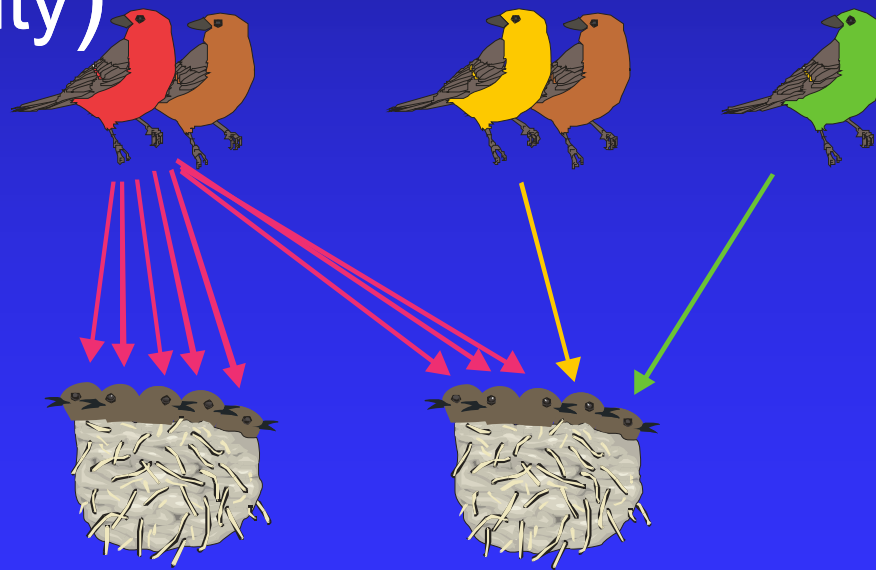
# Úrovně genetické variability

- **populace** – populační biologie, ochranářská genetik)



# Úrovně genetické variability

- **jedinec** – analýzy příbuznosti  
(behaviorální ekologie, např. analýzy paternity)



# Genetické markery

## ■ kódující DNA (geny)

- transcribed sequences
- genetic code
- phenotype
- natural selection
- increasing importance in molecular ecology

## ■ nekódující DNA

- not functional (not known function)
- neutral to natural selection
- majority of DNA in eukaryotes
- pseudogenes
- repetitive DNA

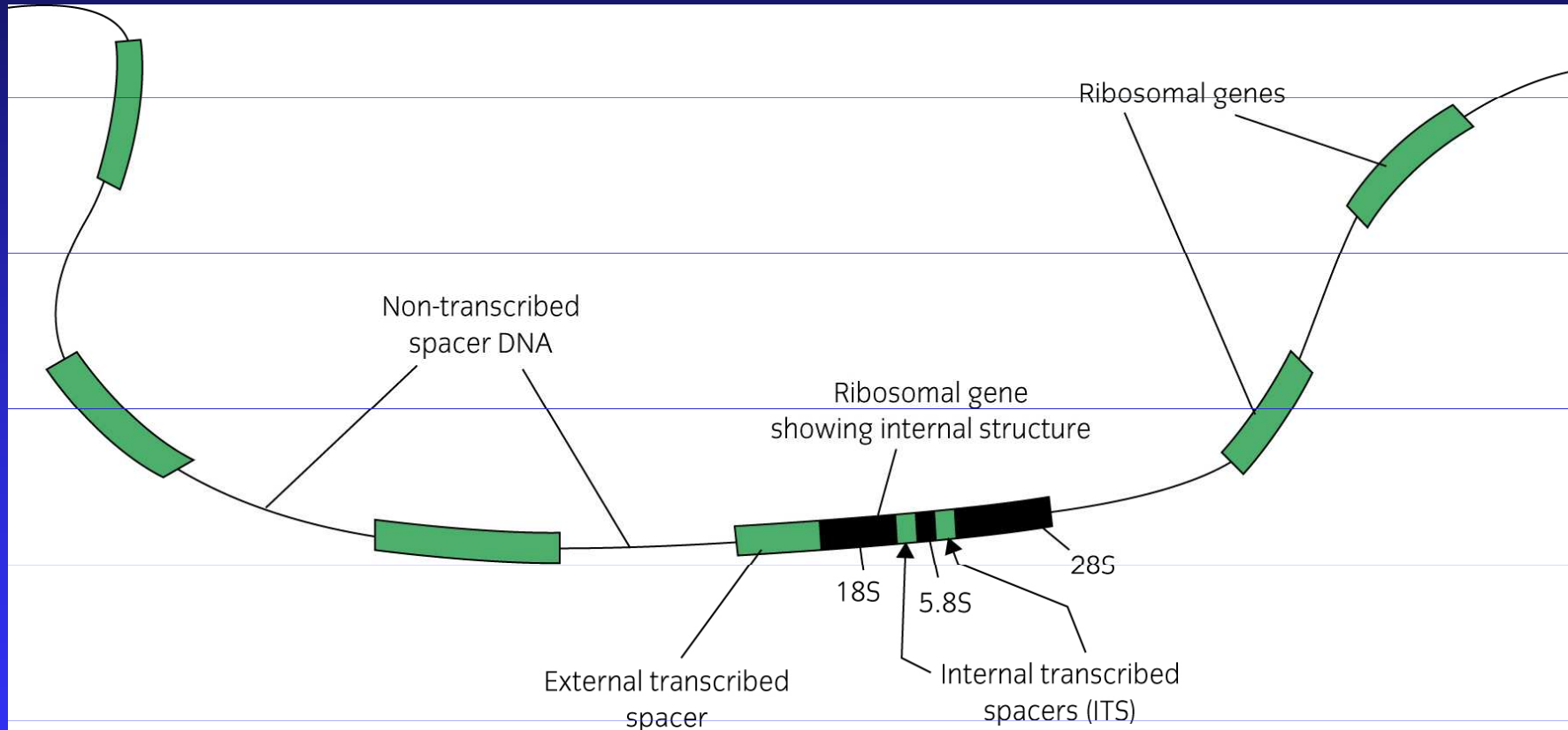
# Repetitivní DNA

DNA	Typical sequence length (bp)	Location
Satellites (>10 <sup>6</sup> repeats/genome)	5-100	Tandem arrays, scattered throughout the genome
Minisatellites (>10 <sup>3</sup> loci/genome)	20-300	Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome
Microsatellites (>10 <sup>4</sup> loci/genome)	1-6	Tandem arrays up to a few 100 bp in length, scattered throughout the genome
Telomeres	4-8	Tandem arrays up to 1kb in length, at the ends of each chromosome
SINEs (>10 <sup>5</sup> /genome)	50-500 (100-300)	Interspersed throughout the genome
LINEs (>10 <sup>3</sup> /genome)	1-5 k	Interspersed throughout the genome

# Kódující („funkční“) DNA

- study of selection
  - codon third position is highly redundant and is not under selection
- 1) ribosomal DNA
  - 2) nuclear structural (protein coding) genes
  - 3) mitochondrial DNA

# 1. Ribosomal DNA



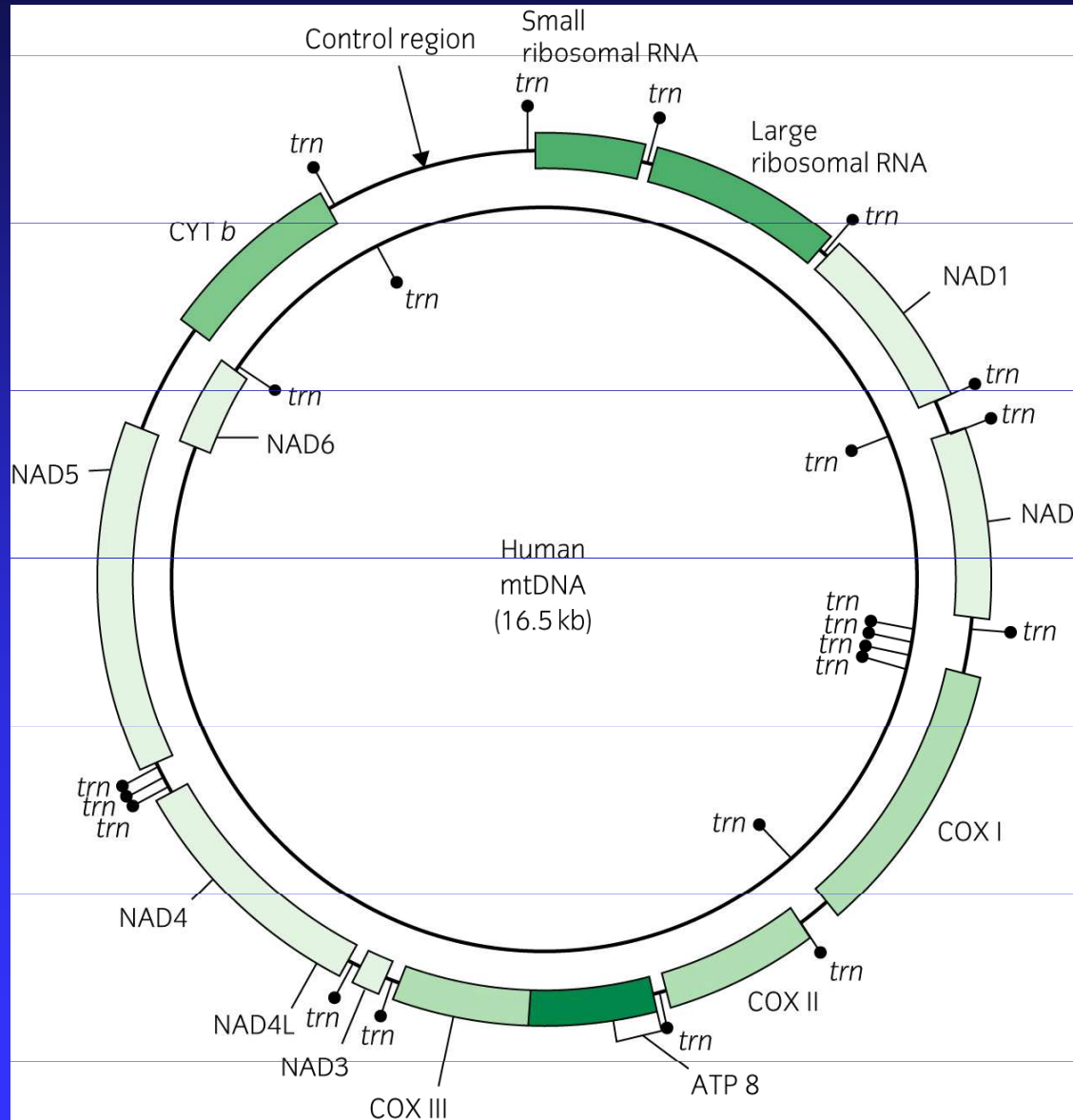
- genes for ribosomal RNA – repeated clusters in eukaryotes
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster in prokaryotes
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

## 2. Nuclear structural genes

- low individual variation – important function (not very often used in molecular ecology) – allozymes
- MHC variation
- SNPs – renewed interest in nuclear structural genes



# 3. Mitochondrial DNA



14 kbp (*Caenorhabditis*)  
42 kbp (*Placopecten*)

- maternally inherited (?)
- no recombination (?)
- phylogeography
- « numts » nuclear copies of mtDNA
- multiple copies

Saccone et al. 2001

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- **sekvenční polymorfismus:**

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- sekvenční polymorfismus
- **délkový polymorfismus**

CG**CACA**TCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CG**C**ATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

# Vznik DNA polymorfismu

- mutace (transice, transverze, inserce, delece)
- rekombinace (kombinace změn vzniklých mutacemi, duplikace a delece při rekombinačních chybách)
- transpozice
- $\Rightarrow$  obecná molekulární genetika

# Genotypizace – stanovení genotypu

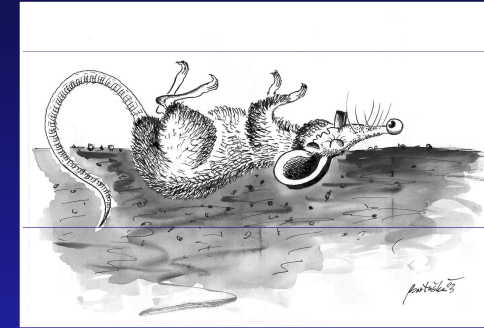
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR)
  - 3) studium variability daného úseku (lokus)

# Izolace DNA

- rozmanitý biologický materiál – musí obsahovat buněčná **jádra nebo mitochondrie** s nedegradovanou DNA
  - dnes většinou komerční kity
  - velký vliv **fixace** vzorků
- 
- Izolace RNA (exprese specifických genů) – dříve problém, dnes RNAlater

# Způsoby získání DNA z volně žijících živočichů:

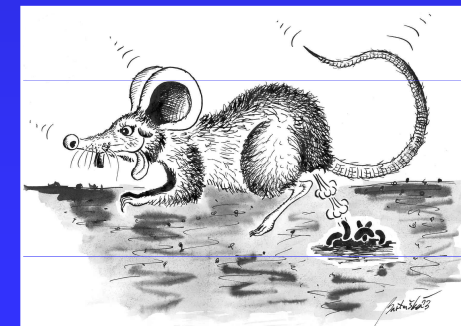
1. **destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy



2. **nedestrukční (invazivní)** – živočich je odchycen a je mu odebrán vzorek tkáně nebo krve



3. **neinvazivní** – zdroj DNA je „zanechán za živočichem“ a je získán bez potřeby odchytu, manipulace či dokonce pozorování





# Fixace materiálu

+

- čerstvá tkáň
- čistý EtOH
- rychlé vysušení
- speciální extrakční pufry
- zamražení

-

- formaldehyd
  - opakované zamražování
  - rozvlhčování sušeného materiálu
  - další fixační média
- speciální metody pro izolaci ze subrecentního materiálu (mamuti, hmyz v jantaru, neandrtálci apod.)

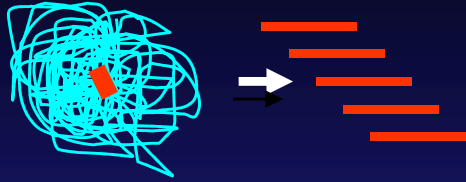
# PCR

Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

# Amplifikace DNA – PCR

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozómů (1n)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	$3,0 \times 10^9$	18
<i>Mus musculus</i>	$3,0 \times 10^9$	20
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	23



# PCR

- Z celkové DNA si namnožíme jen úsek, který nás zajímá.
- Co se bude množit? To určí **primery**.
- **Primery** – krátké oligonukleotidy komplementární k úsekům ohraničujícím místo našeho zájmu.

DNA  
templátu

primer

primer AGGGGACGTACACTCAGCTTT  
templát TCCCCTGCATGTGAGTCGAAA

primer

tento úsek se bude množit

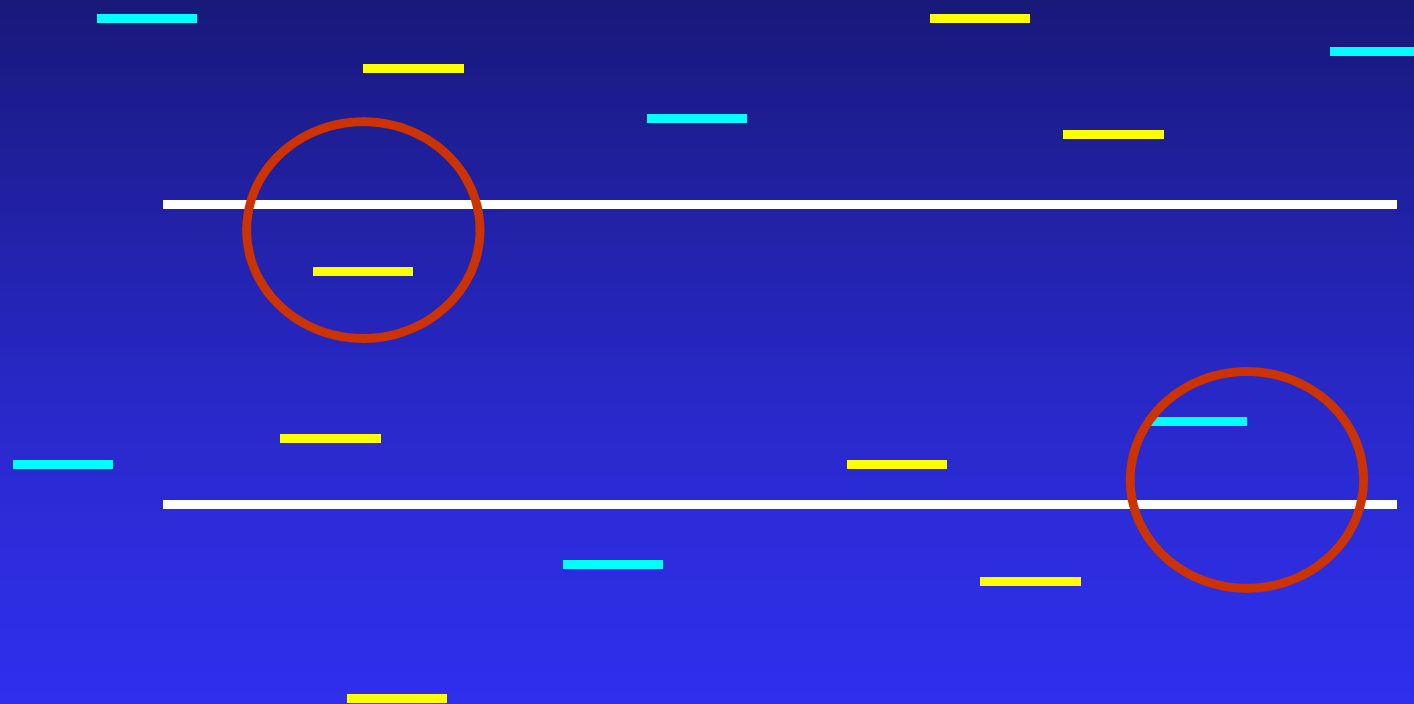
# Denaturace (obvykle 95°C)

při zvýšení teploty se oddělí komplementární vlákna DNA



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

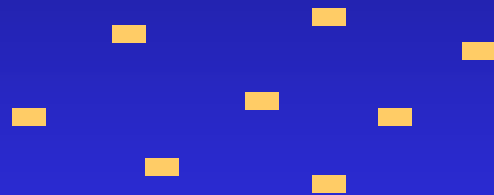
Při ochlazení primery přisednou rychleji než dojde k vzájemné reasociaci dlouhých vláken DNA (obvykle 50 - 65°C) – „annealing“



V úseku mezi primery zůstanou vlákna DNA oddělena



**Primery jsou prodlužovány** přidáváním nukleotidů  
podle sekvence templátu (obvykle 72°C – optimum pro *Taq* polymerázu)



Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



Po ochlazení primery přisednou na templát i nově vzniklé fragmenty („annealing“)



Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



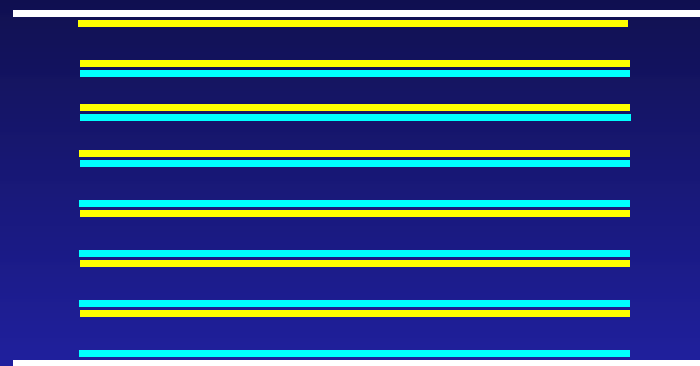
Při dalším zahřátí...



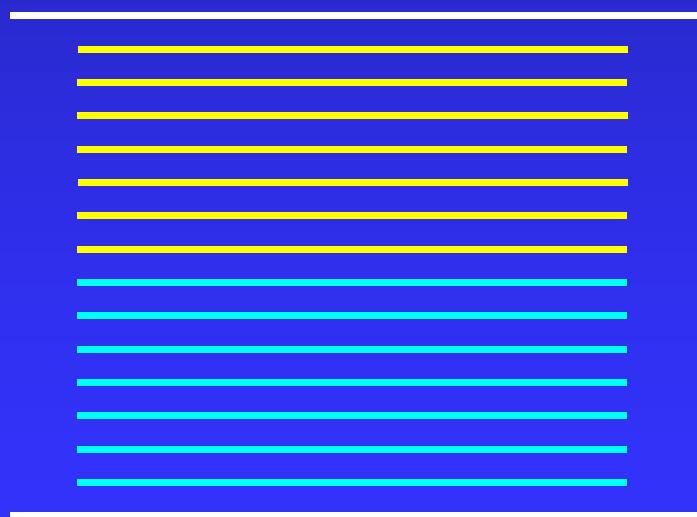
Ochlazení – nasednutí primerů



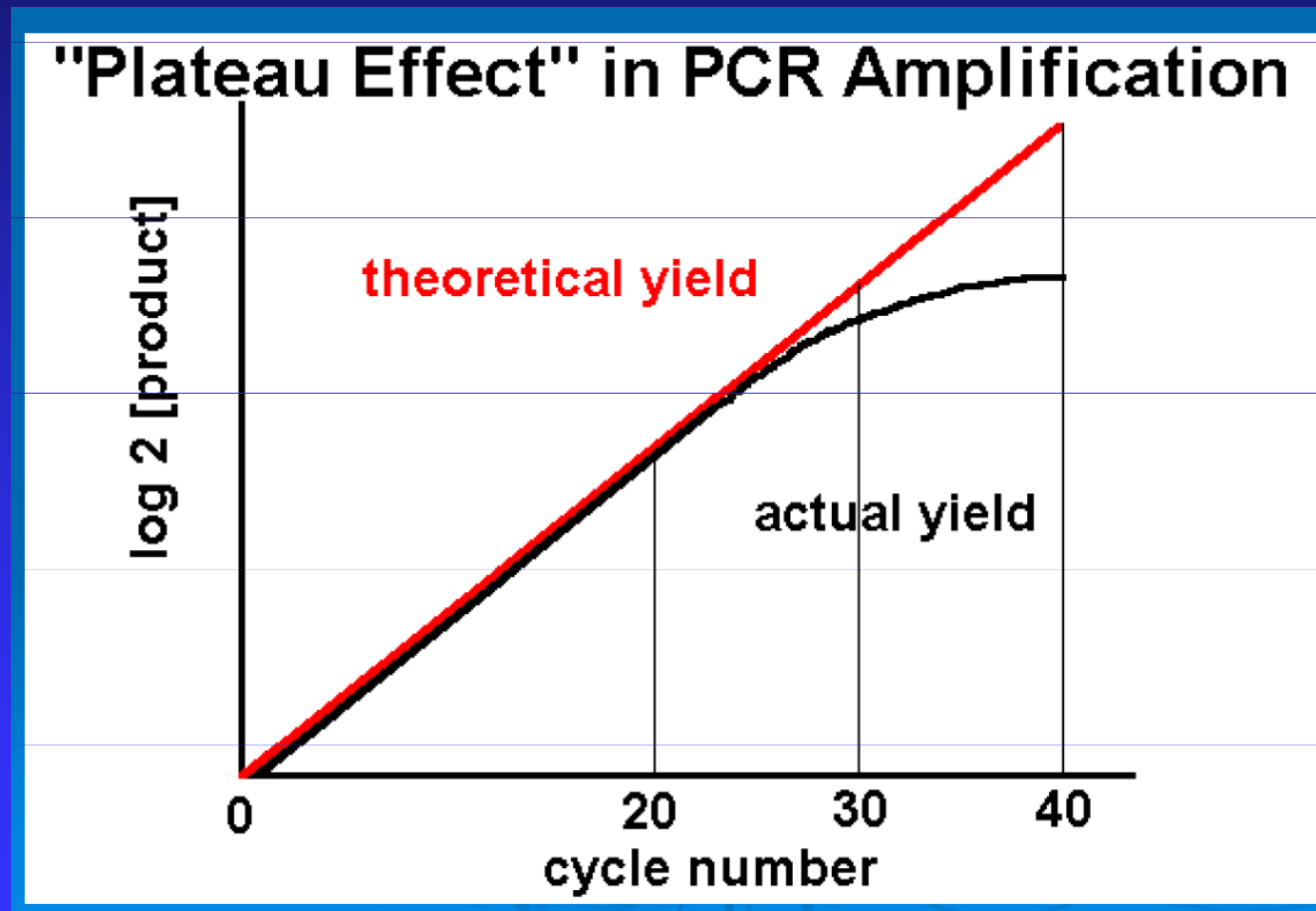
72°C vznik nových fragmentů



95°C denaturace



# Inhibice PCR vysokou koncentrací DNA





# PCR

Cycler MJ Research



Cycler Eppendorf



RoboCycler Stratagene



Cykly (obvykle 20-40):  
**denaturace (95°C )**  
**nasednutí primerů (50-65°C )**  
**elongace=polymerizace (72°C )**

Nejprve však často prodloužená denaturace celkové DNA

Nakonec prodloužená elongace

Příklad  
programu

95°C 3 min

95°C 30 s

60°C 30 s

72°C 1 min

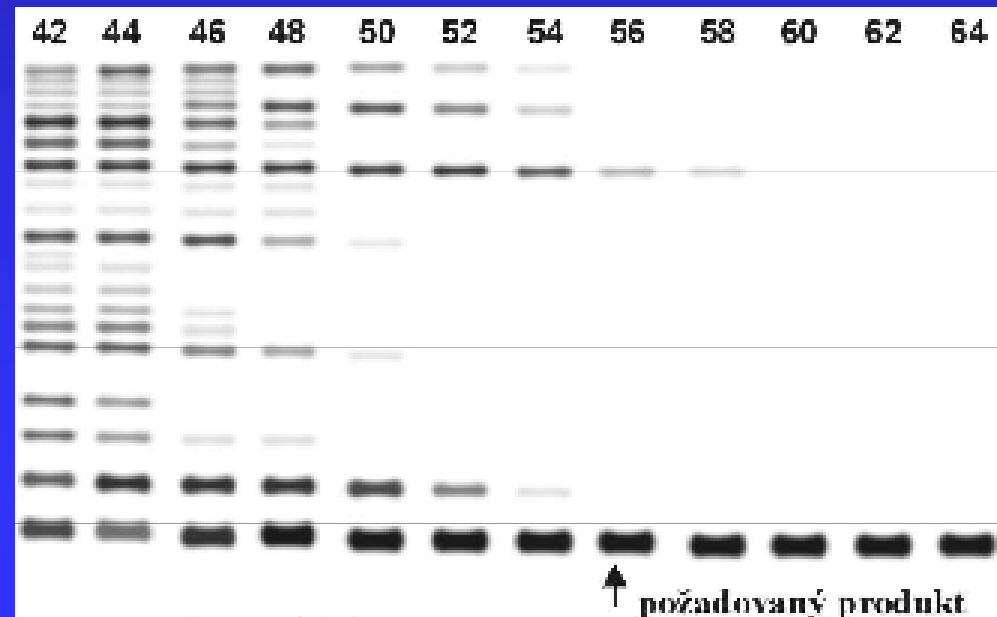
35x zpět

72°C 10 min



# Co když PCR nefunguje?

- Měníme teplotu „annealingu“ (nejlépe použijeme gradient teplot, pokud to náš cykler umí)  
Vyšší teplota=vyšší specificita
- Měníme koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů
- Navrhujeme nové primery



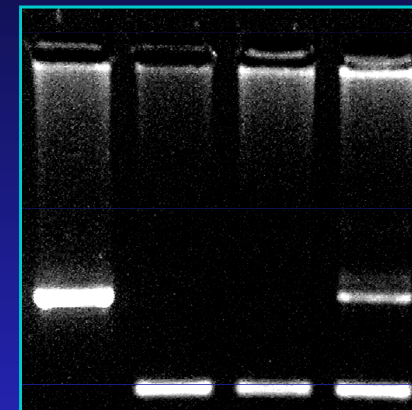
# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 1) délkový polymorfismus

- elektroforéza

# Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti

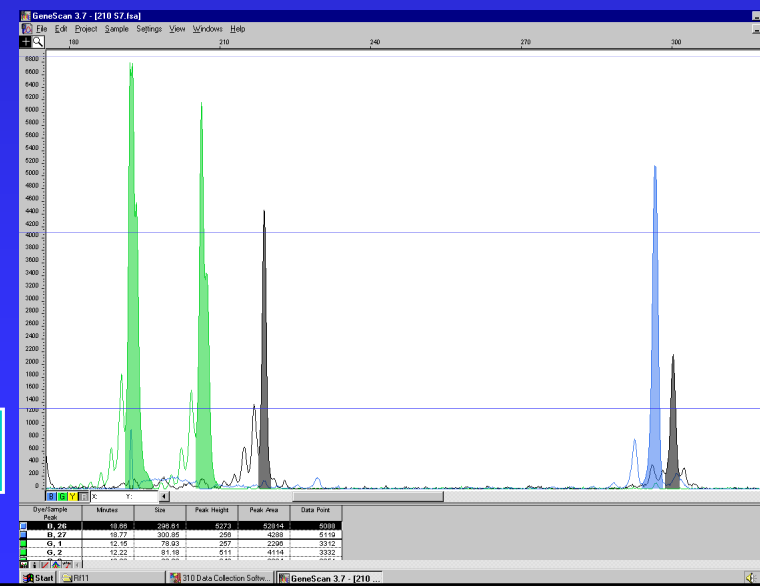
- Agarosa - Hrubé rozdělení (do rozdílu 15 bp)
- Polyakrylamid – Přesnější rozdělení (4 bp)
- Sekvenátor, fragmentační analýza – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



detektor

kapilára

laserový paprsek



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 2) sekvenční polymorfismus

- +/- analýza (elektroforéza)
- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru





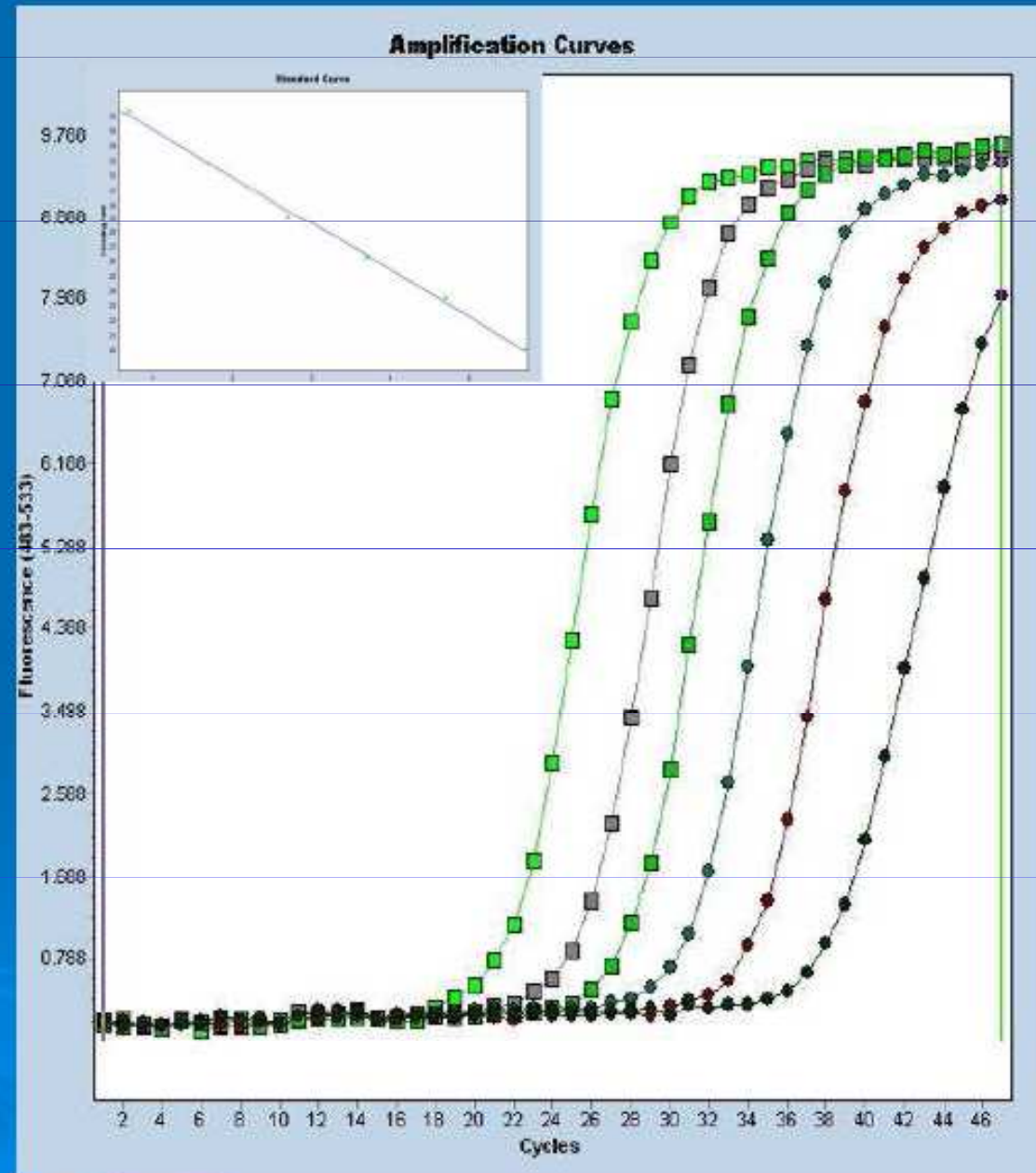
REAL TIME PCR  
(= „kvantitativní PCR“)

# Problém

- Kvantitativní rozdíly v expresi genů (tj. množství mRNA)
- Neinvazivní metody – nutnost stanovit, kdy je ještě ve vzorku dostatek DNA pro smysluplnou analýzu
- Genotypizace SNPs atd.

# PCR vs. real time PCR

- » Fluorescence je měřena v každém cyklu (signál ~ množství PCR produktu)
- » Křivky se zvedají po určitém množství cyklů, které odpovídá počátečnímu množství DNA
- » Srovnání s kalibrační křivkou umožňuje kvantifikaci





# *Fluorescenční strategie*

## **Nespecifická detekce**

» (EtBr), SYBR Green, BEBO, BOXTO...

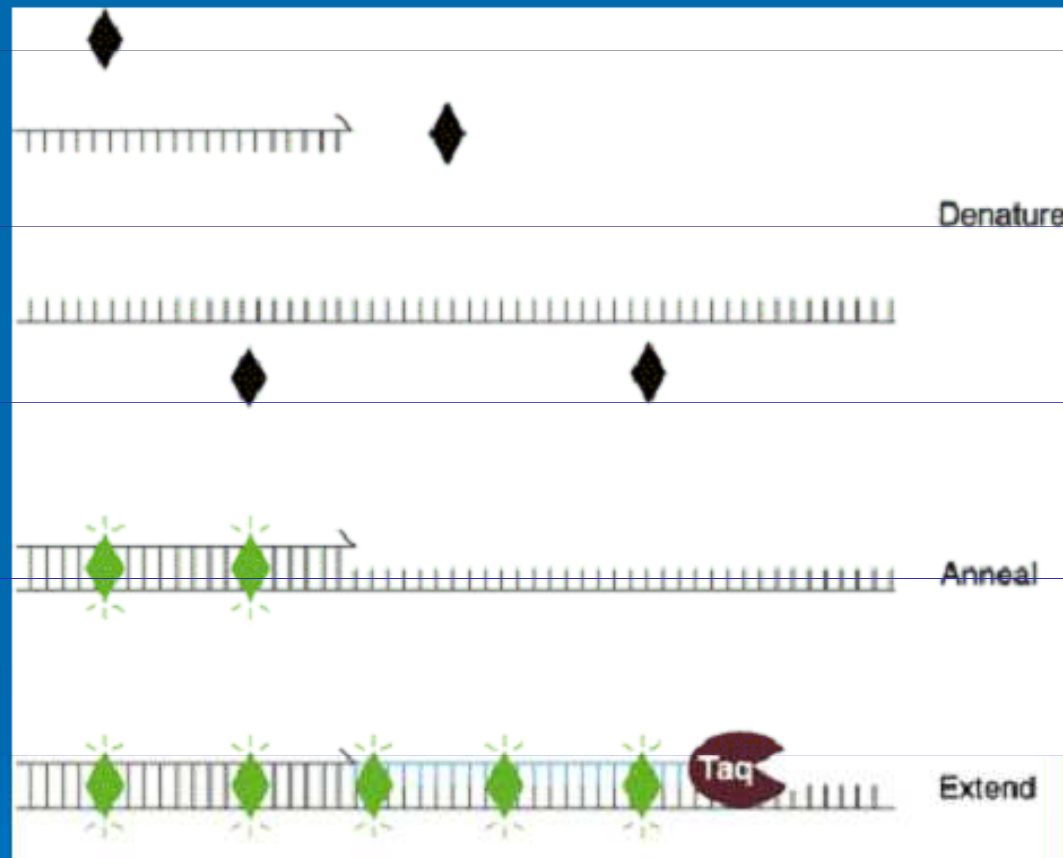
## **Specifická detekce**

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

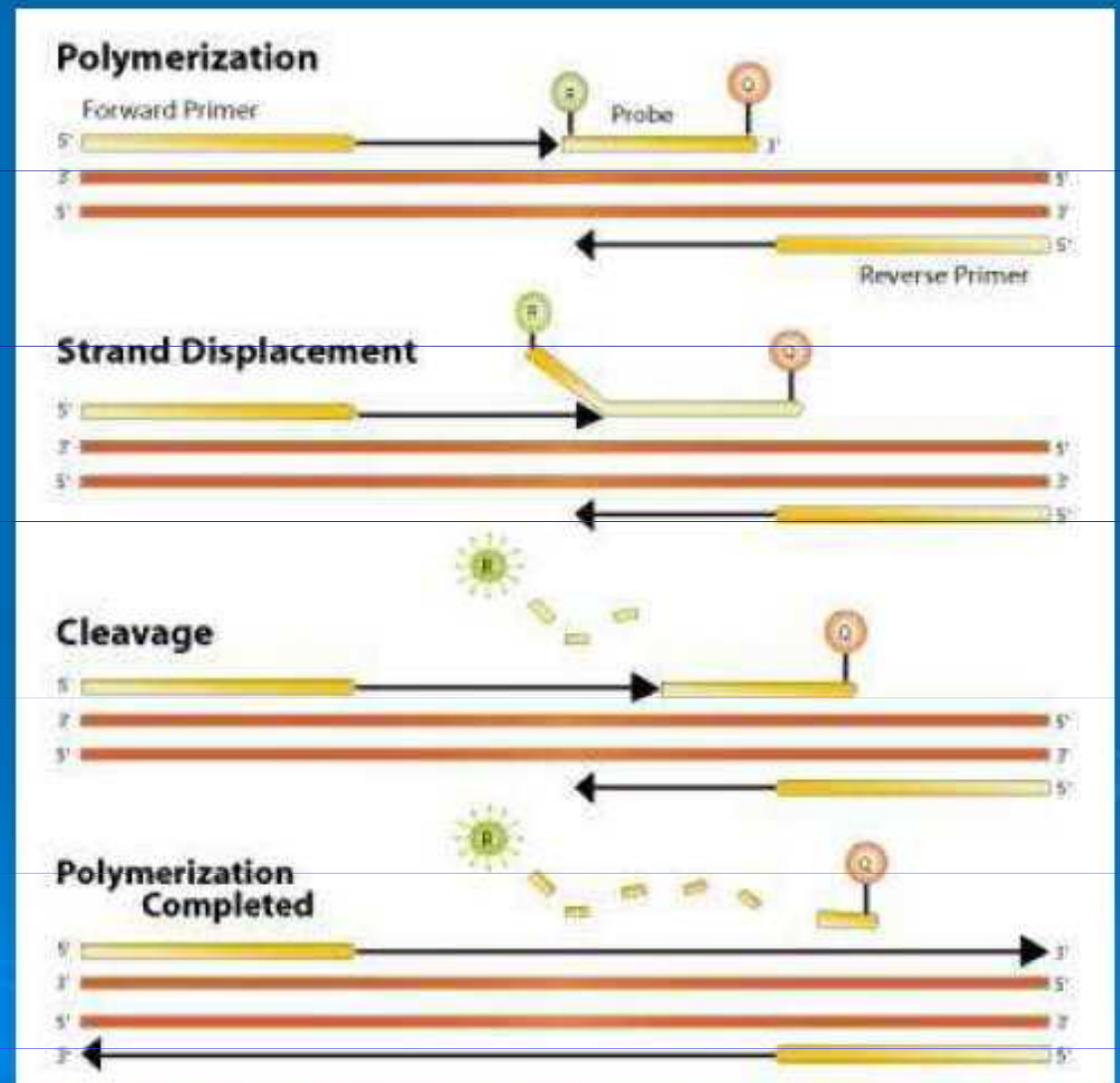
# *SYBR Green*



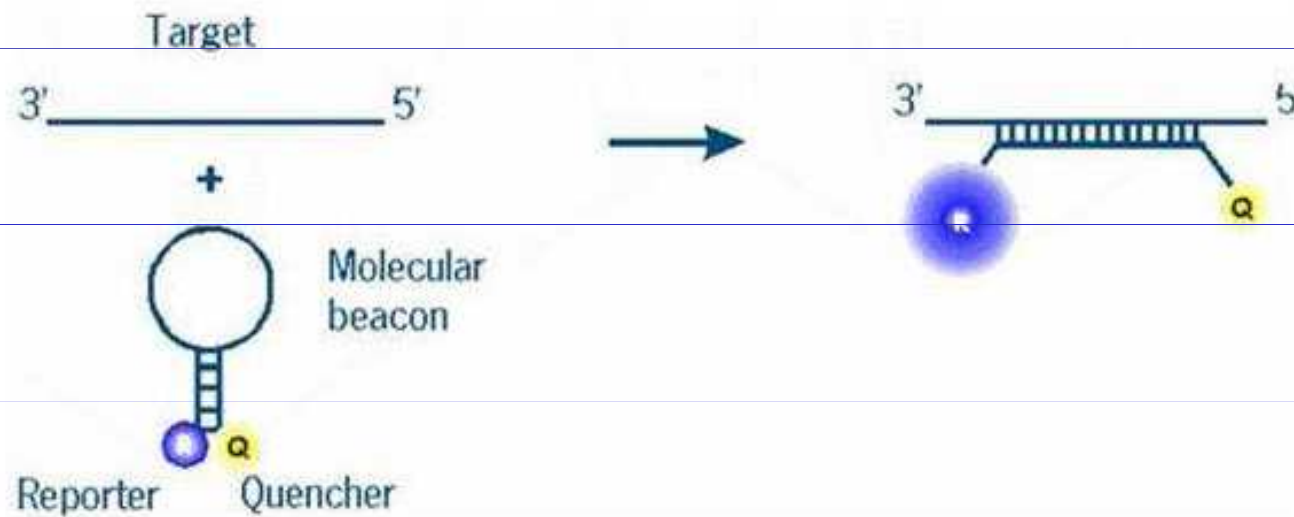
SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

# TaqMan hydrolyzační sondy

- » Intaktní sonda – žádná fluorescence
- » 5' – 3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy degraduje sondu – uvolnění fluorescence



# *Molecular beacon hybridizační sondy*

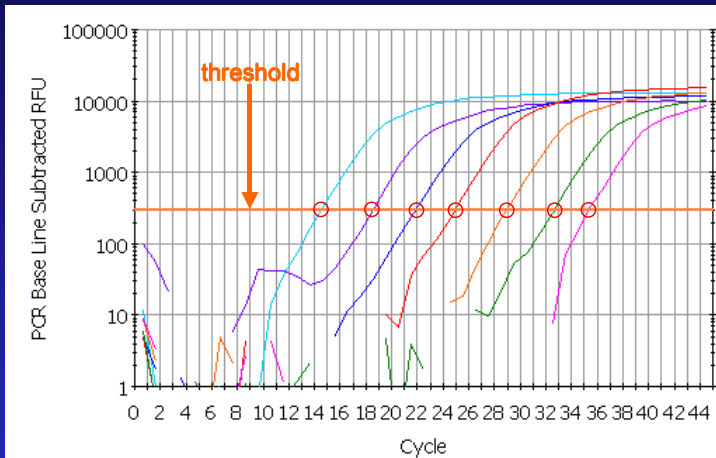




# Real-time PCR přístroje



# Absolutní kvantifikace



- 1) Vytvoření kalibrační křivky
- 2) Real-time PCR se vzorkem s neznámým množstvím DNA, např. z trusu

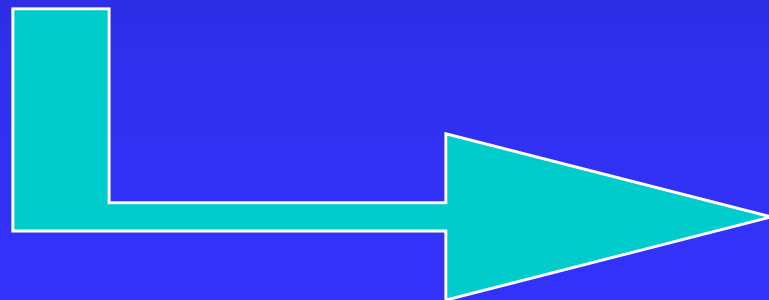
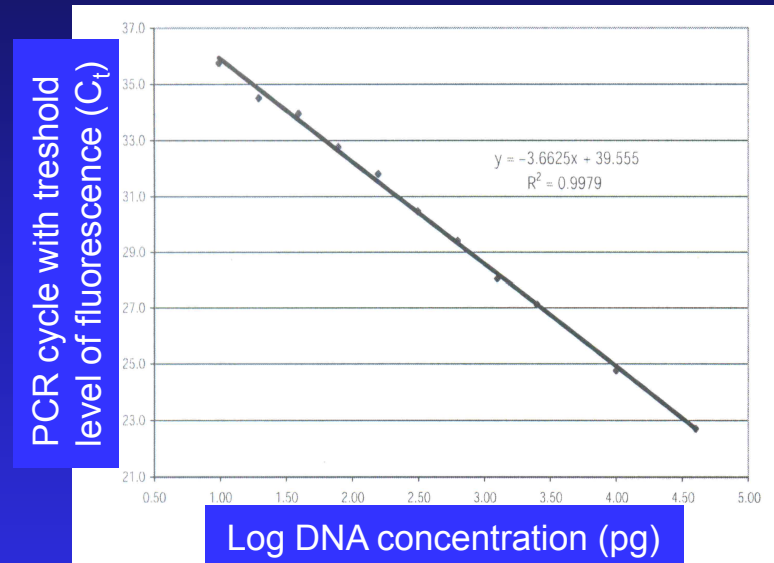
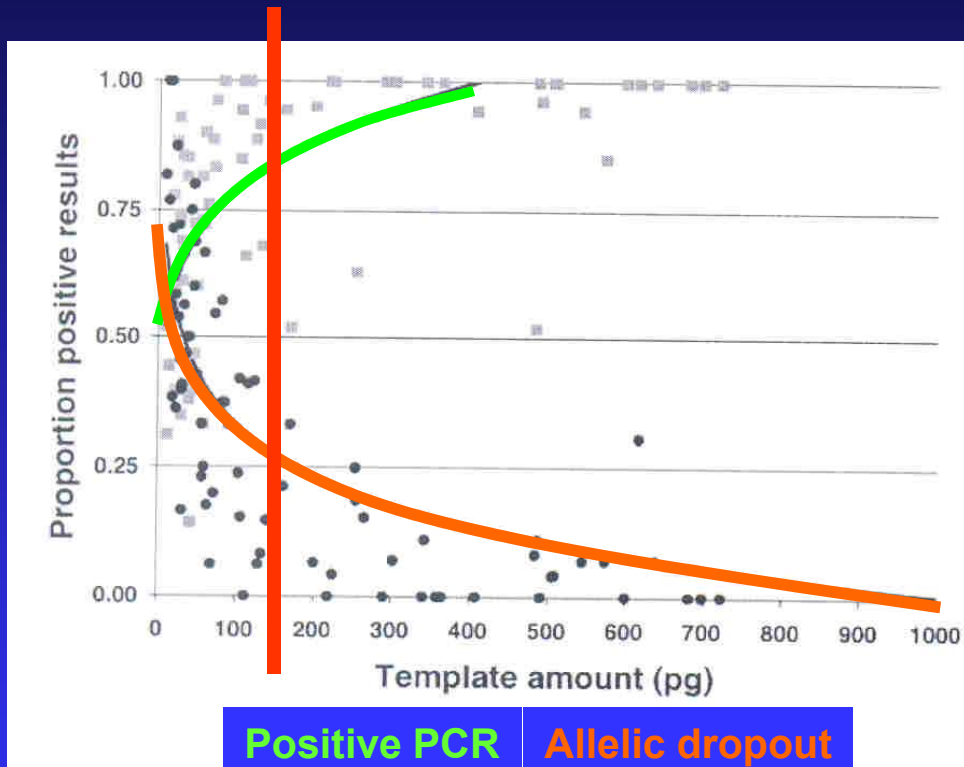
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204  $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns  
○ Standards



PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

# Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků

# Relativní kvantifikace - standardy

- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu