

Genetické metody v zoologii

Miloš Macholán (macholan@iach.cz)
Josef Bryja (bryja@brno.cas.cz)

Sylabus

1. Úvod; Analýza NK I (izolace DNA, genetické markery - jaderná vs. mimojaderná DNA, PCR, real-time PCR, sekvencování) **JB**
2. Analýza NK II ("single-locus" DNA markery: mikrosatelity, LINE, SINE) **JB**
3. Analýza NK III (SNP a jejich analýza: RFLP, DGGE, TGEE, SSCP, klonování) **JB**
4. Analýza NK IV (celogenomové metody, multi-locus" DNA markery: fingerprinting, RAPD, AFLP; next generation sequencing a jeho aplikace; analýzy exprese, transkriptomika) **JB**
5. Analýza fenotypu (signální fenotypy, kvantitativní znaky, analýza landmarků); Cytogenetika (analýza karyotypu, proužkování, FISH, „painting“); Elektroforéza enzymů **MM**
6. Metody analýzy I (základy bioinformatiky, dostupné zdroje dat - GenBank, BLAST atd., alignování sekvencí atd.) **MM**

Sylabus

7. Metody analýzy II (fylogenetická data) - metody založené na vzdálenosti, maximální parsimonie, maximální věrohodnost, Bayesiánské metody **MM**

8. Metody analýzy III (populačně-genetická data) - analýzy založené na frekvencích alel v populaci, "individual-based" modely **JB**

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) **JB**

12. Praktické cvičení v laboratoři IV (analýza DNA fragmentů po PCR, elektroforéza, fragmentační analýza, SSCP v kapiláře) **JB**

13. Praktické cvičení v laboratoři V (sekvencování) **JB**

Doporučená literatura (česká)

Genetické metody v zoologii

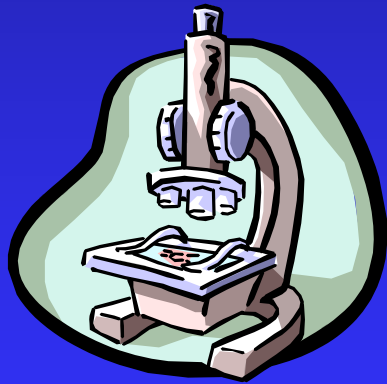
Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

Nakladatelství Karolinum 2004



Proč?

Problém:
zoologie, taxonomie
ekologie, evoluce



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

Genetické metody:

**genetická
data**



Nový rozměr poznání

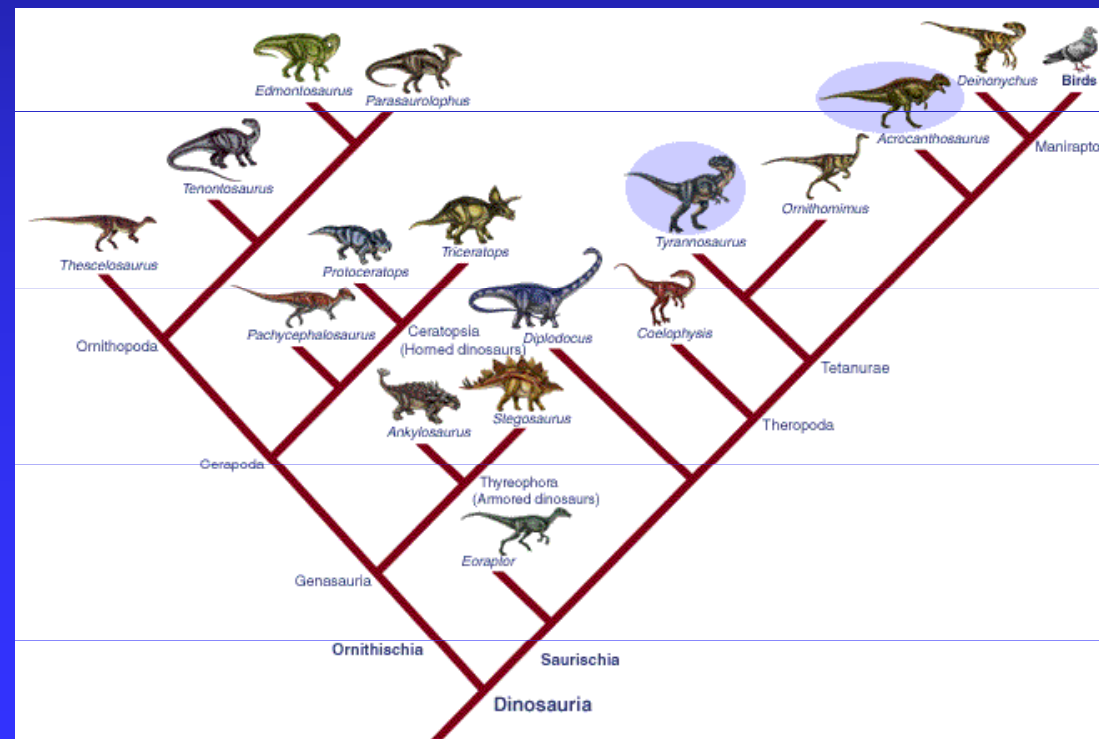
Proč používat genetické metody v zoologii?

- 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

viz Molekulární ekologie – letní semestr

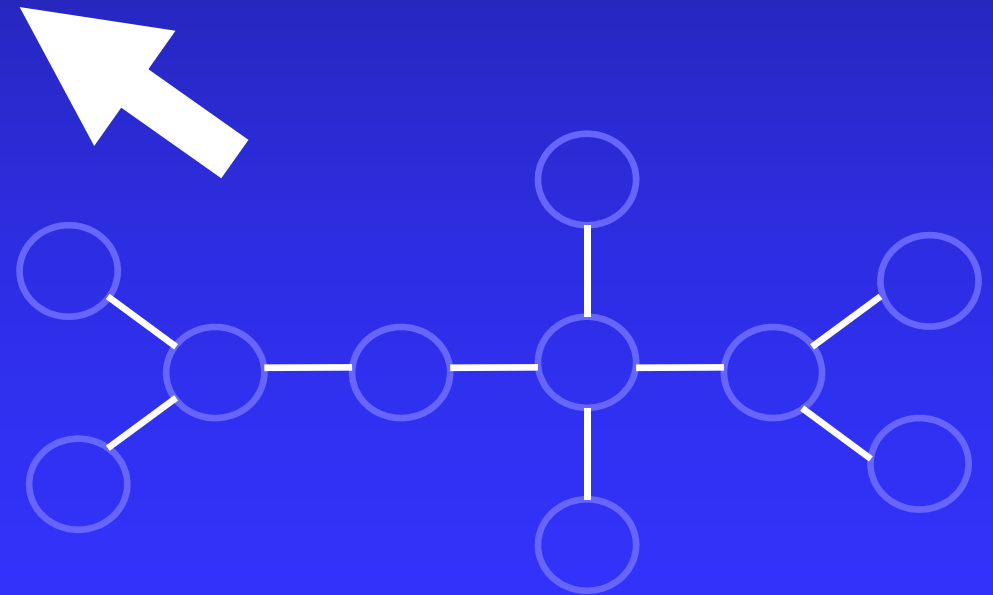
Úrovně genetické variability

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



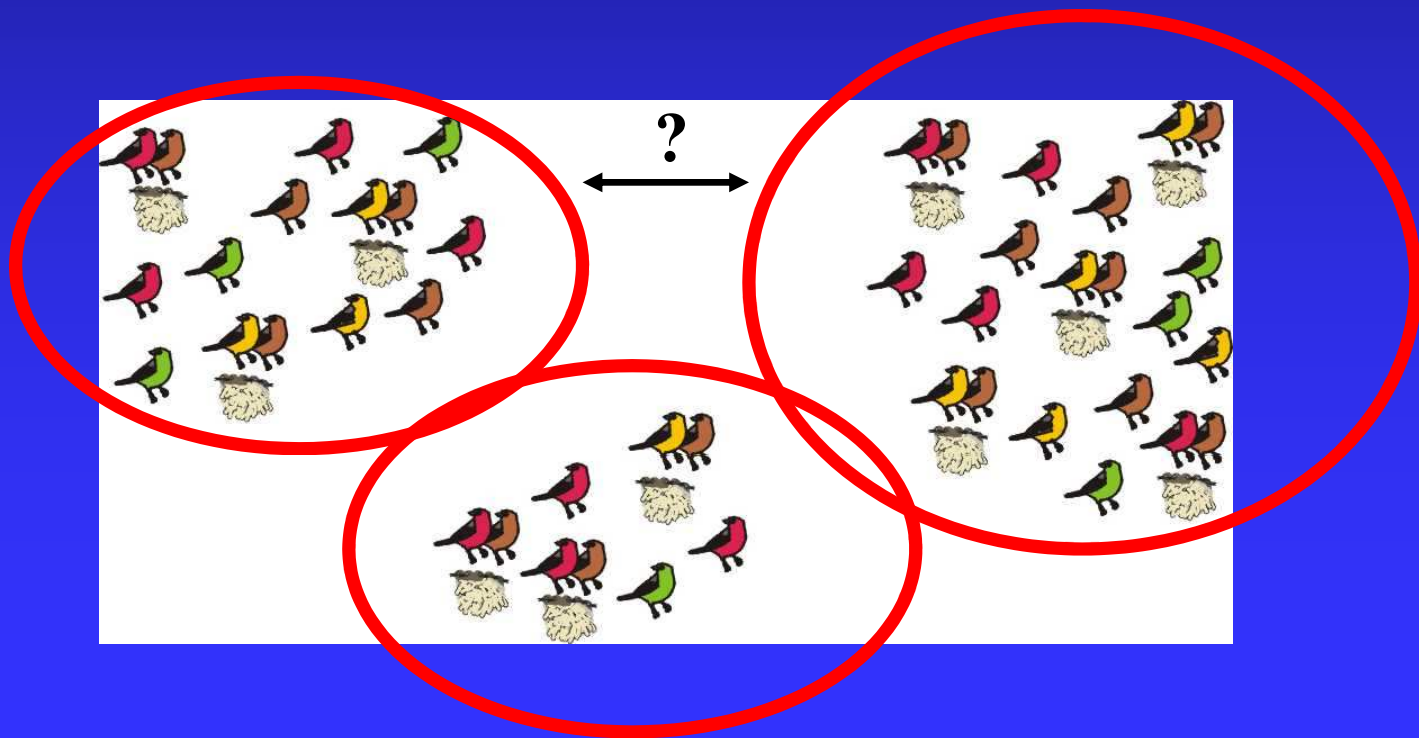
Úrovně genetické variability

- **populace** – studium speciace, fylogeografie



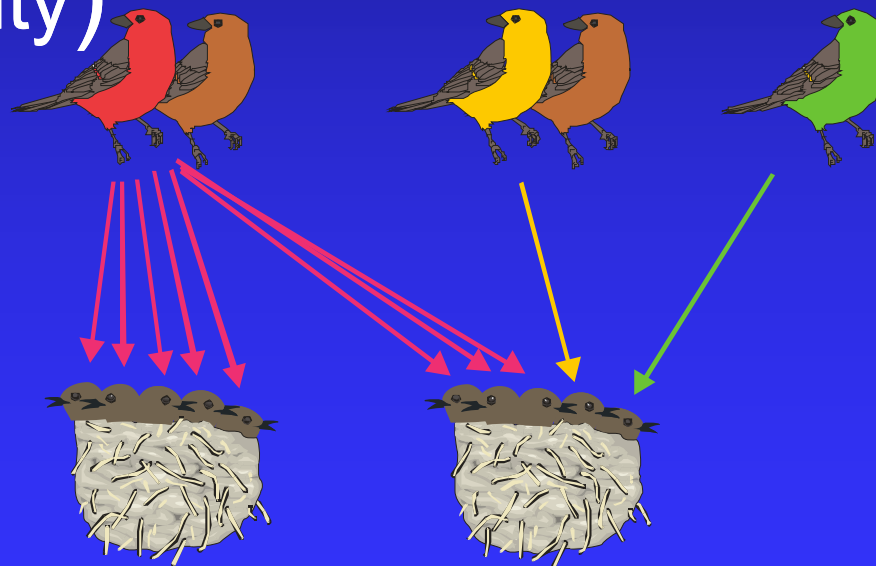
Úrovně genetické variability

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



Úrovně genetické variability

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



Genetické markery

- **kódující DNA (geny)**
- přepisované sekvence
- genetický kód
- vytvářejí fenotyp
- podléhají přírodnímu výběru
- rostoucí význam v přírodních vědách
- **nekódující DNA**
- nefunkční (neznámá funkce)
- neutrální k přírodnímu výběru
- většina DNA u eukaryot (až 95% u obratlovců)
- pseudogeny
- repetitivní DNA

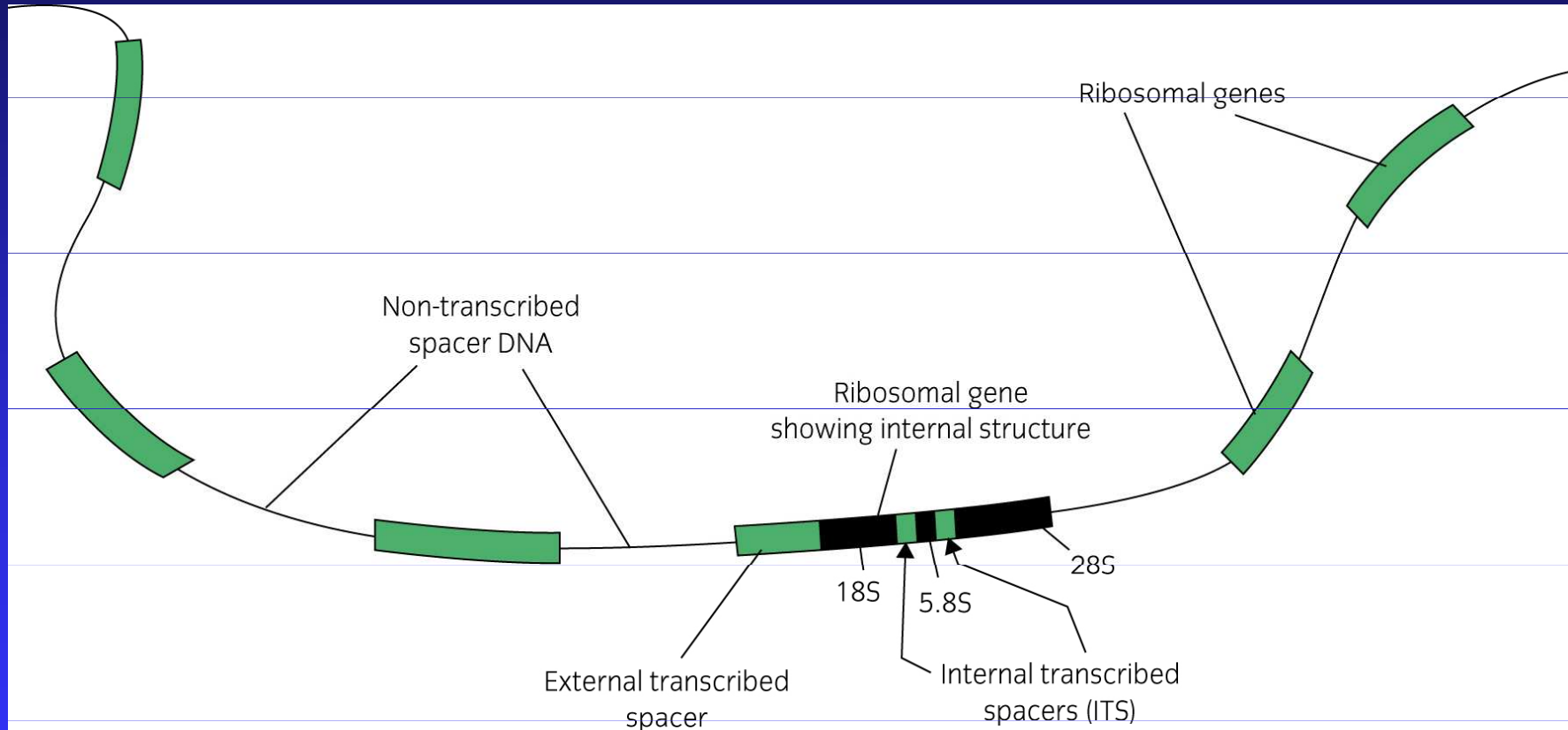
Repetitivní DNA

DNA	Typical sequence length (bp)	Location
Satellites (>10 ⁶ repeats/genome)	5-100	Tandem arrays, scattered throughout the genome
Minisatellites (>10 ³ loci/genome)	20-300	Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome
Microsatellites (>10 ⁴ 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 ⁵ /genome)	50-500 (100-300)	Interspersed throughout the genome
LINEs (>10 ³ /genome)	1-5 k	Interspersed throughout the genome

Kódující („funkční“) DNA

- 1) ribosomal DNA
- 2) nuclear structural (protein coding) genes
- 3) mitochondrial DNA

1. Ribosomal DNA

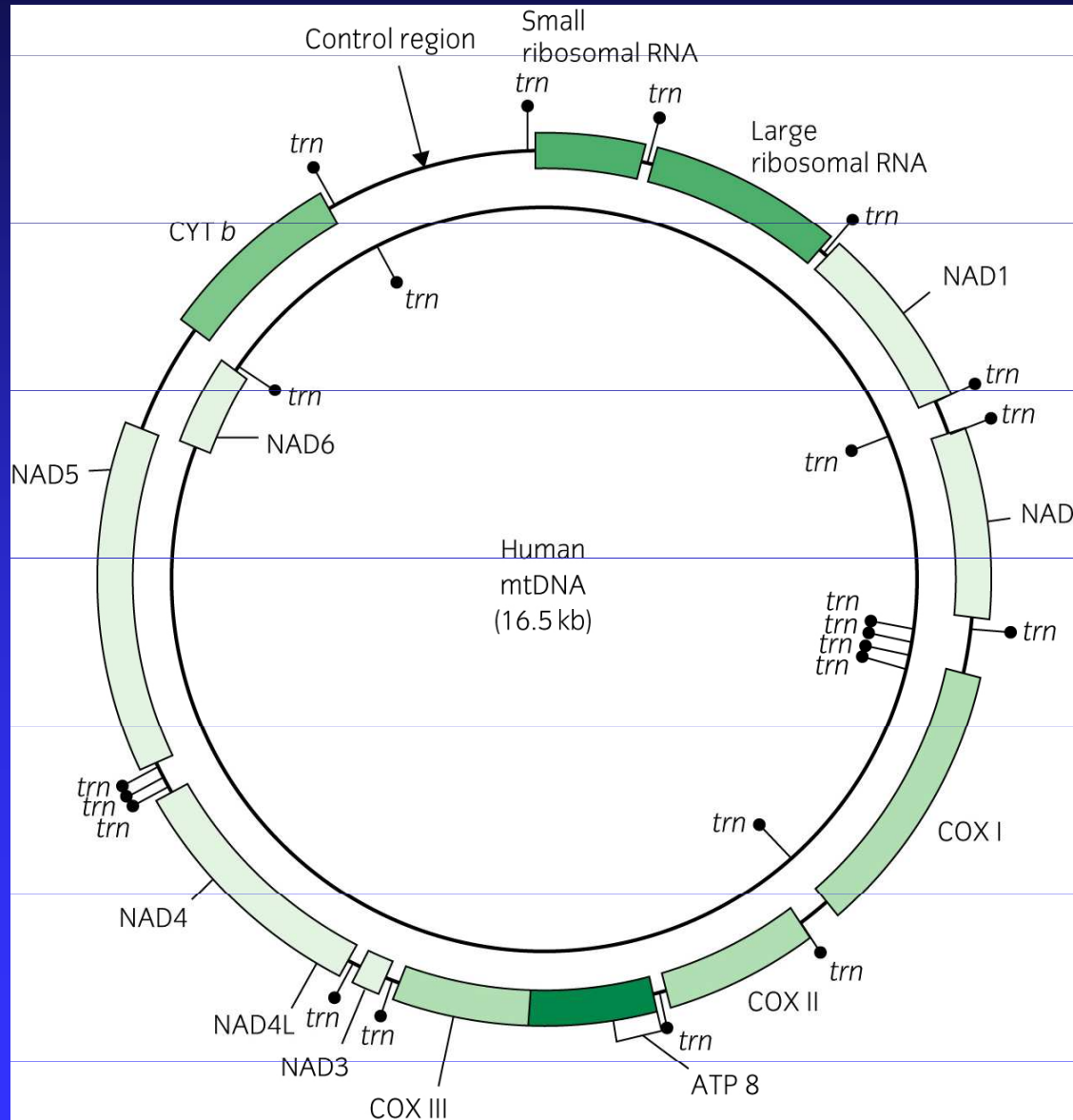


- genes for ribosomal RNA – repeated clusters in eukaryotes
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster in prokaryotes
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

2. Nuclear structural genes

- nízká variabilita mezi jedinci – významná funkce, purifikující selekce (nejsou často používány jako genetické markery) – alozymy
- MHC geny
- SNPs – narůstající význam (jednoduché mutace způsobují významnou funkční změnu)
- studium transkripce - transkriptomika

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

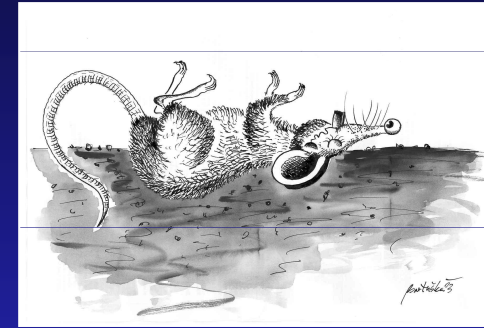
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
 - 1) izolace celkové DNA z tkání
 - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR-based methods)
 - 3) studium variability daného úseku (lokus)

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:

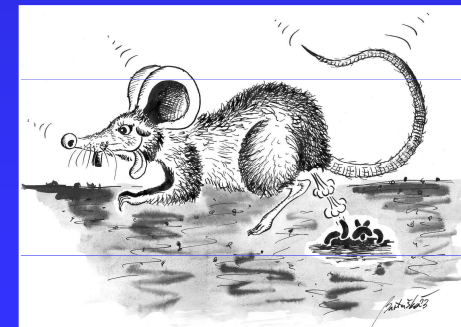
1. **destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy



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.)

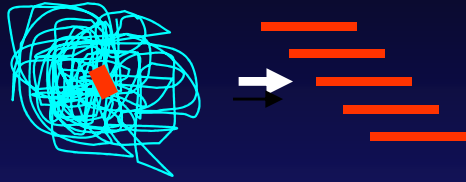
PCR

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

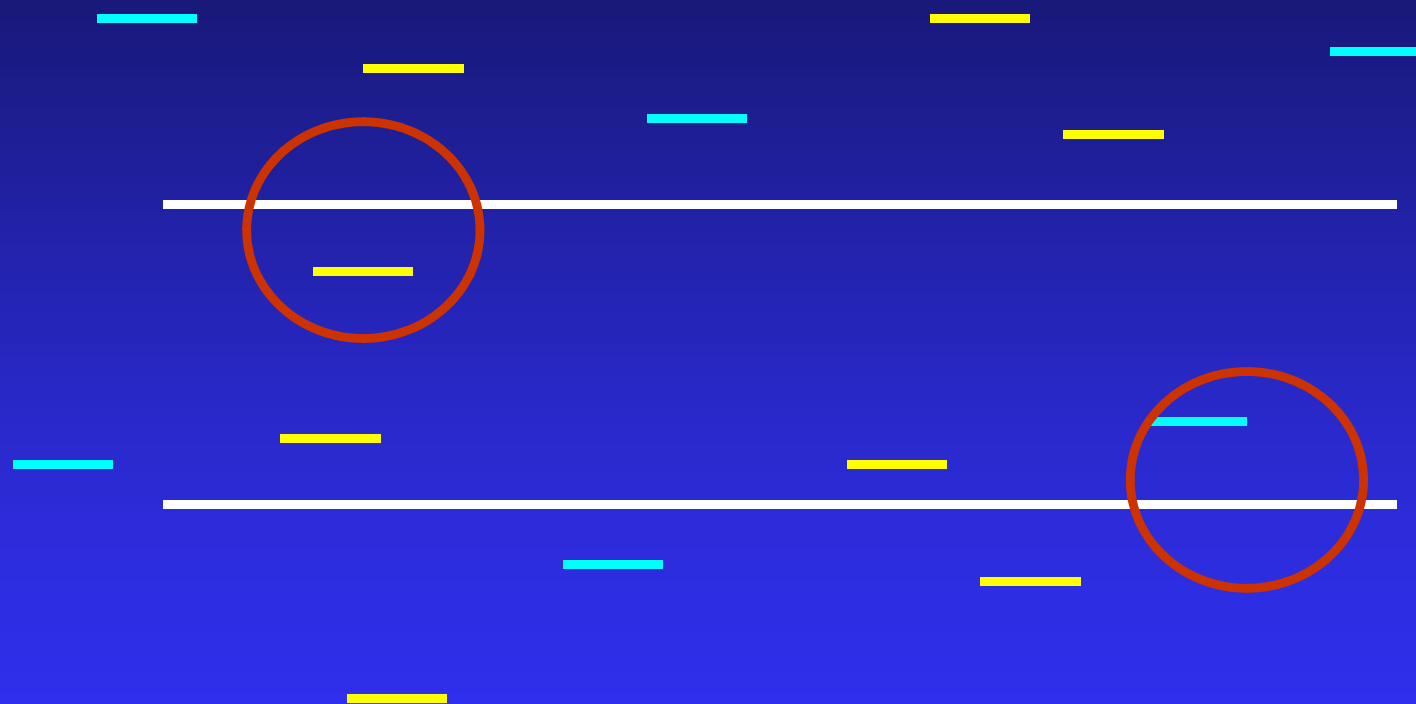
Denaturace (obvykle 95°C)

při zvýšení teploty se oddělí komplementární vlákna DNA



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



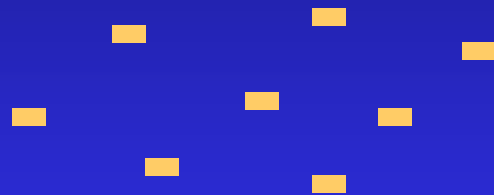
Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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“)



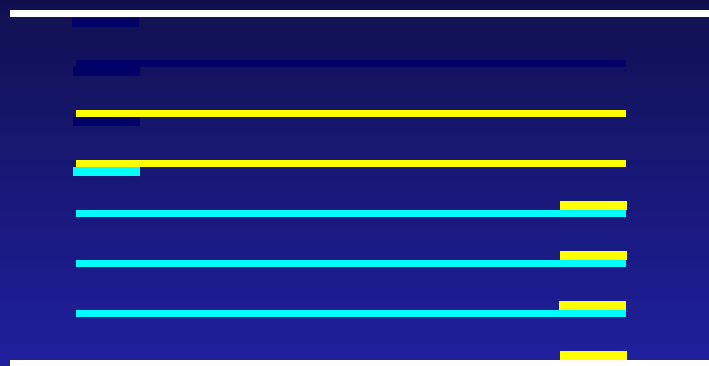
Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



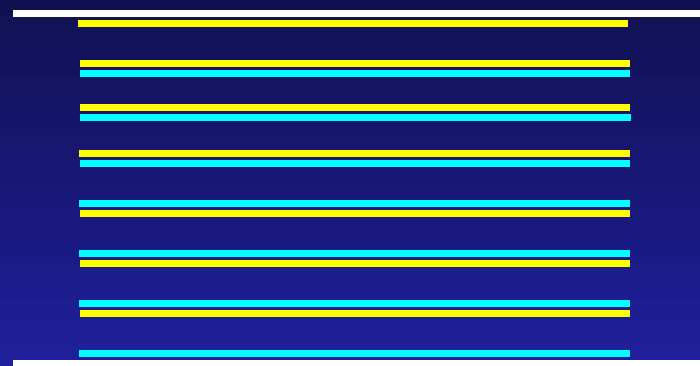
Při dalším zahřátí...



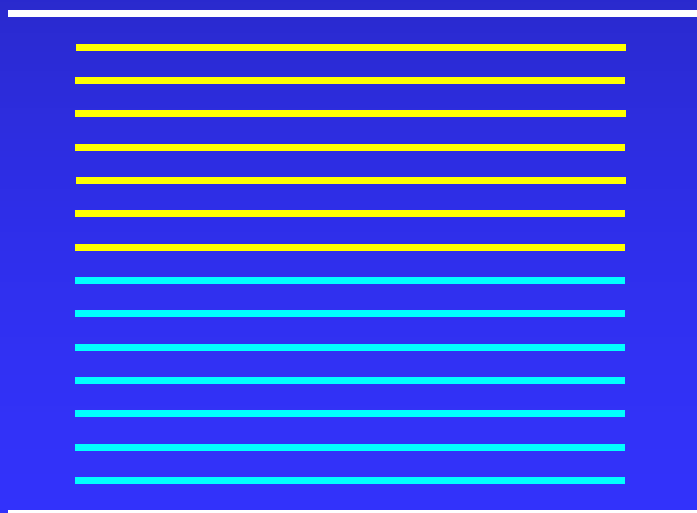
Ochlazení – nasednutí primerů



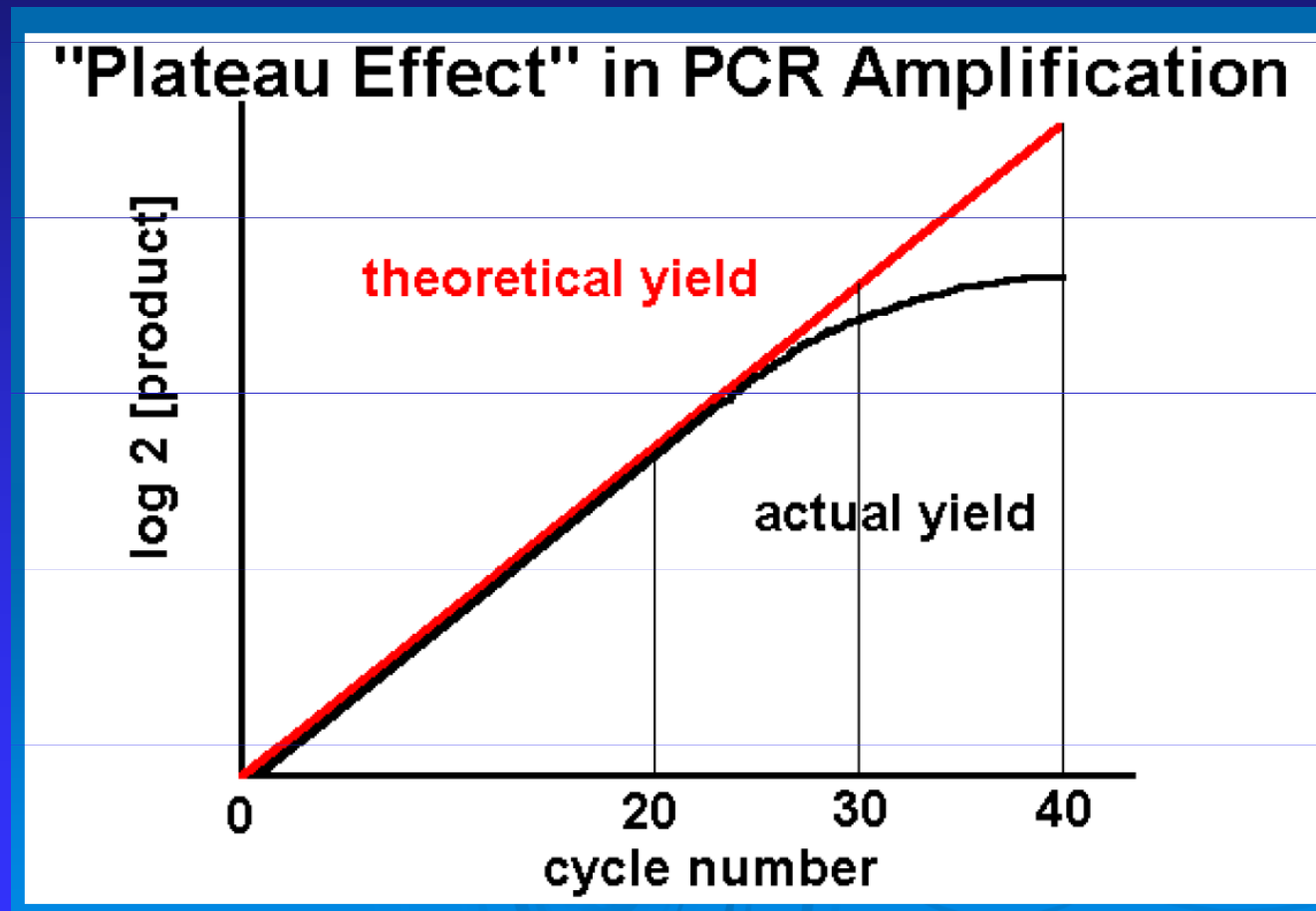
72°C vznik nových fragmentů



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

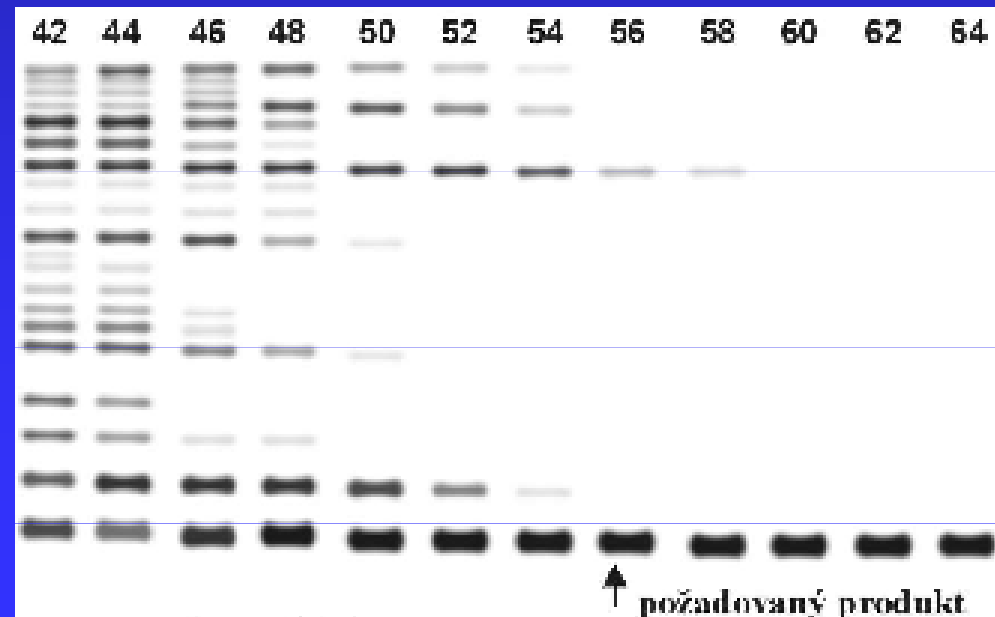
35x zpět

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

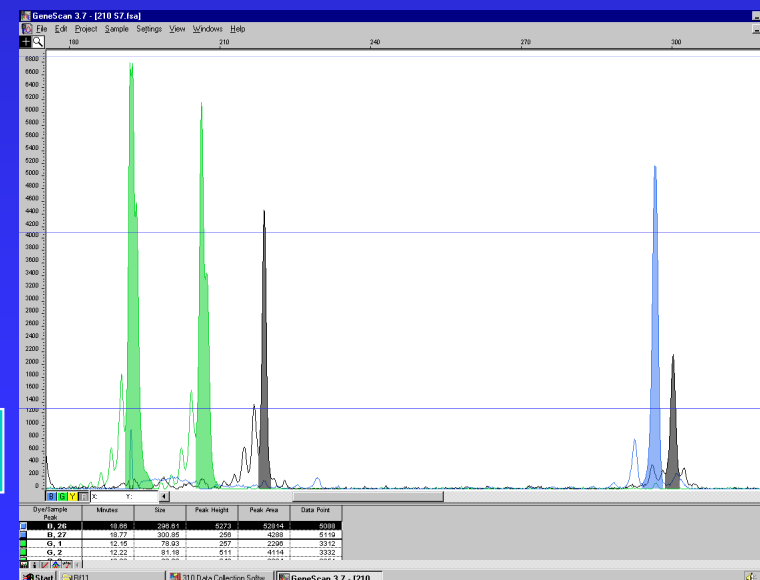
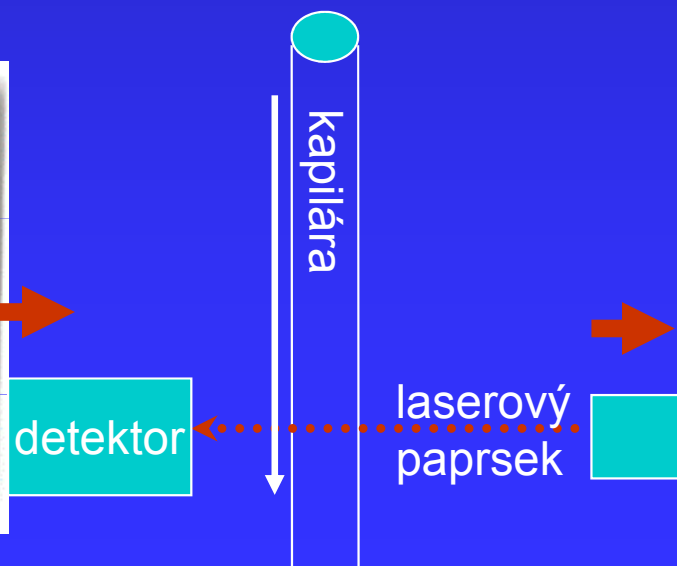
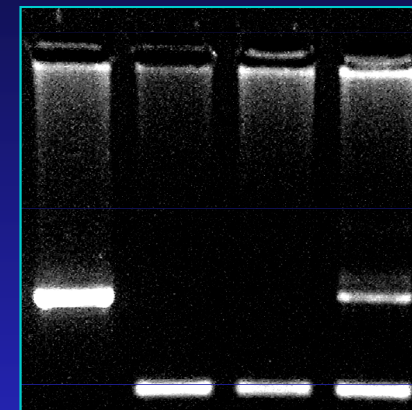


Studium variability nasyntetizovaného úseku

- 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)



Studium variability nasyntetizovaného úseku

2) sekvenční polymorfismus

- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza – mnoho různých metod

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru



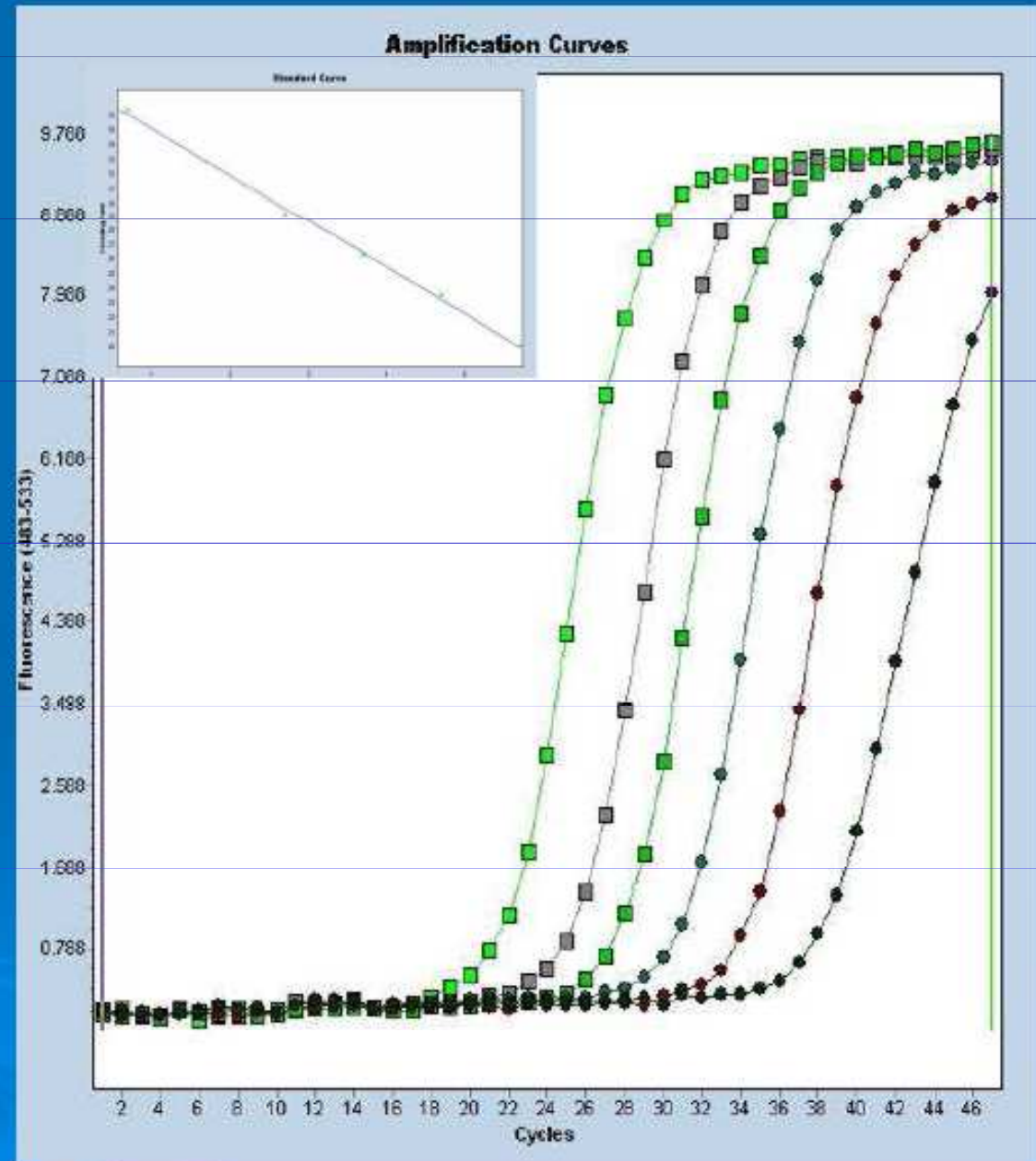
REAL TIME PCR
(= „kvantitativní PCR“)

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...

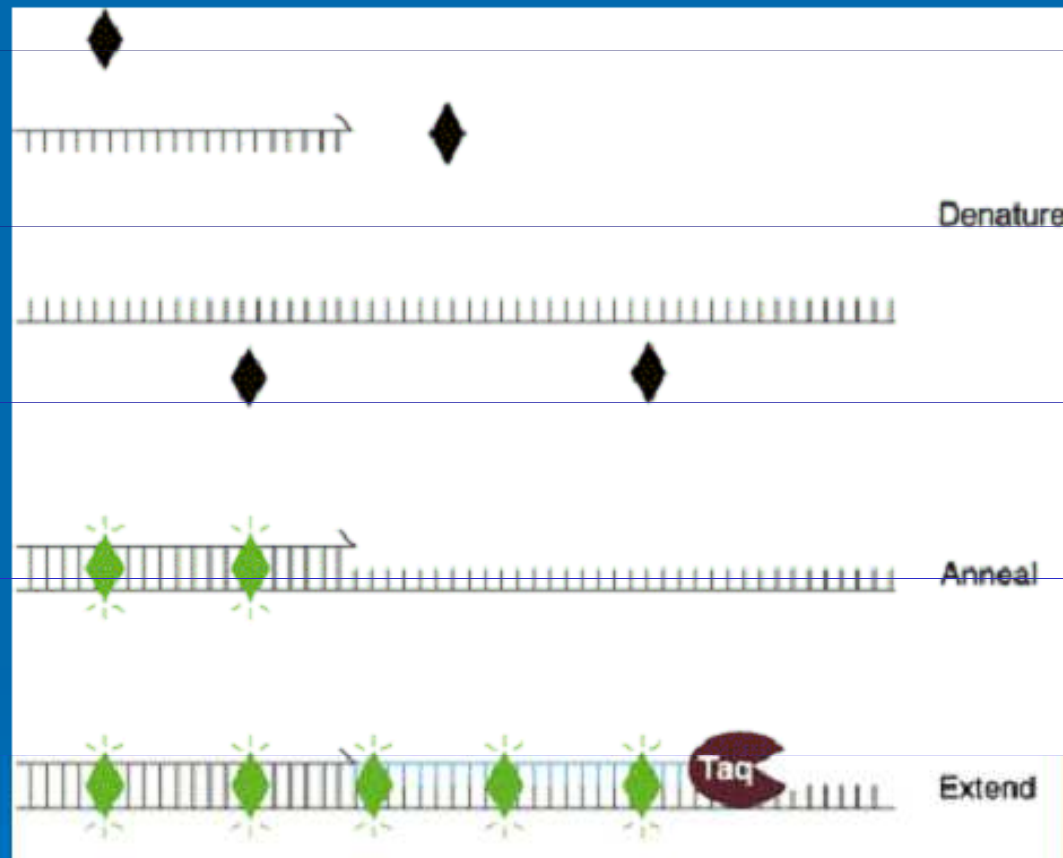
Specifická detekce

» Hydrolyzační sondy (TaqMan®)

» Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)

» ...

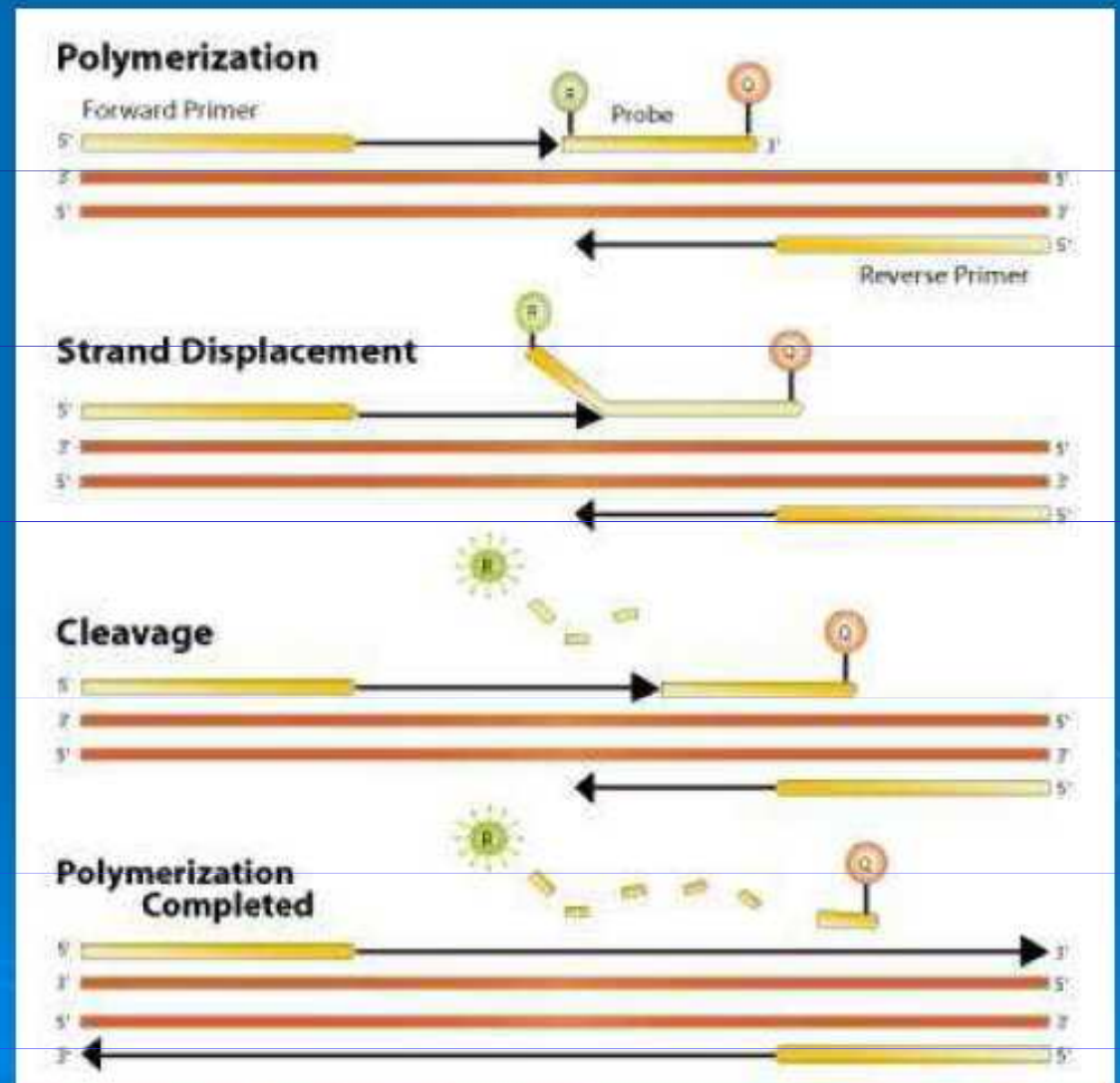
SYBR Green



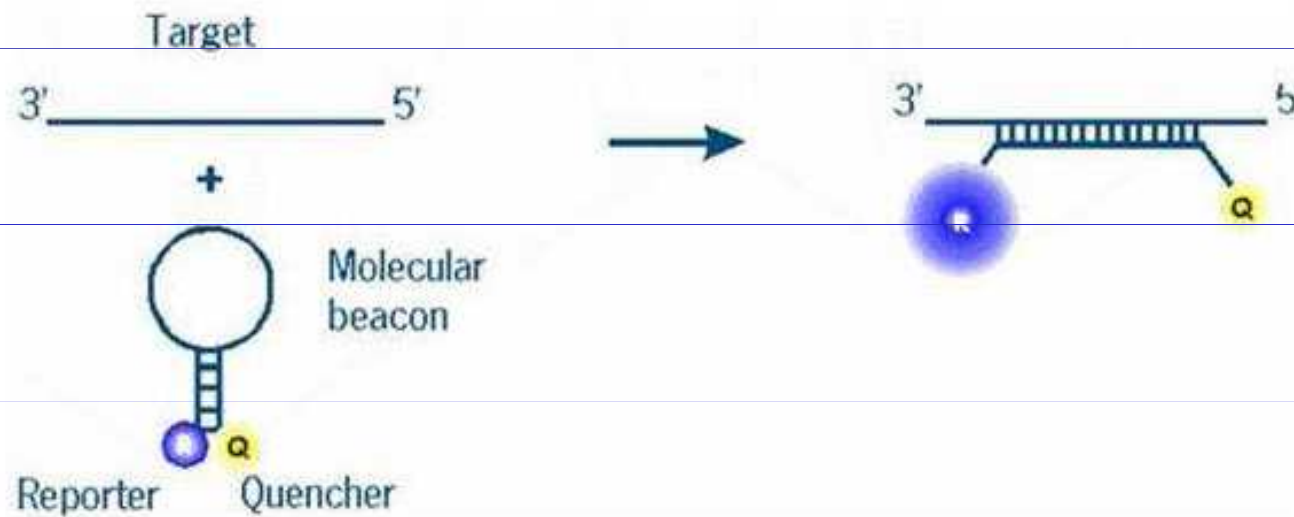
SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

TaqMan hydrolyzační sondy

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



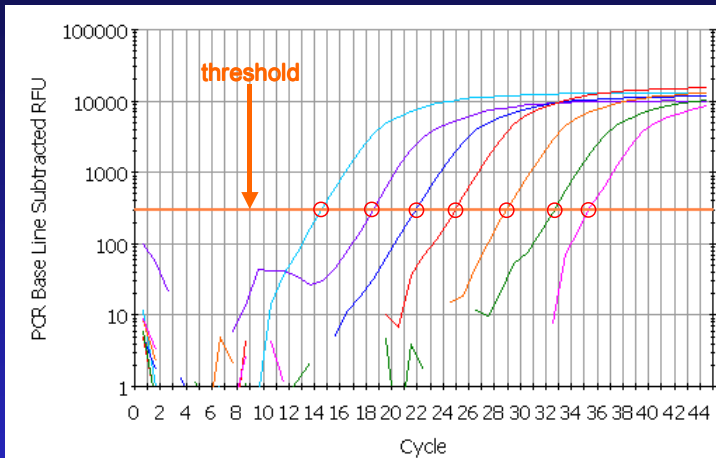
Molecular beacon hybridizační sondy



Real-time PCR přístroje



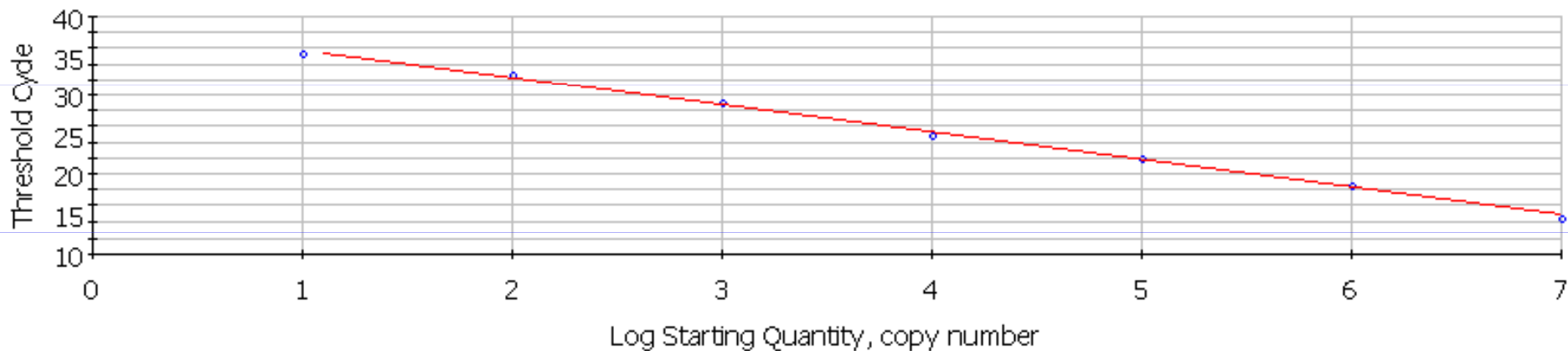
Absolutní kvantifikace



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

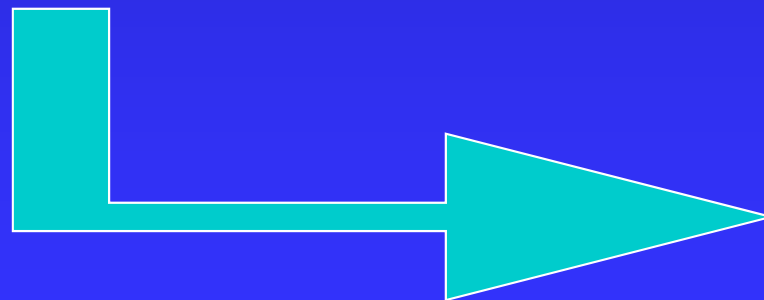
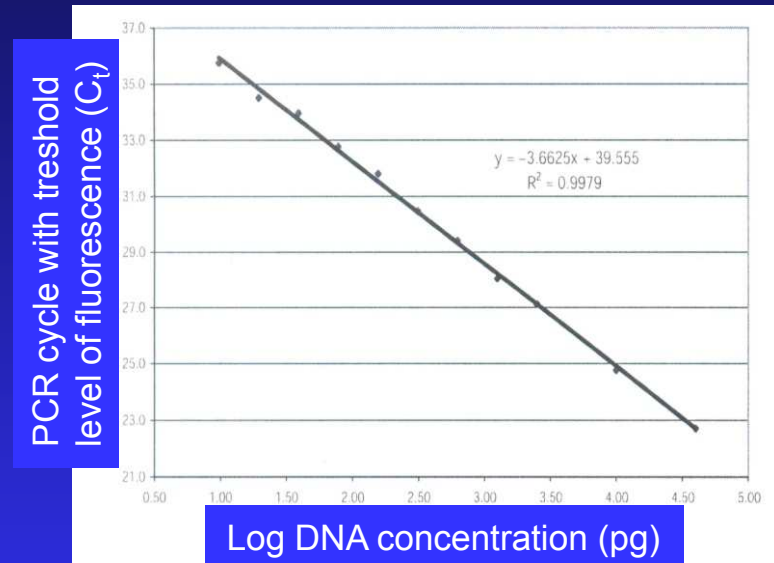
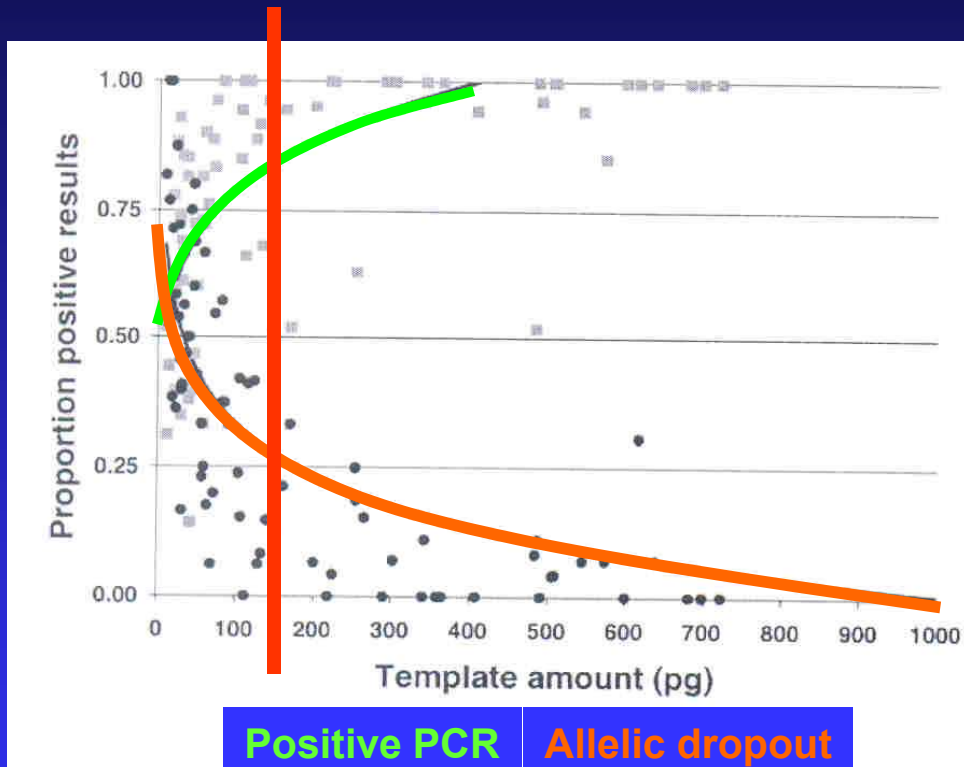
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns
○ Standards



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

Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách



Genotypizace jen „dobrých“ vzorků

Relativní kvantifikace - standardy

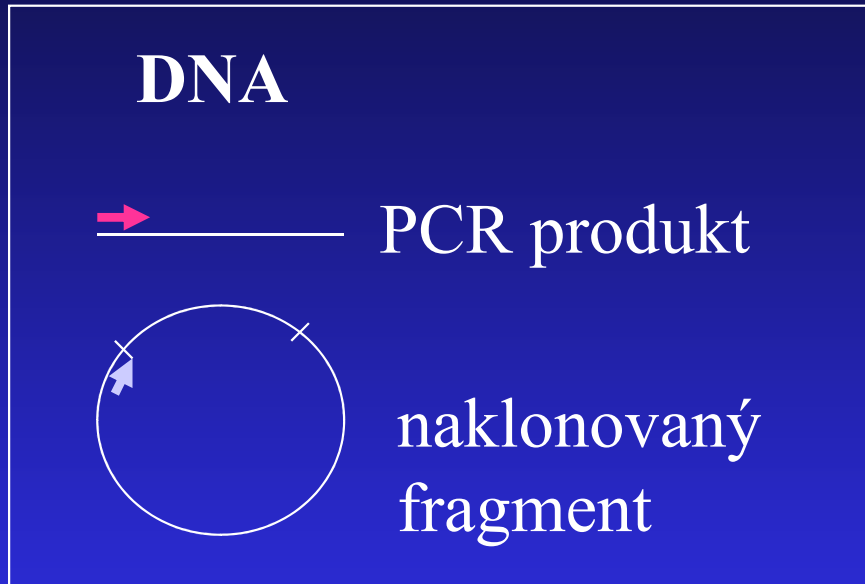
- **Měření úrovně exprese** (např. v různých typech tkání nebo treatment vs. non-treatment atd.
- **housekeeping geny** – slouží jako standard pro měření
- stejný počet kopií ve všech buňkách
- exprimované ve všech buňkách, nezávislé na experimentu

Sekvenování

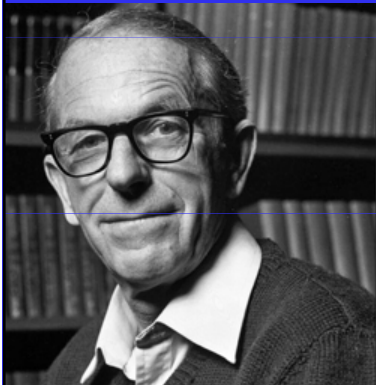
Sekvencování DNA

- Maxam-Gilbertova (chemická) metoda:
bázově-specifická chem. modifikace a
štěpení
fragmentů DNA
- Sangerova (enzymatická) metoda:
terminace replikace pomocí ddNTP

Sekvencování DNA

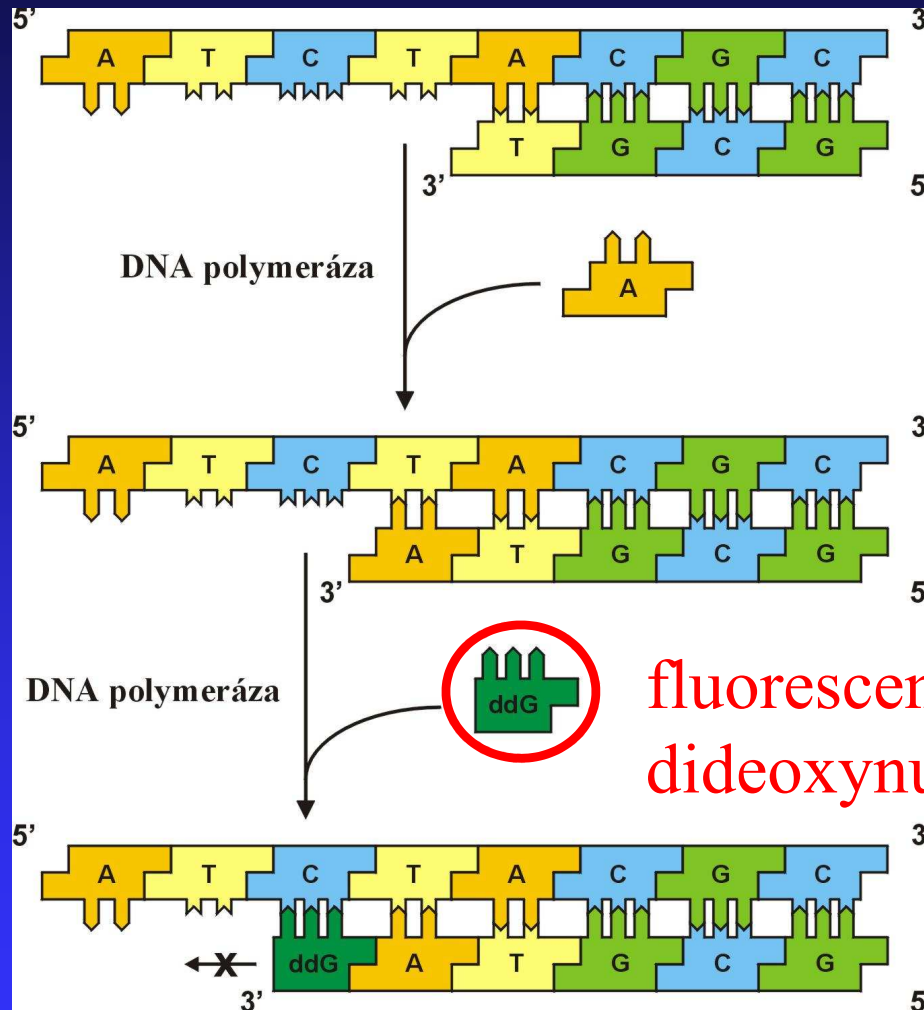


sekvenační reakce se značenými dideoxynukleotidy and jedním **specifickým** nebo universálním primerem

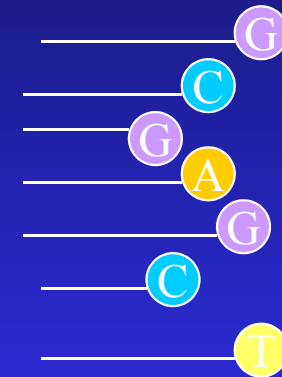


**Sangerova
dideoxy metoda**

Sekvencování DNA



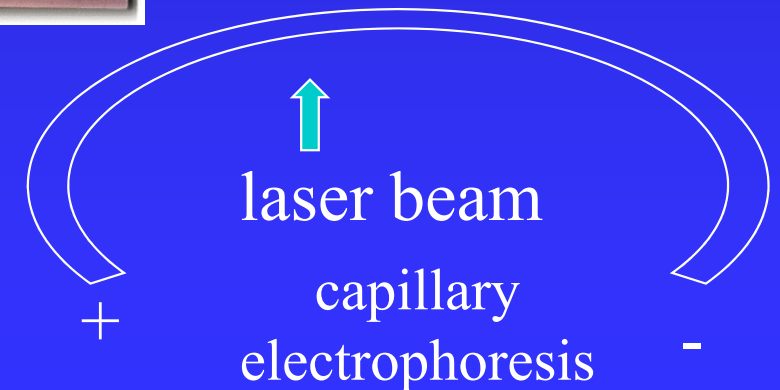
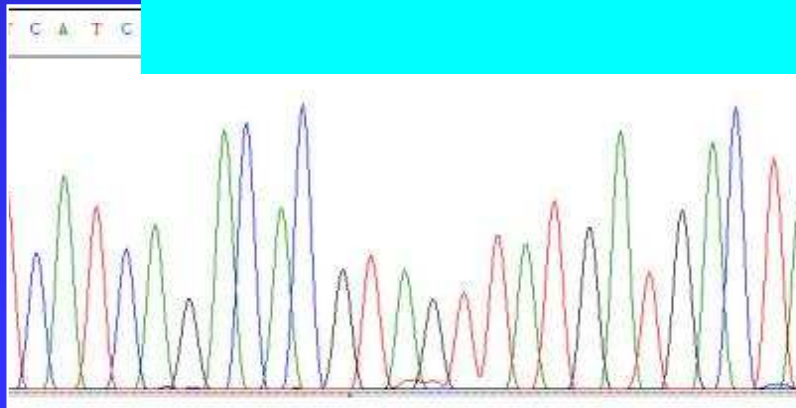
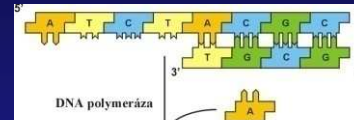
after denaturation



Sekvencování DNA

DNA

- Sekvence délky 500 – 1000 bp
- 4 kapiláry - destička s 96 vzorky za noc
- Jsou i sekvenátory s 96 kapilárami



Příště ...

- Single locus DNA markery – mikrosatelity, SINE, LINE atd....