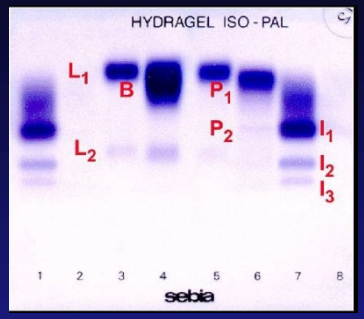
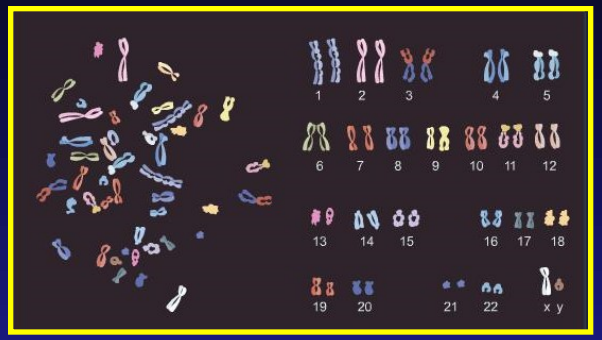
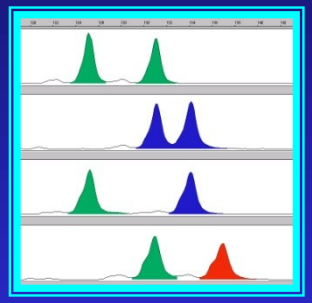
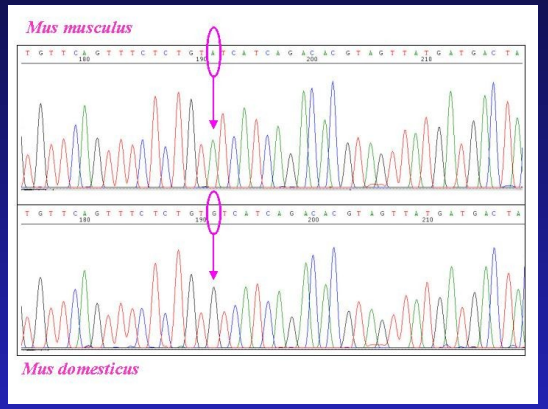








Genetické metody v zoologii

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 (PCR, real-time PCR) JB

11. Praktické cvičení v laboratoři III (analýza DNA fragmentů po PCR, elektroforéza, fragmentační analýza, SSCP v kapiláře) JB

12. Praktické cvičení v laboratoři IV (sekvencování) JB

Doporučená literatura (česká)

Genetické metody v zoologii

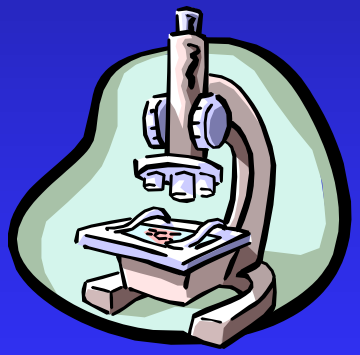
Jan Zima, Miloš Macholán, Pavel Munclinger, Jaroslav Piálek

Nakladatelství Karolinum 2004

Proč?

Problém:
zoologie, taxonomie
ekologie, evoluce

Genetické metody:



klasické metody
morfologická,
ekologická,
bionomická
data

genetická data

Další úroveň poznání
Odpovědi na nové otázky

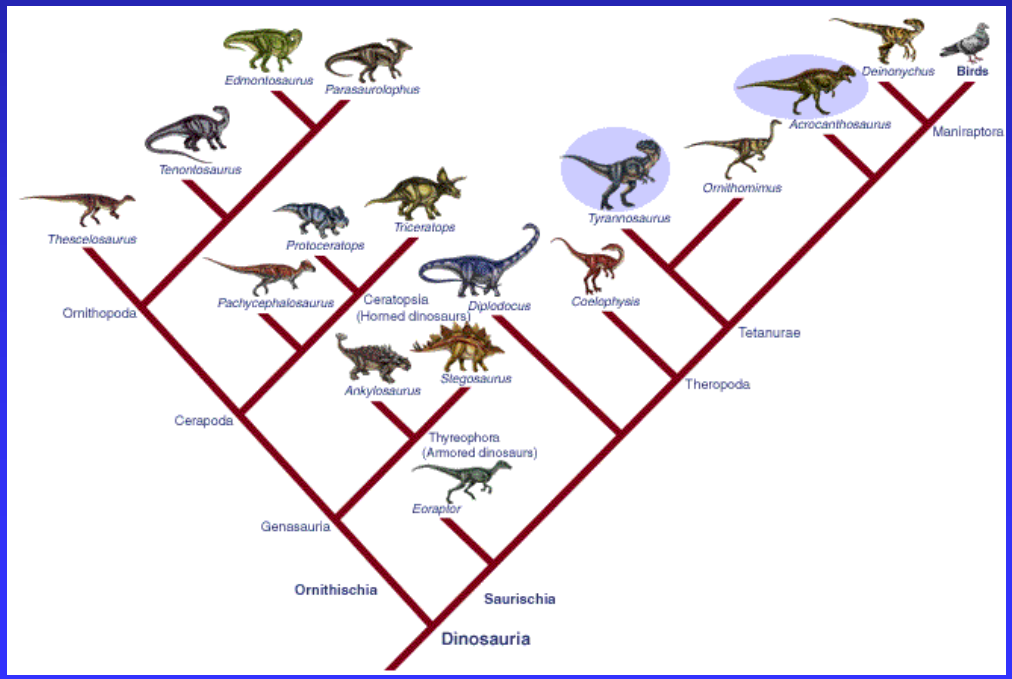
Proč používat genetické metody v zoologii?

- **Často nelze jinak či lépe:**
- rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi populacemi , druhy či vyššími taxony
- 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

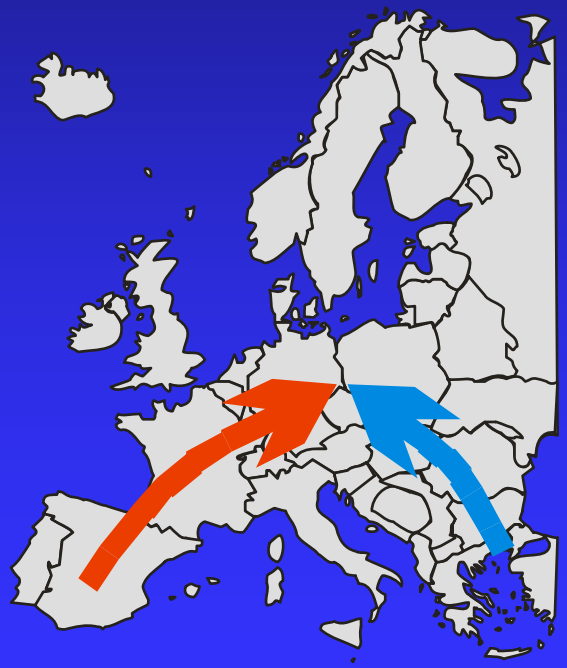
Úrovně genetické variability

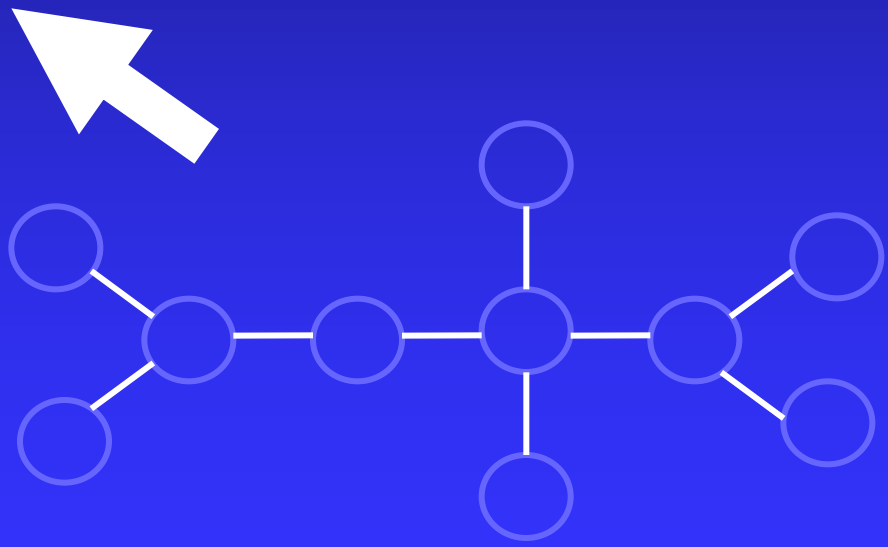
- **druh** – fylogenetické analýzy (fylogenetická systematika, identifikace druhů)



Úrovně genetické variability

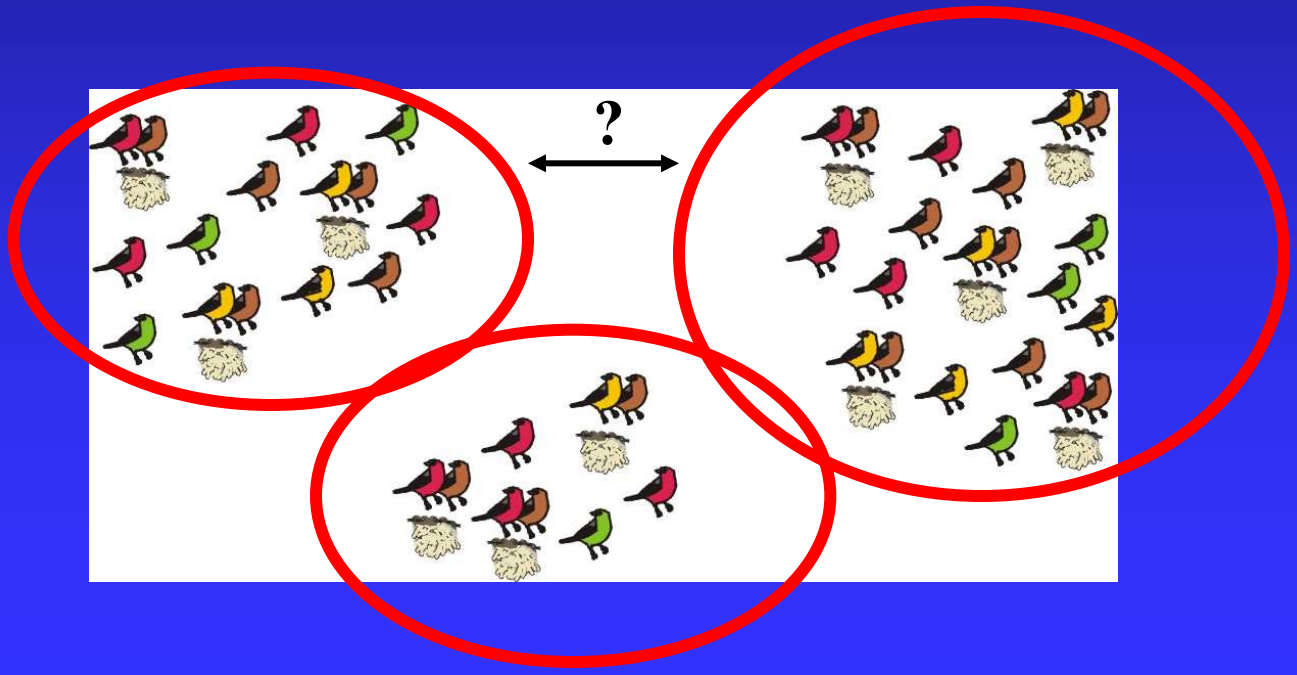
- **populace** – studium speciace, fylogeografie





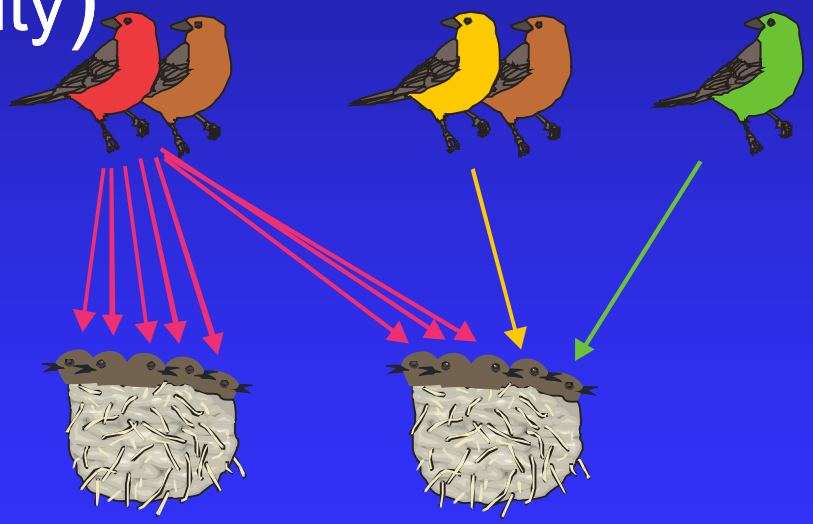
Úrovně genetické variability

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



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 legth, 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

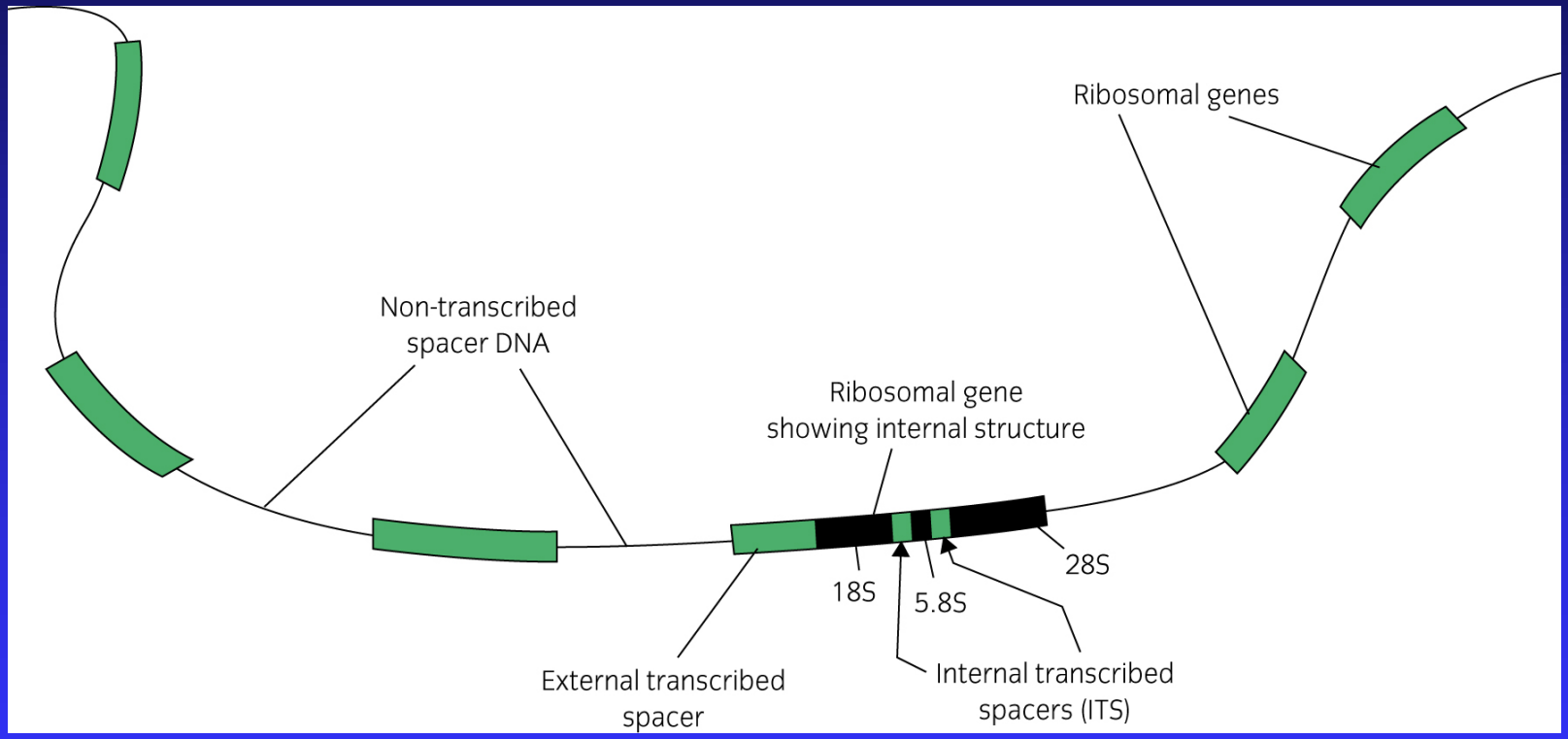
Kódující („funkční“) DNA

1) ribosomal DNA

2) nuclear structural (protein coding) genes

3) mitochondrial DNA

1. Ribosomal DNA

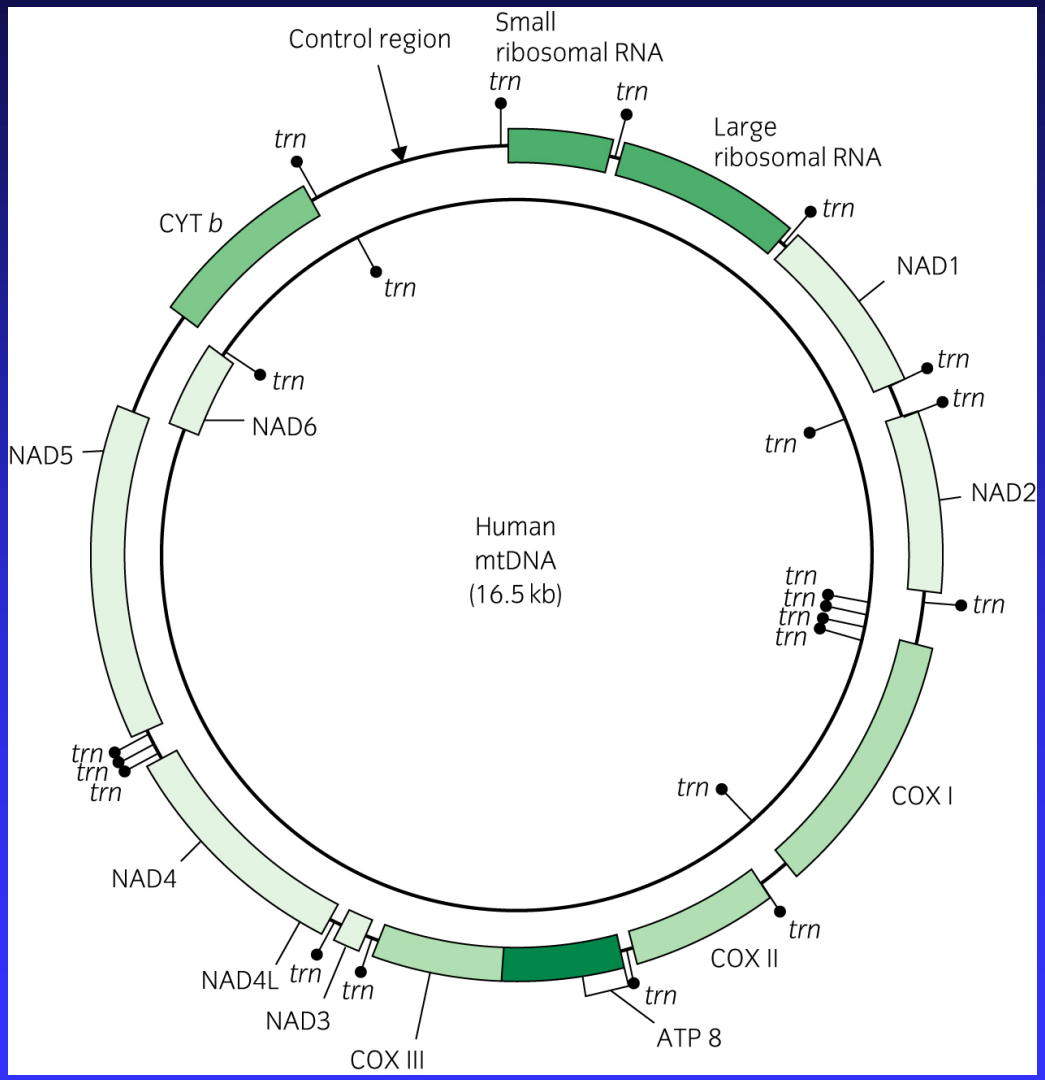


- genes for ribosomal RNA – repeated clusters in eukaryotes
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster in prokaryotes
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

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 (*Placeopecten*)

- maternaly 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:

CGCATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCACATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

Vznik DNA polymorfismu

- mutace (transice, transverze, inzerce, delece)
- rekombinace (kombinace změn vzniklých mutacemi, duplikace a delece při rekombinačních chybách)
- transpozice
- [redacted]becná 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)

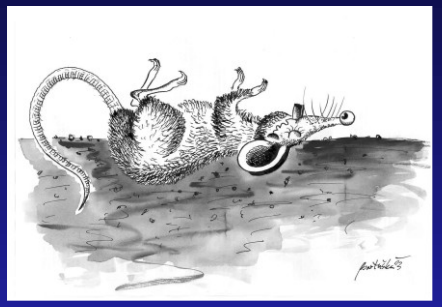
Izolace DNA

- 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

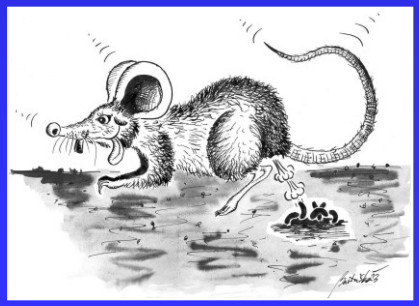
Způsoby získání DNA z volně žijících živočichů:

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	formaldehyd
čistý EtOH	opakované zamražování
rychlé vysušení	rozvlhčování sušeného materiálu
speciální extrakční pufry	další fixační média
zamražení	

- speciální metody pro izolaci ze subrecentního materiálu (mamuti, hmyz v jantaru, neandrtálci apod.)

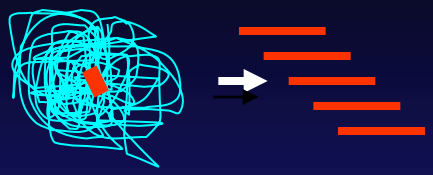
PCR

Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

Amplifikace DNA – PCR

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



PCR

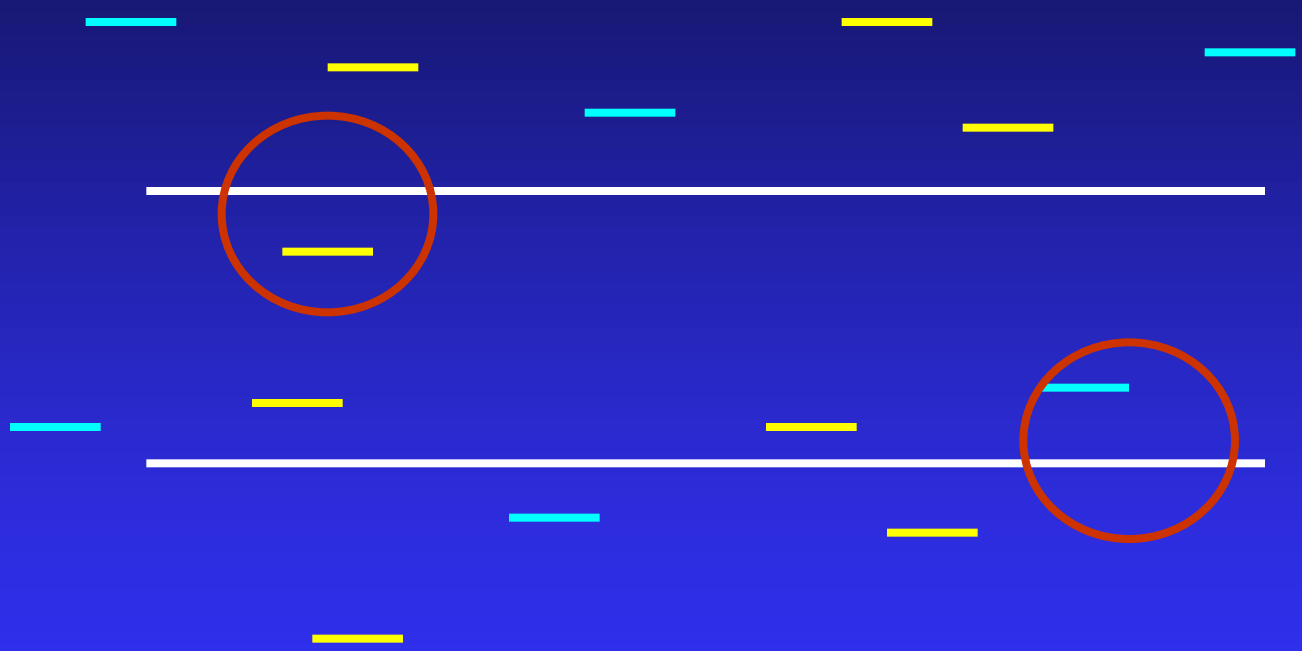
- Z celkové DNA si namnožíme jen úsek, který nás zajímá.
- Co se bude množit? To určí **primery**.
- **Primery** – krátké oligonukleotidy komplementární k úsekům ohraničujícím místo našeho zájmu.

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

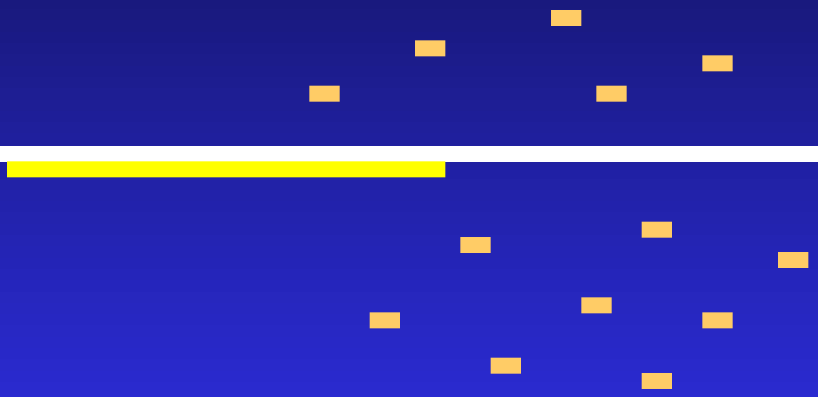


Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

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

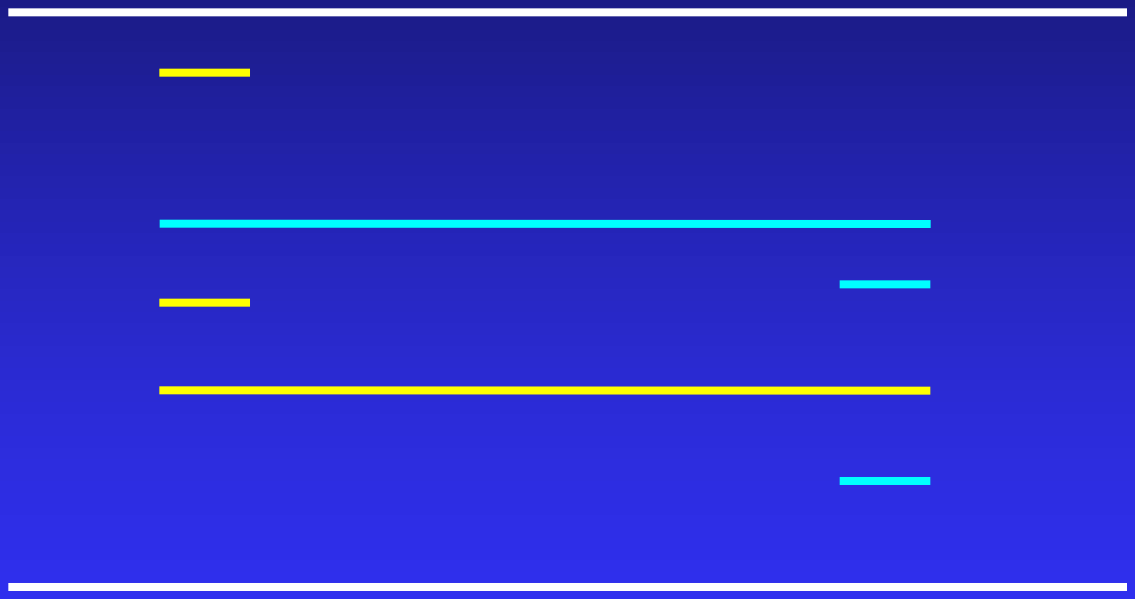
V úseku mezi primery zůstanou vlákna DNA oddělena

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“)

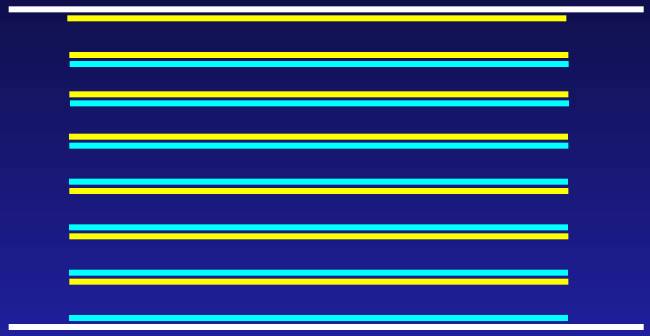


Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií

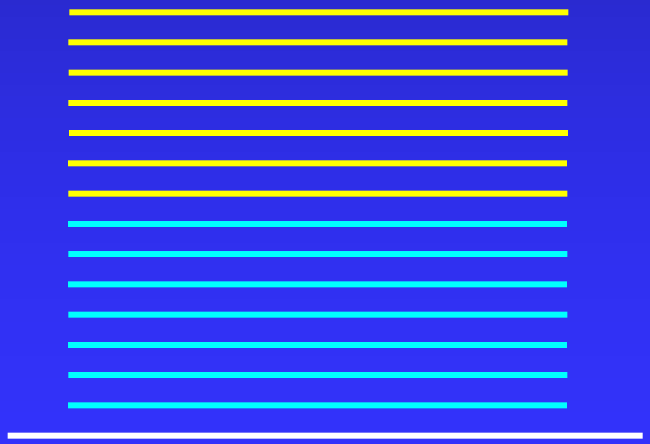
Při dalším zahřátí…

Ochlazení – nasednutí primerů

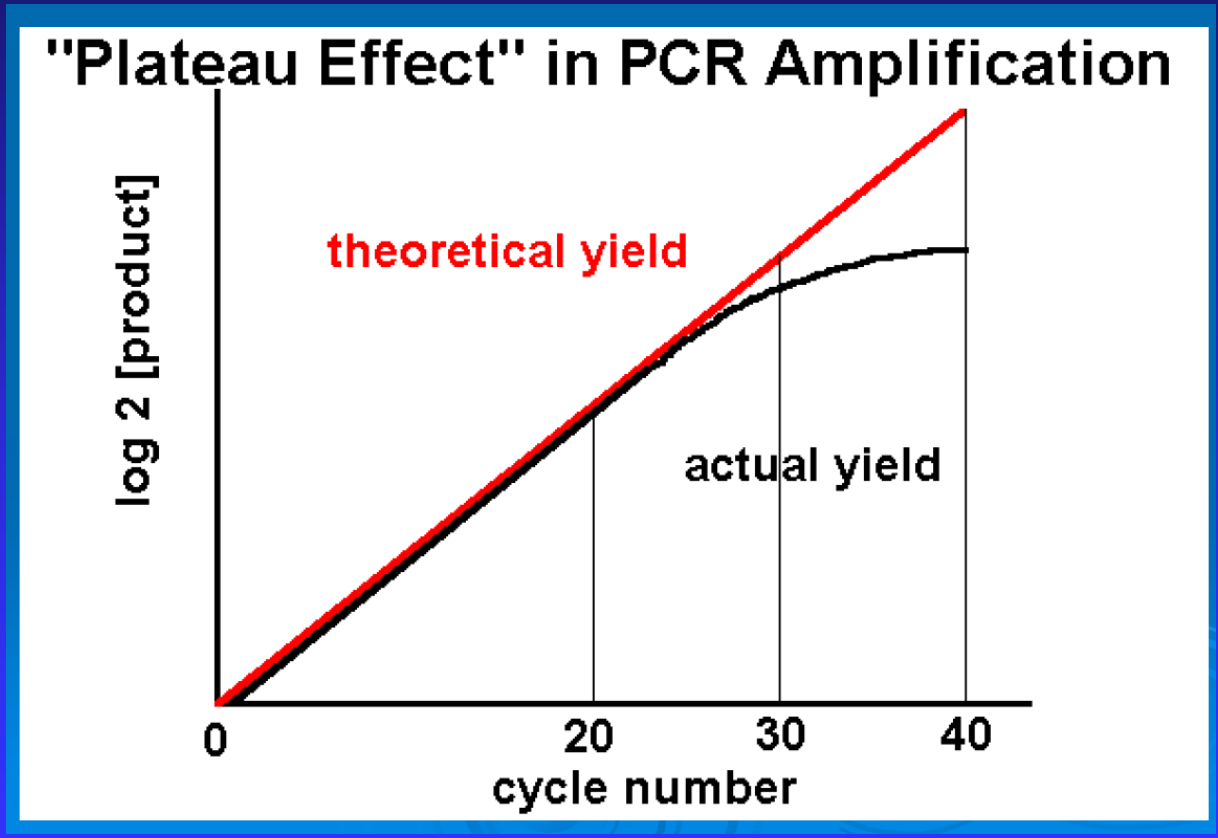
72 C vznik nových fragmentů



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 prodlužená denaturace celkové DNA

Nakonec prodloužená elongace

Příklad programu

95 C 3 min

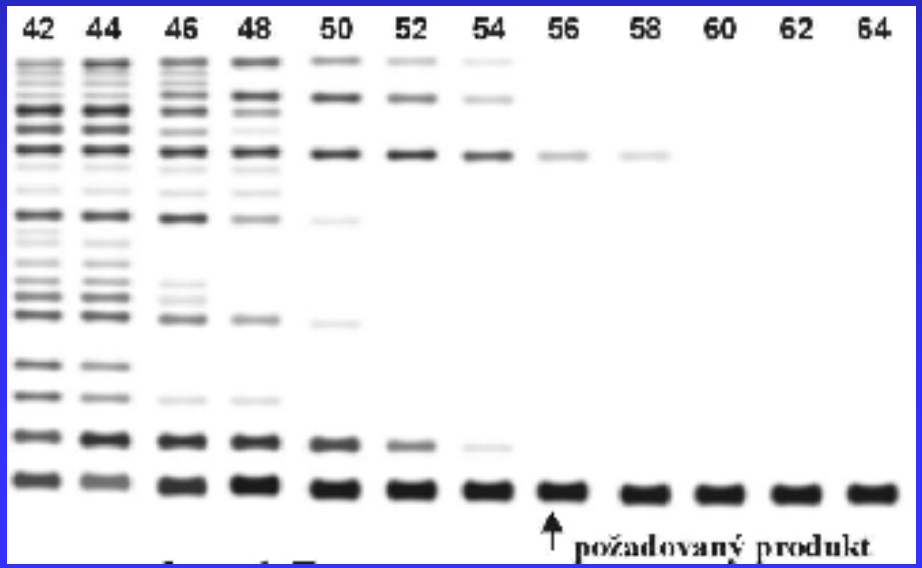
95 C 30 s
60 C 30 s
72 C 1 min
35x zpět

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
- Navrhneme nové primery



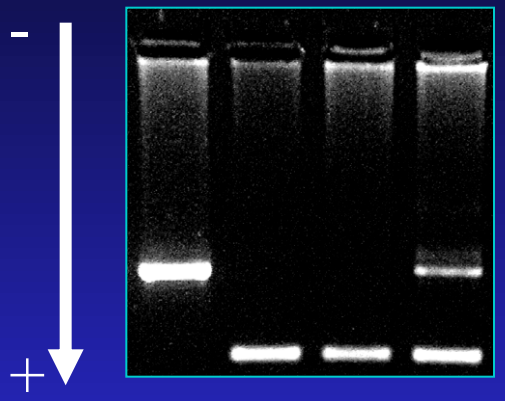
Studium variability nasyntetizovaného úseku

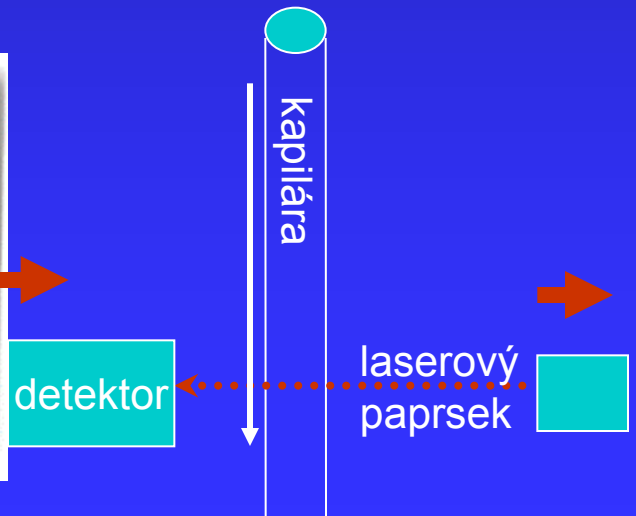
1) **délkový polymorfismus**

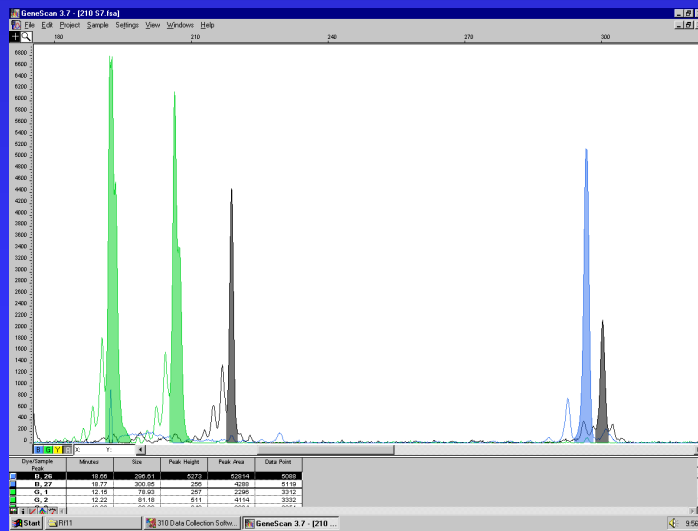
- elektroforéza

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

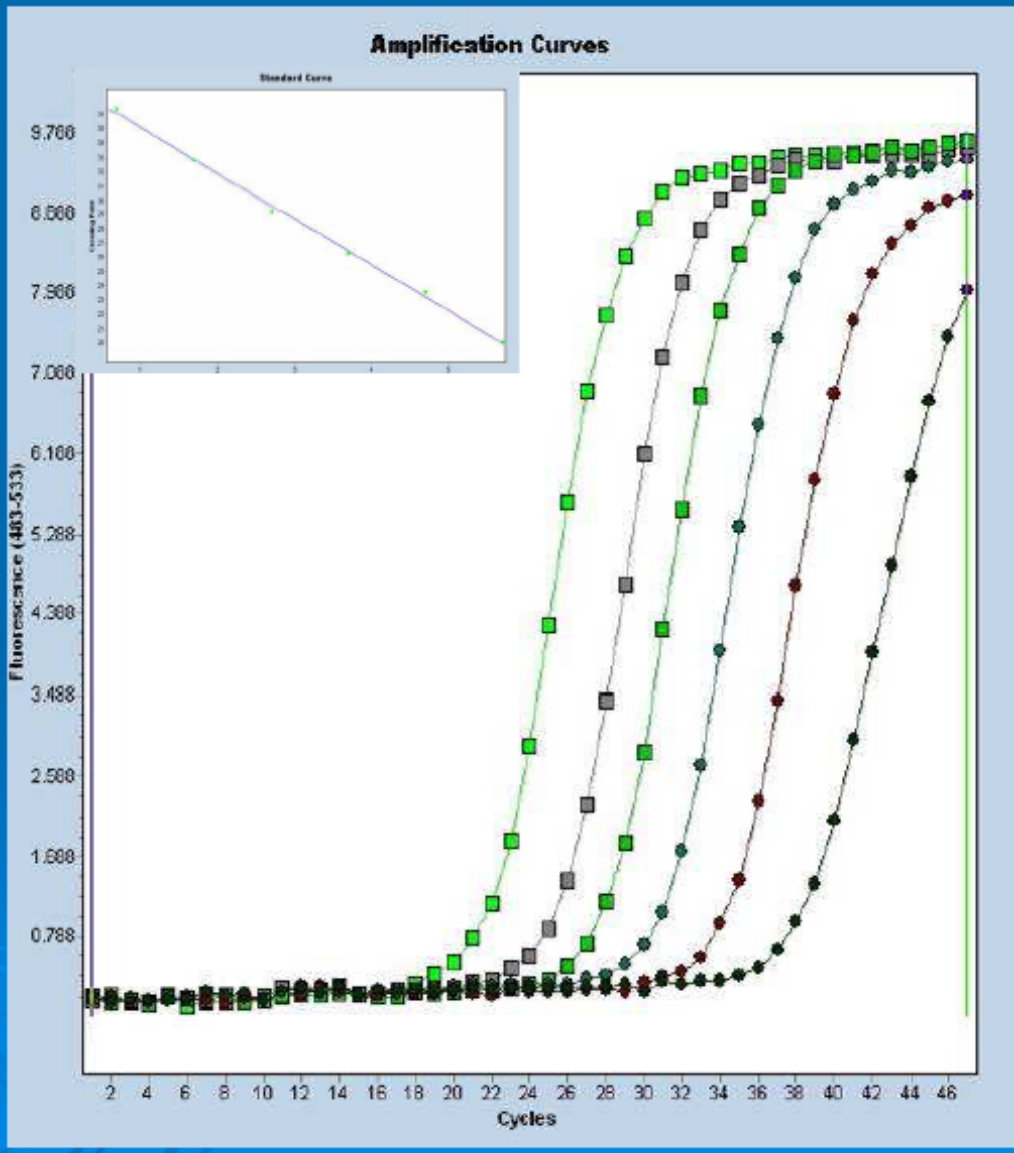
REAL TIME PCR
(= „kvantitativní PCR“)

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

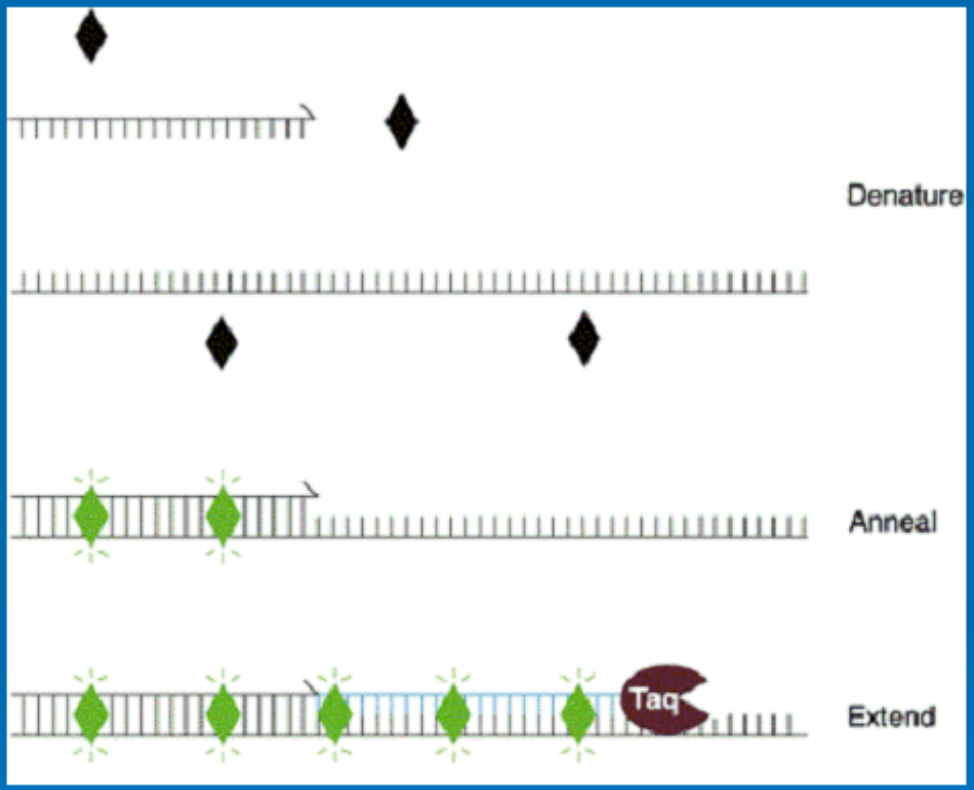
Nespecifická detekce

- (EtBr), SYBR Green, BEBO, BOXTO...

Specifická detekce

- Hydrolyzační sondy (TaqMan®)
- Hybridizační sondy (FRET®, Molecular beacon®)
- ...

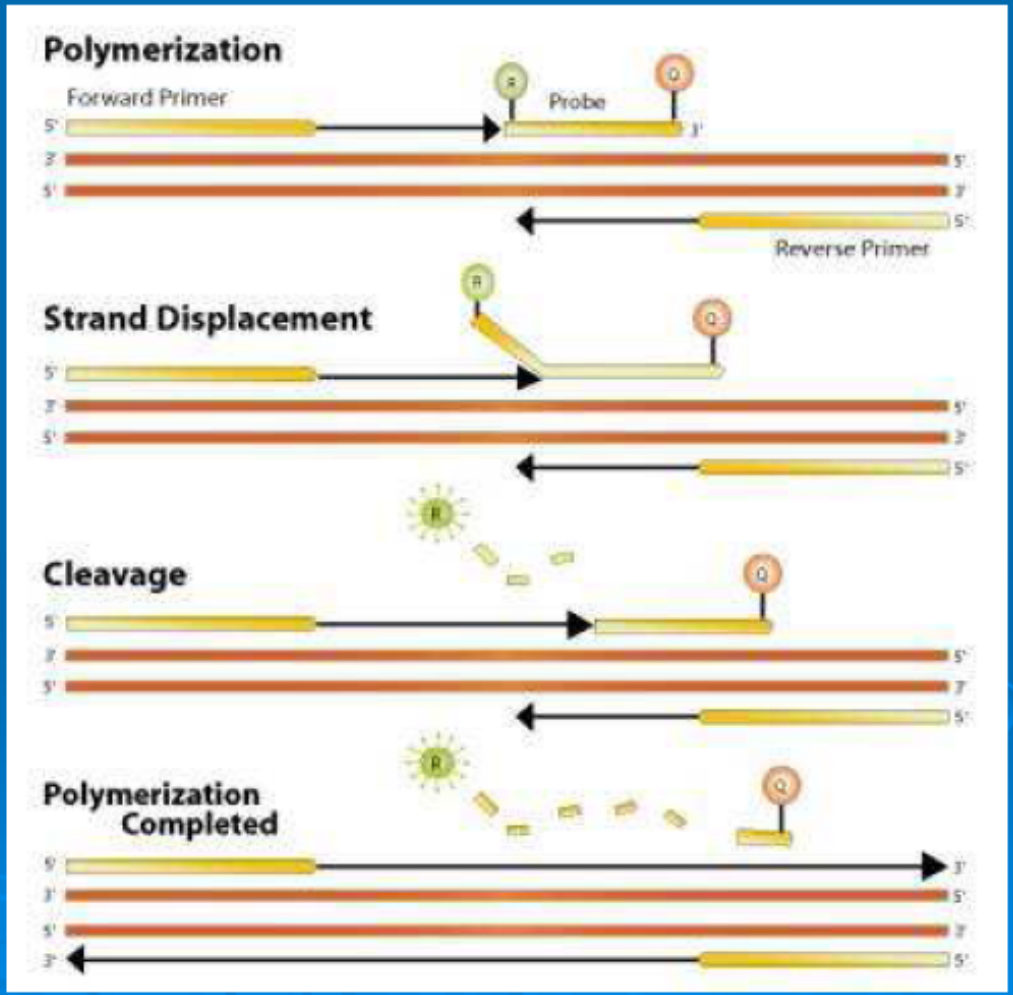
SYBR Green



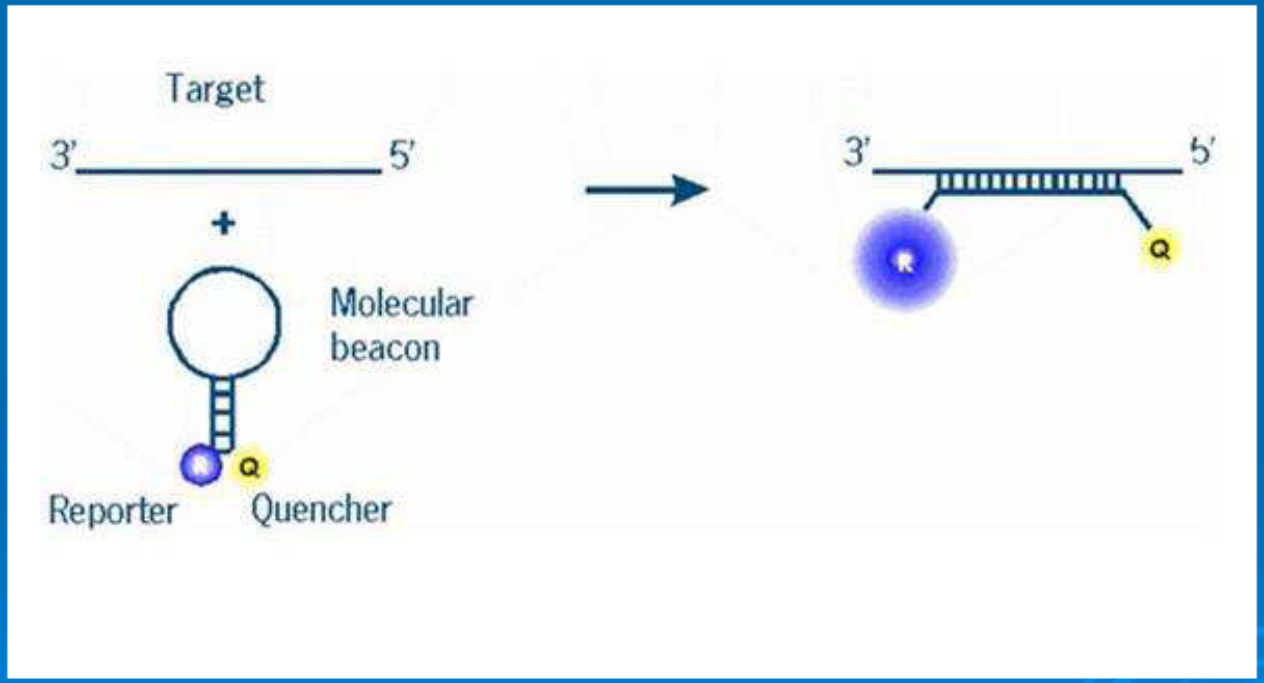
SYBR Green po inkorporaci do dsDNA poskytuje zvýšenou fluorescenci.

TaqMan hydrolyzační sondy

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

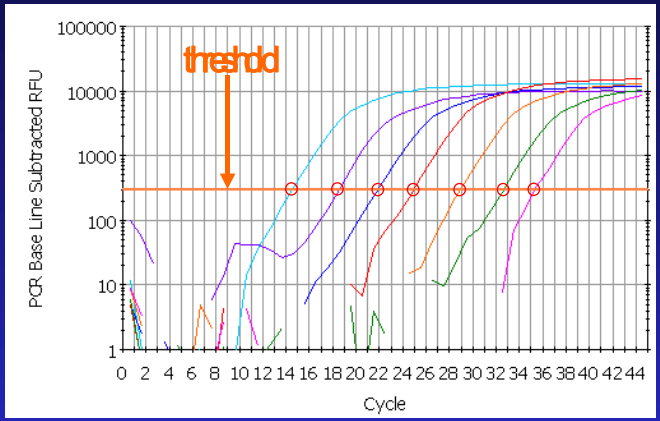


Molecular beacon hybridizační sondy

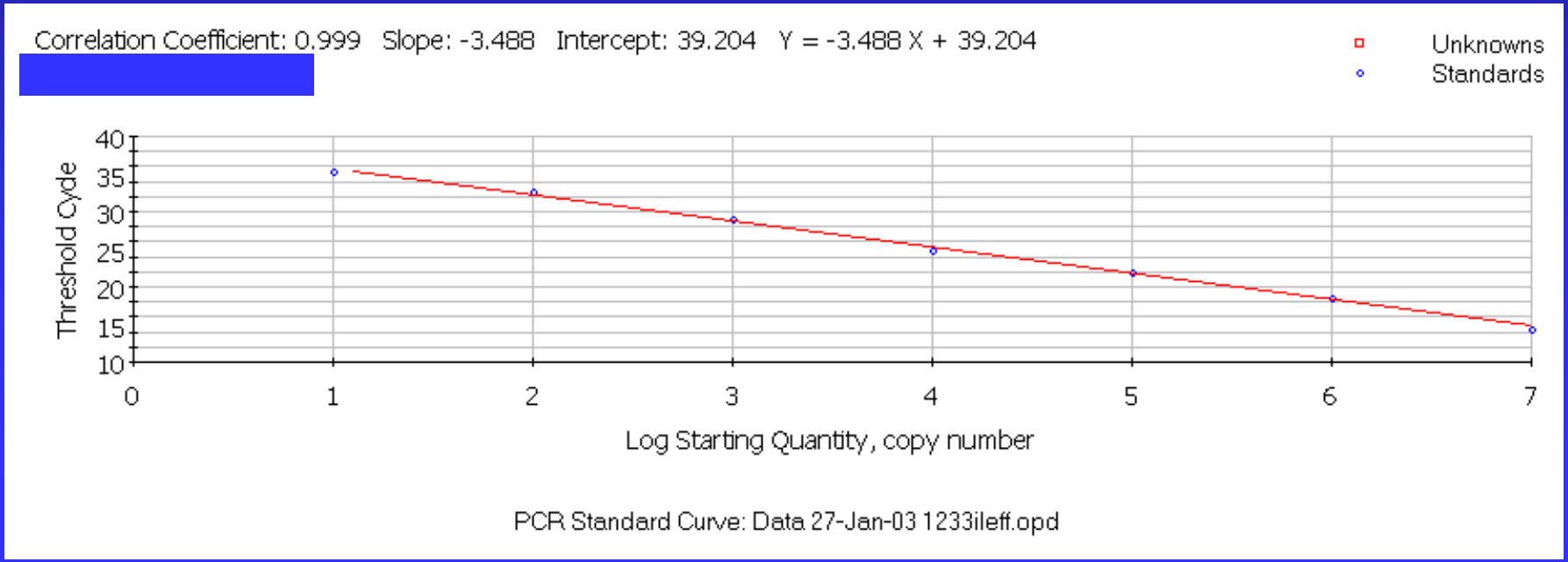


Real-time PCR přístroje

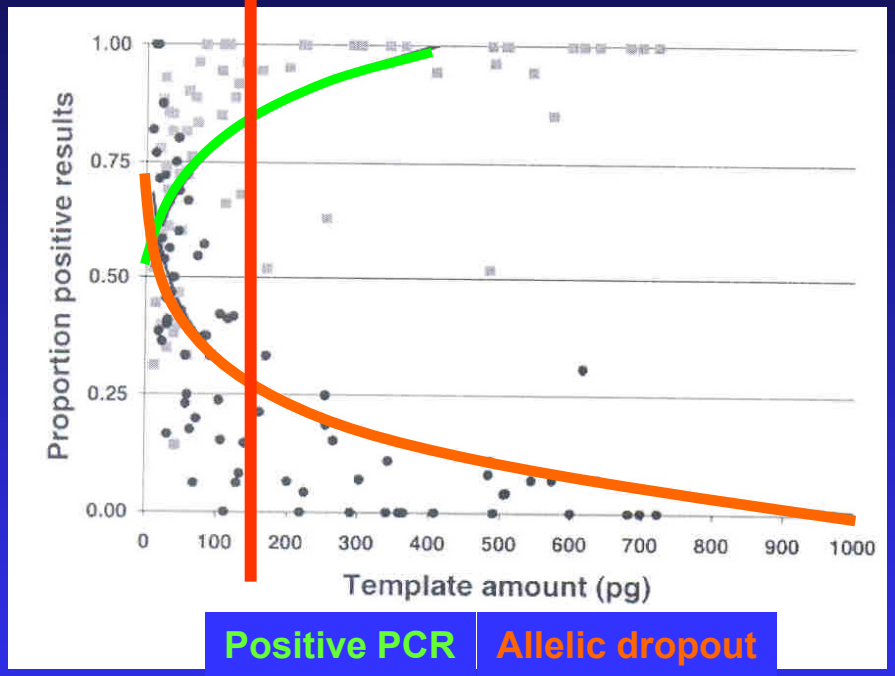
Absolutní kvantifikace

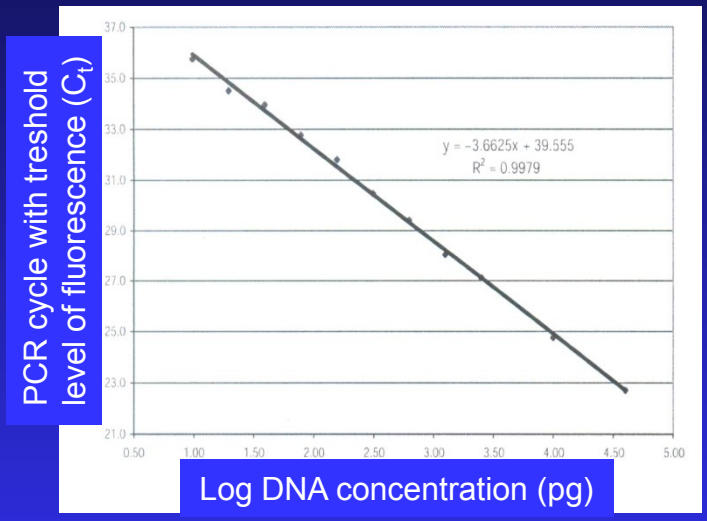


1) Vytvoření kalibrační křivky
2) Real-time PCR se vzorkem s neznámým množstvím DNA, např. z trusu



Stanovení koncentrace DNA při neinvazivních analýzách





Genotypizace jen „dobrých“ vzorků

Morin et al. 2000

Relativní kvantifikace - standardy

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

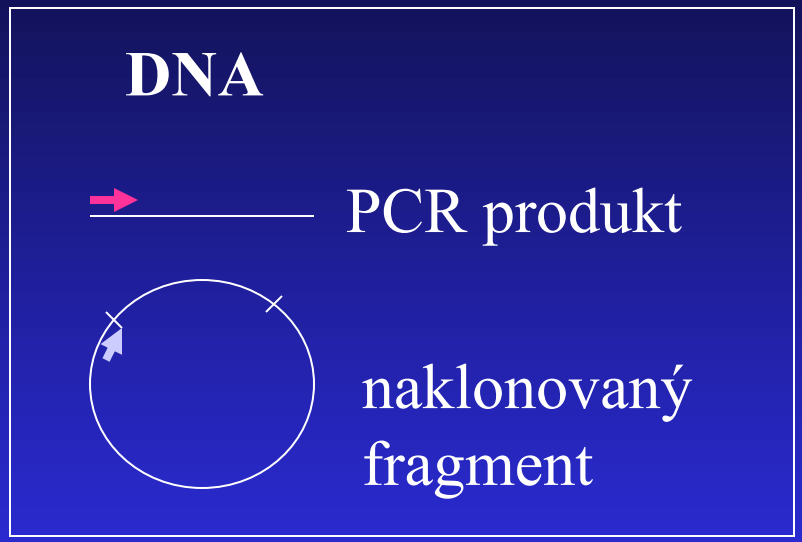
Sekvenování

Sekvencování DNA

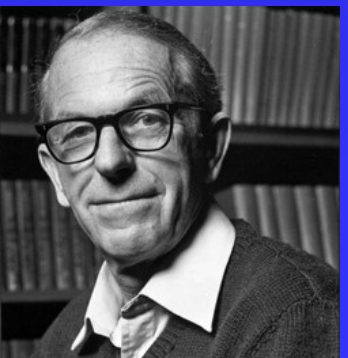
- Maxam-Gilbertova (chemická) metoda:
  bázově-specifická chem. modifikace a štěpení
  fragmentů DNA

- Sangerova (enzymatická) metoda:
  terminace replikace pomocí ddNTP

Sekvencování DNA

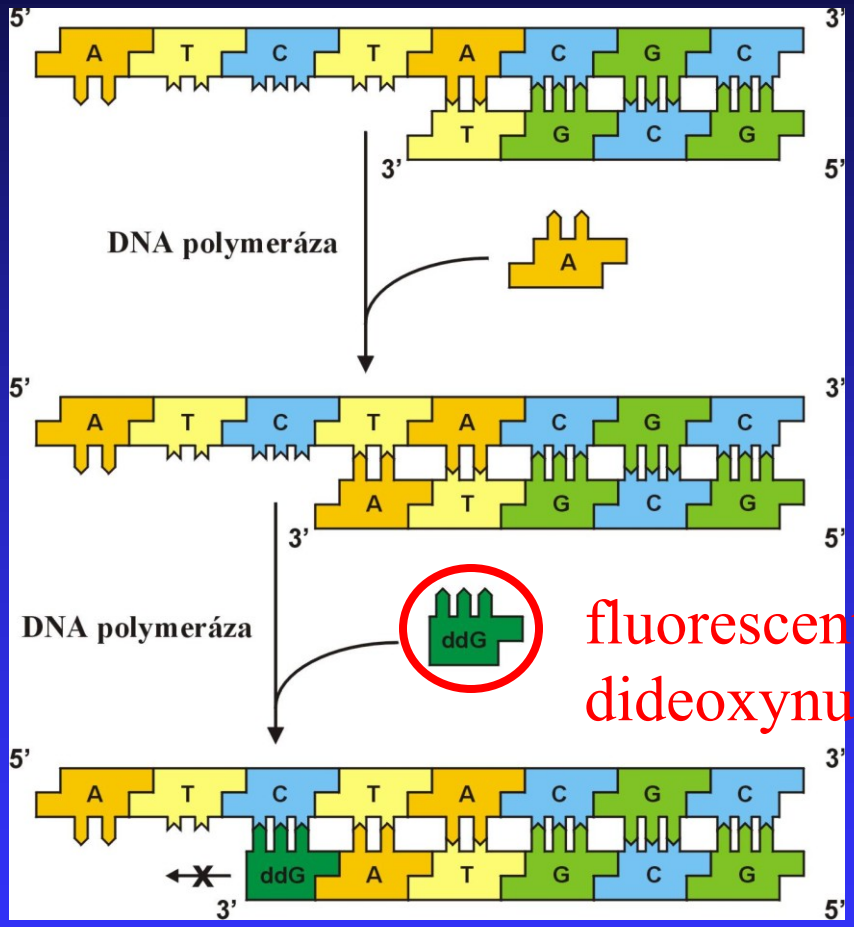


sekvenační reakce se značenými dideoxynukleotidy and jedním specifickým nebo universálním primerem



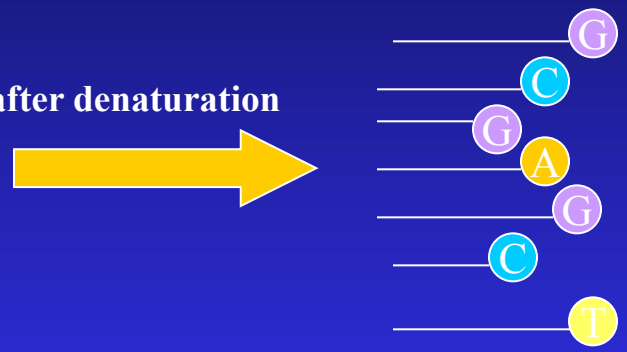
Sangerova dideoxy metoda

Sekvencování DNA



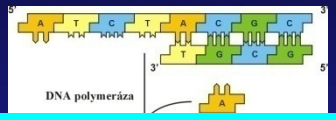
fluorescently-labelled dideoxynucleotide

after denaturation

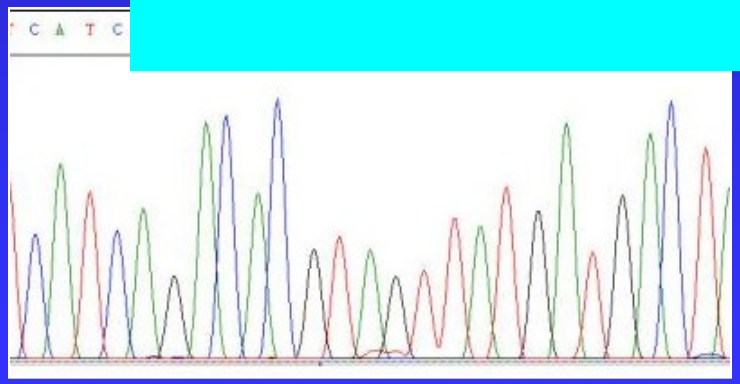


Sekvencování DNA

DNA



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



laser beam

capillary electrophoresis

+

-

Příště …

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