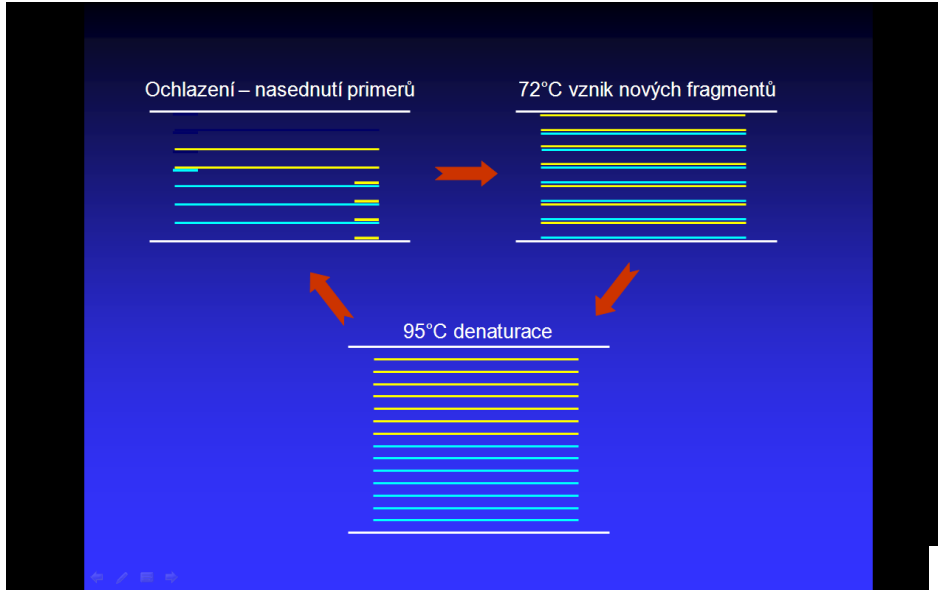
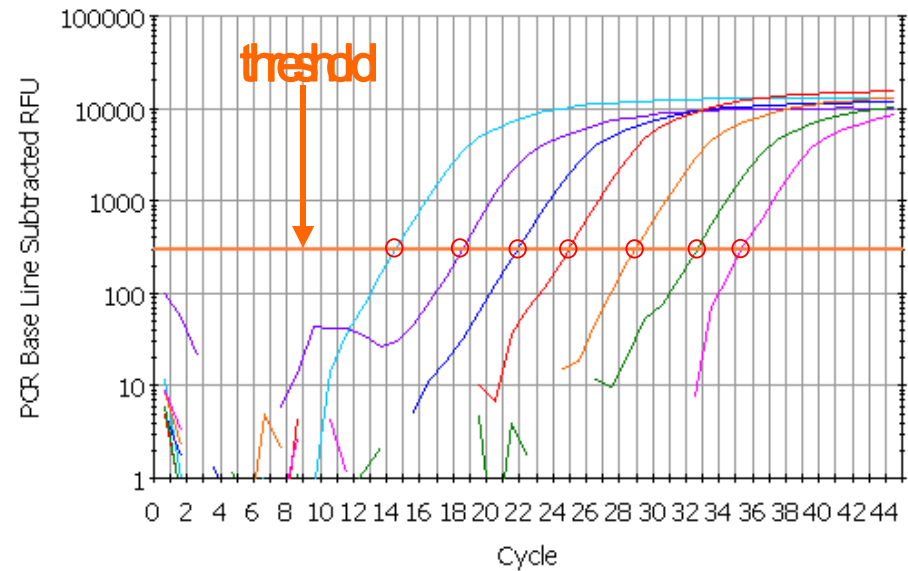


# PCR



# real-time PCR

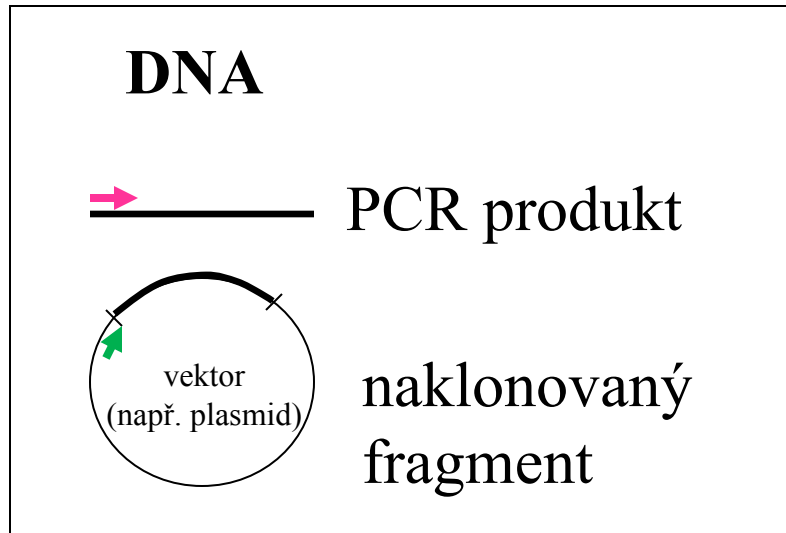


# Sekvenování

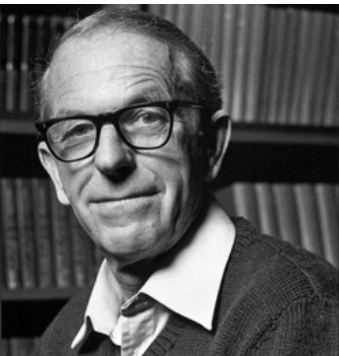
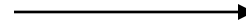
# Sekvencování DNA

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

# Sekvencování DNA

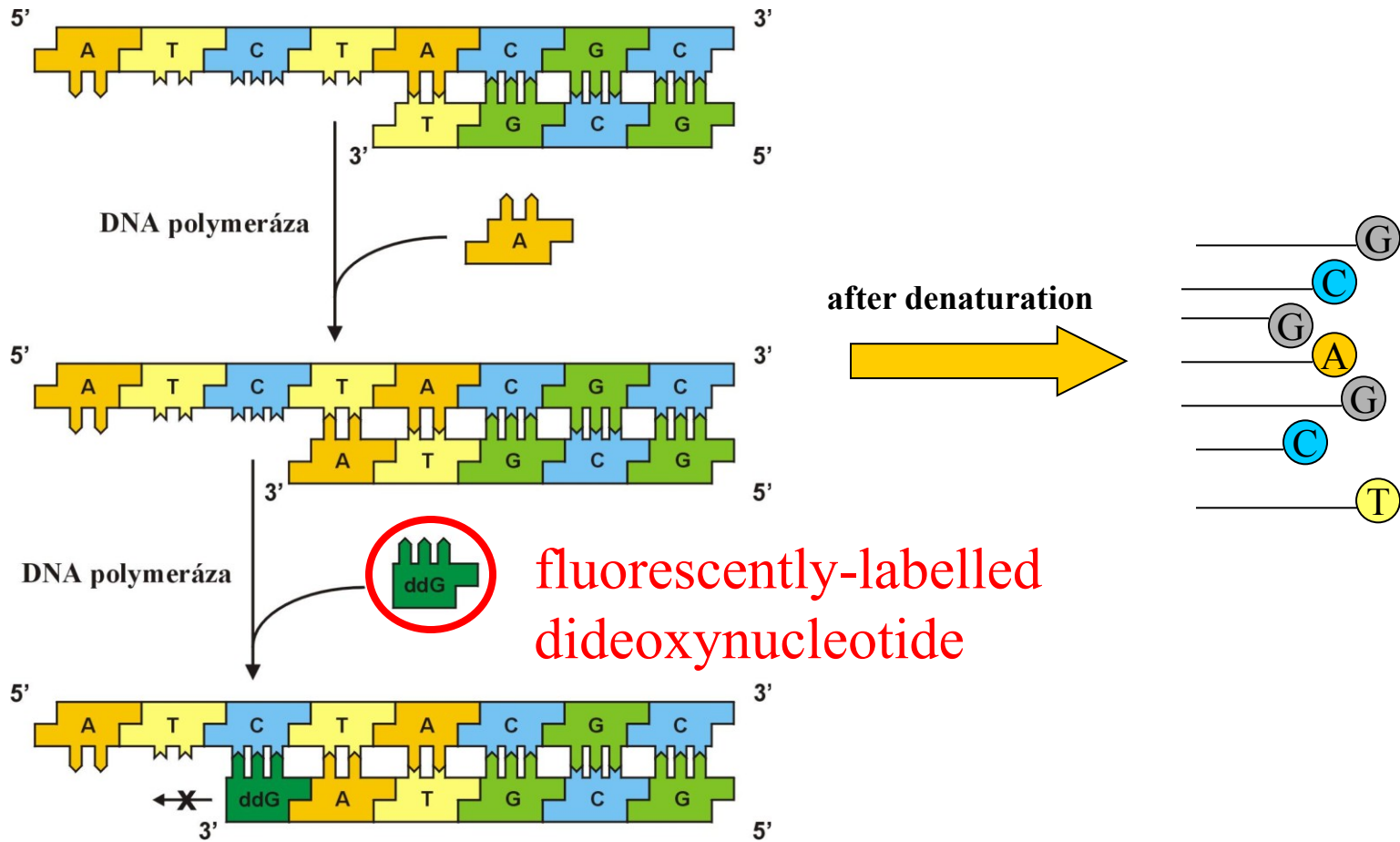


sekvenační reakce se značenými  
dideoxynukleotidy and jedním  
**specifickým** nebo **universálním**  
primerem



**Sangerova  
dideoxy metoda**

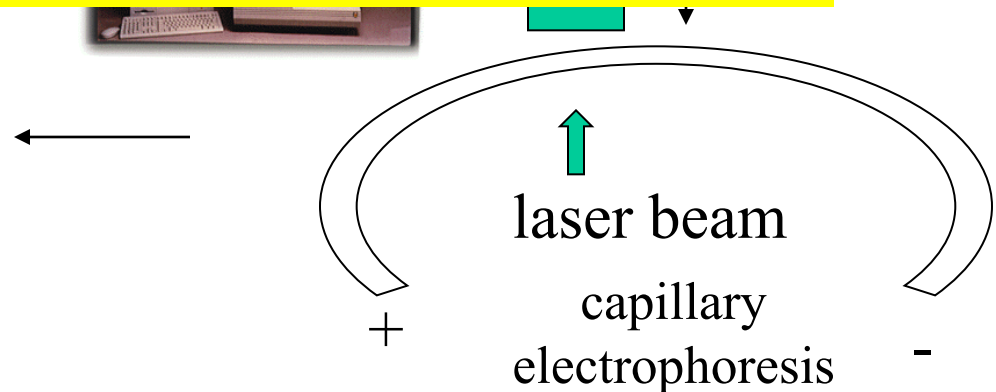
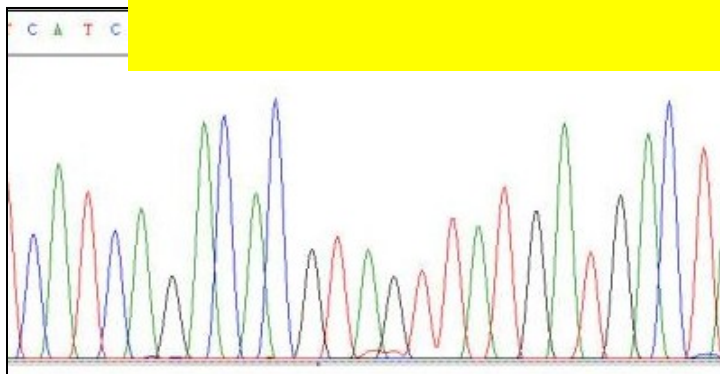
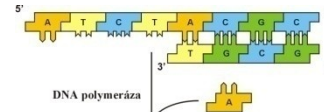
# Sekvencování DNA



# Sekvencování DNA

## DNA

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

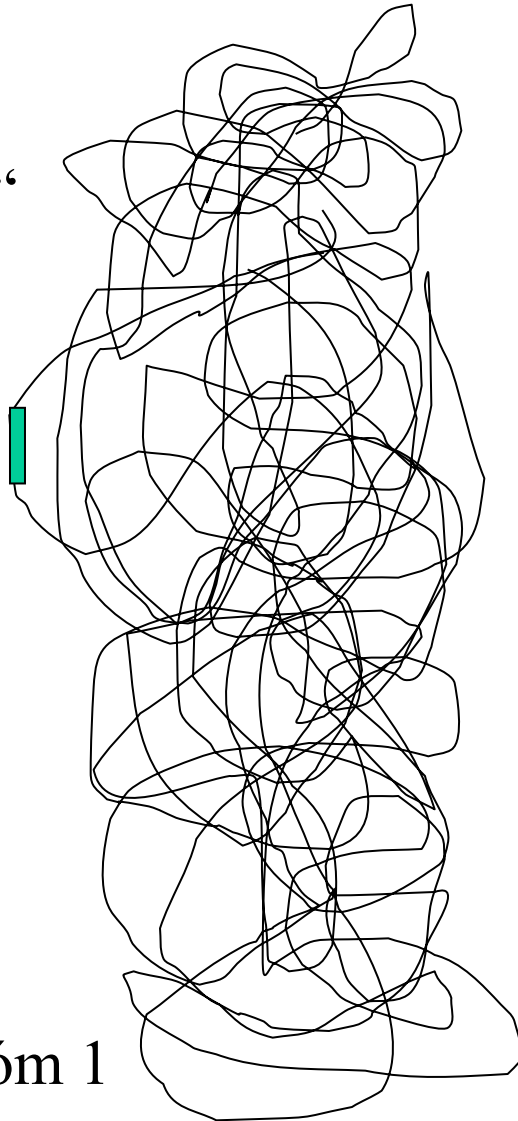


# Genotypizace – stanovení genotypu

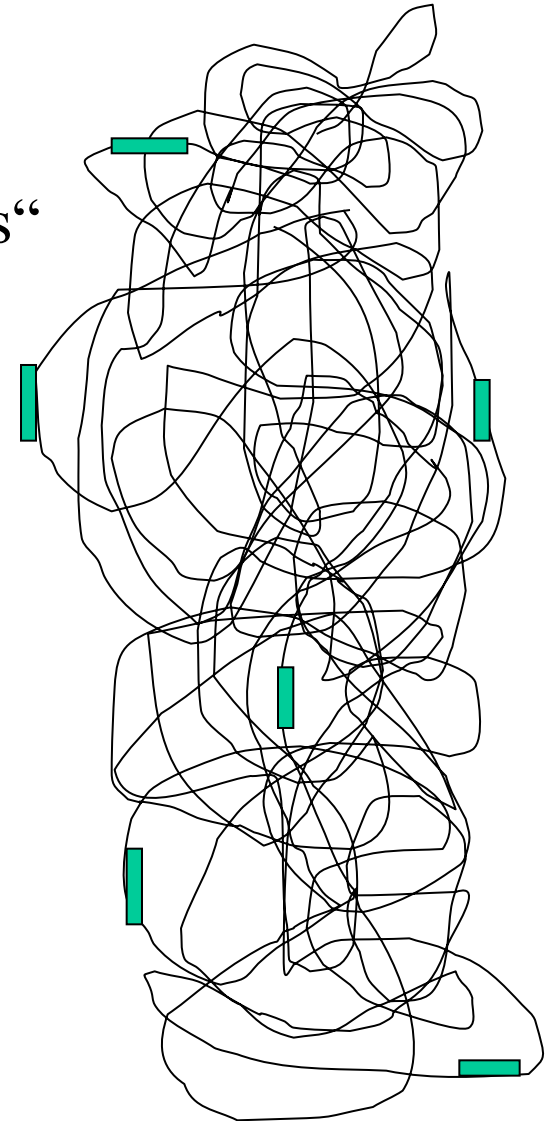
- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR-based methods)
  - 3) studium variability daného úseku (lokus)

# Typy genetických markerů

„single-locus“



„multi-locus“



Př.: chromozóm 1



# Typy genetických markerů

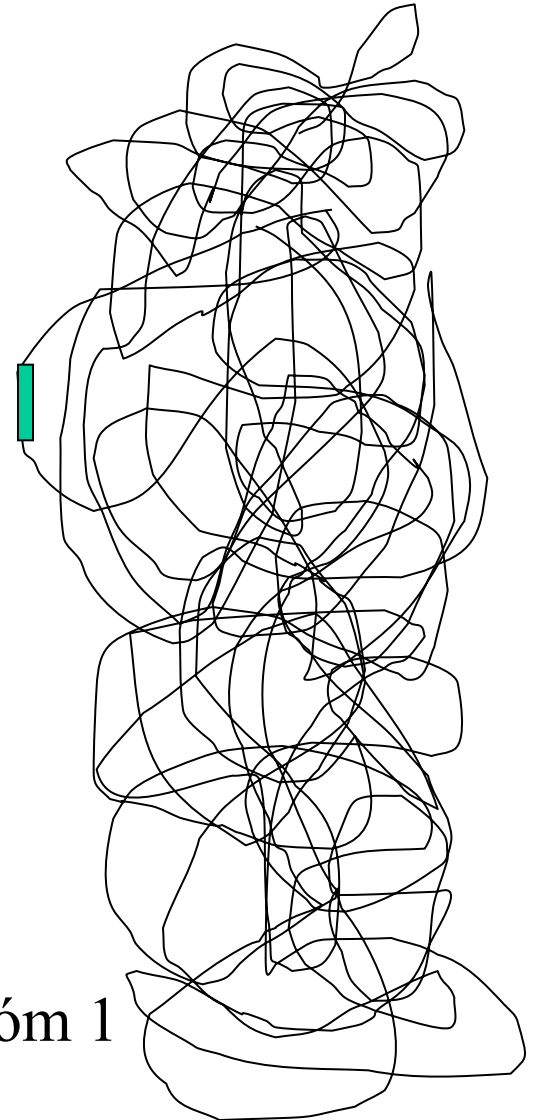
- **dominantní** markery – odliší pouze přítomnost (či nepřítomnost) daného znaku; tj. neodliší obě jeho formy na homologních chromozómech
- **kodominantní** markery – identifikace homologních alel, tj. je možno rozlišit homozygotní a heterozygotní stav (umožňují stanovit frekvenci alel)

# Typy genetických markerů

	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Nuclear multilocus				
Minisatellite DNA fingerprints	No	No	No	High
RAPD	No	No	Yes	High
<b>AFLP</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>Yes</b>	<b>High</b>
Nuclear single locus				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
<b>Mikrosatelite</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>High</b>
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
<b>SNPs (sekvence)</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Low-high</b>

# Single-locus genetic markers

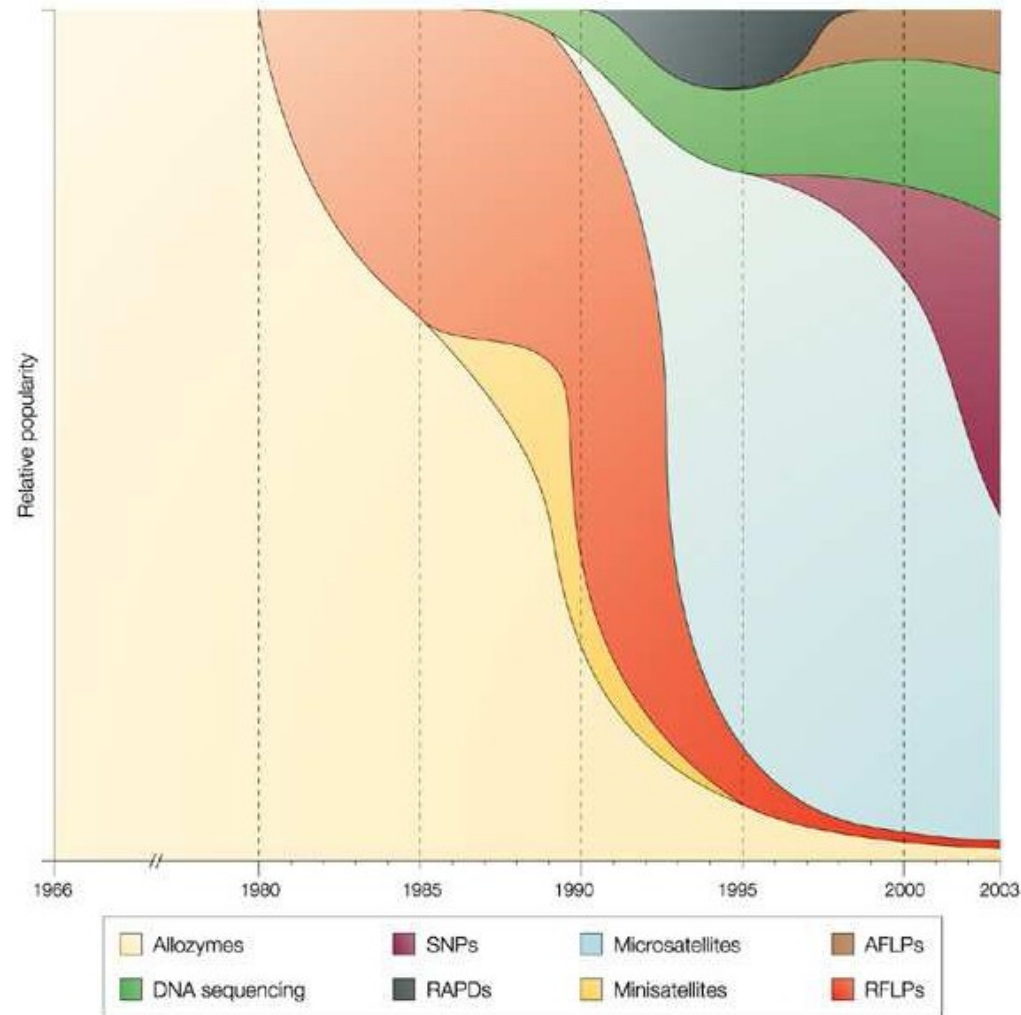
- kodominantní – možno stanovovat frekvence alel (= lze odlišit homo- a heterozygota)
- allozomy a jiné funkční geny - MM
- mikrosatelity – délkový polymorfismus
- SNPs (single nucleotide polymorphisms) – sekvenční polymorfismus
- SINE, LINE – inzerce



Př.: chromozóm 1

Mikrosatelite

# Mikrosatelity jsou stále nejpoužívanější markery v molekulární ekologii



# Mikrosatelity

- VNTR („variable number of tandem repetitions“), SSR („simple sequence repeats“)
- jednotlivé alely se liší délkou

**TTCAGG**CACACACA**ATCTCTAGCTTCGA**

**27 bp**

**TTCAGG**CACACA**ATCTCTAGCTTTGA**

**25 bp**

genotyp diploidního jedince: **25/27**

# Mikrosatelity

- 1-6 (nejč. 2-4) bp motiv
- početné po celém genomu
- vysoká úroveň polymorfismu (běžně 15 alel v populaci)
- Mendelovská dědičnost (autosomy) - kodominance
- ideální pro studium populační struktury a příbuzenských vztahů

# Mikrosatelity - postup analýzy

- Izolace DNA



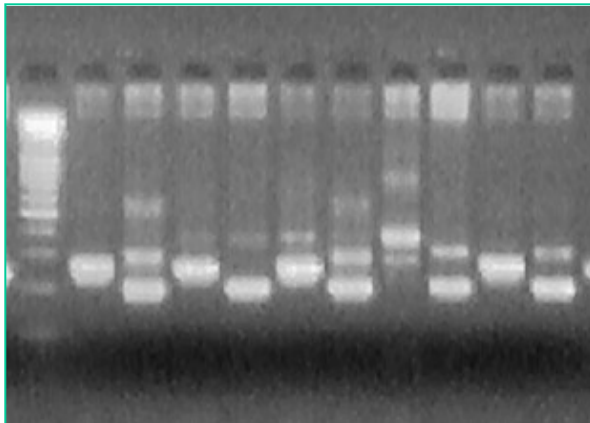
- PCR



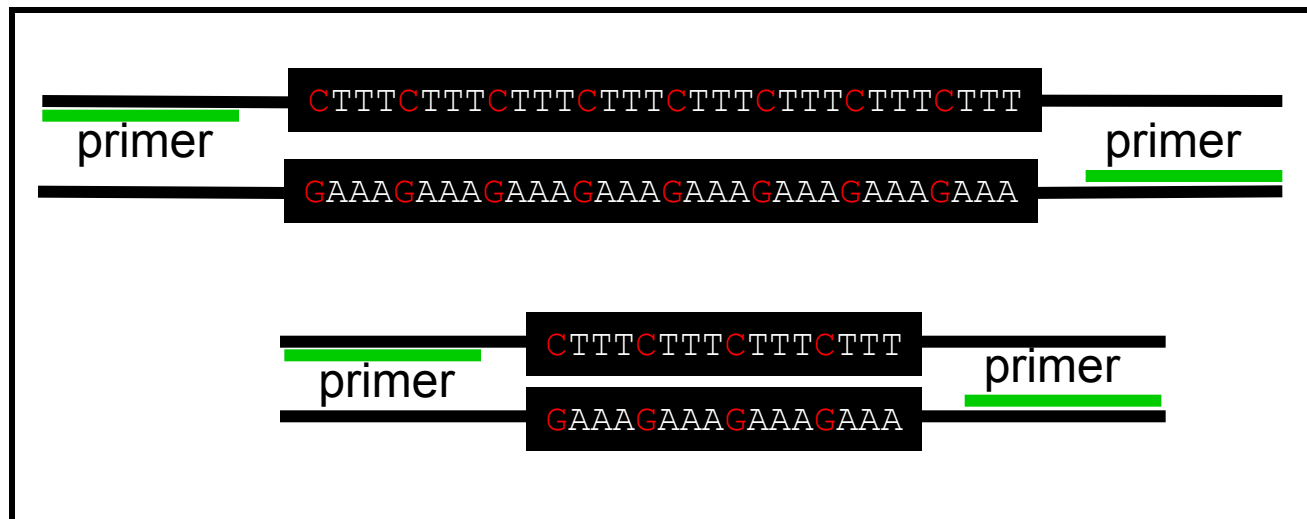
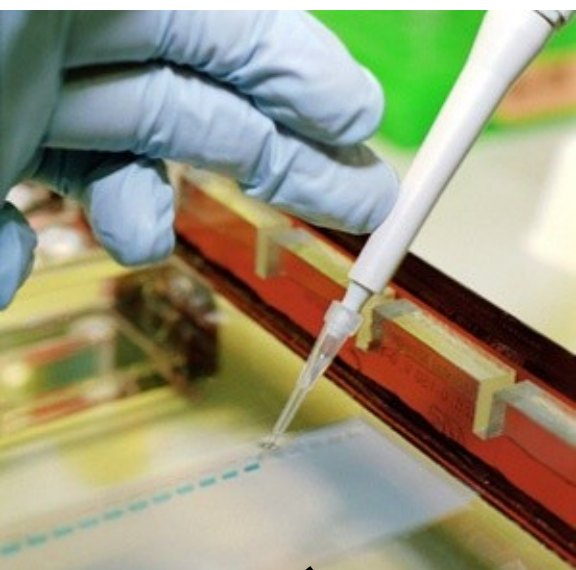
- Detekce  
→ elektroforéza



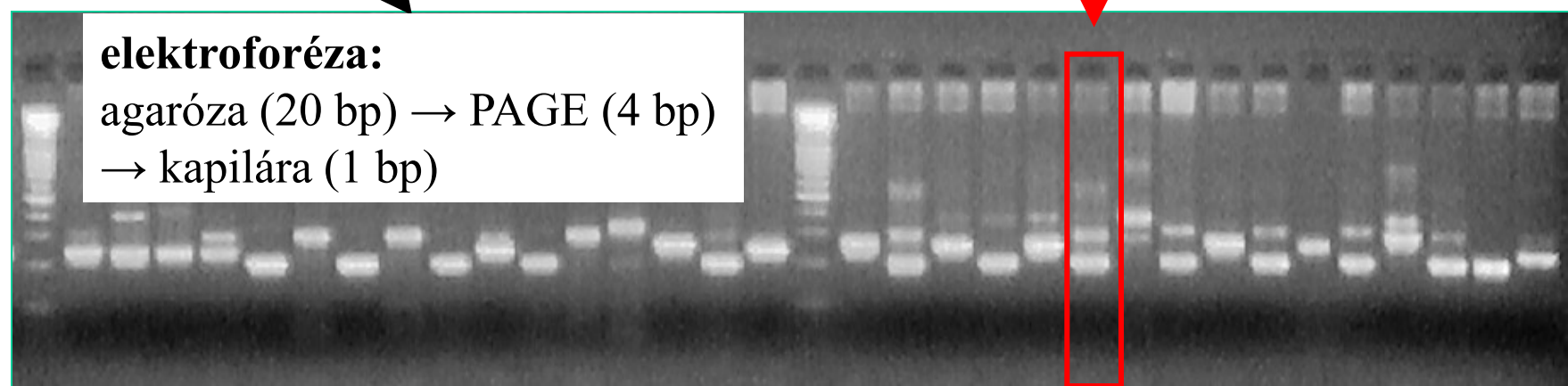
- sekvenátor, fragmentační analýza



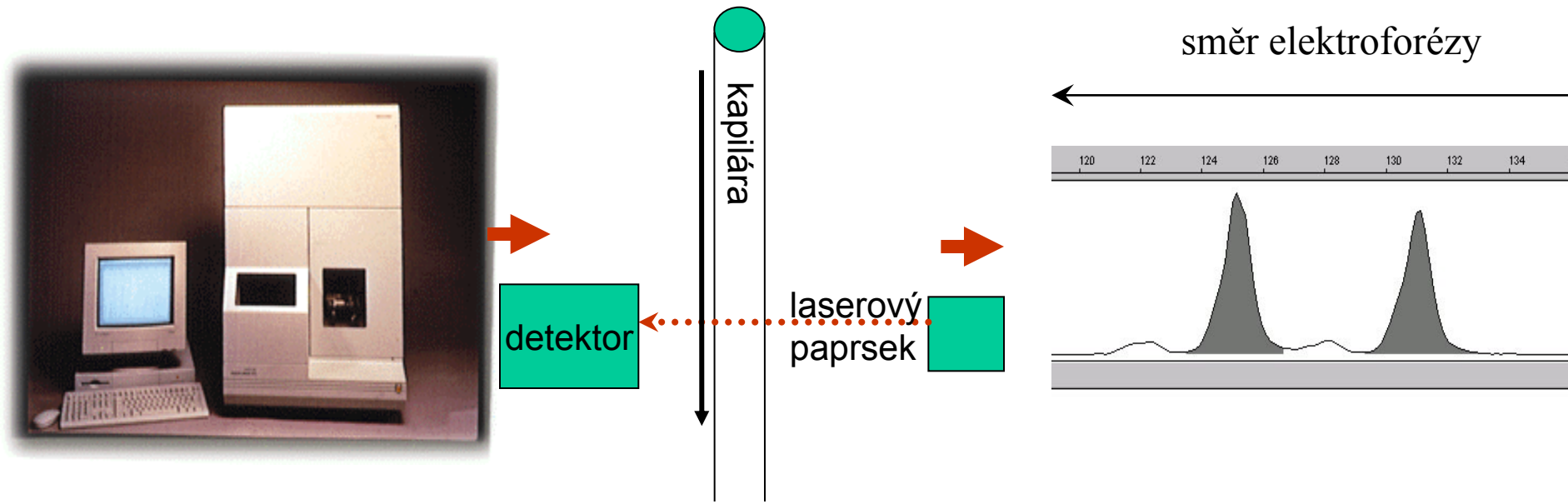




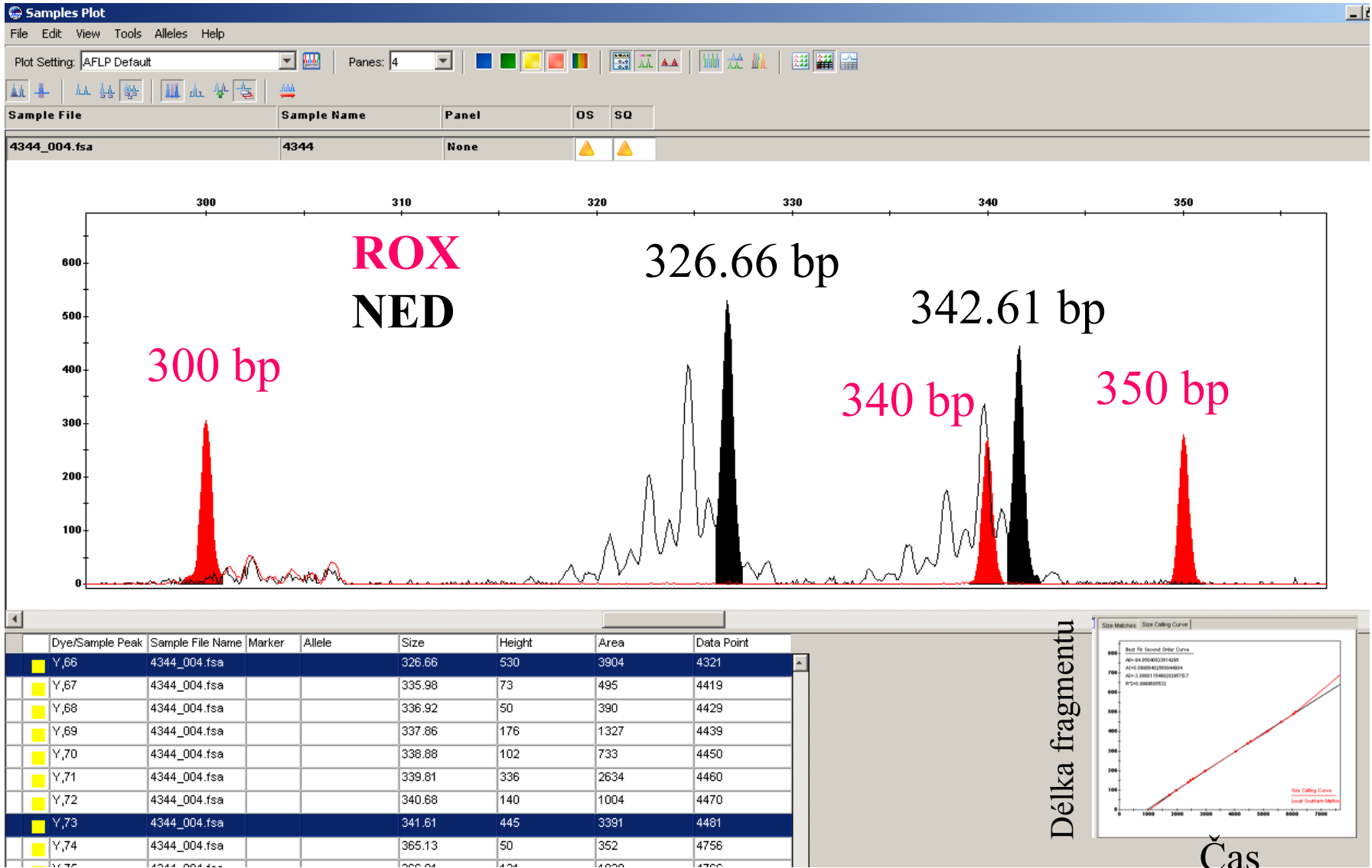
**elektroforéza:**  
agaróza (20 bp) → PAGE (4 bp)  
→ kapilára (1 bp)



# Kapilární elektroforéza ~ Fragmentační analýza



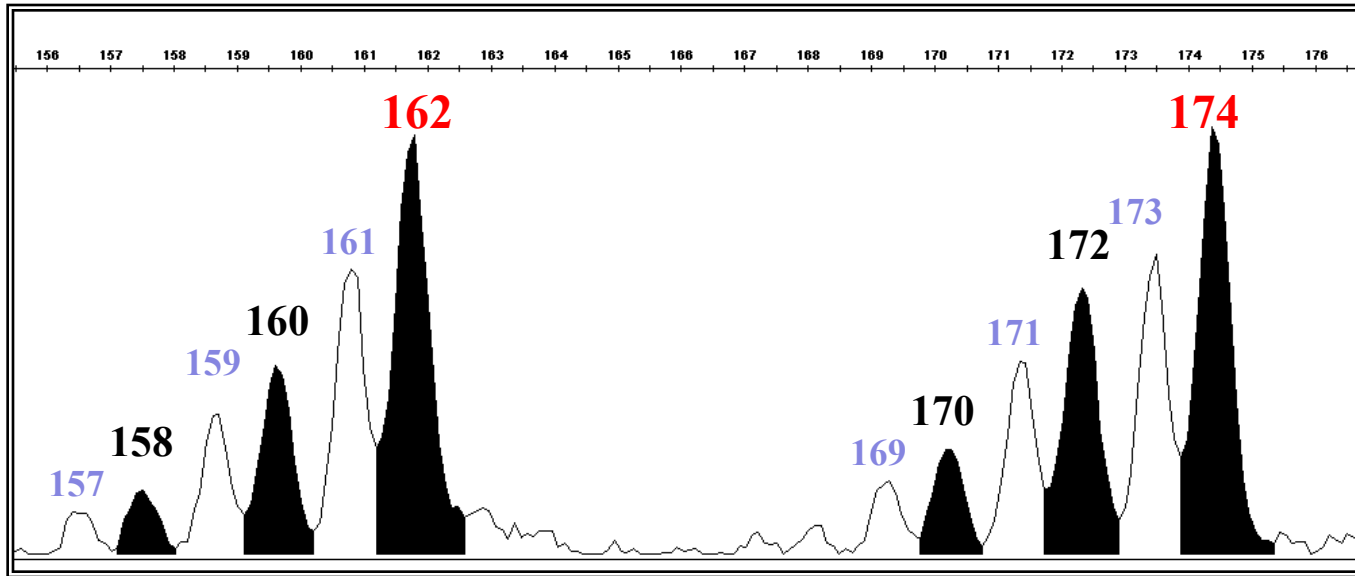
Stanovení délky PCR fragmentů srovnáním se známým standardem  
(ten je označen jinou fluorescenční značkou než PCR produkt)



Genotyp mikrosatelitu na lokusu NED = 326/342 nebo 327/343

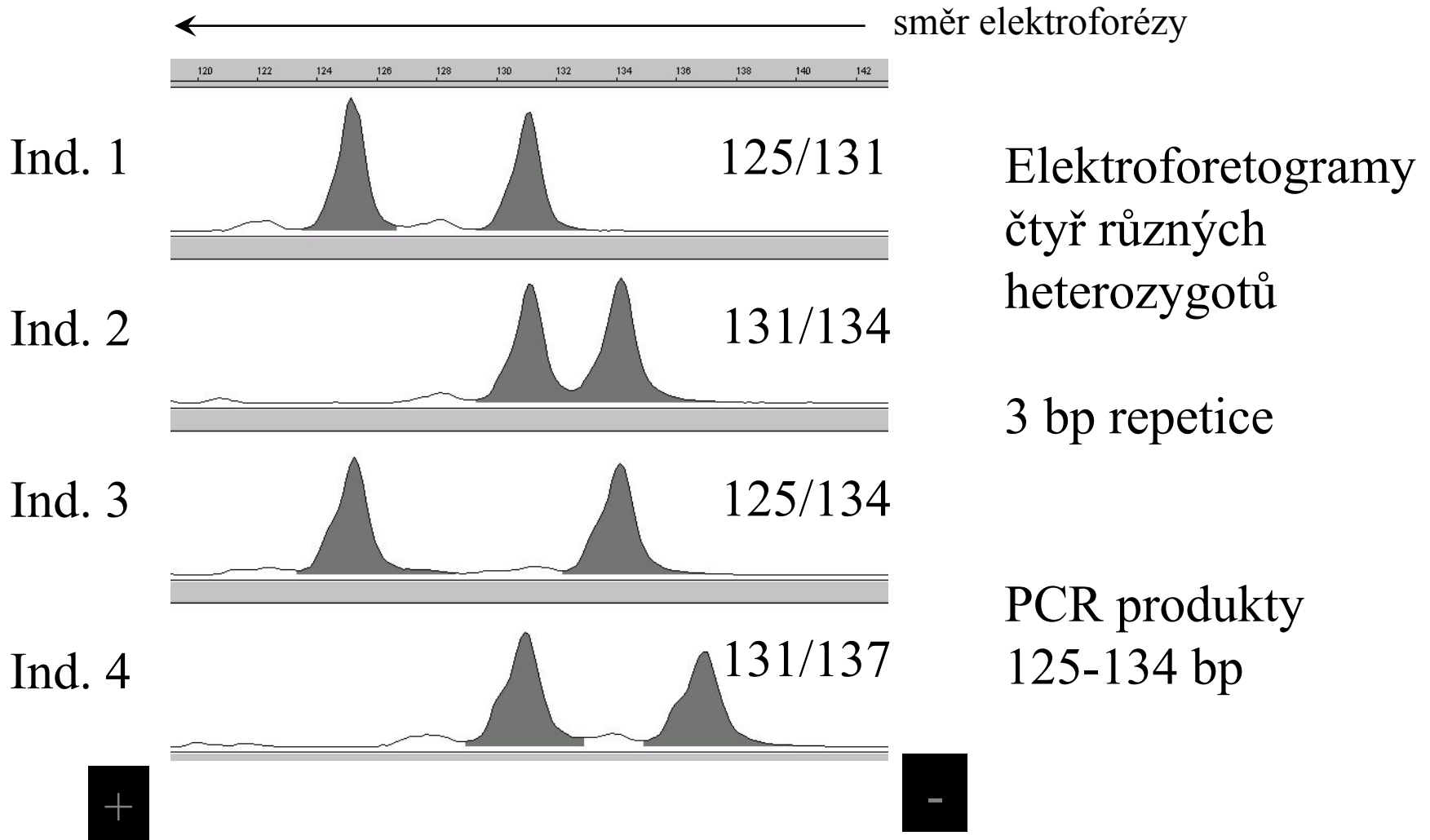


# Genotyp 162/174

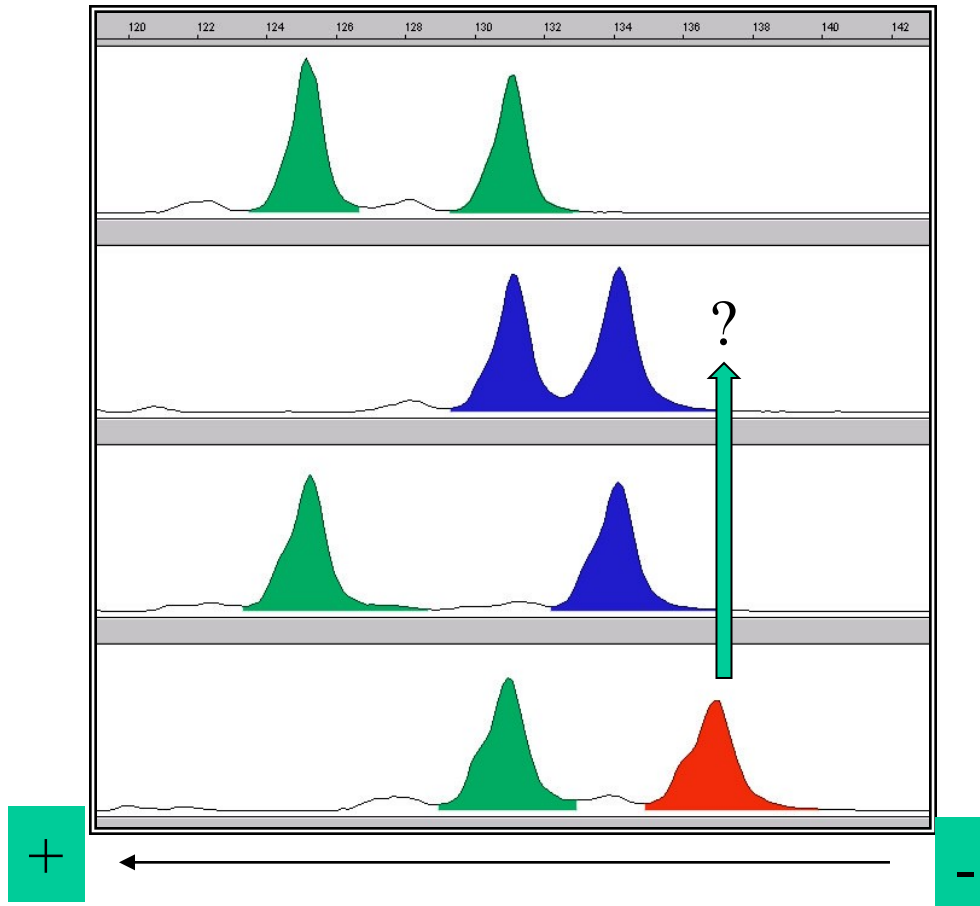


- alely a jejich stuttery jsou černě (rozdíl mezi nimi je 2 bp)
- bílé píky jsou tzv. „mínus A-alely“ a jejich stuttery = výsledek jiné chyby polymerázy, a to nepřidání koncového adeninu
- rozdíl mezi černým a sousedním bílým píkem je 1 bp (tj. chybějící adenin)
- pattern daného lokusu je vždy specifický a často záleží na PCR podmínkách

# Srovnání různých jedinců - analýzy příbuznosti



# Př. Analýza příbuzenských vztahů



Genotyp (bp)

**Matka: 125/131**

**Otec: 131/134**

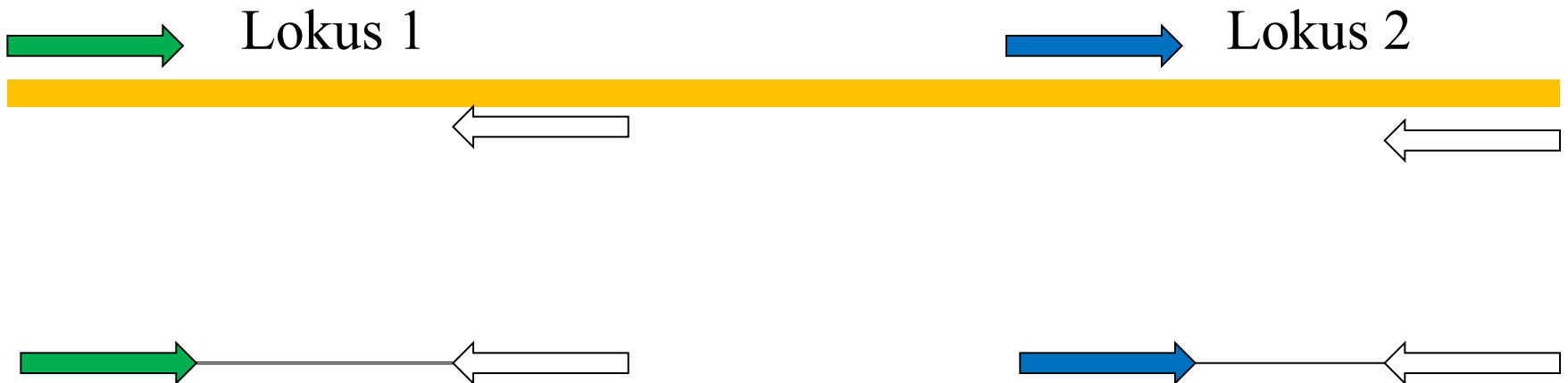
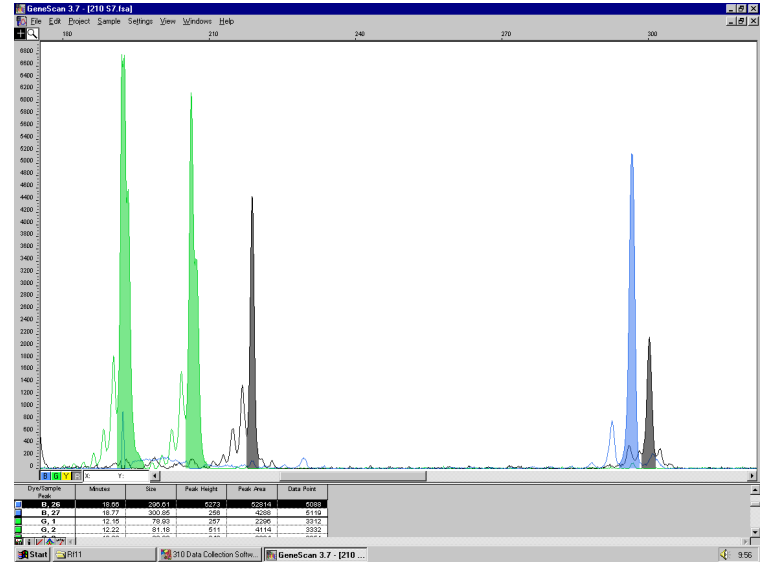
**Potomek 1: 125/134**

**Potomek 2: 131/137**

Sledovaný otec mohl zplodit potomka 1, ale zcela jistě není otcem potomka 2

# Různé značení různých znaků

- Snížení časových a finančních nákladů
- = „multiplex set“
- Až 4 různé barvy (+ 5. barva jako velikostní standard) - analýza až 4 lokusů o stejné velikosti alel





# Mikrosatelity - omezení

- nalezení lokusů (navržení primerů) je pracné a nákladné u volně žijících druhů (genomová knihovna, klonování, screening, sekvencování)

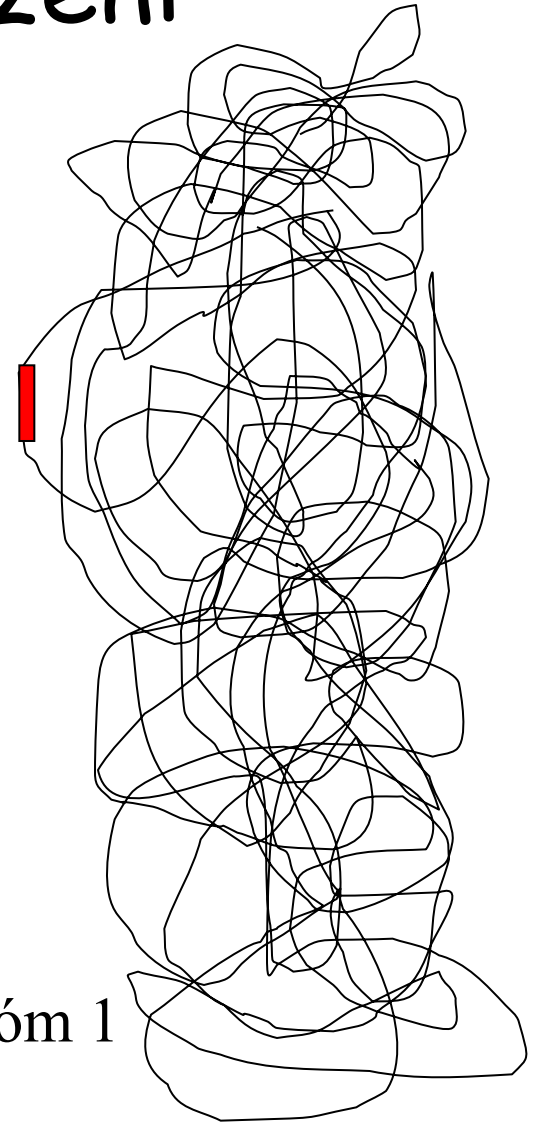


TTCAGG**CACACACA**TCTCTAGCTTCGA

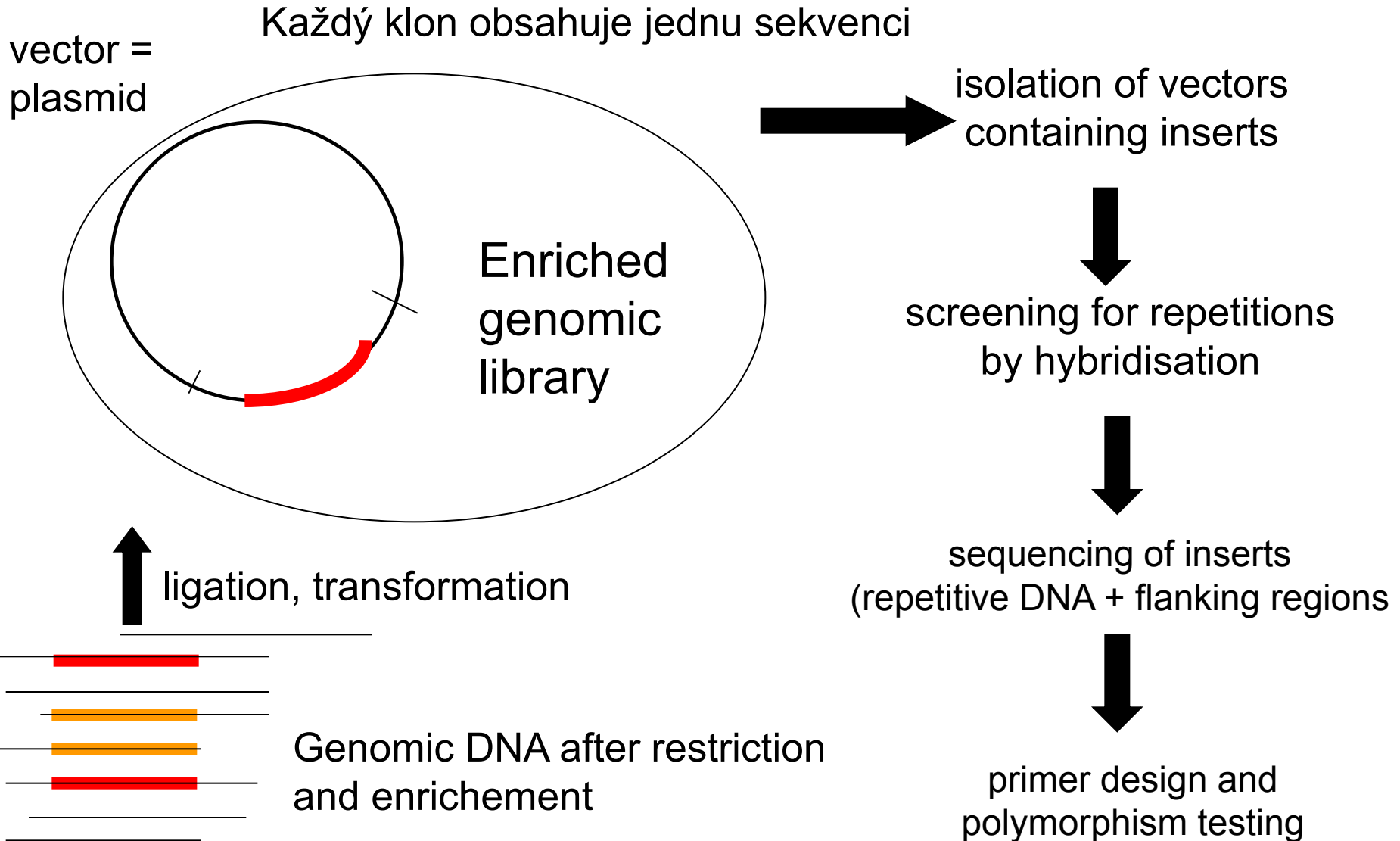


„flanking regions“ – ohraničují repetici a zde musí být navrženy primery pro PCR

Př.: chromozóm 1

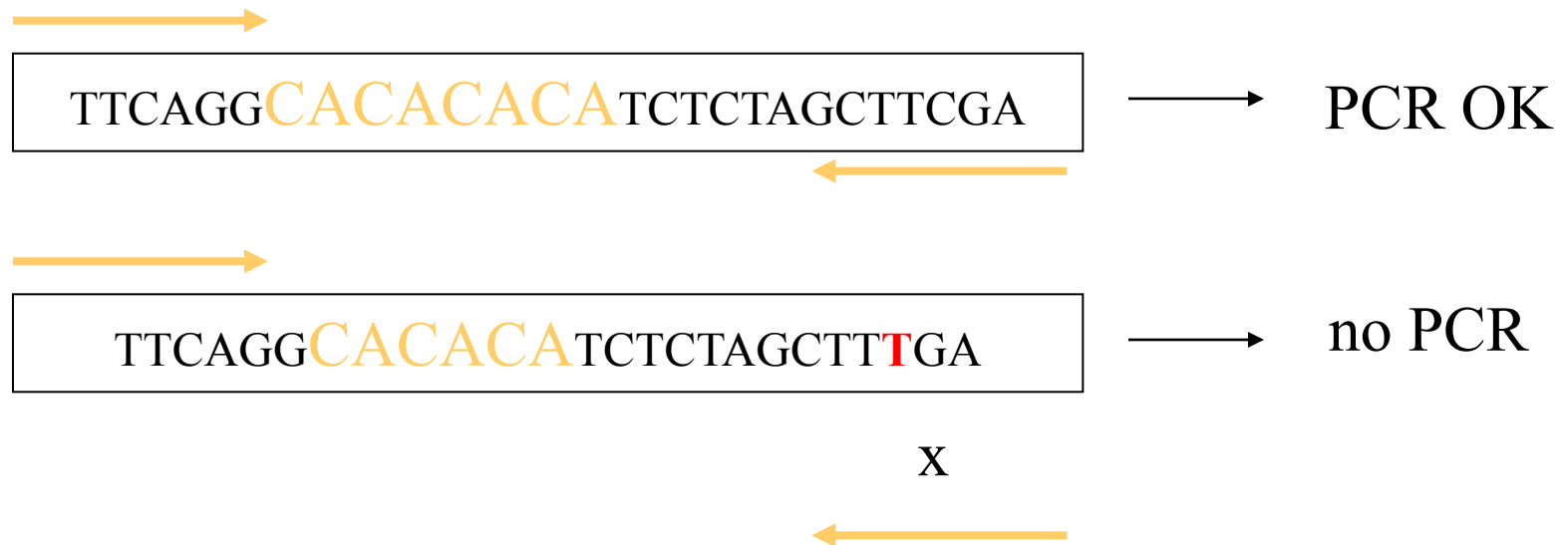


# Restriction, enrichment, cloning, and sequencing



# Mikrosatelity - omezení

- „cross-amplification“ – úspěšnost klesá s fylogenetickou vzdáleností
- nulové alely (mutace v primerových sekvencích) → vyšší proporce „homozygotů“



# Mikrosatelity - budoucnost (?)

- „next-generation sequencing“ – velice rychlá sekvenace stovek tisíců fragmentů z jakéhokoliv genomu
- vyhledání repetitivních sekvencí vhodným softwarem a navržení primerů
- identifikace nových mikrosatelitů rychle, elegantně a relativně levně (1500 EUR)

# Teoretické mutační modely - analýzy vyžadující údaj o podobnosti alel

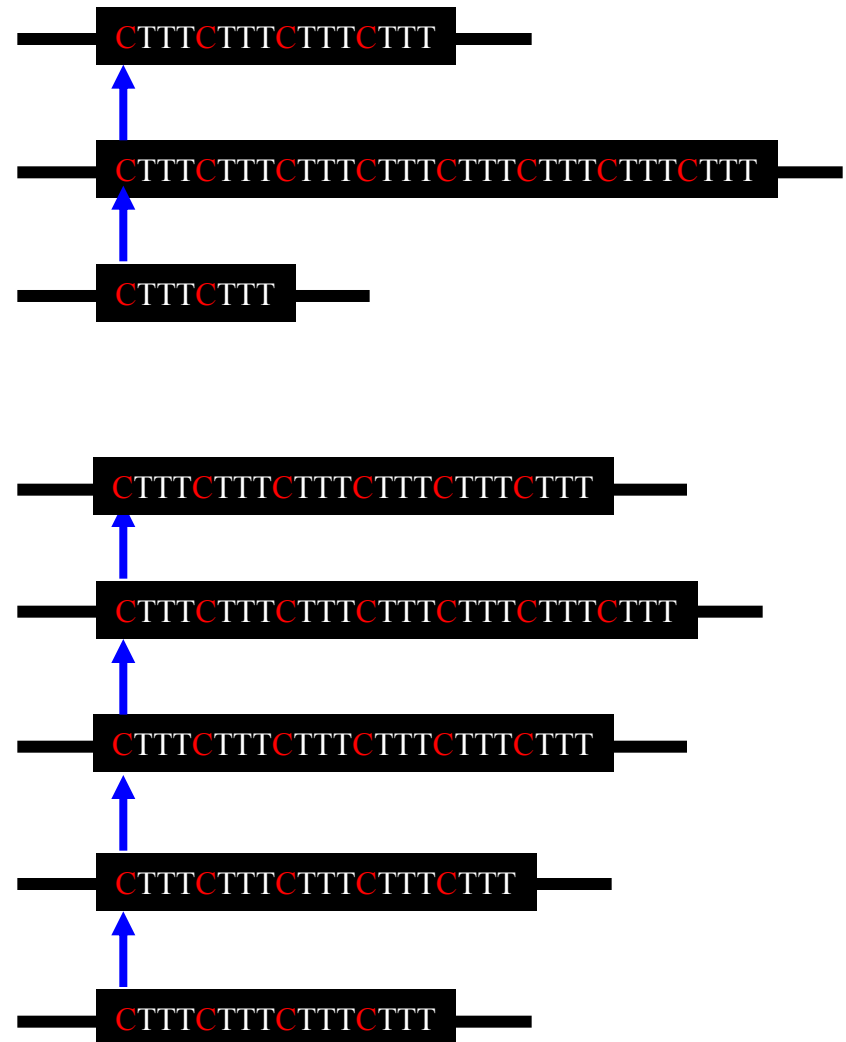
## Dva extrémy

- **IAM – infinitive allele model**

Při mutaci ztráta nebo získání libovolného počtu opakování. Vzniká nová alela, která doposud v populaci nebyla - každá alela vznikne pouze jednou a pak už se nemění. **Není možno** určit podobnost (similarity) alel

- **SMM – stepwise mutation model**

(Mutace způsobeny pouze ztrátou nebo získáním jediného opakování motivu. Mutací může vzniknout alela, která je již v populaci přítomna – tzv. **homoplázie**. Je možno odhadnout podobnost alel.



# Indels

- inzerce nebo delece 1bp či delších úseků – použití pouze pro modely vyžadující „**identity**“ (nepoužitelné pro modely vyžadující „**similarity**“)

TTCAGG CACACACA TCTCTAGCTTCGA

27 bp

SMM model – možno kvantifikovat podobnost alel

TTCAGG CACACACA CA TCTCTAGCTTCGA

29 bp

TTCAGG CACACACA TCTC G TAGCTTCGA

28 bp

TTCAGG CACAC GACA TCTCTAGCTTCGA

28 bp

„Indels“ – pouze pro analýzy, kde je vyžadována „identity“ a nikoliv podobnost

TTCAGG CACACCA TCTCTAGCTTCGA

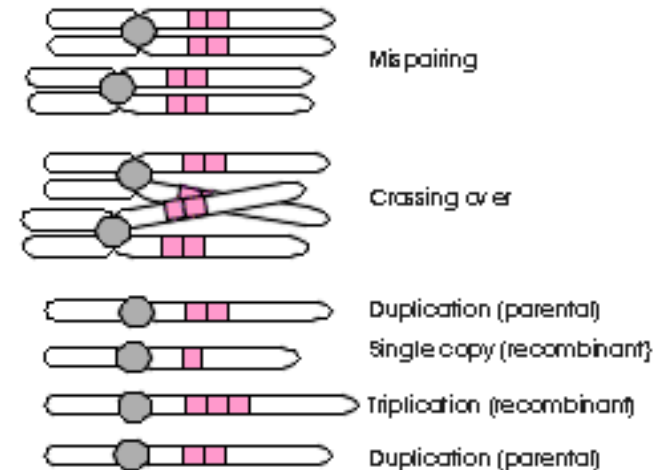
26 bp

TTCAGG CACACACA TCTCTAGTTCGA

26 bp

# Proč je tolik alel? (microsatellite instability)

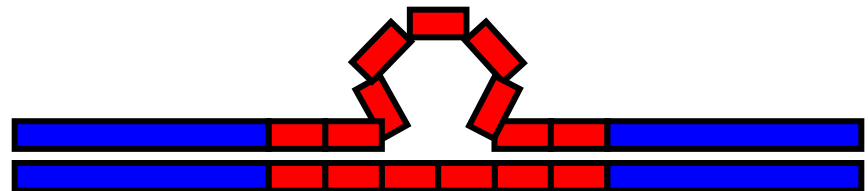
- **Nerovnoměrný (Unequal) crossing-over**  
(díky špatnému alignmentu)



- **Sklouznutí polymerázy při replikaci**

Slip-strand mispairing

(při replikaci nejprve polymeráza sklouzne a vyrobí odlišný počet opakujícího se motivu mikrosatelitu, při alignmentu je pak část opakování vykloněna mimo dvoušroubovici, flanking regions tedy párují)



# Bias (skutečná data)

- **Kratší mikrosatelity** (s malým počtem opakování motivu) **mají zřejmě tendenci se spíše prodlužovat** (slabě převládají adice nad delecemi)
- **Delší mikrosatelity se spíše zkracují** (náchylnější k velkým delecím)
- **Delší mikrosatelity rychleji mutují** (díky více opakováním je vyšší pravděpodobnost pro sklouznutí polymerázy (SSM) – mají více alel)



# Mikrosatelity - závěry

- Mechanismy evoluce mikrosatelitů stále nepříliš objasněny
- Stepwise mutation model SMM platí jen omezeně
- = nevýhoda v populační genetice (jsou rychle nahrazovány jinými markery, např. SNPs)
- = tolik nevádí při identifikaci jedinců a analýzy příbuznosti (paternity)

# SINE, LINE, etc.

(Shedlock et al. 2004, TREE; Ray et al. 2007, MolEcol)

- **Transposable elements**
- Vytváří kopie (většinou)
- Kopie integrovány na nová místa v genomu
- Obvykle nejsou specificky odstraňovány
- Molekulární fosílie – neexistují homoplasie !!!
- Nesmírně početné
- Člověk – víc jak polovina genomu (ost. druhy – 40-90%)

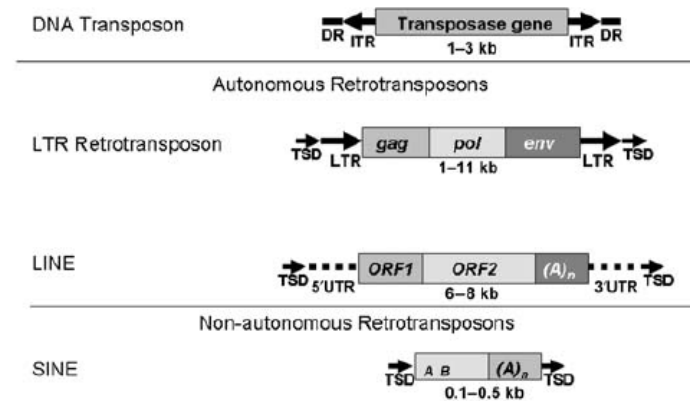


*Objev DNA transpozonů u kukuřice:  
Barbara McClintock*

# Typy transposabilních elementů

- **Kódující své proteiny, autonomní, 1-10 kb**

- **DNA transposony** (cut-and-paste)
- transposasa
- **Retrotransposony** (copy-and-paste)
- **LINE**  
1-2 proteiny, kopie přes RNA
- **LTR retrotransposony**  
5-6 proteinů, také přes RNA

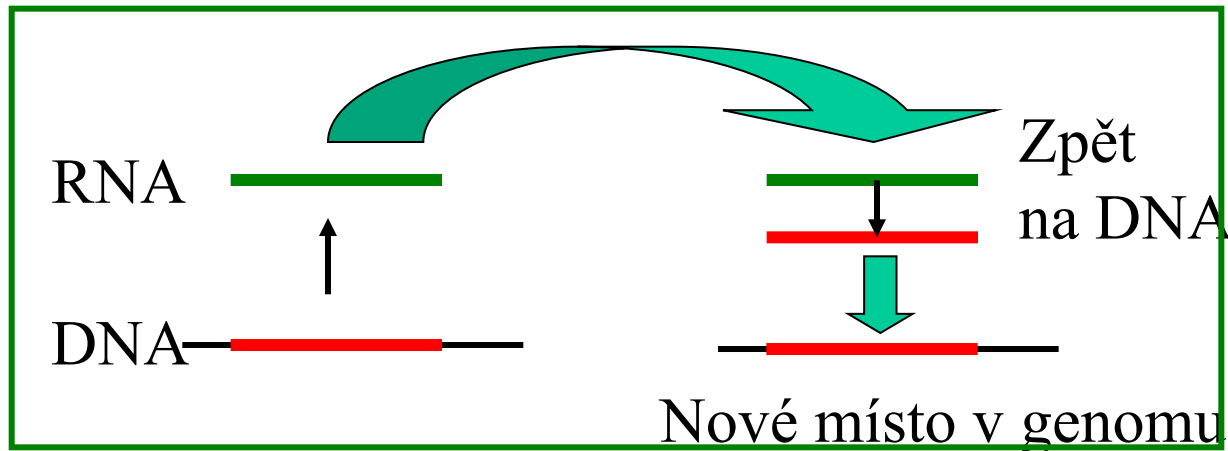


- **Nekódují proteiny, neautonomní, 100-1000 bp**

paraziti předešlých, např. **SINE** (člověk *Alu* – více než 1 milion kopií) – nejčastěji používané v populačních a fylogenetických studiích

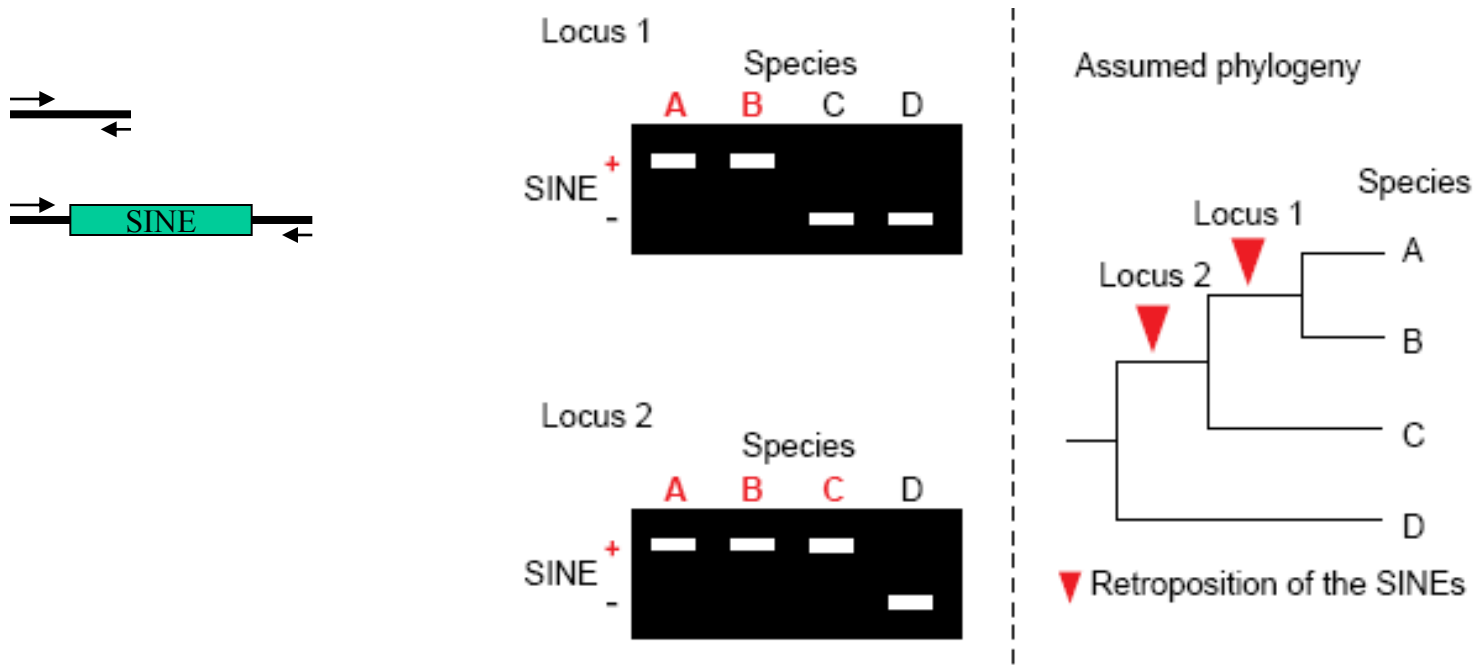
# LINE - mechanismus transpozice

- Kopie přes RNA
- Reversní transkriptáza
- Mašinerii využívají **SINE** (jsou to „paraziti“),  
*Alu* (SINE) a *L1* (LINE) se stejně rychle množí



- **LTR retrotransposony – opět přes RNA, složitější proces**

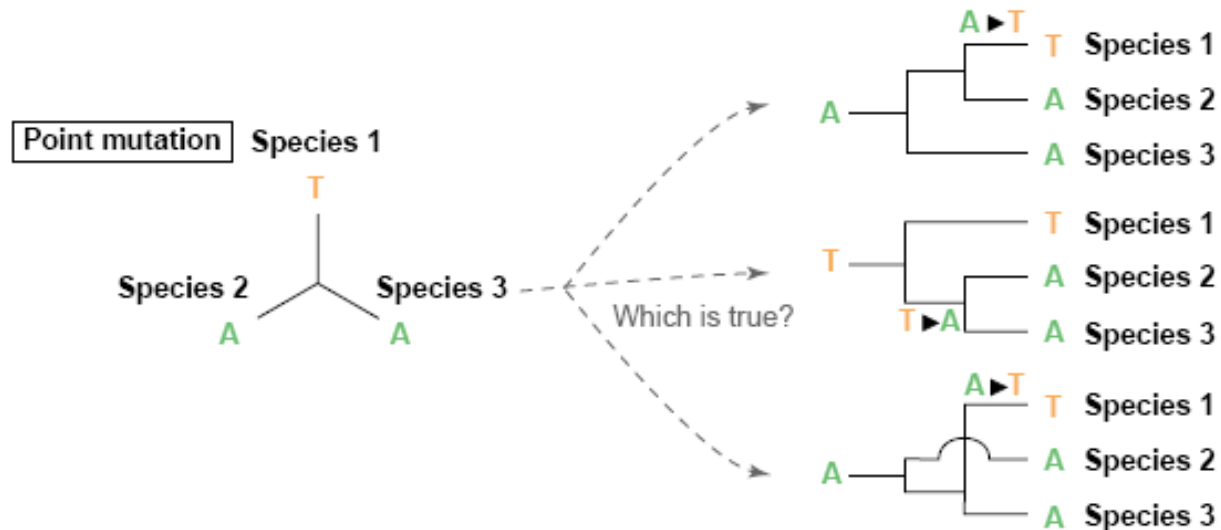
# Velmi nízké riziko homoplázií → SINE = ideální fylogenetické markery



„single-locus marker“

- PCR amplifikace daného úseku a elektroforéza

# Neexistují zpětné mutace = výhoda oproti sekvenačním datům



Příklad aplikace: kytovci vs. sudokopytníci (hroch je bratr velryby)