

# CG020 Genomika Bi7201 Základy genomiky

## Přednáška 4 Genetika přímá

Jan Hejátko

**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,  
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Osnova

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Přístupy „klasické“ genetiky versus „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice

### NÁHODNÁ MUTAGENEZE

#### „Přímě genetický“ přístup

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

EMS



#### „Reverzně genetický“ přístup

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

T-DNA

(retro)transposons



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu

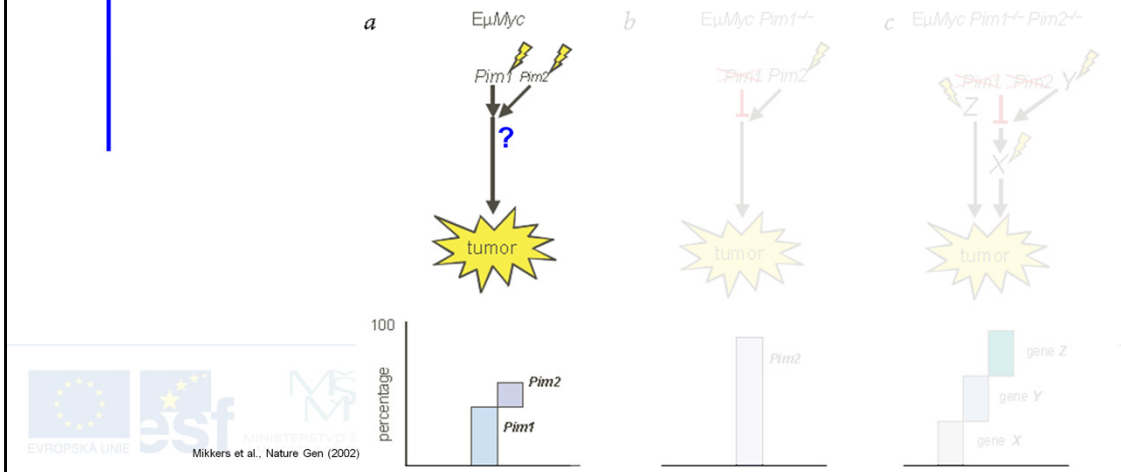


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

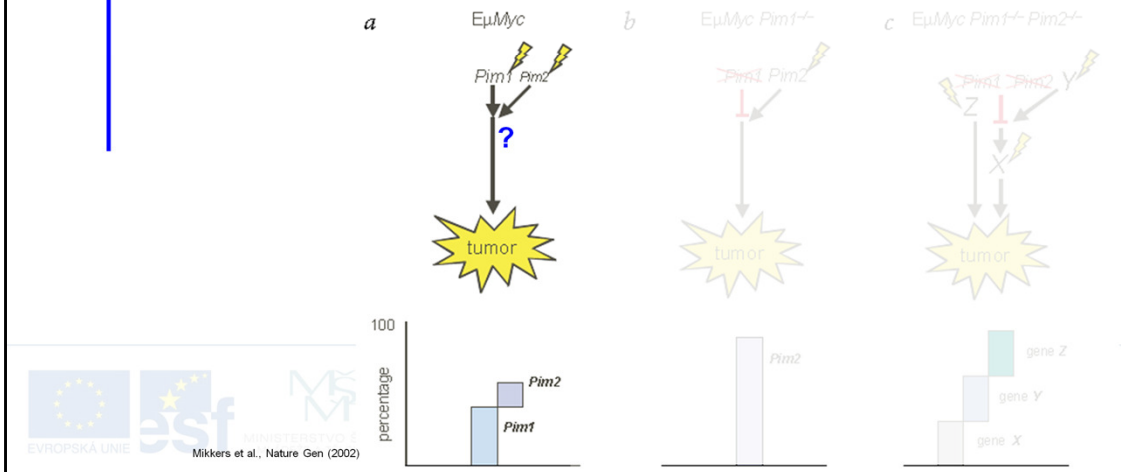
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc myší retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které vznikly díky aktivaci Pim kináz (ve 40% aktivaci *Pim1* a v 15% aktivaci *Pim2*), molekulární cíle těchto kináz byly neznámé



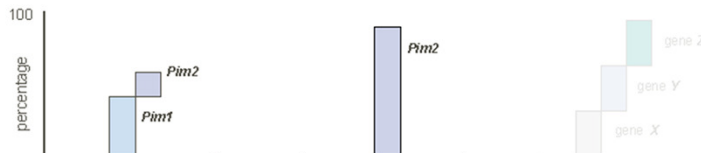
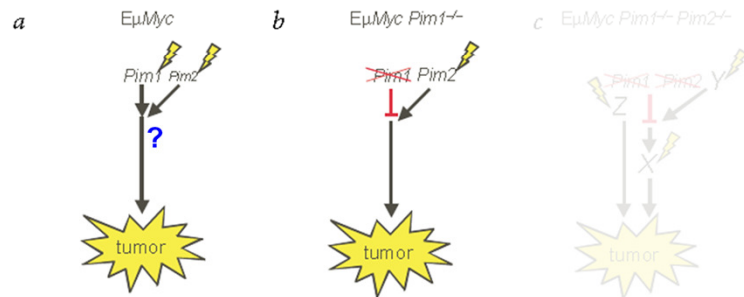
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce  $E\mu$ Myc *pim1* mutantů retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které obsahují v 90% inzerci v blízkosti (aktivaci) *Pim2*



# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze signálních partnerů Pim proteinů (Y), některého z proteinů Pim signální dráhy (X) nebo k aktivaci některé z příbuzných drah vedoucích k lymfomagenezi (Z)

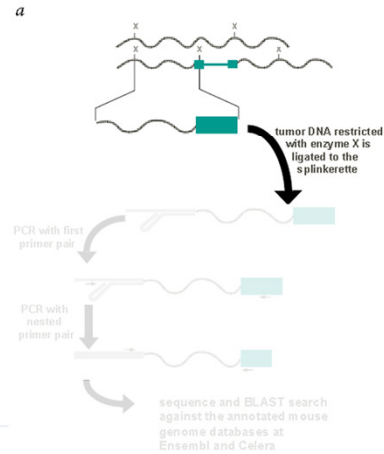
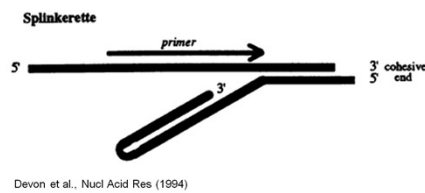


Mikkers et al., Nature Gen (2002)



# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přilehajících k místu inzerce proviru
  - Štěpení genomové DNA a ligace speciálních linkerů, tzv. *splinkerett* (zvýšení specifity amplifikace)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

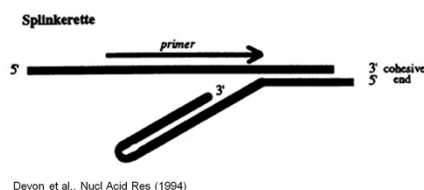


VÁNI

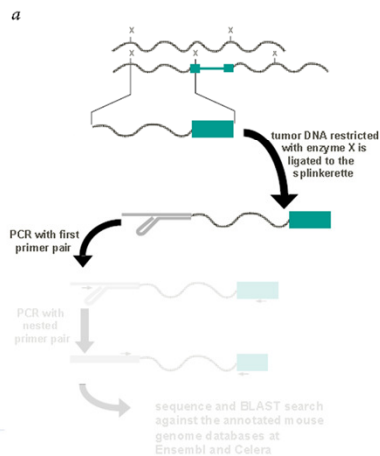
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
  - První amplifikace pomocí specifických primerů



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



PCR with first primer pair

PCR with nested primer pair

sequence and BLAST search against the annotated mouse genome databases at Ensembl and Celera



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

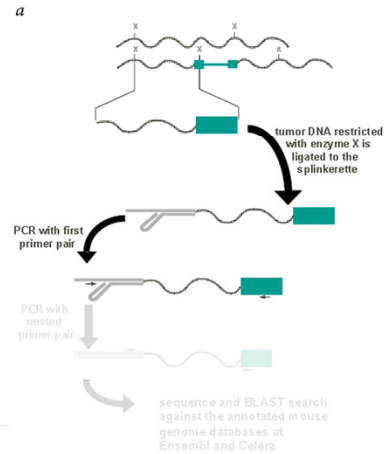
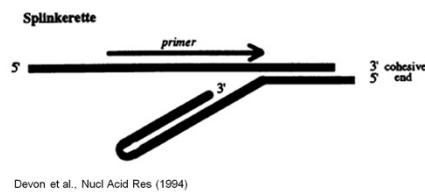


VÁNI

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
  - Druhá amplifikace pomocí „nested“ primerů (zvýšení specifity)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

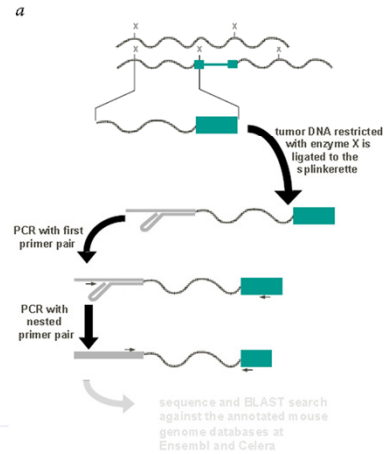
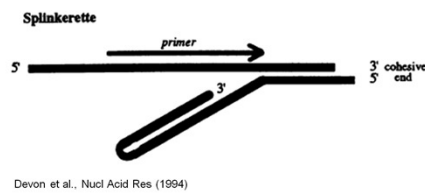


VÁNI

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
  - Sekvence a lokalizace oblastí přiléhajících k protoviru vyhledáváním v anotovaných databázích myšního genomu



Mikkers et al., Nature Gen (2002)



VÁNI

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
    - **metabolického profilu**

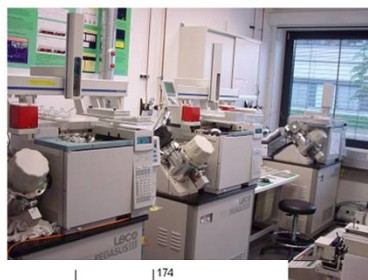


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Metabolické profilování

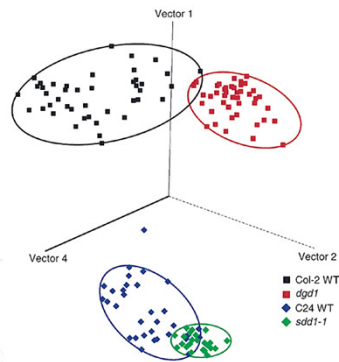
- Metabolické profilování rostlin
  - hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů



Peak No.	Retention Time (min)	Mass (m/z)	Abundance
1	1.2	43	100
2	1.5	59	150
3	1.8	73	200
4	2.1	87	180
5	2.4	101	120
6	2.7	115	100
7	3.0	129	150
8	3.3	143	180
9	3.6	157	120
10	3.9	171	100
11	4.2	185	150
12	4.5	199	180
13	4.8	213	120
14	5.1	227	100
15	5.4	241	150
16	5.7	255	180
17	6.0	269	120
18	6.3	283	100
19	6.6	297	150
20	6.9	311	180
21	7.2	325	120
22	7.5	339	100
23	7.8	353	150
24	8.1	367	180
25	8.4	381	120
26	8.7	395	100
27	9.0	409	150
28	9.3	423	180
29	9.6	437	120
30	9.9	451	100
31	10.2	465	150
32	10.5	479	180
33	10.8	493	120
34	11.1	507	100
35	11.4	521	150
36	11.7	535	180
37	12.0	549	120
38	12.3	563	100
39	12.6	577	150
40	12.9	591	180
41	13.2	605	120
42	13.5	619	100
43	13.8	633	150
44	14.1	647	180
45	14.4	661	120
46	14.7	675	100
47	15.0	689	150
48	15.3	703	180
49	15.6	717	120
50	15.9	731	100
51	16.2	745	150
52	16.5	759	180
53	16.8	773	120
54	17.1	787	100
55	17.4	801	150
56	17.7	815	180
57	18.0	829	120
58	18.3	843	100
59	18.6	857	150
60	18.9	871	180
61	19.2	885	120
62	19.5	899	100
63	19.8	913	150
64	20.1	927	180
65	20.4	941	120
66	20.7	955	100
67	21.0	969	150
68	21.3	983	180
69	21.6	997	120
70	21.9	1011	100
71	22.2	1025	150
72	22.5	1039	180
73	22.8	1053	120
74	23.1	1067	100
75	23.4	1081	150
76	23.7	1095	180
77	24.0	1109	120
78	24.3	1123	100
79	24.6	1137	150
80	24.9	1151	180
81	25.2	1165	120
82	25.5	1179	100
83	25.8	1193	150
84	26.1	1207	180
85	26.4	1221	120
86	26.7	1235	100
87	27.0	1249	150
88	27.3	1263	180
89	27.6	1277	120
90	27.9	1291	100
91	28.2	1305	150
92	28.5	1319	180
93	28.8	1333	120
94	29.1	1347	100
95	29.4	1361	150
96	29.7	1375	180
97	30.0	1389	120
98	30.3	1403	100
99	30.6	1417	150
100	30.9	1431	180
101	31.2	1445	120
102	31.5	1459	100
103	31.8	1473	150
104	32.1	1487	180
105	32.4	1501	120
106	32.7	1515	100
107	33.0	1529	150
108	33.3	1543	180
109	33.6	1557	120
110	33.9	1571	100
111	34.2	1585	150
112	34.5	1599	180
113	34.8	1613	120
114	35.1	1627	100
115	35.4	1641	150
116	35.7	1655	180
117	36.0	1669	120
118	36.3	1683	100
119	36.6	1697	150
120	36.9	1711	180
121	37.2	1725	120
122	37.5	1739	100
123	37.8	1753	150
124	38.1	1767	180
125	38.4	1781	120
126	38.7	1795	100
127	39.0	1809	150
128	39.3	1823	180
129	39.6	1837	120
130	39.9	1851	100
131	40.2	1865	150
132	40.5	1879	180
133	40.8	1893	120
134	41.1	1907	100
135	41.4	1921	150
136	41.7	1935	180
137	42.0	1949	120
138	42.3	1963	100
139	42.6	1977	150
140	42.9	1991	180
141	43.2	2005	120
142	43.5	2019	100
143	43.8	2033	150
144	44.1	2047	180
145	44.4	2061	120
146	44.7	2075	100
147	45.0	2089	150
148	45.3	2103	180
149	45.6	2117	120
150	45.9	2131	100
151	46.2	2145	150
152	46.5	2159	180
153	46.8	2173	120
154	47.1	2187	100
155	47.4	2201	150
156	47.7	2215	180
157	48.0	2229	120
158	48.3	2243	100
159	48.6	2257	150
160	48.9	2271	180
161	49.2	2285	120
162	49.5	2299	100
163	49.8	2313	150
164	50.1	2327	180
165	50.4	2341	120
166	50.7	2355	100
167	51.0	2369	150
168	51.3	2383	180
169	51.6	2397	120
170	51.9	2411	100
171	52.2	2425	150
172	52.5	2439	180
173	52.8	2453	120
174	53.1	2467	100
175	53.4	2481	150
176	53.7	2495	180
177	54.0	2509	120
178	54.3	2523	100
179	54.6	2537	150
180	54.9	2551	180
181	55.2	2565	120
182	55.5	2579	100
183	55.8	2593	150
184	56.1	2607	180
185	56.4	2621	120
186	56.7	2635	100
187	57.0	2649	150
188	57.3	2663	180
189	57.6	2677	120
190	57.9	2691	100
191	58.2	2705	150
192	58.5	2719	180
193	58.8	2733	120
194	59.1	2747	100
195	59.4	2761	150
196	59.7	2775	180
197	60.0	2789	120
198	60.3	2803	100
199	60.6	2817	150
200	60.9	2831	180
201	61.2	2845	120
202	61.5	2859	100
203	61.8	2873	150
204	62.1	2887	180
205	62.4	2901	120
206	62.7	2915	100
207	63.0	2929	150
208	63.3	2943	180
209	63.6	2957	120
210	63.9	2971	100
211	64.2	2985	150
212	64.5	2999	180
213	64.8	3013	120
214	65.1	3027	100
215	65.4	3041	150
216	65.7	3055	180
217	66.0	3069	120
218	66.3	3083	100
219	66.6	3097	150
220	66.9	3111	180
221	67.2	3125	120
222	67.5	3139	100
223	67.8	3153	150
224	68.1	3167	180
225	68.4	3181	120
226	68.7	3195	100
227	69.0	3209	150
228	69.3	3223	180
229	69.6	3237	120
230	69.9	3251	100
231	70.2	3265	150
232	70.5	3279	180
233	70.8	3293	120
234	71.1	3307	100
235	71.4	3321	150
236	71.7	3335	180
237	72.0	3349	120
238	72.3	3363	100
239	72.6	3377	150
240	72.9	3391	180
241	73.2	3405	120
242	73.5	3419	100
243	73.8	3433	150
244	74.1	3447	180
245	74.4	3461	120
246	74.7	3475	100
247	75.0	3489	150
248	75.3	3503	180
249	75.6	3517	120
250	75.9	3531	100
251	76.2	3545	150
252	76.5	3559	180
253	76.8	3573	120
254	77.1	3587	100
255	77.4	3601	150
256	77.7	3615	180
257	78.0	3629	120
258	78.3	3643	100
259	78.6	3657	150
260	78.9	3671	180
261	79.2	3685	120
262	79.5	3699	100
263	79.8	3713	150
264	80.1	3727	180
265	80.4	3741	120
266	80.7	3755	100
267	81.0	3769	150
268	81.3	3783	180
269	81.6	3797	120
270	81.9	3811	100
271	82.2	3825	150
272	82.5	3839	180
273	82.8	3853	120
274	83.1	3867	100
275	83.4	3881	150
276	83.7	3895	180
277	84.0	3909	120
278	84.3	3923	100
279	84.6	3937	150
280	84.9	3951	180
281	85.2	3965	120
282	85.5	3979	100
283	85.8	3993	150
284	86.1	4007	180
285	86.4	4021	120
286	86.7	4035	100
287	87.0	4049	150
288	87.3	4063	180
289	87.6	4077	120
290	87.9	4091	100
291	88.2	4105	150
292	88.5	4119	180
293	88.8	4133	120
294	89.1	4147	100
295	89.4	4161	150
296	89.7	4175	180
297	90.0	4189	120
298	90.3	4203	100
299	90.6	4217	150
300	90.9	4231	180
301	91.2	4245	120
302	91.5	4259	100
303	91.8	4273	150
304	92.1	4287	180
305	92.4	4301	120
306	92.7	4315	100
307	93.0	4329	150
308	93.3	4343	180
309	93.6	4357	120
310	93.9	4371	100
311	94.2	4385	150
312	94.5	4399	180
313	94.8	4413	120
314	95.1	4427	100
315	95.4	4441	150
316	95.7	4455	180
317	96.0	4469	120
318	96.3	4483	100
319	96.6	4497	150
320	96.9	4511	180
321	97.2	4525	120
322	97.5	4539	100
323	97.8	4553	150
324	98.1	4567	180

# 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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 genů pomocí identifikace T-DNA zasažených sekvencí



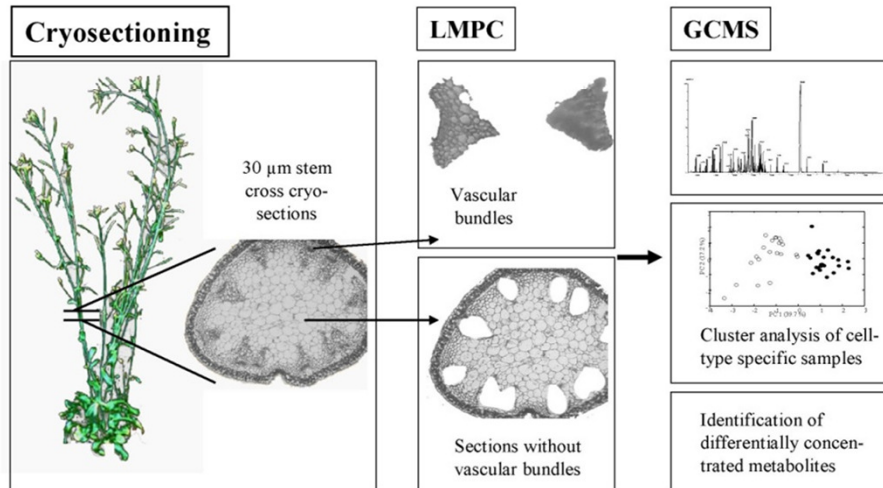
OP ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# Metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
  - možnost využít i speciální techniky, např. mikrodisekce



VÁNI  
ovná  
ndam  
ubilly

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
  - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
    - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
    - metabolického profilu
    - exprese zajímavých genů

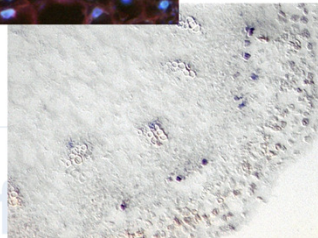
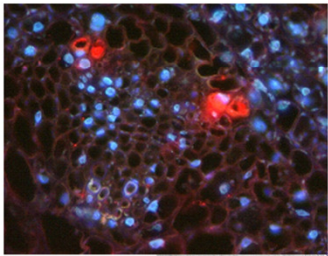


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Expresní profil

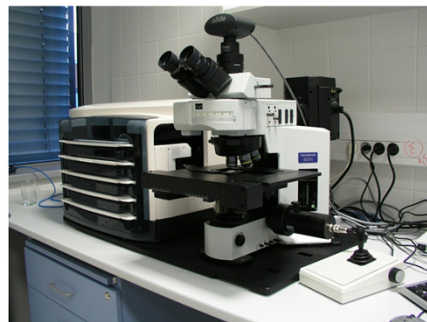
- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese



a státním rozpočtem České republiky

# Expresní profil

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



EVROPSKÁ UNIE

ESI

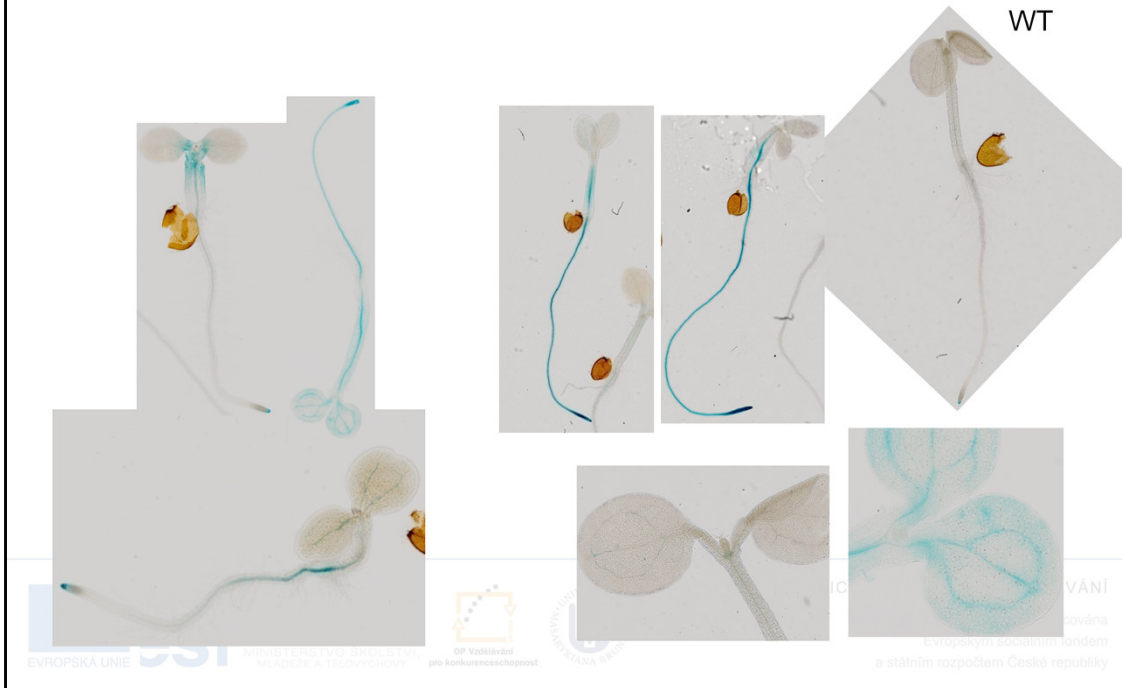
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVU pro konkurenceschopnost "ERAR 9"



INVESTICE DO ROZVOJE V

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Expresní profil



# Osnova

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

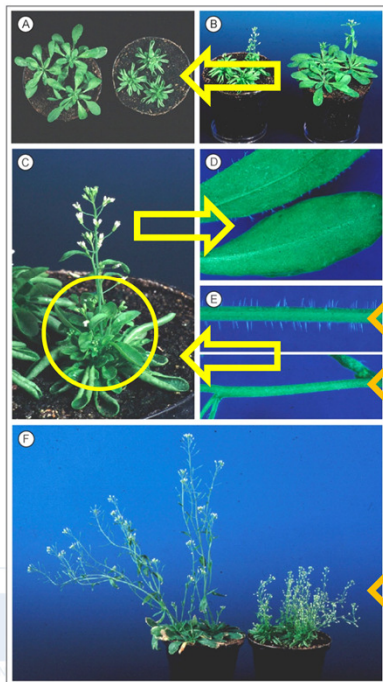
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutanta



- zvlňné listy
- keřčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí



EVROPSKÁ UN



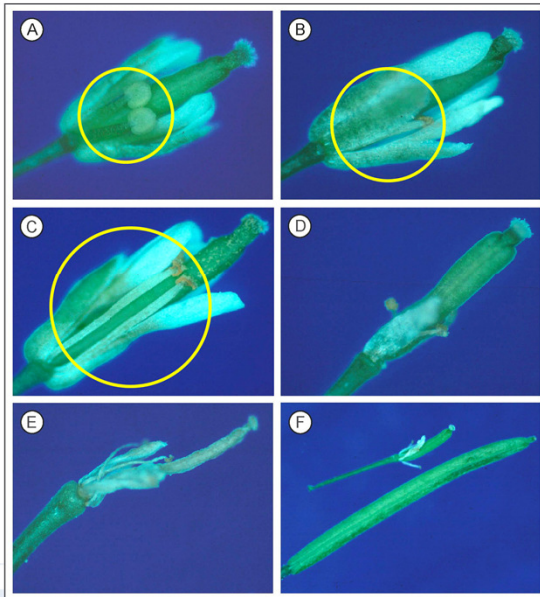
Univerzita  
Brno

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# Identifikace mutanta



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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu
  - identifikace T-DNA mutované oblasti

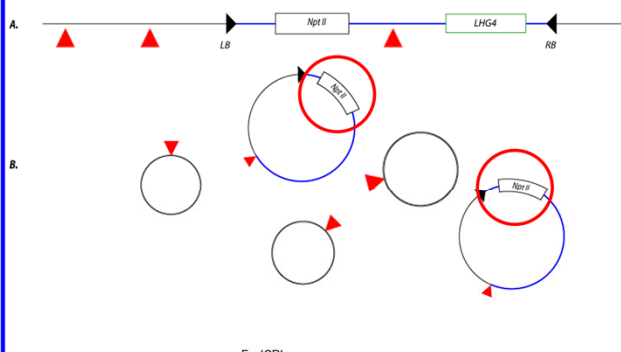


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

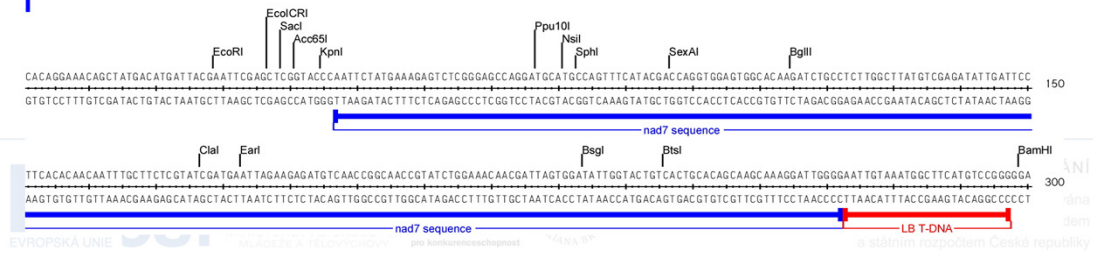
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

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

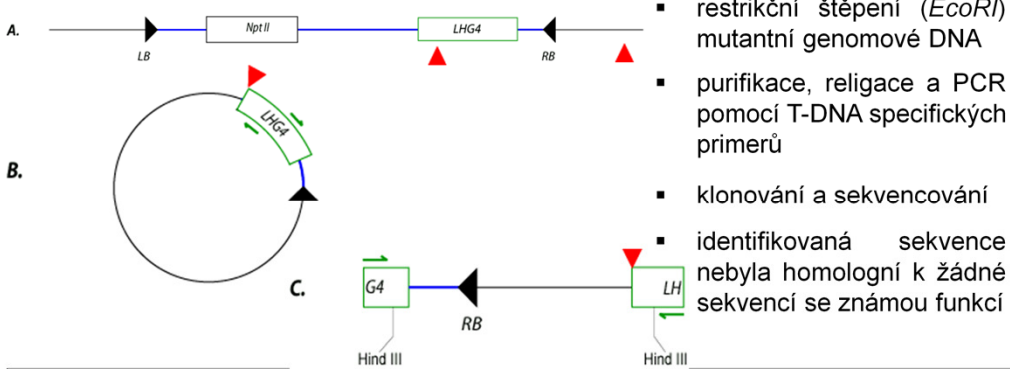


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E. coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

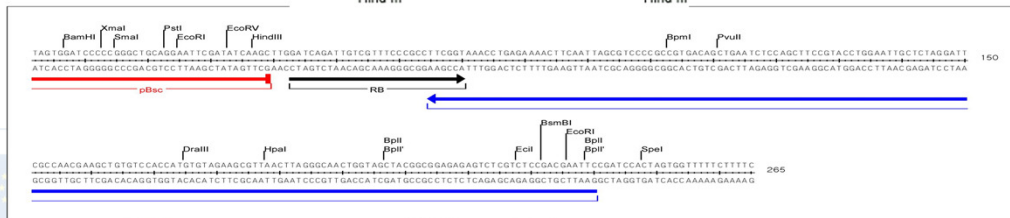


# Identifikace mutovaného lokusu

## 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



# Identifikace mutovaného lokusu

- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu
  - identifikace T-DNA mutované oblasti
  - lokalizace T-DNA inzerce v genomu *Arabidopsis*

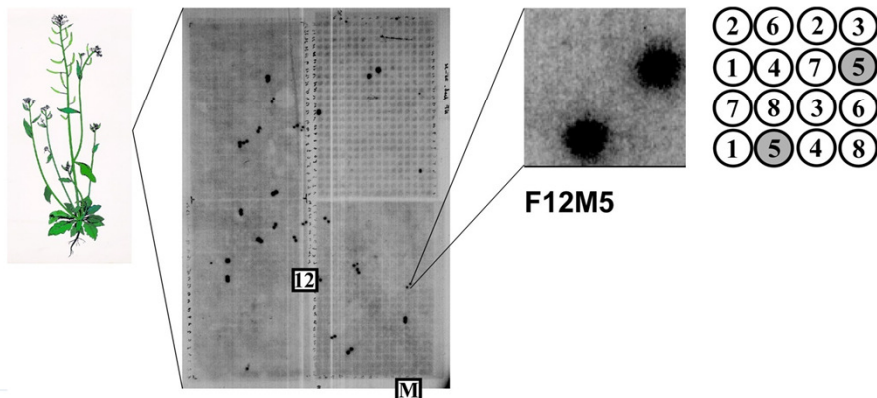


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## 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

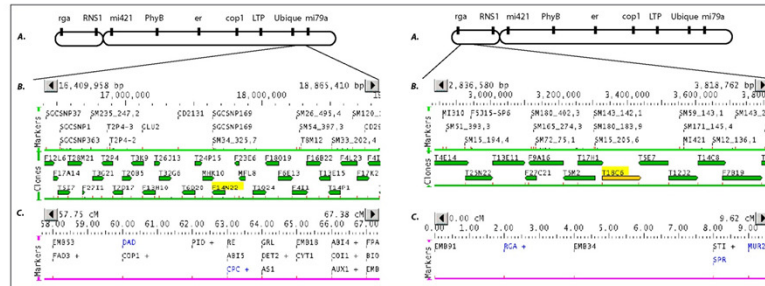


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

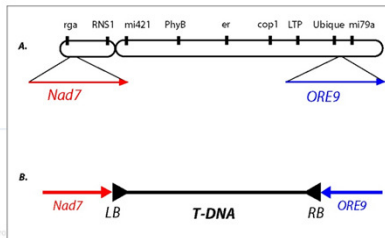
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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 2



CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# Osnova

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

## ▪ Poziční klonování

- podstatou je kosegregační analýza segregující populace (většinou potomstva informativního 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 restrikčních fragmentů úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligací adaptorů)
- **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
  - polymorfismus délky restrikčních 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 ligací adaptorů)



EVROPSKÁ UNIE

esf

MINISTERSTVO  
MLÁDEŽE A TĚL  
ČESKÉ REPUBLIKY

pro konkurenceschopnost

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

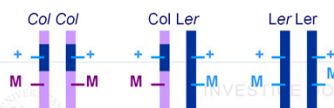
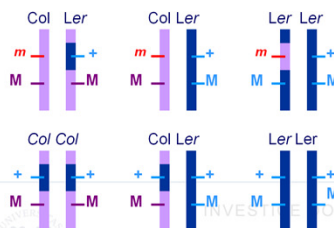
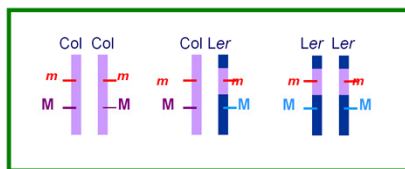
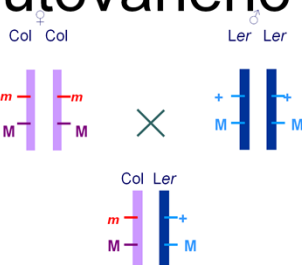
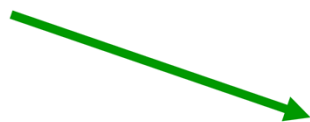
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

Příprava mapovací populace



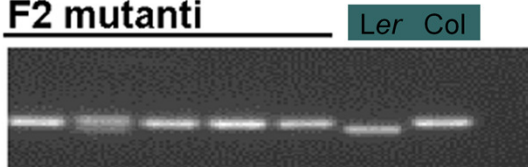
EVROPSKÝ FOND ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

**Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace  
mezi mutací a molekulárním markerem**

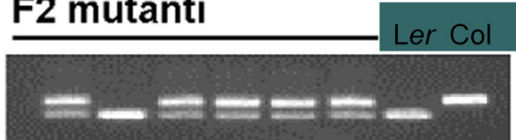
$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col I}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

**F2 mutanti**



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

**F2 mutanti**



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

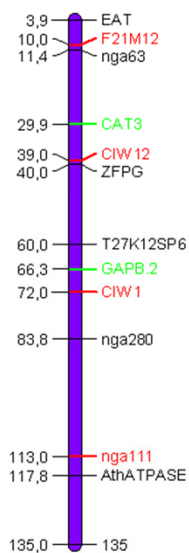


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

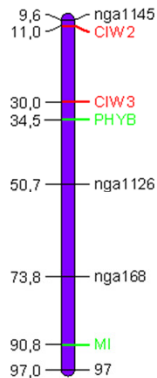
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Mapa DNA molekulárních markerů

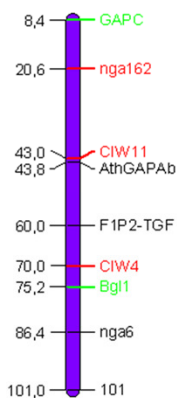
1CH



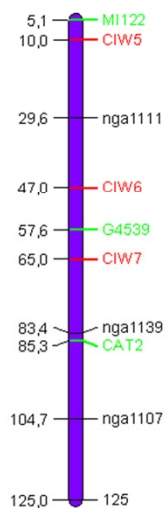
2CH



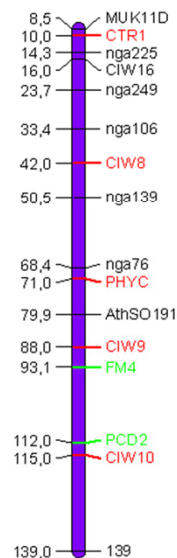
3CH



4CH



5CH



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, Mládeže a tělovýchovy

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



financováno z prostředků státního rozpočtu České republiky

# Markery pro jemné mapování

- AGI Map
- Lister & Dean RI
- Classical
- mi-RFLP
- Goodman
- GoodmanBAC
- TIGR
- Finkelstein
- Atmann

## Maps for Chromosome 2

for all Maps: [Search Options](#)

Selected Maps



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

### AGI Map

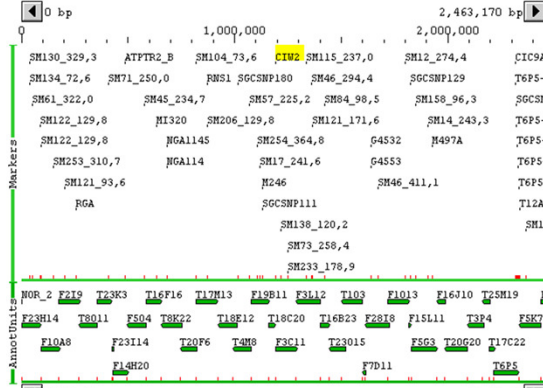
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

[AGI Map color key](#)



### Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



EVROPSKÁ UNIE  
 EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND  
 Mládeží a zaměstnanosti

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost  
 ŠKOLA 2014

IE VZDĚLÁVÁNÍ  
 je spolufinancována  
 evropským sociálním fondem  
 a státním rozpočtem České republiky

# Shrnutí

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Diskuse



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky