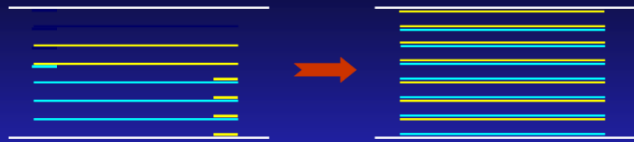


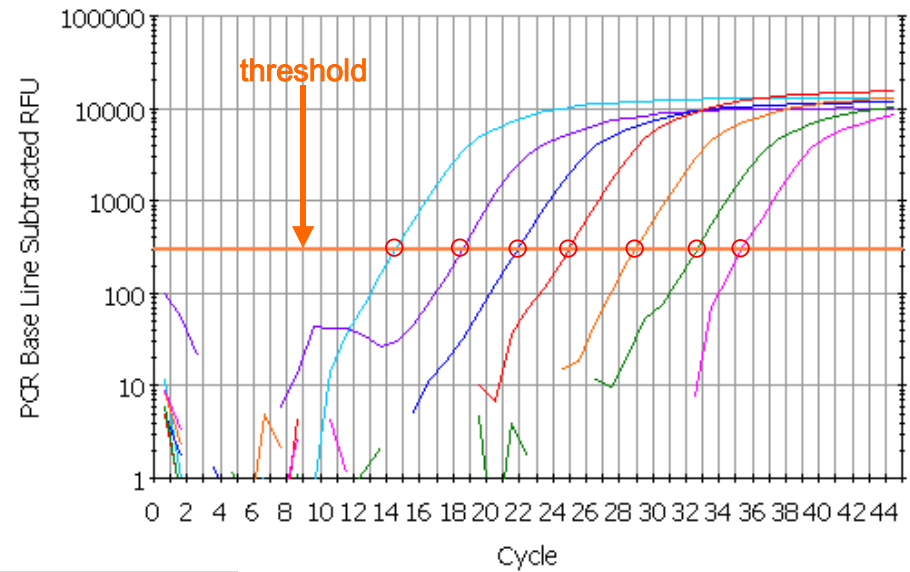
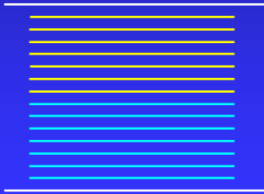
PCR

qPCR

Ochlazení – nasednutí primerů 72°C vznik nových fragmentů



95°C denaturace



Primer - F - AAGTCAGTCTAA=0 -

Primer - F - AAGTCAGTCTA=0

Primer - F - AAGTCAGTCT=0

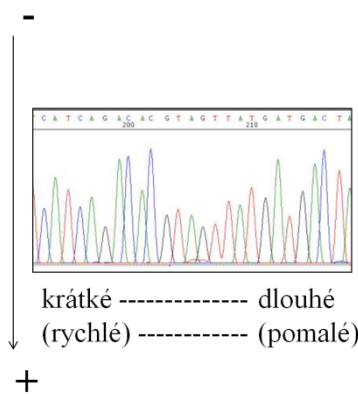
Primer - F - AAGTCAGTC=0

Primer - F - AAGTCAGT=0

Primer - F - AAGTCAG=0

Primer - F - AAGTCA=0

Primer - F - AAGTC=0



Primer - F **AAGTCAGTCTAAATGCGATTGGGA** Rev. Primer - R

Rev. Primer - F **TTCAGTCAGATTTACGCTAACCCCT** Primer - R

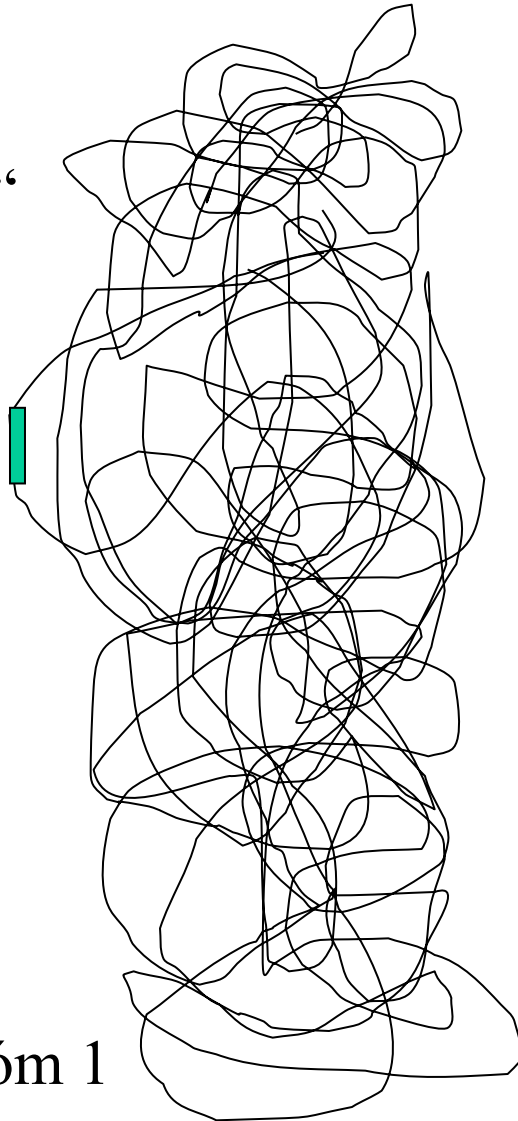
Sekvenování

Genotypizace - stanovení genotypu

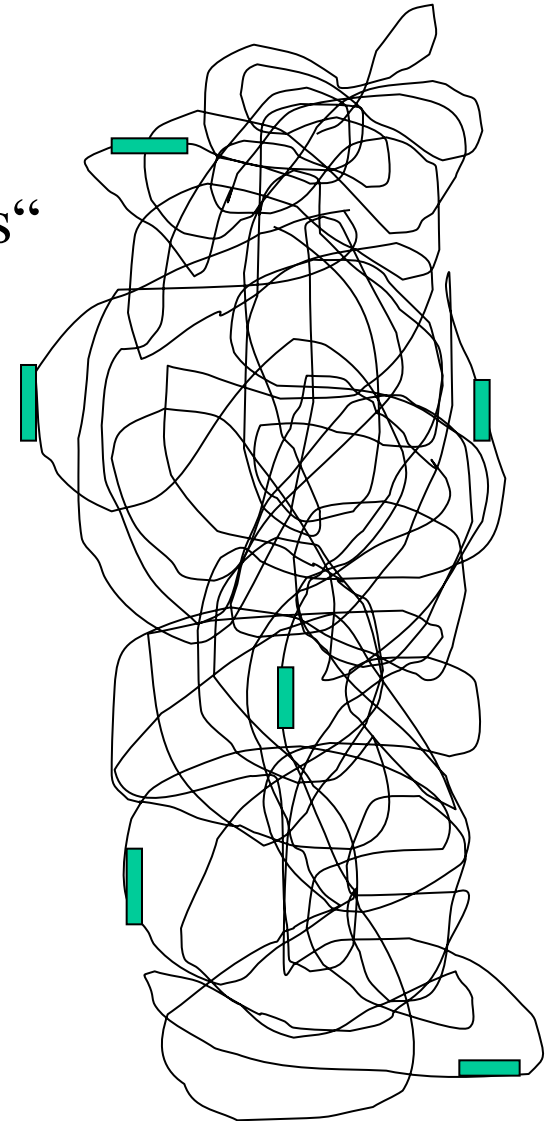
- stanovení formy (alely, haplotypu) určitého úseku DNA („genetického markeru)
 - 1) izolace celkové DNA z tkání
 - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR-based methods)
 - 3) studium variability daného úseku (lokus = marker = znak)

Typy genetických markerů

„single-locus“



„multi-locus“



Př.: chromozóm 1

Typy genetických markerů

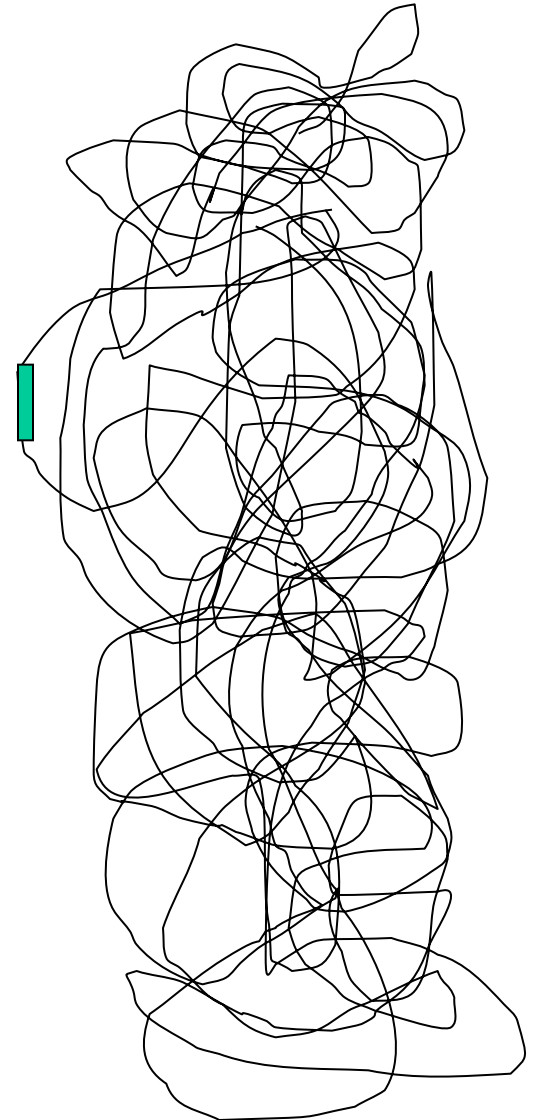
- **dominantní** markery – odliší pouze přítomnost (či nepřítomnost) daného znaku; tj. neodliší obě jeho formy na homologních chromozómech
- **kodominantní** markery – identifikace homologních alel, tj. je možno rozlišit homozygotní a heterozygotní stav (umožňují stanovit frekvenci alel)

Typy genetických markerů

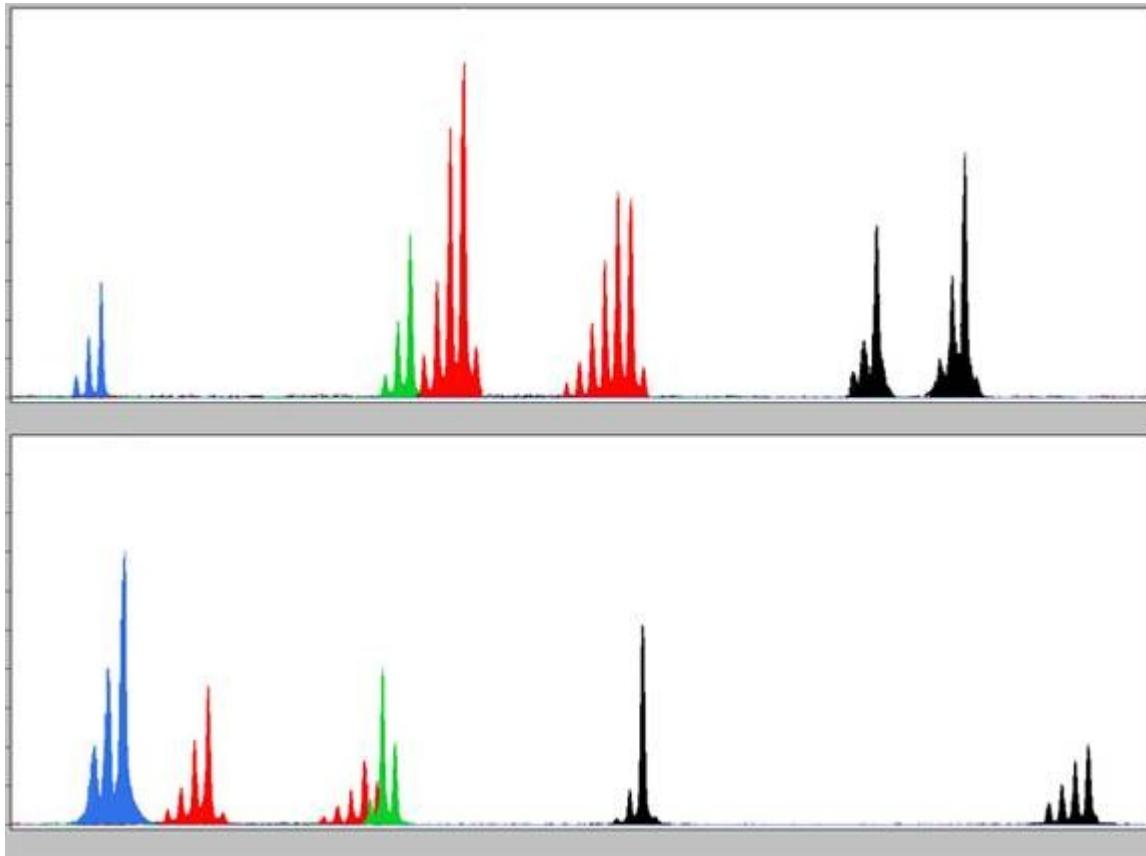
	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Nuclear multilocus				
Minisatellite DNA fingerprints	No	No	No	High
RAPD	No	No	Yes	High
AFLP	No	No	Yes	High
Nuclear single locus				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
Mikrosatelite	Yes	Yes	Yes	High
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
SNPs (sekvence)	Yes	Yes	Yes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

Single-locus genetic markers

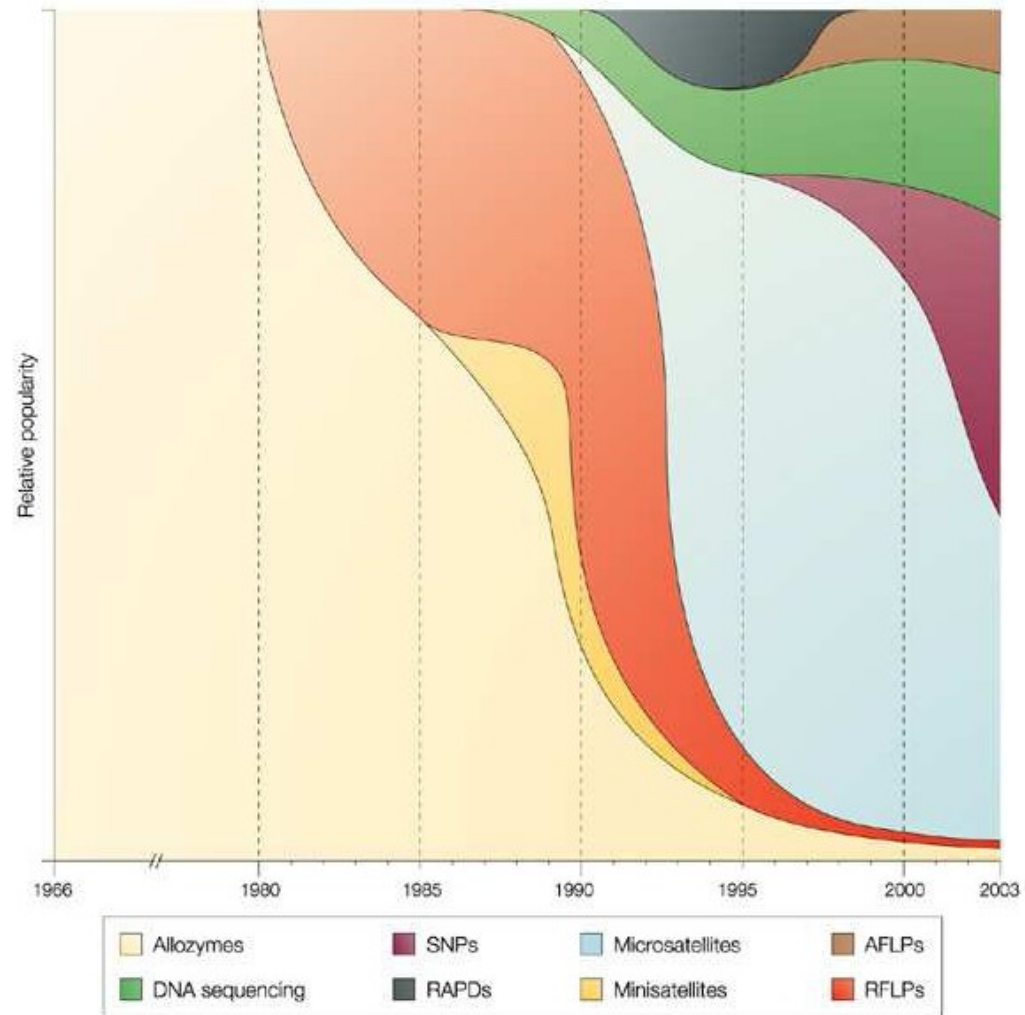
- kodominantní – možno stanovovat frekvence alel (= lze odlišit homo- a heterozygota)
- **allozomy** a jiné funkční geny - **MM**
- **mikrosatelity** – délkový polymorfismus
- **SNPs** (single nucleotide polymorphisms) – sekvenční polymorfismus
- **SINE, LINE** – inzerce (tj. délkový polymorfismus)



Mikrosatellity



Mikrosatelity jsou a budou stále velmi užitečné markery v molekulární ekologii



Mikrosatelity

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

TTCAGGCACACACA**ATCTCTAGCTTCGA**

27 bp

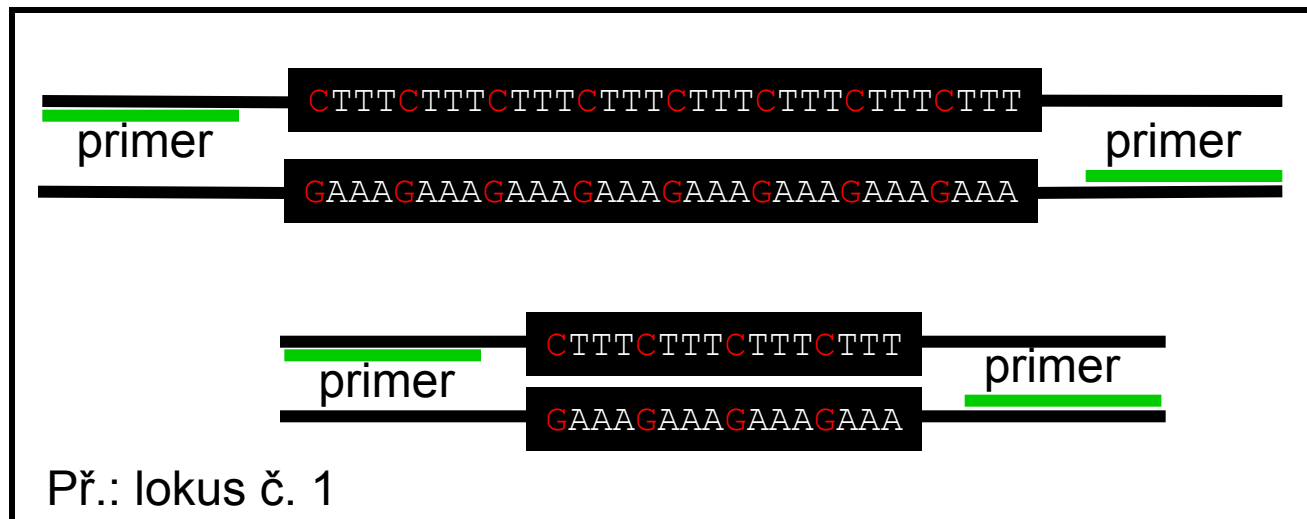
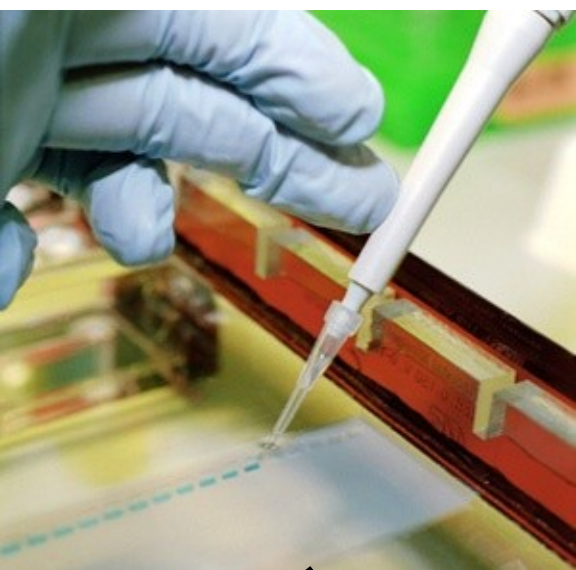
TTCAGGCACACA**ATCTCTAGCTTTGA**

25 bp

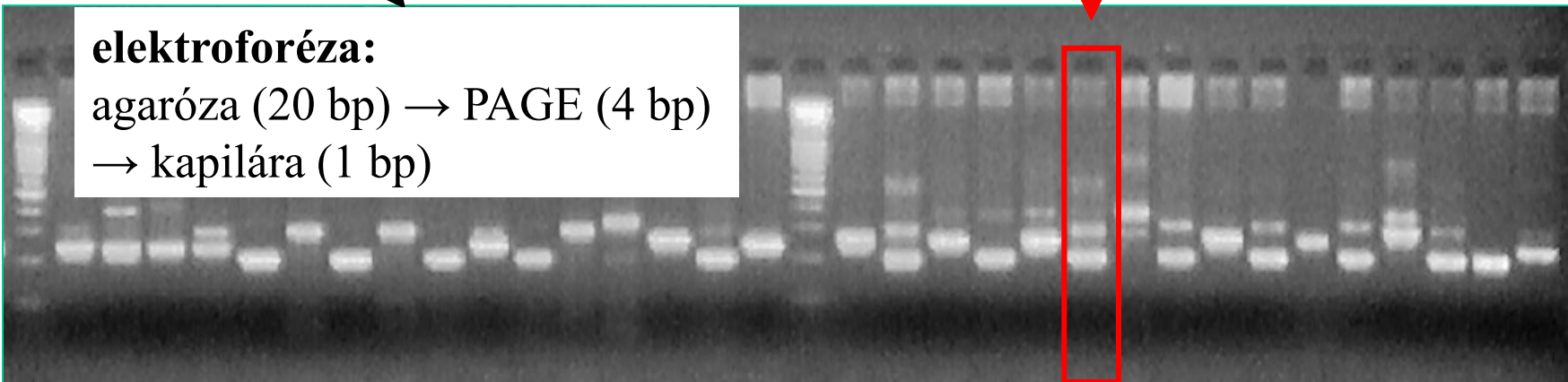
genotyp diploidního jedince: **25/27**

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

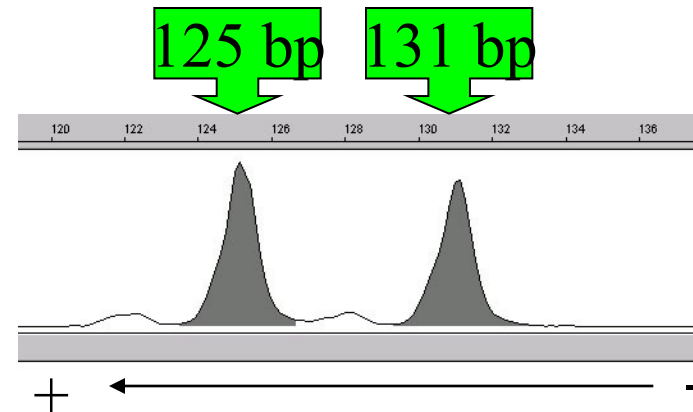


elektroforéza:
agaróza (20 bp) → PAGE (4 bp)
→ kapilára (1 bp)



Kapilární elektroforéza ~ Fragmentační analýza

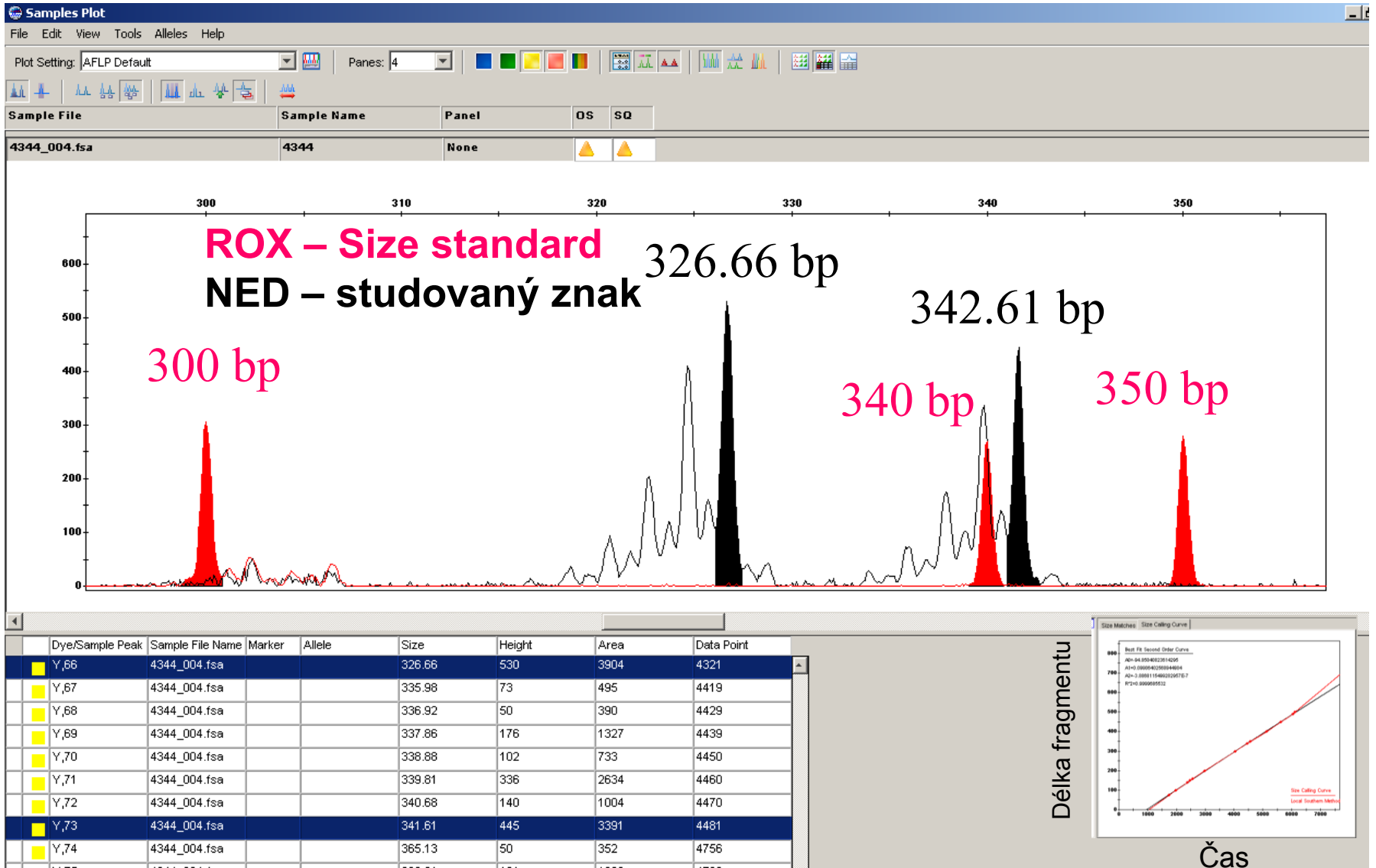
(denaturující polymer POP7 - ssDNA, jeden značený primer)



krátké ----- dlouhé
(rychlé) ----- (pomalé)

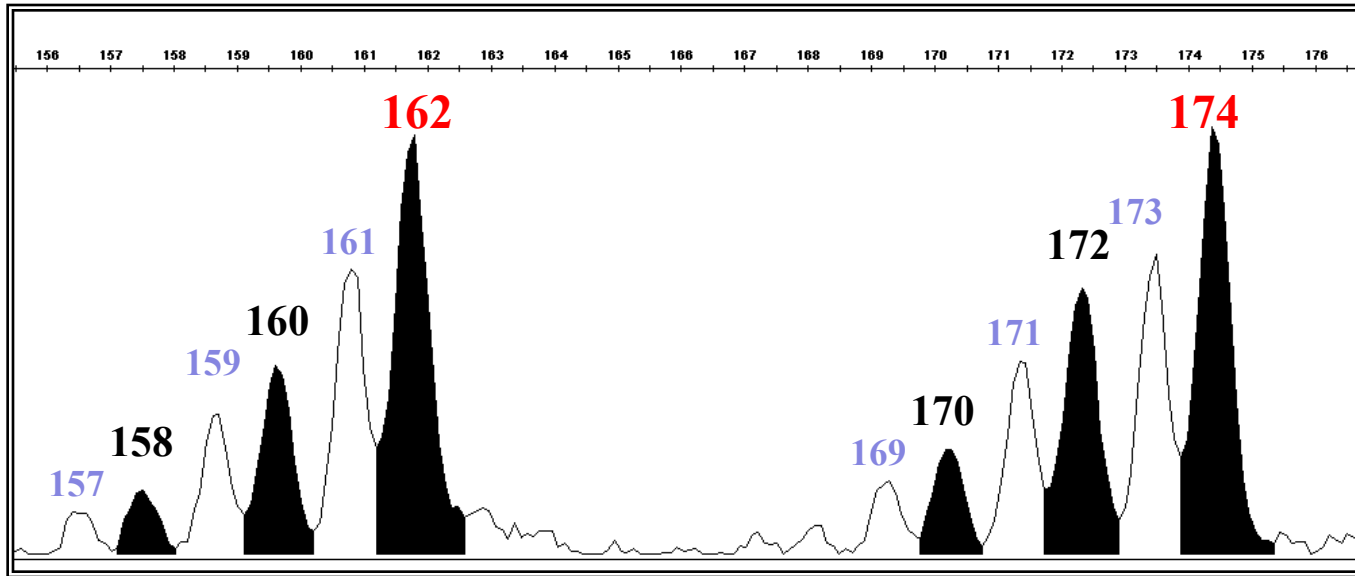


Well controlled
electrophoresis parameters,
high sensitivity



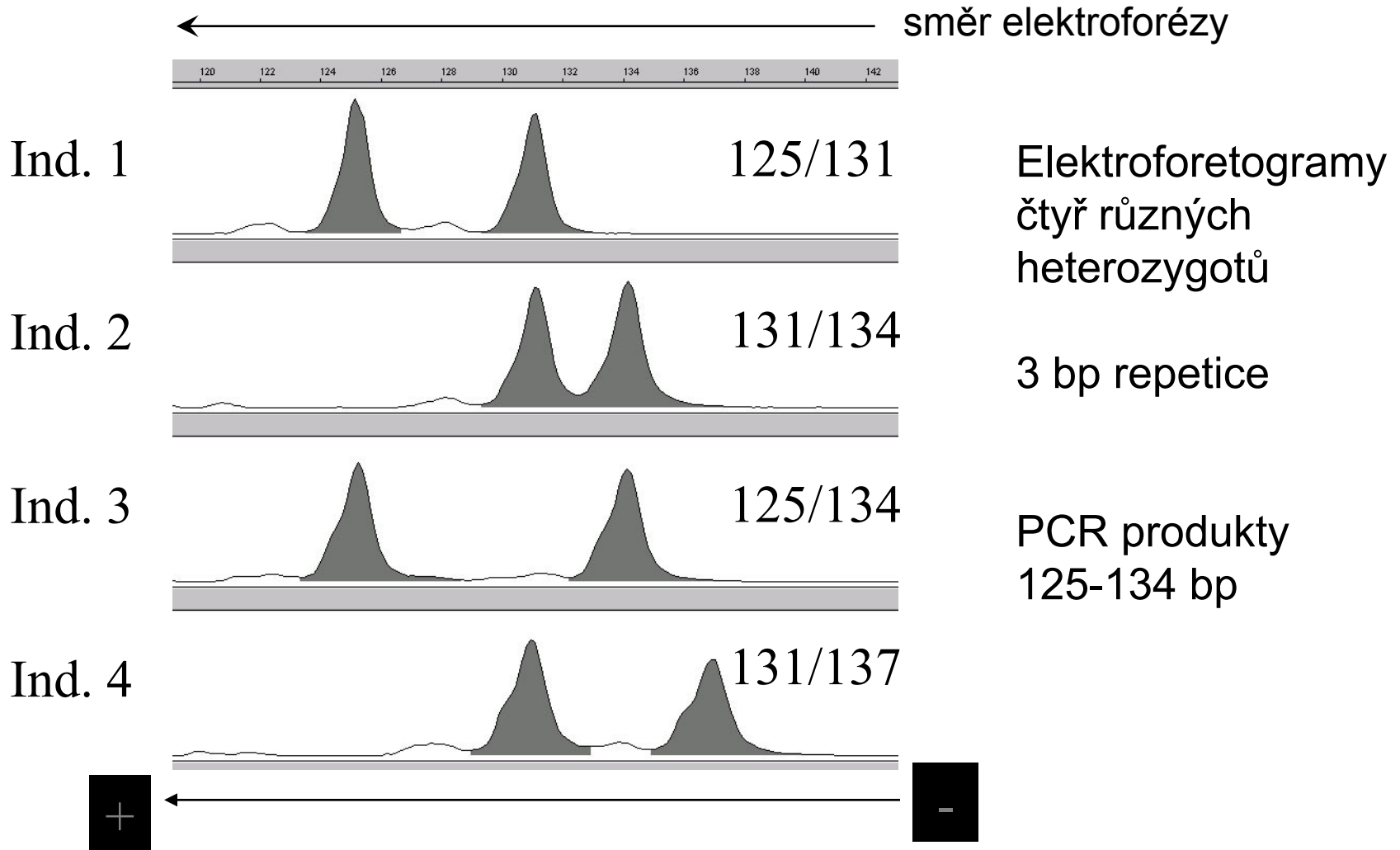
Genotyp mikrosatelitu na lokusu NED = 326/342 nebo 327/343
 Programy: GeneMapper, Genotyper, Geneious, GeneMarker, ...

Genotyp 162/174

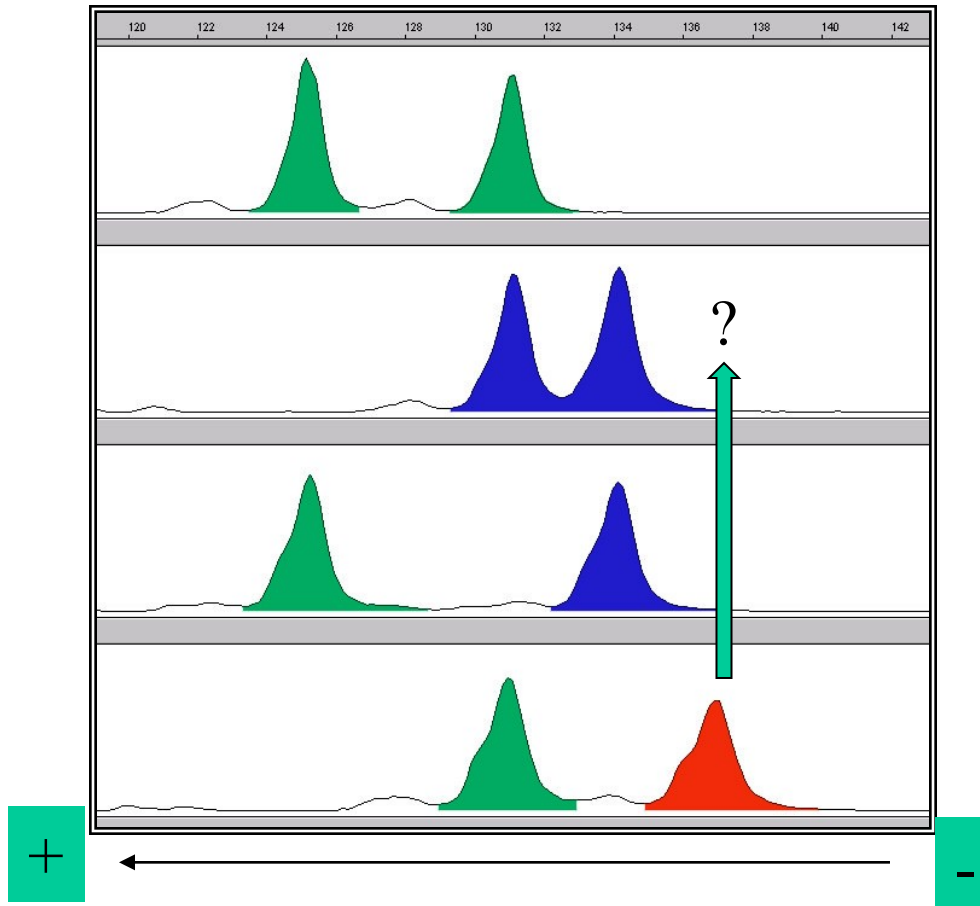


- alely a jejich stuttery jsou černě (rozdíl mezi nimi je 2 bp)
- bílé píky jsou tzv. „mínus A-alely“ a jejich stuttery = výsledek jiné chyby polymerázy, a to nepřidání koncového adeninu
- rozdíl mezi černým a sousedním bílým píkem je 1 bp (tj. chybějící adenin)
- pattern daného lokusu je vždy specifický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

Srovnání různých jedinců - analýzy příbuznosti



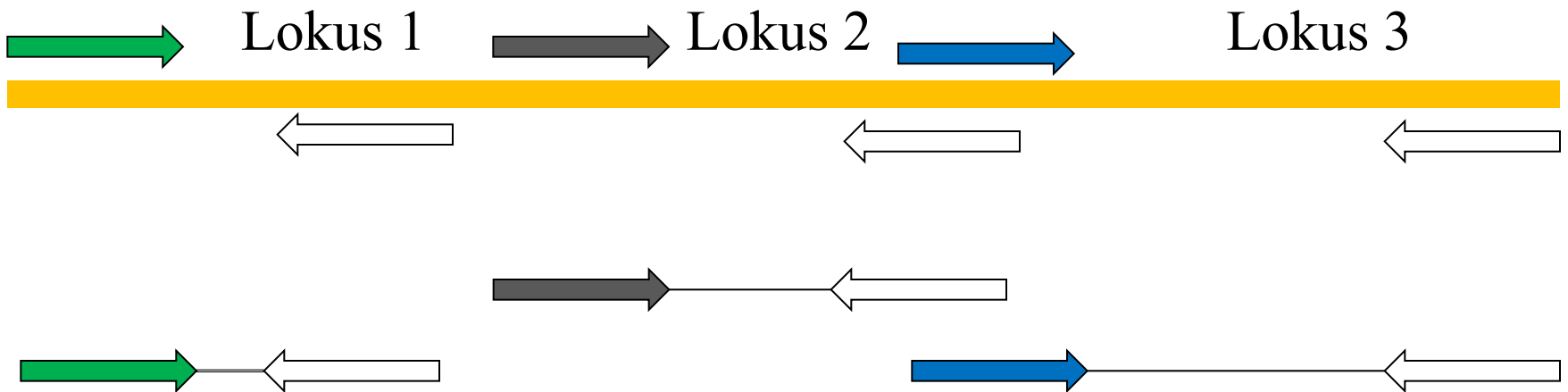
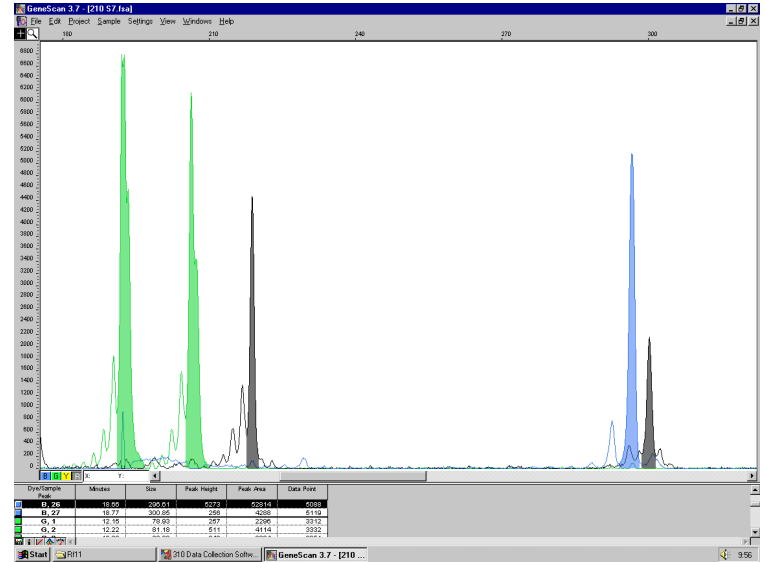
Př. Analýza příbuzenských vztahů



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

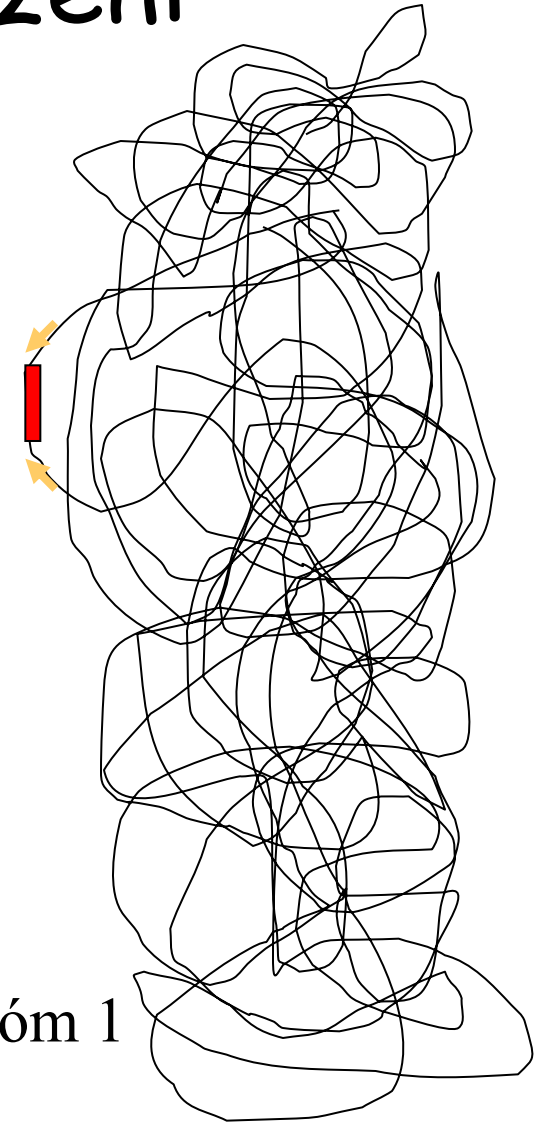
- nalezení lokusů (navržení primerů) je pracné a nákladné u volně žijících druhů (genomová knihovna, klonování, screening, sekvencování)



TTCAGG**CACACACA**TCTCTAGCTTCGA

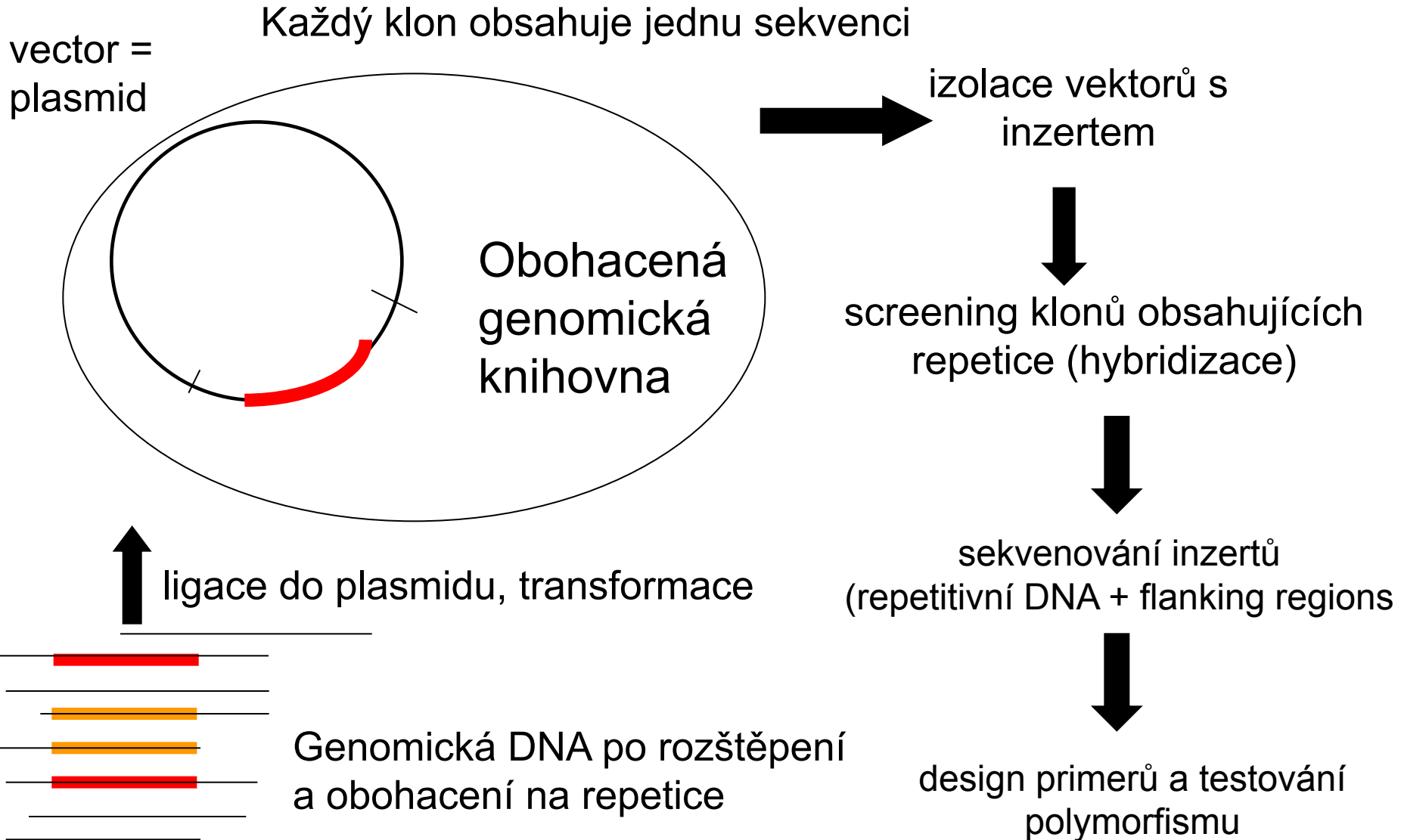


„flanking regions“ – ohraničují repetici a zde musí být navrženy primery pro PCR



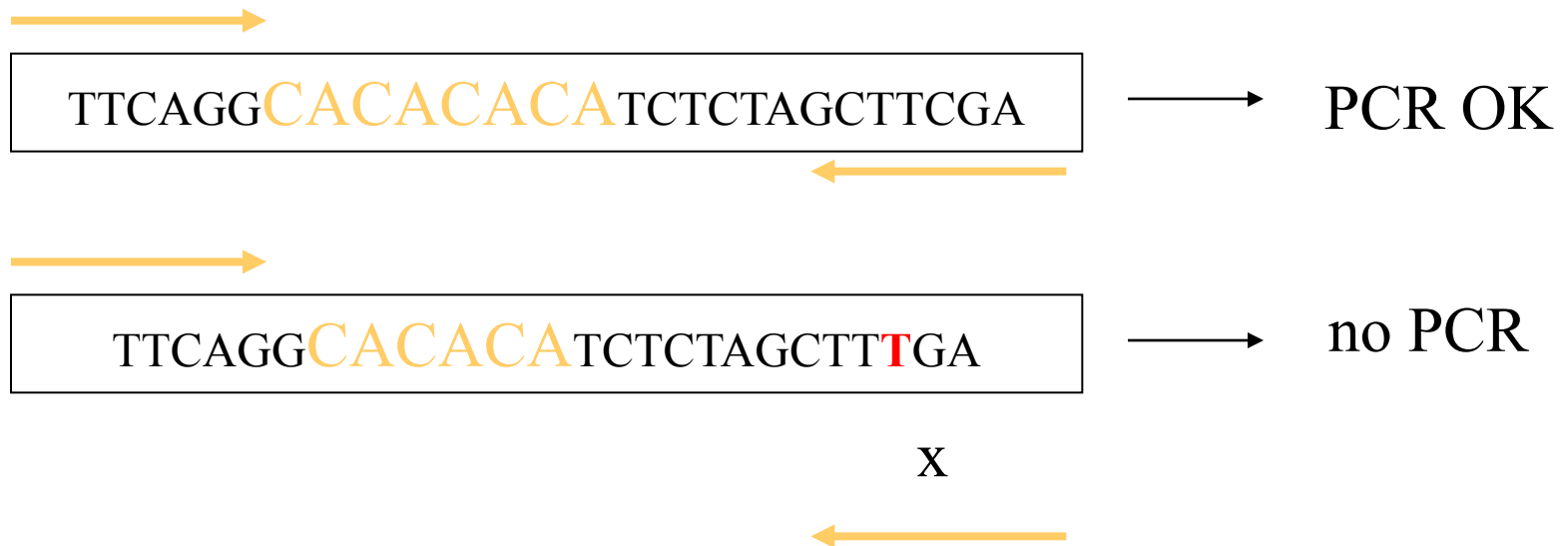
Př.: chromozóm 1

Restriction, enrichment, cloning, and sequencing



Alternativa: cross-species amplification

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



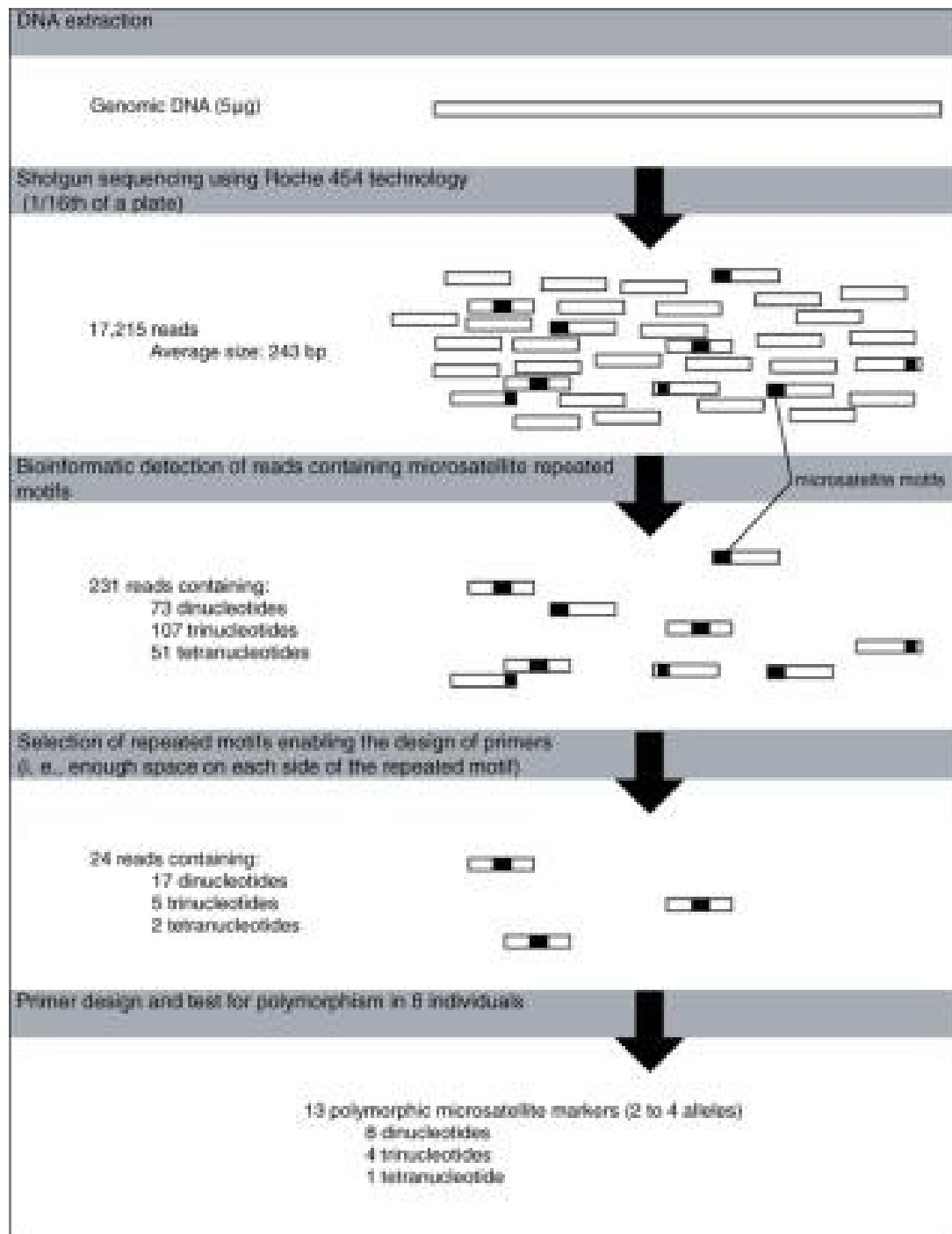
Nulové alely a genotypizační chyby komplikují analýzy příbuznosti

	lokus 1 null alleles		lokus 2 genotyping error	
Matka	100	150	300	350
Samec 1	100	100	300	367
Mládě	150	150	350	365

Samec 1 je vždy opravdovým otcem, ale jednoduchá „exclusion“ metoda ho vždy vyloučí

Optimalizace mikrosatelitů v současnosti = NGS

- „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 ?)





GenoScreen



DE NOVO GENETICS MARKERS : GENO SAT[®] HIGH THROUGHPUT MICROSATELLITES LIBRARY SOLUTIONS

YOU WANT TO :

- ✓ Rapidly obtain a microsatellites database for your species
- ✓ Identify your polymorphic genetic markers
- ✓ Follow-up species genetic biodiversity, conservation, preservation or reintroduction

GIVE US

WAIT ONLY 2 MONTHS

OBTAIN A MINIMUM OF

FOR ALL KIND OF GENOMES

1 µg DNA PER SAMPLE

FROM 12 INDIVIDUALS

SAMPLES RECEPTION

DNA QUANTIFICATION & QUALITY CONTROL

STANDARDIZED MICROSATELLITES ENRICHMENT

OPTIMIZED NEXT GENERATION SEQUENCING

DEDICATED BIOINFORMATICS PIPELINE

8000 RAW SEQUENCES

2000 MICROSATELLITES SEQUENCES

100 *IN SILICO* DESIGNED PRIMERS PAIRS

- ✓ **GENO SAT®**
Motives enrichment + High throughput sequencing + Bioinformatics = Microsatellites library
- ✓ **GENO SAT® PACK**
GENO SAT® + Biological validation of primers pairs including polymorphism test of amplified markers
- ✓ **GENO SAT® PACK PLUS**
GENO SAT® PACK + Genotyping on a large population using validated markers

ALREADY PERFORMED ON MORE THAN 400 SPECIES ALL OVER THE WORLD
WILL YOU BE THE NEXT ONE ?

Využití mikrosatelitů

- identifikace jedinců a analýzy příbuznosti (zejména rodičovství)
- populační genetika (conservation genetics, landscape genetics, etc.)
- fylogeografie a analýzy historické demografie (omezeně – nutno znát **mutační model**)
- fylogenetika, tj. vzdálenější příbuzní – téměř vůbec, vysoké riziko **homoplázií**

Teoretické mutační modely (nutno definovat pro analýzy vyžadující údaj o podobnosti alel)

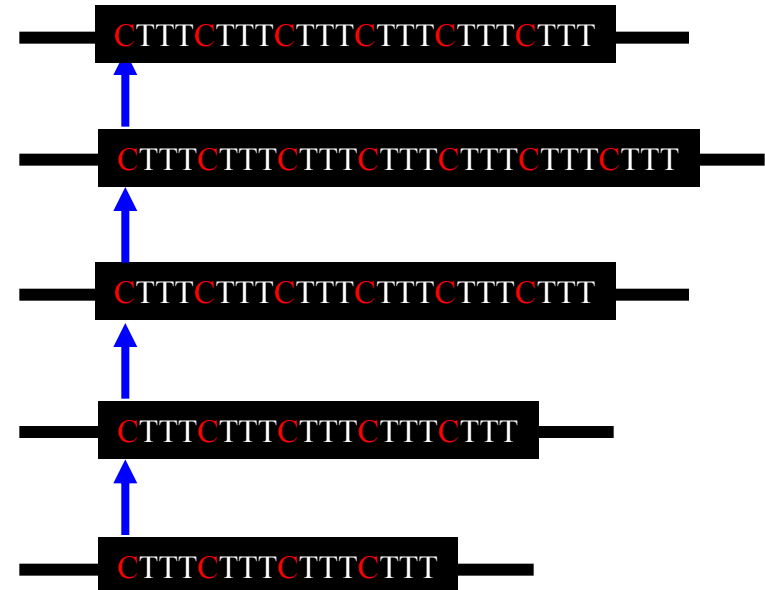
- **IAM – infinitive allele model**

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, ale pouze **identitu**.



- **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 (**similarity**) alel.



Pravda bude někde mezi ...
= Two-phase model (TPM)

Indels

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

TTCAGG**CACACACA**TCTCTAGCTTCGA

27 bp

SMM model – možno kvantifikovat podobnost („similarity“) alel

TTCAGG**CACACACA****CA**TCTCTAGCTTCGA

27 → 29 bp

TTCAGG**CACACACA**TCTC**G**TAGCTTCGA

27 → 28 bp

TTCAGG**CACAC****GACA**TCTCTAGCTTCGA

27 → 28 bp

TTCAGG**CACACCA**TCTCTAGCTTCGA

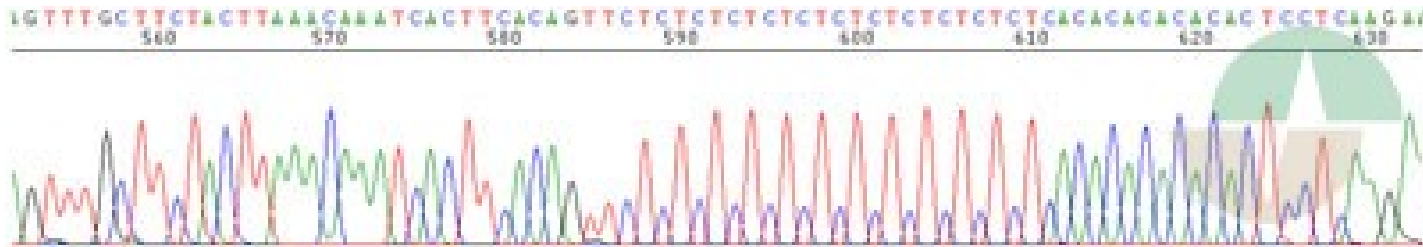
27 → 26 bp

TTCAGG**CACACACA**TCTCTAGTTCGA

27 → 26 bp

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

Další nepravidelnosti (tj. možné komplikace při analýzách)



„složený mikrosatelit“ – rovněž není možné aplikovat jednoduchý mutační model

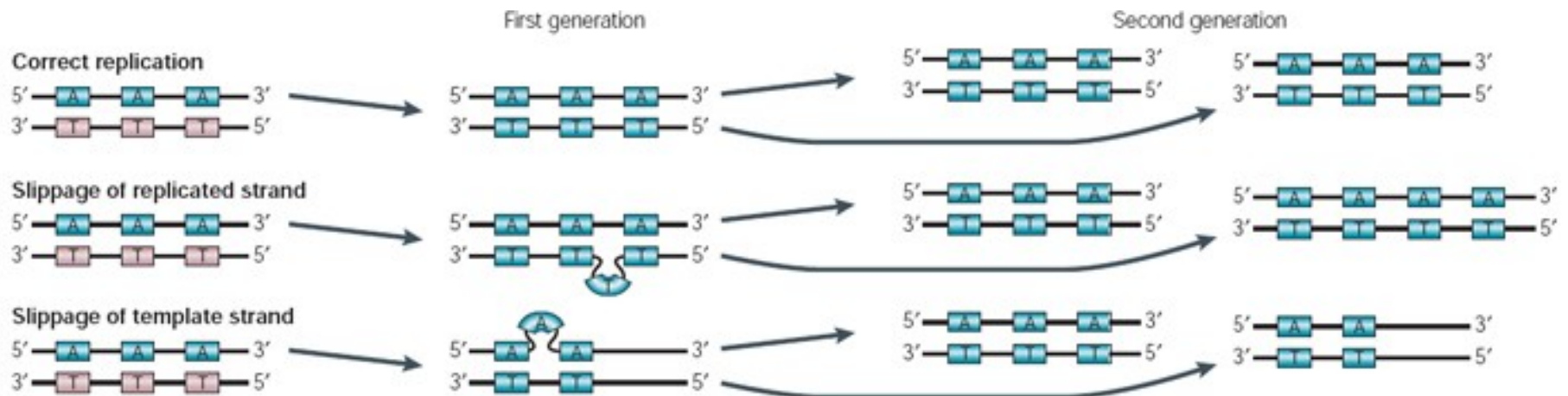
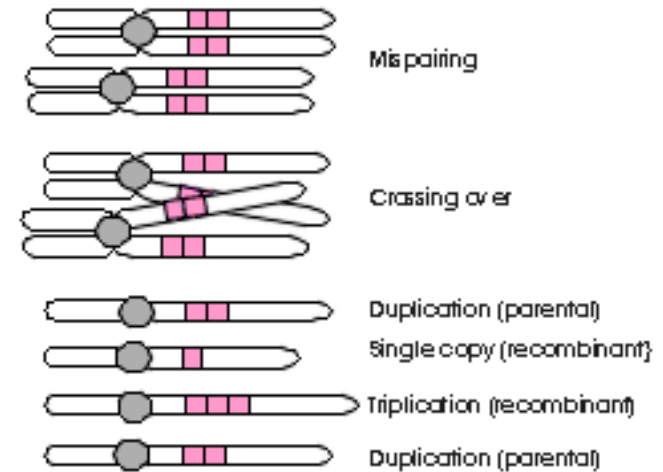
Proč je tolik alel? (microsatellite instability)

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

- **Skouznutí 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** (náchýlnější k velkým delecím)
- **Delší mikrosatelity rychleji mutují** (díky více opakováním je vyšší pravděpodobnost pro sklouznutí polymerázy (SSM) – mají více alel)

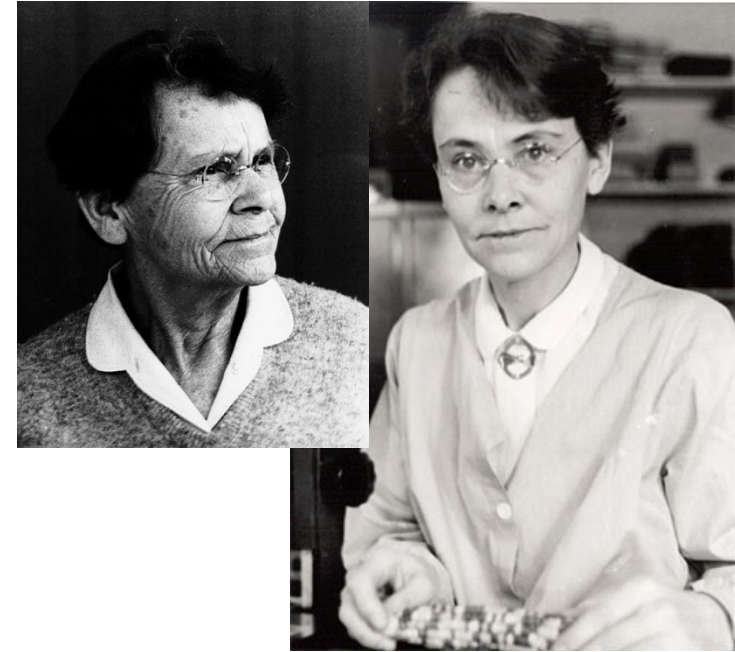
Mikrosatelity - závěry

- 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 pro analýzy příbuznosti (paternity) – zde se budou používat ještě hodně dlouho

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%)

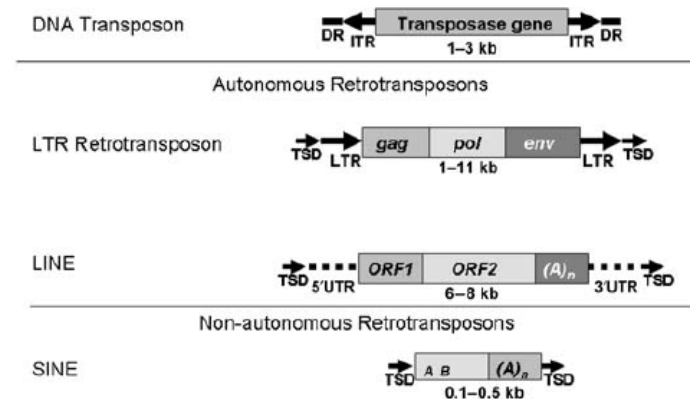


*Objev DNA transpozonů u kukuřice:
Barbara McClintock*

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

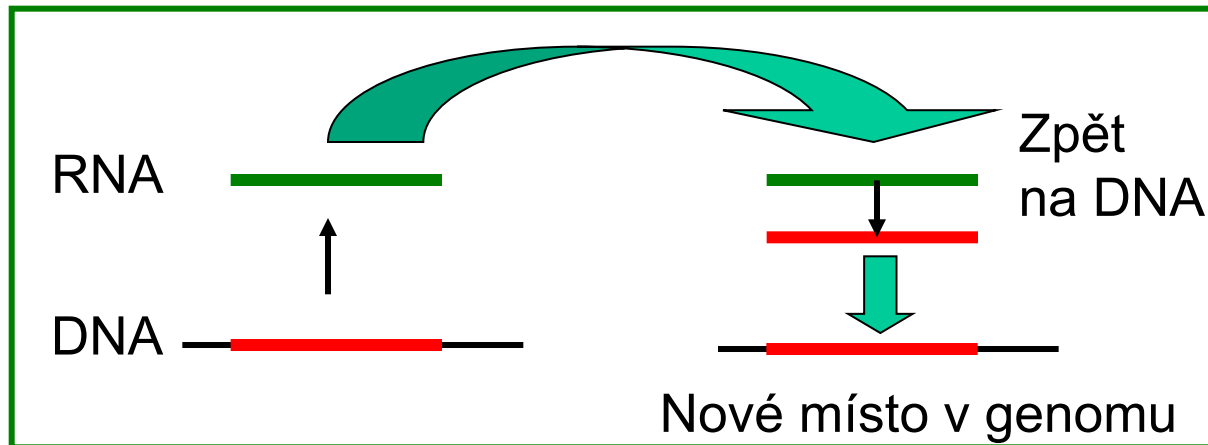


- **Nekódují proteiny, neautonomní, 100-1000 bp**

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

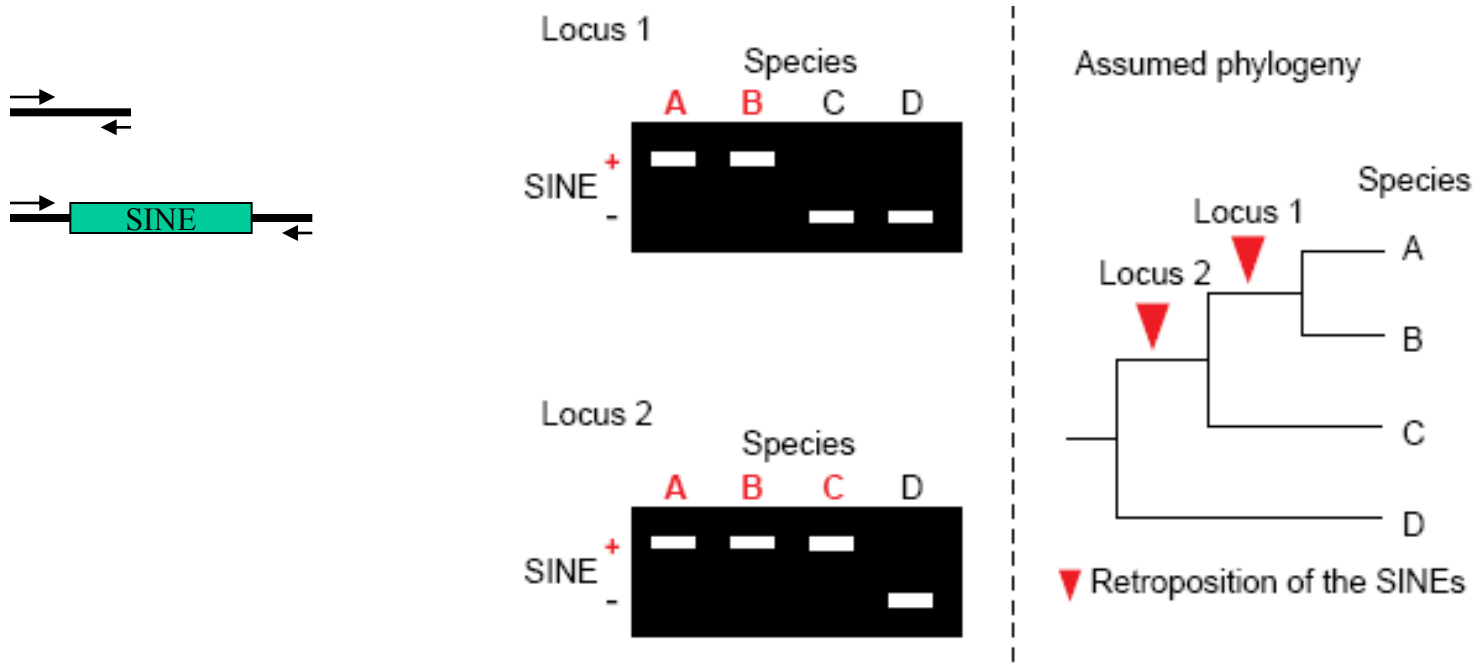
LINE - mechanismus transpozice

- 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**

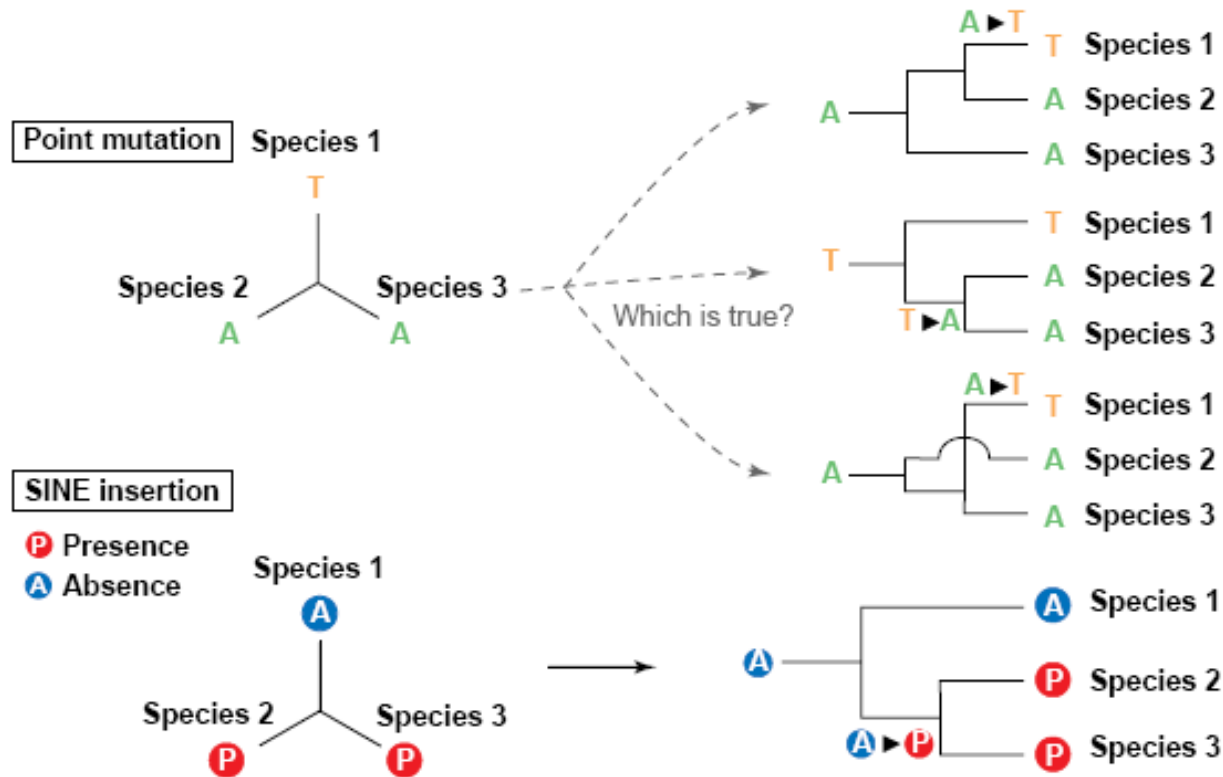
Velmi nízké riziko homoplázií → SINE = ideální fylogenetické markery



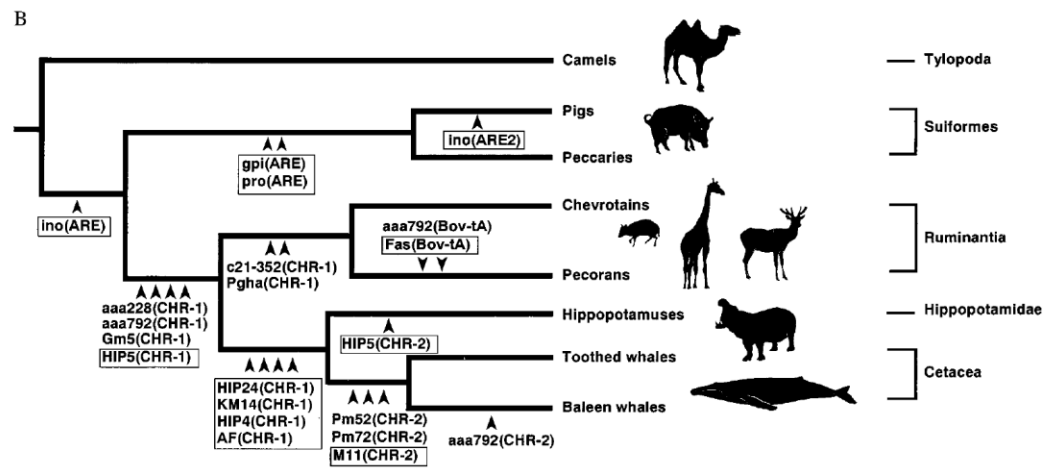
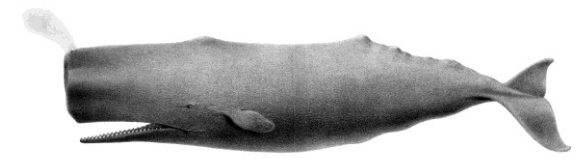
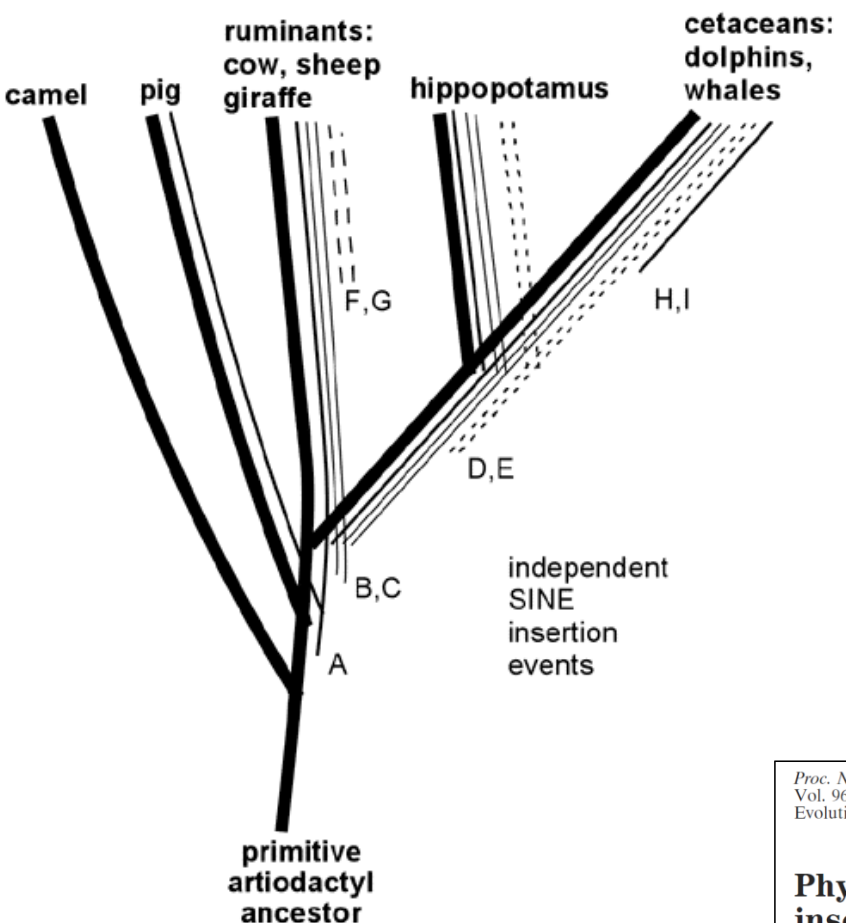
„single-locus marker“

- PCR amplifikace daného úseku a elektroforéza

Neexistují zpětné mutace = výhoda oproti sekvenačním datům



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



Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 Vol. 96, pp. 10261-10266, August 1999
 Evolution

Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales

MASATO NIKAIIDO[†], ALEJANDRO P. ROONEY[‡], AND NORIHIRO OKADA^{†§}

[†]Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho, Yokohama, Midori-ku, Kanagawa 226-8501, Japan; and [‡]Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, 328 Mueller Laboratory, University Park, PA 16802