

Inovace studia molekulární a buněčné biologie reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Genomika (KBB/GENOM)

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Fyzické mapování

Fyzické cytogenetické a fyzické molekulární mapy

Ing. Hana Šimková, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Cíl přednášky

- seznámení s problematikou fyzického mapování a základními typy fyzických map

Klíčová slova

- fyzické mapování, cytogenetické mapy, restriční mapy, optické mapování, mapování pomocí radiačních hybridů, knihovny dlouhých inzertů

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

FYZICKÉ MAPOVÁNÍ

- umístování značek (nukleotidových sekvencí, klonů, restričních míst či jiných typů markerů) na chromozómy – vzdálenosti udávány v bp. Markery nemusí být polymorfní.

Fyzické mapy v širším smyslu:

a) fyzické cytogenetické mapy (vzdálenosti v μm nebo % chromozómu nebo ramene)

- **mapování pomocí aneuploidních, delečních, substitučních a adičních linií**
- mapování na polytenních chromozómech
- proužkování na chromozómech (barviva, *in situ* hybridizace)

b) fyzické molekulární mapy

- vytváření map restričních míst pomocí
 - pulzní elektroforézy (makrorestriční m.)
 - standardní elektroforézy (restriční m.)
 - **optického mapování** (makro/restriční m.)
- **mapování pomocí radiačních hybridů**
- **vytváření fyzických map klonů** (kontigová mapa)
- vytváření fyzických map sekvencí

Investice do rozvoje vzdělávání

Mapování pomocí delečních, aneuploidních, substitučních a adičních linií

- umožňuje umístit marker na chromozóm, jeho rameno nebo část

Aneuploidní linie – chybí rameno, chromozóm nebo více chromozómů

Deleční linie – chybí část chromozómu

Substituční linie – celý chromozóm nebo jeho část nahrazeny chromozómem nebo jeho částí z jiného druhu

Adiční linie – k normální sadě chromozómů přidán(y) chromozóm(y) jiného druhu

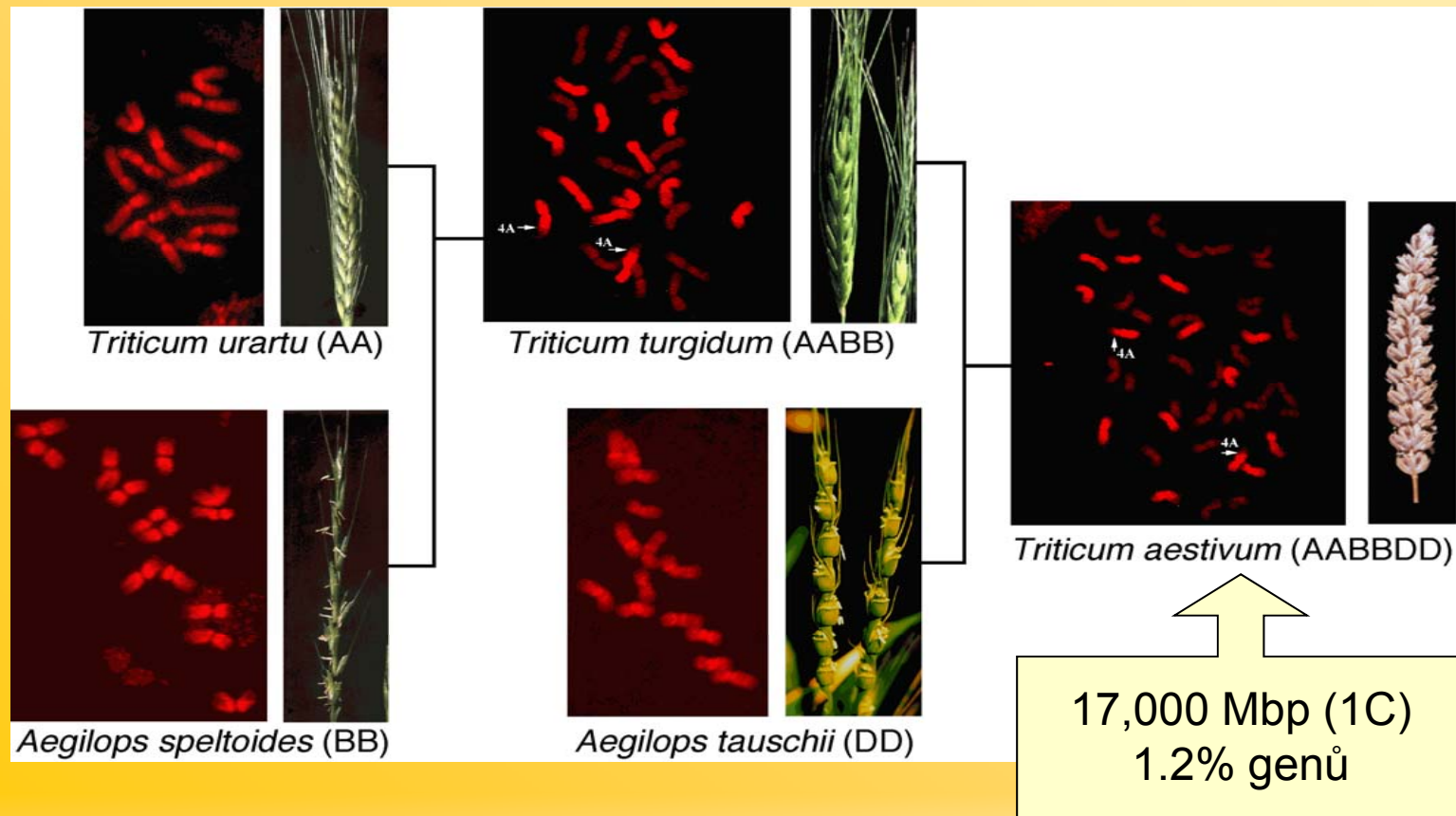
Tyto linie lze vytvářet u polyploidních druhů (tolerují ztrátu chromozómu nebo jeho části).

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Investice do rozvoje vzdělávání

Genom pšenice seté

- Allohexaploidní druh ($2n = 6x = 42$, genom AABBDD)
- Vznikl dvěma nezávislými hybridizacemi

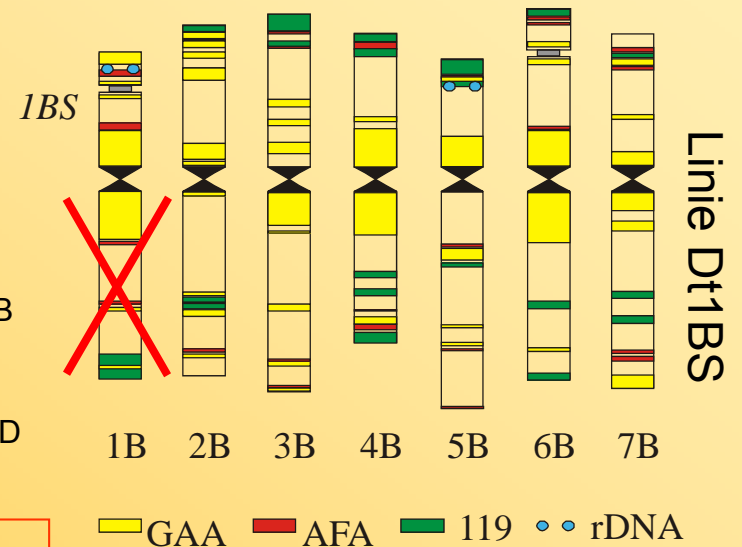
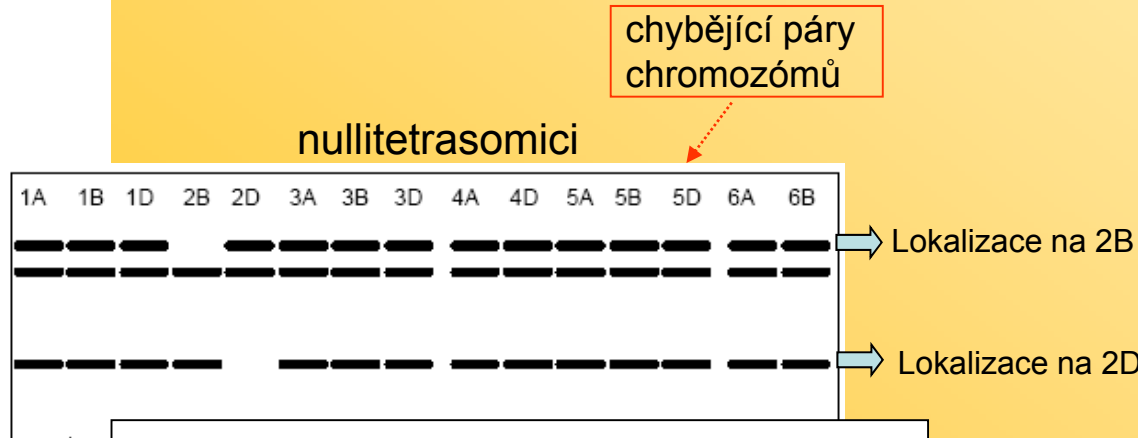


Investice do rozvoje vzdělávání

Aneuploidní linie

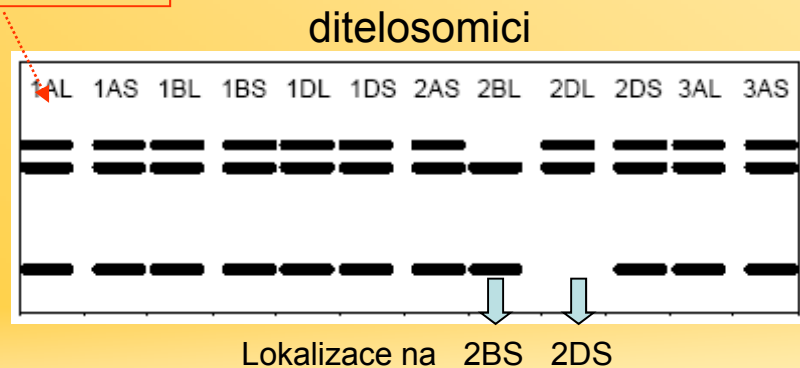
- pro mapování se používají zejména nullitetrasonické linie a ditelosonické linie

Dr. E. R. Sears připravil mnoho aneuploidních linií pšenice odrůdy Chinese Spring. Tím byly objeveny homeologní skupiny pšeničných chromozómů.



Nullitetrasonik – jeden pár homolog. chromozómů chybí, nahrazen jiným párem chromozómů
Ditelosonik – jedno rameno chybí u obou homologních chromozómů

označení ditelosomika

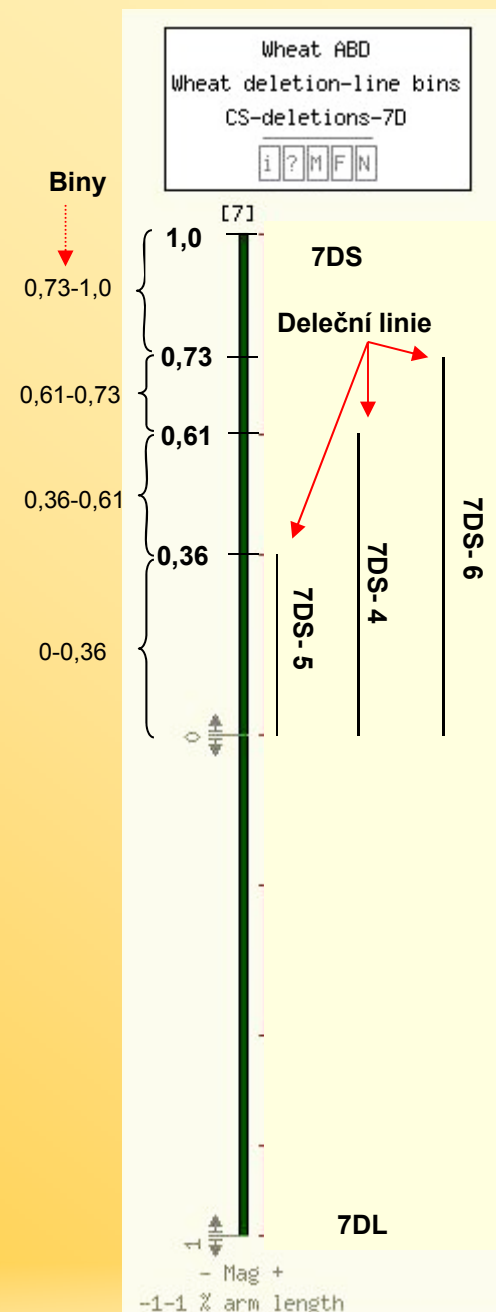


Zamapování – pomocí PCR nebo Southernovy hybridizace

– Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Deleční linie

Dr. B. Gill připravil deleční linie s homozygotními delecemi různé délky, které umožňují rozdělit všechna ramena pšeničných chromozómů na definované frakce, tzv. **biny**.



Investice do rozvoje vzdělávání

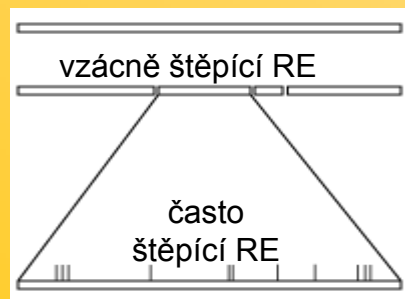
Využití optického mapování pro sestavování (makro)restrikčních map

Deproteinovaný chromozóm(y) navázán na mikroskopické sklíčko, molekula se natáhne – lineární vlákno. Fixované vlákno naštěpeno restriční endonukleázou, obarví se fluorescenční barvičkou. Naštěpená restriční místa můžeme pozorovat jako mezery fluorescenčním mikroskopem.

Vhodné zejména pro mapování celých mikrobiálních genomů (bez nutnosti kultivace mikrobů).

Investice do rozvoje vzdělávání

chromozóm
makrorestrikční
mapa
restrikční mapa



Optické mapování genomové DNA *Deinococcus radiodurans* za použití enzymu *NheI*. Reprezentativní molekula DNA dlouhá 0.7 mm (2.4 Mb), přecházející přes 6 zorných polí mikroskopu, byla použita k vytvoření optické mapy.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Radiační hybridní mapování

– fragmenty chromozomů (5-10 Mbp) ze studovaného organismu (donora) získané ozařováním (letálními dávkami - 3000-8000 radů) jsou inkorporovány do souboru fibroblastových buněčných kultur křečka (recipienta). Soubor hybridních buněk = **panel radiačních hybridů** – reprezentuje celý genom. Za pomoci markerů se zjišťuje, s jakou frekvencí se jednotlivé lokusy vyskytují společně (koretence) – odvozuje se fyzická vzdálenost mezi markery.

Pro jemnější mapování – křeččí buněčné linie obsahující pouze jeden chromozóm studovaného organismu.

Jednotka – 1 cR (centiRay).

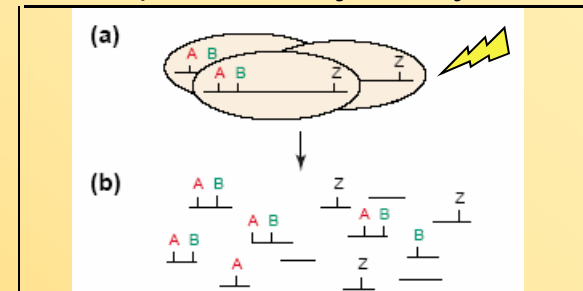
Statistická metoda – nejlépe v kombinaci s PFGE k ověření uspořádání.

V současné době jsou k dispozici standardní panely celého lidského genomu

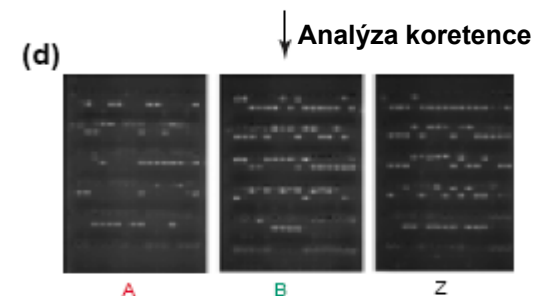
– lze srovnávat údaje z různých laboratoří.

☹ je nutné mít dostatečně specifické primery, aby se vyskytovaly v genomu jen jednou a neamplifikovaly DNA křečka

☺ narozdíl od knihoven panel radiač. hybridů obsahuje všechny sekvence z genomu

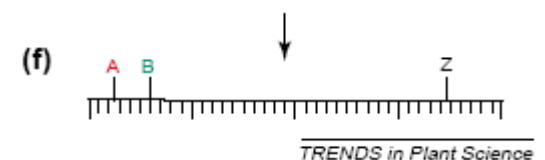


(c) Vytvoření panelu rad. hybridů



(e)

A	1	-	1	1	1	...	1
B	1	-	1	-	1	...	1
Z	-	1	-	1	1	...	-



TRENDS in Plant Science

Investice do rozvoje vzdělávání

Vytváření fyzických map klonů (kontigové mapy)

Sestavují se z klonů DNA **knihoven dlouhých inzertů**.

Používané klonovací vektory

- **kosmidy, fosmidy** (do 45 kb)
- **umělé bakteriální chromozómy** (BAC, PAC, BIBAC) – do 400 kb, zpravidla 100-200 kb
- **umělé kvasinkové chromozómy** (YAC) do 1000 kb, zpravidla 300-500 kb

Reprezentativnost knihoven:

$$N = \ln(1-P)/\ln(1-f)$$

N = potřebný počet klonů v knihovně

P = požadovaná pravděpodobnost, s jakou najdeme určitý gen (např. 0,99)

f = frakce genomu představovaná 1 inzertem (f = L/G)

L = průměrná délka inzertu (bp)

G = celková velikost genomu (bp)

Pokrytí (coverage) knihovny:

$$\text{Coverage} = NxL/G$$

Investice do rozvoje vzdělávání

Kosmidy

Kosmid (1978) – kombinací plasmidu (počátek replikace – *ori*, rezistence k antibiotiku, restriční místo) a fága lambda (1-2 *cos* sekvence – umožňuje sbalení *in vitro* do virových částic – vyšší účinnost transformace).

Maximální velikost do 45 kb.

Existují i binární kosmidové vektory – umožňují vnesení kosmidu do rostlin prostřednictvím *Agrobacteria*.

Kosmidy se vyskytují ve více kopiích na buňku – může vést k nestabilitě.

Fosmidy

- obdobná struktura a klonovací kapacita jako kosmidy, ale nesou počátek replikace z F-faktoru *E. coli* – zajišťuje jednokopiovost vyšší stabilita →

Můžou existovat jako indukovatelně vícekopiové.

PAC (umělý chromozóm odvozený z bakteriofága P1)

- kombinace bakteriofága P1 a plasmidu nesoucího F faktor (1994)

Selekce rekombinantů – klonovací místo v genu *SacB* – pozitivní selekce na médiu se sacharózou (nefunguje stoprocentně).

Má počátek replikace umožňující vícekopiovost (jen pro pomnožení, pak odstraněn)

Má T7 a SP6 promotory – umožňují transkripci klonovaného fragmentu *in vitro* – RNA se použije jako sonda pro hybridizaci nebo k syntéze proteinů *in vitro*

Investice do rozvoje vzdělávání

BIBAC (binární umělý bakteriální chromozóm)

- kombinace BACu a Ti plasmidu z *Agrobacterium tumefaciens* (1997)

Replikuje se v *E. coli* i *Agrobacteriu* jako jednokopiový plasmid.

Selekce transformantů – rezistence ke kanamycinu.

Selekce rekombinantů – *SacB*

Selekce pro transformaci v rostlinách – GUS-NPTII (bifunkční fúzní peptid)

BIBACy vnášeny elektroporací do *Agrobacteria*

Umožňuje vnášení dlouhých úseků DNA do rostlin

- pro funkční analýzu kandidátních genů
- pro využití ve šlechtění – např. geny pro rezistence (ve shlučích)

Umělý kvasinkový chromozóm (YAC)

YAC – kombinace bakteriálního plasmidu a kvasinkového chromozómu (komponenty pro replikaci a segregaci) – kyvadlový plasmidový klonovací vektor (1987)

- kultivovány v *S. cerevisiae* - auxotrofní kmeny – mutace v genu pro syntézu určité látky (selekce - transformanti nesou nezmutovaný gen)
- fragmenty do 1000 kb. Selekce rekombinantů – klonovací místo v genu *Sup4*

☹️ výskyt chimér, horší účinnost transformace, komplikovanější izolace a purifikace, nestabilita

Investice do rozvoje vzdělávání

Selekční systém pro přítomnost inzertu v YACu:

- inzerční místo v genu *SUP4* (tRNA supresorový gen)
- mutace *adel* v genomu kvasinky → vede k tvorbě červených kolonií

Za přítomnosti produktu genu *SUP4* (lokalizován na YACu)
– potlačena exprese alely *adel* → bílé kolonie

Při inaktivaci genu *SUP4* inzercí DNA
- alela *adel* exprimována → červené kolonie

Investice do rozvoje vzdělávání