

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.

Genetické mapování

Genetické markery

Ing. Hana Šimková, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



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

Cíl přednášky

- seznámení s principy genetického mapování, s obecnou charakteristikou genetických markerů a s nejběžněji používanými markerovými systémy, včetně vysoko-kapacitních

Klíčová slova

- genetické mapování, genetické markery

Investice do rozvoje vzdělávání



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

GENETICKÉ MAPOVÁNÍ

Genetické mapy – určují vzájemnou polohu polymorfních značek (markerů) na základě frekvence rekombinací. Polymorfismus – existence více rozlišitelných variant (alel) v populaci.

Genetické mapování – je založeno na analýze genetické vazby. Jediná metoda, která umožňuje mapování genů, které jsou detekovatelné pouze jako fenotypové znaky.

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

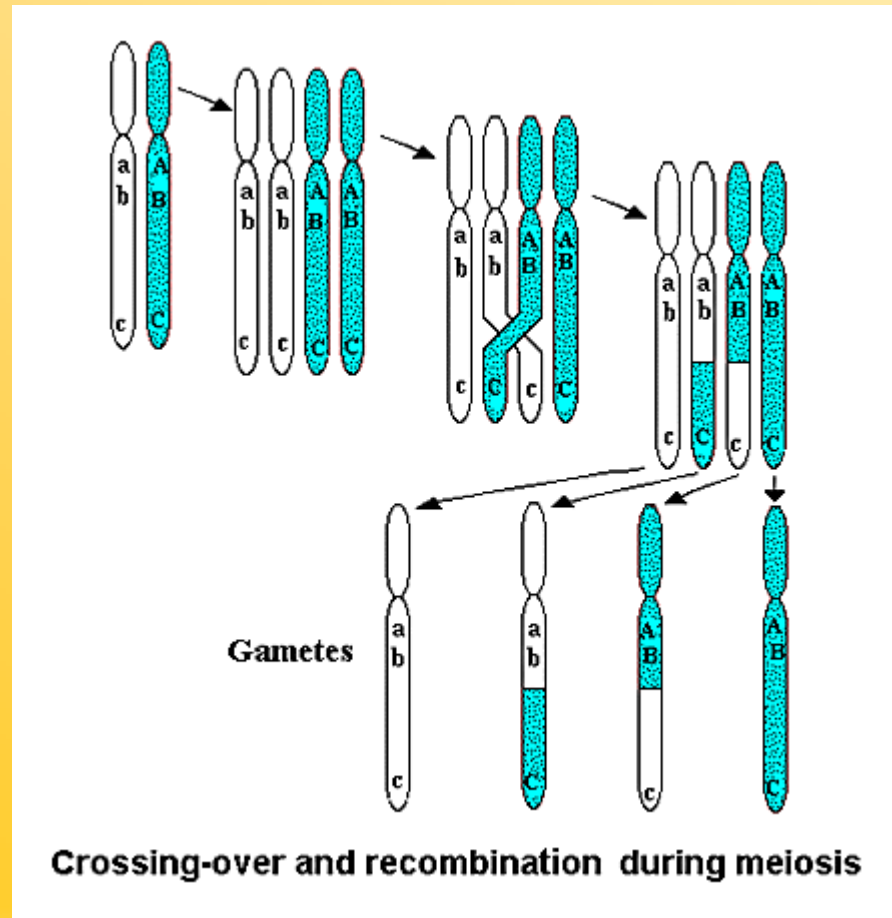
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Schéma genetické rekombinace

- založeno na rekombinaci mezi polymorfními lokusy v meiotické profázi.

Model dvojitého zlomu



Investice do rozvoje vzdělávání

Jednotka genetických map – 1cM - odpovídá 1% výskytu rekombinací (mezi 2 znaky, markery) v potomstvu.

Nekoresponduje s fyzickými vzdálenostmi (u centromery rekombinace potlačeny – pozitivní interference)

1 cM = 1000 kb u člověka (euchromatin autozomů)

500 kb u drozofily

300 kb – u rostlin na koncích chromozomů

až několik Mb – u rostlin v blízkosti centromery

Statistické zpracování získaných dat

– programy **JoinMap**, **MAPMAKER**

Investice do rozvoje vzdělávání



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

GENETICKÉ MARKERY

Genet. marker – fenotypový znak, protein, gen nebo sekvence DNA

a) fenotypové – různý fenotypový projev alel genů (tvar semen, barva očí)

b) biochemické – izoenzymy

c) DNA markery – polymorfismus nukleotidových sekvencí

Požadavky na genetické markery:

- jednoduchost použití
- finanční nenáročnost
- vysoká četnost výskytu
- vysoký polymorfismus
- reprodukovatelnost
- možnost automatizovat proces analýzy („high-throughput“)

Investice do rozvoje vzdělávání

GENETICKÉ DNA MARKERY

Nejčastěji používané DNA markery:

1. založené na hybridizaci

- **RFLP** (restriction fragment length polymorphism)
- DArT (diversity arrays technology)

2. založené na PCR

- SCAR (sequence-characterized amplified region)
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)
- RAPD (random amplified polymorphic DNA)
- markery odvozené z repetitivních sekvencí:
 - **SSR** (simple sequence repeat)
 - ISSR (inter-simple sequence repeat)
 - REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism)
 - IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism)
 - ISBP (insertion-site based polymorphism)
- **AFLP** (amplified fragment length polymorphism)

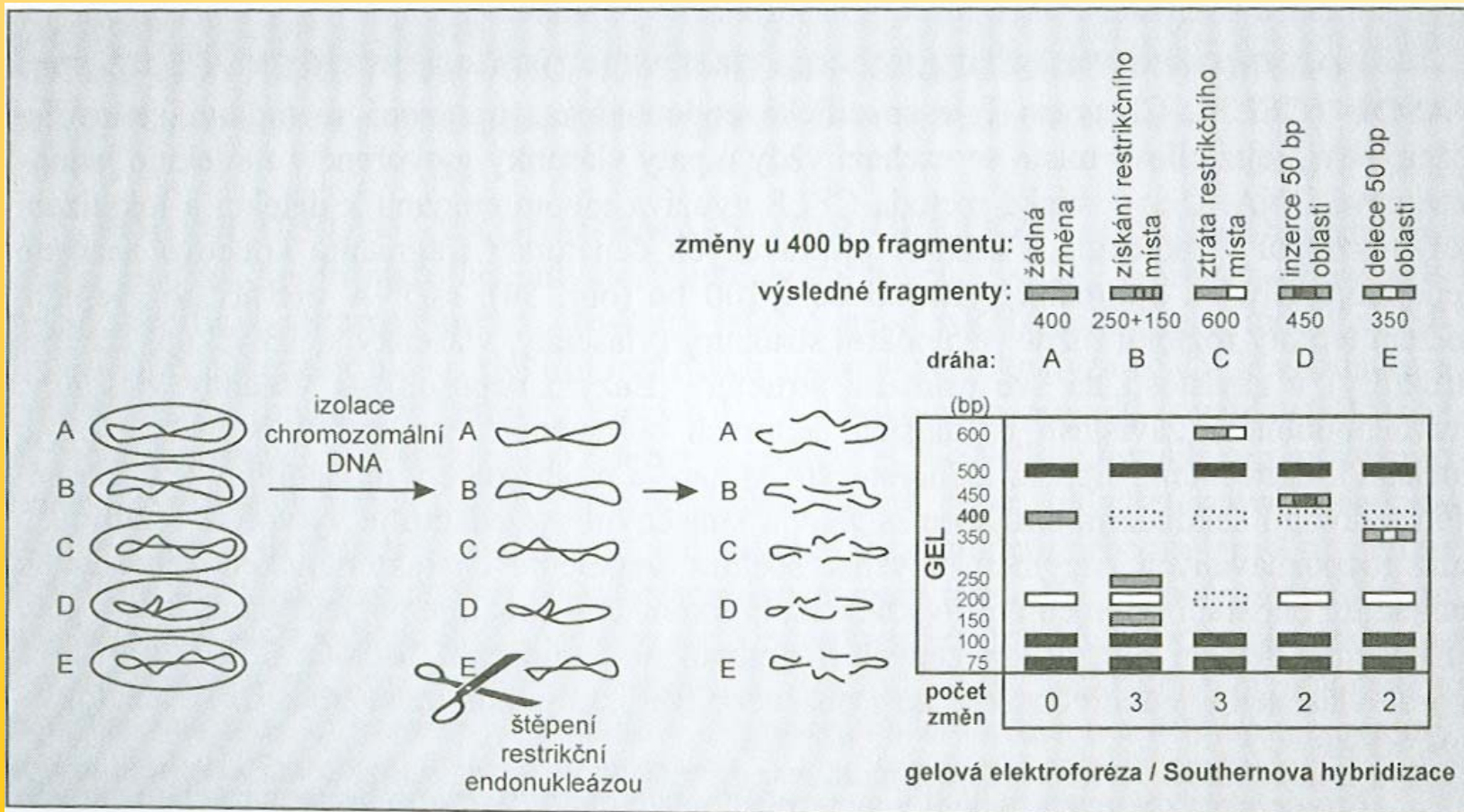
3. založené na sekvenování

- **SNP** (single nucleotide polymorphism)

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

RFLP (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)

Investice do rozvoje vzdělávání



Obr. 33 Analýza polymorfismů délek restrikčních fragmentů chromozomové DNA



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

RFLP markery

- založeny na získání nebo ztrátě specifického restrikčního místa v rámci určitého úseku DNA, případně inzerci/deleci
- jsou bialelické, kodominantní

Sonda pro RFLP: fragment genomické DNA
cDNA
EST

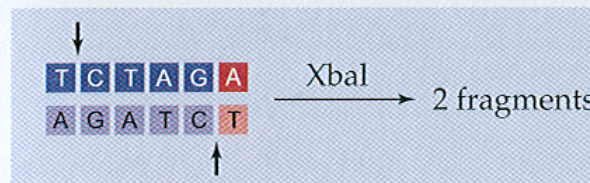
- ☺ spolehlivé, reprodukovatelné, lze identifikovat změnu konkrétního lokusu, kodominantní
- ☹ pracné, časově náročné, vyžaduje hodně DNA (kvalitní)

Proto jsou převáděny na markery na bázi PCR ⇒

Investice do rozvoje vzdělávání

⇒ **markery CAPS** (štěpené amplifikované polymorfni sekvence) – kombinace PCR pro analyzovanou sekvenci a RFLP této sekvence (**PCR-RFLP**)

```
TTTTGATTTTTCAGCAGAATTTGCGGGAAACGATTCGAGTCCCAATTTTA  
AATCTCAATTTTGC AAAAGGATTCTCAAATATCAGTATTA AAAACGAAA  
CTTTCTGAAGTGGAAGAAAATTTGAAAAACGTAGTCAAGATTATTACGA  
GATGAAAGCTGAAAAGGAATGTTAGAGAAGAGAGTTGAAAACCAAAG  
TATCAAGTCATGAAATGGATAGTCTTCAAGAATTGAAATTAGCCAGGTAA  
TTATATTAACATCTTGACGTGTTGTTTTGCATTTAATTCAAGTTTTCTAG  
[A/G]CAAAAAGCACAAGATCAAAAAGAGAAAGCAGTGGAGGAGTGTAAC  
ATGCATAAGAGAAAATA GTTGGTTTGGAAGAAGAAATTCGTGCGATGGT  
CGAACAGTTGAGGCTGGCAAAGTTCAATCTGAATGAGAACAAAAAGAAT  
TTGATGAGTACAAGAACAAGGCGCAGAAAATTTGACAGCTAAAGAGAAA  
CTGGTGGAGTCGCTGAAAGTCAGAGGTTTTGAGAGATTTGACCGAGGATTGA  
TATTA AATTCAATTCA GCAAGGAATCGGATCCA GTGATCGTCTCTGTTCA
```



Gibson a Muse, 2004



Investice do rozvoje vzdělávání

⇒ **markery SCAR** (amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí) – sekvenováním konců RFLP markeru a odvozením primerů. Polymorfismus přímo v amplifikovaném úseku nebo po jeho štěpení restriční endonukleázou.

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

DArT (diversity arrays technology)

- paralelní reverzní RFLP – umožňuje detekovat variabilitu genomu v tisícovkách lokusů genomu současně. Vhodné pro *genotyping* (charakterizaci genotypu), studium diverzity druhu, konstrukci genetických map.

A) Vytvoření mapovací platformy (*microarraye*) pro daný druh

1) *Redukce genomu* = vytvoření genomových „reprezentací“

- štěpení dvěma restričními endonukleázami – 1. často štěpící

(*Bst*NI)

- 2. vzácně štěpící

(*Pst*I)

- ligace adaptéru jen k *Pst*I místům

- amplifikace z primerů komplementárních k *Pst*I adaptérům

→ vzniknou 2 typy fragmentů – konstantní – u všech jedinců daného druhu

- variabilní (polymorfní) – jen u

některých jedinců = **DArT markery**

2) *Tvorba knihovny* – smícháním „reprezentací“ z mnoha různých jedinců daného druhu (např. odrůd) a jejich zaklonováním do vektoru → vneseno do *E. coli*

3) *Tvorba arraye* – jednotlivé klony z knihovny nanášeny robotem na mikroskopické sklíčko – vytvořena *microarray* pro daný druh

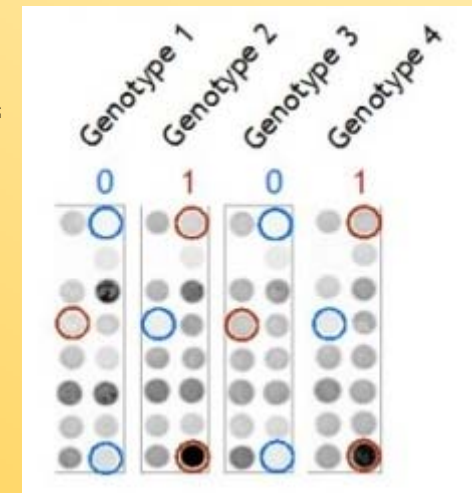
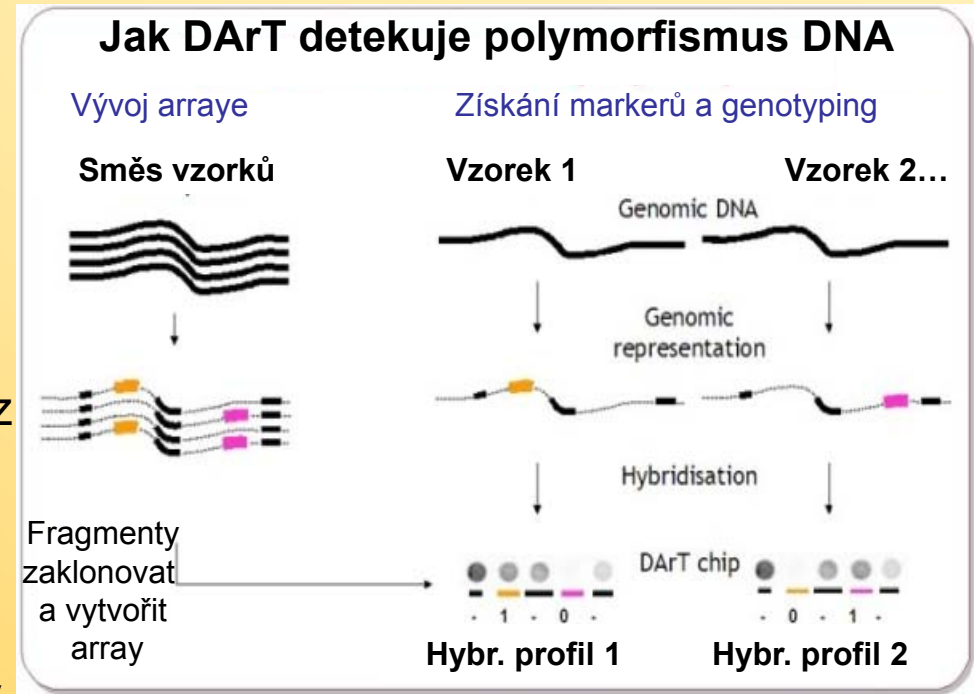
- nejprve „objevná“ *array*
- pak *array* obohacená o polymorfismy (přeskládáním klonů)

B) Analýza genotypu

- z DNA studovaného jedince vytvořena „reprezentace“
- označena fluorescenční barvičkou
- hybridizována na *microarray*
- oskenováno, statisticky vyhodnoceno
- každý jedinec – specifický hybridizační profil

Můžou být převedeny na markery SCAR.

☺ Většinou unikátní sekvence, často odvozené z genů.



www.diversityarrays.com

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

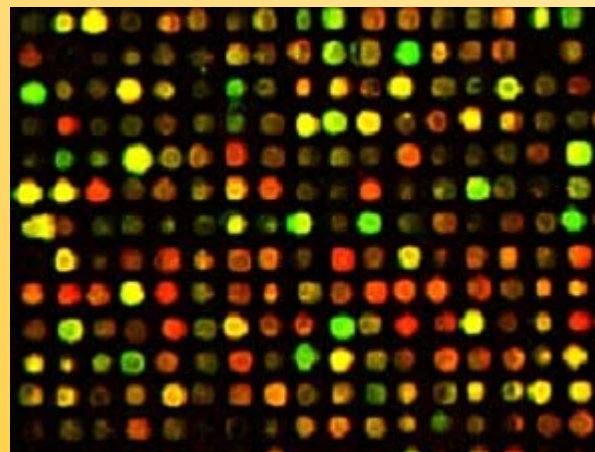
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

SFP (polymorfismus v jednom znaku)

- využívají arraye vytvořené pro analýzu exprese
- na mikroskopickém sklíčku naneseny desítky až stovky tisíc krátkých sond o stejné délce, odvozených z genů
- po hybridizaci s genomickou DNA analyzovaných jedinců (např. rodičů nebo jedinců z mapovací populace) detekovány rozdíly v hybridizaci = **single feature polymorphisms = SFP markery**

- ☹️ problematické u polyploidů
 - obtížné rozlišit geny z homeologních genomů, dominantní markery



RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfní DNA)

Vyvinuty pro genetické mapování a fingerprinting (charakterizaci odrůd).

Primer – 1 náhodný oligonukleotid (10bp)

- 😊 jednoduché, k syntéze primerů není zapotřebí sekvenční informace
- 😞 špatně reprodukovatelné, dominantní

Polymorfní proužky můžou být osekvenovány a převedeny na markery SCAR.

SSR (opakování jednoduchých sekvencí, mikrosatelity)

Využití:

- Pro DNA fingerprinting, genetické mapování, MAS, studie genetické diverzity, populační studie
Krátké repetice (jednotka 1-6 bp) – zejména mezi geny a v nekódujících oblastech.

Detekce:

- primery a) neznačené
b) značeny fluorescenčně

Vizualizace:

a) Elektroforéza – agaróza (více než 3%)
- PAGE – denaturující
- nedenaturující
b) Pomocí sekvenátoru – umožňuje
„multiplexing“

- ☺ četný výskyt, vysoce polymorfní, kodominantní, rozlišují více alel, reprodukovatelné, „high-throughput“
- ☹ obtížné vyhodnocování (hodně proužků)

ISSR (inter-simple sequence repeats)

- primery komplementární k mikrosatelitu + několik sousedních nukleotidů na ukotvení. Amplifikuje se úsek mezi mikrosatelity.
- nevyžaduje znalost sekvence
Využití: pro analýzu genetické diverzity, fingerprinting, genetické mapování

😊 rychlé, můžeme rozlišovat mezi příbuznými jednotlivci, nízké náklady, „high-throughput“

😞 dominantní, hůře reprodukovatelné, pro některé primery slabé výnosy

REMAP (amplifikovaný polymorfismus mikrosatelit-retrotranspozón)

Jeden primer odvozen z konzervované oblasti (LTR) retrotranspozónu, druhý z mikrosatelitu.

Analýza na vysokohustotním agarózovém gelu nebo PAGE.

Dominantní.

Polymorfní proužky mohou být převedeny na markery SCAR.

Ke studiím genetické diverzity i mapování.

Investice do rozvoje vzdělávání

IRAP (amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozóny)

A) Dva různé primery z oblasti LTR

B) Jediný primer z oblasti LTR

Polymorfnní proužky mohou být převedeny na markery SCAR.

Investice do rozvoje vzdělávání

ISBP (polymorfismus založený na místě inserce) RJM (repeat-junction markers - markery ze styčných bodů repetice)

- vychází z toho, že transponovatelné elementy se vkládají do sebe. Na základě analýzy náhodných sekvencí (obvykle BES) lze najít místa přechodů mezi jednotlivými transponovatelnými elementy. Na ně se navrhnou primery. Program **IsbpFinder**.

- ☺ Obvykle unikátní markery v rámci celého genomu, reprodukovatelné, vyšší četnost výskytu.
- ☹ Většinou dominantní, nemusí být polymorfní → uplatňují se hlavně jako fyzické markery.

AFLP (polymorfismus amplifikovaných fragmentů)

Použití:

- vhodné pro saturační mapování (zahušťování map), mapování QTL a rozlišení odrůd
- nevhodné pro genotyping (charakterizaci genotypu) a MAS (jsou dominantní)

EcoRI – vzácněji štěpící

MseI – často štěpící

Detekce:

primer pro selektivní amplifikaci (komplementární k *EcoRI* adaptéru) značen radioaktivně

Vizualizace:

Elektroforéza - PAGE – denaturující
Expozice z gelu na rentgenový film.

- ☺ reprodukovatelné, vysoké rozlišení, časově nenáročné, nevyžaduje znalost sekvence
- ☹ dominantní, práce s radioaktivitou

fAFLP (fluorescenční AFLP)

Selektivní primer značen fluorescenčně.

Detekce: sekvenátor – umožňuje automatizaci a „multiplexing“

Polymorfní proužky můžou být osekvenovány a převedeny na markery SCAR.

Investice do rozvoje vzdělávání

Srovnání nejpoužívanějších markerových systémů

Marker	Založ. na PCR	Četnost	Dominance	Reprodukovatelnost	Automatizace	Vývoj	Pracnost použití
RFLP	Ne	Střední	Kodominantní	Vysoká	Nízká	Střední	Vysoká
RAPD	Ano	Vysoká	Dominantní	Nízká	Střední	Snadný	Nízká
SCAR	Ano	Vysoká	Ko/dominantní	Vysoká	Střední	Pracný	Střední
CAPS	Ano	Střední	Kodominantní	Vysoká	Střední	Střední	Střední
AFLP	Ano	Vysoká	Dominantní	Střední	Stř./vysoká	Střední	Střední
SSR	Ano	Vysoká	Kodominantní	Vysoká	Stř./vysoká	Pracný	Nízká
ISSR, IRAP REMAP	Ano	Vysoká	Dominantní	Střední	Stř./vysoká	Snadný	Nízká
ISBP	Ano	Vysoká	Dominantní	Vysoká	Stř./vysoká	Pracný	Nízká
DArT, SFP	Ne	Vysoká	Dominantní	Střední	Vysoká	Střední	Nízká
SNP	Ne	Extrém. vysoká	Ko/dominantní	Vysoká	Vysoká	Střední/ snadný	Nízká

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