

# 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.*

# Poziční klonování

Ing. Hana Šimková, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



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

# Cíl přednášky

- seznámení s metodou pozičního klonování genů pro kvalitativní znaky

# Klíčová slova

- poziční klonování, kolinearita, *bulked segregant analysis*, *chromosome walking*, *chromosome jumping*

Investice do rozvoje vzdělávání



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

## POZIČNÍ KLONOVÁNÍ

*(positional cloning, map-based cloning)*

- izolace genu pouze na základě znalosti jeho pozice na mapě (fyzické, genetické)
- nemusí být známa funkce genu (mechanismus působení, biochemická podstata produktu)

Investice do rozvoje vzdělávání

## Postup pro monogenní znaky

### A) Fáze genetická

- 1) Najít výrazný a spolehlivý fenotyp pro gen, který hledáme (obvykle mutantní alela)
- 2) Určit způsob dědičnosti – např. monogenní recesivní
- 3) Zkřížit linii s mutantním fenotypem s linií kontrastní (*wild-type*=WT) – odvodit mapovací populaci – pro hrubou analýzu F2 (200-300 jedinců), pro dominantní fenotyp potvrdit v F3 homozygotnost
- 4) Vyhodnotit vazbu dostupných markerů na mutantní fenotyp
- 5) Určit polohu genu na genetické mapě vzhledem k okolním markerům
- 6) Získat nové markery – např. z analýzy skupin segregantů (BSA - **bulk segregant analysis**) nebo z databází příbuzných organismů (**kolinearita**)

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

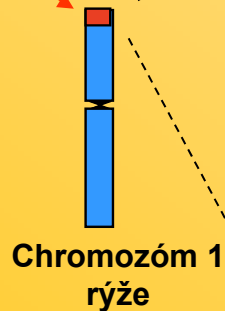
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

# V oblasti genu *Sr2* existuje kolinearita (konzervované uspořádání genů) mezi genomem pšenice a rýže

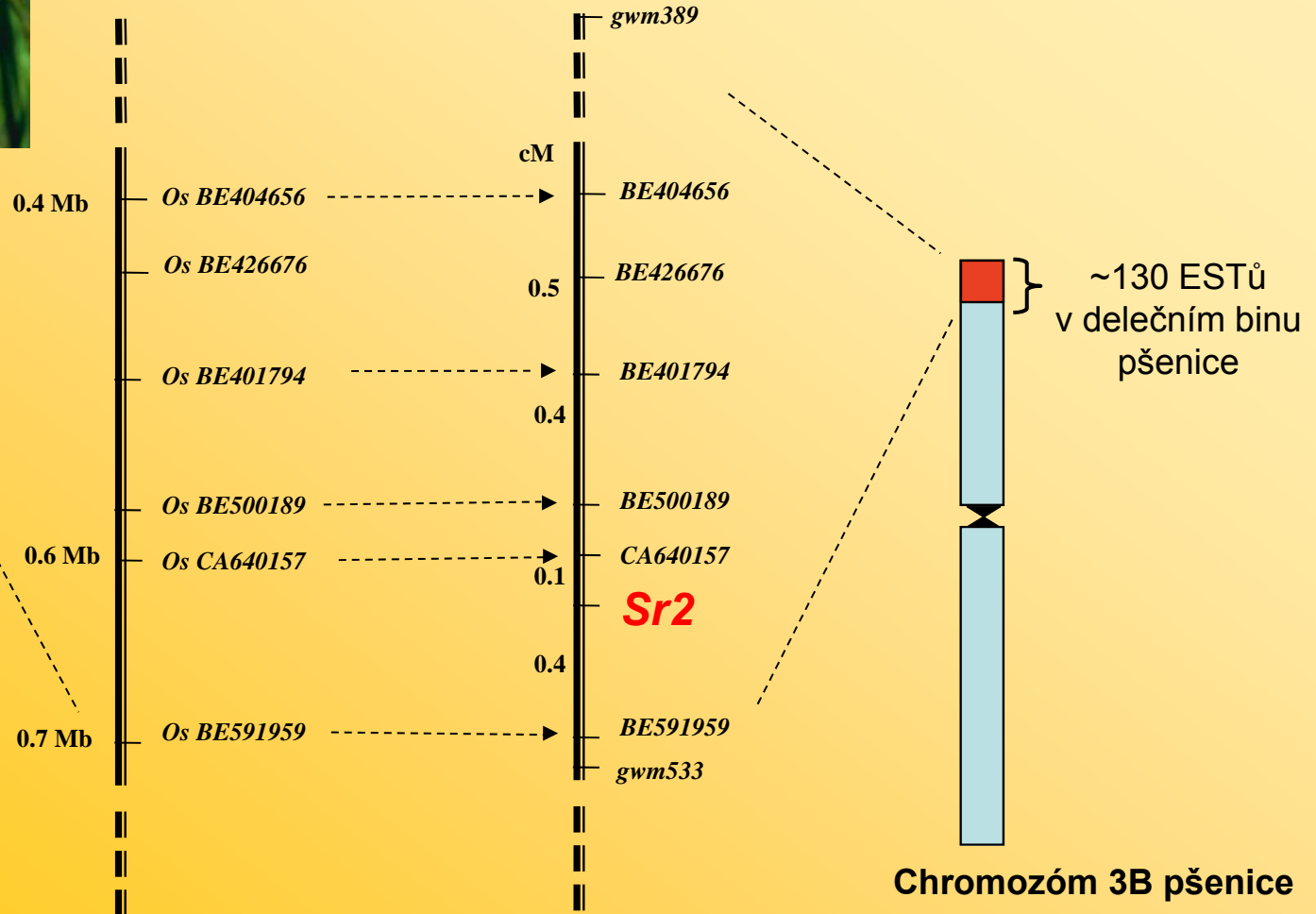
→ použití markerů z rýže k zahuštění genetické mapy pšenice



Kolineární (orthologní) oblast v genomu rýže



Investice do rozvoje vzdělávání



## Genetická mapa pšenice

Chinese Spring x CS/Hope 3B

Spielmeyer et al. 2007

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



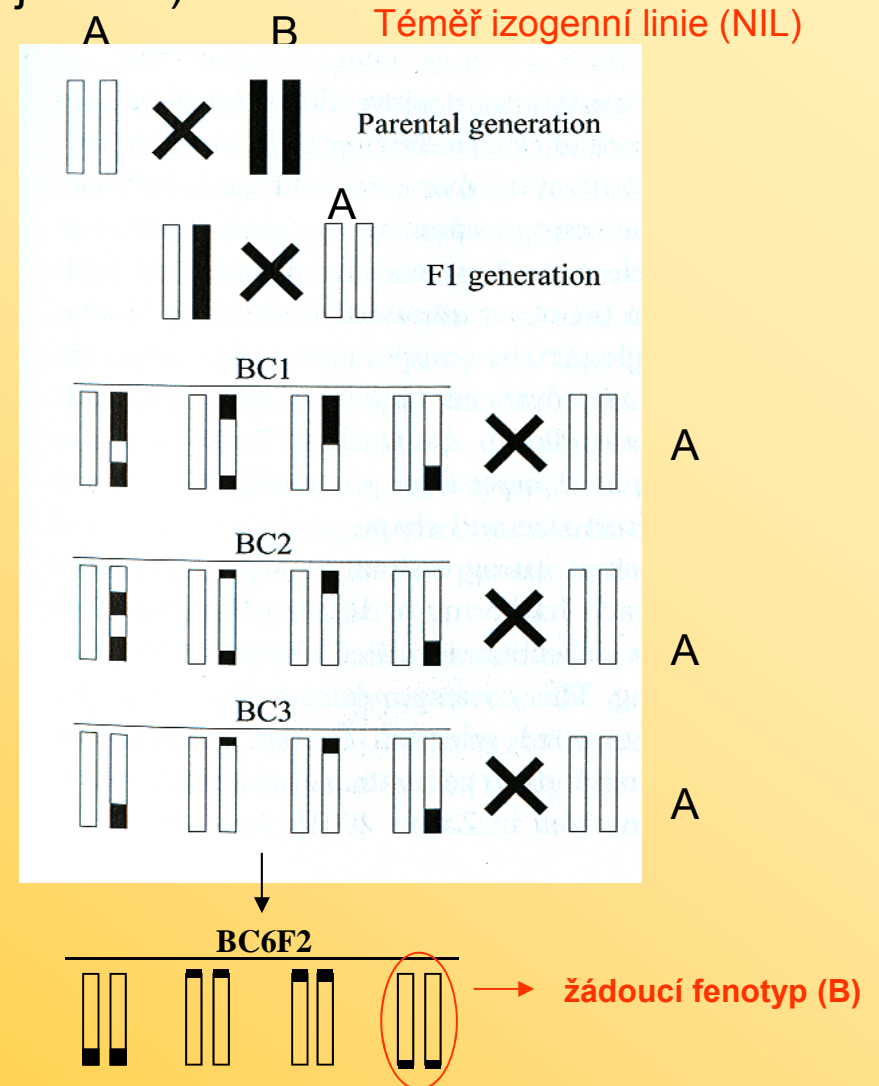
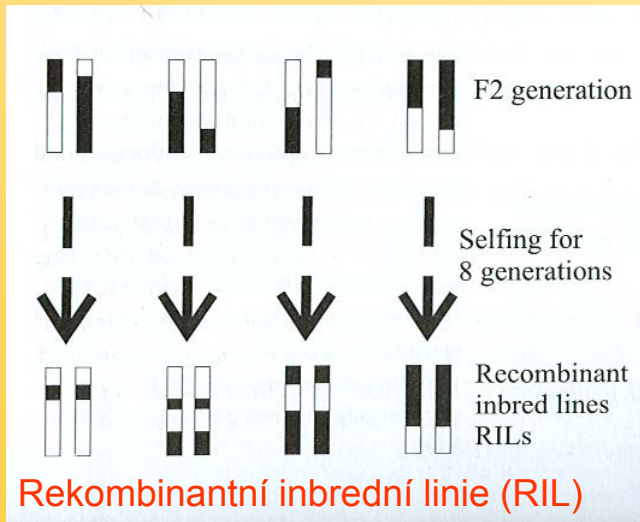
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

7) Pro zjištění těsnější vazby odvodit pokročilejší mapovací populace,  
např. RIL nebo NIL (několik tisíc jedinců)



8) Najít markery v co nejtěsnější vazbě – optimálně pod 0,5 cM - z obou stran genu

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

Investice do rozvoje vzdělávání



## B) Fáze genomická

- 1) Selektovat BAC klon(y) nesoucí markery v těsné vazbě: skrínig na základě
  - PCR na poolech vytvořených z knihovny
  - hybridizace na membránách s nanesenými replikami knihoven

Pokud je k dispozici fyzická mapa, lze při malé genetické vzdálenosti přímo sestavit lokální kontig, který propojuje markery obklopující gen z obou stran. Pokud ne, musíme →

- 2) Získat koncovou sekvenci vybraných BAC klonů (BES)
- 3) Najít polymorfismus (genetický marker) v rámci této sekvence a zjistit těsnost jeho vazby s genem na základě analýzy v mapovací populaci
- 4) Vybrat BAC klon nejvíce se přibližující hledanému genu
- 5) Provést skrínig knihovny koncovou sekvencí prvního BAC klonu → nalezení sousedního BAC klonu
- 6) Sestavit lokální kontig (metoda „*chromosome walking*“, případně „*chromosome jumping*“)

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.*

# Chromosome walking (procházení po chromozómu)

- obvykle od markeru ve vazbě na gen ke genu, nebo od jednoho obklopujícího markeru ke druhému

Postup:

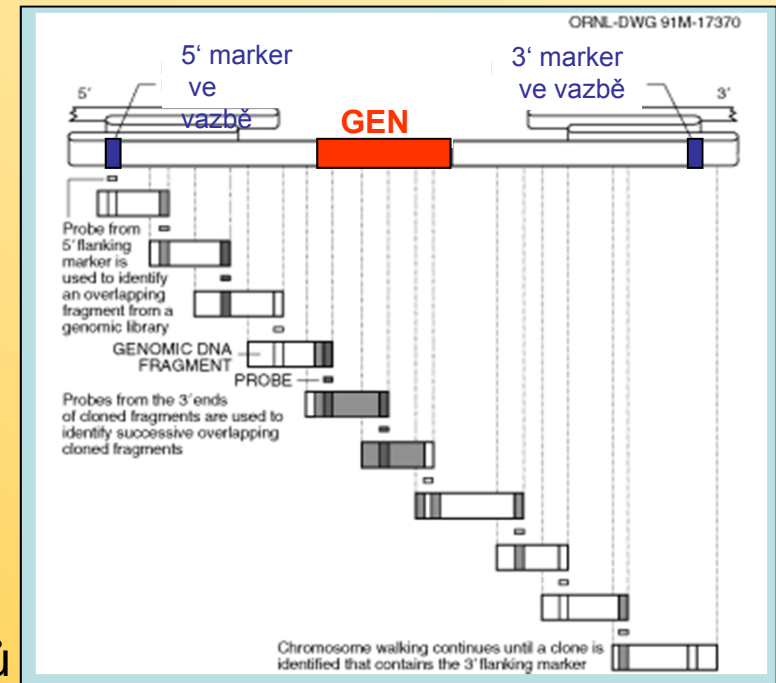
1. Skríníng knihovny markerem (hybridizace, PCR)
  - výběr klonu (obvykle několik)
2. Odvození sondy (markeru) z konce vybraného klonu (nejvzdálenějšího)

Skríníng knihovny  
Odvození sondy (markeru)

atd.

až ke genu nebo druhému obklopujícímu markeru

Důležité odvozování genetických markerů ze získaných BAC klonů – vyhodnocuje se síla vazby, ověřuje orientace kontigu. Problém – repetitivní DNA (sondy z BAC konců musí být jednokopiové)



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.*

## Chromosome jumping (přeskakování po chromozómu)

- k překlenutí větších úseků DNA, případně mezer v kontigu (až 100 kb)

- A) Příprava speciální knihovny pro *jumping* – obsahuje přeskakovací klony - nesou nesousedící sekvence ze vzdálených oblastí genomu
1. parciální štěpení – pomocí PFGE selekce fragmentů 50 - 200 kb
  2. spojení konců ligázou – původně vzdálené konce k sobě
  3. štěpení 2. restriktázou
  4. selekce fragmentu nesoucího spoj – zaklonování do fága  $\lambda$  → knihovna pro *jumping*

B) *Jumping*

1. odvození sondy z počátečního úseku
2. skrínig knihovny pro *jumping* – selekce klonu
3. odvození sondy z 2. konce tohoto klonu – použije se
  - pro *walking*
  - pro další *jumping*

Investice do rozvoje vzdělávání

- 7) Vytipovat a osekvenovat kandidátní BAC klon (*shotgun* sekvenování)
- 8) Vytipovat kandidátní geny na základě sekvence
- 9) Osekvenovat (přesné sekvenování) kandidátní geny pro mutantní a *wild-type* alely → nalézt polymorfismy (SNP)
- 10) Otestovat primer specifický pro mutantní alelu na kosegregaci s mutantním lokusem, případně zjistit vliv SNP na změnu struktury proteinu
- 11) Potvrdit gen – vnesením kandidátní sekvence (dominantní alela) do mutantního nebo *wild-type* pozadí, nesoucího recesivní alelu genu, případně vyřazením genu z funkce cílenou mutagenezí
- 12) Charakterizovat kandidátní gen z hlediska regulace a funkce