

Molekulární genetiky zvířat 3
Antonín Stratil

Česká zemědělská univerzita v Praze

Osnova

1. Genetický polymorfismus

- obecně
- polymorfismus DNA
 - molekulární podstata
 - molekulární důsledky mutací
 - využití polymorfismu DNA
 - vybrané metody studia
 - ověřování původu

2. Mapování genomů hospodářských zvířat

- cíle analýzy genomů
- východiska
- genetické mapování (vazbové)
- cytogenetické mapování (chromozómové)
- mapování pomocí somatického hybridního panelu
- mapování pomocí radiačního hybridního panelu
- komparativní (srovnávací)
- určení úplné sekvence (s polohou všech genů a markerů)
- využití genomových map

Cíle studia genomů hospodářských zvířat

- **poznání organizace genomu a pochopení funkce genů ovlivňujících užitkovost a zdraví**
- **zlepšení šlechtitelské práce využitím MAS (marker assisted selection)**
- **izolace významných genů (konstrukce transgenních zvířat)**
- **poznání evolučních vztahů mezi genomy zvířat a člověka**
- **studium animálních modelů lidských chorob**

Analýza genomu

Odhalování variability DNA a celková analýza genomů zvířat zahrnuje:

- a) identifikaci genetických markerů
- b) konstrukci genetických map
- c) konstrukci map QTL
- d) lokalizaci a popis genů podílejících se na projevu užitkových vlastností
- e) určení úplné sekvence DNA genomů

Cíl: Využití v selekci podporované markery (MAS) a genomické selekci

Molekulární podstata polymorfismu DNA

- **bodové mutace (záměna jedné báze; SNP – single nucleotide polymorphism; dvě kategorie:**
tranzice – transition = záměna purin za purin, nebo pyrimidin za pyrimidin; tj. A→G, G→A, C→T nebo T→C; transverze – transversion: záměna purinu pyrimidinem nebo pyrimidinu purinem,
tj. A→C, A→T, G→C, G→T, C→A, C→G, T→A nebo T→G)
- **záměna několika bází**
- **inzerce**
- **delece**
- **inzerce/delece (indel)**
- **translokace (přemístění segmentu DNA do jiného místa)**
- **inverze (obrácení segmentu DNA)**

Repetitivní polymorfismus

- **minisatelity (VNTR – variable number of tandem repeats; 10-100 bází; DNA se rozštěpí restriční enzymem, fragmenty se separují elektroforézou v agarózovém gelu a provede se hybridizace s minisatelitovou sondou - fingerprint)**
- **mikrosatelity (STR – short tandem repeats; tandemová opakování, nejčastěji 1, 2, 3, 4 nebo 5 nukleotidů, např. T, AC, GGC, ATTT, ACCGG; původ mikrosatelitů – prokluzování při replikaci – replication slippage, tj. DNA templát a jeho kopie posunutím změny své relativní polohy, takže část templátu je buď kopírována dvakrát, nebo vynechána)**

Molekulární důsledky mutací

1. 1. *V kódujících sekvencích:*

Bodové mutace:

- * substituce báze ve funkčním tripletu na stop kodon (nonsense mutation; TAT – tyrosin; TAA – stop; důsledek – předčasné ukončení translace)
- * mutace způsobující záměnu aminokyseliny (missense mutation; CAT – histidin; CAA – glutamin)
- * mutace, která nemění aminokyselinu (synonymní; silent; CAT – histidin; CAC – histidin)(degenerovaný genetický kód – více než jeden kodon pro většinu aminokyselin)
 - * mutace několika sousedních bází (většinou dochází k záměně aminokyseliny)

Inzerce nebo delece:

- * tři báze nebo násobek tří – vložení nebo vynechání jedné nebo více aminokyselin v polypeptidovém řetězci
- * jiný počet než násobek tří bází – posun fáze translace (frameshift mutation)
- Chromozómové aberace (translokace; inverze) – významné změny proteinu

2. 2. *V regulačních sekvencích, zesilovačích a zeslabovačích:*

- * ovlivnění funkce genu, a v důsledku, syntetizovaného proteinu, podle toho, jak změna v sekvenci postihla funkci dané oblasti (od žádného dopadu až po absenci proteinu)

3. 3. *V ostatních nekódujících a anonymních sekvencích:*

- * ve většině případů nemá funkční dopad

Některé příklady následků variability v DNA sekvenci genů

Splice donor variant: A splice variant that changes the 2 base region (GT) at the 5' end of an intron

Splice acceptor variant: A splice variant that changes the 2 base region (AG) at the 3' end of an intron

Stop gained: A sequence variant whereby at least one base of a codon is changed, resulting in a premature stop codon, leading to a shortened transcript

Frameshift variant: A sequence variant which causes a disruption of the translational reading frame, because the number of nucleotides inserted or deleted is not a multiple of three

Stop lost: A sequence variant where at least one base of the terminator codon (stop) is changed, resulting in an elongated transcript

Initiator codon variant: A codon variant that changes at least one base of the first codon of a transcript

Inframe insertion: An inframe non synonymous variant that inserts bases into in the coding sequence

Inframe deletion: An inframe non synonymous variant that deletes bases from the coding sequence

Missense variant: A sequence variant, that changes one or more bases, resulting in a different amino acid sequence but where the length is preserved

Synonymous variant: A sequence variant where there is no resulting change to the encoded amino acid

Stop retained variant: A sequence variant where at least one base in the terminator codon is changed, but the terminator remains

Intron variant: A transcript variant occurring within an intron

(Uvedeno 12 typů variability z celkového počtu 25) (<http://www.ensembl.org/>)

Využití polymorfismu DNA

- ověřování původů (kontrola rodičovství)
- mapování genomů (genetické, vazbové mapy)
- mapování QTL (lokusů pro kvantitativní znaky)
- poznání chemické struktury proteinů
- identifikace doposud neznámých proteinů
- identifikace alelických variant zodpovědných za poruchy metabolismu (genetické choroby)
- identifikace alel příznivě ovlivňujících užitkové vlastnosti
- odhalování funkčních rozdílů mezi produkty různých alel
- fylogenetické analýzy
 - zjištění genetické struktury plemen nebo linií hospodářských zvířat
 - zjištění genetické vzdálenosti mezi plemeny nebo liniemi hospodářských zvířat
 - studium genetické diverzity

Nejpoužívanější metody

v molekulární genetice zvířat

- a) *Separační metody (Elfo)*
- b) *Denaturace a hybridizace*
- c) *RFLP*
- d) *PCR*
- e) *Detekce mikrosatelitů*
- f) *Sekvenování*
- g) *PCR-RFLP*
- h) *SSCP*
- i) *DGGE*
- j) *AFLP*
- k) *RAPD*
- l) *Pyrosekvenování*
- m) *PCR v reálném čase
(real-time PCR)*
- n) *DNA array (čipy)*

Markery pro mapování

- a) Markery typu I, tj. exprimované geny (komparativní, méně vazbové)
- b) Markery typu II, tj. vysoce variabilní sekvence DNA bez vlastního fenotypového projevu, nekódující sekvence (vazbové, ne komparativní)
- c) Markery typu III – SNP (jednonukleotidové polymorfizmy), vazbové

Ad a) RFLP: původní markery pro mapování lidského genomu, s PCR je testování snadné a jednoznačné, avšak mají malou hustotu v genomu

b) mikrosatelity: dnes nejvýznamnější markery pro vazbové mapování

c) SNP: vysoká hustota (cca každých 500-1000bp), malý polymorfismus (většinou jen bialelické), jednoduchá analýza, automatizace

d) STS (sequence tag site-místo s adresou sekvenční): jedinečná sekvence obvykle 200 – 400 bp, amplifikovatelná PCR.

např. mapování pomocí RH panelu a výběr BAC klonů při sekvenování.

Mikrosatelity

Mikrosatelity: krátké tandemové repetice složené z mono, di, tri nebo tetra nukleotidových motivů.

Vysoce polymorfní \Rightarrow různé alely. Jejich počet je relativně vysoký (5-20).

Např. $(GC)_n$ $n = 5-25$ opakování

5' ATCGGTATT **GCGCGCGCGCGCGCGCT** ACGTT 3' n=8

5' ATCGGTATT **GCGCGCGCGCT** ACGTT 3' n=5

5' ATCGGTATT **GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCT** ACGTT 3' n=11

$(AT)_6 (GT)_{16}$ $(TG)_{19} TA (TG)_4 (TA)_5$ $A_7 (TA)_7 TTTATAAACC (GT)_{14}$

Mikrosatelity-typy

Dinukleotidové repetice:

Výskyt každých 300-500 kb.

- a) pravidelné repetice bez přerušení (např. $(CA)_n$) (perfect)
- b) nepravidelné repetice (např. $(CA)_n CG(CA)_m$) (imperfect)
- c) přerušené repetice (např. $(CA)_n CCA (CA)_m$) (interrupted)
- d) složené repetice (např. $(CA)_n (TG)_m$) (composite)

$(AT)_6(GT)_{16}$

$(TG)_{19}TA(TG)_4(TA)_5$

$A_7(TA)_7TTTATAAACCC(GT)_{14}$

Tri- a tetranukleotidové repetice:

Výskyt každých 3 000-5 000 kb.

Nejrozšířenější - $(AAB)_n$, kde B = C, G nebo T.

U tetranukleotidových repetití převládá $(AAAB)_n$.

asociace s vmezeřenými repetitivními *Alu* elementy.

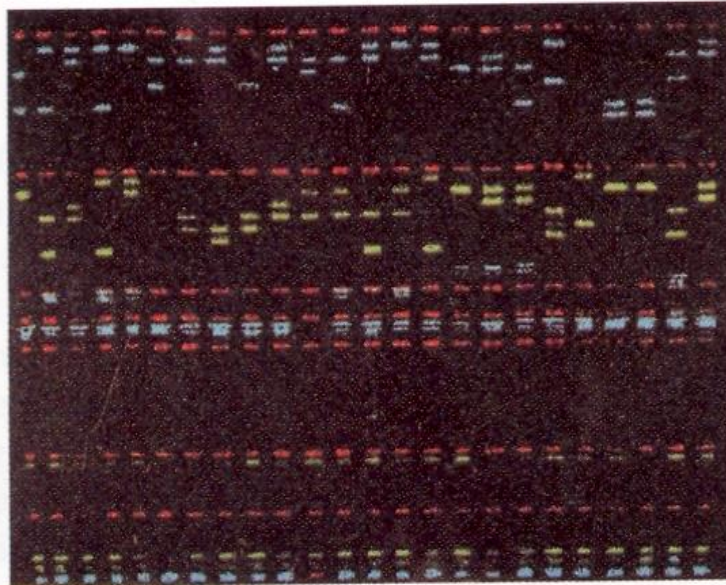


Figure 6.17 The use of microsatellite analysis in genetic profiling.

In this example, microsatellites located on the short arm of chromosome 6 have been amplified by PCR. The PCR products are labeled with a blue or green fluorescent marker and run in a polyacrylamide gel, each lane showing the genetic profile of a different individual. No two individuals have the same genetic profile because each person has a different set of microsatellite alleles, the alleles giving rise to bands of different sizes after PCR. The red bands are DNA size markers. Image supplied courtesy of PE Biosystems, Warrington, UK, and reproduced with permission.

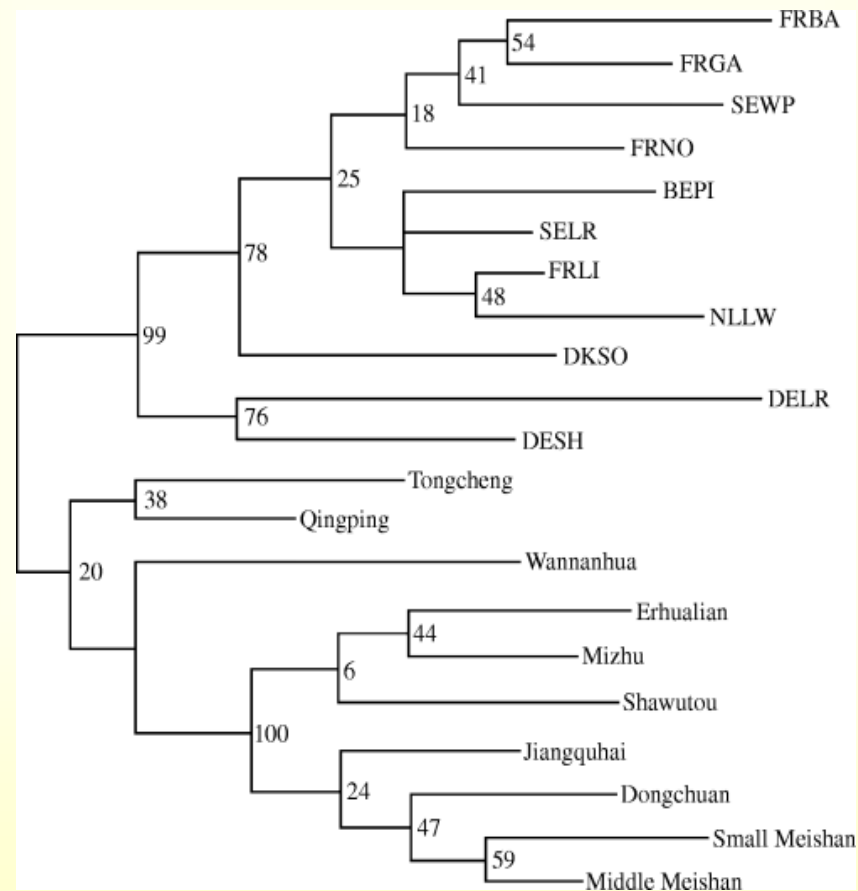
Frequencies of *Eco47III* and *SCZ001* alleles of *APOA2* gene in different breeds of pigs *

Breed	No. of animals	<i>Eco47III</i>		<i>SCZ001</i>															
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>321</i>	<i>325</i>	<i>329</i>	<i>349</i>	<i>354</i>	<i>359</i>	<i>370</i>	<i>378</i>	<i>382</i>	<i>390</i>	<i>394</i>	<i>396</i>	<i>419</i>	<i>424</i>	<i>432</i>	
Large White	14	0.93	0.07	0.11	0.64	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	
Landrace	12	0.58	0.42	0.04	0.46	0.00	0.38	0.04	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Pietrain	18	0.94	0.06	0.00	0.92	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Black Pied Prestice	7	1.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.07	0.14	0.00	0.00	0.14	0.00	
Czech Meat Pig	15	0.77	0.23	0.00	0.33	0.17	0.23	0.00	0.00	0.07	0.07	0.03	0.03	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	
Hampshire	5	1.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Duroc	5	1.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.40	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	
Meishan	12	1.00	0.00	0.00	0.21	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.04	

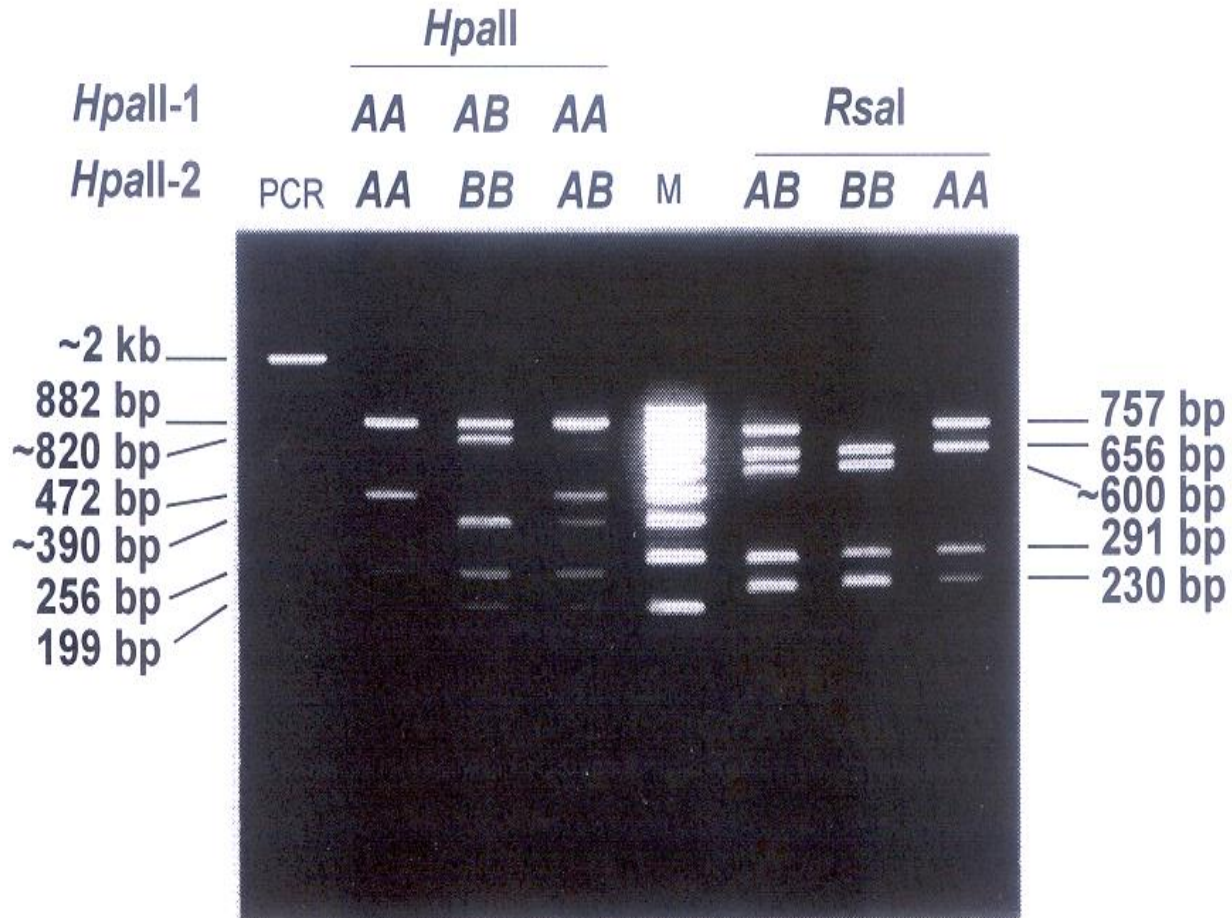
*Allele *Eco47III B* appears to cosegregate with *SCZ001* alleles *349* and *354* in our set of pigs.

Neighbour-joining phylogenetic tree

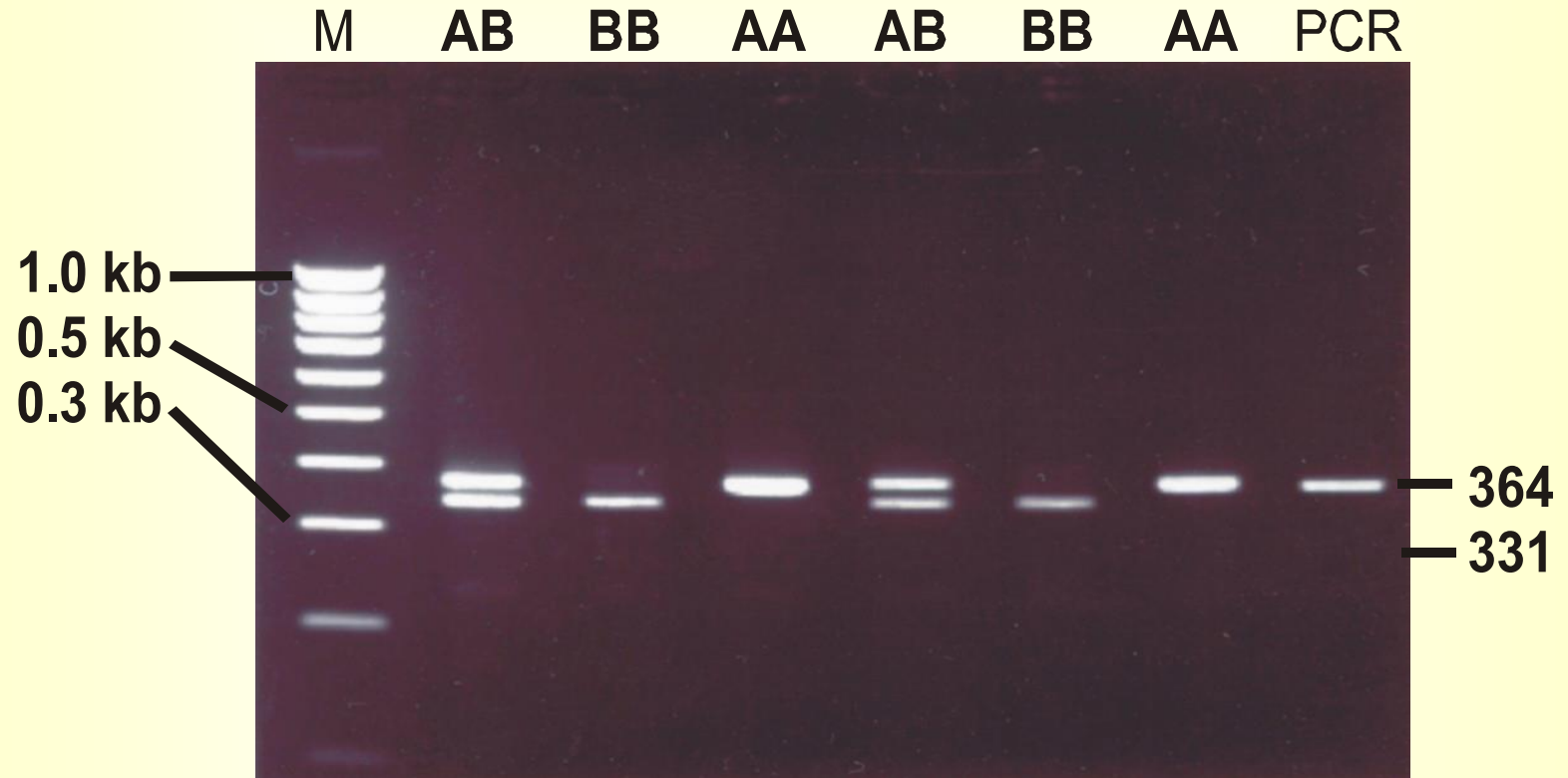
Figure 3 NJ tree showing the genetic divergence among European pigs and Chinese pig populations, using Nei's standard distance on the basis of allele frequencies from 18 microsatellites (referred from Laval *et al.* 2000). The number in the branch indicates the percentage occurrence in 1000 bootstrap replicates. Abbreviated breed codes are the followings, FRBA (France *Basque*), FRGA (France *Gascon*), FRNO (France *Normand* or *Blanc de l'Ouest*), FRLI (France *Limousin*), SEWP (Sweden *European Wild Pig*), SELR (Sweden *Swedish Landrace*), BEPI (Belgium *Piértrain*), NLLW (the Netherlands *Great Yorkshire*), DKSO (Denmark *Sortbroget*), DELR (Germany *German Landrace*), DESH (Germany *Schwäbisch-Hällisches*). (Fan *et al.*, *Animal Genetics* 33, 422-427, 2002)



Polymorfismus MYF 5 prasete



PCR-RFLP of *SKI* gene (restriction with *A/w*26I)



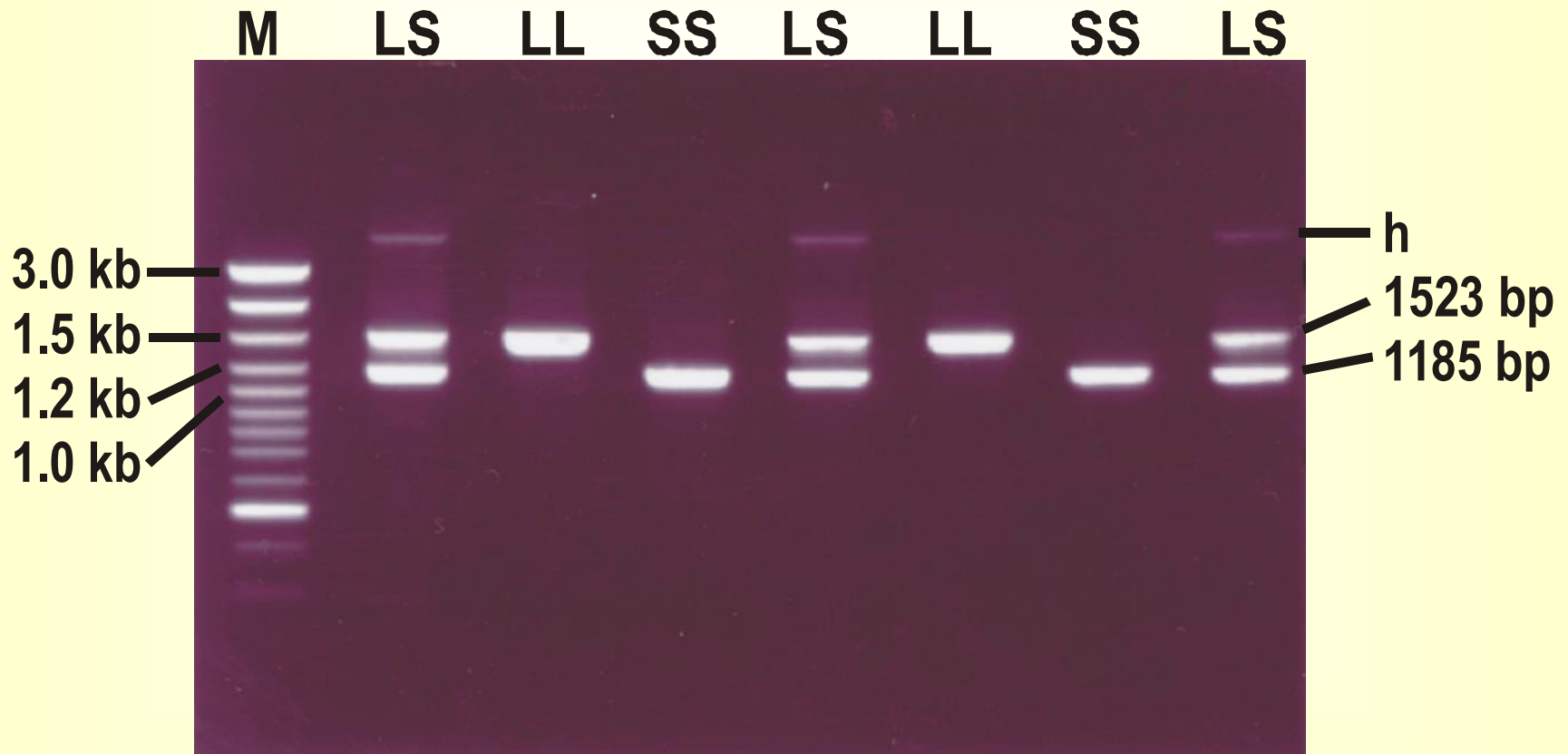
(position 304 – 305: Pietrain – TC; Meishan CG)

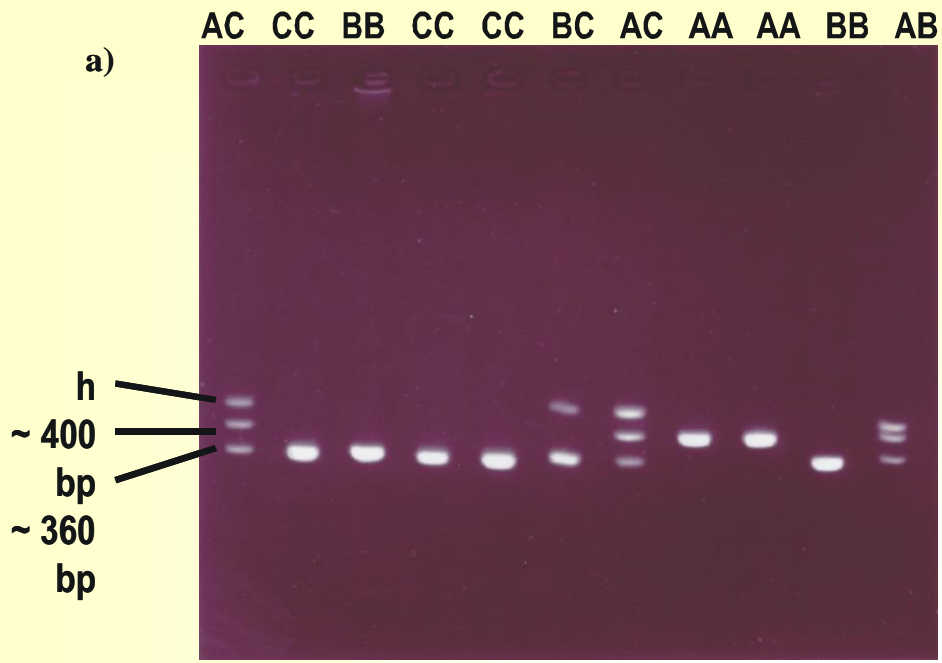
A comparison of amino acid sequences of the SKI fragments from Pietrain and Meishan pigs

```
Pietrain  CSRCTADQLEILKVMGILPFSAPSCGLITKTAERLCNALLYGGAYPPPCKQELAASLAL 60  
Meishan  CSRCTADQLEILKVMGILPFSAPSCGLITKTAERLCNALLYGGAYPPPCKQELAASLAL 60  
*****
```

```
Pietrain  GLERSERSVRVYHECFGKCKGLLVPELYSSPSAACIQCLDCSLLLYPP 107  
Meishan  GLERSERSVRVYHECFGKCKGLLVPELYSSPSAACIQCLDCRLLLYPP 107  
*****
```

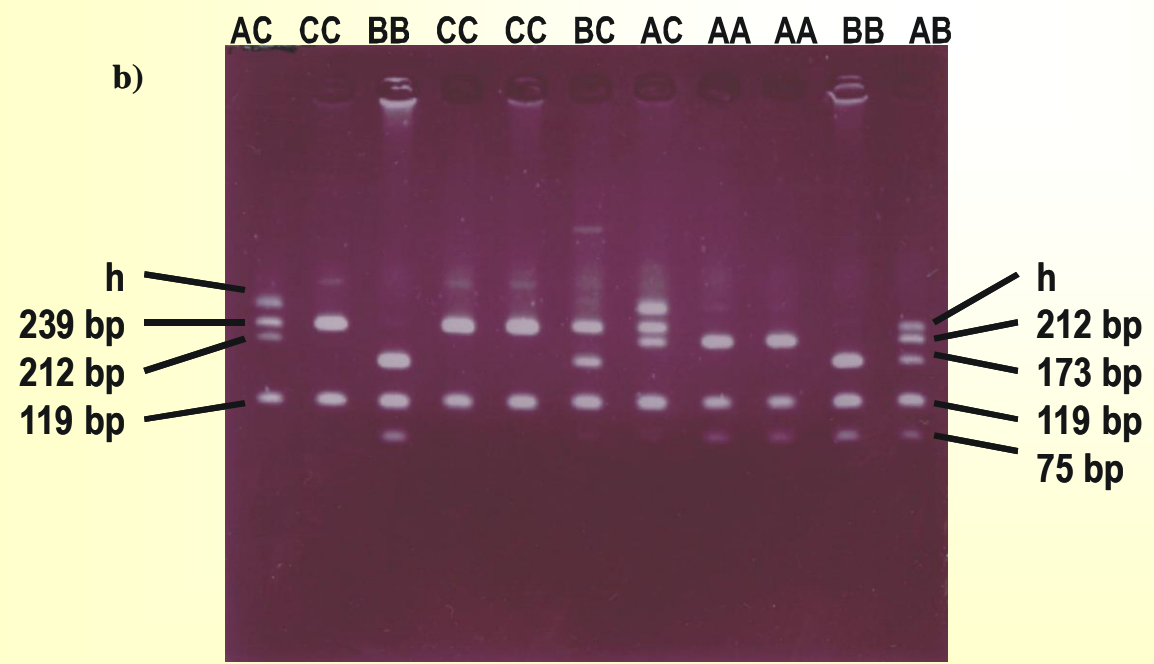
Length polymorphism (insertion/deletion) of the PRE
in intron 2 at *PREA* locus of porcine *GBA*





Electrophoresis showing length polymorphism at *PREB* locus of porcine *GBA*

a) Separace PCR produktů v agarózovém gelu



b) Elektroforéza stejných PCR produktů jako v (a), po štěpení *Bam*HI

Comparison of four partial sequences of three alleles (A,B,C) at the *PREB* locus (SINE in intron 4) of *GBA* gene

```

L35 Allele A 61 CGGTTGACTCAGATTCACATATCTTGGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATTCTTGGGCCACTCCCGCGGCAC 140
LW21 Allele A 61 CGGTTGACTCAGATTCACATATCTTGGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT--GCCATTCTTGGGCCACTCCCGCGGCAC 138
LW21 Allele B 61 CGGTTGACTCAGATTCA-----TTTCTTGGGCCACTCCCGCGGCAC 101
M218 Allele C 61 CGGCTGACTCAGATTCACATATCTTGGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT--GCCATTCTTGGGCCACTCCCGCGGCAC 139
*** *****

```

```

L35 Allele A 141 CTGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTCTAATCGGATCTGTAGCTGCCGGCCTACACCACAGCCACAGCAACTTGGGATCCGAG 220
LW21 Allele A 139 CTGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTCTAATCGGATCTGTAGCTGCCGGCCTACACCACAGCCACAGCAACTTGGGATCCGAG 218
LW21 Allele B 102 CTGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTCTAATCGGATCTGTAGCTGCCGGCCTACACCACAGCCACAGCAACTTGGGATCCGAG 181
M218 Allele C 140 CTGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTCTAATCGGATCTGTAGCTGCCGGCCTACACCACAGCCACAGCA----- 185
*****

```

```

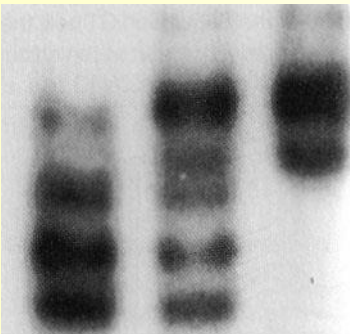
L35 Allele A 221 CCGCGTCTGCGACCTACACCACAGCTCACGGCAACGCCAGATCCTTAACCCACTGAGCAAGGCCAGGGATCCAACCCACA 300
LW21 Allele A 219 CCGCGTCTGCGACCTACACCACAGCTCACGGCAACGCCAGATCCTTAACCCACTGAGCAAGGCCAGGGATCCAACCCACA 298
LW21 Allele B 182 CCGCGTCTGCGACCTACACCACAGCTCACGGCAACGCCAGATCCTTAACCCACTGAGCAAGGCCAGGGATCCAACCCACA 261
M218 Allele C 186 -----ACGCCAGATCCTTAACCCACTGAGCAAGGCCAGGGATCCAACCCACA 252
*****

```

f) SSCP

(single-stranded conformation polymorphism)

- *konformační polymorfismus jednořetězců*
- vzorek (produkt PCR) se nanáší po denaturaci na nedenačovací PAGE za konstantní teploty
- ssDNA = konformace \Rightarrow mobilita
- separace vláken DNA lišících se až jedním NT



SSCP (autoradiografie)

g) DGGE

(denaturant gradient gel electrophoresis)

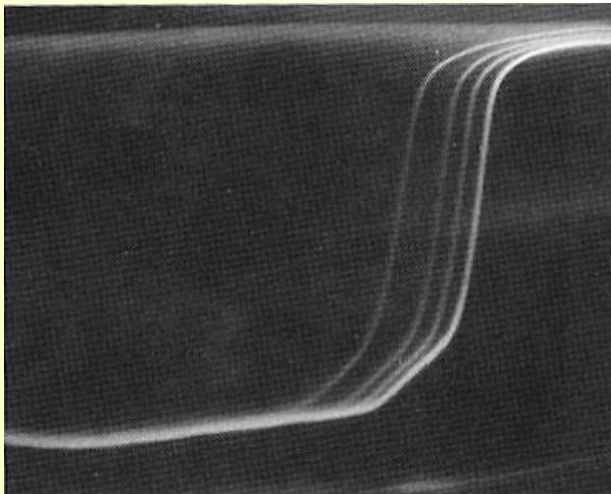
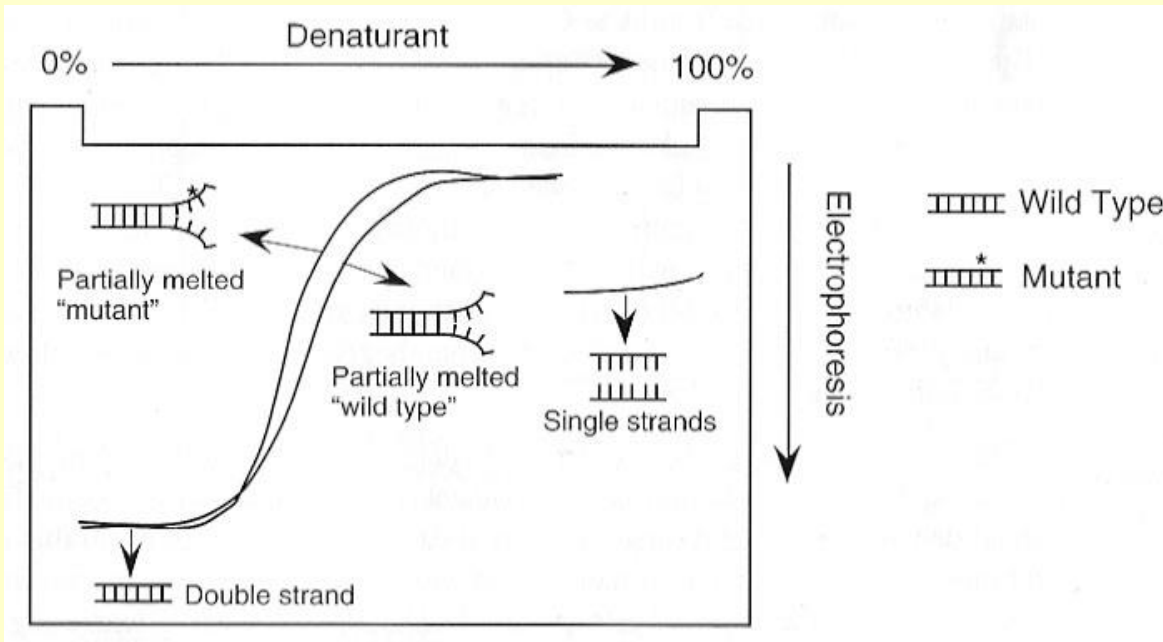
- *denaturační gradientová gelová elektroforéza*
- nedenaurované fragmenty DNA se separují v PAA gelu o gradientu denaturantu na základě své velikosti a teploty tání

sekvence = T_m = stupeň denaturace \Rightarrow mobilita
(nižší T_m = dřív se denaturuje = zpozdí se)

denaurované molekuly se pohybují pomaleji

- umožňuje detekovat i SNP

DGGE



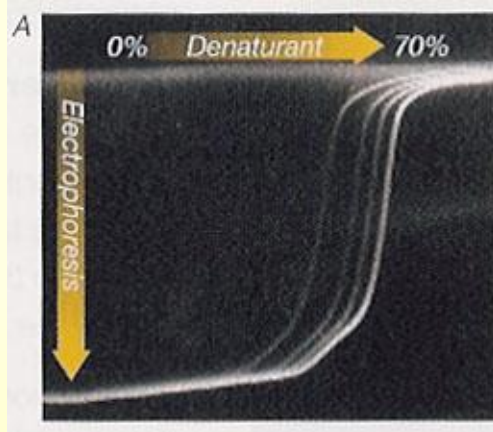
Perpendikulární DGGE, EtBr

DGGE - typy

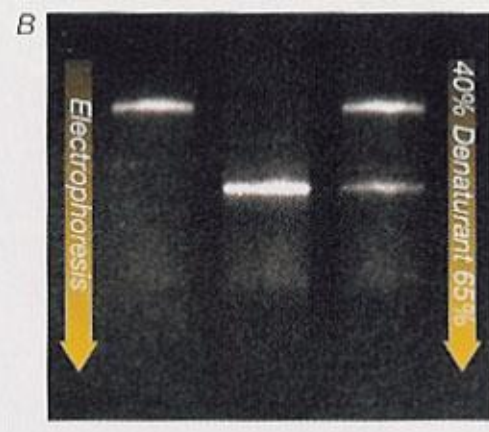
Denaturant: močovina, formamid

Typy gelů:

perpendikulární



paralelní



DGGE

(fotografie gelu)



Odvozené metody:

- CDGE (constant denaturant gel electrophoresis - gelová elektroforéza při konstantní koncentraci denaturantu)
- TGGE a TTGE : teplotní gradient, částečné nebo úplné denaturace molekuly DNA je dosaženo teplotou

h) AFLP

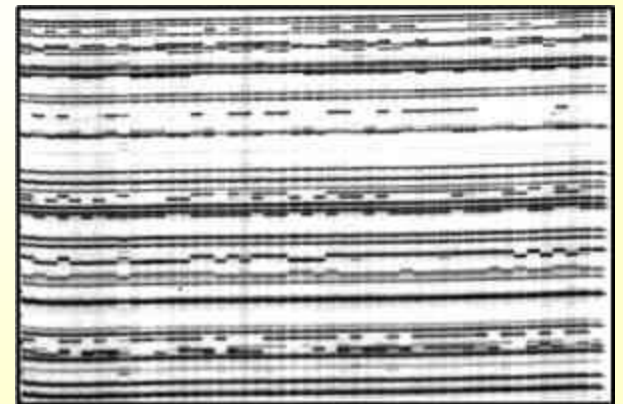
(amplified fragment length polymorphism)

- *detekce DNA restrikčních fragmentů pomocí PCR amplifikace*
- Amplifikace restrikčních fragmentů probíhá pomocí ligace ds adaptorových sekvencí na konec restrikčního místa, což slouží jako „univerzální“ vazebné místo pro primery při PCR

Výhody a využití AFLP:

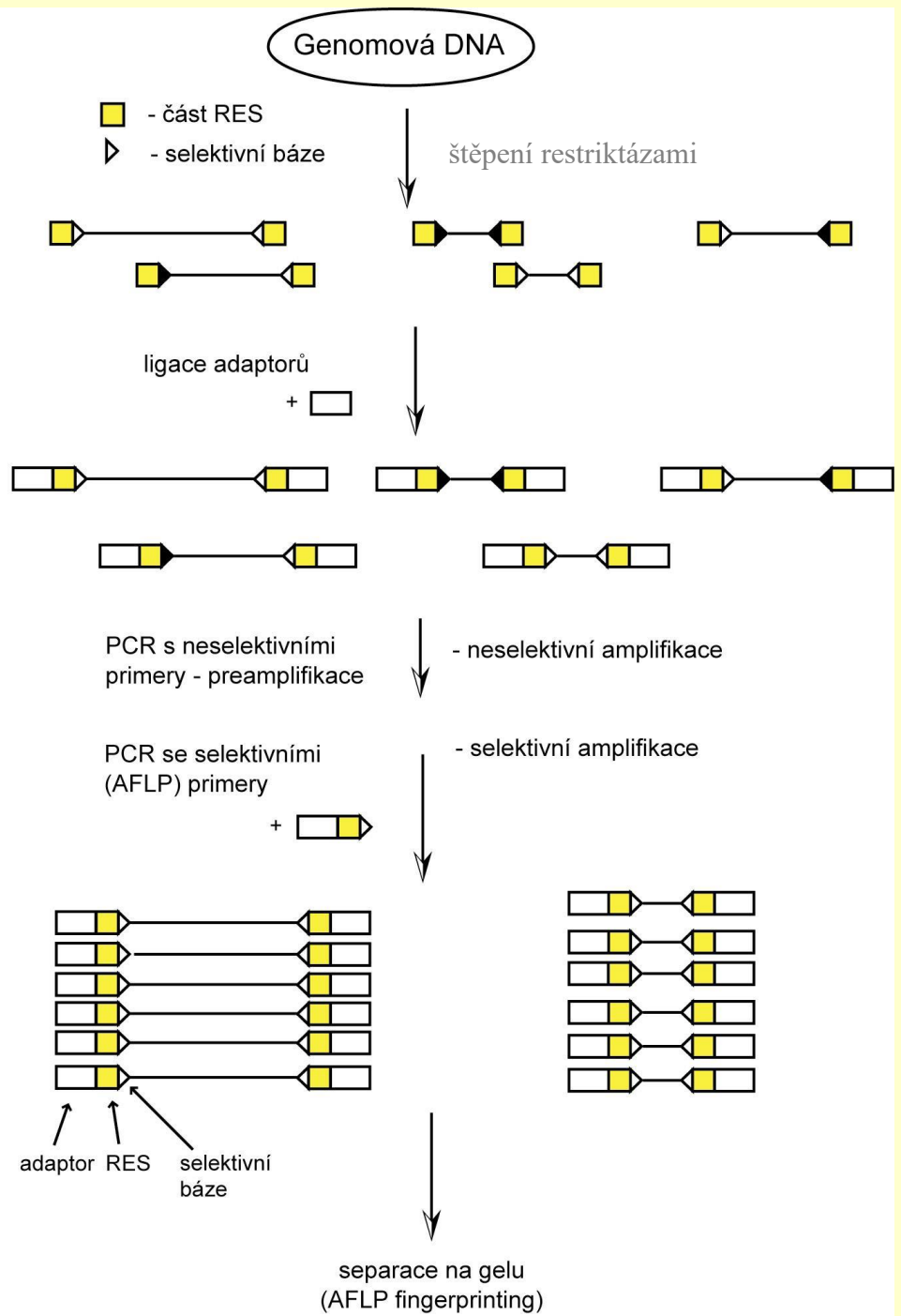
- a) není třeba znát sekvenci (biodiverzita, genetické vzdálenosti)
- b) lze odečítat kodominantně (genetické mapování)
- c) vysoká hustota markerů (poziční klonování)
- d) umožňuje srovnání celkové genomové DNA i klonů genomové DNA a tvorbu „transkripčních profilů“ při expresní analýze.

DNA fingerprint pomocí AFLP

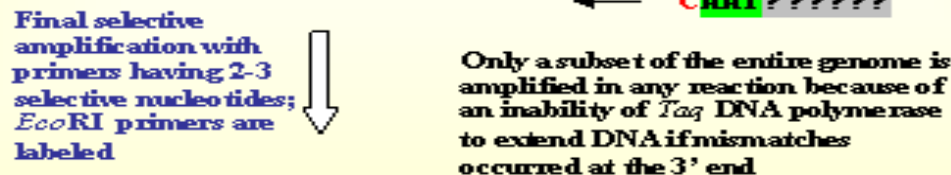
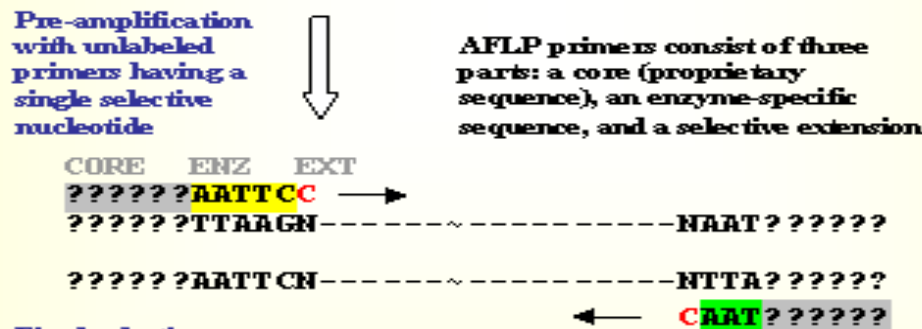
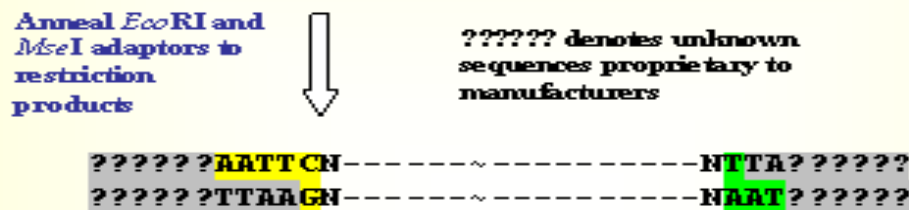
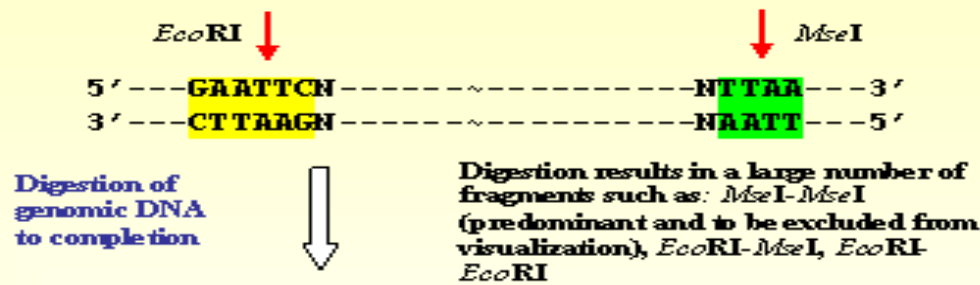


AFLP

(schéma)



AFLP procedure

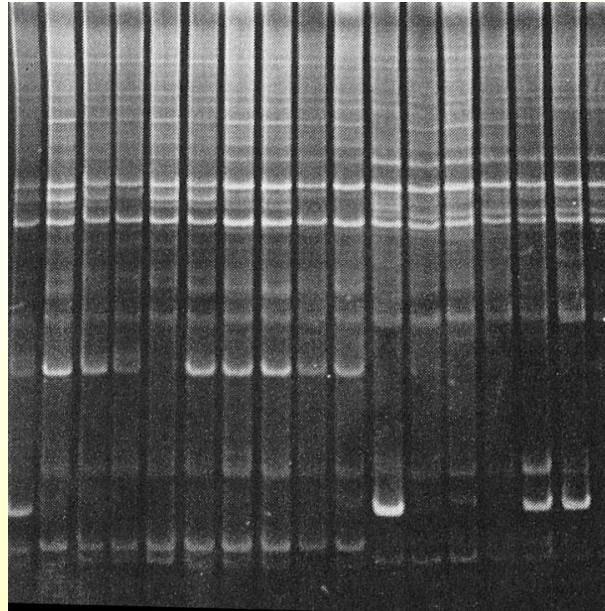


i) RAPD

(random amplified polymorphic DNA)

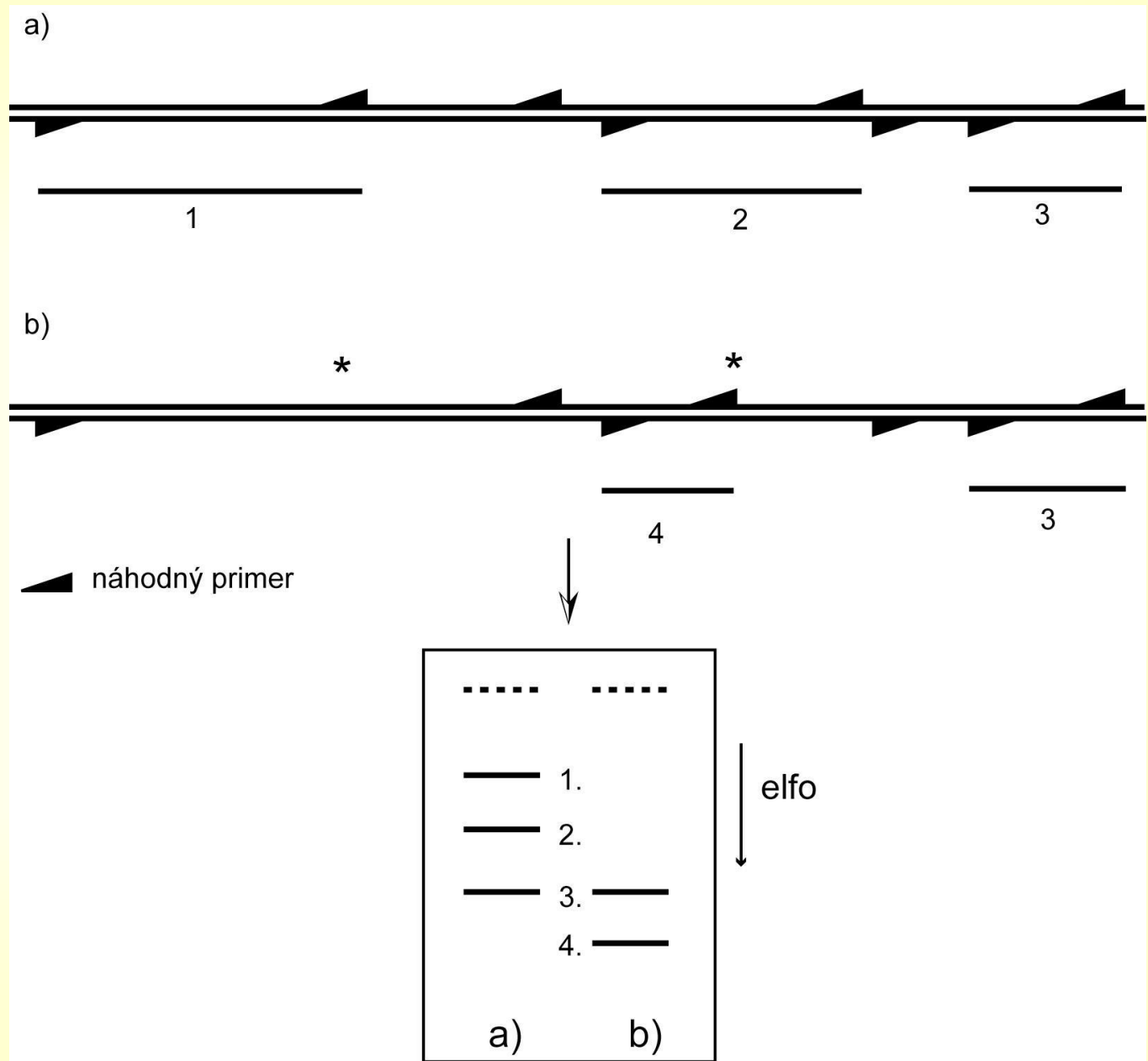
Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA

- pro tvorbu genomového fingerprintu, kde je málo známo o sekvenci
- zahájení PCR - krátký málo specifický oligonukleotid (obvykle 10NT)
- detekce velkého množství polymorfizmů (genetické mapy, mapování QTL, fingerprinting, genetických vzdáleností)
- lokalizace SNP neznámá.



RAPD

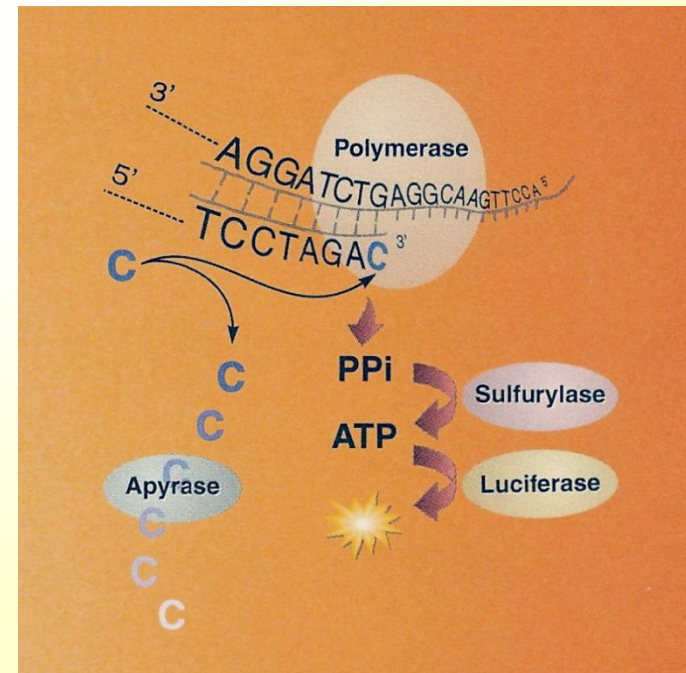
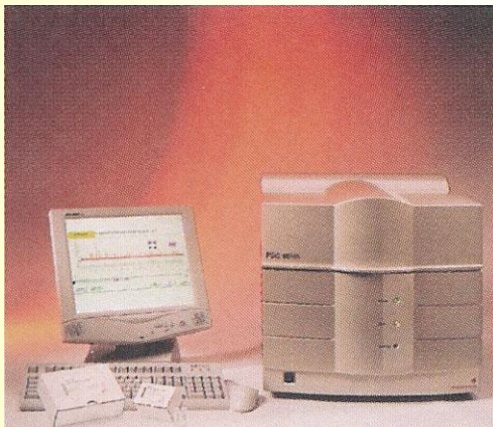
(schéma)



k) Pyrosekvenování

(sekvenování při syntéze)

- sekvenování v reálném čase, bez nutnosti použití gelové elektroforézy
- probíhá paralelně (96 vzorků současně)
- využití:
 - detekce mutací (SNP)
 - kvantitativní stanovení (odhad frekvence alel)



Pyrosekvenování

Pyrosekvenování (angl. *pyrosequencing*) je jedna z novějších metod sekvenování DNA. Je sice (podobně jako Sangerova metoda) založena také na syntéze nových sekvencí DNA, ale liší se způsobem, jak je detekováno začlenění daného nukleotidu (nevyžaduje elektroforézu). Pyrosekvenování vyvinul v roce 1996 ve Stockholmu profesor Pal Nyrén se svým studentem Mostafou Ronaghi.

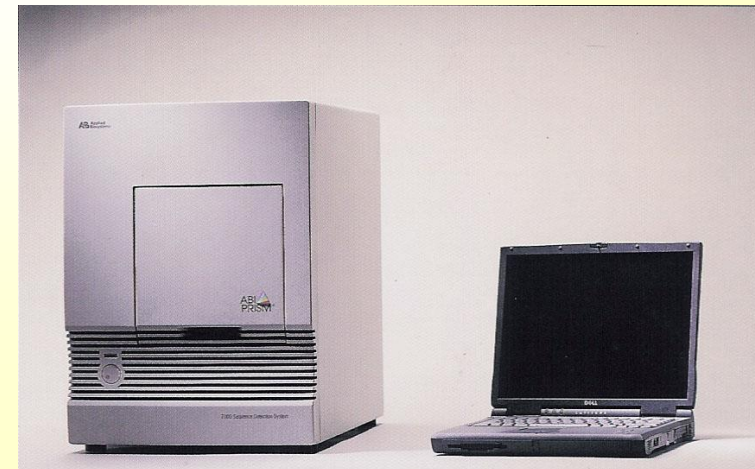
Ve směsi pro pyrosekvenování musí být přítomno velké množství enzymů, mimo DNA polymerázy ještě **ATP sulfuryláza**, **luciferáza** a **apyráza**; ze substrátů pak **adenosinfosulfát** a **luciferin**. Do této směsi jsou postupně vkládány nukleotidy různých typů (**dATP**, **dGTP**, **dCTP**, **dTTP**). Když se po přidání jednoho z nich uvolní světelné záření, znamená to, že se do vznikajícího řetězce začlenil jeden nebo více nukleotidů tohoto typu. Toto světlo zde vzniká v důsledku enzymatické reakce, na jejímž začátku je uvolnění **pyrofosfátu** z nově začleněného nukleotidu a na jejímž konci je spotřeba vzniklého **ATP luciferázou** k oxidaci **luciferinu**.

I) PCR v reálném čase

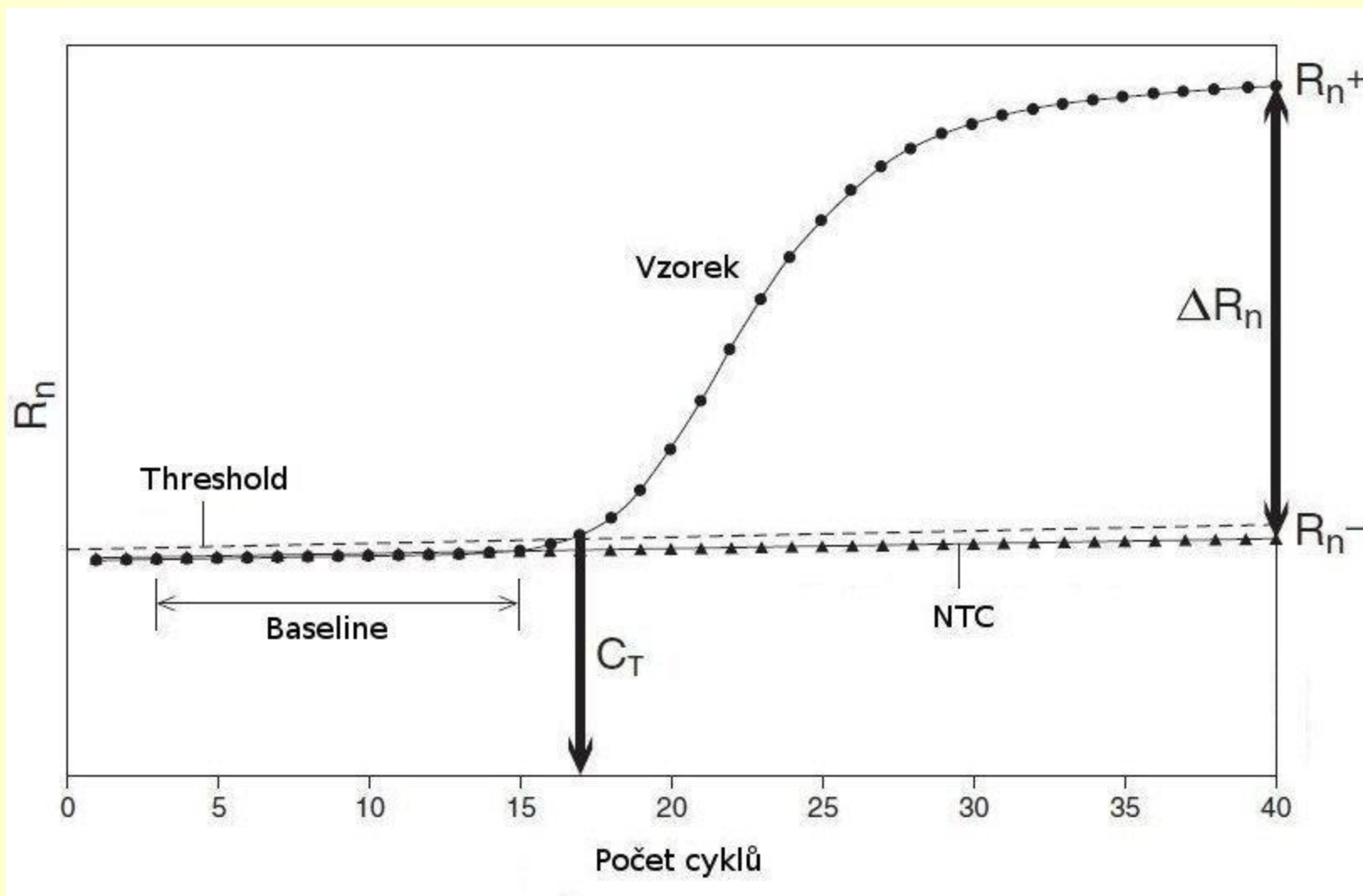
(real-time PCR)

- moderní metoda umožňující sledování průběhu PCR v reálném čase
- na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu
- a) kvantitativní PCR v reálném čase - kvantifikace genomové DNA (např. viry, GMO) nebo mRNA (studium exprese)
- b) pro analýzu bodu tání produktu (melting analysis) – ověření identity a kvality produktu (amplifikátu)
- c) pro genotypizaci - přímé stanovení genotypu (pomocí analýzy bodu tání nebo hybridizačního systému).

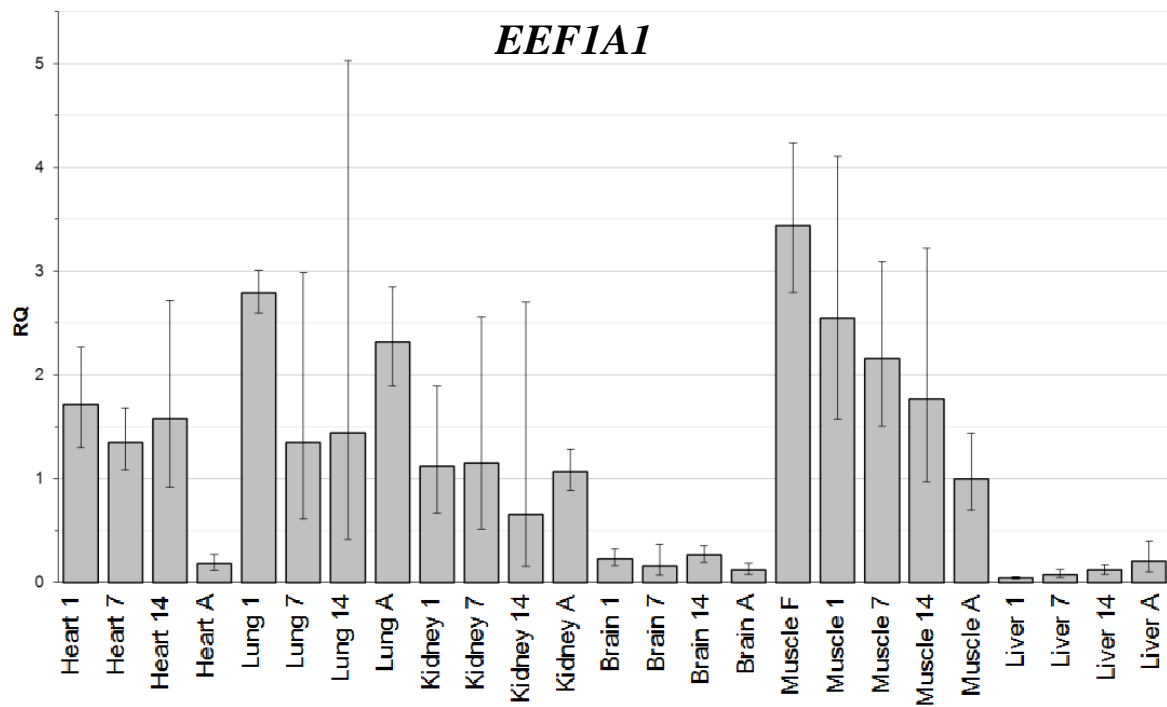
Technika může být plně automatizovaná, ale vyžaduje nákladné zařízení



Znázornění průběhu amplifikace při real-time RT-PCR (dle Applied Biosystems)

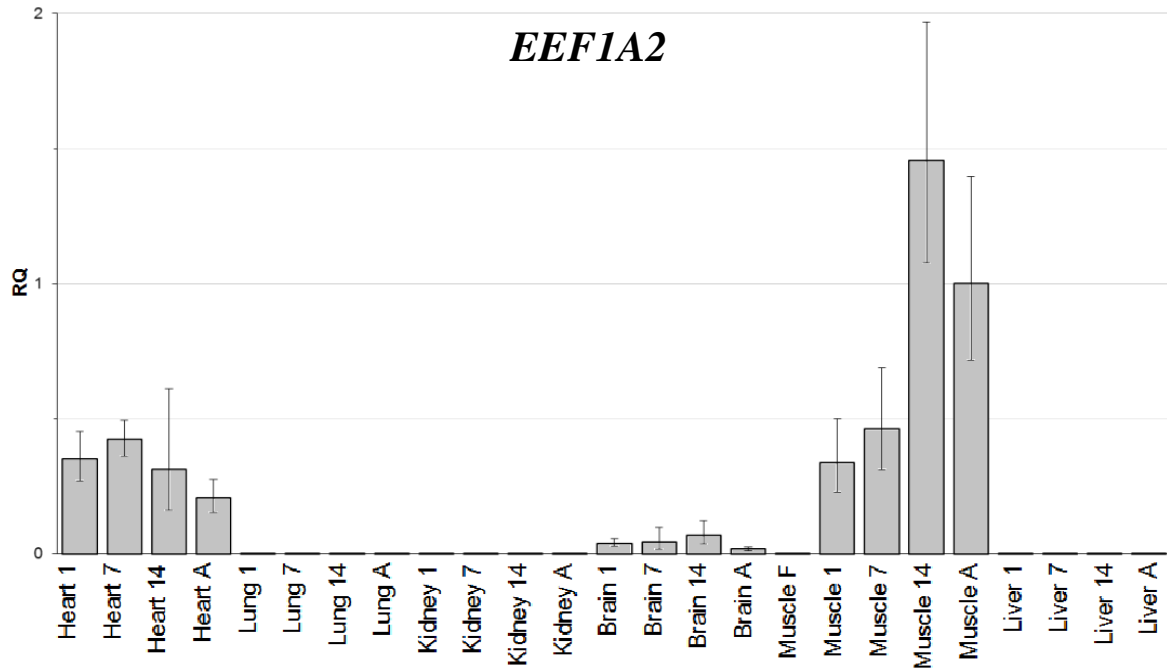


EEF1A1

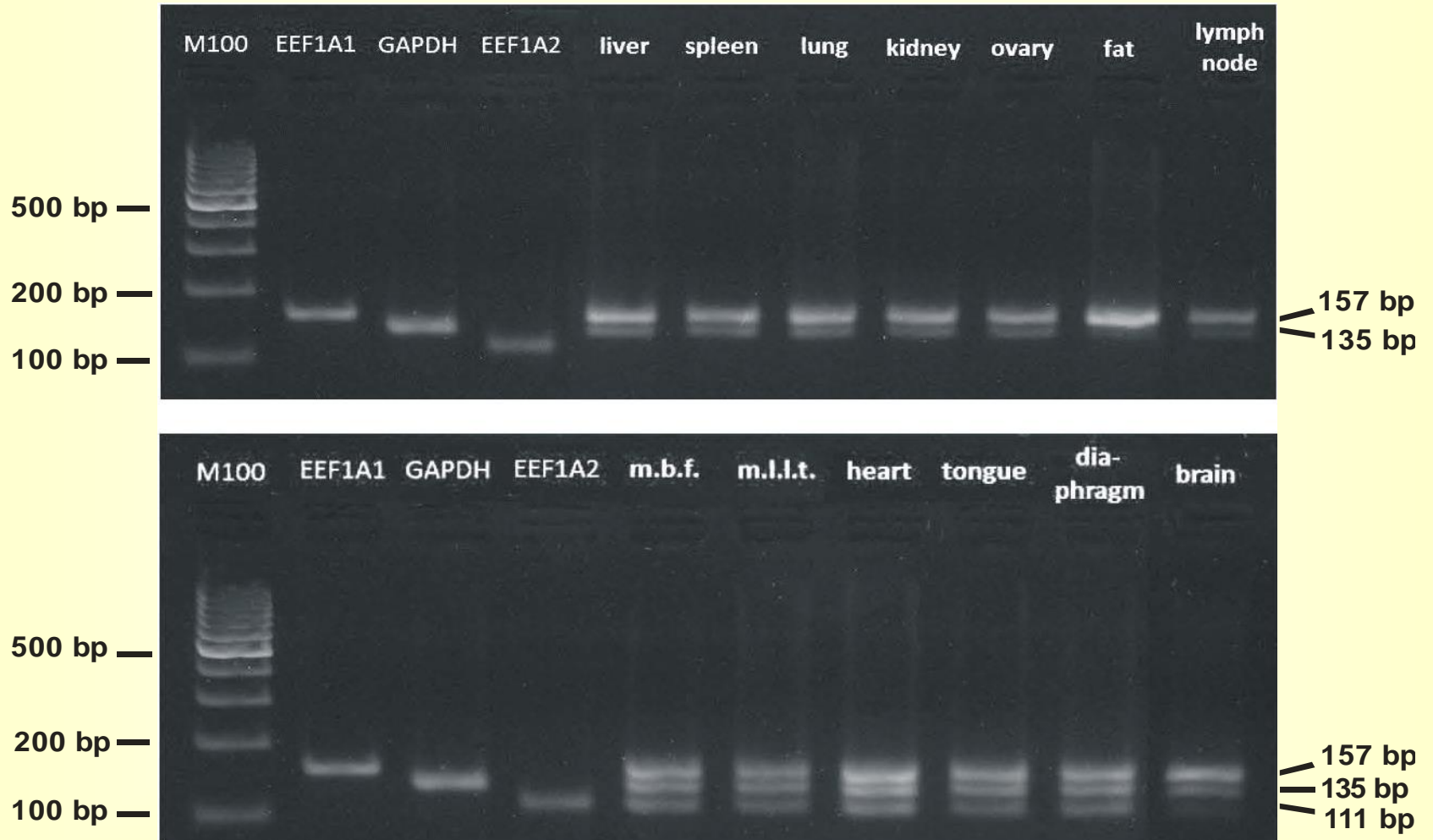


Relativní kvantifikace exprese mRNA *EEF1A1* a *EEF1A2* v některých tkáních prasat ve srovnání s expresí ve svalu dospělého prasete. Jako referenční gen byl použit *HPRT1*.

EEF1A2



Agarózová elektroforéza multiplex PCR produktů cDNA (*EEF1A1*, *EEF1A2* a *GAPDH*) připravených z mRNA tkání dospělých prasat. Ukázka **transkripčních profilů**.



m) DNA array

(DNA chips, biochips)

- umístění ve formě teček (spotů) na folie nebo sklíčka
- hybridizace na řádově tisíce spotů
- založeno na hybridizaci značeného vzorku (DNA, RNA) na DNA známé sekvence

Využití:

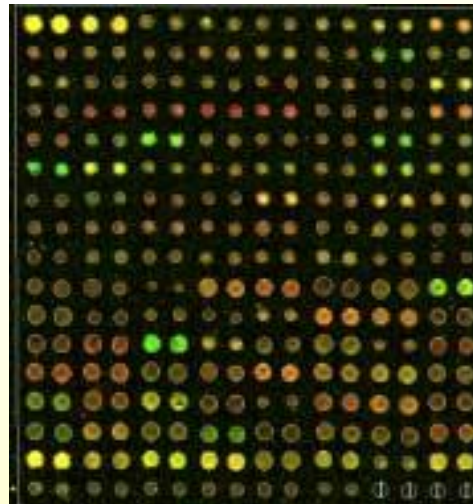
- studium exprese genů
- detekce SNP
- genotypování

Microarray: cDNA, oligo

Oligoarray (50-70mer):

HS- 16 659 genů

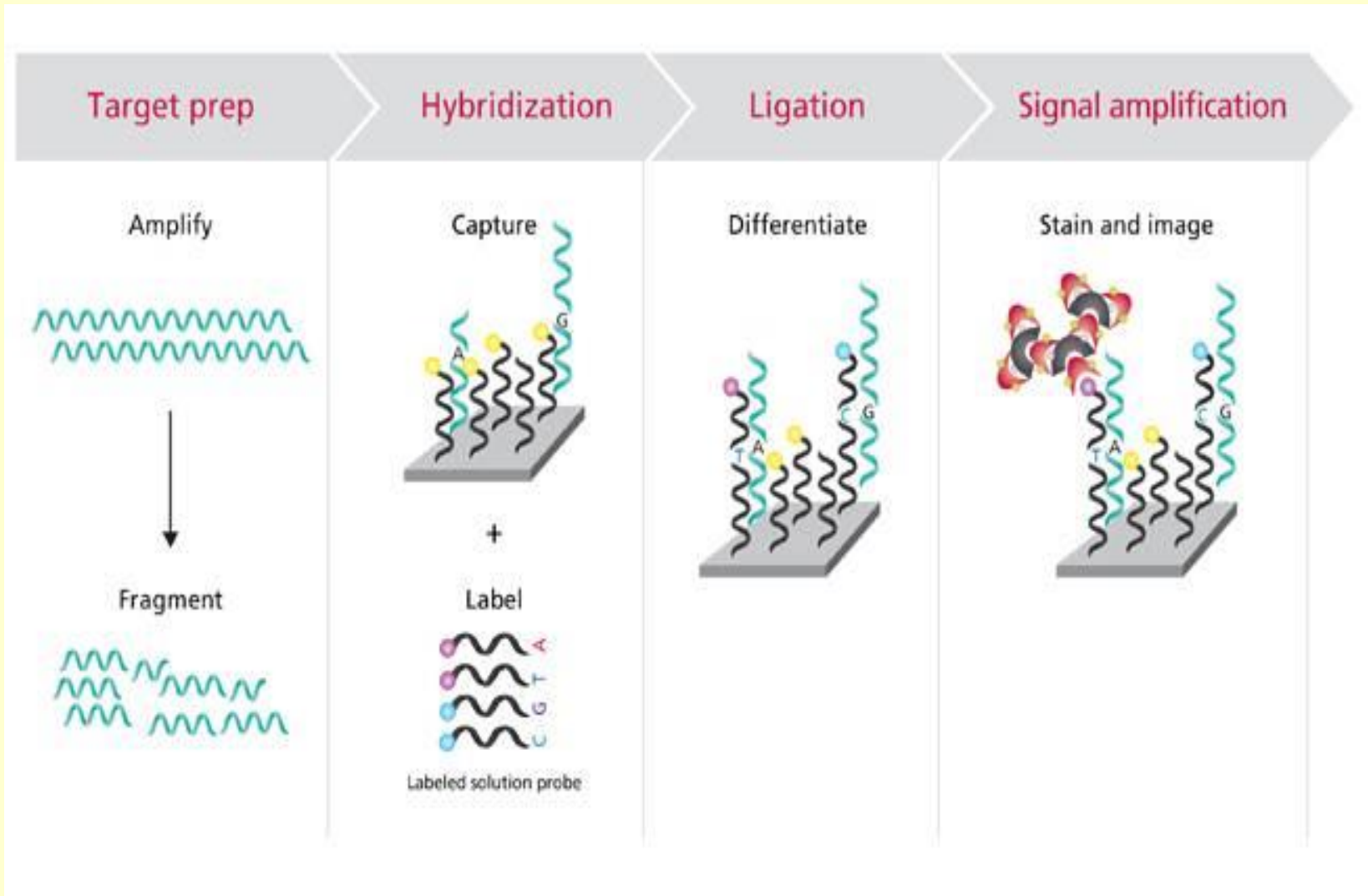
MM- 13443 genů



CattleArray3800

Contains 3820 selected cDNA clones

Diagram Illustrating the SNP Genotyping Procedures



genotyping



Biochemická genetika

Genetické diference v biochemickém složení jedinců téhož druhu.

Genetický polymorfismus je výskyt dvou nebo více variant u téhož druhu, v téže době a v takovém měřítku, že nejřidčeji vyskytující se varianta se nemůže udržet pouze opakující se mutací.

Největší pozornost byla věnována bílkovinám.

Struktura bílkovin: - primární (pořadí aminokyselin)

- sekundární (prostorové uspořádání sousedních aminokyselin)

- terciární (prostorové uspořádání celého polypeptidového řetězce)

- kvarterní (subjednotková struktura)

Typy biochemické variability:

a) chybění některých složek

b) variabilita v kvantitě nebo aktivitě některých složek

c) molekulární variabilita (polymorfismus) proteinů

ad a) Chybění některých složek

- delece odpovědného strukturního genu

- mutace strukturního genu zabrání vzniku funkčního proteinu

- porucha regulace genu

- protein (enzym) je produkován v normálním množství, ale je nefunkční (záměna důležité aminokyseliny v aktivním centru)

Příklady: - absence některých enzymů nezbytných pro metabolismus fenylalaninu. Důsledek: fenyلكetonurie, albinismus, tyrozinóza, alkaptonurie

- *absence různých bílkovin, často enzymů, u člověka nebo u zvířat (IgA, alfa 1-antitrypsin u člověka, atropinesteráza u králíků, esteráza u ovcí aj.)*

ad b) Variabilita v kvantitě nebo aktivitě

- **zvýšená koncentrace (u mikroorganismů)**
- **snížená koncentrace (heterozygotní stav genu – jedna alela funkční, druhá nefunkční; mutace v promotoru, případně v zesilovačích; mutace ve struktuře proteinu, zejména v aktivním centru)**

ad c) Molekulární variabilita proteinů

- **polymerismus**
- **konformační variabilita**
- **alomerismus: primární - sekvenční**
 - **prostetický****kvarterní - uspořádání podjednotek**

Primární sekvenční, částečně prostetický alomerismus = polymorfismus

Metody studia:

Elektroforéza: - agarový/agarózový gel

- škrobový gel

- polyakrylamidový gel

- dvojrozměrná elektroforéza

Izoelektrofokuzace

Využití histochemických a biochemických metod

Western blotting a detekce pomocí protilátek, aj.

Příčiny rozdílné migrace při elektroforéze:

- molekulová hmotnost

- konformace

- elektrický náboj

Různé metody separace využívají rozdílných aspektů nebo jejich kombinací pro požadovanou separaci.

Při studiu polymorfismu hraje největší úlohu elektrický náboj proteinu v daném pH pufru – již malá změna náboje proteinu má za následek změnu migrace při elektroforéze. Zvláště velkou roli na ovlivnění elektrického náboje mají aminokyseliny - **kyselina asparagová a glutamová**, které mají záporný náboj, a **lyzin, arginin a histidin**, které mají kladný elektrický náboj.

Záměna neutrální aminokyseliny některou z výše uvedených aminokyselin (a *vice versa*) má za následek změnu náboje celé proteinové molekuly, která se projeví změnou migrace při elektroforéze.

Na výsledném elektrickém náboji proteinové molekuly se rovněž podílejí prostetické skupiny, které mají elektrický náboj – u glykoproteinů je to zejména kyselina sialová, u fosfoproteinů kyselina fosforečná. Tyto prostetické skupiny jsou příčinou *heterogenity* proteinů.

Příčiny polymorfismu:

- **záměna jedné aminokyseliny**
- **záměna několika aminokyselin**
- **rozdíly v prostetických skupinách**
- **delece**
- **inzerce**
- **duplikace**
- **nerovnoměrný crossing-over**
- **posun fáze translace**

Teoretické a praktické aspekty studia polymorfních bílkovin

- **studium chemického složení bílkovin**
- **funkční rozdíly v bílkovinách jako důsledek jejich polymorfismu**
- **studium genetické vazby a konstrukce chromozómových map**
- **studium podobnosti mezi bílkovinami různých tělních tekutin**
- **studium různých otázek evoluce, systematiky a biologie živočichů**
- **objasňování fylogenetického původu hospodářských zvířat**
- **studium struktury plemen a linií hospodářských zvířat**
- **zjišťování genetické vzdálenosti mezi plemeny a liniemi hospodářských zvířat**
- **kontrola rodičovství u hospodářských zvířat**
- **hledání vztahů mezi fenotypy polymorfních bílkovin a užitkovými znaky**
- **šlechtění ryb**

Chemické složení proteinů

- záměna jedné aminokyseliny
- záměna několika aminokyselin
- rozdíly v prostetických skupinách
- delece
- inserce
- duplikace
- nerovnoměrný crossing-over
- posun fáze translace

Příklad: lidský hemoglobin:

normální hemoglobin A – v β řetězci na 6. pozici – kyselina glutamová

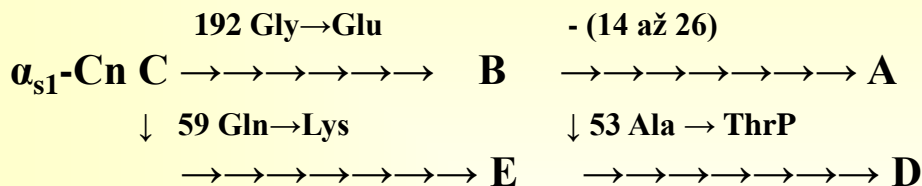
srpkovitý hemoglobin S – v β řetězci na 6. pozici – valin

(Takových záměn je u lidského hemoglobinu popsáno na 200)

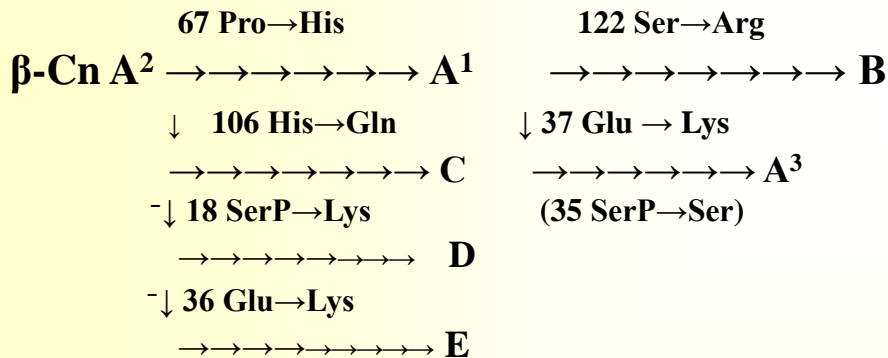
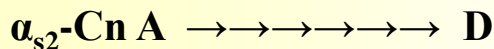


Vztahy mezi variantami kravského mléka: α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn, β -Cn a κ -Cn

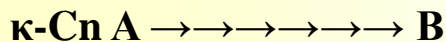
(Varianty α_{s1} -Cn C, α_{s2} -Cn A, β -Cn A² a κ -Cn A jsou považovány za původní typy)



- (51 – 59)



148 Asp→Ala



Ze schématu je patrné:

- několik mutací ovlivňuje fosfopeptid.

Zajímavé je srovnání varianty β -Cn C a β -Cn E s variantou β -Cn A² (ve které je na pozici 35 SerP). Toto srovnání ukazuje na úlohu Glu 37 pro fosforylaci Ser 35.

- u dvou variant se vyskytují delece, které nejsou zanedbatelné: 13 aminokyselin u α_{s1} -Cn A a 9 aminokyselin u α_{s2} -Cn D.

Ve výše uvedených příkladech se jednotlivé genetické varianty proteinu lišily záměnami jedné aminokyseliny nebo delecí několika zbytků. U některých bílkovin se varianty odlišují v několika aminokyselinách. Například ovčí globinový řetězec β varianty Hb A se odlišuje od Hb B v 7 aminokyselinách /WILSON et al., 1970/:

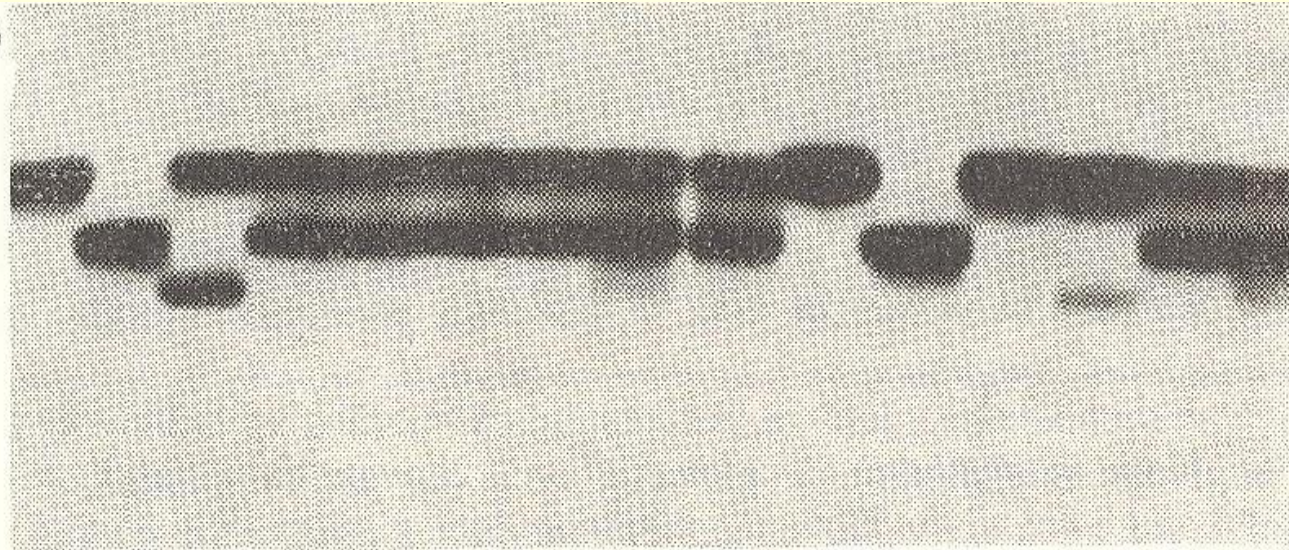
	49	57	74	75	119	128	143
Hb A	Ser	Ala	Val	Glx	Ser	Glx	Arg
Hb B	Asx	Pro	Met	Lys	Asn	Asp	Lys

Další z ovčích hemoglobinů, anemický hemoglobin C, má řetězec α identický s α řetězcem Hb A a Hb B, ale odlišuje se v řetězci β .

Aminokyselinová sekvence β^C řetězce se liší nejméně v 16 aminokyselinách od β^A a nejméně v 21 aminokyselinách od β^B . Srovnání N-koncových sekvencí β^B a β^C vypadá následovně /pro podrobnější diskusi viz MANWELL a BAKEROVÁ, 1970/:

β^B met-leu-thr-ala-glu-glu-lys-ala-ala-val-thr-gly-phe-trp

β^C PRO-ASN-lys-ala-LEU-ILE-thr-SER-phe-trp



Hb	A	B	A	AB	AB	AB	AB	AB	AB	A	B	A	A	AB	AB
			+					+				+			+
			C					C				C			C

1. Separace ovčích hemoglobinů při elektroforéze ve škrobovém gelu. — Separation of sheep hemoglobins in starch gel electrophoresis

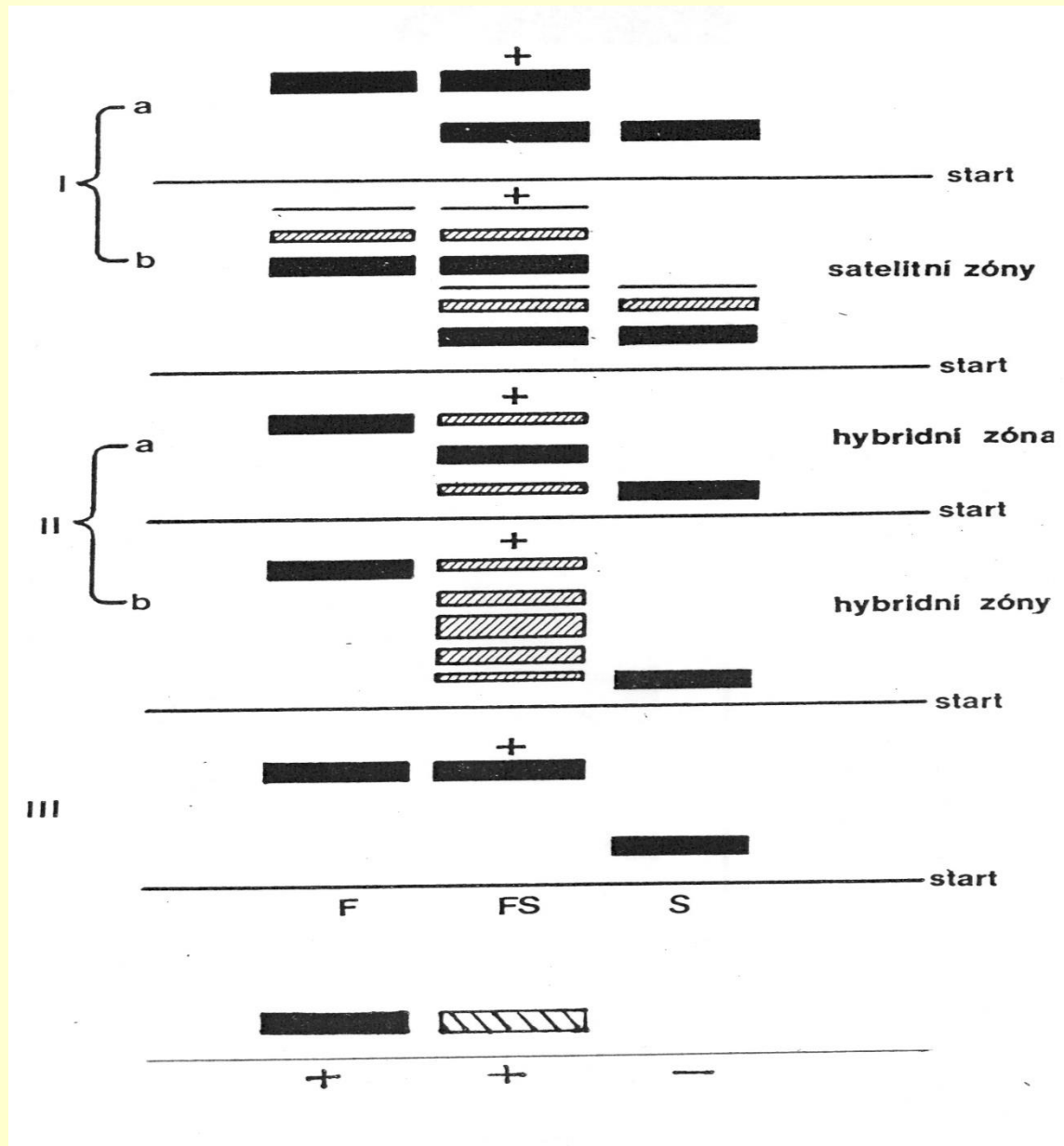
Polymorfismus a funkce proteinu

- žádná změna funkce (neutrální mutace)
- funkce je změněna
- protein ztratil svoji funkci
- protein není syntetizován

Záměna aminokyseliny může a nemusí ovlivnit funkci - v závislosti na tom, která aminokyselina je zaměněna. Je-li zaměněna aminokyselina, která je v aktivním centru enzymu nebo ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti proteinu, dochází ke změně funkce (snížení nebo ztráta aktivity). Při záměně v místě, které nemá vliv na funkci nebo vlastnosti, zůstává aktivita nezměněna (neutrální mutace). Polymorfních proteinů (variant) s nezměněnou funkcí je většina. Změněná funkce - příklad hemoglobin S, kappa - kasein kravského mléka.

Deficience specifických enzymů - velký počet → genetické choroby.

Schématické znázornění základních typů proteinového polymorfismu po elektroforetické separaci (dialelický lokus). Homozygoti jsou F nebo S, heterozygot je FS.



kodominance

**dominance,
recesivita**

start

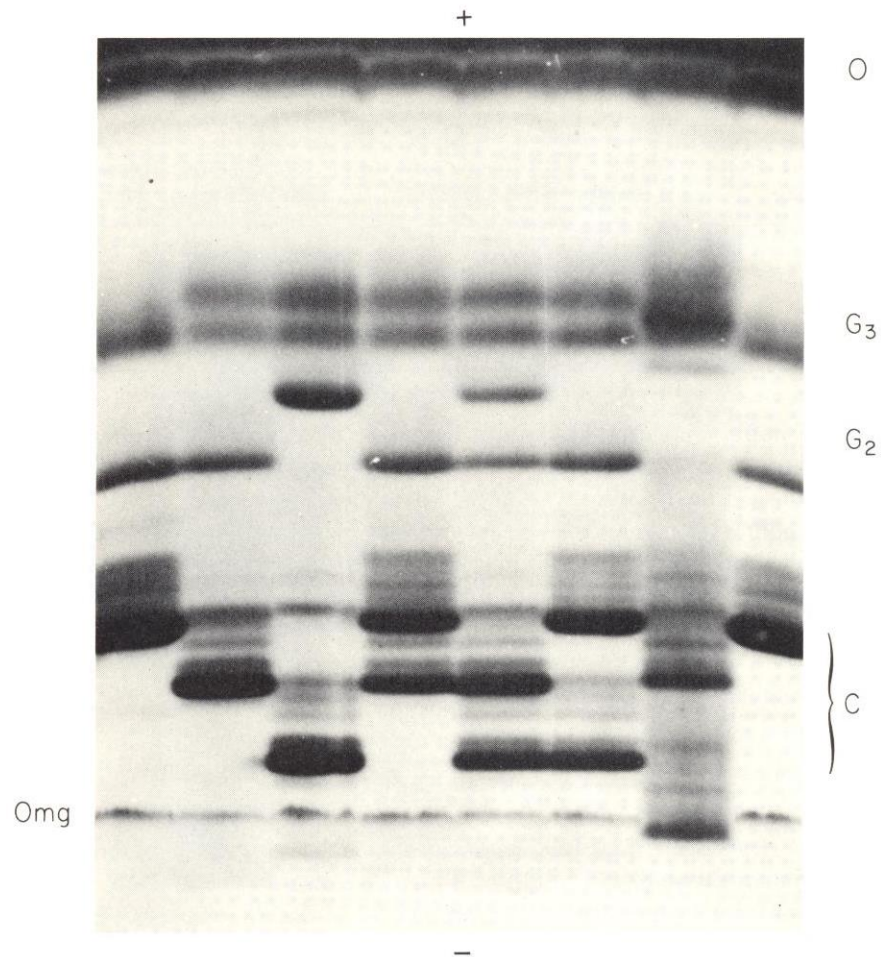


FIG. 7. Variation of Fe-conalbumin, G₂, and G₃ ovoglobulins in the tris-citrate-borate buffer of Stratil (1967a). Five distinct sets of zones can be seen: O, ovalbumin; G₃, ovoglobulins; G₂, ovoglobulins; C, conalbumins (saturated with iron); Omg, ovomacroglobulin. The conalbumin phenotypes are, from left to right: (1) A; (2) B; (3) C; (4) AB; (5) BC; (6) AC; (7) *Gallus sonnerati* heterozygote for B and B.W.; (8) A. The three main G₂ genotypes are represented among the individuals surveyed in this gel: numbers 1, 2, 4, 6, and 8 are G₂ B; number 3 is G₂ A; and number 5 is G₂ A B. Sample number 7, from a Sonnerat's Jungle Fowl, has its G₂ ovoglobulins tending to overlap the G₃ zones, and this species has neither of the common G₂ variants found in chicken and Red Jungle Fowl populations.

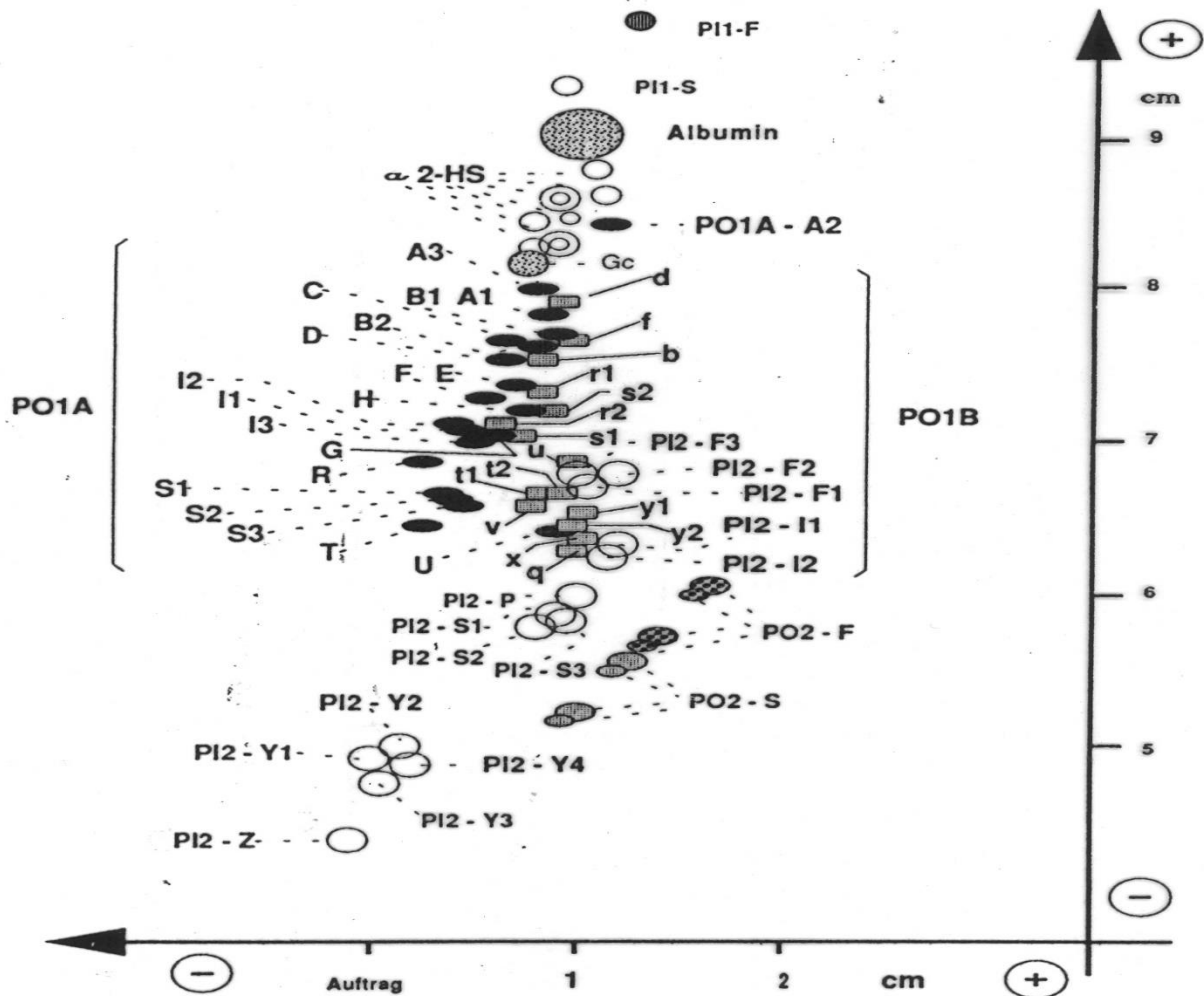
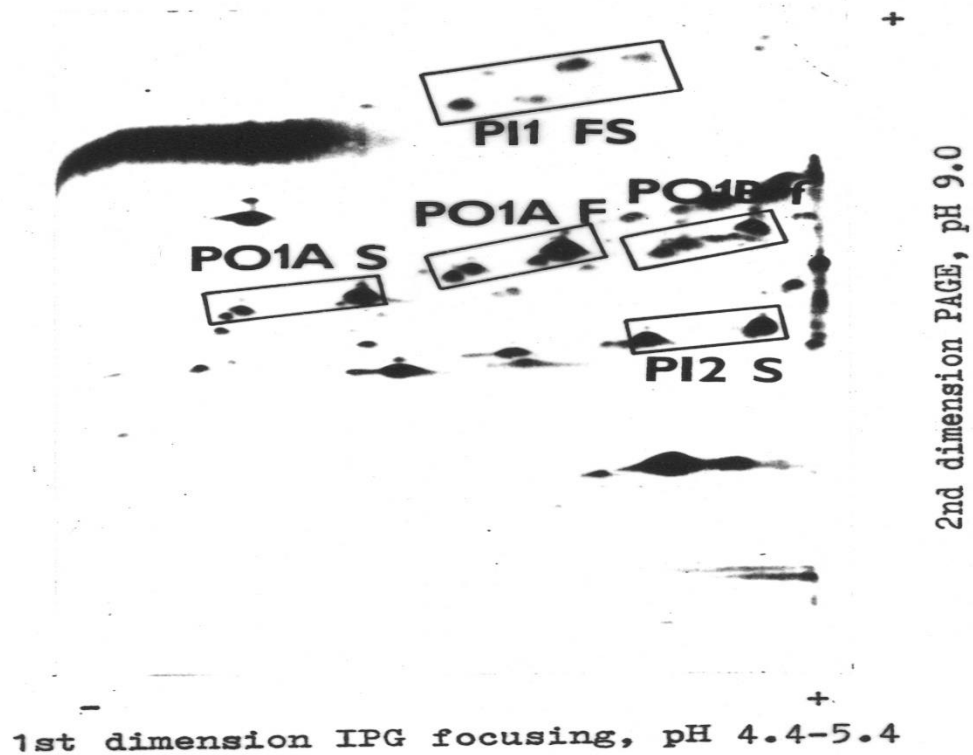


Abbildung 5: Diagramm der Verteilung der Proteinspots des Agarose-PAGE-Elektropherogramms. Die Auftrennung auf der x-Achse ist diejenige der ersten Dimension im Agarosegel, jene der y-Achse ist diejenige der zweiten Dimension im Polyacrylamidgel. Die verschiedenen Varianten der Serumproteinsysteme PI1, PI2, PO1A und PO1B sind aufgezeichnet. Von weiteren Systemen (Albumin, Vitamin D bindendes Protein (Gc), α_1 B-Glycoprotein (PO2) und dem α_2 -HS-Glycoprotein (α_2 -HS)) ist die Lage und teilweise die Varianten angegeben. Die Skala der y-Achse ist gestreckt, damit die Proteinspots direkt mit dem Diagramm der Abbildung 4 verglichen werden können.

Example of 2-D IPG focusing - PAGE
separation of pig serum



Určování rodičovství a identifikace jedince u živočichů

Význam: ověření původu a identifikace

HZ: zákon 154/2000 Sb.

- **prase:** určení genetického typu (identifikace) kanců ve šlechtitelských chovech
- **skot:** genetický typ před výběrem pro plemenitbu (odchovny býků), ověření a osvědčení původu plemenných býků,
- **koně:** genetický typ před výběrem pro plemenitbu, ověření a osvědčení původu hříbat po inseminaci (všech u angl.pln.)
- **další druhy:** pes, exotické ptactvo, chránění živočichové CITES (původ i identifikace)
- **člověk:** soudní lékařství (paternita, identifikace jedince)

Základní pojmy

Pojmy:

parentita: rodičovství

paternita: otcovství

identifikace jedince: určení, že vzorek DNA patří konkrétnímu jedinci (molekulární daktyloskopie)

Vývoj a použití metod

Význam v genetice člověka i zvířat, praxe

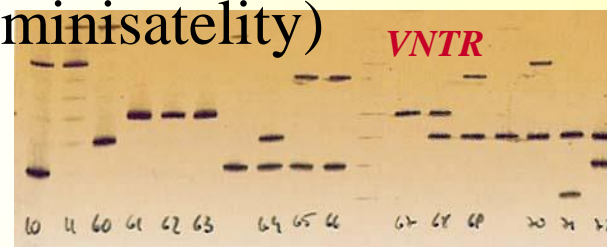
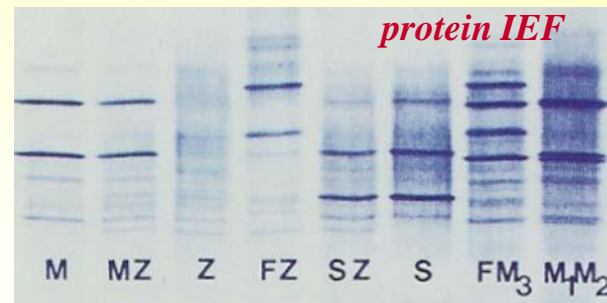
Dříve: polymorfismus krevních skupin
a bílkovin (imunogenetika; biochemická
genetika)

Dnes: variabilita DNA (DNA fingerprinting)

- VNTR (variable number of tandem repeats, minisatelity)
- HLA
- STR (short tandem repeats, mikrosatelity)

Požadavky:

- vysoká spolehlivost zamítnutí a (nebo) potvrzení rodičovství
- relativně snadné a rychlé laboratorní testování
- vysoká reprodukovatelnost
- nejnižší cena

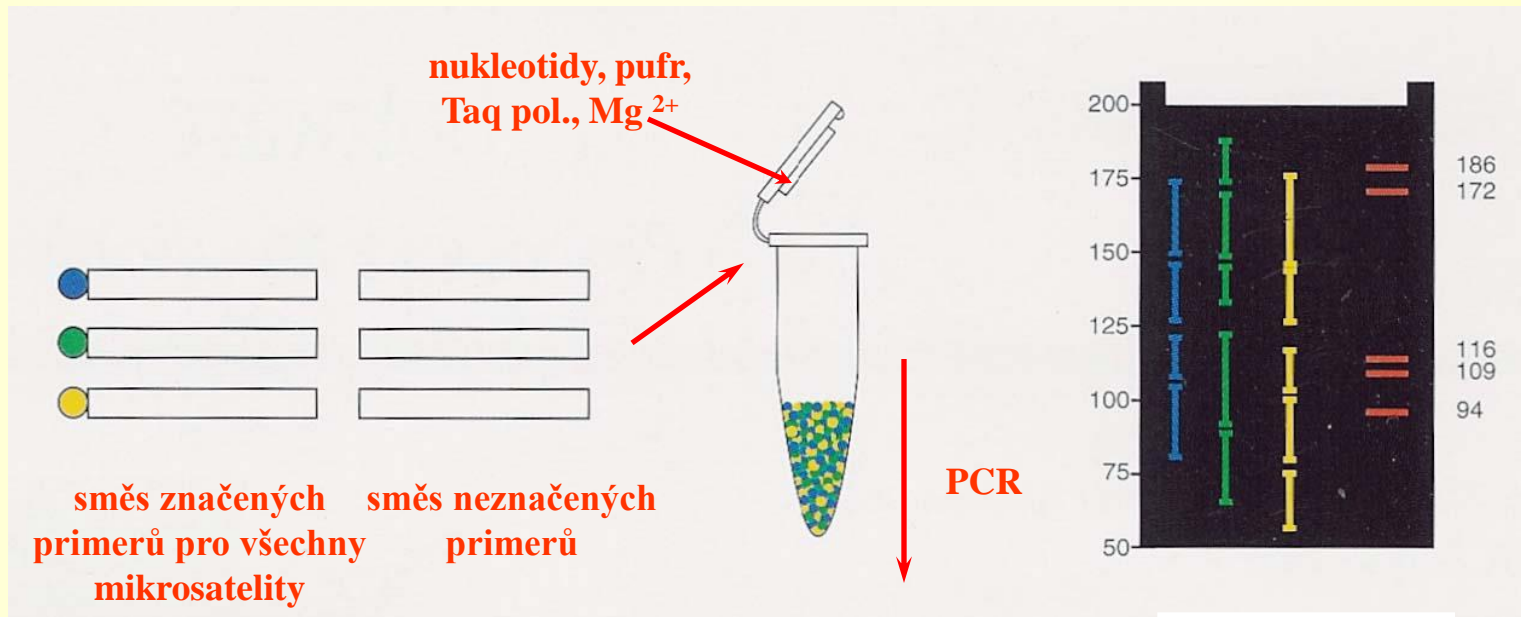


Postup analýzy

1. Izolace genomické DNA
2. Multiplex PCR
3. Fragmentační analýza (kapilární elfo)
4. Určení alel jednotlivých mikrosatelitů
5. Ověření rodičovství (parentity)

Příprava vzorku - PCR

multiplex PCR – v jedné zkumavce amplifikujeme více mikrosatelitů



Fluorescenční barvy:

FAM - modrá

HEX - zelená

NED – žlutá

TAMRA, ROX - červená

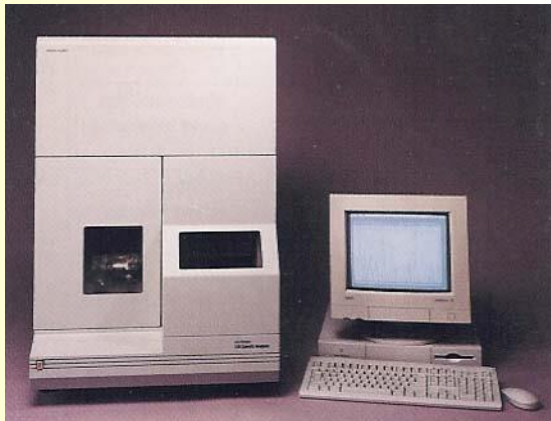


rozsah velikostí
pro jednotlivé
MS

Fragmentační analýza

Kapilární elektroforéza, fluorescenční detekce

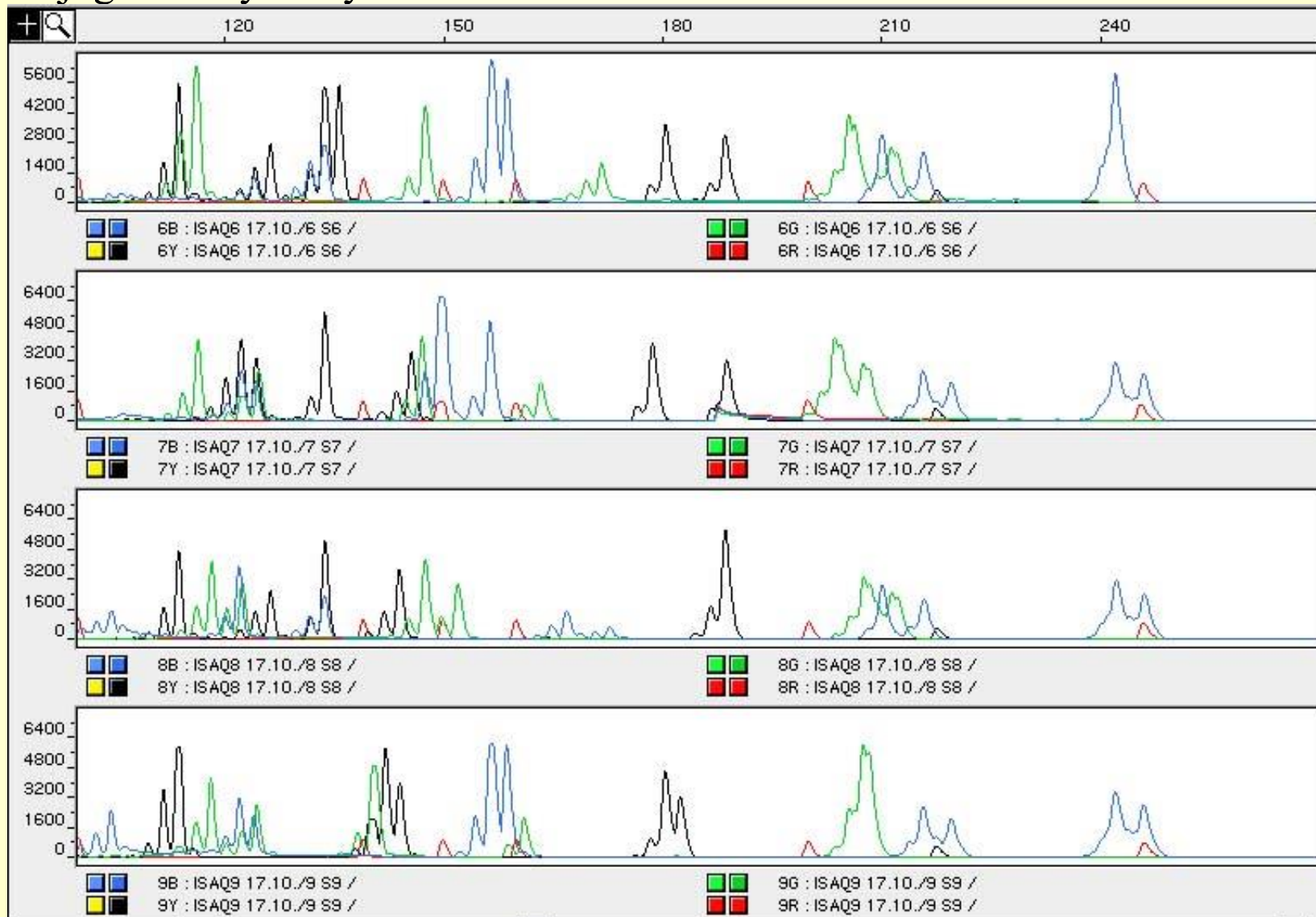
Přístroj: genetický analyzátor ABI PRISM 310



Výstup fragmentační analýzy

Kapilární elektroforéza, fluorescenční detekce

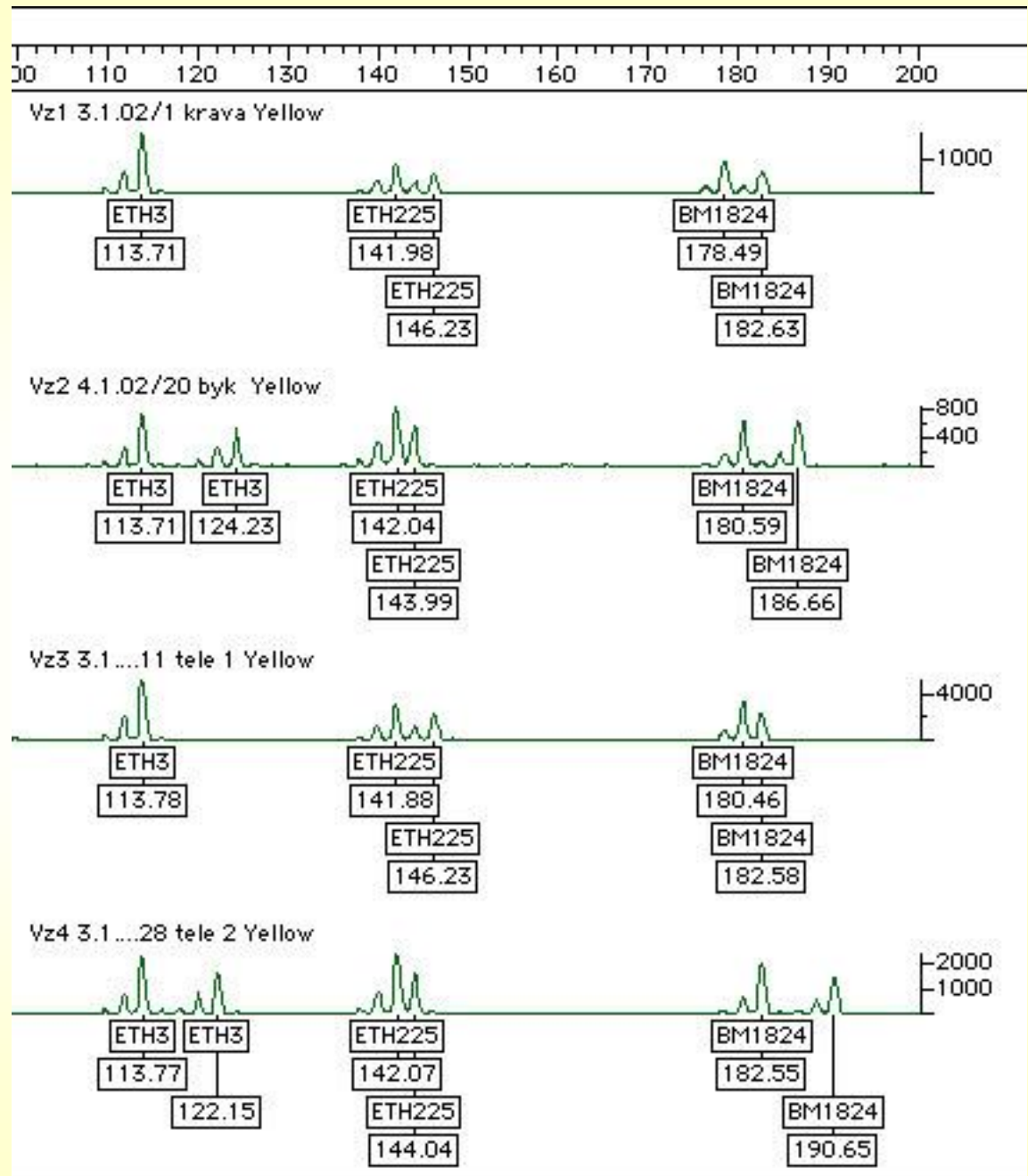
Přístroj: genetický analyzátor ABI PRISM 310



Vyhodnocení -určení parentity

Příklad tří bovinních
mikrosatelitů

kráva, býk, 2 potomci
(tele 2 nepatří býkovi)



Používané mikrosatelity

Prase (10x) – S0068, S0107, SW24, SW840, SW353, SW936, SW353, S0070, SW72, TNFB

Skot (11x) – TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH3, ETH10, ETH225, BM1824, BM2113, INRA23, SPS115

Koně (12x) – HTG4, HTG6, HTG10, HMG7, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, VHL20, AHT4, AHT5, ASB2

Koně (17x) – VHL20, AHT4, HTG4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS2, HMS3, ASB17, LEX3, HMS1, CA425

Pes (10x) - PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079

Frekvence alel:

$$q^A = (2AA + AB) : 2n$$

q^A - frekvence alely A; AA – počet zvířat genotypu AA;
AB – počet zvířat genotypu AB; n – celkový počet zvířat

Genová (alelová) četnost absolutní: $P + Q = 2n$

Genová (alelová) četnost relativní (frekvence alel): $p + q = 1$

Frekvence fenotypů; frekvence genotypů

Rovnováha populace (Hardy-Weinbergova rovnováha):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, \text{ tj. : } (q^A)^2 + 2 \cdot q^A \cdot q^B + (q^B)^2 = 1$$

q^A - frekvence alely A

q^B - frekvence alely B

Statistika ověření metody

Polymorphism information content (PIC)

-vyjadřuje informativnost polymorfních markerů

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^k x_i^4$$

Teoretická heterozygotnost (1 lokus):

x_i – frekvence i-té alely

$$h = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Paternity exclusion (1 rodič se ověřuje)

-pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů

$$PE(1) = 1 - 2 \sum_{i=1}^k x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^k x_i^4$$

One parental genotype unavailable

-pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li genotyp jednoho z rodičů neznámý

$$PE(2) = 1 - 4 \sum_{i=1}^k x_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^k x_i^3 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^4$$

Parentage exclusion

-pravděpodobnost vyloučení obou rodičů, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů

$$PE(3) = 1 + 4 \sum_{i=1}^k x_i^4 - 4 \sum_{i=1}^k x_i^5 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 8 \sum_{i=1}^k x_i^2 \sum_{i=1}^k x_i^3 + 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^3 \right)^2$$

Platí, že $PE(3) > PE(1) > PE(2)$

Combined exclusion probability (CEP):

$$CEP = 1 - (1 - PE_1)(1 - PE_2)(1 - PE_3) \dots (1 - PE_k)$$

Vliv frekvence a počtu alel

Počet alel	Frekvence alel	Heterozygotnost	PIC	PE1
2	0,5 : 0,5	0,50	0,38	0,19
2	0,3 : 0,7	0,42	0,34	0,17
2	0,9 : 0,1	0,18	0,16	0,08
2	0,99:0,01	0,02	0,02	0,01
5	0,9 : 0,025 : 0,025 : 0,025 : 0,025	0,19	0,18	0,10
5	0,2 : 0,2 : 0,2 :0,2 : 0,2	0,80	0,77	0,60
10	10 x 0,1	0,90	0,89	0,79

Typy genových map

- a) vazbové (genetické, rekombinační) mapy
- b) cytogenetické (chromozómové)
- c) mapování na somatickém hybridním panelu (SCH)
- d) mapování na radiačním hybridním panelu (RH panel)
- e) srovnávací (komparativní) mapy
- f) sekvence genomu

a) Vazbové mapy

založené na analýze genetické vazby

Morganova pravidla:

1. Geny jsou na chromozómech uspořádány lineárně za sebou.
2. Počet vazbových skupin se rovná haploidnímu počtu chromozómů.

Vazbová skupina – blízké umístění genů (markerů) na jednom chromozómu, přičemž pravděpodobnost pozorovaných rekombinant mezi nimi je menší než 50%.

Pravděpodobnost výskytu crossingoverů - θ (theta).

Úplná vazba – žádné crossingovery ($\theta = 0$)

Neúplná vazba ($0,5 > \theta > 0,0$)

Volná kombinovatelnost ($\theta > 0,5$)

1cM (centiMorgan) – vzdálenost dvou genů (markerů), mezi kterými se vyskytuje 1% rekombinací.

Rekombinační frekvence – počet rekombinant dělený celkovým počtem potomků.

Syntenní skupina – geny (markery) lokalizované na stejném chromozómu.

Haplotyp – konkrétní sestava dvou a více alel na jednom z homologních chromozómů.

Vazbové mapy

Vazbové (genetické, rekombinační) mapy

udávají informaci o pořadí genů a anonymních markerů na chromozomu a relativní vzdálenosti mezi nimi v cM (1 cM=1% rekombinací).

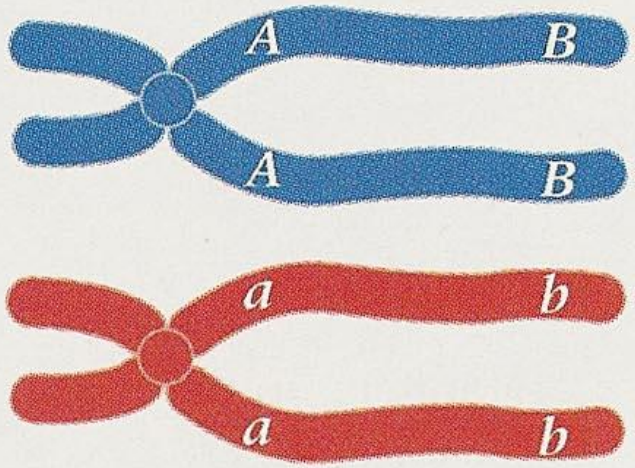
- pouze u polymorfních lokusů
- meiotické crossing-over = síla genové vazby

tzv. referenční rodiny- třígenerační; speciálně připravené u lidí složitější rodokmeny (vyj. mapování pomocí spermií)

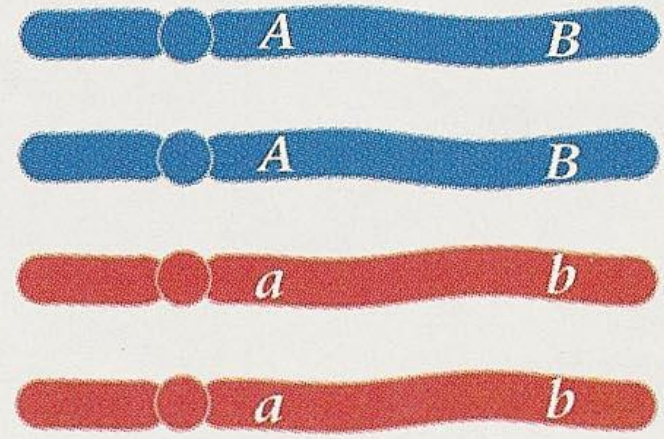
Problém: >25 cM dvojité C-O, rozdíly mezi pohlavím ale i populacemi

Crossing-over

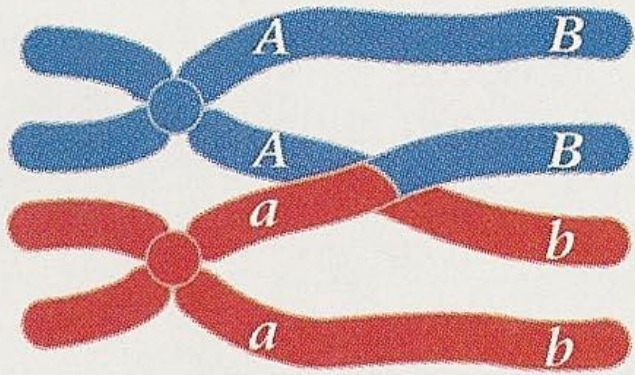
(A)



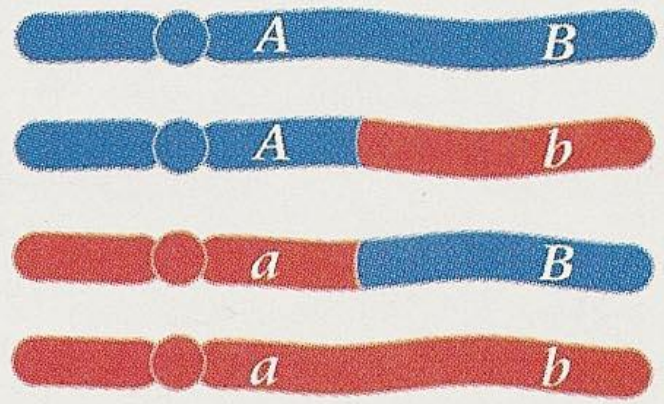
*meióza bez
crossing-overu*



(B)



*jednoduchý
crossing-over*



Mapping of genes

A.....B.....C

r_{AB}

r_{BC}

-
- Determine recombination fraction
- Distance is proportional to % recombination

Results:

Metric units

25	recombination (%)
34.7	Haldane map function (cM)
27.5	Kosambi map function (cM)

Calculate

Reset

Information

Numbers may be entered with decimal point, but whether you should do this with a period "." (American system) or a comma "," (continental system) depends on how your browser is configured. Results are returned in the American system.

The Haldane mapping function allows for the fact that some recombinant gametes arise from triple, quintuple (etc etc) crossovers while some parental gametes arise from double, quadruple (etc etc) crossovers. The Kosambi mapping function also allows for all that, plus negative interference (the fact that occurrence of a crossover makes another nearby crossover less likely). The Kosambi function is recommended for genetic mapping in Arabidopsis.

In Microsoft® browsers, entering non-numerical characters in any field may generate an error message. Netscape® browsers are preferable for viewing this page and site.

This calculator is provided "as is" without express or implied warranty. It may not give accurate results on all browsers and under all conditions. Do not rely on its results if any material harm or mental anguish could result from an incorrect calculation.

To perform a basic check for satisfactory function: enter 11 in the recombination field and press Calculate. The results should be:

- Haldane: 12.4 cM
- Kosambi: 11.2 cM

Haldaneho mapovací funkce bere v úvahu skutečnost, že některé rekombinantní gamety vznikají trojitými, pětinasobnými, atd. crossovery, zatímco některé gamety, které odpovídají rodičovským gametám, vznikají dvojitými, čtyřnasobnými, atd. crossovery.

Kosambiho mapovací funkce bere v úvahu totéž, ale navíc uvažuje **negativní genetickou interferenci** (skutečnost, že při výskytu crossoveru v určitém místě je nepravděpodobný výskyt jiného crossoveru v jeho blízkosti).

The Kosambi function is:

$$d_M = \frac{1}{4} \ln \left[\frac{1+2r}{1-2r} \right]$$

d_M is the distance between a pair of markers in Morgans
 r is recombination frequency between a pair of markers

Zjišťování vazby metodou Lod skóre

(zkratka z Log = logaritmus; odds = ang. šance ve prospěch; zde pro převahu pravděpodobnosti;

Skóre = poměr rekombinant k nerekombinantám).

Jde o statistickou metodu pro detekci vazby z poměru dvou pravděpodobností. V čitateli je hodnoceno konkrétní skóre ve prospěch existence vazby a ve jmenovateli je zvažováno skóre jako by vazba neexistovala (viz vzorec níže).

Skóre z potomstev se vypočítává v sérii rekombinačních frakcí, např. $\theta = 0,01; 0,02; 0,03 \dots 0,48; 0,49$. Výsledky relativních pravděpodobností z různých rekombinačních frakcí (θ) se převedou na dekadický logaritmus, a to je vlastní Lod skóre označované písmenem Z. Z se počítá pro různá potomstva zvlášť takže výsledkem je hodnota ΣZ , ke které lze kdykoliv připočítávat další zjištěné hodnoty Z. Existuje několik počítačových programů pro výpočet Lod skóre. Pro hrubší orientační stanovení θ (po 5 cM) lze použít hotové tabulky. Jestliže $\Sigma Z \geq +3$, existuje pravděpodobnost 1000:1 pro existenci vazby. Je-li $\Sigma Z \leq -2$, geny jsou volně kombinovatelné. Jestliže je $-2 < Z < +3$, není možno rozhodnout a je třeba doplňovat údaje z dalších potomstev.

$$\Sigma z = \log \frac{P(0 < \theta < 0.5)}{P_{0,5}}$$

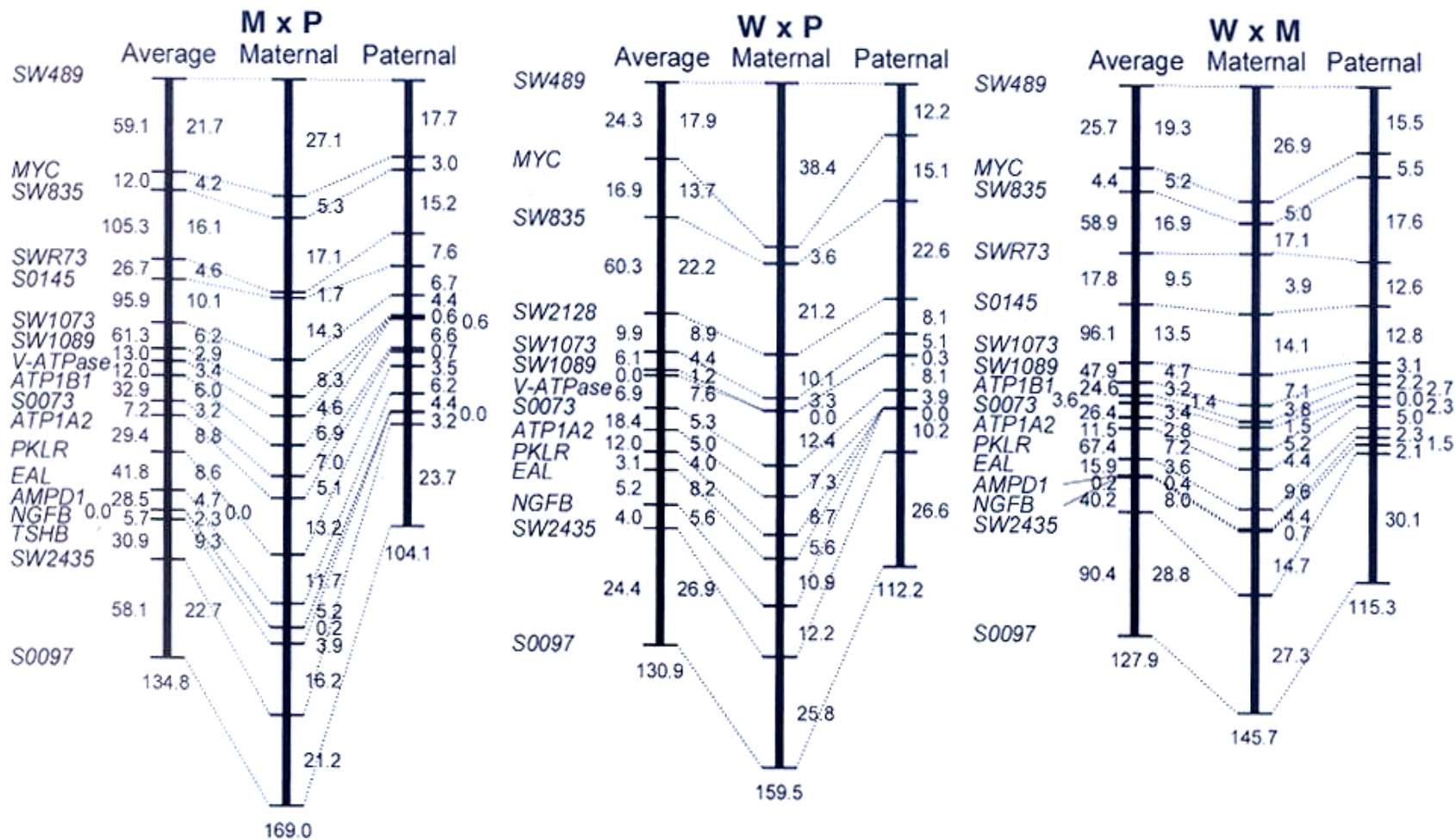
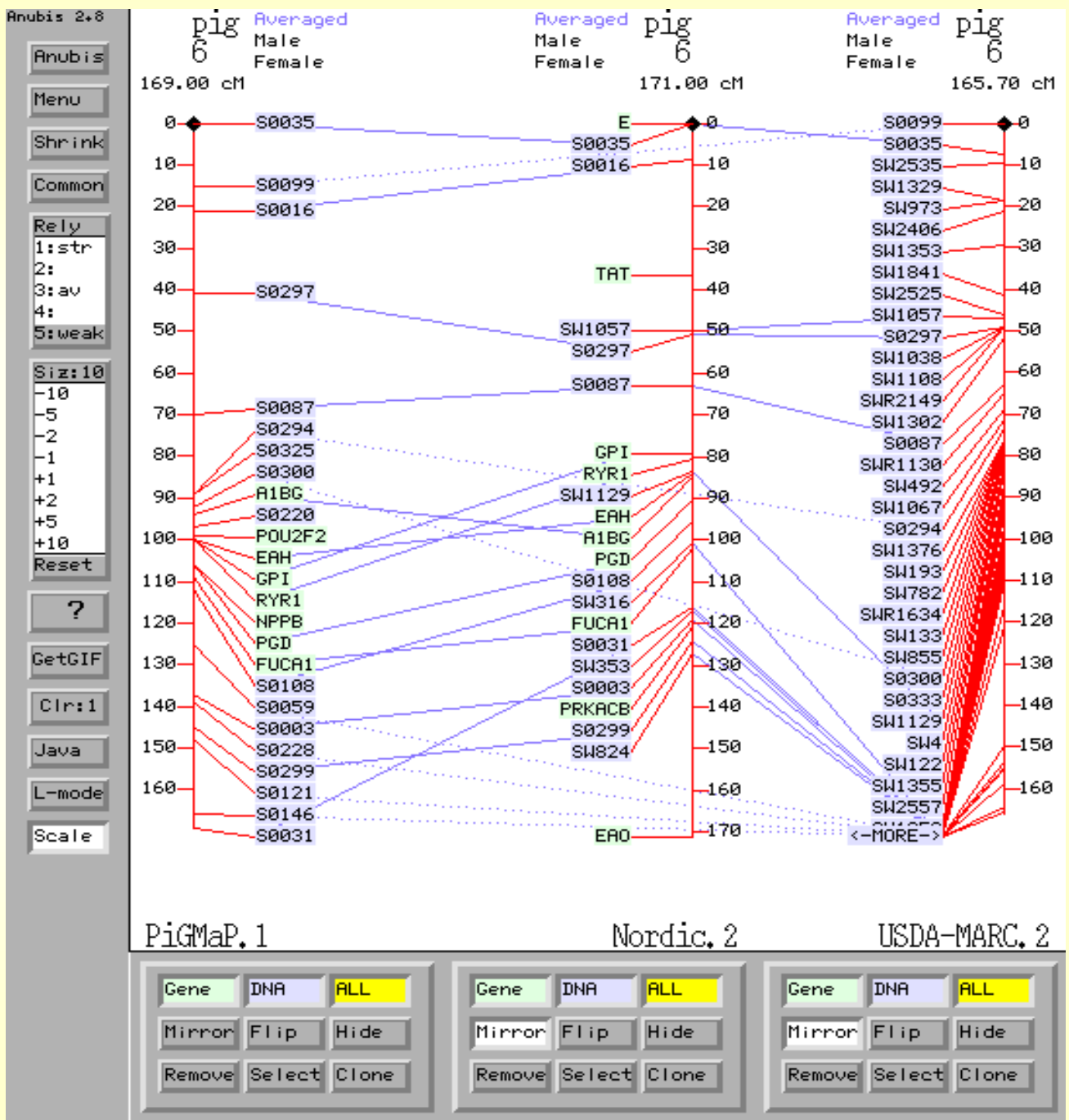


Fig. 2. Genetic linkage maps of SSC4. For each family the sex-averaged (left), maternal (middle) and paternal (right) maps are shown with the estimated Kosambi map distances (cM) between loci (numbers at right hand side of the maps). To the left hand side of the sex-averaged maps the statistical supports for the pair-wise order of markers are given. The total lengths of the maps are indicated at the bottom of each bar

Srovnání vazbových map



Vazbové mapy u prasete

PiGMaP (Pig Gene Mapping Project)

- 18 evropských laboratoří + Austrálie, JAP, USA
- 5 F₂ rodin divergentních plemen (Skotsko, F, NL: MxLW(Y), Švédsko: WxY, Něm: MxP, WxM, WxP)

Nordic: sev. země

USDA (United States Department of Agriculture)

- USDA-MARC2 (U.S. Meat Animal Research Center)

NIAI (Japonsko)

b) Cytogenetické mapy

syn. **Chromozómové; fyzické**

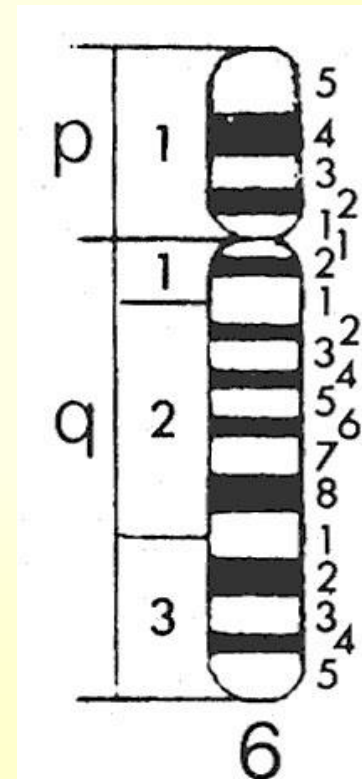
- studium karyotypu, fyzické umístění genů na chromozomech a jednotlivé vzdálenosti mezi nimi

Identifikace chromozomů

- velikost, tvar a specifické barvení ('pruhování')

Poloha genu na chromozomu:

např. **LIPE SSC6q12**



Chromozómy

centromera, telomera

p raménko (krátké; =petit), q raménko (dlouhé)

chromozómy: - metacentrické

- **submetacentrické**
- **telocentrické, akrocentrické (pouze s jedním raménkem)**
- **subtelocentrické (jedno raménko znatelně kratší)**

počet, tvar, velikost → karyotyp

idiogram – schematické znázornění ideální stavby chromozómů

autozómy, pohlavní chromozómy (heterochromozómy, gonozómy)

G pruhování (Giemsovým barvivem)

Q pruhování (barvení chinacrinem)

R pruhování (reverzní pruhy ke G nebo Q)

This site is hosted at *The Roslin Institute* using funds from **BBSRC**

[Home](#)

[Help](#)

[History](#)

[Code](#)

[Credits](#)

[Maps](#)

[Search](#)

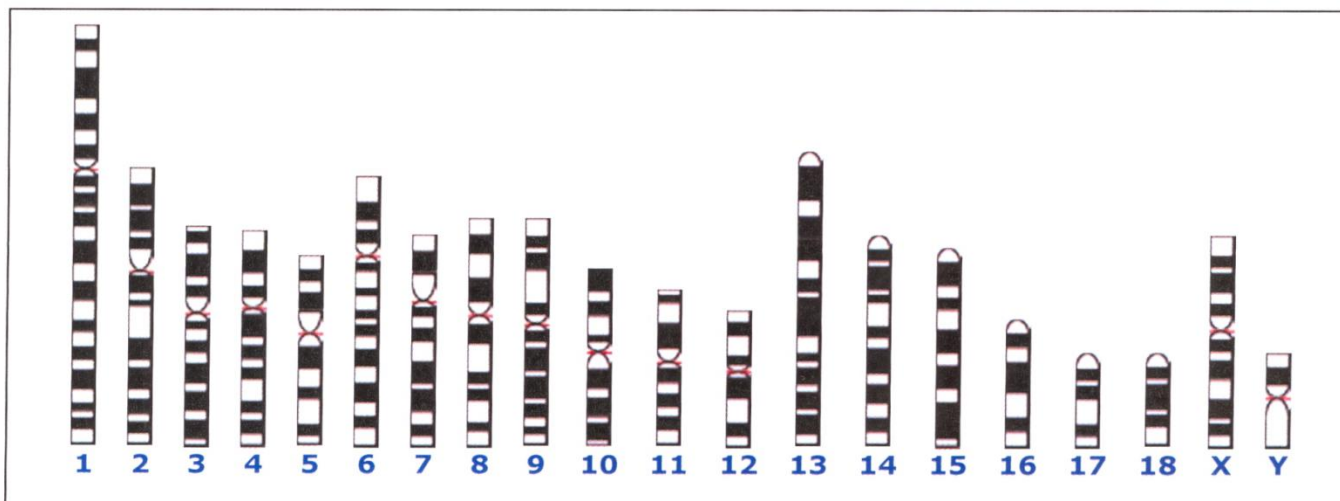
[ArkMAP](#)

[Web Services](#)

[Release Notes](#)

pig (*Sus scrofa*)

Chromosome Karyotype



Contact: info@thearkdb.org

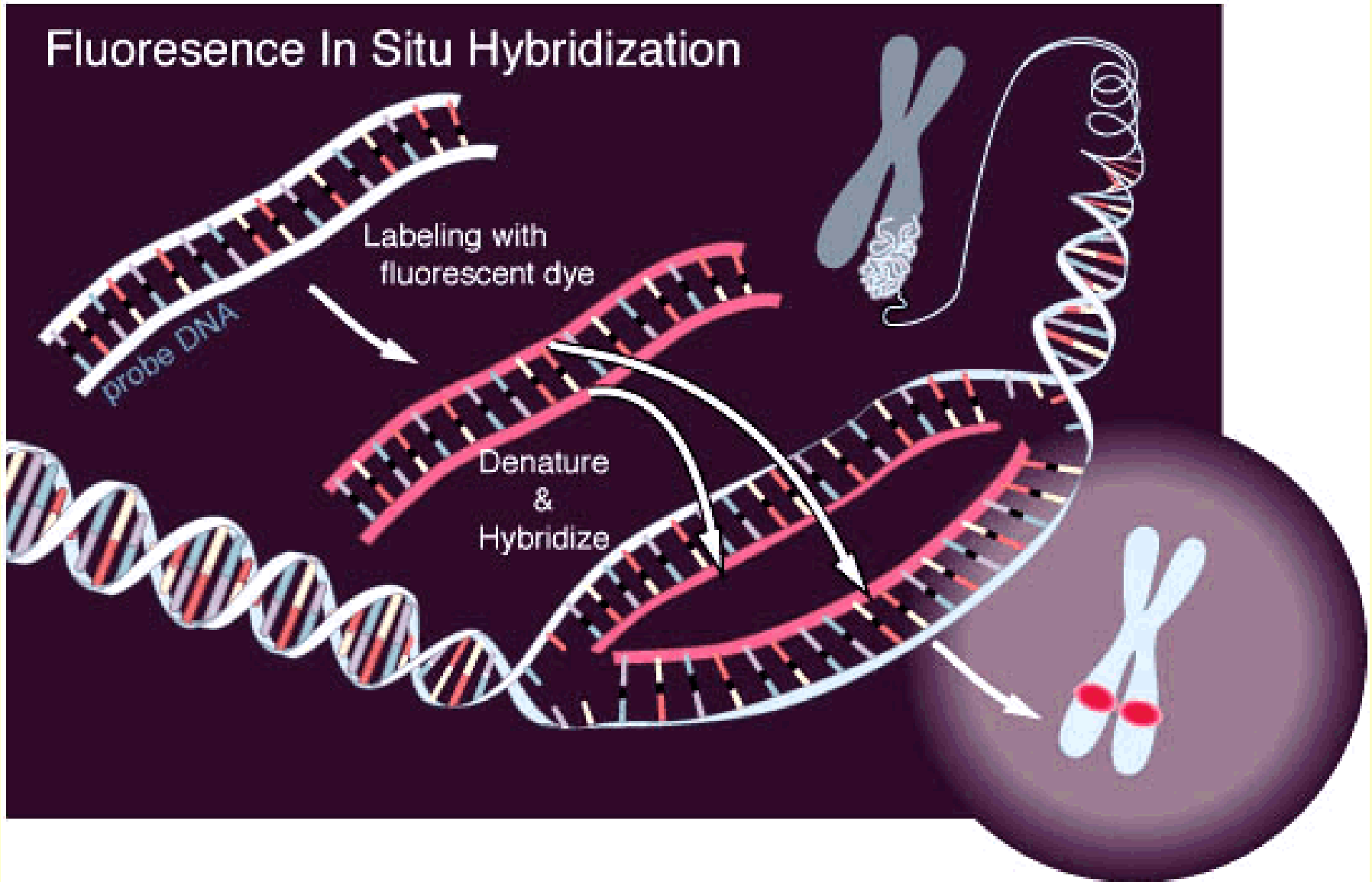
[Report problems with this page](#)

© The Roslin Institute 2007-2010, all rights reserved

Diploidní počet chromozómů některých druhů

Druh	2n
Člověk	46
Myš	40
Kůň	64
Prase	38
Skot	60
Koza	60
Ovce	54
Pes	78
Kočka	38
Králík	44

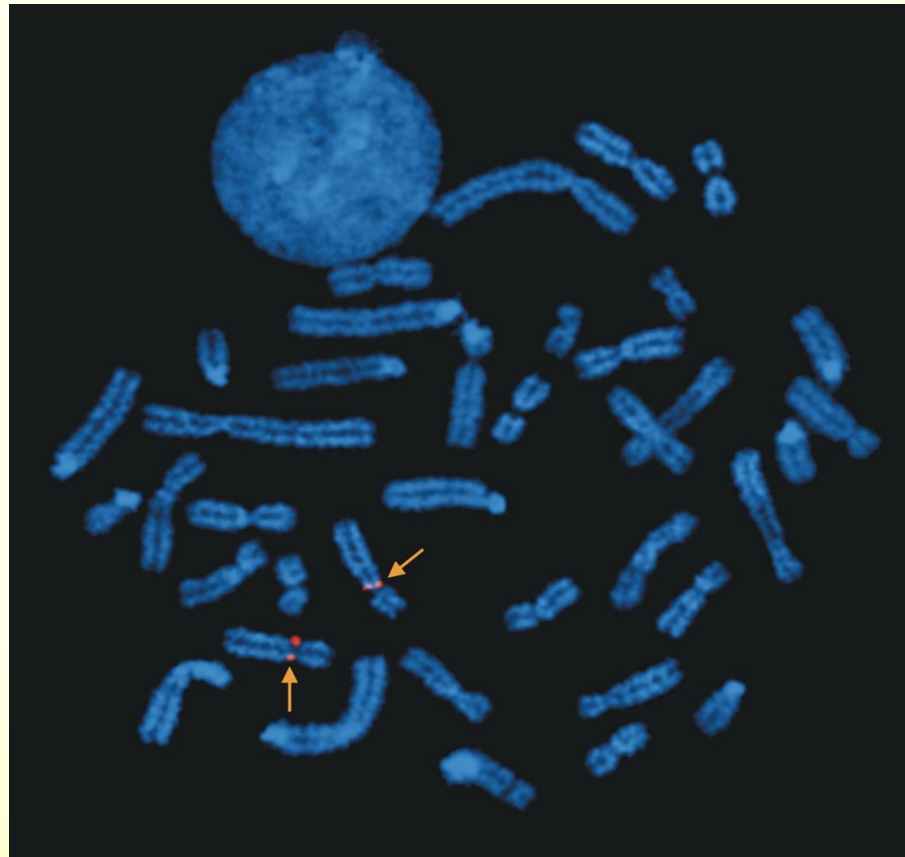
Cytogenetické mapování



RISH – radioactive in situ hybridization

FISH – fluorescence in situ hybridization

Chromosome assignment of ASPN to porcine chromosome SSC3q11 using FISH and the BAC253B1 as probe

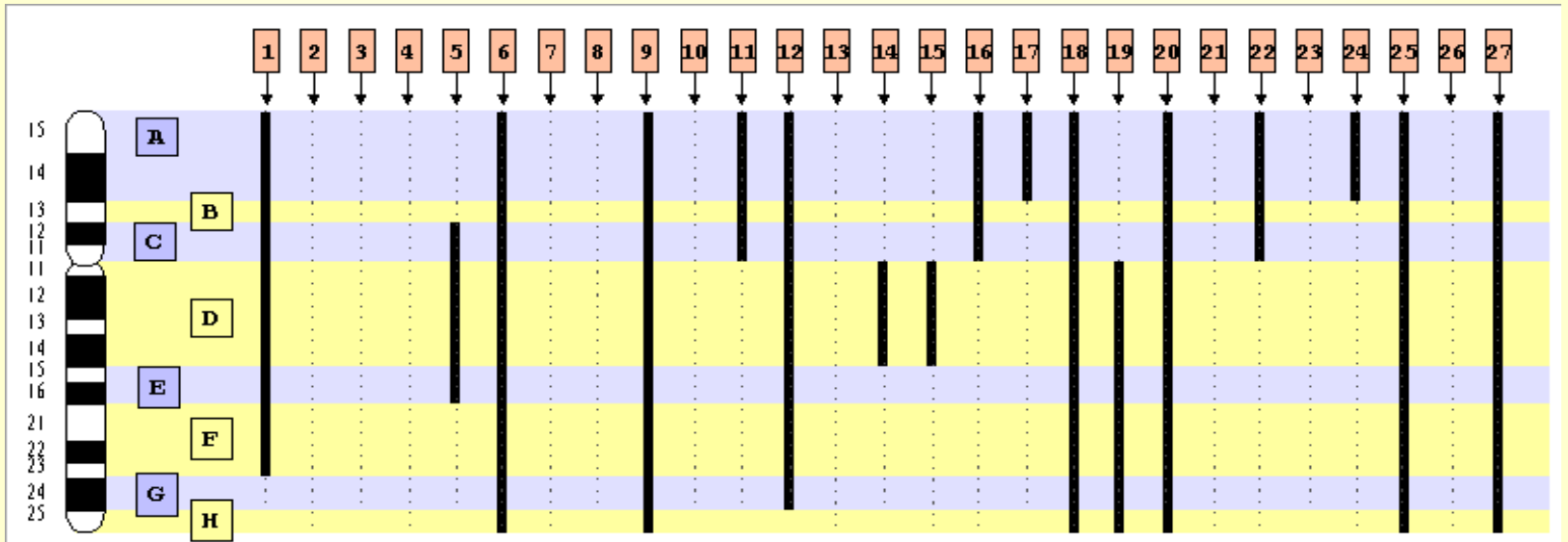


c) SCH a RH mapy (somatický hybridní panel a radiační hybridní panel)

somatický hybridní panel: analýza hybridních somatických buněk. Fúze buněk dvou druhů (myš x prase) – hybridní buňky ztrácející chromozomy zkoumaného druhu, stabilizace když je obsažen jen 1 cizí chromozom (nebo fragment) – klon. Panel je pak kolekce těchto různých klonů.

radiační hybridní panel: linie buněk obsahujících určitý cizí chromozom se ozáří – její chromozomy se rozpadají. Pak se fúzuje s linií recipienta a vytvoří klony, kde každý obsahuje určitou část chromozomu zkoumaného druhu.
Výhoda: až 5x podrobnější než vazbové mapy.

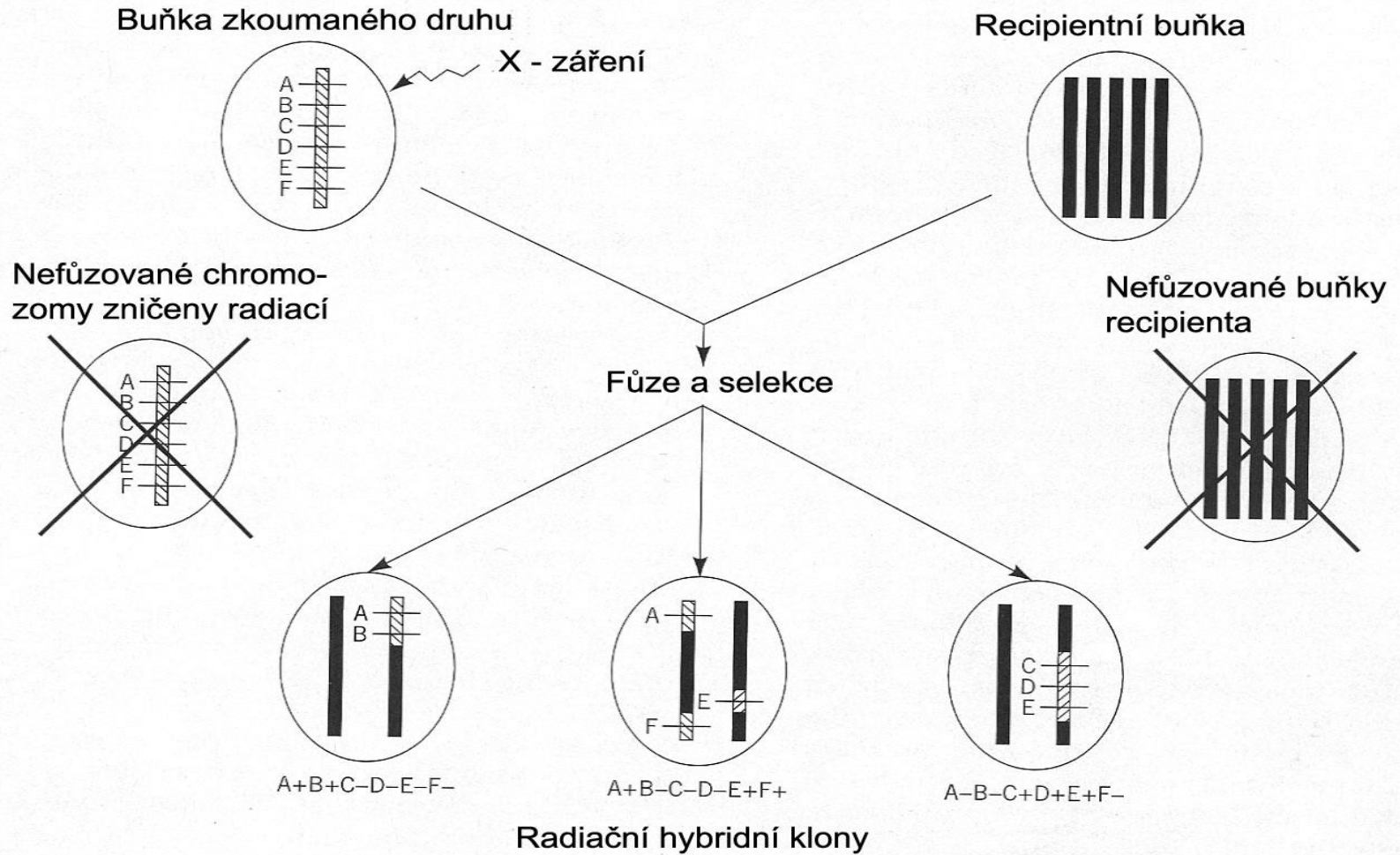
Somatic cell hybrid panel



SSC4

Pig chromosome 4

Radiační hybridní panel



Mapping of LMNA

Reference map :

Hawken et al. (90 Hybrids)

PCR data :

0001100010011000000100000000010000001000

000000000000000000010000110000000001111001

0010011111

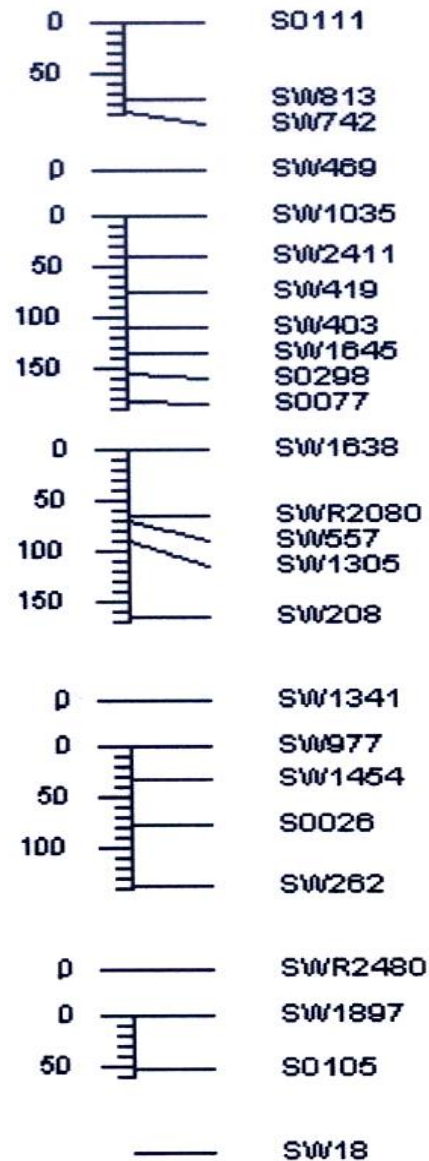
Retention fraction : 24 %

Results observed on the RH panel :

Identification of best location by : *Minimization of breakage number*

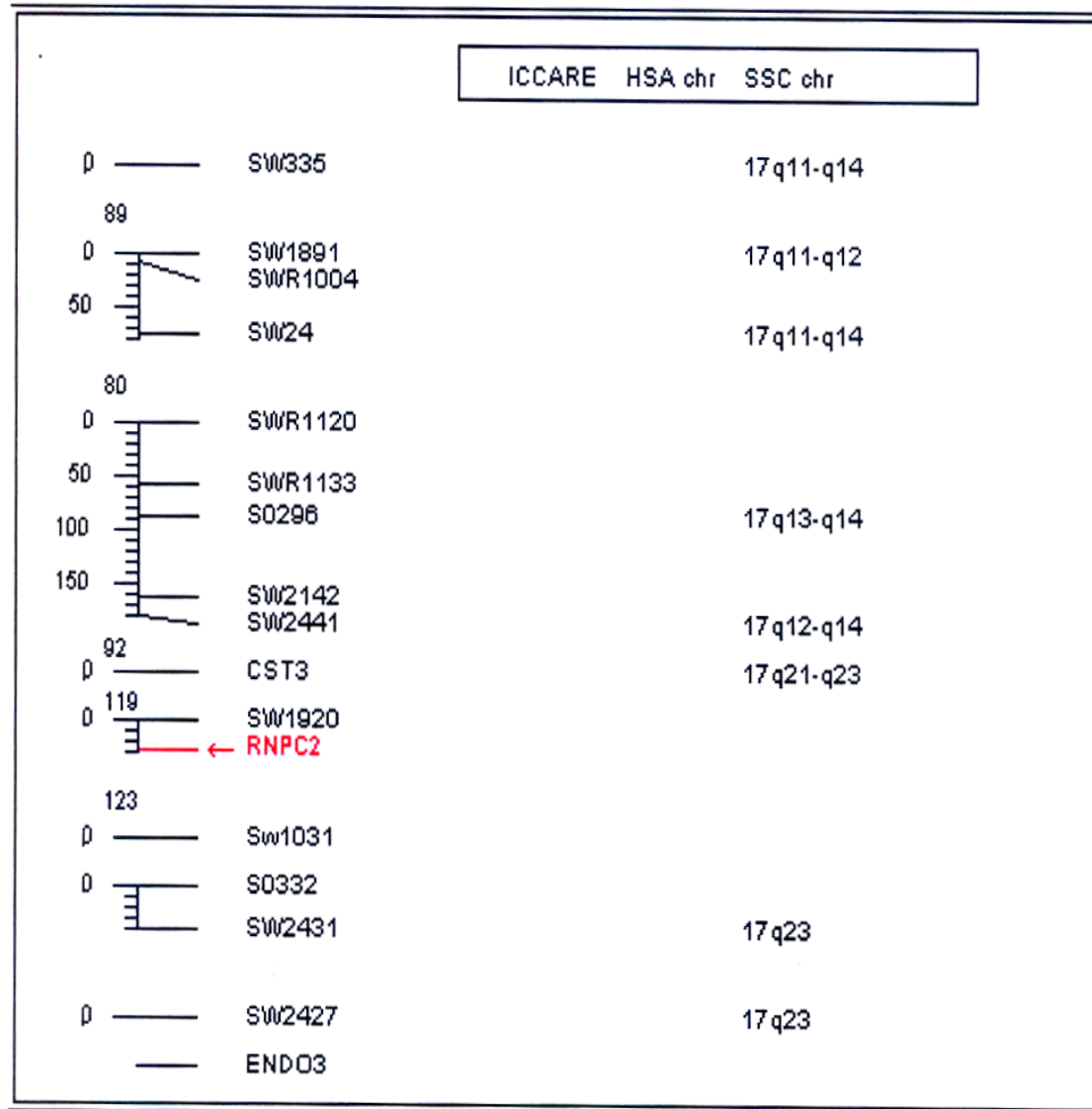
Order	Chr.	Diff. break	Markers
1	4	-	SW2404 S0227 SW480 SW2509 SW489 SW835 S0301 S0001 SWR73 SWR2179 SW1492 SW969 SW871 SW1707 SW2128 SWR362 SW1520 SW1513 SW1003 SW317 SWR981 SW45 SW35 SW1336 SW1073 SW1475 SW839 SW724 S0107 SW1089 MOS SW841 SW1364 SW589 SW286 SW1996 S0214 SW270 LMNA SW512 SW2435 SW818 SW1710 SW445 SW58 S0097 S0161 SW1461 SWR153
2	4	4	SW2404 S0227 SW480 SW2509 SW489 SW835 S0301 S0001 SWR73 SWR2179 SW1492 SW969 SW871 SW1707 SW2128 SWR362 SW1520 SW1513 SW1003 SW317 SWR981 SW45 SW35 SW1336 SW1073 SW1475 SW839 SW724 S0107 SW1089 MOS SW841 SW1364 SW589 SW286 SW1996 LMNA S0214 SW270 SW512 SW2435 SW818 SW1710 SW445 SW58 S0097 S0161 SW1461 SWR153
3	4	4	SW2404 S0227 SW480 SW2509 SW489 SW835 S0301 S0001 SWR73 SWR2179 SW1492 SW969 SW871 SW1707 SW2128 SWR362 SW1520 SW1513 SW1003 SW317 SWR981 SW45 SW35 SW1336 SW1073 SW1475 SW839 SW724 S0107 SW1089 MOS SW841 SW1364 LMNA SW589 SW286 SW1996 S0214 SW270 SW512 SW2435 SW818 SW1710 SW445 SW58 S0097 S0161 SW1461 SWR153
4	4	6	SW2404 S0227 SW480 SW2509 SW489 SW835 S0301 S0001 SWR73 SWR2179 SW1492 SW969 SW871 SW1707 SW2128 SWR362 SW1520 SW1513 SW1003 SW317 SWR981 SW45 SW35 SW1336 SW1073 SW1475 SW839 SW724 S0107 SW1089 MOS SW841 SW1364 SW589 SW286 SW1996 S0214 SW270 SW512 LMNA SW2435 SW818 SW1710 SW445 SW58 S0097 S0161 SW1461 SWR153
5	9	6	SWR68 SW21 SW911 SWR1848 LMNA SW827 SW2401 SW940 SW2407 SW2074 SW54 SW1434 SW511 SW1615 SW383 SWR250 S0109 SW2571 SW539 SW1677 SW1491 S0081 SWR1950 S0119 S0095 SWR1939 SSC8B04 SWR915 SW944 SW866 SWR123 SW1006 S0019 SW989 SWR1357 SW1435 SW2093 SW174 SW749 SW1651

IMpRH – porcine chromosome 16 (118 hybrids)

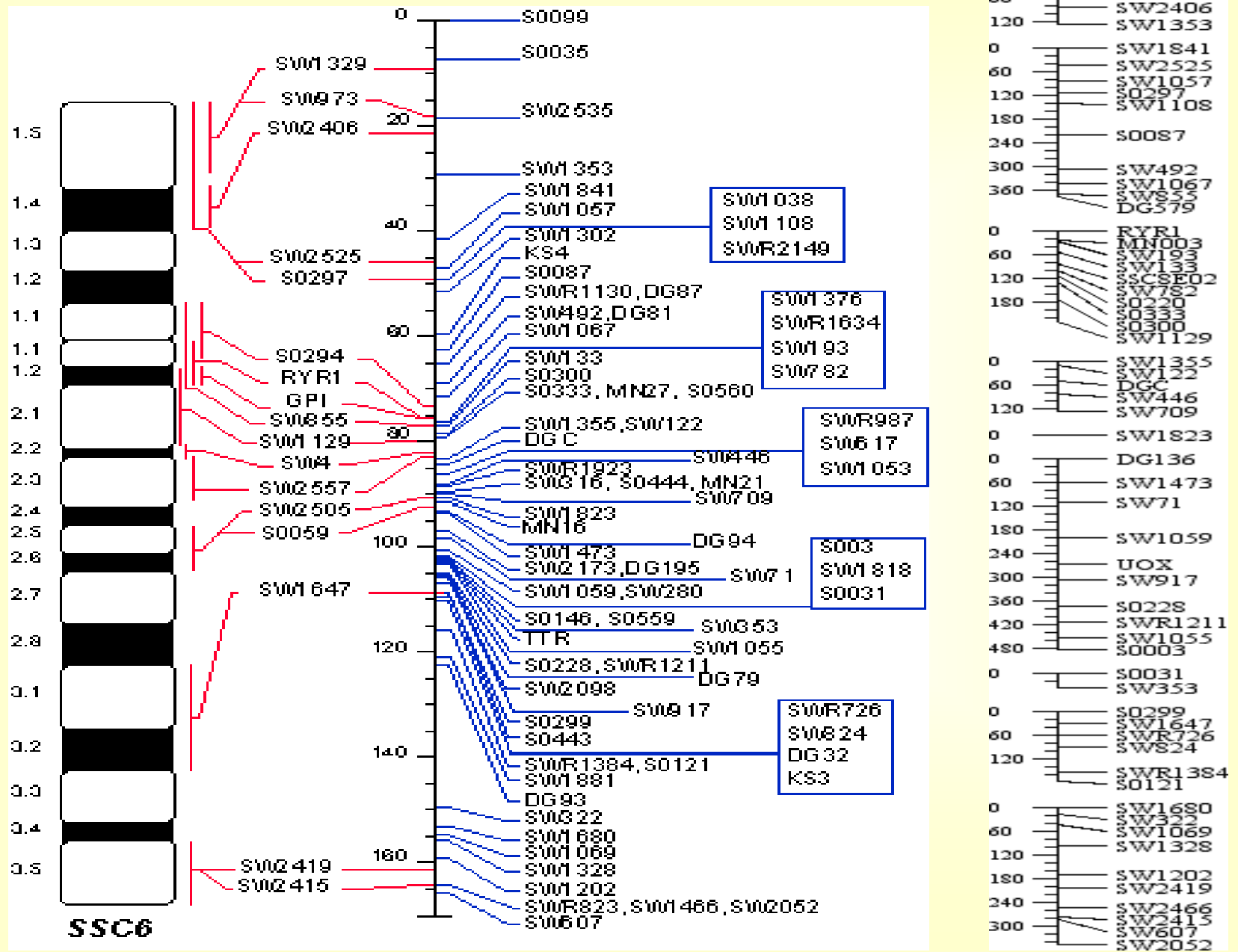


Mapping of RNPC2:

Chromosome 17 map :

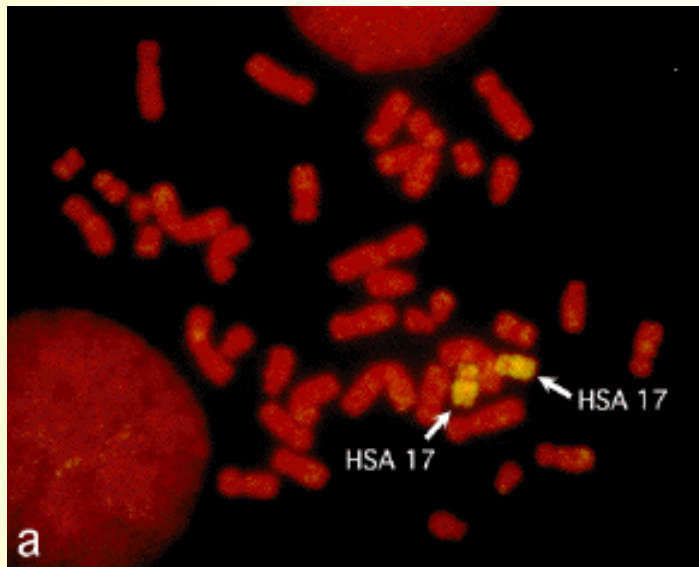


Mapování genomu

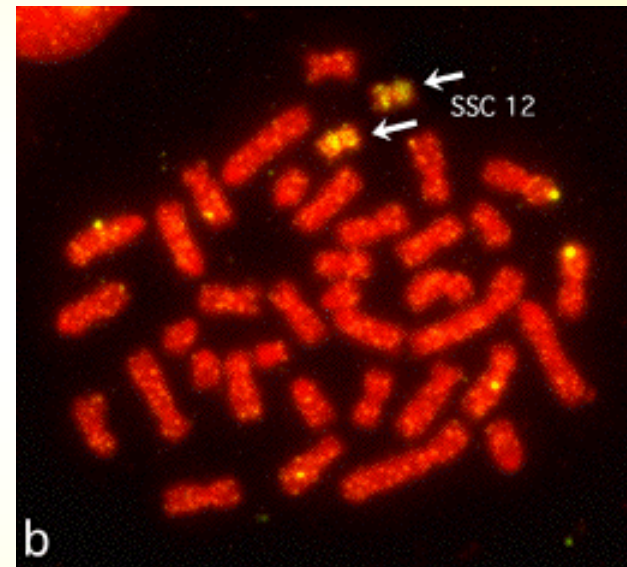


An example of bidirectional painting

Bidirectional painting between SSC12 and HSA 17



HSA 17 labelled by a PARM-PCR SSC12 probe



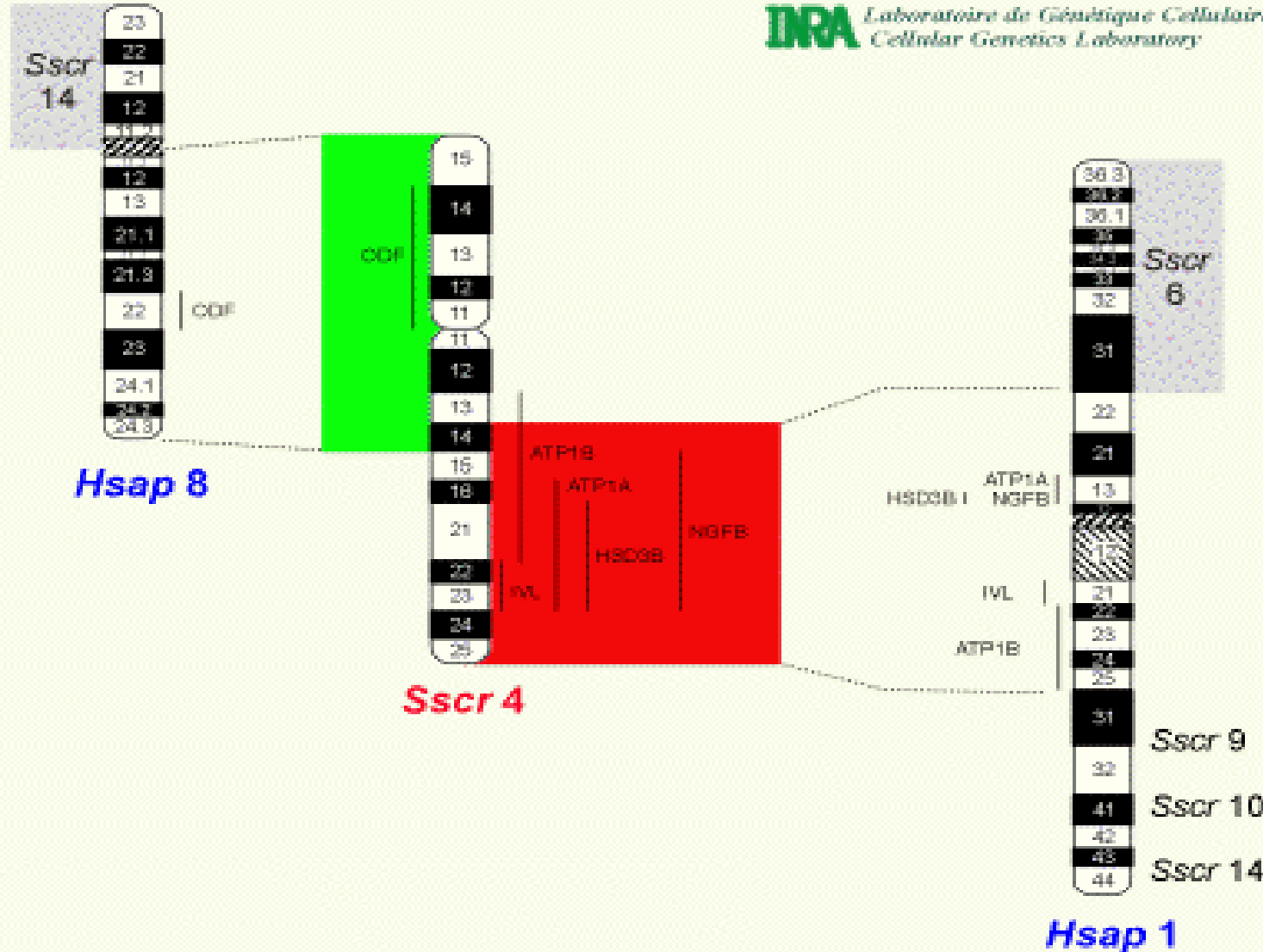
SSC12 labelled by DOP-PCR HSA 17 probe

These two slides demonstrate the interest of bidirectional heterologous hybridisation to establish segment-to-segment matches between porcine and human chromosomes.

The porcine chromosome **SSC12** used as probe (PARM-PCR) on human metaphase, gave an hybridisation signal on the entire **HSA 17** chromosome and no signal on other chromosomes (Fig. a). The reverse hybridisation using **HSA 17** as probe (DOP-PCR, Cambio) on porcine chromosomes gave a signal only on the entire **SSC 12** (Fig. b). So we conclude that there is correspondence between these two chromosomes over their entire length as reported in this [drawing](#).

Komparativní mapa (SSC 4) (heterologní chromozómové barvení)

IRA *Laboratoire de Génétique Cellulaire*
Cellular Genetics Laboratory



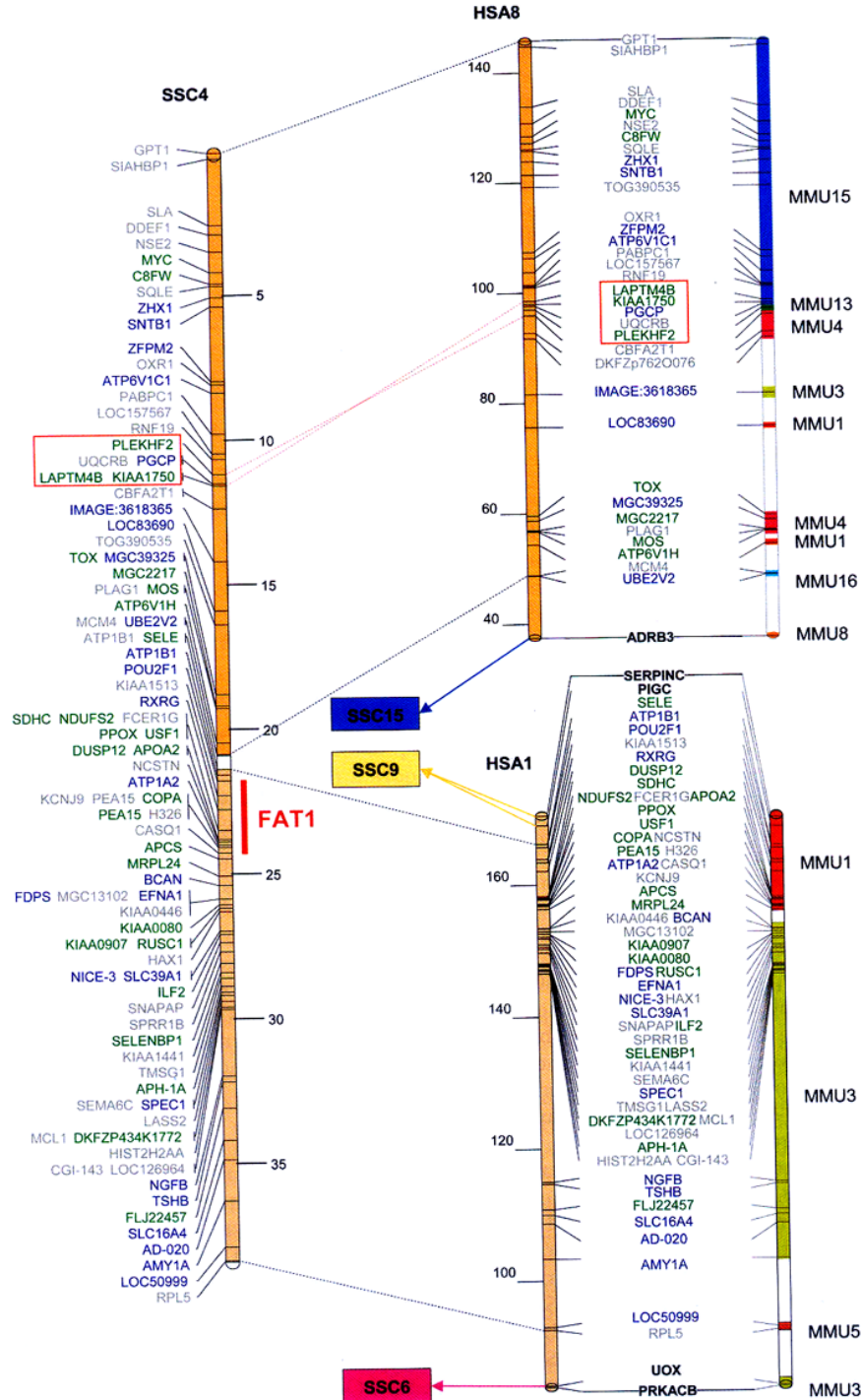
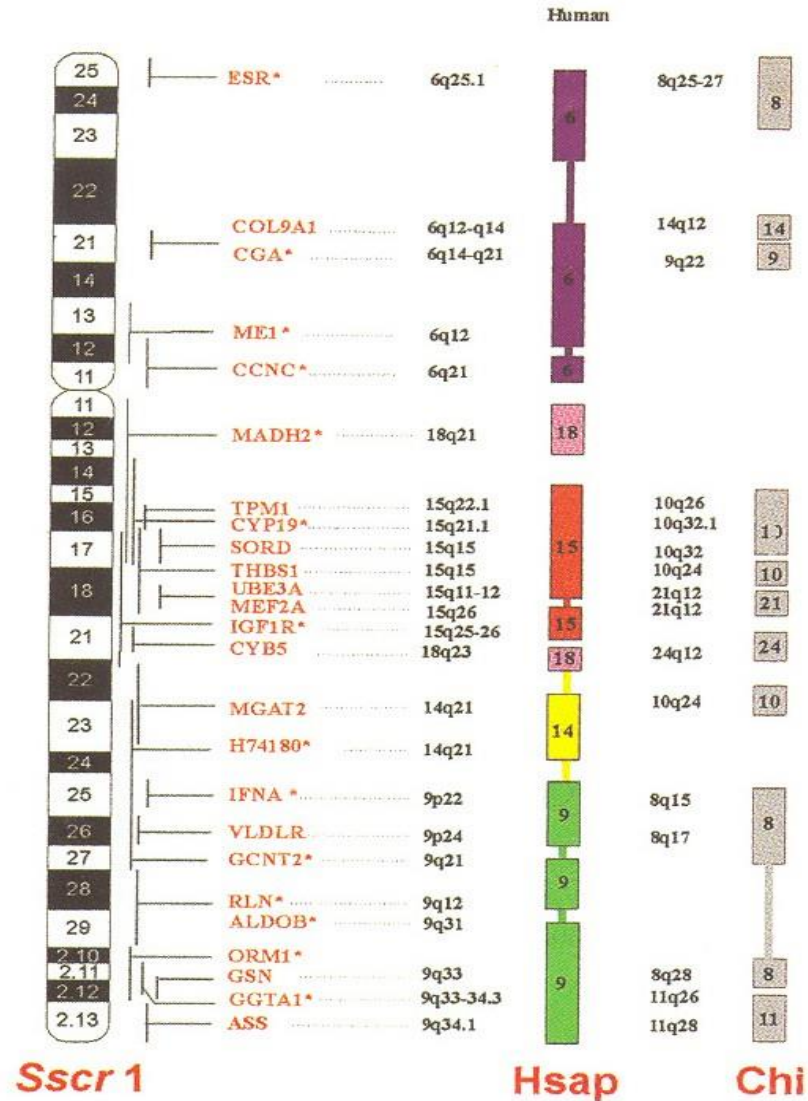


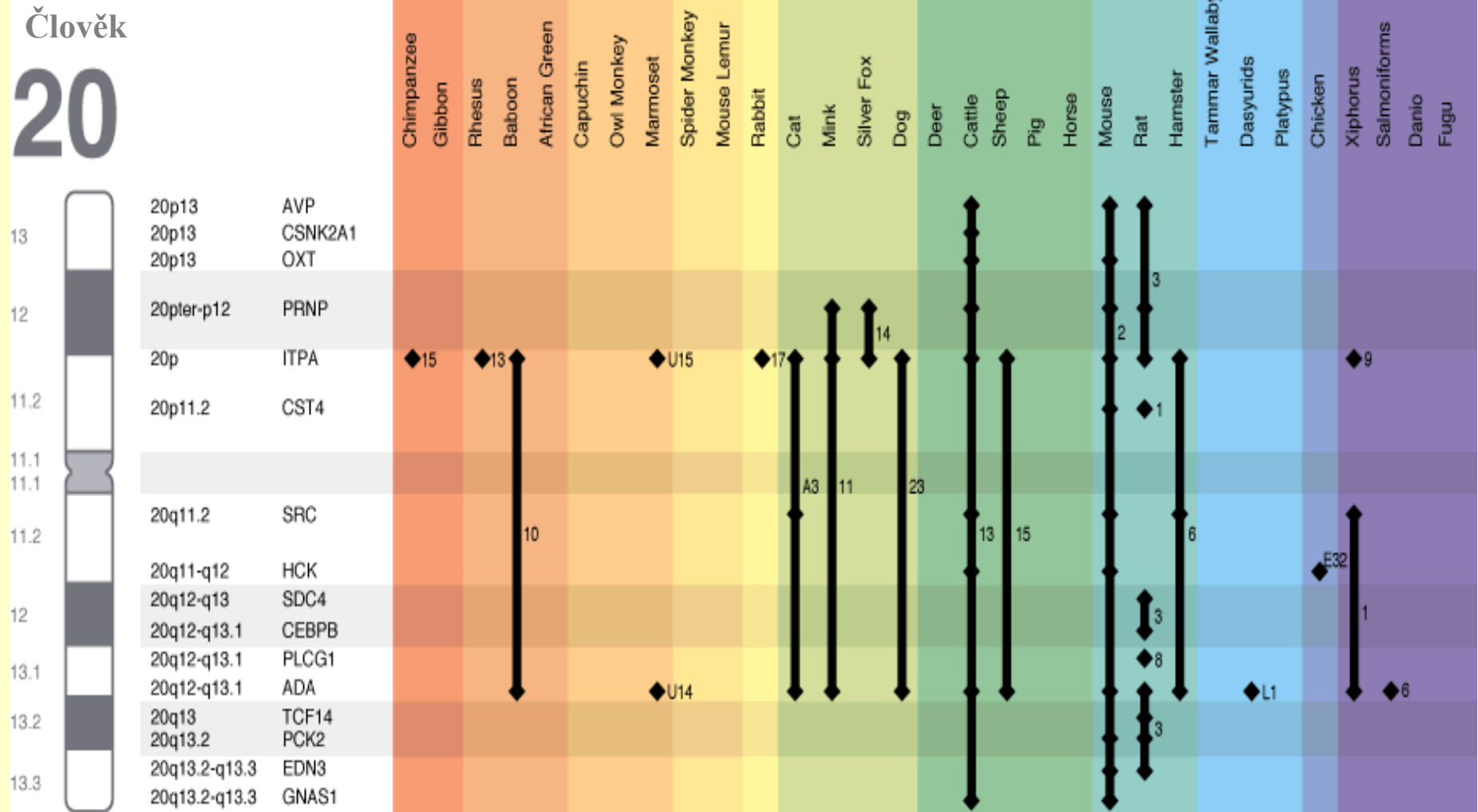
Fig. 3. A comparative map of SSC4, HSA1/HSA8, and mouse chromosomes. The porcine distances are given in Rays and the human in Mbp. The color coding for the mouse chromosomes are according to the UCSC genome database (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). The boxed genes indicate a possible inversion of the gene order between the porcine and human genomes. The location of the *FAT1* QTL is shown as a bar on the SSC4 physical map.

Komparativní mapa (prase-člověk) chromozomu 1 prasete



Srovnávací mapy II

Různé druhy obsahují segmenty odpovídající HSA20 na různých chromozomech a v různých konzervovaných segmentech



Integrovaná mapa

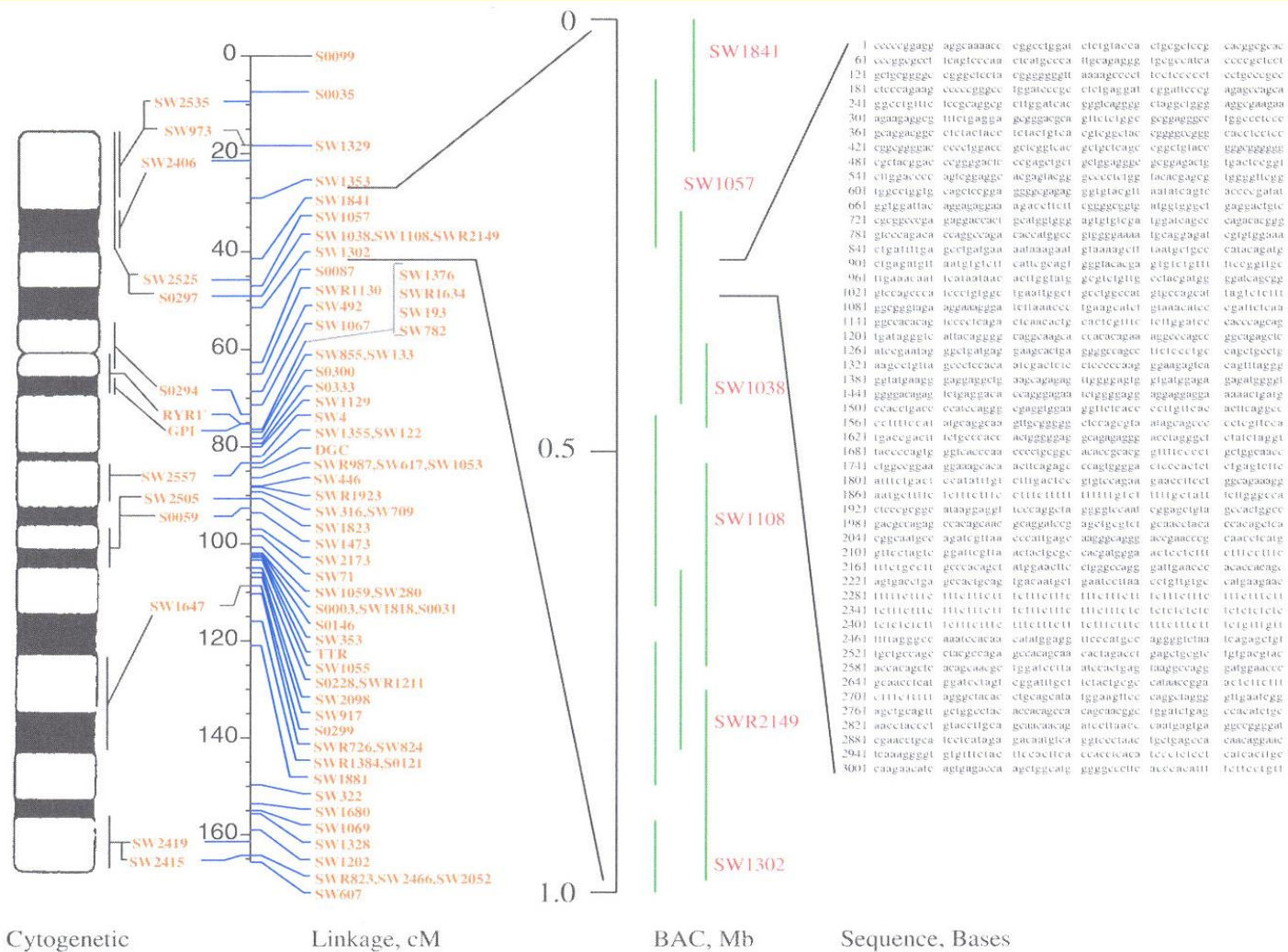


Fig. 1. The diagram represents the four major types of chromosome maps. Above the cytogenetic map is an image of a G-banded metaphase spread of pig chromosome 6. Cytogenetic assignments to specific chromosomal bands based on *in situ* hybridisation are indicated to the right of the chromosome. The genetic linkage map shows the linear alignment of genetic markers and the distances between markers are relative to the amount of recombination between these markers during meiosis (cM). The linkage map and cytogenetic maps are integrated based on markers assigned to both maps (markers between maps). The bacterial artificial chromosome (BAC) map contains a set of BAC clones (indicated by vertical lines to the left of the scale) that overlap each other and distances are usually measured in either kilobases (kb) or megabases (Mb) of nucleotides. The BAC map is integrated with the other maps by determining which BACs contain specific DNA segments (marker names to the right of the BAC clones). Finally, the actual sequence of DNA nucleotides can be determined by sequencing the BAC clones. The BAC map and sequence data presented are hypothetical.

Vybrané databáze užívané v molekulární genetice a genomice (1)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov	databáze sekvencí DNA a proteinů
http://www.ebi.ac.uk	dtto
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html	Explore the Homo sapiens genome
http://www.expasy.ch	databáze proteinových sekvencí
http://www.uniprot.org	dtto
http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/links.shtml	Human Genome Project Information
http://www.genome.ad.jp/kegg/	japonská databáze obsahující metabolické mapy
http://bioinformatics.ubc.ca/resources/links_directory/	bohatý zdroj databází a dalších bioinformačních přístupů
http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/	databáze exprimovaných sekvencí různých druhů (Gene Index)
http://www.genecards.org/index.shtml	exprese genů člověka a další info
http://www.genenames.org/guidelines.html	nomenklatura genů člověka
http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php	dtto
http://www.animalgenome.org/	databáze genomů hosp. zvířat
http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html	databáze QTL prasete
http://omia.angis.org.au/	Online Mendelian Inheritance in Animals
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim	Online Mendelian Inheritance in Man
https://www-lgc.toulouse.inra.fr/internet/	cytogenetika prasete (cytogenet. mapy, RH mapy, SHC panel aj.)

Vybrané databáze užívané v molekulární genetice a genomice (2)

- <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html> PCR troubleshooting
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> vyhledávání homologních sekvencí (DNA a proteinů)
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> porovnání sekvencí
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html> analýza čtecích rámců
- <http://www.bioinformatics.org/sms/index.html> kolekce programů pro analýzu sekvencí DNA a proteinů
- <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> webcutter - štepení restr. enzymy
- http://perso.fundp.ac.be/~lambertc/coursdes1/coursdes_english.shtml#Chap%202.3 seznam serverů s programy pro analýzu sekvencí
- <http://tfbind.hgc.jp/> vazebná místa pro transkripční faktory
- <http://www-genome.wi.mit.edu/science/software/software> seznam programů pro analýzu genomů (včetně programu na navrhování primerů, Primer3)
- <http://nar.oxfordjournals.org/> další cesta: 2008 Database Issue - M.Y.Galperin: Database Summaries - Supplementary Files: Table 1 - MS Word Format
kolekce databází molekulární biologie