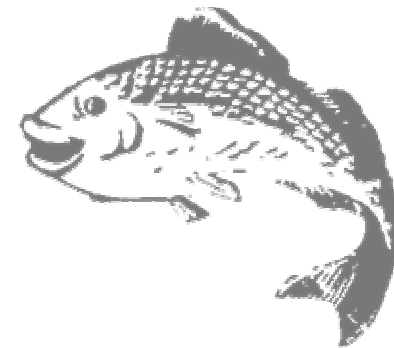


# Seminář „Genetika ryb“



Projekt vznikl za podpory FRVŠ 2030/2007

Zpracovali:

Jana Zrůstová

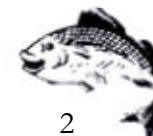
Vít Baránek

Karel Bílek



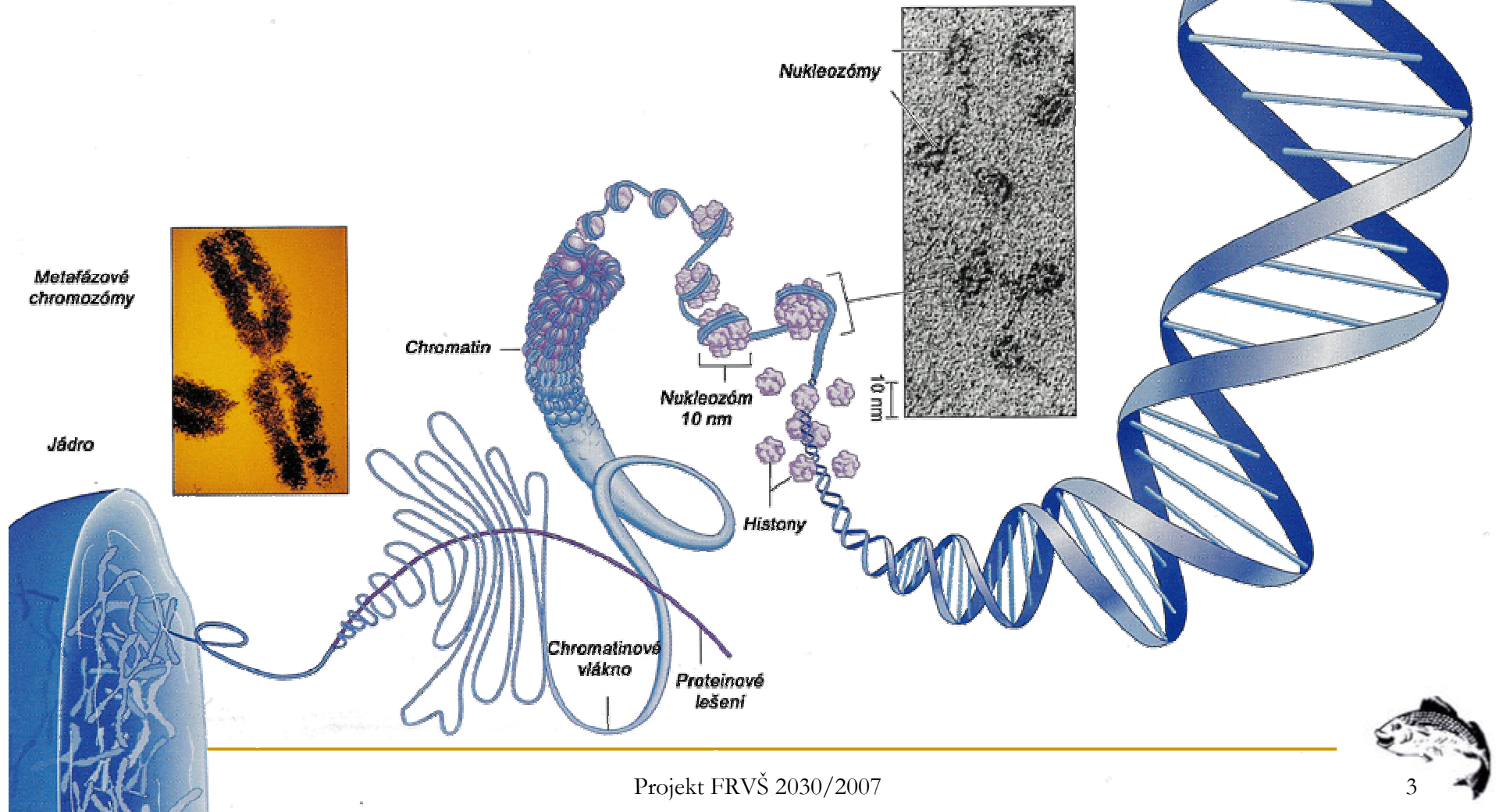
# Osnova semináře „Genetika ryb“

- 9.00 úvod
- 9.10 teorie o DNA + její izolace
- 10.30 popis druhů
- 11.00 pojem genom, gen, teorie o PCR + její provedení
- 12.?? přestávka na oběd
- 13.30 úvod do cytogenetiky ryb
- 14.30 vyhodnocení PCR
- 15.00 transgenní ryby
- 16.00 závěr

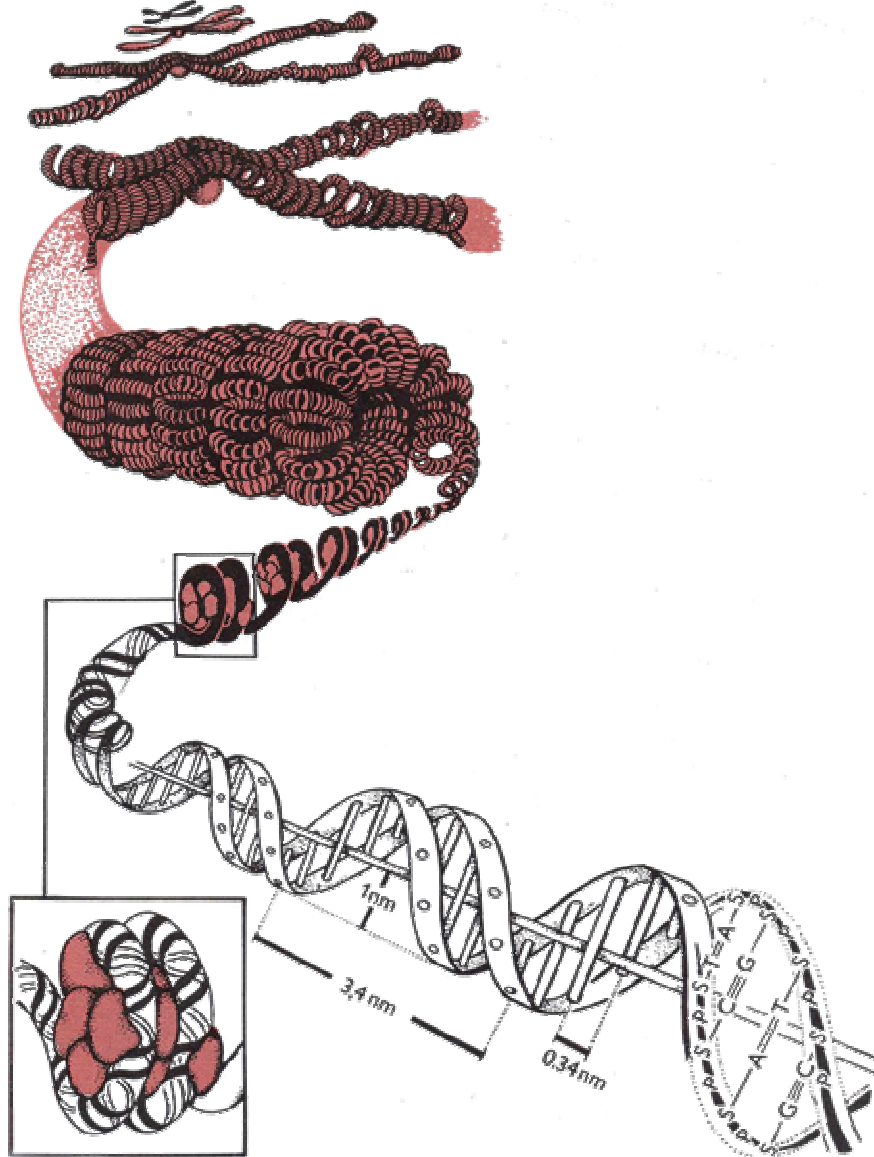


# Lokalizace jaderné DNA u eukaryot

Holá DNA  
histony odstraněny



# Struktura DNA

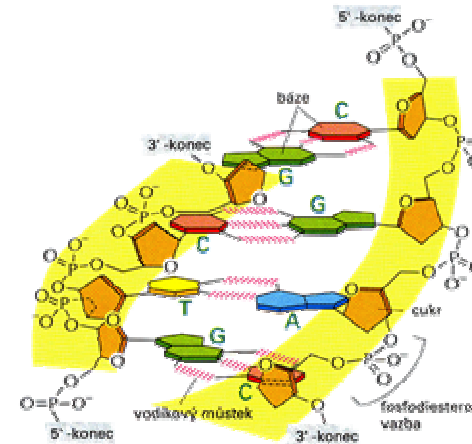


## ■ Chargaffova pravidla:

- obsah  $A = T$ ,  $G = C$
- součet purinových = pyrimidinových ( $A + G = T + C$ )
- poměr  $(A+T) / (G+C)$  je různý u druhů
- obsah  $GC = (G+C)/(A+T+G+C)$

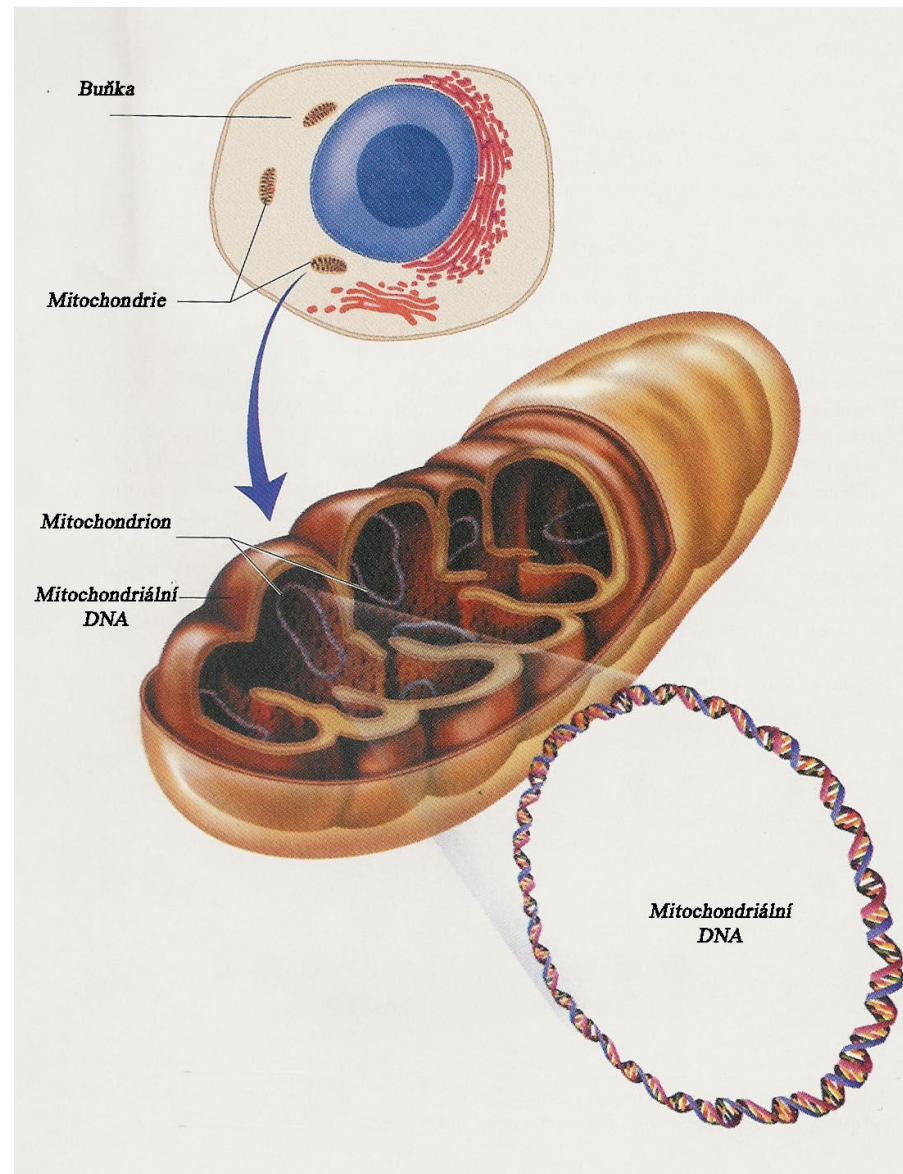
## ■ Watsonovo-Crickovo párování:

- A-T, C-G, U-A, tzv. komplementární báze



# mtDNA

- u živočichů - cirkulární dsDNA
- 16 – 20 kb
- 37 genů
  - rRNA
  - tRNA
  - geny „CO“ (c-oxidáza)
  - geny ND1 – ND6 (NADH-dehydrogenáza)
  - geny pro ATPázy aj.



# Metody izolace nukleových kyselin

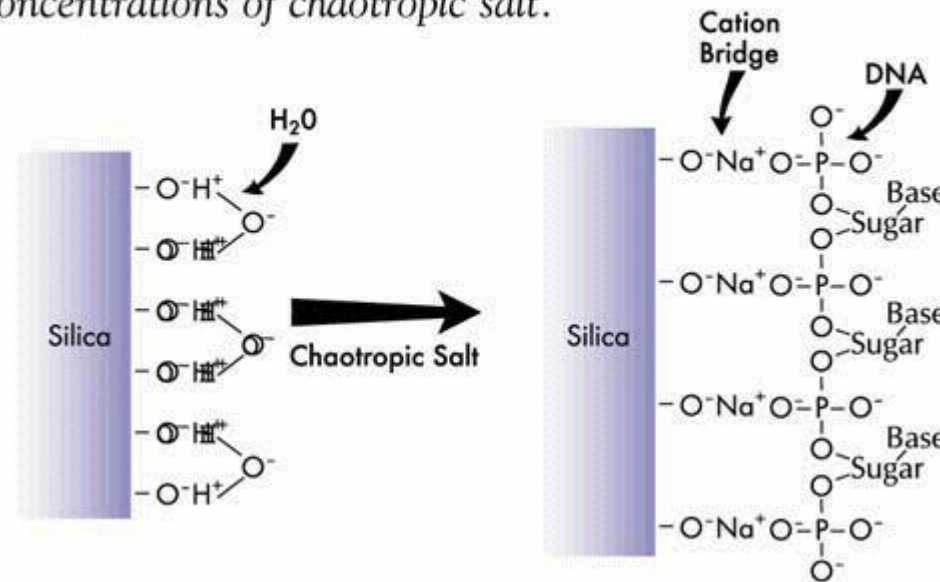
- Metody adsorpční
  - DNA se váže na křemičité sklo v přítomnosti chaotropní látky
- Metody využívající rozdílné rozpustnosti
  - Zahrnují fenolové extrakce a etanolové nebo izopropanolové precipitace (srážení)
  - Obecně rozšířené, široké aplikace
- Centrifugace v hustotním gradientu
  - Izopyknické centrifugace v gradientu CsCl
  - Vhodné při velkém množství a pro vysokou čistotu



# Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým

**Fig. 1**

A possible mechanism for silica binding of DNA in high concentrations of chaotropic salt.



# Protokol pro „DNA Tissue Spin Kit“

- Homogenizovat 20 mg izolované tkáně, vložit do 1,5 ml eppendorfovy zkumavky, přidat 200  $\mu$ l pufru T1. Vortexovat 10 s.
- Přidat 25  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml), vortexovat 15 s. Inkubovat 56 °C/2 hod. (V případě nedostatečného rozložení vzorku, inkubovat přes noc.)
- Dále dle protokolu ... provedení „Izolace DNA“





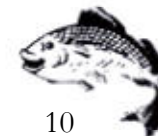
# Užitečné pojmy

- Genom – veškerý soubor genetického materiálu buňky, jedince, druhu ... (soubor všech genů a GI buňky; kompletní genetický materiál organismu)
  - rozvolněná DNA jedné jediné buňky je u člověka dlouhá přibližně 2 metry x 100 triliónů buněk (20x Slunce-Zem)



# Struktura genomu

- Kódující sekvence (2-5% genomu): geny strukturní, regulační, pro tRNA a rRNA
  - Exony - kódující sekvence (nesou GI)
  - Introny - nekódující sekvence (nesou GI), ale jsou součástí genu !
- Genové rodiny: příbuzné geny o stejné nebo podobné struktuře, obdobná funkce
  
- Nekódující repetitivní sekvence: význam jako genové markery
  - Mikrosatelity: krátké tandemové repetice složené z mono, di, tri nebo tetra nukleotidových motivů. Polymorfní.
  - Telomery - dokončení syntézy 3' konců chromozómů, tandemové repetice. Tvorba telomerázou, u savců jen v zárodečných a rakovinných buňkách.



# Struktura genomu (*Danio rerio*)

## Karyotype

## What's New in Ensembl 47

### Danio rerio News

- ▶ **Zebrafish updates**  
Ensembl Zebrafish expression pattern Xrefs and DNA align features have been updated with new data from ZFIN, and a few new oligo arrays have been added.

### General News

- ▶ **FTP site rearrangements**  
For release 47 we have rearranged our FTP directory structure, so that instead of being <species>/<file\_type> it will be <file\_type>/<species>.  
[Read more...](#)
- ▶ **Histogram plots**  
We now support URL based histogram and colour gradient plots, compatible with the UCSC-based BED and other formats.  
[Read more...](#)
- ▶ **GO terms now projected onto more species**  
Some important changes have been made to Ensembl GO projections, in collaboration with the team at GOA.  
[Read more...](#)
- ▶ **Changes to Xrefs**  
A number of changes have been made to the external database references (Xrefs) for various species.  
[Read more...](#)

- E. coli: 4,64 Mbp (4300)
- D. melanogaster: 165 Mbp
- Člověk (projekt HGP, 2/2001) 3000 Mbp (~40 000)

## About the Zebrafish genome

## Statistics

<b>Assembly:</b>	Zv7, Apr 2007
<b>Genebuild:</b>	Ensembl, Jun 2007
<b>Database version:</b>	47.7a
<b>Known protein-coding genes:</b>	17,330
<b>Projected protein-coding genes:</b>	1,495
<b>Novel protein-coding genes:</b>	2,497
<b>Pseudogenes:</b>	98
<b>RNA genes:</b>	4,053
<b>Genscan gene predictions:</b>	45,287
<b>Gene exons:</b>	232,290
<b>Gene transcripts:</b>	31,841
<b>SNPs:</b>	1,914
<b>Base Pairs*:</b>	1,527,000,581
<b>Golden Path Length**:</b>	1,440,582,308
<b>Most common InterPro domains:</b>	<a href="#">Top 40</a> <a href="#">Top 500</a>

\* Total number of base pairs = sum of lengths of DNA table

\*\* Reference assembly (Golden path) length = sum of non-redundant top level seq regions



# Gen

- The existence of genes was first suggested by Gregor Mendel (1822-1884), who, in the 1860s, studied inheritance in pea plants and hypothesized a factor that conveys traits from parent to offspring. He spent over 10 years of his life on one experiment. Although he did not use the term *gene*, he explained his results in terms of inherited characteristics.
  - Hugo de Vries in 1889, who, at that time probably unaware of Mendel's work, in his book *Intracellular Pangenesis* coined the term "pangen" for "the smallest particle [representing] one hereditary characteristic,,.
  - Wilhelm Johannsen abbreviated this term to "gene" ("gen" in Danish and German) two decades later.
- zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page)



# Gen je ...

- pořadí nukleotidů schopné replikace, které nese samostatnou jednotku informace a která má obvykle biologický význam (J. Soška, 1976). I když určitý problém představuje otázka, co budeme rozumět jednotkou informace a co biologickým významem, je tato definice dostatečně široká a zahrnuje geny, které řídí primární strukturu bílkovin, geny, které jsou matricí pro rRNK a tRNK, geny jiného typu (např. operátorové) a konečně i ta nukleotidová pořadí, která tvoří "tiché" geny.

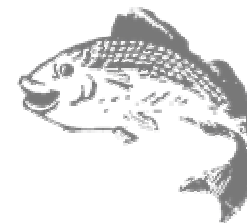
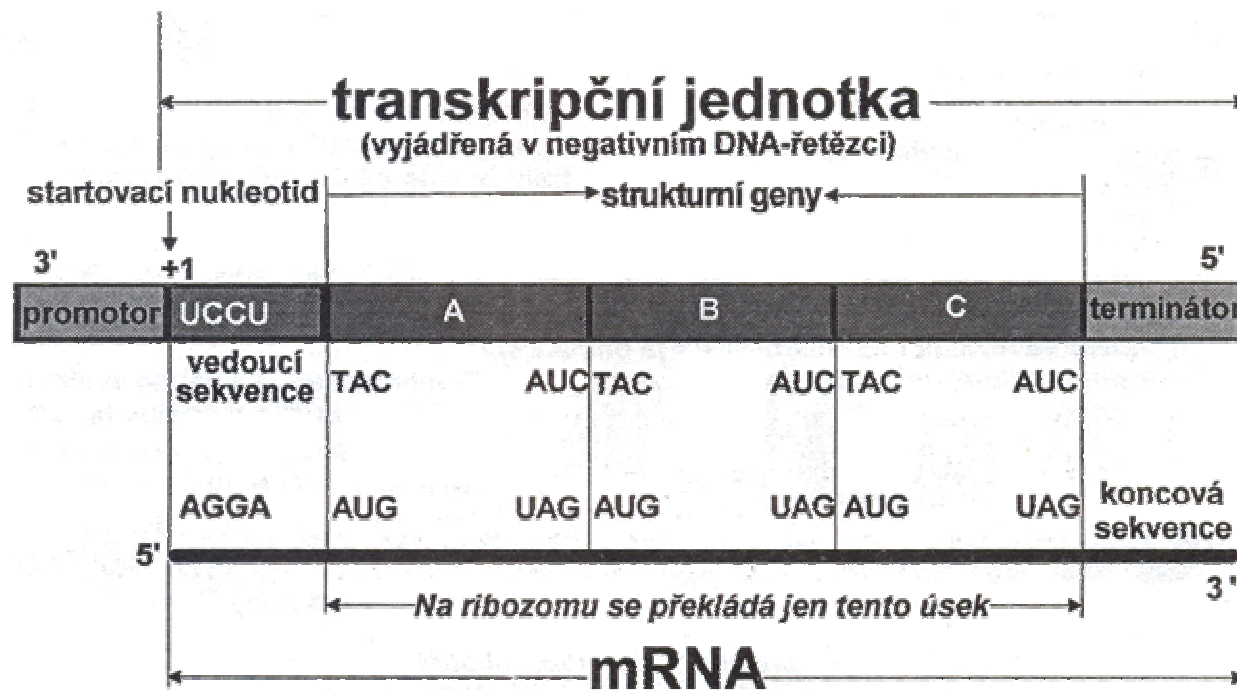


# Strukturní gen (eukaryot)

- Kóduje primární strukturu polypeptidu (proteinu)
  - Transkripční jednotka: úsek od startovacího NT po terminátor (co se transkribuje z DNA do (hn)RNA)
    - Začátek transkripce - od startovacího nukleotidu
    - Konec transkripce - AATAAA (polyadenylační signál)
    - Regulační oblasti
      - promotor: TATA box (vazba RNA-polymerázy I)  
CAAT box  
GC box a oktamer (vazba obec. transkripčních faktorů)
      - zesilovače transkripce (enhancery) - sekvence na DNA pro vazbu specifických transkr. faktorů (proteinů).
  - Kódující sekvence:
    - začíná - iniciační kodon (start kodon)
    - končí - terminační kodon (stop kodon)



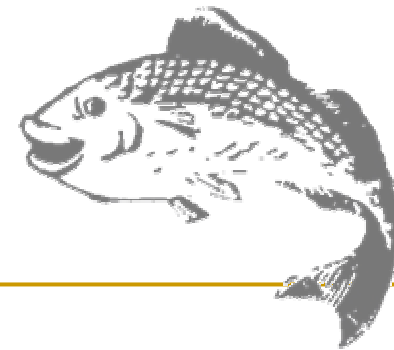
# Strukturní gen (eukaryot)



---

# Polymerázová řetězová reakce

---





# Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Kary B. Mullis (\* 28. 12., 1944)
  - ([http://en.wikipedia.org/wiki/Kary\\_Mullis](http://en.wikipedia.org/wiki/Kary_Mullis))
- Developed in 1983, Nobel Prize in Chemistry (1993)
  - (<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>)



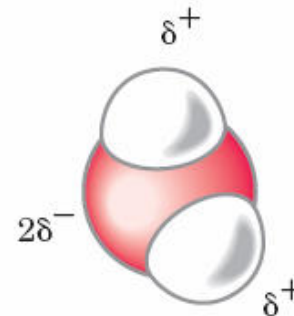
# Reakční složení PCR

Složka	μl
H <sub>2</sub> O	18,8
pufř LA (10x)	2,5
dNTP mix	0,5
primer A	0,5
primer B	0,5
LA polymeráza	0,2
(izolovaná) DNA	2
<b>Celkem</b>	<b>25</b>



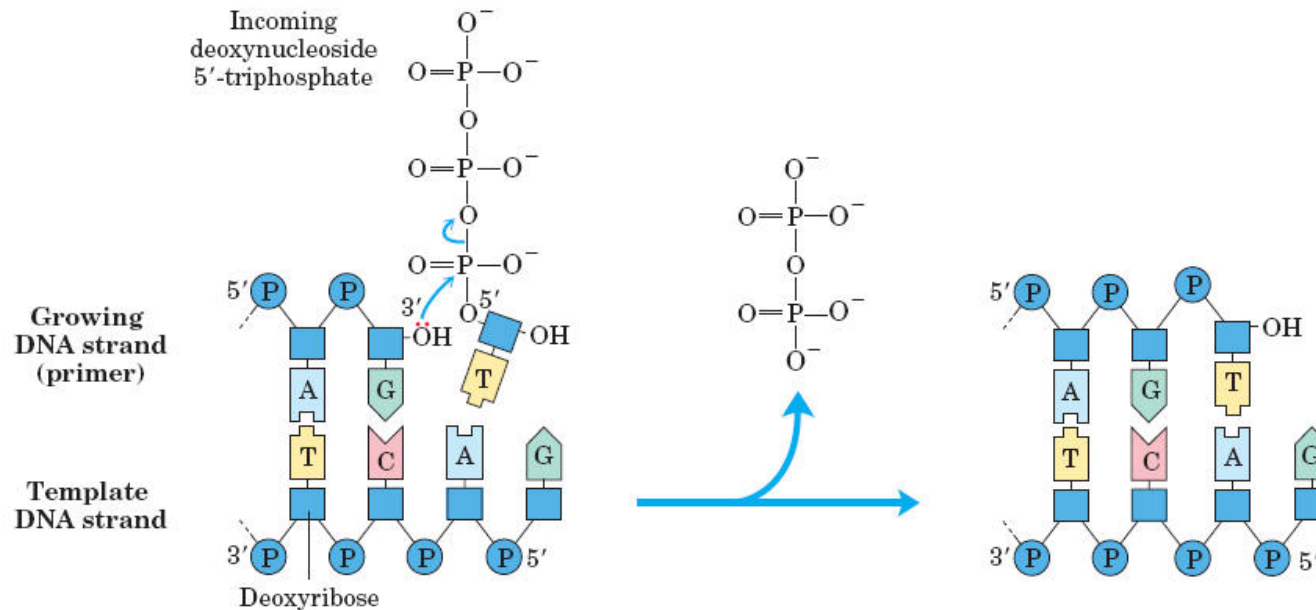
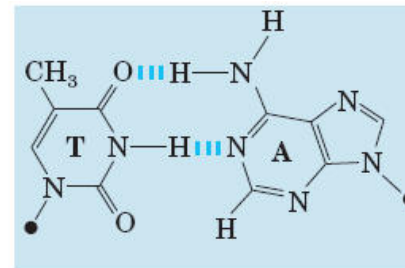
# Reakční složení PCR

Složka	$\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	18,8
pufr LA (10x)	2,5



# Reakční složení PCR

Složka	μl
dNTP mix	0,5



# Reakční složení PCR

Složka	μl
primer A	0,5
primer B	0,5

**APA2 2 A (\*144H5)** 23.07.2007

21-mer  
 5'- TGG CAA GGA CCT GAT GGA GAA -3'

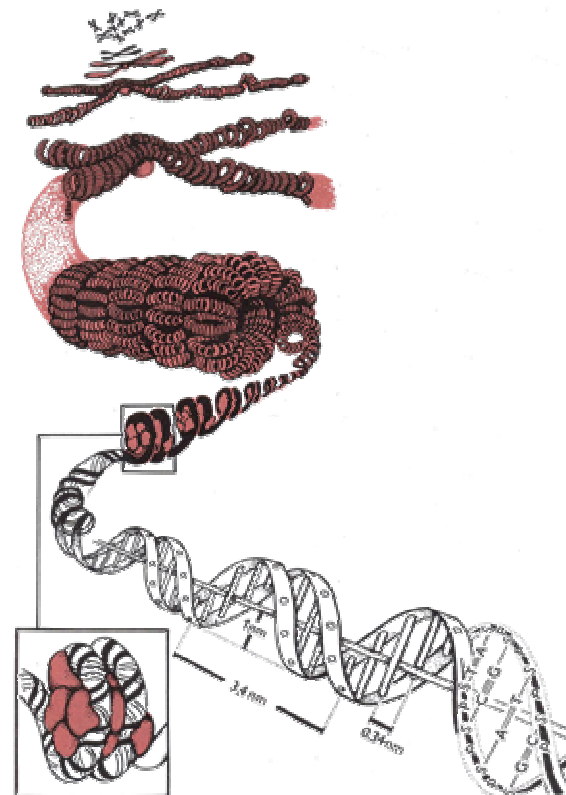
výtěžek: 29,08 nmol = 7,26 OD = 190,1 μg (scale: 40 nmol)  
 purifikace: Sephadex G-25 stanovení kvality: UV spektrum

extinkční koef. ε: 249.7 ml/μmol GC: 52.4% MW: 6537 T<sub>m</sub>(A): 47.8°C T<sub>m</sub>(B): 49.2°C  
 $T_m(A) = 81.5 + 16.6 \times (\log[\text{konc.iontů}]) + 0.41 \times (\%GC) - (600/\text{délka}) - 0.63 \times (\%formamidu)$ ,  
 kde konc. iontů (koncentrace všech iontů, tj. včetně Na<sup>+</sup>) = 60mM; 10% formamidu  
 $T_m(B) = 81.5 + 16.6 \times (\log[\text{konc.K}^+]) + 0.41 \times (\%GC) - (675/\text{délka})$ , kde konc. K<sup>+</sup> = 50 mM  
 (Hodnoty T<sub>m</sub> jsou vypočteny jen pro 14 - 70 -mery)

Rozpuštění na koncent. 100 pmol/μl (0,1mM roztok):  
 přidat 291 μl vody (pufru)

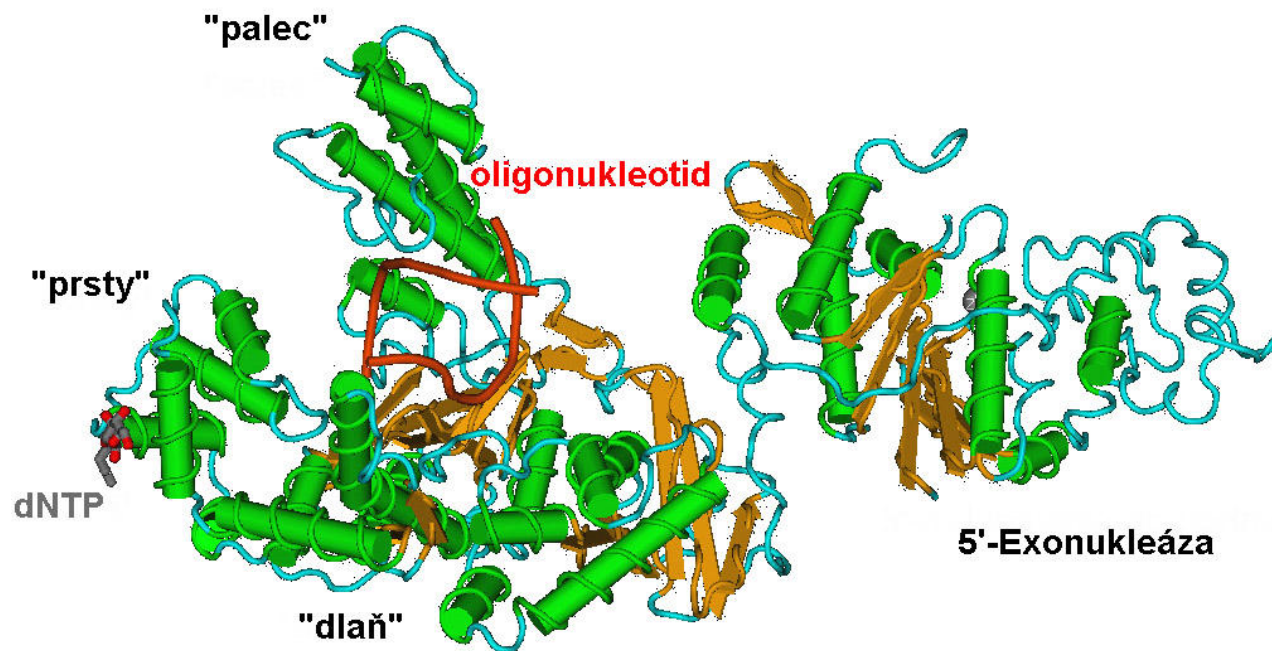
*Generi Biotech* <http://www.generi-biotech.com>  
 049 5056314 · 049 5056316 (FAX)

*převodní vztahy pro oligonukleotid:*  
 1 OD = 4005 pmol = 26.2 μg  
 1 nmol = 0.250 OD = 6.54 μg  
 1 μg = 153.0 pmol = 0.0382 OD



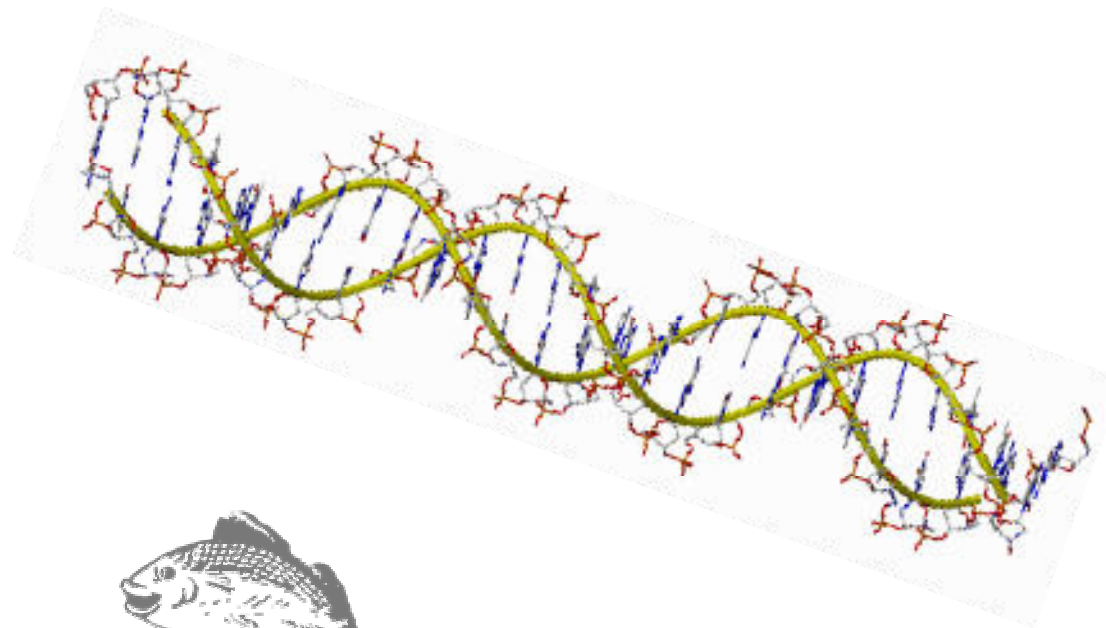
# Reakční složení PCR

Složka	$\mu\text{l}$
LA polymeráza	0,2

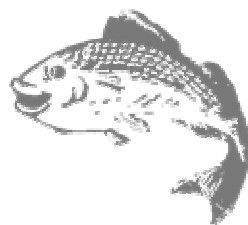


# Reakční složení PCR

Složka	$\mu\text{l}$
(izolovaná) DNA	2



Video ...



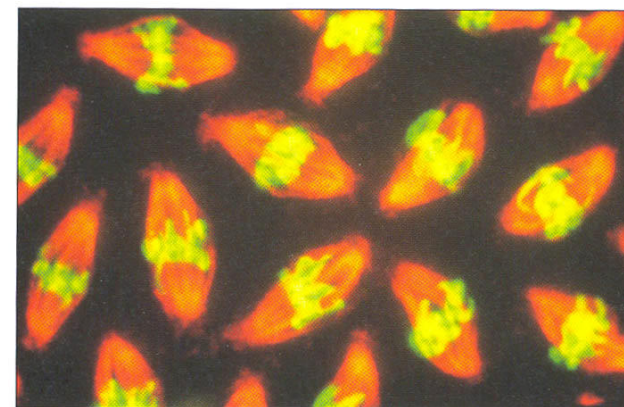
# Reakční složení PCR

Složka	$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	18,8
pufř LA (10x)	2,5
dNTP mix	0,5
primer A	0,5
primer B	0,5
LA polymeráza	0,2
(izolovaná) DNA	2
<b>Celkem</b>	<b>25</b>



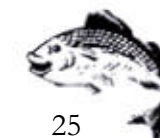


# Buněčné dělení



4 μm

Figure 6. Karyotype of *Oncorhynchus mykiss* gynogen. Arrows indicate fragments of paternal chromosomes (from Chourrout & Quillet, 1982).



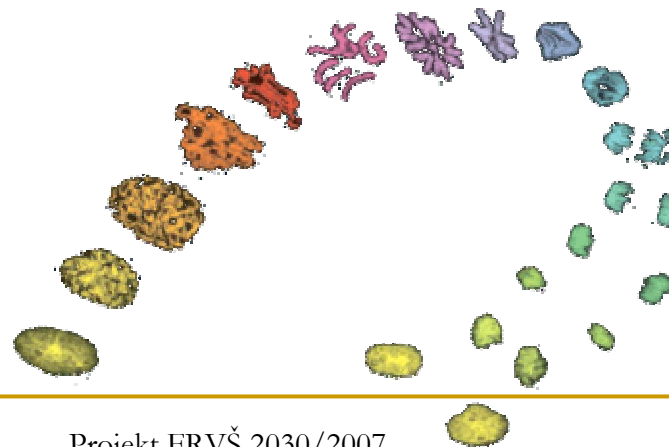
# Buněčný cyklus

- Lze rozdělit na
  - mitotická fáze M fázi (mitóza)
    - profáze
    - metafáze
    - anafáze
    - telofáze
  - interfáze - 90% celého buněčného cyklu
    - Interfázi můžeme rozdělit na  $G_1$ , S,  $G_2$  fázi
      - $G_1$  (postmitotická fáze) („first gap“) – metabolická aktivita (transkripce, translace)
      - S – fáze – probíhá zdvojení (replikace) DNA
      - $G_2$  (premitotická fáze) („second gap“) – metabolická aktivita

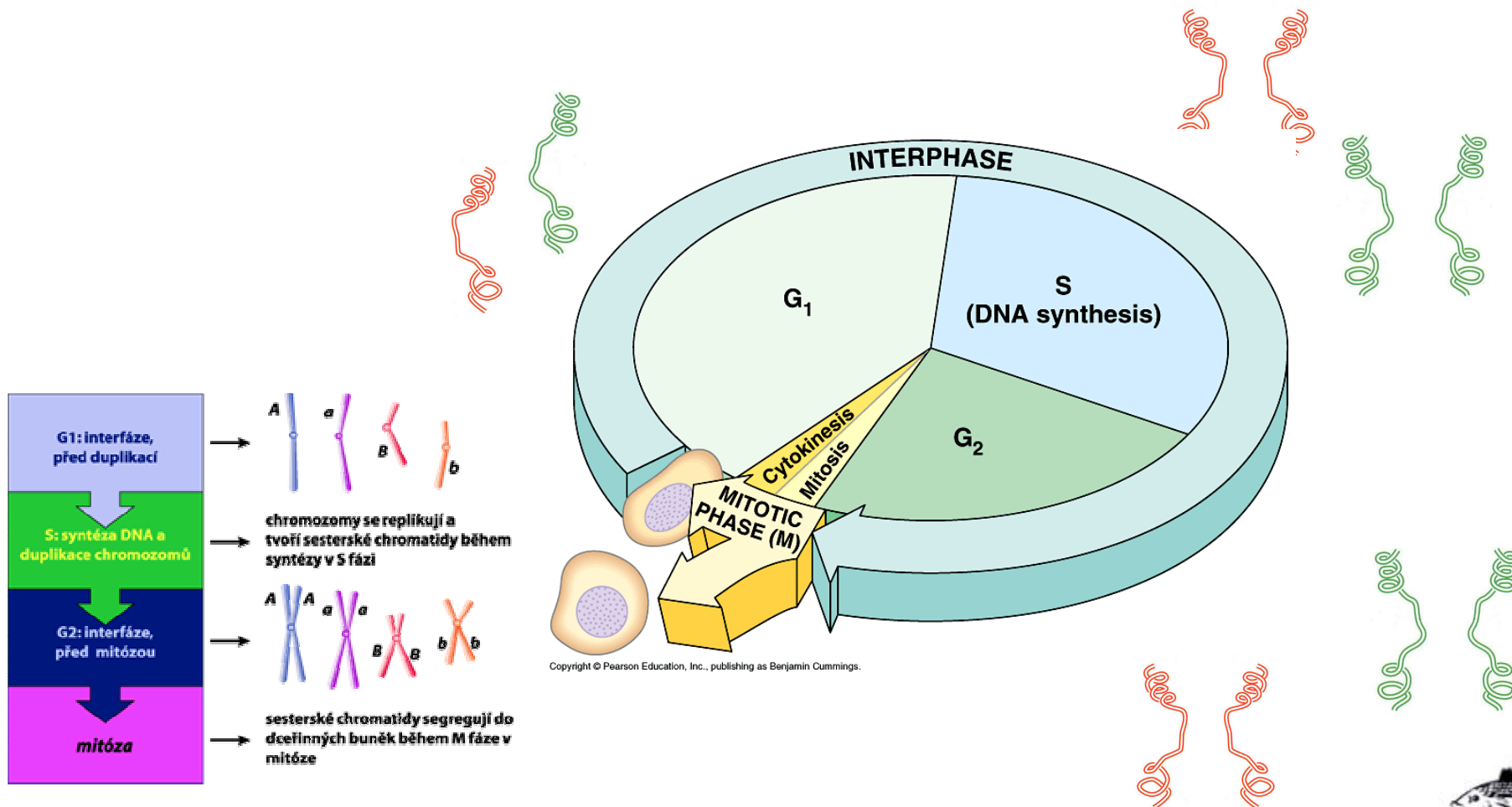


# Užitečné pojmy

- Sesterské chromatidy = každý duplikovaný (zdvojený) chromosom má dvě sesterské chromatidy, které obsahují identické kopie DNA.
- Chromozóm = tyčinkovitý či pentlicovitý útvar, tvořený DNA (až několik cm dlouhou) a bílkoviny. Velikost, tvar a počet chromozómů je různý, ale pro daný druh vždy shodný. Uprostřed nebo na okraji se vytváří tzv. centromera
- Karyotyp = soubor chromozómů, charakteristický pro daný druh



# Buněčný cyklus



# Ploidie a číslo N

- ploidie = počet kopií každého *chromosomu* přítomného v buněčném jádru
- číslo N = počet každé dvoušroubovicové *molekuly DNA* v jádru
- každý chromosom obsahuje v odlišných fázích buněčného cyklu jednu nebo dvě molekuly DNA.

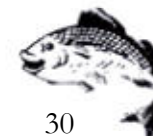
Terminologie pro variabilitu počtu chromozomů	
Aneuploidie	$2n \pm$ chromozom
nulizomie	$2n - 2$
monozomie	$2n - 1$
trizomie	$2n + 1$
tetrazomie, pentazomie	$2n + 2$ ; $2n + 3$ atd.
Euploidie	Násobení $n$
diploidie	$2n$
polyploidie	$3n, 4n, 5n$
• triploidie	• $3n$
• tetraploidie	• $4n, 5n$ atd.



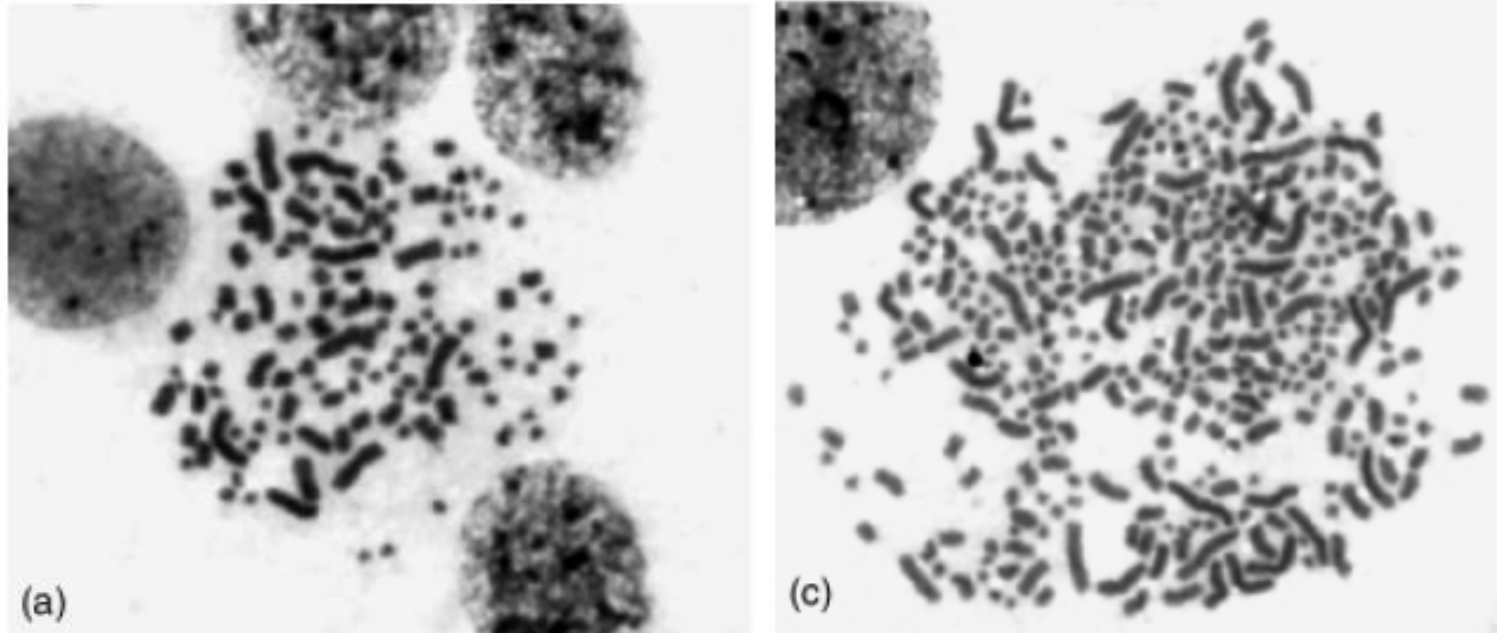
# Počty chromozomů u ...

- Kapr 104
- Rak poustevník 254
- Jeseter 520

Druh	Ploidie	Počet chromozomů
<i>Lepisosteus osseus</i> ;	2n	56
<i>Tinca tinca</i> ;	2n	48
<i>Silurus glanis</i> ;	2n	60
<i>Tinca tinca</i> ;	3n	72
<i>Silurus glanis</i>	3n	90
<i>Acipenser ruthenus</i> ;	4n	~120
<i>Huso huso</i>	4n	~120
hybrid jeseterů	5n	~150
hybrid jeseterů	6n	~180
hybrid jeseterů	7n	~210
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8n	~250
hybrid jeseterů	9n	~270



# Metafázové chromozomy

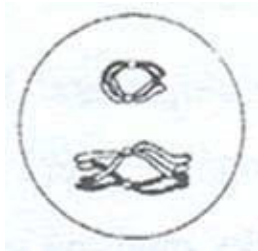


Metaphase plates from the sturgeon larvae: (a) 'haploid' Siberian sturgeon with 120 chromosomes, (c) 'triploid' hybrid Siberian/Russian sturgeon with 360 chromosomes.

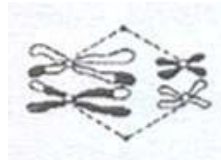


# Meiόza I - heterotypické dělení

PROFAZE



METAFAZE



ANAFAZE

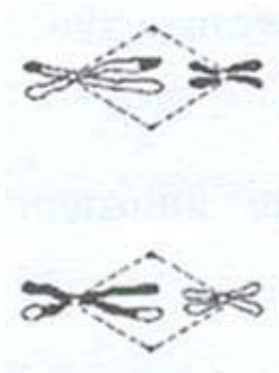


TELOFAZE

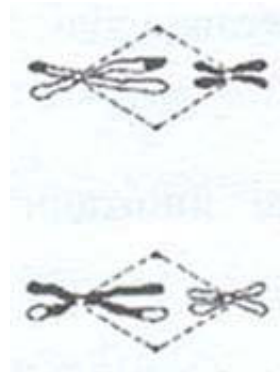


# Meiόza II - homeotypické dělení

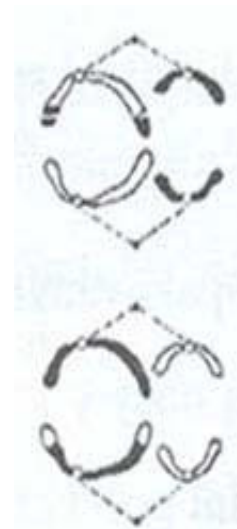
PROFAZE



METAFAZE



ANAFAZE

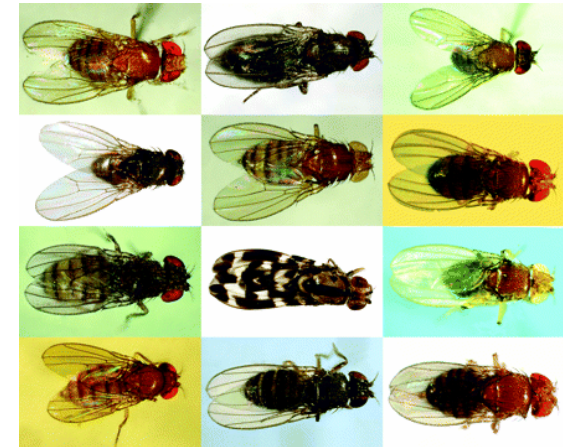


GAMETY

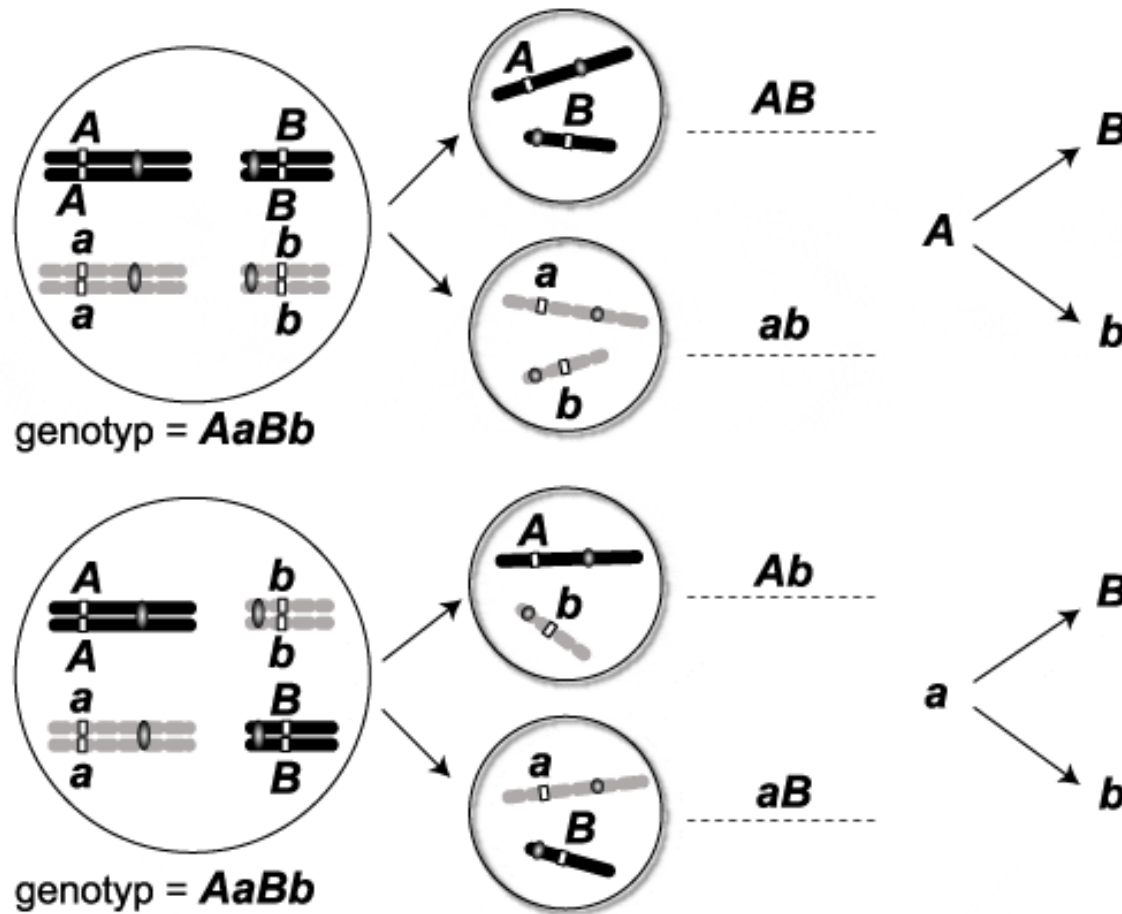




# Tvorba gamet a segregace



2. dihybrid: geny **A; B** (alely **A, a; B, b**)



# Mozaika

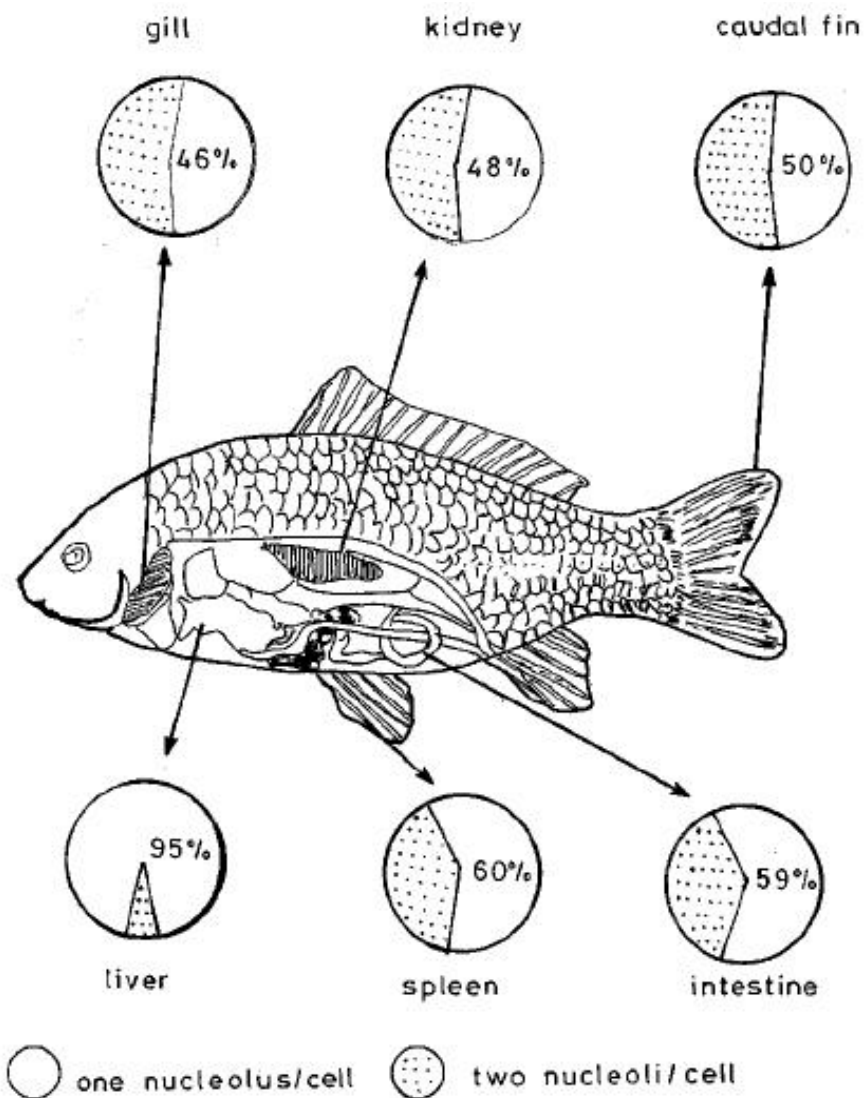


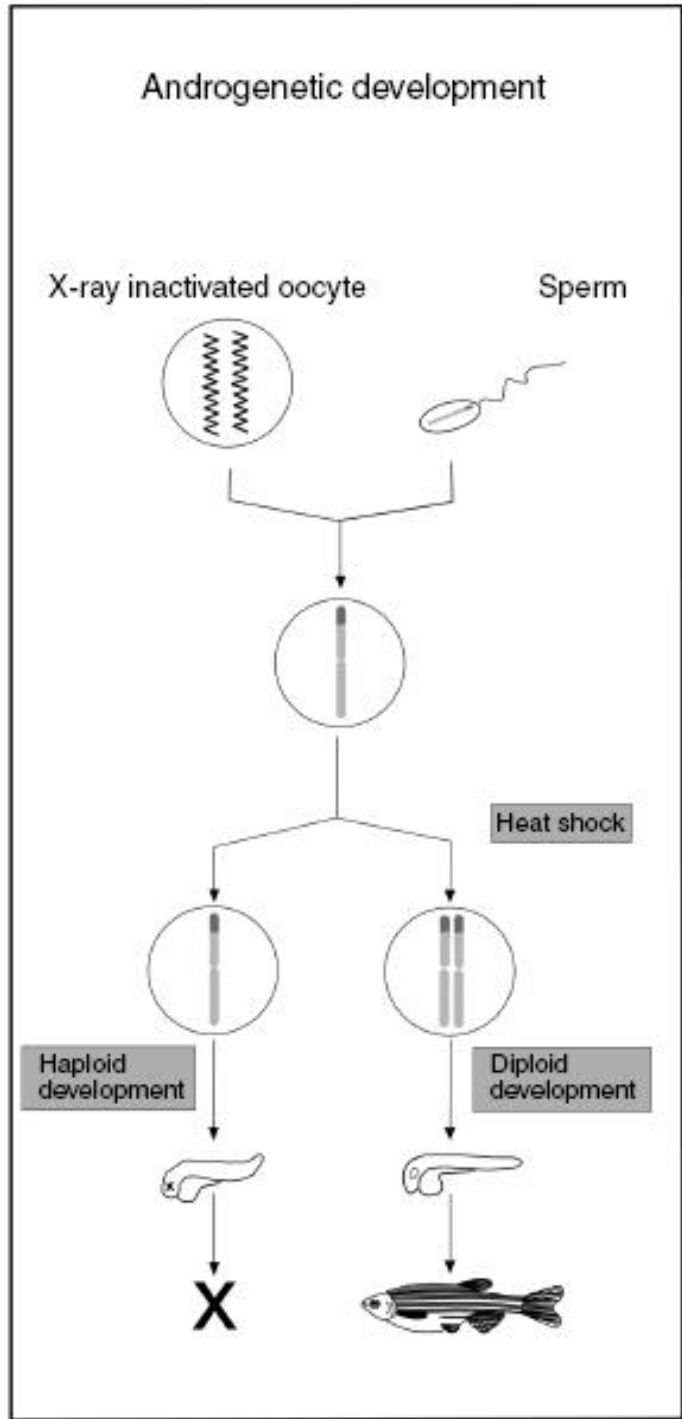
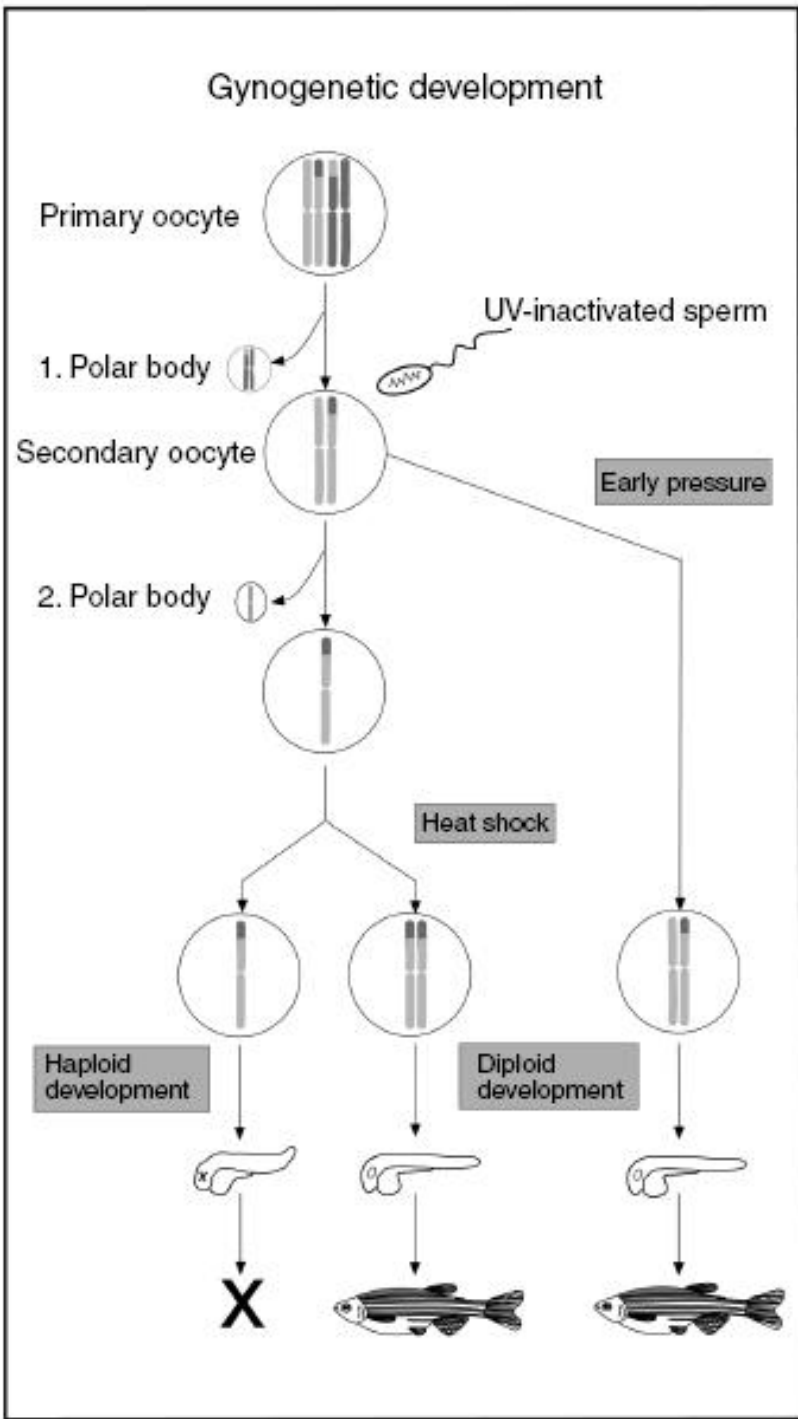
Figure 4. Variation in the number of nucleoli in different tissues of a 2 year-old diploid carp, *Cyprinus carpio* (from Carman *et al.*, 1992).



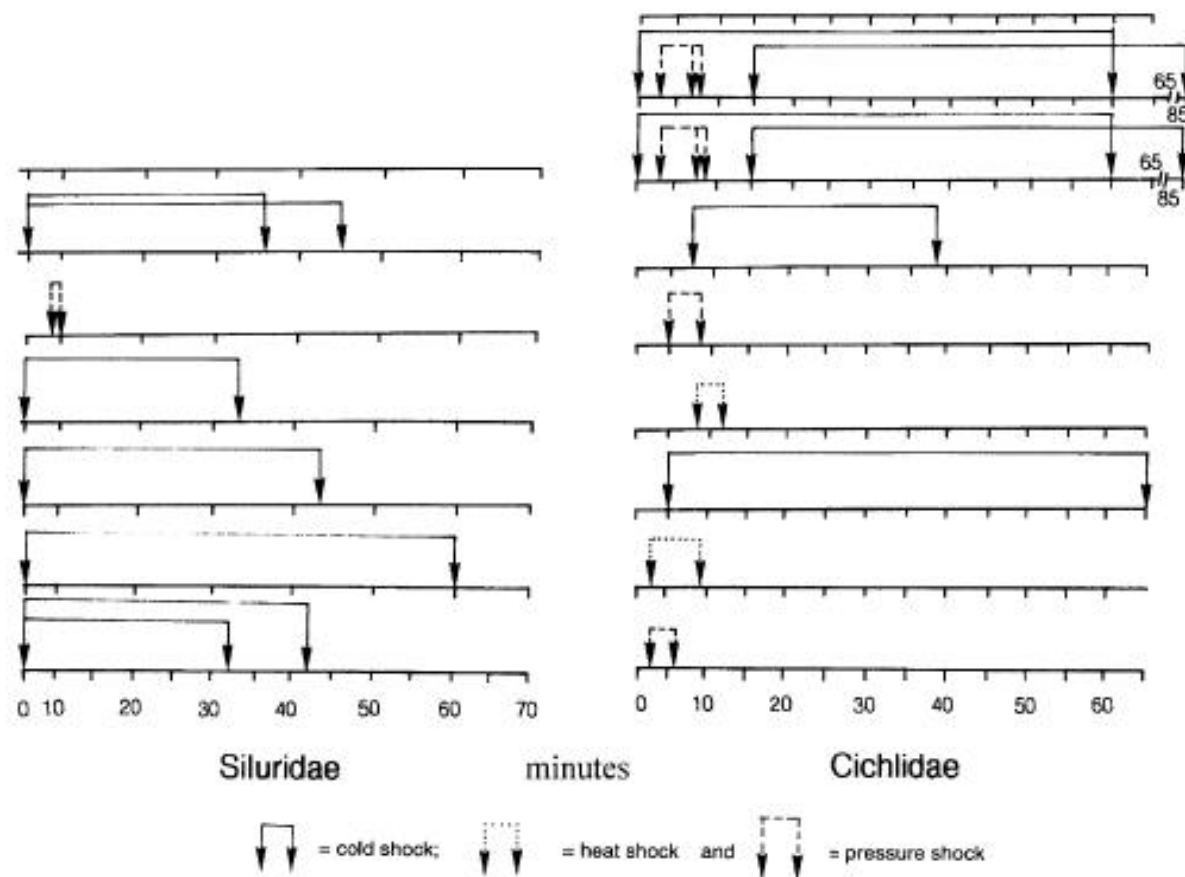
# Genomické manipulace

- Gynogeneze
- Androgeneze
- Klonování parentálních genomů
- Polyploidizace





# Schéma ovlivnění ...



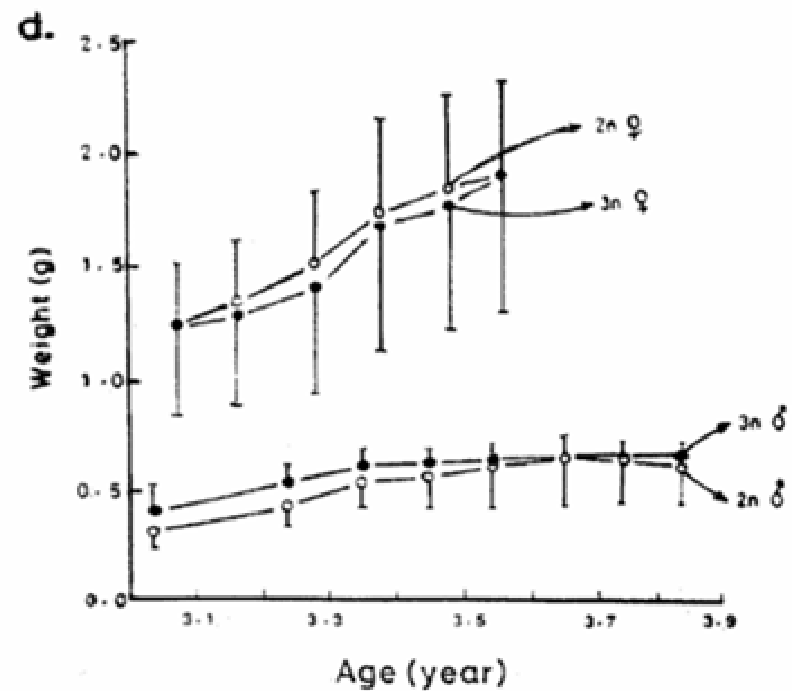
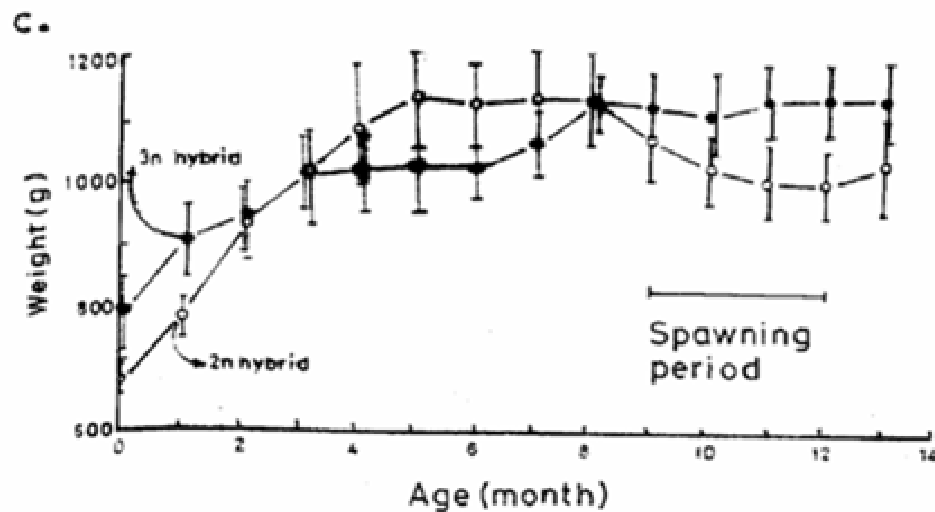
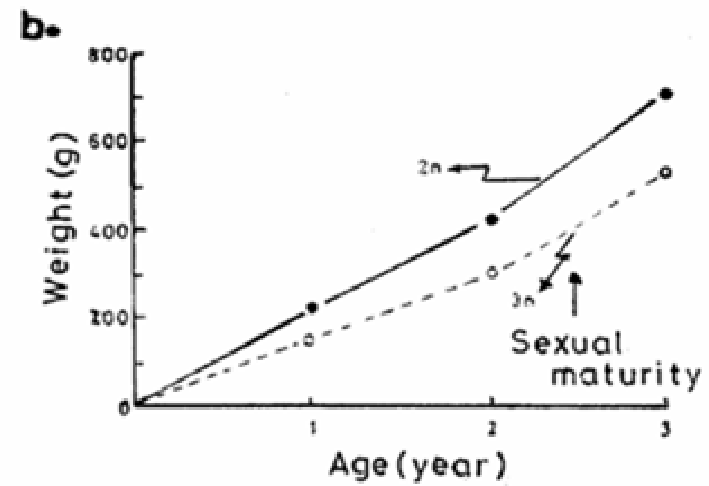
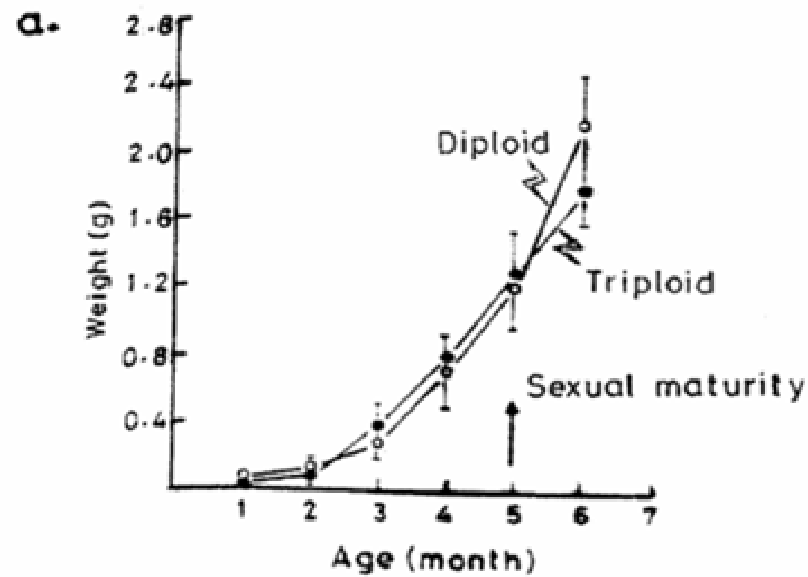


Figure 15. Growth of diploid and triploid fish. (a) *Betta splendens* (Kavumpurath & Pandian, 1992a); (b) *Pagrus major* (Kitamura *et al.*, 1991); (c) Hybrid ♀ of plaice ♀ × flounder ♂ (Lincoln, 1981c) and (d) *Oncorhynchus gorbusha* (Benfey *et al.*, 1989).

# Genové inženýrství

- buněčné inženýrství (genetické) - manipulace s celým genomem, např. řízená polyploidizace rostlin, klonování živočišných embryí nebo somatických buněk
- genové inženýrství - modifikace genů a jejich přenos mezi organismy
- proteinové inženýrství - cílená chemická příprava genů pro vznik nových produktů s novými vlastnostmi



# PCR-RFLP

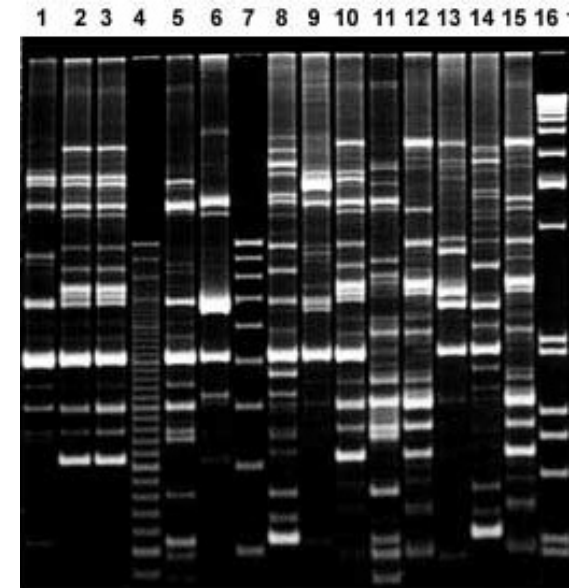
- Analýza maternálně dědičné mtDNA pomocí RFLP je základem mnoha
  - fylogenetických studie
  - mikrotaxonomického členění druh
  - určování přítomnosti hybridních jedinců.
    - PCR-RFLP analýza mitochondriálních genů ND-5/6 a ND-3/4 byla úspěšně použita k detekci polymorfismu u evropských a asijských poddruhů kapra obecného (Gross a kol., 2002; Kohlmann a kol., 2003).
    - V případě lososovitých ryb je analýza mtDNA s použitím PCR-RFLP využívána v mnohých pracech k analýze genetické variability populací např. pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Bagley a kol., 1998; Hansen a kol., 1999)





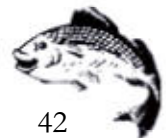
# RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

- **RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**
  - krátký specifický primer jako sonda k hybridizaci při PCR s genomovou DNA.
  - použití několika různých oligonukleotidů k RAPD tak dovoluje získat data vedoucí k určení variability



# VNTRs

- představují „minisatelity a mikrosatelity“
  - markery ke studiu variability diverzity rybích populací
  - slouží také k identifikaci jedinců, určení příslušnosti jedinců k populacím
  - určení rodičovství nebo otcovství
  
- Mikrosatelity jsou přítomny jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech genomu a jsou charakteristické vysokým stupněm polymorfismu.
  
- Mikrosatelity lze využívat ke konstrukci „linkage maps“ event. jen k určování některých „linkage groups“, využívají se i k mapování QTL (Quantitative Trait Loci).
  - Pro ryby bylo zatím zmapováno jen velmi málo QTL lokusů. MAS u ryb, její možnosti a perspektivy byly zčásti popsány u kapra obecného (Sun a kol., 2001).



# Mikrosatelity

- Vysoce polymorfní  $\Leftrightarrow$  různé alely (5-20).
  - Např. (GC) $n$   $n = 5-25$  opakování

5´ ATCGGTATTGCGCGCGCGCGCGCTACGTT 3´ n=8

5´ ATCGGTATTGCGCGCGCTACGTT 3´ n=5

5´ ATCGGTATTGCGCGCGCGCGCGCGCGCTACGTT 3´ n=11



# Characterization of different strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.) (Cyprinidae, Cypriniformes) in Bangladesh using microsatellite DNA markers

Allele size (bp)	Common carp strain			
	Scaled carp	Mirror carp	Red carp	Koi carp
<i>MFW1</i>				
200	0.03	0.15	0.17	0.32
192	0.05	0.35	0.00	0.08
180	0.03	0.03	0.20	0.08
174	0.17	0.15	0.15	0.08
166	0.20	0.15	0.05	0.20
160	0.08	0.08	0.05	0.10
150	0.13	0.00	0.03	0.00
144	0.30	0.05	0.10	0.03
138	0.03	0.05	0.25	0.13
<i>MFW2</i>				
260	0.10	0.32	0.15	0.43
238	0.00	0.13	0.25	0.32
216	0.28	0.08	0.25	0.10
200	0.00	0.00	0.05	0.03
178	0.08	0.00	0.10	0.05
170	0.43	0.17	0.13	0.05
160	0.13	0.30	0.08	0.03
<i>MFW11</i>				
210	0.00	0.00	0.08	0.13
190	0.15	0.03	0.15	0.08
174	0.08	0.30	0.20	0.05
170	0.30	0.55	0.30	0.45
164	0.25	0.05	0.22	0.30
160	0.17	0.08	0.00	0.00
124	0.05	0.00	0.05	0.00
<i>MFW15</i>				
264	0.03	0.13	0.08	0.10

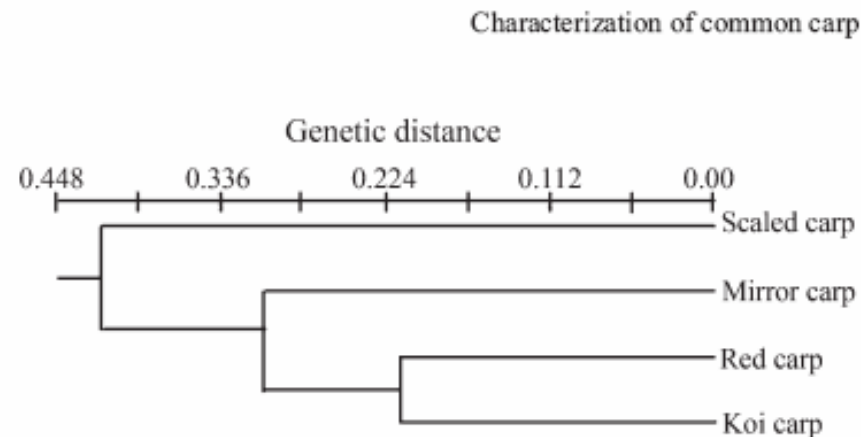
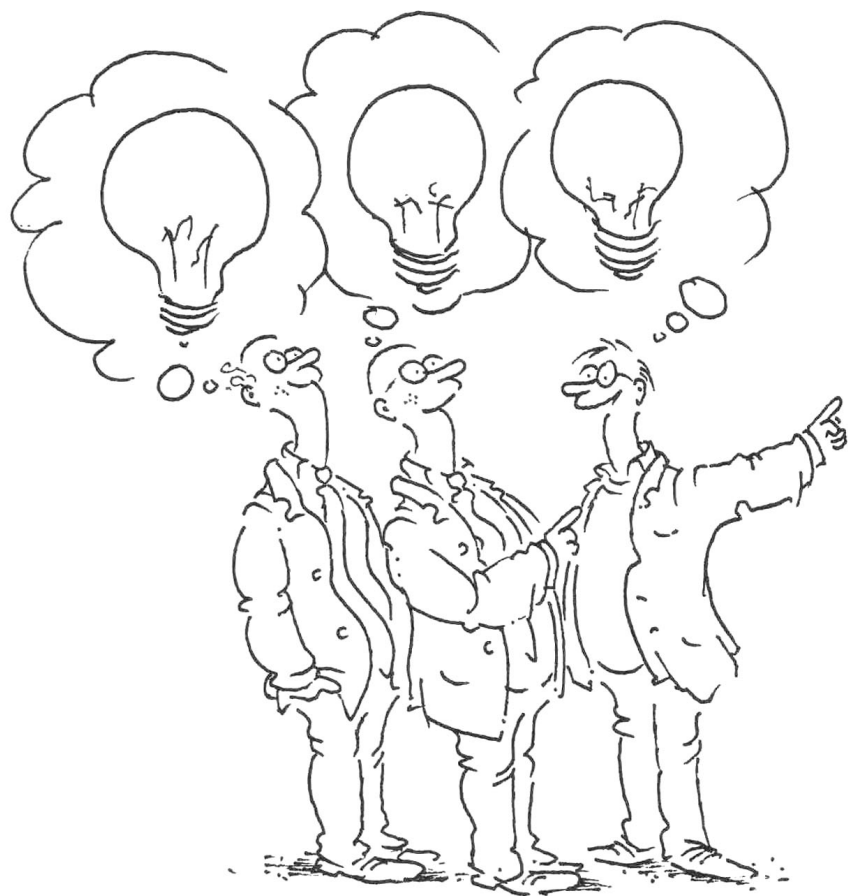


Figure 1 - Unweighted pair-group method with averages dendrogram based on Nei's (1972) genetic distance, summarizing the data on differentiation between *C. carpio* strains, according to microsatellite DNA analysis.





Renčín

Děkuji Vám za pozornost



# Použitá literatura a zdroje

- Devlin R. H., Nagahama Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364
- Pandian T. J. and Koteeswaran R. (1998): Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167–243
- Ralf Dahm, Robert Geisler, and Christiane Nusslein-Volhard Zebrafish (*Danio rerio*) Genome and Genetics. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2nd Edition. Volume 15; Edited by Robert A. Meyers. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 3-527-30652-8
- R. K. Mondol, S. Islam and S. Alam. (2006): Characterization of different strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.) (*Cyprinidae*, *Cypriniformes*) in Bangladesh using microsatellite DNA markers, *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 626-633
- Hulák M., Kašpar V., Flajšhans M., Linhart O. (2006): Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb - přehled, *Bulletin VÚRH Vodňany*, 42(2)
- Flajšhans M., Piačková V., Ráb P. (2006): Vyšší ploidní úrovně u ryb a některé problémy jejich analýzy, *Bulletin VÚRH Vodňany*, 42(2)
- Aninace PCR použita z: <http://www.dnalc.org/home.html>
- Animace RNA interference z: <http://www.nature.com/focus/rnai/animations/index.html>

