

## Ćwiczenie C04B Markery genetyczne

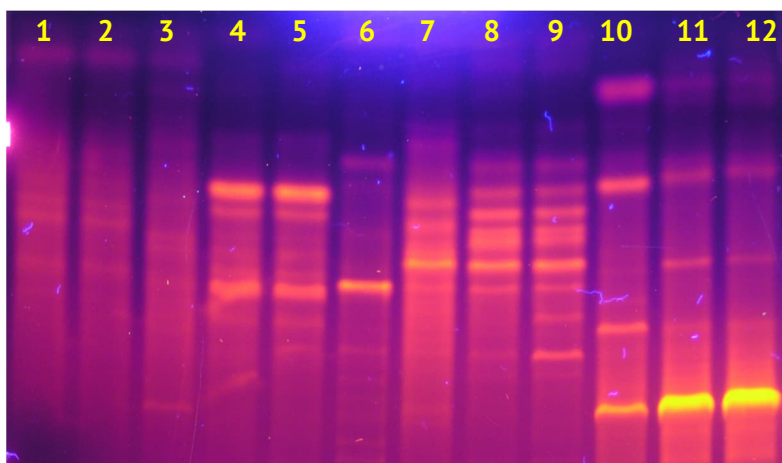
### Pojęcie markera genetycznego Markery morfologiczne Markery izoenzymatyczne Markery DNA Zastosowanie markerów genetycznych

Prof. dr hab. Roman Zieliński

#### ➔ 1. Pojęcie markera genetycznego

##### 1.1. Definicja markera genetycznego

Marker genetyczny jest to cecha, która może być wykorzystana do identyfikacji osobników lub gatunków. Marker powinien być polimorficzny, uwarunkowany jednogennie oraz nie powinna występować interakcja genotypowo-środowiskowa<sup>1</sup>.



Rys. 1.1. Identyfikacja gatunków pijawek przy pomocy markerów DNA opartych o bakteryjny gen *KatG* (markery B-SAP).

Ścieżki:

- 1,2: *Theromyzon maculosum*,
- 3: *Theromyzon tessulatum*,
- 4, 5: *Helobdella stagnalis*,
- 6: *Aboglossiphonia pepilosa*,
- 7: *Placobdella costata*,
- 8, 9: *Hemiclepis marginata*,
- 10: *Glossiphonia concolor*,
- 11, 12: *Glossiphonia complanata*.

<sup>1</sup> Markerem genetycznym jest gen np. kodujący cechę fenotypową lub białko/enzym. Markerem genetycznym może być także inna sekwencja DNA. Definicje, które utożsamiają marker genetyczny tylko z sekwencją DNA są błędne. Sekwencja DNA to jeden z typów markerów genetycznych.

Markery genetyczne od lat wykorzystywane są w badaniach biologicznych, medycznych, diagnostyce i hodowli. Początkowo markerami były łatwo rozróżnialne cechy fenotypowe, które wykorzystywano do konstrukcji map genetycznych, a także w hodowli. Wprowadzenie markerów izoenzymatycznych zrewolucjonizowało genetykę populacyjną umożliwiając analizę wielu osobników w krótkim czasie. Za sprawą kodominacji możliwe stało się przełożenie obserwowanych fenotypów enzymatycznych na genotypy, co pozwoliło na ocenę częstości alleli w populacji oraz poziomu polimorfizmu. Niestety, liczba markerów izoenzymatycznych jest zbyt mała, aby wykorzystać je do konstrukcji wysyconych map genetycznych. Dopiero analiza DNA, zwłaszcza z wykorzystaniem PCR, dostarczyła niemalże nieograniczonej ilości markerów, które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych, w tym w diagnostyce. Markery można wykorzystać do identyfikacji osobników w populacji, gatunków (tzw. markery gatunkowe), a także do szacowania ryzyka chorób genetycznych.

## ➔ 1.2. Podział markerów genetycznych

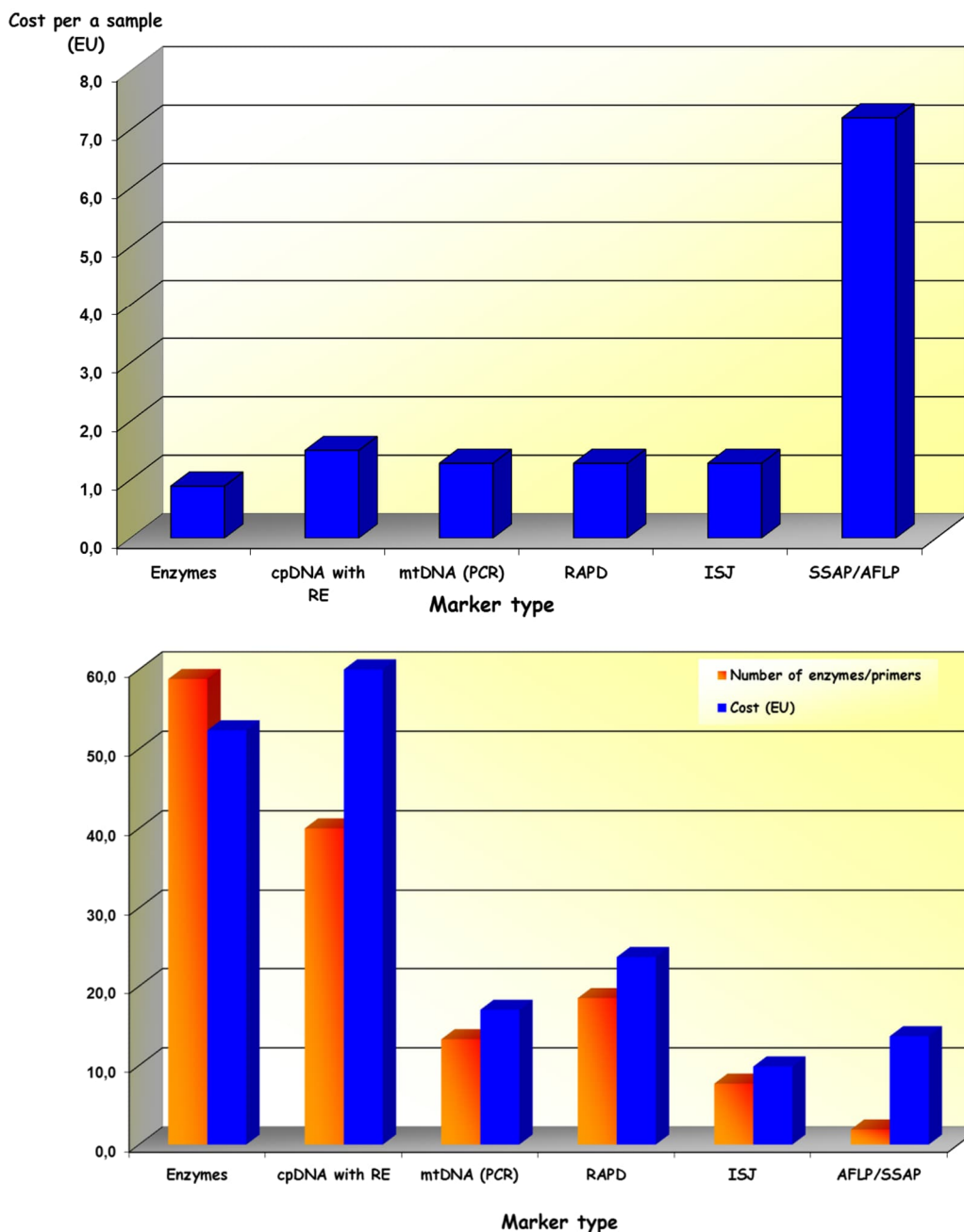
Markery genetyczne dzielimy na:

- markery morfologiczne, np. barwa kwiatu, barwa oczu, barwa ciała u *D. melanogaster*;
- markery molekularne, w tym:
  - ▶ markery izoenzymatyczne, np. dehydrogenaza mleczanowa, aminopeptydaza, esteraza;
  - ▶ markery DNA, np. mikrosatelity (SSR), markery AFLP, STS, SNP.

Tabela 1.2. Charakterystyka markerów genetycznych		
Typ	Korzyści	Ograniczenia
Morfologiczne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Łatwa analiza</li> <li>• Niski koszt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Zależność od czynników środowiskowych</li> <li>• Ograniczona liczba</li> </ul>
Izoenzymatyczne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niski koszt</li> <li>• Kodominacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zależność ekspresji od tkanki i stanu fizjologicznego</li> <li>• Ograniczona liczba</li> </ul>
Markery RFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nie wymagają wiedzy o sekwencji</li> <li>• Kodominacja</li> <li>• Brak wpływu środowiska</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kosztowne i czasochłonne</li> <li>• Duża ilość DNA o wysokiej jakości</li> <li>• Trudna automatyzacja</li> <li>• Użycie izotopów</li> </ul>
Markery SSR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kodominacja</li> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konieczna znajomość sekwencji</li> <li>• Stosunkowo drogie</li> </ul>
Markery AFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> <li>• Nie wymagają wiedzy o sekwencji</li> <li>• Możliwa automatyzacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Czasochłonne</li> <li>• Trudne technicznie</li> <li>• Kosztochłonne</li> </ul>
Markery SSAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> <li>• Możliwa automatyzacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Wymagana wstępna wiedza o sekwencji</li> <li>• Trudne technicznie</li> <li>• Kosztochłonne</li> </ul>

### ➔ 1.3. Koszt analizy

Zastosowanie danego typu markera zależy od celu analizy oraz kosztu uzyskania istotnej informacji. Przykładowo, w badaniach populacyjnych istotne jest zastosowanie technik, które generują dużą liczbę markerów. Metody pozwalające uwidocznić markery enzymatyczne są tanie, ale liczba zidentyfikowanych loci enzymatycznych jest stosunkowo mała. Najczęściej identyfikuje się 1-4 loci w jednej reakcji enzymatycznej. Analizując 5-6 enzymów, co jest rutyną



**Rys. 1.3.** Koszt analizy przy pomocy różnych typów markerów genetycznych. Góra: koszt analizy jednej próby. Dół: liczba enzymów/starterów jaką należy wykorzystać aby ujawnić 100 loci (lub prążków) oraz koszt analizy w przeliczeniu na 100 loci (lub prążków). Markery enzymatyczne wydają się najtańsze, gdy analizujemy jedynie koszt próby. Jednocześnie są one jednymi z droższych, jeżeli oszacujemy koszt ujawnienia 100 loci. Biorąc pod uwagę liczbę loci, bardziej ekonomiczna jest analiza przy pomocy markerów AFLP/SSAP (Polok 2007).

w jednostkowej analizie możemy maksymalnie uzyskać 5-24 loci. Z kolei techniki pozwalające na identyfikację markerów DNA są drogie, jeżeli wykonujemy pojedynczą reakcję. Jednakże pojedyncza reakcja pozwala zidentyfikować nawet 100 loci markerowych, co sprawia, że koszt analizy dużej liczby loci jest niższy dla markerów DNA (Rys. 1.3).

### 1.3.1. Analiza zróżnicowania genetycznego populacji studentów Uniwersytetu Radomskiego



Pewien badacz otrzymał grant w wysokości 5 tys. PLN na ocenę różnic genetycznych studentów uczących się na różnych kierunkach WNMiNoZ. Przystępując do analiz rozważał wybór między markerami ISJ i SSAP. Koszt analizy jednej próbki przy pomocy markerów ISJ wynosi 1 EU (1 EU = 4,7 PLN), natomiast koszt analizy jednej próby przy pomocy markerów SSAP wynosi 8 EU. Średnia liczba loci generowanych przy pomocy techniki ISJ na jeden starter wynosi 10, przy czym średnia liczba polimorficznych loci wynosi 6. Technika SSAP generuje średnio 100 loci na jedną parę starterów, spośród których średnio 70 loci jest polimorficznych. Badacz wybrał markery ISJ, twierdząc, że przy pomocy markerów ISJ będzie mógł przeanalizować więcej osób niż przy pomocy markerów SSAP. Czy badacz postąpił słusznie? Proszę uzasadnić przedstawiając odpowiednie obliczenia.

## 2. Markery morfologiczne



Markery morfologiczne są łatwo rozróżnialnymi wizualnie cechami fenotypowymi dotyczącymi najczęściej barwy (barwa kwiatu, oczu), kształtu (kształt kwiatu, skrzydeł, uszu), typu wzrostu lub zachowania (Rys. 2). Cechy te uwarunkowane są jednogenowo. U człowieka do cech będących markerami morfologicznymi należy barwa oczu (jasne i ciemne), kręcone lub proste włosy, łysienie lub brak łysienia, albinizm i normalna pigmentacja, polidaktylia i normalny rozwój palców. Podobny polimorfizm cech morfologicznych obserwuje się u wszystkich gatunków. U wielu organizmów markery morfologiczne naniesiono na mapy genetyczne. Było to możliwe



**Rys. 2a.** Zróżnicowanie pokroju (A), kształtu i koloru kwiatów (B) oraz kształtu liści u kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana*). Kalanchoe jest sukulentem liściowym z rodziny gruboszowatych. W Polsce występuje jako roślina doniczkowa. Zawiera glikozydy nasercowe. W stanie naturalnym występuje w Afryce i na Madagaskarze. Wykorzystywana w medycynie ludowej w terapii kamieni nerkowych, zapalenia płuc oraz reumatoidalnego zapalenia stawów (AL-Khayri i inni 2022).

dzięki otrzymaniu szeregu mutantów dotyczących poszczególnych loci. Przykładem jest *Drosophila melanogaster*, która od ponad stu lat jest obiektem modelowym w badaniach genetycznych. W Polsce jest ona znana jako wywilżna kartowata, wywilżanka lub muszka owocówka. W środowisku naturalnym występuje w pobliżu drzew owocowych i fermentujących owoców (Rys. 2b).



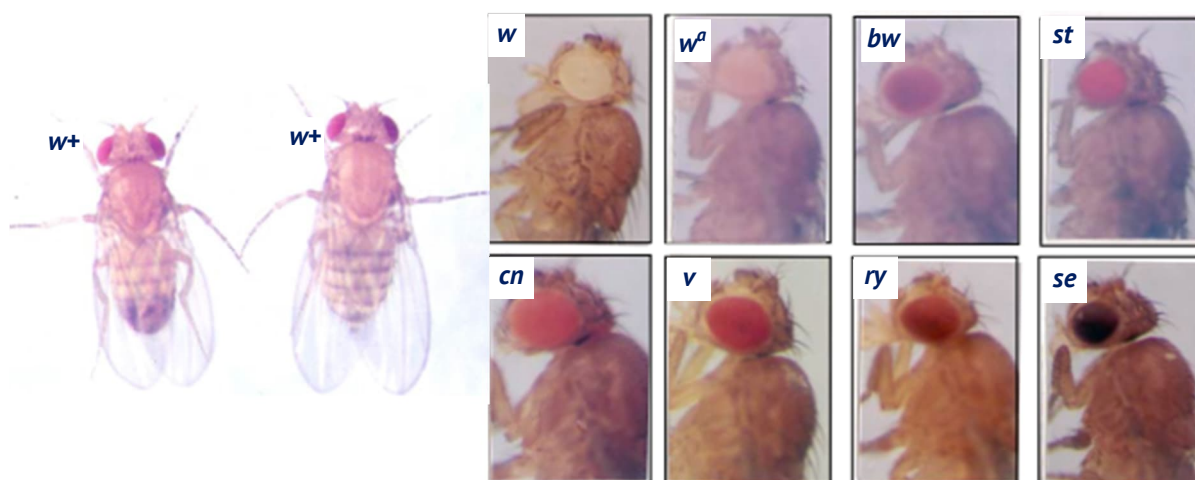
**Rys. 2b.** Wywilżna kartowata (*D. melanogaster*) żerująca na owocach.

## ➔ 2.1. Markery morfologiczne u *Drosophila melanogaster*

Obecnie znanych jest 4 000 genów *D. melanogaster*, których allele warunkują alternatywne formy morfologiczne. Geny te dotyczą barwy oczu, ciała, kształtu, rozwoju, zachowania.

### 2.1.1. Barwa oczu

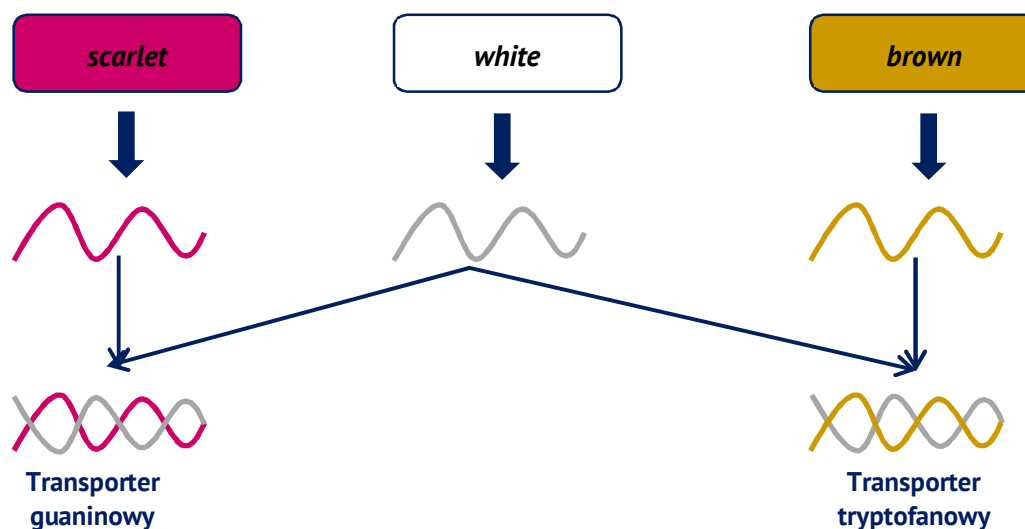
W populacjach naturalnych *D. melanogaster* najczęściej występuje czerwona barwa oczu ze względu na zawartość barwnego pigmentu. Mutacje w genach warunkujących syntezę pigmentu prowadzą do różnych odcieni barwy czerwonej aż do barwy białej.



**Rys. 2.1.1a.** Barwa oczu u *D. melanogaster* (Ranganath i Tanuja 1999).

Oznaczenia barwy:  $w^+$  - samiec i samica o czerwonej barwie oczu;  $w$  - barwa biała (white),  $w^a$  - brzoskwiuniowa (apricot);  $bw$  - brązowa (brown),  $st$  - szkarłatna (scarlet),  $cn$  - cynobrowa (cinnabar),  $v$  - czerwono-pomarańczowa (vermilion);  $ry$  - różowa (rosy),  $se$  - czerwono-brązowa (sepia).

Barwa oczu u *D. melanogaster* jest efektem syntezy pigmentu i jego akumulacji w komórkach pigmentowych. Czerwony pigment (drosopteryna) powstaje z prekursora - guaniny, natomiast pigment brązowy (ommochrom) powstaje z tryptofanu. Prekursory pigmentu są transportowane do komórek pigmentowych za pomocą transportujących białek błonowych należących do nadrodziny ABC. Białka te występują w postaci heterodimerów kodowanych przez trzy geny:  $w$  (white),  $bw$  (brown) i  $st$  (scarlet). Produkty genów *white* i *scarlet* kodują polipeptydy wchodzące w skład transportera guaninowego. Transporter tryptofanowy zbudowany jest z polipeptydów kodowanych przez geny *white* i *brown* (Rys. 2.1.1b). Mutacje punktowe w genach *white*, *brown* i *scarlet* prowadzą do substytucji aminokwasowych, które skutkują zmianą aktywności transporterów i w efekcie zmianą barwy oczu (Mackenzie i inni 1999).



**Rys. 2.1.1b.** Molekularne podstawy powstania barwy oczu u *D. melanogaster*. Trzy geny, *scarlet*, *white* i *brown* kodują łańcuchy polipeptydowe heterodimerów transportera guaninowego i tryptofanowego.

### 2.1.2. Mutacje skrzydeł

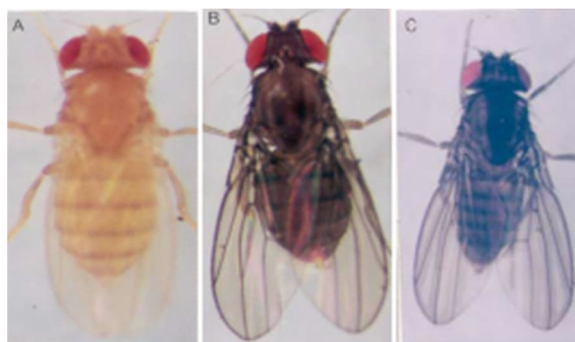
*Drosophila melanogaster* ma dwie pary skrzydeł. Ich kształt i struktura są determinowane genetycznie. Mutacje w genach warunkujących kształt skrzydeł powodują ich redukcję lub zanik. Skrzydła mogą być skrócone, brzegi mogą być zgrubiałe.



**Rys. 2.1.2.** Mutacje skrzydeł u *D. melanogaster*. A. brak skrzydeł, B. skrzydła nierozwinięte, C. rozwinięte tylko lewe skrzydło, D. rozwinięte tylko prawo skrzydło, E. skrzydła normalne (Ranganath i Tanuja 1999).

### 2.1.3. Barwa ciała

Barwa ciała u *D. melanogaster* jest szara. Mutacje prowadzą do zmiany barwy na żółtą lub różne odcienie czerni.



**Rys. 2.1.3.** Mutacje barwy ciała u *D. melanogaster*. A. barwa żółta (*yellow*), B. barwa czarna (*black*), C. barwa szaro-niebiesko-czarna (*ebony*) (Ranganath i Tanuja 1999).

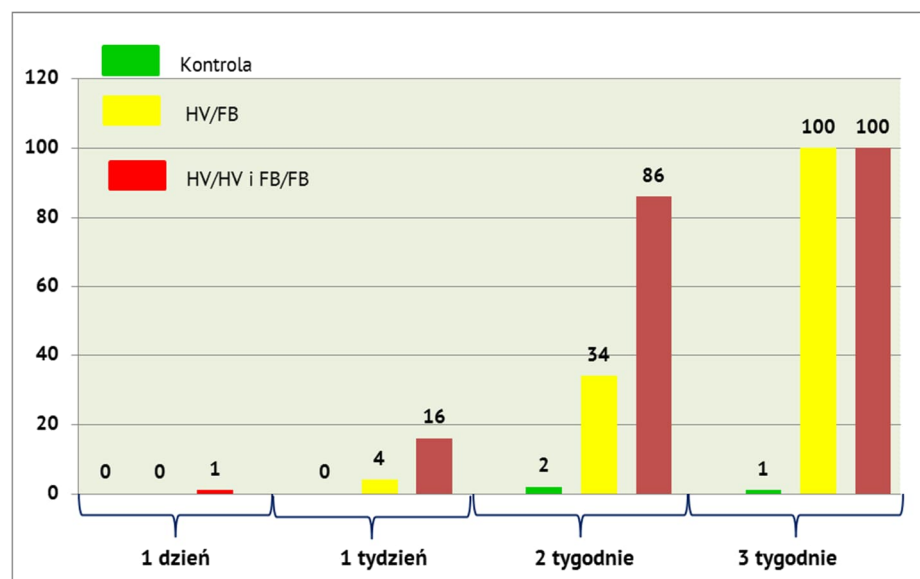


## 2.2. Wykorzystanie mutantów *D. melanogaster* do badania mechanizmów warunkujących choroby genetyczne człowieka

*Drosophila melanogaster* jest bardzo dobrym modelem do badania molekularnych mechanizmów leżących u podłoża chorób genetycznych człowieka. Główną zaletą muszki owocowej jest łatwość analizy dziedziczenia cech w poszczególnych pokoleniach, łatwość uzyskiwania i analizy molekularnej mutantów. Geny, które pełnią istotne funkcje u *D. melanogaster* mają liczne homologi u człowieka. Mutacje w tych genach często związane są z chorobami genetycznymi, w tym zaburzeniami neurologicznymi. Badanie przyczyny choroby u danej osoby polega na identyfikacji genu u danej rodziny, znalezieniu homologa tego genu u organizmu modelowego, a następnie analizie funkcjonalnej u organizmu modelowego. Możliwa jest też identyfikacja zestawu genów u organizmów modelowych, w których mutacje prowadzą do efektów neurologicznych i mają efekty letalne, znalezienie homologów u człowieka i na tej podstawie identyfikowanie przyczyn genetycznych danej choroby.

Ataksja spastyczna typu 3 (autosomalna recesywna ataksja spastyczna z leukoencefalopatią, ARSAL) jest rzadką chorobą genetyczną charakteryzującą się zanikiem mózdzku, dystonią, a także łagodnym oczopląsem, skoliozą i lekkim upośledzeniem słuchu. Przyczyną są rearanżacje w genie *MARS2* zlokalizowanym na chromosomie 2q33.1.

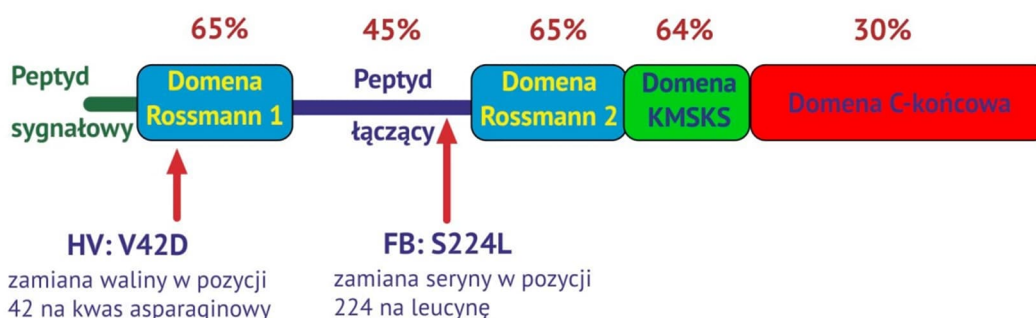
Identyfikacja podłoża genetycznego ataksji spastycznej typu 3 była możliwa dzięki badaniom mutantów *D. melanogaster*. U muszki owocowej mutacje w genie *Aats-met*, kodującym syntetazę metionylaminoacylo-tRNA, prowadzą do dysfunkcji mitochondriów i postępującej wraz z wiekiem degeneracji pręcików światłoczułych u *D.*



**Rys. 2.2a.** Procent degeneracji pręcików światłoczułych u *D. melanogaster* z mutacjami w genie *Aats-met* w stanie heterozygotycznym (HV/FB) i homozygotycznym (HV/HV i FB/FB) w zależności od wieku (Bayat i inni 2012).

*melanogaster*. W genie występują dwa zmutowane allele *HV* i *FB* oraz allele *Df* i *PB* warunkujące normalny rozwój pręcików światłoczułych. Homozygoty *HV/HV* oraz *FB/FB* charakteryzują się silną degeneracją pręcików począwszy od pierwszego tygodnia. Formy te są semiletalne. U heterozygot *HV/FB* degeneracja pręcików jest opóźniona, rozpoczyna się dopiero w drugim tygodniu (Rys. 2.2a).

Na podstawie sekwencji *Aats-met* zidentyfikowano ludzki homolog, *MARS2*, który również koduje metionilo-aminoacylo-tRNA. Podobnie jak *Aats-met*, *MARS2* koduje białko mitochondrialne, którego sekwencja jest od 44% do 65% identyczna z sekwencją białka kodowanego przez *Aats-met* (Rys. 2.2b).



**Rys. 2.2b.** Struktura białka AATs-met u *D. melanogaster* i jego podobieństwo do białka MARS2 człowieka. Procent identycznych sekwencji w zależności od regionu białka podano na górze. Strzałki wskazują mutacje u *D. melanogaster* prowadzące do degeneracji pręcików światłoczułych (Bayat i inni 2012).

Gen *MARS2* człowieka zlokalizowano na długim ramieniu chromosomu 2 (2q) w obrębie prążka 33.1, w regionie, który wcześniej powiązano z chorobą neurologiczną określaną jako ataksja spastyczna typu 3 (ARSAL). Gen *MARS2* zbudowany jest z jednego egzonu o długości 3 528 bp, który koduje polipeptyd o długości 593 aminokwasów. Mutacje w genie *MARS2* obejmują duplikacje i delecje znacznych fragmentów, które powodują powstanie nieaktywnych polipeptydów. W efekcie poziom białka kodowanego przez *MARS2* jest znacznie obniżony u chorych z ARSAL. Prowadzi to do zaburzeń w łańcuchu oddechowym w mitochondriach i nadprodukcji reaktywnych form tlenu, które powodują uszkodzenie neuronów i zaburzenie podziałów komórkowych (Bayat i inni 2012).

### ➔ 3. Markery izoenzymatyczne

**Izoenzymy to formy enzymu, które pełnią taką samą funkcję katalityczną, ale różnią się właściwościami w polu elektrycznym i/lub specyfiką tkankową.**

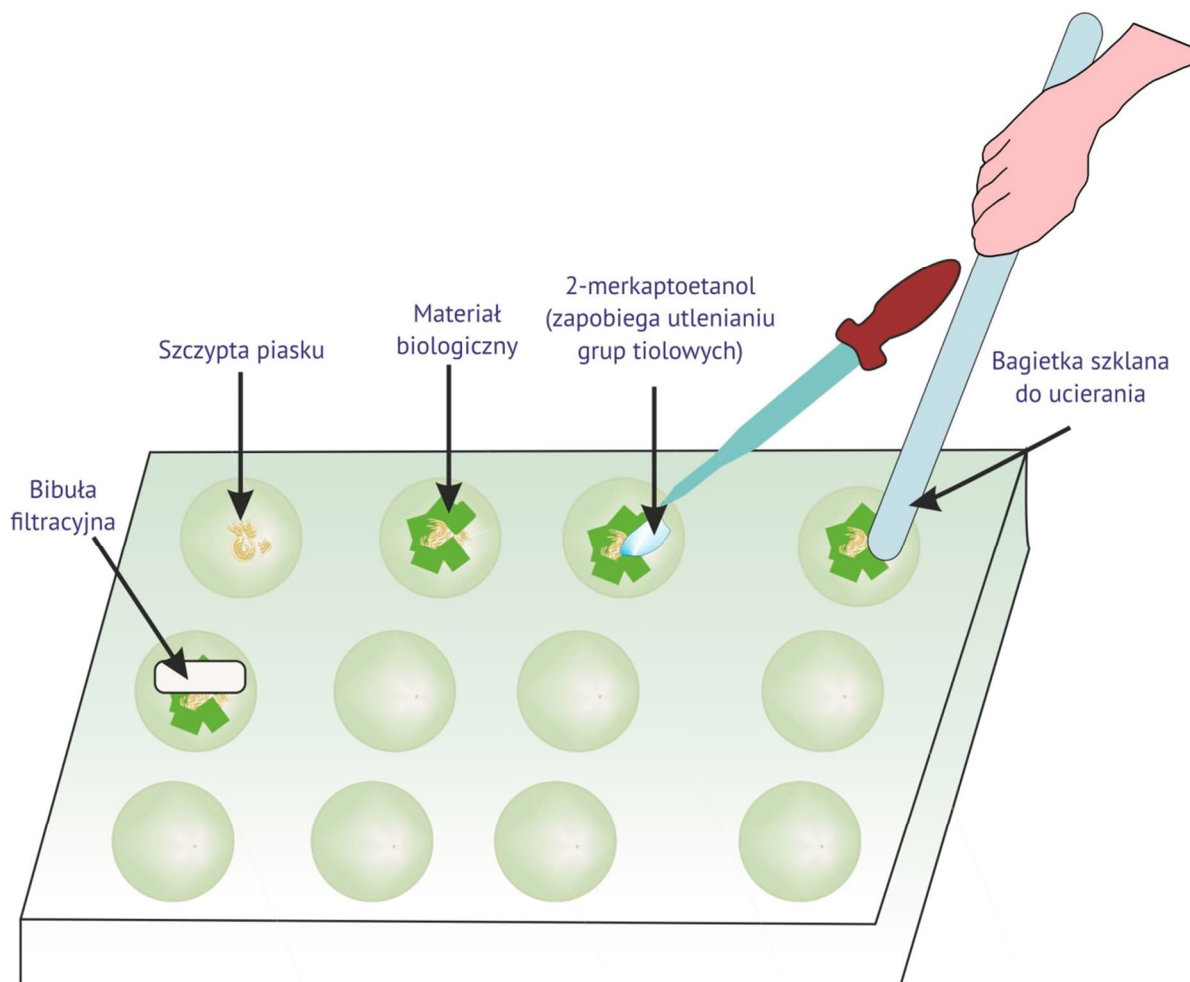
Enzymy najczęściej występują w postaci różnych form molekularnych określanych izoenzymami. Izoenzymy można wykryć na podstawie pozycji, jaką zajmują na stałym nośniku po elektroforezie, a także na podstawie różnic we właściwościach fizycznych, kinetycznych lub za pomocą przeciwciał. Główną zaletą markerów izoenzymatycznych jest łatwość przełożenia układu prążków na żelu na genotyp. Dzięki temu enzymy pozwalają na ocenę zmienności genetycznej populacji, gdyż każdemu osobnikowi można przypisać genotyp.

Zastosowanie izoenzymów w genetyce populacyjnej po raz pierwszy wykazało znaczne różnicowanie genetyczne wielu gatunków. Izoenzymy wykorzystywane są także w diagnostyce różnicowej wielu chorób. Przykładowo, wzrost stężenia kwaśnej fosfatazy w osoczu występuje w wirusowym zapaleniu wątroby, poziom trypsyny wzrasta w chorobach trzustki.



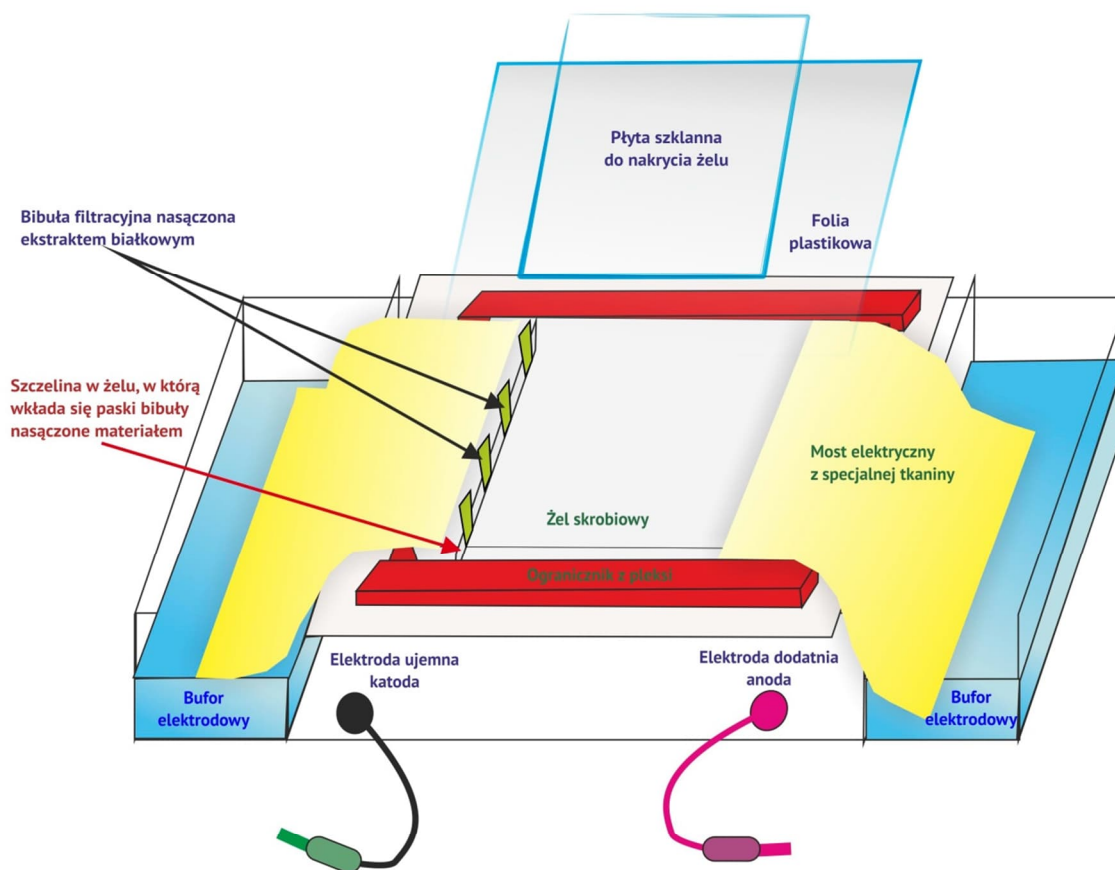
### ➔ 3.1. Rozdział elektroforetyczny białek enzymatycznych

**Elektroforeza, która polega na rozdzieleniu molekuł na podstawie ich wielkości i ładunku pod wpływem pola elektrycznego, jest najbardziej popularną metodą identyfikacji izoenzymów.** Elektroforezę prowadzi się na stałym nośniku. W przypadku białek najczęściej wykorzystuje się skrobię i poliakrylamid. W celu identyfikacji izoenzymów sporządza się ekstrakt surowy białek przez ucieranie materiału biologicznego w buforze ekstrakcyjnym z dodatkiem piasku kwarcowego (Rys. 3.1a).



**Rys. 3.1a.** Przygotowanie materiału biologicznego do elektroforezy białek enzymatycznych. Ekstrakt zawiera wszystkie białka obecne w tkance.

Wszystkie białka z tkanki są obecne w ekstrakcie. Komponenty białkowe ekstraktu rozdzielane są na podstawie ich ładunku i wielkości w specjalnych naczyniach (Rys. 3.1b). Enzymy mające ładunek ujemny migrują do elektrody dodatniej (anody). Te, które mają ładunek dodatni wędrują do elektrody ujemnej (katody). Szybkość migracji zależy od wielkości ładunku i wielkości białka. Po zakończeniu elektroforezy w żelu znajdują się wszystkie białka z tkanki. Ich identyfikacja polega na wykorzystaniu specyficznej dla danego enzymu reakcji histochemicznej.



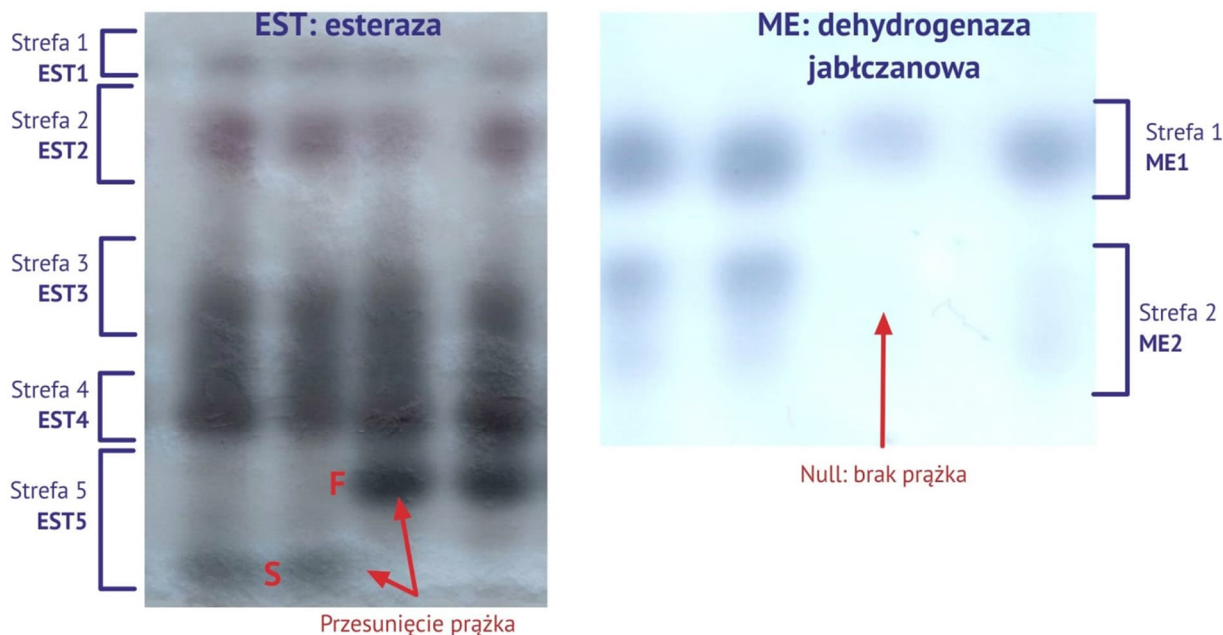
**Rys. 3.1b.** Elektroforeza w żelu skrobiowym. Paski bibuły filtracyjnej nasączone ekstraktem białkowym umieszcza się w szczelinie żelu. W zbiornikach naczynia znajduje się bufor elektrodowy. Żel połączony jest z buforem za pomocą mostków elektrycznych ze specjalnej tkaniny (żel nie jest zanurzony w buforze). Po podłączeniu pola elektrycznego następuje migracja białek. Trwa ona aż do momentu zakończenia elektroforezy. Po odłączeniu pola elektrycznego białka zostają unieruchomione w określonym miejscu na żelu.

## ➔ 3.2. Odczytywanie wyników analizy enzymatycznej

Enzymy uwidaczniane są na żelu w postaci układu prążków, które mogą występować w kilku strefach. Każda strefa odpowiada jednemu locus enzymatycznemu. Różne strefy odpowiadają izoenzymom kodowanym przez różne loci. Zmienność form enzymu w obrębie strefy wynika z obecności różnych alleli w locus, które dają różny wzór prążków. Formy enzymu wynikające z obecności różnych alleli w locus to allozymy. Izozymy i allozymy często opisuje się w postaci ruchliwości podawanej w mm i liczonej od początku żelu (miejsca nałożenia prób).

Zmienność w obrębie strefy obserwowana jest w postaci przesunięcia prążka lub braku prążka (Rys 3.2).

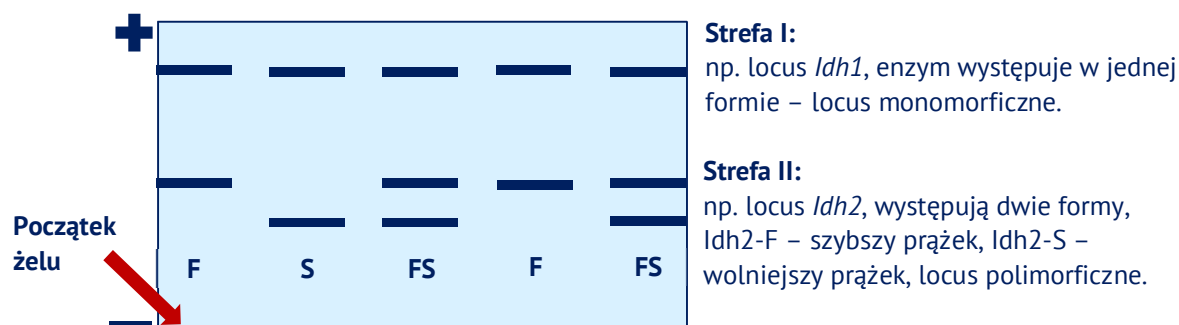
- **Przesunięcie** – prążek zmienia pozycję w stosunku do prążka obserwowanego w kontroli. Prążek szybszy najczęściej oznaczamy jako F (fast), prążek wolniejszy jako S (slow). Przesunięcie prążka dziedziczy się w sposób kodominujący, czyli u heterozygoty widoczne są wszystkie prążki homozygot rodzicielskich. Pozycję prążków oceniamy w stosunku do początku żelu – miejsca nałożenia prób.
- **Brak prążka, tzw. null** oznacza brak aktywności enzymu. Widoczne jest „puste miejsce” na żelu. Brak prążka jest cechą recesywną, obecność prążka jest cechą dominującą.



**Rys. 3.2a.** Obraz izoenzymów otrzymanych w wyniku rozdziłu elektroforetycznego. EST: esterazy, zidentyfikowano pięć stref, które odpowiadają izoenzymom (EST1 – EST5) kodowanym przez pięć różnych loci. W locus *Est5* (enzym EST5, strefa 5) występują dwa allele, jeden koduje formę szybką (F), drugi wolną (S). ME: dehydrogenaza jabłczanowa, zidentyfikowano 2 strefy odpowiadające dwóm loci. W locus *Me2* (enzym ME2, strefa 2) zidentyfikowano dwa allele, przy czym jeden nie wykazywał aktywności (null) i jest obserwowany na żelu jako „puste miejsce”.

Nie wszystkie loci enzymatyczne wykazują zmienność u danego gatunku/populacji. Wiele enzymów jest konserwatywnych i występuje w postaci jednej formy kodowanej przez jeden allel. Takie enzymy określa się mianem monomorficznych. Przykładem loci monomorficznych są *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4* i *Me1* przedstawione na rysunku 3.2a. Polimorficzne loci enzymatyczne charakteryzują się obecnością co najmniej dwóch alleli kodujących różne allozomy. Przykładem loci polimorficznych na rysunku 3.2a jest *Est5* i *Me2*.

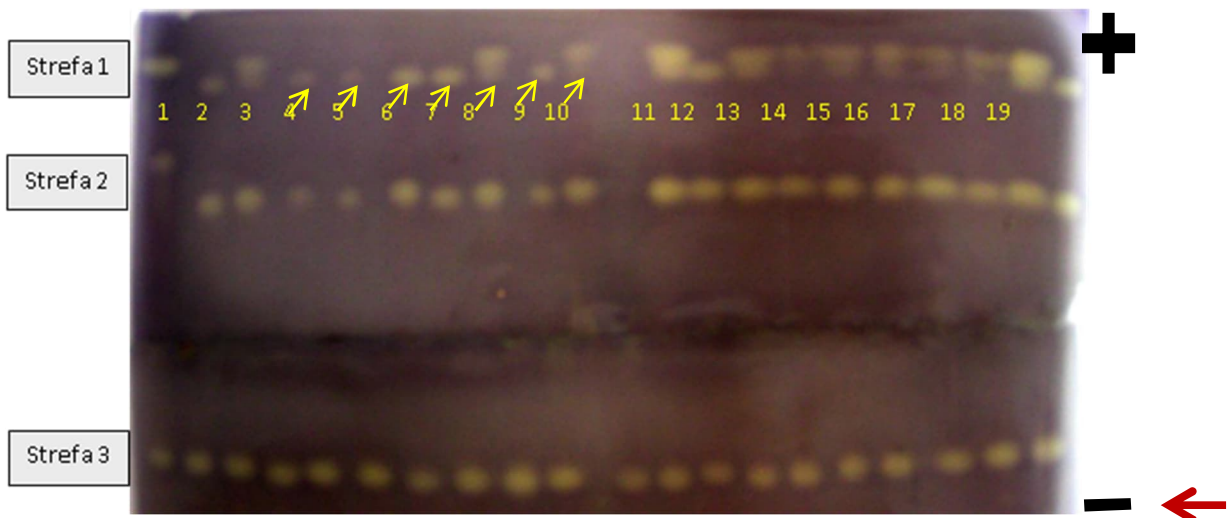
Kodominujące dziedziczenie występujące w przypadku przesunięcia prążka ma konsekwencje w obserwowanych obrazach na żelu. W przypadku kodominacji heterozygota ma cechy obu homozygot. Na żelu jest to obserwowane jako suma prążków występujących u homozygot, przy założeniu, że enzym jest monomerem (Rys. 3.2b).



**Rys. 3.2b.** Schemat odczytu żelu przedstawiającego rozdzielanie elektroforetyczne izoenzymów przy założeniu, że enzym jest monomerem.



3.2.1. Na rysunku poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Wiedząc, że aktywny enzym jest monomerym, zinterpretuj uzyskany żel. Strzałka oznacza miejsce nałożenia prób. Proszę odczytu dokonać w komputerze.



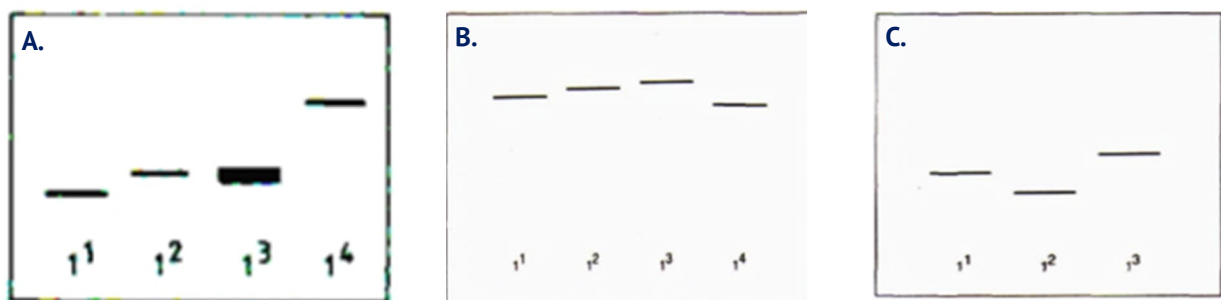
**Rys. 3.2.1.** Obraz uzyskany w wyniku rozdziału elektroforetycznego izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej na żelu skrobiowym.

- Ile izoenzymów uwarunkowanych różnymi genami widocznych jest na rysunku. Oznacz te geny za pomocą symbolu *Sod* i odpowiedniego numeru przyjmując 1 dla izoenzymów o największej ruchliwości.
- Ile alleli możemy wyróżnić w każdej ze stref?
- W której strefie obserwujemy allozymy?
- Przyjmując oznaczenia A1 dla allela warunkującego enzym o wyższej ruchliwości i A2 dla allela warunkującego enzym o niższej ruchliwości podaj genotypy osobników 1–10.



### 3.3. Allele wielokrotne

Dla izoenzymów często obserwujemy allele wielokrotne, co oznacza, że w populacji są trzy lub więcej alleli w locus. Allele te dają prążki o różnej ruchliwości. Wówczas oznaczamy je liczbami wskazującymi na ruchliwość w mm mierzoną drogą przebytą od początku żelu, np. *Idh1-10*, *Idh1-20* itd. Zapis powyższy odczytujemy jako: locus *Idh1*, allel o ruchliwości 10 mm; locus *Idh1*, allel o ruchliwości 20 mm. Występowanie alleli wielokrotnych komplikuje obraz żeli zwłaszcza w analizach populacyjnych (Rys. 3.3), co utrudnia prawidłowy odczyt.

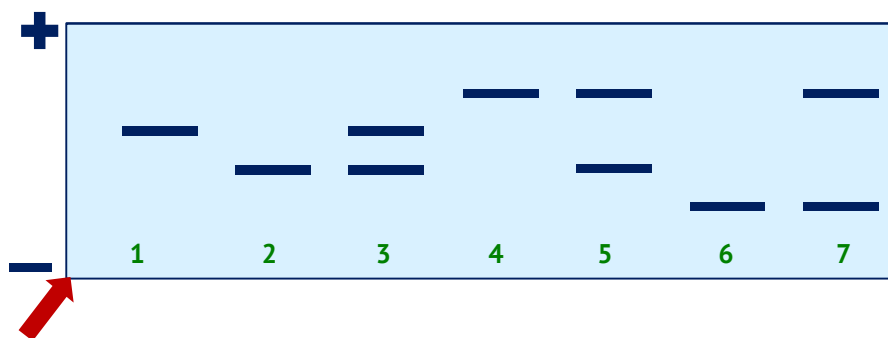


**Rys. 3.3.** Występowanie alleli wielokrotnych w loci enzymatycznych. A. Locus *Aat* u *Chara*. B. Locus *Lap* u *Pleurozium schreberi*. C. Locus *Px* u *Pleurozium schreberi*.

3.3.1. Na rysunku 3.3.1. przedstawiono schemat wzorów prążków dla locus *Mdh*. Aktywny enzym jest monomerym.

A. Ile alleli obserwujemy w tym locus?

B. Proszę oznaczyć allele numerami, przyjmując numer 1 dla najszybszego allele i podać genotypy osobników obserwowanych na rys. 3.3.



Rys. 3.3.1. Wzór prążków uzyskany dla enzymu MDH. Strzałka wskazuje początek żelu. Cyfry oznaczają poszczególne osobniki.

### ➔ 3.4. Multimery

W przypadku enzymów, które funkcjonują w postaci monomerów, określenie genotypu jest proste – homozygoty mają zawsze jeden prążek, a heterozygoty dwa. Jednakże wiele enzymów występuje w postaci multimetrów, które składają się z dwóch lub większej liczby łańcuchów polipeptydowych. Jeżeli dany gen koduje multimeryczny enzym, zazwyczaj u heterozygoty łańcuchy polipeptydowe kodowane przez różne allele łączą się prowadząc do powstania wieloprążkowych fenotypów.

- Homomery zbudowane są z identycznych łańcuchów polipeptydowych. W zależności od liczby łańcuchów mogą to być homodimery, homotrimery, homotetramery itd.
- Heteromery zbudowane są z różnych łańcuchów polipeptydowych kodowanych przez różne allele danego locus, lub różne loci. W zależności od liczby łańcuchów mogą to być heterodimery, heterotrimery, heterotetramery itd.

Jeżeli funkcjonalny enzym kodowany przez jedno locus jest dimerem, to heterozygoty  $A_1A_2$ , gdzie  $A_1$  i  $A_2$  oznaczają różne allele, mają trzy prążki:

- jeden odpowiadający dwóm łańcuchom polipeptydowym kodowanym przez allel  $A_1$ ,
- jeden odpowiadający dwóm łańcuchom polipeptydowym kodowanym przez allel  $A_2$ ,
- jeden prążek w środku, pomiędzy prążkami odpowiadającymi homozygotom; środkowy prążek odpowiada cząsteczce enzymu zbudowanej z jednego łańcucha polipeptydowego kodowanego przez  $A_1$  i jednego łańcucha polipeptydowego kodowanego przez  $A_2$ .

W ujęciu ilościowym, stosunek cząstek będących homodimerami do heterodimerów wynosi 1:2:1, gdzie 1 to homodimery jednego typu, 2 to heterodimery, 1 to homodimery drugiego typu. Ponieważ heterodimerów jest dwukrotnie więcej niż homodimerów, prążek odpowiadający heterodimerom powinien być intensywniejszy.

Jeżeli funkcjonalny enzym jest tetramerem kodowanym przez jedno locus to liczba prążków u heterozygoty zwiększa się do pięciu (Rys. 3.4). Wynika to z faktu, że składanie polipeptydów multimerycznego enzymu kodowanego przez jedno locus jest losowe.

Multimery mogą także powstać w wyniku współdziałania różnych loci, co dodatkowo komplikuje wzory elektroforetyczne. Przykładem takiego enzymu jest dehydrogenaza mleczanowa człowieka, która występuje w postaci tetrameru i jest kodowana przez dwa loci. W przypadku multimetrów hodowanych przez różne loci składanie polipeptydów nie zawsze jest losowe i w dużej mierze zależy od czasu, który upłynął od duplikacji pierwotnego locus.



**Rys. 3.4.** Wzór prążków dla tetramerycznego enzymu kodowanego przez jedno locus, w którym występują dwa allele.

### 3.4.1. Wzory prążków dehydrogenazy cytrynianowej ssaków

Dehydrogenaza cytrynianowa (IDH) u ssaków występuje w postaci kilku izoenzymów uwarunkowanych różnymi loci. IDH1 funkcjonuje jako monomer, który szybko migruje w polu elektrycznym i na żelu znajduje się w pobliżu anody. IDH1 występuje w postaci dwóch allozymów, formy szybszej A1 i wolniejszej, A2. IDH2 funkcjonuje jako dimer. IDH2 posiada ładunek dodatni, szybsza forma IDH2 jest oznaczona jako B1 a wolniejsza jako B2.

- Proszę narysować obraz wzoru prążków, na którym będą widoczne wszystkie możliwe homozygoty w obu loci oraz heterozygota w obu loci.
- Jak odróżnić na żelu heterozygotę dla IDH1 od heterozygoty dla IDH2?
- Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci, jeżeli skrzyżujemy osobnika o genotypie A1A1B1B2 z osobnikiem A2A2B1B2?
- Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci, jeżeli skrzyżujemy dwa osobniki o genotypie A1A2B2B2.
- Jak wyglądałyby wzory u homozygot w locus IDH1 i heterozygoty w tym locus, gdyby dodatkowo powstawały 2 prążki w wyniku obróbki potranslacyjnej?

## ➔ 4. Markery DNA

Markery DNA stanowią użyteczne narzędzie w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych. Markery DNA okazały się bardzo wygodne w mapowaniu genetycznym, badaniach populacyjnych i ewolucyjnych, a także w identyfikacji określonych genotypów w celach diagnostycznych. Do najbardziej korzystnych cech markerów DNA należy ich ogromna ilość oraz wysoki polimorfizm.

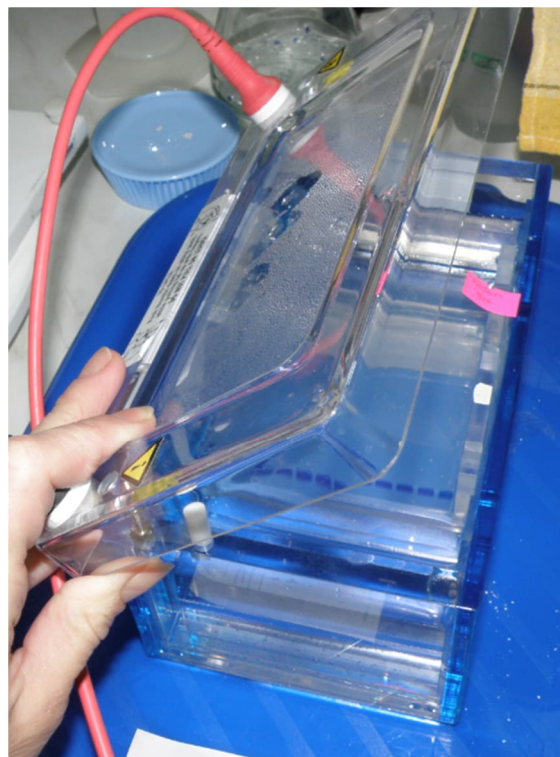
Polimorfizm markerów DNA wynika z substytucji pojedynczych nukleotydów (SNP), insercji i delecji nukleotydów (in-del), niewielkich duplikacji, translokacji i insercji. Najbardziej użyteczne są markery DNA, które są równomiernie rozmieszczone w genomie jak np. AFLP, SSAP. Wiele markerów DNA znajduje się w regionach genomu, które nie zawierają genów. Klasycznie takie markery określa się mianem neutralnych, ponieważ dotyczą sekwencji niekodujących. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że dane z sekwencjonowania genomów wykazały, że sekwencje

niekodujące w DNA często pełnią różne funkcje regulatorowe i niekoniecznie marker zlokalizowany poza genem, a dokładniej egzonom, jest neutralny.

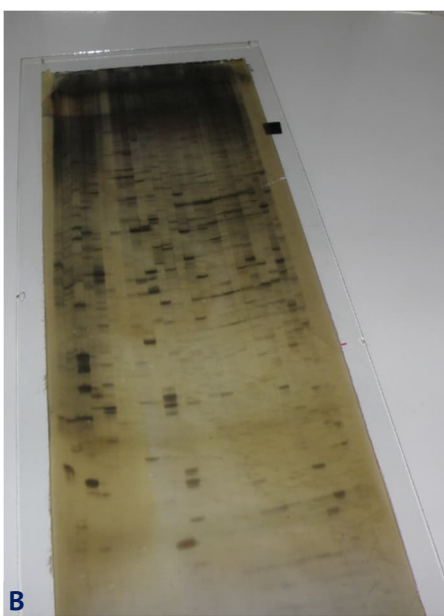
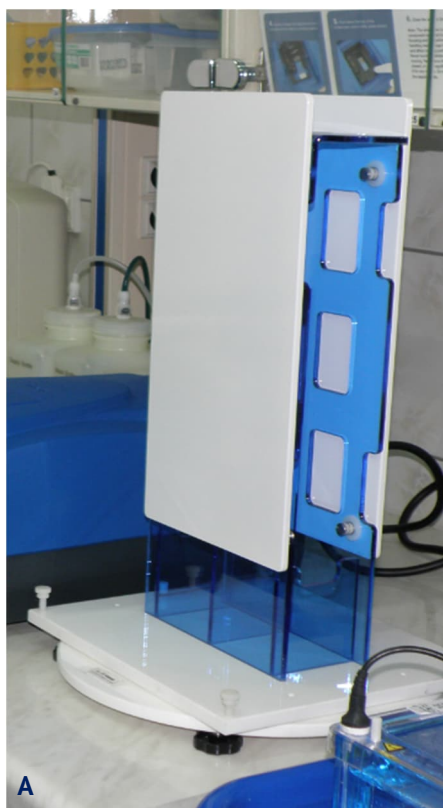
Markery DNA dzieli się w zależności od metody wykorzystywanej do detekcji polimorfizmu DNA. Generalnie wyróżnia się markery wykorzystujące enzymy restrykcyjne (analiza restrykcyjna, RFLP); markery wykorzystujące reakcję PCR (STS, SSR, RAPD i inne) oraz markery będące kombinacją enzymów restrykcyjnych oraz PCR (AFLP, SSAP).

W technologii markerów DNA materiałem wyjściowym najczęściej jest całkowity DNA wyizolowany z tkanki. Otrzymany DNA trawi się enzymami restrykcyjnymi lub przeprowadza reakcję PCR przy użyciu starterów, które powielają wybrane fragmenty DNA. Produkty reakcji rozdziela się na żelach agarozowych lub poliakrylamidowych (Rys. 4a i 4b). W praktyce markery DNA obserwowane są w postaci prążków na żelu lub pików odczytywanych przy pomocy sekwenatorów.

Markery DNA mogą być kodominujące lub dominujące. W przypadku markerów kodominujących obserwujemy różnice w

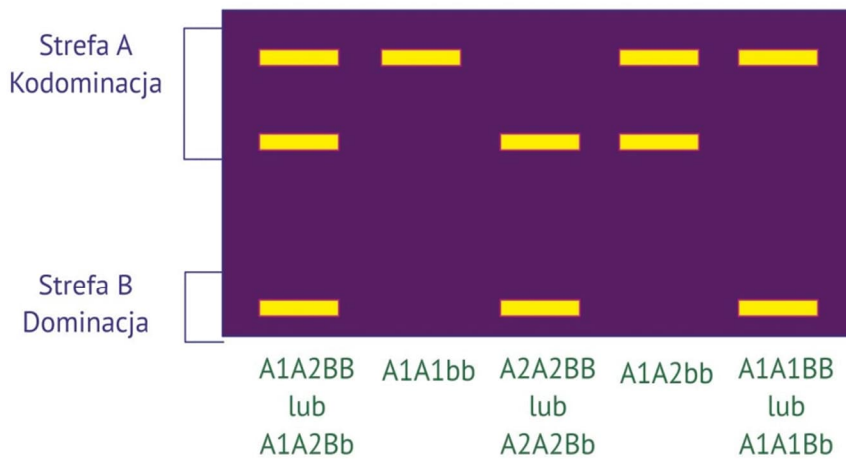


**Rys. 4a.** Naczynie do elektroforezy agarozowej DNA. Widoczne są studzienki z naniesionym DNA oraz barwnikiem.



**Rys. 4b.** A. Naczynie do elektroforezy poliakrylamidowej. B. Żel poliakrylamidowy z wybarwionymi prążkami DNA. Widoczna szyba, do której przymocowany jest żel.

ruchliwości prążków na żelu, które wynikają z różnej długości analizowanego fragmentu. Heterozygota ma wówczas dwa prążki. Markery kodominujące mogą występować w postaci wielu alleli. Polimorfizm dominujących markerów DNA polega na obecności lub braku prążka, a więc mogą występować tylko dwa allele. Brak prążka jest cechą recesywną. Dominujące markery DNA nie pozwalają na rozróżnienie homozygot dominujących od heterozygot (Rys. 4c).



**Rys. 4c.** Polimorfizm markerów DNA. W strefie A występuje kodominacja. Heterozygoty można jednoznacznie odróżnić od homozygot. W strefie B występuje dominacja. Homozygoty dominujące i heterozygoty mają taki sam fenotyp – obecność prążka. Rozróżnienie między strefą kodominującą i dominującą występującą na jednym żelu jest praktycznie niemożliwe bez mapowania. Dlatego odczyt żelu zależy od typu markera. Markery RFLP i SSR odczytuje się jako kodominujące, a markery RAPD, STS, AFLP, SSAP odczytuje się jako dominujące.

## ➔ 4.1. Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne (restryktazy, endonukleazy restrykcyjne) to endonukleazy, które mają zdolność przecinania łańcucha DNA w ściśle określonych miejscach. Pochodzą od bakterii i archeontów, u których pełnią funkcje ochronne – degradują DNA bakteriofagów. Zidentyfikowano około 3600 różnych enzymów restrykcyjnych, które zalicza się do pięciu klas. Około 800 enzymów rutynowo używa się w biologii molekularnej. Enzymy te dostępne są komercyjnie. Nazwy enzymów restrykcyjnych pochodzą od bakterii, z których je wyizolowano. Przykładowo, *EcoRV* oznacza rodzaj *Escherichia* (E), gatunek *coli* (co), szczep R (R) oraz kolejność identyfikacji. Rzymska cyfra „V” oznacza, że był to piąty z kolei enzym restrykcyjny zidentyfikowany u szczepu R *Escherichia coli*.



### 4.1.1. Wykorzystanie programu NEB cutter

Dehydrogenaza 6-fosfoglukonowa (6PGD) jest istotnym enzymem cyklu pentozowego. Brak tego enzymu u człowieka powoduje hemolizę. Izoenzymy są krótsze od wariantu podstawowego na skutek mutacji typu delecji/insercji, która przesuwa ramkę odczytu.

**Rys. 4.1.1.** Zrzut ekranu z programu NEB cutter.



- Proszę wejść na stronę NEB cutter: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- W dużej białej ramce proszę wkleić sekwencję dostarczoną w pliku „Human 6PGD”.
- Pozostałe parametry proszę pozostawić bez zmian (minimum ORF length, NEB enzymes, standard sequences).
- Proszę wybrać „submit”.
- Otrzymamy schemat genu i miejsc restrykcyjnych wraz z nazwami enzymów.
- Proszę wybrać „Custom digest” (Rys. 4.1.1)
- Na liście, która się pojawi proszę wybrać *BsmI* i *MspI*.
- Proszę zaakceptować na dole strony „Digest”.
- Następnie korzystając z listy oraz wyników analizy proszę podać następujące informacje.

- A. Ile jest miejsc cięcia dla *BsmI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *BsmI*?
- B. Ile jest miejsc cięcia dla *MspI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *MspI*.
- C. Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 2% żelu agarozowym.
- D. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?
- E. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?
- F. Jaka jest długość fragmentów, które powstaną w wyniku przecięcia genu tylko przez *BsmI*?
- G. Ile jest i jak długie są fragmenty, które powstaną w wyniku przecięcia jednocześnie przez *MspI* i *BsmI*?



4.1.2. Cięcie sekwencji genu kodującego dehydrogenazę 6-fosfoglukonową (6PGD) enzymami restrykcyjnymi: *EcoRI* i *HpaII*.

Za pomocą programu NEB cutter proszę przeprowadzić symulację cięcia sekwencji genu kodującego dehydrogenazę 6-fosfoglukonową (6PGD) enzymami restrykcyjnymi: *EcoRI* i *HpaII*, a następnie odpowiedzieć na poniższe pytania. Proszę wykorzystać sekwencję dostarczoną w pliku „Human 6PGD”.

- A. Ile jest miejsc cięcia dla *EcoRI*? Proszę podać pozycję cięcia.
- B. Proszę podać sekwencję rozpoznawaną przez *EcoRI*, jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *EcoRI*?
- C. Ile jest miejsc cięcia dla *HpaII*? Proszę podać pozycję cięcia.
- D. Proszę podać rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *HpaII*?
- E. Proszę podać temperaturę i pH reakcji dla obu enzymów.
- F. Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 1,2% żelu agarozowym.
- G. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?
- H. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?
- I. Ile powstanie fragmentów w wyniku przecięcia genu 6PGD tylko przez *EcoRI* przy założeniu braku metylacji? Jaka jest ich długość?
- J. Ile powstanie fragmentów w wyniku przecięcia genu 6PGD tylko przez *HpaII* w przypadku, gdy sekwencja jest zmetylowana? Proszę uzasadnić odpowiedź.

## ➔ 4.2. Markery oparte o reakcję PCR – SSAP

Markery SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) wykorzystują polimorfizm w obrębie długich końcowych powtórzeń retrotranspozonów (LTR) lub końcowych odwróconych powtórzeń transpozonów DNA (TIR). Transpozony są obecne w genomach wszystkich Eukariota, w tym u człowieka, gdzie stanowią 60% genomu. Transpozony charakteryzują się ogromną zmiennością w odniesieniu do liczby kopii i lokalizacji w genomie. Transpozony są istotnym elementem zmienności genomów. Ich aktywność często związana jest z odpowiedzią na stres.

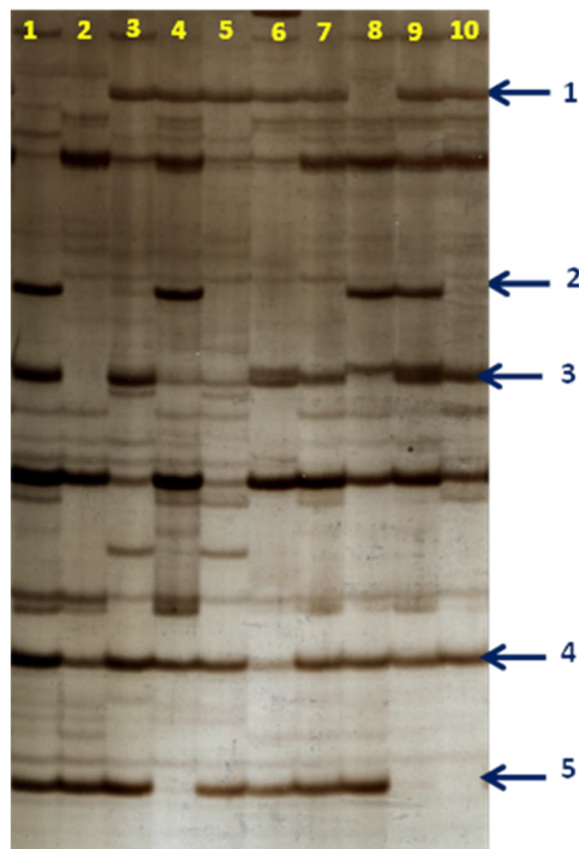
Metodyka SSAP łączy zasady analizy przy pomocy AFLP ze starterami specyficznymi dla określonych sekwencji transpozonowych. Polimorfizm SSAP jest widoczny w postaci prążków na żelu. Obecność prążka jest cechą dominującą, a brak recesywną. Ponadto obecność prążka świadczy o insercji transpozonu w danym miejscu. Dlatego markery SSAP mogą być wykorzystane do oceny liczby insercji w genomach.



### 4.2.1. Ocena liczby miejsc insercji transpozonu DNA typu CACTA

Na rysunku 4.2.1 przedstawiono fragment żelu poliakrylamidowego pokazujący rozdział produktów reakcji SSAP przy użyciu startera komplementarnego do transpozonu CACTA u 10 osobników. Proszę na podstawie stref zaznaczonych strzałkami uzupełnić poniższą tabelę. Proszę odczytu dokonać w komputerze.

Osobnik	Liczba insercji transpozonu CACTA
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	
9.	
10.	
Średnia liczba insercji w badanej grupie osobników.	
Nr strefy monomorficznej.	



Rys. 4.2.1. Żel przedstawiający miejsca insercji transpozonu DNA typu CACTA.

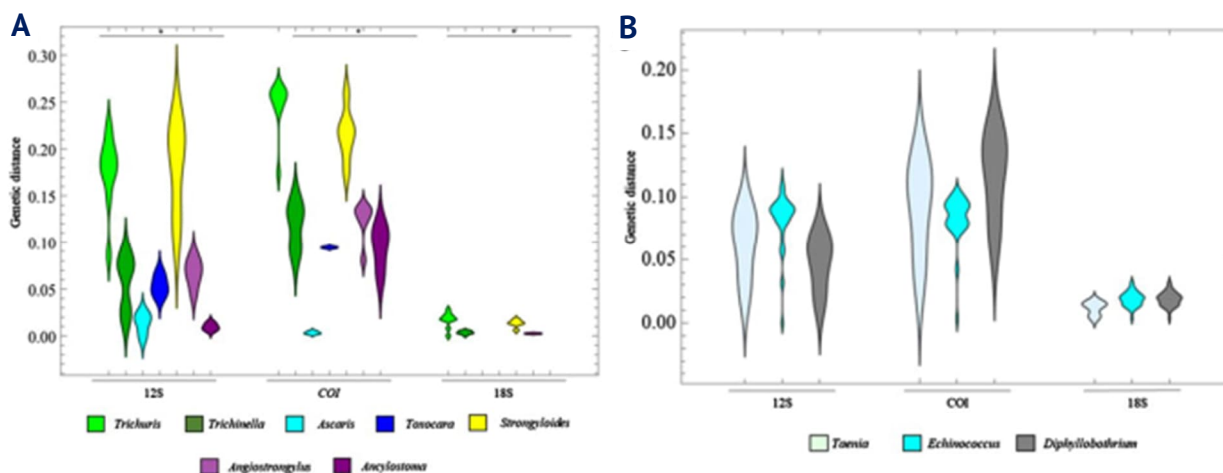
## 5. Zastosowanie markerów genetycznych

Większość cech gatunków, w tym człowieka jest uwarunkowana genetycznie. Jednakże DNA osobników należących do jednego gatunku może się różnić w pewnym, niewielkim zakresie. Różnice genetyczne między osobnikami jednego gatunku to zmienność genetyczna, która wpływa na kształtowanie się cech osobniczych. U człowieka zmienność genetyczna wpływa na fizjologię, rozwój, adaptację do różnych warunków. Podobnie jest u gatunków dziko żyjących, a także gatunków wykorzystywanych przez człowieka oraz tych, które stanowią zagrożenie wywołując choroby. Zrozumienie zmienności genetycznej człowieka, a także gatunków, od których jest zależny pozwala lepiej zapobiegać chorobom oraz je leczyć.

Markery molekularne stanowią bardzo efektywne narzędzie do analizy zmienności genetycznej oraz poszukiwania korelacji między cechami a zmiennością genomu. Korelacja między markerami molekularnymi a chorobami dziedzicznymi umożliwiła identyfikację mutacji odpowiedzialnych za takie choroby jak talasemia, fenyloketonuria, mukowiscydoza i wiele innych.

### ➔ 5.1. Identyfikacja gatunków pasożytniczych

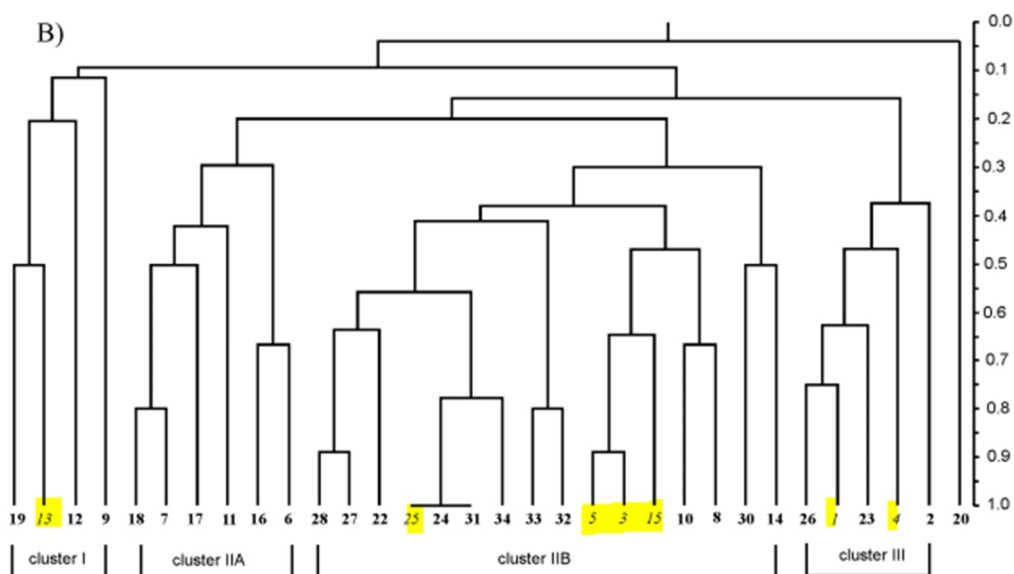
Najczęściej wykorzystuje się cztery klasy markerów: regiony ITS w genach dla rRNA, sekwencje genów dla rRNA, mt rRNA, geny mitochondrialne kodujące białka, w tym COI - gen dla podjednostki I oksydazy cytochromowej, NADH - gen dla NADH dehydrogenazy. Geny mitochondrialne wykazują większą zmienność sekwencji ze względu na szybszą ewolucję mtDNA. Wyższy stopień konserwatywności genów jądrowych dla rRNA wykorzystywany jest w identyfikacji jednostek wyższego rzędu.



**Rys. 5.1.** Zakres odległości genetycznej pomiędzy gatunkami (A) i rodzajami (B) nicieni uzyskany przy pomocy mitochondrialnych genów dla rRNA (12S), genu mitochondrialnego COI oraz jądrowych genów dla rRNA (18S). Znaczny zakres zmienności 12S oraz COI wskazuje na użyteczność tych markerów dla identyfikacji gatunków (Chan et al., 2021).

## ➔ 5.2. Epidemiologia *Mycobacterium tuberculosis*

W 2019 roku odnotowano 14 mln przypadków gruźlicy na świecie, zmarło 1,4 mln osób (śmiertelność 10%). Zrozumienie czynników wpływających na transmisję gruźlicy wymaga technik śledzenia poszczególnych szczepów w różnych populacjach. Epidemiologia molekularna stanowi połączenie biologii molekularnej i epidemiologii. Obejmuje ona analizę rozprzestrzeniania się chorób poprzez identyfikację patogenów i ich zróżnicowania na poziomie molekularnym. Do najczęściej wykorzystywanych markerów należy element insercyjny *IS6110* oraz gen *KatG*, który dodatkowo pozwala na różnicowanie szczepów wrażliwych i opornych na izoniazyd (najczęściej stosowany lek przeciwprątkowy).



**Rys. 5.2.** Grupowanie szczepów *M. tuberculosis* otrzymanych od pacjentów z północno-wschodniej Polski na podstawie sekwencji *IS6110*. Na żółto zaznaczono szczepy lekooporne.

## ➔ 5.3. Identyfikacja gatunków roślin na potrzeby produkcji kosmetyków

Pochodzenie materiału roślinnego jest istotne dla przemysłu kosmetycznego ze względu na regulacje prawne, etyczne, a także bezpieczeństwo kosmetyków. Zgodnie z Protokołem z Nagoja, rośliny wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym podlegają ścisłej kontroli. Celem jest przeciwdziałanie biopiractwu, a także pewność, że materiał wyjściowy nie jest skażony niepożądanymi związkami.

Identyfikacja gatunków na podstawie morfologii jest obarczona błędami związanymi z oznaczeniem oraz właściwościami danego gatunku. Gatunki taksonomiczne nie zawsze odpowiadają gatunkom biologicznym, co oznacza, że pomiędzy gatunkami taksonomicznymi nie zawsze występuje bariera reprodukcyjna. Gatunki takie łatwo się krzyżują, co skutkuje utratą cech istotnych dla przemysłu kosmetycznego. Markery DNA wykorzystywane są do identyfikacji roślin na poziomie gatunkowym i odmianowym od kilkudziesięciu lat:

- identyfikacja szafranu uprawnego (*Crocus sativus*);
- identyfikacja zanieczyszczeń kurkumy (*Curcuma longa*), gatunkiem dziko rosnącym (*Curcuma zedoaria*);
- identyfikacja roślin GMO.

## 6. Literatura

- Al-Khayri JM, Mahdy EMB, Taha HSA, Eldomiaty AS, Abd-Elfattah MA, Latef AAHA, Rezk AA, Shehata WF, Almaghasla MI, Shalaby TA i inni. 2022. Genetic and morphological diversity assessment of five *Kalanchoe* genotypes by SCoT, ISSR and RAPD-PCR markers. *Plants* 11:1722. Dostęp: doi.org/10.3390/plants11131722.
- Bayat V, Hiffault I, Jaiswal M, Te'treault M, Donti T, Sasarman F, Bernard G, Demers-Lamarche J, Dicaire MJ, Mathieu J. 2012. Mutations in the mitochondrial methionyl-tRNA synthetase cause a neurodegenerative phenotype in flies and a recessive ataxia (ARSAL) in humans. *PLOS Biology* 10:e1001288. Dostęp: doi:10.1371/journal.pbio.1001288
- Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD. 1999. *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:173-185
- Polok K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn: SQL.
- Ranganath HA, Tanuja T. 1999. Teaching and learning with *Drosophila*. Mutant phenotypes of *Drosophila melanogaster*. *Resonance*: 95-104.

## Odpowiedzi

### 1. Pojęcie markera genetycznego

#### 1.3. Koszt analizy

##### 1.3.1. Analiza zróżnicowania genetycznego populacji studentów Uniwersytetu Radomskiego

Pewien badacz otrzymał grant w wysokości 5 tys. PLN na ocenę różnic genetycznych studentów uczących się na różnych kierunkach WNMiNoZ. Przystępując do analiz rozważał wybór między markerami ISJ i SSAP. Koszt analizy jednej próbki przy pomocy markerów ISJ wynosi 1 EU (1 EU = 4,7 PLN), natomiast koszt analizy jednej próby przy pomocy markerów SSAP wynosi 8 EU. Średnia liczba loci generowanych przy pomocy techniki ISJ na jeden starter wynosi 10, przy czym średnia liczba polimorficznych loci wynosi 6. Technika SSAP generuje średnio 100 loci na jedną parę starterów, spośród których średnio 70 loci jest polimorficznych. Badacz wybrał markery ISJ, twierdząc, że przy pomocy markerów ISJ będzie mógł przeanalizować więcej osób niż przy pomocy markerów SSAP. Czy badacz postąpił słusznie? Proszę uzasadnić przedstawiając odpowiednie obliczenia.

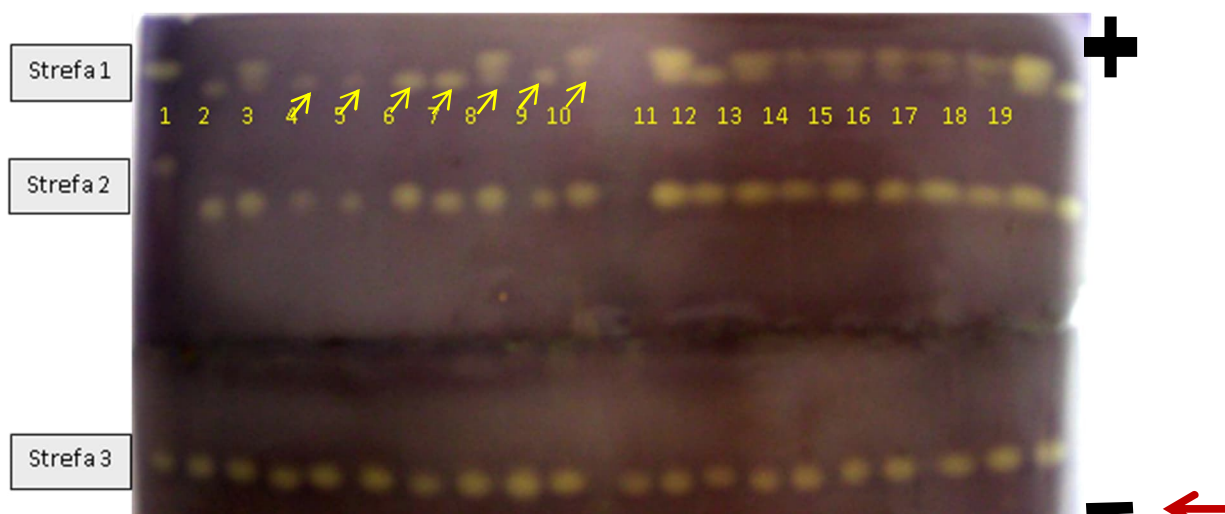
- W pierwszej kolejności należy ocenić ile populacji należy przeanalizować.
  - ▶ Na WNMiNoZ funkcjonują cztery kierunki: lekarski, kosmetologia, fizjoterapia i pielęgniarstwo. Ponieważ zadaniem badacza była ocena różnic genetycznych między populacjami studentów, należy przeanalizować **cztery populacje**, z których każda reprezentuje dany kierunek.
- Następnie należy ocenić ile prób możemy przeanalizować przy pomocy każdego z wymienionych typów markerów dysponując 5 tys. PLN.
  - ▶ Koszt analizy jednej próby przy pomocy techniki ISJ wynosi 1 EU, co odpowiada w przybliżeniu 4,7 PLN. Dysponując 5 tys. PLN możemy przeanalizować  $5\ 000/4,7 = 1063,8$  prób, w zaokrągleniu **1064 próby, co daje 266 prób na populację.**
  - ▶ Koszt analizy jednej próby przy pomocy techniki SSAP wynosi 8 EU, czyli  $8 \times 4,7 \text{ PLN} = 37,6 \text{ PLN}$ . Dysponując 5 tys. PLN możemy przeanalizować  $5\ 000/37,6 = 132,9$  prób, w zaokrągleniu **133 próby, co daje 33 próby na populację.**
- Porównanie liczby przeanalizowanych prób, faktycznie wypada na korzyść markerów ISJ. Jednakże, aby ocenić zróżnicowanie genetyczne należy tak dobrać technikę, aby przeanalizować dostatecznie dużą liczbę prób, przy jednocześnie dużej liczbie loci, które wykazują wysoki polimorfizm.
- Przyjmuje się, że minimalna liczba prób na populację powinna wynosić 20-30. Tym samym, aby ocenić wybór badacza należy dodatkowo ocenić, który z typów markerów pozwoli uzyskać więcej informacji o polimorfizmie. Dlatego w dalszej kolejności należy ocenić liczbę polimorficznych loci ujawnionych przez każdą z technik.

- Technika ISJ generuje średnio 10 loci, z których 6 jest polimorficznych. Analizując 266 osób z każdej populacji przy pomocy jednego startera ocenimy polimorfizm zaledwie w 6 różnych loci. Całkowita informacja uzyskana z analizy dla danej populacji będzie wynosiła **266 x 6 = 1596 genów**.
- Technika SSAP generuje średnio 100 loci na jedną parę starterów, z czego 70 jest polimorficznych. Analizując 33 osoby z populacji uzyskamy informację z 70 różnych loci, co jest blisko 12 razy więcej niż przy pomocy markerów ISJ. Całkowita informacja uzyskana dla populacji to **33 x 70 = 2 310 genów**, a więc o 44% więcej genów reprezentujących większy zakres zmienności genomu.
- W ostateczności wybór badacza nie był przemyślany, gdyż wybierając technikę SSAP uzyskałby więcej informacji o zróżnicowaniu badanych grup studentów. Liczba identyfikowanych polimorficznych loci zrekompensowałaby mniejszą liczbę prób, która i tak mieści się w dopuszczalnych granicach zalecanych w analizach populacyjnych.

### 3. Markery izoenzymatyczne

#### 3.2. Odczytywanie wyników analizy enzymatycznej

3.2.1. Na rysunku poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Wiedząc, że aktywny enzym jest monomerym, zinterpretuj uzyskany żel. Strzałka oznacza miejsce nałożenia prób. Proszę odczytu dokonać w komputerze.



**Rys. 3.2.1.** Obraz uzyskany w wyniku rozdziału elektroforetycznego izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej na żelu skrobiowym.

A. Ile izoenzymów uwarunkowanych różnymi genami widoczne jest na rysunku. Oznacz te geny za pomocą symbolu *Sod* i odpowiedniego numeru przyjmując 1 dla izoenzymów o największej ruchliwości.

- 3 izoenzymy uwarunkowane różnymi genami.
  - ▶ Strefa 1: Sod1
  - ▶ Strefa 2: Sod2
  - ▶ Strefa 3: Sod3

- Enzymy o najwyższej ruchliwości znajdują się najdalej od miejsca nałożenia zaznaczonego strzałką. Wszystkie pokazane izoenzymy mają ładunek ujemny i dlatego przemieszczają się w kierunku elektrody dodatniej (anody).

**B.** Ile alleli możemy wyróżnić w każdej ze stref?

- Strefa 1: 2 allele (jedyna, w której jest obserwowany polimorfizm)
- Strefa 2: 1 allel
- Strefa 3: 1 allel

**C.** W której strefie obserwujemy allozymy?

- W strefie 1, różne prążki oznaczają izoenzymy warunkowane allelami jednego genu, są to więc allozymy.

**D.** Przyjmując oznaczenia A1 dla allela warunkującego enzym o wyższej ruchliwości i A2 dla allela warunkującego enzym o niższej ruchliwości podaj genotypy osobników 1–10.

- A1A1: osobniki 1 i 10
- A2A2: osobniki 2, 4, 5, 6, 7, 9
- A1A2: osobniki 3 i 8

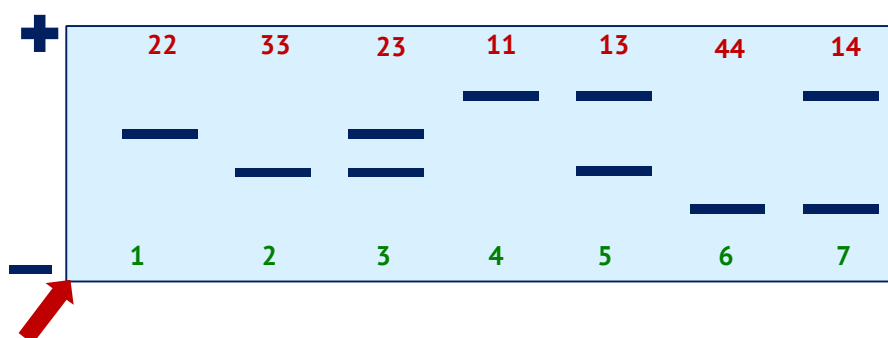
### 3.3. Allele wielokrotne

3.3.1. Na rysunku 3.3.1. przedstawiono obraz rozdziału elektroforetycznego dla MDH. Aktywny enzym jest monomerym.

**A.** Ile alleli obserwujemy w tym locus?

- Cztery allele

**B.** Proszę oznaczyć allele numerami, przyjmując numer 1 dla najszybszego allela i podać genotypy osobników obserwowanych na rys. 3.3.



**Rys. 3.3.1.** Wzór prążków uzyskany dla enzymu MDH. Strzałka wskazuje początek żelu. Cyfry oznaczają poszczególne osobniki.

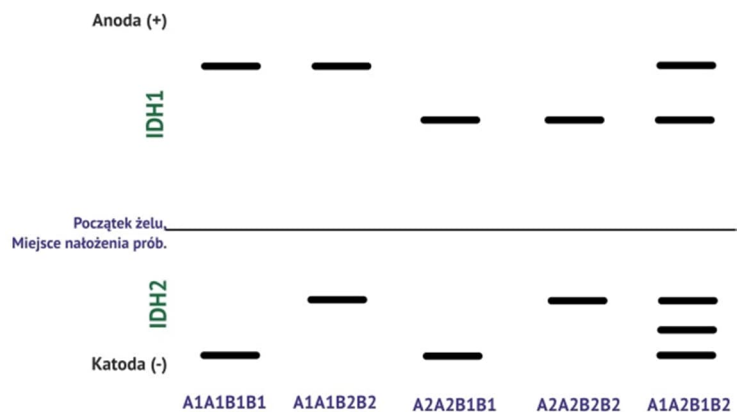


### 3.4. Multimery

#### 3.4.1. Wzory prążków dehydrogenazy cytrynianowej ssaków

Dehydrogenaza cytrynianowa (IDH) u ssaków występuje w postaci kilku izoenzymów uwarunkowanych różnymi loci. IDH1 funkcjonuje jako monomer, który szybko migruje w polu elektrycznym i na żelu znajduje się w pobliżu anody. IDH1 występuje w postaci dwóch allozymów, formy szybszej A1 i wolniejszej, A2. IDH2 funkcjonuje jako dimer. IDH2 posiada ładunek dodatni, szybsza forma IDH2 jest oznaczona jako B1 a wolniejsza jako B2.

A. Proszę narysować obraz wzoru prążków, na którym będą widoczne wszystkie możliwe homozygoty w obu loci oraz heterozygota w obu loci.



Wzór prążków na rys. 3.4.1a

B. Jak odróżnić na żelu heterozygotę dla IDH1 od heterozygoty dla IDH2?

**Rys. 3.4.1a.** Wzór prążków IDH dla homozygot i heterozygot. Na dole podano genotypy osobników.

IDH1 migruje w części anodowej, a IDH2 w części katodowej.

Heterozygoty w locus *IDH1* mają 2 prążki, a w locus *IDH2* – 3 prążki.

C. Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci, jeżeli skrzyżujemy osobnika o genotypie A1A1B1B2 z osobnikiem A2A2B1B2?

Gamety	A2B1	A2B2
A1B1	A1A2 B1B1	A1A2 B1B2
A1B2	A1A2 B1B2	A1A2 B2B2

1/2 = 50% (Rys. 3.4.1c)

**Rys. 3.4.1c.** Segregacja w potomstwie osobników A1A1B1B2 i A2A2B1B2.

D. Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci, jeżeli skrzyżujemy dwa osobniki o genotypie A1A2B2B2.

0%

Oba osobniki są homozygotami w locus *IDH2*, dlatego nie ma możliwości uzyskania heterozygot w obu loci.

E. Jak wyglądałyby wzory u homozygot w locus *IDH1* i heterozygoty w tym locus, gdyby dodatkowo powstawały 2 prążki w wyniku obróbki potranslacyjnej?

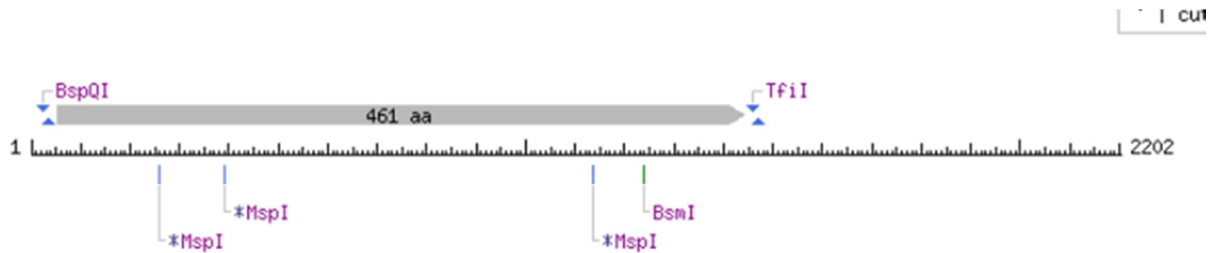


**Rys. 3.4.1e.** Wzory prążków u homozygot i heterozygoty w locus *IDH1* przy założeniu pojawienia się dodatkowych dwóch prążków w wyniku obróbki potranslacyjnej.

## 4. Markery DNA

### 4.1. Enzymy restrykcyjne

#### 4.1.1. Wykorzystanie programu NEB cutter



**Rys. 4.1.1a.** Wynik cięcia sekwencji genu dehydrogenazy 6-fosfoglukonowej enzymami *BsmI* i *MspI*.

**A.** Ile jest miejsc cięcia dla *BsmI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *BsmI*?

- 1 miejsce cięcia.
- pozycja 1238 bp.
- Rozpoznaje GAATG<sub>↓</sub>CN<sup>↑</sup> (odczytujemy na liście enzymów).
- Lepkie końce (wynika z zapisu i oznaczenia strzałkami, które pokazują sposób przecięcia).

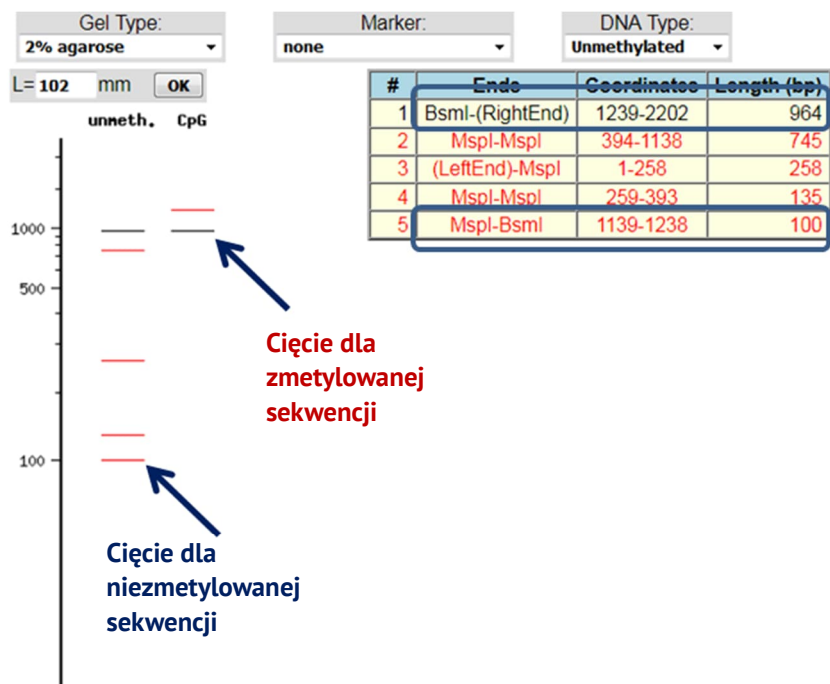
**B.** Ile jest miejsc cięcia dla *MspI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *MspI*.

- 3 miejsca cięcia.
- Pozycje: 258 bp; 393 bp; 1138 bp.
- Rozpoznaje C<sub>↓</sub>CG<sup>↑</sup>G (odczytujemy na liście enzymów).
- Lepkie końce.

**C.** Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 2% żelu agarozowym.

**D.** Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?

- 5.



**Rys. 4.1.1c.** Obraz prążków na 2% żelu agarozowym, który powstał w wyniku cięcia sekwencji genu dehydrogenazy 6-fosfoglukonowej enzymami *BsmI* i *MspI*.

E. Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?

- 2.

F. Jaka jest długość fragmentów, które powstaną w wyniku przecięcia genu tylko przez *BsmI*?

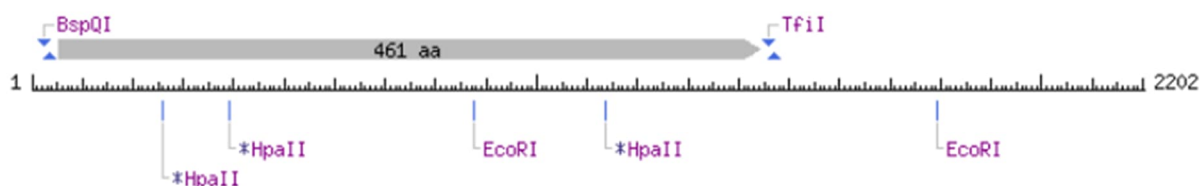
- 964 i 1238.
- *BsmI* tnie tylko raz, zatem powstaną dwa fragmenty. Jeden (od końca 3' nici sensownej) jest opisany w tabeli. Ma on długość 964 bp. Cały gen ma długość 2202 bp, zatem drugi fragment ma długość 2202-964, co daje 1238. Można to także odczytać z tabeli. Skoro fragment od 3' zaczyna się od 1239 bp, to pozostaje 1238 bp.

G. Ile jest i jak długie są fragmenty, które powstaną w wyniku przecięcia jednocześnie przez *MspI* i *BsmI*?

- Jeden fragment o długości 100 bp.

4.1.2. Cięcie sekwencji genu kodującego dehydrogenazę 6-fosfoglukonową (6PGD) enzymami restrykcyjnymi: *EcoRI* i *HpaII*.

Za pomocą programu NEB cutter proszę przeprowadzić symulację cięcia sekwencji genu kodującego dehydrogenazę 6-fosfoglukonową (6PGD) enzymami restrykcyjnymi: *EcoRI* i *HpaII*, a następnie odpowiedzieć na poniższe pytania. Proszę wykorzystać sekwencję dostarczoną w pliku „Human 6PGD”.



Rys. 4.1.2a. Wynik cięcia sekwencji genu dehydrogenazy 6-fosfoglukonowej enzymami *EcoRI* i *HpaII*.

A. Ile jest miejsc cięcia dla *EcoRI*? Proszę podać pozycję cięcia.

- 2 miejsca cięcia (Rys. 4.1.2a).
- Pozycja: 878 bp i 1792 (można odczytać przesuwając się myszą nad nazwą enzymu).

B. Proszę podać sekwencję rozpoznawaną przez *EcoRI*, jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *EcoRI*?

- 5' G<sup>▼</sup>AATTC<sub>▲</sub>3'.
- Lepkie końce.
- Odczytujemy z tabeli enzymów lub „klikając” na nazwę enzymu na schemacie cięcia (Rys. 4.1.2a).

### EcoRI

5' ... G<sup>▼</sup>A A T T C ... 3'  
3' ... C T T A A<sub>▲</sub>G ... 5'

Rys. 4.1.2b. Końce generowane przez *EcoRI*.

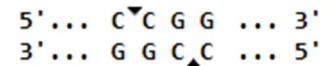
C. Ile jest miejsc cięcia dla *HpaII*? Proszę podać pozycję cięcia.

- 3 miejsca cięcia (Rys. 4.1.2a).
- Pozycja 258 bp, 393 bp, 1138 bp.

D. Proszę podać rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *Hpa*II?

- 5' CCGG 3'
- Lepkie końce.

## HpaII



E. Proszę podać temperaturę i pH reakcji dla obu enzymów.

Rys. 4.1.2d. Końce generowane przez *Hpa*II.

- Odczytujemy ze strony, która pojawia się po „kliknięciu” na nazwę enzymu.

### Buffer name: NEBuffer EcoRI

Salt: 50 mM NaCl

Main: 100 mM Tris-HCl

pH: 7.5

Mg: 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Triton: 0.025%

### Buffer name: rCutSmart Buffer

Salt: 50 mM KOAc

Main: 20 mM Tris-OAc

pH: 7.9

Mg: 10 mM MgOAc

BSA: 100

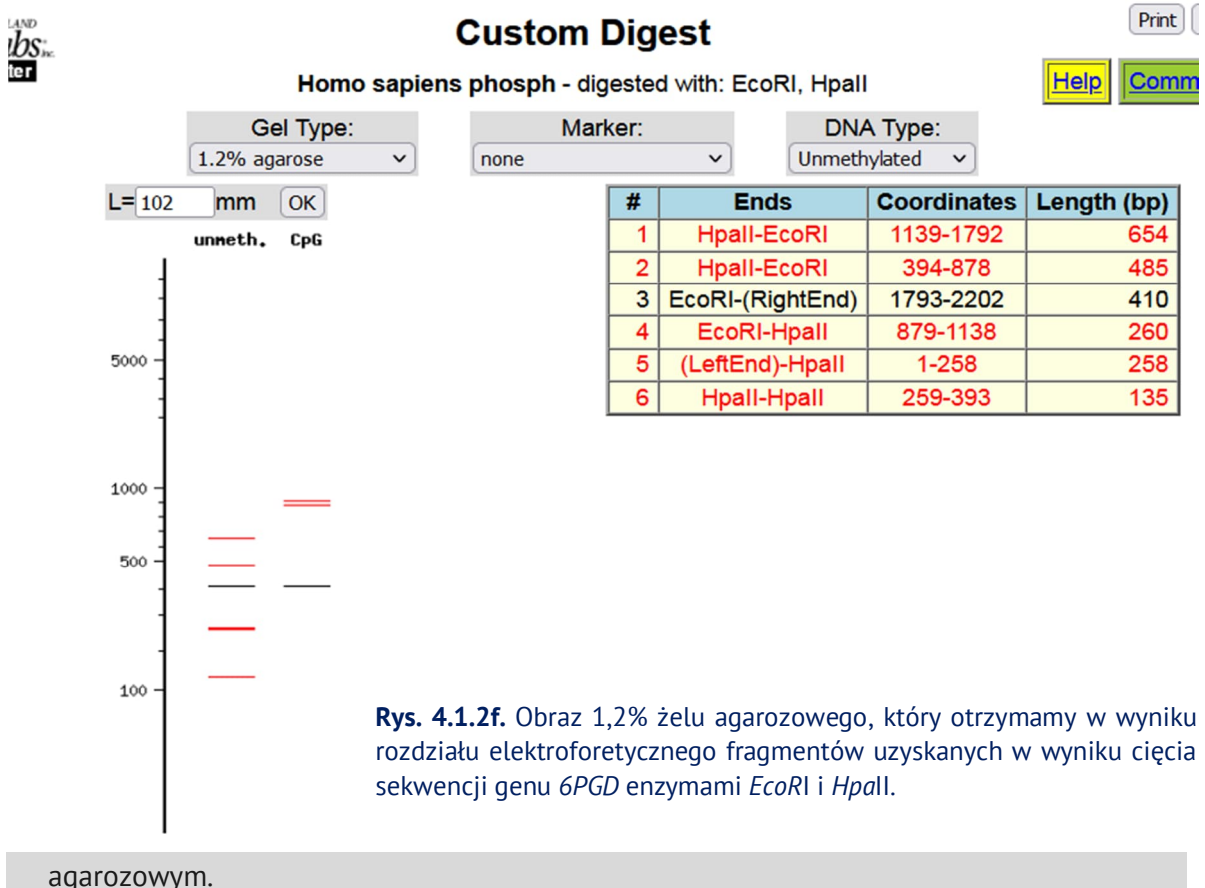
Reaction temperature: 37 °C

Reaction temperature: 37 °C

Rys. 4.1.2d. Warunki reakcji dla *Eco*RI (lewa) i *Hpa*II (prawa).

- *Eco*RI: 37°C i pH 7,5.
- *Hpa*II: 37°C i pH 7,9.

F. Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 1,2% żelu



G. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?

- Pięć fragmentów.

H. Ile powstanie fragmentów, jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?

- Trzy fragmenty.

I. Ile powstanie fragmentów w wyniku przecięcia genu 6PGD tylko przez *EcoRI* przy założeniu braku metylacji? Jaka jest ich długość?

- Tylko jeden. Jest on zaznaczony numerem 3 w tabeli na rysunku 4.1.2f.
- Długość tego fragmentu to 410 bp.

J. Ile powstanie fragmentów w wyniku przecięcia genu 6PGD tylko przez *HpaII* w przypadku, gdy sekwencja jest zmetylowana? Proszę uzasadnić odpowiedź.

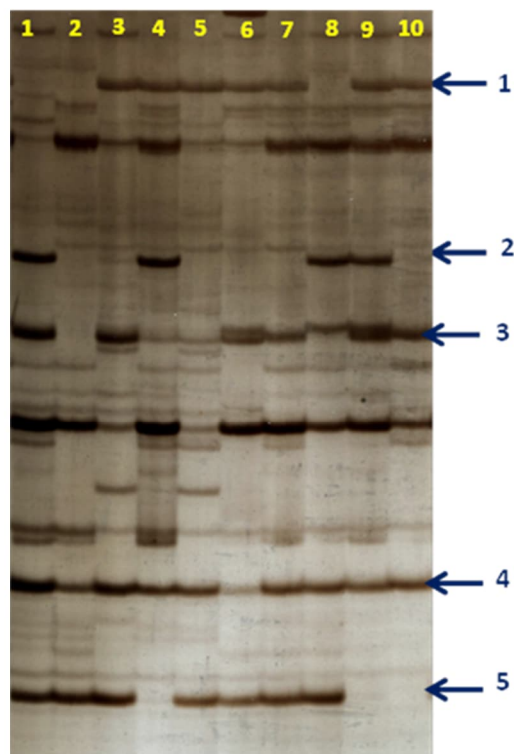
- W przypadku metylacji nie otrzymamy fragmentów powstałych w wyniku cięcia przez *HpaII*.
- *HpaII* nie rozpoznaje sekwencji zmetylowanych, dlatego w przypadku, gdy sekwencja 6PGD jest zmetylowana nie powstają fragmenty będące efektem cięcia przez *HpaII*. Fragmenty widoczne na żelu powstały w wyniku cięcia tylko przez *EcoRI*.

## 4.2. Markery oparte o reakcję PCR – SSAP

### 4.2.1. Ocena liczby miejsc insercji transpozonu DNA typu CACTA

Na rysunku 4.2.1 przedstawiono fragment żelu poliakrylamidowego pokazujący rozdział produktów reakcji SSAP przy użyciu startera komplementarnego do transpozonu CACTA u 10 osobników. Proszę na podstawie stref zaznaczonych strzałkami uzupełnić poniższą tabelę. Proszę odczytu dokonać w komputerze.

Osobnik	Liczba insercji transpozonu CACTA
1	4
2.	2
3.	4
4.	4
5.	4
6.	4
7.	4
8.	4
9.	4
10.	3
Średnia liczba insercji u w badanej grupie osobników.	3,7
Nr strefy monomorficznej.	4 (u wszystkich osobników jest prążek)



Rys. 4.2.1. Żel przedstawiający miejsca insercji transpozonu DNA typu CACTA.