



## 1. Markery genetyczne: definicja

Marker genetyczny jest to cecha, która może być wykorzystana do identyfikacji osobników lub gatunków.

### Cechy markerów genetycznych

- Monogeniczny:** warunkowany przez jeden gen
- Polimorficzny:** występują  $\geq 2$  łatwo rozróżnialne formy
- Stabilny:** nie podlega wpływowi środowiska
- Brak plejotropii:** wpływa tylko na jedną cechę

Markery genetyczne dały podstawę pod rozwój genomiki (analiza genomów), współczesnej hodowli roślin i zwierząt oraz wspomagają diagnostykę chorób u człowieka.

## 1. Markery genetyczne: typy markerów



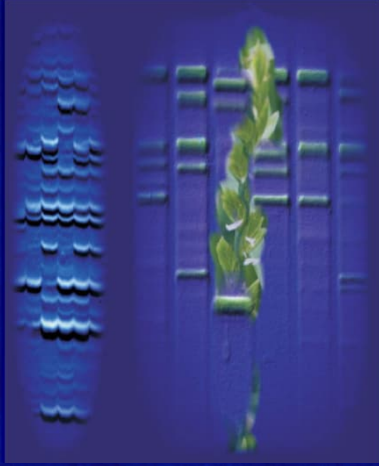
Rozwój technologii molekularnych umożliwił postęp w mapowaniu i analizie genetycznej wielu gatunków roślin, zwierząt i człowieka.

### Typy markerów genetycznych

- Morfologiczne:** pierwsze mapy genetyczne tworzono na podstawie markerów morfologicznych, np. *D. melanogaster*, człowiek.
- Molekularne**
  - Enzymatyczne:** umożliwiły rozwój genetyki populacyjnej dostarczając informacji o zmienności organizmów.
  - DNA:** umożliwiły badanie organizacji genomów i ich ewolucji.

## Markery genetyczne i ich wykorzystanie

1. **Markery genetyczne**
  - Definicja
  - Typy markerów
2. **Markery morfologiczne**
3. **Markery enzymatyczne**
  - Definicja izoenzymów
  - Przebieg analizy
  - Genetyka izoenzymów
4. **Markery DNA**
  - Definicja
  - Enzymy restrykcyjne
  - Markery oparte o reakcję PCR
  - Markery oparte o reakcję PCR i enzymy restrykcyjne



## 2. Markery morfologiczne

**Efektywne wykorzystanie markerów morfologicznych możliwe jest tylko, gdy istnieją kolekcje mutantów dotyczące różnych genów.**



*Pisum sativum*: barwa i rozmieszczenie kwiatów.



*Hordeum vulgare*: kłos normalny oraz z mutacjami recesywnymi: sześciorzędowy (v), krótkie ości (Ik), pomarańczowa osadka kłosowa (o), biała plewa (a).



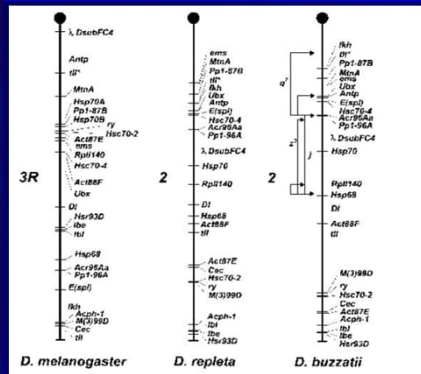
*Pisum sativum*: różne formy listków liścia pierzastozłożonego: normalny, wąsy czepne, listki.

**Formy z wieloma mutacjami recesywnymi to wielogenowe homozygoty recesywne.**



## 2. Markery morfologiczne

U niektórych gatunków (modelowe, uprawne) stworzono mapy genetyczne na podstawie licznych markerów morfologicznych.



Mapy genetyczne gatunków *Drosophila*.

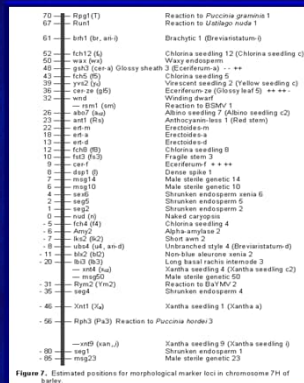


Figure 7. Estimated positions for morphological marker loci in chromosome 7H of barley.

Mapa genetyczna chromosomu 7 *Hordeum*.

U większości gatunków liczba markerów morfologicznych jest zbyt mała, aby stworzyć mapę o rozdzielczości wystarczającej do izolowania genów oraz wykorzystania ich na potrzeby diagnostyki.

## Markery genetyczne i ich wykorzystanie

### 1. Markery genetyczne

- Definicja
- Typy markerów

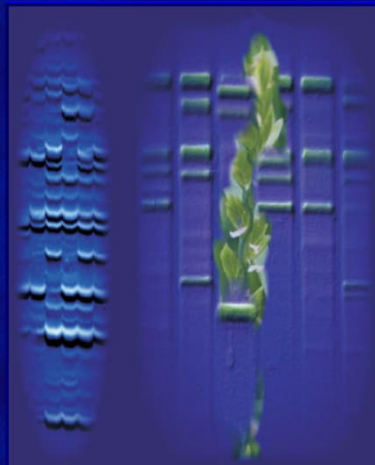
### 2. Markery morfologiczne

### 3. Markery enzymatyczne

- Definicja izoenzymów
- Przebieg analizy
- Genetyka izoenzymów

### 4. Markery DNA

- Definicja
- Enzymy restrykcyjne
- Markery oparte o reakcję PCR
- Markery oparte o reakcję PCR i enzymy restrykcyjne



### 3. Markery enzymatyczne: definicja

**Izoenzymy (izoizomy): formy enzymu o tej samej funkcji ale różniące się właściwościami w polu elektrycznym.**

**Dehydrogenaza mleczanowa człowieka, LDH zbudowana jest z 4 podjednostek kodowanych przez 2 geny, LDHA i LDHB.**

**LDHA**

↓

**M**

**LDHB**


↓

**H**


Geny dehydrogenazy mleczanowej

Polipeptydy, podjednostki LDH


↓ **Podjednostki M i H tworzą 5 różnych tetramerów.**




LDH5: wątroba, mięśnie szkieletowe




LDH4: nerki, trzustka



LDH3: płuca



LDH2: fagocyty



LDH1: serce, krew, mózg

Większość enzymów występuje w postaci wielu form (izoenzymów). Występowanie enzymu w jednej formie jest wyjątkiem.

### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

**Izoenzymy uwidacznia się w procesie elektroforezy w odpowiednim nośniku (np. skrobia) oraz barwnej reakcji histochemicznej.**

Aminokwasy budujące białko posiadają różne ładunki w zależności od łańcuchów bocznych (kwasowe, zasadowe).

**NH<sub>3</sub>**

Koniec N: N-terminus



**COO-**

Koniec C: C-terminus

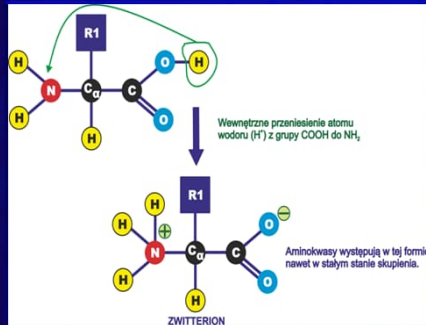
↓ **Sumaryczny ładunek białka zależy od liczby aminokwasów zasadowych i kwasowych.**

○ -1    ○ -1    ● +1    ○ -1    ○ -1    ● +1    =    ○ -2

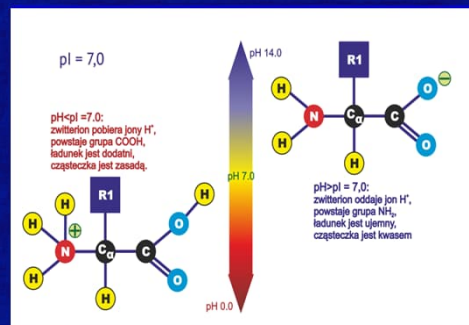
Ładunek białka zależy także od pH środowiska. Białko może mieć ładunek dodatni w wysokim pH i ujemny w niskim lub odwrotnie.

### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

**Punkt izoelektryczny (pI): pH, w którym cząsteczka nie ma ładunku; ładunki dodatnie i ujemne równoważą się, ładunek równa się 0.**



**Zwitterion: w roztworze wodnym, forma aminokwasu pozbawiona ładunku. Ładunek całkowity wynosi 0. Jest to forma stabilna.**



**Cząsteczka może być zasadą lub kwasem w zależności od pI oraz pH środowiska. Cząsteczka o pI = 7 będzie zasadą poniżej pH = 7, a kwasem powyżej pH = 7.**

**Zasadą jest, że każda cząsteczka pobiera protony (H<sup>+</sup>) gdy pH jest poniżej pI (zachowuje się jak zasada) i oddaje protony gdy pH > pI (zachowuje się jak kwas).**



### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

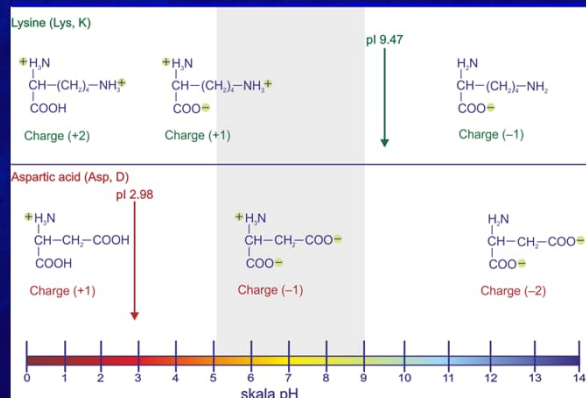
**Zasadowość i kwasowość aminokwasów dotyczy tylko pH = 7,0. W innym pH aminokwas zasadowy może być kwasem i odwrotnie.**

**Lizyna:**

- > pI = 9,47;
- > pH = 7 < pI zatem cząsteczka pobiera H<sup>+</sup>, ładunek jest dodatni, jest zasadą;
- > pH > 9,47 – cząsteczka oddaje H<sup>+</sup>, ładunek ujemny, jest kwasem.

**Kwas asparaginowy:**

- > pI = 2,98;
- > pH = 7 > pI zatem cząsteczka oddaje H<sup>+</sup>, ładunek jest ujemny, cząsteczka jest kwasem;
- > pH < 2,98 – cząsteczka pobiera H<sup>+</sup>, jest zasadą.



Zależność odczynu aminokwasu od pH środowiska.

**Kwas asparaginowy i glutaminowy mają niskie pI i w pH = 7 są kwasami. Lizyna, arginina mają wysokie pI dlatego w pH = 7 są zasadami.**



### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

Elektroforeza to ruch cząsteczki obdarzonej ładunkiem w polu elektrycznym. Ruchliwość zależy od ładunku i wielkości cząsteczki.

The diagram illustrates the process of electrophoresis. A horizontal gel strip is shown with a red box labeled 'Anoda (+)' at the top and a blue box labeled 'Katoda (-)' at the bottom. A white box labeled 'Miejsce nałożenia prób' (loading site) is on the left. A horizontal line represents the starting point of the samples. Above this line, three blue protein complexes with negative charges (-2, -3, -4) are shown with red arrows pointing upwards towards the anode. Below the line, two red protein complexes with positive charges (+2, +1) are shown with blue arrows pointing downwards towards the cathode. A red double-headed arrow on the right indicates the direction of migration for negative charges, and a blue double-headed arrow indicates the direction for positive charges.

Białka o ładunku ujemnym migrują w kierunku elektrody dodatniej (anody)

Białka o ładunku dodatnim migrują w kierunku elektrody ujemnej (katody)

### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

Elektroforezę prowadzi się w nośnikach – żelach, które działają jak sito molekularne.

The diagram shows two types of gels acting as molecular sieves. The top gel has large pores, and the bottom gel has small pores. In both, three protein complexes (yellow, red, and blue) are shown. In the large-pore gel, all three proteins have moved to the right. In the small-pore gel, only the smallest protein (yellow) has moved, while the larger red and blue proteins are still near the starting point.

Duże pory: cząsteczki poruszają się szybko.

Małe pory: cząsteczki poruszają się wolno. Duże białka mogą nie migrować.

Im większe pory tym szybciej poruszają się białka. Małe białka poruszają się szybciej, natomiast duże zatrzymują się blisko miejsca nałożenia.

### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

Funkcję nośnika (żelu) może pełnić skrobia, agarozą, celuloza i poliakrylamid.

Nośnik	Charakterystyka	Wykorzystanie
Agarozą	Duże pory	Białka, kwasy nukleinowe
Octan celulozy	Białka migrują po powierzchni	Białka
Skrobia	Duże pory, migruje większość białek	Białka
Poliakrylamid	Małe pory, im większe stężenie tym mniejsze pory, może zahamować migrację	Białka, kwasy nukleinowe



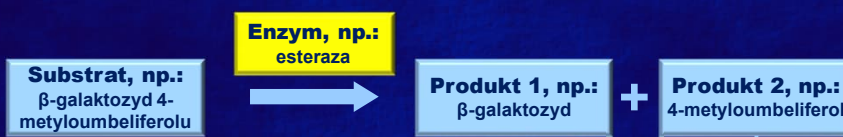
Poliakrylamid to polimer akrylamidu. Akrylamid jest rakotwórczy.

Najczęściej wykorzystuje się skrobię ze względu na łatwość, szybkość i niskie koszty oraz poliakrylamid ze względu na wysoką rozdzielczość.

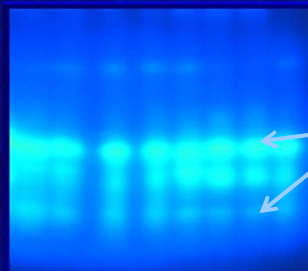


### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy

Miejsce na żelu, w którym enzym jest unieruchomiony ujawnia się wykorzystując reakcję katalizowaną przez enzym.



Rozdział esteraz fluorescencyjnych na żelu skrobiowym. Esterazy są widoczne jako świecące prążki.



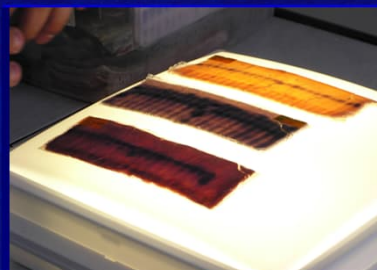
4 MU fluoreskuje w świetle UV

Izoenzymy różniące się ruchliwością





### 3. Markery enzymatyczne: przebieg analizy



### 3. Markery enzymatyczna: genetyka

Izoenzymy mogą być uwarunkowane różnymi genami lub są produktami alleli jednego genu.

#### Podział izoenzymów



### 3. Markery enzymatyczne: genetyka

**Zaletą izoenzymów jest kodominacja, czyli ujawnianie się obu alleli u heterozygoty. Dzięki temu można jednoznacznie określić genotyp.**

$A_1A_1$     $A_2A_2$     $A_1A_2$

$A_1A_1$     $A_1A_1$     $A_2A_2$     $A_1A_2$     $A_1A_2$     $A_1A_2$

Wzór peroksydazy

Na żelu można rozróżnić oba typy homozygot oraz heterozygoty.

Wzory ulegają komplikacji jeżeli aktywny enzym jest multimerem.

Peroksydazy rozkładają nadtlenek wodoru. Uczestniczą w reakcjach oksydo-redukcyjnych w procesach metabolicznych oraz w odpowiedzi na stres. Wykorzystane są do oczyszczania wody przemysłowej z fenoli.

### 3. Markery enzymatyczne: genetyka

**Na jednym żelu obserwuje się allozymy będące produktami alleli jednego genu oraz izoenzymy kodowane przez różne geny.**

Homozygoty   Heterozygoty

SS   FF   FF   FS   FF   FS   SS   FS   FF   FS   FF

AAT1  
AAT2  
AAT3

AAT: transaminaza asparaginianowa

Homozygoty   Heterozygoty

SS   FF   SS   FF   SS   FS   SS   FS   FF   FS   SS

EST1  
EST2  
EST3  
EST4

EST: esterazy

AAT1, AAT2, AAT3 to produkty 3 genów (loci): *Aat1*, *Aat2* i *Aat3*. Obserwowane prążki to izoenzymy. W genie (locus) *Aat2* występują 2 typy wzorów jednoprażkowych SS i FF. Są to allozymy będące produktami różnych alleli w locus *Aat2*. Homozygoty są jednoprażkowe a heterozygoty – dwuprażkowe.

EST1, EST2, EST3, EST4 to produkty 4 genów (loci): *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4*. W genie (locus) *Est1* występują 2 allele, które widoczne są na żelu jako formy jednoprażkowe (homozygoty). Heterozygoty mają 2 prążki.

### 3. Markery enzymatyczne: genetyka

**Kwaśne fosfatazy rozkładają reszty kwasu ortofosforowego. Izoenzymy uwarunkowane są genetycznie i epigenetycznie.**

Kwaśne fosfatazy u człowieka			
Nazwa	Lokalizacja	Chromosom	Diagnostyka
LAP	Lizosomy	11	Choroby metaboliczne
PAP	Prostata, mózg, wątroba	3	Rak prostaty, sprawy o gwałt
EAP	Erytrocyty	2	Anemia, testy ciążowe
MAP	Makrofagi	19	Zaburzenia rozwoju mięśni
OcAP	Osteoklasty	19	Choroby kości



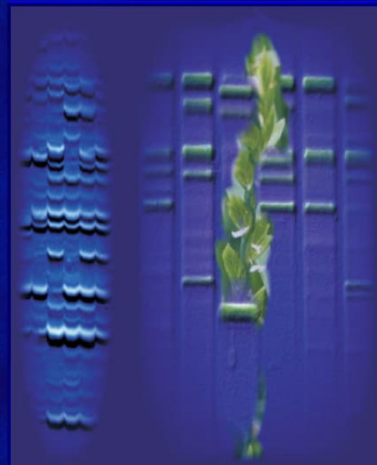
Izoenzymy kwasnej fosfatazy często są efektem obróbki potranslacyjnej. Zmiana genetyczna obserwowana jest jako przesunięcie całej grupy prążków.

**Kwaśne fosfatazy człowieka są markerami wielu chorób i powszechnie wykorzystywane są w diagnostyce klinicznej.**



### Markery genetyczne i ich wykorzystanie

1. Markery genetyczne
  - Definicja
  - Typy markerów
2. Markery morfologiczne
3. Markery enzymatyczne
  - Definicja izoenzymów
  - Przebieg analizy
  - Genetyka izoenzymów
4. **Markery DNA**
  - Definicja
  - Enzymy restrykcyjne
  - Markery oparte o reakcję PCR
  - Markery oparte o reakcję PCR i enzymy restrykcyjne



## 4. Markery DNA: definicja

**Marker DNA to jakakolwiek sekwencja DNA, która może być wykorzystana do identyfikacji osobników, gatunków.**

### Typy markerów DNA

Markery wykorzystujące enzymy restrykcyjne.

Markery wykorzystujące reakcję PCR:

- sekwencje unikalne,
- sekwencje powtarzalne,
- losowe sekwencje genomu.

Markery łączące enzymy restrykcyjne i reakcję PCR.

**Markery DNA są powszechnie wykorzystywane w badaniach genetycznych i ewolucyjnych, a także w hodowli roślin, zwierząt i diagnostyce.**



## 4. Markery DNA: enzymy restrykcyjne

**Enzymy restrykcyjne są to endonukleazy, które mają zdolność przecinania łańcucha DNA w ściśle określonych miejscach.**

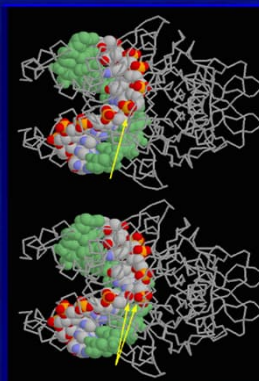
Nazwy enzymów pochodzą od szczepów bakterii, z których je wyizolowano:

- *EcoRV*: *Escherichia coli*, szczep R, enzym klasy V;
- *HindII*: *Haemophilus influenzae*, szczep d, enzym klasy II



ReBASE: baza informacji o enzymach restrykcyjnych.

Zidentyfikowano ~3000 enzymów restrykcyjnych, z czego ~600 jest dostępnych komercyjnie. Są one powszechnie wykorzystywane w genomice i inżynierii genetycznej.



Cząsteczka EcoRV. Strzałki pokazują miejsca cięcia.

**Enzymy restrykcyjne pochodzą od bakterii i Archaea, u których służą do degradacji DNA bakteriofagów (wirusów atakujących bakterie) i tym samym chronią je przed atakiem wirusów.**



## 4. Markery DNA: enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne rozpoznają sekwencje palindromowe. Są one identyczne gdy obie nici DNA czyta się od końca 5' do końca 3'.



*EcoRI* i *PstI* rozpoznają 6-nukleotydową sekwencję.

*MseI* i *TaqI* rozpoznają 4-nukleotydową sekwencję.

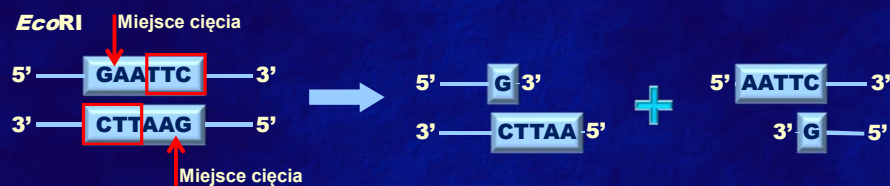
Enzymy restrykcyjne najczęściej rozpoznają sekwencje 4- i 6-nukleotydowe, rzadziej 5-, 7- i 8-nukleotydowe.



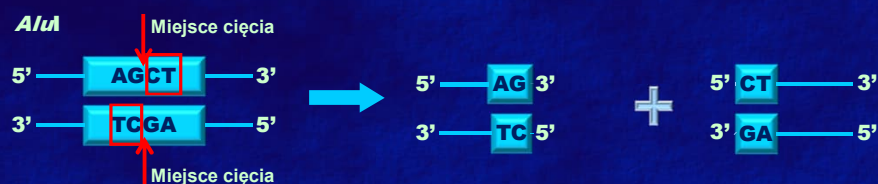
## 4. Markery DNA: enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne tną DNA dając tzw. lepkie końce lub tępe końce. Oba typy enzymów mają różne zastosowania.

### Lepkie końce



### Tępe końce



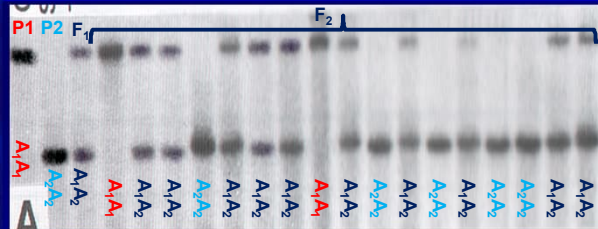


## 4. Markery DNA: enzymy restrykcyjne

Cięcie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi jest podstawą metody RFLP: polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych.

Pokolenie F<sub>2</sub>: potomstwo dwóch heterozygot.

- P: homozygotyczne linie rodzicielskie, np. AA i aa.
- F<sub>1</sub>: potomstwo otrzymane ze skrzyżowania linii homozygotycznych P. Wszystkie osobniki są heterozygotami, np. Aa.
- F<sub>2</sub>: otrzymujemy w wyniku skrzyżowania heterozygot F<sub>1</sub>, np. Aa x Aa. W F<sub>2</sub> osobniki mają różne genotypy: segregują.



Segregacja markerów RFLP w pokoleniu F<sub>2</sub> otrzymanym ze skrzyżowania dwóch homozygotycznych roślin.

Markery RFLP są kodominujące co umożliwia identyfikację genotypów w segregujących populacjach.

Markery RFLP były pierwszymi markerami DNA, które powszechnie wykorzystano do tworzenia map genetycznych u wyższych Eukariota. Nie wymagają one wiedzy o sekwencjach docelowych.



## 4. Markery DNA: markery oparte o PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) to „replikacja *in vitro*”, która umożliwia uzyskanie milionów kopii fragmentów DNA.

### PCR

(ang. polymerase chain reaction)

- Składniki niezbędne do PCR:
  - DNA, które jest matrycą dla replikacji;
  - startery: krótkie fragmenty DNA, które inicjują reakcję;
  - nukleotydy: budulec dla nowo powstałego łańcucha DNA;
  - enzym – termostabilna polimeraza DNA prowadząca replikację.
- Termocykler umożliwia szybkie zmiany temperatur zgodne z zadanym schematem.



Jeden z pierwszych modeli termocykleriów



Model pozwalający na analizę w czasie rzeczywistym (real time).



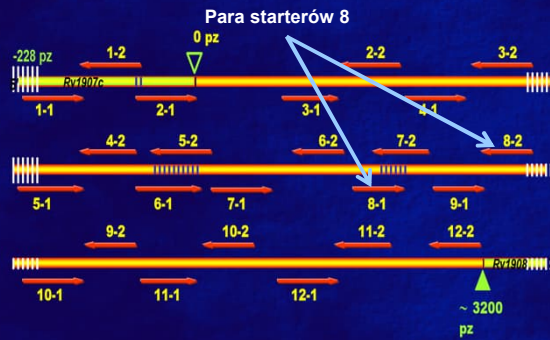
Współczesny model z gradientem temperaturowym i grzejną pokrywą.

PCR polega na powtarzaniu cykli ogrzewania i ochładzania mieszaniny reakcyjnej w celu manipulowania temperaturo-zależnymi procesami: denaturacją DNA i replikacją prowadzoną przez enzym.



## 4. Markery DNA: PCR – sekwencje unikalne

Reakcja PCR genu *KatG* u *M. tuberculosis* wykorzystywana jest do identyfikowania szczepów lekoopornych.



Produkty PCR otrzymane przy pomocy pary starterów *KatG8*.

Gen *KatG* podzielono na 12 ~300-nukleotydowych fragmentów na podstawie występowania mutacji warunkujących oporność na izoniazyd. Startery dobrano tak aby były komplementarne do miejsc mutacji. Jeżeli mutacja występuje u danego szczepu to starter się nie przyłącza (brak komplementarności) i nie zachodzi amplifikacja.



## 4. Markery DNA: PCR - sekwencje powtarzalne

Mikrosatelity (SSR): 1-6 nukleotydowe sekwencje, które występują w tandemowych powtórzeniach (5-50 kopii) w wielu miejscach genomu.

Powtórzenia sekwencji CTG. Allele różnią się liczbą powtórzeń CTG.

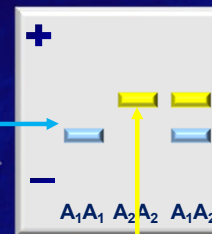
Allel A<sub>1</sub>: 9 powtórzeń



Allel A<sub>2</sub>: 7 powtórzeń



Elektroforeza



Mikrosatelity różnią się u poszczególnych gatunków, dlatego przed analizą należy sekwencje te scharakteryzować dla danej grupy systematycznej.

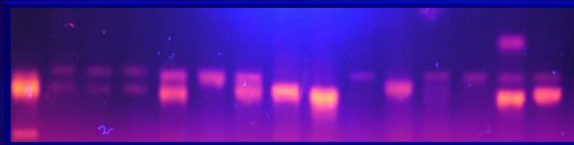
Polimorfizm wynika z różnej liczby kopii sekwencji w tandemie. Allele różnią się długością, a więc także ruchliwością na żelu. U heterozygot widoczne są oba allele – kodominacja.



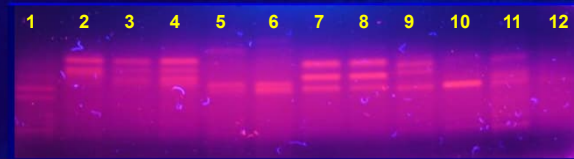


## 4. Markery DNA: PCR - sekwencje powtarzalne

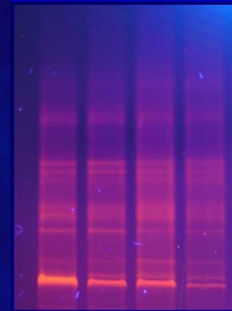
Mikrosatelity (SSR) charakteryzują się wysoką częstością mutacji, co pozwala rozróżniać osobniki.



Segregacja SSR (H06) w pokoleniu F<sub>2</sub>



1. *L. loliaceum*, 2. *L. remotum*, 3. *L. persicum*, 4. *L. temulentum*, 5. *L. canariense*, 6. *L. edwardii*, 7, 8. *L. multiflorum*, 9, 10, 11. *L. perenne*, 12. *L. rigidum*.



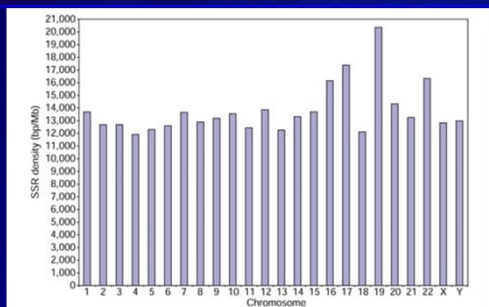
Wzory SSR u limby.

Mikrosatelity wykorzystywane są do oceny zróżnicowania genetycznego, śledzenia pokrewieństwa i dróg migracji.

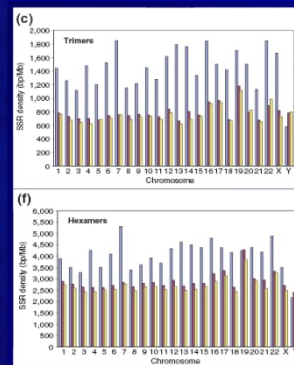


## 4. Markery DNA: PCR – sekwencje powtarzalne

U człowieka mikrosatelity są równomiernie rozmieszczone na wszystkich chromosomach. Stanowią one 3% genomu.



Rozmieszczenie mikrosatelitów na chromosomach człowieka liczone jako stosunek par zasad (bp) w mikrosatelitach do milionów par zasad w chromosomie (Mbp).



Rozmieszczenie mikrosatelitów w egzonach (niebieskie), intronach (czerwone) i regionach międzygenowych (żółte).

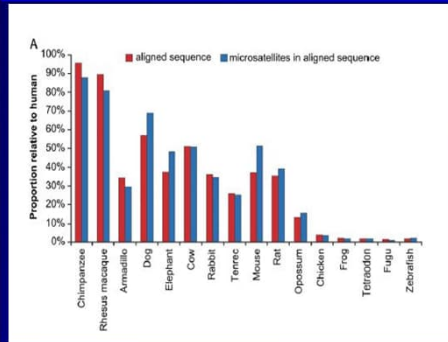
W egzonach człowieka występują głównie powtórzenia 3- i 6-nukleotydomowe. Ekspansja mikrosatelitów może być przyczyną chorób neurodegeneracyjnych.

Subramanian et al. 2003

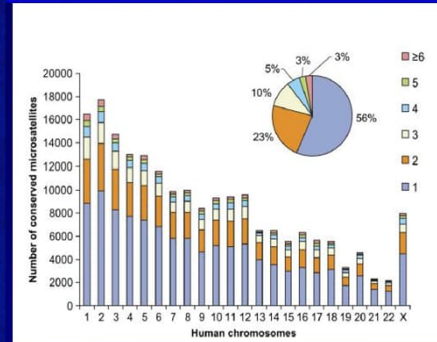


## 4. Markery DNA: PCR – sekwencje powtarzalne

Większość mikrosatelitów (85%) człowieka występuje także u blisko spokrewnionych gatunków.



Procent sekwencji podobnych do sekwencji człowieka (czerwone) oraz procent mikrosatelitów w uliniowanych sekwencjach.



Występowanie mikrosatelitów człowieka u kręgowców poza naczelnymi. Liczby wskazują u ilu gatunków dany procent sekwencji występuje.

Konserwatywność mikrosatelitów u kręgowców może wskazywać, że nie zawsze są one neutralnymi markerami nie mającymi wartości adaptacyjnej.

Buschiazzo and Gemme 2010



## 4. Markery DNA: PCR, SNPs

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) to zmiana jednego nukleotydu w danej pozycji.

- SNP dotyczy tranzycji i transwersji:
  - tranzycja - zmiana w obrębie jednej grupy, np. A na G;
  - transwersja - zmiana między grupami np. A na T.
- SNP może występować w sekwencjach kodujących i niekodujących.
- Podstawienie może mieć charakter:
  - synonimiczny – nie zmienia się aminokwas w białku;
  - niesynonimiczny – zmienia się aminokwas.

```

rpgip1/1-996364 AAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCTCTCAGGTT
pSCP1/1-889318 AAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCTCTCAGGTT
PGIP/1-903318 AAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCTCTCAGGTT
PGIP+VST/1-903318 AAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCTCTCAGGTT
    
```

Zamiana A na T (transwersja) w transgenie P<sub>gip</sub> wprowadzonym do grochu.

SNP wykrywa się podczas sekwencjonowania genomów, a także przy zastosowaniu metod skanujących genom, które łączą PCR i enzymy restrykcyjne. Nie wymaga znajomości sekwencji docelowej.

SNP to polimorfizm co oznacza, że częstość wariantu w populacji jest >1%. Warianty o częstości <1% są klasyfikowane jako mutacje.

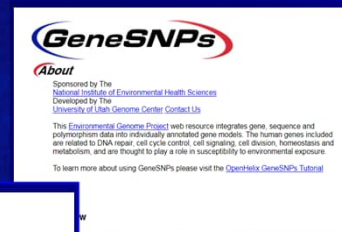


## 4. Markery DNA: PCR, SNPs

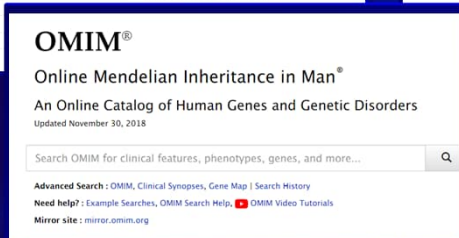
**SNPs w egzonach mogą być przyczyną chorób jednogenowych (np. hemofilia), w intronach mogą zwiększać ryzyko np. nowotworów.**



Baza NCBI



Baza Uniwersytetu Utah



Baza OMIM: katalog genów i chorób u człowieka

**SNPs w populacji ludzkiej zdeponowano w bazach danych, które pozwalają na analizę zmienności oraz powiązanie z genami i cechami.**

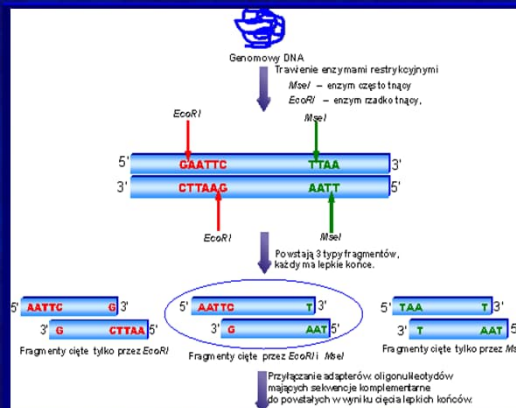


## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

**Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych (AFLP): polega na cięciu DNA enzymami restrykcyjnymi i następnie ich amplifikowaniu.**

**AFLP: (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

- **Etap 1: Genomowy DNA jest cięty enzymami restrykcyjnymi:**
  - W wyniku cięcia otrzymuje się 3 typy fragmentów.
  - Fragmenty mają lepkie końce: krótkie jednoniciowe fragmenty powstałe poprzez cięcie.
- **Etap 2: Ligacja - przyłączanie adapterów, czyli oligonukleotydów komplementarnych do lepkich końców.**



**Fragmenty powstałe w wyniku cięcia dwoma enzymami restrykcyjnymi amplifikuje się przy pomocy odpowiednio dobranych starterów.**

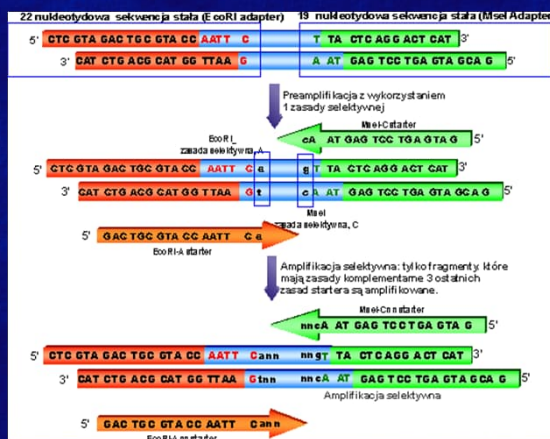


## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

**AFLP: Amplifikacja jest prowadzono w dwóch etapach: preamplifikacja i amplifikacja selektywna.**

**AFLP: (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

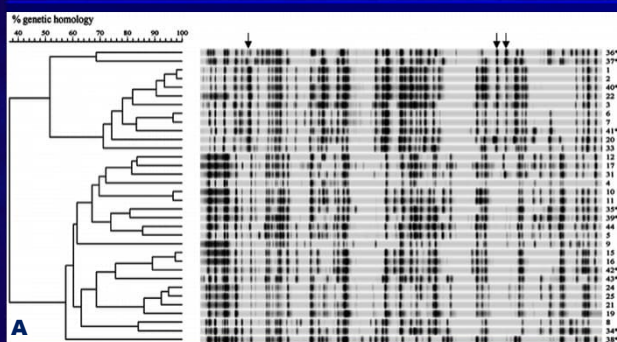
- **Etap 3: preamplifikacja** – powielanie fragmentów restrykcyjnych z adapterami przy użyciu starterów komplementarnych do adapterów z 1 dodatkową selektywną zasadą.
- **Etap 4: selektywna amplifikacja** - produkty preamplifikacji powielane są przy pomocy starterów komplementarnych do adapterów z 3 dodatkowymi zasadami selektywnymi.



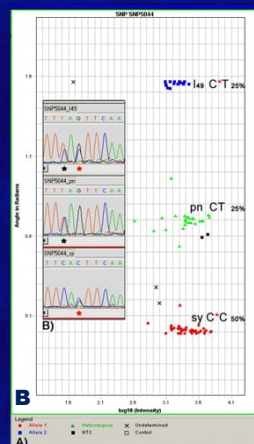
**Preamplifikacja zwiększa specyfikę AFLP poprzez wstępną amplifikację fragmentów, które następnie powiela się przy pomocy zestawu starterów zawierających od 3 do 6 selektywnych zasad.**

## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

**Produkty reakcji AFLP są uwidaczniane jako prążki na żelu poliakrylamidowym lub jako piki w automatycznych sekwencerach.**



**A: Różnicowanie *Campylobacter jejuni* ujawnione za pomocą AFLP. Produkty amplifikacji są uwidocznione jako prążki na żelu. B. Wydruk komputerowy analizy AFLP w sekwencerach.**



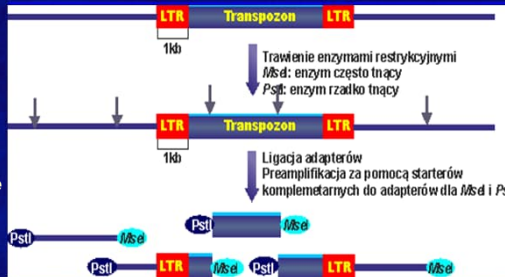
**Procedura AFLP nie wymaga znajomości sekwencji docelowej. Dzięki temu ma zastosowanie w badaniach u gatunków, których genomy nie są poznane, w badaniach populacyjnych oraz tworzeniu map genetycznych.**

## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

**SSAP: odmiana metody AFLP, która polega na amplifikacji fragmentu transpozonu między miejscem restrykcyjnym a starterem PCR.**

**SSAP: Sequence Specific Amplification Polymorphism**

- Trawienie enzymami restrykcyjnymi, ligacja i preamplifikacja przebiegają podobnie jak w metodzie AFLP.
- Zamiast *EcoRI* wykorzystuje się *PstI* jako enzym rzadko tnący.
- Sekwencją docelową jest sekwencja transpozonowa:
  - retrotranspozon (transpozon RNA, transpozon LTR);
  - transpozon DNA.



W wyniku preamplifikacji między innymi powstają fragmenty oflankowane adapterami dla obu enzymów restrykcyjnych. Wśród nich są fragmenty zawierające transpozony.

W amplifikacji selektywnej poprzez dobranie odpowiednich starterów namnaża się tylko fragmenty zawierające transpozony.

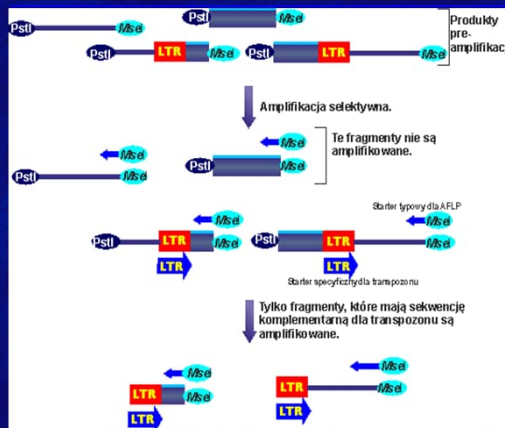


## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

**W metodzie SSAP w amplifikacji selektywnej wykorzystuje się starter specyficzny dla transpozonu oraz typowy starter AFLP.**

**SSAP: Sequence Specific Amplification Polymorphism**

- Fragmenty SSAP różnią się długością i na tej podstawie są rozdzielane elektroforetycznie, na żelach poliakrylamidowych lub w automatycznych sekwencjatorach.
- Odległość miejsca restrykcyjnego od transpozonu różni się w różnych miejscach genomu.
- SSAP wykrywa miejsca insercji i pozwala ocenić liczbę miejsc insercji danego transpozonu w genomie.



W związku z wykorzystaniem startera komplementarnego do transpozonu metoda wymaga znajomości sekwencji transpozonów.



## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

Startery do analizy retrotranspozonów metodą SSAP projektuje się najczęściej na granicy regionów LTR i genu *gag*.



Struktura retrotranspozonu.

**LTR:** (ang. long terminal repeats):

- U3, R, U5 - sygnał inicjacji i terminacji transkrypcji

**pol:**

- pr - proteaza
- Int - integraza
- RT - odwrotna transkryptaza
- RNaseH

**gag:**

- PBS - miejsce przyłączenia startera
- CP - białko kapsydo-podobne
- NA - miejsce przyłączenia kwasu nukleinowego

**PPT - polypurine ogon**

**BLAST** oraz **CLUSTAL** wykorzystywane są w celu ustalenie sekwencji konsensowej dla grupy transpozonów i na jej podstawie projektuje się startery.



## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

W projektowaniu starterów do analizy transpozonów wykorzystuje się sekwencje TIR oraz elementy konserwatywne, np., RNA-azę H.



Transpozon DNA.

**TIR - 17bp końcowe odwrócone powtórzenia:**  
CACTACTAGGAAAAGGC

**17x - 16bp powtórzony motyw:**  
TAGCAGTGGCGACCA

**TnpD - region wysoce podobny do Spm**

**TnpD - 3 razy powtórzony motyw.**

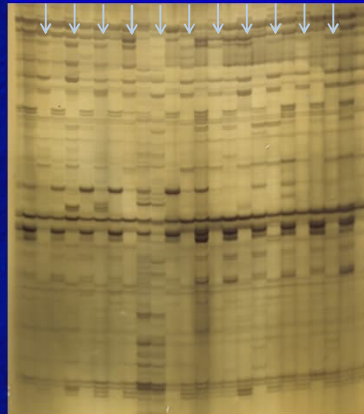
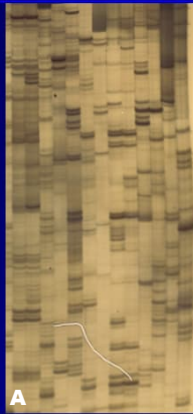
**TnpA - gen podobny do Spm TnpA.**

**RNaseH: gen RNA-zy H.**



## 4. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

Transpozony stanowią nawet 90% genomów Eukariota i są istotnym elementem procesów ewolucyjnych.



Miejsca insercji retrotranspozonów (a) oraz transpozonów DNA u pijawek (B).

SSAP z wykorzystaniem enzymów wrażliwych na metylację (strzałki).

Zarówno w metodzie AFLP jak i SSAP można wykorzystać enzymy wrażliwe na metylację. Pozwala to wykrywać miejsca zmetylowane.



## Zagadnienia 1-3

### 1. Markery genetyczne

- Co to jest marker genetyczny?
- Jakimi cechami powinien charakteryzować się marker genetyczny?
- Jakie wyróżniamy typy markerów genetycznych i gdzie poszczególne typy znalazły zastosowanie?

### 2. Markery morfologiczne

- Jakie warunki muszą być spełnione aby efektywnie wykorzystać markery morfologiczne?
- Dlaczego markery morfologiczne nie znalazły zastosowania w hodowli oraz tworzeniu map genetycznych?

### 3. Markery enzymatyczne: definicja

- Podaj definicję izoenzymu.
- Wyjaśnij w jaki sposób powstaje 5 różnych izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH) u człowieka?



## Zagadnienia 4-5

### 4. Markery enzymatyczne: analiza

- W jaki sposób uwidaczniamy izoenzymy?
- Ile wynosi sumaryczny ładunek polipeptydu, który składa się z 5 aminokwasów o ładunku ujemnym (każdy -1) oraz 3 aminokwasów o ładunku dodatnim (każdy +1)?
- Co to jest elektroforeza?
- Od czego zależy ruchliwość cząsteczki w polu elektrycznym?
- Wymień nośniki, w których prowadzi się elektroforezę?
- Które nośniki stosuje się tylko do białek, a które znajdują zastosowanie do białek i kwasów nukleinowych?



### 5. Markery enzymatyczne: genetyka

- Jak dzielimy izoenzymy ze względu na uwarunkowania genetyczne?
- Co to są allozymy?
- Z czego wynika obecność izoenzymów uwarunkowanych przez odrębne geny (loci)?
- Na czym polega epigenetyczne uwarunkowanie izoenzymu i jak je rozpoznać?
- Co jest główną zaletą izoenzymów w analizach genetycznych?
- Czy na jednym żelu można zaobserwować wszystkie typy izoenzymów? Podaj przykłady.
- Jaką funkcję pełnią peroksydazy? Gdzie są wykorzystane peroksydazy?
- Jaką funkcję pełnią kwaśne fosfatazy u człowieka?



## Zagadnienia 6-7

### 6. Markery DNA: definicja

- jak definiujemy marker DNA?
- Jakie wyróżniamy typy markerów DNA?

### 7. Markery DNA: enzymy restrykcyjne

- Co to są enzymy restrykcyjne, u jakich organizmów występują i jaką pełnią u nich funkcję?
- Gdzie enzymy restrykcyjne znalazły wykorzystanie?
- Co to jest sekwencja palindromowa? Przedstaw na schemacie?
- Jakie sekwencje rozpoznają enzymy restrykcyjne?
- Czym różnią się lepkie końce od tępych końców? Przedstaw na schemacie.
- Co jest warunkiem analizy miejsc restrykcyjnych w pojedynczych genach?
- Czy wszystkie potencjalne fragmenty DNA jakie mogą powstać po cięciu enzymem restrykcyjnym są zawsze widoczne na żelu? uzasadnij odpowiedź.
- Ile miejsc restrykcyjnych może posiadać gen?
- Co to jest mapa restrykcyjna?
- Co oznacza skrót RFLP? Co jest podstawą tej metody?
- Przedstaw na schemacie co oznacza stwierdzenie, że markery RFLP są kodominujące?





## Zagadnienie 8-9

### 8. Markery DNA: PCR – sekwencje unikalne

- Jaka wiedza jest niezbędna aby powielić dany fragment DNA przy pomocy PCR?
- W jakich fragmentach genów można wykryć polimorfizm za pomocą PCR?
- Z czego wynika obecność lub brak prążka na żelu w przypadku analizy PCR sekwencji unikalnych?
- Wyjaśnij dlaczego markery PCR są dominujące?
- Jakiego zastosowania ma reakcja PCR genu *KatG* u *Mycobacterium tuberculosis*?



### 9. Markery DNA: PCR – sekwencje powtarzalne

- Co oznacza skrót SSR?
- Co to są mikrosatelity?
- Z czego wynika kodominacja markerów mikrosatelitarnych?
- Jaka cecha mikrosatelitów pozwala rozróżniać osobniki?
- Czy mikrosatelity człowieka występują we wszystkich chromosomach? uzasadnij odpowiedź.
- Czy mikrosatelity człowieka są dla niego unikalne? uzasadnij odpowiedź.
- O czym może świadczyć



## Zagadnienia 10-11

### 10. Markery DNA: SNPs

- Wyjaśnij znaczenie skrótu SNP.
- Jaki typ zmian leży u podłoża SNP?
- Czy polimorfizm na poziomie nukleotydów zawsze prowadzi do polimorfizmu na poziomie białka? Uzasadnij odpowiedź.
- Jakiego znaczenia może mieć SNP w genomie człowieka?
- Gdzie można znaleźć informacje o SNP w genomie człowieka?

### 11. Markery DNA: PCR + enzymy restrykcyjne

- Co oznacza skrót AFLP, SSAP?
- Proszę omówić etapy reakcji AFLP.
- Proszę podać różnice między preamplifikacją a selektywną amplifikacją.
- Jak uwidacznia się produkty AFLP?
- Czym różni się metoda SSAP od AFLP?
- Która z metod wymaga znajomości sekwencji docelowej, AFLP czy SSAP? Proszę uzasadnić odpowiedź.
- Jaki typ sekwencji wykrywa metoda SSAP?
- Jak projektuje się startery w metodzie SSAP?
- Czy AFLP i SSAP pozwalają wykrywać miejsca zmetylowane? Proszę uzasadnić odpowiedź.



**Centre for Evolution, Genomics  
and Biomathematics, e-Gene**



**polokkornelia@gmail.com**

**<https://www.matgen.pl>**

**Centre for Evolution, Genomics  
and Biomathematics, e-Gene**



**prof.romanzielinski@gmail.com**

**<https://www.matgen.pl>**