

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

**FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A
PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ**

Katedra obecné zootechniky a etologie



**Vhodnost některých mikrosatelitů pro ověřování
původu u psů**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Mgr. Ivan Majzlík, CSc.

Odborný konzultant: Ing. Jaromír Dostál, DrSc

Autor práce: Daniela Ratajová

2009

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala sama za odborného dohledu školitele a vedoucího bakalářské práce. Z literatury jsem čerpala obecné poznatky a výsledky související s touto prací. Literární zdroje uvádím v příslušných kapitolách a literárním přehledu.

V Praze.....

.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli bakalářské práce panu Ing. Jaromíru Dostálovi DrSc., který mi umožnil pod svým vedením vykonat výzkum potřebný pro tuto bakalářskou práci a vždy mi byl nápomocen i při psaní bakalářské práce, paní Libuši Koberové, která mi velice ochotně pomáhala s výzkumem a prací v laboratoři k mé bakalářské práci a dále bych ráda poděkovala panu Doc. Ing., Mgr. Ivanu Majzlíkovi Csc., jakožto vedoucímu bakalářské práce, který mi vždy rád pomohl a poradil.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a přítelovi, kteří mě v mých zálibách a ve studiu vždy podporovali a byli mi velkou oporou.

AUTORSKÝ REFERÁT

Tato bakalářská práce na téma „Vhodnost některých mikrosatelitů pro ověřování původu u psů“ má ve svém literárním přehledu dvě hlavní části, v první části se pojednává o genomu psa, který je charakteristický počtem 39 párů chromozómů, které obsahují deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a ta je tvořena bázemi, kyselinou fosforečnou a deoxyribózou. Dále se v této části věnuji základním principům dědičnosti, redukčního dělení a některým zdrojům variability.

Další a rozsáhlejší část literárního přehledu je rozdělena na několik podkapitol a je věnována základním informacím o mikrosatelitech. Co jsou to mikrosatelity, z čeho se skládají a kde se nacházejí, jejich evoluční vývoj a z jakého důvodu tak rychle mutují, jaká je jejich funkce, jaké je jejich využití a aplikace, a proč jsou k ověřování původu či detekci některých chorob vhodné.

Po literárním přehledu následuje kapitola materiál a metodika, v níž popisuji, jak jsem postupovala v laboratoři při studiu vhodnosti mikrosatelitů pro ověřování původu u psů, což zahrnuje izolaci DNA, metodu získání PCR produktu a elektroforézu na komerčním gelu Spreadex.

Následující kapitoly zhodnocují a porovnávají získané výsledky o vhodnosti některých mikrosatelitů pro ověřování původu u psů s informacemi v literatuře, což bylo také cílem této práce.

Cílem této práce bylo zjistit vhodnost některých mikrosatelitů pro ověřování původu u psů. Vzhledem k tomu, že se testovalo poměrně málo zástupců velkého počtu plemen, nejsou výsledky zcela průkazné, ale za nejvhodnější mikrosatelit pro ověřování původu u psů z testovaných považuji mikrosatelit FH4306, kde jsem našla 14 alel, pak TINAG se 7 alelami a nejméně vhodný SCN11A se třemi alelami.

Klíčová slova: mikrosatelity; genom psa; funkce mikrosatelitů; polymorfismus mikrosatelitů; využití mikrosatelitů.

SUMMARY

This work is about on the subject “The suitability of microsatellites for paternity control in dogs” has got in its digest two main parts, the first part is about the genom of the dogs, that is characterized by 39 pairs of chromosom, containing deoxyribonucloetic acid (DNA) which it made by bases, phosphoric acid and deoxyribose. Below this part is about basic principle heredity, meoises and some sources of variability.

The next but longer part of the digest is divided on several chapters and this is summary of basic information about microsatellites. Characteristic of microsatellites, consist type, place of being, its evolution and speed of mutation, its function and application, reason its suitability for paternity testing and diseases detecting.

After digest is chapter “Material and method”. This part is about work in laboratory by the testing Suitability of microsatellites for paternity testing in dogs. Methods of DNA isolation, Polymerase chain reaction and electrophoresis on Spreadex gel are described.

Next chapters “Results about discussion” contains some thoughts about suitability of microsatellites for paternity testing in dogs relevant to information in the literature, what is point of my work.

Point of this work was to investigate Suitability of some microsatellites for paternity testing in dogs. The testing group was relative small, so results are not a lot of documented, the microsatellite SCN 11A is the least convenient for paternity testing, because I found only three alleles. The microsatellite TINAG is more convenient for paternity testing than the microsatellite SCN 11A, because by microsatellite TINAG I found seven alleles. The most convenient for paternity testing is microsatellite FH 4306 with fourteen alleles. This microsatellite.

Keywords: microsatellites; genom of the dogs; function of microsatellites; polymorphism of microsatellites; upgrading of microsatellites

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	3
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
3.1. GENOM PSA	4
3.2. MIKROSATELITY	9
3.2.1. <i>Definice mikrosatelitů</i>	9
3.2.2. <i>Polymorfismus mikrosatelitní DNA</i>	10
3.3. FUNKCE MIKROSATELITŮ	12
3.4. VÝVOJ MIKROSATELITŮ	13
3.4.1. <i>Evoluce mikrosatelitů</i>	13
3.4.2. <i>Proč mikrosatelity mutují tak rychle?</i>	14
3.5. KDE A JAK JE MOŽNO VYUŽÍT MIKROSATELITY	17
3.5.1. <i>Aplikace mikrosatelitů</i>	17
3.5.2. <i>Mikrosatelity a choroby</i>	20
4. MATERIÁL A METODIKA	24
4.1. IZOLACE DNA	25
4.2. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	27
4.2.1. <i>PCR mikrosatelitu TINAG a SCN 11A</i>	27
4.2.2. <i>PCR mikrosatelitu FH 4306</i>	29
4.3. ELEKTROFORÉZA NA KOMERČNÍM GELU SPREADEX	32
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	35
6. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ	44
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	47
9. PŘÍLOHY.....	48
Příloha 1.: Dělení M3 (a M1) markeru pro gel Spreadex.....	48
Příloha 2.: Rozpětí bází pro výběr vhodného typu gelu Spreadex.....	49

1. ÚVOD

Toto téma jsem zvolila, protože spojuje dvě věci, o které se zajímám, genetiku a kynologii. Genetika mě zajímá již od střední školy, kdy jsem se s ní poprvé blíže setkala a v dalším studiu bych se jí chtěla věnovat na oboru šlechtění zvířat. Kynologie mě zajímá už od útlého věku, celý můj život je spjat se psy zejména pak s českými fousky, jezevčíky, malými hrubosrstými vendeeskými basety a bassethoundy.

Domnívám se, že ověřování původu u psů je stále aktuálnější téma a v budoucnu se bude stále více využívat, nejen proto, že neustále přibývá psů i plemen, ale i proto, že přibývá problémů s původem jedinců.

Podle mezinárodní kynologické organizace musejí mít štěňata pro vydání průkazu původu tzv. nezpochybnitelný původ, což je v některých případech docela velký problém, a to zejména u „velkochovatelů“, kterých je mezi kynology velké množství. Za situace, že máte několik chovných fen a několik chovných psů jednoho plemene, při nedůsledném hlídání, lze jen těžko určit, zda otcem těchto štěňat je ten či onen pes, případně pokud máte více vrhů ve stejné době a neoddělené, bývá problematické určit i matku štěňat, to určí pouze genetická analýza. Pochopitelně, že když má chovatel více chovných psů a fen, neznamená to automaticky, že má nepořádek v evidenci a neumí si ohlídat, který pes nakryl kterou fenu, nebo, jestli tohle štěně je skutečně této feny, ale je to pouze na jeho poctivosti, svědomitosti a odpovědnosti.

Další problém může nastat i za situace, kdy má chovatel doma jednu jedinou fenu, byl na krytí u chovatele, který má také jednoho jediného psa, takže by se teoreticky dalo říct, že nemůže nastat možnost nějakého zpochybnění původu štěňat, ale není tomu tak. Stačí jeden šikovný „voříšek“ ve vsi, pro kterého není plot žádný problém, neopatrnost chovatele při vycházce s fenou, či feny svévolná vycházka. Tomu se dá zabránit, když o voříškovi víme, fenu někam „schováme“, na vycházku s ní raději nepůjdeme a nedopustíme, aby nám utekla. Horší je, když na tyto možnosti nejsme připraveni a o nakrytí feny ještě dalším psem, nemáme ani tušení, narodí se štěňata a jak rostou, postupně zjišťujeme, že každé je podezřele jiné. Aby nedošlo k tomu, že všichni jedinci z vrhu nedostanou průkaz původu, udělá se genetická analýza na ověření původu a jedincům, jenž bude původ souhlasit, bude průkaz

původu vydán, jakožto čistokrevným jedincům plemene. Jedincům, kterým původ nesouhlasí, průkaz původu vydán nebude, protože nejsou čistokrevnými jedinci daného plemene.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce na téma „Vhodnost některých mikrosatelitů pro ověřování původu u psů“ je otestovat některé mikrosatelity na stupeň jejich polymorfismu a zjistit tak, který mikrosatelit je vhodný, který je méně vhodný a který je zcela nevhodný pro ověřování původu u různých plemen psů. I mikrosatelit, který má více alel u různých plemene psů nemusí být pro ověřování původu u určitého plemene vhodný, protože se u tohoto plemene vyskytuje jen jako monomorfní. Čím je však u plemene popsáno více alel konkrétního mikrosatelitu, tím je pro ověřování původu vhodnější. Zvyšuje se tak pravděpodobnost poznání falešného potomka, u kterého nesouhlasí jeden z rodičů a ve výjimečných případech žádný z nich.

Do plemenné knihy FCI (Mezinárodní kynologická federace) mohou být zapsána jen štěňata, jejichž původ je nezpochybnitelný. To znamená, že nejsou žádné důvody předpokládat, že rodiče zapsaní v průkaze původu takových štěňat by neměli být jejich pravými rodiči.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. *Genom psa*

Karyotyp je dán tvarem, velikostí, strukturou a počtem chromozómů. Karyotyp je pro jednotlivé druhy poměrně konstantní. Pes má 39 párů chromozómů, to je celkem 78 chromozómů (Hartl, Šebková, 2007).

Užití výrazu „poměrně konstantní“ není podle mého názoru zcela přesné. Karyotyp je pro jednotlivé druhy konstantní a jakýkoliv jiný počet chromozómů v genetické výbavě jedince má za následek velice vážné defekty či úhyn jedince.

Pes má v každé somatické (tělní) buňce 39 párů chromozómů, vždy jeden chromozom z páru od své vlastní matky a druhý chromozom od svého skutečného otce, to je celkem 78 chromozómů. Toto značíme symbolem „ $2n$ “ a hovoříme o diploidním počtu chromozómů. Když takový jedinec začne tvořit svoje pohlavní buňky – gamety (vajíčka a spermie), ty pak mají jen po jednom chromozomu z každého chromozómového páru, tedy jen 39 chromozómů celkem. To značíme symbolem „ n “ a hovoříme o haploidním počtu chromozómů. A zde jsme u prvního zdroje genetické variability (proměnlivosti). Je věcí náhody, který ze dvou chromozómů, pes či fena, dostane do té či oné pohlavní buňky, zda-li ten chromozom byl získán od matky, či ten, který jedinec získal od svého otce. (Dostál, 2007)

Ve spermii má pes pouze 39 chromozómů (z každého páru jeden) a fena má ve vajíčku rovněž 39 chromozómů (také z každého svého chromozómového páru jeden), dostáváme splynutím spermie a vajíčka celkem 2^{39} možných kombinací vazbových skupin, což je více než 500 miliard, přesně 549 755 813 888. Ve skutečnosti je genetická proměnlivost daleko větší, protože ve vypočítané hodnotě není započítán stupeň výměny genetického materiálu crossing – overem, ani podíl mutací, ani hodnota mimojaderné dědičnosti. Kdyby nedocházelo k redukčnímu dělení (meióze) při tvorbě gamet (spermii a vajíček) počet chromozómů by se s každou generací zdvojnásoboval. Proto se redukčním dělením diploidní počet chromozómů snižuje na poloviční – haploidní (n). Je tak dosaženo

toho, že v každé pohlavní buňce zůstává z každého chromozómového páru jen jeden, a to kterýkoliv chromozom uvádí ve svém díle z roku 1995 Dostál.

Je prokázáno, že žena vyprodukuje až 700 000 vajíček. V pubertě tento počet klesá na 335 000. V pěti letech má 34 500 vajíček a v 10 letech pouhých 500. Jejich úbytek je většinou zaviněn vstřebáváním zárodečných buněk.

Celkový počet spermií v jedné dávce převyšuje 15 miliard, neboť průměrný počet je 4 miliardy 588 miliónů spermií na krychlový cm spermatu. U člověka je to asi 10 miliónů na jeden krychlový milimetr (Wailly, 2005).

Chromozomy obsahují kyselinu deoxyribonukleovou – DNA, která je nositelkou genetické informace.

Chromozomy mají pentlicový nebo tyčinkový tvar a skládají se ze dvou podélných částí zvaných chromatidy, které jsou naprosto identické. V místě ohybu chromozomu je tzv. centroméra a chromozom se tak dělí na dvě ramena. V této formě jsou chromozomy v buňce pod mikroskopem viditelné pouze ve fázi dělení, zatímco mimo dělení buňky (tzv. interfázi) viditelné nejsou. Chromozomy se ve fázi dělení buňky podélně rozštěpí, chromatidy se osamostatní a přesunou se k pólům buňky, kde se vytvoří nová jádra dceřinných buněk. Důležité je, že dělením chromozómů vznikají naprosto identické chromatidy, které přecházejí do dceřinných buněk, vytvářejí dál chromozomy a přenášejí přesně stejné genetické informace. (Procházka, 2005)

Není úplnou pravdou, že části chromozómů zvané chromatidy jsou identické, například části pohlavních chromozómů (gonozómů) mají homologní část a heterologní část. Není ani zcela pravdou, že v místě ohybu chromozomu je tzv. centroméra a chromozom se tak dělí na dvě ramena. Existuje několik typů chromozómů podle umístění centroméry.

Podle Hrubana a Majzlíka z roku 2007 jsou chromozómy nejčastěji sledovány během jedné etapy buněčného dělení zvané *metafáze*, protože v metafázi je chromatin nejvíce nahuštěn a chromozómy jsou mikroskopicky viditelné. Lze na nich rozlišit dvě chromatidy, tj. dvě identické části vzniklé dělením, které jsou připraveny k úplnému rozdělení do dvou dceřinných buněk. Jsou však ještě spojeny v místě zvaném centroméra. Místo centroméry je

obvykle zúžené (primární konstriktce), takže chromozóm může být rozdělen na krátké rameno (ustálené označení písmenem p) a dlouhé rameno (označení q). Na koncové části jednoho ramena některých chromozómů může být další zúžení (sekundární konstriktce), které zaškrcuje část zvanou satelit. V této části je přítomen tzv. organizátor jadérka, ve kterém jsou u eukaryotů lokalizovány geny pro ribozómovou rRNA. Konce chromozómových ramen se nazývají telomery (řec. Telos = konec). Podle umístění centroméry a délky ramen dělíme chromozómy tvarově na čtyři typy:

- Metacentrické – U nich je centromera uprostřed, ramena jsou přibližně stejně dlouhá.
- Submetacentrické – (sub=pod) Jedno rameno je kratší.
- Subtelocentrické – Centromera je posunuta za 3/4 délky, takže jedno rameno je velmi zkrácené.
- Telocentrické (nebo též akrocentrický, řec. Akros=vrchní, telos=konec). Centromera je na konci, chromozóm má jen dlouhá ramena.

V buňce jsou vždy dva chromozomy funkčně a tvarově shodné. Nazýváme je chromozomy homologní. Tyto homologní chromozomy spolu tvoří chromozómový pár. (Dostál, 1995)

Na každém chromozomu je velké množství genů. Geny umístěné na jednom chromozomu se dědí společně, na různých nezávisle na sobě. Geny ležící na páru chromozómů proti sobě (genlocus), tvoří funkční dvojici a nazývají se alely. Jsou-li kvalitativně totožné, je tento pár i jimi určovaná vloha homozygotní (v genetickém vzorci se označují stejně velkým písmenem – NN nebo nn). Liší-li se kvalitativně, je takový pár alel i vloha, která je navenek stejná, heterozygotní. Výsledná vlastnost je totiž určena tím genem z páru alel, který je průraznější, převažující – dominantní. Ve formulích se proto označuje velkým písmenem. Jeho „slabší“ protějšek je recesivní a značí se malým písmenem. (Martínek, 2000)

Jsou znaky a vlastnosti, které kontroluje jen jeden gen, dva, případně několik málo genů. Naproti tomu jsou znaky a vlastnosti, které jsou kontrolované velkým množstvím genů a ještě navíc je jejich vývoj více nebo méně ovlivněn podmínkami vnějšího prostředí. (Dostál, 2007)

Znaky, které jsou kontrolovány jedním či několika málo geny (majorgeny, geny se silným účinkem) se nazývají znaky kvalitativní. Jsou jednoduše děděny (dle Mendelova zákona) a jsou minimálním způsobem ovlivněny vlivem prostředí. Příkladem takového znaku je třeba zbarvení srsti. Znaky kontrolované velkým množstvím genů (polygenů, minor genů – genů malého účinku) jsou znaky kvantitativní. Takovým znakem je například kohoutková výška. Kvantitativní znaky jsou velkou měrou ovlivněny podmínkami prostředí, v němž se organismus vyvíjí. U těchto vlastností se zjišťuje koeficient heritability – h^2 , koeficient dědivosti, jenž vyjadřuje jakým podílem se na fenotypu podílí geny a jakým podílem podmínky prostředí.

Uvádí se, že pes má 20 439 genů, což je méně než má člověk. Tyto geny činí pouze 5% celé DNA. Větší část DNA tedy nic nekóduje. Počet poznaných genů není však pravděpodobně konečný. Další studie jistě přinesou další objevy. Genom psa je o 18% menší než genom člověka a o 6% menší než myší genom.

Protože pes je teprve pátým savcem ze zhruba 5500 druhů savců žijících na naší zemi, který má genom analyzovaný, není toto srovnání nijak překvapivé. Jen asi 0,2% DNA je velmi konzervativní částí, která se nachází u všech živočišných druhů a nekóduje strukturu žádného proteinu. Možná že rozhoduje jen o tom, že tento organismus je živočich a ne rostlina, hmyz, bakterie či něco jiného.

Bylo-li uvedeno, že je znám kompletní genom psa, jde o analýzu necelých 99% molekuly DNA. Zbytek tvoří část, která asi také nic nekóduje a jejíž objasnění vyžaduje vývoj nových metod. Jde o úseky, ve kterých se opakuje stále stejná báze, a není ještě možné přesně zjistit, kolikrát se toto opakování vyskytuje.

Mezinárodní týmy vědců objevily a popsaly 2,5 milionů polymorfizmů u psů. Polymorfizmy jsou změny (odchylky) ve složení DNA, které mohou či nemusí být příčinami fenotypických odchylek, ale některé asi jsou příčinou toho, že dnes známe více než 400 různých plemen psů odlišných exteriérem i chováním, velikostí a pracovním využitím, či jsou zodpovědné za rozvoj dědičných chorob a defektů. Uvádí se, že u psů je popsáno okolo 500 dědičných chorob, které jsou obdobné jako u člověka, ale jen cca 50 je jich dokonale objasněno až na molekulární úrovni, to znamená, že jen u těchto dědičných chorob je popsána příčinná mutace DNA (odchylka v jejím složení).

Dnes známe 2 385 199 138 párů bází genomu psa. Báze jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny/puriny: adenin (A) a guanin (G) a pyrimidiny: Thymin (T) a cytosin (C)/. DNA (deoxyribonukleová kyselina) je složena z uvedených 4 bází (v nejrůznějších kombinacích za sebou), kyseliny fosforečné a pětiuhlíkatého cukru (deoxyribózy). Molekula DNA je dvouvláknová, uspořádaná ve dvoušroubovici (pro představu jde o žebřík stočený podle své osy jako závit na šroubu), kde jsou jednotlivá vlákna DNA spojena vodíkovými můstky tak, že A s T pojí dva vodíkové můstky a třemi vodíkovými můstky je spojen C s G. To dává této molekule určitý řád. Gen pak není nic jiného než určitý kus DNA, přičemž vždy jedno vlákno je kódující (určující), která aminokyselina bude zabudována do polypeptidického řetězce bílkoviny – enzymy a ten pak plní určitou funkci v organismu (některý něco štěpí, jiný spojuje, některý urychluje reakci a podobně), (Parker, 2004, Olander, Kluglyak 2004, Olander et al 2006, Dostál, 2006).

3.2. Mikrosatelity

3.2.1. Definice mikrosatelitů

Mikrosatelit se skládá ze specifických sekvencí DNA bází nebo nukleotidů, který zahrnuje mono, di, tri nebo tetra tandemová opakování. Například AAAAAAAAAAAA může být uváděno jako $(A)_{11}$, GTGTGTGTGTGT může být zmíněno jako $(GT)_6$, CTGCTGCTGCTG může být zmíněno jako $(CTG)_4$, ACTCACTCACTCACTC může být zmíněno jako $(ACTC)_4$. V literatuře mohou být také nazývány prosté sekvence opakování (SSR), krátké tandemové opakování (STR) nebo variabilní číslo tandemového opakování. Alely ve specifickém místě (lokus) se mohou lišit v čísle (počtu) opakování. Mikrosatelity, to znamená počet opakování, je děděno podle Mendelova zákona. (www.woodrow.org)

Některé repetitivní sekvence mají charakter retropozónů. Smysl existence repetitivních sekvencí (někdy označované jako genomové „smetí“) není znám. Tyto sekvence jsou buď rozptýlené po genomu nebo jsou soustředěny tandemově v určitých částech chromozómů, např. v koncových segmentech (telomérách) nebo jsou kolem centromery. Pokud jsou v genomu rozptýleny a jsou vytvářeny jednoduchými motivy a krátkými repeticemi (např. dvojnukleotidový motiv CACACA ...CA_n, kde $n = 30 - 100$) označujeme je jako mikrosatelit, mikrosatelitní DNA. Jedinci se liší počtem repeticí (tedy délkou mikrosatelitu, kterou lze zjistit elektroforézou). Využívají se k identifikaci rodičovství, pravosti odrůd, mapování genomu a nepřímé diagnostice. (Hruban, Majzlík, 2007)

Elektroforéza je metoda dělení látek ve stejnosměrném elektrickém poli. Dělená látka se nanese na gel, který funguje jako síto, např. agar, polyakrylamid aj. DNA, RNA, protein aj. putují vždy směrem od „-“ k „+“ a o jejich pohyblivosti rozhoduje velikost fragmentů, krátké jsou rychlejší. U proteinů směr a rychlost závisí navíc na pH pufru, izoelektrickém bodu látky aj.). Výsledkem elektroforézy v závislosti na velikosti DNA fragmentů (počtu repetice daného motivu) jsou různě pohyblivé proužky DNA, které po obarvení tvoří mnohdy velmi složité vzory podle nichž je možné identifikovat jedince podobně jako pomocí daktyloskopie (v populaci je obtížné najít identický DNA vzor). Metoda identifikace s použitím minisatelitních repetitivních sekvencí se označuje jako DNA finger-printing nebo též jako metoda DNA otisků. (Hruban, Majzlík, 2007)

Mikrosatelit může být nazýván i jako přívěsek DNA. Podobná mikrosatelitní DNA je minisatelitní DNA, liší se však v délce neboli počtu opakování.

Minisatelitní DNA – lokalizovaná především na telomérách, je tvořena složitějšími motivy DNA sekvencí, které se opakují mnohatisíckrát (někdy až $1 \cdot 10^7$) a jsou vysoce polymorfnní. Jedinci se sice liší počty opakování motivů jako u mikrosatelitní DNA, ale k detekci genetického polymorfizmu se používá restriční štěpení endonukleázami a k zviditelnění minisatelitů se užívají označené DNA sondy. (Hruban, Majzlík, 2007)

3.2.2. Polymorfizmus mikrosatelitní DNA

Jde o opakování jednoduchých motivů v sekvenci, např. dinukleotidová opakování (CA) a jsou jen v několika desítkách kopií, přičemž jedinci se liší podobně jako u minisatelitní DNA počtem opakování. Jsou velmi užitečné pro mapování, protože jsou pravidelně roztroušeny po genomu. Dnešní kompletizované genetické mapy (tj. zbývajících 95% nekódujících sekvencí v genomu) jsou zaplněny především mikrosatelitními polymorfnními markery. K detekci mikrosatelitního polymorfizmu není potřeba restričního štěpení endonukleázou. Pokud mikrosatelitní sekvenci přemostíme na obou koncích primery, polymorfizmus lze určit pomocí PCR. Produkty PCR od různých jedinců se budou lišit délkou. Protože jak v případě bodového, tak repetitivního polymorfizmu jsou výsledkem různě dlouhé fragmenty DNA, což označujeme obecně jako polymorfizmus délky DNA fragmentů. Pokud je vymezení délky určitého fragmentu závislé na restričním štěpení endonukleázami (většina bodového polymorfizmu a polymorfizmu minisatelitní DNA), označujeme jej jako polymorfizmus délky restričních fragmentů nebo zkráceně jako RFLP (z angl. restriction fragment length polymorphism).

Bodový polymorfizmus

Principem jsou rozdíly mezi jedinci dané záměnou báze v homologním místě DNA. Vznikl bodovými mutacemi (tranzice, transverze)

Repetitivní polymorfismus

Podstatou tohoto polymorfizmu je existence variabilních a hypervariabilních opakujících se sekvencí v genomu. Jedinci se od sebe liší počtem opakování určitých sekvencí tak, jak jdou tandemově za sebou. Obvykle se rozlišuje tzv. polymorfismus minisatelitní a mikrosatelitní DNA. Repetitivní sekvence nekódují proteiny a jejich polymorfismus vykazuje převážně mnohočetný alelismus (alelické série).

Tranzice

Bodová mutace záměnou purinových bází mezi sebou (G za A) nebo pyrimidinových bází mezi sebou (C za T, nebo U).

Transverze

Je záměna purinové báze za pyrimidinovou a naopak (bodová mutace).

3.3. *Funce mikrosatelitů*

Proč mikrosatelity existují?

Mají mikrosatelity nějakou funkci, nebo jsou prostě jen nepotřebná „veteš“ DNA? To ještě není zcela přesně známo. Tady jsou nějaké současné domněnky:

1. Mikrosatelity jsou „veteš“ DNA a změna je převážně přirozená.

Mikrosatelity obvykle nemají žádný efekt na fenotyp a když mutují, je to škodlivé, a ne užitečné. U lidí, 90 % známých mikrosatelitů jsou nalezeny v nekódující oblasti genomu. Když nalezneme mikrosatelity u lidí v kódující oblasti, mohou být některé jejich alely ve vazbě s příčinnými mutacemi dědičné choroby. Zajímavě, když nalezneme v kódující oblasti, mikrosatelity jsou obvykle trinukleotidové opakování. Jedna možnost vysvětlení je, že každý další typ jiného nukleotidového opakování než trinukleotidové, může být také škodlivé pro kódující oblast, protože to může způsobovat mutaci posunem fáze translace.

2. Mikrosatelity zajišťují nezbytný zdroj genetické proměnlivosti.

U bakterií je za příčinu změny v alelách mikrosatelitů v kódující oblasti považována adaptivita v odlišném prostředí. Jinak, krátká alela může být přizpůsobivá v jednom prostředí a dlouhá alela s mnoha opakováními může být adaptivní v jiném prostředí. Specificky, krátké proteinové vlákno může dělat bakterii méně „choulostivou“ a delší vlákno ji může dělat více „choulostivou“ a více patogenní (Moxon and Wills, 1999). Tudiž, změna délky vlákna může příkladně zajistit přežití populace bakterií ve změněných podmínkách prostředí.

Similary et al. (1999) věří, že mikrosatelitní změna může být cesta ke kompenzaci za ztrátu genetické variability způsobenou genetickým driftem a selekcí.

3. Mikrosatelity mohou pomáhat regulaci genové expresi a bílkovinné funkci.

Kashi and Soller (1999) také uvažují, že mikrosatelity mohou mít regulační úlohu v genové expresi. Ty jsou nalézány blízko kódujících oblastí genů kontrolujících různé proteinové funkce a genetické aktivitě. Například *Drosophila* má v period clock genu dvě majoritní varianty (Thr-Gly)₁₇ a (Thr-Gly)₂₀. Dvě varianty jsou děděny ve dvou vysoce významných kloněch a bylo ukázáno, že mohou být funkčně adaptivní.

3.4. Vývoj mikrosatelitů

3.4.1. Evoluce mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou značně variabilní. V jednom lokusu, můžete mít deset různých opakování, ale jedinec může mít 15 nebo 20 opakování, pokud je homozygot, nebo obě opakování, pokud je v daném mikrosatelitním genu heterozygot. Proč?

Vývoj prostě znamená změnu. Mikrosatelitní alely se mění (mutují). V populaci, tak může existovat mnoho alel jednoduchých mikrosatelitních lokusů. Mikrosatelitní alely se liší v čísle opakování. Například, jedna alela může mít sedm opakování CT a další alela může mít 8 opakování. V populaci, tam může existovat mnoho alel (až do sedmdesáti nebo osmdesáti!) téhož mikrosatelitu a v jediném lokusu, to může být jinak, například jen dvě alely. Homozygot bude mít stejná čísla opakování na obou chromozomech, kdežto heterozygot bude mít rozdílná čísla opakování. Okolní region mikrosatelitního lokusu, je nazýván **obklopující region**, může pořád mít stejné sekvence. Toto je důležité pro PCR reakci, protože obklopující region může tudíž být užíván jako PCR primery, a ty mohou být použity u stejného druhu nebo někdy dokonce i mezidruhově. Na následujícím schéma je ukázáno, jak jsou sekvence dvou molekul DNA mikrosatelitu reprezentovány na dvou homologních chromozomech diploidního organismu.

Homozygot: (Obě vlákna mají sedm CT opakování)

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG...

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG...

5' obklopující region

mikrosatelitní lokus

3' obklopující region

Heterozygot: (Jedno vlákno má sedm opakování a další má osm opakování)

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG...

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTGG...

Jak byly tyto rozdílné alely vytvořeny? Mutací! Domníváme se, že mikrosatelity mutují 100 až 1000 krát častěji než například kódující sekvence. To dělá mikrosatelity užitečné pro studium evoluce v krátkých časových rozpětích (stovky nebo tisíce let), kdežto nahrazení párů bází v kódujících úsecích jsou spíše užitečné pro studium evoluce přes dlouhá časová rozpětí (milióny let). (www.woodrow.org)

3.4.2. Proč mikrosatelity mutují tak rychle?

Pro mutaci mikrosatelitů existují dvě hypotézy, které ji vysvětlují.

1. „Polymerázový skluz“ nebo „sklouznuté vlákno – chybné párování“

Když se DNA replikuje, polymeráza ztrácí stopu tohoto místa a jedno ze dvou vláken má odlišné číslo opakování než původní vlákno. Pro výbornou ilustraci toho, jak tento skluz může nastat se podívejte na článek o DNA mikrosatelitech: *Agenti evoluce? – tento článek chci doplnit*. Motiv tohoto článku je zaměřen na vysvětlení malých změn v čísle opakování (připojení nebo nahrazení jedné nebo více opakování).

2. Unequal crossing – over během meiózy

Toto je myšlenka vysvětlující více drastické změny v počtech opakování. V diagramu dole, chromozom A získal příliš mnoho opakování během crossing-overu a chromozom B získal také několik opakování.

MODEL Y MIKROSATELITNÍCH MUTACÍ (Jarne and Logoda, 1996)

1. Postupný mutační model (SMM)

Tento model vysvětluje, že když mikrosatelity mutují, získávají nebo ztrácejí pouze jedno opakování. Toto předpokládá, že pokud se dvě alely liší v jednom opakování, jsou blíže příbuzné (mají více nedávných běžných předků) než alely odlišné v mnoha opakováních. Velikost alel určuje statistické struktury subpopulací. Genetická vzdálenost těchto subpopulací je nazývána **Rst**. SMM je všeobecně preferovaný model, když počítáme vztahy mezi jedinci a populační substrukturou, ačkoliv i tam je problém homoplázy.

Homopláza

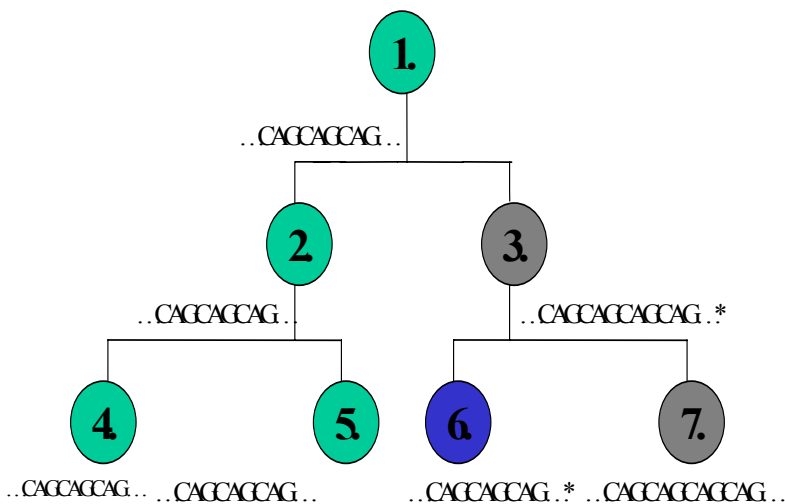
Předpokládejme, že studujeme populaci a najdeme v ní čtyři jedince. Tři z nich mají stejný genotyp a jeden má genotyp odlišný. Toto by mohlo naznačovat, že tři se stejným genotypem jsou navzájem blíže příbuzní než ti ostatní. Avšak, toto nemusí být nutně pravda.

(www.woodrow.org)

K lepšímu pochopení tohoto případu poslouží schéma dole.

Hvězdička naznačuje mikrosatelitní mutaci.

Obr. 1.: Schéma populací



V tomto schématu, populace 1 dává vznik dvěma populacím, populaci 2 a 3. V populaci 3 byla postupná mutace, takže teď jsou tam čtyři CAG opakování namísto tří. Populace 3 dala vznik dalším dvěma populacím, populaci 6 a 7. Populace 6 jedno opakování ztratila, takže nyní má tři CAG opakování. Problém je, že populace 4, 5 a 6 mají stejnou alelu v tomto mikrosatelitním lokusu, přesto vznikly odlišným vývojem. My můžeme říct, že jejich

alely jsou stejné, ale nemají stejný původ. Když vědci zkoušeli pouze tento jeden lokus mylně usoudili, že populace 6 je blíže příbuzná k populaci 4 a 5 než k populaci 7. (Vědci obvykle mají přístup ke genotypu současné generace nebo vrcholu řady)

Tento úkaz, když dvě alely jsou identické v postavení ale ne v původu je znám jako homopláza. V populačních studiích, homopláza může vést k podcenění odchylky. Cesta k objevení homoplázy by byla zkoušení mnoha dalších lokusů. Homopláza je ale pořád myšlenka, která má malý efekt na populace v kratším časovém úseku (stovky generací) a postupný populační model je pořád preferovaný model. (Goodman, 1998)

2. „K“ model alel

Tento model objasňuje, že mikrosatelit může mutovat v jednu z „K“ alel, náhodně. Tudíž, to nepředpokládá, že osm opakujících se sekvencí nezbytně mutuje jen do sedmi nebo devíti opakujících se sekvencí. Je zrovna tak pravděpodobné, že může mutovat v patnáct opakujících se sekvencí.

3. Model nekonečných alel

Každá mutace může náhodně vytvořit nějakou novou alelu. Alela o patnácti opakováních může být právě tak blízce příbuzná alele o deseti opakujících se sekvencích jako alela o jedenácti opakováních. Všechno tohle znamená, že tyto jsou rozdílné alely. Jinými slovy, **velikost není důležitá**. Tento statistický model je nazýván **Fst**.

Protože mikrosatelity mutují rychle, mohou být využívány ke studiu nedávných evolucí v populacích, příbuznosti populací (mikrosatelitních identifikačních znaků pro rozdílné jedince) a soudnictví. (www.woodrow.org)

3.5. Kde a jak je možno využít mikrosatelity

3.5.1. Aplikace mikrosatelitů

Protože mikrosatelity jsou široce rozptýleny v eukaryotickém genomu, jsou vysoce variabilní a jsou analyzované pomocí PCR reakce. PCR metoda vyžaduje pouze nepatrné množství vzorku. Mikrosatelity mohou být využívány v mnoha rozdílných oblastech výzkumu jako například:

Soudnictví – Mikrosatelitní lokusy, původně známé v soudní aplikaci jako krátká tandemová opakování, jsou široce užívána pro soudní identifikaci jedince a ověřování původu a jsou predominantními genetickými znaky v této oblasti aplikace. V případech soudní identifikace jedince, je cíl typicky spojit genetické znaky podezřelého se znaky vzorku krve, semene nebo vlasů vzatým ze zločinu. V opačném případě cílem může být spojen vzorek nalezený na oblečení podezřelého s obětí. Ověření původu v kriminální práci může vyžadovat vyšetření otcovství, aby se prokázalo znásilnění nebo incest. Další aplikace vyžaduje spojení DNA vzorků s příbuznými ztracených osob. Protože délky mikrosatelitů se liší u různých osob a jsou dědičné, kriminalisté je mohou velmi dobře používat k identifikaci kriminálních, ověřování původu jako postup známý jako DNA profilace nebo „otisk prstu. Mikrosatelitní systémy jsou atraktivní a důležité pro jejich relativně snadné využití, typičnost a vysokou úroveň polymorfizmu. Schopnost uplatnit PCR i v minimálním množství vzorku je obzvláště možná v kriminálních případech, kdy je získán pouze nepatrný vzorek biologického materiálu.

Diagnózy a identifikace dědičných chorob – Protože mikrosatelity jsou výrazně polymorfní mohou některé jejich alely sloužit jako užitečné znaky pro časně odhalení rakoviny, pokud je prokázáno, že jsou ve vazbě s některým rakovinovým genem. Protože jsou polymorfní, a jich popsáno více jak 150.000, jsou studována vazbová spojení s geny zodpovědnými za různé genetické vady, defekty a dědičnými chorobami.

Populační studie – Při pohledu na změny frekvencí mikrosatelitů v populaci, mohou být dělány závěry o populační skladbě a rozdílech, genetickém driftu, genetických nedostacích a dokonce o datování posledních společných předků v evolučním vývoji.

Konzervativní biologie – mikrosatelity mohou být použity ke zjištění neočekávaných změn v populaci. Mikrosatelity jsou rovněž použitelné v určení nových a začínajících populací. (www.woodrow.org)

Identifikace zvířat - Protože polymorfismus DNA je o několik řádů vyšší než u proteinů, je výhodně využíván ke kontrole rodičovství u zvířat. Na rozdíl od dříve používaných proteinových znaků, které mají při kontrole hodnotu jen vylučovací (krevní skupiny u zvířat), DNA polymorfismus poskytuje nesčetné varianty, takže jeho hodnota je mnohdy identifikační. Fingerprinting nebo spíše polymorfismus mikrosatelitů se stávají běžnou součástí dokladů o původu plemenářsky cenných zvířat.

Aneuploidie

Je odchylka od normálního počtu chromozómů (chybění nebo nadbytek jednotlivých chromozómů v párech).

Aberace

Je odchylka od normálního tvaru a funkce chromozómu. Patologická změna tvaru chromozómu (delece, translokace, centrická fúze aj.)

Delece

Je zkrácení chromozómu (ztráta části DNA).

Translokace

Je přemístění chromozómového segmentu (na homologních chromozómech nebo mezi heterologními chromozómy).

Centrická fúze=Robertsova fúze (translokace)

Je středové spojení dvou akrocentrických (telocentrických) chromozómů. Častá příčina aneuploidií. (Hruban, Majzlík 2007)

Psí genom s průměrným vepsáním o velikosti 16 kb byl tříděn při rozsahu mikrosatelitní sekvence určující relativní frekvenci těchto opakování (Rothuiren et al., 1984). Nejfrekventovanější opakování byla (CA)_n (CT)_n, která byla přítomna přibližně každých 43 kb. Naproti tomu vzdálenost mezi mikrosatelity o třech nebo čtyřech nukleotidech byla

průměrně 320 kb. Zajímavé je, že u GAAA sekvence o čtyřech nukleotidových opakováních byl nalezen extrémní polymorfismus u psů, což je důležitým faktorem ve zkoušení mapových zvláštností u druhů jako je pes s jeho rozvrstvenými populacemi plemen (Francisco et al., 1996). Tito autoři oznámili, že tetranukleotidové opakování bylo přítomno asi jednou za každých sto až dvě stě kb v psím genomu. Psí mikrosatelity byly značně užívány ke zkoušení plemenné struktury (Fredholm and Wintero, 1995), (Pinkanen et al., 1996, Zajc et al., 1997) jsou zkoušeny jako neocenitelné markery pro užití při ověřování původu (Ruvinsky and Sampson, 2001).

Testování založené na polymorfismu mikrosatelitů

Praktické problémy systémů založených na testování minisatelitů byly nyní do značné míry překonány přesměrováním mikrosatelitů jako alternativního zdroje variability DNA pro ověřování původu u psů. Ačkoliv psí mikrosatelity mají nižší úroveň polymorfismu ve srovnání s minisatelity, plán psího genomu byl vytvořen stovkami mikrosatelitních lokusů, takže může být využíván pro ověřování původu. Dva kolektivy autorů (Zajc et al., 1994) a (Binns et al., 1995) ukazují efektivnost mikrosatelitů jako nástrojů pro ověřování původu u psů. Toto bylo potvrzeno. Je to relativně jednoduchá metoda, protože PCR produkt může být snadno použit pro automatickou analýzu na sekvenátoru DNA (Ruvinsky and Sampson, 2001).

Vzorky DNA matky, štěňat a potenciálního otce jsou použity v PCR reakci. Namnožený produkt touto reakcí je v souladu se skutečnou velikostí alely. V jednom systému (Zajc et al., 1994) nebyly primery označeny a PCR produkt rozdělený na polyakrylamidovém gelu, byl obarven použitím ethidium bromidu. Používanější systém je ten druhý (Binns et al., 1995), kde primer nese fluerescentní přívěsek a tím je umožněno, aby alely byly určeny již na automatickém DNA sekvenátoru (Ruvinsky and Sampson, 2001).

Domnívám se, že u nás je používanější první způsob analýzy podle Zajce et al., (1994) a to s neoznačenými primery a následným barvením roztokem ethidium bromidu. V našem případě byly mikrosatelity testovány touto metodou.

Analýza zahrnuje užití odlišného čísla mikrosatelitních lokusů. Velikost alel srovnávající DNA matky a štěňat pozná rodičovskou alelu u štěňat. Každý potenciální otec

může pak být vyloučen z biologického otcovství. Falešný otec obvykle není vyloučen na základě pouze jednoho mikrosatelitního loku (Ruvinsky and Sampson, 2001).

3.5.2. Mikrosatelity a choroby

DNA diagnostika

Polymorfizmu DNA je současně využíváno v lékařské a veterinární diagnostice. Zatímco cytogenetická vyšetření dovolovala určit jen hrubě morfologicky rozpoznatelné odchylky (chromozómové aberace, aneuploidie), DNA diagnostika umožňuje detekci genových mutací a spolehlivé určení heterozygotů – přenašečů recesivně dědičných poruch. Současně jde o stovky známých defektů, přičemž desítka genů se již rutinně testuje v lidské diagnostice během těhotenství. Stejný počet genů je již využíván ve veterinární diagnostice (detekce mutace projevující se prasečím stresovým syndromem, defekt imunity u holštýnského skotu, metabolické defekty u skotu a ovcí atd.). DNA polymorfismus je současně využíván k detekci patogenů (od virů počínaje, přes bakterie, prvoky, houby až po velké parazity). Výhodou je rozpoznání druhů, které morfologicky nelze rozlišit. (Hruban a Majzlík, 2007)

Mikrosatelitní sekvence jsou opakující DNA sekvence. Například v jedné části z chromozomu číslo 4, CAG nukleotidy jsou opakovány mnohokrát. (např. CAGCAGCAGCAG). Jestliže trinukleotidy jsou opakovány mnohokrát, mohla by to být příčina Huntingtonovy choroby člověka v dospělosti. Další choroby opakováním trinukleotidů jsou také známy jako příčina neurologických poruch. V dnešní době se ukázalo, že čtrnáct neurologických poruch je výsledkem expanze trinukleotidových opakování, které rozšiřují třídy těchto nemocí. Choroby způsobené opakováním trinukleotidových sekvencí mikrosatelitů mohou být kategorizovány do dvou subtříd zakládajících se na lokaci trinukleotidových opakování: choroby zahrnující nekódující opakování (nepřekládající sekvence) a choroby zahrnující kódující sekvence (exony). V hlavních trinukleotidových poruchách jsou buď dominantně dědičné nebo vázané na chromozomem X, s jednou výjimkou, kterou je Friedrichova ataxie, která je autosomálně recesivní (Goldstein and Schlotterer, 1999; Cummings and Zoghbi, 2000).

Ne všechny choroby jsou způsobeny chybou v jednom genu. Někdy může být příčinou choroby poškození mnoha genů, například u schizofrenie. Pro tyto choroby byly používány mikrosatelitní sekvence jako markery pro lokalizaci nemocného regionu určitého chromozomu. Tato metoda je nazývána poziční klonování. Mikrosatelitní markery jsou ve vazbě s příčinnou mutací dědičné choroby, genovou korelací a při analýze těchto markerů uvnitř rodin můžeme předpovídat, jak bude nemoc dědičná. (Risch, 2000).

Příklady chorob poškozující trinukleotidová opakování

Huntingtonova choroba

Symptomy: Pozdější výskyt demence a ztráty motorické kontroly, je tanec sv. Víta, vyskytující se po 10 – 20 letech stáří. Motorickým poruchám často předchází nebo jsou doprovázeny paměťovými deficity, poklesem poznávacích schopností nebo změnami v osobnosti. U mladých lidí je výskyt této choroby vzácný, pacient vykazuje ztuhlost, bradykinesii, epilepsii, prudkou demenci a zrychlený průběh choroby.

Vliv mikrosatelitů: CAG kódující opakování v prvním exonu HD genu. Normální gen zahrnuje 6 až 35 opakování a zasažený gen má 36 až 121 opakování. U dospělých nastane typický projev onemocnění, když opakování zahrnuje 40 až 50 jednotek, kdežto alely zahrnující více jak 70 opakování znamená prudší mladistvou formu choroby. Mikrosatelit kontroluje přidání aminokyseliny glutamin do huntingtinovy bílkoviny.

Chromozómové mapování: chromozom číslo 4

Zalomený chromozom X

Symptomy: Mentální retardace, dlouhé a nápadné uši a čelisti, pronikavá řeč, hyperaktivita, chudý oční kontakt a stereotypní pohyby ruky (například: mávání a štípání). Je zasažen jeden ze 4.000 samců, samic je zasaženo méně v závislosti na poměru buněk s normálním X chromozomovou aktivitou k abnormální X chromozomové aktivitě.

Zapojení mikrosatelitů: Opakování je CGG v nekódující oblasti genu FMR2 a normální je 6 až 53 opakování. Nemoc se vyskytuje, když počet opakování je mezi 60 - 200.

Chromozómové mapování: chromozom X

Myotonická dystrofie

Symptomy: DM je nejprudší forma této choroby zahrnující nízký tlak, dýchací úzkost při narození a vývojové abnormality. Nápor u dospělých zahrnuje proměnlivou ztrátu mentální funkce, myotinii, svalovou slabost a postupné svalové pustošení. Další rysy mohou zahrnovat obličejové dysmorfologie, současně šedý zákal, testikulární atrofie, předčasné plešatění u mužů, selhání ledvin, nadbytečná sekrece inzulínu a srdeční přenosové abnormality.

Zapojení mikrosatelitů: CTG opakování v nekódující oblasti genu DMPK. Normální je počet opakování je mezi 5 a 37, choroba může zahrnovat od 50 do tisíců opakování.

Chromozómové mapování: chromozóm číslo 19

Spinalbulbarní svalová atrofie

Symptomy: Neurologická degenerace vedoucí k obtížnostem při mluvení, artikulaci a polykání, svalová slabost a zakrnění. Znaky mírně androgenní necitlivosti jsou typické u adoscelentů.

Zapojení mikrosatelitů: CAG opakování v prvním kódujícím exonu androgenního receptoru (AR) genu. Počet opakování mezi 9 a 36 je normální, choroba se vyvíjí u lidí s 38 až 62 opakováními

Chromozómové mapování: chromozom X, recesivní

Fridrichova ataxie

Symptomy: Ataxie, oslabený šlachový reflex, ztráta pozičního a kývavého smyslu, disartikulace (nezřetelná řeč), kardiomyopatie, diabetes mellitus (cukrovka), zakrnění zraku, skolióza páteře a kosterní abnormality. Nemoc se vyskytuje v časném dětství.

Zapojení mikrosatelitů: CAG opakování v nekódující oblasti genu X25. Normální gen obsahuje 7 až 34 opakování. Nemocný gen má od 34 do 80 opakování.

Chromozómové mapování: Chromozóm číslo 9, recesivní

PŘÍKLADY CHOROB KONTROLOVANÝCH GENY VE VAZBĚ S MIKROSATELITY

Schizofrenie a bipolární porucha

Symptomy: Schizofrenie je charakterizována sluchovými a zrakovými halucinacemi a iluzemi, symptomy bipolární poruchy zahrnují hrozné výkyvy nálady mezi mánií a depresí.

Zapojení mikrosatelitů: Užitím 388 mikrosatelitních markerů uvnitř osmi rodin, výzkumníci (Bailer et al., 2002) našli vnímavost lokusu pro obě choroby, schizofrenii i bipolární poruchu na chromozomu 3.

Chromozómové mapování: Chromozom číslo 3

Vrozená celková hypertrichosa

Symptomy: Vzácná porucha vlasového růstu, charakterizována nadměrným vlasovým růstem ve tváři a ve vrchní části těla, někdy nazývaný jako vlkodlačí syndrom.

Zapojení mikrosatelitů: Užitím hypervariabilních mikrosatelitních markerů, výzkumníci (Figurea et al., 1995) lokalizovali gen v části chromozomu X.

Chromozómové mapování: chromozom X, dominantní

Astma a bronchiální hypercitlivost

Symptomy: Běžné respirační potíže charakterizované stálými příhodami kašláním, zadýchávání se a dušností.

Zapojení mikrosatelitů: Zdánlivé astmatická náchylnost byla identifikována na genu ADAM33 v oblasti chromosomu 20 (Van Eedewgh et al., 2002).

Chromosomové mapování: chromosom číslo 20

Detekce rakoviny

Poměr mikrosatelitního zvětšení (to, že je zvýšen v počtu opakování) nebo zmenšení (snížení v čísle opakování) v buňce je zvýšení výskytu některého typu rakovin, kvůli defektu v enzymech, které opravují chyby v DNA. Časná klinická detekce některých typů rakoviny tlustého střeva nebo močového měchýře užívající změny v počtu mikrosatelitních opakováních byla úspěšná. (Yonekura et al.; 2002, Moxon and Willis; 1999), (www.woodrow.org)

4. MATERIÁL A METODIKA

K tomu, abychom mohli studovat mikrosatelity a jejich vhodnost či nevhodnost pro ověřování původu u psů, musíme nejprve udělat několik velice důležitých úkolů. Jako první musíme ze správně odebrané krve do zkumavky s přípravkem proti srážení krve, většinou to bývá EDTA, izolovat DNA. DNA je možno izolovat i z jiného biologického materiálu jako například z cibulky chlupu či jiné tkáně. Dnes už ale existují i PCR cyklery, které využívají PCR přímo z krve a nemusí se předtím DNA izolovat. Měla jsem možnost tento cykler na své praxi vidět, pozorovat jak pracuje a porovnat jeho PCR produkt z krve s PCR produktem získaným klasickou metodou, to znamená z izolované DNA. Výsledný PCR produkt z krve obsahoval i hemoglobin, což na výsledné fotografii vůbec nehrálo roli. Tento postup je však dost nový a já jsem pracovalo klasickou metodou, tudíž jsem musela DNA z krve nejprve izolovat, věřím však, že dnes už se plně využívá. Pokud se nám izolace DNA podařila, musíme udělat na cykleru PCR produkt. Získaný PCR produkt použijeme k elektroforéze na komerčním gelu, kde se nám teprve objeví požadované mikrosatelitní alely.

4.1. Izolace DNA

Postup při izolaci DNA se musí velice přesně dodržovat, pracujeme s mikromnožstvím látek a každá kapička navíc nebo míň může v úspěšnosti výsledku hrát určitou, často velmi významnou roli. Při pipetování používáme podle možností, co nejmenší pipetu. To znamená, máme-li pipetovat 2 μ l a máme k dispozici pipetu o velikosti 10 - 100 μ l a pipetu o velikosti 1 - 10 μ l, použijeme tu s rozsahem 1 - 10 μ l, aby pipetování bylo co nejpřesnější.

Nejprve pipetujeme 20 μ l přípravku QIAGEN na dno 1,5 ml ependorfky. Poté přidáme 200 μ l vzorku krve. Pokud je množství vzorku krve menší než 200 μ l, doplníme vzorek krve na toto množství PBS vodou. Dále pak přidáme 200 μ l pufru AL ke vzorku a patnáct vteřin vortexujeme (důkladně promícháme na vibračním přístroji vortex), následně po dobu deseti minut inkubujeme v lázni vytemperované na 56 °C. Po skončení inkubace dáme ependorfky do centrifugy a odstředíme na impuls, to znamená, že zapneme centrifugu a jakmile budou otáčky 13 tisíc za minutu, centrifugu vypneme. Následně přidáme 200 μ l ethanolu (asi 96%ního) ke vzorku do ependorfky, důkladně promícháme na vortexu po dobu asi patnácti vteřin a pak opět odstředíme na impuls. Poté aplikujeme vzorek z 1,5 ml ependorfky na QIA amp kolonku komerčně vyráběnou, která je ve 2 ml zkumavce, uzavřeme víčko a odstředíme při 8.000 otáčkách po dobu jedné minuty, následně přendáme kolonku do čisté 2 ml zkumavky a starou zkumavku s filtrátem vyhodíme. Velice pečlivě otevřeme kolonku a přidáme 500 μ l pufru AW 1. Uzavřeme víčkem a centrifugujeme při 8.000 otáčkách po dobu jedné minuty. QIA amp kolonku přendáme do čisté 2 ml zkumavky a zkumavku s filtrátem vyhodíme. Poté přidáme do zkumavky s kolonkou 500 μ l komerčního přípravku AW 2. Pečlivě uzavřeme a centrifugujeme po dobu tří minut maximálně při 14.000 otáčkách. Pokud se náhodou stane to, že pufr přijde do kontaktu s kolonkou, je nutné znovu vzorek odstředit při plných otáčkách alespoň jednu minutu (při 14.000 ot./min). Dále pak umístíme kolonku do čisté 1,5 ml ependorfky a vyhodíme zkumavku obsahující filtrát. Pečlivě otevřeme kolonku a přidáme 200 μ l pufru AE nebo destilovanou vodu, lepší je však pufr AE, jak mi bylo doporučeno. Při laboratorní teplotě inkubujeme po dobu minimálně jedné minuty, lepší je však inkubovat pět minut a po inkubaci odstředíme při rychlosti 8.000

otáček za minuty po dobu jedné minuty. (Vzorky izolované DNA můžeme uchovávat v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.)

Abychom se přesvědčili, že se nám podařilo DNA izolovat, musíme provést kontrolní elektroforézu na agaróze následujícím postupem:

Rozvaříme si agarózu, používáme 1,5 % - 3 % roztok. Pak dáme rozvařenou agarózu do vodní lázně asi na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezitím si připravíme vaničku a nasadíme hřebeny. Vychladlou agarózu na cca $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ nalijeme do vaničky asi do poloviny výšky hřebenu, tak aby se nám nespojily jamky a necháme ji ztuhnout. Následně si připravíme mix o složení 3 μl TBE a 2 μl STOP pufru (barvička modrá) na jeden vzorek. Směs zvortexujeme a odstředíme na impuls. Připravíme si zkumavky a označíme je. Do každé zkumavky napipetujeme 5 μl premixu, přidáme příslušný vzorek izolované DNA a promícháme pipetou. Připravíme DNA marker tak že, 0,5 μl DNA markeru 100bp přidáme k 7,5 μl pufru TBE a 2 μl barvičky a promícháme pipetou. Ze ztuhlé agarózy vyndáme hřebeny a vložíme vaničku do přístroje na elektroforézu. Do první jamky dáme směs DNA markeru a do dalších nasadíme vzorky. Elektroforéza probíhá asi 30 minut při 100 V a 80 - 100 mA. Po skončení elektroforézy vložíme pod UV lampu a zjistíme výsledky.

4.2. PCR (*polymerase chain reaction*)

Nejprve si připravíme primery, buď si je konstruujeme nebo si je necháme připravit podle literatury. Primery mají délku okolo 20 nukleotidů.

Je potřeba zjistit, za jakých podmínek proběhne PCR reakce. Zde jsou zejména důležité koncentrace hořčičných iontů a teploty během PCR reakce. I když jsou podmínky reakce publikovány a používáme stejný typ cykleru (přístroje, kde probíhá PCR) je třeba si toto znova ověřit v našich podmínkách, většinou je třeba určité modifikace určeného postupu. Při práci je potřeba postupovat velmi pečlivě a zachovávat důslednou čistotu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku zejména nežádoucí DNA.

4.2.1. PCR mikrosatelitu *TINAG* a *SCN 11A*

Postup a směs na PCR mikrosatelitů *TINAG* i *SCN 11A* jsou stejné, rozdílné jsou jen primery .

Primer F pro mikrosatelit *TINAG* (GTTCCAATGTGATGGCTGTG) a primer R pro mikrosatelit *TINAG* (CAGGCCTGTGACTGATGAGA) a primer F pro mikrosatelit *SCN 11A* (GCAGTTTGGGGACTGCTAAA) a primer R pro mikrosatelit *SCN 11A* (AGAATGGAATCTTGCCCAGA).

(jhered.oxfordjournals.org)

Stejně jako u přípravy směsi na kontrolu přítomnosti DNA si i nyní připravíme mix podle počtu vzorků. Je nutné, abychom všechny látky vyjma DMSO a La polymerázy po rozmrznutí při práci uchovávali na ledu (plastová krabice s otvory, uchovávaná v mrazáku, která po vyjmutí z mrazáku velice dlouho mrazí). DMSO se na led nedává a La polymeráza nezamrzá a do mixu se pipetuje ihned po vyjmutí z mrazáku. Mix připravíme takto: 12,8 μl PCR vody, 1,5 μl 1,5 mmol Chloridu hořčičného, 2,5 μl La pufru, 0,5 μl nukleotidů, 1 μl F primeru, 1 μl primeru R, 0,5 μl DMSO a 0,2 μl La polymerázy na jeden vzorek. Mix krátce vortexujeme a odstředíme na impuls při 13.000 otáčkách.

Připravíme si zkumavky do PCR cykleru a očíslováme je. Do každé z nich napipetujeme 20 μ l mixu a následně do každé zkumavky přidáme 5 μ l příslušného vzorku izolované DNA. Pak přendáme zkumavky do cykleru a zapneme příslušný program.

PCR program pro TINAG a SCN 11A, označený pracovně HLA-FR

1. 95 °C – 2 minuty
2. 55°C – 30 sekund
3. 68°C – 30 sekund
4. 94°C – 30 sekund
5. go to 2 – 32 krát
6. 55°C – 30 sekund
7. 68°C – 3 minuty
8. 4°C – až 12 hodin

Tento program trvá asi dvě hodiny, po skončení programu přístroj zchladí vzorky na 4 °C, čímž je PCR ukončena.

Než budeme s PCR produktem dále pracovat, je lepší opět provést kontrolní elektroforézu.

Použijeme 3 % roztok agarózy. Máme – li ji uvařenou, pouze ji rozejdeme v mikrovlnné troubě, při rozeřádání nezapomene povolit víko láhve, v němž je ztuhlá agaróza, aby výpary z agarózy mohly unikát a láhev nepraskla. Po rozvaření ji dáme do vodní lázně asi na 55 °C. Pak si připravíme vaničku, nasadíme hřebeny a lijeme do ní agarózu o teplotě asi 55 °C přibližně do poloviny výšky hřebenu. Mezi ztuhnutím agarózy si připravíme mix.

Mix si připravíme takto: 3 μ l TBE a 2 μ l STOP pufru (modrá barvička) na jeden vzorek. Mix zvertexujeme a odstředíme na impuls. Připravíme si zkumavky a očíslováme. Do každé napipetujeme 5 μ l premixu a poté přidáme 5 μ l příslušného PCR produktu. Dále si uděláme DNA marker. Použijeme 7,4 μ l TBE, 2 μ l STOP pufru (modré barvičky) a 0,6 μ l DNA markeru DNA 100bp. Vaničku s agarózou vložíme do elektroforézy a do každé jamky napipetujeme 10 μ l příslušného vzorku, s tím, že do první jamky dáme DNA marker.

V případě potřeby dolijeme pufr. Elektroforézu zapneme na 100 Voltů a necháme ji běžet asi třicet minut. Po třiceti minutách elektroforézu vypneme, vyjmeme ji z pufru a vložíme do fotografického přístroje. Objeví - li se nám na fotografii nějaké frakce, znamená to, že se vytvořil PCR produkt.

Při ověřování původu, musíme s PCR produkty ještě dále pracovat, abychom zjistili, zda původ souhlasí či ne, ale jsou testy, kde nám kontrolní elektroforéza po PCR řekne, co chceme vědět. Takovým příkladem je test na příčinnou mutaci pro oční chorobu CEA (colie eye anomalie). Při této testaci se udělá jedna PCR a pak se udělá druhá PCR se stejnými vzorky, stejným postupem ale s jinými primery. Porovnáním výsledků obou PCR zjistíme, který jedinec je touto chorobou postižen, který je zdravý a kdo je pouze jejím nositelem.

Pro ověření původu pomocí mikrosatelitů musíme PCR produkt použít ještě k elektroforéze na komerčním gelu Spreadex v pufru TAE.

4.2.2. PCR mikrosatelitu FH 4306

Primer F (TTCAGAGTGATGCGTGGTAG) a primer R (TGCACCAATGTCAAGCATAC)
(www.fhrc.org)

Postup pro PCR mikrosatelitu FH-4306 je velice podobný jako pro mikrosatelit TINAG a SCN 11A. Liší se použité primery a v koncentracích použitých látek potřebných pro PCR tohoto mikrosatelitu.

Mix pro PCR mikrosatelitu FH 4306 připravíme tímto způsobem: 12,3 µl PCR vody, 2,5 µl La pufru, 2 µl 2 mmol chloridu hořečnatého, 0,5 µl nukleotidů, 1 µl primeru F a 1 µl primeru R, 0,5 µl DMSO a 0,2 µl LA polymerázy na jeden vzorek. Látky pipetujeme v tomto pořadí. Pracujeme stejně jako v předchozím postupu pro PCR mikrosatelitu TINAG a SCN 11A, to znamená v rukavicích a na ledu mimo látek DMSO a LA polymeráza. Mix zvortexujeme a odstředíme na impuls.

Připravíme si zkumavky do PCR cykleru a očíslováme. Do každé zkumavky si napipetujeme 20 µl mixu a přidáme 5 µl daného vzorku DNA do příslušné zkumavky.

Pipetou vzorek DNA s mixem jemně promícháme. Zkumavky důkladně uzavřeme a vložíme do cykleru, tak aby byl vyvážený, nastavíme příslušný program a zapneme.

Program pro PCR mikrosatelitu FH 4306, pracovníě označeného jako PDE 6 B

1. 95 °C - 2 minuty
2. 95 °C – 30 sekund
3. 56 °C – 30 sekund
4. 68 °C – 30 sekund
5. Go to 2 – 29 krát
6. 68°C – 7 minut
7. 4°C – až 12 hodin

I tento program trvá kolem dvou hodin, po skončení programu přístroj zchladí vzorky na 4°C, čímž je PCR ukončena.

Mezitím si připravíme agarózu. Nejčastěji používáme 0,8 % roztok agarózy. Máme – li ji rozvařenou pouze ji rozehejeme v mikrovlnné troubě (povolíme víko, aby páry mohly unikát a láhev nepraskla) a pak zchladíme v lázni(víko utáhneme, aby se agaróza nevytlila). Poté si připravíme vaničku a nasadíme hřebeny. Agarózu o asi 55°C lijeme do připravené vaničky a necháme ji ztuhnout .

Po skončení PCR programu musíme udělat kontrolu, abychom zjistili, zda se nám podařilo PCR produkt vytvořit. Opět si připravíme mix na jeden vzorek tímto způsobem: 5 µl TBE pufru a 2 µl STOP pufru (barvička modrá), mix vortexujeme a odstředíme na impuls. Poté si připravíme zkumavky a očíslováme, do každé zkumavky pipetujeme 7 µl mixu a přidáme 3 µl příslušného vzorku PCR produktu, pipetou jemně promícháme. Potřebujeme ještě DNA marker. Napipetujeme si 7 µl TBE, přidáme 2 µl STOP pufru (modré barvičky) a pak přimícháme 1 µl DNA markeru DNA 100 bp, pipetou opět jemně promícháme.

Odstraníme hřebeny a vložíme vaničku s agarózou do pufru do elektroforetického přístroje. Do každé jamky pipetujeme 10 µl příslušného vzorku (celý obsah zkumavky) a to tak, že do první jamky dáme DNA marker a pak pokračujeme vzorky. Po napíchní všech vzorků zapneme elektroforézu na 100V a necháme ji asi půl hodiny běžet. Asi po 30

minutách zkontrolujeme zda vzorky agarózou prošly dost daleko, pokud ano, přístroj vypneme, vaničku vyjmeme a uděláme snímek. Kontrolní snímek ukáže, zda se podařilo vytvořit PCR produkt.

4.3. Elektroforéza na komerčním gelu Spreadex

Elektroforéza na komerčním gelu se dělá z PCR produktu, je to metoda kdy stejnosměrný proud prochází pufrům TAE a frakce se na gelu dělí podle velikosti vždy ve směru do „-“ k „+“. Gelů Spreadex existuje několik typů a používají se podle velikosti párů bází a podle následujících kritérií vybíráme gel, který použijeme.

Gel Spreadex	Optimální pásmo
EL 1200	250 – 800 párů bází
EL 800	200 – 500 párů bází
EL 600	150 – 350 párů bází
EL 500	100 – 300 párů bází
EL 400	75 – 250 párů bází
EL 300	50 – 200 párů bází

Při elektroforéze na gelu Spreadex používáme DNA marker M3.

Elchrom Scientific M3 marker na gel Spreadex

M3 marker obsahuje směs DNA fragmentů získaných odděleným trávením pBR322 s třemi restrikčními enzymy: MspI, Hae I, Hae II. V pásmu 75 až 622 párů bází jsou fragmenty následujících délek: 622, 587, 540, 527, 504, 458, 434, 404, 393|348, 337, 332, 309| 270, 267, 259, 242, 238, 234, 217, 213, 206, 201, 192, 190, 190, 184, 180, 174, 160, 160, 153, 152, 151, 147, 147, 141, 132, 131, 124, 123, 123, 110, 109, 104, 103, 100, 93, 90, 89, 83, 80, 76 a 75 párů bází. Tyto tvoří na gelu frakce o charakteristické síle a vzdálenosti elektroforetické migrace, jak je znázorněno na příloze.

DNA koncentrace: 0,4 µg/µl v 50 µl.

Objem 1 µl do EtBr, 0,2 µl do SYBR barvených gelů

Uskladnění do -20 °C

POSTUP

Pro elektroforézu na komerčním gelu Spreadex na mikrosatelit TINAG použijeme gel Spreadex EL 600, pro mikrosatelit SCN 11A použijeme gel Spreadex EL 800 a na mikrosatelit FH 4306 použijeme Spreadex EL 1200.

Jako pufr do elektroforézy použijeme TBE pufr ředěný: 50 ml dodaného elfo pufru v tubě vmíchaného do 1950 ml destilované vody. Po skončení elektroforézy vždy pufr z přístroje vylijeme do válce a ten přikryjeme voskovaným papírem, aby se do pufru nedostaly prachové částice a mikroorganismy ze vzduchu a nevyschl, protože může být použit opakovaně.

Pufr vždy předem nalijeme do elektroforetického přístroje a pokusíme se odstranit bubliny, poté zapneme promíchávání a potom nasadíme vzorky v mixu.

Jako vždy si připravíme mix a to takto: 2 μ l TAE elfo pufru ředěného, 1 μ l loading pufru (barvička fialová dodaná) na jeden vzorek. Mix zvortexujeme a odstředíme na impuls. Připravíme si zkumavky a očíslováme. Do každé zkumavky si napipetujeme 3 μ l premixu a přidáme 2 μ l příslušného vzorku PCR produktu, pipetou jemně promícháme. Připravíme si ještě DNA marker. Smícháme 1 μ l M3 markeru, 1 μ l loading pufru (barvička fialová) a 3 μ l TEA pufru, jemně promícháme pipetou. Vypneme míchání a ponoříme gel do pufru do přístroje. Zajistíme gel plastovým krytem a do každé jamky napícháme 5 μ l vzorku, do první jamky přijde DNA marker a pak pokračujeme vzorky.

Elektroforézu zapneme a necháme ji běžet přes dvě hodiny. Elektroforéza začíná na 100V, hodnota ampér je různá, záleží na tom, jaký použijeme gel, jestli děláme jeden nebo dva či více gelů a podobně. Pokud ampéry nabudou limitní hodnoty 450 Ampér, hodnota voltů se začne snižovat. Nesmíme zapomenout zapnout i míchání, protože pokud ho nezapneme, pufr i gel se bude přehřívat, ampéry velice rychle nabudou limitní hodnoty, gel se zkroutí, zčehne a později rozpadne. Když necháme probíhat elektroforézu méně než dvě hodiny, frakce nebudou tak dobře rozděleny, necháme – li ji probíhat dlouho přes dvě hodiny, pufr se přehřeje a zkroutí gel a následná fotografie pak bude špatně čitelná, pokud se jí vůbec podaří udělat.

Po ukončení elektroforézy vyjmeme gel z pufru, položíme si ho na vhodnou láhev, nejlépe pěti litrovou a odřízneme gel silikonovým nebo kovovým vláknem z plastové podložky. Odříznutý gel opatrně vložíme do vaničky s barvicím roztokem. Barvicí roztok je roztok 4 μ l ethidium bromidu ve 100 ml destilované vody (barvička se dá použít několikrát). Barvičku uchováváme ve tmě v lednici. Gel barvíme 30 – 45 minut ve tmě. Po barvení gel odbarvíme. Barvičku vlijeme zpět do tmavé nádoby a dáme do ledničky, do vaničky na gel nalijeme destilovanou vodu, ihned ji vylijeme a nelijeme na gel čerstvou destilovanou vodu a ve tmě necháme asi deset minut odbarvovat. Po deseti minutách opět vyměníme destilovanou vodu a necháme pět minut odbarvovat. Po pěti minutách vyjmeme gel z destilované vody a opatrně vložíme do fotografického přístroje. Pokud se nám objeví frakce znamená to, že jsme celou dobu pracovali správně a podle toho, jak se dělí DNA marker (viz přílohy) můžeme odečítat jaké alely obsahuje studovaný mikrosatelit.

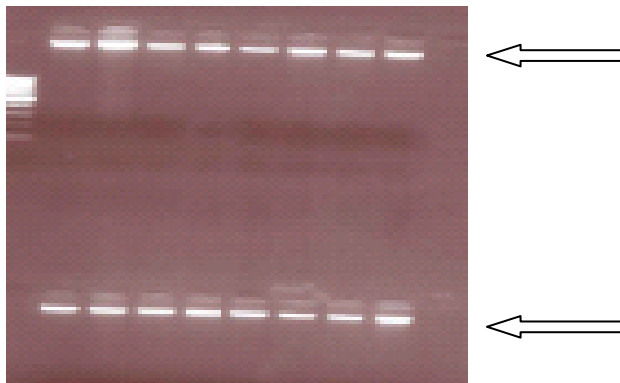
5.VÝSLEDKY A DISKUZE

Obr.2. : Izolovaná DNA - ukázka

Fotografie elektroforézy izolované DNA v gelu 3 % agarózy v pufru TBE, pH 8

Šipka označuje izolovanou DNA.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



9. 10. 11. 12. 13.14. 15. 16.

DM = DNA marker 100 bp

1. – 16. – jedinci, jimž se izolovala DNA

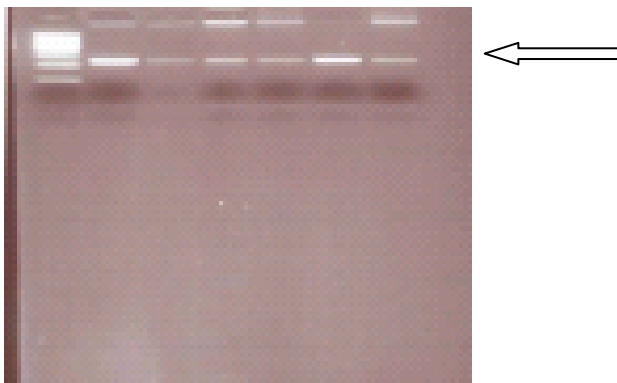
Na fotografii pod UV světlem jsou vidět frakce DNA, což znamená, že se DNA podařilo izolovat a můžeme ji použít k PCR reakci.

Obr. 3. : PCR produkt – ukázka

Fotografie elektroforézy PCR produktu ve 3 % agarózovém gelu v pufru TBE, pH 8.

Šipka označuje frakci PCR produkt. Na startu je zbytek DNA.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6.



DM = DNA marker 100 bp

1. americký stafordšírský teriér - matka
2. americký stafordšírský teriér – testovaný potomek
3. americký stafordšírský teriér – testovaný potomek
4. americký stafordšírský teriér – testovaný potomek
5. americký stafordšírský teriér – testovaný potomek
6. americký stafordšírský teriér - otec

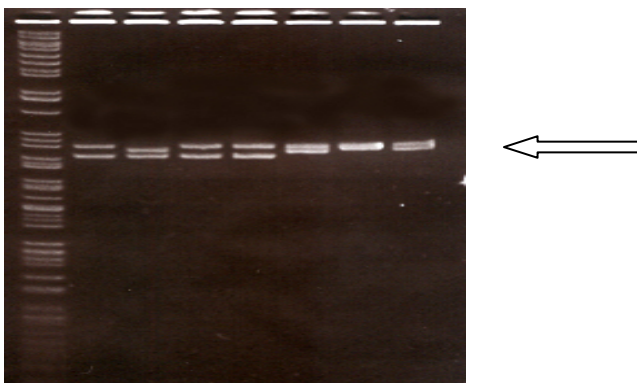
Na fotografii pod UV osvětlením jsou vidět frakce, což znamená, že se podařilo namnožit PCR produkt a může být použit k další části pokusu a to je elektroforéza na komerčním gelu Spreadex v TEA pufru.

Obr. 4. : MIKROSATELIT SCN 11A - 1

Fotografie elektroforézy PCR produktu mikrosatelitu SCN 11A v komerčním gelu Spreadex EL 1200 v pufru TAE, pH 8, pod UV osvětlením.

Šipka označuje mikrosatelitní alely.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.



DM = DNA marker M3

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. Nemo – pražský krysařík | 259/243 - matka |
| 2. Žulinka – pražský krysařík | 251/243 |
| 3. Nelinka – pražský krysařík | 259/243 |
| 4. Nikitka – pražský krysařík | 259/243 |
| 5. Noris – pražský krysařík | 259/251 |
| 6. Noretka – pražský krysařík | 259/251 |
| 7. Kimi – pražský krysařík | 259/251 – otec |

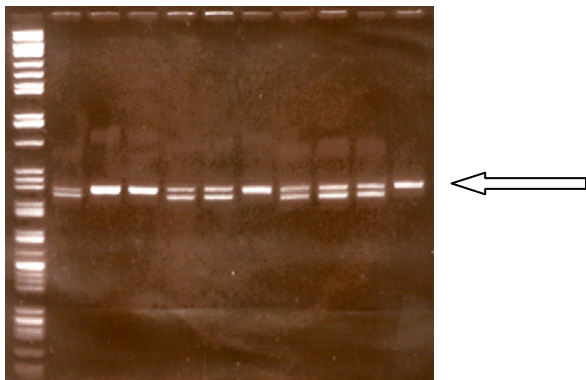
Zde můžeme vidět rodiče a 5 jedinců, jejichž původ podle tohoto mikrosatelitu souhlasí.

Na této fotografii vidíme 7 jedinců a všichni jsou heterozygoti, vyskytují se zde tři alely, alela o 259 párech bází se zde vyskytuje s nejvyšší četností a to šestkrát, alely o 251 a 243 párech bází se obě vyskytly čtyřikrát.

Obr. 5. : MIKROSATELIT SCN 11A - 2

Fotografie elektroforézy PCR produktu mikrosatelitu SCN 11A na komerčního gelu Spreadex EL 1200 v pufru TAE, pH 8, pod UV osvětlením. Šipka označuje mikrosatelitní alely.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.10.



DM = DNA marker M3

1. Kiss- erdelteriér	259/251 - matka
2. Chapie – erdelteriér	259/259
3. Charmer – erdelteriér	259/251
4. Chuck – erdelteriér	259/251
5. Chici – erdelteriér	259/251
6. Chocolate – erdelteriér	259/259
7. Choicy – erdelteriér	259/251
8. Chorine – erdelteriér	259/251
9. Christine – erdelteriér	259/251
10. Hektor – erdelteriér	259/259 - otec

Zde vidíme skupinu erdelteriérů, kde pod číslem jedna je vzorek matky a pod číslem 10 vzorek otce. Všech osm jedinců by podle tohoto mikrosatelitu mohlo být určeno jako potomci těchto rodičů. V tomto příkladě vidíme čtyři homozygoty pouze s jednou alelou o 259 párech bází. Pak zde vidíme 6 heterozygotů s alelami 259 a 251 párů bází. Alela o 259 párech bází je zastoupena 14 krát a šestkrát je zastoupena alela o 251 párech bází.

V tomto testování bylo využito vzorků sedmi pražských krysaříků a deseti erdelteriérů. Výsledky jsou ovlivněny tím, že obě testované skupiny byly vlastně dvě „rodiny“. V „rodině“ erdelteriérů se vyskytly pouze dvě alely a to alela o 259 párech bází a alela o 251 párech bází. V „rodině“ pražských krysaříků se vyskytly tři alely a to ty dvě samé jako u erdelteriérů a navíc alela s 243 páry bází. Celkem se alela o 259 párech bází vyskytla dvacetkrát, alela o 251 párech bází se vyskytla desetkrát, a alela o 243 párech bází se vyskytla pouze čtyřikrát.

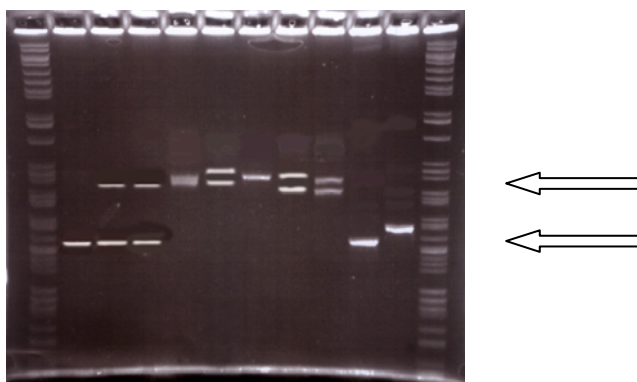
Na internetových stránkách jhered.oxfordjournals.org se uvádí, že mikrosatelit SCN 11A je tvořen opakováním motivu CTAT. Nejdelší alela tohoto mikrosatelitu má deset opakování. Při testování tohoto mikrosatelitu na vhodnost pro ověřování původu jsem objevila tři alely.

Obr. 6.: MIKROSATELIT TINAG

Fotografie elektroforézy PCR produktu na komerčním gelu Spreadex EL 1200 v pufru TAE, pH 8, pod UV osvětlením.

Šipka označuje alely mikrosatelitů.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. DM



DM = DNA marker M3

1. Meggy – americký stafordšírský teriér	198/198
2. Kiss – erdelteriér	198/258
3. Chapie – erdelteriér	198/258
4. 6436 – americký stafordšírský teriér	258/258
5. Pauline – špic	266/258
6. Žulinka – pražský krysařík	262/262
7. Nemo – pražský krysařík	262/246
8. Šery – špic	246/254
9. Ronda – briard	198/198
10. Mary – špic	210/210

Na snímku tohoto gelu s alelami mikrosatelitu TINAG je vidět pět homozygotních genotypů: dvakrát 198, 258, 262, 210 párů bází a pět heterozygotních genotypů: dvakrát 198/258, 266/258, 262/246, 246/254. Celkem se vyskytlo sedm alel. Nejvíce zastoupena je alela se 198 páry bází a to šestkrát, dále pak alela o 258 párech bází a to pětkrát, třikrát byla zastoupena alela o 262 párech bází, dvakrát byly zastoupeny alely s 210 páry bází a s 246 páry bází. Nejméně zastoupeny a to jedenkrát byly alely o 266 párech bází a 254 párech bází.

V tomto testování bylo použito pěti plemen psů, tří špiců, dvou amerických stafordšírských teriérů, dvou pražských krysaříků, dvou erdelteriérů a jeden briard.

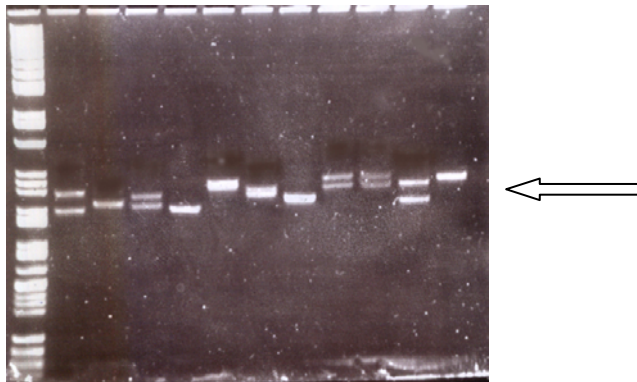
Mikrosatelit TINAG se mi pro ověřování původu u psů zdá vhodnější než mikrosatelit SCN 11A, protože při testování na deseti ne všech vzájemně příbuzných jedincích se vyskytlo celkem sedm alel. Na internetových stránkách: jhered.oxfordjournals.org je uvedeno, že mikrosatelit TINAG jehož opakovacím motivem je CCTT a nejdelší alela tohoto mikrosatelitu má třináct opakování.

Obr. 7. : MIKROSATELIT FH 4306 - 1

Fotografie elektroforézy PCR produktu na komerčním gelu Spreadex EL 1200, v pufru TAE, pH 8, pod UV osvětlením.

Šipka označuje alely mikrosatelitů.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11.



DM = DNA marker

1. PCR č. 12 - border kolie	243/257
2. Faty – slovenský kopov	247/257
3. Kyra – český fousek	245/253
4. Elza – ČF/NKO	243/243
5. ? - erdelteriér	261/269
6. 14003 – jezevčík	255/259
7. 14603 – jezevčík	249/255
8. 2830 – howavard	267/271
9. 3310 – howavard	263/269
10. 3028 - howavard	249/267
11. ? - aljašský malamut	267/267

Na této fotografii vidíme pouze dva homozygotní genotypy a to s alelami 243 párů bází a s alelami 267 párů bází, ostatních devět genotypů je heterozygotních. V heterozygotních genotypech se vyskytují alely: 245 párů bází, 247 párů bází, 249 párů bází, 253 párů bází, 253 párů bází, 255 párů bází, 257 párů bází, 259 párů bází, 261 párů bází, 263 párů bází, 267 párů bází, 269 párů bází a 271 párů bází. Celkem bylo v těchto vzorcích nalezeno 13 alel. Nejvíce se vyskytla alela 267 párů bází a to čtyřikrát, alela 243 párů bází se vyskytla třikrát, alely 249, 255, 257 a 269 párů bází se vyskytly dvakrát, ostatních osm alel se vyskytlo pouze jedenkrát.

V tomto testu bylo použito vzorků tří howavardů, dvou jezevčíků, jednoho českého fouska, jednoho erdelteriéra, jednoho slovenského kopova, jednoho aljašského malamuta

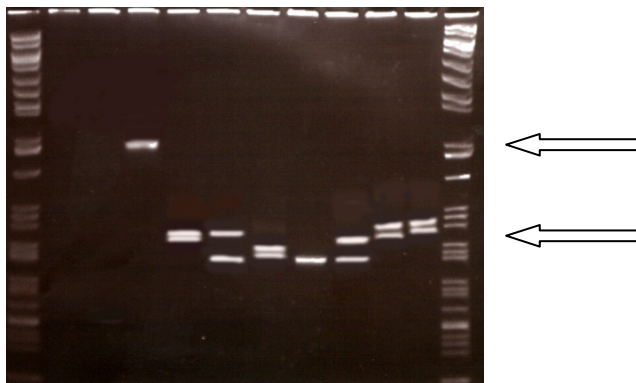
a jednoho potomka českého fouska a německého krátkosrstého ohaře z přilítí krve. Je zajímavé, že zrovna tento jedinec je homozygotního genotypu 243/243 párů bází.

Obr. 8. : MIKROSATELIT FH 4306 - 2

Fotografie elektroforézy PCR produktu na komerčním gelu Spreadex EL 1200, pufr TAE, pH 8, pod UV osvětlením.

Šipky označují mikrosatelitní alely.

DM 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. DM



DM = DNA marker

1. Leticie - čivava

2. Šony - čivava

3. 14003 - jezevčík

4. PCR č. 2 – border kolie 253/257

5. PCR č. 8 – border kolie 239/257

6. PCR č. 10 – border kolie 263/269

7. Elza – ČF/NKO

8. 3028 - howavard

9. 2830 - howavard

10. 3310 - howavard

Ná této fotografii alel mikrosatelitu FH 4306 vidíme pouze osm genotypů, protože vzorky číslo jedna a dvě nevyšly, je to způsobeno nejspíše tím, že izolovaná DNA čivav Letricie a Šonyho byla uchovávána dlouhou dobu v mrazáku. Z této fotografie vzorky číslo 3., 7., 8., 9. a 10 byly použity již v předchozím pokusu, takže k hodnocení jsou pouze vzorky tří border kolií, vzorky číslo 5., 6. a 7.

Všechny tři genotypy jsou heterozygotní a vyskytuje se u nich pět alel. Dvakrát se vyskytla alela o 257 párech bází a ostatní alely o 239, 243, 249 a 253 párech bází se vyskytly pouze jedenkrát.

Tento gel se v pufru při elektorforéze mírně pokroutil, i přesto že elektroforéza trvala při 100 V 2 hodiny 8 minut a hodnota mA nedosáhla ani limitní hodnoty 450 mA a byla vypnuta při 447 mA.

Celkem tedy na mikrosatelit FH 4306 bylo testováno 14 jedinců, tři border kolie, tři howavardi, dva jezevčíci, jeden erdel teriér, jeden slovenský kopov, jeden aljašský malamut, jeden český fousek a jeden kříženec českého fouska a německého krátkosrstého ohaře. Pouze dva jedinci aljašský malamut a kříženec ČF/NKO byli homozygotního genotypu, ostatní jedinci byli heterozygoti. Bylo nalezeno celkem 14 alel, alely o 257 a 267 párech bází se vyskytly čtyřikrát, alely o 269 a o 243 párech bází se vyskytly třikrát, dvakrát se vyskytly alely o 249, 253, 255 a 263 párech bází a alely s 239, 245, 247, 259, 261 a 271 páry bází se vyskytly jeden krát.

Nejvhodnější k ověřování původu u psů z těchto tří mikrosatelitů: SCN 11A se třemi alelami, TINAG se sedmi alelami a FH 4306 se čtrnácti alelami považují mikrosateliti FH 4306 právě proto, že má čtrnáct alel a jeho stupeň polymorfizmu je nejvyšší.

Heike Dölz (2005) také studovala následující mikrosatelity a jejich polymorfizmus u plemene německý ostnosrstý ohař (Deutsch Stichelhaar). Popsala následující počty alel:

<u>Mikrosatelit</u>	<u>Počet alel:</u>	<u>Mikrosatelit</u>	<u>Počet alel</u>
VIA SD10	4	FH 2159	6
FH 2441	4	PEZ 19	4
FH 2140	7	FH 2613	7
PEZ 6	5	FH 2670	7
FH 2537	4	FH 2294	5
FH 3725	3		

Při studiu původu u německých ostnosrstých ohařů bohužel nebyl použit mikrosatelit FH 4306, který jsem testovala já a nemohu tedy porovnat výsledky, ale bylo využito osmi jiných mikrosatelitů ze skupiny FH. Z tabulky vyplývá, že nejmenšího polymorfizmu dosahuje mikrosatelit FH 3725 se třemi alelami, nejvyššího polymorfizmu dosahují mikrosatelity FH 2140, FH 2613, FH 2670 se sedmi alelami.

Jelikož německý ostnosrstý ohař je plemeno příbuzné českému fousku a německému drátosrstému ohaři a také patří do skupiny ohařů, domnívám se, že u všech těchto tří plemen by byl tento soubor mikrosatelitů, zejména ty s větším počtem alel, velice dobře využitelné k ověřování původu u celé skupiny ohařů.

Vzhledem k tomu, že metoda analýzy mikrosatelitů je stejná, liší se jen použitím primerů a malou modifikací metody PCR, lze popsanou metodu použít při analýze dalších více jak 150 000 známých mikrosatelitů.

Variabilita jednotlivých systému mikrosatelitů dovoluje odhadnout rovněž fylogenetické vzdálenosti nejen jednotlivých plemen psů, ale všech představitelů řádu Canidae, potažmo všech savců až po člověka.

6. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

Metoda izolace DNA byla zvládnuta, metoda namnožení potřebního úseku DNA pomocí PCR cykleru byla zvládnuta, metoda kontrolní elektroforézy na 1 – 3 % roztoku agarózy v pufru TBE byla zvládnuta a metoda elektroforézy na komerčním gelu Spreadex a v pufru TAE byla také zvládnuta. Všechny tyto metody byly využity pro testování vhodnosti mikrosatelitů pro ověřování původu u psů.

Vzhledem k tomu, že dnes je známo přes 150 000 mikrosatelitů a domnívám se, že nejsou známy ještě všechny, je složité říct, které mikrosatelity jsou pro ověřování původu nejvhodnější a které nejsou vhodné a pro která plemena, to bude stát ještě mnoho práce a mnoho zkoumání, ale v současné době můžeme říct, že čím více má mikrosatelitů alel, čím větší je jeho polymorfismus, tím vhodnější je pro využití k ověřování původu u psů potažmo i jiných savců.

Mikrosatelity jsou kromě ověřování původu využívány k mnoha jiným účelům, například identifikace zvířat, identifikace lidí pro forenzní a kriminalistické účely, pro studium variability populace nejen psů, ale i hospodářských zvířat a dalších savců, studium příbuznosti plemen a fylogenetického původu druhů zvířat, mapování chromozomů a v neposlední řadě se mikrosatelity, které jsou ve vazbě s geny ovlivňující některé choroby využívají právě pro detekci těchto chorob. Genetická analýza dokáže určit jedince, kteří jsou zdraví, jedince, kteří jsou nositelem dané choroby a dokáže v některých případech odhalit nemocné jedince ještě před klinickým propuknutím nemoci. Takovým příkladem mikrosatelitu je i mikrosatelit FH 4306, který jsem testovala na vhodnost pro ověřování původu u psů, který je ve vazbě s genem pro chorobu CEA (colic eye anomaly), která se značně vyskytuje u kolie a plemen, kde kolie byla nějakým způsobem použita při šlechtění.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bailer a kolektiv, 2002, cituje www.woodrow.org
- Binns a kolektiv, 1995, cituje Ruvinsky A. a Sampson J. v *The Genetics of the dogs*
- Cummings a Zoghbi, 2000, cituje www.woodrow.org
- Dölz H., 2005, Diplomarbeit: Inzucht und genetische Variabilität innerhalb der Hunderasse Deutsch – Stichelhaar – Eine molekulargenetische Analyse mittels DNA – Mikrosatellitenmarker, Friedrich – Schiller – Universität Jena, Biologisch – Pharmazeutische – Fakultät mit Phyletischem Museum
- Dostál J., 2006, *Genom psa je přečten – co dál? Svět psů*, s.
- Dostál J., 1995, *Chov psů – genetika v kynologické praxi*, Dona, s. 206, ISBN:80-85463-58-X
- Dostál J., 2005, *Genetika a šlechtění plemen psů*, Dona, s. 261, ISBN:978 – 80-7322-104-1
- Figurea a kolektiv, 1995, cituje www.woodrow.org
- Francisco a kolektiv, 1996, cituje Ruvinsky A. a Sampson J. v *The Genetics of the dogs*
- Fredholm a Wintero, 1995, Pinkanen a kolektiv, 1996, Zajc a kolektiv, 1997, cituje Ruvinsky A. a Sampson J. v *The Genetics of the dogs*
- Goldstein a Schlotterer, 1999, cituje www.woodrow.org
- Goodman, Simon J., 1998, cituje: www.woodrow.org.
- Hartl K., Šebková N., 2007, *Kynologie*, Česká zemědělská universita v Praze, 130 s. ISBN:978-80-213-1617-1
- Hruban V. Majzlík I., 2007, *Obecná genetika*, Česká zemědělská universita v Praze, s. 316, ISBN:978-80-213-0600-4
- Jarne a Logoda, 1996, cituje www.woodrow.org
- Kashi a Soller, 1999., cituje www.woodrow.org
- Martínek B. J., *Pointer, Plot*, 2000, 185 s., ISBN:80-902603-5-7
- Moxon a Wills, 1999 cituje www.woodrow.org
- Ostrander E. A. a Kruglyak L., *Unlashing the Canine Genome*, 2004., *Genome Research* (www.genome.org) s.1271- 1274
- Ostrander E. A., Giger U., Lindblad – Toh K., *The dog and its genome*, CSHL press, 2006, s. 567, ISBN:087969742-3
- Parker H.G., Kim L.V., Sutter N.B., Carlson S., Lorentzen T. D., Malek T. B., Johnson G. S., DeFrance H. B., Ostrander E. A., Kruglyak L., *Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog*, 2004, *Science* (www.sciencemag.org)

Procházka Z., 2005, Chov psů, Paseka, s 320, ISBN:80-7185-768-8
Risch, 2000, cituje www.woodrow.org
Ruvinsky A., Sampson J., 2001, The Genetics of the dogs, CABI publishing, , 564 s., ISBN:0-85-199-5209
Similary, Kashi s Soller, 1999 cituje www.woodrow.org
Wailly de P., Psí abeceda, Práh, 2005, 213 s., ISBN:
Yonekura a kolektiv; 2002, cituje www.woodrow.org
Zajc a kolektiv, 1994, cituje Ruvinsky A. a Sampson J. in The Genetics of the dogs

<<http://www.elchrom.com>> , 6. 4.2009

<<http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/content/full/96/7/843/TBL1>>, 23.1. 2006

<<http://www.vetmed.ucdavis.edu/PHR/LyonsDen/CompGenDogmicro.htm>>, 1.8. 2007

<<http://www.woodrow.org/teachers/2002/Biology/Projects/p3>>, 7.7. 2008

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- AE pufr** – komerčně vyráběná látka, výrobce: QIAGEN, Bio-Consult, s.r.o. Czech Republic
- AL pufr** - komerčně vyráběná látka, výrobce: QIAGEN, Bio-Consult, s.r.o. Czech Republic
- AW1 pufr** - komerčně vyráběná látka, výrobce: QIAGEN, Bio-Consult, s.r.o. Czech Republic
- AW2 pufr** - komerčně vyráběná látka, výrobce: QIAGEN, Bio-Consult, s.r.o. Czech Republic
- ČF** – plemeno psa český fousek
- DMSO** - komerčně vyráběná látka, výrobce: FERMENTAS, Německo
- DNA** – kyselina deoxyribonukleová, nositelka genetické informace
- DNA marker 100bp** - komerčně vyráběná látka, výrobce: FERMENTAS, Německo
- DNA M3 marker** - komerčně vyráběná látka, výrobce: SCIENTIFIC ELCHROM, Švýcarsko
- EDTA** – Ethylenediaminetetraacetic acid, komerčně vyráběná látka, výrobce: SERVA, Německo
- Kb** – kilobite, jednotka množství informace
- La polymeráza** - komerčně vyráběná látka, výrobce: dodává - TOP BIO, Praha
- La pufr** - komerčně vyráběná látka, výrobce: FERMENTAS, Německo
- NKO** – plemeno psa německý krátkosrstý ohař
- PBS voda** - komerčně vyráběná látka, výrobce: dodává - Top Bio, Praha
- PCR** – Polymerasa chain reaction, polymerázová řetězová reakce, metoda namnožení potřebného úseku DNA
- Primer F** – Forward primer, komerčně vyráběná látka, výrobce:
- Primer R** – Reverse primer, komerčně vyráběná látka, výrobce:
- QIAGEN** - komerčně vyráběná látka, výrobce: dodává Bio-Consult, Czech Republic
- STOP pufr** - komerčně vyráběná látka, výrobce: FERMENTAS, Německo
- TEA pufr** – Trisacetate EDTA, komerčně vyráběná látka, výrobce: - dodává Bio Tech. Praha, SCIENTIFIC ELCHROM, Švýcarsko
- TBE pufr** – Tris – borát EDTA, komerčně vyráběná látka, výrobce: Bio tech. a.s. Praha

9. PŘÍLOHY

Příloha 1.: Dělení M3 (a M1) markeru pro gel Spreadex

M3 marker	M1 marker
— 622	— 622
— 587	
— 540	
— 527	— 527
— 504	
— 458	
— 434	
— 404	— 404
— 393	
— 348	
— 337	
— 332	
— 309	— 309
— 270	
— 267	
— 259	
— 242	— 242
— 238	— 238
— 234	
— 217	— 217
— 213	
— 206	
— 201	— 201
— 192	
— 190, 190	— 190, 190
— 184	
— 180	— 180
— 174	
— 160, 160	— 160, 160
— 153	
— 152, 151	
— 147, 147	— 147, 147
— 141	
— 132	
— 131	
— 124	
— 123, 123	— 123, 123
— 110	— 110
— 109	
— 104	
— 103	
— 100	
— 93	
— 90	— 90
— 89	
— 83	
— 80	
— 76	— 76
— 75	

Zdroj: www.elchrom.com

Příloha 2.: Rozpětí bází pro výběr vhodného typu gelu Spreadex

