

Genetyka ogólna

wykład dla studentów II roku biotechnologii

Andrzej Wierzbicki

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii

andw@ibb.waw.pl

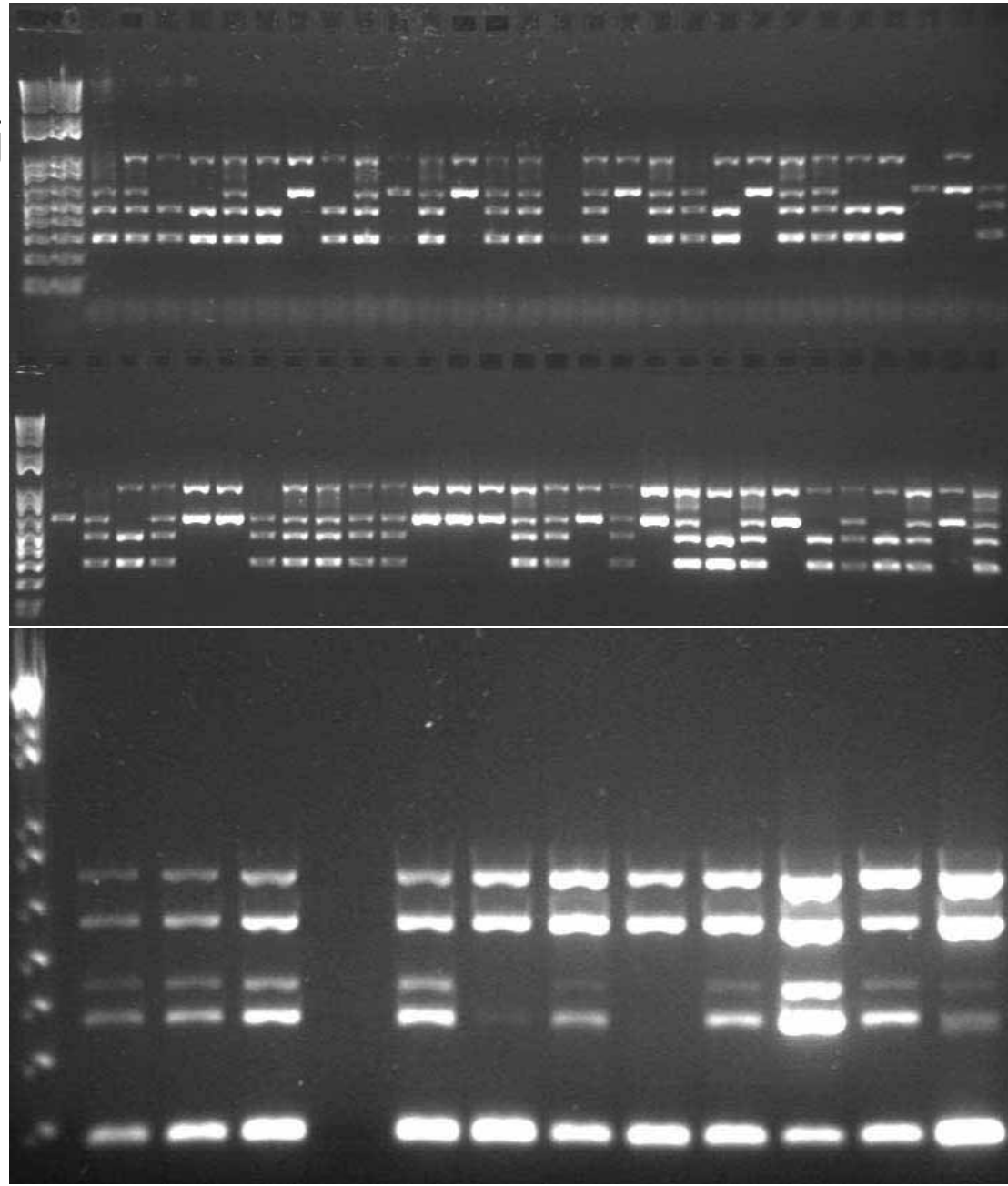
<http://arete.ibb.waw.pl/private/genetyka/>

Metody genetyki molekularnej

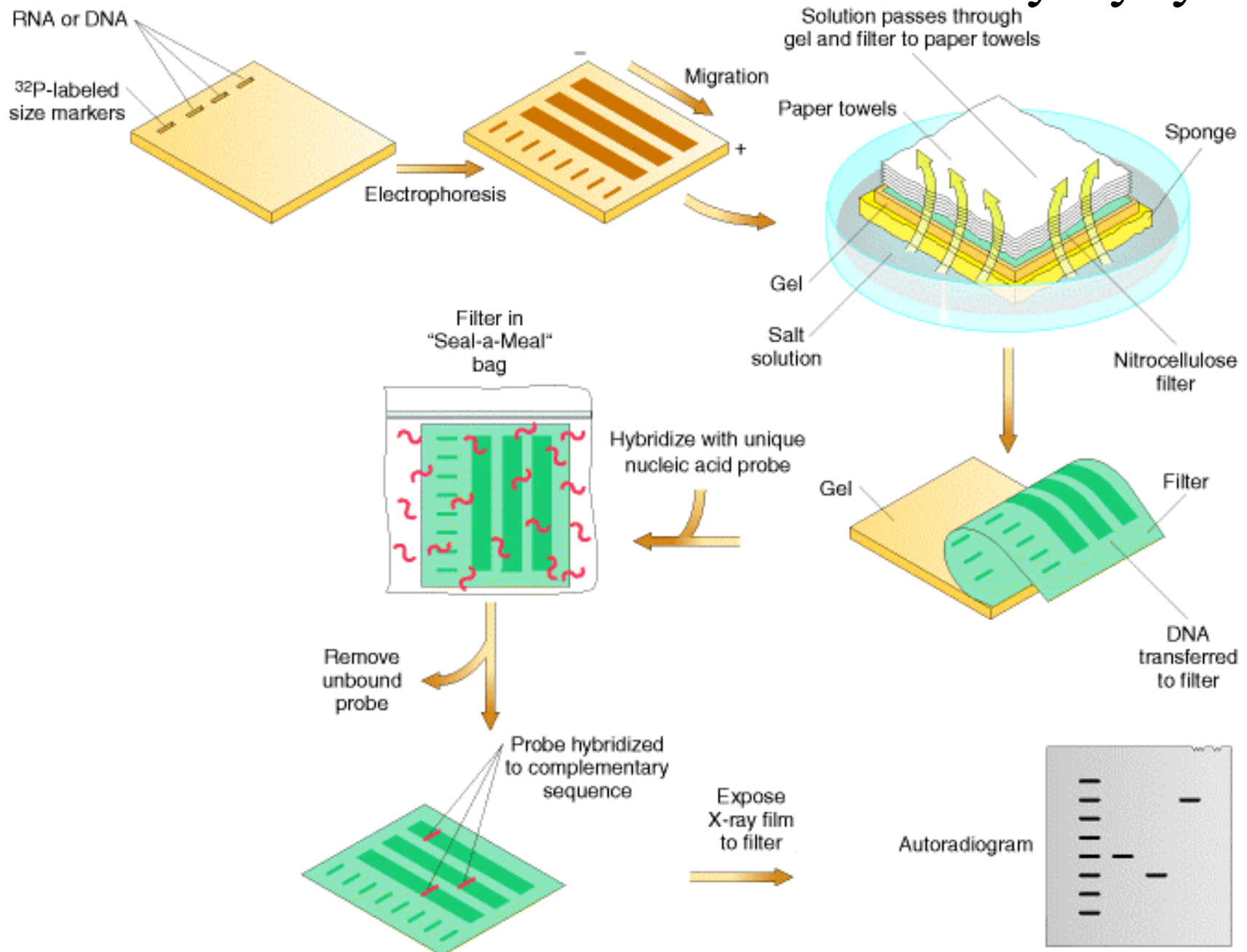
1. Trawienie restrykcyjne i ligacja pozwalają na uzyskiwanie sztucznych cząsteczek DNA
2. PCR pozwala amplifikować dowolne cząsteczki DNA

Zastosowania PCR

- klonowanie genów o znanej sekwencji
- klonowanie genów o sekwencji możliwej do odgadnięcia
- sprawdzanie obecności jakiejś sekwencji
- analiza ilościowa



Hybrydyzacja



Ustalanie liczby kopii transgenu

- trawienie enzymem tnącym w obrębie transgenu
- następne miejsce trawienia już poza transgenem
- miejsce integracji losowe - odległość od drugiego miejsca restrykcyjnego też losowa
- liczba prążków świadczy o liczbie kopii transgenu

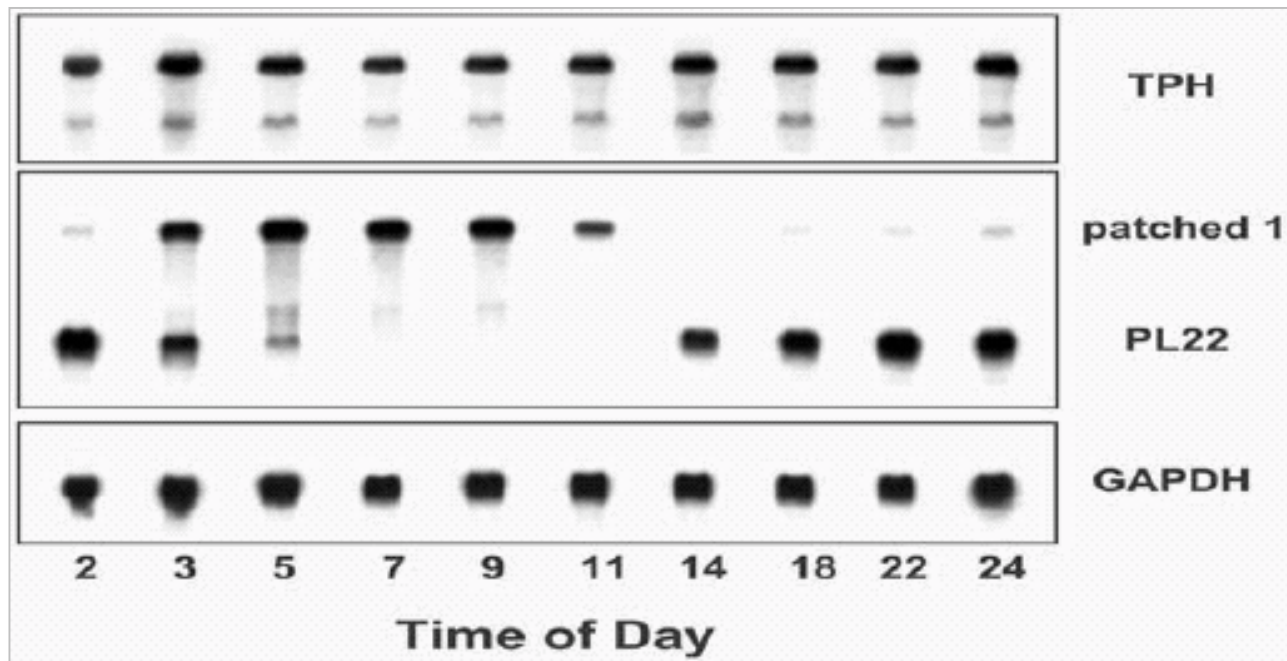
wykrywanie rearanżacji w genomie

- trawienie enzymem tnącym jeden raz w obrębie badanej sekwencji - wykrycie transpozycji transpozonu
- trawienie enzymem tnącym wiele razy obrębie badanej sekwencji - wykrycie zmiany w budowie sekwencji

Hybrydyzacja northern

Zastosowania

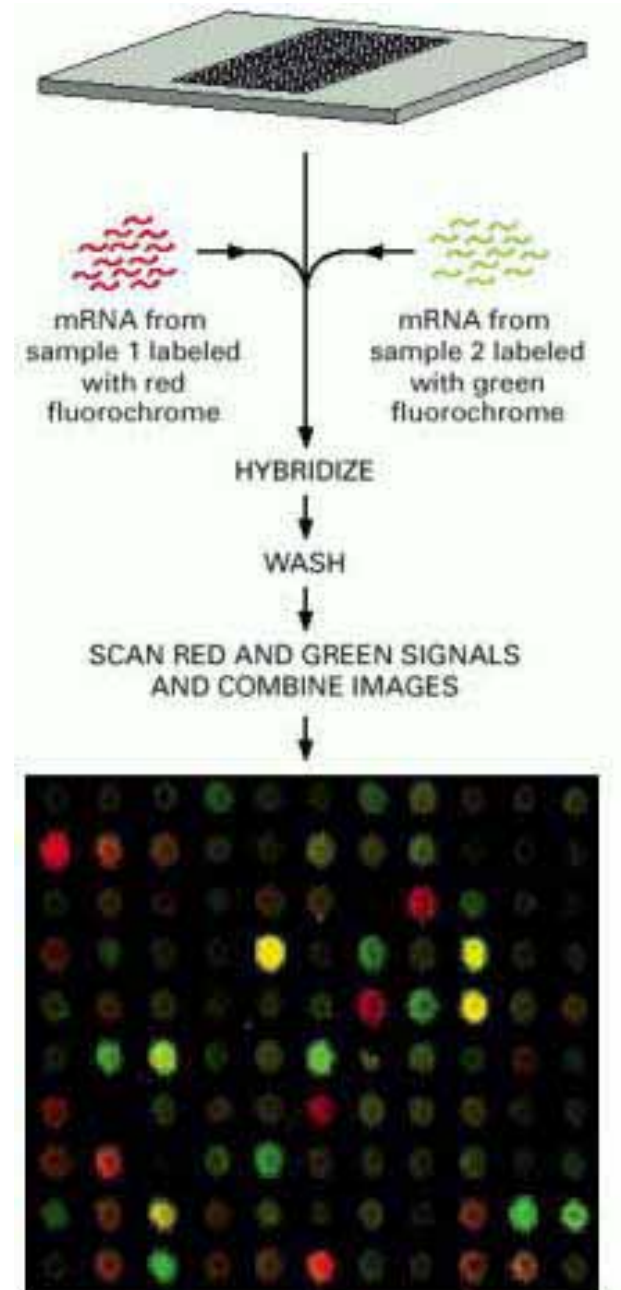
- ustalenie wielkości RNA - wykrywanie splicingu
- ustalenie ilości RNA - badanie poziomu ekspresji



Mikromacierze DNA

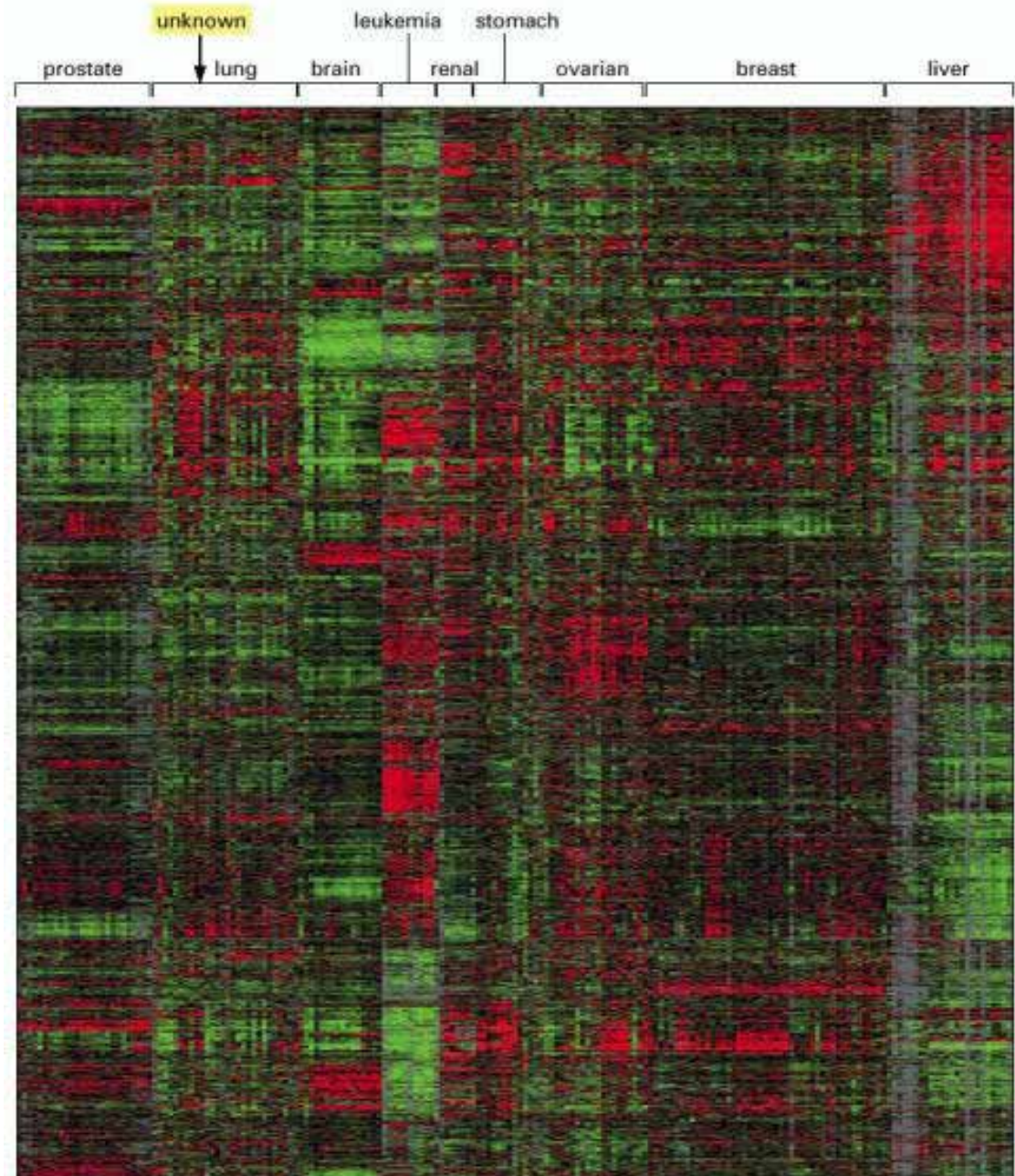
Mikromacierze DNA pozwalają na zbadanie poziomu ekspresji wszystkich genów w jednym eksperymencie

- płytka z naniesionymi DNA
- hybrydyzacja z wyznakowanym badanym RNA



Interpretacja wyników

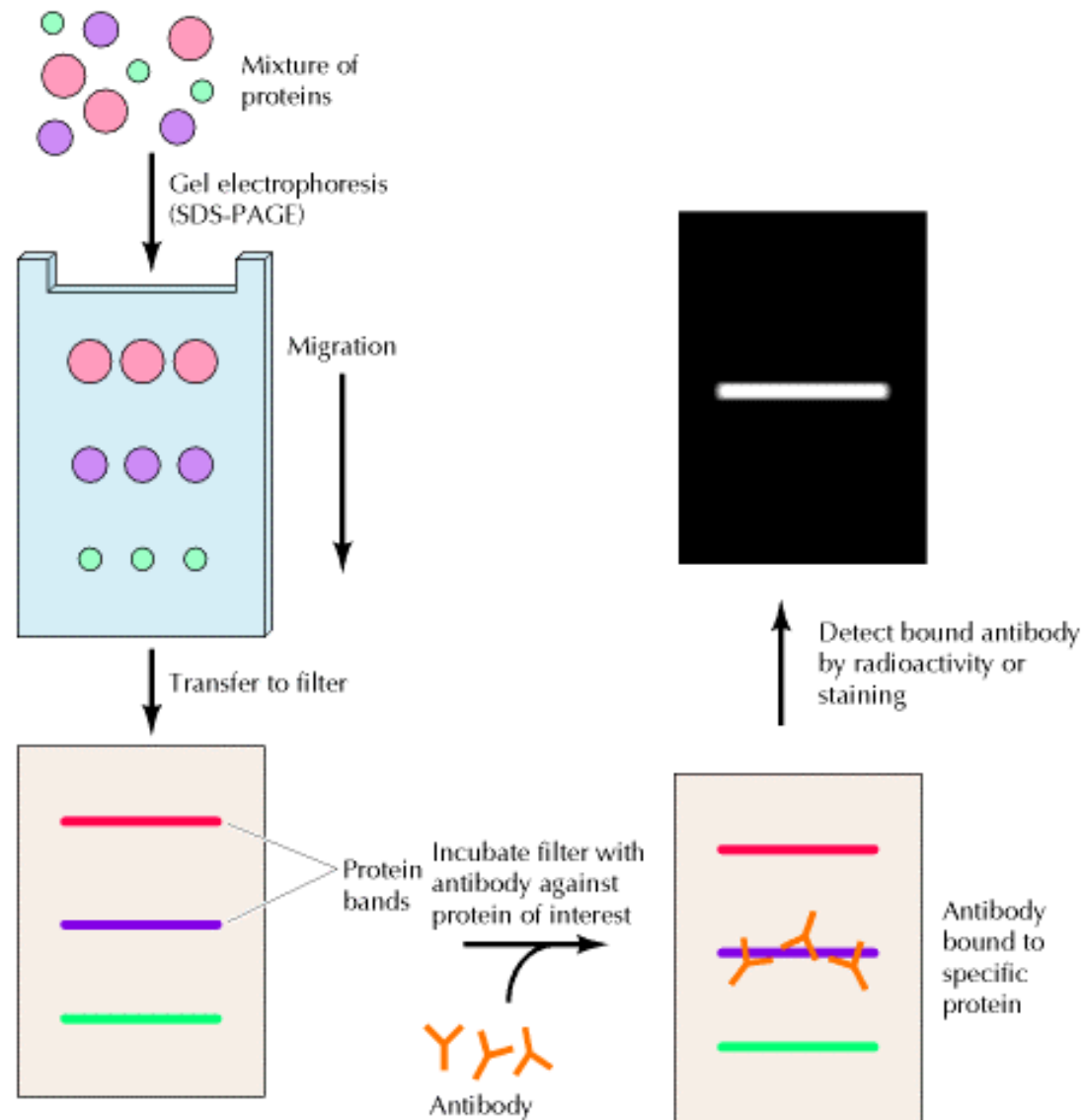
- analiza statystyczna
- wybór pojedynczych genów do dalszej analizy
- szukanie podobieństw między wzorami ekspresji



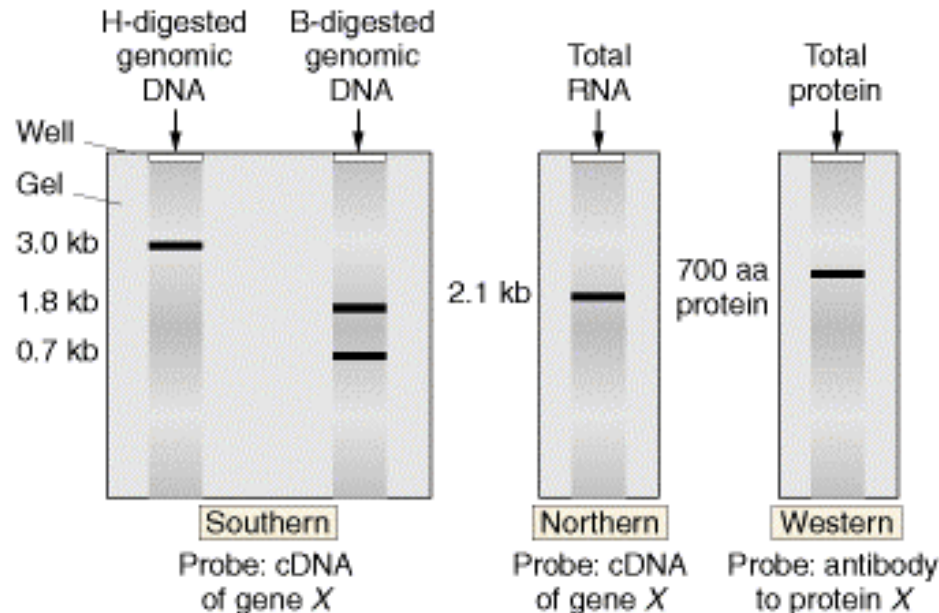
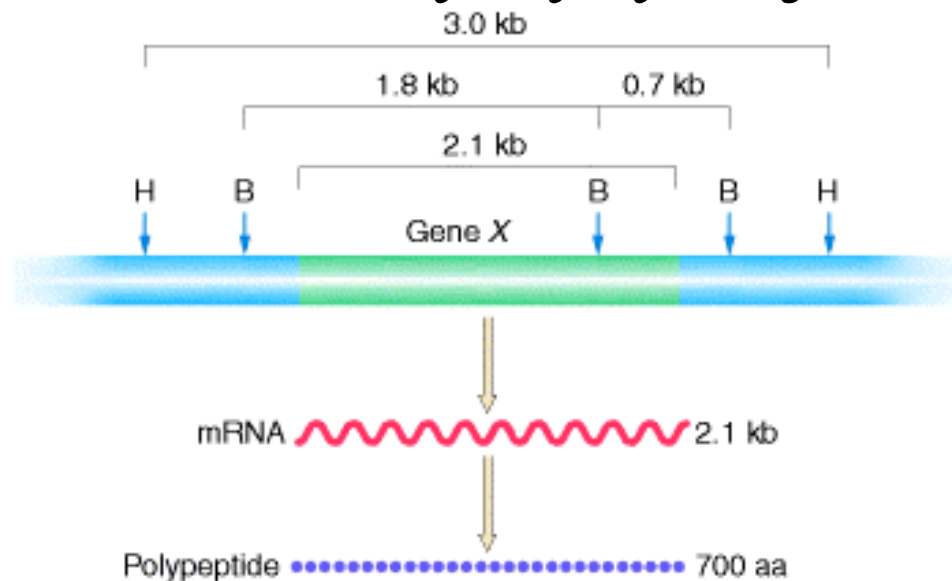
Immunodetekcja białek

Western

- rozdziół białek w żelu
- detekcja przy użyciu specyficznych przeciwciał



Porównanie hybrydyzacji i immunodetekcji



1. Hybrydyzacja i immunodetekcja służą do specyficznego wykrywania kwasów nukleinowych i białek

Genetyka stosowana

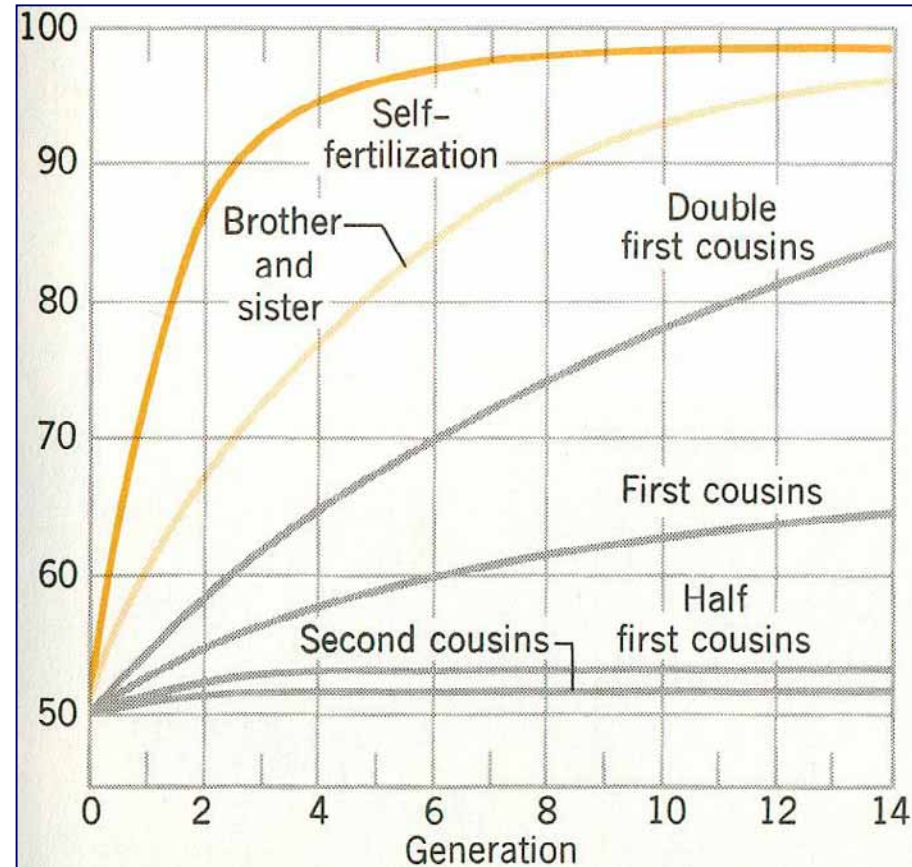
- Genetyka hodowli
- Organizmy modyfikowane genetycznie
 - uzyskiwanie
 - wykorzystanie
 - bezpieczeństwo

Dwa podejścia do problemu hodowli doskonałych zwierząt hodowlanych i roślin uprawnych

- hodowla czystych linii
- uzyskiwanie mieszańców

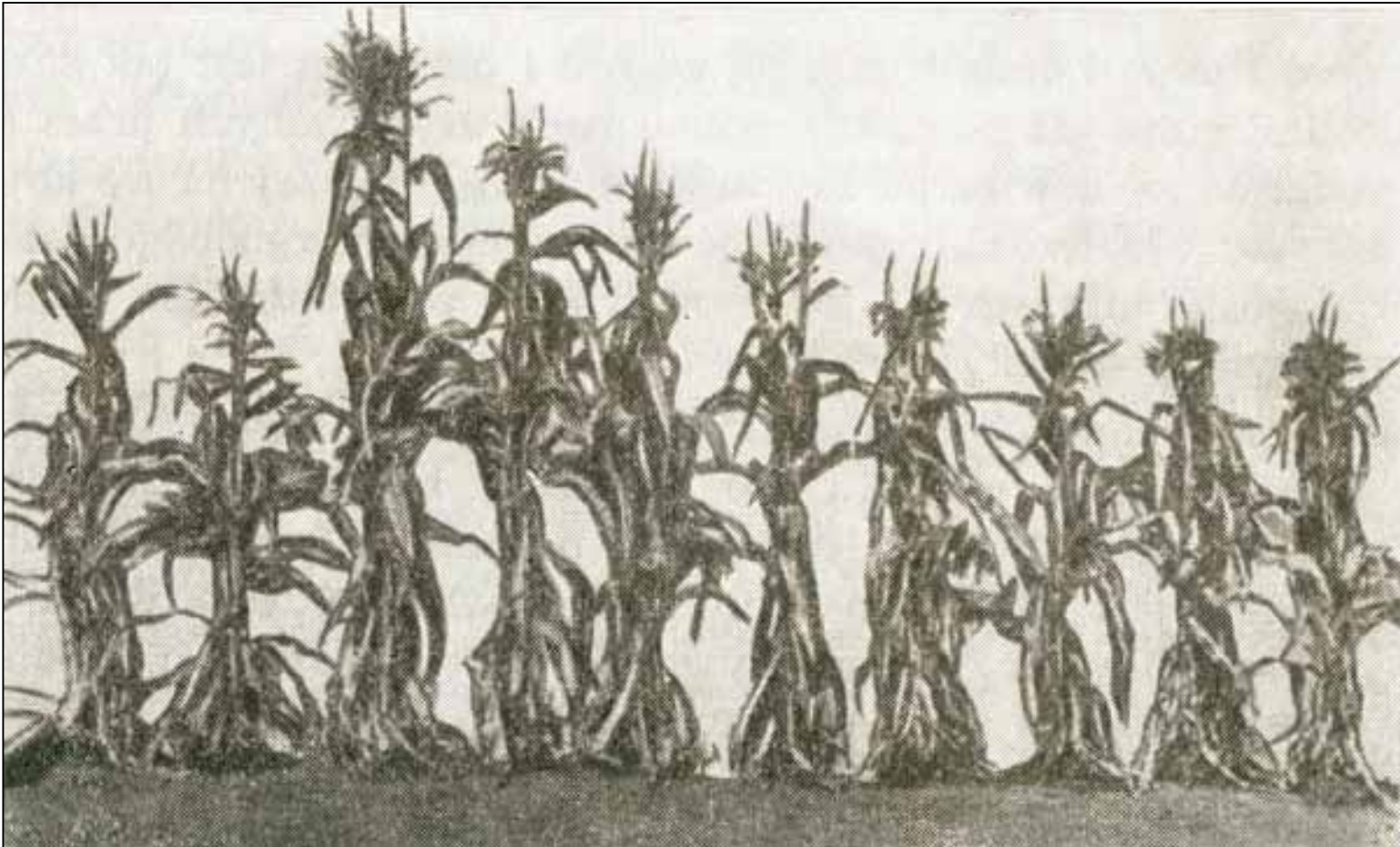
Hodowla czystych linii

- wybór organizmów o najkorzystniejszych cechach
- długotrwała selekcja wsobna
- prowadzi do pełnej homozygotyczności i jednocześnie homogenności linii



Heterozja - wybujałość mieszańców

- krzyżówka dwóch odmian lub ras często ma zwiększony wigor
- po dalszym krzyżowaniu wigor się zmniejsza



Organizmy modyfikowane genetycznie

Co to są OMG?

- organizmy zmodyfikowane przez celową i nieprzypadkową interwencję w materiał genetyczny

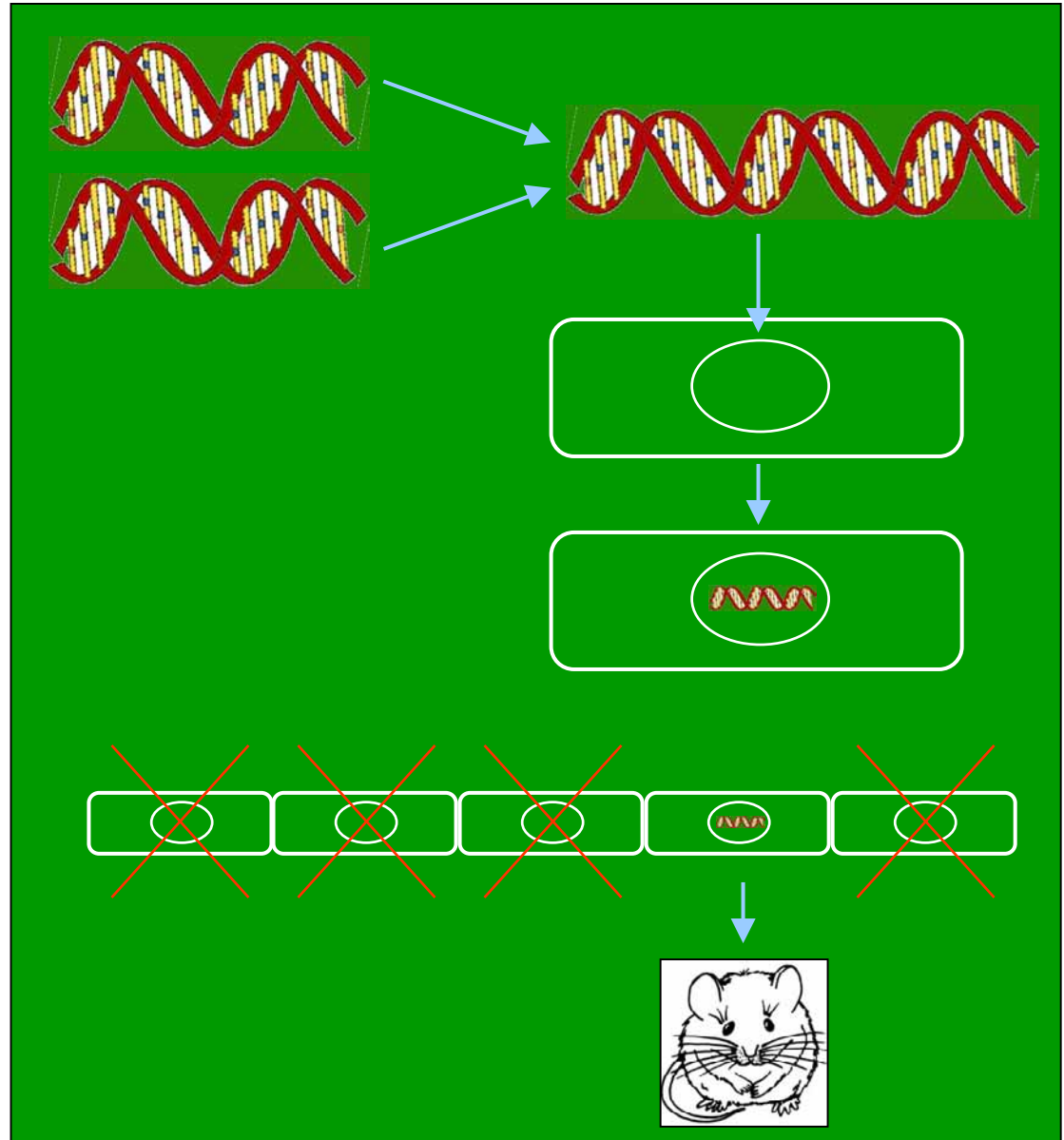
Co nie jest OMG?

- organizmy uzyskane w drodze hodowli
- poliploidy
- mutanty

Uzyskiwanie OMG

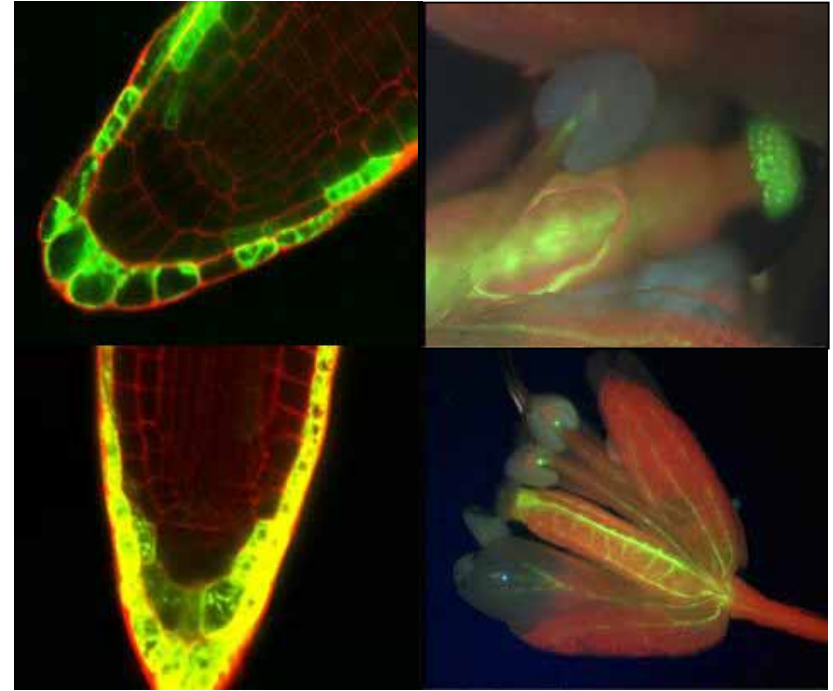
Etapy uzyskiwania OMG

- przygotowanie DNA
- wprowadzenie DNA
- integracja do genomu
- selekcja transformantów
- odtworzenie organizmu



Przygotowanie DNA

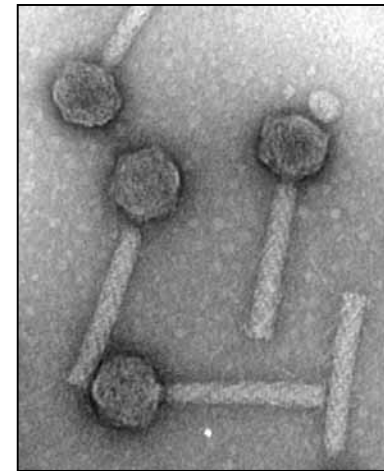
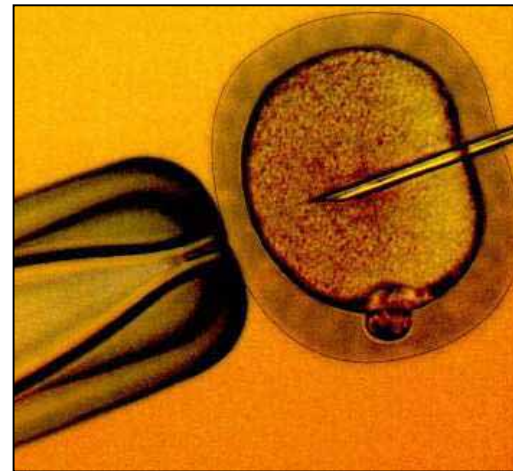
- sekwencje, które chcemy wstawić
 - sekwencja kodująca
 - promotor
- sekwencje pomocnicze
 - sekwencje plazmidu
 - sekwencje pomagające przy wprowadzaniu DNA
 - sekwencje pomagające przy integracji DNA
 - sekwencje niezbędne do selekcji transformantów



promotory tkankowo specyficzne

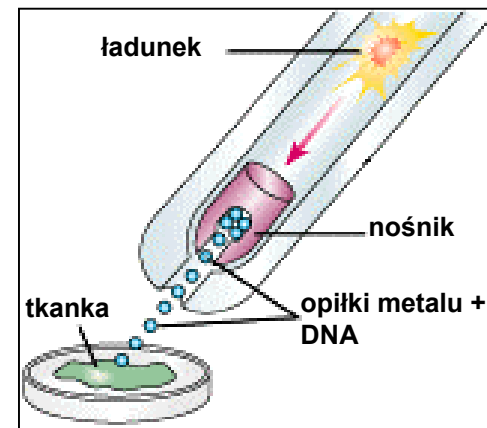
Wprowadzenie DNA

- metody bezpośrednie
 - elektroporacja
 - mikroiniekcja
 - strzelba genowa
- metody pośrednie
 - wirusy
 - Agrobacterium



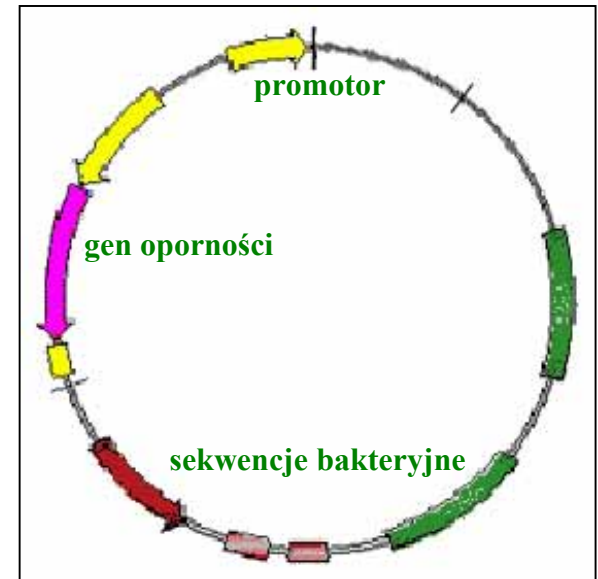
komórki
+ DNA

elektrody



Agrobacterium tumefaciens

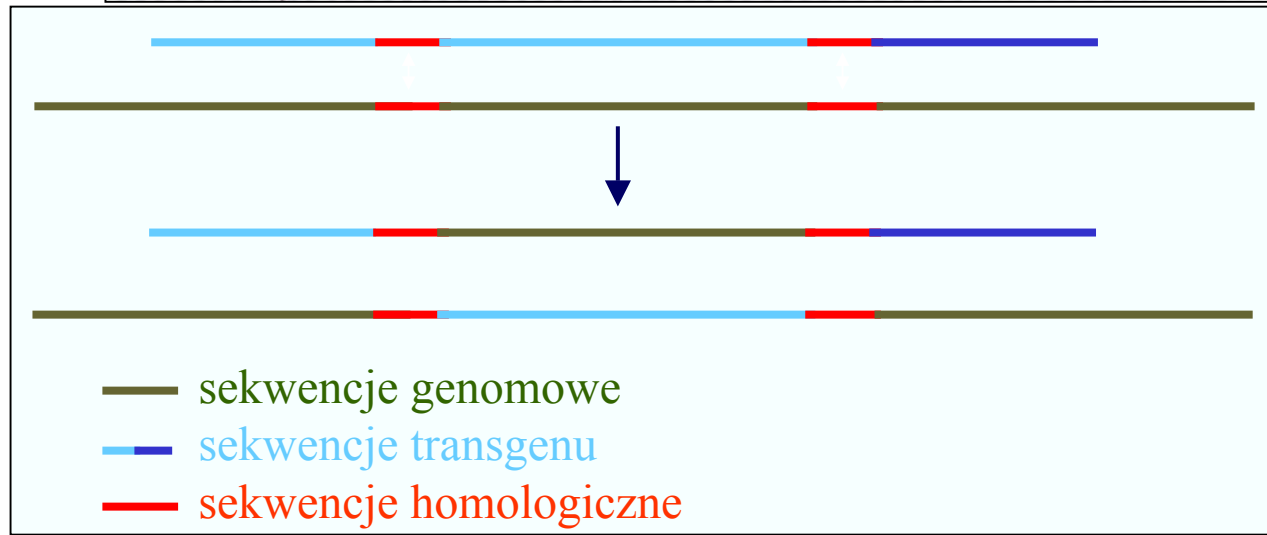
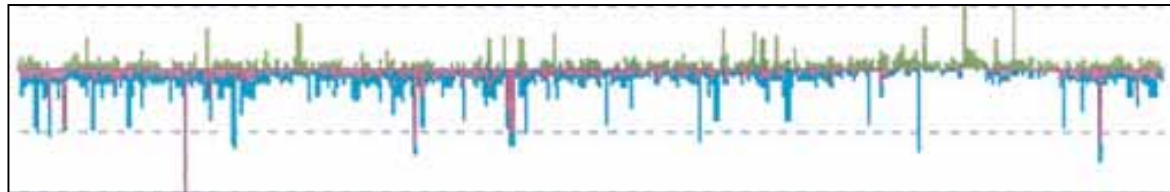
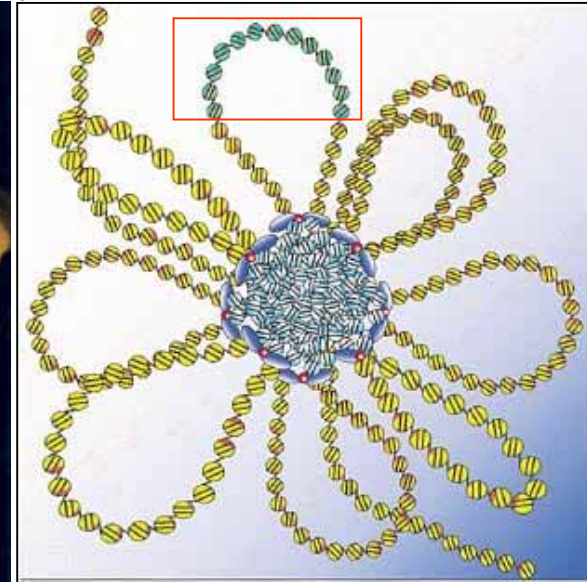
- bakteria zdolna do wprowadzania genów do komórek roślinnych
- naturalnie wprowadza geny biosyntzy aminokwasów i hormonów
- po przerobieniu może wprowadzać geny wybrane przez człowieka



Uzyskiwanie OMG

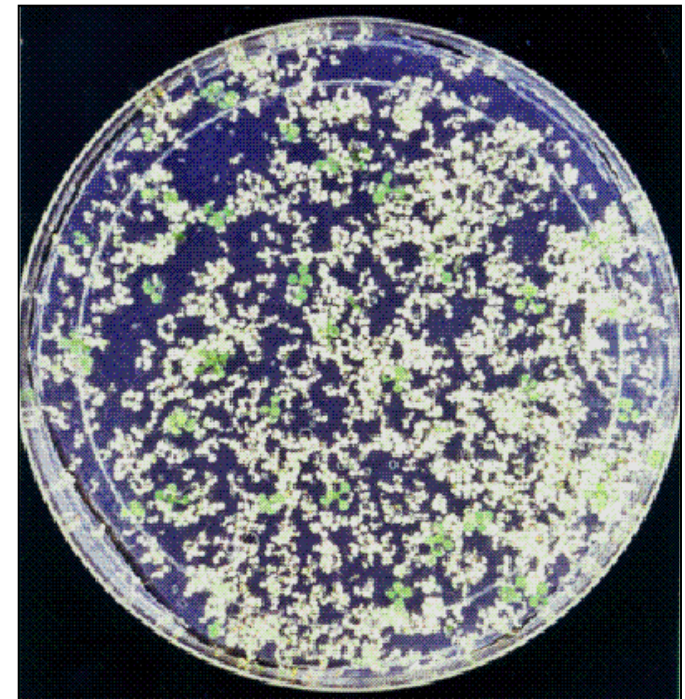
Integracja do genomu

- ekspresja przejściowa
- integracja losowa
- rekombinacja homologiczna



Selekcja transformantów

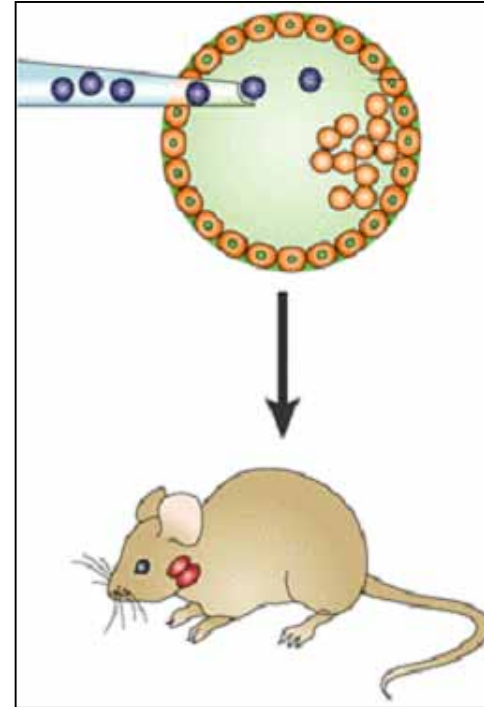
- wydajność transformacji jest mocno ograniczona
- wprowadzenie genu oporności na antybiotyki



Uzyskiwanie OMG

Odtworzenie organizmu z pojedynczej komórki

- rośliny - regeneracja lub embriogeneza somatyczna
- zwierzęta - klonowanie

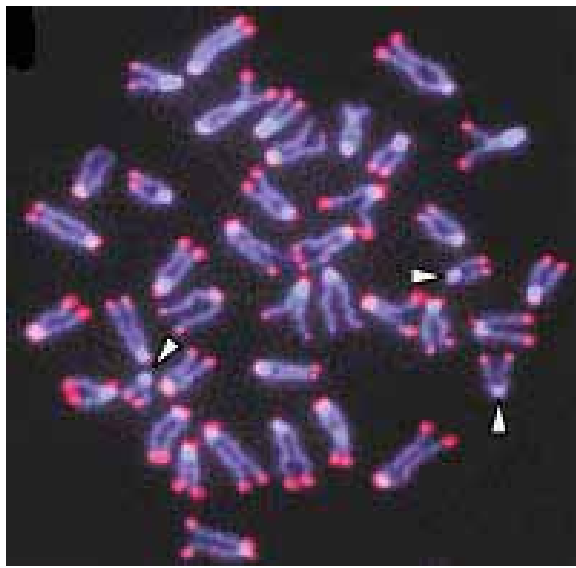
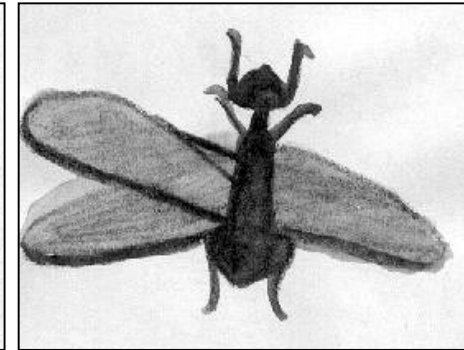
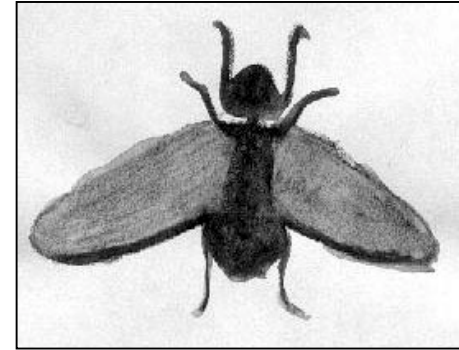


Przykłady zastosowań OMG

- ustalanie funkcji genów
- produkcja cennych białek
- zwiększanie wydajności w rolnictwie
- oczyszczanie środowiska

Ustalanie funkcji genów

- manipulacje genami i obserwowanie skutków
- usunąć i patrzeć co będzie
- dodać i patrzeć co będzie



normalny poziom
cykliny D



nadmiar
cykliny D

Cyklina D reguluje intensywność podziałów komórkowych

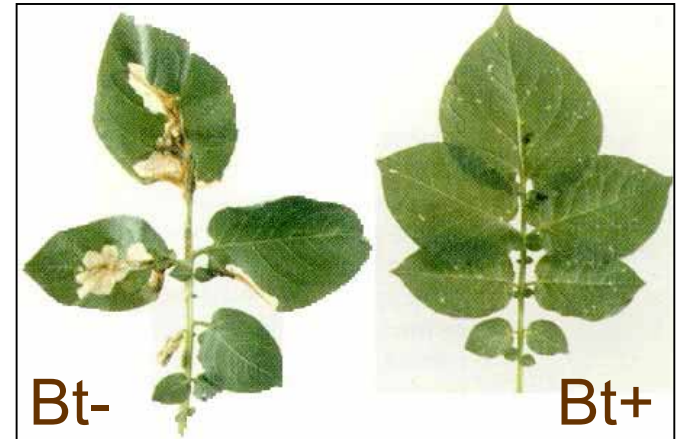
Produkcja cennych białek

białko	gatunek	uwagi
hormon wzrostu	tytoń	<i>w chloroplastach</i>
lipaza trzustkowa	tytoń	
kolagen	tytoń	
szczepionka na WZW B	ziemniaki, tytoń	
szczepionka na cholerę	ziemniak	
przeciwciała α - <i>Streptococcus mutans</i>	tytoń	<i>przeciw próchnicy</i>
polimery	rzodkiewnik, tytoń	
różne enzymy	rzepak i in.	
α -glukozydaza	królik	
antytrombina III	koza	

Zwiększanie wydajności w rolnictwie

- uodpornienie na szkodniki
- uodpornienie na herbicydy
- poprawa składu

ryba ze zwiększoną
produkcją hormonu
wzrostu



Oczyszczanie środowiska

- redukcja rtęci z gleby
- rozkładanie substancji wybuchowych w glebie

formy występowania rtęci:

- związki organiczne bardzo toksyczne
- jony toksyczne
- forma metaliczna mało toksyczne

tulipanowiec
zdolność do redukowania
 Hg^{2+} do metalicznej rtęci



rzodkiewnik zdolny do
rozkładania organicznych
związków rtęci



Zagrożenia związane z OMG

- toksyczność dla człowieka
- niekontrolowane rozprzestrzenianie się w środowisku
- transfer genów do innych gatunków



pszenica *Triticum aestivum*



Triticum turgidum

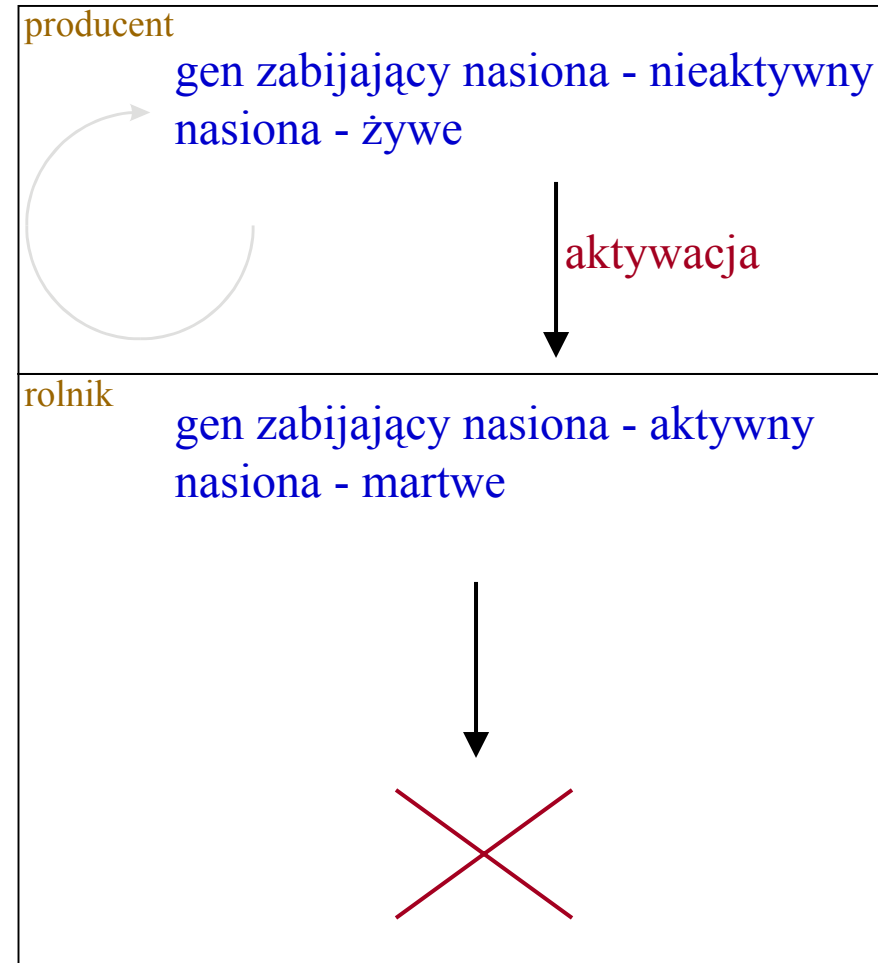


Aegilops speltoides

Zagrożenia związane z OMG

Zwiększanie bezpieczeństwa OMG

- zachowanie szczególnej ostrożności
- zapobieganie tworzeniu transgenicznego pyłku
- nie tworzenie nasion



1. Hodowla pozwala na uzyskiwanie doskonałych odmian i ras.
2. Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwala na genetyczne modyfikacje organizmów.

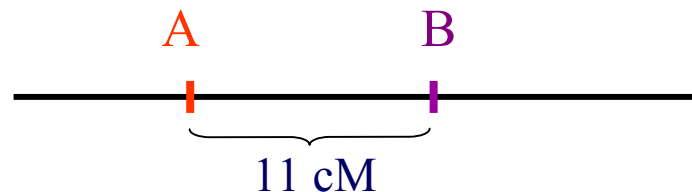
1. Genetyka mendlowska,
2. Chromosomowa teoria dziedziczności,
3. Struktura DNA,
4. Kod genetyczny i białka,
5. Transkrypcja i translacja,
6. Genomy,
7. Regulacja ekspresji genów,
8. Replikacja i mutageneza,
9. Genetyczne podłoże ważnych procesów,
10. Ewolucja,
11. Techniki genetyki molekularnej,
12. Genetyka stosowana

Co to jest odległość między genami i jak ją wyznaczyć na podstawie wyniku krzyżówki testowej?

- odległość to częstość rekombinacji

	$\frac{A\ B}{A\ B}$	X	$\frac{a\ b}{a\ b}$	
		↓		
krzyżówka testowa	$\frac{A\ B}{a\ b}$	X	$\frac{a\ b}{a\ b}$	
		↓		
	$\frac{A\ B}{a\ b}$	$\frac{a\ b}{a\ b}$	$\frac{A\ b}{a\ b}$	$\frac{a\ B}{a\ b}$
oczekiwane	25%	25%	25%	25%
obserwowane	47%	42%	5%	6%
gamety F1	$\frac{A\ B}{a\ b}$	$\frac{a\ b}{a\ b}$	$\frac{A\ b}{a\ b}$	$\frac{a\ B}{a\ b}$
	rodzicielskie		rekombinanty	
	89%		11%	

A - czerwone oczy
 a - fioletowe oczy
 B - normalne skrzydła
 b - krótkie skrzydła



odległość między genem fioletowych oczu a genem krótkich skrzydeł wynosi 11 cM

Skrzyżowano pochodzącego z hodowli wsobnej królika o długich uszach i długim ogonie z królikiem o krótkich uszach i krótkim ogonie. Zakładamy, że obie cechy determinowane są przez pojedyncze geny leżące na tym samym chromosomie w odległości 20 centymorganów, geny determinujące te cechy nie wykazują oddziaływań genetycznych oraz, że krótkie uszy i krótki ogon determinowane są przez allele recesywne.

Jakie fenotypy wystąpią w pokoleniach F1 i F2 oraz jakie będą ich proporcje?

U – długie uszy

u – krótkie uszy

O – długi ogon

o – krótki ogon

P: $UO / UO \times uo / uo$

F1: UO / uo

F2: -?

gamety:

$UO \ 80\%/2 = 40\%$

$uo \ 80\%/2 = 40\%$

$Uo \ 20\%/2 = 10\%$

$uO \ 20\%/2 = 10\%$

Powtórzenie

		gamety ojcowskie				
F2		UO	uo	Uo	uO	
		0,4	0,4	0,1	0,1	
gamety matczyne	UO 0,4	UUOO 0,16	UuOo 0,16	UUOo 0,04	UuOO 0,04	<i>U – długie uszy</i> <i>u – krótkie uszy</i> <i>O – długi ogon</i> <i>o – krótki ogon</i>
	uo 0,4	UuOo 0,16	uuoo 0,16	Uuoo 0,04	uuOo 0,04	
	Uo 0,1	UUOo 0,04	Uuoo 0,04	Uuoo 0,01	UuOo 0,01	
	uO 0,1	UuOO 0,04	uuOo 0,04	UuOo 0,01	uuOO 0,01	

długie uszy, długi ogon 66%

krótkie uszy, krótki ogon 16%

długie uszy, krótki ogon 9%

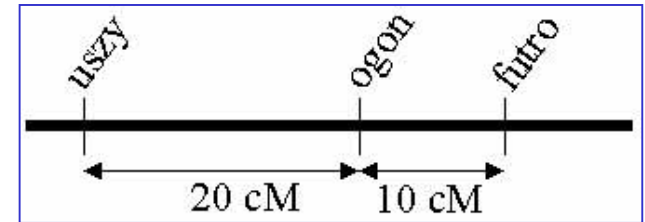
krótkie uszy, długi ogon 9%

Powtórzenie

Okazało się, że króliki różnią się jeszcze jedną cechą, kolorem sierści na łapach. Te o długich uszach i długim ogonie mają ciemne łapy, te o krótkich uszach i krótkim ogonie mają białe łapy. W F1 wszystkie króliki mają ciemne łapy. Odległości między genami determinującymi trzy badane cechy przedstawione są na mapie genetycznej.

Jakie fenotypy wystąpią w pokoleniu F2 oraz jakie będą ich proporcje?

U – długie uszy O – długi ogon Ł – ciemne łapy
u – krótkie uszy o – krótki ogon ł – jasne łapy



gamety:

<i>uszy</i>	<i>ogon</i>	<i>łapy</i>		
<i>długie</i>	<i>długi</i>	<i>ciemne</i>	<i>rodzicielski</i>	$= (1 - 0,18 - 0,08 - 0,02) / 2 = 0,36$
<i>krótkie</i>	<i>krótki</i>	<i>jasne</i>	<i>rodzicielski</i>	$= (1 - 0,18 - 0,08 - 0,02) / 2 = 0,36$
<i>długie</i>	<i>krótki</i>	<i>jasne</i>	<i>rekobinant U-O</i>	$= 0,2 / 2 - 0,01 = 0,09$
<i>krótkie</i>	<i>długi</i>	<i>ciemne</i>	<i>rekobinant U-O</i>	$= 0,2 / 2 - 0,01 = 0,09$
<i>długie</i>	<i>długi</i>	<i>jasne</i>	<i>rekobinant O-Ł</i>	$= 0,1 / 2 - 0,01 = 0,04$
<i>krótkie</i>	<i>krótki</i>	<i>ciemne</i>	<i>rekobinant O-Ł</i>	$= 0,1 / 2 - 0,01 = 0,04$
<i>długie</i>	<i>krótki</i>	<i>ciemne</i>	<i>rekombinant U-O-Ł</i>	$= 0,2 * 0,1 / 2 = 0,01$
<i>krótkie</i>	<i>długi</i>	<i>jasne</i>	<i>rekombinant U-O-Ł</i>	$= 0,2 * 0,1 / 2 = 0,01$

F2

			rodzicielskie		rekombinanty U-O		rekombinanty O-Ł		rekombinanty U-O-Ł	
			UOŁ	uoł	uOŁ	Uoł	UOł	uoŁ	UoŁ	uOł
			0,36	0,36	0,09	0,09	0,04	0,04	0,01	0,01
rodzicielskie	UOŁ	0,36	0,1296	0,1296	0,0324	0,0324	0,0144	0,0144	0,0036	0,0036
	uoł	0,36	0,1296	0,1296	0,0324	0,0324	0,0144	0,0144	0,0036	0,0036
rekombinanty U-O	uOŁ	0,09	0,0324	0,0324	0,0081	0,0081	0,0036	0,0036	0,0009	0,0009
	Uoł	0,09	0,0324	0,0324	0,0081	0,0081	0,0036	0,0036	0,0009	0,0009
rekombinanty O-Ł	UOł	0,04	0,0144	0,0144	0,0036	0,0036	0,0016	0,0016	0,0004	0,0004
	uoŁ	0,04	0,0144	0,0144	0,0036	0,0036	0,0016	0,0016	0,0004	0,0004
rekombinanty U-O-Ł	UoŁ	0,01	0,0036	0,0036	0,0009	0,0009	0,0004	0,0004	0,0001	0,0001
	uOł	0,01	0,0036	0,0036	0,0009	0,0009	0,0004	0,0004	0,0001	0,0001

fenotyp:

długi ogon, długie uszy, ciemne łapy

(częstość 0,6198)

			rodzicielskie		rekombinanty U-O		rekombinanty O-Ł		rekombinanty U-O-Ł	
			UOŁ	uoł	uOŁ	Uoł	UOł	uoŁ	UoŁ	uOł
			0,36	0,36	0,09	0,09	0,04	0,04	0,01	0,01
rodzicielskie	UOŁ	0,36	0,1296	0,1296	0,0324	0,0324	0,0144	0,0144	0,0036	0,0036
	uoł	0,36	0,1296							
rekombinanty U-O	uOŁ	0,09	0,0324			0,0081	0,0036		0,0009	
	Uoł	0,09	0,0324		0,0081					
rekombinanty O-Ł	UOł	0,04	0,0144		0,0036			0,0016	0,0004	
	uoŁ	0,04	0,0144				0,0016			
rekombinanty U-O-Ł	UoŁ	0,01	0,0036		0,0009		0,0004			0,0001
	uOł	0,01	0,0036						0,0001	

Analiza statystyczna wyników krzyżówek

- hipoteza zerowa: wynik nie odbiega od założonego rozkładu
- wyliczenie współczynnika χ^2 (chi-kwadrat)
- odczytanie prawdopodobieństwa z tabel - prawdopodobieństwo, że wynik odbiega od oczekiwanego rozkładu przez przypadek

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{wart.obserwowane} - \text{wart.oczekiwane})^2}{\text{wart.oczekiwane}}$$

d.f \ P	0,05	0,001
1	3,8	10,3
2	6,0	13,8
3	7,8	16,2

tabela prawdopodobieństwa

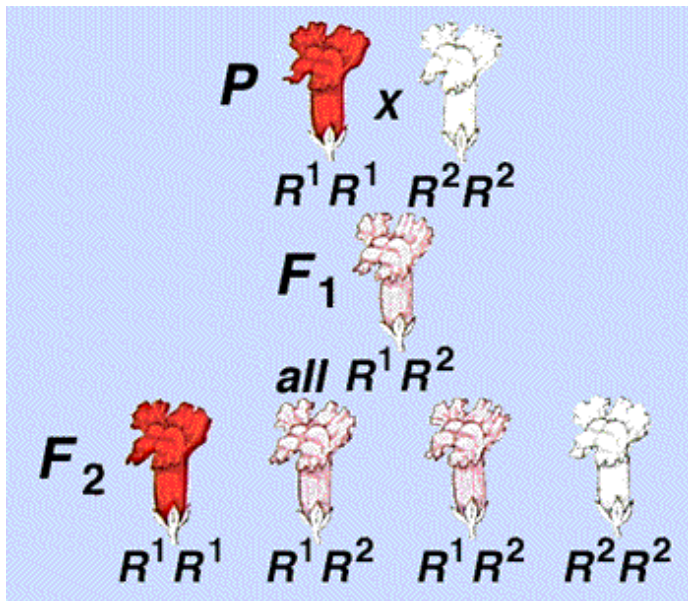
	w.obs.	rozkład	w.ocz.	
żółty groszek	6022	3	6017	0,0042
zielony groszek	2001	1	2006	0,013
			suma:	0,017 -> $P \geq 0,05$ wynik nie odbiega

	w.obs.	rozkład	w.ocz.	
żółty groszek	4552	3	6017	356
zielony groszek	3471	1	2006	1069
			suma:	1425 -> $P \leq 0,001$ wynik odbiega

Jaka jest różnica między niepełną dominacją a addytywnością?

niepełna dominacja

addytywność



1 : 2 : 1

AAbb X **aaBB**

gamety ojcowskie

		AB	Ab	aB	ab
F2 gamety matczyne	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

A_B_	ciemnobrązowe	9
A_bb	jasnobrązowe	3
aaB_	szare	3
aabb	zielone (bezbarwne)	1

Czy odporność na malarię wynika ze szczególnych właściwości sierpowatych erytrocytów i czy to nadal jest pleiotropia?

•2 x tak

Anemia sierpowata

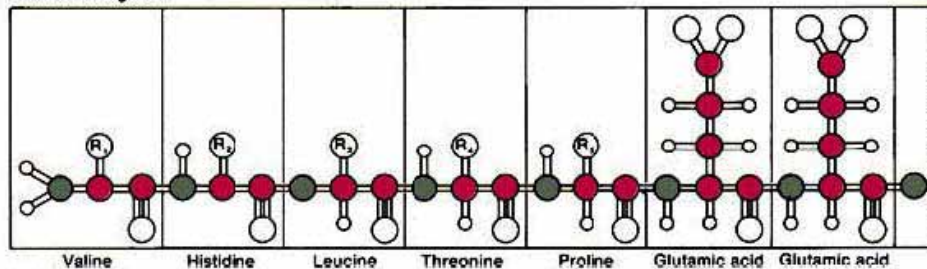
A - hemoglobina normalna
S - hemoglobina uszkodzona

	AA	AS	SS	
hemoglobina	normalna	normalna i uszkodzona	uszkodzona	kodominacja
erytrocyty	normalne	normalne	uszkodzone	A dominujący S recesywny
e. wysoko	normalne	uszkodzone	anemia	niepełna dominacja
malaria	podatny	odporny	odporny	S dominujący A recesywny

Co mutacja zmienia w białku kodowanym przez zmutowany gen?

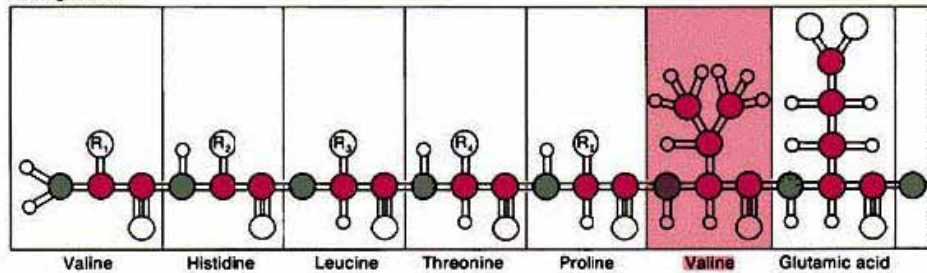
- sekwencję aminokwasową

Normal hemoglobin

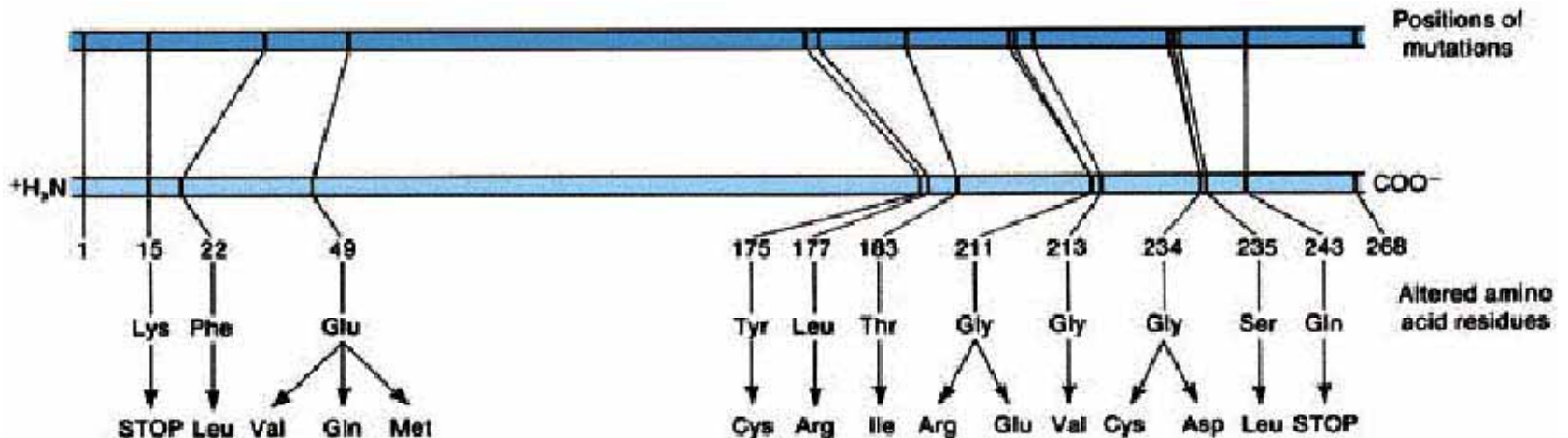


Hemoglobin A:
aa 6 - glu

Hemoglobin S



Hemoglobin S:
aa 6 - val



Sekwencjonowanie genomów

Metoda shotgun

- losowa fragmentacja DNA
- wybór fragmentów o odpowiedniej wielkości
- wstawianie do wektora
- sekwencjonowanie
- składanie sekwencji w komputerze

