



Молекулярные методы исследования ДНК растений, базирующиеся на фрагментном (анонимном) полиморфизме ДНК: RFLP, RAPD, AFLP, ISSR, микросателлиты, SCoT и другие....

Николай Фризен

Ботанический Сад Университета Оснабрюк, Германия

friesen@biologie.uni-osnabrueck.de

Маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, позволяющие анализировать организм на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования.

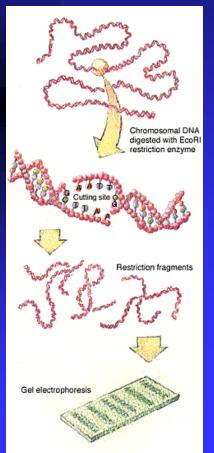
Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом.

Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о *кодоминантном* типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о *доминантном* наследовании

RFLP PCR

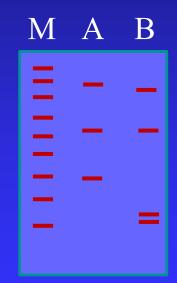
Restrictions Fragment Length Polymorphism Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Это способ исследования ДНК, путем разрезания аплифицированных фрагментов с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гельэлектрофореза (ДНК электрофореза).



Часто использовался для анализа хлоропластной ДНК



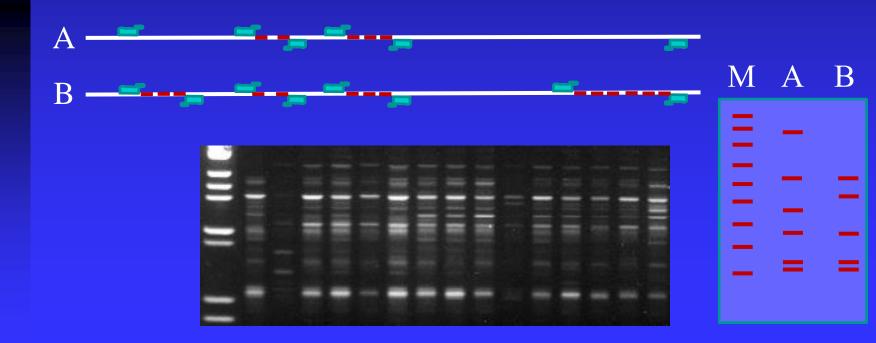




Метод: **RAPD** - Random Amplified Polymorphic DNA Случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (Williams et al, 1990).

RAPD анализ включает в себя проведение полимеразной цепной реакции с использованием одного декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью.

Продукты RAPD анализа образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированного инвертированной последовательностью данного праймера.



Плюсы и минусы RAPD Метода: Доминантный маркер

- + Сравнительно быстрый и дещевый метод
- Высокая чувствительность к изменениям условий реакций сравнивать можно только фрагменты амплификации из одной ПЦР реакции ограниченное количество образцов в каждом анализе

Для повышения достоверности необходимо использование большого количества ПЦР реакций с различтыми праймерами

RAPD анализ может служить своеобразным экспресс - методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп,

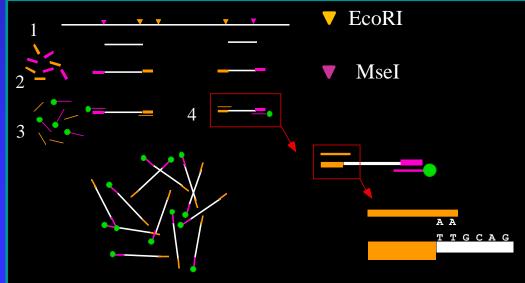
Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания генетического разнообразия микроорганизмов, высших растений, беспозвоночных и позвоночных животных.

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP маркеры — маркеры полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК (Vos et al., 1995).

- 1 Геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI) с образованием фрагментов с выступающими 3' концами.
- 2 Рестрицированная геномная ДНК легируется с адаптером, содержащим «липкие» концы для данных рестрикционных сайтов.

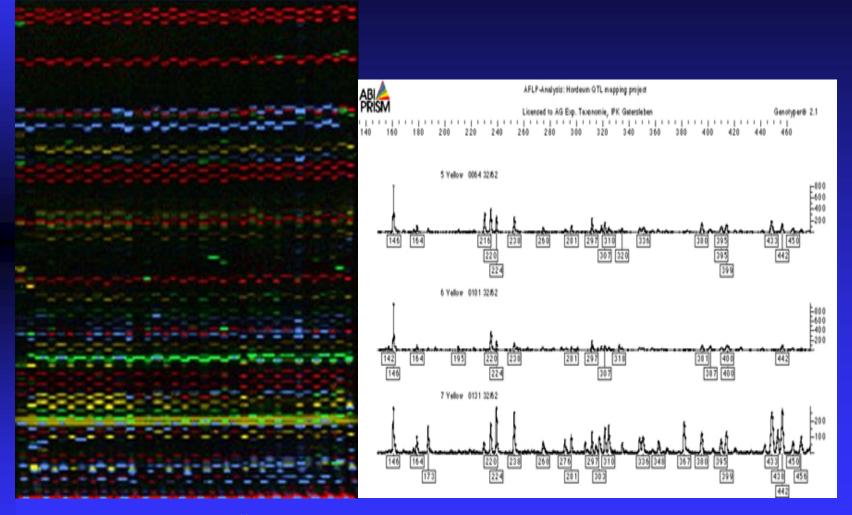
Далее проводятся две последовательные ПЦР:

- 3 В первой ПЦР используются праймеры полностью комплементарные адаптерам EcoRI и Msel, в результате чего образуется большое количество продуктов амплификации между адаптерами EcoRI и Msel, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза.
- 4 Во второй ПЦР праймеры с адаптерами EcoRI и Msel содержат на 3' конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 3) для селективной амплификации.



AFLP

Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоктивной или с флуорисцентной меткой.



AFLP-Акриламидный Гель 3 AFLP-Реакции и один Стандарт (Красный)

Плюсы и минусы **AFLP** Метода:

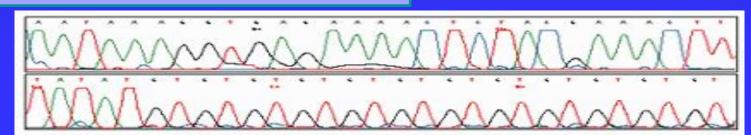
Доминантный маркер

- + Полиморфизм **AFLP** выше чем у RAPD и ISSR.
- неограниченное количество образцов в каждом анализе
- Сравнительно дорогое оборудование, програмное обеспечение и также дорогие расходные материалы.

ISSR — Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz et al, 1994). ISSR маркеры – маркеры основанные на межмикросателитных последовательностях

При ISSR анализе также как и в RAPD используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида. Праймеры комплементарны повторяющимся участкам генома, таким как микросателлиты. Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей, обусловленной «проскальзыванием» при репликации ДНК и точечными мутациями.

Микросателлитная ДНК – ДНК из коротких тандемных повторов длиной от 1 до 6 пар оснований. Используются как молекулярные маркеры в определении родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации.



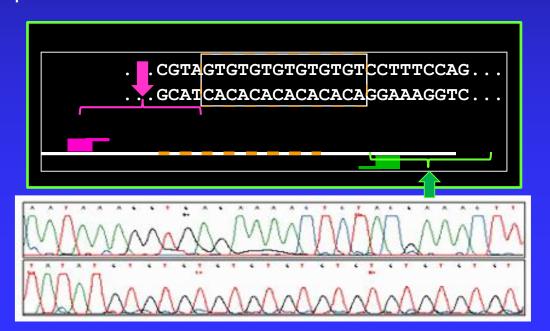
Плюсы и минусы ISSR Метода:

Доминантный маркер

- + Сравнительно быстрый и дещевый метод Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига.
- Однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же как и функция, остаются неизвестными

Simple Sequence Repeats (SSRs) Микросателиты

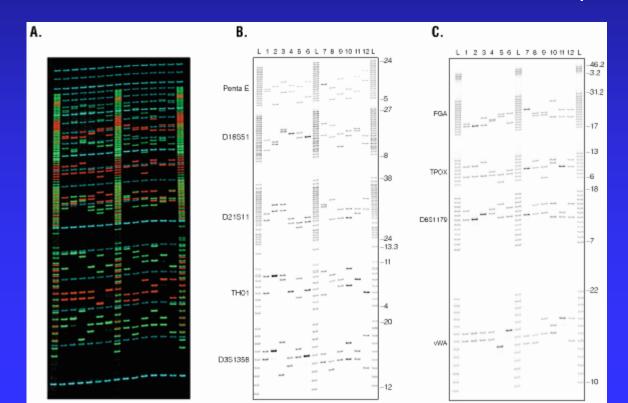
ПЦР с флангирующими праймерами к короткому мини или микросателитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу. Однако, одна пара праймеров для флангов в ПЦР позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса. Для многих микросателлитных локусов не удается выявить полиморфизм. Как правило, фланкирующие последовательности для данного микросателлитного локуса оказываются видоспецифичными.



SSR - Simple Sequence Repeats

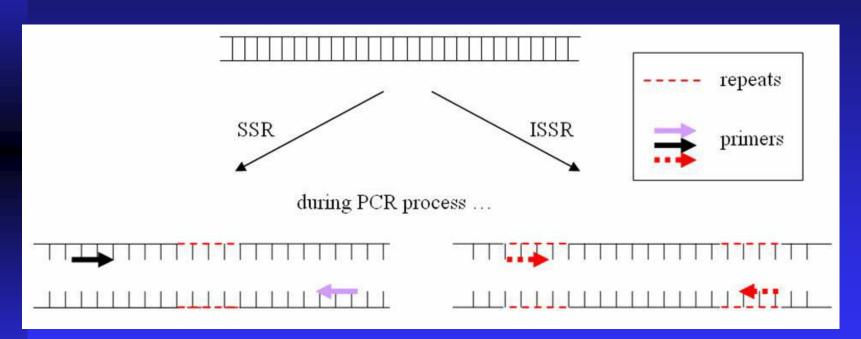
Кодоминантный маркер

- универсальность метода в использовании
- высокая степень полиморфизма
- возможность делать внутривидовые филогенетические построения, в том числе изучать малые, изолированные и однополые популяции
- ограничение: участие в рекомбинационном процессе, трудно сравнивать далекие в систематическом отношении организмы



Сравнение SSR и ISSR

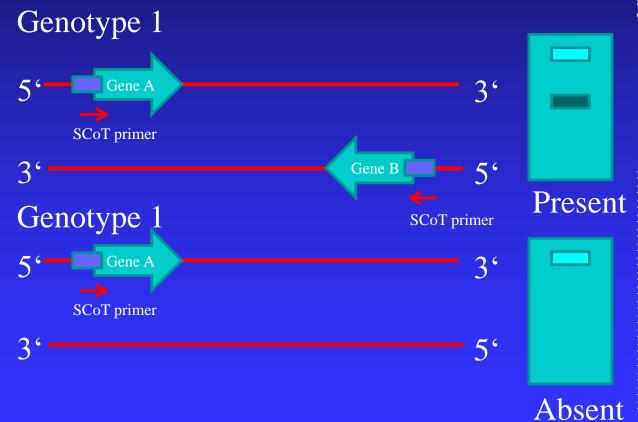
В SSR методе работают два фланкирующих праймера одного микросателитного региона, а в ISSR методе работает один праймер, содержащий повторы и амплифицирует регион между микросателитами.



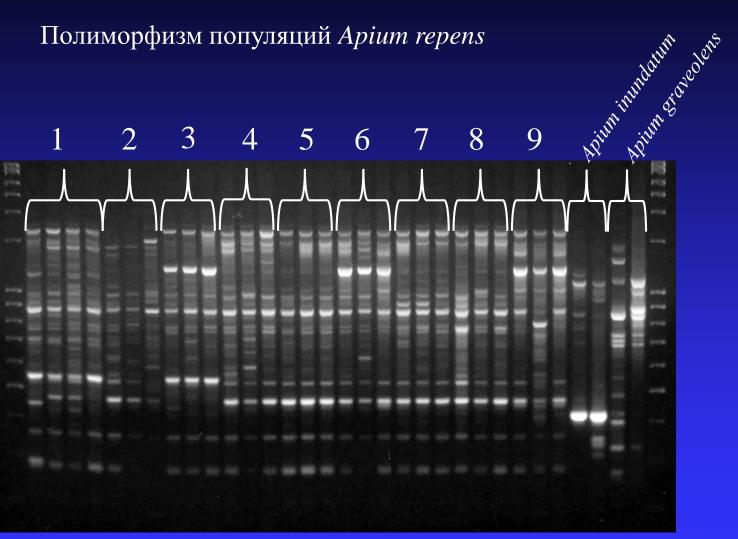
SCoT - Start Codon Targeted Polymorphism Collard, B. C. Y. & Mackill, D. J. 2009

Относительно новый метод основанный на полиморфизме фланкируемый с коротким консервативным ATG старткодоном.

Для ПЦР используется 18 нуклеотидный праймер, включающий ATG.



Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism

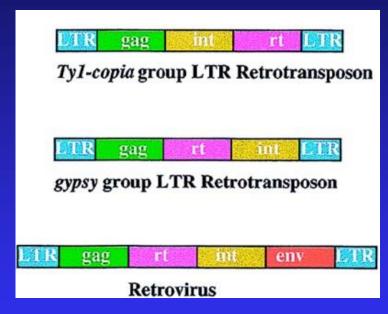


1-9 Популяции *Apium repens* из Германии и Австрии Primer: SCoT16

LTR-Retrotransposons

LTR- Ретротранспозоны

Ретротранспозоны широко распространены у растений и могут составлять до 50 % всей геномной ДНК



LTR- long terminal repeat; Gag - core particle components; rt - reverse transcriptase; int - integrase; env - envelope glycoprotein.

IRAP —Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism

Полимеразная цепная реакция между праймерами, комплементарными последовательностям двух рядом расположенных LTR ретротранспозона.

Метод имеет несколько вариантов. В первом варианте IRAP используется единичный праймер из LTR. Продукты амплификации образуются между двумя инвертированными LTR с одинаковой последовательностью, то есть в одной цепи 5'-конец одного LTR ориентирован к 3'-концу другого LTR. Если центральная часть ретротрапозона длинее обычного размера ПЦР продуктов (около 3000 пар оснований), то ПЦР будет проходить только между двумя LTR из разных ретротранспозиций. В этом случае соседние LTR должны располагаться в инвертирванном положении. В другом варианте IRAP используются два разных праймера к ивертированным LTR: один праймер с 5'-конца, а другой с 3'-конца LTR, ориентированые в разные стороны от ретротранспозона. В данном случае соседние LTR располагаются как прямые длинные повторы. И, наконец, в третьем варианте IRAP используются праймеры к LTR из разных ретротрапозонов в различной ориентации. Можно комбинировать праймеры из LTR с другими праймерами из повторяющейся ДНК.

REMAP — Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism,

RBIP — Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms

Метод, основанный на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов и выявляющий кодоминантные аллельные варианты. Его принцип основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции и праймер к LTR ретротранспозона, который встроен в данный участок между первыми двумя праймерами. В результате ПЦР будет амлифицироваться один из вариантов фрагментов, фланкированных парой праймеров, поскольку последовательность между LTR слишком длинная для ПЦР между сайтами геномной ДНК с ретротранспозоном внутри. Этот метод выявляет полиморфизм только для данного полиморфного локуса. К его достоинствам относят кодоминантность полиморфных вариантов, возможность использования для дот-блот анализа большого количества сортов.

iPBS — inter PBS amplification

Метод, основанный на использовании праймеров к PBS (Primer Binding Site), участок связывания тРНК к последовательностям ретротранспозонов. Метод эффективен для выявления полиморфизма между образцами, а также для клонирования новых ретротранспозонов у эукариот.

Обработка и анализ данных фрагментного анализа

- 1. Перевод наличие или отсутствие одинаковых фрагментов ДНК в бинарную матрицу (есть / нет полосы)
- а. Анализ геля на наличие полос вручную или при помощи программ

Программы: Phoretix 1D Professional

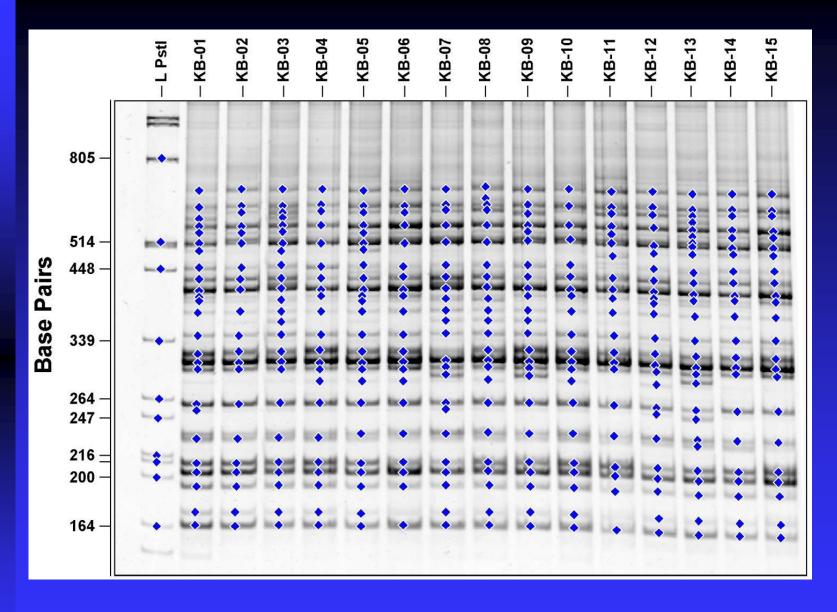
GeneMapper

Программы бесплатные:

CrossChecker

(http://www.plantbreeding.wur.nl/UK/software_crosschecker.html)

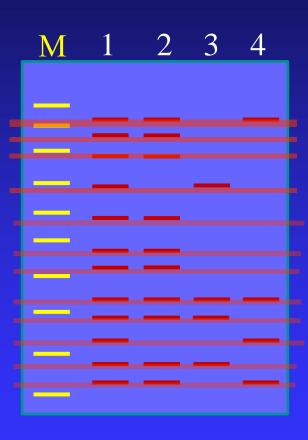
В любом случае проверка вручную на адекватность интерпретации!



Пример анализа электрофореграмм ISSR-спектров ДНК с помощью программного обеспечения

Пример бинарной матрицы фрагментного метода для кластерного анализа

Фрагмент	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
1	1	1	0	1
2	1	1	0	0
3	1	1	0	0
4	1	0	1	0
5	1	1	0	0
6	1	1	0	0
7	1	1	0	0
8	1	1	1	1
9	1	1	1	0
10	1	0	0	1
11	1	0	0	0
12	1	1	1	0
13	1	1	0	1



Обработка данных фрагментного анализа

- 2. Анализ сходства и построение деревьев
- а. Создать матрицу попарных расстояний
- б. Провести кластеризацию одним из имеющихся многочисленных методов (UPGMA, NJ и т.п.)

Расстояния:

коэффициенты попарного сходства(S) между фингерпринтами отдельно по каждому

Праймеру по формуле:

S=2Fab(Fa+Fb),

где Fab - число полос, общих для двух особей,

Fa и Fb – общее число полос для каждой особи.

Обработка микросателлитных последовательностей

Перевод в частоты аллелей
Проверки на соответствие распределение Харди
- Вайнберга
Подсчет многочисленными программами для
популяционной генетики
(BioSys, Arlequine, GenePop и многие другие)

Что дают микросателлиты, AFLP, RAPD, SCoT, ISSR и Ко.?

- Наличие генетической дифференциации популяций и выявление популяционной структуры вида
- Криптические симпатрические виды на ранних этапах видообразования
- Поток генов (миграция) между популяциями

НО: генетические маркеры надо искать для каждой группы!

◆Методы

 Области применения маркерных систем /молекулярных методов/ на различных таксономических уровнях

Организм Популяция Подвид Вид Секция Род Семейство Порядок Класс

