

# Методы, основанные на ПЦР

Прикладная генетика для зоологов, лекция 4

Мюге Н.С.

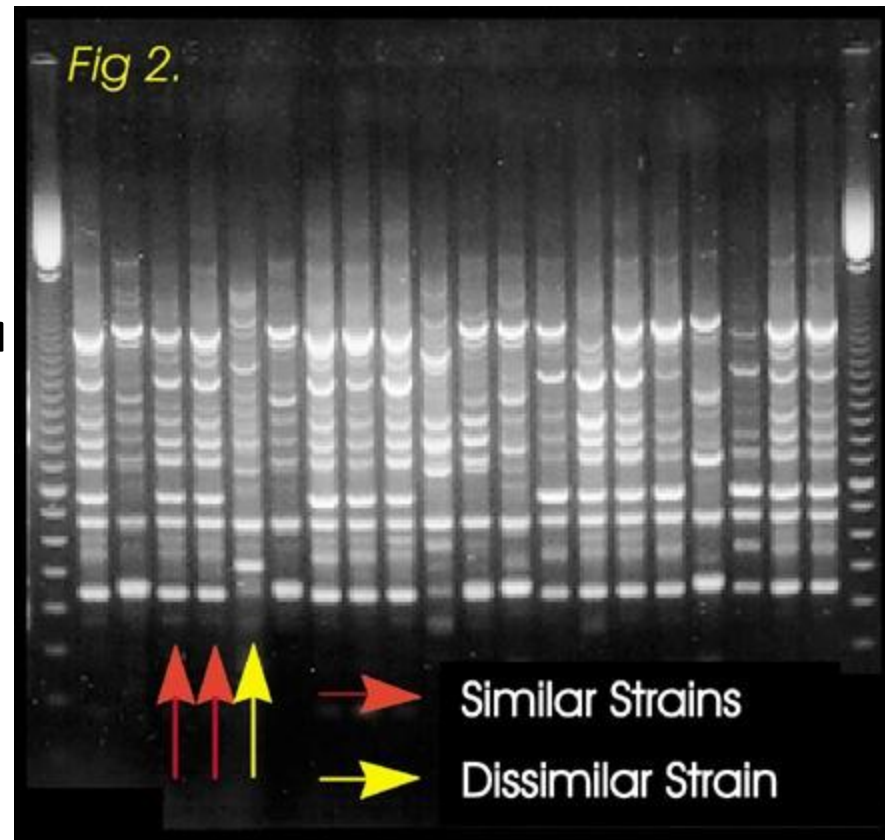
# RAPD PCR

---

- Короткие праймеры (10-12 по)
- Низкая температура отжига
- Плюсы:
- быстрый способ оценить различия между особями и популяциями

Минусы:

- Строго зависит от концентрации и качества матрицы
- Практически не публикуется как ненадежный метод



# Условия постановки RAPD

1.	10x ПЦР буфер	2.5 мкл
2.	4x dNTPs	5 мкл (150 мкМ каждого)
3.	Праймер	150 пкМ
4.	MgCl <sub>2</sub> (50мМ)	1мкл (2мМ)
5.	Тaq-полимераза	0.3 мкл
6.	milli-Q H <sub>2</sub> O	до 20 мкл
7.	Раствор ДНК(5-10 нг)	5 мкл (5-10 нг)

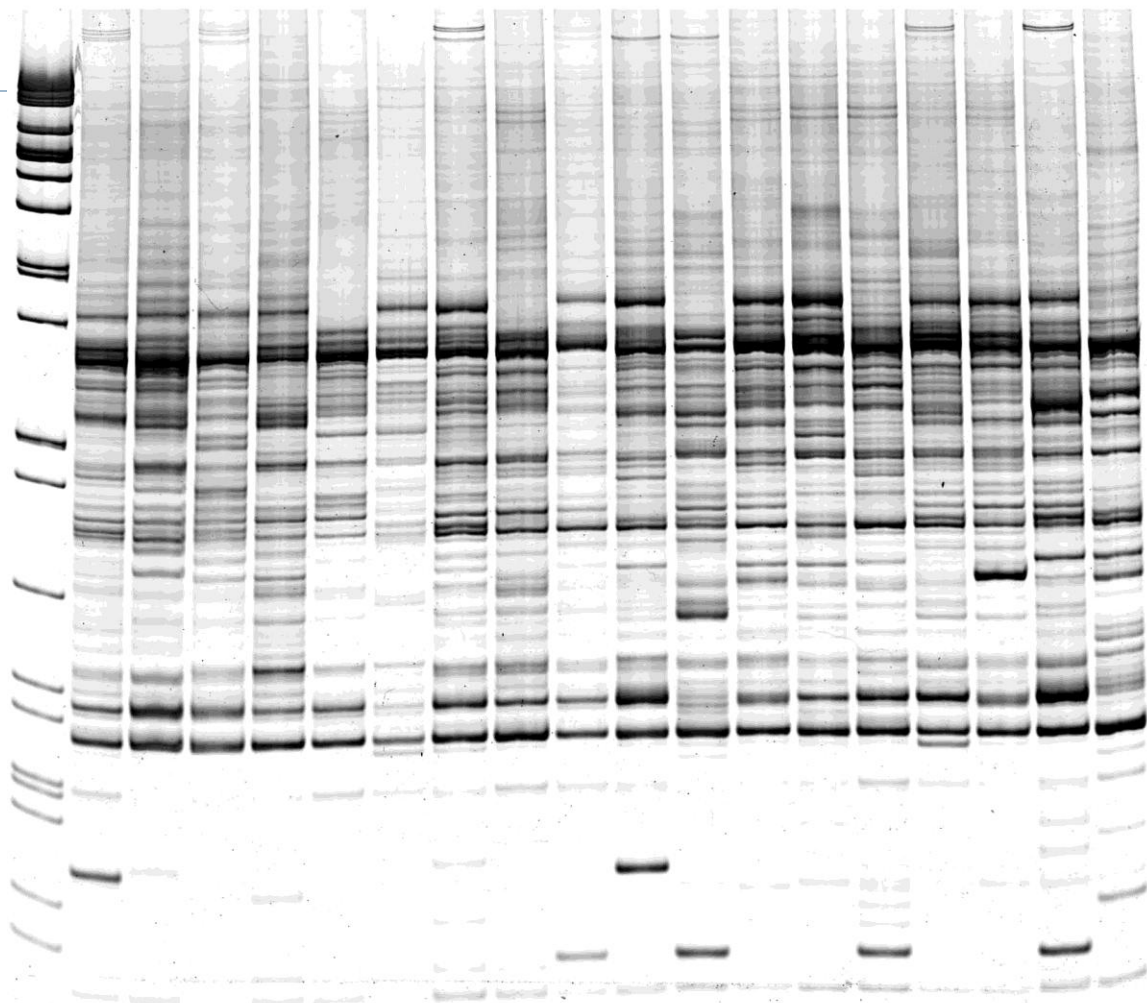
Состав стандартной реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции.

Примеры RAPD праймеров:

A09 (GGG TAA CGC C),  
A07 (GAA ACG GGT G),  
B09 (TGG GGG ACT C),  
K20 (GTG TCG CGA G).  
A12 (TCG GCG ATA G).

1.	Плавление	94°C	4 мин
2.	Плавление	94°C	30 сек
3.	Отжиг праймеров	36°C	30 сек
4.	Синтез ДНК	72°C	1 мин
5.	Повтор		37 циклов
6.	Окончательный синтез	72°C	10 мин

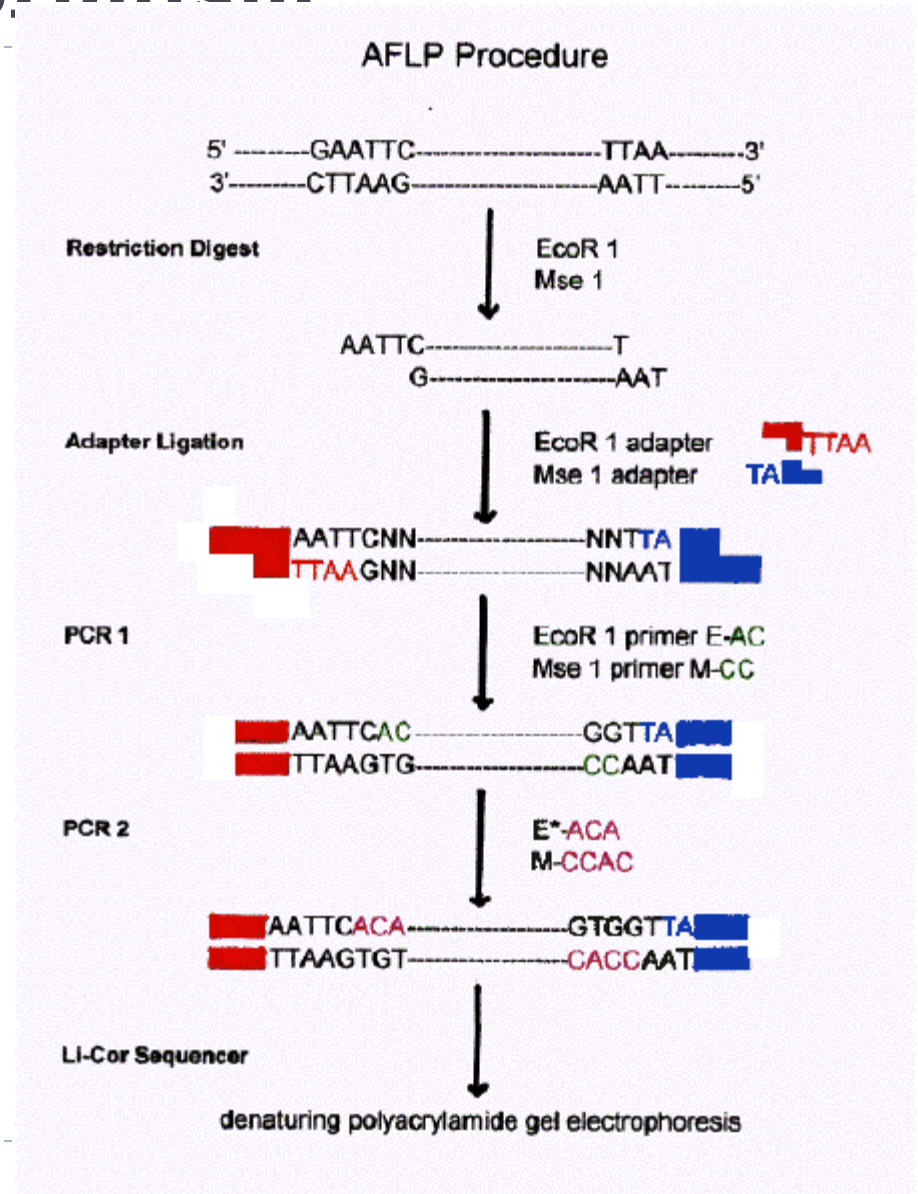
Программа для проведения полимеразной цепной реакции на термоциклере PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).



RAPD-PCR спектры русского осетра с праймером B09.  
Полоса 1 – маркеры молекулярной массы ( $\lambda$ /PstI).

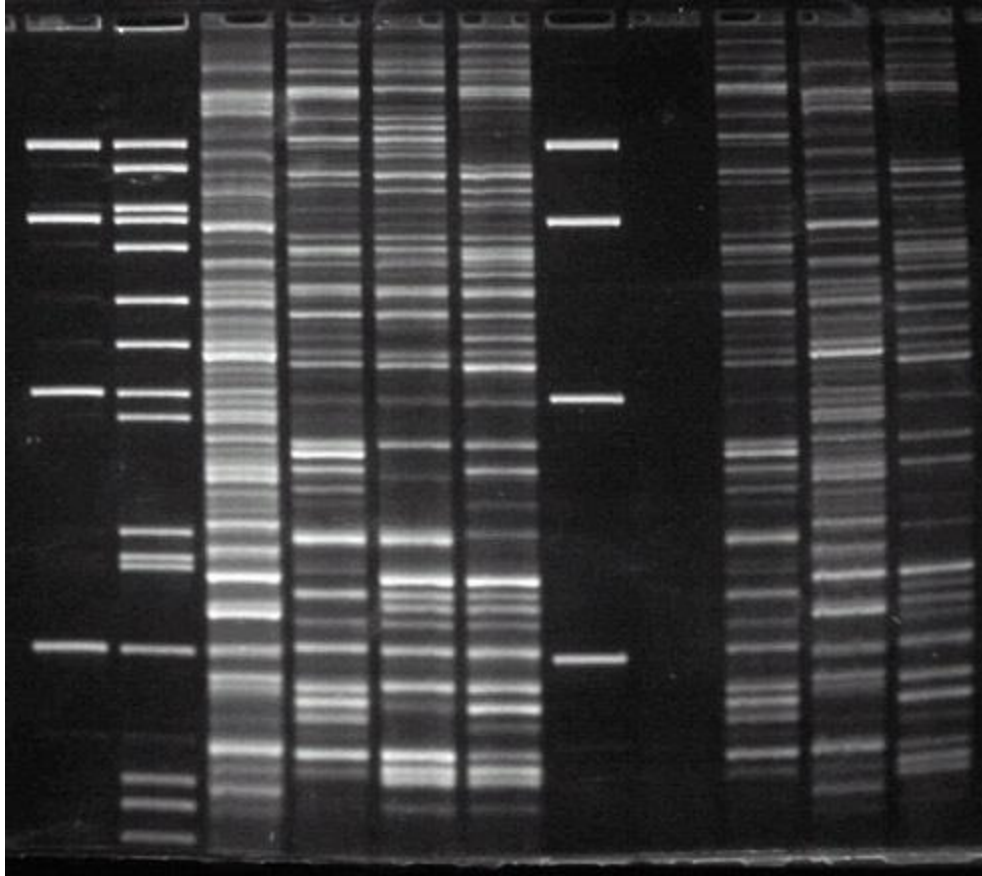


# AFLP - Amplified fragment length polymorphism



# AFLP

---



# Пример селективных праймеров для AFLP

---

GATT	gatgagtcctgagcggatt
GATG	gatgagtcctgagcggatg
GATC	gatgagtcctgagcggatc
GAAA	gatgagtcctgagcggaaa
GAAT	gatgagtcctgagcggaat
GAAG	gatgagtcctgagcggaaag
GAAC	gatgagtcctgagcggaac
GACA	gatgagtcctgagcggaca
GACT	gatgagtcctgagcggact
GACG	gatgagtcctgagcggacg
GACC	gatgagtcctgagcggacc
GAGA	gatgagtcctgagcggaga
GATG	gatgagtcctgagcggagt
GAGG	gatgagtcctgagcggagg
GAGC	gatgagtcctgagcggagc

---



# Не все комбинации селективных AFLP праймеров работают одинаково хорошо

Table 10. Primer combinations for Barley species

		MseI Primers							
		-CAA	-CAC	-CAG	-CAT	-CTA	-CTC	-CTG	-CTT
EcoRI Primers	-AAC								
	-AAG			⊘	⊘				
	-ACA								
	-ACC								
	-ACG								
	-ACT			⊘					
	-AGC						⊘		
	-AGG								

Table 11. Primer combinations for Maize species

		MseI Primers							
		-CAA	-CAC	-CAG	-CAT	-CTA	-CTC	-CTG	-CTT
EcoRI Primers	-AAC	⊘							
	-AAG					⊘			
	-ACA	⊘							
	-ACC								
	-ACG						⊘		⊘
	-ACT		⊘		⊘			⊘	⊘
	-AGC								⊘
	-AGG								

## AFLP<sup>®</sup> Plant Mapping

Protocol

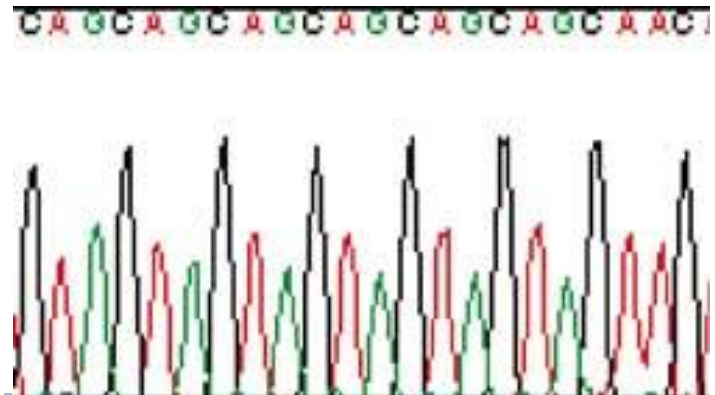


## Микросателлитный и минисателлитный анализ

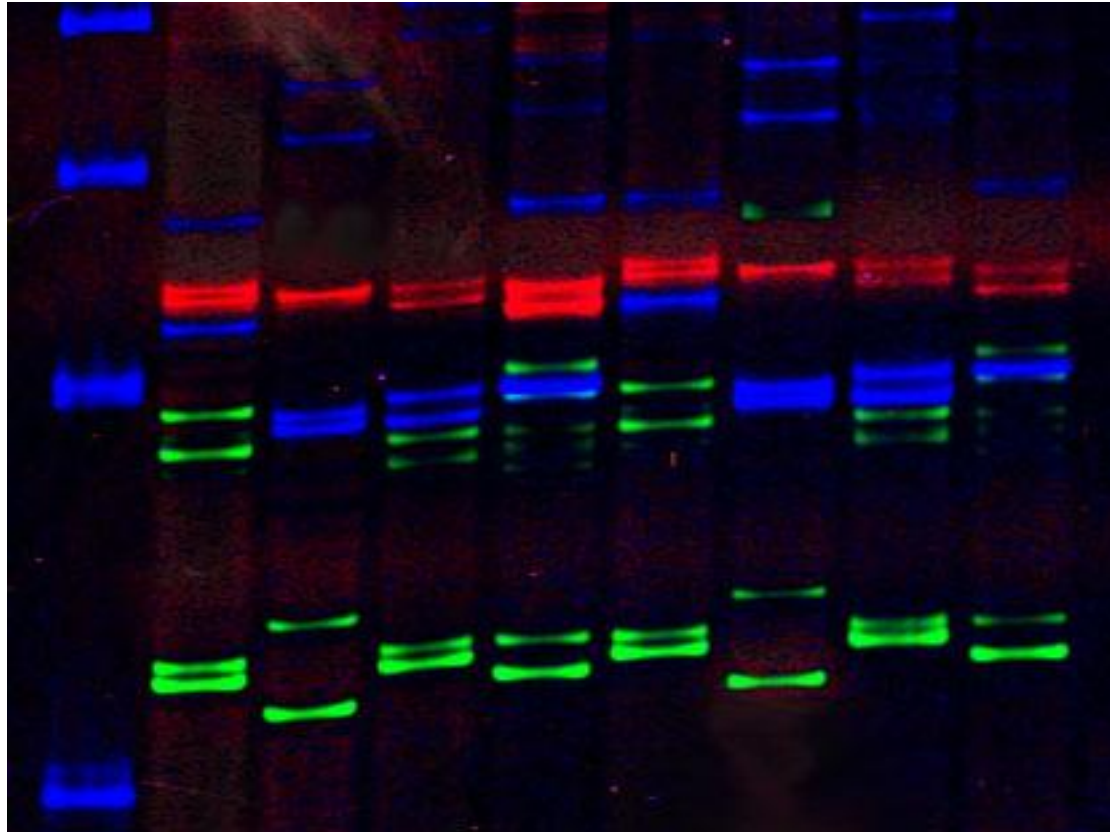
- изучение tandemных повторов в строении ДНК  
(минисателлиты – повтор.звено-6-100н.п., кластер-0.2-20 тыс.н.п;  
микросателлиты – повтор.звено-2-6н.п., кластер-20-60н.п.)

-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



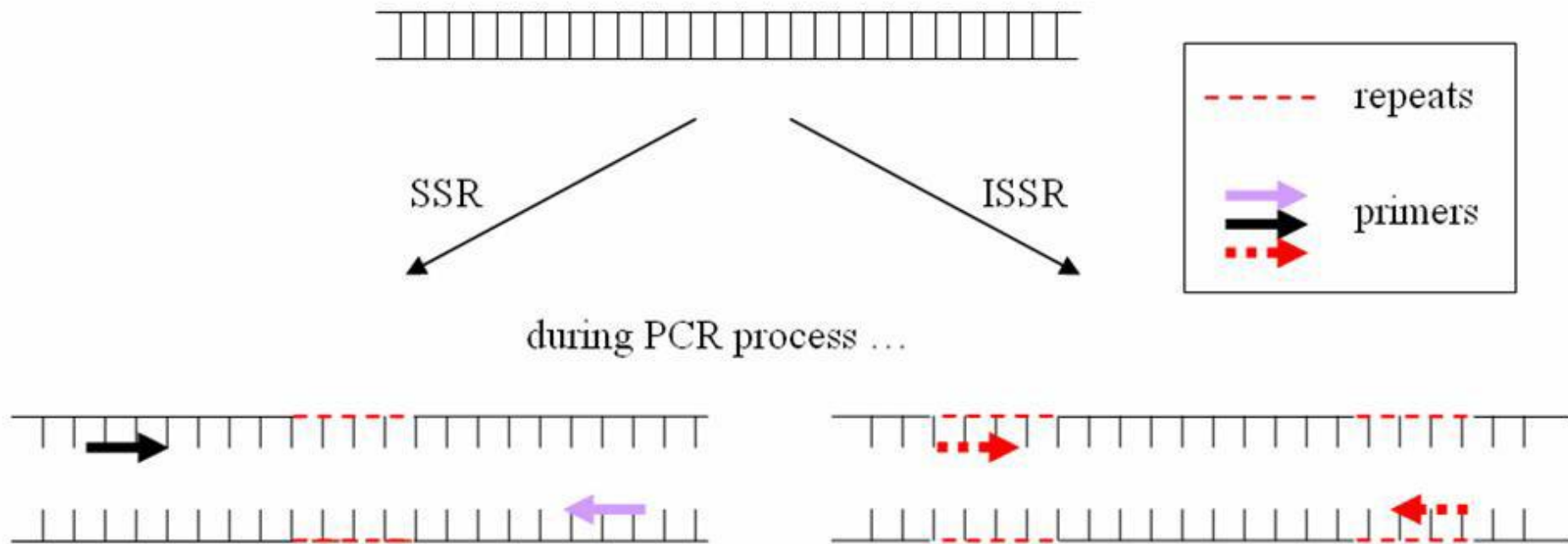
## Микросателлитный анализ



Forward primers in each pair were labeled on their 5' end with fluorescent dyes as follows: **OMMI082 – JOE**, **OneIII – FAM**, **Ots253 – TAMRA**.



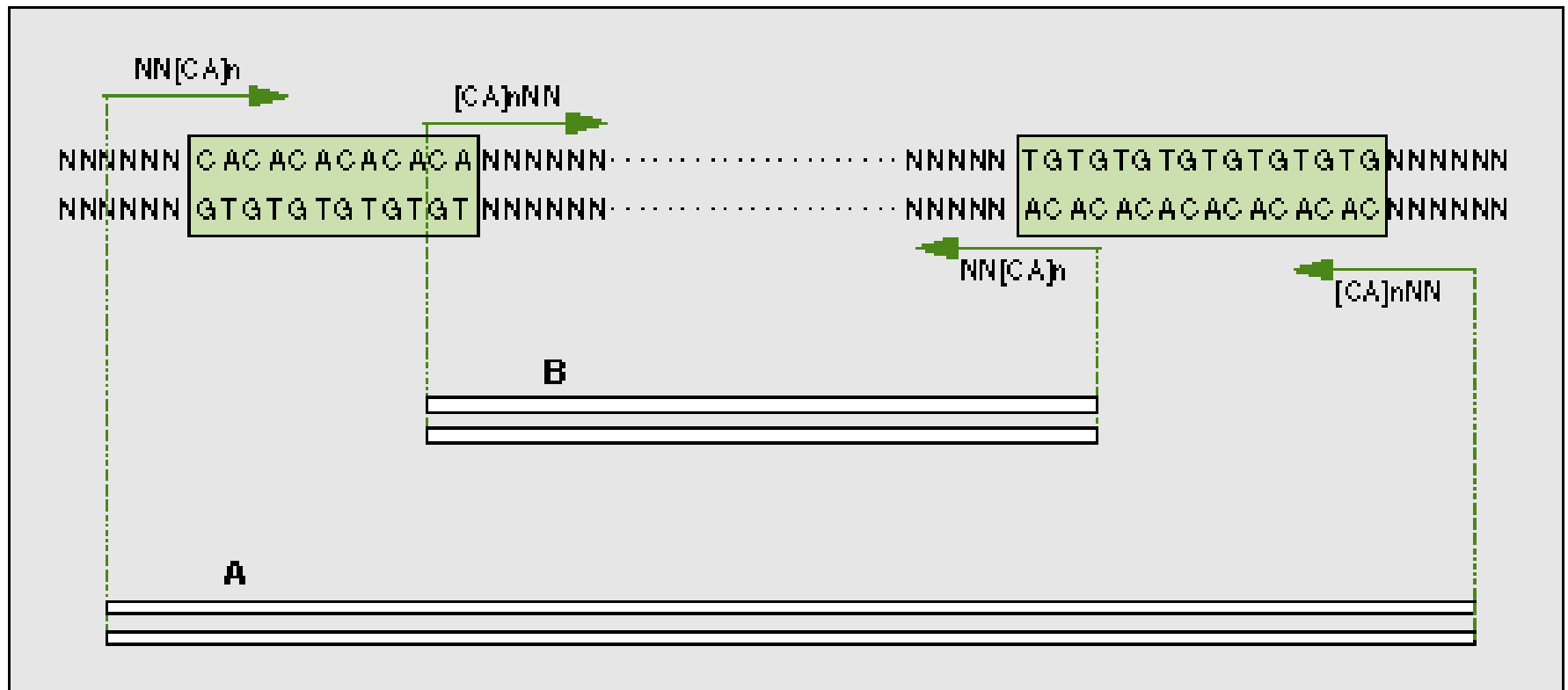
# Сравнение техники микросателлитного (SSR) и межмикросателлитного (ISSR) анализа



**SSR and ISSR.** SSR employs primers targeting a single repeat region, while ISSR employs a single primer containing repeats to amplify regions between two repeats.

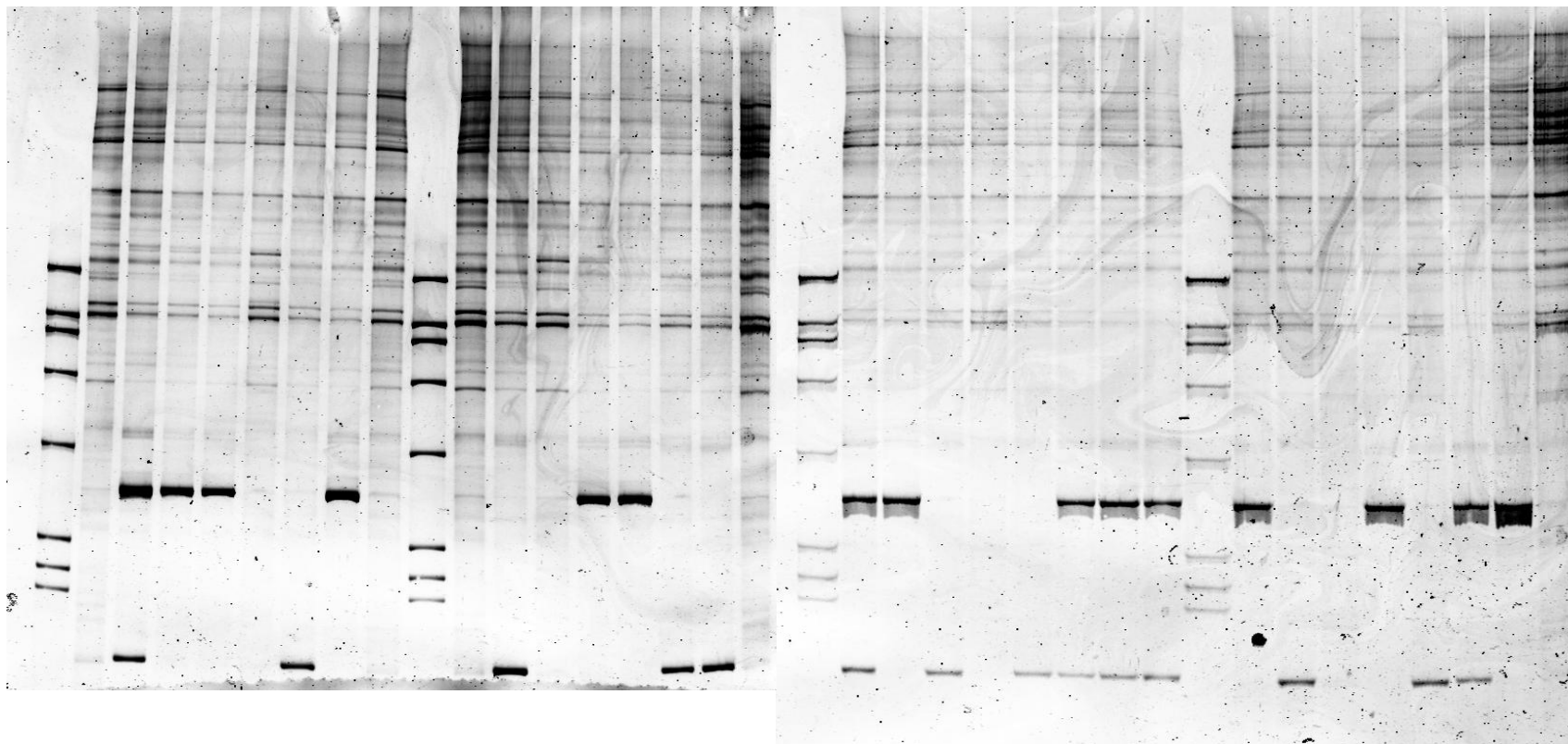


# Принцип действия ISSR



ISSR principle. If arbitrary nucleotides of the primer are located at the 5' end of the microsatellite, product A will be generated. If they are located at the 3' end, product B will be generated

# Скринирование ISSR на акриламидном геле



ISSR праймер J-ctc дорожки 1, 10, 19, 28 – ладдер, 2, 3 – родители, остальные – дети (нумерация сквозная на два геля)

# Что дают микросателлиты, SNP, AFLP, RAPD и т.п.?

---

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

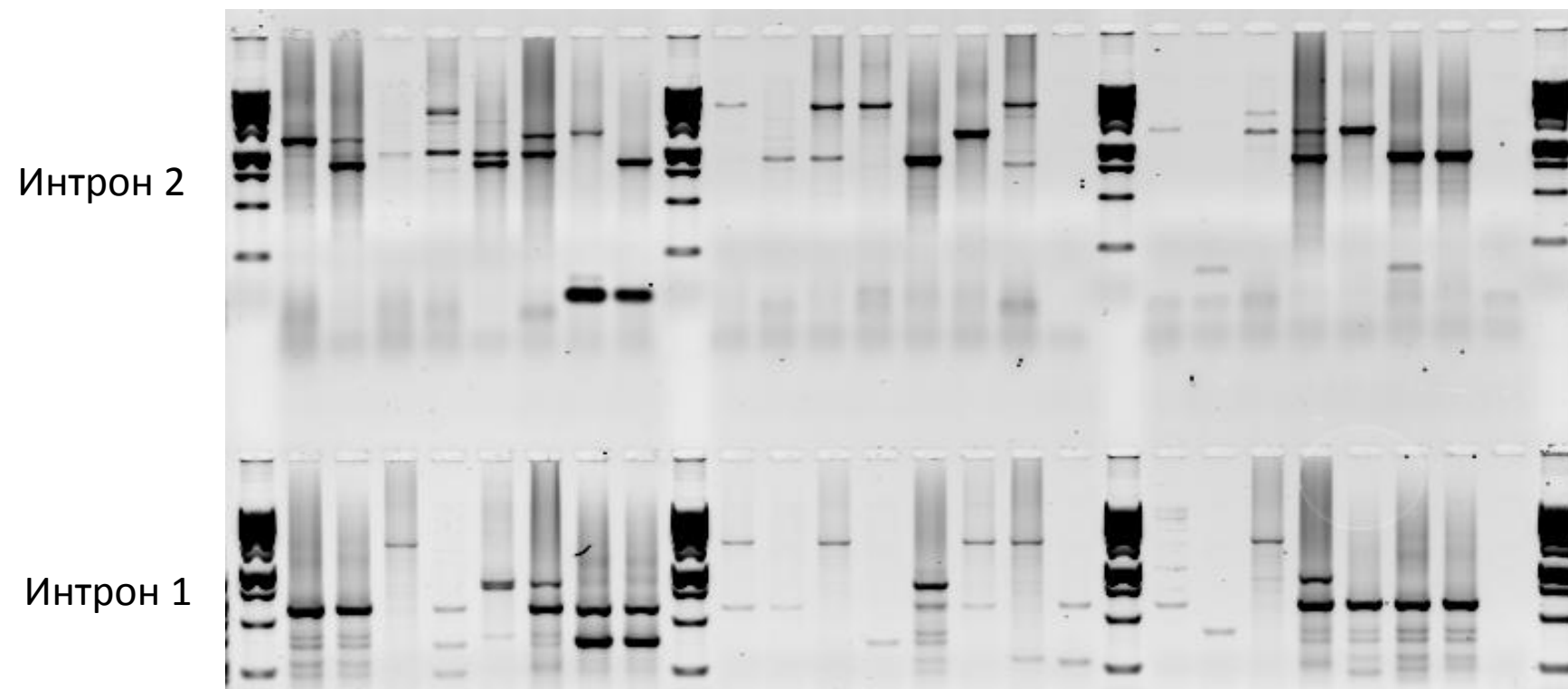
**НО: генетические маркеры надо искать для каждой группы!**

---



# Скринирование минисателлитов на агарозном геле

---



# Разработка праймеров на SNP

ATACACTGAGTATGGTGTGAAGAATGCA**A**AAGCATGGAACAGT  
 ATACACTGAGTATGGTGTGAAGAATGCA**G**AAGCATGGAACAGT  
 CTGAGTATGGTGTGAAGAATGC**t**A  
 CTGAGTATGGTGTGAAGAATGC**t**G

TAAGACTACGCTGCTATCTACTACAGCAACATAC  
 TAAGACTACGCTGCTATCTACTACAGCAACATAC  
 CTGCTATCTACTACAGCAACA



Tips:

~150-250 bp

- ▶ PCR product should be approximately 150-250 bp
- Check primers for self-dimers, pair-dimers, and hairpins.

Pf12f\_G, 2 bp, dG = -2.0 kc/m (worst= -47.0)

5' CTCAGGACTCTCACTTCC**CACCAATG** 3'  
 ||        ||  
 3' **GTAACCAC**CCTTCACTCTCAGGACTC 5'

Pf12f\_G, 3 bp (Loop=8), dG = -0.5 kc

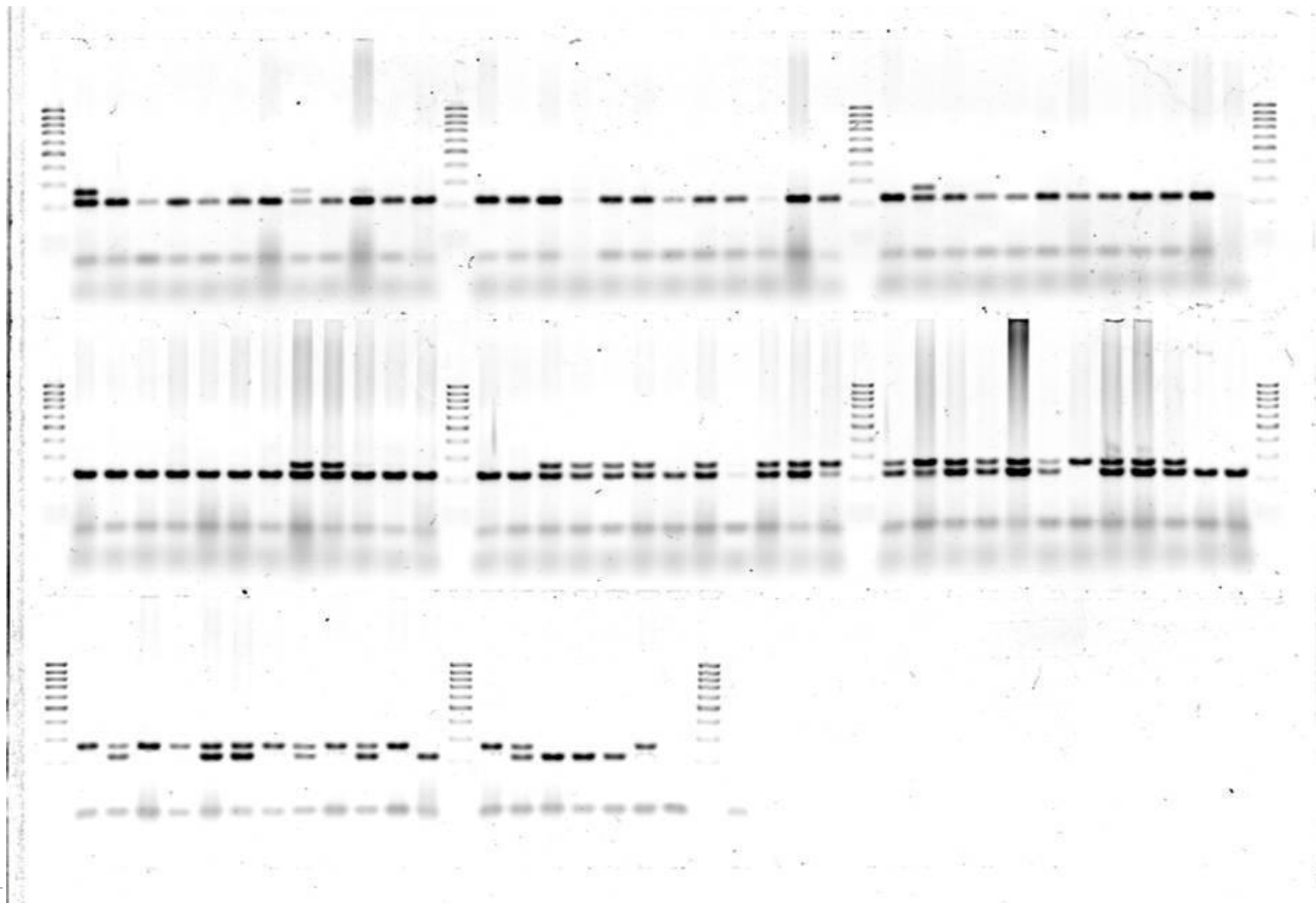
5' CTCAG**GGA**CTCT  
 |||  
 3' GTAACCAC**CCT**TCAC





# Определение аллелей SNP локусов в агарозном геле

---



# Обработка данных фрагментного анализа

---

▶ 1. Перевод в бинарную матрицу (есть/нет полосы)

а. Анализ геля на наличие полос вручную или при помощи программ

Программы (дорогие):

**Phoretix ID Professional**

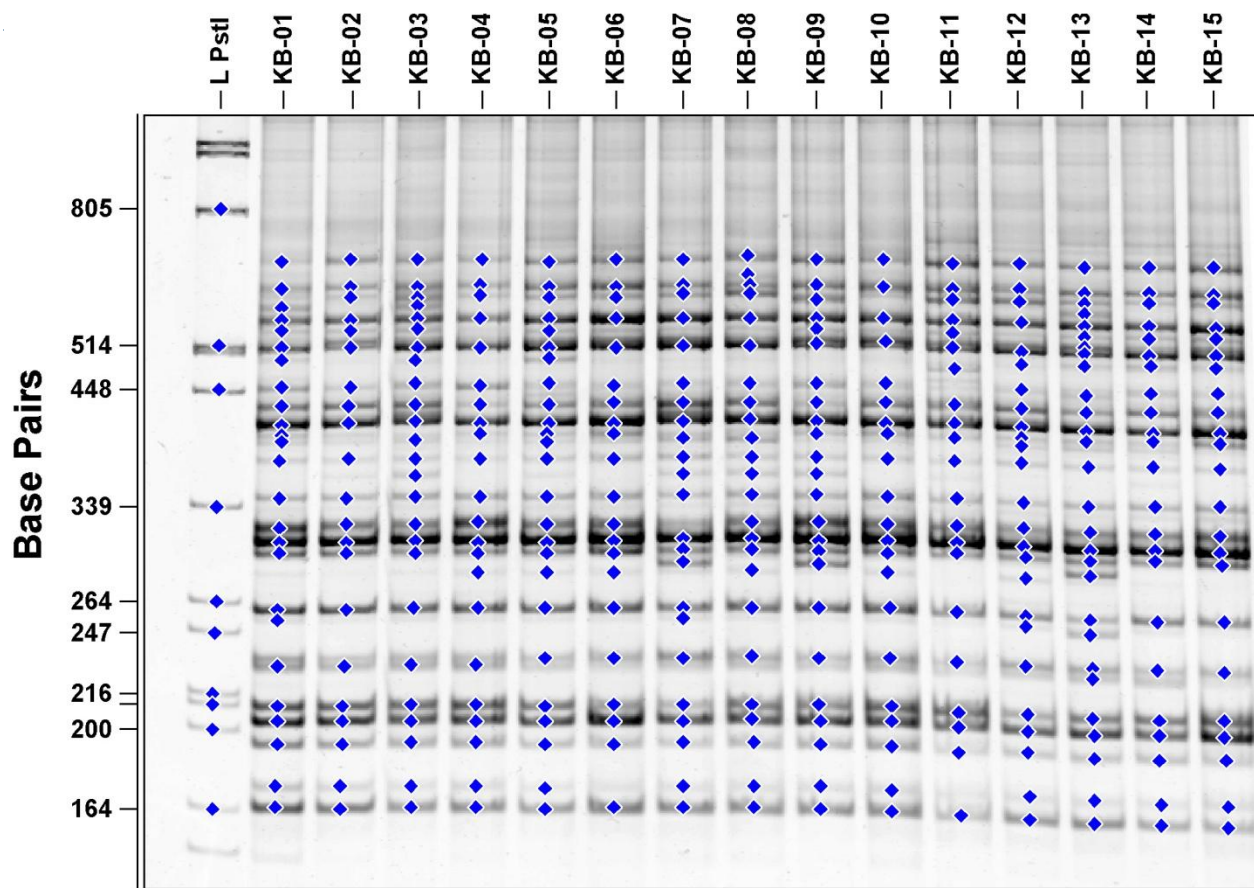
**GeneMapper**

Программы бесплатные:

**CrossChecker** ([http://www.plantbreeding.wur.nl/UK/software\\_crosschecker.html](http://www.plantbreeding.wur.nl/UK/software_crosschecker.html))

В любом случае проверка вручную на адекватность интерпретации бэндов!





Анализ электрофореграмм RAPD-спектров ДНК с помощью программного обеспечения Phoretix 1D Advanced (Nonlinear Dynamics).

# 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:
- ▶  $S=2F_{ab}(F_a+F_b)$ ,
- ▶ где  $F_{ab}$  - число полос, общих для двух особей,
- ▶  $F_a$  и  $F_b$  – общее число полос для каждой особи.



## GENETIC DISTANCE ESTIMATION FOR PATTERN ANALYSIS

At the moment, two methods to compute the genetic distance for pattern analyses such as RFLP, RAPD, and AFLP are implemented.

### Method 1 (Nei and Li, 1979)

The genetic distance is computed as follows:

$$GD_{xy} = 1 - \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y},$$

where  $N_{xy}$  is the number of fragments (bands) shared in lines  $x$  and  $y$ , and  $N_x$  is the number of fragments in line  $x$ , and  $N_y$  is the number of fragments in line  $y$ .

Example

sample 1 1010100011

sample 2 1010111100

$N_x=5$

$N_y=6$

$N_{xy}=3$

$GD_{xy}=1 - (2*3) / (5+6) = 0.455$

sample 1 1110011000

sample 2 1110000001

$N_x=5$

$N_y=4$

$GD_{yx}=1 - (2*3) / (5+4) = 0.33$

### Method 2 (Link et al., 1995)

The genetic distance is computed as follows:

$$GD_{xy} = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_{xy}},$$

where  $N_x$  is the number of bands in line  $x$  and not in line  $y$ ,  $N_y$  is the number of bands in line  $y$  and not in line  $x$ , and  $N_{xy}$  is the number of bands shared in lines  $x$  and  $y$ .

Example

sample 1 1010100011

sample 2 1010111100

$N_x=2$

$N_y=3$

$N_{xy}=3$

$GD_{xy} = (2+3) / (2+3+3) = 5/8 = 0.625$

sample 1 1110011000

sample 2 1110000001

$N_x=2$

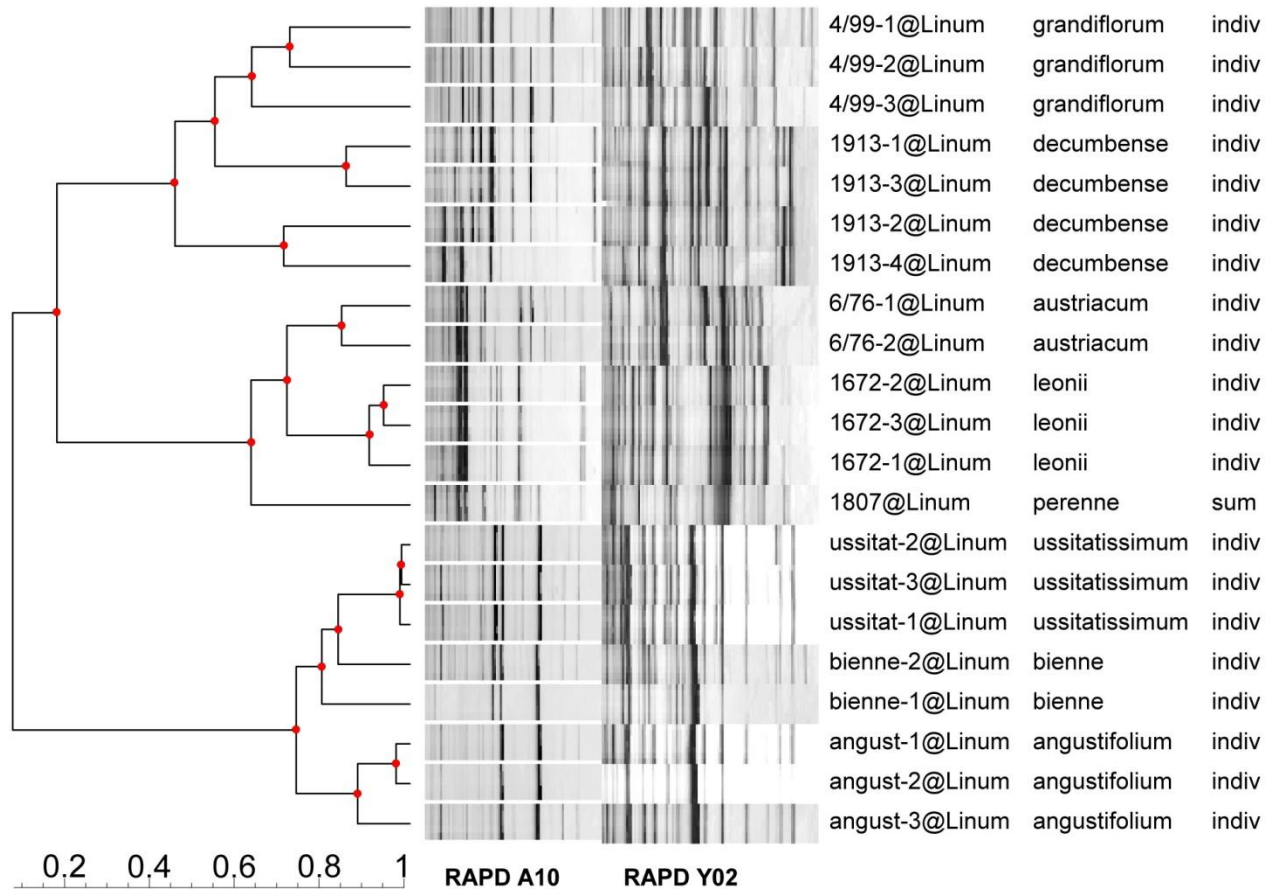
$N_y=1$

$N_{xy}=3$

$GD_{yx} = (2+1) / (2+1+3) = 3/6 = 0.5$



# Пример кластеризации пород льна по данным RAPD



# 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)



# Arlequin – бесплатная и удобная программа для обработки данных фрагментного анализа

