

Analýza komplexních genomů pomocí tříděných chromozómů

J. Vrána, H. Šimková, J. Šafář, M. Kubaláková, J. Číhalíková, J.
Doležel



Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytometrie,
Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc



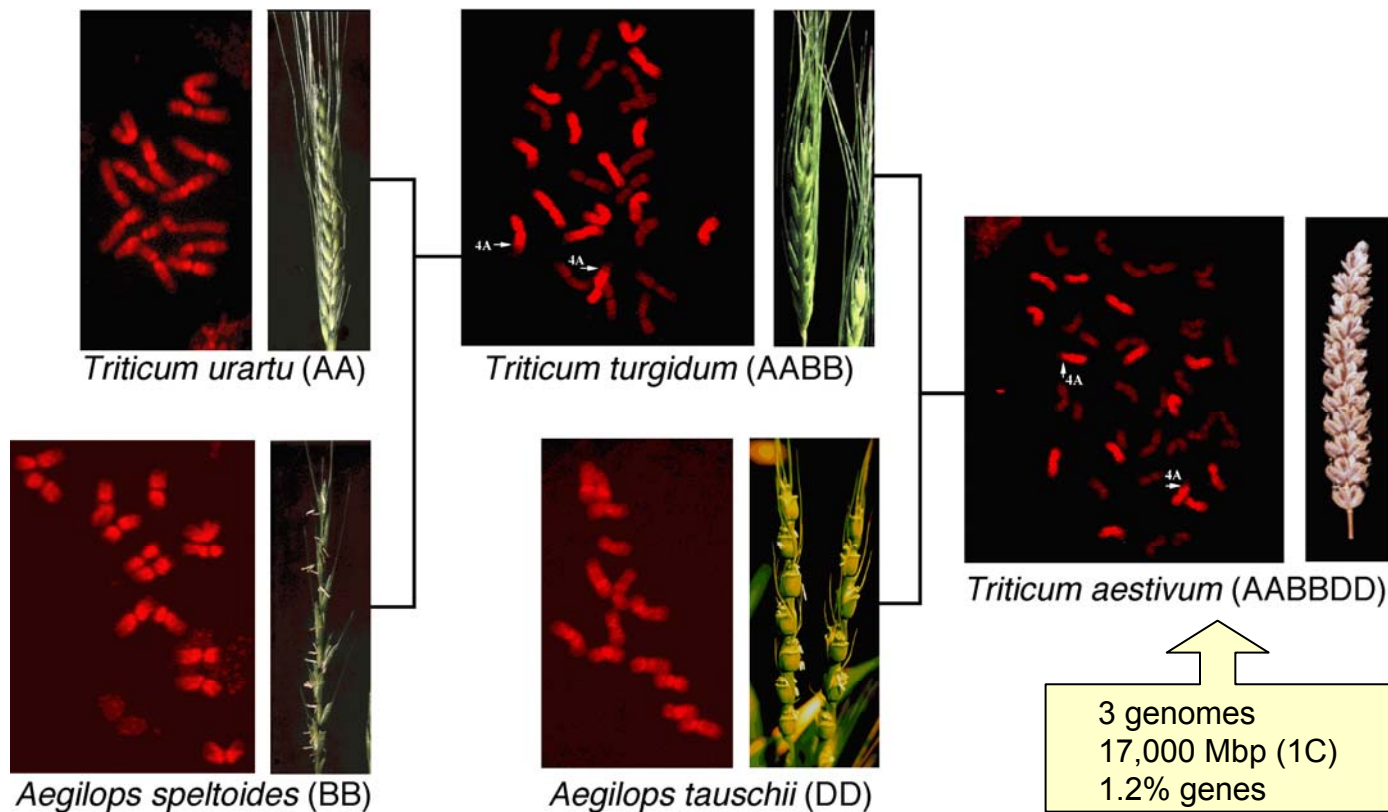
Přehled

- Nedostatek potravy a role obilovin ve výživě lidstva
- Jaderný genom pšenice
- Zavedení chromozómové genomiky pro obiloviny
- Směrování k referenční sekvenci pšeničného genomu

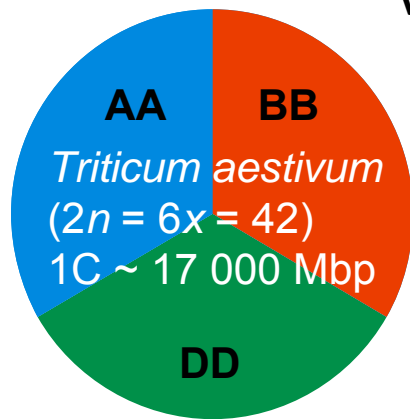


Jaderný genom pšenice

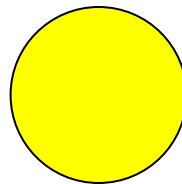
- Allohexaploidní odrůda ($2n = 6x = 42$)
- Původ ve dvou nezávislých kříženích
- Převaha repetitivních sekvencí DNA (>86%)



Jak se vypořádat se složitostí genomu pšenice?



Velikost jaderného genomu



Homo sapiens
($2n = 2x = 46$)
1C ~ 3 400 Mbp

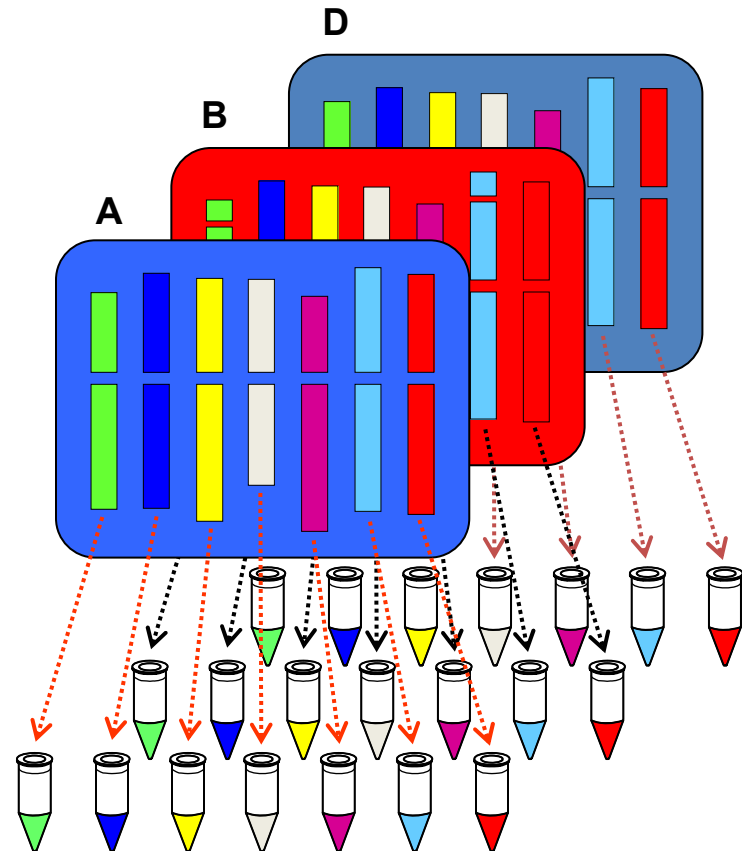


Arabidopsis thaliana
($2n = 2x = 10$)
1C ~ 150 Mbp



- Chromozómy: 605 - 995 Mbp (3.6 – 5.9% genomu)
- Chromozómová ramena: 225 - 585 Mbp (1.3 – 3.4% genomu)

Jaderný genom



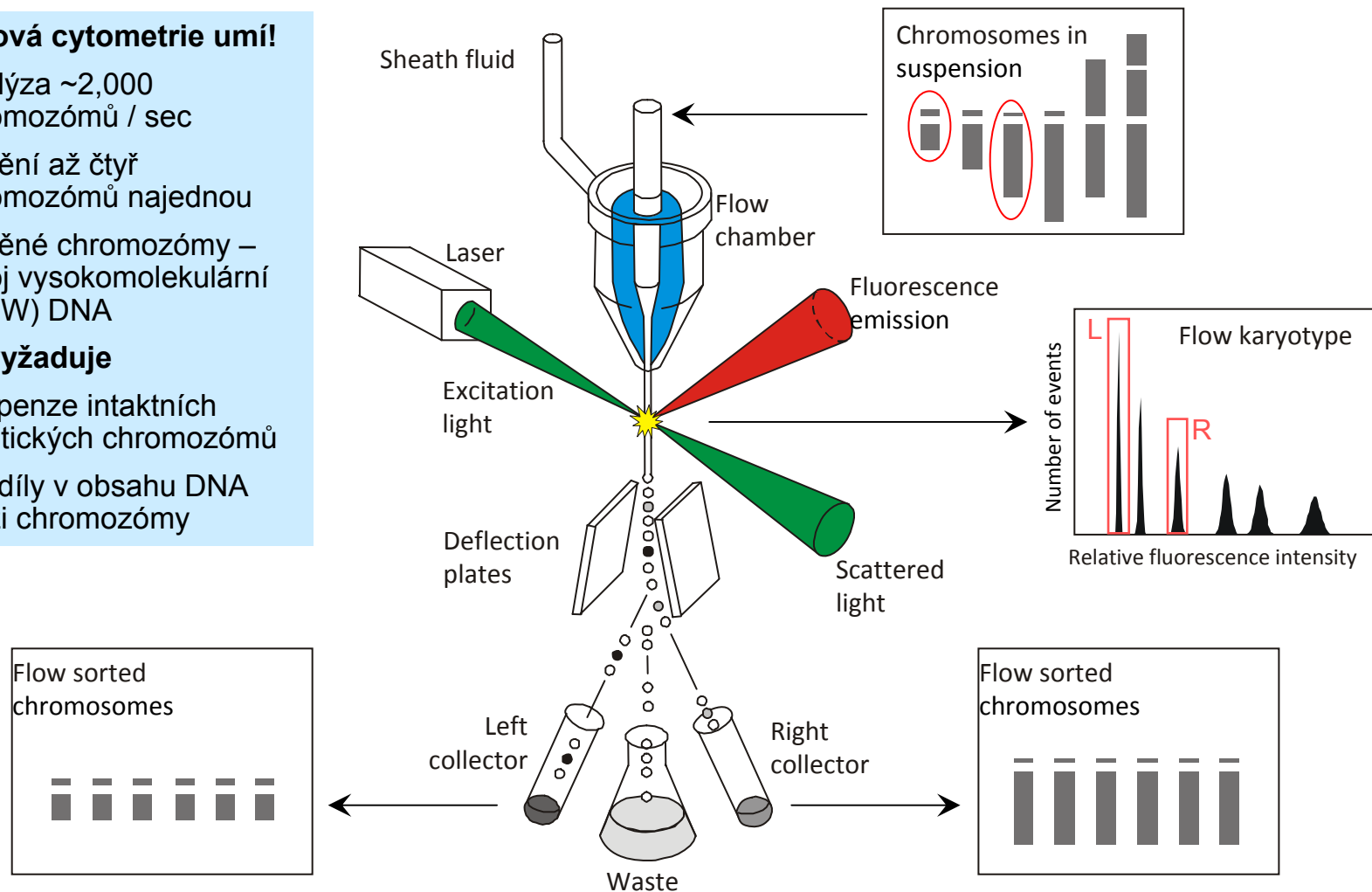
„Chromozómy v pohybu“ (Flow cytogenetics)

Průtoková cytometrie umí!

- Analýza ~2,000 chromozómů / sec
- Třídění až čtyř chromozómů najednou
- Tříděné chromozómy – zdroj vysokomolekulární (HMW) DNA

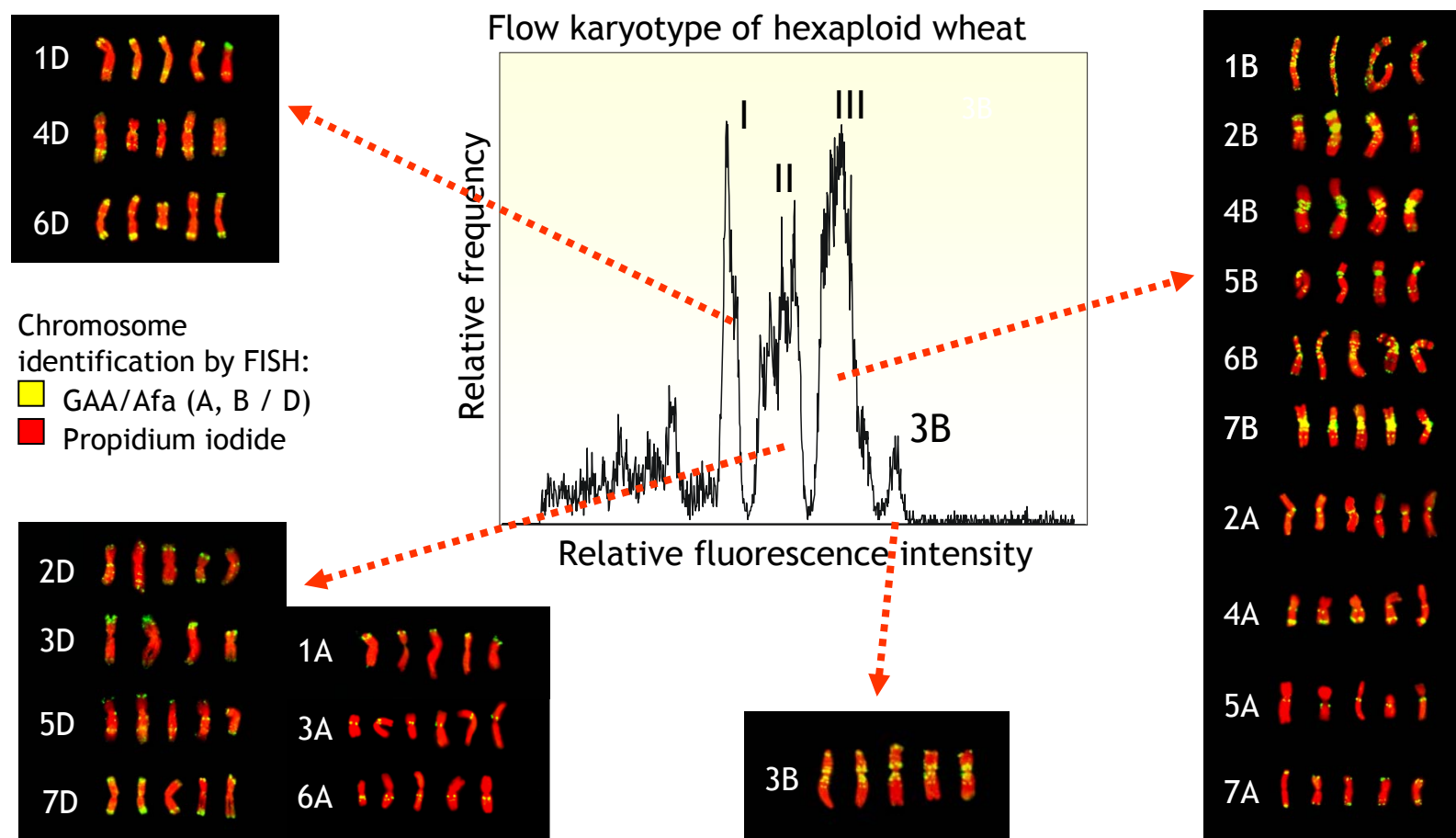
... ale vyžaduje

- Suspenze intaktních mitotických chromozómů
- Rozdíly v obsahu DNA mezi chromozómy



Třídění chromozómů hexaploidní pšenice

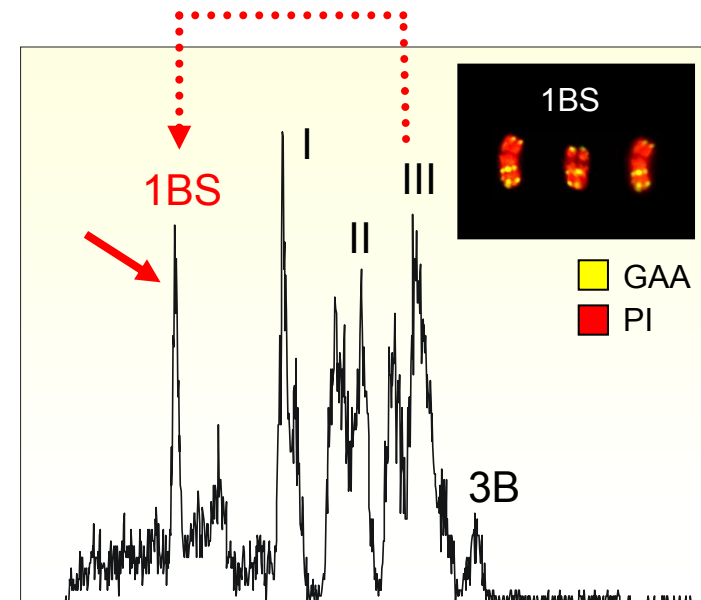
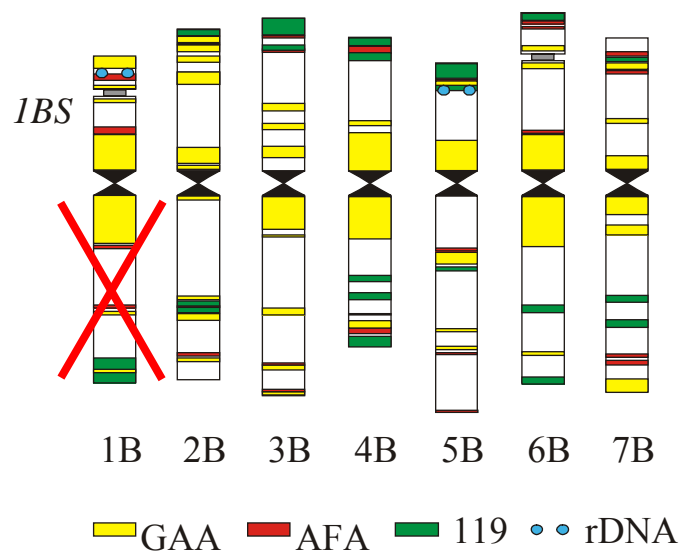
- Pouze chromozóm 3B může být izolován z hexaploidní pšenice se standardním karyotypem (cv. Chinese Spring)



Třídění chromozómů ze speciálních linií

- Hexaploidní pšenice toleruje aneuploidii
- Příbuzný chromozóm v každém subgenomu (A, B nebo D) může kompenzovat ztrátu homoeologního chromozómu nebo ramene

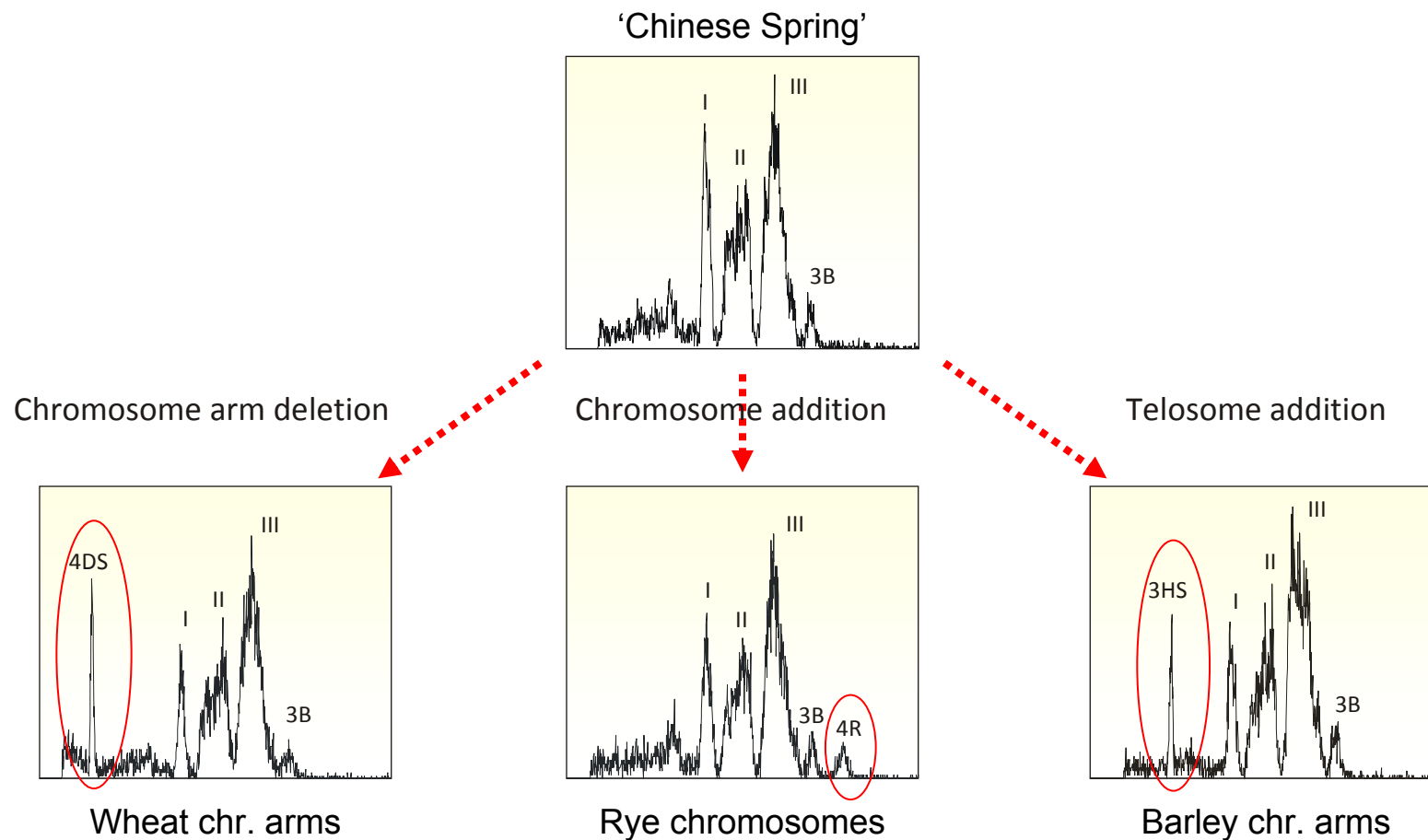
B genome chromosomes:



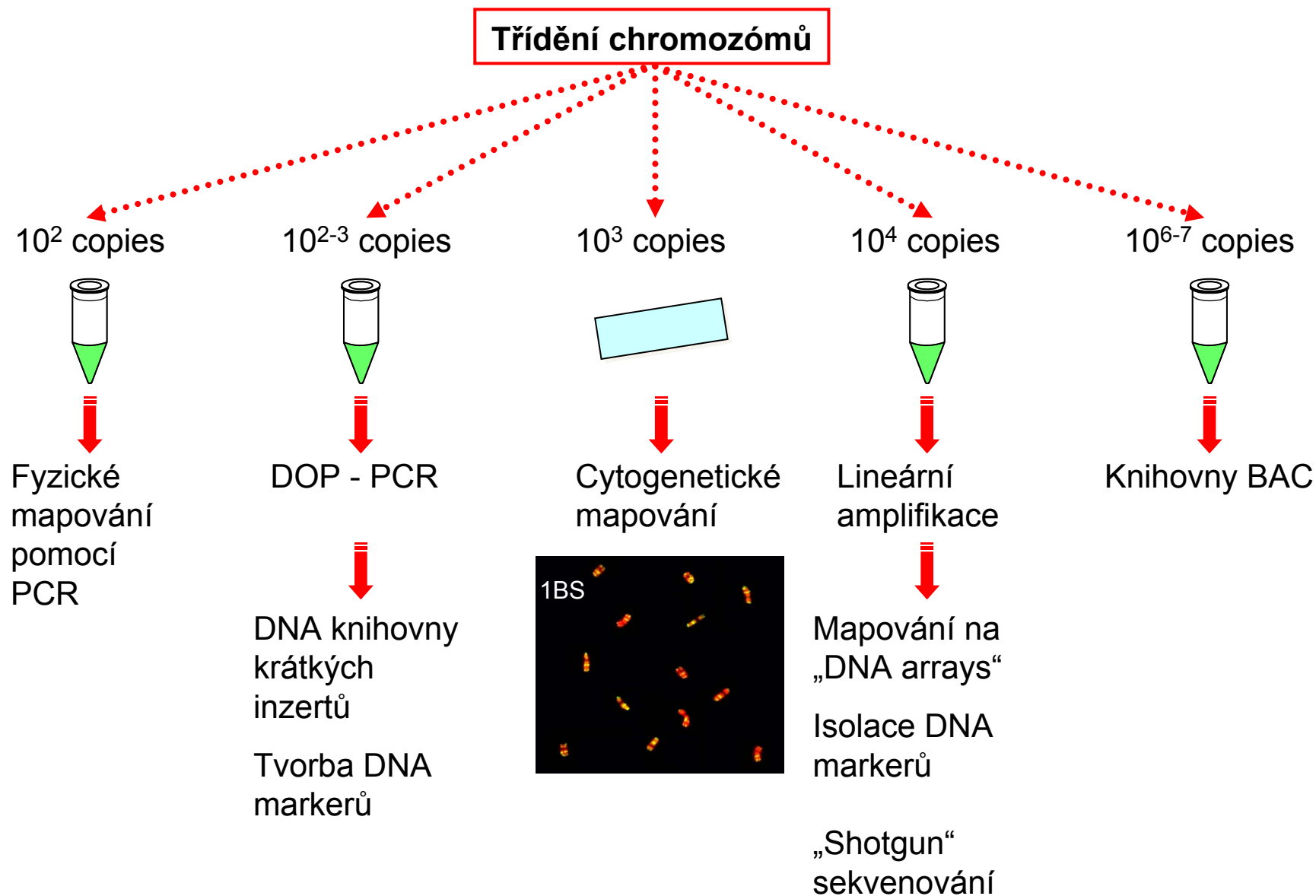
1BS: ~ 315 Mb (~ 1.9 % 1C)

Izolace specifických chromozómů/ramen

- Polyploidní pšenice toleruje aneuploidii a navíc má schopnost udržovat chromozómy jiných genomů rodu *Triticeae*



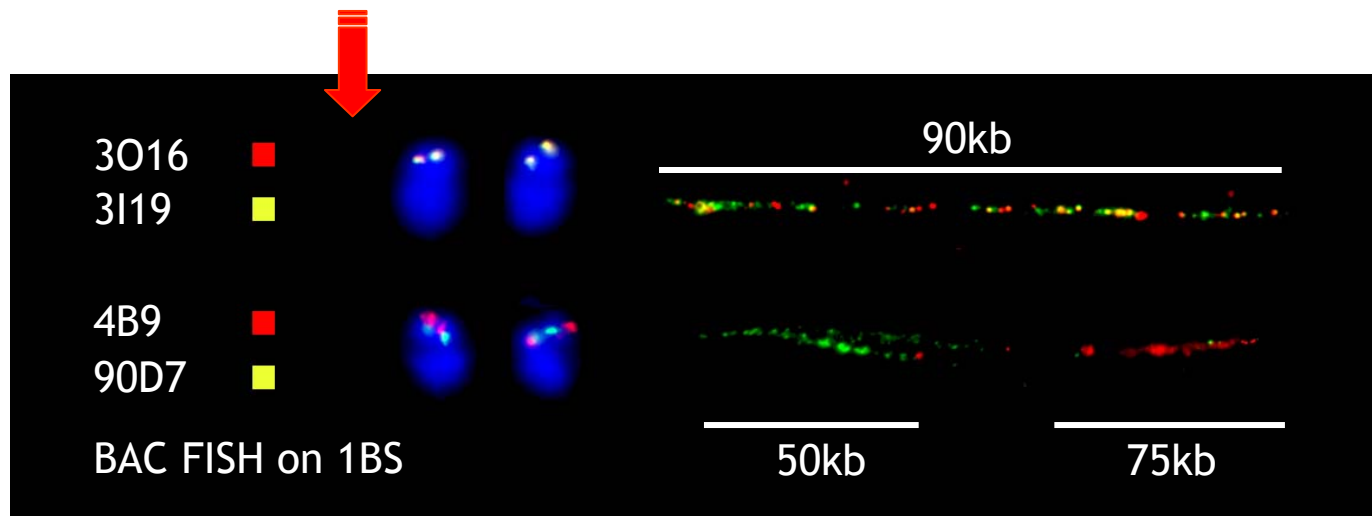
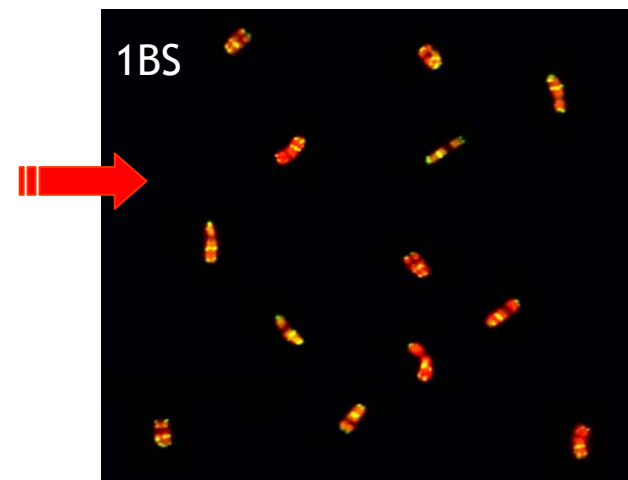
Portfolio aplikací tříděných chromozómů



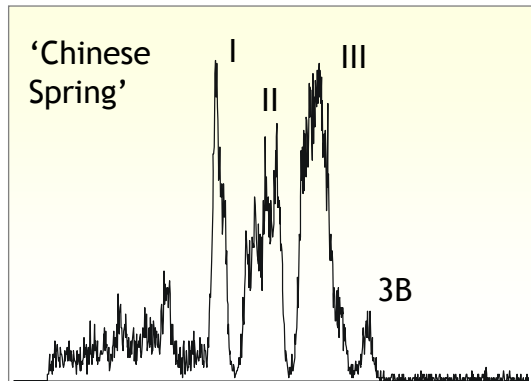
Cytogenetické mapování

Tříděné chromozómy jsou ideálními objekty pro značení pomocí FISH:

- Vysoká kapacita (mapování na velkých populacích chromozómů)
- Vysoká citlivost (localizace krátkých sekvencí DNA ~1-2kb)
- Vysoké prostorové rozlišení

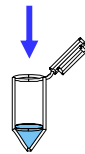


Chromozómově-specifické knihovny BAC



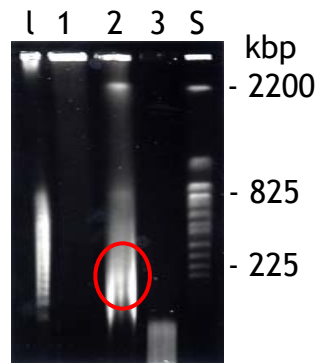
Chromosome analysis and sorting

5 x 10⁶ tříděných chromozómů (~6 týdnů třídění)



Částečné štěpení

Velikostní selekce - PFGE



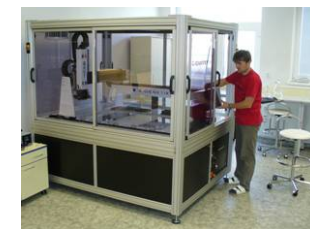
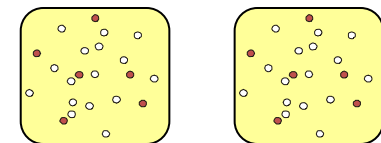
Tvorba knihoven BAC:

- Množství DNA (1-5 µg DNA)
- Vysoká kvalita DNA (HMW)
- Vysoká účinnost klonování
- Velikost inzertů (50 - 250 kbp)

Transformace do *E. coli*

Ligace do defosforylovaného BAC vektoru

Kolonie



Uspořádávání do kultivačních misek

Šafář et al., Plant J. 39: 968, 2004



Tvorba „clone-based“ fyzické mapy

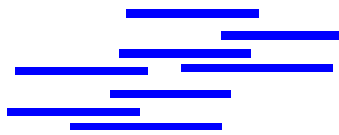
Konstrukce knihovny BAC



Extrakce BAC DNA



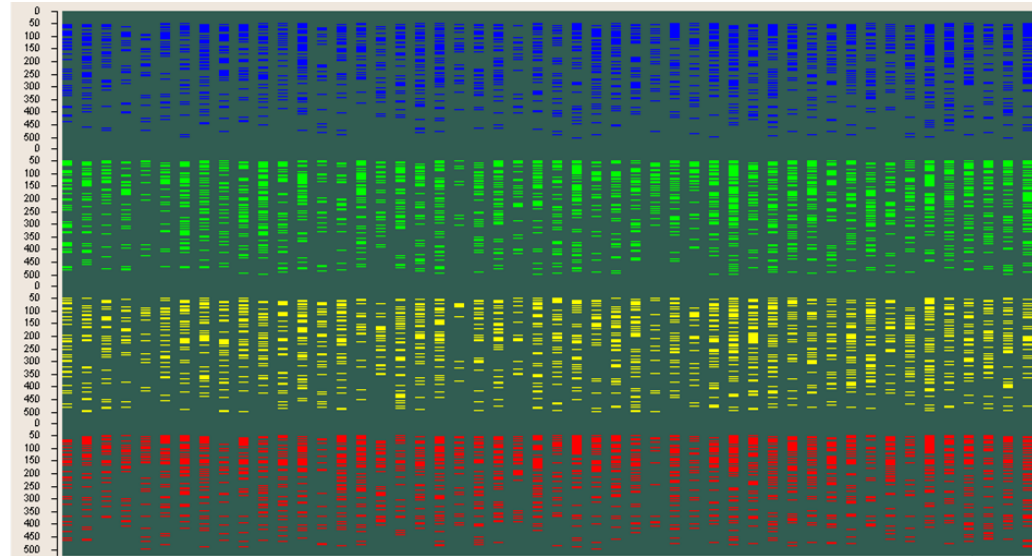
Štěpení 5 restričními enzymy



Fluorescenční značení (SNaPshot kit)



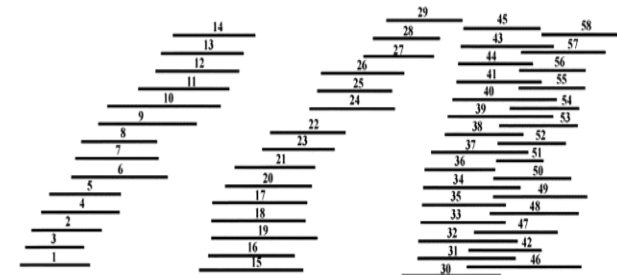
<http://olomouc.ueb.cas.cz/>



Elektroforéza (ABI3730)

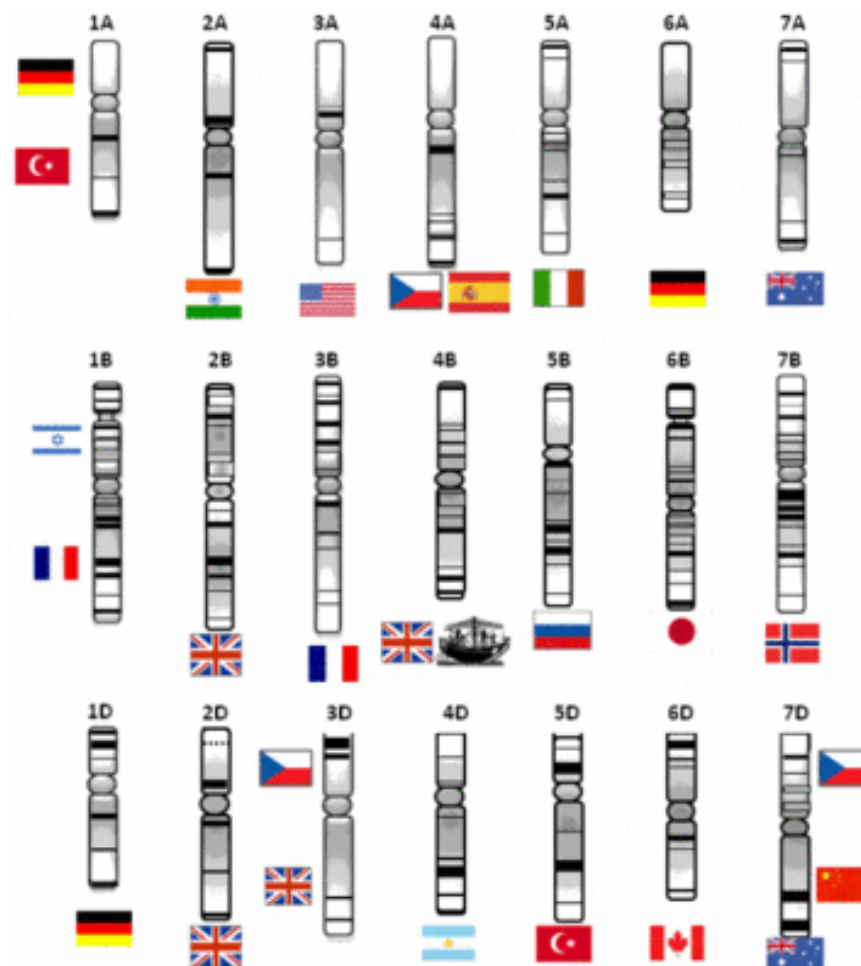


Vytváření kontigů (Genoprofiler, FPC)



Sekvenování všech pšeničných chromozómů

- Sestavení „low-copy“ a genových sekvencí
- Zjištění virtuálního pořadí genů
- Usnadnění ukotvení fyzických map a posičního klonování
- Poskytnutí sekvencí komunitě šlechtitelů
- Mezinárodní konsorcium
- Jednotlivé pracoviště se zabývají různými chromozómy/rameny



Závěry

- Třídění pomocí průtokové cytometrie může být použito k rozdělení jaderných genomů obilovin na jednotlivé chromozómy nebo ramena
- Na chromozómech založená strategie umožňuje cílenou a efektivní analýzu komplexních a polyploidních genomů
- Tato strategie umožňuje vývoj celogenomové fyzické mapy pro pšenici
- Na chromozómech založená strategie umožňuje rozdělení práce a nákladů díky mezinárodní spolupráci

