



Szent István Egyetem  
HALGAZDÁLKODÁSI TANSZÉK



# GÉNTÉRKÉPEZÉS ÁLLATOKON 1

Dr. Kovács Balázs





# Mi a géntérképezés ?

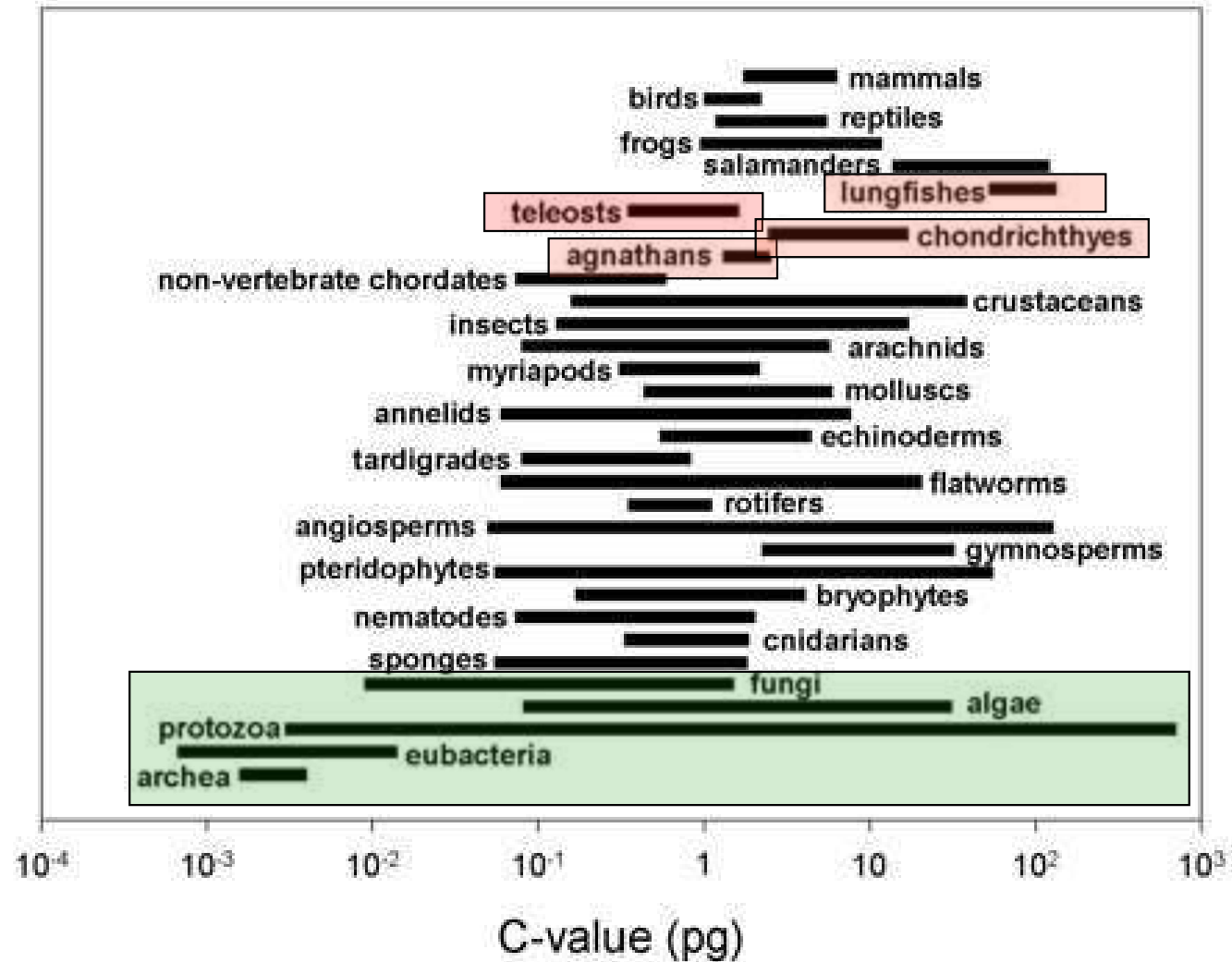
A géntérképezés során a különböző tulajdonságok, kromoszóma elemek, gének és QTL-el egymástól való távolságát, a genomban való viszonylagos elhelyezkedésüket határozzuk meg anélkül, hogy valóban megszekvenálnánk a DNS-t.

Jelentős szerepe van a gének és génfunkciók összekapcsolásában, vizsgálatában.



# Genomok mérete 3.

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék





# Genomok mérete 1.

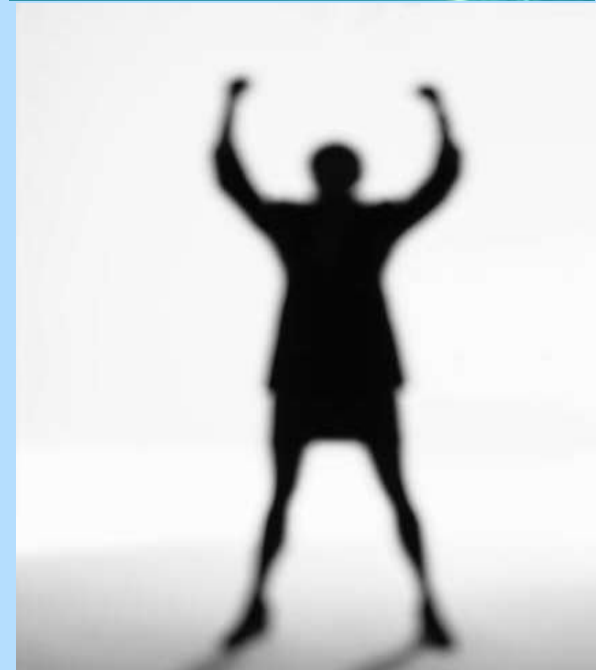
A legkisebb állati genom mérete :0.02pg

Növényi parazita nemtóra  
(*Pratylenchus coffeae*),



Az emberi genom mérete: 3.5pg

(*Homo sapiens*)







## Genomok mérete 2.

A legkisebb gerinces és hal genom mérete: 0.35pg

Zöld pöttyös bőröndhal  
(*Tetraodon fluviatilis*)



A legnagyobb állati genom és hal genom mérete: 132.83pg

Márványos tüdőshal  
(*Protopterus aethiopicus*)

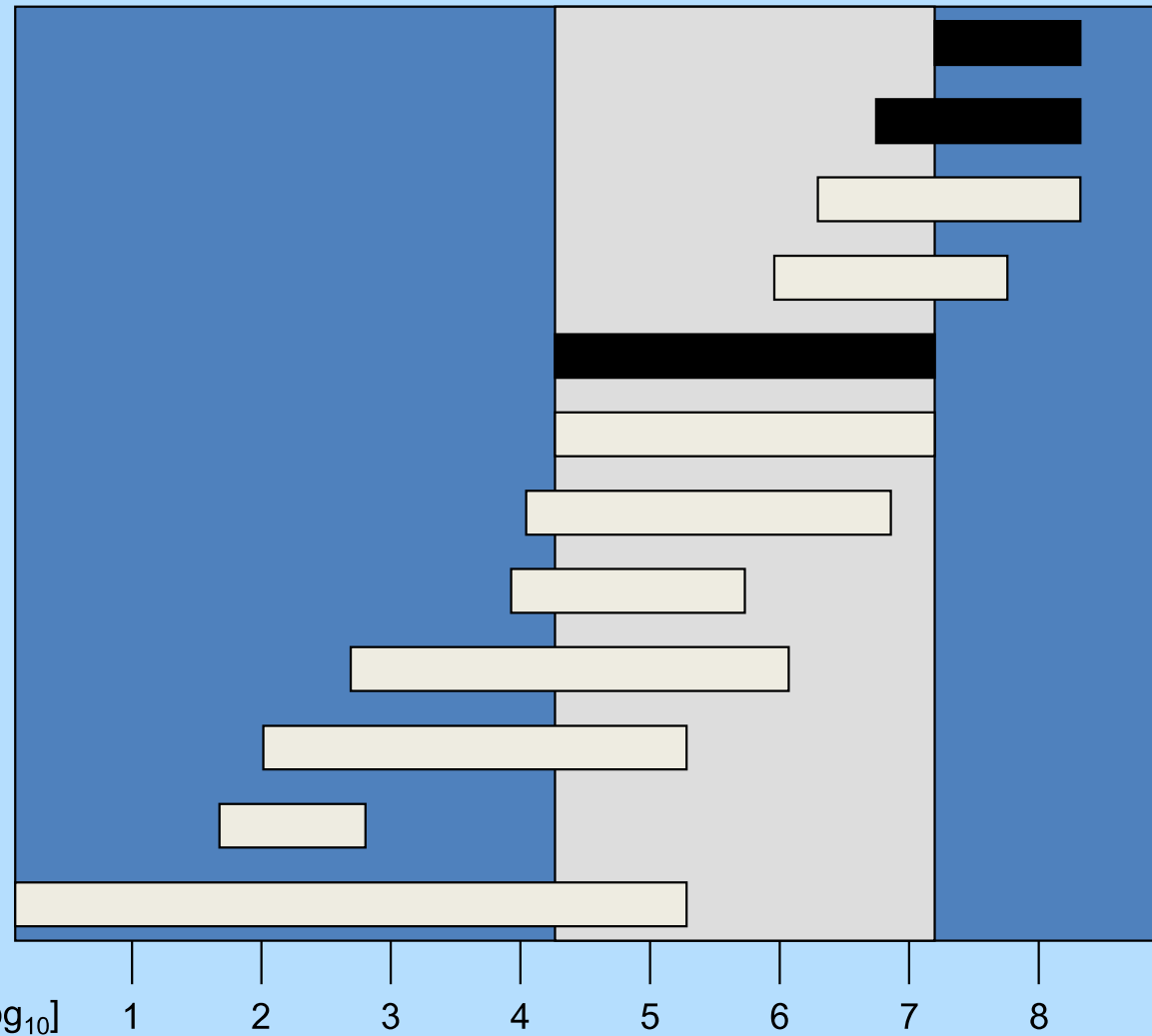




# A géntérképezési technikák felbontóképessége

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

- Teljes kromoszóma
- Kromoszoma régió
- Metafázisos FISH
- Genetikai kapcsoltság
- Radiációs hibridek
- STS-content (YAC)
- PFGE
- Interfáisos FISH
- YAC klónozás
- BAC klónozás
- STS és EST térkép
- Genom szekvenálás



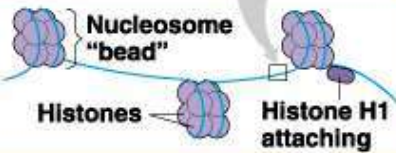


# Kromatin állomány szerveződése



DNA double helix

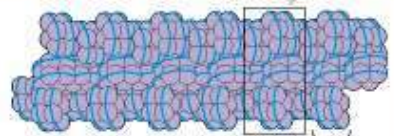
2 nm



11 nm



(a) Nucleosomes



30 nm



Nucleosome

(b) 30-nm

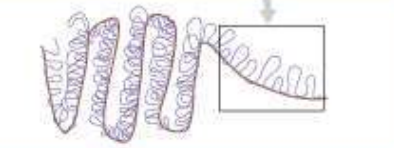


Protein scaffold

300 nm



(c) Looped



700 nm



(d) Metaphase chromosome

1400 nm



nukleoszóma

szolenoid

hurok struktúra

kromatin köteg

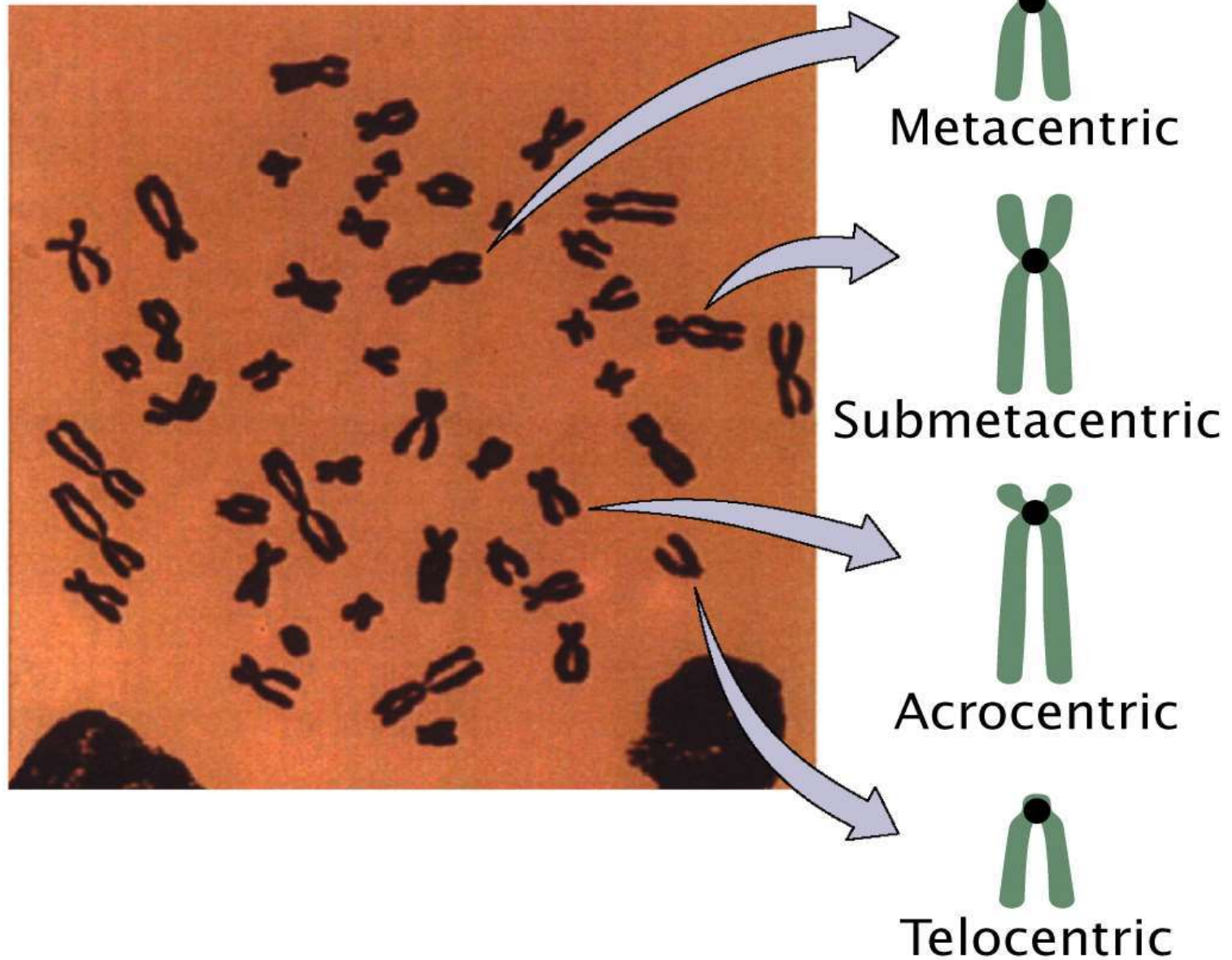
kromoszóma





Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

# Nomenklatúra 1

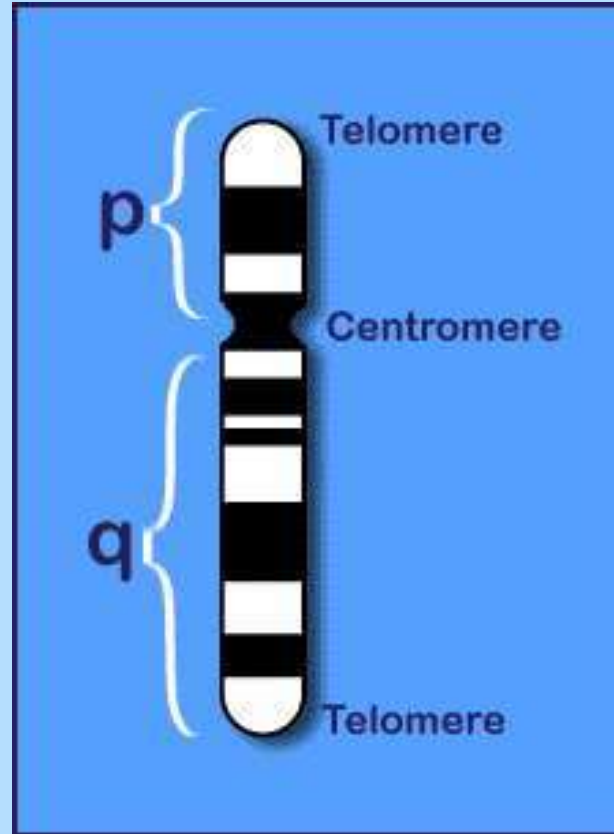


Fig\_02-08 *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company

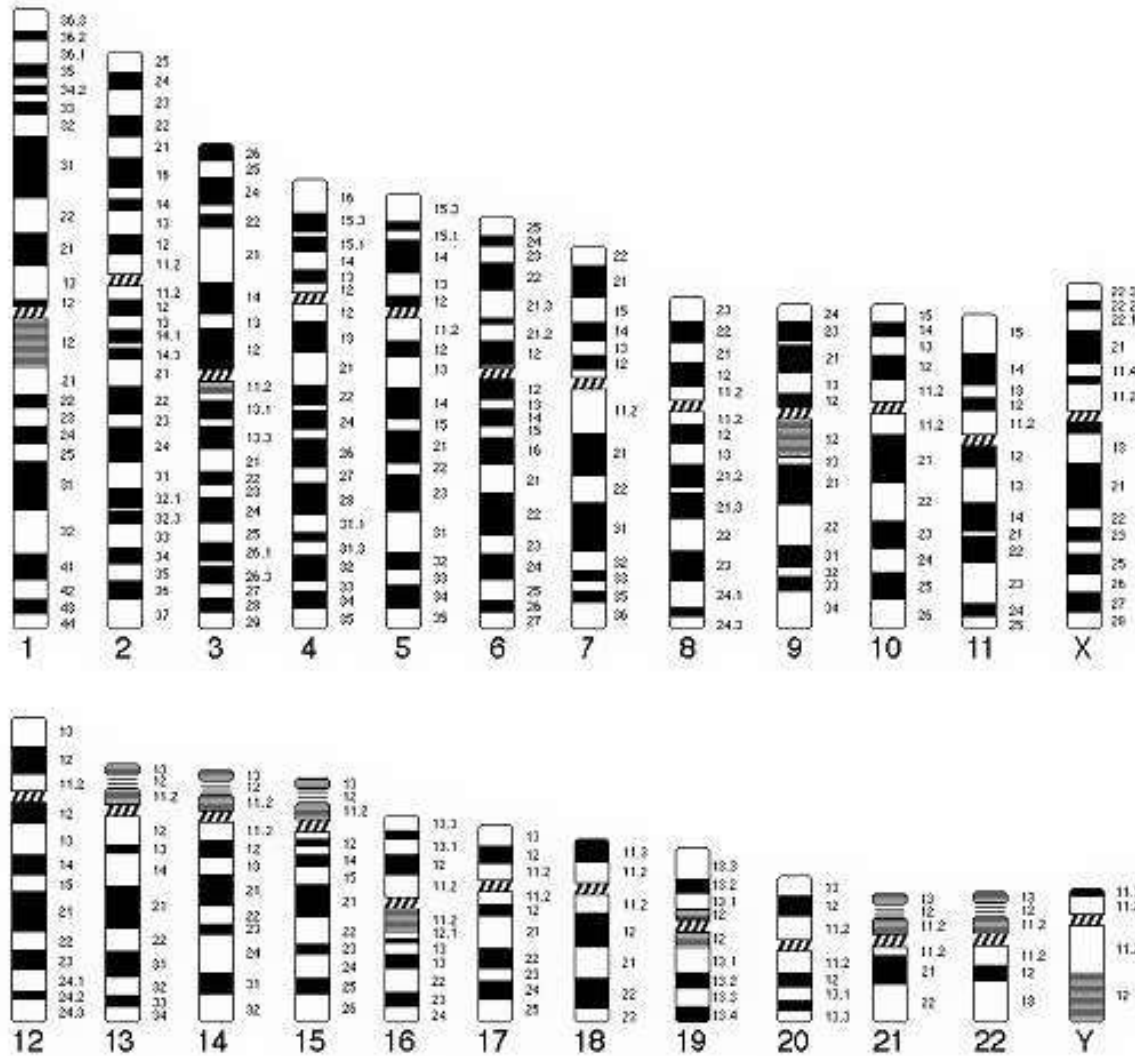


# Nomenklatúra 2

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



# Idiogram

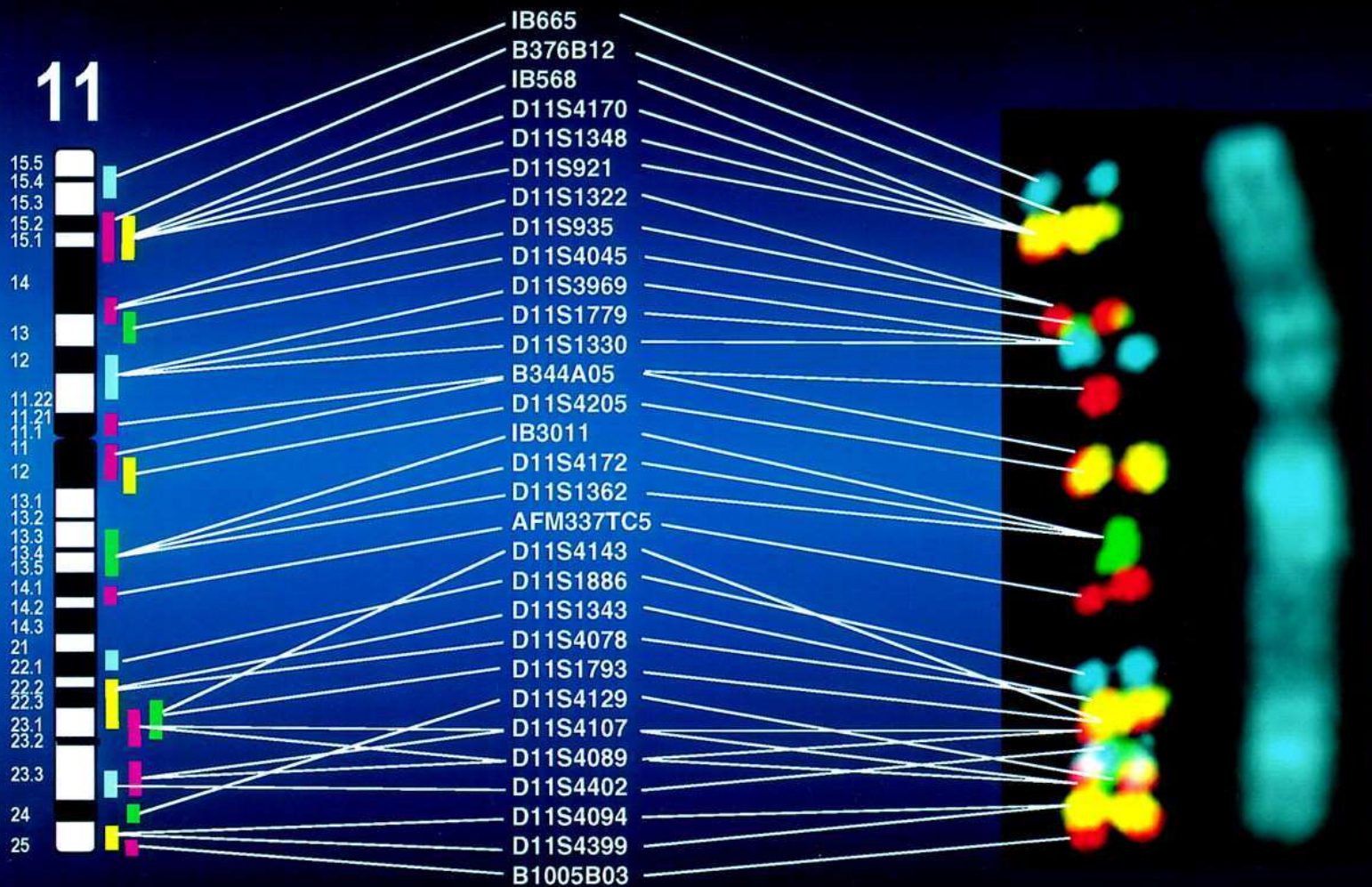


Humán Kromoszóma készlet G-staining





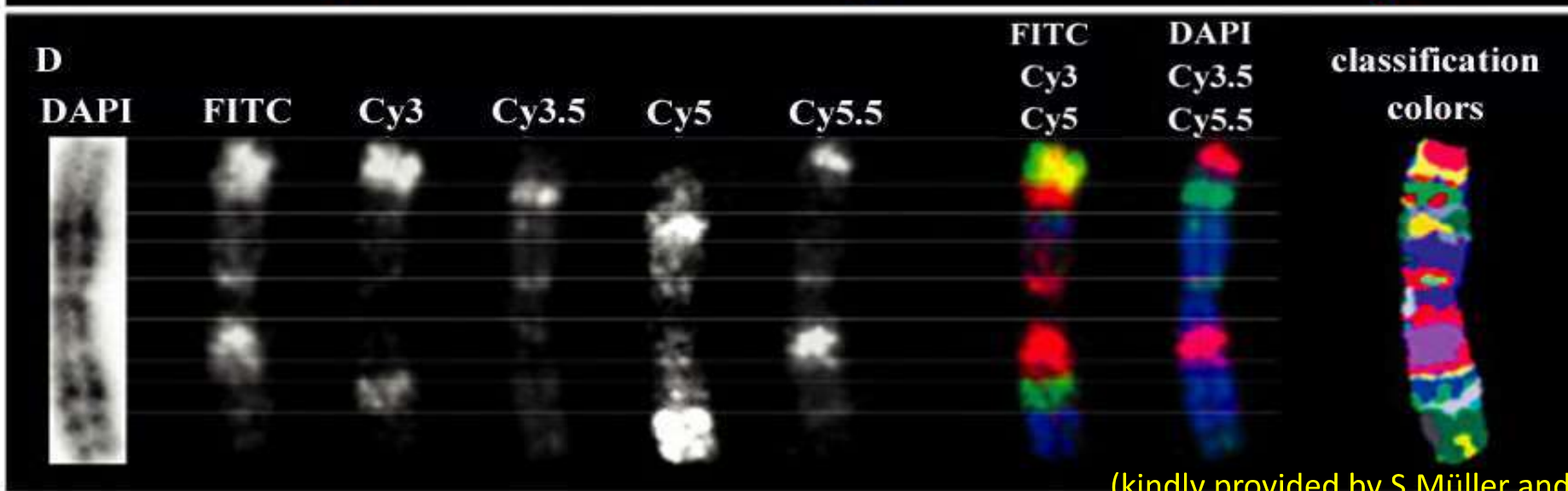
Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék







# Humán kromoszóma készlet, gibbon kromoszóma FISH



(kindly provided by S. Müller and



Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

# RESTRIKCIÓS térképezés



# RESTRIKCIÓS TÉRKÉPEZÉS

Prokarióták és Kisebb DNS darabok térképezésére :

- Fragmentek
- Transzpozonok
- Plazmidok
- Fágok
- Megaplazmidok
- Bakteriális genomok

Vizsgálatára használják elsősorban

Kimutatás:

- Agaróz elektroforézissel
- PAGE
- Kapilláris elektroforézis

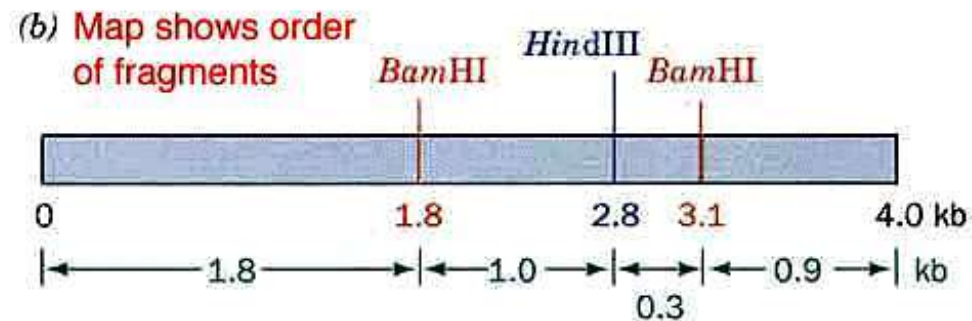
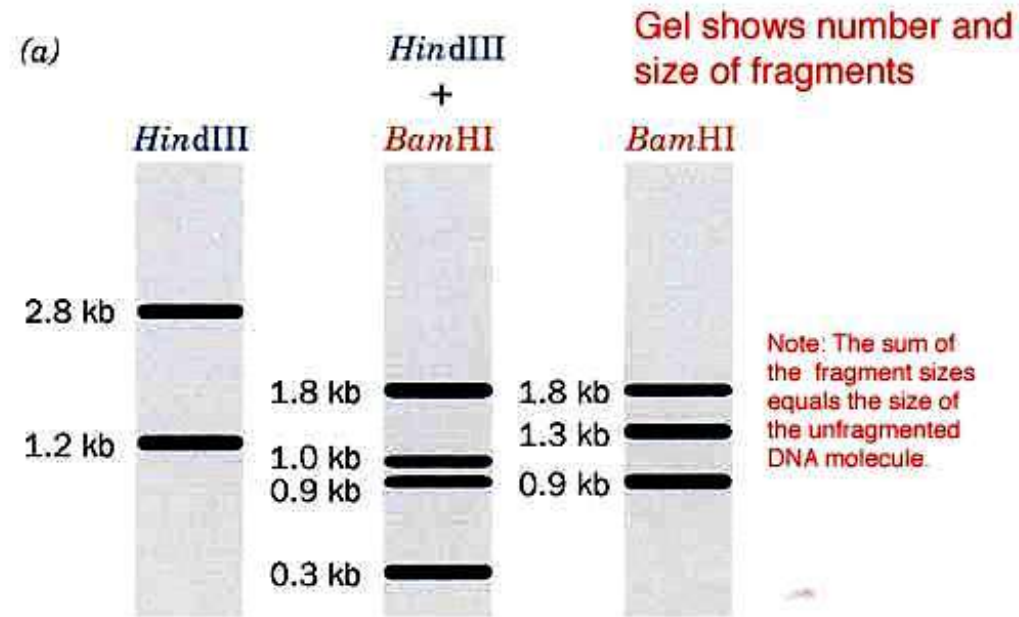


## RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZOK

	I-es típus	II-es típus (98%)	III-as típus
példa	EcoK	EcoRI	EcoPI
felismerőhely	AAC(N6)GTGC	GAATTC	AGACC
hasítási hely	~1 kb-ra	5'-foszfát	24-26 bp-ra
metiláció	A <sup>Mn6</sup> AC(N6)GTGC	GA <sup>m</sup> ATTC	AG <sup>m</sup> ACC
nukleáz és metiláz	egy-egy alegység ( <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> gén)	külön enzim	egy-egy alegység
hasítás kofaktora	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
metiláció kofaktora	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	S-AdoMet	S-AdoMet

- 3000 II-es enzim, >220 felismerőhely (750 baktérium törzsből)
- izoskizomérek:

# RESTRIKCIÓS TÉRKÉPEZÉS

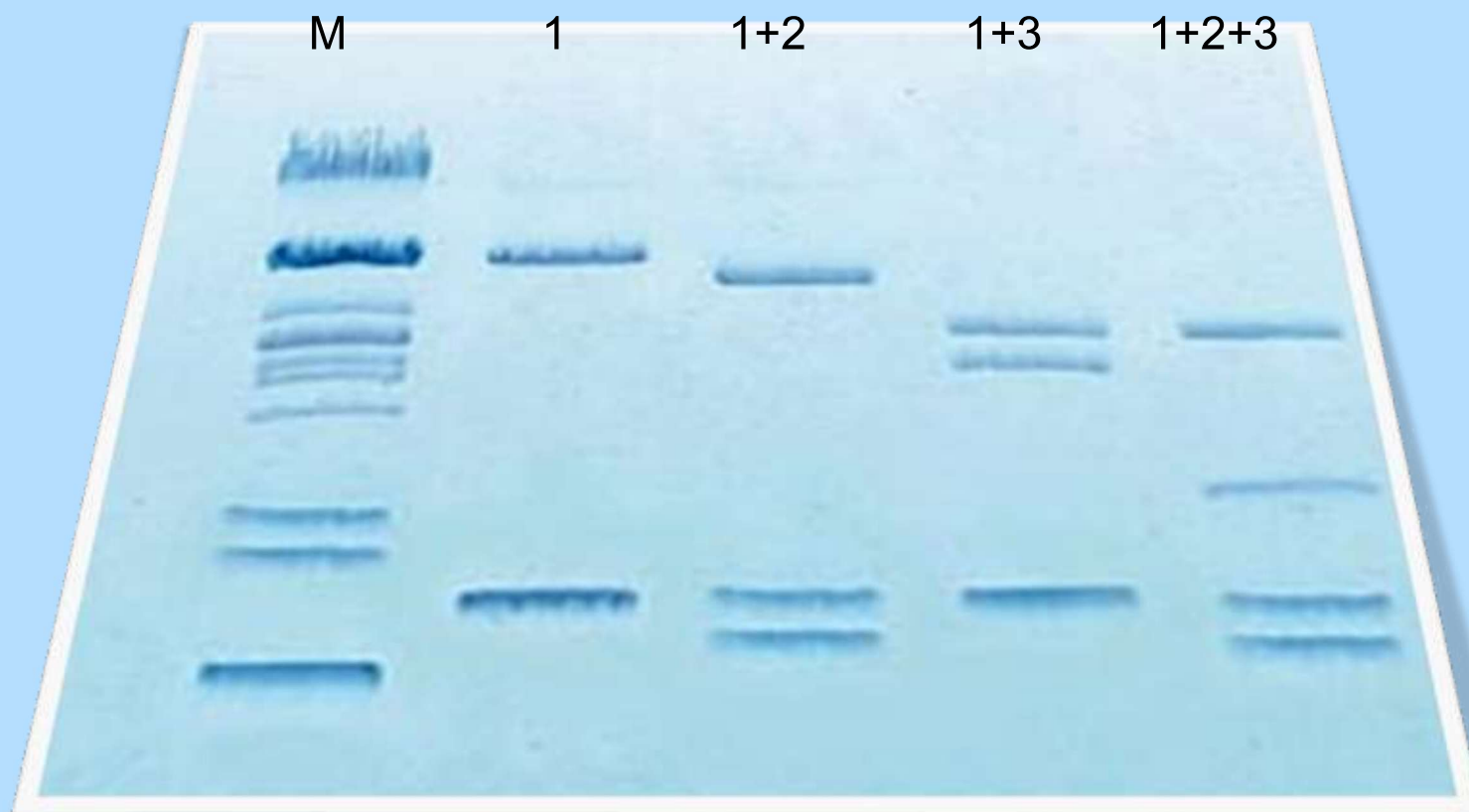






# RESTRIKCIÓS TÉRKÉPEZÉS

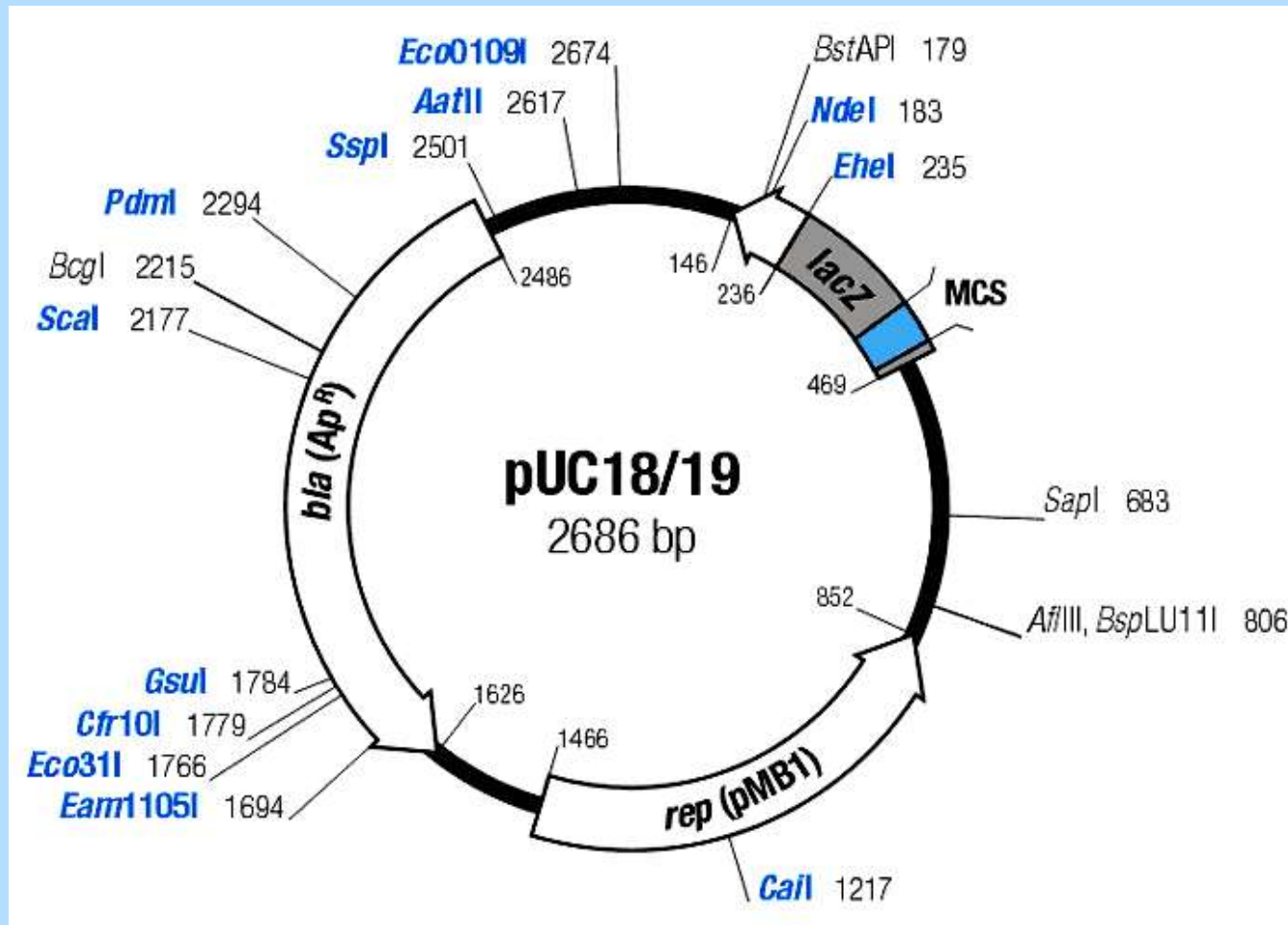
Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék





# RESTRIKCIÓS TÉRKÉPEZÉS

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék







## Programmok restriktációs hasítóhely kereséshez „Térképezéshez”

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

- TACG V3  
<http://athena.bioc.uvic.ca/tacg3/formt.html>
- NEBcutter V2.0  
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- PlasMapper Version 2.0  
<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>
- Restriction Map Generator  
<http://www.algosome.com/resources/restriction-map/enzyme-digest.php>

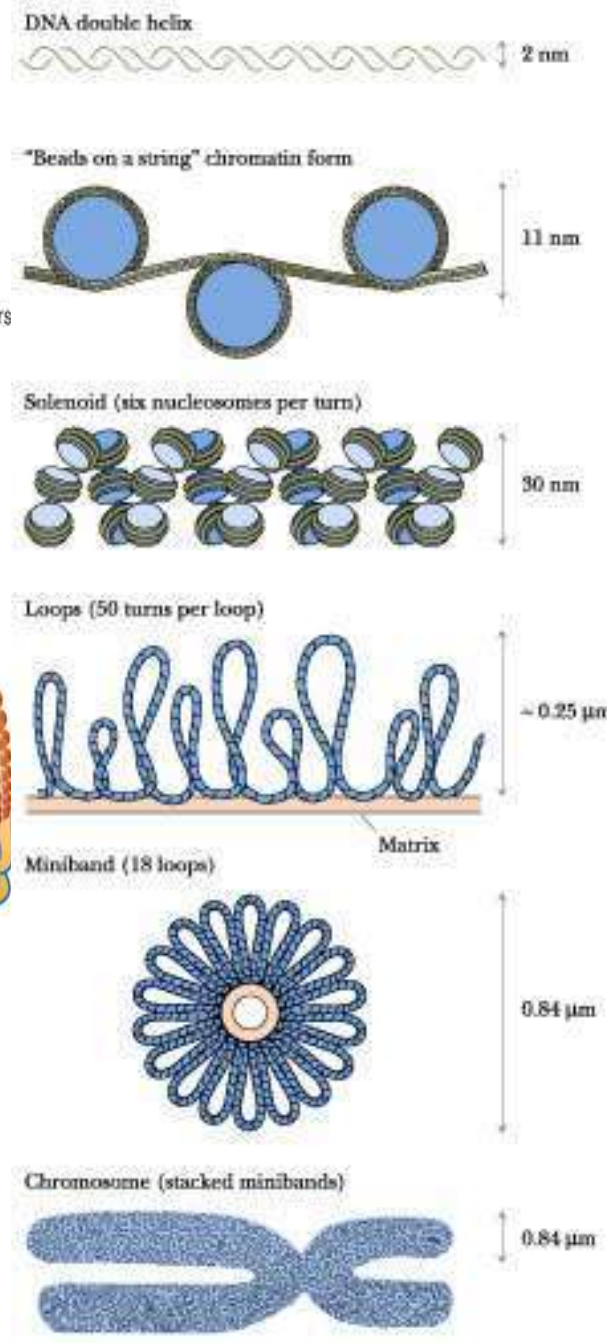
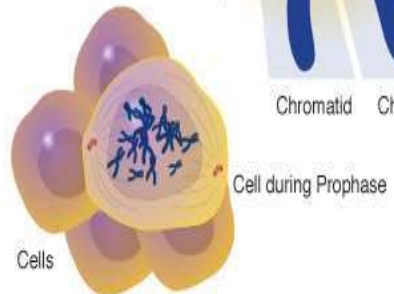
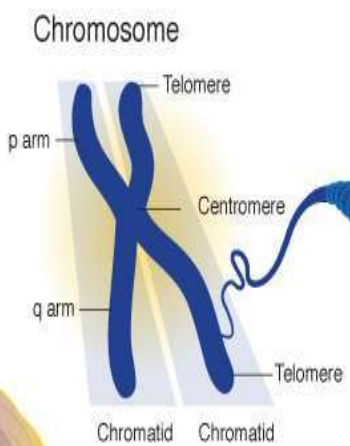
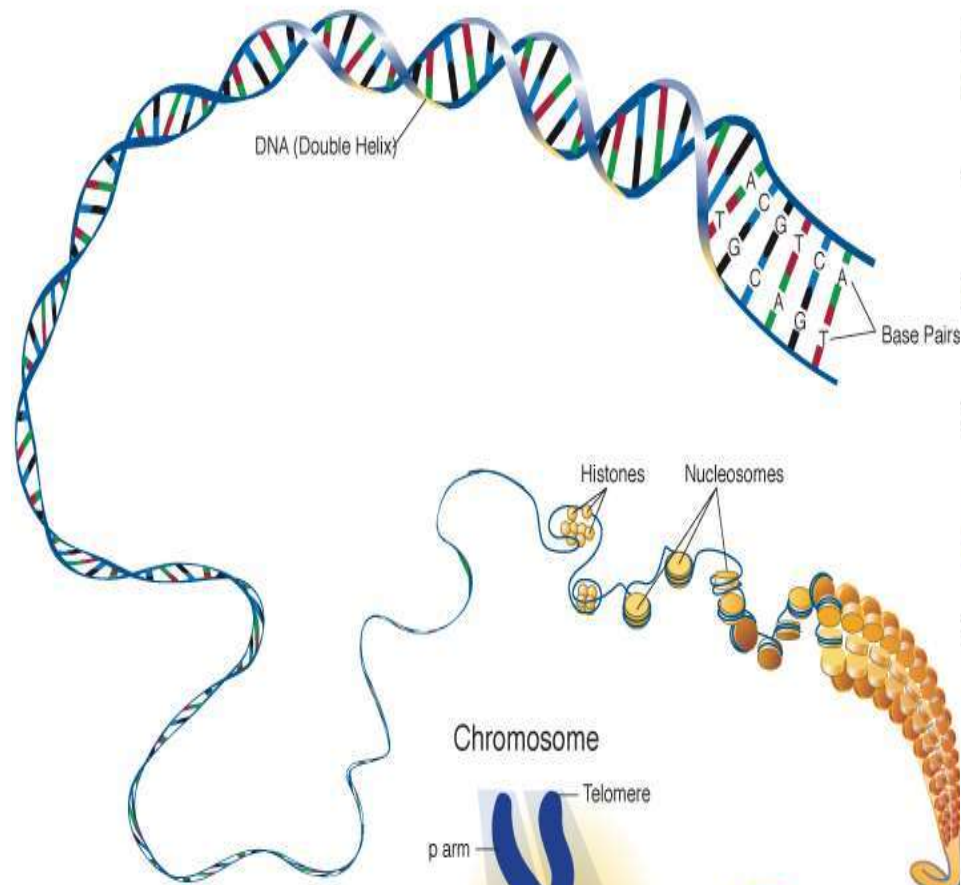


Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



# KAPCSOLTSÁGI vagy REKONBINÁCIÓS térképezés

Eukarióta szervezetekben alkalmazható



Base pairs per turn	Packing ratio
10	1
80	6-7
1200	~40
60,000	680
$\sim 1.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^4$
18 loops/miniband	$1.2 \times 10^4$



# Mendel törvényei

## Első törvény: (Uniformitás törvénye)

homozigóta szülők utódnemzedékének összes tagja genotípusában és fenotípusában is egyforma.

## Második törvény: (a szegregáció, vagy hasadás törvénye)

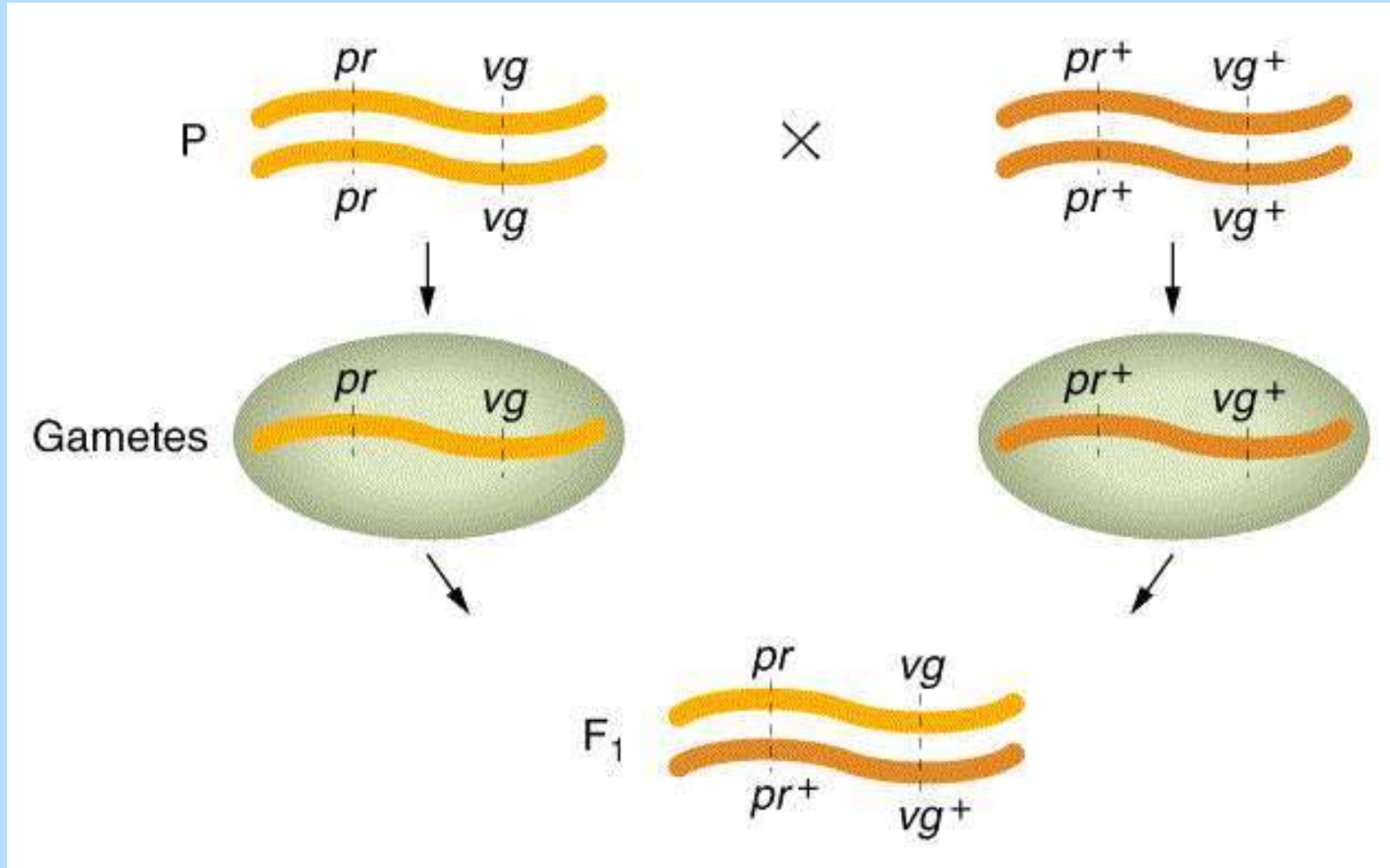
Egy gén pár két tagja egymástól szétválva jut az ivarsejtekbe, így a gaméták egyik fele a pár egyik, a gaméták másik fele a pár másik tagját hordozza. (az első utódnemzedékben a szülői tulajdonságok nem olvadnak össze, hanem ezt a nemzedéket továbbkeresztezve változatlanul megjelennek a második utódnemzedékben)

## Harmadik törvény: (A független kombináció törvénye)

Két gén esetén mindkét gén alléljei kettéválnak ivarsejtképzéskor, de az egyik szétválása nem függ a másiktól.

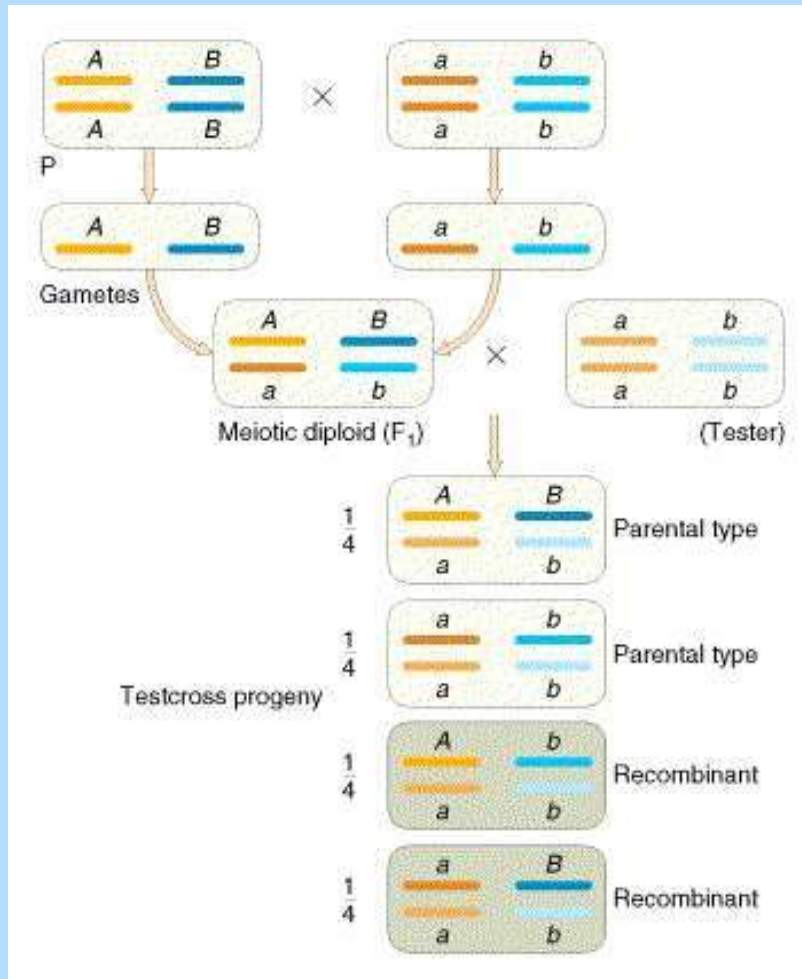
(Ez csak akkor érvényes, ha a gének „nincsenek fizikailag összekapcsolva” vagyis különböző kromoszómákon vannak, vagy azonos kromoszómán egymástól elég távol helyezkednek el.)

## Azonos kromoszómán levő allélpárok kapcsolt öröklődése



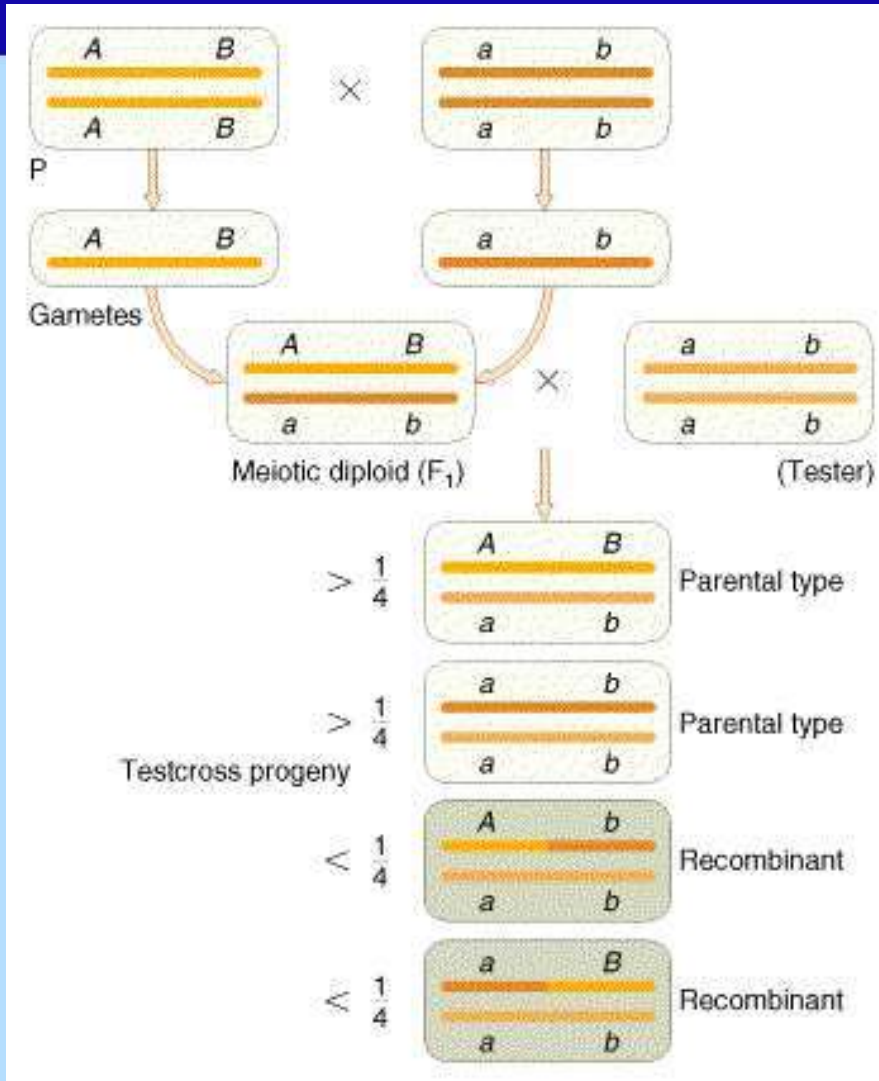


# Kromoszómák újra rendeződése (Interkromoszómális rekombináció)



**Az interkromoszómális (független) rekombináció mindig 50 százalékos rekombinációs gyakoriságot eredményez.**

# Intrakromoszómális rekombináció



**Intrakromoszómális rekombináció esetén a rekombinánsok aránya rendszerint kevesebb mint 50 százalék.**





Egymáshoz tartozó lókuszok alléljainak újra kombinálódását figyelték meg igen kis százalékban

## Rekombináció:

Olyan haploid génekombináció létrejött, amely különbözik a haploid szülői génekombinációtól.

## Szükséges eszköztár:

- Vizsgálandó tulajdonságok, markerek, gének, allélok, stb.
- Rekombináns egyedek (azaz keresztezés F2 generáció).



# Thomas Hunt Morgan Drosophila kísérlete I.

szemszín:  $pr$  (purple = lila) és  $pr^+$  piros

szárnyhossz:  $vg$  (vestigial = csökevényes) és  $vg^+$  normális

P  $prpr\ vgv$  nőstény x  $pr^+pr^+\ vg^+vg^+$  hím

F1  $prpr^+\ vgv^+$  nőstény x  $prpr\ vgv$  hím

F2 fenotípusa:  $pr^+\ vg^+$  1339

$pr\ vg$  1195

$pr^+\ vg$  151

$pr\ vg^+$  154

összesen: 2839



## T.H. Morgan Drosophila kísérlete II.

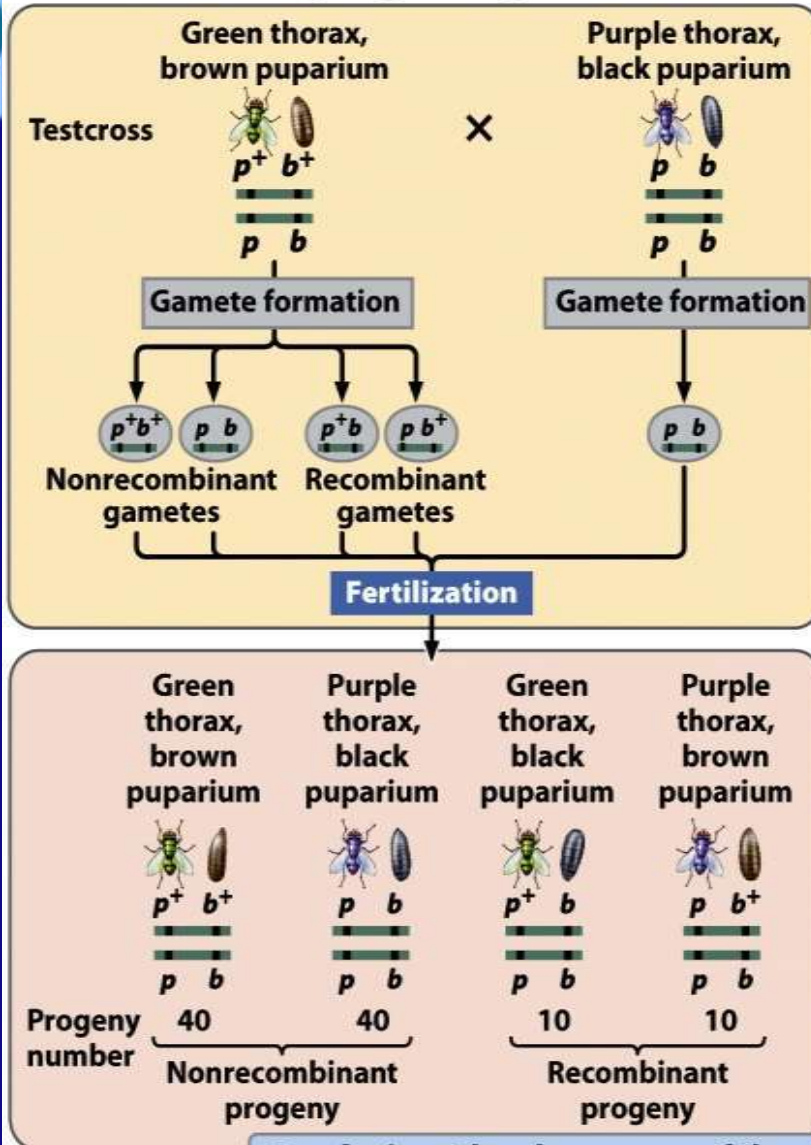
Felcserélt allél kombináció

P  $pr^+pr^+ vgvg$  nőstény x  $prpr vg^+vg^+$  hím

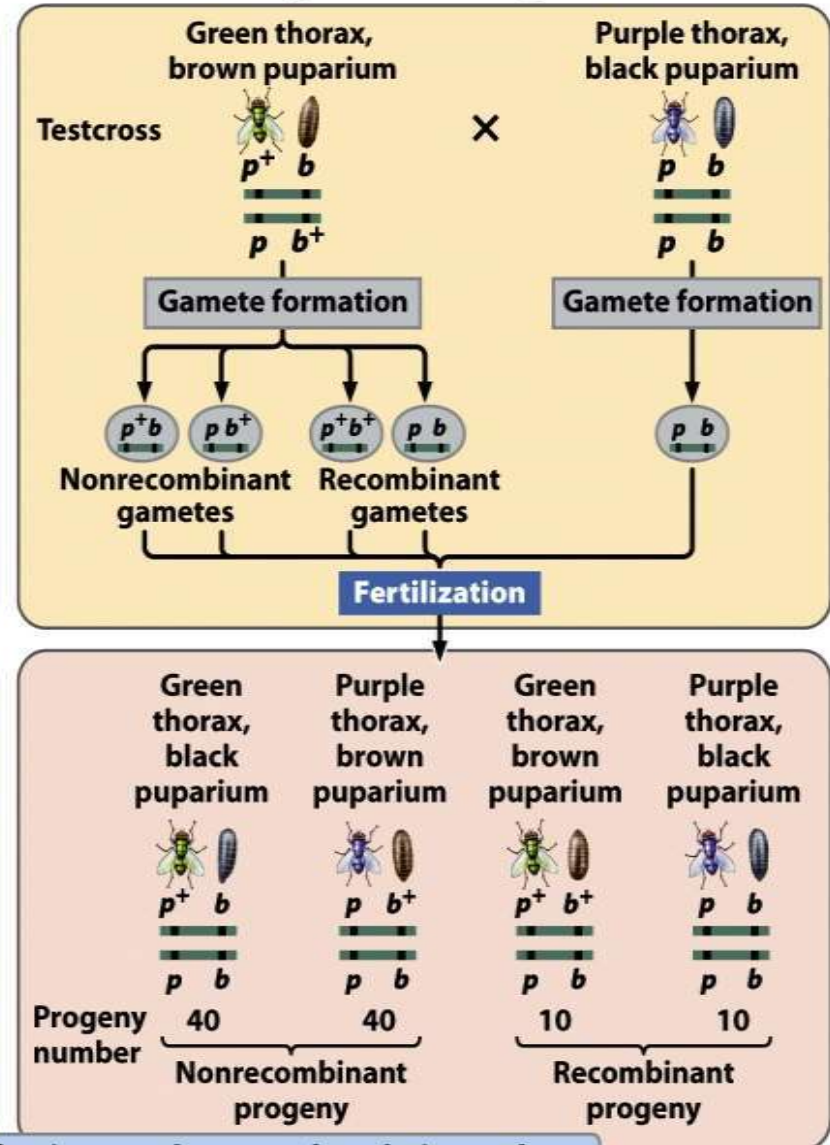
F1  $pr^+pr vg^+vg$  nőstény x  $prpr vgvg$  hím

Utódok	$pr^+ vg^+$	157
	$pr vg$	146
	$pr^+ vg$	965
	<u><math>pr vg^+</math></u>	<u>1067</u>
	összesen:	2335

### (a) Alleles in coupling configuration



### (b) Alleles in repulsion configuration

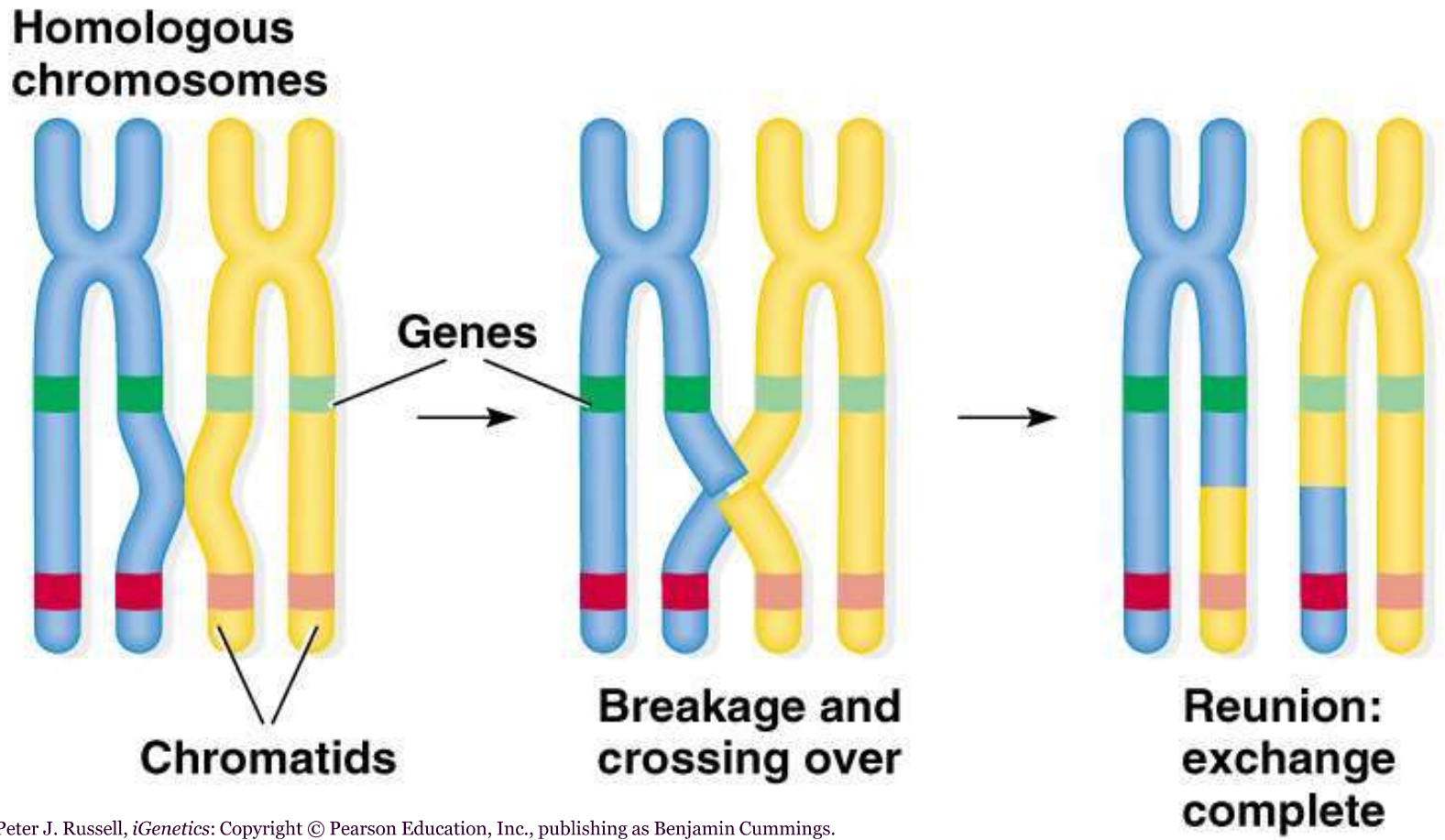


**Conclusion:** The phenotypes of the offspring are the same, but their numbers differ, depending on whether alleles are in coupling or in repulsion.

Figure 7-8  
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
© 2009 W. H. Freeman and Company



## Nem szülői (rekombináns) ivarsejtek keletkezése kapcsolt gének esetén



- Az egyed mindkét szülőtől egy homolog kromoszómát kap. Az átkereszteződés (crossing over) a homolog kromoszómák nem-testvér kromatidái között történik.
- új allél kombinációt eredményez.

## Az átkereszteződés valószínűsége távolság függő

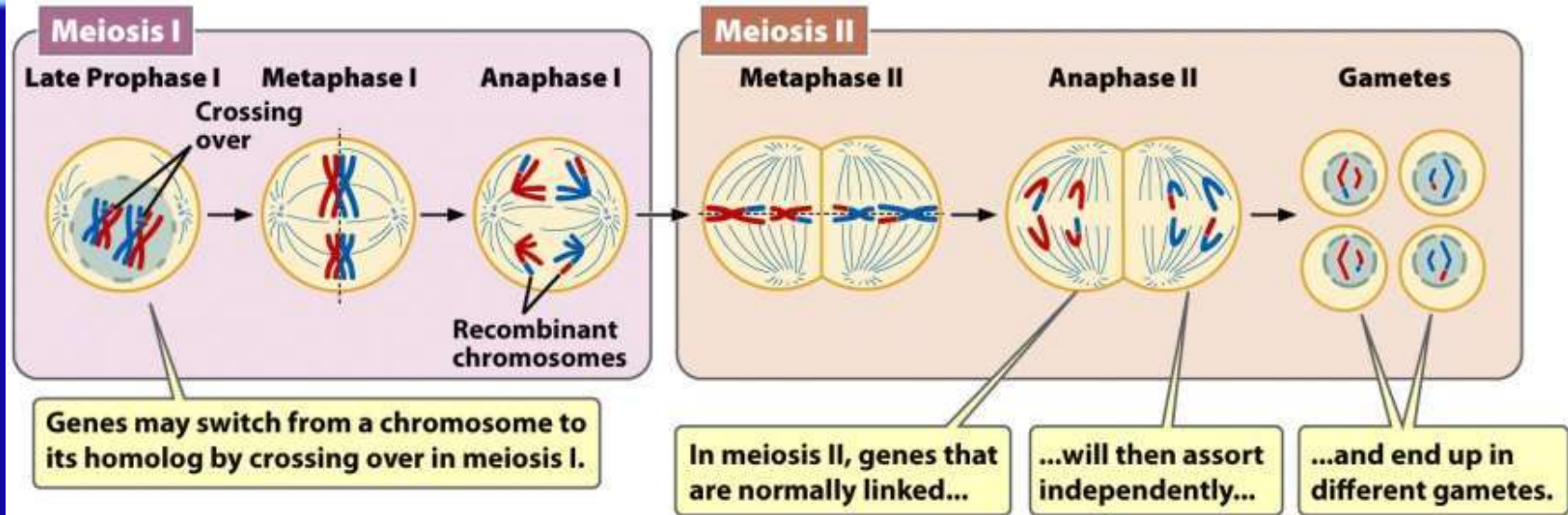


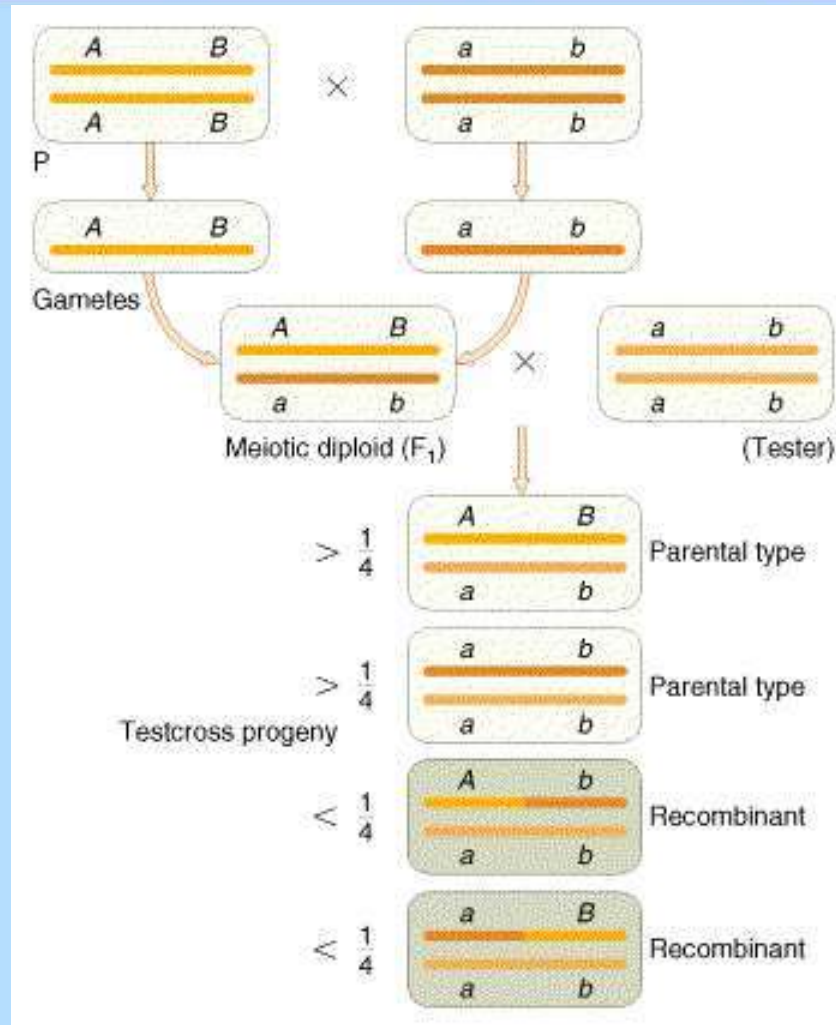
Figure 7-4  
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
© 2009 W. H. Freeman and Company

- **Minél távolabb van két gén a kromoszómán annál nagyobb valószínűséggel játszódik le átkereszteződés közöttük a meiózisos sorá**
- **A rekombinációs frekvenciát mérve a gének közötti távolságra következtethetünk.**
- 1% recombináns (0,01 gyakoriság) = 1 map unit (mu) vagy 1 cM (centimorgan-T.H. Morgan tiszteletére )  
Pl.: 12% recombináns (0,12 gyakoriság) = 12 mu vagy 12 cM

Általánosságban egy tipikus kromoszóma: 200 mu

Általánosságban egy tipikus gén = .01 mu or 60,000 nucleotides

## Kétpontos térképezés



A kimutatható kapcsoltság esetén a rekombinánsok aránya mindig kevesebb mint 50 százalék.





## Kétpontos térképezés

Ha tesztkeresztezésben a rekombinációs gyakoriság két gén esetén kisebb mint 50%, akkor a két gén ugyanazon kromoszómán kapcsoltan található.

Amennyiben a rekombinációs gyakoriság 50%, vagy nagyobb, a két gén nagy valószínűséggel nem kapcsolt, és különböző kromoszómákon helyezkedik el, de az is lehet, hogy azonos kromoszómán de nagyon távol található.



Azonos kromoszómán egymástól távol elhelyezkedő mendeli lókuszek nem mutattak kapcsoltságot.

**5.6. táblázat.** A Mendel által vizsgált hét tulajdonság kromoszomális lokalizációja

Tulajdonság	Kromoszóma
Maghéj színe (sárga–zöld)	1
Virágszín (lila–fehér)	1
Hüvelyfelszín (sima–ráncos)	4
Virágok helyzete (oldalsó–végálló)	4
Szár (magas–alacsony)	4
Hüvely színe (sárga–zöld)	5
Mag alakja (kerek–szögletes)	7



## A rekombinációs térképezés lépései

1., *Tiszta keresztezések*

P legalább két génre *ismert, de egymástól eltérő genotípusú szülők, vagy szülői vonalak*

2., *F1 tesztkeresztése*

*F1 egyed* x *ismert genotípusú egyed (teszter)*

3., *F2 utódokban a szülői és rekombináns utódok számolása*

*pr<sup>+</sup> vg<sup>+</sup>* 157

*pr vg* 146

*pr<sup>+</sup> vg* 965

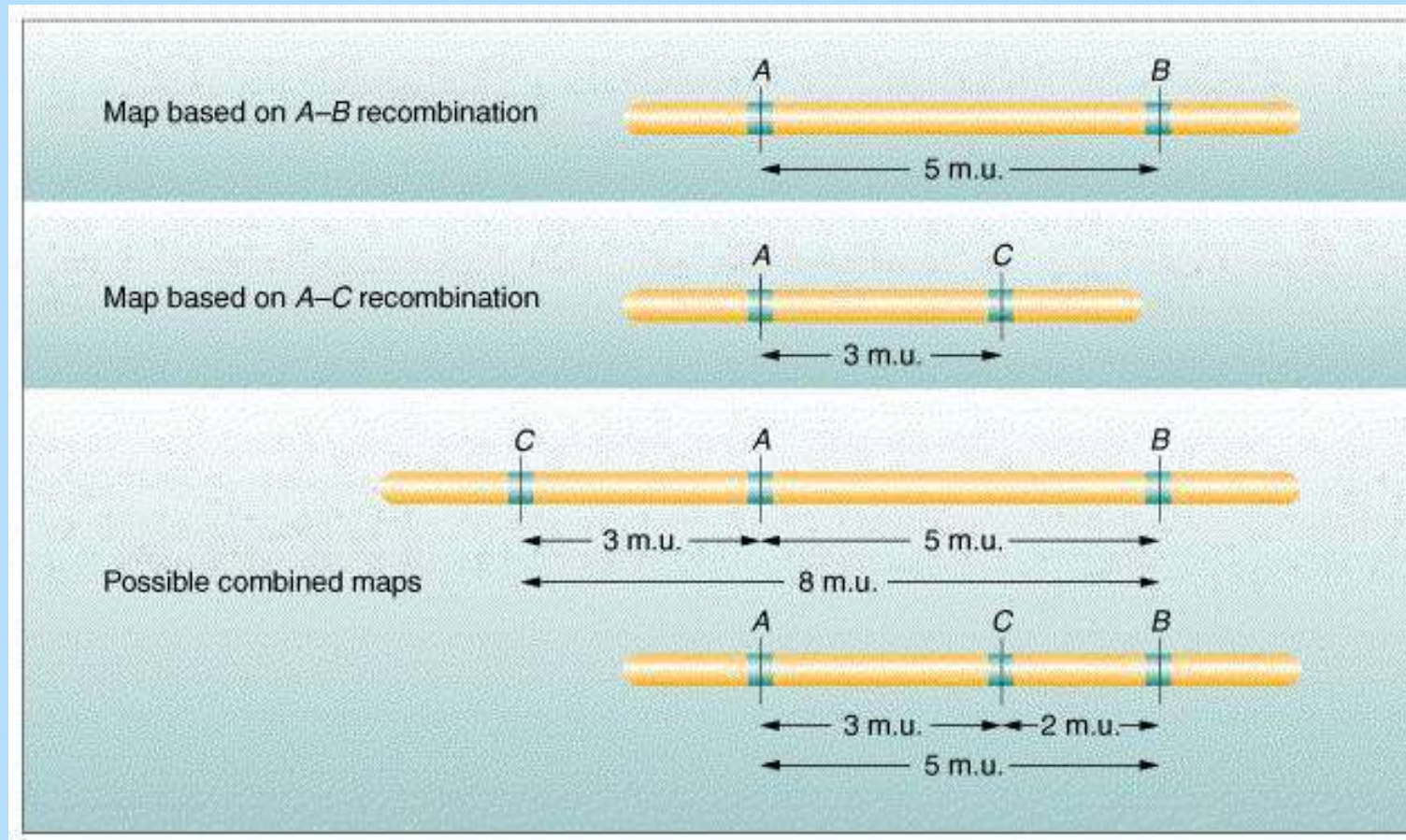
*pr vg<sup>+</sup>* 1067

összesen: 2335

4., *RF számolás: 303 : 2335 x 100 = 12,9 cM*



## A térképtávolságok additívak



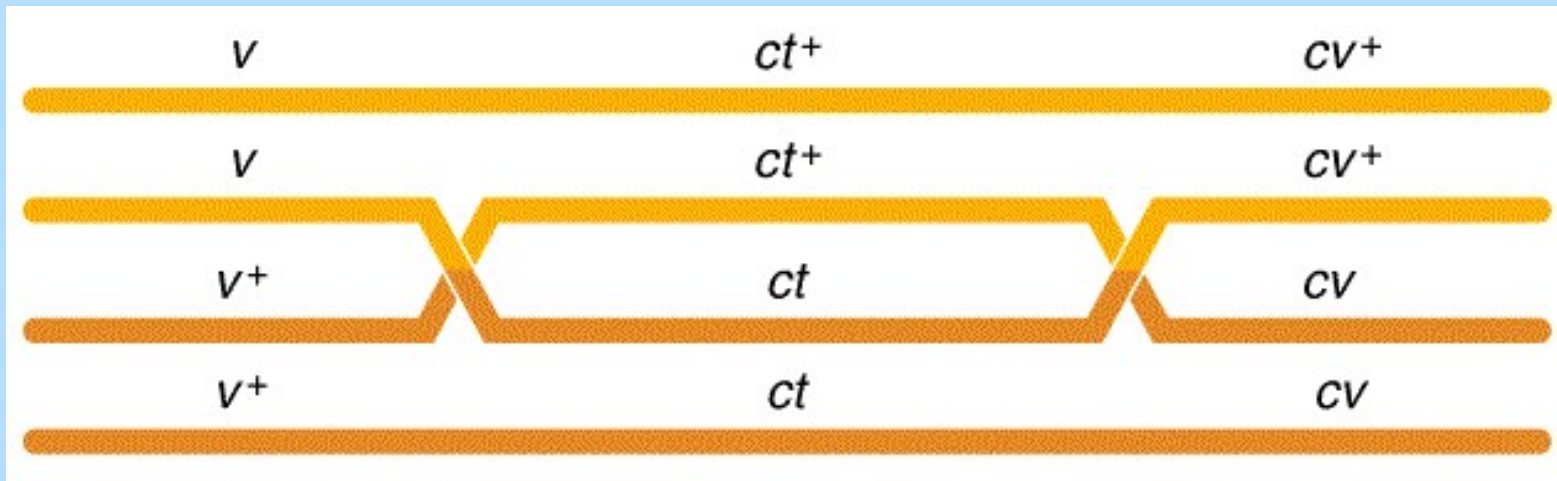
Mivel a térképtávolságok additívak, A-B és A-C távolsága két lehetőséget ad B-C távolságára nézve.

**A, B és C gén meghatározott helye a kromoszómán a lókusz.**





## A kettős rekombináció nem mindig észlelhető genetikai módszerekkel



- A kettős átkereszteződés olyan rekombináns kromatidokat eredményez, melyek allél elrendeződése a két szélső gént tekintve megegyezik a szülői elrendeződéssel.



# Génsorrend meghatározása a kettős rekombináns osztály segítségével

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

Possible gene orders	Double recombinant chromatids

Középső gén:

ct

v

cv

Három gén esetén csak három sorrend lehetséges. A sorrendek úgy változnak, hogy mindig másik gén kerül középre.  
(A megfordított sorrendeket azonosnak tekintjük.)



# Génsorrend meghatározása a kétszeres rekombinációs osztály segítségével

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

Possible gene orders	Double recombinant chromatids

Legritkább kategória:

*v* *ct* +  
+ + *cv*



Ezért a *ct* génnek kell közepén lennie.

- Három gén esetén csak három sorrend lehetséges. A kétszeres átkereszteződések minden lehetősége közül csak az ábra első sorának génsorrendje esik egybe a kapott adatokkal.



**3 pontos térképezésnél az a gén van középen,  
amelyik a legritkább rekombinációs osztályban a  
szülői genotípushoz képest eltérést mutat.**





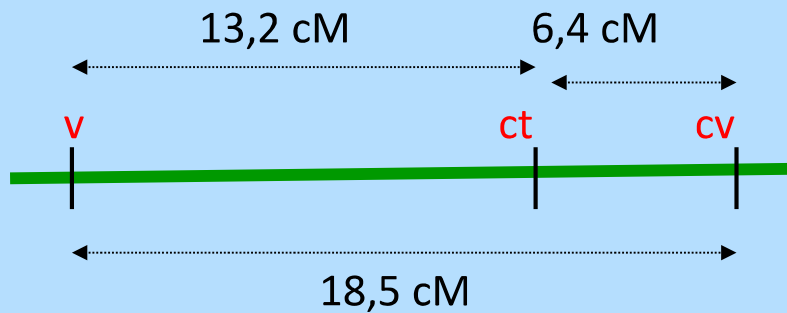
**3 pontos térképezésnél a két gén közötti térképtávolság helyes kiszámításához a középük eső kettős rekombináns osztályt kétszeres szorzóval kell figyelembe venni.**



# Hárompontos térképezés

Drosophila tulajdonságok: *v*-sötét szem, *cv*-keresztvéna hiány, *ct*-lecsípett szárny

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



$$13,2 + 6,4 = 19,6 \neq 18,5 \quad /$$

?

Rekombinációs analízis:

Szülői kombinációk: + *cv ct* és *v + +*

*cv – v* viszonylatában rekombináns

*v cv* és + +: 45+40+89+94=268

RF = 268/1448 = 18,5%

*v – ct* viszonylatában rekombináns

*v ct* és + +: 89+94+3+5=191

RF = 191/1448 = 13,2%

*ct – cv* viszonylatában

*cv +* és + *ct*: 45+40+3+5=93

RF = 93/1448 = 6,4%



# Hol történtek rekombinációs események a kromoszóma mentén?

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

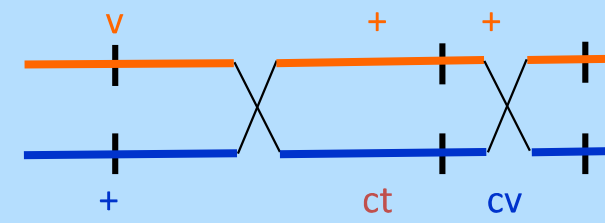
Drosophila tulajdonságok: *v*-sötét szem, *cv*-keresztvéna hiány, *ct*-lecsípett szárny

P  $+/+, ct/ct, cv/cv \times v/v, +/+, +/+$

F1  $v/+, ct/+, cv/+ \text{♀} \times v/v, ct/ct, cv/cv \text{♂}$

F2	$v$	$+$	$+$	580
	$+$	<i>ct</i>	<i>cv</i>	592
	$v$	$+$	$cv$	45
	$+$	<i>ct</i>	$+$	40
	$v$	<i>ct</i>	<i>cv</i>	89
	$+$	$+$	$+$	94
	$v$	<i>ct</i>	$+$	3
	$+$	$+$	<i>cv</i>	5
	összesen:			1448

Rekombinációs analízis:  
Szülői kombinációk:  $+ ct cv$  és  $v + +$   
*cv* – *v* viszonylatában rekombináns  
*v cv* és  $+$





## Hol történtek rekombinációs események a kromoszóma mentén?

Drosophila tulajdonságok: *v*-sötét szem, *cv*-keresztvéna hiány, *ct*-lecsípett szárny

P  $+/+, ct/ct, cv/cv$  x  $v/v, +/+, +/+$

F1  $v/+, ct/+, cv/+$  ♀ x  $v/v, ct/ct, cv/cv$  ♂

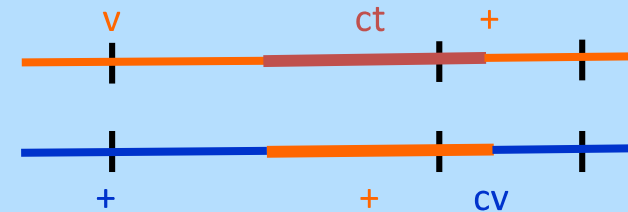
}	<i>v</i>	+	+	580
	+	<i>ct</i>	<i>cv</i>	592
}	<i>v</i>	+	<del><i>cv</i></del>	45
	+	<i>ct</i>	+	40
}	<i>v</i>	<del><i>ct</i></del>	<i>cv</i>	89
	+	+	+	94
}	<i>v</i>	<del><i>ct</i></del>	+	3
	+	+	<del><i>cv</i></del>	5
	összesen:			1448

Rekombinációs analízis:

Szülői kombinációk: + *ct* *cv* és *v* + +

*cv* – *v* viszonylatában rekombináns

*v* *cv* és + +



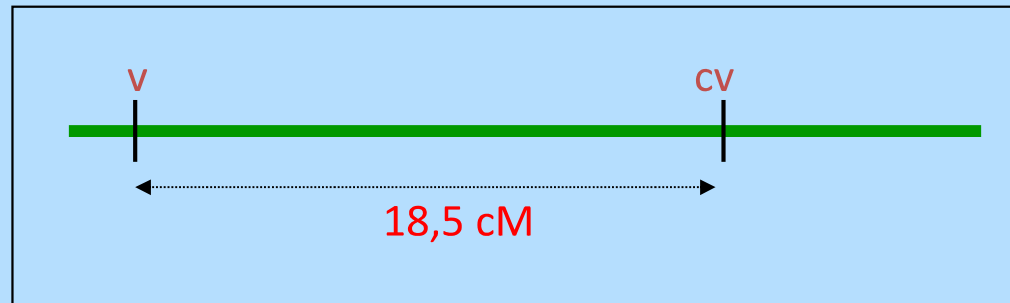
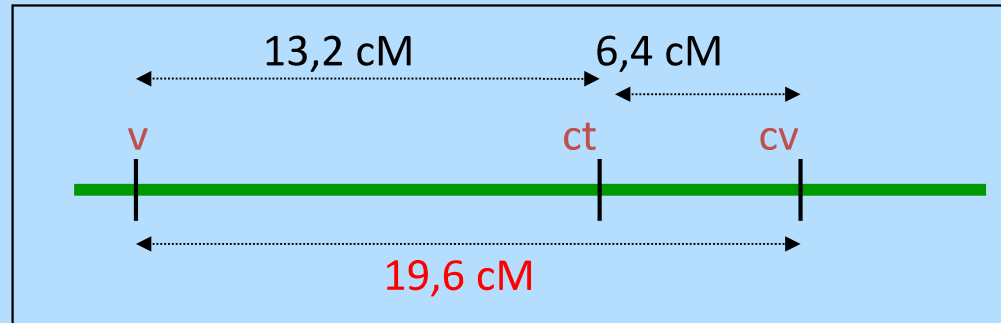
A hiba oka az, hogy *v*-*cv* távolság számításakor nem vettük figyelembe a kettős rekombinánsokat.

A korrigált érték:  $45+40+89+94+3+3+5+5 = 284$  RF =  $284/1448 = 19,6\%$





## A 3 pontos térképezés tanulságai



A nagy távolságot átfedő kétpontos térképezéssel nyert adatok pontatlanabban becsülik a valós térképtávolságot mint a 3 pontos adatok, mivel a többszörös rekombinációs kategóriát figyelmen kívül hagyják.



Mivel arányos a valódi térképtávolság?

A térképtávolságot a rekombinációs gyakorisággal (RF) mérjük.

$$RF = \frac{\text{rekombináns utódok száma}}{\text{összes utódok száma}} = \text{rekombinánsok átlagos száma}$$

**Az RF azonban pontatlan mérőszám.**

Hogyan pontosítottuk a 3 pontos térkép adatot?

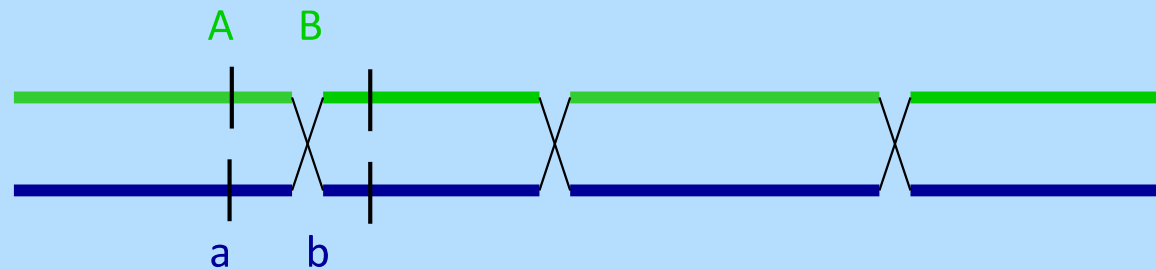
Figyelembe vettük a nem látható crossoverek számát is. A látható rekombinációs események mindegyike is crossoverből származik, ezért ha két gén között meg tudnánk számolni az összes crossoverek számát, akkor pontos térkép adatot kaphatnánk. Ez azonban technikailag megoldhatatlan.

**Ami a térképtávolsággal ténylegesen arányos, az valójában a gének közé eső átkereszteződések (crossing overek) átlagos száma.**

Kis géntávolság esetén a két szám közel azonos. Nagy géntávolságnál a crossoverek száma jelentősen nagyobb mint a rekombinánsok száma. A kérdés az, hogy pontosan mennyivel?



## A kétpontos térkép kis géntávolságnál pontos

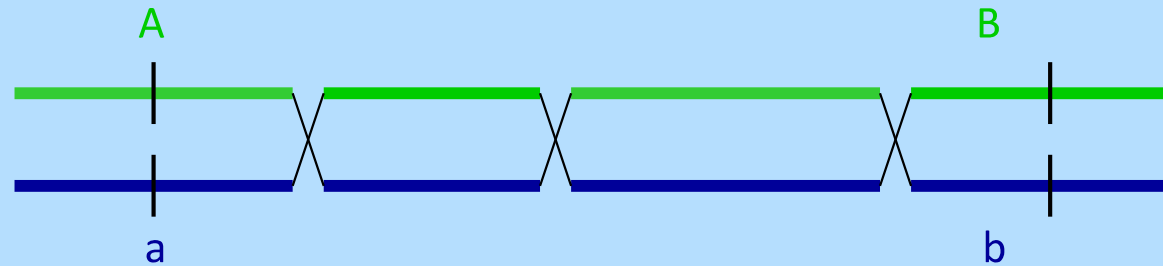


2 közeli lókuszt között lejátszódó átkereszteződés (crossover) esélye kicsi, a többszörös átkeresztezések valószínűsége pedig szinte elhanyagolható (két pici szám négyzete elhanyagolhatóan kicsi).

A kétpontos térképezés adatai ezért kis géntávolságok esetén pontosak megbízhatóak.



## A kétpontos térkép nagyobb géntávolságnál pontatlan



2 távolabbi lókuszt között lejátszódó átkereszteződés esélye nagy, a több-szörös átkereszteződés valószínűsége pedig a távolsággal arányosan (az egyszeres crossoverok hatványa szerint) nő.

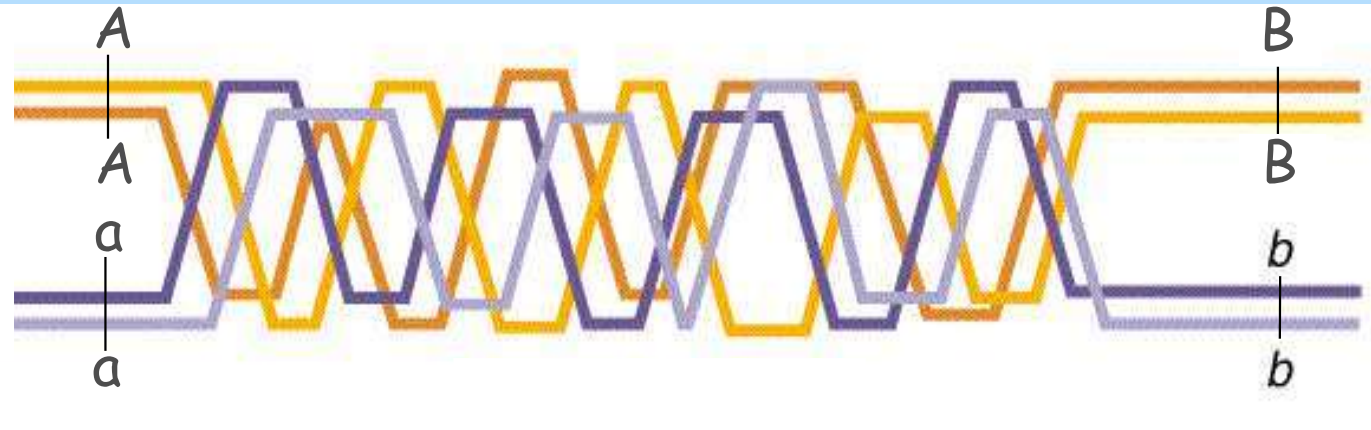
pl: Ha a távolságot 2 cM-ről 20 cM-ra (10-szeresére) növeljük, a 2-szeres crossoverok valószínűsége  $0,02^2=0,0004$ -ról  $0,2^2=0,04$ -re, 100-szorosára nő.

A kétpontos térképezés adatainak pontossága a géntávolság növekedésével hatványozott arányban csökken, a tényleges fizikai távolságnál pedig egyre kisebb értéket mér.





A kétpontos térkép nagyon nagy géntávolság esetén nem mutat kapcsoltságot



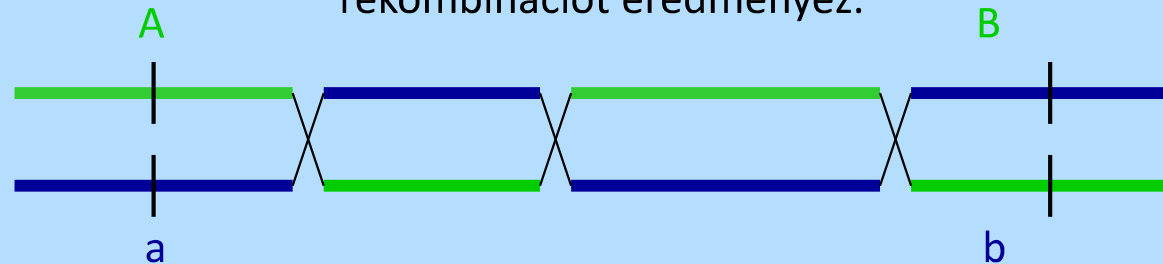
Két lókuszt között fokozatosan növelve a távolságot elérjük azt a határt amikor **a többszörös átkereszteződések biztosan bekövetkeznek.**

A többszörös crossover a vizsgált markergének szempontjából kétféle kimenetelű lehet:  
vagy eredményez rekombinációt, vagy nem.

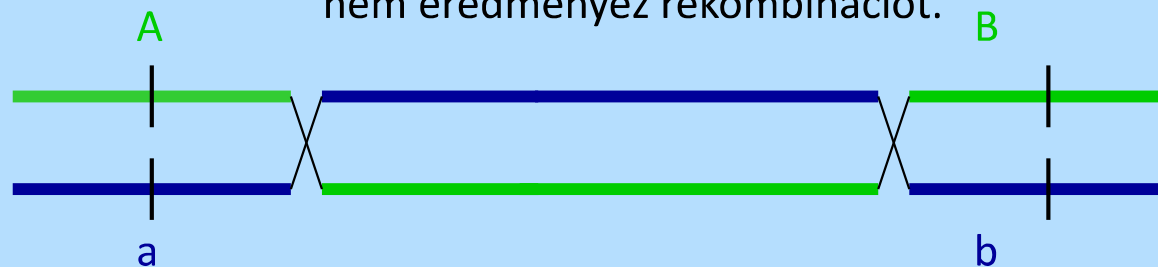


## A kétpontos térkép nagyon nagy géntávolság esetén nem mutat kapcsoltságot

2 igen távoli lókuszt között lejátszódó minden páratlan számú átkereszteződés rekombinációt eredményez.



2 igen távoli lókuszt között lejátszódó bármely páros számú átkereszteződés nem eredményez rekombinációt.

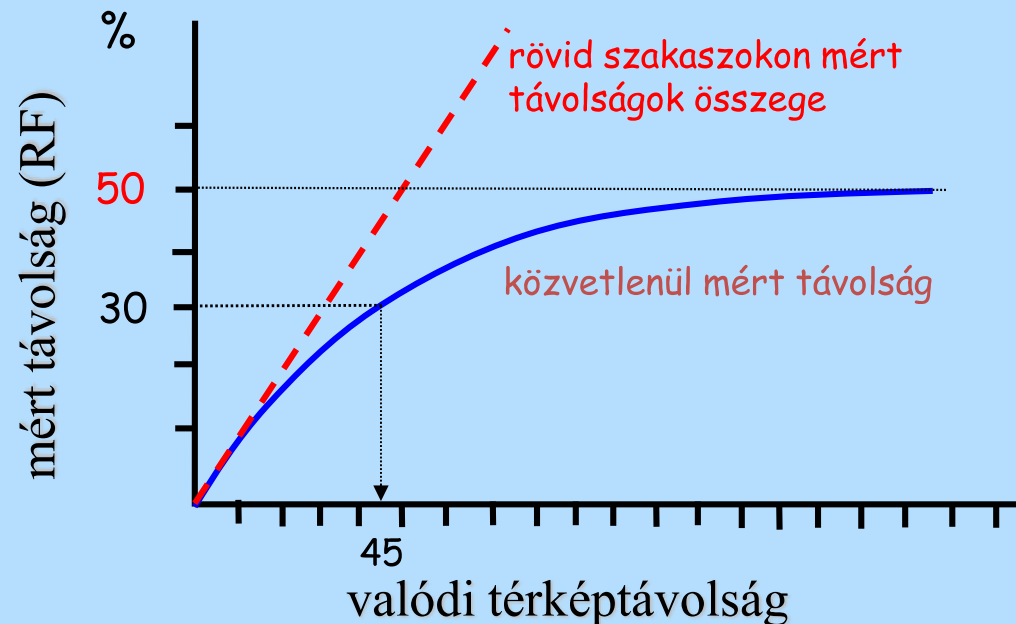


Mivel a crossoverek fele páros, fele páratlan számú, ez távoli lókusztok esetén pontosan 50% RF-et eredményez.

A két gén között közvetlenül mérhető legnagyobb távolság tehát soha nem haladja meg az 50 cM-t. Ekkor a gének nem tűnnek kapcsoltnak.



## A kétpontos térképezés a Haldane függvénnyel pontosítható

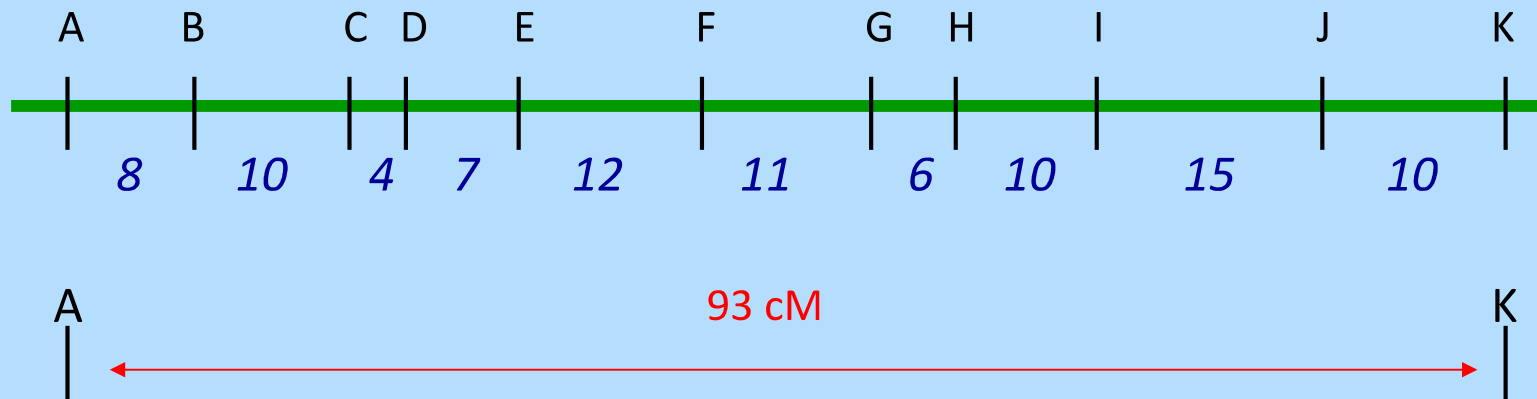


A két függvény kis távolságok esetén egybeesik. A pontos térképtávolságok mérésének egyik megoldása a lehető legkisebb szakaszokkal történő térképezés. Ez azonban nehézkes, munkaigényes, és egy sor élőlény esetén nem lehetséges.

A megoldást a térképfüggvény adja  
(A térképfüggvény = a kék görbe függvénye).

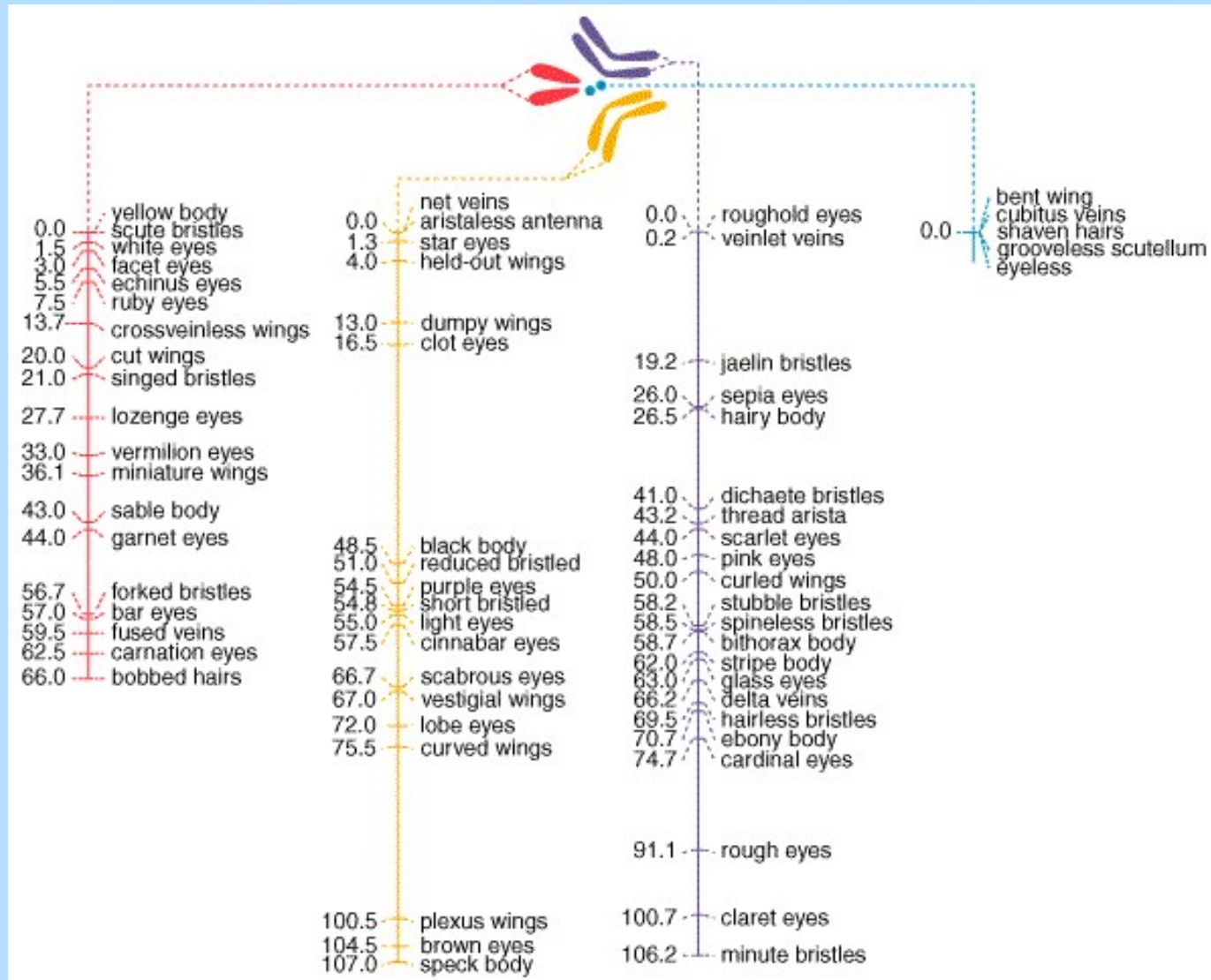


## Géntérképek jellegzetességei

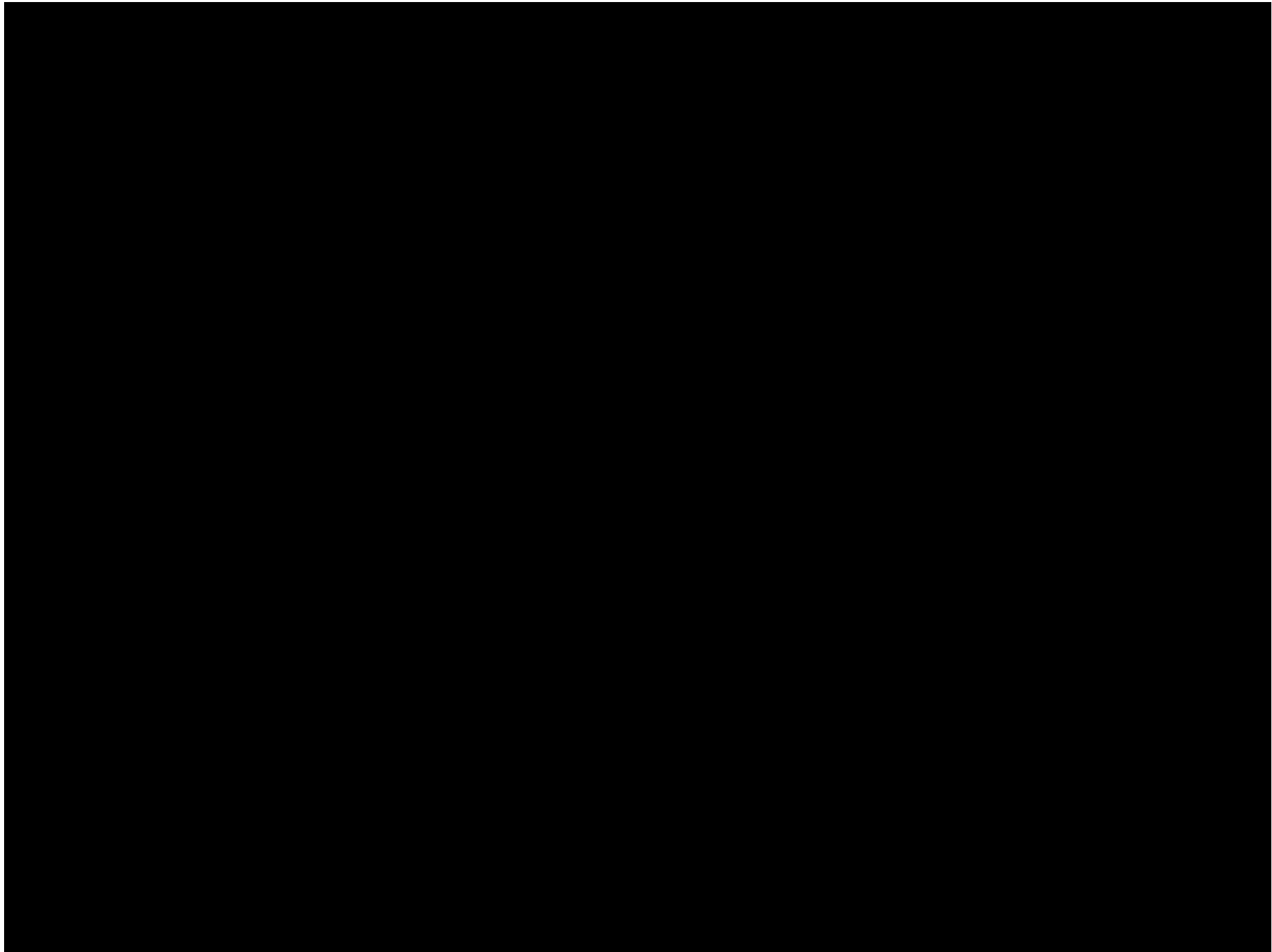


Egy kromoszóma rendszerint több mint 50 cM hosszúságú.  
A térképezés során mindig közeli lókuszokat térképeznek egymáshoz, és az adatokat térképfüggvénnyel pontosítják.

# A *Drosophila melanogaster* korai géntérképe









# Thomas Hunt Morgan Drosophila kísérlete I.

szemszín:  $pr$  (purple = lila) és  $pr^+$  piros

szárnyhossz:  $vg$  (vestigial = csökevényes) és  $vg^+$  normális

P  $prpr\ vgv$  nőstény x  $pr^+pr^+\ vg^+vg^+$  hím

F1  $prpr^+\ vgv^+$  nőstény x  $prpr\ vgv$  hím

F2 fenotípusa:	$pr^+\ vg^+$	1339
	$pr\ vg$	1195
	$pr^+\ vg$	151
	$pr\ vg^+$	154
	összesen:	2839



## T.H. Morgan Drosophila kísérlete II.

Felcserélt allél kombináció

P  $pr^+pr^+ vgvg$  nőstény x  $prpr vg^+vg^+$  hím

F1  $pr^+pr vg^+vg$  nőstény x  $prpr vgvg$  hím

Utódok	$pr^+ vg^+$	157
	$pr vg$	146
	$pr^+ vg$	965
	<u><math>pr vg^+</math></u>	<u>1067</u>
	összesen:	2335



## A rekombinációs gyakoriság (=RF vagy rekombinációs frekvencia) számítása

Morgan kísérletében az F2 geno- és fenotípusos megoszlása:

<b>Szülői kategóriák:</b>	<i>pr<sup>+</sup> vg<sup>+</sup></i>	1339	
	<i>pr vg</i>	1195	
<b>Rekombináns kategóriák:</b>	<i>pr<sup>+</sup> vg</i>	151	} 305
	<i>pr vg<sup>+</sup></i>	154	
	<b>összesen:</b>	<b>2839</b>	

Rekombinánsok száma:  $151+154=305$

Összes utód száma: 2839

**Rekombinációs gyakoriság: rekombináns utódok száma osztva az összes utód számával.**

$305/2839=0,107=10,7\%$ , nyilvánvalóan kisebb mint 50%.



# GÉNTÉRKÉPEZÉS ÁLLATOKON

## Genetikai markerek

Dr. Kovács Balázs





# Genetikai markerek

Definíció: (könyvjelzők) **Jelzésre** alkalmas fehérjék, gének, DNS szakaszok amelyeknek **több változatuk** (alléljuk) van.

Típusai:

- Fenotípusos bélyegek (testforma, szín, pikkelyek, úszósugarak)
- Fehérje polimorfizmusok
- DNS polimorfizmusok



# Fehérje polimorfizmusok I.

- Allélek (más méret, más szerkezet, más töltés)
- keményítő gél, poliakrilamid gél,
- specifikus festési eljárások
- mintázat eltérésének értékelése



## Fehérje polimorfizmusok II.

Előnye:

- a kidolgozott rendszer más fajok vizsgálatára is alkalmazható

Hátránya:

- 2-3 tucatnyi izoenzimet azonosítottak
- Az allélek száma viszonylag alacsony(5-6) Ennek oka, hogy a fehérjék szerkezete meglehetősen kötött.
- A genom kódoló 1-3%-ából származnak



# DNS markerek

- Nem csak a kódoló régióból származhatnak. A genom teljes hosszában megtalálhatóak.
- Általában ismétlődő DNS szekvenciák (Variable Number Tandem Repeat, VNTR) amelyben az ismétlődő szakaszok 2-64 bp hosszúak
- sok lehetséges allél (20-30)

kimutatásuk:

- Restrikciós enzimekkel
- hibridizációval
- PCR-el



## RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZOK

	I-es típus	II-es típus (98%)	III-as típus
példa	EcoK	EcoRI	EcoPI
felismerőhely	AAC(N6)GTGC	GAATTC	AGACC
hasítási hely	~1 kb-ra	5'-foszfát	24-26 bp-ra
metiláció	A <sup>Mn6</sup> AC(N6)GTGC	GA <sup>m</sup> ATTC	AG <sup>m</sup> ACC
nukleáz és metiláz	egy-egy alegység ( <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> gén)	külön enzim	egy-egy alegység
hasítás kofaktora	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
metiláció kofaktora	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	S-AdoMet	S-AdoMet

- 3000 II-es enzim, >220 felismerőhely (750 baktérium törzsből)
- izoskizomérek:

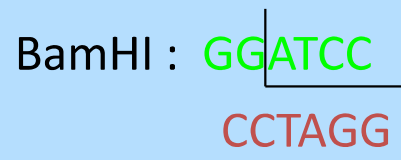




## RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZOK

– **tetra-, penta-, hexa-**, oktanukleotid, abszolút v. részleges specifitás:

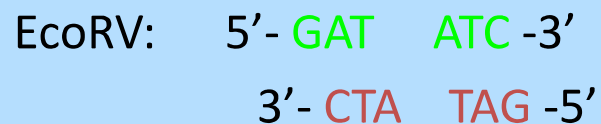
– szimmetrikus (**palindróm**)/ van kivétel



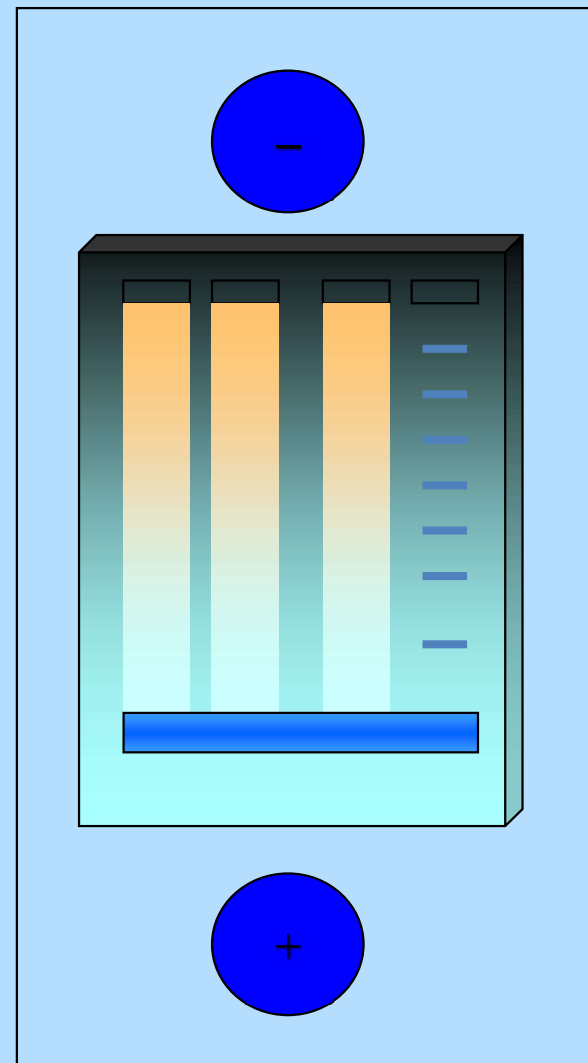
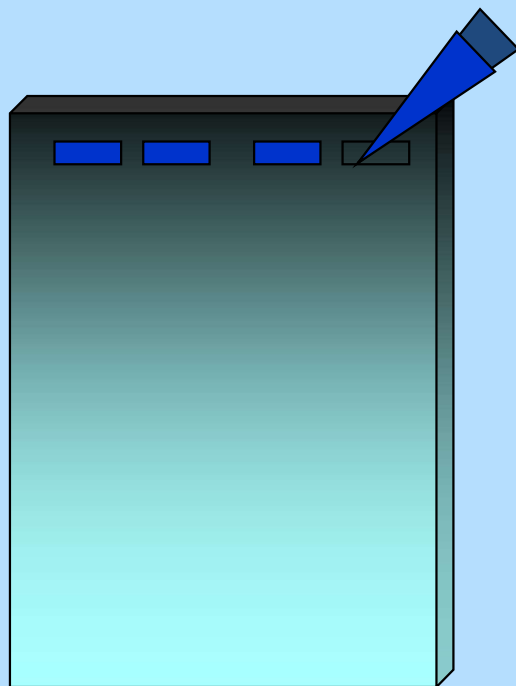
– **Ragadós/** tulnyúló vég:



– **Tompavég** vég:



# Gél elektroforézis





# DNS FRAGMENTUMOK SZEPARÁLÁSA

Agaróz gél elektroforézis (horizontális, “submarine”)

felbontás: **200bp – 20 000bp**

mólsúly meghatározáshoz markerek

festés: etídium-bromid, SYBR-green

Poliakrilamid gél elfó (vertikális)

felbontás: **1 bp – 6 000bp**

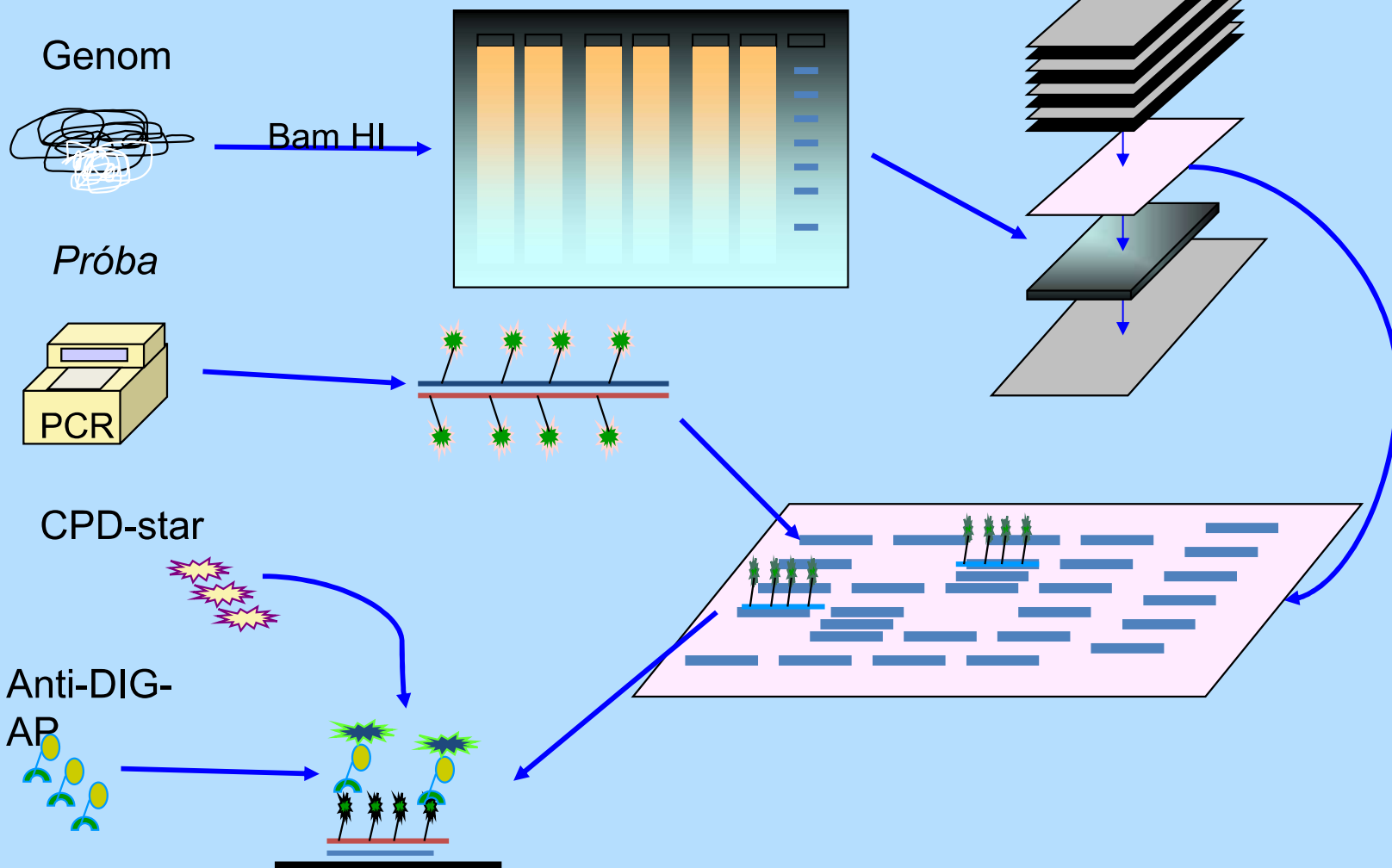
festés: autoradiográfia, fluoreszcencia,  
kemilumineszcencia

“Pulse-field” gél elektroforézis (PFGE)

felbontás: **20 000bp – 2 000 000 bp**

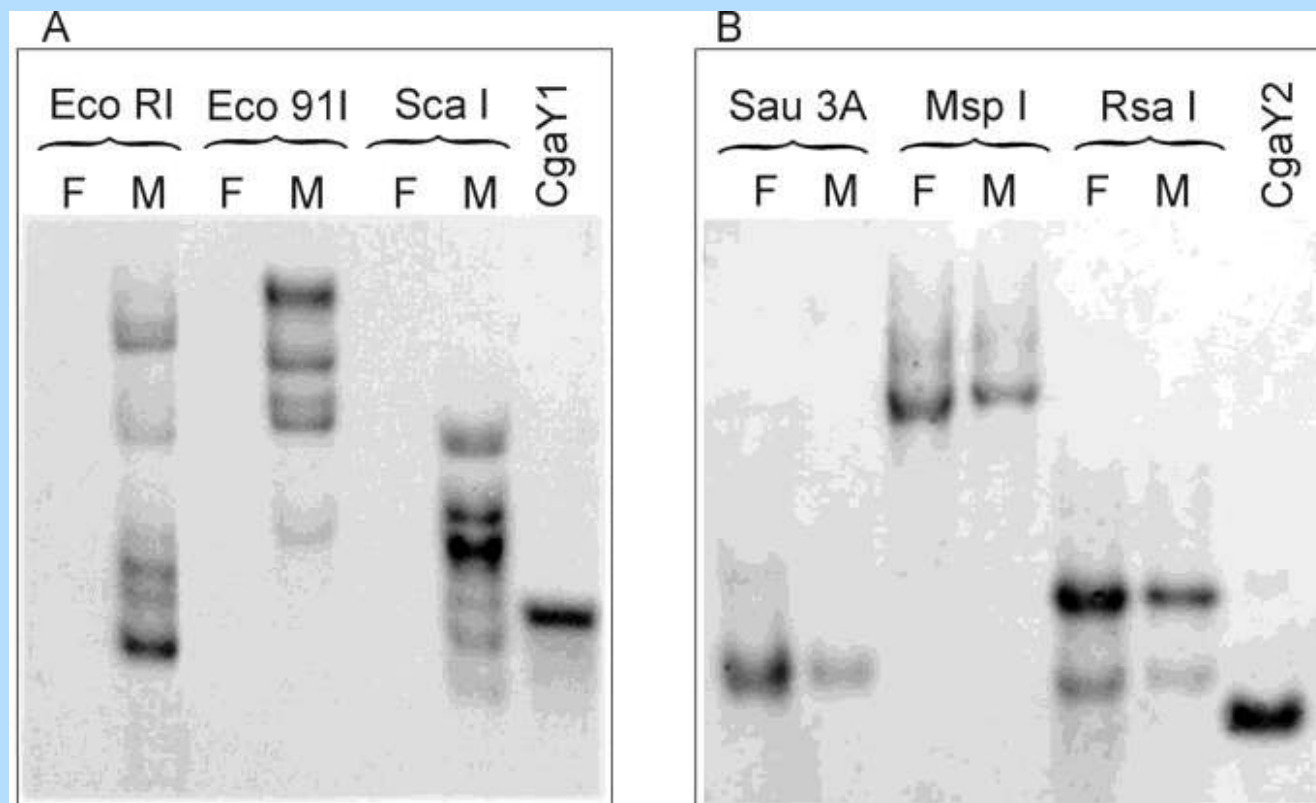


## Southern hibridizáció





# SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ







# Polimeráz láncreakciónak (PCR) I.

- *Termophilus aquaticus*-ból **hőstabil DNS polimeráz**.  
(Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987)
- DNS szakaszok **szelektív felszorzása**
- Rendkívül **kis mennyiségű** DNS-ből / szövet -ből ( 1 cm<sup>2</sup> úszó, 1-2 pikkely, 100μl vér, 1 napos ivadék) elvégezhető.
- Tucatnyi összetevő, egymáshoz viszonyított arányukat, valamint a hőmérsékleteket **optimalizálni** kell.
- Jól reprodukálható
- **Reakció:** 3 lépés ciklikus ismétlése
  - a kiválasztott szakasz minden ciklusban megduplázódik (30 ciklus végén  $2^{30} = 1\,073\,741\,824$ )



# Polimeráz láncreakciónak (PCR) II.

## 1.) Denaturáció:

a DNS spirál két szálának szétválasztása,  
92-95 °C-on

## 2.) "annealing" v. feltapadás

A primerek hibridizálnak 50-60 °C körüli hőmérsékleten a DNS azon szakaszaira, melyeknek a bázissorrendje ezt lehetővé teszi

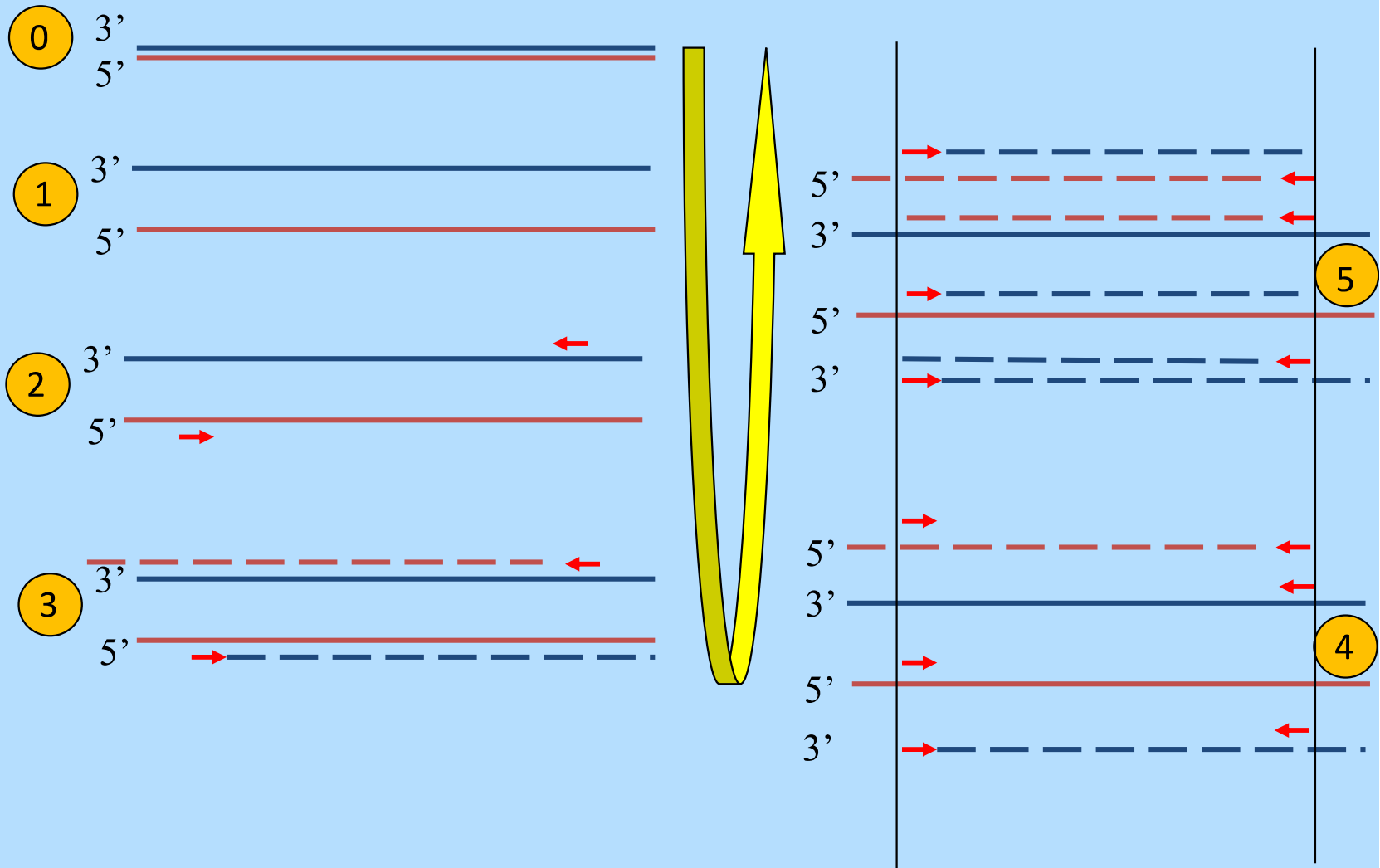
## 3.) Lánchosszabbítás v. "elongáció":

A primerekről kiindulva 72 °C -on a Taq polimeráz lemásolja a DNS-t.



# PCR

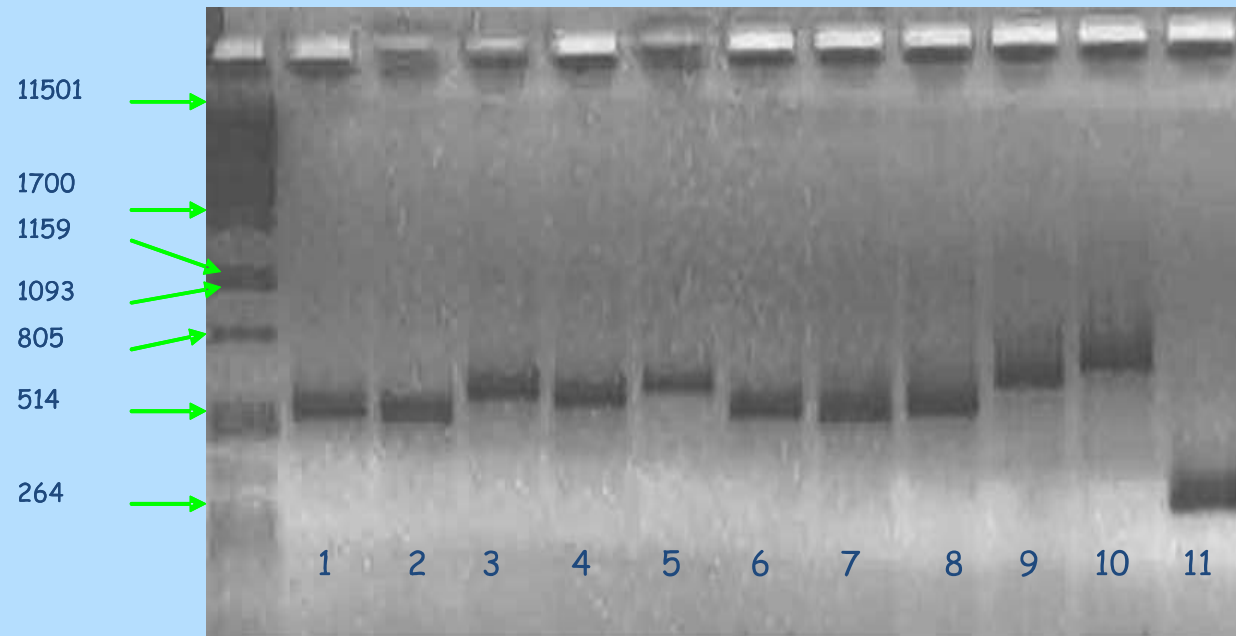
Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék





# Agaróz gélelektroforézis eredménye

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



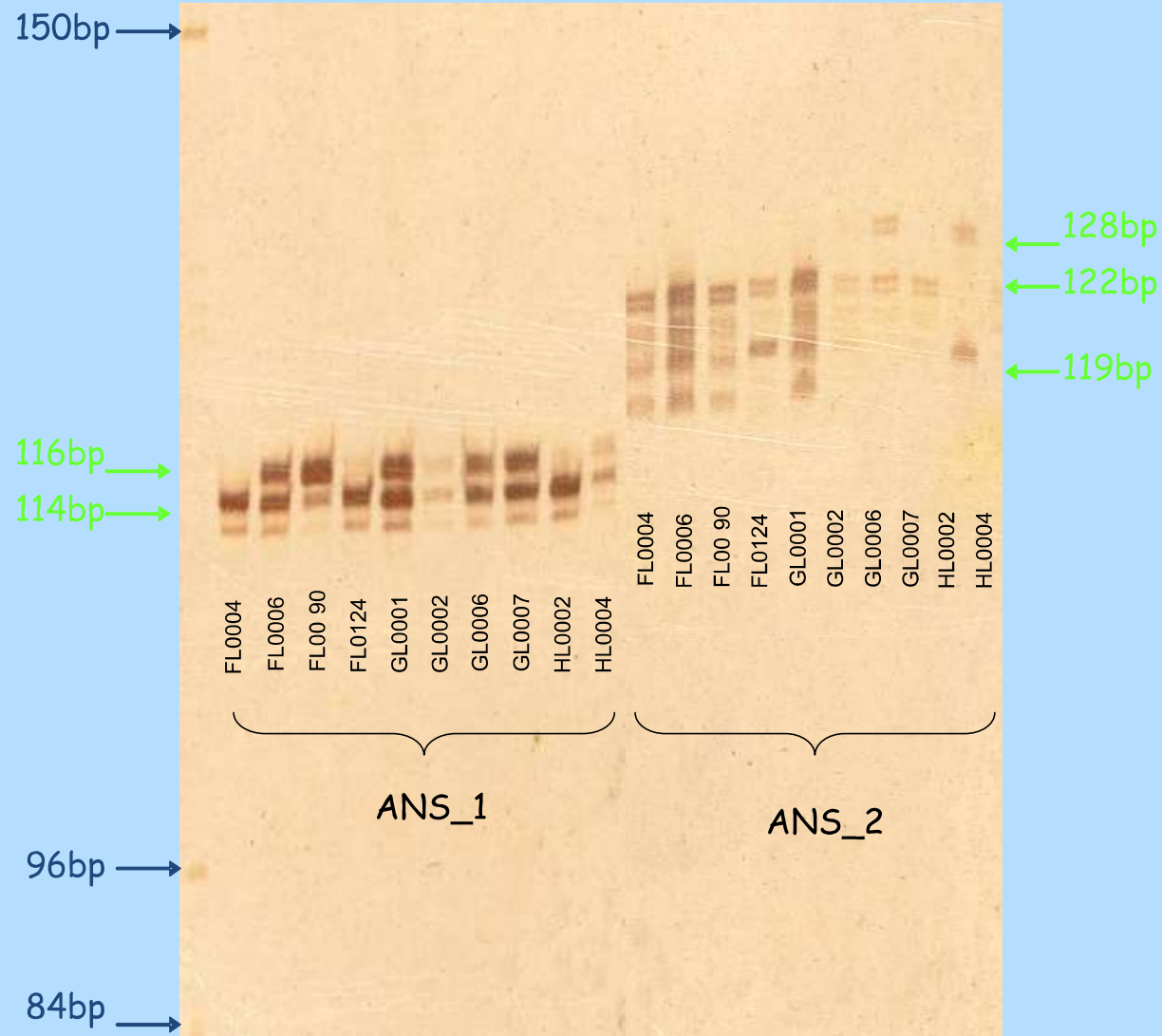
Molekulasúly  
marker

PCR Termék



# Akrilamid gélelektroforézis eredménye

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék







# Miniszatellit (DNS ujjlenyomat, RFLP)

- 16-64bp-os ismétlődő szakaszok (10-15bp-os magszekvenciával)
- Rekonbinációs **forró pontok**
- Kimutatásuk:
  - A genom **restrikciós** feldarabolása
  - Agaróz gélelektroforézis (nincsenek elkülönülő fragmentek)
  - Nylon membránra kötik a DNS-t
  - Radioaktívan jelölt mag szekvenciával hibridizálnak
  - Csíkmintázat értékelése



## Miniszatellit (DNS ujjenyomat, RFLP) II.

- **Sok** szövet / DNS kell hozzá
- Hosszadalmas
- **Bonyolult mintázat**
- Kiértékelése hibákkal terhelt
- 1500kb-onként van egy repeat
- inkább a **kromoszómák végeire** lokalizálódnak.



# Mikroszatellit markerek

- **1-6 bpnyi** ismétlődéseket tartalmazó repeat
- keletkezésükre többféle magyarázat van
- halak genomjában minden **10kb-ban** van egy
- Analízisük **specifikus PCR reakción** alapul.

A primerek a határoló szekvenciákhoz tapadnak.

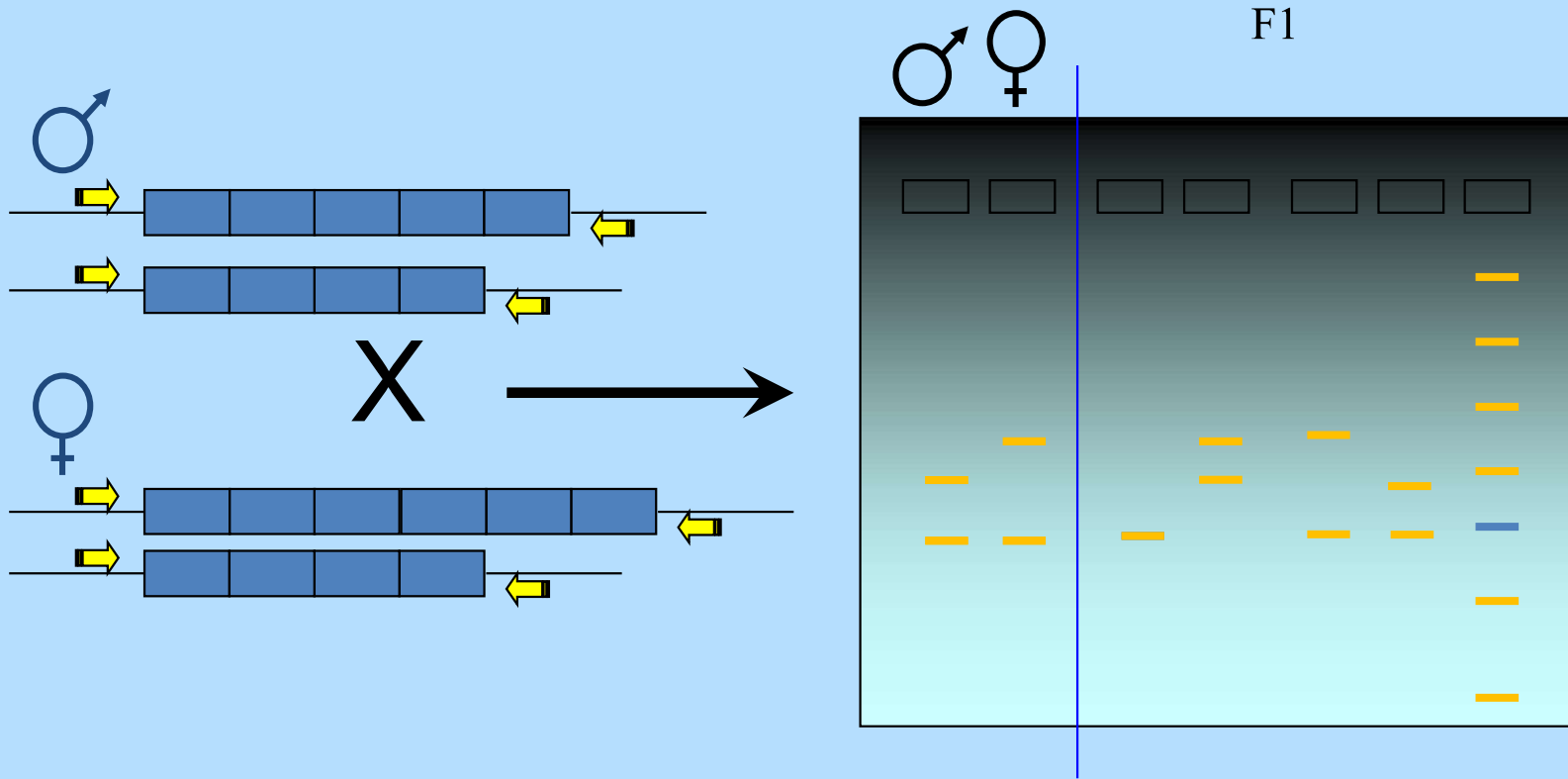
A kapott fragmentek **50-300bp** hosszual (halaknál szignifikánsan hosszabbak, mint emlősőknél)

- **Kimutatásuk:**
  - poliakrilamid gélen (radioaktív jelölés, ezüstoffestés),
  - speciális agaróz gélen (etídium bromid)
  - vagy kapilláris (fluorescens)



# Microsatellitek

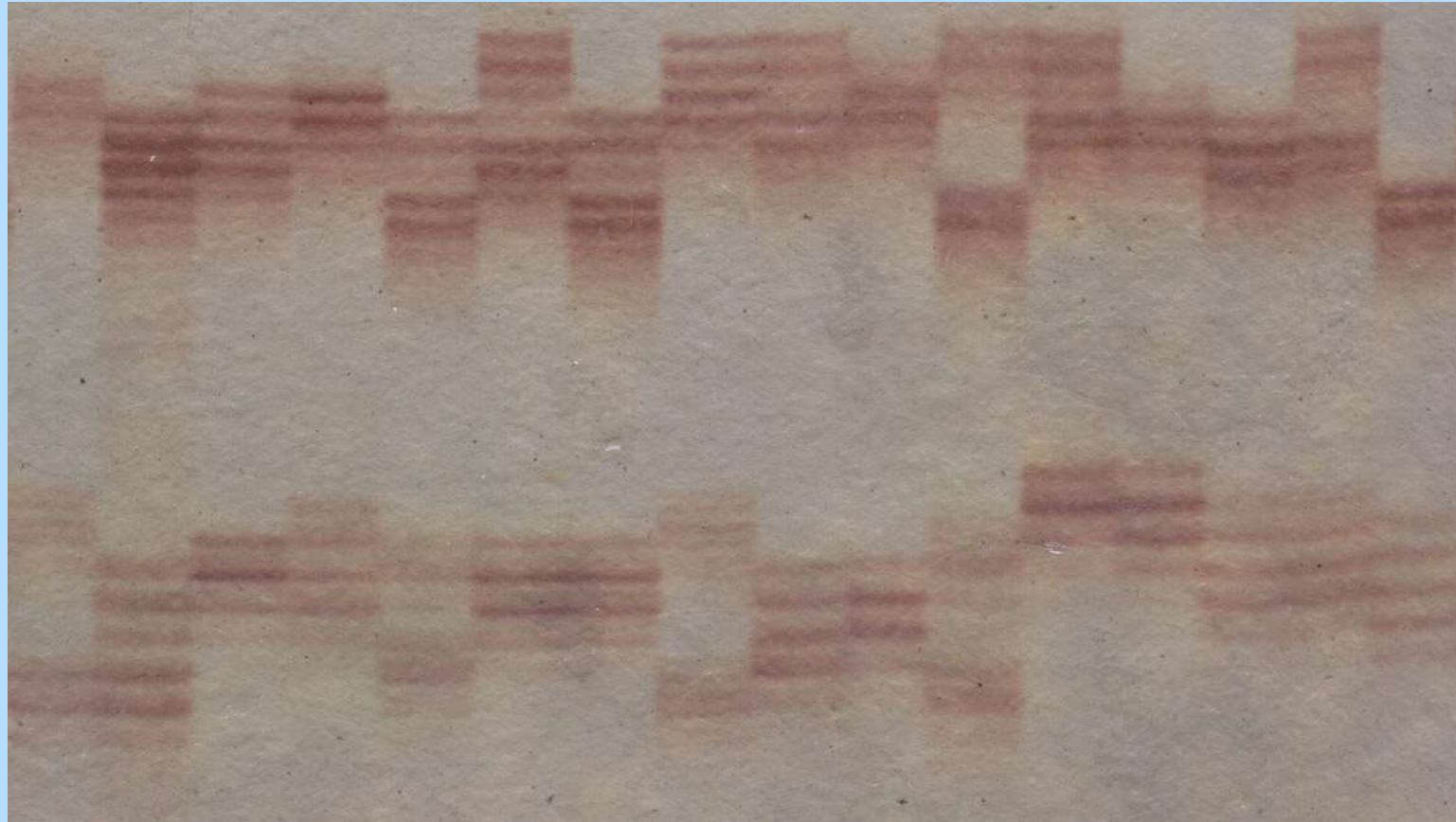
Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék





# Ponty tenyészállományok genetikai gazdagságának felmérése MS analízissel

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék







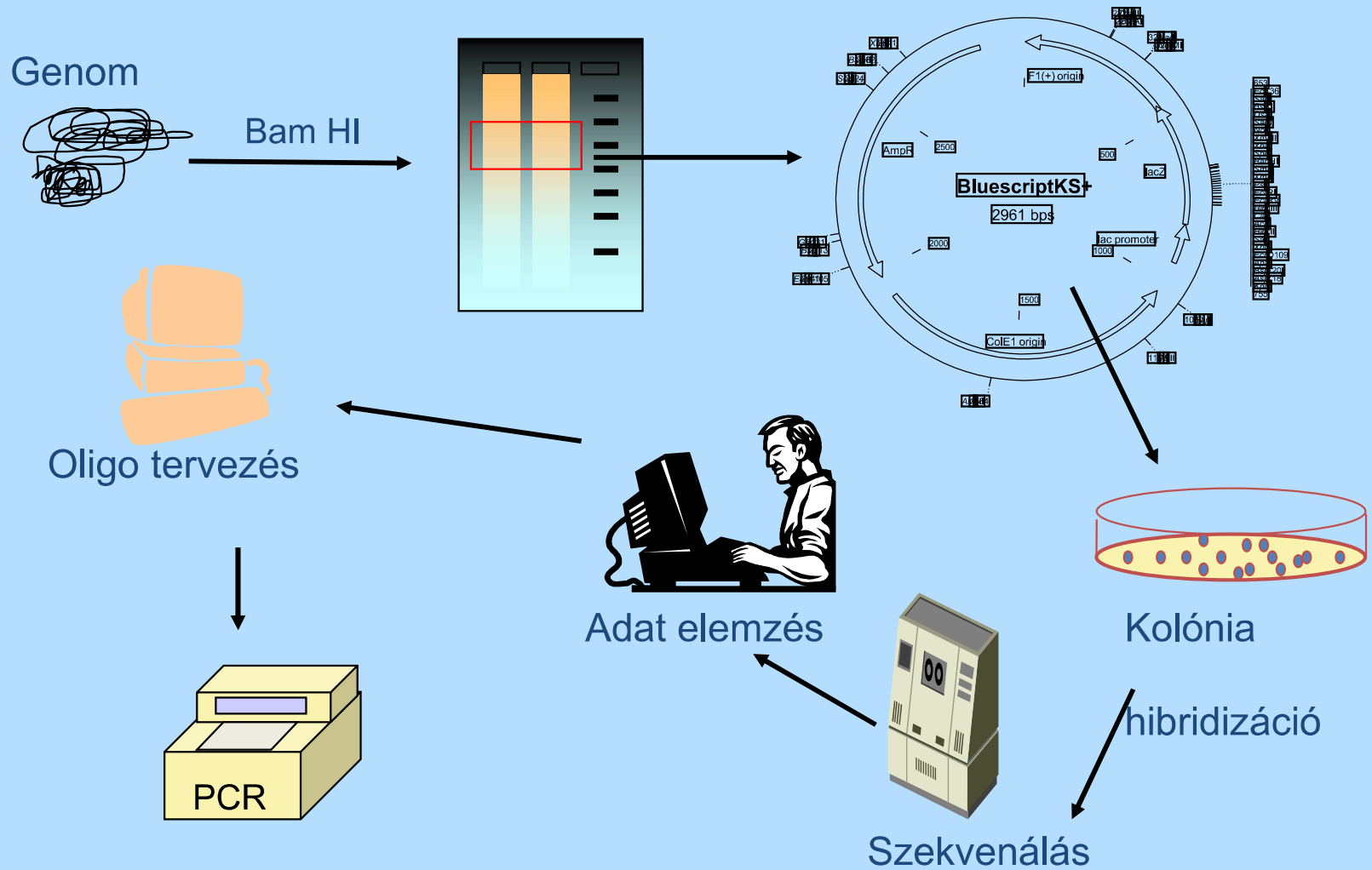
# Mikroszatellit markerek II.

- Előnyök:
  - kevés DNS-t igényel
  - gyors
  - kodomináns (homo- és heterozigóták elkülöníthetőek)
  - Magasfokú polimorfizmus (25-30 allél)
  - közeli rokon fajokban is működhet
- Hátrányok
  - izolálás költséges (számítógépesen ismert szekvenciákból, génkönyvtárból szekvenálást követően)
  - A genomot egy ponton vizsgálja (multiplex reakcióban 2-3 helyen, reakciók keverhetők, fluoreszcensen azonos mérettartományban is vizsgálhatóak)



# MICROSATELLITE

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék





## Egyéb specifikus PCR alapú technikák

- mtDNS PCR-RFLP
  - változékony régiókat felsokszorozását követő restrikciós analízis
  - jól alkalmazható kisebb változások kimutatására
- EPIC-PCR(Exon-Primed Intron Crossing PCR)
  - Az exonok konzervatív végeiről kiindulva sokszorozza a változékony intronokat
  - molekuláris taxonómiai célokra jól alkalmazható
  - kombinálható az RFLP technikával
  - Kereskedelembe kaphatók e célra használható jó eséllyel használható primerek.



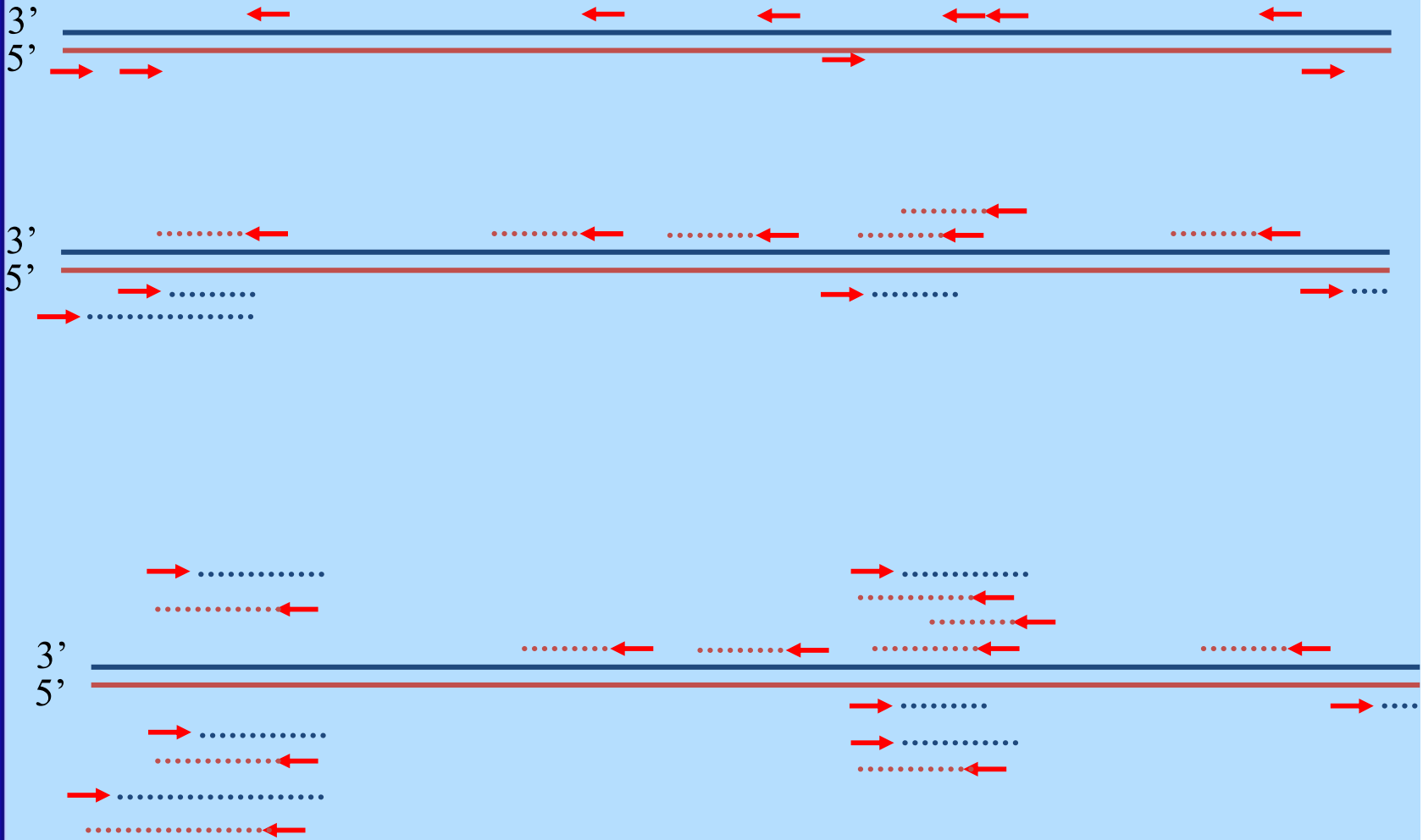
## Random Amplified Polymorphism of DNA (RAPD)

- Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990
- Egy **6-10bp** hosszú primert használ
- Több **ismeretlen DNS szakaszt** sokszoroz fel (3-30)
- 100bp-3500bp hosszú fragmentek
- A mintázat egyes csíkjai minden egyedben megtalálhatóak (monomorf), mások változatosan fordulnak elő a különböző egyedekben (polimorfok)



# RAPD

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

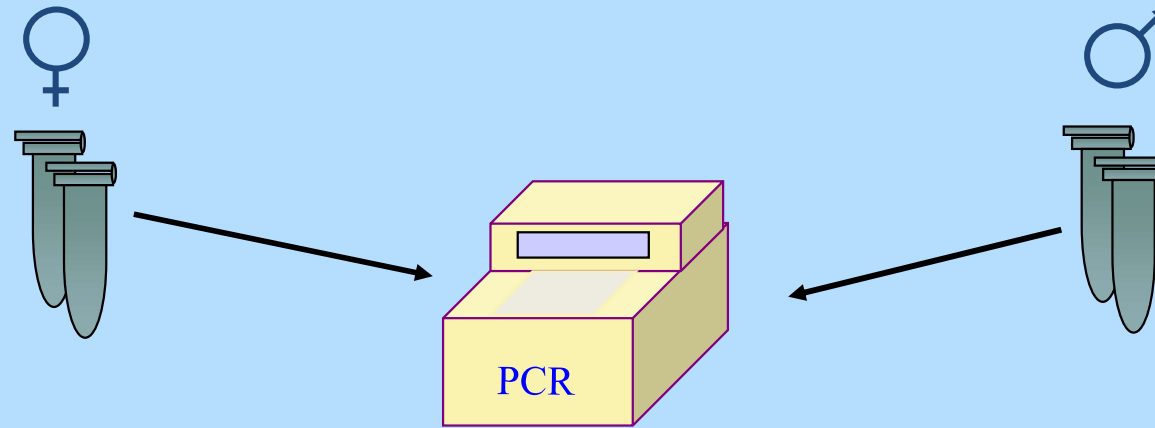




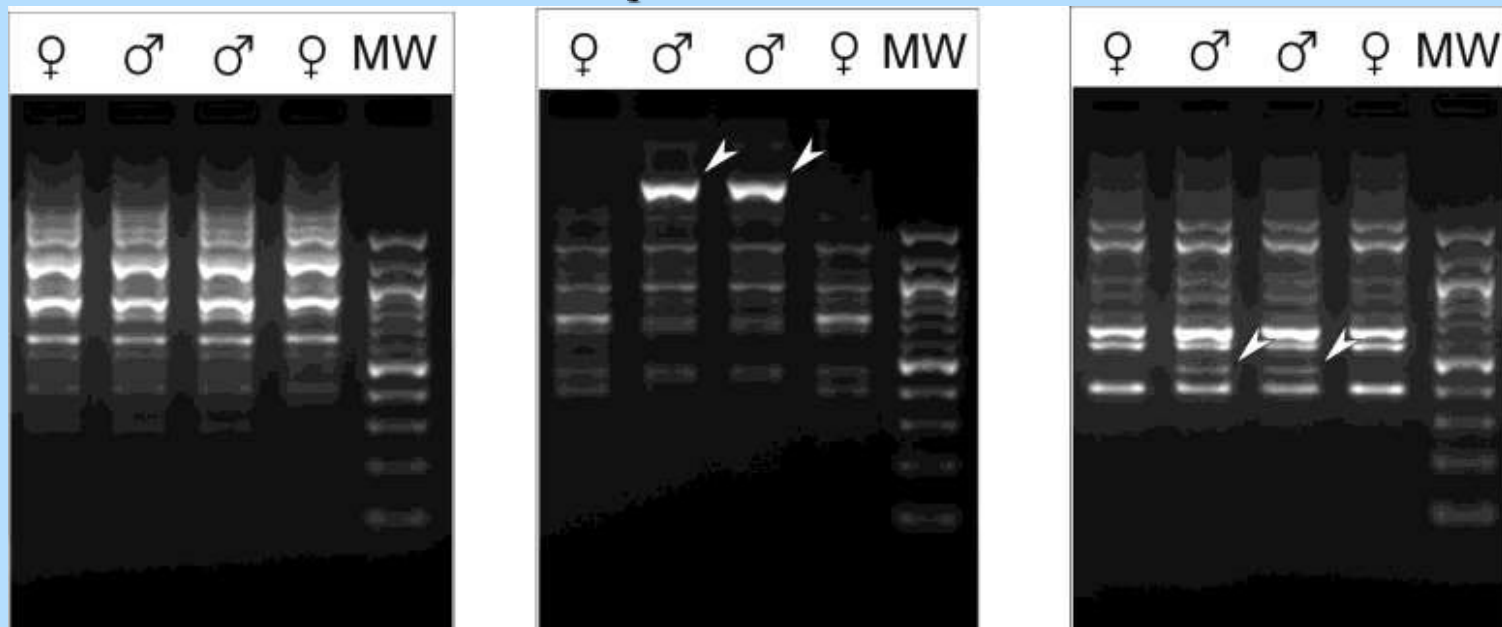


# RAPD

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



10 bp PRIMERS





# RAPD I.

- **Ismeretlen genomon** is alkalmazható
- Az eljárás **minden fajon** működik azonos körülmények között
- A primerek **olcsók** és kereskedelmi forgalomban kaphatók
- **Gyors**, egyszerű



## RAPD II.

- Egy primerrel működik /további primerek, vagy restriktív hasítások teljesen megváltoztatják a mintázatot.
- **Nagyon érzékeny** a reakció körülményekre
- Nem kodomináns, hanem **domináns-recesszív** módon öröklődik
- A csikok eredete és egymáshoz való viszonya nem ismert



## Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

- Genomot **restrikciós enzimekkel** feldaraboljuk
- A végekre **adaptorokat** ragasztanak (ligálás)
- **Horgonyozott primerekkel** végzünk PCR-t
- Poliakrilamid gélen, vagy **kapillárison** választjuk el
- Ezüstoffestéssel radioaktív, vagy fluoreszcens jelöléssel detektáljuk
- A horgonyok **bázisösszetételének** változtatásával változik a mintázat



# AFLP

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

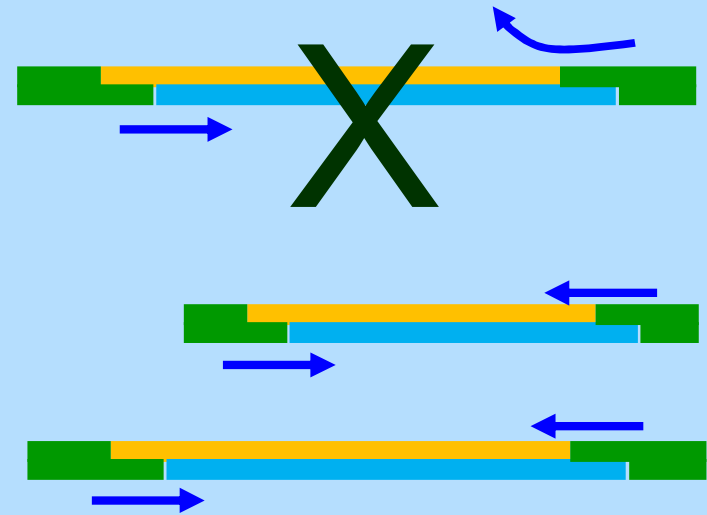


Genomi DNS

Restrikciós hasítás



Adaptorok ligálása



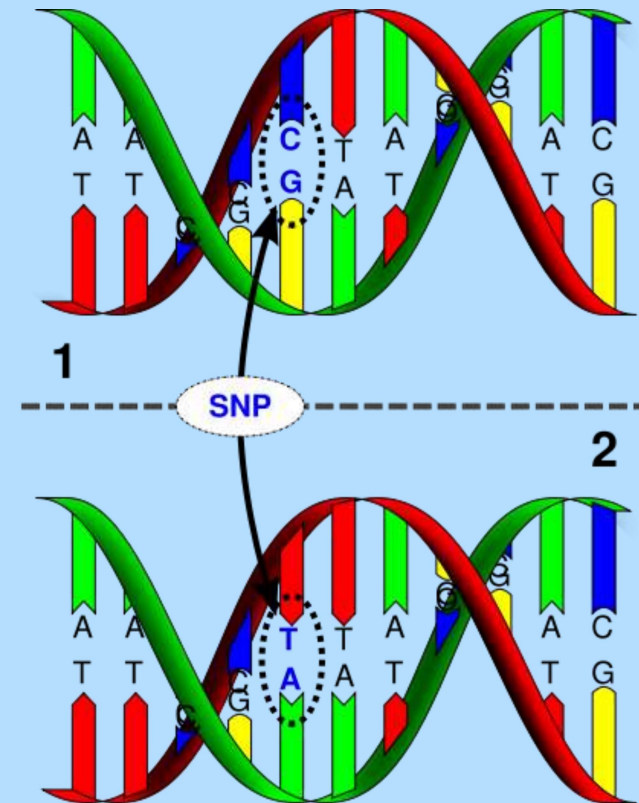
Horgony primerek



## SNP – Single Nucleotide Polymorphism

A humán genomban átlagosan minden 1000 bp-ban 1 eltérés a homológ kromoszómákban, máshol 100-600 bp-omként is lehet.

- SNP: Single-nucleotide polymorphism
- Synonymous SNP: No change in amino-acid sequence
- Non-synonymous SNP: Altered amino-acid sequence
- Polymorphism: DNA variation in which sequence is present in at least 1% of the population
- Most common type of genetic variation
  - May occur every 100-300 bases

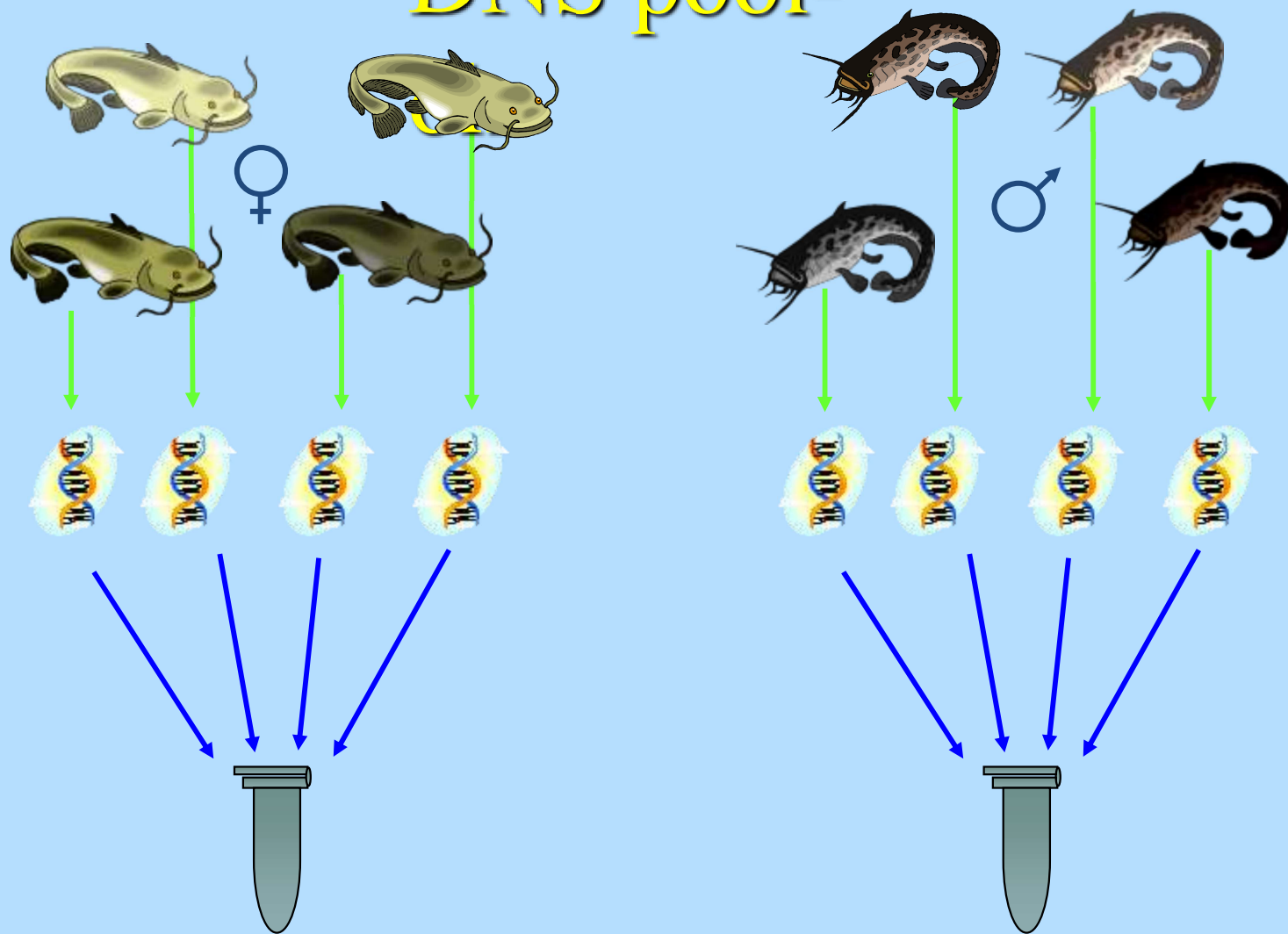




# Egyéb eljárások

- Reprezentációs Differencia Analízis (RDA) két genom közötti különbségeket lehet felerősíteni vele
- Expressed Sequence Tag (EST) gének azonosítására és térképezésére

# DNS pool-





# Markerek felhasználás I.

- Természetes populációk **genetikai diverzitásának** felmérése: (Virk et al., 1995; Xiao és mtsai, 1996; Apostol és mtsai 1996), ahol a mikroszatellitek nem állnak rendelkezésre.
- Tenyésztett vagy természetes **fajok, alfajok, variánsok, hibridek változatok** elkülönítése: A RAPD-ot a következő halfajok ill. azok alfajainak elkülönítésére alkalmazták sikerrel: tilapia (*Oreochromis niloticus*, Bardakci és Skibinski, 1994; Dinesh és mtsai, 1996), különböző trópusi halfajok (Dinesh és mtsai, 1993)



Populációk genetikai **diverzitásának, illetve beltenyésztettségének** meghatározása RAPD markerekkel.

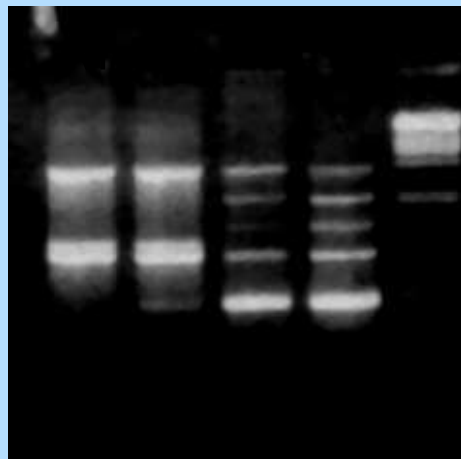
Fragment(bp) \Egyed	A	B	C	D
364	1	1	1	0
280	0	1	1	1
222	1	0	0	0
152	0	1	0	1
140	0	1	0	0
116	1	0	0	1
98	0	1	1	0
75	1	0	1	1
Egyedi kód	10100101	11011010	11000011	01010101



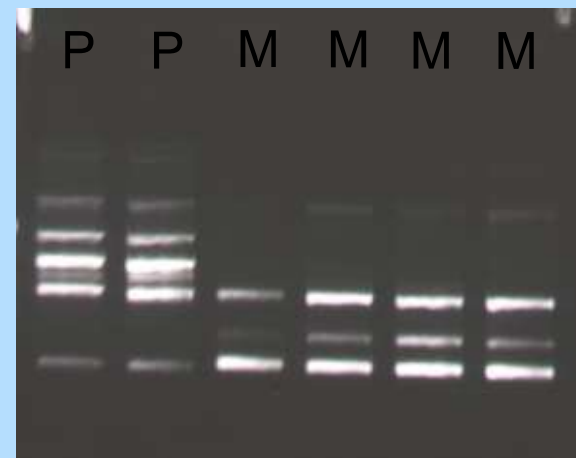


## Fajok, alfajok, variánsok, hibridek, változatok, egyedek elkülönítése

Márna (*Barbus barbus*)



Petényi márna  
(*Barbus meridionalis Petenyii*)





## Markerek felhasználás II.

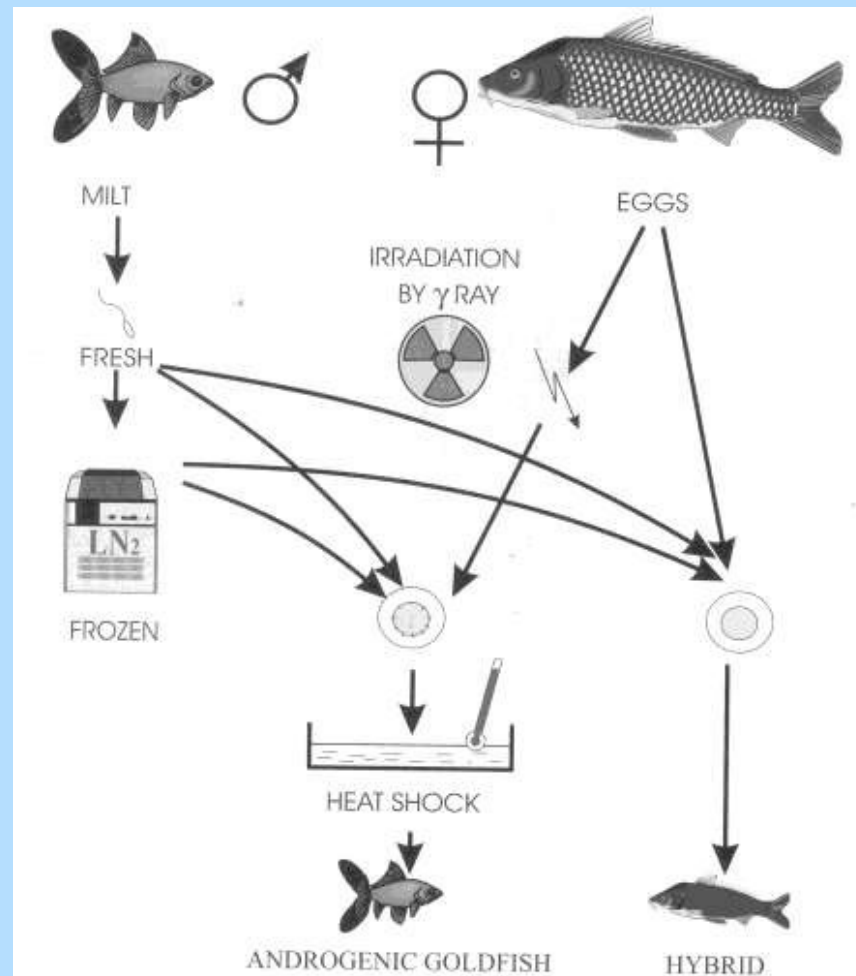
- Tenyészpulációk **beltenyésztettségi** fokának vizsgálata: Elsősorban nagyemlősök (Kantanen és mtsai, 1995) esetében alkalmazzák
- **Géntérképezés**
- **Androgenezis és gynogenezis ill hibridizáció** sikerességének ellenőrzése:
- Szex**specifikus markerek** izolálása:
- Származásellenőrzés
- Kórokozók azonosítása és jellemzése



## Interspecifikus androgenezissel létrehozott aranyhalak vizsgálata RAPD analízissel

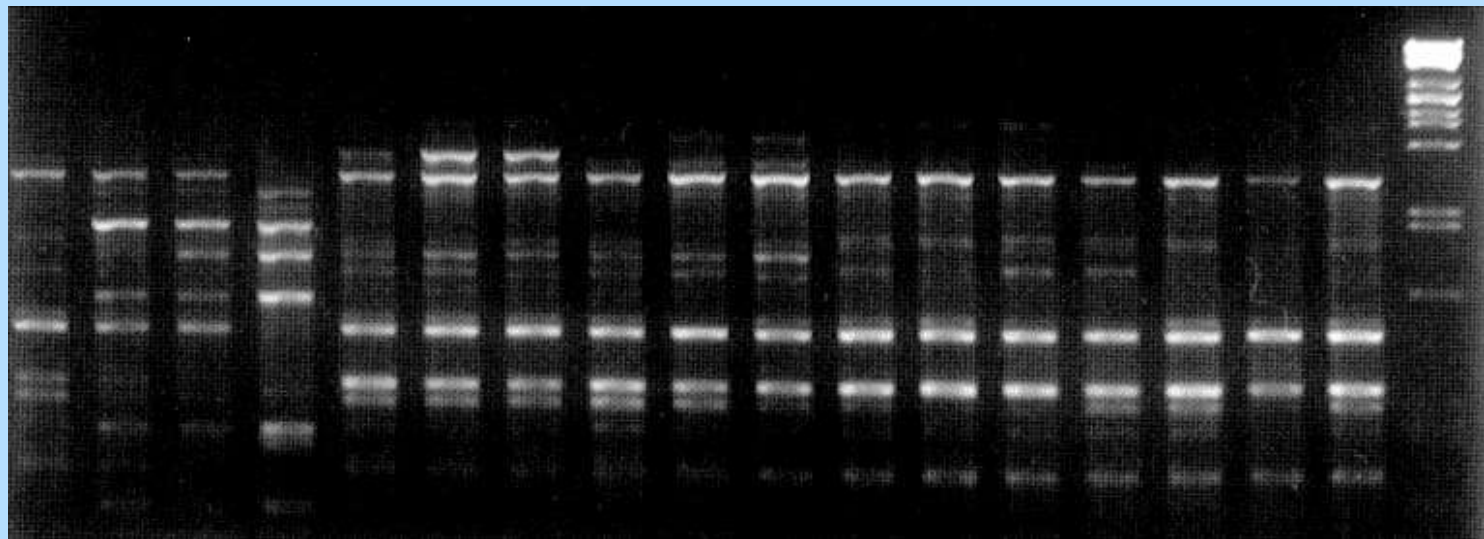


## Interspecifikus androgenezissel létrehozott aranyhalak vizsgálata RAPD analízissel





## Interspecifikus androgenezissel létrehozott aranyhalak vizsgálata RAPD analízissel



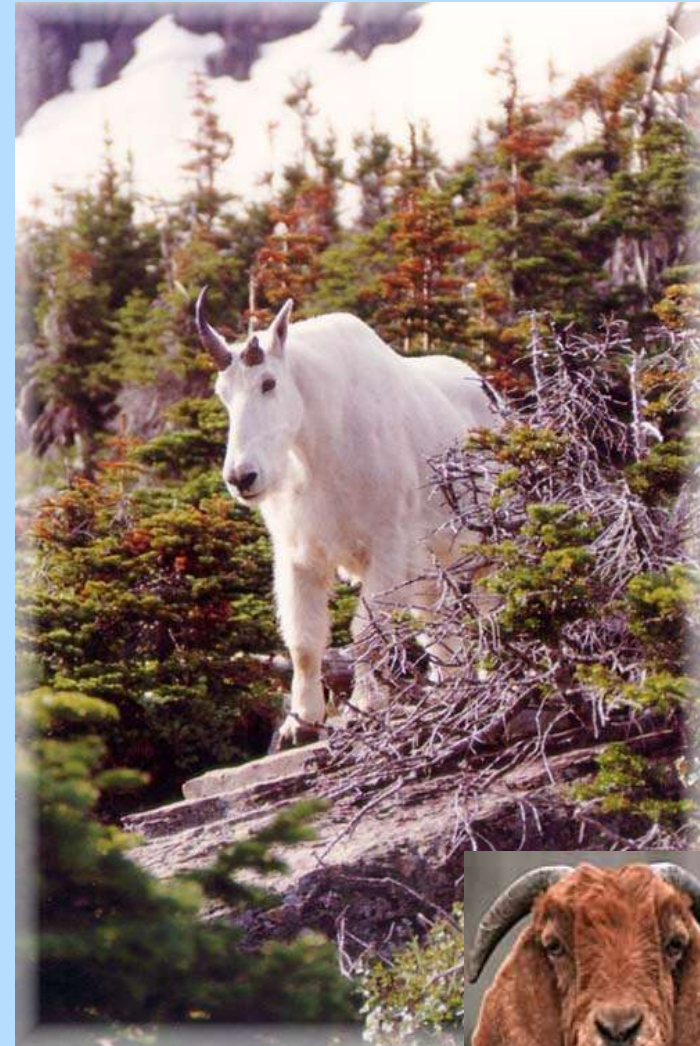








# Klón (YAC, BAC) alapú térképezés



Szent István Egyetem MKK VTI  
Halgazd





# Megközelítés I.

- A genom darabolható / klónozható.
  - Könyvtár hozható létre
- STS (Sequence Tagged Site)
  - A genom egyetlen pontján,
  - egyetlen kópiában megtalálható,
  - 200-500bp hosszúságú DNS szakaszok  
(gyakorlatilag csak az ismétlődő és több kópiás szekvenciák nem tartoznak ide),
  - amelyek jelenléte biztosan azonosítható.

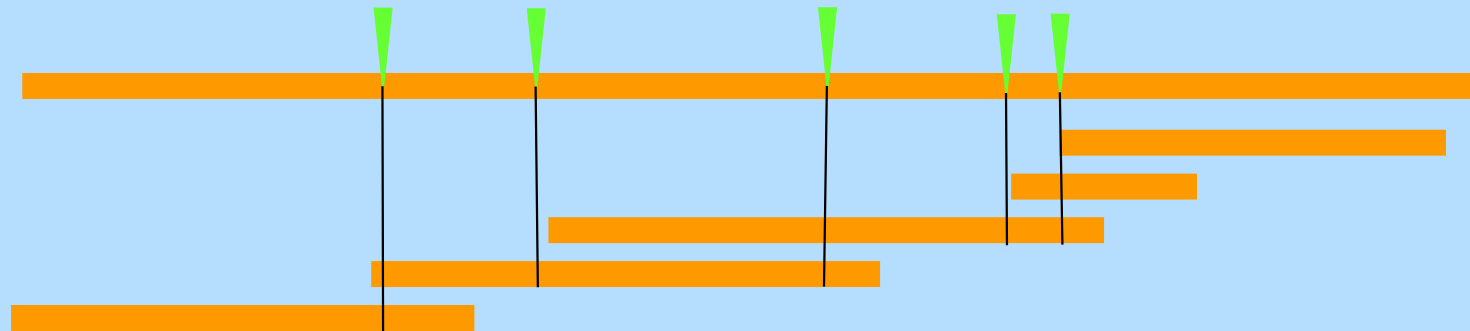


## Megközelítés II.

- Megkereshetők az egy adott STS-t (gént /markert) hordozó klónok.
- Az klónok egymástól függetlenül vizsgálhatók
- Átfedő darabokkal összerakható / lefedhető az egész genom



# Átfedő klónok



CONTIGous block of clones – egybefüggő klón sorozat

Cél: a vizsgált régió maradéktalan összeillesztése



# Hasítás restriktációs enzimekkel

Felismerő hely	Felismerő helyek távolsága (bp)
4bp	256
5bp	1024
6bp	4096
7bp	16 384
8bp	65 536





## Genomok darabolása restriktációs enzimekkel

Faj	Haploid genom (bp)	Várható fragment szám		
		4-es hasító	6-os hasító	8-as hasító
E. coli	$0,49 \times 10^7$	19 140	1 196	74
Saccharomyces cerevisiae	$1,20 \times 10^7$	46 875	2 929	183
D. melanogaster	$12,83 \times 10^7$	501 171	31 323	1 958
H. sapiens	$320,1 \times 10^7$	12 503 906	781 494	48 843





# Ritkán / ritkábban hasító enzimek

- A 4 bázis előfordulási gyakorisága különböző

Pl.: Humán genom 40% -ban tartalmaz G+C

- A citozin gyakran metilált ez gátolja a restriktációs enzimet

Pl.: *NotI* (8bp- GCGGCCGC)

Várt átlagos méret 65 kb

Valóságban 1000-1500 kb

(*E. Coli* 74 fragment helyett 20)

- CTAG szekvencia ritkábban fordul elő a vártnál

(*Bfal*-4, *SpeI*-6, *XbaI*-6, *NheI*-6, *BlnI*-6)



# A genomdarabolás követelményei:

- Egyforma fragment méret
- Vektornak megfelelő méret

## Genomdarabolás a gyakorlatban

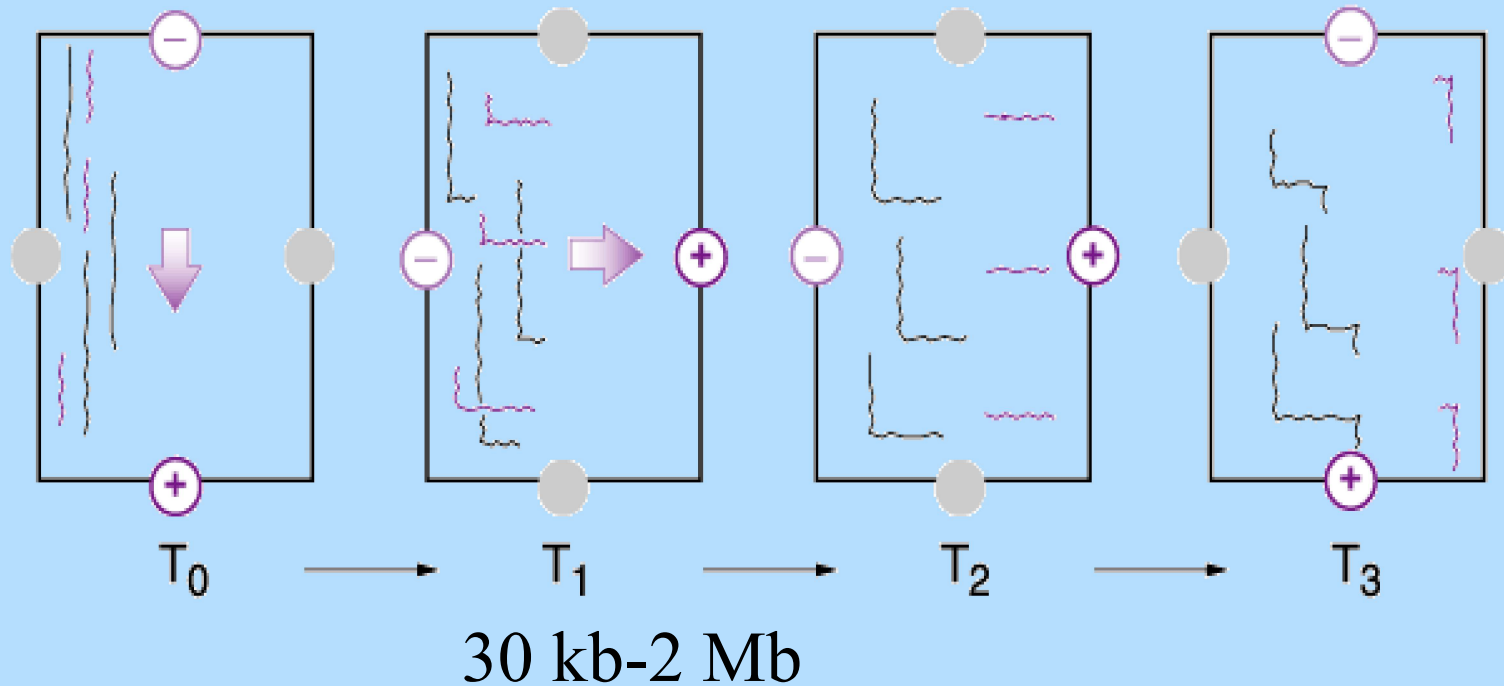
- 4-6 bp felismerő enzimek túl kicsire vágnak
- 8bp felismerő enzimekkel
- Több enzimmel egymástól független emésztés
- Részleges emésztések 6-8 bp felismerő enzimekkel (átfedő klónokat eredményez)

Szükséges a méret szelekció





# PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)



OFAGE (Orthogonal-Field Alteration Gel Electrophoresis)

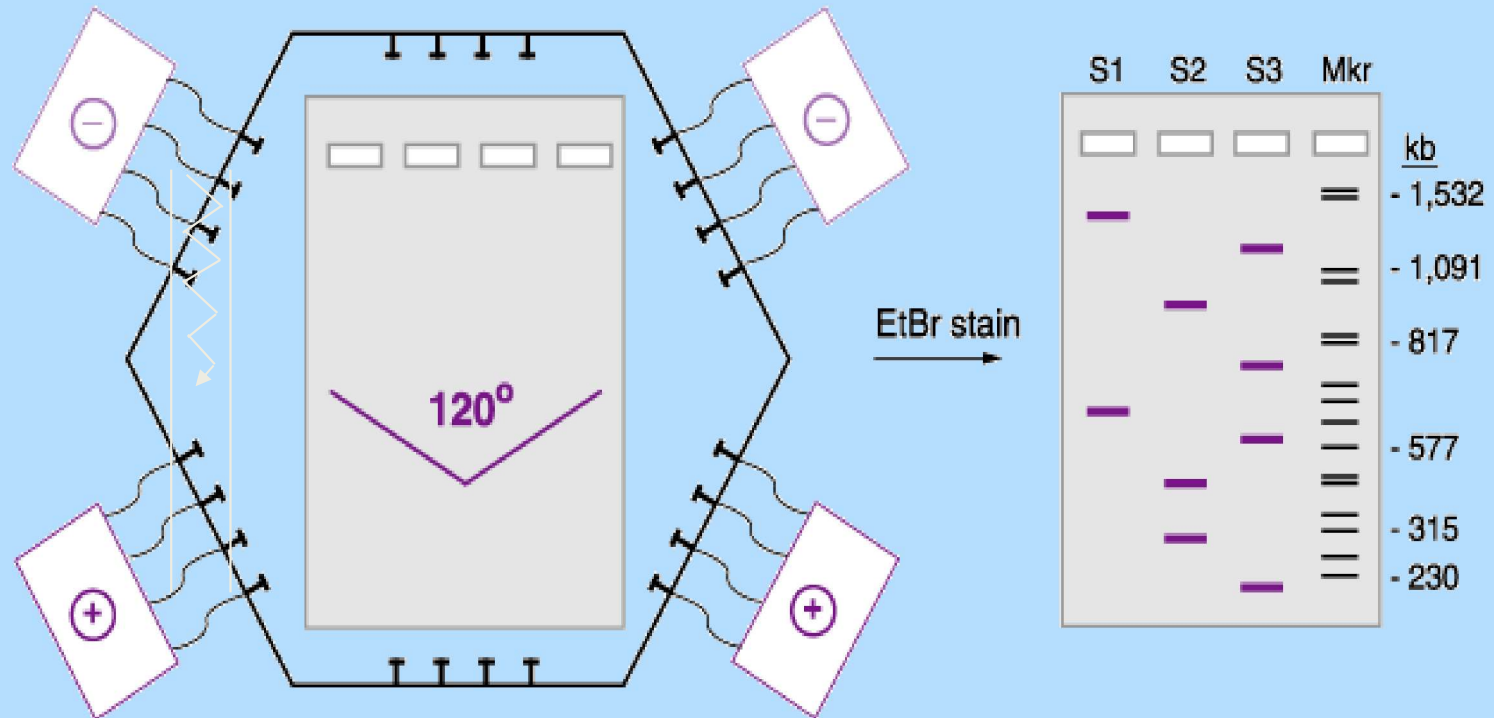
FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis)

TAFE (Transversely Alternating Field Electrophoresis)





# CHFE (Contour-clamped Homogenous Electrical Field Electrophoresis)



10 Mb  $\leq$



# Genom lefedettség

• Szükséges független klónok száma nagyobb, mint az átlagos fragmentméret alapján kalkulált

- Egyesek többször, mások egyszer sincsenek jelen

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)}$$

N = szükséges klónok száma  
P = előfordulás valószínűsége  
n = fragmentméret alapján várható klónok száma





# Genom lefedettség pl.:

- Humán genom:  $3,2 \times 10^6$  kb
- Átlagos fragmentméret: 20 kb
- Várható klónok száma:

$$3,2 \times 10^6 / 20 = 1,6 \times 10^5$$

$$N = \frac{\ln(1-0,95)}{\ln(1-1/1,6 \times 10^5)} = 4,8 \times 10^5$$

- 95% valószínűség 3x lefedettségénél
- 99% valószínűség 5x lefedettségénél



# Genom / mennyiség

- <http://www.genomesize.com/>  
» 4000 faj / hivatkozás

$$\frac{\text{bp}}{0,978 \times 10^9} = \text{DNS tömeg (pg)}$$

(Dolezel et al., *Cytometry* 51A: 127-128, 2003).

- 1 bp  $\approx$  0.978 x 10<sup>-9</sup> pg



# Legkisebb genomok

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

*Meloidogyne graminicola*  
Gyökér gumó nematoda  
0,027 pg



*Rhinolophus euryale*  
Mediterrán patkó denevér  
1,87 pg



(70x)



# Fontos genomok

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

*Drosophila melanogaster*

Muslinca

0,18pg

(6,7x)

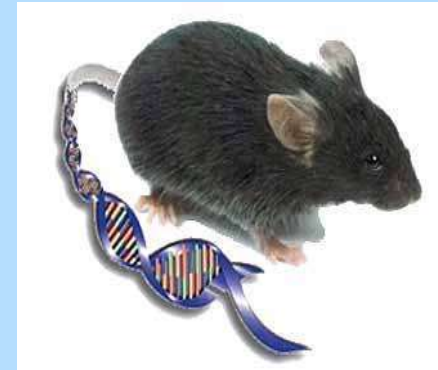


*Mus musculus*

Házi egér

3,25 pg

(120x)



*Homo sapiens*

Human

3,5 pg

(129x)





# Legnagyobb genomok

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

*Tympanoctomys barrerae*  
Vörös viscacha patkány 8,4 pg  
(311x)



*Protopterus aethiopicus*  
Márványozott tüdőshal 132,83 pg  
(4920x)





# Vektor választás

- Klónozendó fragmentek mérete  
(Nagyobb klón = kevesebb klón)
- Kezelhetőség
  - Kisebb fragmentek könnyebben klónoozhatóak
  - Kis fragmentek könnyebben transzformálhatók
  - Nagyobb fragmentek könnyebben sérülnek
  - Nagyobb klónok könnyebben vesznek el
- Fág könyvtárak jobban eltarthatóak





# Vektorok

	Átlagos inszert méret
Plazmid	1bp-12 kb
$\lambda$ Fág	9-23 kb
Kozmid	30-45 kb
P <sub>1</sub> Fág	70-100 kb
PAC	100-300 kb
BAC	$\leq$ 300 kb
YAC	20-2000 kb



	inszert méret	E.coli	S. cerevisiae	D. melanogaster	H.sapiens
Plazmid	10 kb	4 90	1 200	128 300	3 201 000
$\lambda$ Fág	18 kb	272	667	7 128	177 833
Kozmid	40 kb	122	300	3 208	80 025
P <sub>1</sub> Fág	85 kb	58	141	1 509	37 658
PAC	250 kb	20	48	514	12 804
BAC					
YAC	1000 kb	5	12	128	3 201

# YAC

## Yeast Artificial chromosomes

Burke & Olson 1987

ARS - kromoszóma replikációs origó

TEL - Telomer régió

CEN4 - centromer régió

URA3 - élesztő marker gén

TRP1 - élesztő marker gén

ORI - bakteriális replikációs origó

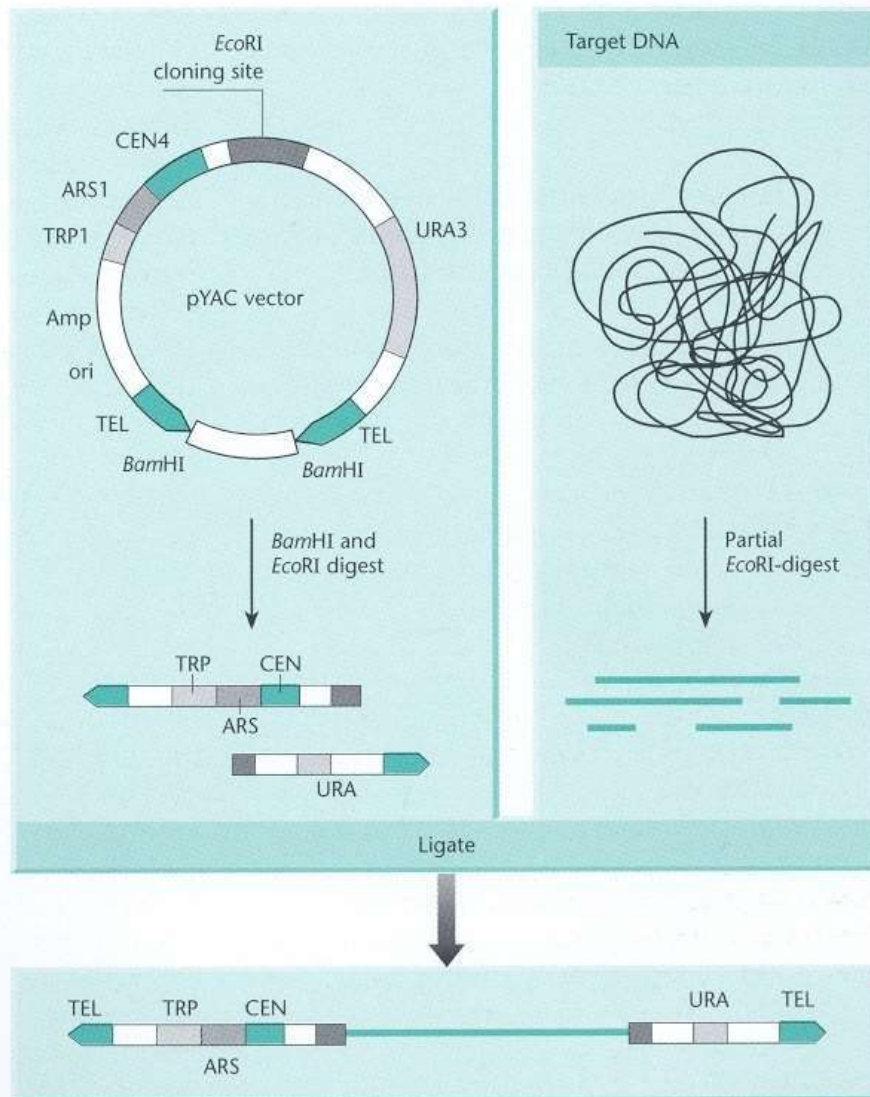
Amp –ampicilin rezisztencia

Élesztőbe kell transzformálni

Kópiaszám 1 / sejt

Minimum 20 kb

Maximum 2000 kb





# YAC hátrányai

- A nagy fragmentek a ligálás és a transzformálás között instabilak
- 10-60% közötti a kiméra klónok száma
  - Együttes ligálódás
  - Rekombináció a klónok között  
(In situ hibridizációval tesztelhető)

Az inszertek középső régiója deletálódhat (20-260 kb )

- Ligálás közben
- Mitotikus osztódások közben  
(gyakorisága csökkenthető rekombináció deficiens törzsekkel)

Nagy gyakorisággal vesznek el bizonyos YAC-ok a mitózisok során

- Nem szereti a ismétlődő és palindrom szekvenciákat
- Az élesztő kromoszómák nehezen választhatók el a YAC-októl

# PAC

## P1-derived Artificial chromosomes

Sternberg et al. 1992

*Pac* - Pacase hasító és pakolás indító hely

*loxP* - Cre rekonbináz felismerő hely

Kan<sup>r</sup> - Kanamicin rezisztencia

plazmid replicon

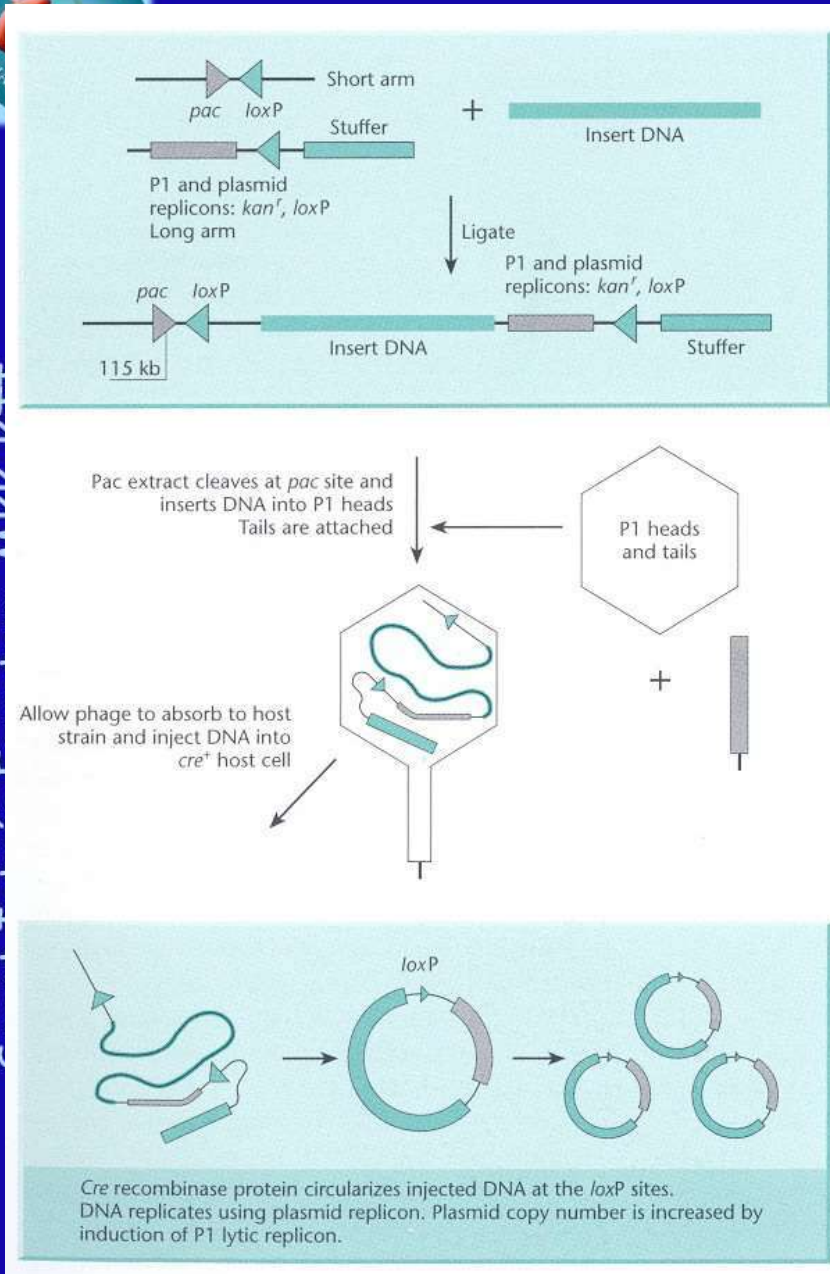
P<sub>1</sub> litikus replicon

Szükséges még:

- Pacase
- Fág fej + farok extract
- Cre<sup>+</sup> bakterium törzs

A kópiaszám növelhető (IPTG)

Insert: 100 - 300 kb





# PAC előnyei / hátrányai

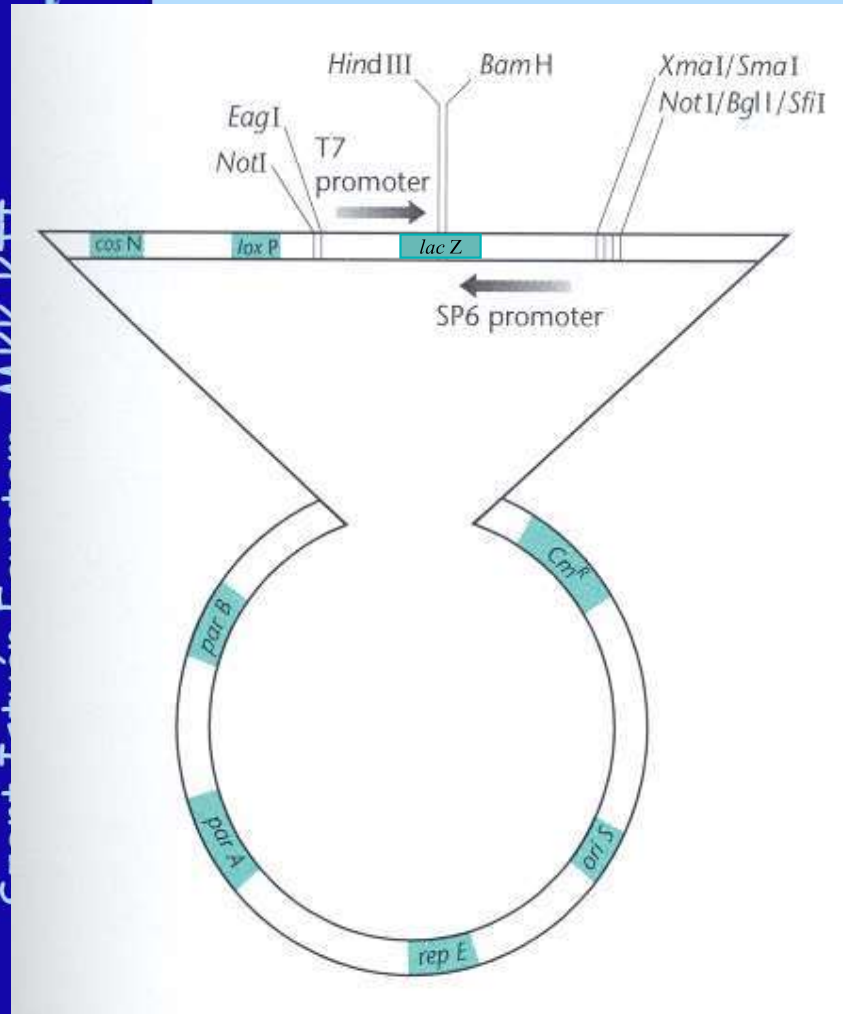
- Csak 1-2% közötti a kiméra klónok száma
- A klónok stabilak (nincs jelentős deletálódás)
- Könnyen elkülöníthetőek a klónok a bakteriális szekvenciáktól
- Jól tolerálja az ismétlődő és palindrom szekvenciákat
- A kópiaszám növelhető
- Nehéz megfelelő lefedettségű könyvtárakat létrehozni
- Több munkát igényel



# BAC

## Bacterial Artificial chromosomes

Shizuya et al. 1992



F-faktor-ból (egy kópiás szex faktor)

*oriS* - replikációs origó

*repE* -ATP függő helikáz

*parA* } kópiaszám befolyásoló gének  
*parB* }

*Cm<sup>R</sup>* - Chloramfenikol rezisztencia gén

*loxP* - Cre rekombinááz felismerő hely

*cosN* - $\lambda$  termináz kötő hely

*lacZ* - E.coli  $\beta$  galaktozidáz

Kópiaszám 1-2 / sejt

Insert: 100 - 300 kb



# BAC előnyei / hátrányai

- A kiméra klónok száma 1% alatti
- A klónok stabilak (nincs jelentős deletálódás)
- Könnyen elkülöníthetőek a klónok a bakteriális szekvenciáktól
- Jól tolerálja az ismétlődő és palindrom szekvenciákat
- Könnyen kezelhető
- Kék-fehér szelekció
- A kópiaszám alacsony



# Contig



CONTIGous block of clones – egybefüggő klón sorozat

Cél: a vizsgált régió maradéktalan összeillesztése

Kis felbontású térkép YAC-ból

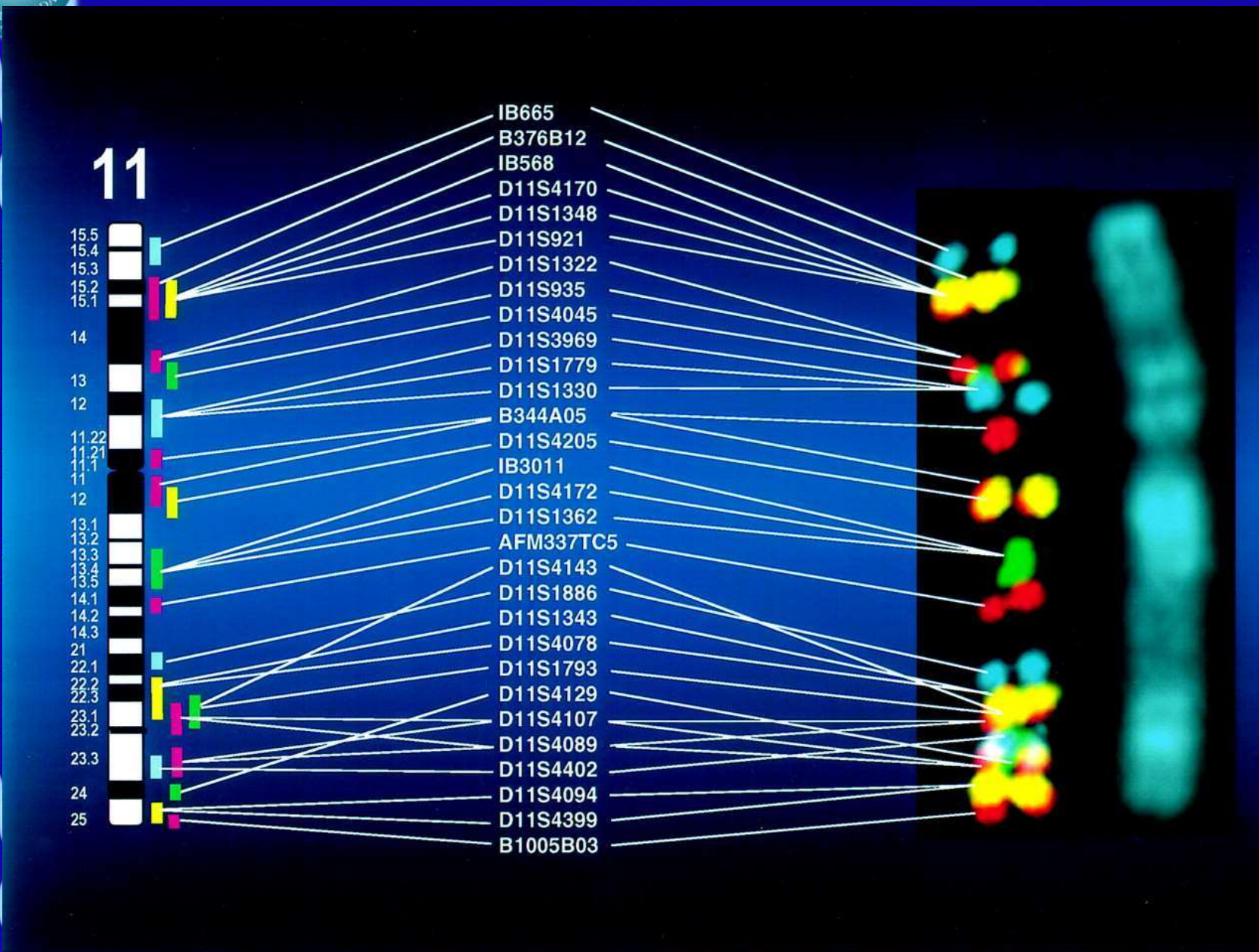
Nagy felbontású térkép COSMID-ból

Gyakorlat: YAC, BAC, PAC, COSMID vegyesen



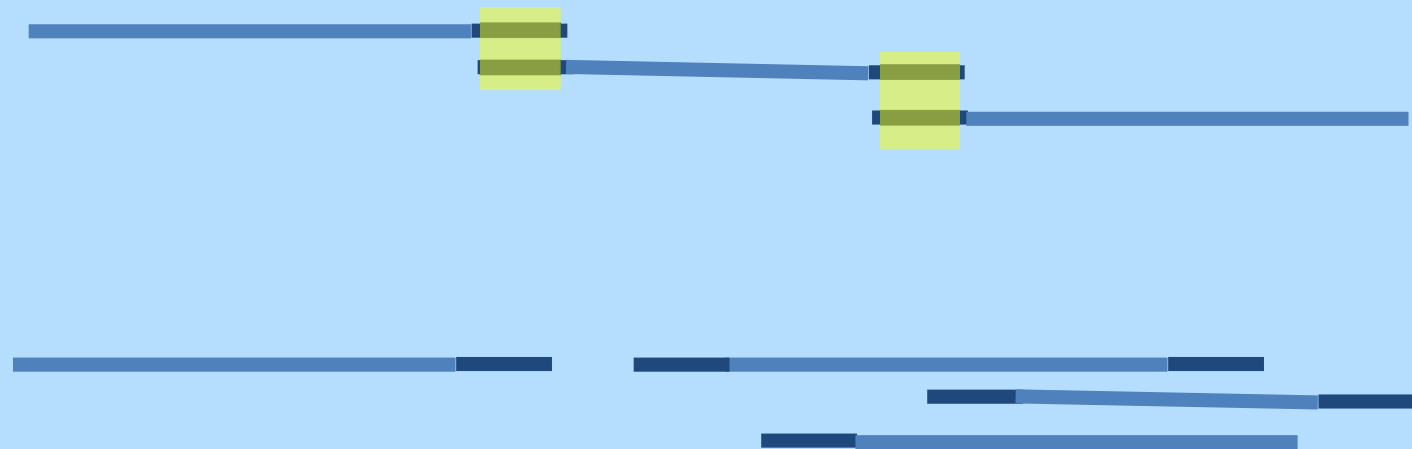
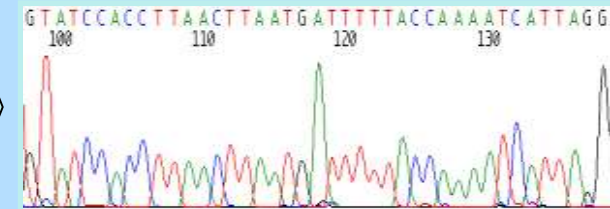
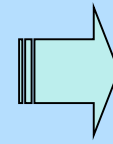
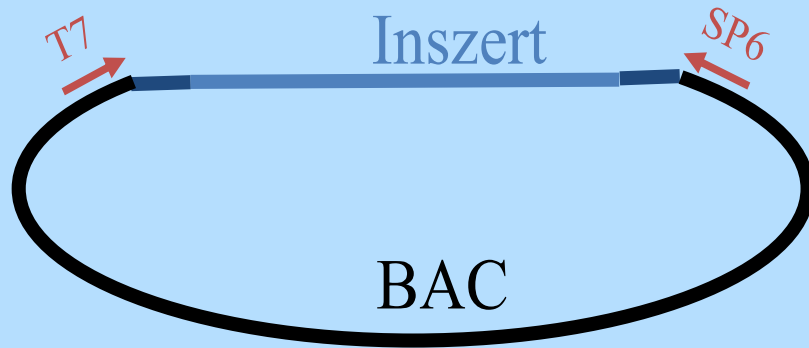
# Contig készítés FISH-el

Szent István Egyetem, MKK-KTI





# Contig készítés terminális szekvenciákkal

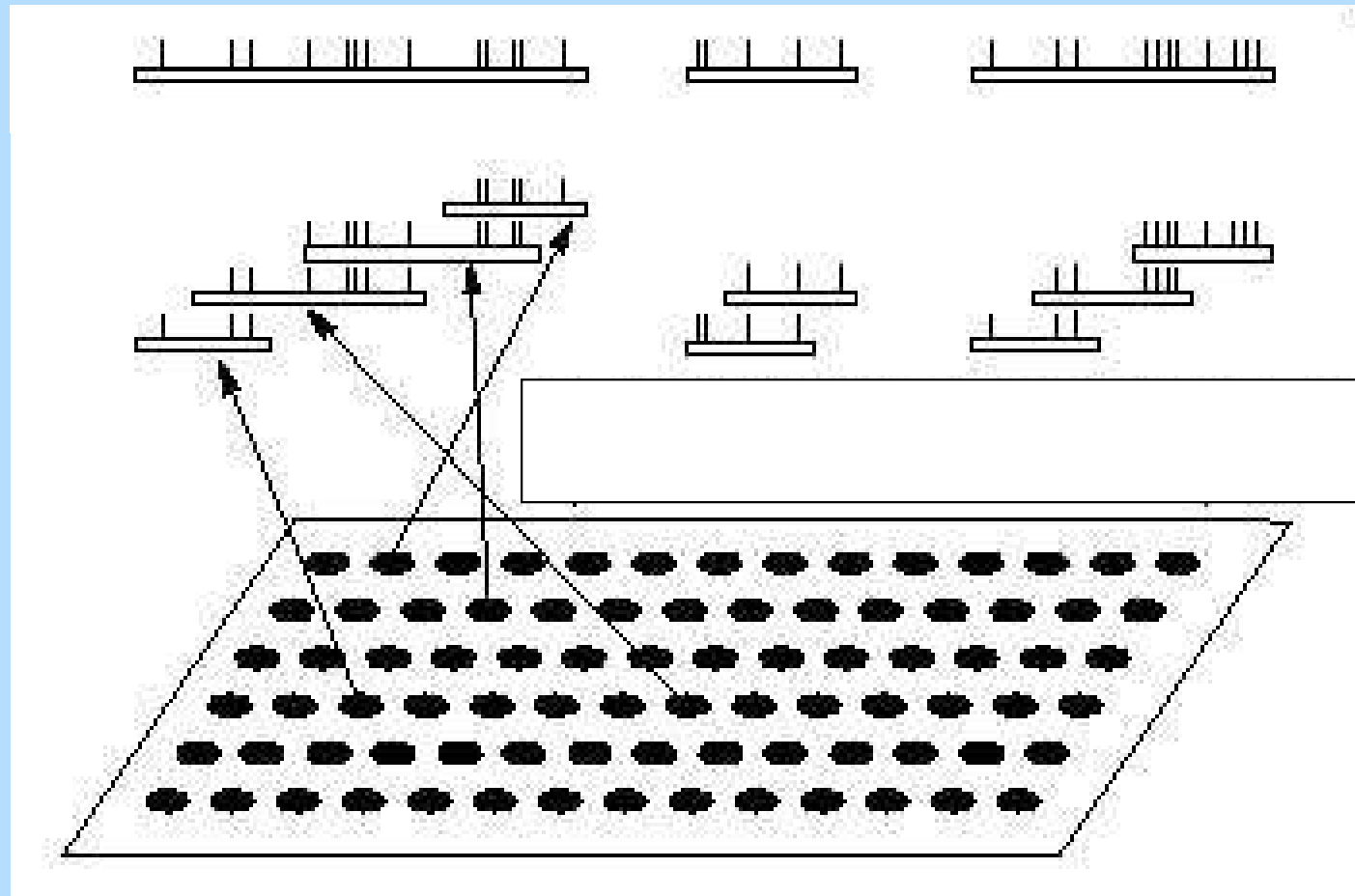






# Contig készítés hibridizációval

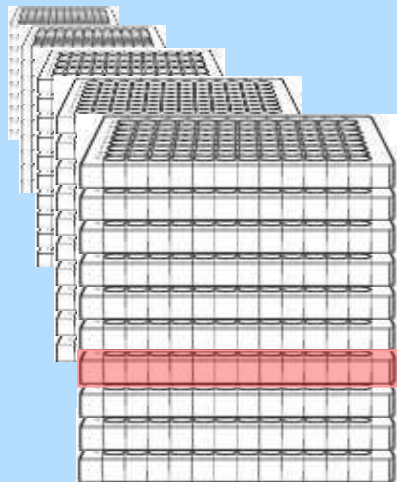
Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék







# Contig képzés pool PCR-el



1. Pool : 10 plate-ből 1 minta

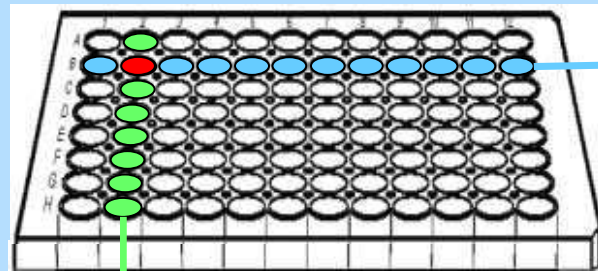
9 600 db  
BAC klón

10 db PCR



2. Pool : plate-ből 1 minta

10 db PCR



3. Pool : 1 sorból 1 minta

8 db PCR

4. Pool : 1 oszlopból 1 minta

12 db PCR

Összesen: 40 db PCR

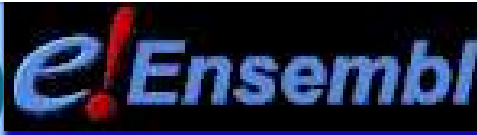


# Genom szekvenálás

- Egy gerinces genom 400 Mb – 6 Gb között van ( $4 \times 10^8$ - $6 \times 10^{10}$  bp)

Két stratégia:

- Hierarchical Shotgun Sequencing (HSS)
- Whole Genome Shotgun Sequencing (WGSS)
- **White Papers:** együttes törekvés egyes genomok szekvenálásához , támogatások megszerzéséhez



Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

## Ensembl Species



**Alpaca**  
*Vicugna pacos*



**Anole Lizard**  
*Anolis carolinensis*



**Armadillo**  
*Dasyopus novemcinctus*



**Bushbaby**  
*Otolemur garnettii*



**Caenorhabditis elegans**



**Ciona intestinalis**



**Ciona savignyi**



**Cat**  
*Felis catus*



**Chicken**  
*Gallus gallus*



**Chimpanzee**  
*Pan troglodytes*



**Cow**  
*Bos taurus*



**Dog**  
*Canis familiaris*



**Dolphin**  
*Tursiops truncatus*



**Drosophila melanogaster**  
*Drosophila melanogaster*



**Elephant**  
*Loxodonta africana*



**Fugu**  
*Takifugu rubripes*



**Gorilla**  
*Gorilla gorilla*



**Guinea Pig**  
*Cavia porcellus*



**Hedgehog**  
*Erinaceus europaeus*



**Horse**  
*Equus caballus*



**Human**  
*Homo sapiens*



**Hyrax**  
*Procavia capensis*



**Kangaroo rat**  
*Dipodomys ordii*



**Lamprey** ([preview - assembly only](#))  
*Petromyzon marinus*



**Lesser hedgehog tenrec**  
*Echinops telfairi*



**Macaque**  
*Macaca mulatta*



**Marmoset**  
*Callithrix jacchus*



**Medaka**  
*Oryzias latipes*



**Megabat**  
*Pteropus vampyrus*



**Microbat**  
*Myotis lucifugus*



**Mouse**  
*Mus musculus*



**Mouse Lemur**  
*Microcebus murinus*



**Opossum**  
*Monodelphis domestica*



**Orangutan**  
*Pongo pygmaeus*



**Pig**  
*Sus scrofa*



**Pika**  
*Ochotona princeps*



**Platypus**  
*Ornithorhynchus anatinus*



**Rabbit**  
*Oryctolagus cuniculus*



**Rat**  
*Rattus norvegicus*



**Saccharomyces cerevisiae**  
*Saccharomyces cerevisiae*



**Shrew**  
*Sorex araneus*



**Sloth**  
*Choloepus hoffmanni*



**Squirrel**  
*Spermophilus tridecemlineatus*



**Stickleback**  
*Gasterosteus aculeatus*



**Tarsier**  
*Tarsius syrichta*



**Tetraodon**  
*Tetraodon nigroviridis*



**Tree Shrew**  
*Tupaia belangeri*



**Wallaby**  
*Macropus eugenii*



**Xenopus tropicalis**



**Zebra Finch**  
*Taeniopygia guttata*



**Zebrafish**  
*Danio rerio*



# Szarvasmarha géntérképezés

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



## Gazdasági jelentőség

Élelmezési szempontok:

Tej-, és hústermelés

29 pár autoszóma, X, Y





# Szarvasmarha géntérképezés

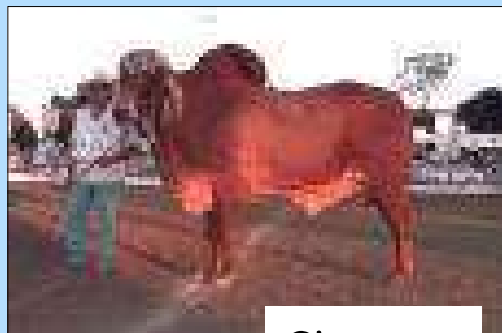
## Projektek

**ROSLINI INTÉZET**  
**INRA**  
**USDA-MARC**  
**CSIRO**

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

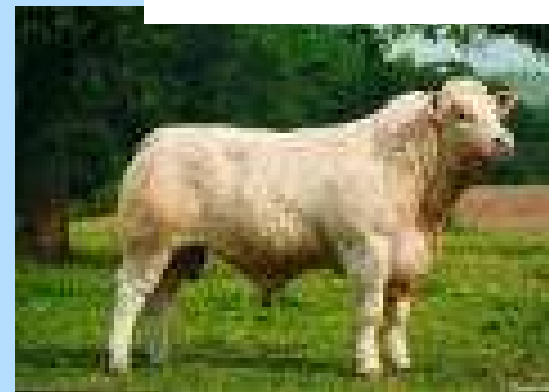


Indu brazil



Gir

Charolais





# Nemzetközi szarvasmarha referencia panel (IBRP)

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

CSIRO Referencia családok	Brahman x Gir x Indu Brazil	46
	Szimmentáli x Brahman	13
	Ausztrál Fríz x Sahival	68
Texas University Referencia családok	N'Dama x Boran	56
ILRAD18 Referencia család		65
BovMap Referencia családok	Holstein	36
	Normande	19
	Charolais	10
USDA-MARC Referencia család	Gelbvieh x Szimentáli x Piemonti x Hereford	15
IRRF Referencia családok	Aberdeen Angus, Gelbvieh, Simmental	459
	South Devon	

Forrás: [www.cgd.csiro.au/cgd/cgd.families](http://www.cgd.csiro.au/cgd/cgd.families); <http://www.beef.crc.org.au/default.asp?page=/research/program+1>



Brahman



N'dama





# Genetikai térkép

1997. Ezt egy olyan térkép előzte meg amely 4, már addigra elkészült térkép összevonásával jött létre

1997.

746 marker (600 mikrosztellit)

31 kapcsoltsági csoport

Térkép hossza: 3532 cM

Később már csak a felbontás növelése  
konszenzus térkép (pl: BTA24)

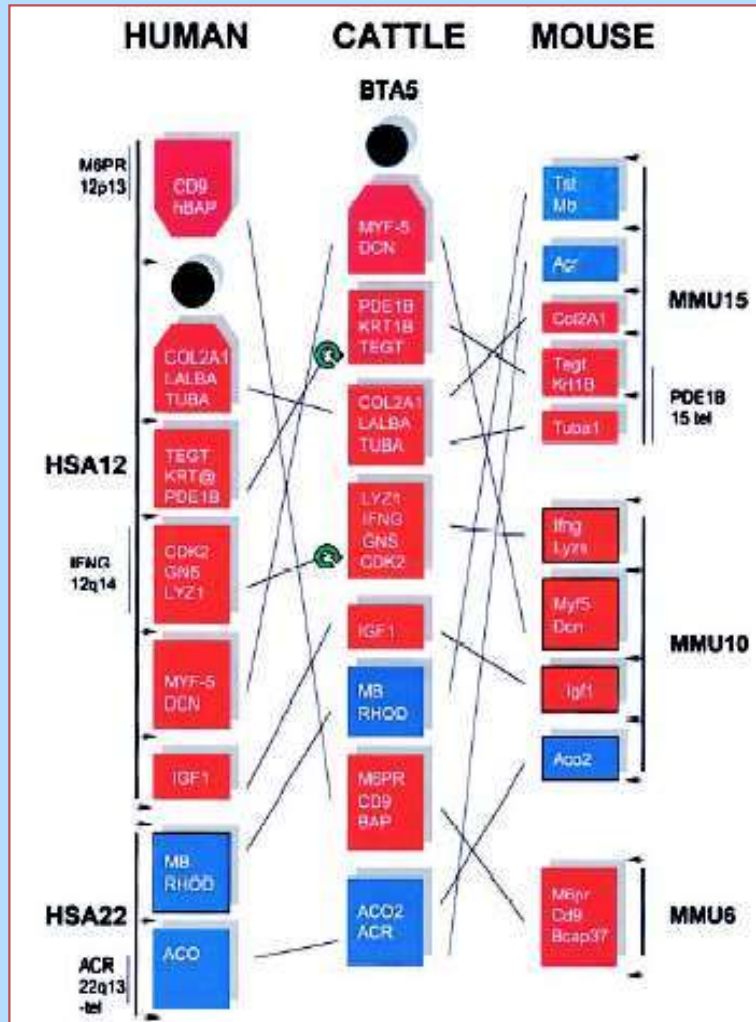


# Fizikai térkép

RH panel:

- » BovR5 (Womack és mtsai 2002.)
- » RH<sub>12000</sub> (Reymond és mtsai 2002 )
- » RH<sub>3000</sub> (Williams és misai 2002)

# Összehasonlító térkép



Szarvasmarha  
összehasonlító térkép az  
ember és az egér  
viszonylatában



# Fizikai térkép

## BAC könyvtárak:

- » 6x- os takarás (Ureta-Vidal és mtsai 2003)
- » 5x-ös takarás (Zhu és mtsai 1999)
- » 11-12 x-es takarás (Warren és mtsai 2000)

» 10,7 x-es takarás CHORI-204 (bacpac.chori.org)

Ezek alapján 15x-ös takarású BAC térkép



# Juh géntérképezés

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

A faj jelentősége:  
tejtermelés  
hústermelés  
gyapjú

Kromoszómaszám:  
26 pár autoszóma  
X,Y ivari kromoszóma







# Juh genetikai térkép I.

## Referencia családok

USDA-MARC

(suffolk x romanov) x romanov

(romanov x rambuillet) x romanov

(rambUILlet x romanov) x romanov





# Juh genetikai térkép II.

## Referencia családok

IMF

9 család, 3 generációs pedigrék



A keresztezéshez felhasznált fajták:

Texel

Perendale

Coopworth

Merino

Romney



# Genetikai térkép III.

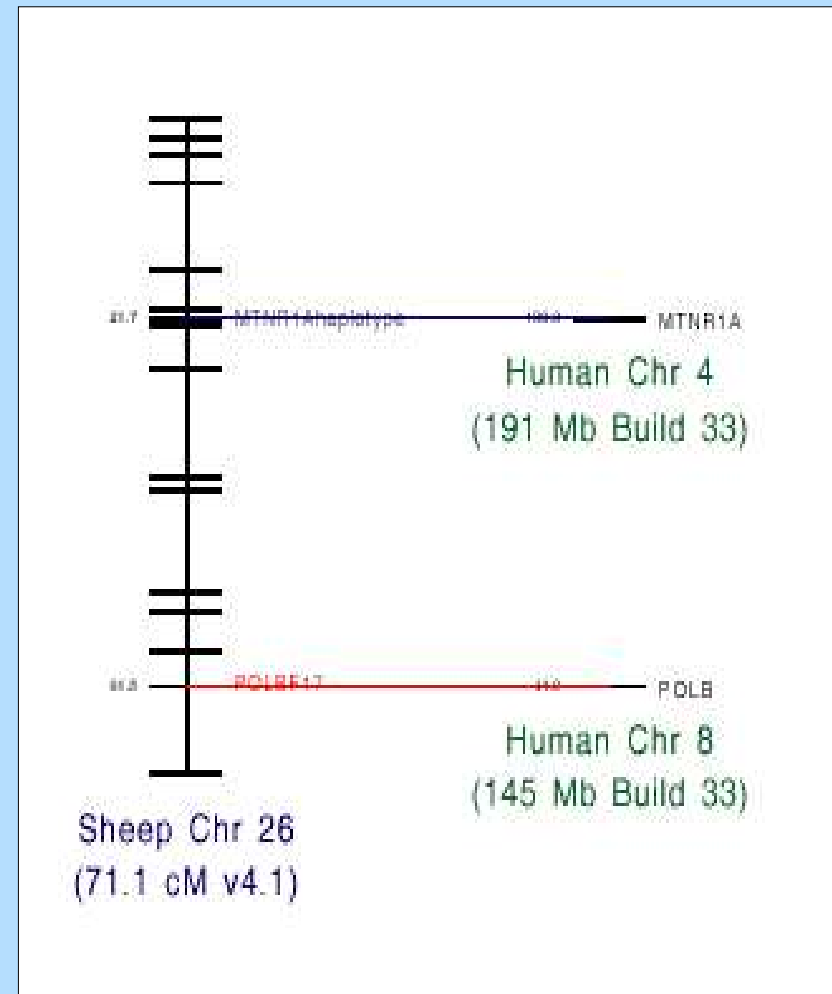
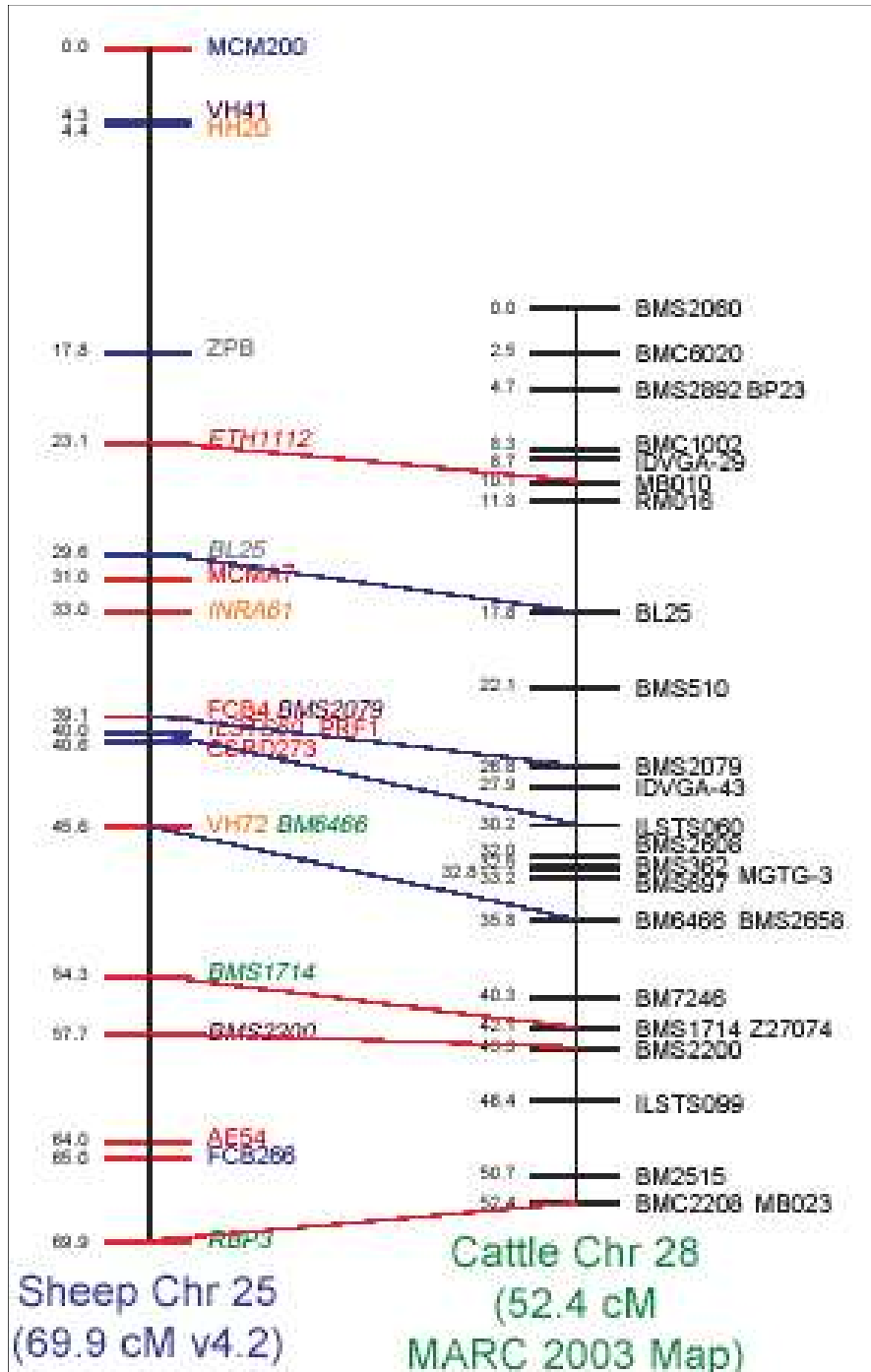
- 1998-ban USDA tette közzé  
519 marker (101 juh mikroszatellit, 402 szarvasmarha mikroszatellit, 16 gén)  
átlagos marker távolság: 6,5 cM  
térkép hossza: 3063 cM (autoszómákon)
- 2001-ben IMF felhasználásával  
1062 lókuszt  
térkép hossza: 3400 cM (autoszómákon), ké-  
ivar átlagára vonatkoztatva ~ 132 cM - X kromoszómá



# Fizikai térkép

- BAC könyvtár: 3x fedettség 123 kbp inszertméret
- RH panel – INRA dolgozta ki
  - RH 5000
  - RH 12000 (Shay és mtsai 2001.)
  - (RH 10000) (Andre Eggen)

# Összehasonlító térkép







# Sertés

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék

- A faj jelentősége
- Géntérképezési projektek, populációk
- Genetikai térkép
- Fizikai térkép
- Összehasonlító térkép



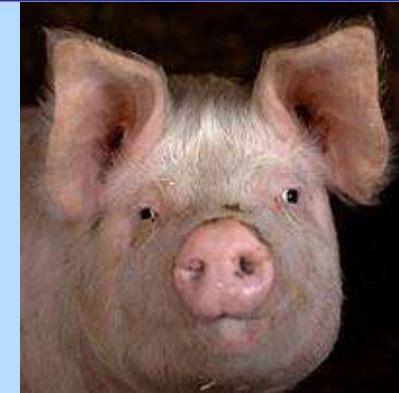


# Sertés

## A faj jelentősége:

Gazdasági szempontok:

a vöröshús fogyasztás 43%-át teszik ki  
(hús, zsír termelés – hátszalonna vastagság,  
intramuszkuláris zsír mennyiség)



egészségügyi vonatkozás

egyres humán betegségek modellje  
xenotranszplantáció





# Sertés

## Géntérképezési projektek:

### PigMaP

18 európai, és 7 egyéb csoport  
(USA, Japán Ausztrália)

USDA-ARS  
amerikai csoport

### INRA

francia csoport

### NAGRP

Géntérképezési koordinációs program



# Sertés

## Térképezési populációk:

Roslin Intézet

kínai meishan



X

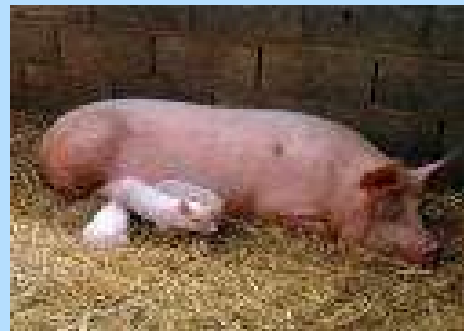
Észak-Európa  
(skandináv országok)

vaddisznó



X

nagy fehér sertés



nagy fehér sertés





# Sertés

## Genetikai térképek

Kromoszóma szám: 18 autoszóma és az ivari (X,Y) kromoszómák

Genom méret:  $\sim 3 \times 10^9$  bp

Térképezett lókuszek:

Gén:  $\sim 1000$

Mikroszatellit:  $\sim 1700$

AFLP marker:  $\sim 2300$

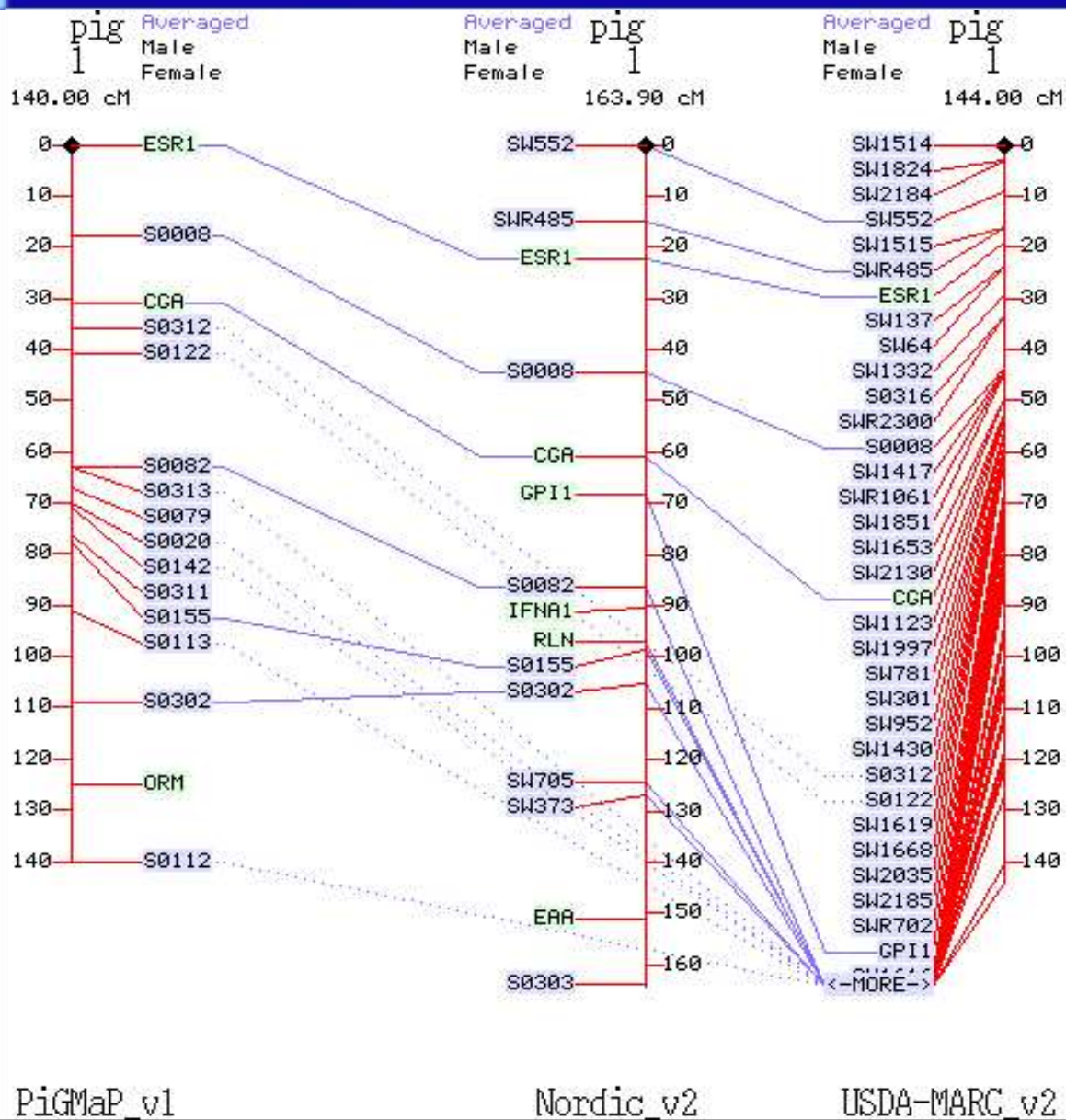
Rothschild, 2003





# Sertés

Szent István Egyetem, MKK-KTI  
Halgazdálkodási Tanszék



## Genetikai térkép

### SSC1

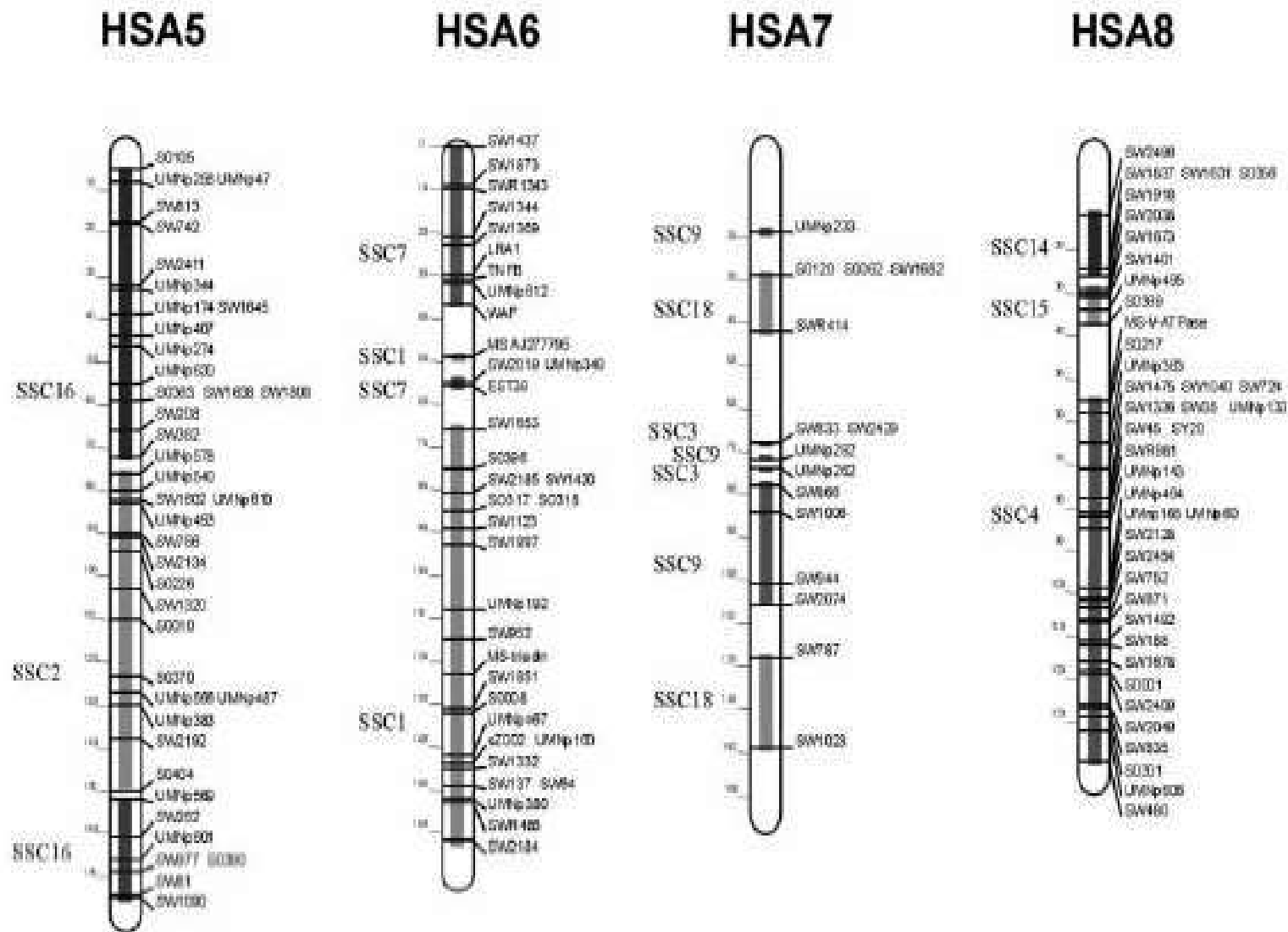




# Sertés

## Fizikai térképek

- Szomatikus sejthibrid panel
- Radiációs hibrid panel  
IMpRH<sub>7000</sub>, IMNpRH<sub>212000</sub>, SSRH
- BAC könyvtár
  - 150 kbp inszert hossz - x 5 fedésű - roslini PigEBAC
  - 165 kbp inszert hossz - x 10-11 fedésű - RPCI-44
    - x 10 fedésű - CHROI-242
    - x 5 fedésű - INRA
- YAC könyvtár
  - 589 kbp inszert hossz - x 6,5 takarás - roslini PigEBAC





# Tyúk

## A faj jelentősége:

- gazdasági szempontok:

élelemezési - tojás, hús

ipari - toll

- egészségügyi-orvosi szempontok:

a legfontosabb a nem emlős, gerinces modell állat

vírusok és onkogének felismerése, retrovírusok vizsgálata,

immunrendszer működése szabályozása (MHC)



# Tyúk

## Géntérképezési projektek:

East-Lansing

Bumstead és Palyga



vörös dzsungel tyúk

back cross

56 egyed

Fehér Leghorn

X



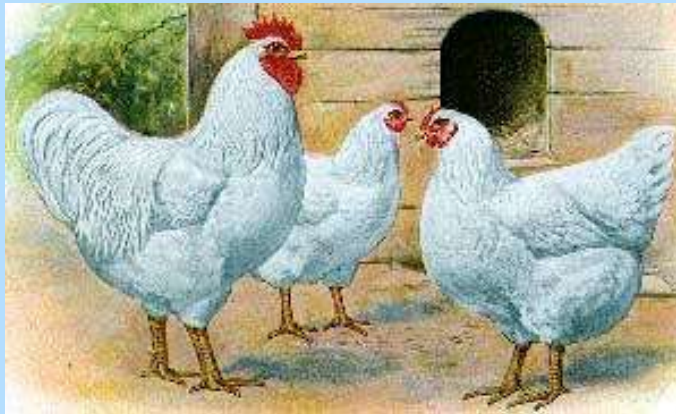


# Tyúk

## Géntérképezési projektek:

### Wageningen

Groenen



Fehér Plymouth Rock

F2 keresztezés

465 utóddal

### Compton

Crittenden



Fehér Leghorn

Back cross

52 utóddal





# Tyúk

Kromoszóma szám: 38 autoszóma  
és

az ivari (Z, W) kromoszómák

Hím: ZZ - heterogametikus

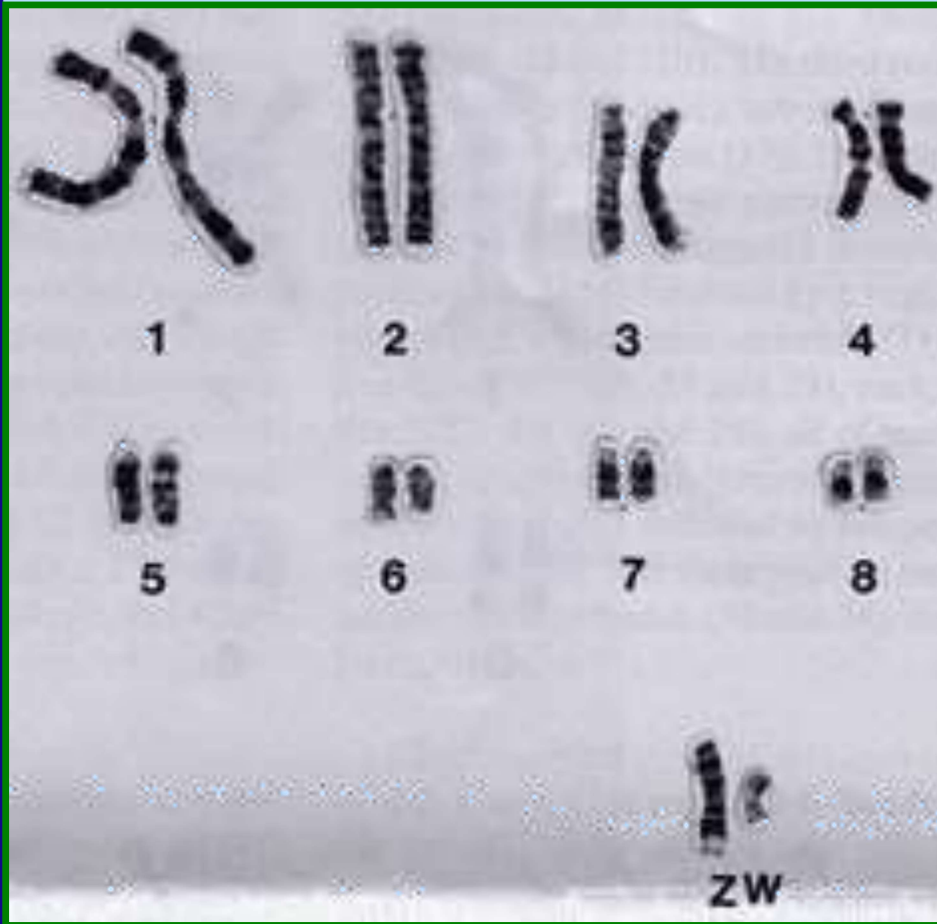
Tojó: ZW - homogametikus

- makrokromoszómák
- mikrokromoszómák (5-20 Mb)

Genom méret:  $\sim 1,2 \cdot 10^9$  bp

# Tyúk

## Citogenetikai térkép

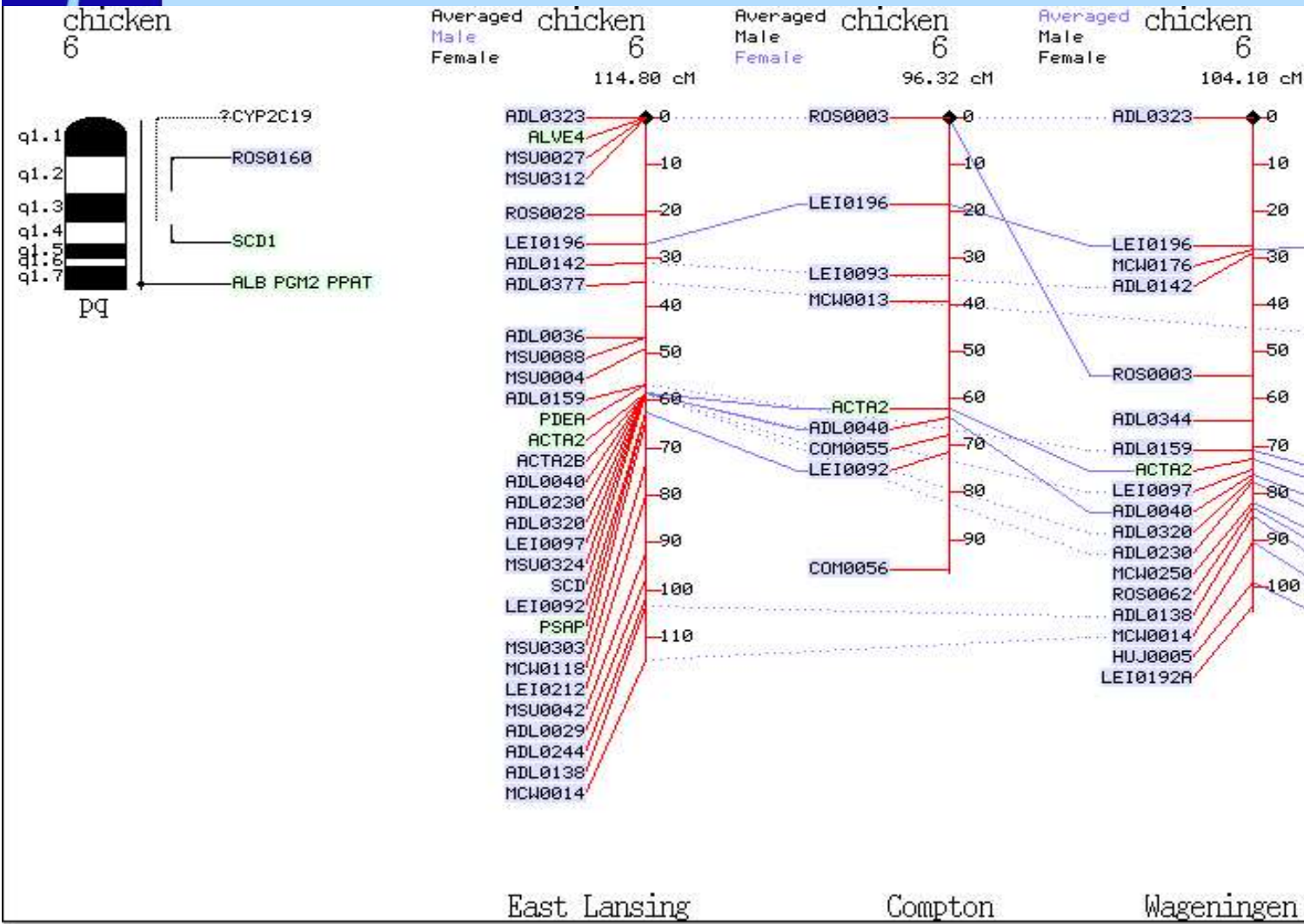


Kromoszóma szám: 38  
autoszóma és  
az ivari (Z, W)  
kromoszómák

csak a 8 autoszóma  
és a két ivari  
kromoszóma  
különíthető el jól



# Tyúk Genetikai térkép





# Tyúk

## Genetikai térkép

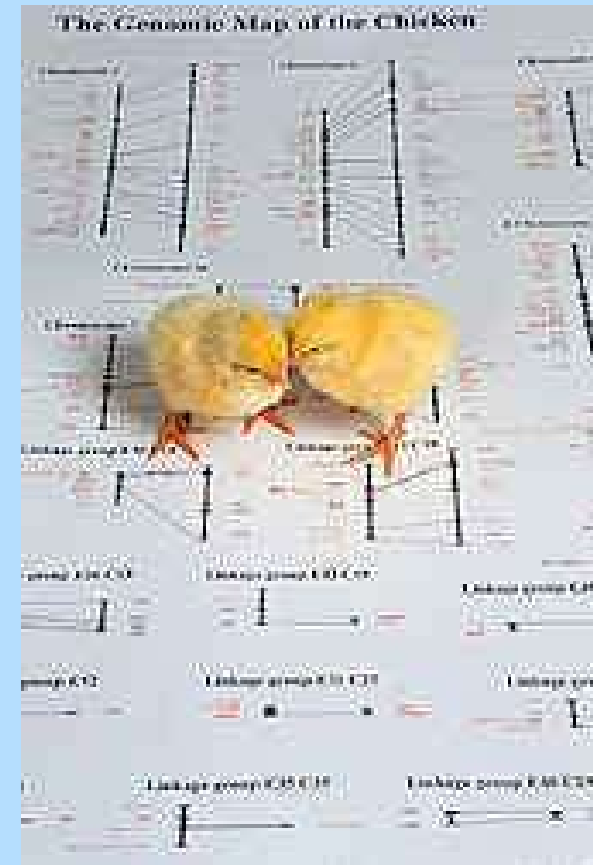
Konszenzus térkép 2000

Markerek:

1889 lókuszt térképeztek

Mikrosztellit	801
Miniszatellit	40
AFLP	552
RFLP	244
RAPD	65

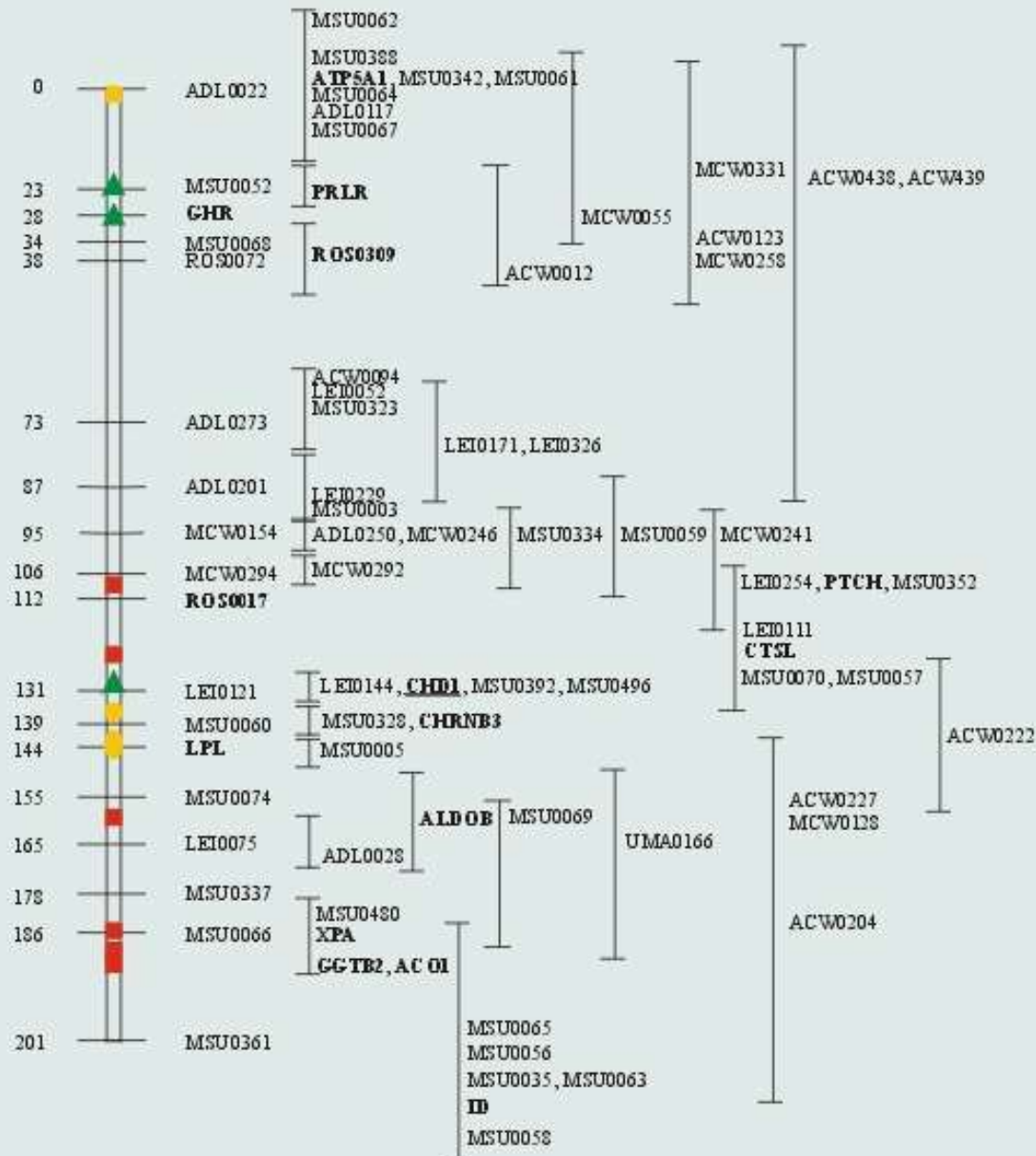
~ 3800 cM



# Tyúk

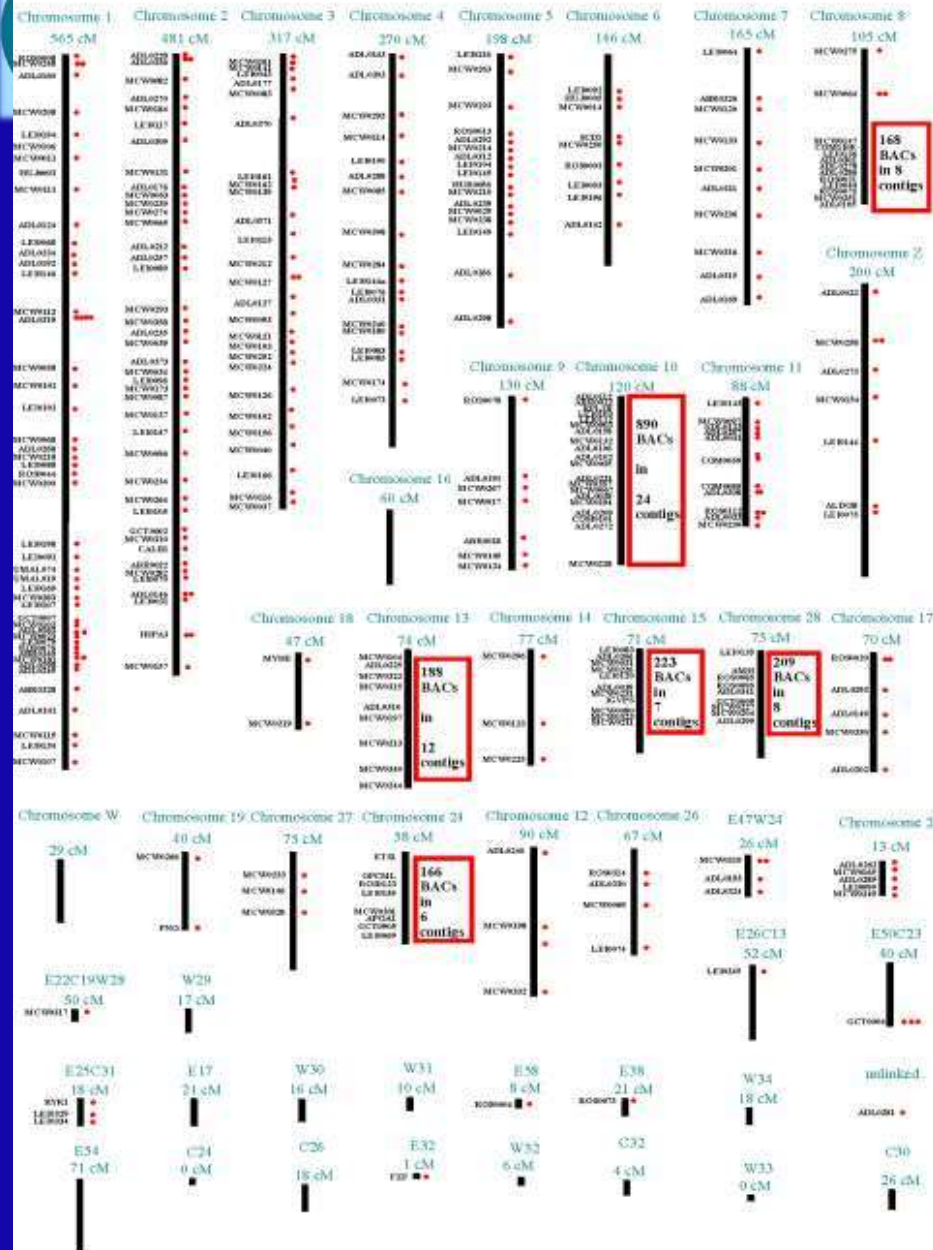
## Genetikai térkép

### Chromosome Z





## Position of isolated BAC clones (2459)



# Tyúk

## Fizikai térkép

YAC könyvtár

634 kbp inszertméret - x10 fedés

BAC könyvtár

134 kbp inszertméret - x 5,5 fedés

150 kbp inszertméret - x 15 fedés

182 kb inszertméret - x11 fedés

CHORI-261

Consensus Linkage Map of the Chicken Genome (January 2000)  
Comparative Mapping Information: Chicken - Man - Mouse

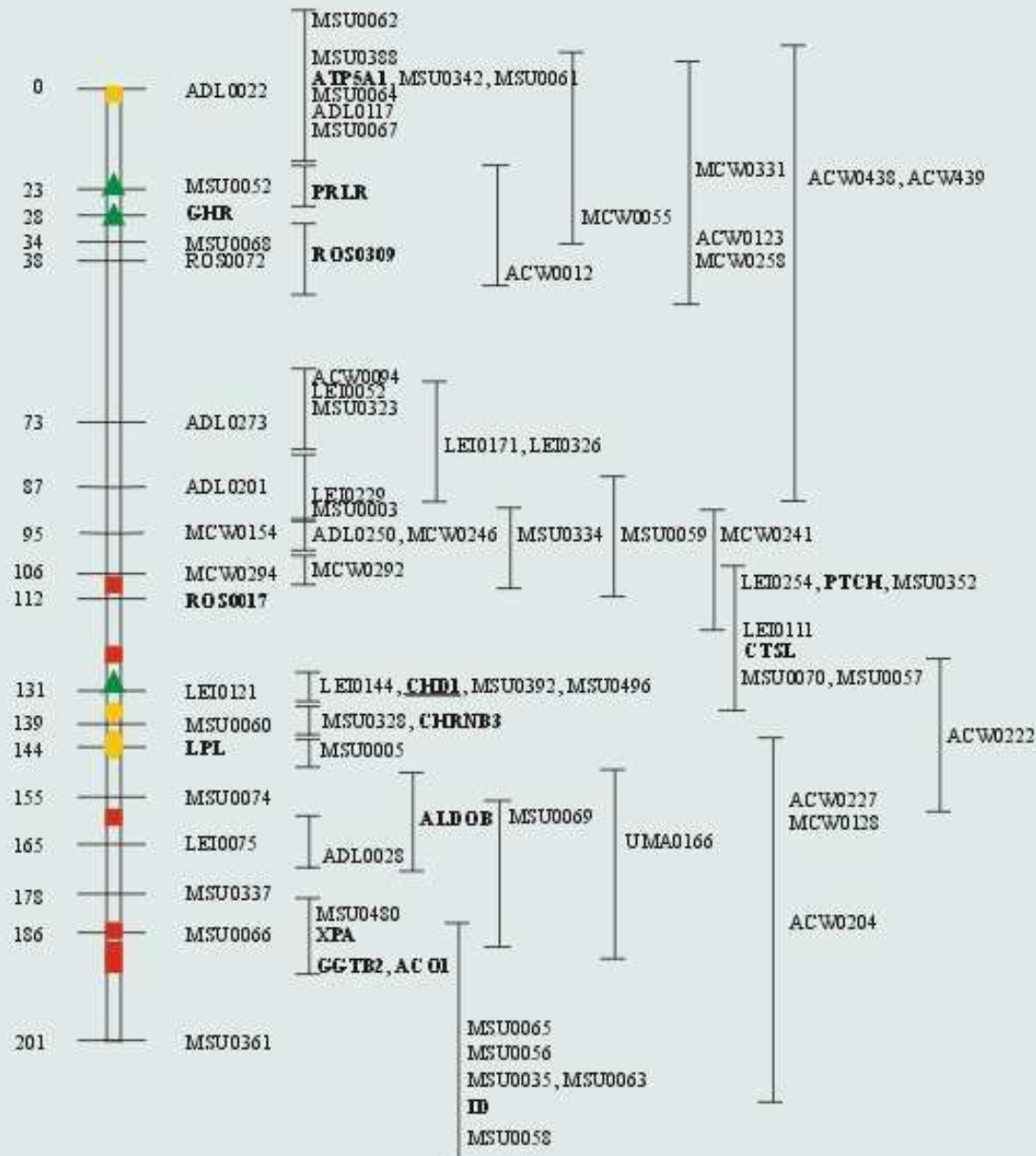
Groenen et al. (2000) *Genome Research* 10: 137-147

Chromosome 1	Chromosome 2	Chromosome 3	Chromosome 4	Chromosome 5	Chromosome 6	Chromosome 7	Chromosome 8	Chromosome 9	Chromosome 10	Chromosome 11	Chromosome 12	Chromosome 13	Chromosome 14	Chromosome 15	Chromosome 16	Chromosome 17	Chromosome 18	Chromosome 19	Chromosome 20	Chromosome 21	Chromosome 22	Chromosome 23	Chromosome 24	Chromosome 25																																												
VMOH 7p11-q11 2	ACV9B 2p22-p21.3 -	BSP2 7p12 3	PKAF 10q21.1 10	DI 11p15.5 7	CH 11p15.5 7	CAAF1 11q13 10	FYB2 11q14 2	JFAFE 1p25-p34.3 4	HTR1D 3p63-p34.3 4	BEF1 14q22-q24 12	TGFR 14q24 12	HEPCAL4 14q22.3 12	CHD 14q22.3 12	DNKCL 14q22.3-q21 14	BS04 14q22.3 14	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10																																									
BADA3 8p15 2	SHH 7q36 5	ADPRT 1q42 1	EB2 7q36 5	CAH 7p15.5 7	CAAF1 11q13 10	FYB2 11q14 2	JFAFE 1p25-p34.3 4	HTR1D 3p63-p34.3 4	BEF1 14q22-q24 12	TGFR 14q24 12	HEPCAL4 14q22.3 12	CHD 14q22.3 12	DNKCL 14q22.3-q21 14	BS04 14q22.3 14	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10	PKAF 10q21.1 10	PKDFC 10q24 7	ACD2 10q25-q24 7	SCD1 10q25 10																																										
WFCAM 8p11.3-12 12	VDR 10p13 2	TOPBP1 1q41 1	MRC1 10p13 2	COL3A1 3p24.3-p24.2 14	CFAP 3q21-q25 -	IGFBP1 9q33-q34.1 4	BMP6 9pter-q31 13	BCL2 11q21.33 1	YBE1 10p11.31-p11.22 5	MYL 10p11.3 5	SPPL1 10p11.21 17	ADCYAP9 10p11 -	PEX6 9q11.23-q12 4	GALH1 9p12-q11.2 4	CA3 9q22 3	TEBE 9q29 15	NYC 9q24.12-q24.13 15	<table border="1"> <tr><th colspan="3">Chromosome Z</th></tr> <tr><td>PFLR</td><td>5p14-p13</td><td>15</td></tr> <tr><td>GHR</td><td>5p14-p12</td><td>15</td></tr> <tr><td>CTSL</td><td>9p22.1-q22.2</td><td>3</td></tr> <tr><td>PTCH</td><td>9q22.3</td><td>13</td></tr> <tr><td>CHD1</td><td>5q15-q21</td><td>17</td></tr> <tr><td>CHRNB3</td><td>8p11.2</td><td>8</td></tr> <tr><td>LPL</td><td>8p22</td><td>8</td></tr> <tr><td>ALDOB</td><td>9q22.3-q31</td><td>4</td></tr> <tr><td>XPA</td><td>9q22.3</td><td>4</td></tr> <tr><td>GGTB2</td><td>9p21-p13</td><td>4</td></tr> <tr><td>ACO1</td><td>9pter-qter</td><td>4</td></tr> </table>	Chromosome Z			PFLR	5p14-p13	15	GHR	5p14-p12	15	CTSL	9p22.1-q22.2	3	PTCH	9q22.3	13	CHD1	5q15-q21	17	CHRNB3	8p11.2	8	LPL	8p22	8	ALDOB	9q22.3-q31	4	XPA	9q22.3	4	GGTB2	9p21-p13	4	ACO1	9pter-qter	4	<table border="1"> <tr><th colspan="3">BPT</th></tr> <tr><td>TP3</td><td>17p11.1</td><td>11</td></tr> </table>	BPT			TP3	17p11.1	11	<table border="1"> <tr><th colspan="3">C14</th></tr> <tr><td>HEPA</td><td>9q33-34.1</td><td>-</td></tr> </table>	C14			HEPA	9q33-34.1	-
Chromosome Z																																																																				
PFLR	5p14-p13	15																																																																		
GHR	5p14-p12	15																																																																		
CTSL	9p22.1-q22.2	3																																																																		
PTCH	9q22.3	13																																																																		
CHD1	5q15-q21	17																																																																		
CHRNB3	8p11.2	8																																																																		
LPL	8p22	8																																																																		
ALDOB	9q22.3-q31	4																																																																		
XPA	9q22.3	4																																																																		
GGTB2	9p21-p13	4																																																																		
ACO1	9pter-qter	4																																																																		
BPT																																																																				
TP3	17p11.1	11																																																																		
C14																																																																				
HEPA	9q33-34.1	-																																																																		

Tyúk

Összehasonlító térkép

## Chromosome Z



# Tyúk

## Összehasonlító térkép





# Tyúk

## Genom szekvenálás

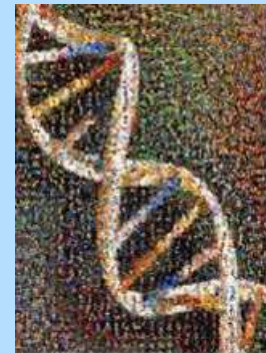


Szekvenálási stratégia

The National Human Research Institute  
(NHGRI)

X 6 takarású WGS (Whole Genome Shotgun)  
stratégiát alkalmaztak

2004 Április – draft szekvencia





# Genom szekvenálás

- Egy gerinces genom 400 Mb – 6 Gb között van ( $4 \times 10^8$ - $6 \times 10^{10}$  bp)

Két stratégia:

- Hierarchical Shotgun Sequencing (HSS)
- Whole Genome Shotgun Sequencing (WGSS)
- **White Papers:** együttes törekvés egyes genomok szekvenálásához , támogatások megszerzéséhez





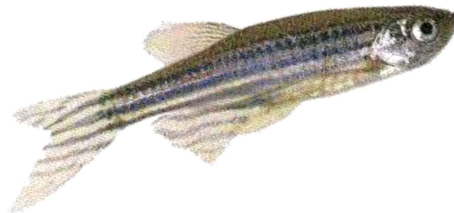
Fugu (*Takifugu rubripes*)

Medaka (*Oryzias latipes*)



Strickleback (*Gasterosteus aculeatus*)

Green Spotted pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*)



Zebrafish (*Danio rerio*)

Lamprey (*Petromyzon marinus*)



Mammal:

