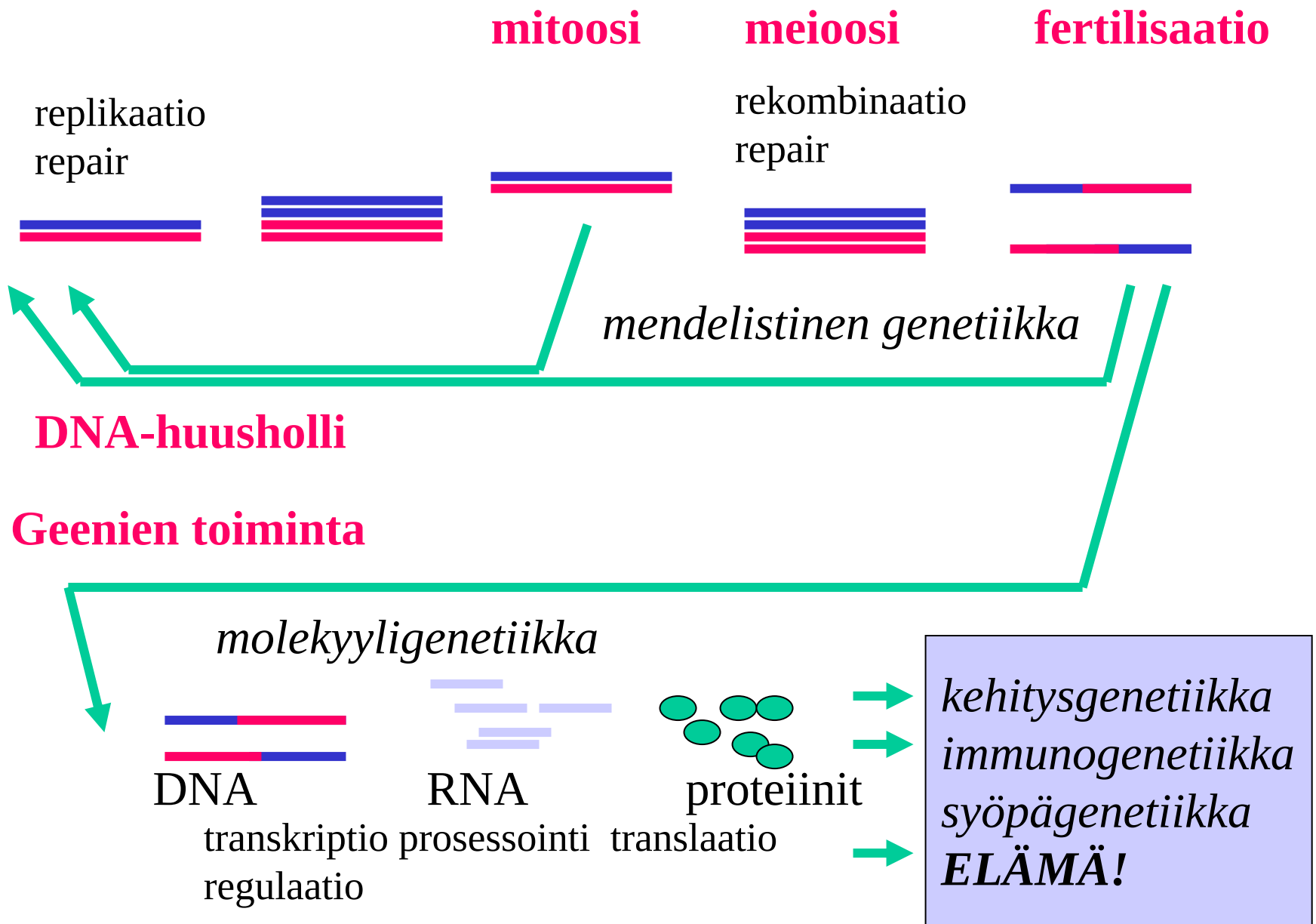




Genetiikan perusteiden miellekartta: miten geenejä lueskellaan?

Geenien lukeminen? Siis meidän toimesta, ei polymeraasin tekemänä?

Geenien lukemisesta eli DNA:n sekvensoinnista on puhuttu jo niin usein, että nyt on vihdoinkin vilkaistava, mitä se tarkoittaa.

Polymeraasiketjureaktio eli PCR monistaa sen mitä me haluamme

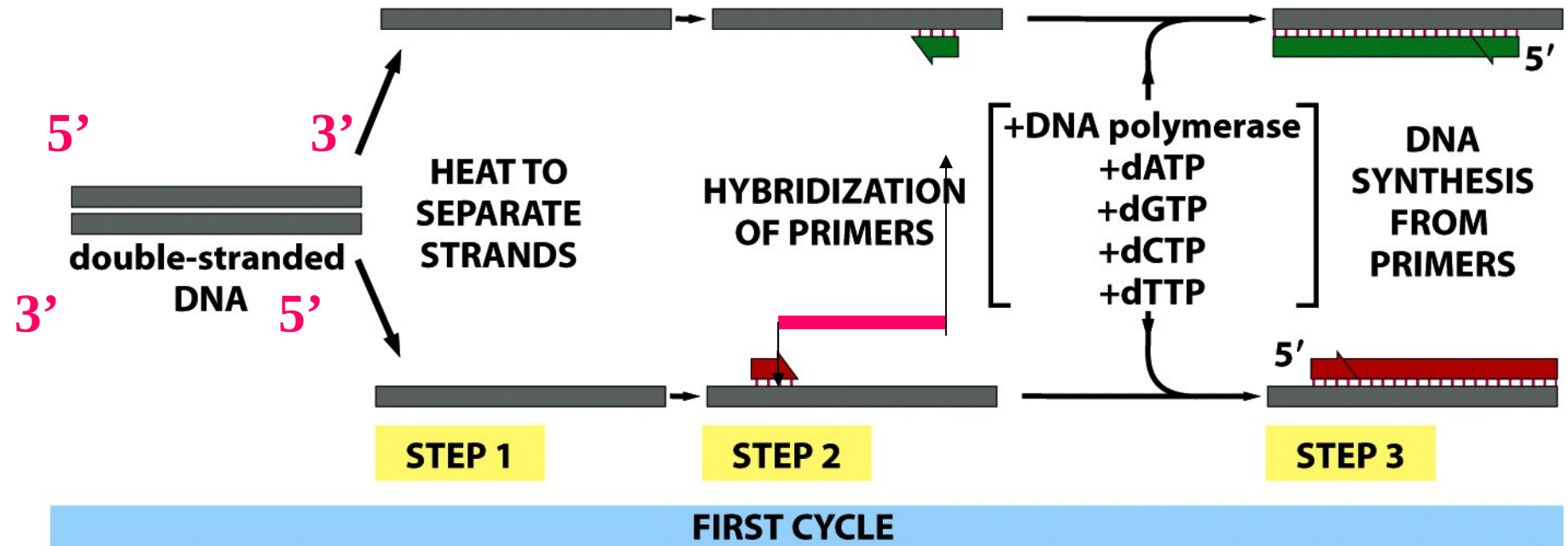


Figure 8-45a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Kemian Nobel 1993 [Kary S. Mullis](#)

CELL 545

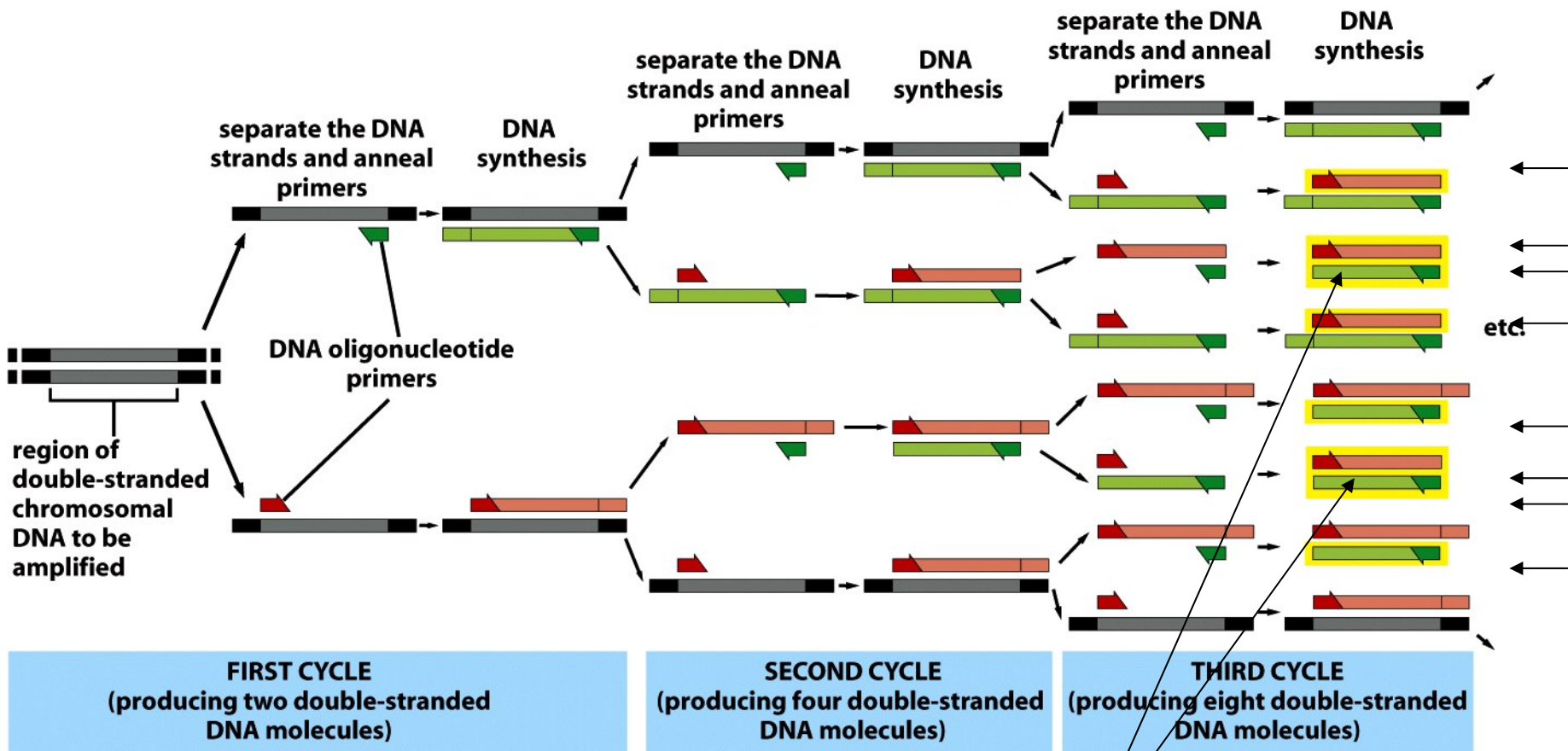


Figure 8-45b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Tästä eteenpäin *määrämittaisten*
molekyylien osuus kasvaa
eksponentiaalisesti, nyt niitä on 8

CELL 545

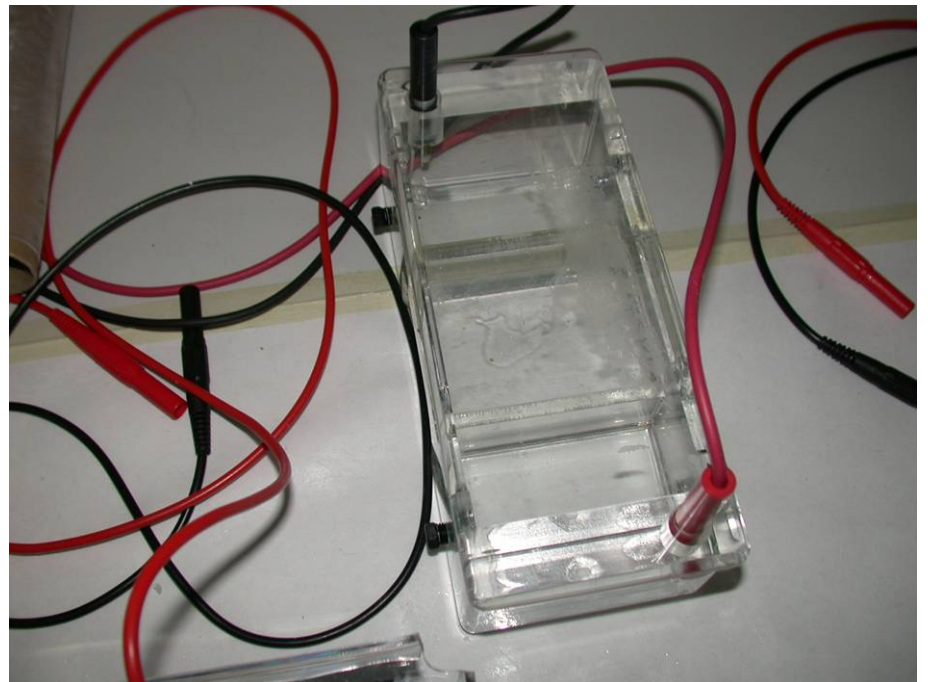
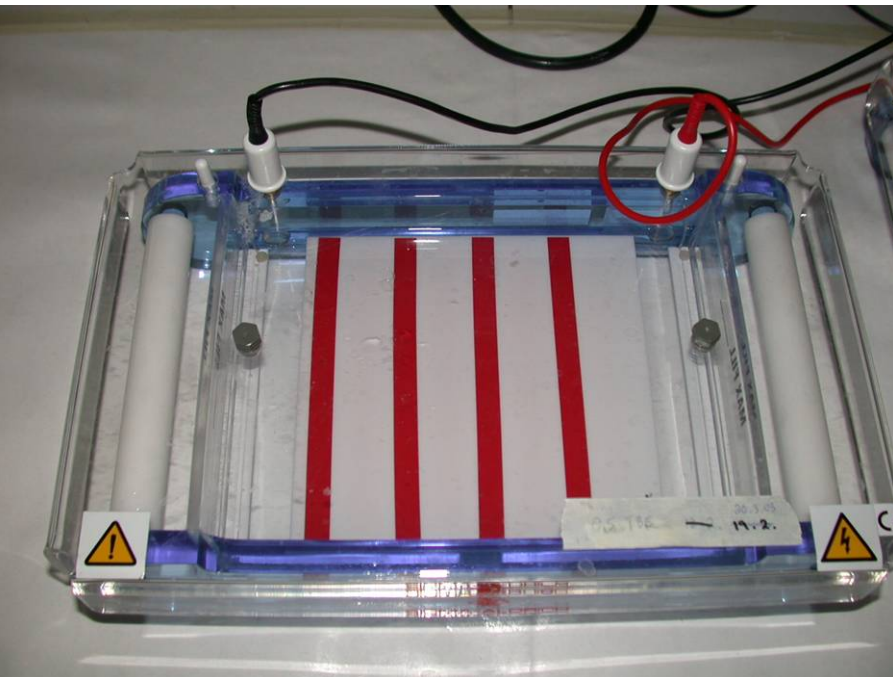
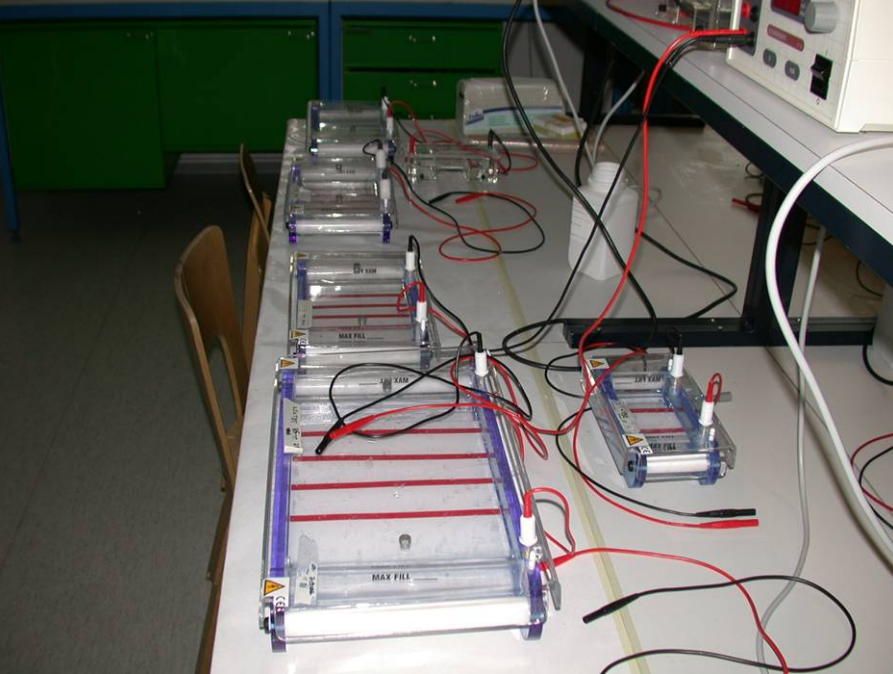
(vasta puolet, mut aluksi ei ollut yhtään. Kolmen lisäsyklin jälkeen
määrämittaisia on 240/ 256, ja kolmenkymmenen syklin jälkeen yhä enemmän)

PCR-kone

eli thermal cycler on musta tai harmaa laite, joka osaa nostaa ja laskea pikku putkien (1.5 ml) lämpötilaa vilkkaasti 45°C ja 100°C välillä *ohjelman* mukaan



Agaroosigeelielektroforeesilla
erotellaan erikokoiset DNA-
molekyylijoukot ja poimitaan UV-
valossa talteen





Töissä tarvitaan joukoittain
pipettejä ja sentrifugeja



Melkein kaikki tavara on kertakäyttöistä paitsi sterilointisäiliöt, joita jokainen saa tuoda kotoaan sen minkä tarvitsee. Äideille tulee pieni etu siitä, että piltti- ym purkkeja tarvitaan paljon.

PCR-RFLP

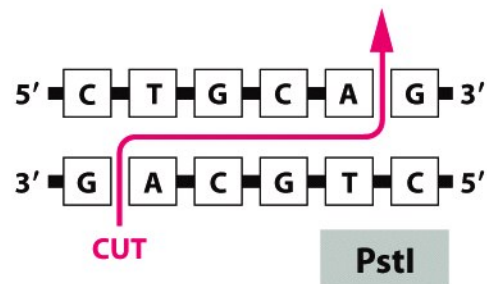
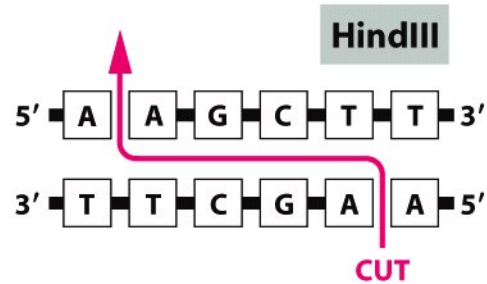
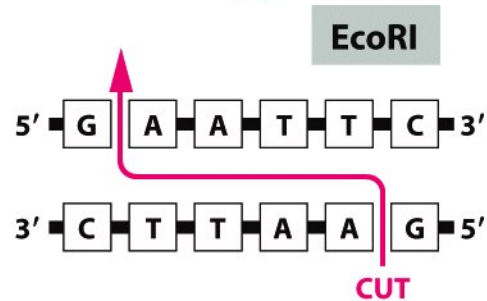
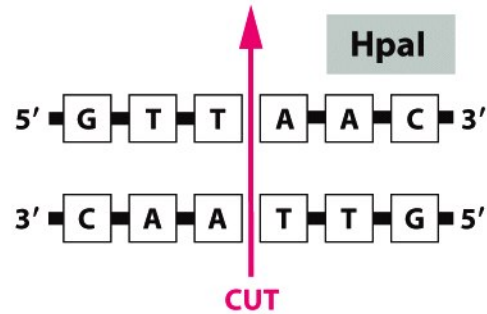
Polymeraasiketjureaktion ja restriktioentsyymien avulla voidaan tunnistaa erilaisia DNA-jaksoja, vaikkapa eri lajeja

RFLP = restriction fragment length polymorphism

Esimerkki puolalaisilta kirjolohifarmeilta:

Haluttiin tunnistaa lajilleen loisia yksin kappalein, koska mikroskopointi on vaikeaa ja epämääräistä (hermostuttavaa)

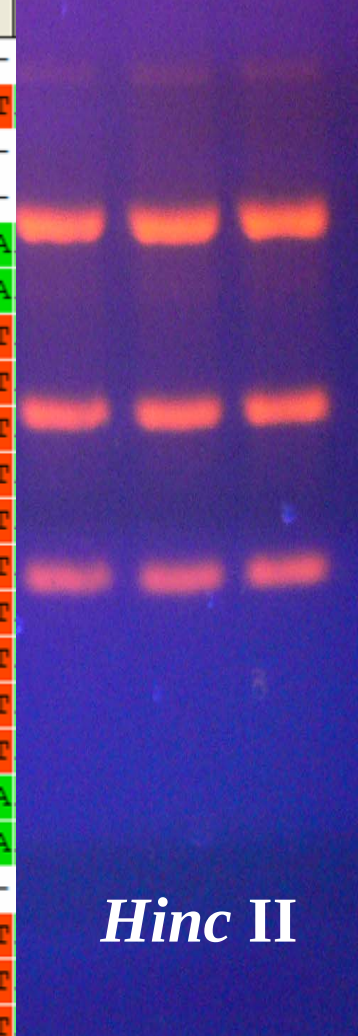
Lajeista on pohjalla sekvenssitietoa, jonka avulla restriktioentsyymit valittiin



Restriktioentsyymit
katkovat DNA:ta
spesifisesti, tylppiä tai
kohesiivisia päitä

Figure 8-31 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

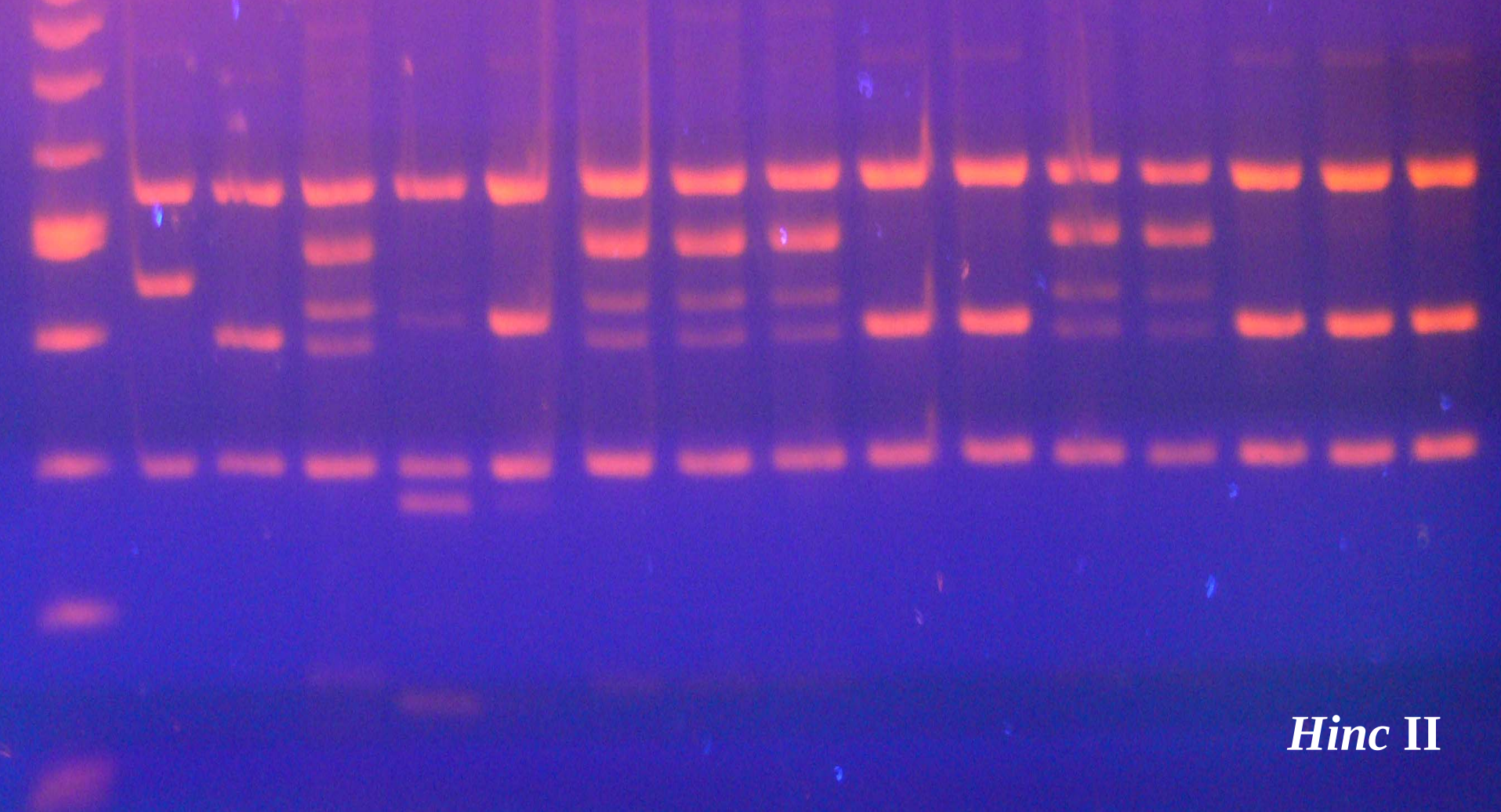
G. teuchis standard EF464679 Rokicka	-----
G. teuchis AJ249350 Cunningham	ATCCAGCTTAGGGGAAC TGGTTAGTCAAAGCATT
G. teuchis hybrid EF464680 Rokicka	-----
G. teuchis sex partner predicted	-----
G. truttae EF464481 Rokicka	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGT-AGTCATCGCATA
G. truttae AJ132260 Cunningham	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGT-AGTCACGCATA
G. salaris Homo Dane EF464677 Rokicka	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAATCTGGCATT
G. salaris hybrid EF464676	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAAYCATGGCATT
G. salaris AJ515912 Lindenstrom	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAAYCATGGCATT
G. salaris Thymallus EF464678 Rokicka	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris DQ898302 Robertsen	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris DQ823390 Jorgensen	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris Z72477 Cunningham	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris AF484544 Zietara	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris Macedonian	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. salaris Macedonian hetero	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGTTAACCATGGCATT
G. derjavini DQ355975 Malmberg	GACCAGCTTGGGGGAAC TGGC-CGTCAACGCTTA
G. derjavini DQ323402 Zietara	GACCAGCTTGGGGGAAC TGGC-CGTCAACGCTTA
G. brachymystacis DQ385448 You	-----
G. derjavinoides DQ484530 UK Zietara	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGT-AGTCATGGCGTT
G. derjavinoides AJ132259 Cunningham	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGT-AGTCATGGCGTT
G. derjavinoides EF445939 Rokicka	ATCCAGCTTGGGGGAAC TGGT-AGTCATGGCGTT



Hinc II

Hinc II katkaisukohta on GTYRAC. Keltaiset katkeaa, GTTAAY katkeaa puoliksi, koska se on heterotsygootti. GTAGT ei katkea lainkaan.

Y = T ja C, R = G ja A

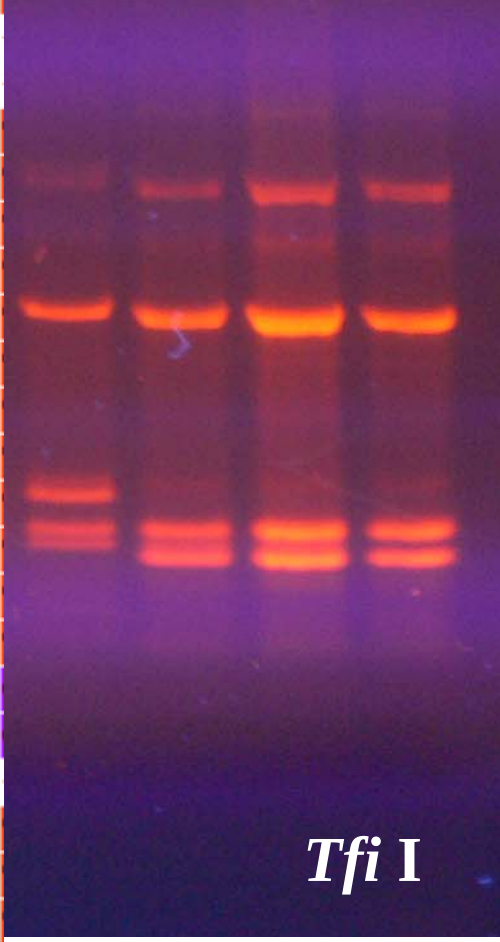


Hinc II

Hinc II katkaisukohta on GTYRAC

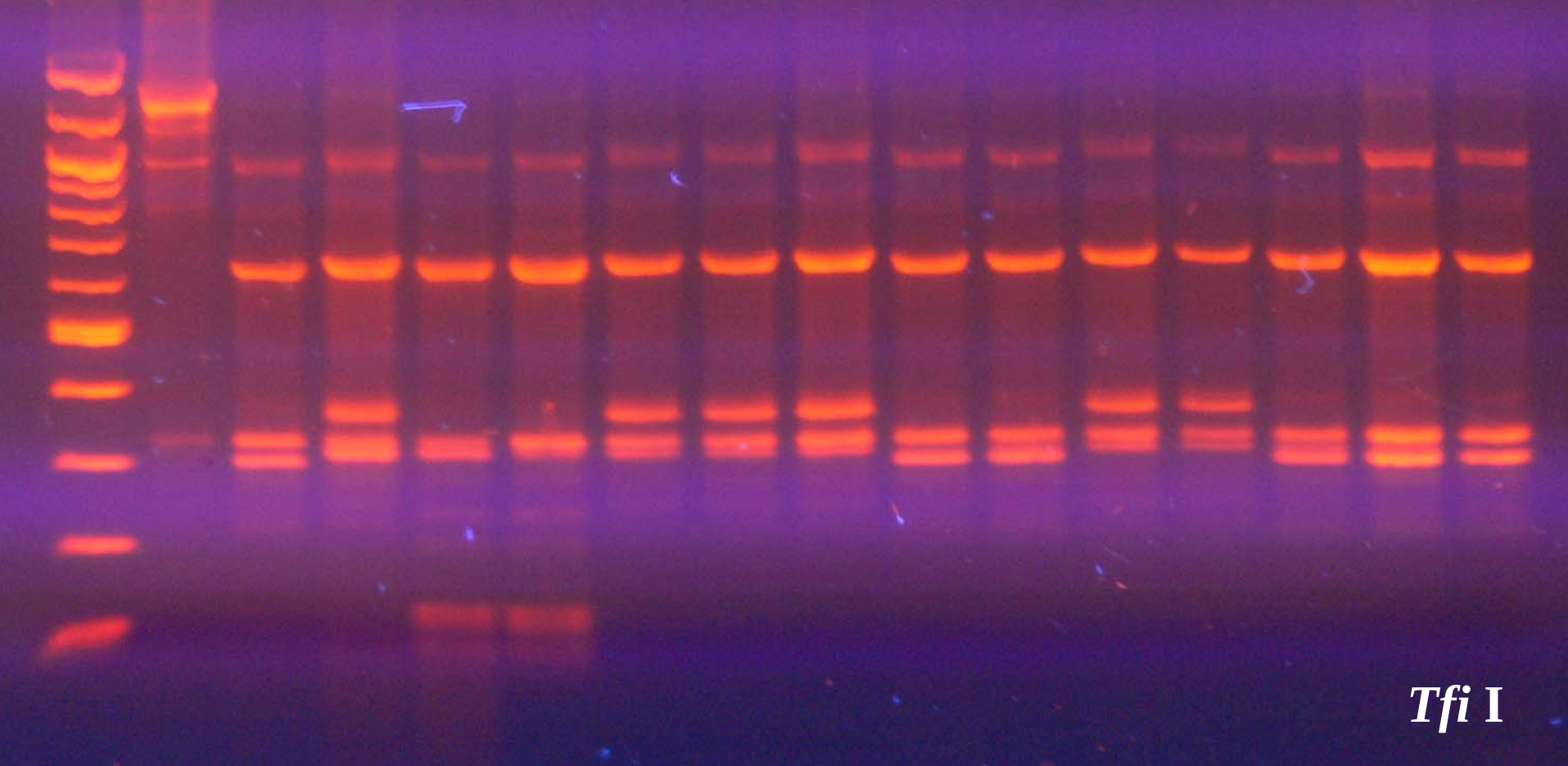
Noin 1200 emäsparin mittainen DNA on katkeillut ennusteiden mukaisiksi pätkiksi, jotka erottuvat hienosti. Montako erilaista kuviota löydät?

G. teuchis hybrid EF464680 Rokicka	-----
G. teuchis sex partner predicted	-----
G. truttae EF464481 Rokicka	TGGTTATTTCGTTTCAGTAATGCATGGC
G. truttae AJ132260 Cunningham	TGGTTATTTCGTTTCAGTAATGCATGGC
G. salaris Homo Dane EF464677 Rokicka	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris hybrid EF464676	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris AJ515912 Lindenstrom	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris Thymallus EF464678 Rokicka	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris DQ898302 Robertsen	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris DQ823390 Jorgensen	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris Z72477 Cunningham	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris AF484544 Zietara	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris Macedonian	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. salaris Macedonian hetero	TGGTGATTTCGTTTGTATTGCATGGT
G. derjavini DQ355975 Malmberg	TGTGTATTTCGTTCTATAGCGGTTGGC
G. derjavini DQ323402 Zietara	TGTGTATTTCGTTCTATAGCGGTTGGC
G. brachymystacis DQ385448 You	-----
G. derjavinoides DQ484530 UK Zietara	TGCGTATTTCGTTTCAGTAA-GCATGGC
G. derjavinoides AJ132259 Cunningham	TGCGTATTTCGTTTCAGTAA-GCATGGC
G. derjavinoides EF445939 Rokicka	TGCGTATTTCGTTTCAGTAA-GCATGGC



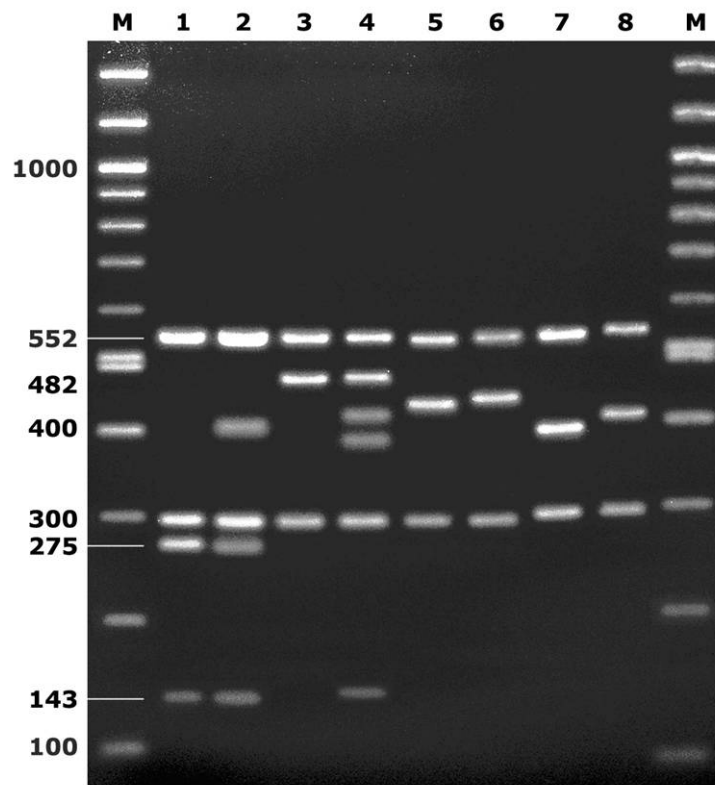
Entsyymi *Tfi* I katkaisee DNA:n paikasta GAWTC, mutta ei lainkaan vastaavasta paikasta TATTC

W = T ja/tai G

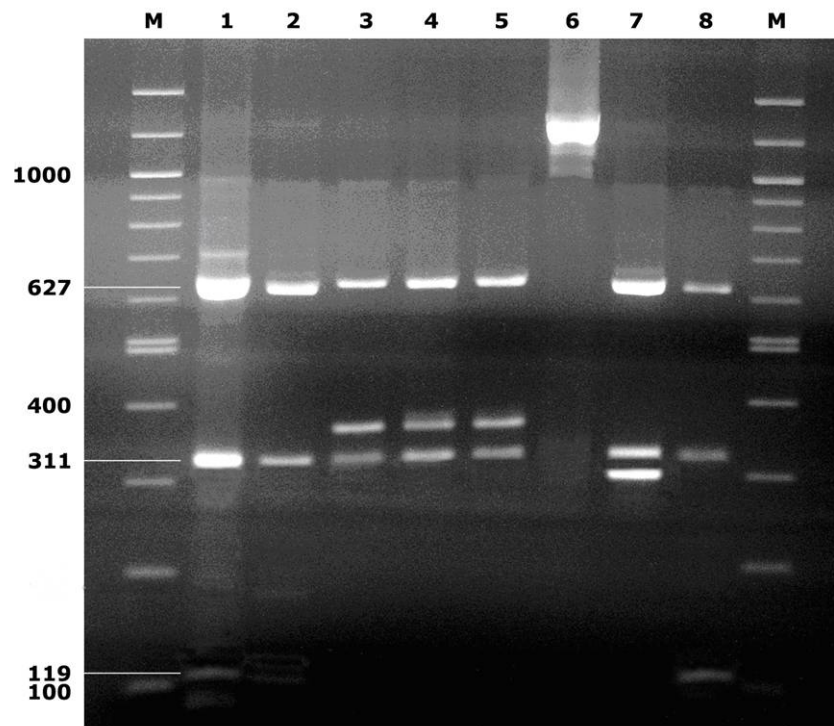


Tfi I

Entsyymi *Tfi I* katkaisee DNA:n paikasta GAWTC. Tämä entsyymi jakaa lajit vain noin kolmeen ryhmään. Kaikki lajit erottuisivat, jos geelinä olisi tiukempi akryyliamidigeeli, mutta agarosi on halpaa eikä lainkaan epäterveellistä. Seuraavassa slidessa julkaisua varten tehty kuva, jossa selitetään kaikki.



A



B

Figure 4. The RLFP patterns for ITS rDNA region. A - fragments digested with restriction enzyme *Hinc* II; B - fragments digested with restriction enzyme *Tfi* I; Lines: 1 - *G. salaris* (standard), 2 - *G. salaris* (Lindenstrøm et al. 2003), 8 – *G. salaris* (Lindenstrøm et al. 2003) homozygote, 3 - *G. teuchis*, 4 - *G. teuchis* #2, 5 - *G. truttae*, 6 - *G.* "lavareti", 7 - *G. derjavinoides*. M – 100 bp marker.

Noin saatiin selville

Farmeilla oli (ainakin) 7 erilaista loiskloonaa (triviaali juttu)

Muutamit kloonit olivat pysyvästi heterotsygoottisia eli lisääntyvät ilman tavallista meioosia ja seksuaalista rekombinaatiota (ainakin pitkiä aikoja)

Hybridisaatiota tapahtuu, vaikkakin se on harvinaista

Hybridisaatio voi johtaa uusiin loiskantoihin, melkeinpä uusiin lajeihin (jotka *voivat* olla vaarallisempia kuin kantamuodot)

Vieraslaji (amerikkalainen kirjolohi) on oikea parasiittihautomo, jossa "jalostetaan" risteyttämällä harmittomista kotoperäisistä loisista "superloisia"

Toinen esimerkki

Mudulla (*Phoxinus phoxinus*) on paljon eri lajisia loisia

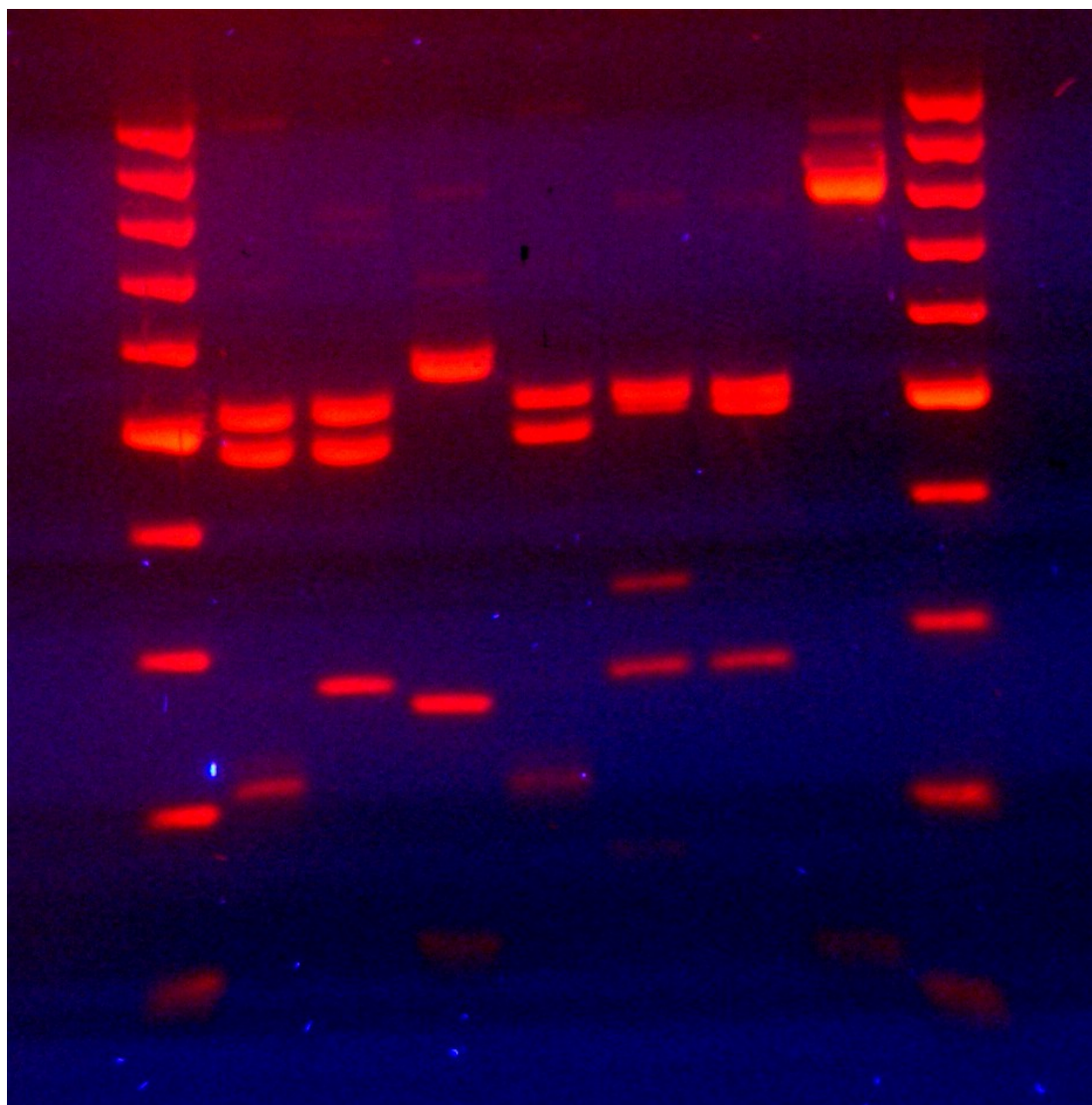
Piti kerran tunnistaa niitä varmasti ja nopeasti







5'-GTCTC(N)1-3'/3'-CAGAG(N)5-5'.



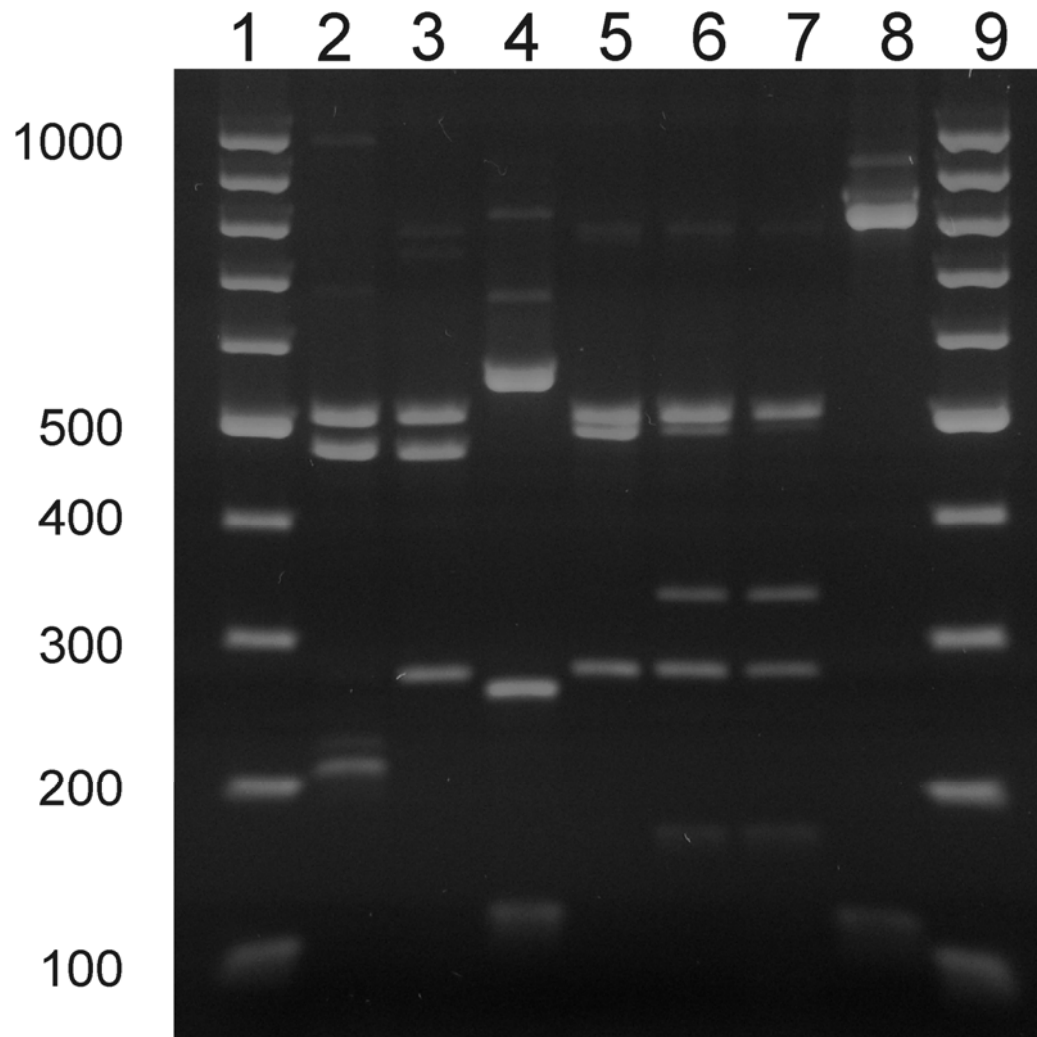


Figure 1. Ordered demonstration gel showing the PCR-RFLP patterns of ITS of *Gyrodactylus* parasite species/genotypes on *Phoxinus phoxinus* in Hangasoja, Kuusamo. The MW ladder is on the lanes 1 and 9. Lane 2. *G. jussii*, 3. *G. aphyae*, 4. *G. magnificus*, 5. *G. cf. pannonicus* ITSvid/Vid, 6. *G. cf. pannonicus* ITSvid/Var hybrid, 7. *G. cf. pannonicus* ITSVar/Var, 8. *G. phoxini*. The restriction fragment sizes corresponded the *a priori* predictions made on the basis of the previously known DNA sequences deposited under these names.

PCR-RFLP

Soveltuu hyvin moniin ekologisiin tehtäviin

On halpaa ja nopeaa, voidaan käsitellä suuriakin näytemääriä

Pitää tietää mitä ollaan tekemässä ja varmistaa asioita ja tulkintoja sekvensoimalla

Esimerkkinä muuan [lohijuttu](#) (Nilsson *et al.* 2001)