

Podsumowanie .

Na wykładach omawialiśmy to na jakie pytania odpowiada ekologia molekularna, analizowanie zmienności na różnych poziomach, przyglądanie się różnym aspektom biologii gatunku, nie tylko związanych z samą genetyką, badanie przy pomocy markerów genetycznych – mikrosatelitarnych, mitochondrialnych, obrabianie danych na komputerach.

Dziś – jak należy się przygotowywać do tego, żeby zrealizować jakiś temat z zakresu ekologii molekularnej?

Wybieramy zagadnienie, a następnie dobieramy do niego odpowiednie narzędzie molekularne, zwykle wybór odpowiedniego markera molekularnego. Następnie odpowiednio analizuje się ten marker. Jakie problemy się pojawiają jeśli chodzi o zagadnienia związane z ekologią molekularną? Bywają zagadnienia, których dostępnymi metodami się nie da rozwiązać, albo też metody są zbyt drogie i mało wydajne.

Materiały mogą być inwazyjne, pół-inwazyjne lub nieinwazyjne a nawet muzealne.

Jeśli chodzi o zagadnienia genetyki populacyjnej, gdzie szacujemy zmienność genetyczną populacji, zróżnicowanie między populacjami, możemy się posługiwać materiałem nieinwazyjnym. Ale jeśli chcemy np. analizować wieloojcostwo, musimy mieć materiał bezpośrednio od osobnika.

Im więcej miejsc w genomie przebadamy tym lepiej, ale już od pewnej ilości nie warto zdobywać więcej bo informacja jest wystarczająco kompletna. Zwykle trzeba przynajmniej 20 osobników – absolutne minimum.

Jaka jest zależność między markerami molekularnymi a zagadnieniem jakie chcemy rozwiązać?

Są dwie klasy markerów: mitochondrialne (jednorodzielskie) i kodominujące (dwurodzielskie). Jeżeli interesują nas zagadnienia na poziomie osobniczym, jak analiza rodzicielstwa, wieloojcostwa, określanie areału osobników danego gatunku, to potrzebujemy takich markerów które dadzą dokładną charakterystykę poszczególnego osobnika, markerów mikrosatelitarnych, kodominujących w liczbie kilkunastu najlepiej. Dziedziczą się one zgodnie z prawami Mendla, więc świetnie nadają się do analiz biologii rozrodu.

Jeśli chodzi o genetykę populacyjną to nadają się też wszelkie polimorficzne markery molekularne również DNA mitochondrialne, określanie zmienności w grupach osobników, także markery dominujące jak AFLP, RAPD, allozyny.

Czy zawsze mamy dowolność wykorzystania markerów molekularnych?

Są pewne ograniczenia: nie zawsze potrafimy uzyskać wiarygodną informację o określonych markerach w zależności od pochodzenia materiału. Z mtDNA jest o wiele łatwiej uzyskać rzetelną informację, wolniej ono degraduje w próbach nieinwazyjnych, jest więcej kopii na komórkę niż zwykłego DNA.

Markery mikrosatelitarne w materiałach nieinwazyjnych i muzealnych – materiał genetyczny jest słabej jakości, małe stężenie, zdegradowany. Analizy mogą być utrudnione. Jakie mogą być problemy? Dwa główne: ADO allelic drop-out i FA fals allelic – odrzucenie alleliczne, czyli że jeden z alleli markera nie ulega amplifikacji, bo się zdegradował, nie przyłącza się starter, a drugi problem to włączanie się obcego DNA np. ze środowiska. W pierwszym przypadku zanizamy a w drugim zawyżamy heterozygotyczność istniejącą. Są metody mające na celu ograniczenie tych błędów: strategia wieloprobówkowa – daną mikrosatelitę u danego osobnika amplifikuje się nie raz ale kilka – kilkanaście razy i tworzy się konsensusowy genotyp pokazujący jak rzeczywiście genotyp wygląda. Bo nie w każdym PCR dany allel się zamplifikuje.

Inna metoda: multipleksowa amplifikacja - przeprowadza się preamplifikację, czyli umieszcza się w mieszaninie wszystkie startery wszystkich mikrosatelitów jakie chcemy analizować, amplifikuje się, co ma na celu zwiększenie liczby kopii określonych fragmentów DNA. Produkt jest materiałem do dalszych amplifikacji, pojedynczych mikrosatelitów.

Jeszcze jeden pomysł – połączenie multipleksowej amplifikacji z półzagnieżdżonym PCR-em, dwie reakcje, w drugiej reakcji matrycą jest produkt pierwszej reakcji, stosuje się tu inną parę starterów –

tzw. zagnieżdżonych czyli takich które mają miejsca komplementarne wewnątrz produktu reakcji pierwszej. Amplifikuje się najpierw wszystko, pobiera się produkt PCR-u i wprowadza się semi-nested reakcję z zagnieżdżonym jednym starterem, i dodatkowo przeprowadza się ją jeszcze w kilku powtórzeniach, produkty łączy się i umieszcza w jednej analizie na sekwenatorze.

Warto też planując badania na materiale nieinwazyjnym, przeprowadzić badanie pilotowe – w ekstraktach z materiałem amplifikuje się mtDNA, jeśli się ono amplifikuje, wtedy próbujemy w tych próbach badać markery mikrosatelitarne. Jeśli się nie amplifikują to trzeba udoskonalić etap izolacji.

Kiedy błędy są najbardziej uciążliwe? Tabelka. np. zmienność genetyczna – wpływ błędów jest oceniany jako niski lub średni. Zaniża się lub zawyża poziom heterozygotyczności. Badając dużą liczbę prób raczej nie powinniśmy mieć problemu z określeniem różnorodności allelicznej. Więc można próby nieinwazyjne stosować.

Badania struktury genetycznej, zróżnicowanie między populacjami, błędy też mają niewielkie znaczenie.

Błędy mają duże znaczenie gdy działamy na poziomie osobniczym, jak badanie areału, rodzicielstwa, pokrewieństwa, etc. należy wprowadzać strategie ograniczające błędy.

Gdy badamy jakiś gatunek, może mieć on już scharakteryzowany genom, mikrosatelity, startery, metody amplifikacji. Nie zawsze tak jest, często są to gatunki jeszcze nie zmapowane. Można wykorzystać cross-amplifikację – wykorzystać informację od gatunku pokrewnego do amplifikacji mikrosatelity u gatunku celowego cross-amplifikacja zwykle gorzej działa na bezkręgowcach. Jakie mogą się pojawić problemy? Może mimo pokrewieństwa gatunków, nie być mikrosatelit amplifikowanych tymi samymi starterami. Często satelita polimorficzna u gatunku źródłowego będzie amplifikowana ale u docelowego te satelity nie będą polimorficzne – będą występowały w całym gatunku w postaci jednego allelu.

Jak szukać informacji o mikrosatelitach dla gatunku albo grupy gatunków? np. strona NCBI, można tu znaleźć, sprawdzić dostępność różnych markerów molekularnych dla danego gatunku. Wyszukiwarki mikrosatelitarne: Primer3, gdzie wprowadza się określoną sekwencję fragmentu genomu np. z genebanku, a on wyszukuje nam sekwencje mikrosatelitarne. np. Msatfinder (?).

nie zawsze stwierdzenie obecności alleli zerowych albo innych problemów z cross-amplifikacją jest do wychwycenia na pierwszy rzut oka i prostymi metodami, dlatego pierwsze uzyskane dane warto wprowadzić do programu, który da nam pierwszą analizę wyniku, np. genalex. Microchecker – specjalnie do tego przeznaczony, nakierowany głównie na identyfikację alleli zerowych i ich frekwencję. Określa on poziom heterozygot w przypadku różnych klas genotypów – różniących się o jeden, dwa czy ileś motywów powtórzonych i na tej podstawie identyfikuje czy mamy jakieś odchylenia od heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej.

Ile powinniśmy przebadać mikrosatelitów żeby mieć informacje? O genetyce populacji potrzeba przynajmniej 10 markerów mikrosatelitarnych, żeby dobrze scharakteryzować zmienność wewnątrz i zróżnicowanie między. Do badania rodzicielstwa wystarczą 2-4 jeśli są bardzo polimorficzne.

Analizy mtDNA – można postępować tak samo, czyli przyglądać się temu co jest opublikowane i na tej podstawie prowadzić badania, albo samemu projektować startery bazując tylko na opublikowanych sekwencjach mtDNA.