



Linc Gabriella

A FISH technika alkalmazása az előnemesítésben

Czuczor Gergely Bencés Gimnázium és Kollégium
Győr, 2016. április 13.

www.meetthescientist.hu







Kansas-i képek



Áttekintés

- kutatási háttér bemutatása
- molekuláris citogenetikai technikák: FISH (fluoreszcens in situ hibridizáció)
- FISH technológia alkalmazása a termesztett búza és rokonsági körében

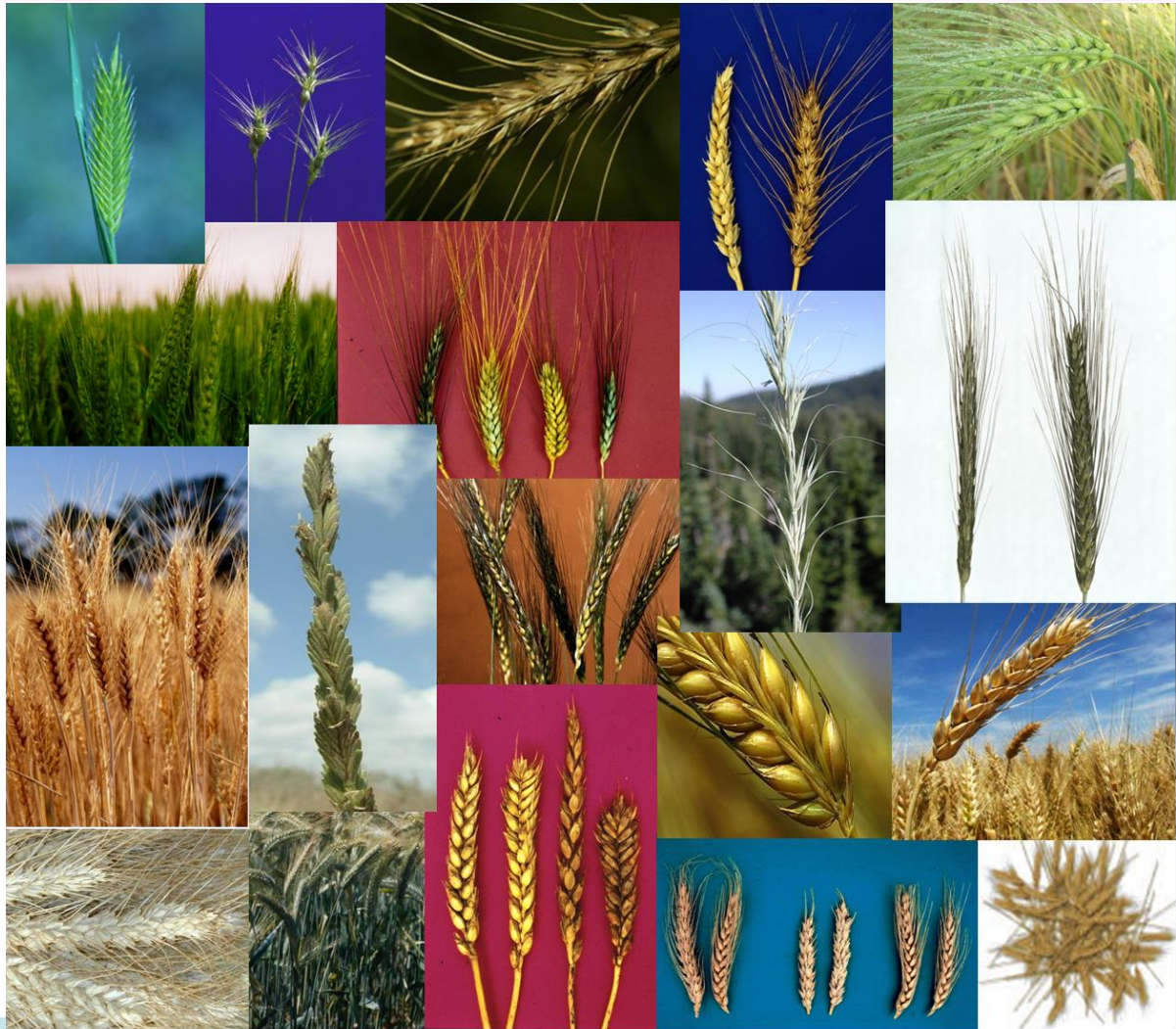
MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

A termesztett búza genetikai variabilitása

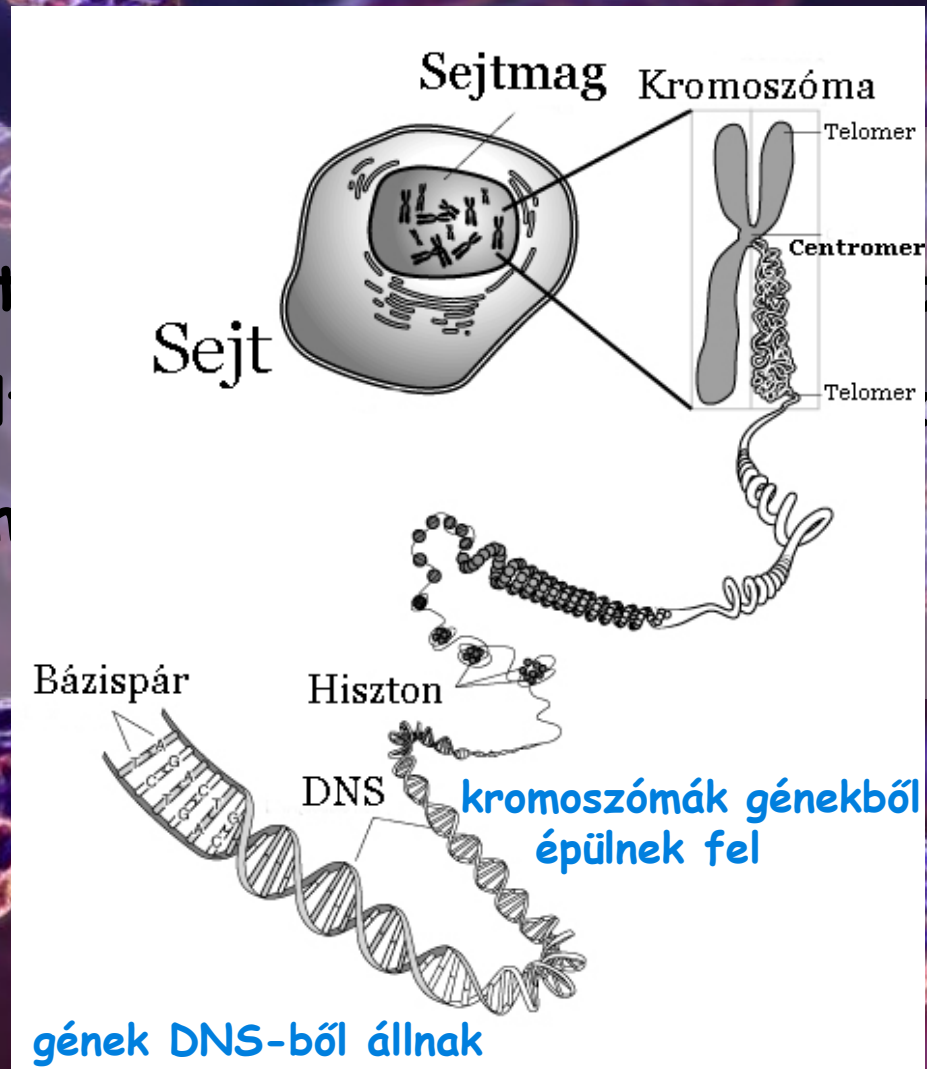
Prebreeding - előnemesítés

Klíímaváltozás:
abiotikus (hő, só, és
szárazságtűrés), valamint
biotikus(betegségrezisztencia)
**stresszekkel szemben
ellenállóbb genotípusok**

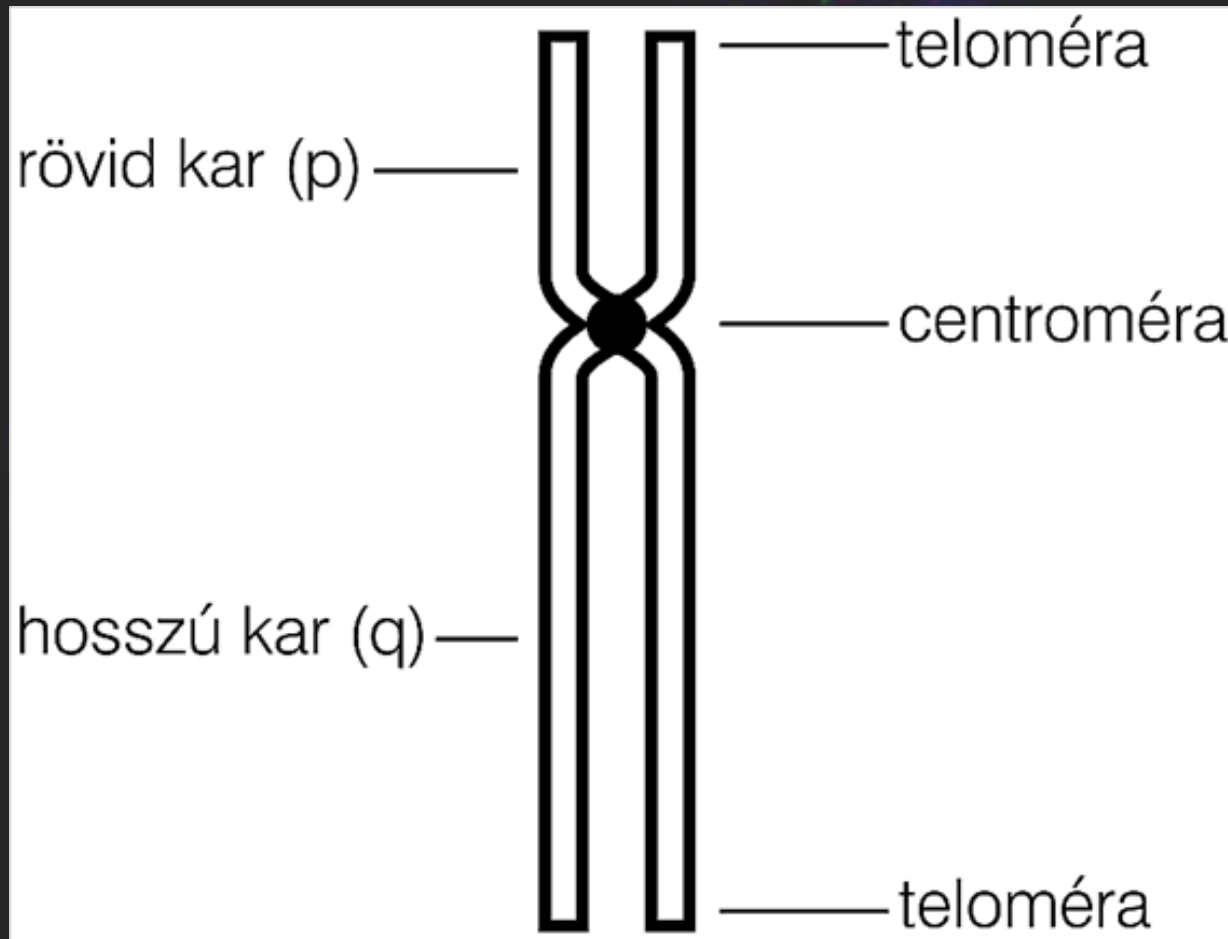
idegen fajú addíciók,
szubsztitúciók és
transzlokációk előállítása



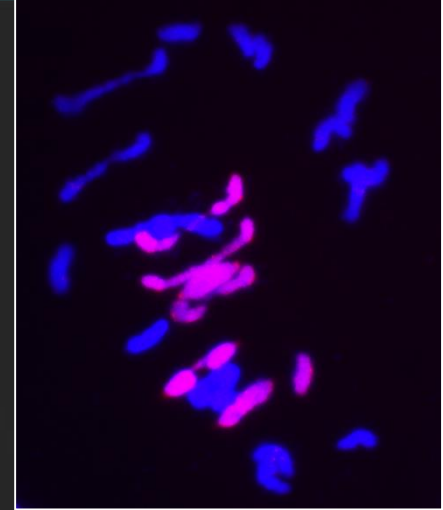
Kromoszómák



Kromoszómák morfológiája



Faj- és nemzetségkeresztezések – miért fontos?



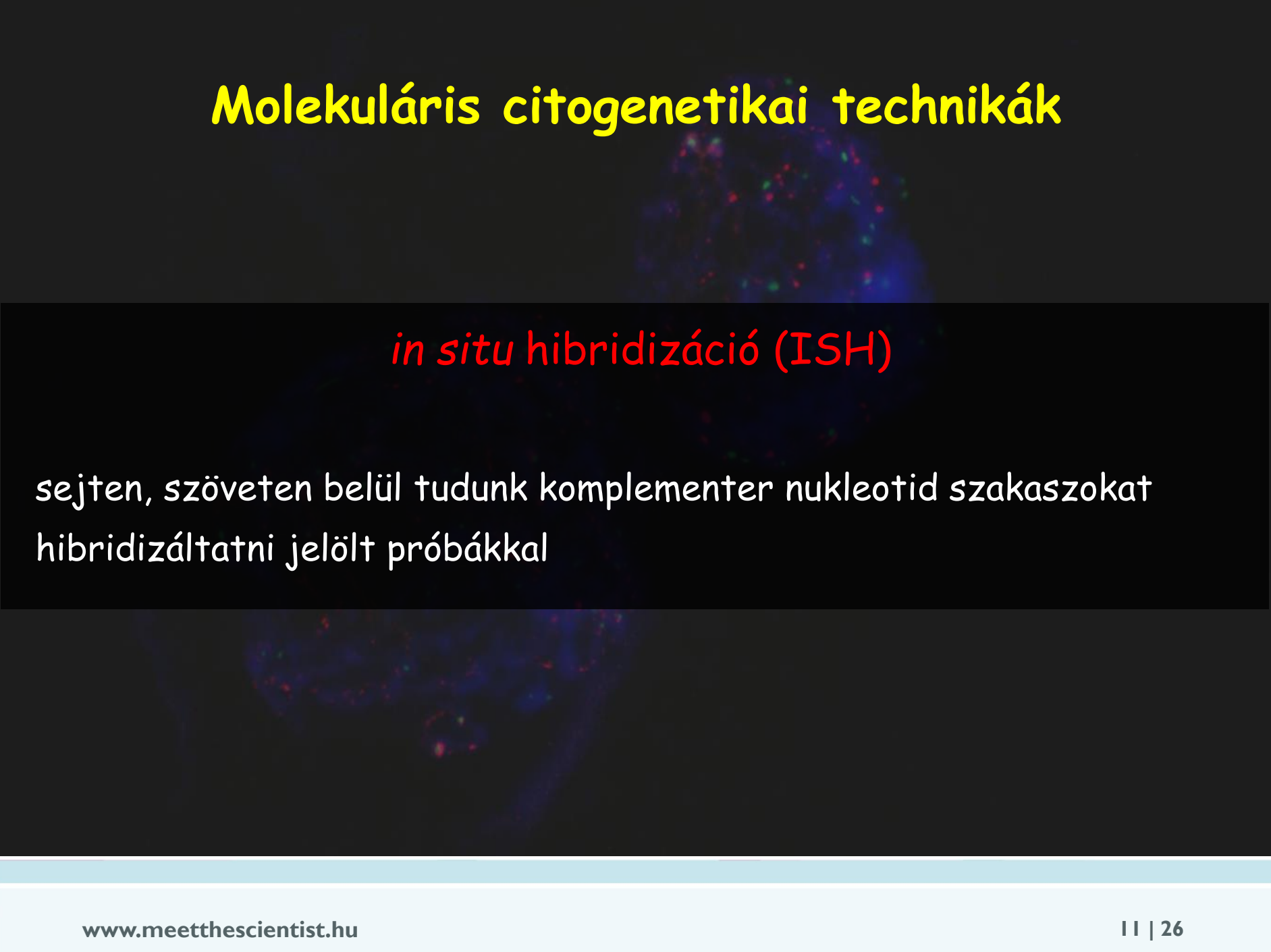
- kedvező agronómiai tulajdonságok átvitele a rokon fajokból a termesztett búzába
- az utódokban a beépített kromoszómák (szegmentumok) kimutatása molekuláris citogenetikai módszerekkel

Molekuláris citogenetika

- a molekuláris genetika és a citogenetika társtudománya
- a kromoszómák szerkezetét, genetikai funkcióját vizsgálja molekuláris szinten
- alapja a nukleinsav hibridizáció (DNS, RNS)



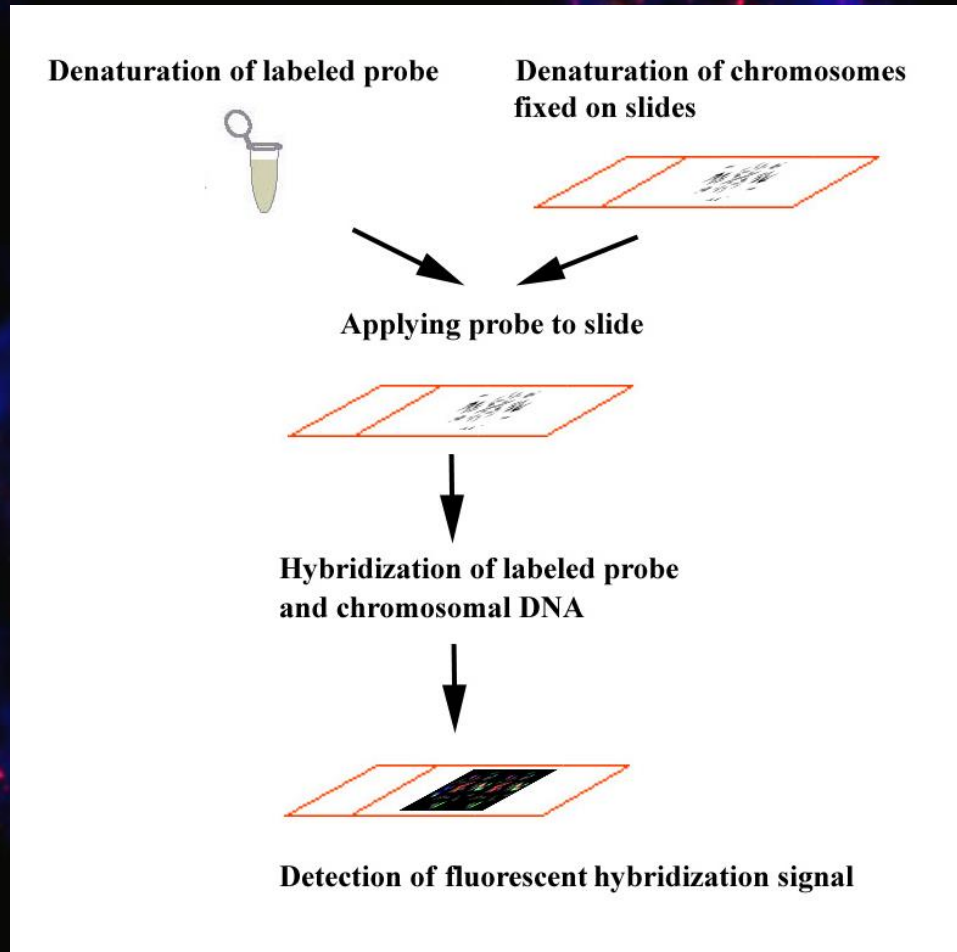
Molekuláris citogenetikai technikák



in situ hibridizáció (ISH)

sejten, szöveten belül tudunk komplementer nukleotid szakaszokat hibridizáltatni jelölt próbákkal

Az ISH alapvető lépései



Próba jelölési módok

- **rádioaktív** (P^{32} , S^{35} , I^{125} , H^3) – nem használjuk

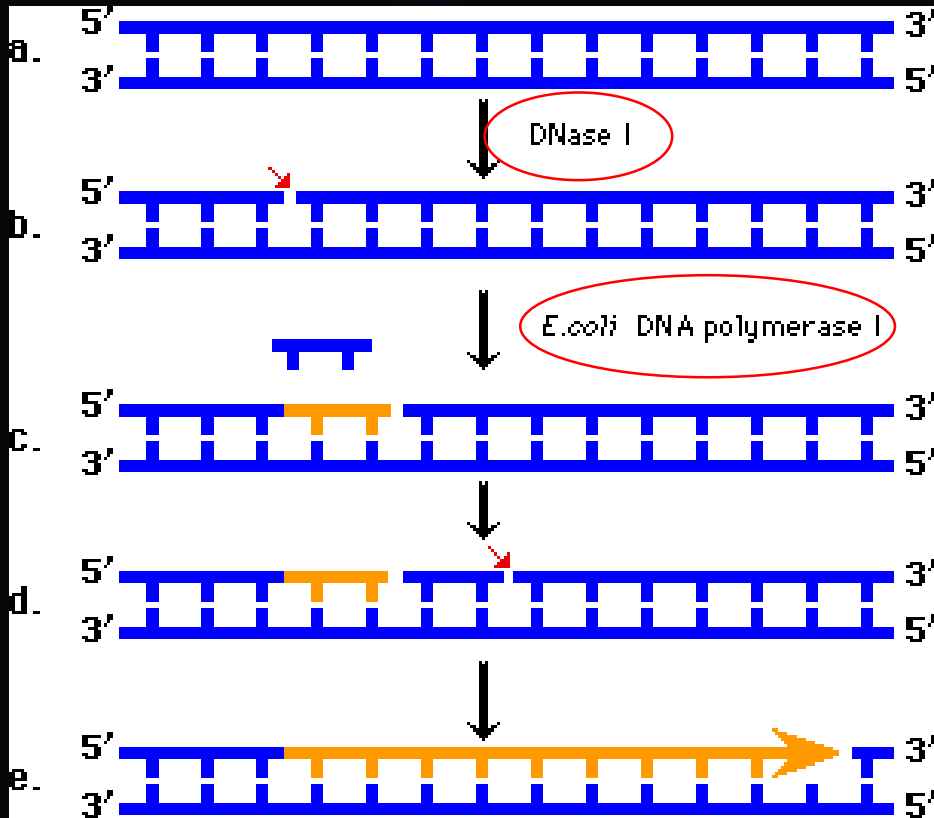
- **nem- rádioaktív**

- **indirekt:** Digoxigenin (*Digitalis purpurea*, steroid)
Biotin (vitamin H1)

(próbákat hapténnel jelölik, amihez fluorokróm kapcsolható)

- **direkt:** fluorokrómok (fluorogreen-11-dUTP,
fluorored-11-dUTP)

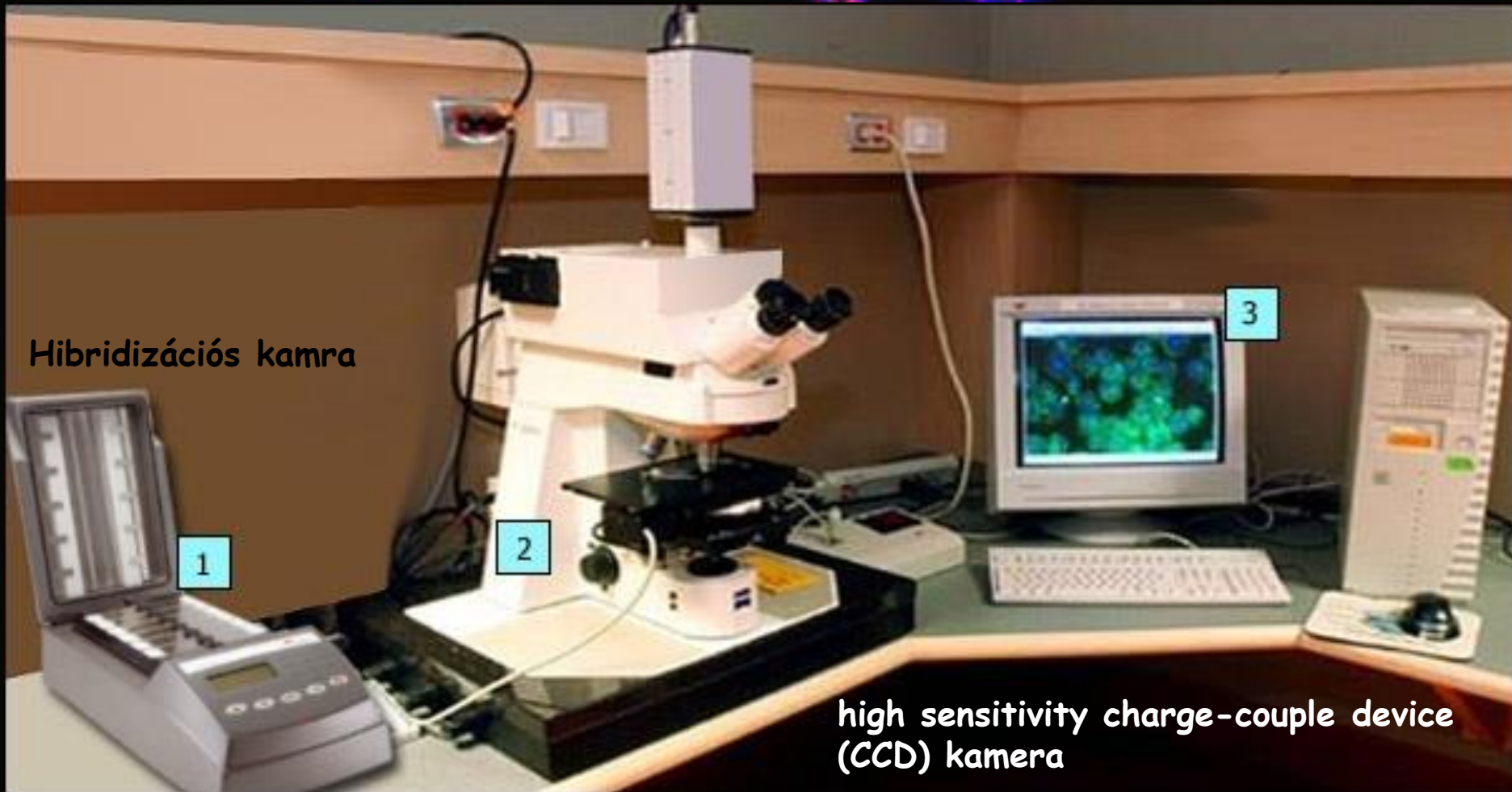
Enzimatis jelölés - Nick Transzláció



1. DN-áz I enzim kis, random bevágásokat (*nick*) ejt a DNS szálain
2. DNS-polimeráz I a bevágástól indulva a sorban következő nukleotidokat kivágja, és a reakcióelegyhez adott jelölt nukleotidokat építi be



Hibridizáció - elemzés



Nagy felbontású FISH a növényi kutatásban

- **Metafázis**

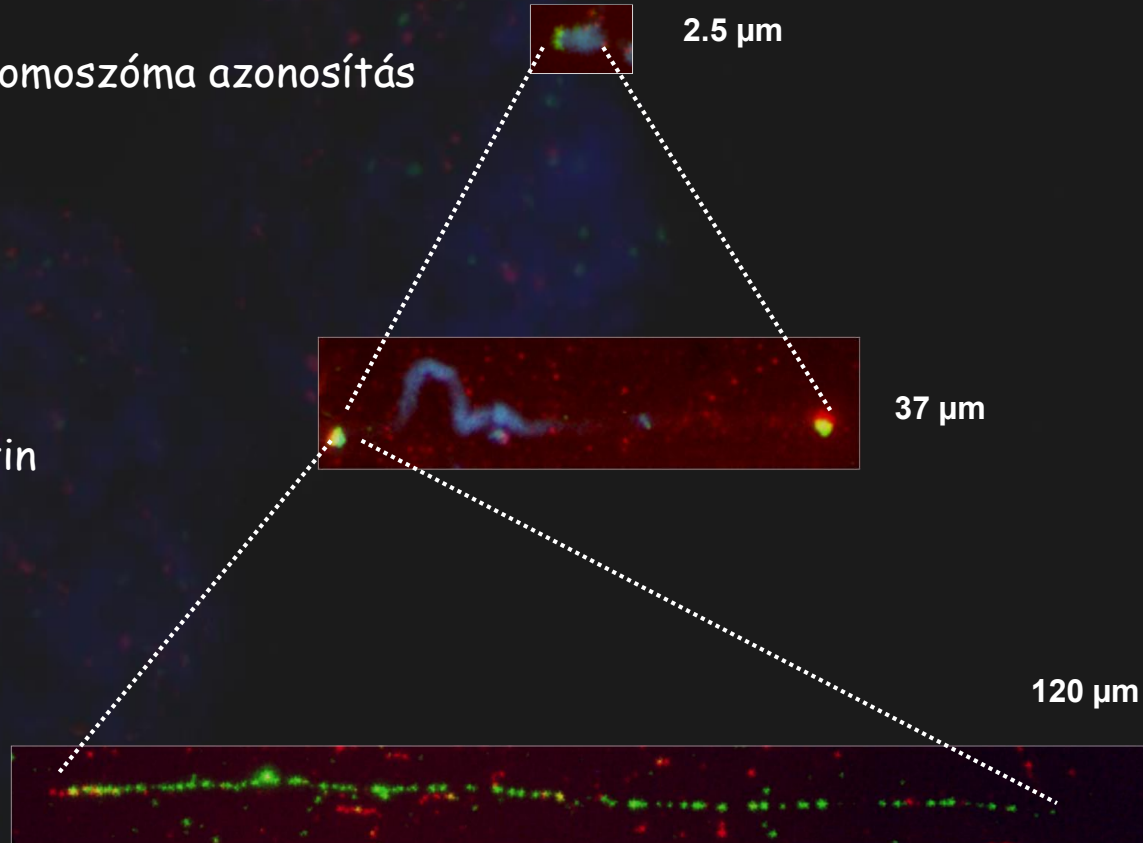
- hibridizációs jelek száma, kromoszóma azonosítás
- genomazonosítás
- alacsony felbontás

- **Pachytén**

- kromoszómák azonosítása
- heterokromatin és eukromatin megkülönböztethető
- kedvezőbb felbontás

- **DNS fiber**

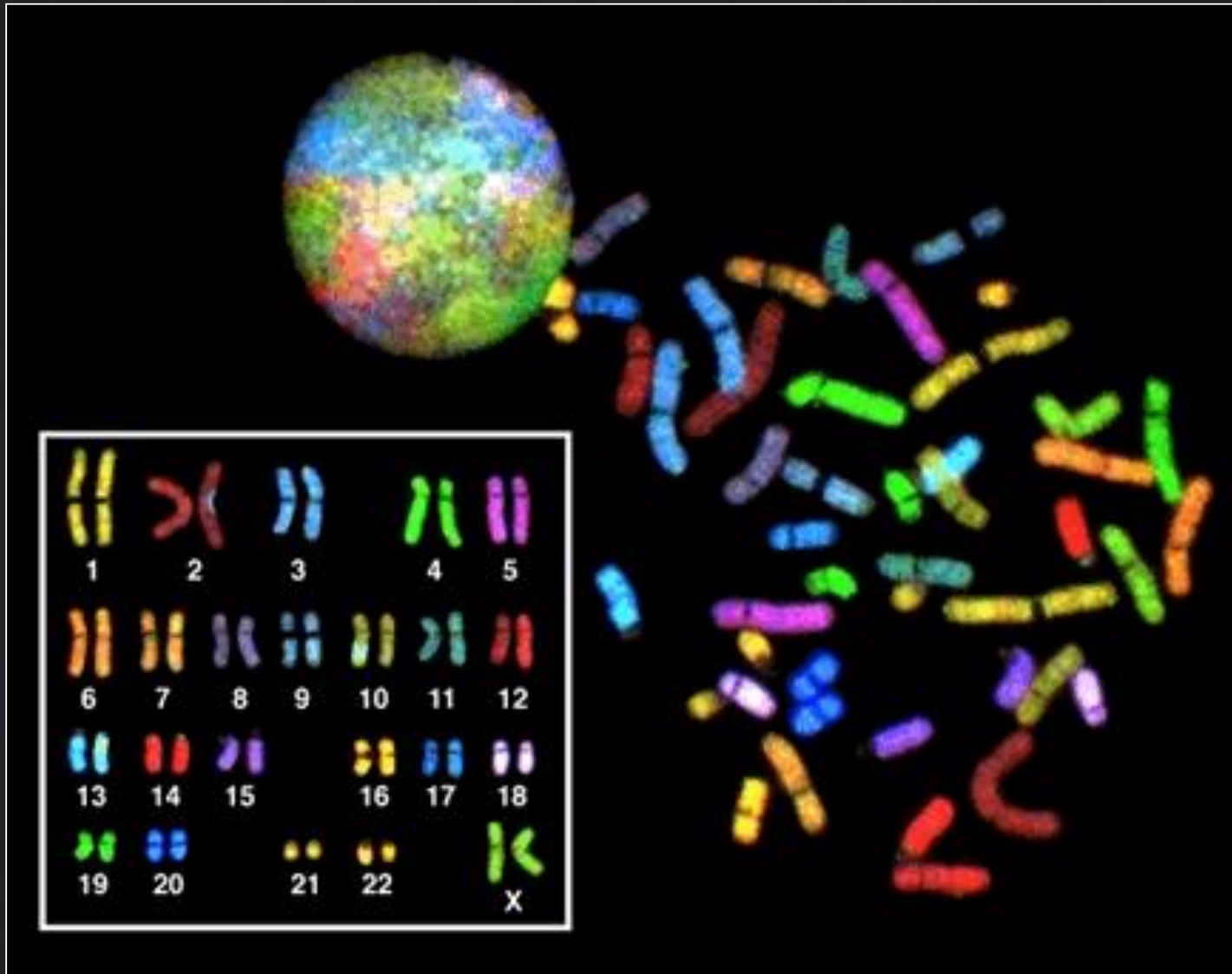
- felbontás ~ 1 kb
- kimutathatóság < 700 bp
- DNS szekvencia 2.5 - 3.5 bp / μm pontossággal elemezhető
- nincs kromoszóma szerkezet



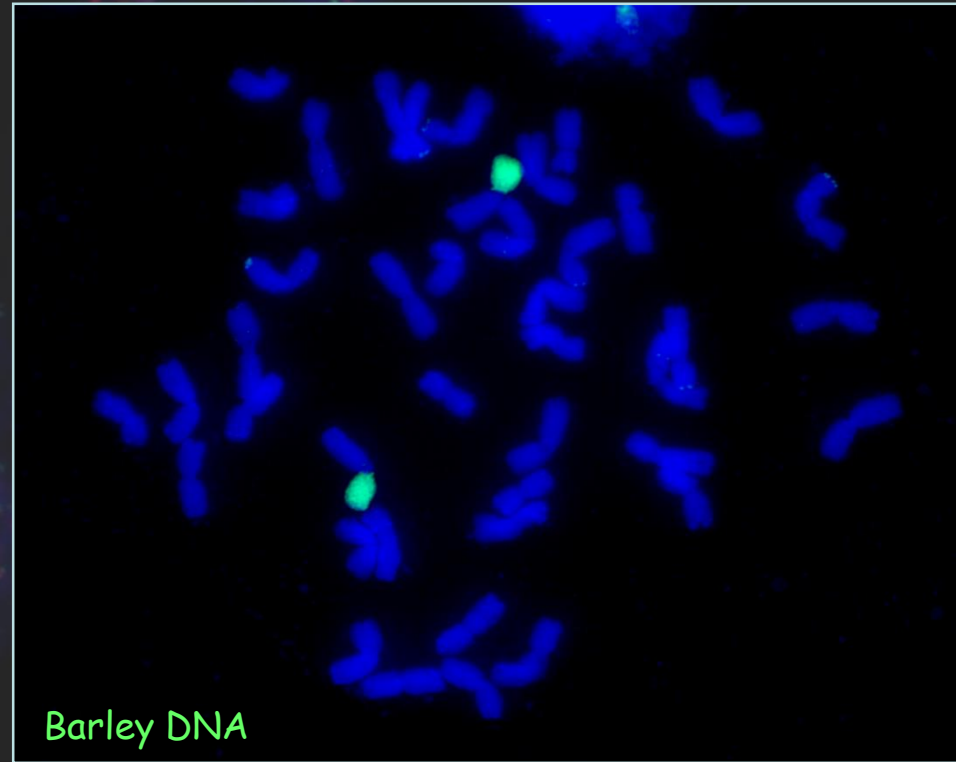
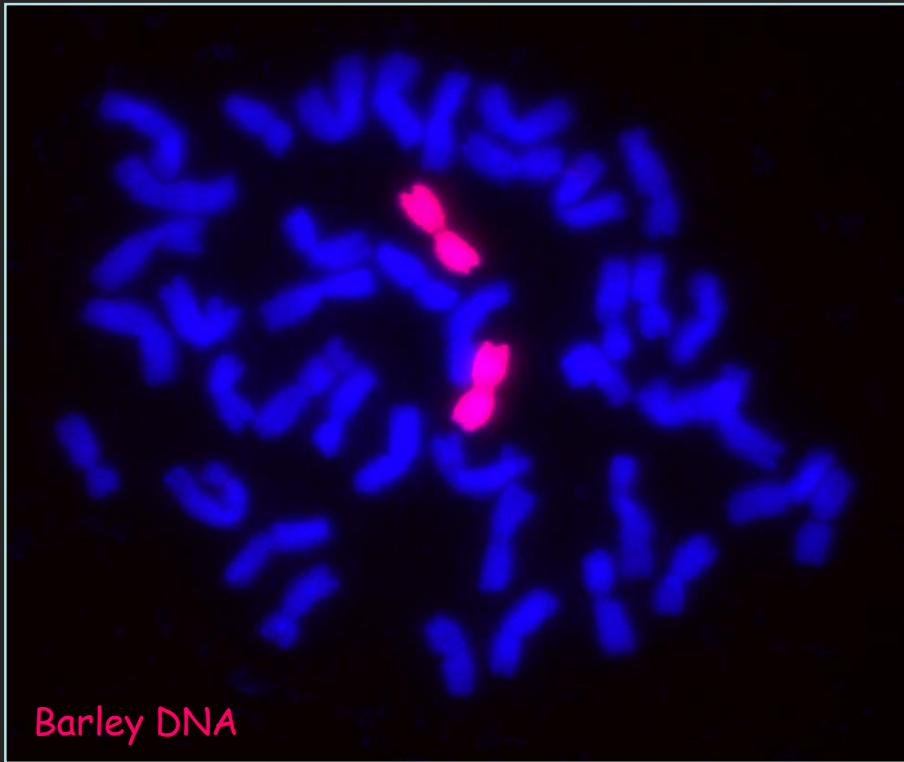
ISH mitótikus kromoszómákon

- az első FISH kísérleteket mitotikus kromoszómákon végezték
- kromoszómák morfológiai tulajdonságai pontosan megfigyelhetők (centroméra, teloméra, szatellit)
- kondenzált kromatin szerkezet
- alacsony és limitált kimutathatósági tartomány és detektálási érzékenység

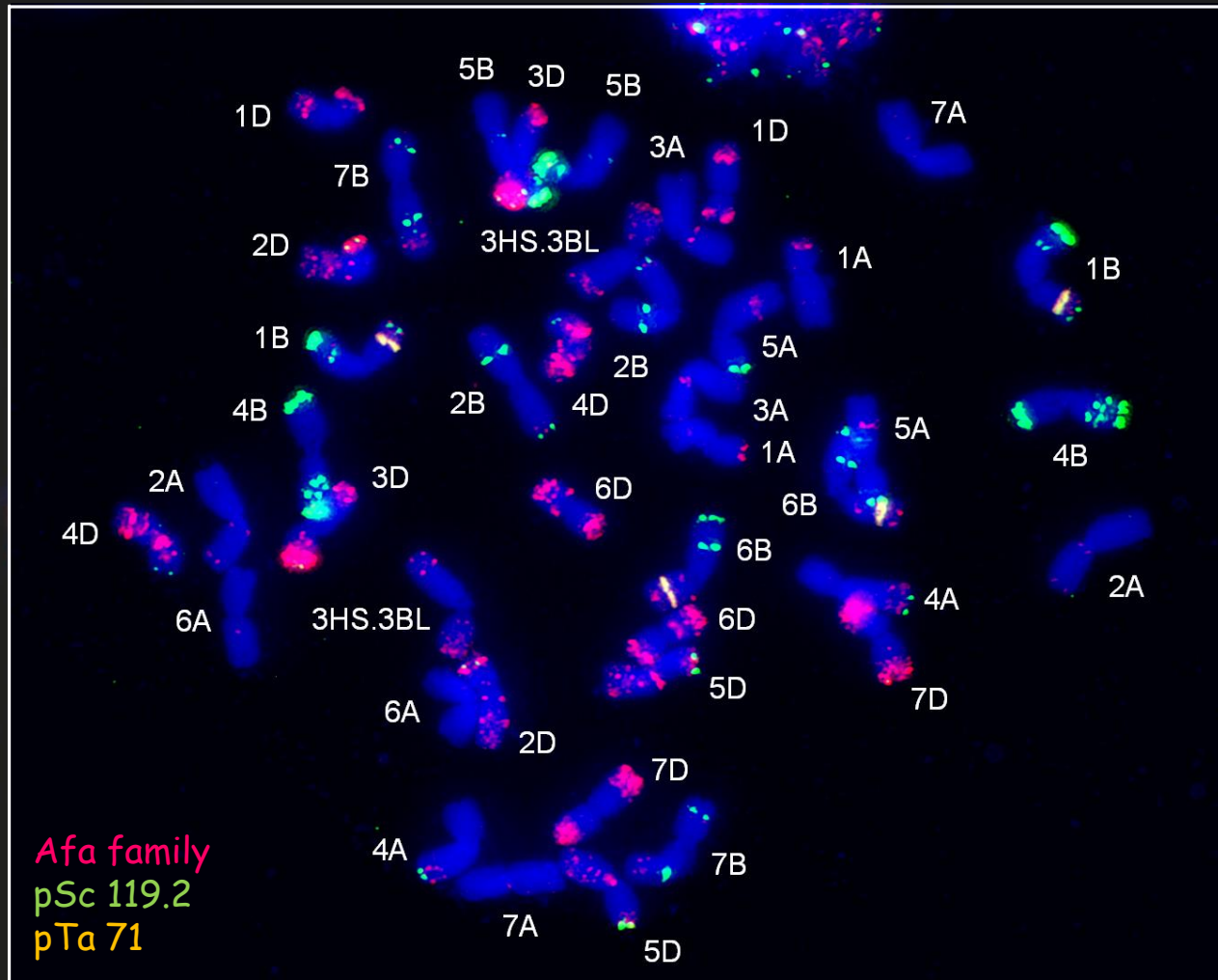
Humán spektrális kariotipizálás



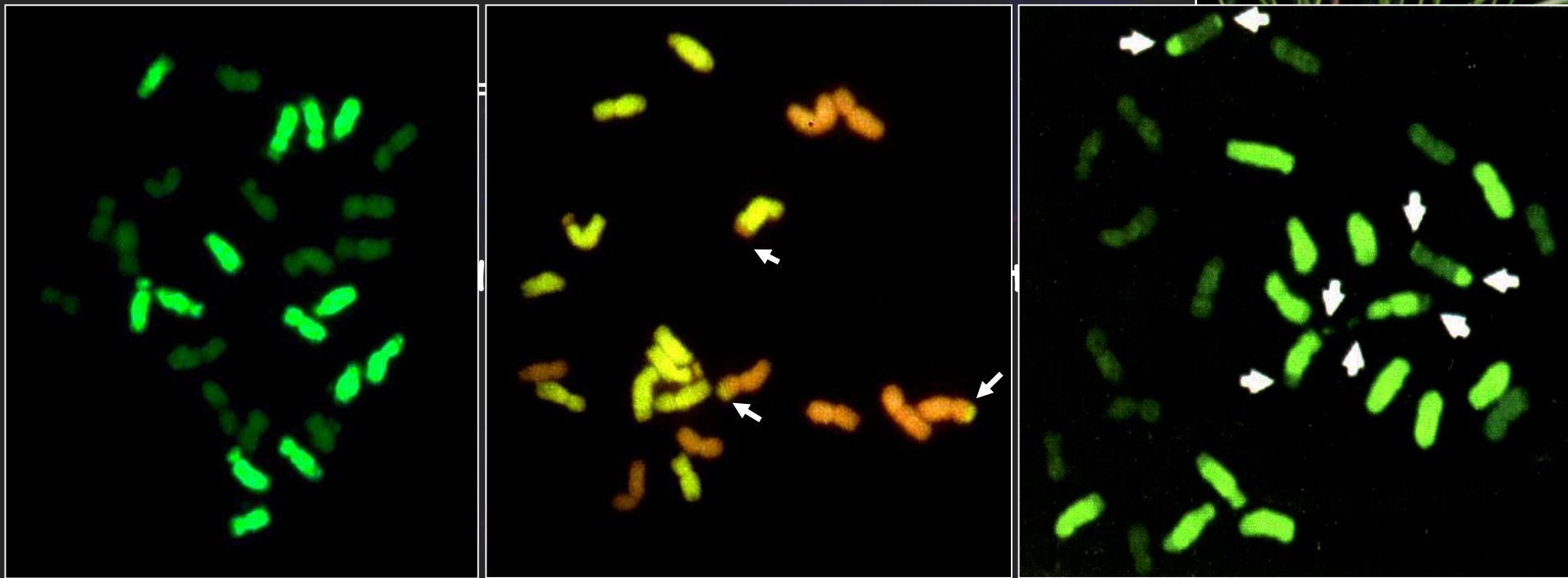
GISH (genomikus *in situ* hibridizáció) idegen eredetű DNS kimutatására a búza genomban



GISH és FISH idegen eredetű DNS kimutatására és azonosítására a búza genomban



Az *Ae. cylindrica* Host. ($2n=4x=28, D^cD^cC^cC^c$) faj genomjainak elkülönítése (GISH és FISH)



C^c labelled with fluorescein-11-dUTP



D^c unlabelled

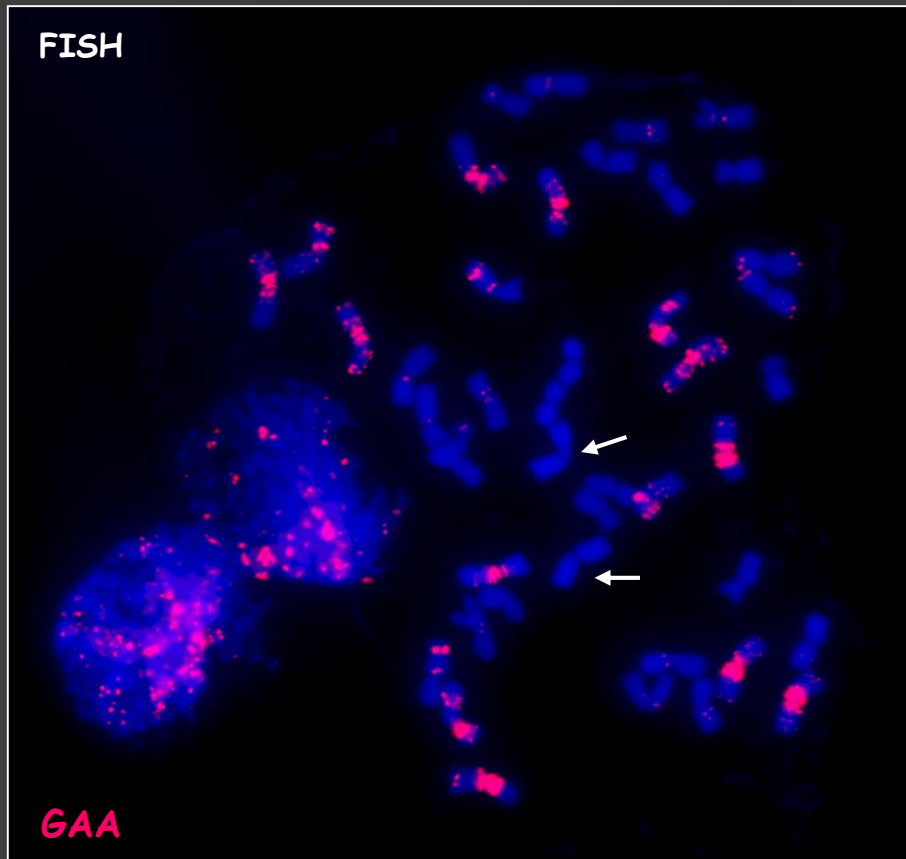


counterstained with PI



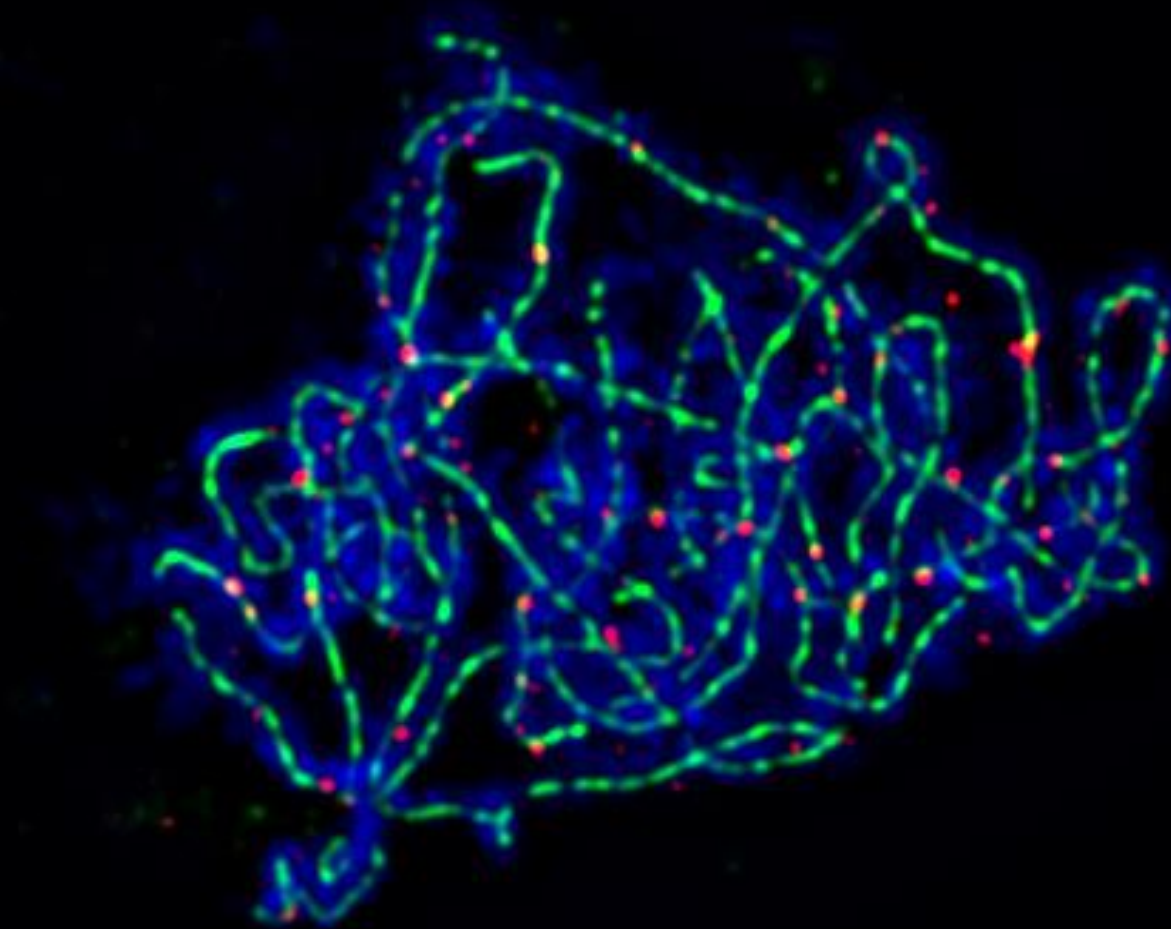
Linc et al. 1999. *Genome*

Búza/*T. elongatum* 6E diszómás addíciós vonall azonosítása



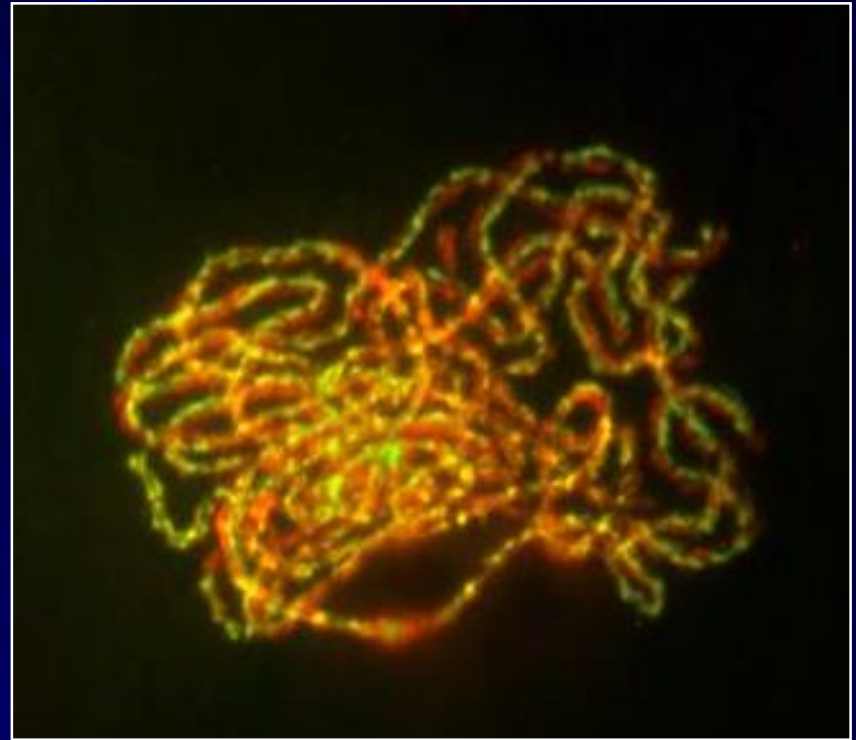
Linc et al. 1012. CGR

Pachytén-FISH



Meiózis v. számcsökkentő osztódás profázisának 3. alfázisa

Pachytén-FISH alkalmazási lehetőségei

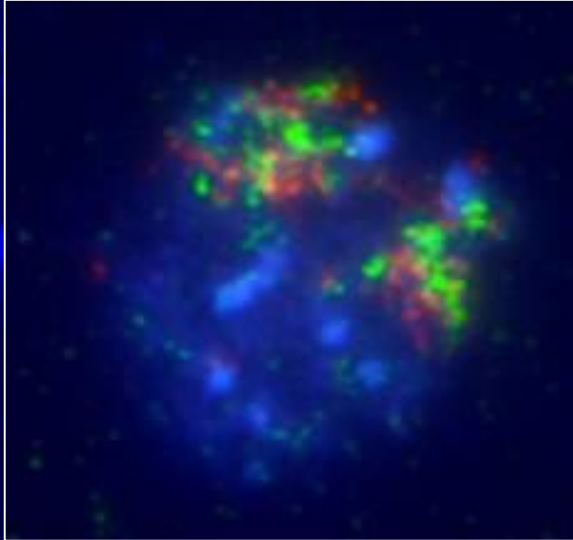


Lolium x *Festuca* fajhibrid meiotikus párosodásának tanulmányozása,
leírása és alkalmazása egyetemi oktatásban

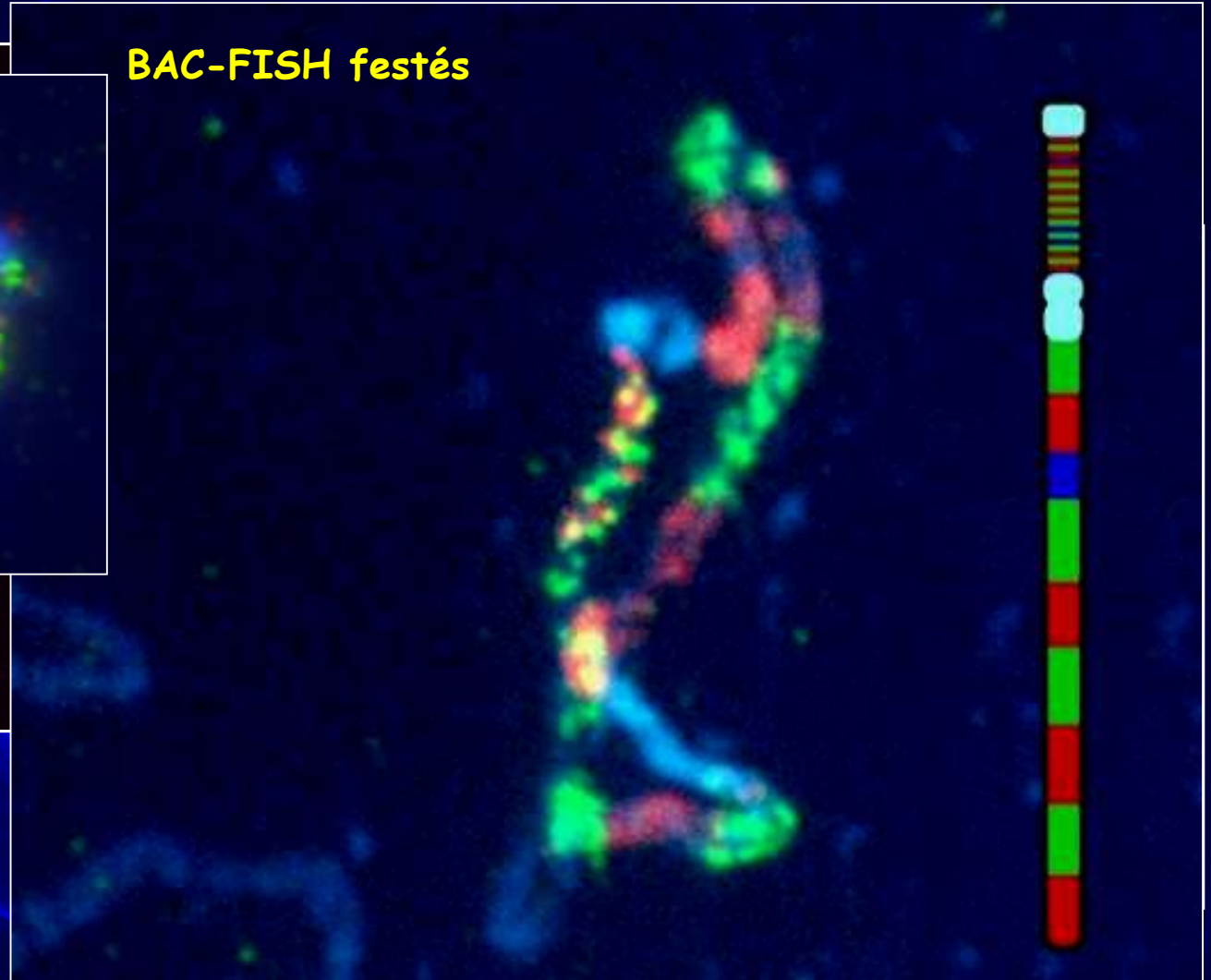
Lukaszewski, Kopecky, Linc G: Meiosis with labeled parental genomes. University of California, Riverside, USA <http://www.plantbiology.ucr.edu/faculty/>

Pachytén-FISH

BAC-FISH festés



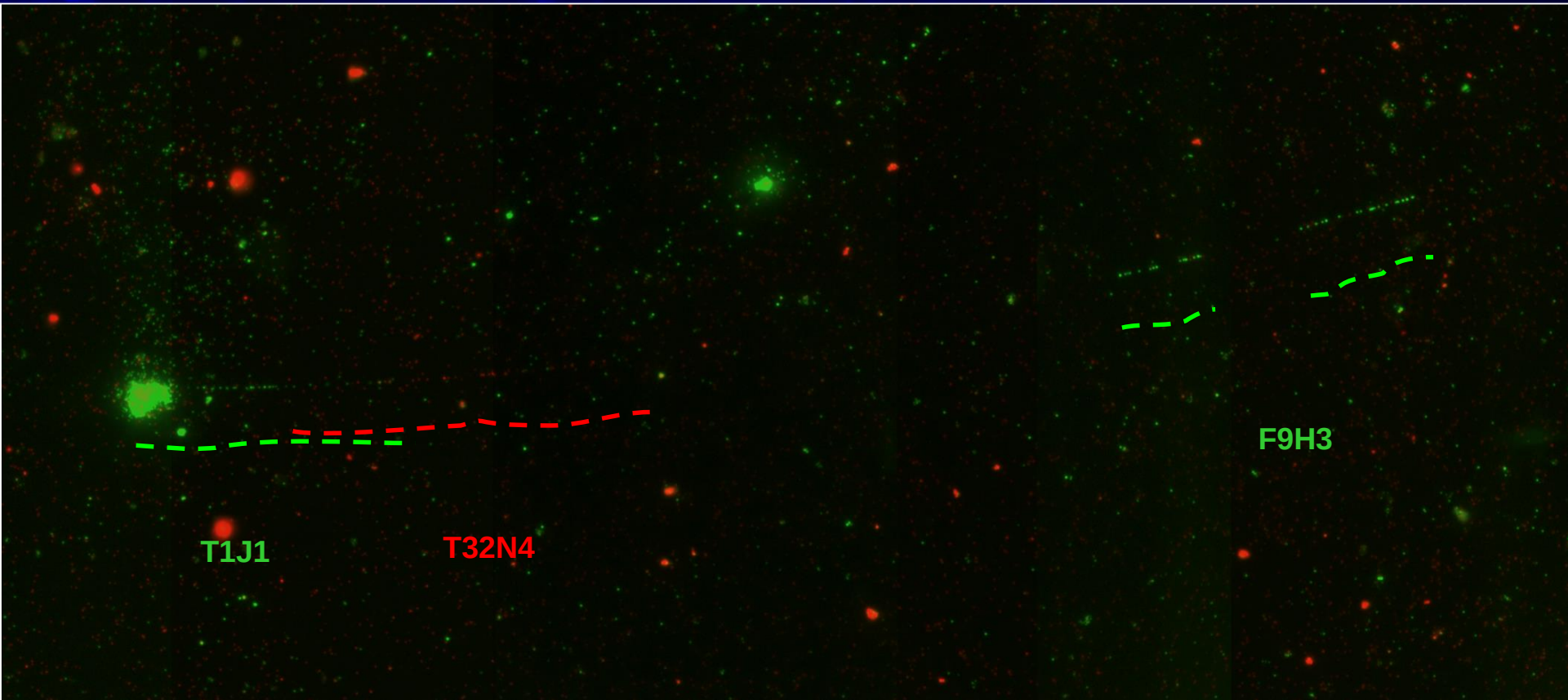
búza
árpa



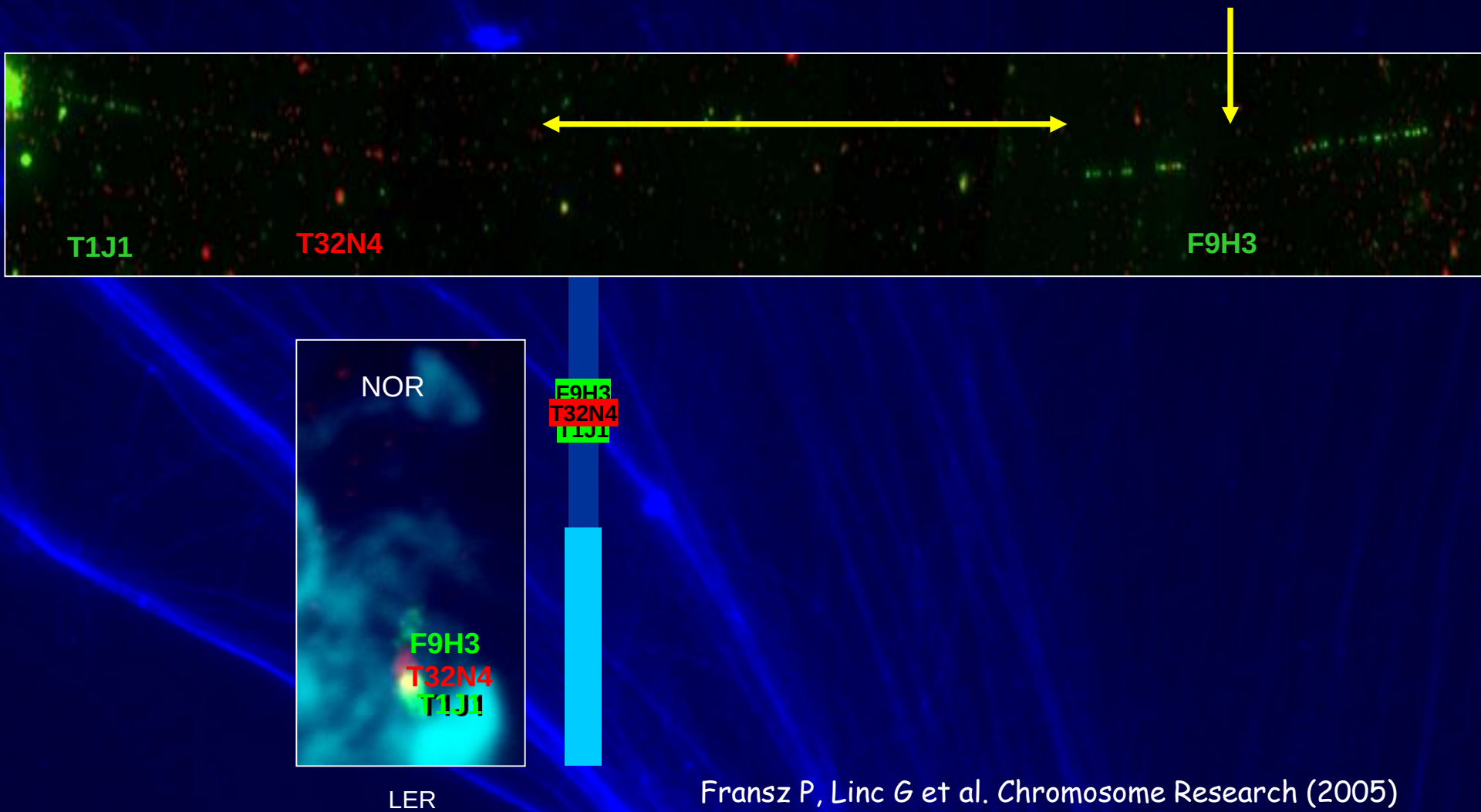
DNS fiber-FISH

- sejtmagok izolálása levélből, gyökércsúcsból
- tisztítás szűréssel (20-50 μm)
- DNS kiszabadítása a sejtmagokból (lízis puffer)
- fiber szálak nyújtása és fixálása
- jelölt próba hibridizálása, detektálása

Mennyi plusz információt nyerhetünk fiber-FISH alkalmazásából?



A pachytén- és fiber-FISH kombinációjával...



Fransz P, Linc G et al. Chromosome Research (2005)

3D-FISH

- megőrzött térbeli szerkezetű sejtmagokon 3D-mikroszkópiával kombinálva

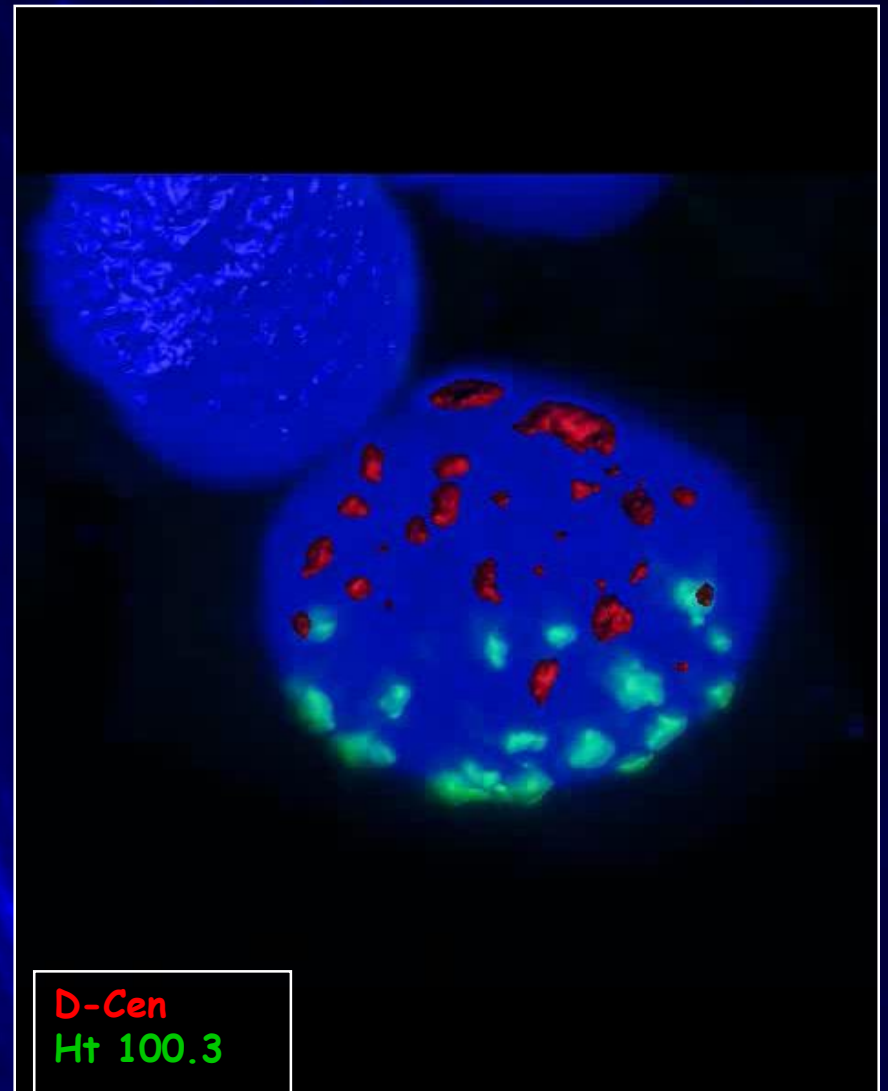
Próba jelölés

lehetővé teszi a 3D megjelenítést egyes génlókuszok, szubkromoszómális tartományok és akár egész kromoszómák egyes

Sikeres 3D-FISH kísérletek megvalósításához két fontos feltételnek kell teljesülni:

- ✓ optimálisan jelölt DNS próbák
- ✓ nukleáris morfológia megőrzése, sejtek permeabilitása

3D - FISH 3D-ben...





Köszönöm a figyelmet!

www.meetthescientist.hu

