

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Fyzické mapování vazebně neidentifikovaných oblastí pomocí  
BAC klonů u *Xenopus tropicalis***

**Physical mapping of genome regions without linkage map  
using BAC clones in *Xenopus tropicalis***

**Petra Špirhanzlová**

**V Praze 2012**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ing. Vladimír Krylova, Ph.D. v Laboratoři vývojové biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a pod vedením Nicolase Polleta, Ph.D. v Laboratoři syntetické a systémové biologie Univerzity Val d'Essonne v Evry za použití uvedené literatury.

V Praze, srpen 2012

.....

Petra Špirhanzlová

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. a také RNDr. Tereze Tlapákové PhD. a RNDr. Jaroslavu Máchovi za podporu, cenné rady a trpělivost.

Poděkování patří i Nicolasovi Polletovi PhD. a Sophie Polletové PhD. za podporu během pobytu v jejich laboratoři v rámci programu Erasmus.

## Abstrakt

*Xenopus leavis*, který byl ve 20. století oblíbeným modelovým organismem je v současné době nahrazován diploidním druhem *Xenopus tropicalis*, který má nejen kratší generační dobu, ale i menší genom. Jedním z nedostatků *Xenopus tropicalis* je absence úplné vazebné a fyzické mapy. Podle JGI genomové databáze (assembly 4.1) se nachází na krátkém raménku chromozómu 2 a 7 nemapované oblasti, do kterých byly v novější verzi (assembly 7.1) přiřazena řada BAC klonů s osekvenovaným jedním nebo oběma konci. Vystává ovšem otázka, zda tyto 100 bp dlouhé sekvence stačí k unikátnímu zařazení BAC klonu do genomu *Xenopus tropicalis*.

S cílem ověření správnosti zařazení těchto BAC klonů v JGI databázi byly vybrány BAC klony, které se podle databáze nachází na krátkém raménku chromozómu 2. Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace byly tyto BAC klony lokalizovány na metafázních chromozómech. Vybrané BAC klony vykazovaly signál na krátkém raménku chromozómu 1, místo na krátkém raménku chromozómu 2 a ve většině případech byly opačně orientované, což ukazuje na to, že koncová sekvence 100 pb je pravděpodobně nedostatečná k unikátní identifikaci BAC klonu do chromozómu. V rámci této práce byl zaveden funkční protokol pro izolaci a značení BAC DNA.

### Klíčová slova:

*Xenopus tropicalis*, fluorescenční *in situ* hybridizace, umělý bakteriální chromozóm, vazebná mapa

## **Abstract**

*Xenopus leavis* was a favorite model organism during the 20th. century, but nowadays it has been replaced by diploid *Xenopus tropicalis*, which has not only shorter generation time, but also smaller genom.

One of the disadvantages of *Xenopus tropicalis* is the lack of full physical and linkage map. According to JGI genome database (assembly 4.1) there are unmapped regions on short arm of the chromosome 2 and 7 . Several BAC clones ( with a single or dual-end sequence) has been found to be located within this region, according to a recent assembly 7.1. However , it isn't clear whether 100bp length of BAC ends is enough to place entire BAC clone into the genom of *Xenopus tropicalis*. In order to prove correct inclusion of these BAC clones into JGI database, several BAC clones, which are supposed to be located on short arm of chromosome 2, were picked.

Using fluorescence *in situ* hybridisation, the signal of these BAC clones was localised on the short arm of chromosome 1 instead of chromosome 2 and in most cases they had opposite orientation. It means that the 100bp length of BAC ends propably isn't sufficient to place entire BAC clone on chromosome. New working protocol of BAC DNA isolation and labeling was established.

### **Key words:**

*Xenopus tropicalis* , fluorescence *in situ* hybridisation, bacterial artificial chromosome, linkage map

# Obsah

Seznam zkratek	9
<b>1. Úvod</b>	<b>11</b>
<b>2. Cílediplomové práce</b>	<b>12</b>
<b>3. Literární přehled</b>	<b>13</b>
3.1 Obojživelníci jako modelové organismy	13
3.1.1 Rod <i>Xenopus</i> jako modelový organismus	13
3.1.2 <i>Xenopus leavis</i>	13
3.1.3 <i>Xenopus tropicalis</i>	14
3.1.3.1 Genom <i>Xenopus tropicalis</i>	15
3.1.3.2 Vazebná mapa <i>Xenopus tropicalis</i>	15
3.2 Bacterial artificial chromosomes (BAC)	16
3.2.1 Struktura BAC	16
3.2.2 BAC knihovna	17
3.2.2.1 Konstrukce BAC knihovny	17
3.2.2.2 BAC knihovny <i>Xenopus tropicalis</i>	18
3.3 Fyzické mapování genomu <i>Xenopus tropicalis</i> pomocí BAC	18
3.4 <i>In situ</i> hybridizace (ISH)	18
3.4.1 Fluorescenční <i>In Situ</i> hybridizace (FISH)	19
3.4.1.1 Syntéza FISH sond	20
3.4.1.1.1 Nick translace	20
3.4.1.1.2 Metoda náhodných primerů	21
<b>4. Materiál</b>	<b>22</b>
4.1 Biologický materiál	22
4.2 Použité roztoky	22
4.3 Přístroje	23
<b>5. Metody</b>	<b>25</b>
5.1 Izolace BAC DNA	25
5.1.1 Příprava kultury	25
5.1.2 Izolace BAC DNA	25
5.1.3 Kontrola BAC DNA	25

5.1	Příprava sondy	27
5.1.2	Příprava sondy metodou Nick translace	27
5.2.1.1	Test Dnázy I	27
5.2.1.2	Nick translace	27
5.2.2	Random priming	29
5.3	Southern blot	30
5.4	Izolace genomové DNA	30
5.5	Příprava buněk z tkáňové kultury	31
5.5.1	Kultivace	31
5.5.2	Synchronizace	31
5.5.2.1	Serum starvation	31
5.5.2.2	Synchronizace pomocí kolchicinu	31
5.5.3	Příprava buněk pro metafázní spready	32
5.6	FISH	32
5.6.1	Příprava metafázích spreadů	32
5.6.2	FISH – první den	33
5.6.2.1	Denaturace a hybridizace sondy s chromozómy	33
5.6.2.1.1	Simultánní denaturace	33
5.6.2.1.2	Oddělená denaturace	34
5.6.3	Promývání skel	34
5.6.4	Pozorování signálu	35
5.6.5	Analýza obrazu	35
<b>6.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>36</b>
6.1	Výběr vhodných BAC klonů	36
6.2	Izolace BAC DNA	37
6.2.3	Úprava protokolu za účelem snížení obsahu RNA	37
6.2.3	Izolace BAC DNA za použití kolony	39
6.3	Příprava kompetitorové DNA	42
6.3.1	Příprava kompetitoru pomocí injekční jehly	42
6.3.2	Sonikace DNA	42
6.4	Značení sondy	44
6.5	Synchronizace buněčné kultury	46

6.6 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	48
6.6.1 Simultánní denaturace sondy s metafázními spready	48
6.6.2 Oddělená denaturace sondy a metafázích spreadů.	49
6.5.3 Fyzické mapování vybraných BAC klonů	50
<b>7. Diskuze</b>	<b>55</b>
7.1 Úprava protokolu pro izolaci a značení BAC DNA	55
7.2 FISH	56
7.3 Fyzické mapování pomocí FISH	56
<b>8. Závěr</b>	<b>58</b>
<b>Citovaná literatura</b>	<b>59</b>

## SEZNAM ZKRATEK

BAC	bacterial artificial chromosome
BFM	bromfenolová modř
bp	base pair (pár bazí)
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
cDNA	complementární DNA
CCC	covalently closed circle (konformace plasmidové DNA)
DAPI	4'6-diamin-2-fenylindol (fluorofor)
DAB	diaminobenzidin
dig-dUTP	digoxigeninovaný deoxyuridintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
KCl	chlorid draselný
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	dihydrogenfosforečnan draselný
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
mRNA	messenger RNA
MS222	Ethyl 3-aminobenzoatemethansulfonát
NaCl	chlorid sodný
NaHCO <sub>3</sub>	hydrogenuhlíčitan sodný
NaOH	hydroxid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	hydrogenfosforečnan sodný
OC	open circle (konformace plasmidové DNA)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)

RCD	relative centromere distance (relativní vzdálenost od centroméry)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
SSC	saline-sodium citrate
TBE	Tris/borate/EDTA
TK	H <sub>2</sub> O voda pro tkáňové kultury
TMR	tetramethyl rhodamin
TSA	Tyramide Signal Amplification

# 1. Úvod

Obojživelníci a zejména *Xenopus leavis* se pro účely vývojové biologie využívali po dobu více než jednoho století. *Xenopus leavis* se ovšem ukázal jako nevhodný pro různé genetické manipulace kvůli svému pseudotetraploidnímu genomu (Luo et al., 2001). Jako alternativní model se nabízí *Xenopus tropicalis*, který je diploidní, má menší genom a kratší generační dobu (Amaya, 2005).

V roce 2002 byl u tohoto modelového organismu spuštěn projekt sekvenace jeho genomu. V současnosti známe více než 28 000 genových modelů identifikovaných v 19 545 scaffoldech. Vazebná a fyzická mapa genomu *Xenopus tropicalis* zatím obsahuje velké množství nemapovaných oblastí, z nichž nejrozsáhlejší se nacházejí na krátkém raménku chromozómu 2 a 7 (Hellsten et al., 2010). Existuje velké množství genomových knihoven *Xenopus tropicalis*. Nejstarším vektorem využívaným k tomuto účelu je YAC (yeast artificial chromosome) schopný nést fragment DNA dlouhý až 300 kpb. YAC má ovšem řadu nevýhod, v první řadě nestabilitu. (Bronson et al., 1991). Jako vhodnou alternativu lze použít BAC (bacterial artificial chromosome), jehož insert dosahuje velikosti kolem 150 kbp (Song et al., 2001). V dnešní době máme k dispozici několik BAC knihoven druhu *Xenopus tropicalis* na jejichž základě vznikly provizorní fyzické mapy genomu. Lokalizace jednotlivých BAC klonů byla provedena na základě DNA sekvence zahrnující cca 100 bp z obou konců. Vzhledem k značnému množství repetitivních sekvencí v genomu *Xenopus tropicalis* vyvstává otázka, zda takto krátké sekvence jsou dostatečné k unikátní lokalizaci BAC klonu do genomu. Údaje z genomové databáze JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/>) ukazují, že vazebně nemapované oblasti genomu *Xenopus tropicalis* korespondují s celou řadou BAC klonů. Cílem této diplomové práce bylo pomocí metody Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) lokalizovat na metafázích chromosomech pozici BAC klonů respektive scaffoldů v rámci vazebně nemapovaného krátkého ramene chr. č.2, a tím potvrdit, či vyvrátit oprávněnost zařazení příslušných BAC klonů v databázi JGI.

Vzhledem k tomu, že metoda izolace a značení BAC klonů a vlastní a BAC FISH technika nebyla v laboratoři školitele zavedena, bylo nutné nejprve sestavit funkční protokol.

## 2. Cíle diplomové práce

- Zavést protokol pro izolaci BAC DNA, izolovat DNA vybraných BAC klonů za účelem vytvoření značené sondy pomocí dig- 11- dUTP
- Zavést protokol pro značení BAC DNA pomocí dig- 11- dUTP a syntetizovat sondy z vybrané BAC DNA
- Zavést protokol pro BAC FISH, mapovat vybrané BAC klony za účelem ověření správnosti sestavení vazebné mapy

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Obojživelníci jako modelové organismy

Od 20. století jsou obojživelníci využíváni jako jeden z nejčastějších modelových organismů pro potřeby studia vývojové biologie. Obojživelníci mají ve srovnání se savci výhodu v tom, že u nich dochází ke vnějšímu oplození, což umožňuje snadné pozorování embryogeneze. Oocytů, produkovaných samicí, je značné množství, jsou velké a snadno se s nimi manipuluje. Embrya jsou ve srovnání s rybím modelem (Zebříčka pruhovaná - *Danio rerio*) mnohem odolnější. V neposlední řadě se také u nich cení jejich relativně krátká generační doba (Amaya et al., 1998).

##### 3.1.1 Rod *Xenopus* jako modelový organismus

Rod *Xenopus* patří do podčeledi *Xenopidinae*, čeledi *Pipidae*, řádu *Anura*, a tvoří ho zhruba dvacet druhů. Až na *Xenopus tropicalis* jsou všechny druhy polyploidní.

Původ těchto obojživelníků je v jižní a jihozápadní Africe, posléze byli introdukováni do Ameriky, kde vytlačují tamní druhy žab.

*Xenopus* patří mezi vodní živočichy, v laboratorních podmínkách se chová v akváriu. Vyžaduje vodu teplou 16 – 32°C. Jako potrava mu slouží mrtvý organický materiál (Hirsch et al., 2002).

Jeho využití se rozšířilo ve 30. letech 20. století, když se *Xenopus leavis* začal využívat k testování hladiny choriongonadotropinu v moči potenciálně gravidních žen. Tento těhotenský test byl vítanou novinkou, protože předtím se k tomuto účelu využívali králíci a myši a každé zvíře muselo být po ukončení testu utraceno (Gurdon and Hopwood, 2000).

##### 3.1.2 *Xenopus leavis*

*Xenopus leavis* (Drápatka vodní) byl nejvíce využíván ve 20. století. Objev možnosti hormonálně indukovat samce a samice ke kopulaci umožnil celoroční přísun oocytů, což přispělo k oblíbenosti *Xenopus leavis* u embryologů (Shapiro, 1935).

*Xenopus leavis* má 36 chromozómů a byl nejdříve klasifikován jako diploidní (Tymowska and Fischberg, 1982). Pozdější experimenty ale ukázaly, že u něj v rámci

evoluce došlo k duplikaci genomu, a je tedy tetraploidní, což znemožňuje některé metody genetické analýzy (Amaya et al., 1998).

S jistotou lze ale říci, že experimenty s *Xenopus leavis* přinesly odhalení mnoha poznatků vývojové biologie, zejména některé molekulární mechanizmy embryogeneze, řízení buněčného cyklu nebo replikace chromozómů (Graf and Kobel, 1991).

. *Xenopus leavis* dorůstá velikosti do 10 cm a v přírodě se dožívá věku 5 až 15 let, jeho generační doba je přibližně 1 rok. Samice najednou snáší 200 – 500 oocytů o průměru 1,0 - 1,3 mm (Hirsh et al, 2002).

### 3.1.3 *Xenopus tropicalis*

*Xenopus tropicalis* je vhodnější modelový organismus pro výzkum než *Xenopus leavis*. Je menší (dospělý jedinec dorůstá délky přibližně 4 - 5cm), jeho generační doba činí 3 - 5 měsíců (viz obr.1). Počet chromozómů u *Xenopus tropicalis* je 20, a jedná se o jediný diploidní druh rodu *Xenopus*, což umožňuje snáze provádět experimenty založené na knock-outu, missexpresi, overexpresi nebo silencingu genů (Amaya, 2005).

Oocyty jsou menší, než u *Xenopus leavis* (0,7 – 0,8 mm), ale stále vhodné pro mikroinjikaci. V jedné snůšce samice naklade přibližně 1000 - 9000 oocytů (Amaya et al. 1998).



**Obr. 1** Srovnání velikosti dospělých samic *Xenopus leavis* (vlevo) a *Xenopus tropicalis* (vpravo). Převzato z Hirsch et al., 2002.

### 3.1.3.1 Genom *Xenopus tropicalis*

Genom *Xenopus tropicalis* je dlouhý  $1,7 \times 10^9$  bp, což představuje asi polovinu velikosti genomu *Xenopus leavis* ( $3,1 \times 10^9$  bp). S nárůstem oblíbenosti *Xenopus tropicalis* jako modelového organismu byla iniciována snaha o vytvoření jeho genomických zdrojů. Roku 2002 zahájil The Joint Genome Institute of the Department of Energy (JGI) projekt sekvenace genomu *Xenopus tropicalis* (Klein et al., 2002; Abu-Daya et al., 2012).

Podle *Xenopus tropicalis* assembly 4.1 je v současné době přečteno více než 1,5 Gpb, což představuje zhruba 8x velikost genomu *Xenopus tropicalis*. Osekvenováno je 19,549 scaffoldů (osekvenované úseky DNA, řazené sestupně podle velikosti), z toho prvních 272 scaffoldů (dlouhých minimálně 1,56 Mb) obsahuje zhruba polovinu genomu (Hellsten et al., 2010). Celkem 267 z těchto scaffoldů vykazuje podobnost s lidským nebo kuřecím genomem, přičemž 60% všech genů na těchto scaffoldech se dá přímo asociovat s některým z lidských nebo kuřecích orthologů. Zatím se podařilo identifikovat 28 000 genových modelů v rámci těchto scaffoldů.

V novější databázi assembly 7.1 bylo možné na základě této syntenie provizorně umístit 170 scaffoldů *Xenopus tropicalis* bez genetických markerů do vazebné mapy (Hellsten et al., 2010).

Data jsou k dispozici na webových stránkách ([http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/Info/Index](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/Info/Index)) nebo oficiálních stránkách JGI Genome Browser (<http://genome.jgi.doe.gov/Xentr4/Xentr4.home.html>).

Mezi další projekty týkající se sekvenování genomu se řadí generování EST (Expressed Sequence Tag) a BAC (Bacterial artificial chromosome), PAC (P1 Artificial chromosome) a cDNA knihovny (Hirsch et al., 2002).

### 3.1.3.2 Vazebná mapa *Xenopus tropicalis*

Existence ucelené vazebné mapy a znalost molekulárních markerů je důležitá pro studii genomu každého modelového organismu (Henderson, 1970).

Jako genetický marker slouží polymorfní lokus (vyskytující se v populaci minimálně ve dvou alelách). Dříve sloužily pro tvorbu vazebných map markery rozpoznatelné na základě fenotypu (barva oka, produkce enzymu) získané z kódující sekvence DNA. V současné době jsou ale vazebné mapy konstruovány pomocí markerů

polymorfních nekódujících sekvencí DNA, které se nepojí s fenotypovým projevem (Paterson et al., 1988).

Základem vazebného mapování je frekvence rekombinace na chromozómech. K rekombinaci dochází při meiotickém „crossing-over“, který probíhá mezi homologními oblastmi chromozómu. Měřítkem genetické vazebné mapy je 1cM, což odpovídá 1 % rekombinací. Pravděpodobnost této události je tedy tím vyšší, čím jsou od sebe lokusy vzdálenější (Griffiths et al., 2000).

V současné době existuje neúplná vazebná mapa *Xenopus tropicalis*, která je založena na polymorfních SSR (Simple Sequence Repeat) markerech. Do této chvíle bylo analyzováno 1 713 markerů, z nichž 1 558 bylo zařazeno do 10 vazebných skupin. Zbylé markery byly rozříděny do 6 malých clusterů (<http://tropmap.biology.uh.edu/map.html>).

Jedním z úkolů vazebného mapování *Xenopus tropicalis* je identifikace scaffoldů vzhledem k jednotlivým vazebným skupinám a jejich seřazení do správného pořadí (Kochan et al., 2003; Wells et al., 2011).

### **3.2 Bacterial artificial chromosomes (BAC)**

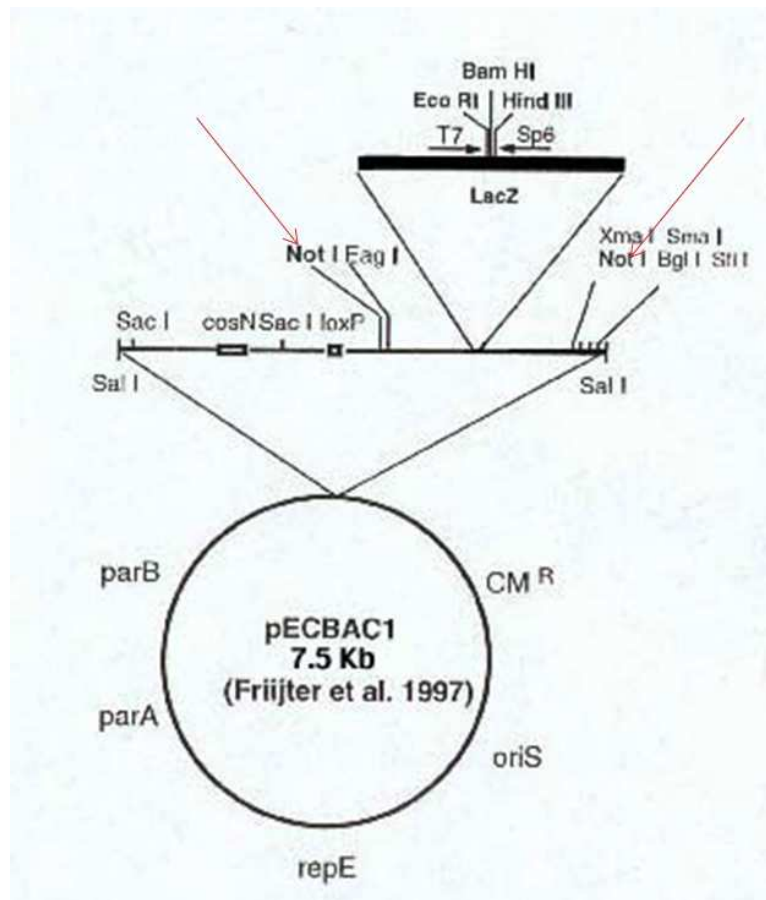
V současné době je k dispozici řada vektorů, které se dají využít ke klonování velkých fragmentů DNA. Nejstarší takový vektor je Yeast Artificial Chromosome (YAC), který lze použít ke klonování DNA až do velikosti 2 Mbp. YAC mají ovšem řadu nevýhod, mezi které patří velké množství chimérických klonů (40 – 60 %) nebo nestabilita a tendence k vyštěpování částí insertu (Bronson et al., 1991).

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) představuje nejrozšířenější alternativu k YAC vektorům. Jedná se o klonovací systém založený na F<sup>-</sup> faktoru bakterie *Escherichia coli*, který umožňuje klonovat úseky DNA o velikosti až 300 kbp. Jedná se o vysoce stabilní vektor, jelikož se v buňce nachází pouze v jedné až dvou kopiích, tudíž běžně nedochází k rekombinacím v rámci insertu (Song et al., 2001).

#### **3.2.1 Struktura BAC**

Každý BAC obsahuje oblast s restrikcími místy pro restriktázy EcoRI, HindIII, BamHI a také CG- bohatou oblast s restrikcími místem pro NotI, což slouží k případnému vyštěpení insertu, popřípadě elektroforetickému ověření přítomnosti BAC DNA (viz obr. 2). Další částí vektoru je místo počátku transkripce oriS a lokusy parA,

parB a repE, které jsou zodpovědné za udržení pouze jedné kopie vektoru na buňku. Nepostradatelnou součástí BAC je gen pro chloramfenikolovou resistenci a gen pro  $\beta$ -galaktosidázu (Shizuya and Kouros-Mehr, 2001).



**Obr. 2** Schéma BAC klonu, šipky ukazují na restrikční místa Not I., která oddělují vektor a insert. Převzato z Frijters et al. 1997.

### 3.2.2 BAC knihovna

BAC knihovna je soubor fragmentů DNA určitého organismu, klonovaných do BAC vektorů. Ty jsou poté transformovány do *E. Coli*. Často obsahuje celý genom daného organismu. První BAC knihovna byla vytvořena roku 1992 pro lidský a rostlinný model (Woo et al., 1994). V dnešní době má svojí BAC knihovnu téměř každý modelový organismus.

#### 3.2.2.1 Konstrukce BAC knihovny

Při přípravě BAC knihovny se nejdříve izoluje DNA daného organismu s vysokou molekulární hmotností. Po té je provedeno štěpení restrikční endonukleázou Hind III a výsledek reakce je zkontrolován pomocí pulzní elektroforézy. Fragменты o

velikosti 100-150 kbp jsou izolovány, ligovány do pBAC-Lac vektoru a transformovány do *E. Coli*. Pomocí automatického robota pak je každý klon naočkován do připravených 384-jamkových destiček obsahujících LB médium, chloramfenikol a 15% glycerol. Celá knihovna se uchovává při teplotě -80° C (Ishii et al., 2004).

### **3.2.2 BAC knihovny *Xenopus tropicalis***

V současné době je k dispozici několik BAC knihoven mapujících genom *Xenopus tropicalis*. Jako příklad lze uvést knihovnu zkonstruovanou na Keio university of Tokio v Japonsku, která obsahuje více než 100 000 klonů nebo v Institutu for System Biology v Seattlu, která se skládá z 160 000 BAC klonů.

V laboratoři školitele je k dispozici BAC knihovna vytvořená v Institutu systémové a syntetické biologie v Paříži. Zmíněná knihovna je odvozená z kmene Ivory coast a obsahuje 92 000 klonů z nichž některé mají osekvenovány oba konce a některé pouze jeden (N. Pollet, ústní sdělení).

### **3.3 Fyzické mapování genomu *Xenopus tropicalis* pomocí BAC**

Fyzická mapa ukazuje reálnou vzdálenost mezi dvěma lokusy, vyjádřenou počtem párů bazí.

BAC fyzická mapa představuje soubor klonů z BAC knihovny uspořádaných tak, aby se navzájem částečně překrývaly a jejich pořadí odpovídalo jejich umístění v genomu. Dostupnost fyzické mapy zásadním způsobem usnadňuje a urychluje vyhledávání a izolaci genů. V současné době je nejrozšířenější metodou fyzického mapování *in situ* hybridizace (ISH) (Li et al., 2012).

### **3.4 *In situ* hybridizace (ISH)**

U klasické hybridizace se k detekci DNA nebo RNA sekvencí využívají komplementární oligonukleotidové nebo polynukleotidové sondy (Gall et al, 1969). Izolovaná molekula DNA nebo RNA bývá navázána na nosič (gel, nitrocelulosa membrána) (Pardue and Gall, 1969). Při metodě *in situ* dochází k hybridizaci přímo ve tkáni, buňkách nebo chromozómech fixovaných na podložní sklo (Tompsett et al., 2009).

Dvouvláknová DNA (dsDNA) musí být během hybridizace denaturována na jednovláknovou DNA (ssDNA). K tomu je ovšem nutná vysoká teplota, která by mohla poškodit DNA. Řešením toho problému je využití formamidu, který slouží k destabilizaci vodíkových můstků a tím snižuje bod tání DNA ve vodné roztoku (Casey and Davidson, 1977).

Sondy používané při ISH jsou nejčastěji radioaktivně značené, což přináší celou řadu nevýhod, jako například vysoké nároky na vybavení laboratoře, bezpečnost a vysoké pořizovací náklady. Jako alternativa se v současné době používají neradioaktivní sondy, které jsou nejen levnější a mají delší životnost, ale i manipulace s nimi je snazší a rychlejší. Detekce těchto sond probíhá na základě histochemie nebo imunohistochemie. Příkladem jsou sondy značené pomocí nukleotidů dig-11- dUTP nebo biotin -16-dUTP (Bloch, 1993).

### **3.4.1 Fluorescenční In Situ hybridizace (FISH)**

Metoda FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace), při které dochází k detekci signálu na základě fluorescence se v poslední době stala jednou z nejpoužívanějších cytogenetických technik. Fluorescenčně značené sondy specificky nasedají na denaturované komplementární vlákno DNA přímo na chromozómu (Trask, 1991).

Pomocí FISH lze podobně mapovat sekvence v interfázním jádře, či na meiotických pachytenních chromozómech (Sieben et al, 2007).

FISH sondy se dělí na místně specifické, celochromozomální a celogenomové, které se využívají pro komparativní FISH v rámci studia evoluce genomů. Jejich velikost se pohybuje od 20 bp až po sondy velké několik stovek kpb.

FISH sondy mohou být RNA, oligonukleotidového, ssDNA a dsDNA původu. RNA sondy se využívají k vizualizaci rRNA, mRNA a poly(A) RNA v cytoplasmě buňky (Russell and Keiler, 2012). Oligonukleotidové sondy se syntetizují z deoxyribonukleotidů. Jejich výhodou je malé velikost (40-50 bazí), díky čemuž se snadno dostávají na místo určení a hybridizují rychleji. Citlivost této metody je ovšem nižší a je nutné znát přesnou sekvenci cílové DNA (Stoecker et al., 2010).

Jednovláknové DNA sondy jsou velké 200-500 bp. Přípravují se reverzní transkripcí mRNA nebo PCR amplifikací za použití jednoho primeru. Příprava těchto sond je dražší a časově náročnější.

Nejčastějším typem využívaným pro FISH jsou dsDNA sondy. Cílová sekvence se liguje do vektoru, který je následně transformován do bakterií E.Coli.. Vektor s inzertem je poté izolován. Před hybridizací je nutné sondu denaturovat neboť se jedná o dvouvláknovou DNA (Nath and Johnson, 1998).

### **3.4.1.1 Syntéza FISH sond**

Signál lze vizualizovat přímo v případě, že byl ke značení sondy použit nukleotid konjugovaný s fluorochromem například fluorescein izothiokyanát (FITC). Takovéto sondy se často využívají v případě lokalizace repetitivních sekvencí (Hoff et al., 2010).

Pokud chceme lokalizovat unikátní sekvenci, je třeba přistoupit k nepřímé vizualizaci sondy. V tomto případě značený nukleotid slouží jako hapten, což je látka vyvolávající specifickou imunitní reakci po navázání na makromolekulový nosič. Nejčastěji používané hapteny jsou biotin a digoxigenin. Na něj se váže látka konjugovaná s fluorochromem (Hauptmann and Gerster, 1994). Signál takto vytvořených sond je silnější. V případě použití krátkých sond bývá takovýto signál stále nedostačující a je ho nutné amplifikovat (Schriml et al., 1999; Speel et al., 1999).

Značení sond obvykle probíhá metodou náhodných primerů (random priming) nebo nick translací.

#### **3.4.1.1.1 Nick translace**

Nick translace (metoda posunu jednořetězcového zlomu) je jednou z technik inkorporace značených nukleotidů do DNA sondy na základě působení dvou enzymů - DNázy I a DNA-polymerázy I s 5'-3' exonukleázovou aktivitou. DNáza I vytvoří zlom (nick) na jednom řetězci DNA. DNA polymeráza I pak využívá volný 3' konec jako primer. Díky své 5'-3' exonukleázové aktivitě odbourává štěpený řetězec ve směru 5'-3' a díky polymerázové aktivitě pak znovu tuto oblast syntetizuje, tentokrát však také s použitím značených nukleotidů. Při nick translaci nedochází k amplifikaci DNA (Rigby et al., 1977).

Velikost kvalitních sond využívaných pro FISH by se měla pohybovat mezi 100-500 bp. Vzhledem k tomu, že při nick translaci dochází ke štěpení DNA na menší fragmenty na základě frekvence jednořetězcových zlomů, je nutné upravovat množství použité DNázy I. Dlouhé molekuly je třeba štěpit na více místech, je tedy nutné přidat více enzymu nebo prodloužit čas působení. Pokud tomu tak není, výsledné fragmenty

sondy by byly příliš malé, což by mělo za následek snížení specifity FISH signálu a zhoršení kvality obrazu. Proto je nutné před každou nick translací provést test DNázy I za účelem zjištění kvantity enzymu nutného pro syntézu sondy o správné velikosti (Rigby et al., 1977).

#### **3.4.1.1.2 Metoda náhodných primerů (random priming)**

Metoda značení DNA pomocí PCR s náhodnými primery, "random-primer-PCR" je založená na použití směsi náhodných oligonukleotidů, obvykle hexanukleotidů. Některé oligonukleotidy z této směsi s velmi vysokou pravděpodobností nasednou na jakoukoliv sekvenci DNA, kde potom působí jako primery pro replikační reakci katalyzovanou Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I. Tento enzym se vyznačuje pouze polymerázovou aktivitou a nemá exonukleázovou aktivitu, takže pouze vyplní mezery mezi nasednutými primery řetězcem, do kterého zařadí značené nukleotidy (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Metoda random-primer-PCR je použitelná pro značení velmi malých (10 ng) i velkých (až 3 µg) množství DNA. Metoda je účinná jak při použití krátkých i velmi dlouhých fragmentů DNA. Konečné množství označené DNA závisí na množství a čistotě použitého templátu, použitém značení a době inkubace. Velikost značených fragmentů DNA získaných metodou random-primer-PCR závisí také na množství a velikosti templátové DNA (Zou et al., 2003).

## 4. MATERIÁL

### 4.1 Biologický materiál:

- Dlouhodobá tkáňová kultura Speedy, odvozená z fibroblastů *Xenopus tropicalis* kmene Ivory coast
- BAC knihovna Institutu systémové a syntetické biologie, Paříž
- *Xenopus tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov Institutu systémové a syntetické biologie, Paříž

### 4.2 Použité roztoky:

- Tekuté médium : 150 ml L-15 Leibovitz (Sigma); 30 ml 5x RPMI médium (Sigma), 30 ml FBS (Fetal bovine serum) (Sigma); 3 ml glutamin (25 mg/ml) (práškový) (Sevapharma a.s.); 7,8 ml NaHCO<sub>3</sub> (7,5%); 225 µl gentamycin (80 mg/ml); do 450 ml TK H<sub>2</sub>O
- Trypsin-EDTA solution 10x (Sigma)
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM
- DAB (diamino benzidin): 50mg DAB/100ml/ 3µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Ethidium bromid: 1 mg/ml H<sub>2</sub>O
- GET- RNase pufr: Tris pH 8,0 25 mM ; EDTA 10mM ; RNase A 150µg/ml
- Lyzační pufr: SDS 1% ; NaOH 0,2M
- Neutralizační pufr: KAc 1,32M, pH
- 5x TBE (Tris-borát-EDTA): 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,0
- 1x PBS: 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- 2/3 PBS: 2 díly 1x PBS, 1 díl H<sub>2</sub>O
- 1x TNT: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20, pH 7,5
- TNB: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,5% Blocking reagent (Boehringer), pH 7,35
- PK pufr : Tris 10mM; EDTA 10mM; NaCl 100mM; SDS 0,5%
- 2x SSC: 300 mM NaCl; 30 mM citrát sodný, pH 7,0

- Izotonický roztok pro *X. tropicalis*: 100 mM KCl; 5 mM HEPES; 1 mM EDTA, pH 7,3
- Fixační roztok: methanol a kyselina octová v poměru 3:1
- Roztok pepsinu: 50 µg pepsinu/ml 0,01 M HCl; zásobní roztok pepsinu: 1 mg pepsinu/ml 3mM octanu draselného
- Mowiol/DAPI: 6 g glycerol; 2,4 g Mowiol 4.88 (Polysciences); 6 ml H<sub>2</sub>O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; 0,5 µg/ml DAPI (Sigma)
- 10x NT buffer : 0.5M Tris-HCl pH8.0; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mg/ml BSA
- H<sub>2</sub>O byla vždy destilovaná

### 4.3 Přístroje

- pH elektroda Theta 90, typ HC 103
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga MiniSpin® Plus (Eppendorf)
- Centrifuga Multi-Spin MSC-3000 (Biosan)
- Termocyklér Techne FTGRAD FD (Techne)
- Termocyklér PTC 100 (MJ Research Inc.)
- NanoDrop Spectrophotometer ND-100
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort)
- Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet International)
- UV Transluminátor TS-20E, 254 nm (UVP ČR)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Sonikátor 740 (Mettler electronics)
- Pulsní elektroforéza (Cheff mapper XA systém)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vodní lázeň Techne FTE 10DE (Techne)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1 (Ika Works)
- Vyhřevná ploténka (Vazas)
- Vyhřívavý blok Eppendorf ThermoStat Plus (Eppendorf)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus)

- CCD (Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation)
- Program pro zpracování obrazu ImageJ
- Program pro zpracování programu ACC Analyser 5.0

## 5. METODY

### 5.1 Izolace BAC DNA

#### 5.1.1 Příprava kultury

Připravila jsem si 1x LB médium tak, že jsem rozpustila 1 tabletu LB (Sigma Aldrich) v 50ml H<sub>2</sub>O a roztok nechala vysterilizovat v autoklávu. Následně jsem přidala antibiotikum chloramfenikol tak, aby jeho konečná koncentrace byla 12,5 µg/ml. Takto připravené médium se dá uchovávat při 4° C až několik měsíců.

96-ti jamkovou destičku s vybraným BAC klonem jsem vyjmula z mrazícího boxu těsně před inokulací kultury a pomocí špičky pipety jsem uvolnila malé množství, které jsem přenesla do zkumavky s 5 ml LB média.

Kulturu jsem kultivovala vždy přes noc (12 hodin) v termostatu při 37° C za stálého třepání.

#### 5.1.2 Izolace BAC DNA

Druhý den jsem bakterie centrifugovala rychlostí 12 000 rpm 20 minut při 4° C. Odstranila jsem supernatant a peletu resuspendovala v 1 ml GET-RNase pufru. Vzorek jsem nechala stát 5 minut na ledu a poté přidala 1 ml lyzačního pufru. Zkumavku jsem opatrně zamíchala převrácením (2 - 3x) a nechala ji inkubovat na ledu. Po 5-ti minutách jsem přidala opět stejný objem neutralizačního roztoku a pozorovala jsem, jak se lyzát sráží.

Sraženu jsem centrifugovala 40 minut rychlostí 12 000 rpm za teploty 4° C a poté jsem opatrně odebrala supernatant do nové zkumavky.

Roztok jsem srážela přidáním 2,1 ml isopropanolu a po 30ti minutách inkubace při teplotě -20° C jsem zkumavky centrifugovala 30 minut rychlostí 12 000 rpm za teploty 4°C.

Peletu jsem opláchla přidáním 1 ml 70% ethanolu a znovu centrifugovala 10 minut rychlostí 12 000 rpm. Peletu jsem rozpustila v 50µl H<sub>2</sub>O.

### 5.1.3 Kontrola BAC DNA

BAC DNA byla kontrolována na 1% agarózovém gelu s etidium bromidem (1 $\mu$ g/ml gelu) na který jsem nanesla směs 5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l DNA a 2  $\mu$ l 6x loading dye (Fermentas).

Elektroforéza probíhala v 1x TBE pufru po dobu 30 minut při napětí 100V. Výsledky jsem analyzovala pomocí transluminátoru při vlnové délce 254 nm a snímala CCD černobílou kamerou.

Pro ověření, zda jsem doopravdy izolovala BAC DNA jsem použila restriktázu Not I a následně vzorek nanesla na pulzní elektroforézu. BAC klony, se kterými jsem pracovala, obsahují dvě Not I. restriční místa (viz obr. 2 ), tudíž jsem očekávala, že na výsledném gelu z PFGE uvidíme dva proužky DNA, malý vektor a insert o velikosti okolo 120 kb.

#### Schéma reakce :

- 500ng BAC DNA
- 1  $\mu$ l Not I. restriktázy (Fast digest; Fermentas)
- 3  $\mu$ l 10x fast digest pufru
- doplnit H<sub>2</sub>O do 30  $\mu$ l

Zkumavku jsem nechala inkubovat 30 minut ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37° C. Reakci jsem zastavila pomocí 5 minutové inkubace při 80° C.

Připravila jsem si 1% agarózový gel, bez přidání EtBr. Na pulzní elektroforéze (Cheff mapper XA systém) jsem nastavila tyto údaje:

- molecular weight : 5kb -> 300kb
- initial switch time : 5 sekund
- final switch time: 30 sekund
- rampling faktor: 0,375

Cyklus pulzní elektroforézy trval 15 hodin a teplota 1x TBE pufru byla udržována na 15°C po celou dobu. Gel jsem nakonec obarvila vložení do vody s etidium bromidem (1 $\mu$ g/ml) na 30 minut a prohlédla pod UV lampou.

## 5.2 Příprava sondy

### 5.2.1 Příprava sondy metodou Nick translace

Nejdříve jsem rozpustila 3mg Dnázy I v 0.5 ml 0.3M NaCl, a přidala 0,5 ml glycerolu, tento zásobní roztok jsem uchovávala při teplotě -20° C.

Před každou Nick translací bylo nutné provést test Dnázy I, díky kterému jsem zjistila, jaké množství enzymu mám použít.

#### 5.2.1.1 Test Dnázy I

Těsně před začátkem manipulace jsem přidala 1 µl zásobního roztoku Dnázy I do 1ml ledově vychlazené vody.

#### Reakční směs pro Dnázy I:

- 2 µg BAC DNA
- 10 µl 10x NT- pufu
- 10 µl beta-mercaptoethanolu
- 1, 2.5 nebo 5 µl zředěného roztoku Dnázy I
- Doplnit vodou do 100 µl

Takto jsem připravila 3 zkumavky s různým množstvím Dnázy I a vše nechala inkubovat 2 hodiny při teplotě 15° C v termocykleru.

Po skončení inkubace jsem provedla elektroforetickou analýzu na dvouprocentním agarózovém gelu. Vybrala jsem takové množství enzymu, aby se výsledná velikost DNA fragmentů pohybovala mezi 100 a 500 bp.

#### 5.2.1.2 Nick translace

Test Dnázy I a samotnou Nick translaci bylo vždy nutné provést v ten samý den, kvůli možné degradaci naředěné DNázyI.

#### Reakční směs pro Nick translaci:

- 2 µg BAC DNA
- 10 µl 10x NT- pufu

- 10  $\mu$ l beta-mercaptoethanolu
- množství naředěné Dnázy I zjištěné při testu Dnázy I
- 10  $\mu$ l 10x zásobního roztoku nukleotidů
- 20 jednotek E.coli DNA polymerázy I.
- doplnit vodou do 100  $\mu$ l

Inkubace opět probíhala 2 hodiny v termocykleru při 15° C a velikost fragmentů byla otestována na agarózovém gelu, zda se pohybuje mezi 100 - 500 pb. Pokud byla velikost fragmentů příliš velká, přidala jsem 1  $\mu$ l zředěné Dnázy I a inkubovala další hodinu. V případě, že fragmenty byly příliš malé, bylo nutné celou nick translaci zopakovat za použití menšího množství Dnázy I.

Po ověření velikosti fragmentů jsem reakci zastavila přidáním 3  $\mu$ l 0,5M EDTA a 1  $\mu$ l 10% SDS a zahřátím 5 minut na 68 °C. Hotová sonda se přečistila pomocí kolonky Sephadex 25.

Některé sondy jsem připravila pomocí kitu Nick translation kit (Abbott). Používala jsem upravený protokol, který se liší zejména v doporučené koncentraci nukleotidů.

#### **Nukleotidový mix:**

- 2,5  $\mu$ l dATP (2,5 mM)
- 2,5  $\mu$ l dCTP (2,5 mM)
- 2,5  $\mu$ l dGTP (2,5 mM)
- 0,9  $\mu$ l dTTP (2,5 mM)
- 4  $\mu$ l Digoxigenin dUTP (1mM)
- 12,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

#### **Reakční směs pro Nick translaci:**

- 1  $\mu$ g BAC DNA
- 5  $\mu$ l dNTP mix
- 10x Nick translation buffer (součást kitu)
- 10  $\mu$ l Nick translation enzym (součást kitu)
- doplnit H<sub>2</sub>O do 50  $\mu$ l

Směs jsem zamíchala pomocí pipety a inkubovala po dobu 4 hodin v termocykleru při teplotě 15° C. Po skončení inkubace jsem reakci zastavila 10 minutovým zahřátím na 70°C .

Velikost fragmentů jsem opět zkontrolovala pomocí elektroforézy.

### **5.2.2 Random priming**

Některé sondy jsem připravila metodou náhodných primerů (random priming). K tomuto účelu jsem použila kit Decalabel DNA labeling kit (Fermentas).

#### **Schéma reakce pro random priming:**

- 10 µl random primeru v 5 x reakčním pufru
- 1 µg BAC DNA
- doplnit H<sub>2</sub>O do 42 µl

Obsah zkumavky jsem zamíchala a povařila 10 minut na vroucí vodní lázni a následně ochladila v ledové tříšti. Po centrifugaci jsem přidala:

- 5 µl non radioaktiv Labeling mix
- 1,75 µl Dig- 11- dUTP nukleotid (1mM)
- 1 µl Klenow fragment exo minus

Vše jsem zamíchala, zcentrifugovala a inkubovala 20 hodin v termocykleru při teplotě 30° C. Reakci jsem zastavila zahřátím zkumavky na 72° C po dobu 5-ti minut.

Hotovou sondu jsem přečistila precipitací isopropanolem. Ke vzorku jsem přidala 1/10 objemu octanu sodného a 0,7 objemu isopropanolu, zamíchala a centrifugovala při maximální rychlosti 30 minut. Poté jsem odebrala supernatant a peletu rozpustila v H<sub>2</sub>O.

Výslednou velikost fragmentů jsem zkontrolovala pomocí elektroforézy, s tím, že kvalitně připravená sonda se pohybuje v rozmezí 100 - 500 pb.

### 5.3 Southern blot

Za účelem kontroly inkorporace dig-11- dUTP v hotových sondách jsem provedla Southern blot.

Nejprve jsem nanesla 200 ng sondy do 2% agarózového gelu a elektroforézu nechala běžet 30 minut. Dále jsem gel přeblotovala na nitrocelulózovou membránu. Membrána a filtrační papír musely přesně vyhovovat rozměrům gelu. Přeblotování trvalo 1 hodinu s proudem 130 mA. Membránu jsem inkubovala 30 minut v TNB pufru a poté v protilátce (Antidogoxigenin- POD) 1000 x ředěné v TNB pufru po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace jsem membránu promyla 3 x 5 minut v 1x PBS.

Připravila jsem si roztok DAB tak, že jsem nejprve navázila 50 mg DAB do 100 ml H<sub>2</sub>O a směs zahřívala na kahanu až téměř k bodu varu. Po vychlazení jsem přidala 3 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Membránu jsem v roztoku inkubovala 30 minut, dokud nedošlo k obarvení sondy.

Výsledné zbarvení na membráně jsem poté porovnávala s fotografií gelu a stanovila velikost fragmentů a kvalitu sondy.

### 5.4 Izolace genomové DNA

Genomovou DNA jsem izolovala z pulců starých 3 týdny. Pulce jsem usmrtila pomocí 0,4% MS222 a po té je převedla do 15 ml PK pufru a rozstříhala na velmi malé kousky. Poté jsem přidala 75 µl 200x proteinázy K a kádinku nechala inkubovat ve vodní lázni 24 hodin při teplotě 50° C.

Po skončení inkubace jsem směs rozdělila do několika 15ml zkumavek a extrahovala z ní DNA fenol-chloroformovou metodou. Ke směsi jsem přidala stejný objem fenolu (pH 7,5 - 7,8) a zkumavky míchala nejdříve v ruce a poté na třepáče nejméně 10 minut. Následně jsem vzorky nechala centrifugovat 20 minut rychlostí 300 rpm při pokojové teplotě. Vodní fázi jsem přepipetovala do nové zkumavky a přidala ½ objemu chloroformu a ½ objemu fenolu. Opakovala jsem třepání a centrifugaci. K odebranému supernatantu jsem přidala 1x objem chloroformu a opět třepala a centrifugovala. Výsledný supernatant obsahující genomovou DNA jsem srážela přidáním 0,1 objemu octanu sodného a 0,7 objemu isopropanolu. Směs jsem centrifugovala rychlostí 14 000 rpm 20 minut za teploty 4° C. Odebrala jsem supernatant, peletu opláchla 2 ml 70% ethanolu a vzorek znovu stočila za stejných podmínek. Peletu jsem rozpustila v H<sub>2</sub>O.

Do zkumavky jsem přidala 10  $\mu$ l RNázy A (10mg/ml) a vše inkubovala 2 hodiny ve vodní lázni vyhřáté na 37° C. Enzymatickou reakci jsem inhibovala další fenol-chloroformovou extrakcí a výsledný supernatant jsem opět srážela pomocí octanu sodného a isopropanolu.

Koncentraci DNA jsem ověřila na nanodropu a 500  $\mu$ l jsem nanesla na elektroforézu.

## **5.5 Příprava buněk z tkáňové kultury**

### **5.5.1 Kultivace**

Buňky jsem kultivovala v kultivačních lahvích v 20 ml 2/3 XT média za stabilní teploty 28° C a koncentrace CO<sub>2</sub> 6 %.

Kultura byla pasážována jednou týdně a výměna média proběhla každé 2 - 3 dny.

### **5.5.2 Synchronizace**

Za účelem zhotovení preparátů s co největším obsahem mitóz jsem vyzkoušela několik způsobů synchronizace buněčné kultury. Nejvíce účinná byla metoda Serum starvation a metoda synchronizace za použití kolchicinu.

#### **5.5.2.1 Serum starvation**

Po posledním pasážování jsem nechala buňky růst a přisednout na dno kultivační lahve. Druhý den jsem odebrala médium, láhev 3x propláchla v PBSa a doplnila L15 médium, které obsahovalo pouze 0,2 % BSE. Další den ráno jsem odsála staré médium a nahradila jej L15 médiem s obsahem 10 % BSE. Buňky jsem nechala růst 6 hodin a posléze sebrala za účelem přípravy buněčných preparátů pro FISH.

#### **5.5.2.2 Synchronizace pomocí kolchicinu**

Do kultivační lahve jsem přidala roztok kolchicinu tak, aby jeho výsledná koncentrace činila 0,2  $\mu$ g/ ml.. Kolchicin jsem nechala působit 4,5 hodiny v termostatu a poté jsem médium v každé lahvi vyměnila za 5 ml 10x ředěného roztoku trypsin/EDTA v 2/3 PBS.

Pod inverzním mikroskopem jsem kontrolovala, zda jsou buňky stále přisedlé ke dnu lahve. Po jejich uvolnění jsem reakci zastavila přidáním 5 ml čerstvého média.

### **5.5.3 Příprava buněk pro metafázní spready**

Suspensi sebranou do 15ml zkumavek jsem centrifugovala 10 minut rychlostí 900 rpm v centrifuze vychlazené na teplotu 4° C. Odebrala jsem supernatant a peletu buněk jsem promyla 10 ml 2/3 PBS. Poté jsem centrifugaci opakovala a sediment jsem opatrně resuspendovala v 2 ml izotonického roztoku pro *Xenopus tropicalis*. Následně jsem po stěně pomalu přidala 3,26 ml H<sub>2</sub>O (hypotonizace 40 mmol). Obsah zkumavky jsem promíchala opatrným převrácením (2 - 3x) a nechala inkubovat 20 minut při pokojové teplotě.

Buňky jsem fixovala pomocí fixáže metanol: kyselina octová v poměru 3:1. Suspenzi jsem vždy míchala probubláváním Pasteurovou pipetou. Po 10 minutové inkubaci jsem buňky centrifugovala 10 minut rychlostí 900 rpm za teploty 4° C.

Cyklus fixace jsem celkem opakovala 3x, pokaždé s novou fixází. Nakonec jsem odebrala supernatant tak, abych dosáhla požadované koncentrace buněk pro nakapání.

Suspensi buněk lze uchovávat poměrně dlouhou dobu při teplotě -20° C, je ovšem nutné pravidelně měnit fixáž.

## **5.6 FISH**

### **5.6.1 Příprava metafázích spreadů**

Na čistá, odmaštěná podložní sklíčka jsem pipetou s ustríženou špičkou kápala suspenzi buněk z výšky cca 10 cm. Preparát jsem položila na ploténku vyhřátou na 37° C a čekala, až se téměř celá fixáž odpařila. Jakmile jsem na sklíčku zpozorovala tzv. „sandy surface“ (oblast vypadá, jako by byla posypaná pískem), vložila jsem preparát na 2 sekundy do kyvety obsahující 50% kyselinu octovou. Díky tomuto kroku je odstraněn zbytek cytoplasmy.

Jedno kontrolní sklo jsem poté 10 minut barvila 5% Giemsou za účelem zjištění počtu mitóz.

Takto připravené preparáty se dají uchovávat až několik let při teplotě -20° C.

### **5.6.2 FISH – první den**

Připravila jsem si 2% roztok paraformaldehydu rozpuštěním 4 g práškového paraformaldehydu ve 200 ml 1x PBS. Vzniklou suspenzi jsem zahřívala ve vodní lázni vyhřáté na 65°C po dobu 1,5 hodiny. Poté jsem přidala 5 kapek 10M NaOH a počkala ještě 10 minut do úplného rozpuštění. Roztok jsem nechala vychladit na pokojovou teplotu, přefiltrovala přes filtrační papír a nakonec jsem upravila pH na hodnotu 7,3 - 7,4 pomocí HCl. Vzniklý roztok se dá uchovávat při teplotě 4° C až 3 týdny.

Následovala příprava roztoku pepsinu Do 47,5 ml destilované vody jsem přidala 43 µl koncentrované HCl. Vzniklou 0,01M HCl jsem nechala předehřát ve vodní lázni na teplotu 37° C. Připravila jsem zásobní roztok pepsinu o koncentraci 1 mg/ml navážením 3 mg práškového pepsinu do 3ml 3mM roztoku octanu draselného . K předehřáté 0,01M HCl jsem přidala 2,5 ml zásobního roztoku pepsinu a vše nechala 5 minut vytemperovat.

Preparáty jsem do roztoku pepsinu vkládala v 10 sekundových intervalech a po 5 minutách ve stejném pořadí vyjmula. Působení enzymu jsem ukončila ponořením skel do 1x PBS a skla ještě jednou promyla 5 minut v 1x PBS ve velké Petriho misce na třepačce.

Poté jsem preparáty postfixovala po dobu 30 minut v kyvetě naplněné 2% paraformaldehydem a po ukončení postfixace je opět promyla 3 x 5 minut v 1x PBS za stálého třepání.

Následně jsem skla opláchla destilovanou vodou a dehydratovala v postupné řadě methanolu nebo ethanolu (70%, 90%, 100%), pokaždé po dobu 3 minut. Nakonec jsem preparáty nechala uschnout na vzduchu.

#### **5.6.2.1 Denaturace a hybridizace sondy s chromozómy**

Používala jsem dva způsoby denaturace. V prvním případě jsem nechala sondu a podložní skla denaturovat společně (simultánní denaturace), v druhém případě jsem chromozomální preparáty a sondy denaturovala zvlášť (oddělená denaturace).

##### **5.6.2.1.1 Simultánní denaturace**

Připravila jsem si 50 µl hybridizační směsi pro každý preparát, která obsahovala:

- 25 µl deionizovaného formamidu
- 5 µl 20x SSC

- 500 ng sondy
- injekční H<sub>2</sub>O doplnění do 50 µl
- 1 µl kompetitoru (500 ng)

Vzniklou směs jsem nanasla na preparáty, přikryla krycím sklem a denaturovala v termocykleru s plotýnkovým modulem 5 minut při teplotě 70° C.

Preparáty jsem poté vložila do vlhké komůrky se 30 ml 50% formamidu a inkubovala přes noc v termostatu při 37° C.

#### **5.6.2.1.2 Oddělená denaturace**

Ve vodní lázni jsem nechala předeřhát 70% deionizovaný formamid ve 2x SSC na teplotu 72 ° C. Poté jsem preparáty začala vkládat v 10-ti sekundových intervalech a po 2 minutách je ve stejném pořadí vyjmula. Skla jsem poté dehydratovala 5 minut ve vzestupně řadě ledově vychlazeného ethanolu (70%, 90%, 100%) a nechala uschnout na vzduchu. Sondu jsem před vlastní denaturací precipitovala pomocí isopropanolu.

#### **Schéma reakce pro precipitaci sondy:**

- 500 ng sondy
- 10 % objemu 3M octanu sodného
- 1x objem isopropanolu

Vzniklou směs jsem centrifugovala při maximální rychlosti 20 minut za teploty 4° C, odstranila supernatant a peletu rozpustila v 70% deionizovaném formamidu.

Směs jsem nanasla na suché denaturované preparáty, vše přikryla krycím sklem inkubovala přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C.

#### **5.6.3 Promývání skel**

Druhý den jsem si připravila 50% formamid ve 2 x SSC, pH = 7,0 do 3 kyvet po 50ml a vše předeřhala na teplotu 42° C ve vodní lázni.

Preparáty jsem vyjmula z vlhké komůrky a promývala je v každé z kyvet 5 minut.

Preparáty jsem dále promyla 3 x 5 minut v 2x SSC a 1x 5 minut v 1x TNT pufru ve velké Petriho misce za stálého třepání.

Poté jsem na preparáty aplikovala á 1 ml TNB pufru a inkubovala cca 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubace jsem TNB pufr ze skel

slila a nanasla na ně á 1 ml 200x ředěné protilátky (Anitdigoxigenin Rhodamin Fab ) v TNB pufru. Inkubace proběhla po dobu 1 hodiny opět ve vlhké komůrce při pokojové teplotě.

Následně jsem skla opláchla z obou stran Pasteurovou pipetou 3 x v TNT a 3 x 5 minut v 1x TNT ve velké Petriho misce za třepání. Preparáty jsem opláchla stříčkou s destilovanou vodou a nakonec promyla 3 minuty v destilované H<sub>2</sub>O opět v Petriho misce. Po uschnutí preparátů na vzduchu jsem na každé sklo nanasla 30  $\mu$ l montovacího média s DAPI (Intimex) a ihned pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem nebo uložila do 4° C.

#### **5.6.4 Pozorování signálu**

Hotové preparáty jsem prohlížela pod fluorescenčním mikroskopem. Obrazy jsem snímala CCD černobílou kamerou a pokaždé vyfotila zvlášť metafázní chromozómy a zvlášť FISH signál. Konečnou úpravu a proložení snímků jsem prováděla pomocí programu ImageJ a ACC Image Analyzer 5.0.

#### **5.6.5 Analýza obrazu**

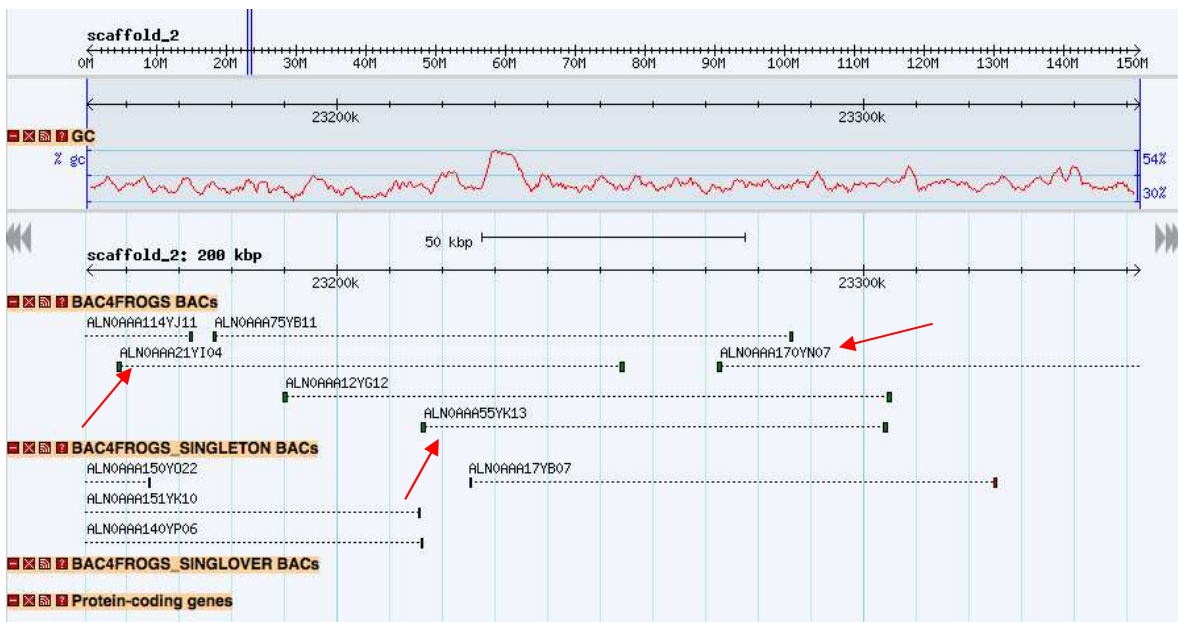
Každý chromozóm jsem identifikovala na základě poměru p a q ramen. Pozici signálu jsem určila na základě RCD (Relative Centromere Distance), což je relativní vzdálenost od centromery vzhledem k délce celého ramena. Každý signál jsem hodnotila na minimálně 6-ti různých mitózách a z hodnot RCD vypočítala aritmetický průměr a směrodatnou odchylku.

K měření RCD jsem použila program ACC Image Analyzer 5.0 a získaná data jsem zpracovala v programu Microsoft Excel.

## 6. Výsledky

### 6.1 Výběr vhodných BAC klonů

Celkové množství BAC klonů mapujících krátké raménko chromozomu 2 u *Xenopus tropicalis* je podle databáze JGI 1714. Každý z nich jsem zobrazila ve webové aplikaci <http://platform-gbrowser.issb.genopole.fr> a vybrala celkem 346 nejvýhodnějších, které pokrývají danou oblast. Vybírala jsem takové klony, které byly pokud možno dostatečně dlouhé, měly známé obě koncové sekvence a nepřekrývaly se více než z 10 % (viz obr. 3).

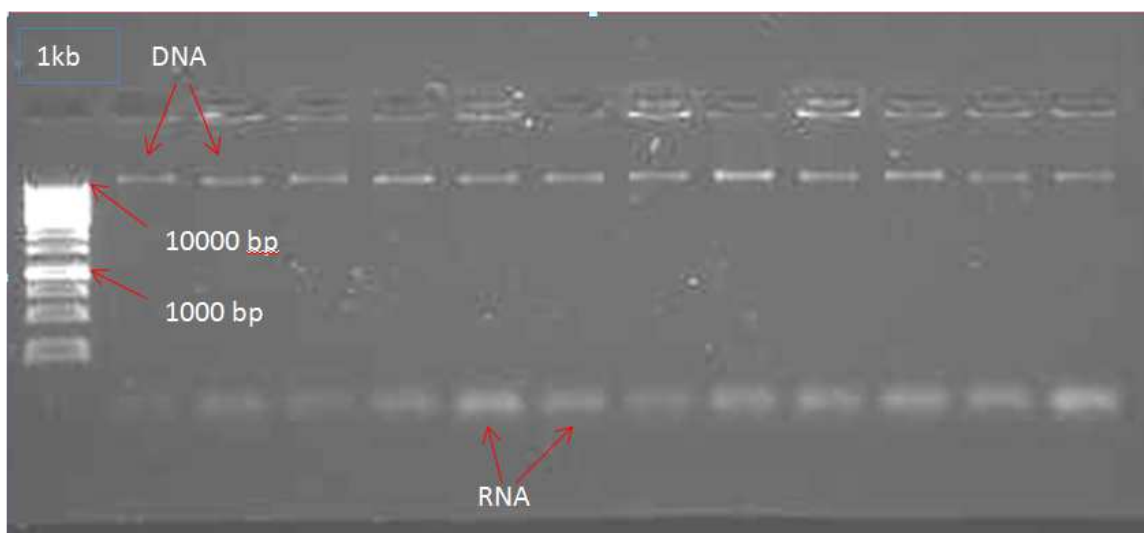


**Obr. 3** Příklad výběru vhodných BAC klonů. Červené šipky ukazují na vybrané BAC klony. BAC4FROGS BACs jsou ty klony, u kterých jsou sekvenované oba dva konce. BAC4FROGS\_Singleton BACs jsou klony s pouze jedním osekvenovaných koncem. Obrázek převzat z aplikace <http://platform-gbrowser.issb.genopole.fr>.

Všech 346 klonů jsem postupně naočkovala do čtyř 96-ti jamkových destiček a takto jsem zhotovila ještě další 2 kopie.

## 6.2 Izolace BAC DNA

Jedním z cílů mé diplomové práce bylo upravit a zavést funkční protokol pro izolaci BAC DNA. Nejprve jsem vybrala 12 náhodných BAC klonů a pokračovala jsem v izolaci podle základního protokolu, který je uveden v kapitole č. 5 Metody. Vzorek DNA jsem nanasla na 1% agarózový gel (viz obr. 4).



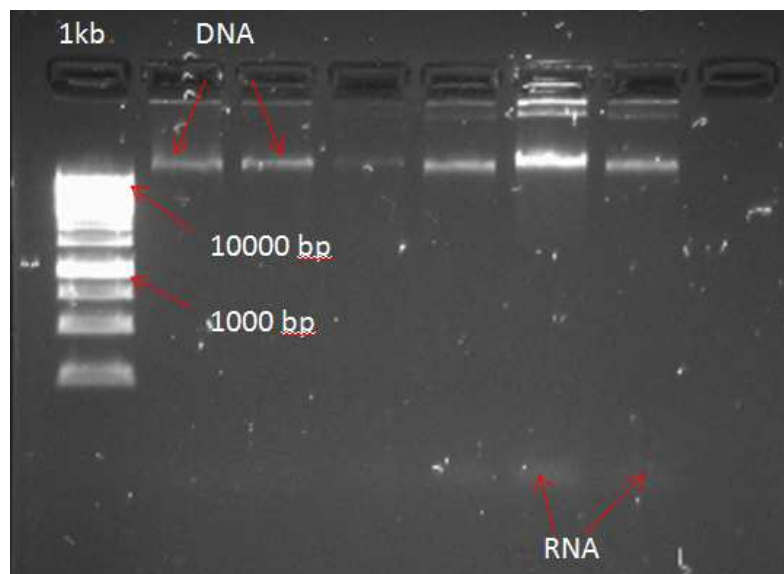
**Obr. 4** Elektroforetická analýza BAC DNA. DNA byla izolována z 12-ti náhodných BAC klonů za účelem optimalizace protokolu. Na fotografii je patrný zvýšený výskyt RNA.

Na fotografii gelu můžeme vidět, že vzorky obsahují velké množství RNA, což je nežádoucí, a proto bylo nutné zařadit při další izolaci BAC DNA krok, který by snížil obsah RNA ve vzorku.

### 6.2.3 Úprava protokolu za účelem snížení obsahu RNA

Stejně kontrolní BAC klony, jako v předchozím experimentu jsem kultivovala nejprve 8 hodin v 2ml prekultuře a poté v kultuře 5 ml 1xLB média přes noc. Druhý den jsem bakterie centrifugovala 15 minut rychlostí 2000 g při teplotě 4° C. Peletu jsem resuspendovala v 5 ml ledově vychlazené H<sub>2</sub>O a opět stočila za stejných podmínek.

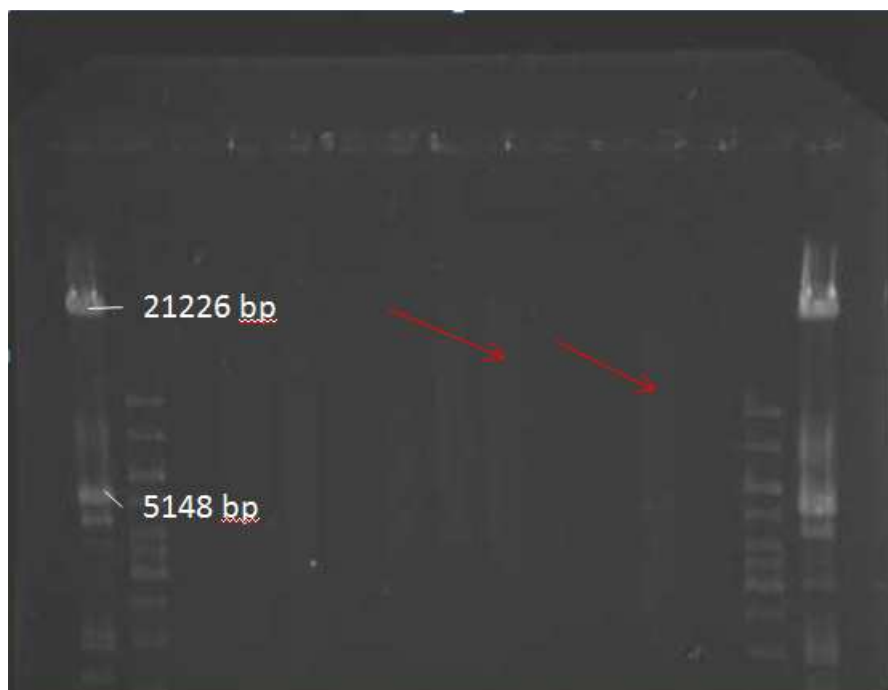
Do GET/RNase pufru jsem přidala RNázuT<sub>1</sub> tak, aby její finální koncentrace byla 2U/ml. Dále jsem pokračovala podle protokolu z předchozího experimentu. Peletu DNA jsem rozpustila v 50μl H<sub>2</sub>O. Vzorek DNA jsem nanasla na 1% agarózový gel (viz obr. 5).



**Obr. 5** Elektroforetická analýza BAC DNA. DNA byla izolována ze 6-ti náhodných BAC klonů za účelem optimalizace protokolu pro izolaci BAC DNA. Z fotografie je patrné, že množství RNA se po úpravě původního protokolu významně snížilo.

Z obrázku je patrné, že množství RNA obsaženého ve vzorcích již není vysoké a proto jsem začala používat RNázuT<sub>1</sub> při nadcházejících extrakcích.

Důležitým krokem protokolu bylo potvrzení, že izolovaná DNA pochází z BAC klonu a nejedná se o bakteriální genomovou DNA. Tento test jsem provedla restriční endonukleázou Not I. Reakci jsem poté nanasla na gel pulzní elektroforézy (viz obr. 6).



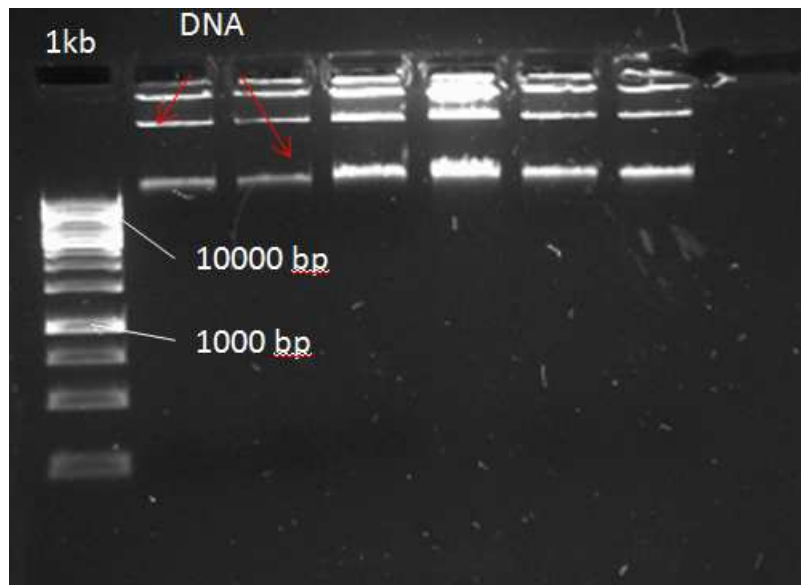
**Obr. 6** BAC DNA nanosená na PFGE. Na 12-ti náhodných BAC DNA byla provedena Not I restrikce, vzorek byl nanesen na pulzní elektroforézu. Na obrázku nevidíme očekávané dva proužky DNA, malý vektor a insert o velikosti kolem 120 kbp., ale pouze smír, na který ukazují červené šipky.

Na fotografii gelu nelze pozorovat očekávané dva proužky DNA, insert o velikosti 120 kb a menší vektor, ale pouze smír. Z tohoto důvodu se s největší pravděpodobností jedná o bakteriální genomovou DNA.

### **6.2.3. Izolace BAC DNA za použití kolony**

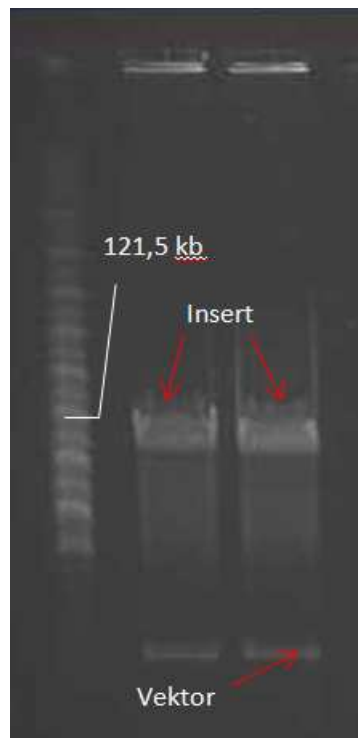
Prekulturu jsem kultivovala opět v 5 ml 1xLB média a kulturu ve 100 ml 2x LB. Oproti předchozímu protokolu jsem nechala supernatant před srážením protéct kolonou (Qiagen plasmid midi kit), která funguje na principu výměny anionů. Na kolonu jsem 2x nanesla 12 ml promývacího roztoku, který je součástí kitu.

Při eluaci je velmi důležité eluační roztok nahřát na teplotu 60° C a celé množství (5ml) rozdělit na 5 x 1ml, aby nedošlo k ochlazení pufru a následným ztrátám. Eluát jsem srážela klasicky za použití octanu sodného a isopropanolu a po centrifugaci rozpustila peletu v 50µl H<sub>2</sub>O. Vzorek DNA jsem nanesla na 1% agarózový gel (viz obr. 7).



**Obr. 7** Elektroforetická analýza BAC DNA. DNA izolovaná ze 6ti náhodných klonů byla izolována pomocí kolonky. Na fotografii vidíme tři proužky DNA pravděpodobně odpovídající třem možným konformacím kruhové DNA (CCC, lineární a OC konformace).

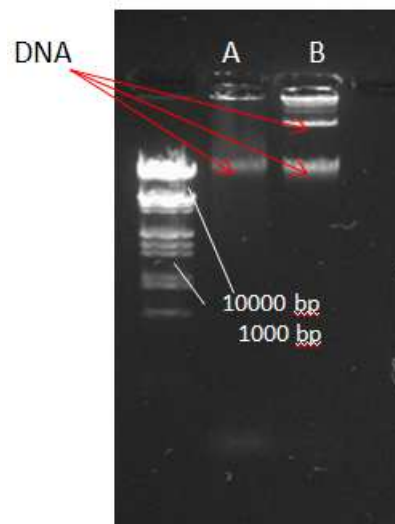
Na dvou vzorcích jsem provedla Not I restrikci a vzorek nanesla na pulzní elektroforézu (viz obr. 8).



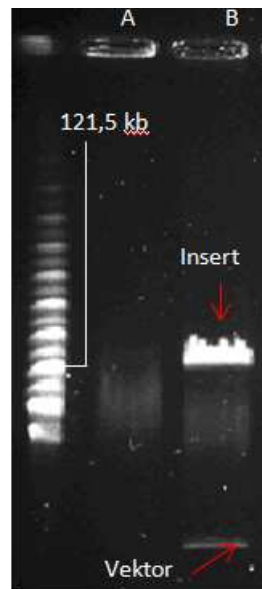
**Obr. 8** BAC DNA po Not I restrikci nanesená na PFGE. Červené šipky ukazují na očekávané 2 proužky DNA, potvrzující, že testovaná DNA je doopravdy BAC původu.

Na fotografii vidíme dva očekávané proužky DNA, 120kb velký insert a menší vektor. Můžeme tedy s jistotou říct, že vyizolovaná DNA je BAC původu.

Pro srovnání jsem nanesla na 1% agarózový gel BAC DNA, která byla izolována metodou bez kolonky a stejný BAC připravený pomocí kolonky (viz obr. 9). Poté jsem provedla Not I restrikci a PFGE (viz obr. 10).



**Obr. 9** Elektroforetická analýza BAC DNA. DNA z jednoho BAC klonu byla izolována bez kolonky (A) a za pomoci kolonky (B).



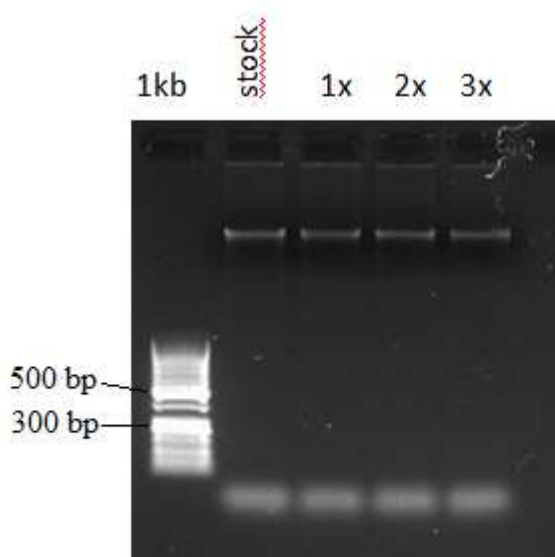
**Obr. 10** BAC DNA na PFGE po Not I. restrikci. DNA izolovaná bez kolonky (A), DNA izolovaná za použití kolonky Qiagen plasmid midi kitu (B).

## 6.3 Příprava kompetitorové DNA

Genomovou DNA jsem izolovala technikou popsanou v kapitole č. 5 Metody. Výslednou koncentraci DNA jsem upravila na hodnotu 500 ng/μl.

### 6.3.1 Příprava kompetitoru pomocí injekční jehly

1 ml roztoku genomové DNA jsem 3 x nasála a vytlačila pomocí injekční stříkačky osazené jehlou G-25. Po každém nasátí jsem odebrala vzorek pro nanesení na agarózový gel (Obr. 11).



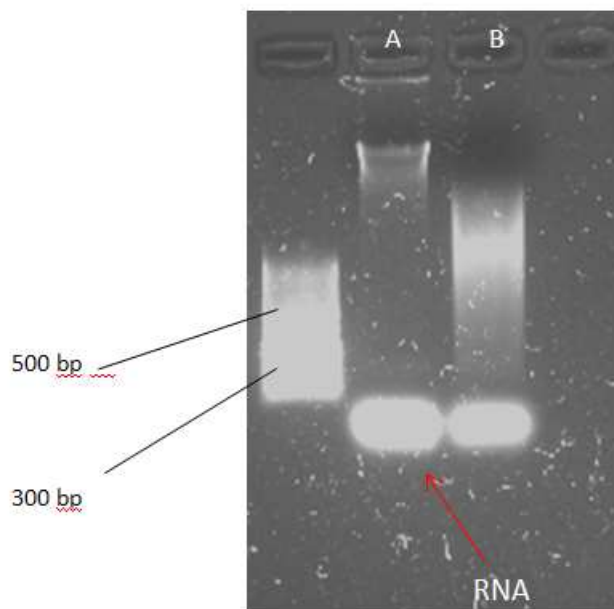
**Obr. 11** Elektroforetická analýza přípravy kompetitoru. Do první jamky byl nanesen 1kb DNA marker, do druhé genomová DNA, která nebyla využita pro přípravu kompetitoru, a do zbylých jamek DNA, která byla protažena jehlou 1 - 3x.

Ideální velikost kompetitoru by se měla pohybovat v rozmezí 300 - 500 bp, z fotografie gelu je ovšem patrné, že tato metoda je nevyhovující.

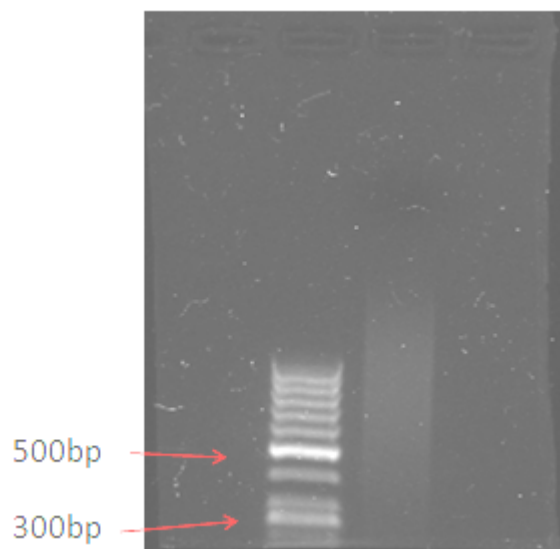
### 6.3.2 Sonikace DNA

Genomovou DNA jsem sonikovala 30 sekund sonikátorem (Sonikátor 740 ; Mettler electronics) nastaveným na intenzitu 10 %. Po nanesení na 2% agarózový gel (viz obr. 12) bylo zřejmé, že smír DNA nemá požadovanou velikost (300 - 500 bp). Přidala jsem tedy dalších 2 x 30 sekund sonikace a zjistila velikost fragmentů pomocí elektroforézy (viz obr. 13 ). Ani tentokrát nebyla velikost kompetitoru dostačující, a proto jsem

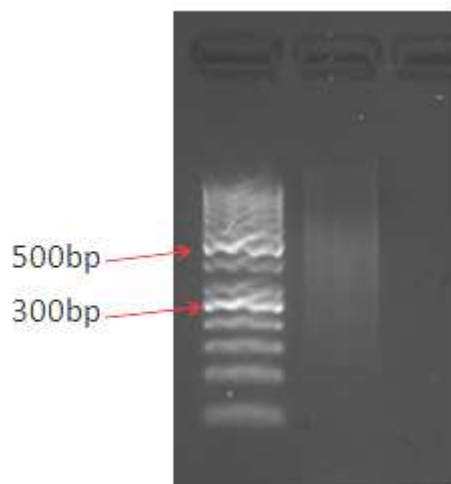
nastavila sonikátor na intenzitu 16 % a sonikovala DNA dalších 3 x 30 sekund. Opět jsem provedla elektroforetickou analýzu (viz obr. 14 ) a tentokrát měly fragmenty DNA vyhovující velikost kolem 500 bp.



**Obr. 12** Elektroforetická analýza genomové DNA během přípravy kompetitoru. Genomová DNA před sonikací (A) a po sonikaci 30 sekund sonikátorem nastaveným na hodnotu 10 % (B).



**Obr. 13** Elektroforetická analýza genomové DNA během přípravy kompetitoru. Po sonikaci 3x 30 sekund sonikátorem nastaveným na hodnotu 10% jsou fragmenty DNA stále příliš velké.



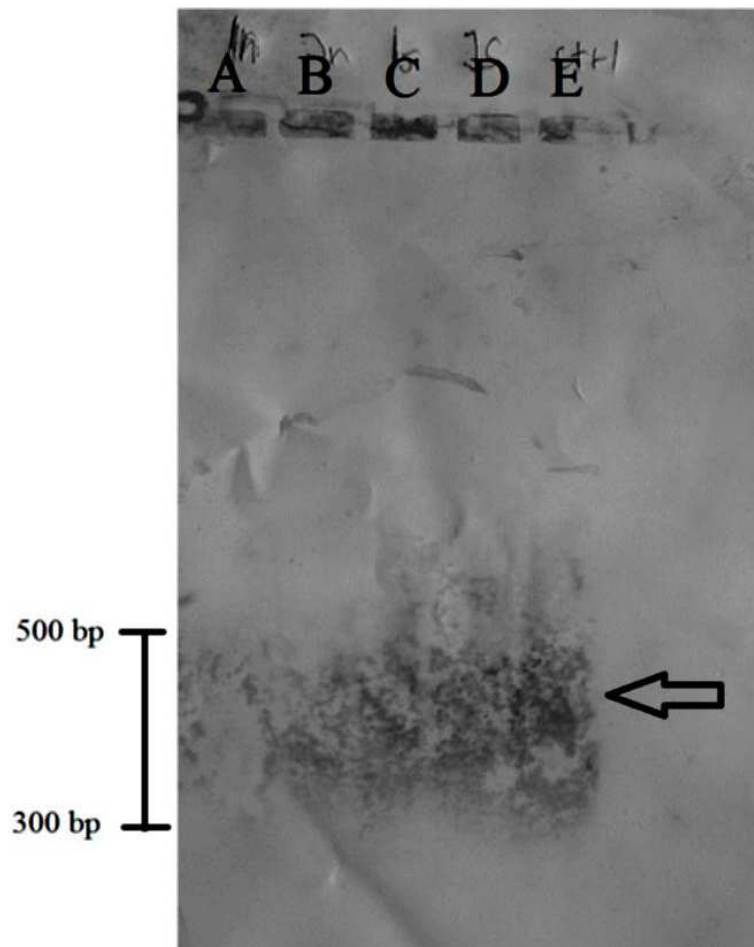
**Obr. 14** Elektroforetická analýza genomové DNA sonikované 30 sekund sonikátorem nastaveným na hodnotu 16%. Z fotografie gelu je zřejmé, že velikost fragmentů se pohybuje kolem 500 bp.

Takto připravený kompetitor jsem rozdělila do několika zkumavek a zamrazila.

#### **6.4 Značení sondy**

Sondy jsem připravovala metodou Nick translace nebo metodou náhodných primerů (Random priming) za použití dig-11-dUTP (viz kapitola č. 5 Metody). Mým cílem bylo zjistit, jaká z těchto značících technik nejvíce vhodná pro přípravu BAC DNA sondy.

Abych zjistila, která metoda poskytuje kvalitnější sondu, použila jsem obě dvě metody ke značení stejné kontrolní BAC DNA. Stupeň inkorporace dig-11-dUTP jsem vizualizovala pomocí Southern blotu (viz obr. 15).



**Obr. 15** Snímek nitrocelulosové membrány z navázanou značenou DNA sondou. Na pozici A a B vidíme sondu připravenou metodou náhodných primerů a na pozici C- E sondu syntetizovanou pomocí nick translace. Na pozici A a C se nachází sonda připravená ze stejné DNA, stejně tak na pozici B a D. Na pozici E vidíme úspěšně testovanou kontrolní sondu syntetizovanou metodou nick translace, která poskytla kvalitní signál po FISH.

Při porovnání intenzity zbarvení DNA směru na fotografii nitrocelulózové membráně je patrné, že sondy na pozici A a B vykazují nižší intenzitu zbarvení a tudíž obsahují menší množství inkorporovaného dig- 11- dUTP, než v případě sond na pozici C - E. Kvalitu sondy bylo ještě třeba ověřit pomocí Fluorescenční *in situ* hybridizace (viz kapitola 6.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace).

## 6.5 Synchronizace buněčné kultury

Buněčnou kulturu jsem synchronizovala pomocí kolchicinu a metodou Serum starvation. Za účelem porovnání obou postupů jsem nakapala na sklíčka suspenzi buněk, které jsem synchronizovala buď jedním či druhým způsobem a porovnála počty mitóz na 6-ti různých preparátech. Před nakapáním jsem zředila buňky na stejnou denzitu a nakapávala je na podložní skla pomocí pipetmana s 1 ml špičkou.

Průměrně se na sklíčkách s buňkami synchronizovanými kolchicinem vyskytovalo 36 mitóz (viz tab. 1) a na sklíčkách s buňkami synchronizovanými metodou serum starvation 24 mitóz (viz tab. 2).

Č. sklíčka	Synchronizace A	Synchronizace B	Synchronizace C
1	42,00	45,00	29,00
2	39,00	39,00	33,00
3	31,00	42,00	35,00
4	43,00	38,00	31,00
5	35,00	34,00	37,00
6	39,00	41,00	28,00
Průměr	38,17	39,83	32,17
Průměr celkem		36,72	

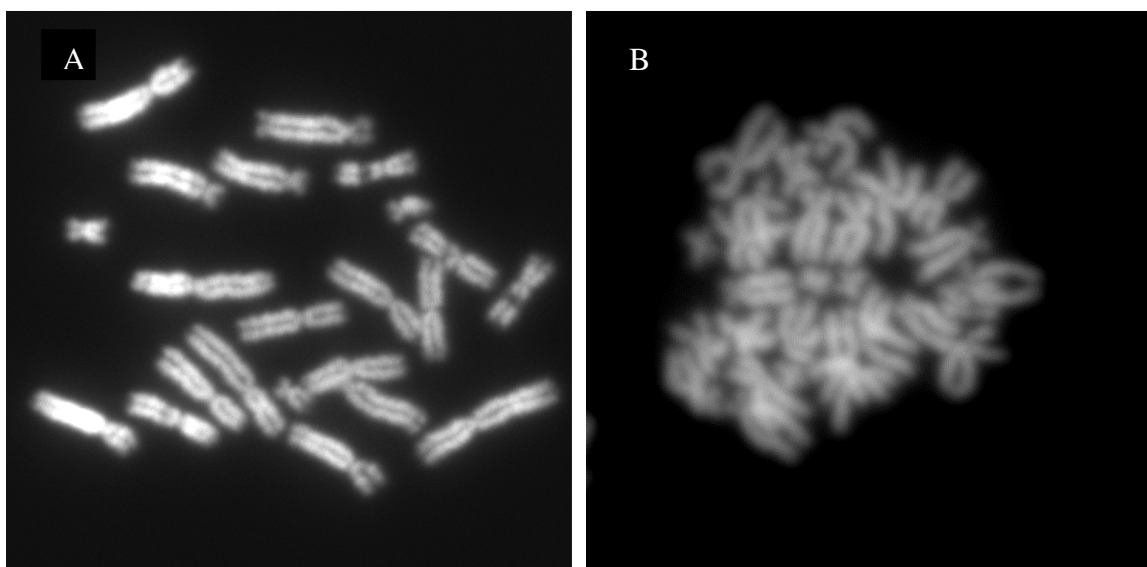
**Tab. 1** Počet mitóz na 6ti sklíčkách v rámci 3 na sobě nezávislých synchronizacích buněčné kultury kolchicinem.

Č.sklíčka	Synchronizace A	Synchronizace B	Synchronizace C
1	31	25	21
2	29	22	18
3	29	19	24
4	31	28	25
5	27	18	17
6	31	20	22
Průměr	24,44	22	21,1667
Průměr celkem		24,27	

**Tab. 2** Počet mitóz na 6ti sklíčkách v rámci 3 na sobě nezávislých synchronizací buněčné kultury metodou serum starvation.

Za účelem ověření významnosti obou průměrů jsem provedla T-test s výsledkem  $8,905 \cdot 10^{-10}$ . Můžeme tedy říci, že rozdíl středních hodnot obou souborů je statisticky signifikantní. Z hodnot průměrů vyplývá, že synchronizace buněk pomocí kolchicinu je výhodnější jednak kvůli úspoře času a také kvůli kvalitě a množství mitóz na sklíčku.

Při obarvení preparátů pomocí DAPI bylo možné sledovat rozdíl i ve vzhledu metafázních chromozómů (viz obr. 16).



**Obr. 16** Srovnání vzhledu metafázních chromozómů. Na obrázku A jsou chromozómy buněk synchronizovaných kolchicinem (A) a na obrázku (B) potom buňky synchronizované metodou serum starvation .

Při porovnání vzhledu mitóz je patrné, že chromozómy buněk synchronizovaných kolchicinem jsou zpravidla rozmístěny rovnoměrně a ve větší vzdálenosti, než chromozómy buněk po serum starvation u nichž byl problém najít na sklíčku chromozómy rozloženy dále od sebe. Při synchronizaci buněk pro fluorescenční hybridizaci *in situ* jsem tedy používala kolchicin.

## 6.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Při úpravě protokolu jsem vycházela z postupu popsáním v kapitole č. 5 Metody.

Bylo třeba vyzkoušet, která metoda denaturace je pro BAC FISH nejvhodnější a jaké množství sondy a kompetitoru použít.

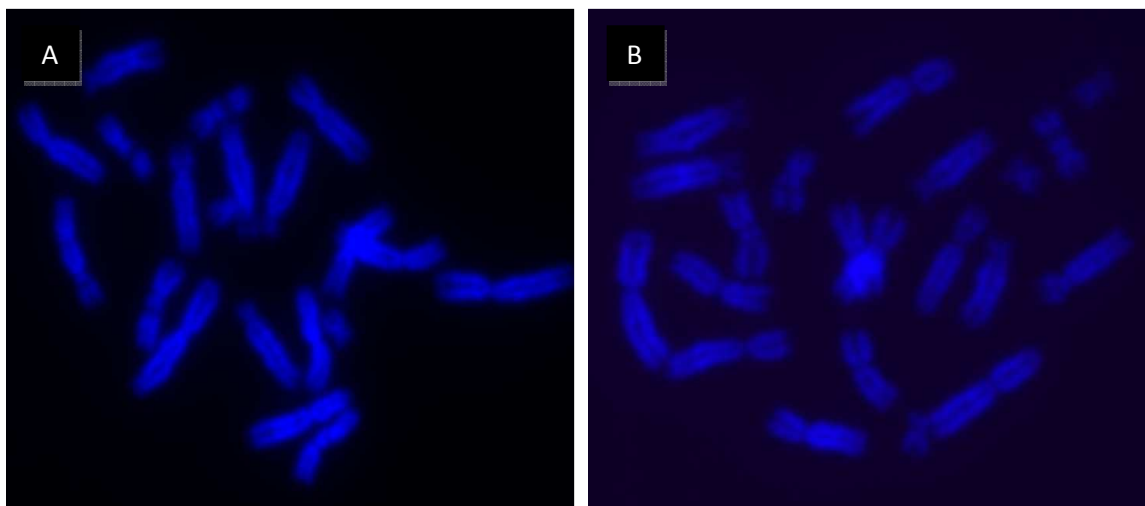
### 6.6.1 Simultánní denaturace sondy s metafázemi spready

Vyzkoušela jsem několik kombinací koncentrací kompetitoru a sondy, která byla syntetizována Nick translací nebo metodou náhodných primerů (viz tab. 3.).

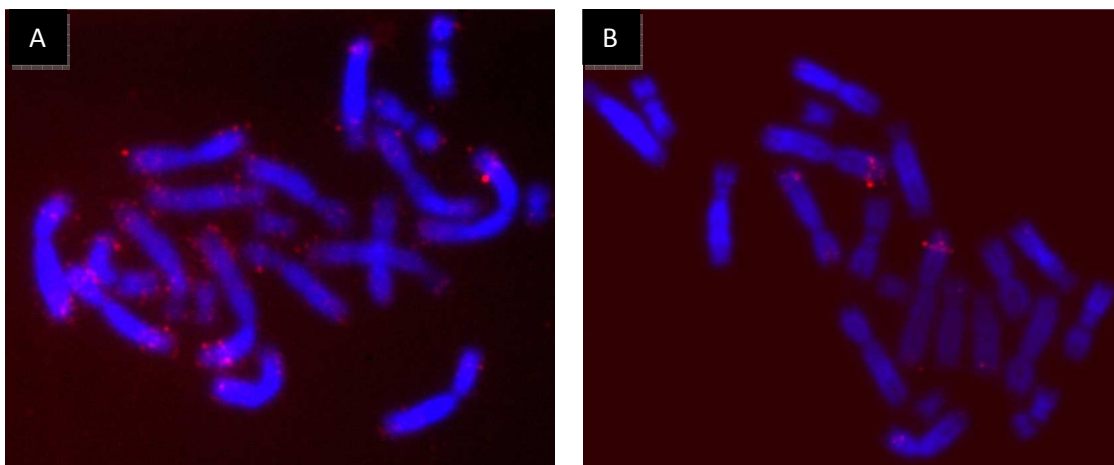
Chromozómy a sondu jsem denaturovala společně v cykleru s plotýnkovým modulem (viz obr. 17 a 18).

Č. kombinace	Sonda (random priming)	Sonda (Nick translation)	Kompetitor
1	200 ng	-	200 ng
2	500 ng	-	500 ng
3		200 ng	200 ng
4	-	500 ng	500 ng

**Tab 3.** Kombinace koncentrací sondy a kompetitoru použitých při optimalizaci protokolu



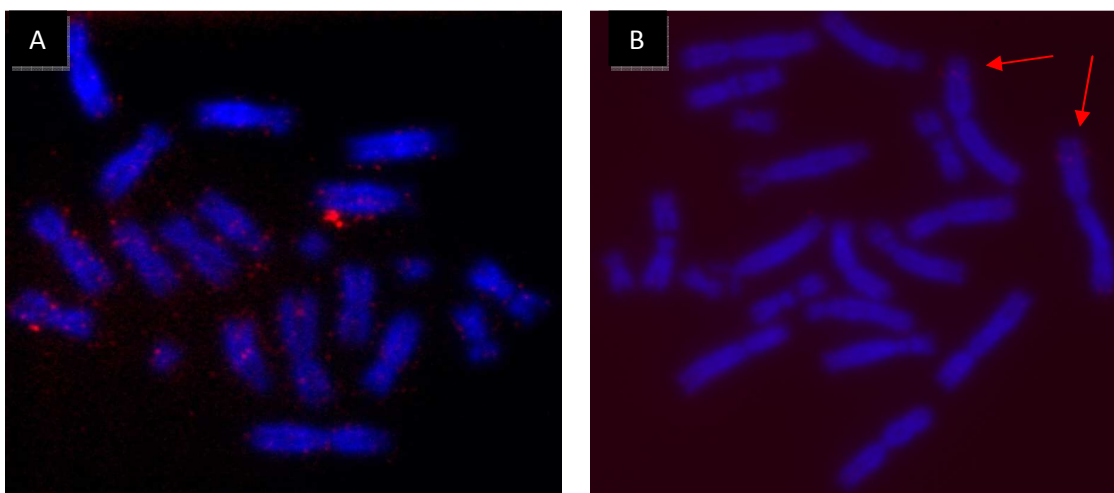
**Obr. 17** Komposit snímků chromozómů obarvených pomocí DAPI (modrá barva) a specifického FISH signálu sondy. Sonda a chromozómy byly denaturovány společně. V obou případech byla použita sonda připravená metodou náhodných primerů. Na obrázku A jsem použila 200 ng sondy a 200 ng kompetitoru, na obrázku B pak 500 ng sondy a 500 ng kompetitoru. Ani v jednom případě není specifický signál sondy patrný.



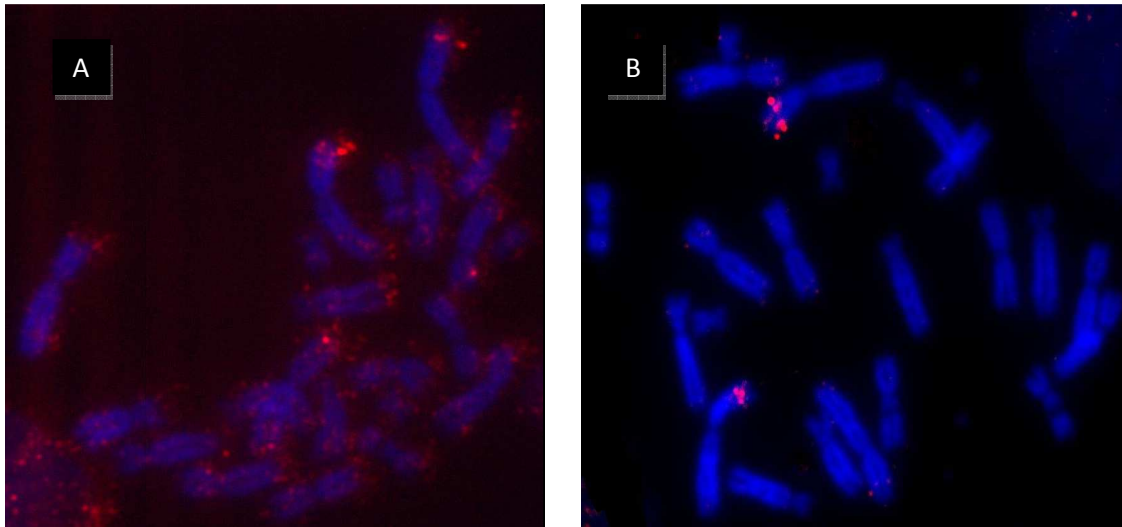
**Obr. 18** Komposit snímků chromozómů obarvených pomocí DAPI (modrá barva) a specifického FISH signálu sondy (červená barva). Sonda a chromozómy byly denaturovány společně. V obou případech byla použita sonda připravena metodou nick translace. NA obrázku A jsem použila 200 ng sondy a 200 ng kompetitoru, na obrázku B pak 500 ng sondy a 500 ng kompetitoru.

### 6.6.2 Oddělená denaturace sondy a metafázích spreadů.

Sérii experimentů jsem zopakovala ještě jednou (viz tab. 3), ale tentokrát jsem denaturovala chromozómy a sondu zvlášť (viz obr. 19 a 20).



**Obr. 19** Komposit snímků chromozómů obarvených pomocí DAPI (modrá barva) a specifického FISH signálu sondy (červená barva). Sonda a chromozómy byly denaturovány odděleně. V obou případech byla použita sonda připravena metodou náhodných primerů. NA obrázku A jsem použila 200 ng sondy a 200 ng kompetitoru, na obrázku B pak 500ng sondy a 500ng kompetitoru. Na obrázku A je vidět silné pozadí, ale ne specifický signál sondy, na obrázku B se vyskytuje velmi slabý signál.

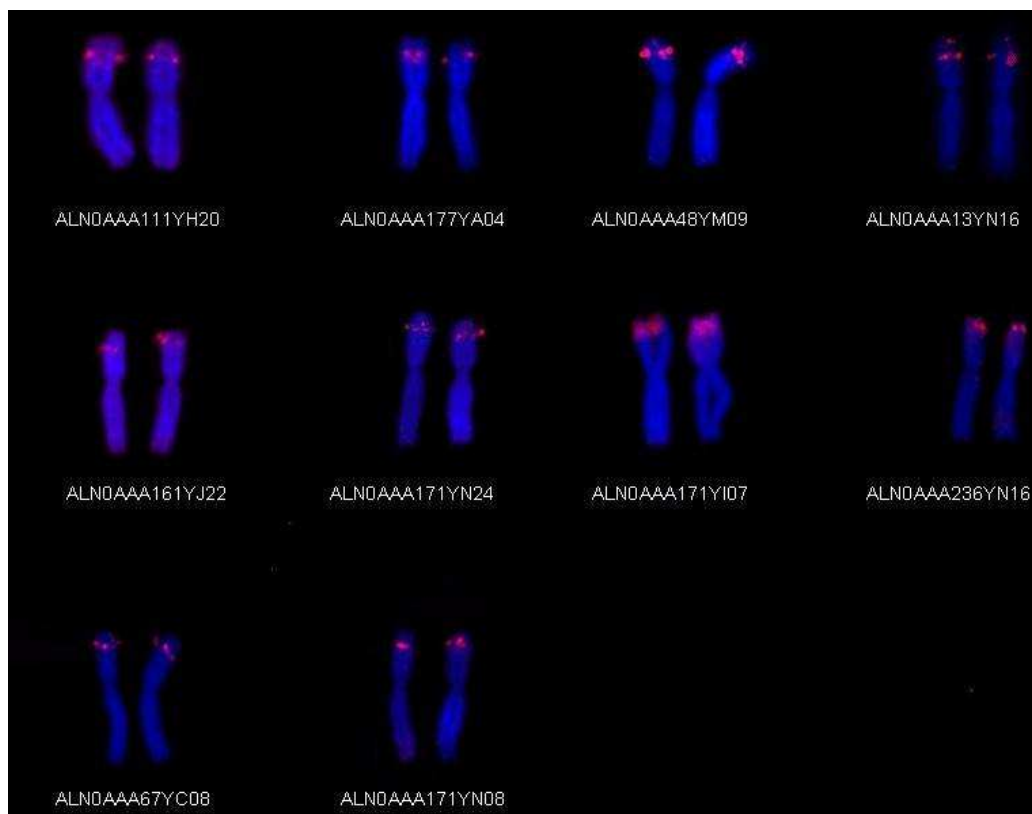


**Obr. 20** Komposit snímků chromozómů obarvených pomocí DAPI (modrá barva) a specifického FISH signálu sondy (červená barva). Sonda a chromozómy byly denaturovány odděleně. V obou případech byla použita sonda připravena metodou nick translace. NA obrázku A jsem použila 200 ng sondy a 200 ng kompetitoru, na obrázku B pak 500 ng sondy a 500 ng kompetitoru.

Z obrázků je patrné, že při užití 200 ng kompetitoru se na snímcích vyskytuje silné pozadí. Při užití 500 ng kompetitoru bylo pozadí minimální. Je také zřejmé, že metoda náhodných primerů není vhodná pro syntézu sondy z BAC DNA vzhledem k tomu, že sonda nevykazovala žádný (viz obr. 17) nebo téměř žádný signál (viz obr. 19). Sondy připravené metodou nick translace vykazovaly signál v případě simultánní i oddělené denaturace ačkoliv v případě oddělené denaturace se signál jeví silnější. Při FISH jsem tedy připravovala sondy pomocí nick translace a denaturaci prováděla odděleně.

### 6.6.3 Fyzické mapování vybraných BAC klonů

V průběhu své práce jsem fyzicky mapovala 10 BAC klonů, které se podle JGI databáze vyskytují na krátkém raménku chromozómu 2. Sondy byly syntetizovány metodou nick translace a denaturace chromozómů a sond probíhala odděleně. Výsledný signál jsem snímala CCD černobílou kamerou a fotografie chromozómů a signálu jsem dále analyzovala v programu ImageJ (viz obr. 21). Chromozómy jsem rozlišovala na základě poměru délky p a q ramene (Tymowska, 1973; Khokha et al., 2009).



**Obr. 21** Chromozomální pozice všech BAC sond mapovaných v rámci této práce pomocí FISH. Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *Xenopus tropicalis*, červeně signály BAC sond.

Pomocí programu ACC Image Analyser 5.0 jsem hodnotila poměr krátkého a dlouhého ramene chromozómu vykazujícího signál. Jelikož jsem předpokládala, že mnou vybrané klony se vyskytují na krátkém raménku chromozómu 2, očekávala jsem poměr ramen cca 0,63. Protože se mnou naměřené hodnoty pohybovaly kolem hodnoty 0,75, dá se s jistotou říci, že se jedná o chromozóm 1. Dále jsem hodnotila relativní vzdálenost od centroméry (RDC) každého signálu, minimálně u 7 mitóz.

Ze zjištěných dat jsem spočítala průměr RDC, směrodatnou odchylku a konfidenci na hladině  $\alpha = 0,05$ . Výsledky měření jsou zaznamenány v tabulce (viz tab. 4).

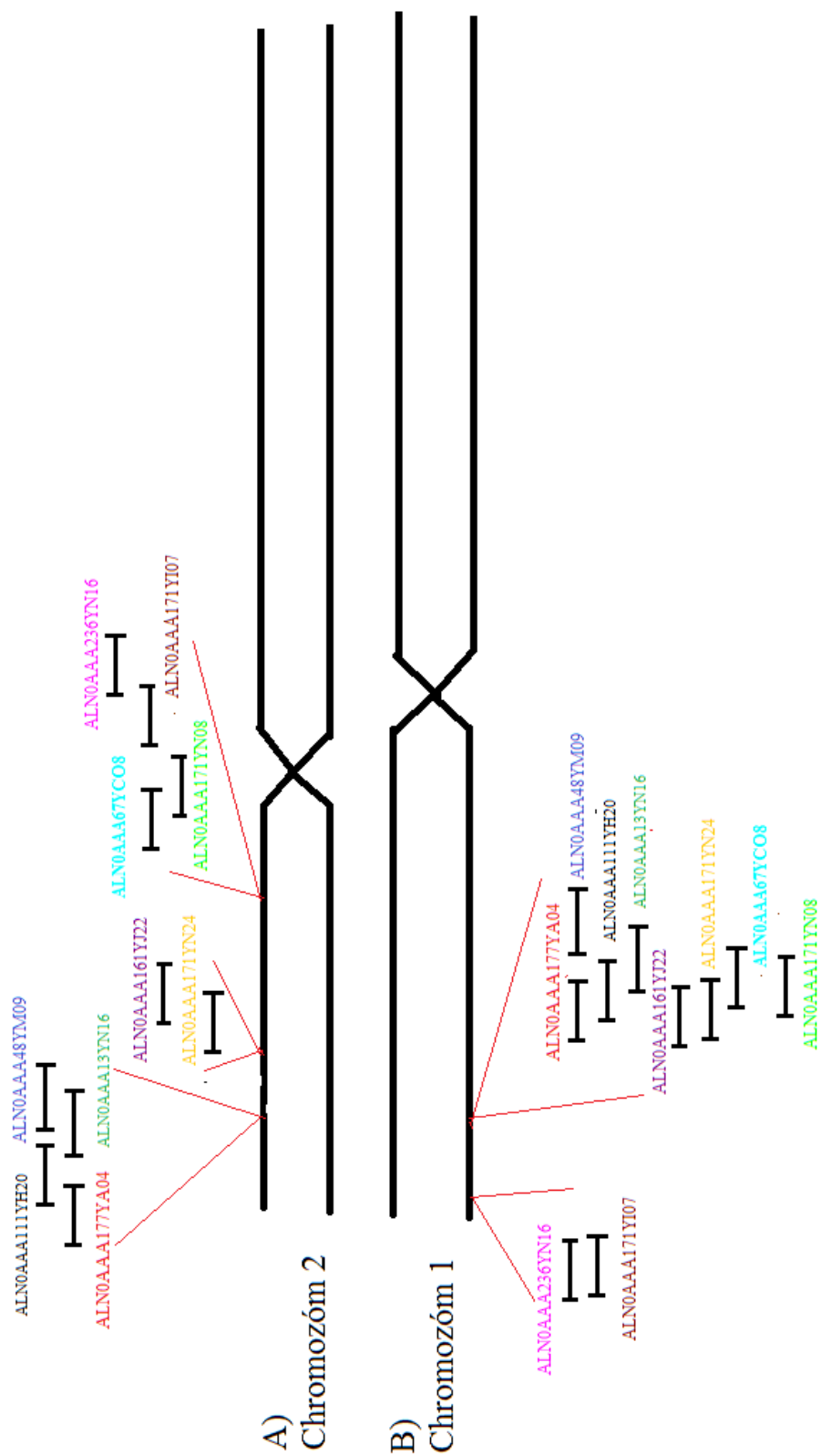
Název	Rameno	RCD	Průměr RCD	Směr. Odchylka	Konfidence $\alpha=0,05$
ALN0AAA111YH20	p	0,65 0,7 0,72 0,69 0,73 0,75 0,69	0,7	0,0249	0,01844
ALN0AAA48YM09	p	0,59 0,67 0,69 0,63 0,65 0,62 0,62	0,64	0,0269	0,01996
ALN0AAA177YA04	p	0,69 0,7 0,71 0,7 0,72 0,73 0,69	0,71	0,0122	0,00907
ALN0AAA13YN16	p	0,68 0,67 0,67 0,65 0,63 0,64 0,65	0,66	0,0151	0,01119
ALN0AAA161YJ22	p	0,74 0,68 0,73 0,7 0,75 0,74 0,74	0,73	0,02	0,01482

Pokračování tabulky č. 4

ALN0AAA171YN24	p	0,71 0,72 0,7 0,69 0,69 0,73 0,72	0,71	0,0139	0,01028
ALN0AAA171YI07	p	0,92 0,9 0,91 0,85 0,89 0,88 0,91	0,89	0,0173	0,01285
ALN0AAA236YN16	p	0,89 0,85 0,89 0,81 0,95 0,93 0,96	0,9	0,0416	0,03084
ALN0AAA67YC08	p	0,68 0,72 0,7 0,65 0,69 0,67 0,69	0,68	0,0151	0,01119
ALN0AAA171YN08	p	0,67 0,7 0,71 0,69 0,68 0,7 0,68	0,69	0,0122	0,00907

**Tab 4.** Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH signálu od centroméry

Srovnala jsem teoretické pozice BAC klonů podle databáze JGI a reálné pozice zjištěné metodou FISH (viz obr. 22).



**Obr. 22** Grafické znázornění pozice BAC klonů. Teoretická pozice vybraných BAC klonů podle databáze JGI na chromozómu 2 (A) a reálná pozice BAC klonů podle výsledků FISH na chromozómu 1 (B).

## 7 Diskuze

### 7.1 Úprava protokolu pro izolaci a značení BAC DNA

V rámci této diplomové práce byl zaveden funkční protokol pro izolaci a značení BAC DNA. Při izolaci BAC DNA podle výchozího protokolu se ve vzorku nacházelo velké množství RNA (Poulsen, 2004). Za účelem snížení obsahu RNA byl protokol upraven přidáním RNázy T<sub>1</sub> (2U/ml) (Wang et al., 1976). Protože při Not I. restrikci a PFGE bylo prokázáno, že izolovaná DNA není BAC původu, bylo nutné do protokolu zařadit krok purifikace DNA za pomoci kolonky (Qiagen plasmid midi kit) fungující na principu výměny anionů (Chrast et al., 1999). Po provedení Not I restrikce a PFGE byla prokázána přítomnost BAC DNA (Gemmill et al., 2002). Jako alternativa by se dala použít exonukleáza (20 000U/ml), v tomto případě by ale bylo nutné pracovat s počáteční bakteriální kulturou o objemu alespoň 500 ml (<http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0499/499larg.pdf>). Výsledné množství izolované BAC DNA se při počáteční bakteriální kultuře 100ml pohybovala kolem 10 µg.

BAC DNA byla značena pomocí dig-11-dUTP metodou náhodných primerů (random priming) a Nick translací. Výchozí protokol pro Nick translaci (Berr and Schubert, 2006) má nevýhodu v tom, že potřebné množství BAC DNA pro DNase I. test a samotnou Nick translaci je minimálně 8 µg. Je proto nemožné Nick translaci zopakovat bez opětovné izolace BAC DNA. Jako řešení tohoto problému byl používán Nick translation kit (Abott), jehož protokol neobsahuje test DNázy I (Marec, ústní sdělení). Celkové množství sondy připravené metodou Nick translation se pohybovalo kolem 1 µg, což platí i pro sondy připravené metodou náhodných primerů.

Pro srovnání kvality sond syntetizovaných oběma způsoby byl stupeň inkorporace dig-11-dUTP vizualizován pomocí Southern blotu (viz obr. 15)(Towbin et al., 1992). Z výsledků je patrné že sondy značené metodou Nick translation obsahují větší množství inkorporovaného dig-11-dUTP než sondy připravené metodou náhodných primerů. Intenzita signálu byla následně porovnána pomocí FISH a bylo dokázáno, nick translace je opravdu vhodnější metoda pro značení BAC sond než metoda náhodných primerů.

## 7.2 FISH

Při přípravě preparátů pro FISH je důležité synchronizovat buněčnou kulturu za účelem zvýšení obsahu metafázních spreadů. Existuje několik metod synchronizace buněčného dělení, v rámci této diplomové práce byla vyzkoušena synchronizace pomocí kolchicinu a metodou serum starvation (Hui et al., 1983; Langan and Chou, 2011). Jako další alternativa je možné synchronizovat buňky pomocí Nicodazolu (Matsui et al., 2012). Z výsledků srovnání obou metod vyplývá, že na sklíčkách po nakapání suspenze buněk synchronizovaných pomocí kolchicinu se nachází větší množství mitóz než v opačném případě.

Jelikož BAC DNA obsahuje velké množství repetitivních sekvencí, je nezbytné používat při FISH kompetitorovou DNA. V rámci této práce byla vyzkoušena syntéza kompetitoru pomocí sonikace a pomocí injekční jehly (Schoppee Bortz and Wamhoff, 2011). Metoda nasátí a vytlačení roztoku DNA injekční jehlou se ukázala jako nefunkční. Naproti tomu sonikace DNA dala za vznik funkčnímu kompetitoru. Další možností přípravy kompetitoru je inkubace DNA ve vroucí vodě, inkubací DNA při teplotě 120° C v autoklávu nebo štěpení DNA pomocí Dnázy I (Hengen, 1997).

Při úpravě protokolu pro fluorescenční *in situ* hybridizaci bylo vyzkoušeno celkem 8 kombinací koncentrací kompetitoru a sondy. Z fotografií chromozómů s FISH signálem je patrné, že ideální množství kompetitoru i značené sondy pro BAC FISH je 500 ng (viz obr. 17 – 20). Při srovnání metod denaturace se zjistilo, že je velký rozdíl, jaký typ sondy byl použit. V případě, že byla sonda připravena metodou Nick translace, je signál patrný jak po simultánní, tak i oddělené denaturaci. Pokud však byla k přípravě sondy použita metoda náhodných primerů, signál byl vidět pouze, když byly chromozómy a sonda denaturovány odděleně. Při dalších experimentech bylo vždy použito 500ng sondy i kompetitoru a denaturace chromozómů a sondy probíhala zvlášť.

## 7.3. Fyzické mapování pomocí FISH

Podle JGI genomové databáze (assembly 4.1) se ve vazebné mapě krátkého raménka chromozómu 2 a 7 vyskytují rozsáhlé nemapované oblasti. Údaje JGI ukazují, že vazebně nemapované oblasti korespondují s celou řadou BAC klonů, které mají osekvenovány cca 100 pb na jednom nebo na obou koncích. Tyto BAC klony byly

v novější verzi této databáze přiřazeny do nemapovaných oblastí na základě syntenie s lidským a kuřecím genomem (Hellsten et al., 2010).

Cílem této diplomové práce bylo vybrat BAC klony, které podle databáze JGI leží na krátkém raménku chromozómu 2 a pomocí FISH určit jejich reálnou polohu na chromozómech. Celkem byla lokalizována pozice 10 BAC klonů, z nichž většina měla osekvenované oba konce.

Z výsledků FISH je patrné, že všech 10 BAC klonů bez výjimky vykazují signál na krátkém raménku chromozómu 1. Poměr ramen u chromozómu 2 by se měl pohybovat kolem hodnoty 0,63. Podle analýzy v programu ACC Analyser 5.0 se ovšem hodnota poměru ramen pohybovala kolem 0,75 což odpovídá právě chromozómu 1 (Tymowska, 1973; Khokha et al., 2009).

Poloha 4 BAC klonů (ALN0AAA111YH20, ALN0AAA48YM09, ALN0AAA177YA04 a ALN0AAA13YN16) souhlasí s pozicí v databázi JGI, až na lokalizaci na chromozómu 1 místo na chromozómu 2, zatímco poloha ani pořadí ostatních BAC klonů neodpovídalo pozici v JGI databázi (viz obr. 22).

Možným vysvětlením je, že tyto BAC klony obsahují repetitivní cluster, která přiřadily BAC konec s větší pravděpodobností na chromozóm 1 než na chromozóm 2. Toto je také důkaz, že sekvence konců o velikosti 100 bp rozhodně nestačí ke spolehlivému přiřazení BAC klonů do vazebné mapy.

Možným řešením tohoto problému se zabývá skupina mého školitele, které se podařilo laserovou microdisekcí vyříznout krátké raménko chromozómu 2. Daná oblast byla amplifikována pomocí kitu WGA pro celogenomovou amplifikaci (Lee et al., 2012) s následným sekvenováním metodou Solexa (Wang et al., 2012). Na základě sekvenačních dat byly identifikovány scaffoldy ležící v analyzované oblasti. Dalším krokem bude identifikace BAC klonů obsahujících nalezené scaffoldy. Tento soubor klonů pak bude osekvenován v celém rozsahu některou z technik hromadného sekvenování. Následně budou klony uspořádány a jejich fyzická poloha ověřena pomocí FISH. Izolace a značení BAC DNA bude probíhat podle protokolu zavedeném v rámci této diplomové práce.

## 8. Závěr

- 1) Zavedla jsem funkční protokol pro izolaci BAC DNA, izolovala jsem BAC DNA 10ti klonů vyskytujících se na krátkém raménku chromozómu 2
  
- 2) Zavedla jsem funkční protokol pro syntézu sond z BAC DNA a vytvořila jsem sondy značené dig-11-dUTP z DNA 10ti BAC klonů vyskytujících se na krátkém raménku chromozómu 2
  
- 3) Pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace jsem propojila pozice 10ti BAC klonů

## Citovaná literatura

Abu-Daya, A., Khokha, M.K., and Zimmerman, L.B. (2012). The Hitchhiker's guide to *Xenopus* genetics. *Genesis* 50, 164-175.

Amaya, E. (2005). Xenomics. *Genome Res* 15, 1683-1691.

Amaya, E., Offield, M.F., and Grainger, R.M. (1998). Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends in Genetics* 14, 253-255.

Berr, A., and Schubert, I. (2006). Direct labelling of BAC-DNA by rolling-circle amplification. *Plant J* 45, 857-862.

Bloch, B. (1993). Biotinylated probes for in situ hybridization histochemistry: use for mRNA detection. *J Histochem Cytochem* 41, 1751-1754.

Bronson, S.K., Pei, J., Taillon-Miller, P., Chorney, M.J., Geraghty, D.E., and Chaplin, D.D. (1991). Isolation and characterization of yeast artificial chromosome clones linking the HLA-B and HLA-C loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1676-1680.

Casey, J., and Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Res* 4, 1539-1552.

Chrast, R., Scott, H.S., and Antonarakis, S.E. (1999). Linearization and purification of BAC DNA for the development of transgenic mice. *Transgenic Res* 8, 147-150.

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.

Frijters, A.C.J., Zhang, Z., Damme, M.v., Wang, G.-L., Ronald, P.C., and Michelmore, R.W. 1997. Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large Eco RI and Hind III genomic fragments of lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 94: 390-399.-9.

Gurdon, J.B., and Hopwood, N. (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology* 44, 43-50.

Graf, J.D., and Kobel, H.R. (1991). Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol* 36, 19-34.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Linkage maps

Hauptmann, G., and Gerster, T. (1994). Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos. *Trends Genet* 10, 266.

Hellsten, U., Harland, R.M., Gilchrist, M.J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N.H., Shu, S.Q., Taher, L., *et al.* (2010). The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328, 633-636.

Henderson, S.A. (1970). The time and place of meiotic crossing-over. *Annu Rev Genet* 4, 295-324.

Hengen, P.N. (1997). Shearing DNA for genomic library construction. *Trends Biochem Sci* 22, 273-274.

Hirsch, N., Zimmerman, L.B., and Grainger, R.M. (2002). *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev Dyn* 225, 422-433.

Hoff, K., Jørgensen, J.T., Müller, S., Røngaard, E., Rasmussen, O., and Schønau, A. (2010). Visualization of FISH Probes by dual-color chromogenic in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 133, 205-211.

Hui, G.N., Palmer, K.L., and Siddiqui, W.A. (1983). Synchronization of *Plasmodium falciparum* in continuous in vitro culture: use of colchicine. *Am J Trop Med Hyg* 32, 1451-1453.

Ishii, Y., Asakawa, S., Taguchi, Y., Ishibashi, S., Yagi, T., and Shimizu, N. (2004). Construction of BAC library for the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Genes Genet Syst* 79, 49-51.

Khokha, M.K., Krylov, V., Reilly, M.J., Gall, J.G., Bhattacharya, D., Cheung, C.Y., Kaufman, S., Lam, D.K., Macha, J., Ngo, C., *et al.* (2009). Rapid gynogenetic mapping of *Xenopus tropicalis* mutations to chromosomes. *Dev Dyn* 238, 1398-1346.

Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S.W., and Richardson, P. (2002). Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn* 225, 384-391.

Kochan, K.J., Wright, D.A., Schroeder, L.J., Shen, J., and Morizot, D.C. (2003). Genetic linkage maps of the West African clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn* 226, 99-102.

Langan, T.J., and Chou, R.C. (2011). Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol Biol* 761, 75-83.

Lee, J.C., Tsai, L.C., Lai, P.Y., Lee, C.C., Lin, C.Y., Huang, T.Y., Linacre, A., and Hsieh, H.M. (2012). Evaluating the performance of whole genome amplification for use in low template DNA typing. *Med Sci Law*.

Li, G., Liu, K., Jiao, S., Liu, H., Blair, H.T., Zhang, P., Cui, X., Tan, P., Gao, J., and Ma, R.Z. (2012). A physical map of a BAC clone contig covering the entire autosome insertion between ovine MHC Class IIa and IIb. *BMC Genomics* 13, 398.

Matsui, Y., Nakayama, Y., Okamoto, M., Fukumoto, Y., and Yamaguchi, N. (2012). Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: a novel method suitable for examining dynamic changes in proteins during mitotic progression. *Eur J Cell Biol* 91, 413-419.

Luo, Z.W., Hackett, C.A., Bradshaw, J.E., McNicol, J.W., and Milbourne, D. (2001). Construction of a genetic linkage map in tetraploid species using molecular markers. *Genetics* 157, 1369-1385.

Nath, J., and Johnson, K.L. (1998). Fluorescence in situ hybridization (FISH): DNA probe production and hybridization criteria. *Biotech Histochem* 73, 6-22.

Pardue, M.L., and Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600-604.

Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., and Tanksley, S.D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335, 721-726.

Poulsen, T.S. (2004). Purification of BAC DNA. *Methods Mol Biol* 255, 91-100.

Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-251.

Russell, J.H., and Keiler, K.C. (2012). RNA visualization in bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 905, 87-95.

Schoppee Bortz, P.D., and Wamhoff, B.R. (2011). Chromatin immunoprecipitation (ChIP): revisiting the efficacy of sample preparation, sonication, quantification of sheared DNA, and analysis via PCR. *PLoS One* 6, e26015.

Schriml, L.M., Padilla-Nash, H.M., Coleman, A., Moen, P., Nash, W.G., Menninger, J., Jones, G., Ried, T., and Dean, M. (1999). Tyramide signal amplification (TSA)-FISH applied to mapping PCR-labeled probes less than 1 kb in size. *Biotechniques* 27, 608-613.

Shapiro, H. A. (1935). Experimental induction of coupling in *Xenopus laevis*, with the production of fertilized eggs. *Nature* 135: 510.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8794-8797.

Shizuya, H., and Kouros-Mehr, H. (2001). The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med* 50, 26-30.

Song, J.Q., Dong, F.G., Lilly, J.W., Stupar, R.M., and Jiang, J.M. (2001). Instability of bacterial artificial chromosome (BAC) clones containing tandemly repeated DNA sequences. *Genome* 44, 463-469.

Speel, E.J., Hopman, A.H., and Komminoth, P. (1999). Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card(s). *J Histochem Cytochem* 47, 281-288.

Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H., and Wagner, M. (2010). Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol* 76, 922-926.

Tompsett, A.R., Park, J.W., Zhang, X., Jones, P.D., Newsted, J.L., Au, D.W., Chen, E.X., Yu, R., Wu, R.S., Kong, R.Y., *et al.* (2009). In situ hybridization to detect spatial gene expression in medaka. *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 1257-1264.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.

Trask, B.J. (1991). Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 7, 149-154.

Tymowska, J. (1973). Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet Cell Genet* 12, 297-304.

Tymowska, J., and Fischberg, M. (1982). A comparison of the karyotype, constitutive heterochromatin, and nucleolar organizer regions of the new tetraploid species *Xenopus epitropicalis* Fischberg and Picard with those of *Xenopus tropicalis* Gray (Anura, Pipidae). *Cytogenet Cell Genet* 34, 149-157.

Wang, H., Zhang, P., Chen, W., Feng, D., Jia, Y., and Xie, L. (2012). Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. *PLoS One* 7, e38885.

Wang, L., Galehouse, D., Mellon, P., Duesberg, P., Mason, W.S., and Vogt, P.K. (1976). Mapping oligonucleotides of Rous sarcoma virus RNA that segregate with polymerase and group-specific antigen markers in recombinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3952-3956.

Wells, D.E., Gutierrez, L., Xu, Z., Krylov, V., Macha, J., Blankenburg, K.P., Hitchens, M., Bellot, L.J., Spivey, M., Stemple, D.L., *et al.* (2011). A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 354, 1-8.

Woo, S.S., Jiang, J., Gill, B.S., Paterson, A.H., and Wing, R.A. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* 22, 4922-4931.

Zou, N., Ditty, S., Li, B., and Lo, S.C. (2003). Random priming PCR strategy to amplify and clone trace amounts of DNA. *Biotechniques* 35, 758-760, 762-755.

<http://genome.jgi.doe.gov/>

<http://genome.jgi.doe.gov/Xentr4/Xentr4.home.html>

<http://platform-gbrowser.issb.genopole.fr>

<http://tropmap.biology.uh.edu/map.html>

[http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/Info/Index](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/Info/Index)

<http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0499/499larg.pdf>