

# Utilizzo di marcatori molecolari in evoluzione e conservazione

Un marcatore genetico è qualsiasi elemento con una base genetica, in genere identificabile con facilità, che permette di caratterizzare un sistema genetico quale:

- individuo
  - varietà
  - popolazione
  - specie
  - taxa superiori
- In passato si utilizzavano caratteri fenotipici morfologici (differenze ereditabili nell'aspetto esterno di un individuo). *Biston betularia*.



## Marcatore molecolare - vantaggi

I caratteri fenotipici sono presenti solo in alcune specie e la loro base genetica deve essere di volta in volta dimostrata (es. incroci).

In ecologia molecolare, filogenesi molecolare e genetica della conservazione si utilizza l'informazione di molecole biologiche (proteine ed acidi nucleici) per lo studio di problemi legati al comportamento degli organismi, allo studio dei sistemi di accoppiamento, ai loro legami di parentela, ed al loro differenziamento.

L'uso dei marcatori molecolari è di particolare interesse perché permette di rivelare dei fenomeni di differenziamento altrimenti difficilmente studiabili (es. rapporti di parentela, connessione tra popolazioni, specie criptiche).

I marcatori genetici sono spesso di sicura interpretazione. Sono applicabili a tutti gli organismi viventi.

Il numero di marcatori disponibili (**a livello di DNA**), la loro facilità di uso e le tecniche di analisi sono in continuo aumento.

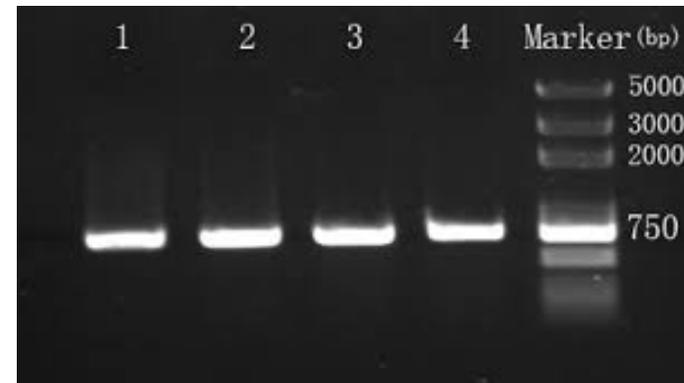
PCR: rivoluzione metodologica.

# Marcatore molecolare a DNA - utilizzo

La reazione di PCR consente di ottenere una quantità elevata di un determinato frammento di DNA da un individuo. Questo deve poi essere analizzato in qualche modo, per ottenere informazioni sulla sequenza che contiene.

Procedura sperimentale:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione via PCR
- Analisi dei frammenti
- Analisi dei dati



A seconda del tipo di DNA utilizzato e della procedura di analisi si distinguono diversi tipi di marcatori molecolari.

## Marcatori mitocondriali e marcatori nucleari

- caratterizzati da un diverso livello di variabilità (utili a diversi livelli tassonomici)
- hanno diversi costi di sviluppo e di applicazione
- in molti organismi sono aploidi i primi (mtDNA) e diploidi i secondi (nDNA)

# Marcatori mitocondriali

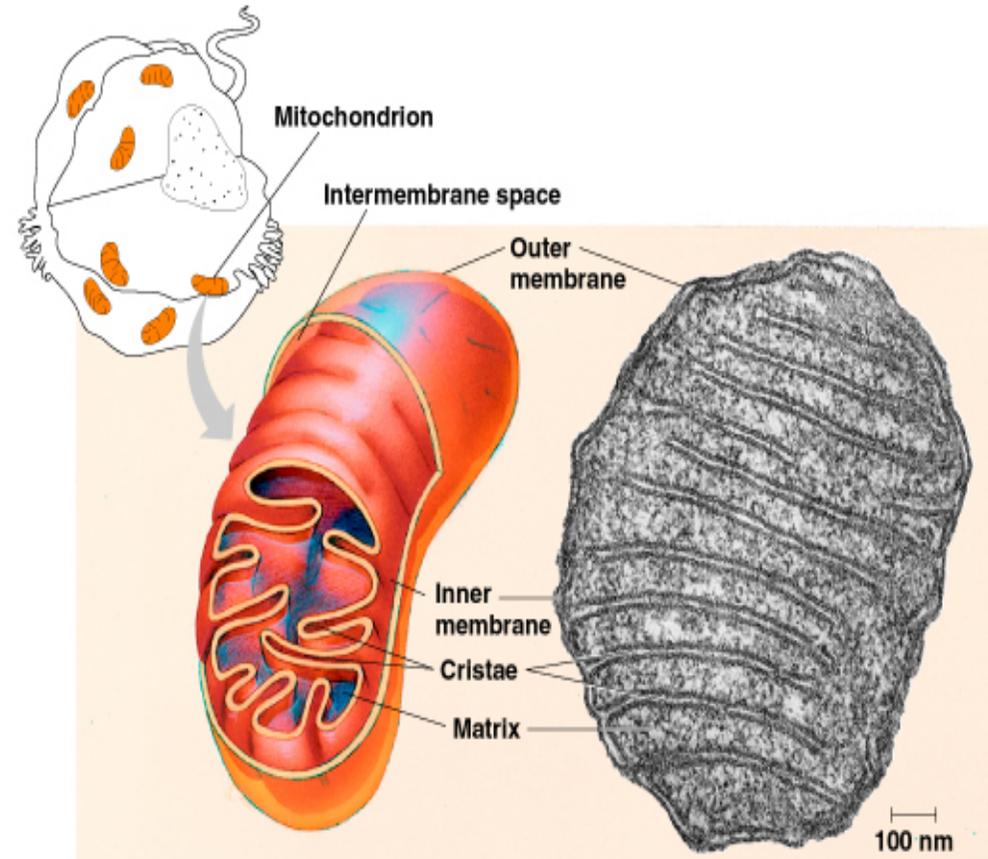
Sono stati tra i primi ad essere utilizzati in filogenesi molecolare e genetica di popolazione di organismi animali.

Copie multiple nelle cellule eucariotiche.

Organelli responsabili del metabolismo energetico della cellula.

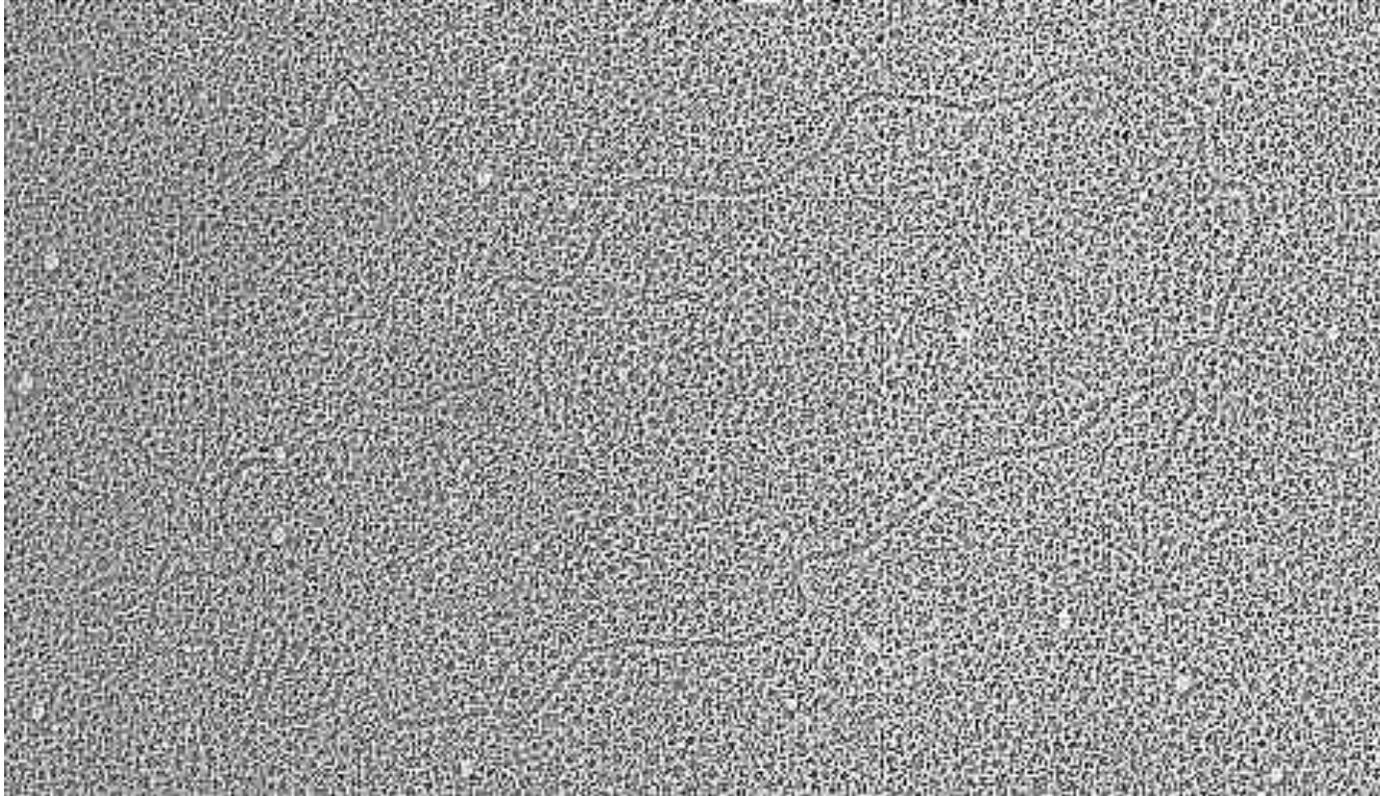
Posseggono un proprio DNA (origine endosimbiotica).

Hanno eredità uniparentale materna nei vertebrati ed in molti invertebrati (aploidi)

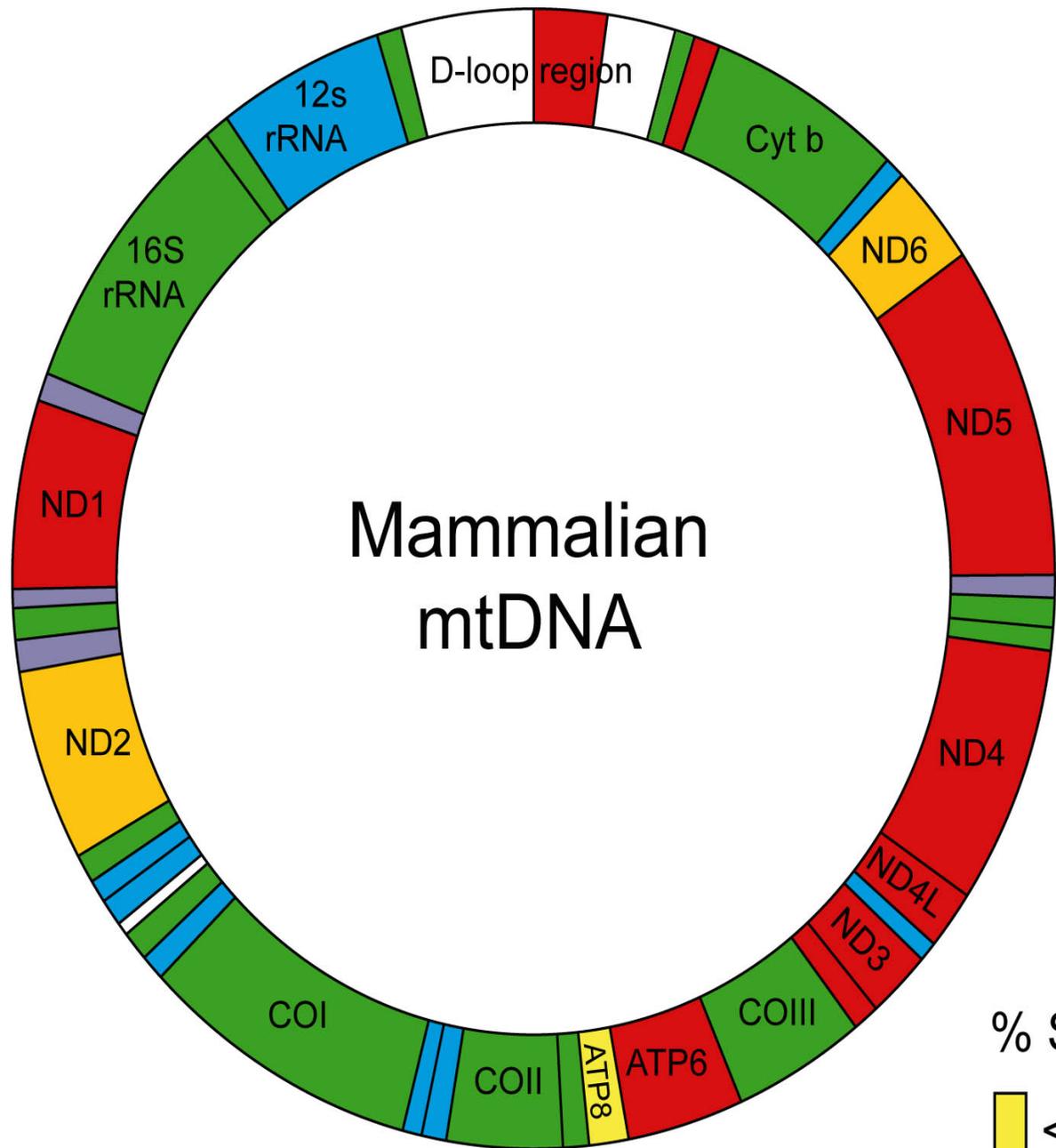


# Genoma mitocondriale

E' un genoma semplificato, molto compatto circolare.



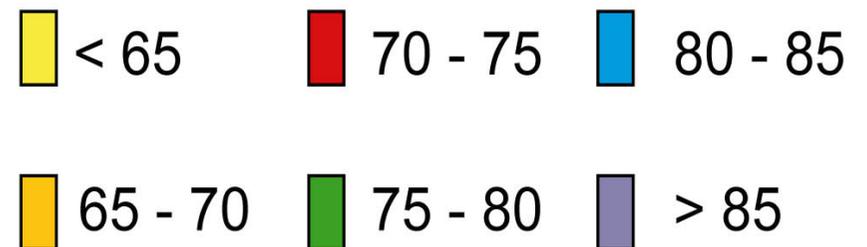
Nei vertebrati non ha introni, ha una dimensione di circa 17 kb e contiene, nell'uomo i geni per circa 20 tRNA, 13 proteine, e due RNA ribosomali.



Alcune parti del DNA mitocondriale sono molto conservate e mostrano un'elevata similarità tra specie di mammiferi

Queste regioni conservate sono state molto presto utilizzate per disegnare primer universali (Kocher et al. 1989)

% Similarity





## TABLE OF CONTENTS

<b>Table of Contents</b> .....	2
<b>Introduction to S.F.G.</b> .....	3
<b>DNA Extraction For PCR</b> .....	4
General Extraction Protocol for Total DNA.....	4
Variations on the Extraction Protocol.....	5
<b>The Cycle</b> .....	7
The Basic Cycle.....	7
Variations in the Cycle.....	8
<b>PCR Protocols</b> .....	9
Hy"gene" .....	9
Protocols .....	9
Frequently used solutions. ....	10
Double-Strand DNA Amplifications .....	11
Double strand problems. ....	11
Single-Strand DNA Amplifications.....	12
Single strand problems.....	13
Double-Strand mRNA Amplifications.....	14
<b>Sequencing protocols</b> .....	15
From single strand PCR products.....	15
From double strand PCR products.....	17
Solid phase stripping with biotinylated primers.....	18
Lambda exonuclease method.....	20
<b>Running the Sequencing Gel</b> .....	20
<b>PCR Primers</b> .....	22
Making them .....	22
Purifying them.....	23
Mitochondrial primers .....	
12s RNA Primers.....	
16s RNA Primers.....	
Cytochrome oxidase II Primers.....	
Cytochrome b Primers.....	
D-loop Primers .....	
Cytochrome Oxidase II Primers .....	
ATPase 6 Primers.....	
Nuclear Gene Primers .....	
bindin.....	
int .....	
creatine kinase .....	
<b>Vector primers</b> .....	
<b>MtDNA maps</b> .....	
<b>Contributors</b> .....	
<b>References to Complete mtDNA Sequences</b> .....	
<b>Selected References to PCR</b> .....	
<b>Solution Appendix</b> .....	
<b>Abbreviations</b> .....	



**THE PALUMBI LAB**

[HOME](#)
[People](#)
[Projects](#)
[Publications](#)
[Books](#)
[Classes](#)
[Links](#)
[Multimedia](#)



**FEATURED NEWS:**

The ocean teems with life that thrives under difficult situations in unusual environments. The Extreme Life of the Sea takes readers to the absolute limits of the ocean world--the fastest and deepest, the hottest and oldest creatures of the oceans. [more . . .](#)

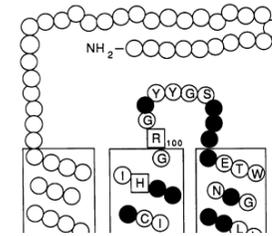


Featured Image - Nudibranch by Lupita Ruiz-Jones

We're interested in ecological, evolutionary, and conservation questions related to marine (and sometimes terrestrial) organisms and ecosystems. We use evolutionary genetics and molecular ecology techniques, and our fieldwork takes us all around the world. Currently, we're studying coral diversity, the adaptive

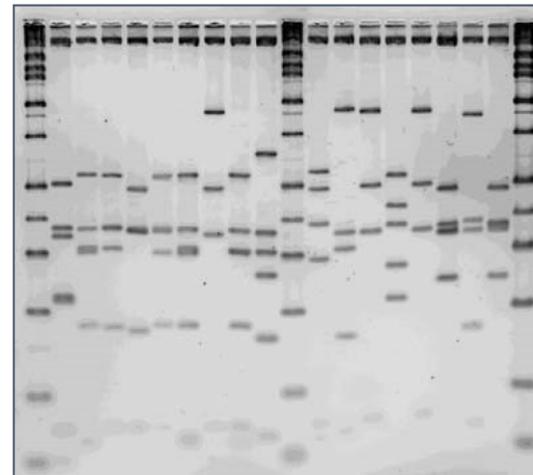
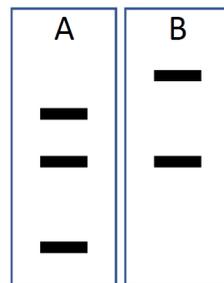
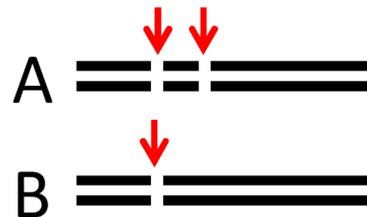
# DNA mitocondriale.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 86, pp. 6196–6200, August 1989  
Evolution



## RFLP

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). DNA is digested with specific restriction enzymes and the resulting fragments are identified by agarose electrophoresis



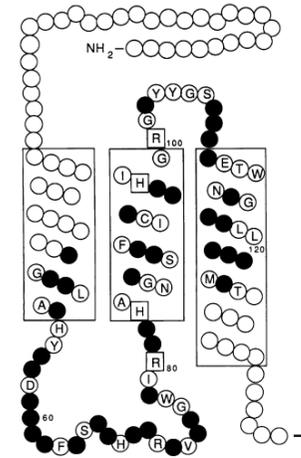
# DNA mitocondriale.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 86, pp. 6196–6200, August 1989  
Evolution

## Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers

(cytochrome *b*/12S ribosomal DNA/control region/evolutionary genetics/molecular phylogenies)

T. D. KOCHER\*, W. K. THOMAS\*, A. MEYER\*†‡, S. V. EDWARDS\*†‡, S. PÄÄBO\*, F. X. VILLABLANCA†‡,  
AND A. C. WILSON\*



Da un punto di vista sperimentale la procedura è molto semplice:

- 1) Estrazione DNA dai singoli individui. Molto spesso esistono dei kit commerciali per l'estrazione.
- 2) Amplificazione del gene mtDNA dai singoli estratti. Il problema è di avere i primer sulle sequenze fiancheggianti le regioni da amplificare. Sono disponibili primer universali che permettono l'amplificazione da diverse specie: disegnati sulle regioni conservate dei singoli geni e sui tRNA.
- 3) Sequenziamento del frammento amplificato (una volta o in casi specifici RFLP).
- 4) Confronto tra le sequenze di diversi individui: numero di basi diverse tra due individui per ogni frammento, frequenza delle singole sequenze in diversi gruppi di individui.

# DNA mitocondriale - alla fine...

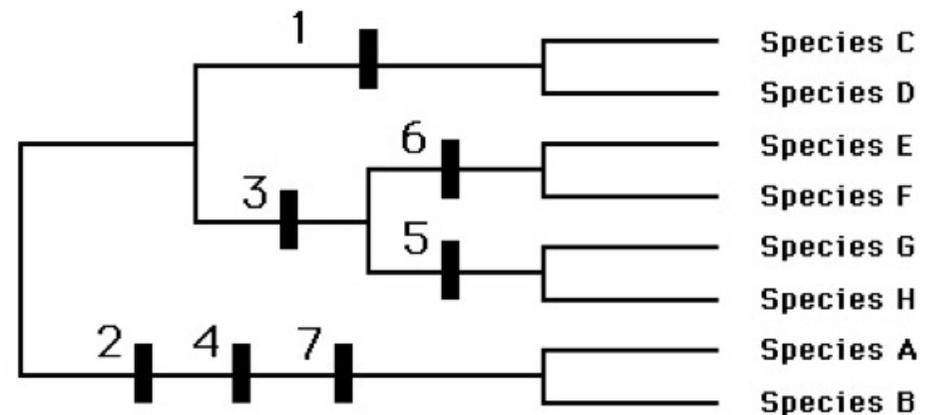
Produce come risultato una sequenza specifica per ogni individuo (è aploide)

es. Ind 1. AATGCATGAT  
Ind 2. A**TT**GCATGAT  
Ind 3. A**TTGT**ATGAT

Confrontando le sequenze posso misurare quanto diverse sono (distanze genetiche).

Posso utilizzare le sequenze ad esempio per identificazione di specie, filogenesi molecolare, genetica di popolazione.

	1	2	3	4	5	6	7
Species A	ACCAGC	CTGTGC	ATCGATG	ACGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	AGA
Species B	ACCAGC	CTGTGC	ATCGATG	ACGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	AGA
Species C	ACGAGC	ATGTGC	ATCGATG	GCCGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	TGA
Species D	ACGAGC	ATGTGC	ATCGATG	GCCGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	TGA
Species E	ACCAGC	ATGTGT	TATCGAT	GCCGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	TGA
Species F	ACCAGC	ATGTGT	TATCGAT	GCCGACTA	AAGTGAT	ACCATAA	TGA
Species G	ACCAGC	ATGTGT	TATCGAT	GCCGACTA	AAGTG	CTACCATA	TGA
Species H	ACCAGC	ATGTGT	TATCGAT	GCCGACTA	AAGTG	CTACCATA	TGA



# DNA nucleare - sequenziamento

La procedura è potenzialmente simile:

- 1) Estrazione DNA dai singoli individui. Molto spesso esistono dei kit commerciali per l'estrazione.
- 2) Amplificazione del gene mtDNA dai singoli estratti...

... ma il problema di avere i primer sulle sequenze fiancheggianti le regioni da amplificare è più serio perché il genoma nucleare è molto più grande e complesso (introni, esoni, regioni non codificanti, regioni duplicate). Solo recentemente sono man mano disponibili primer che funzionano in un ampio spettro di specie.

- 3) Sequenziamento del frammento amplificato...

... ma c'è il problema della ploidia (2 sequenze per individuo se eterozigote) che può richiedere il clonaggio dei frammenti o la ricostruzione attraverso bioinformatica degli alleli. C'è comunque il problema della ricombinazione.

- 4) Se tutto va bene... confronto tra le sequenze di diversi individui: numero di basi diverse tra due individui per ogni frammento, frequenza delle singole sequenze in diversi gruppi di individui.



## DNA nucleare. Marcatori microsatellite.

Sono caratterizzati da elevata variabilità nel numero di ripetizioni, dovuti fenomeni di "slippage" della polimerasi o a crossing-over ineguale.

L'alto tasso di variabilità è alla base dell'elevato numero di varianti alleliche di questi frammenti: molto spesso quasi tutti gli individui sono eterozigoti poiché possiedono due alleli distinti.

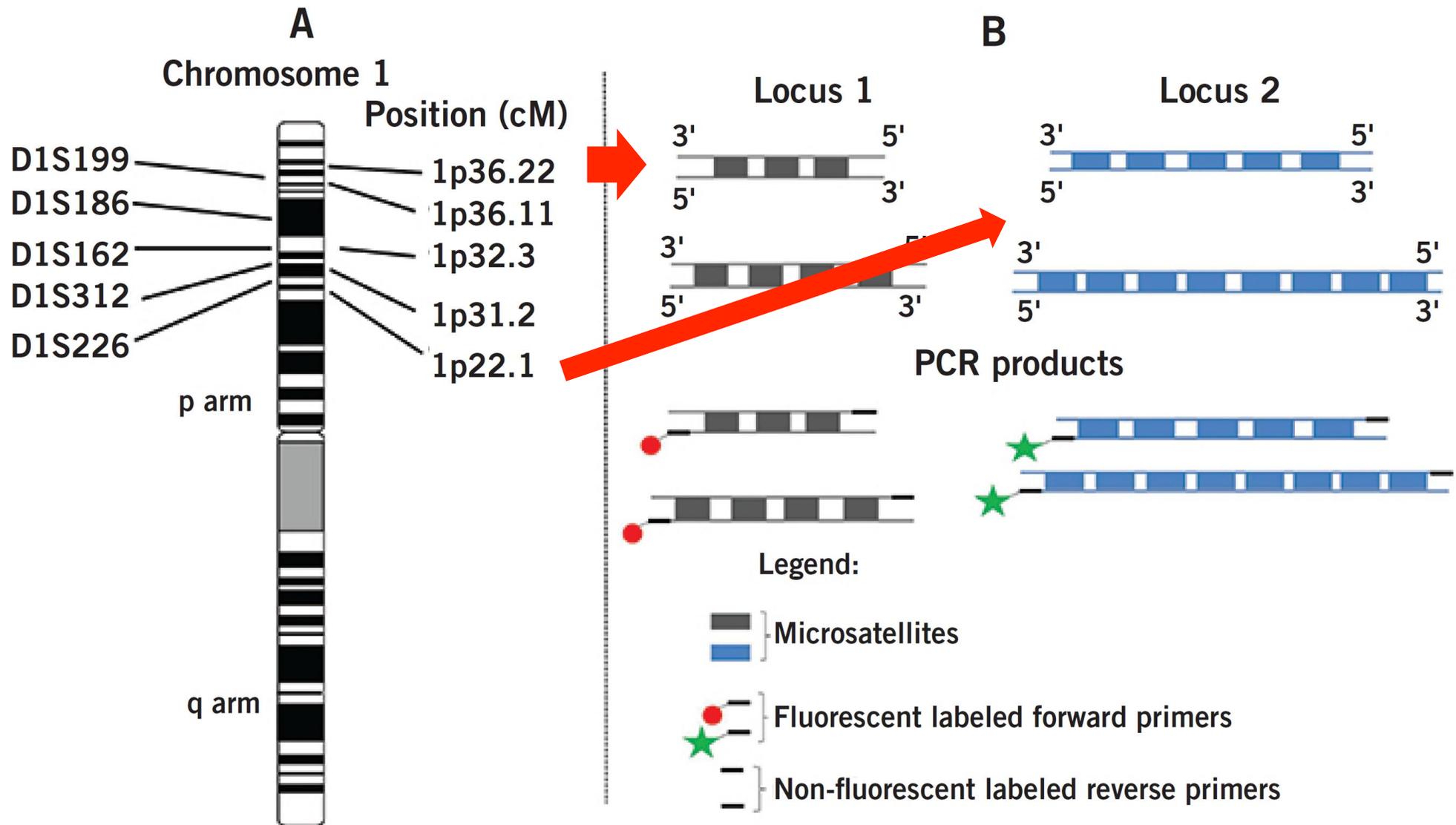
5'-TAATAATAATAATAATAATAA----3' → Allele 1

5'-TAATAATAATAATAATAATAA-3' → Allele 2

Sono i marcatori più utilizzati attualmente in ecologia molecolare, ed in altri campi tra cui la genetica forense (analisi di parentela ed identificazione di individui).

I profili genetici di due individui sono diversi già quando questi sono tipizzati con 3-4 microsatelliti. In genetica forense umana si usa un pannello standardizzato di 13 microsatelliti ( $P=10^{-9}$  che due profili siano identici in due diversi individui)

...sono generalmente fiancheggiati da sequenze uniche che, se conosciute, permettono l'amplificazione del locus microsatellite mediante primer specifici... ????





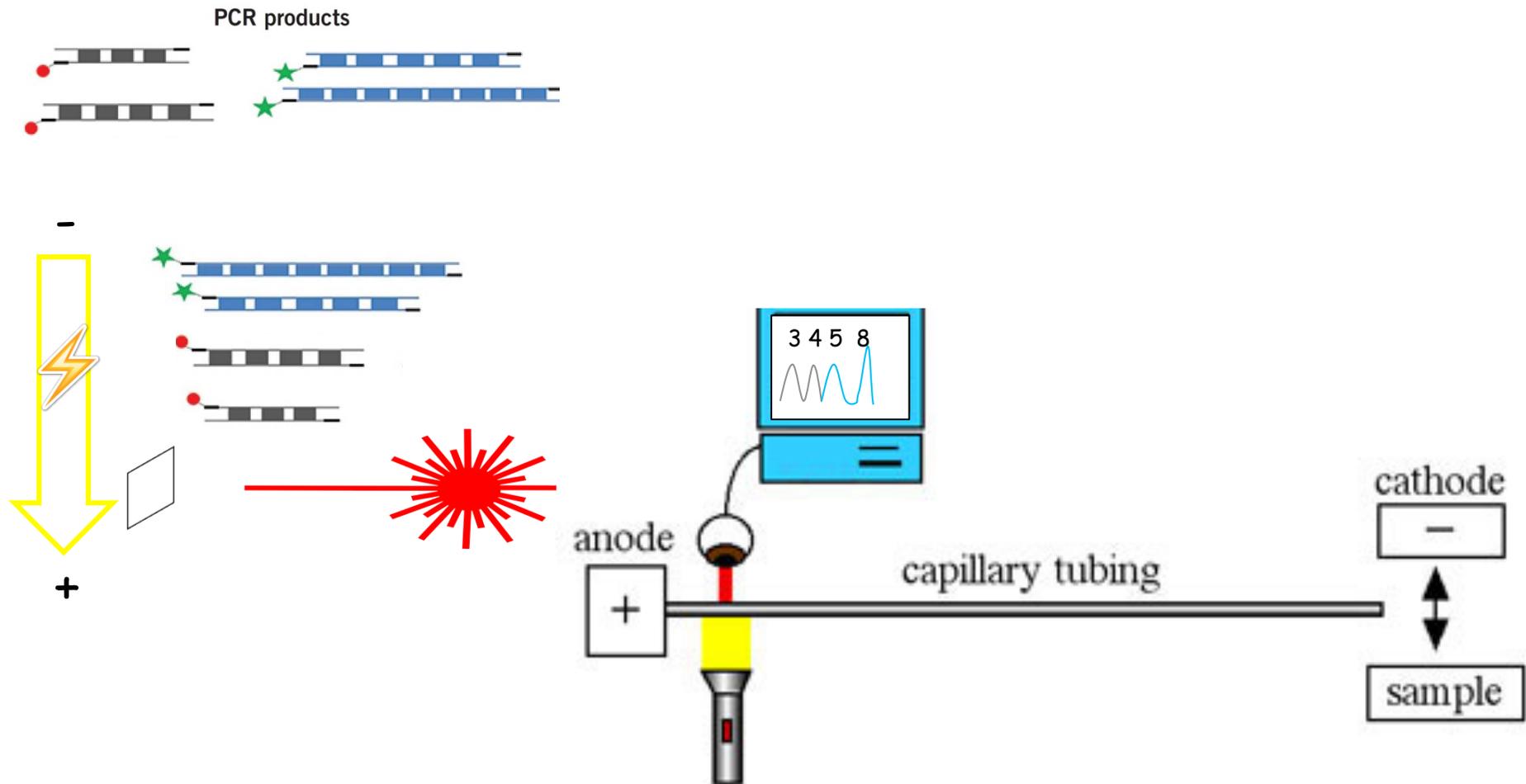
# DNA nucleare. Marcatori microsatellite.

Da un punto di vista sperimentale la procedura è la seguente:

- 1) Estrazione DNA dai singoli individui. Molto spesso esistono dei kit commerciali per l'estrazione.
- 2) Amplificazione del gene microsatellite dai singoli estratti. Il problema di avere i primer è qui più complicato in quanto i microsatelliti devono essere preventivamente isolati dalla specie di studio o devono essere disponibili in letteratura. Uno dei primer sarà marcato con un fluoroforo
- 3) Elettroforesi del frammento amplificato, effettuata mediante elettroforesi su capillare (stesso apparato usato per il sequenziamento), che permette la separazione per dimensione degli alleli di ogni individuo.
- 4) Confronto tra i profili di diversi individui: numero di alleli diversi tra due individui per ogni locus, frequenza dei singoli alleli in diversi gruppi di individui.
- 5) Analisi dei dati.

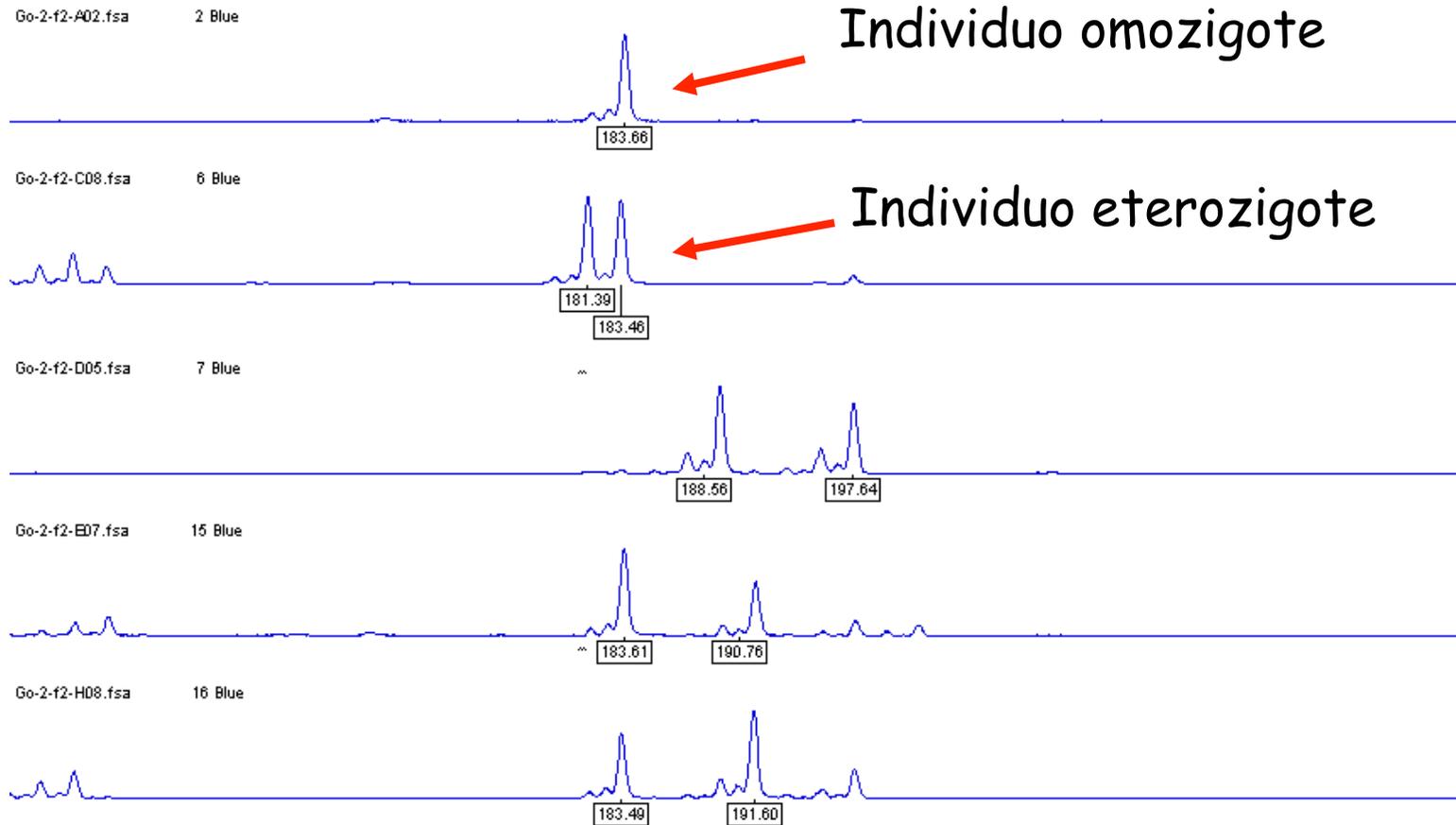
# DNA nucleare. Marcatori microsatellite.

## Elettroforesi su capillare

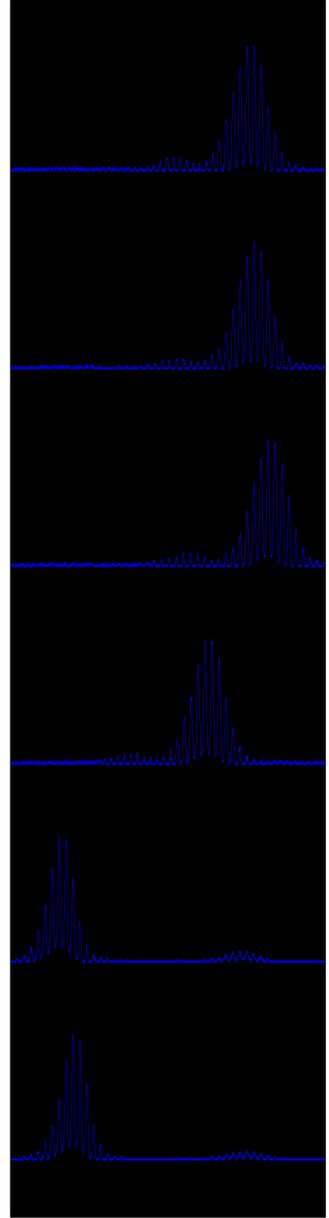
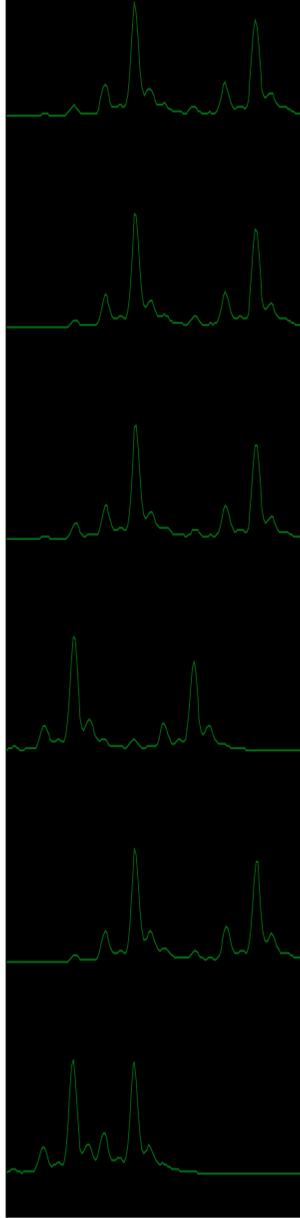
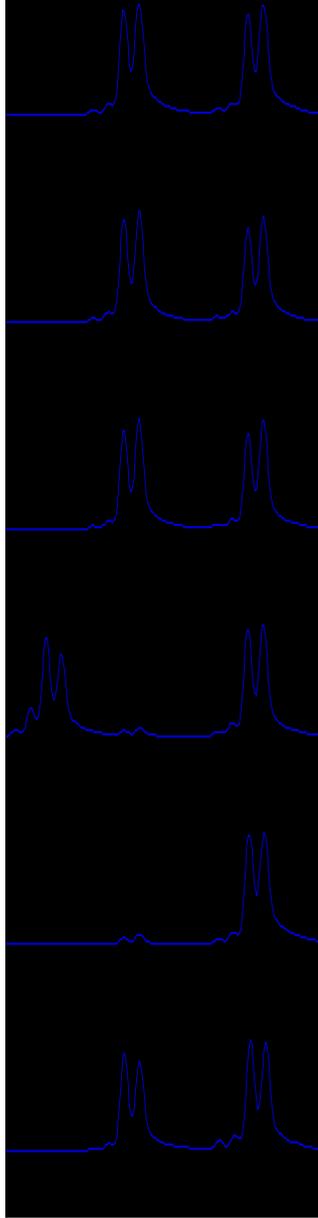
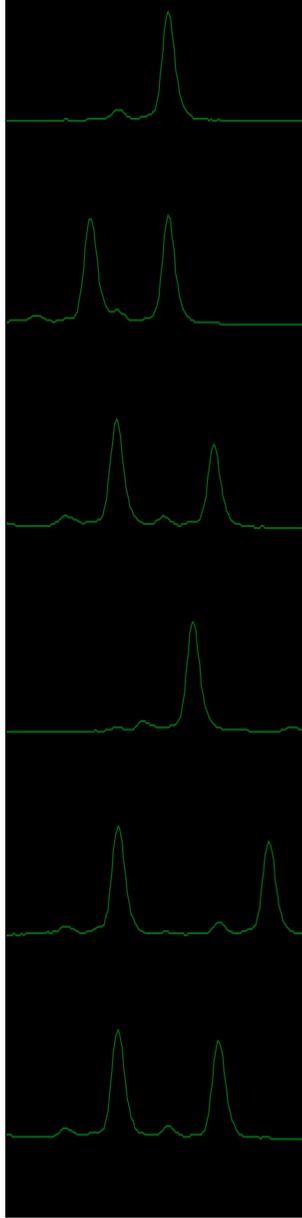


# DNA nucleare. Marcatori microsatellite.

Risultato elettroforesi su capillare. Es. da sequenziatore ABI, visualizzato con Genotyper



Da questo si ricava facilmente il genotipo di ogni singolo individuo.



## Ricapitolando ...

**DNA mitocondriale. Sequenziamento.** Facile e veloce. Livello di variabilità che può essere limitante. Aploide (vantaggio 1 sola sequenza per individuo, svantaggio porta informazione sulla sola linea matrilineare se l'eredità è uniparentale materna).

es. Ind 1. AATGCATGAT  
Ind 2. ATTGCATGAT  
Ind 3. ATTGTATGAT

**DNA nucleare. Sequenziamento.** Più complicato ma potentissimo ( $3 \cdot 10^9$  basi a disposizione nell'uomo...). Diploide.

es. Ind 1. AATGCATGAT/AATGCATGAT  
Ind 2. ATTGCATGAT/AATGCATGAT  
Ind 3. ATTGTATGAT/AATGCATGAT

**DNA nucleare. Microsatelliti.** Molto variabili (troppo per alcune applicazioni).

Investimento iniziale costoso. Ogni locus microsatellite fornisce come risultato un profilo genotipico in cui è registrata la dimensione dei due alleli dell'individuo esaminato.

es. Ind 1. 182/184 ....202/204 .... 124/136  
Ind 2. 182/182.....206/210.....138/142  
Ind 3. 182/186.....202/208.....142/142