

## 9. Určení bakterie rodu *Borrelia* pomocí DNA sekvenace

### Úvod

Co je sekvenování DNA? Pod pojmem sekvenování DNA nebo také „čtení“ DNA se rozumí určení přesného pořadí neboli sekvence jednotlivých nukleotidových bází (resp. nukleotidů) v úseku DNA. Provádí se nejčastěji na principu Sangerovy metody nebo nověji pomocí cyklického sekvenování na termocykleru.

Princip sekvenování. Základem obou metod je amplifikace (namnožení) vlákna DNA, jehož sekvenci chceme znát. Sangerova metoda využívá schopnosti enzymu DNA polymerázy stavět k tomuto tzv. templátovému vláknu komplementární řetězec DNA. Nezbytná je přítomnost vhodného oligonukleotidového primeru jako základu nového vlákna DNA a čtyř typů 2', 3'-dideoxyribonukleosidtrifosfátů ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), kterým chybí na 3' uhlíku ribosy hydroxylová skupina. Díky tomu již nemůže DNA polymeráza při syntéze nového vlákna na tento konec navázat žádný další nukleotid a růst tohoto řetězce se zastaví. Pokaždé tedy, když polymeráza začlení určitý dNTP (např. dATP deoxyadenosintrifosfát) do rostoucího řetězce, je určitá pravděpodobnost, že místo dATP využije ddATP (2', 3'-dideoxyadenosintrifosfát) a v tom případě polymerace končí. Pokud reakce probíhá dostatečně dlouho, získáme tak mnoho různě dlouhých oligonukleotidů, které budou všechny končit adeninem. Po skončení reakce je možné výsledné produkty (kterými jsou různě dlouhé úseky DNA) rozdělit v gelu a zjistit tak délku nově vzniklého řetězce, přičemž délka odpovídá počtu bází od 5'-konce nového řetězce až do místa, kde se vyskytl ddNTP (v našem případě ddATP).

Moderní sekvenování je již plně automatizováno. Reakce probíhá v termocykleru také pomocí DNA polymerázy a vyhodnocení výsledných produktů provádí přístroje sekvenátory, ve kterých se využívá 2', 3'-dideoxyribonukleosidtrifosfátů, které jsou značeny různými fluorescenčními barvami (pro každou bázi je jiná barva). Výslednou sekvenci DNA pak přístroj určuje na základě tohoto barevného značení, a to na principu laserové detekce emise fluorescenčních barev pomocí fotonásobiče a velmi citlivého detektoru přímo z gelu.

Význam sekvenování. Sekvenování DNA se využívá například ve výzkumu biologických procesů, dále třeba v aplikovaných oborech, jimiž jsou diagnostika nemocí či forenzní medicína. Sekvenování se uplatnilo také v projektu čtení lidského genomu (Human Genome Project), ale přečteny byly genomy i jiných organismů, včetně

různých rostlin, živočichů a mikrobus. Někdy se sekvenují pouze určité části genomu, které mají pro výzkum v daném okamžiku význam.

U vzorků klíšťat, u nichž byla detekována přítomnost borélií je nutné pro získání specifického templátu pro sekvenaci provést následnou jednokrokovou PCR, v případě vzorků s nízkou koncentrací vstupní DNA, dvoukrokovou PCR.

*Materiál:*

Vzorek izolované DNA  
KAPPA 2G ready mix  
primery B01, B02, B03, B04  
PCR voda  
Shrimp Alkaline Phosphatase  
Exonuclease I *E.coli*  
BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit  
Chemagic SEQ Pure Kit

**Amplifikace izolované DNA pomocí nested-PCR – 1. krok**

Do zkumavky napipetujeme následující reagenty, zkumavce krátce promícháme a stočíme.

*Reagenty:*

KAPPA ready mix	12,5 µl
primer B03	0,5 µl
primer B04	0,5 µl
voda	6,5 µl
<hr/>	
vzorek	5 µl

Mikrozkumavku vložíme do termocykléru a spustíme následující teplotní protokol:

		95°C – 15 s (denaturace)
1x	95°C – 2,5 min	30x 56°C – 15 s (annealing)
		72°C – 20 s (extenze)

### Gelová elektroforéza:

Po PCR naneste 5 ul amplifikátu na připravený 1,5 % agarózový gel v elektroforetické vaně. Vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 60 minut při konstantním napětí 80V.

Poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transiluminátoru k vyhodnocení. U slabě pozitivních vzorků proveďte druhý krok nested-PCR.

### **Amplifikace izolované DNA pomocí nested-PCR – 2. krok**

Do zkumavky napipetujeme následující reagenty, zkumavce krátce promícháme a stočíme.

KAPPA ready mix	12,5 µl
primer B01	0,5 µl
primer B02	0,5 µl
voda	10,5 µl
<hr/>	
vzorek (amplifikát)	1 µl

### Amplifikace:

Mikrozkumavku vložíme do termocykléru a spustíme následující teplotní protokol:

		95°C – 15 s (denaturace)
1x	95°C – 2,5 min	30x 60°C – 15 s (annealing)
		72°C – 20 s (extenze)

### Gelová elektroforéza:

Po PCR naneste 5 ul amplifikátu na připravený 1,5 % agarózový gel v elektroforetické vaně. Vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 60 minut při konstantním napětí 80V.

Poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transiluminátoru k vyhodnocení. Sekvenaci následně neprovádějte u vzorků s velmi slabým signálem.

## **1. Přečištění amplifikované DNA pomocí metody ExoSAP**

Jedná se o purifikaci pomocí enzymů exonukleázy I a alkalické fosfatázy, které odstraňují nezreagované primery a dNTP z reakce.

Do zkumavky napipetujeme následující reagenty, zkumavku krátce promícháme a stočíme.

1  $\mu$ l SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)

0,5  $\mu$ l Exonuclease I *E.coli*

5,5  $\mu$ l amplifikované DNA

Mikrozkumavku vložíme do termocykléru a spustíme následující teplotní protokol:

37 °C 15 min

80 °C 15 min

10 °C hold

## **2. Příprava sekvenační reakce**

Používá se BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Obsah tohoto kitu tvoří sekvenační pufr a sekvenační mix.

Základní složky sekvenačního mixu:

*DNA polymerasa*

*deoxyribonukleosidtrifosfáty* (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

*2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfáty* (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP)

Do zkumavky napipetujeme následující reagenty, zkumavku krátce promícháme a stočíme.

0,6  $\mu$ l primeru

2,0  $\mu$ l sekvenačního pufru

2,0  $\mu$ l sekvenačního mixu

3,0  $\mu$ l DNA

2,4  $\mu$ l PCR vody

Mikrozkumavku vložíme do termocykléru a spustíme následující teplotní protokol:

96 °C 1 min  
96 °C 10 sek  
50 °C 5 sek            35x  
60 °C 4 min  
  
15 °C hold

### **3. Přečištění sekvenační reakce**

DNA přečistíme pomocí purifikačního kitu Chemagic SEQ Pure Kit:

1. Napipetujte 10 µl (promíchaných) magnetických částic na destičku (destička s okraji), přidejte 10 µl DNA a 150 µl Binding Buffer 1.
2. 4-5x pipetou promíchejte směs a inkubujte 2 min při pokojové teplotě (delší inkubace může vést k navázání neinkorporovaných barviv na částice): 1 min 30 sek inkubace, 30 sek zabere následné umístění na magnet (v bodě 3).
3. Po inkubaci separujte magnetické částice umístěním destičky na magnet tak, aby se hroty magnetu dotýkaly jamek destičky ze strany. Počkejte, než se částice k magnetu přitáhnou, odsajte supernatant (!!! důležité odsát všechn !!!) a poté oddělte destičku z magnetu.
4. Přidejte 100 µl Wash Buffer 2, vložte destičku na magnet, několikrát ji přesuňte přes hroty magnetu a poté posaďte na hroty. Důkladně rozsuspendujte částice propipetováním (4x).
5. Inkubujte 2 min při pokojové teplotě.
6. Oddělte magnetické částice vložem na magnet tak, aby se hroty magnetu dotýkaly jamek destičky ze strany a odsajte supernatant (!!! odsát všechn).
7. Promyjte částice ještě jednou 100 µl Wash Buffer 2, nechte stát 2 min, poté vložte na magnet a několikrát přehoďte přes hroty magnetu (kuličky jsou nyní na boku jamky).
8. Úplně odstraňte supernatant.
9. Oddělte destičku z magnetu a nechte částice vysušit zhruba 10 min při pokojové teplotě. K částicím přidejte 20 µl vody (nechte protéct přes kuličky) a pipetou směs rozsuspendujte.

10. Nechte stát 5 min při pokojové teplotě a občas promíchejte (zhruba po 2 minutách), aby se DNA lépe uvolnila.
  11. Po eluci separujte magnetické částice přiložením na magnet na 2 min tak, aby se hroty magnetu dotýkaly jamek destičky ze strany, lehce povytáhněte destičku a zase spustěte dolů, aby se kuličky nacházely na straně jamky (kuličky lehce povylezou nahoru).
  12. Přeneste eluát obsahující purifikovanou DNA do nové destičky na sekvenaci (destička bez okrajů).
  13. Nechte denaturovat 2 min při 95 °C.
  14. Hned poté zchladěte v mrazáku cca 1 min.
- DNA připravena na sekvenaci.

#### **4. Analýza sekvenační reakce v sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer**

Spustit sekvenátor.

Program 3130 Data Collection v3.0: po levé straně rozkliknout kolonku ga3130 – Plate Manager – New (založit novou destičku) – Name (pojmenovat destičku, např. SeqPlate45), Application (vybrat z nabídky: SequencingAnalysis), Plate Type (vybrat z nabídky: 96-Well), Owner Name, Operator Name (jméno toho, kdo s destičkou pracuje), OK.

V otevřeném okně SequencingAnalysis Plate Editor: Sample Name (název vzorku), Results Group 1 (vybrat z nabídky: sekvenace), Instrument Protocol 1 (vybrat z nabídky: BDT1.1\_36\_POP7\_Ultra), Analysis Protocol 1 (vybrat z nabídky: BDT1.1), OK.

Programu 3130 Data Collection v3.0: vlevo rozkliknout kolonku 3130 – Run Scheduler – Plate View – Find All (najít námi založenou destičku SeqPlate45), vložit odpovídající destičku do sekvenátoru, vpravo kliknout na obrázek destičky se žlutými políčky, která zezelenají, pokud si odpovídá námi zadaná destička s destičkou vloženou do sekvenátoru, v horní liště kliknout na zelené tlačítko Start, OK

Po skončení běhu otevřít program Sequencing Analysis 5.3.1 – Add Samples - kliknout na zelené tlačítko Start (zhodnocení správnosti výsledků)

## **5. Vyhodnocení výsledků**

Program Sequence Scanner v1.0 – Import Traces – Add Selected Traces – OK

Danou sekvenci otevřít kliknutím na myš

Výsledné sekvence se zkopírují do databáze BLAST (dostupné na internetu)

1. Webová stránka <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
2. Basic BLAST - zvolte program nucleotide BLAST
3. Enter Query Sequence – vložte sekvenci
4. Choose Search Set - zatrhněte Others (nr etc.)
5. Klikněte na „BLAST“

Ve výsledné tabulce najdete podle parametru Max indent druh borélie, který se nejvíce shoduje s analyzovanou sekvencí (čím více procent, tím lépe). Pokud by se v procentech shodovaly dvě a více sekvencí, vyberete tu s vyšším skóre.