



# **Sekvenování nukleových kyselin a analýza DNA sekvencí**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

# ***Obsah přednášky***

- 1) Pojem sekvenování**
- 2) Maxamovo-Gilbertovo sekvenování**
- 3) Sangerova metoda s využitím fluoroforů**
- 4) Pyrosekvenování**
- 5) Nové přístupy k sekvenování**
- 6) Příklad reálné analýzy**



# *Doporučená literatura*

[www.farmakogenomika.cz](http://www.farmakogenomika.cz)

# ***Sekvenování***

## **Rozhodující metoda pro stanovení nukleotidových sekvencí**

- **Konečná fáze procesu individualizace jednotlivých izolátů**
- **Metoda je pro většinu mikrobiologických aplikací příliš přesná**

# ***Metody sekvenování nukleových kyselin***

**Chemická metoda sekvenování**  
(Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)

**Enzymová metoda sekvenování**  
(Sangerovo sekvenování)

**Pyrosekvenování**

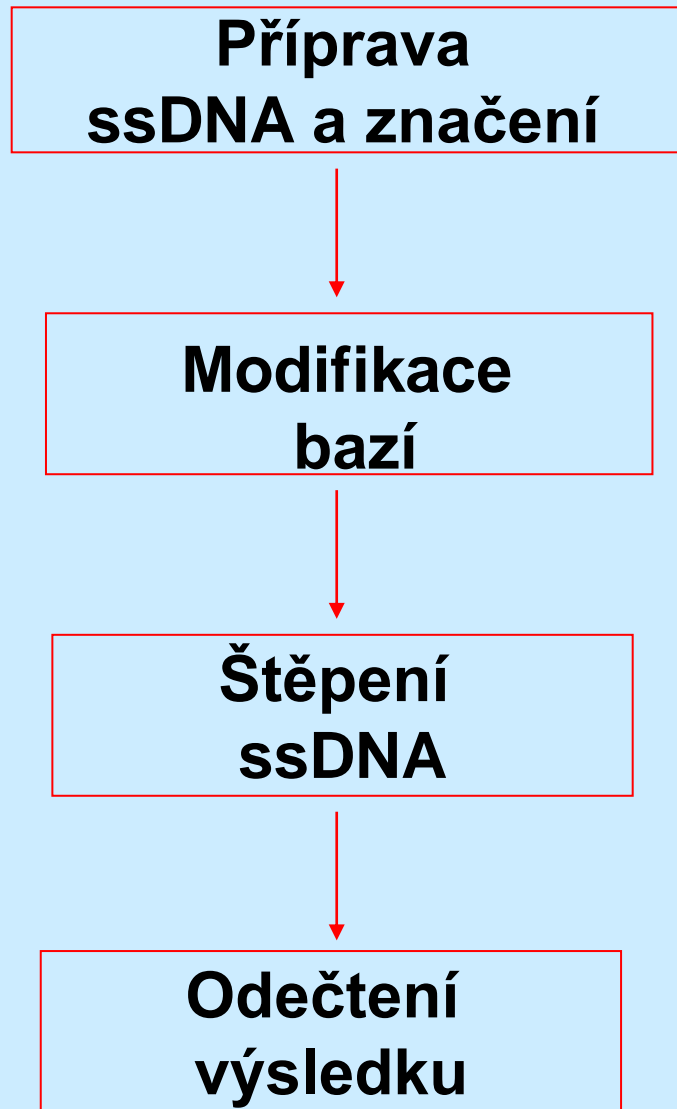
# ***Chemická metoda sekvenování*** ***(Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)***

Podstatou je specifické štěpení molekuly **ssDNA** po modifikaci jednotlivých bází chemickými činidly s následnou elektroforetickou detekcí v denaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Chemická činidla jsou **specifická** pro modifikaci určitých bází:

<b>G</b>	– DMS
<b>A+G</b>	– piperidin
<b>C+T</b>	– hydrazin
<b>C</b>	– hydrazin + NaCl

# *Chemická metoda sekvenování*





# Chemická metoda sekvenování

Příprava  
ssDNA a značení

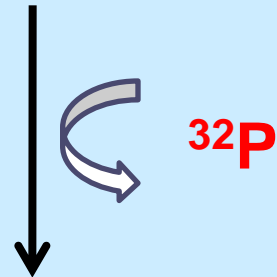


Modifikace  
bází

Asymetrická PCR

Využití vazby  
biotinylovaného primeru

Štěpení  
ssDNA



Odečtení  
výsledku



# Chemická metoda sekvenování

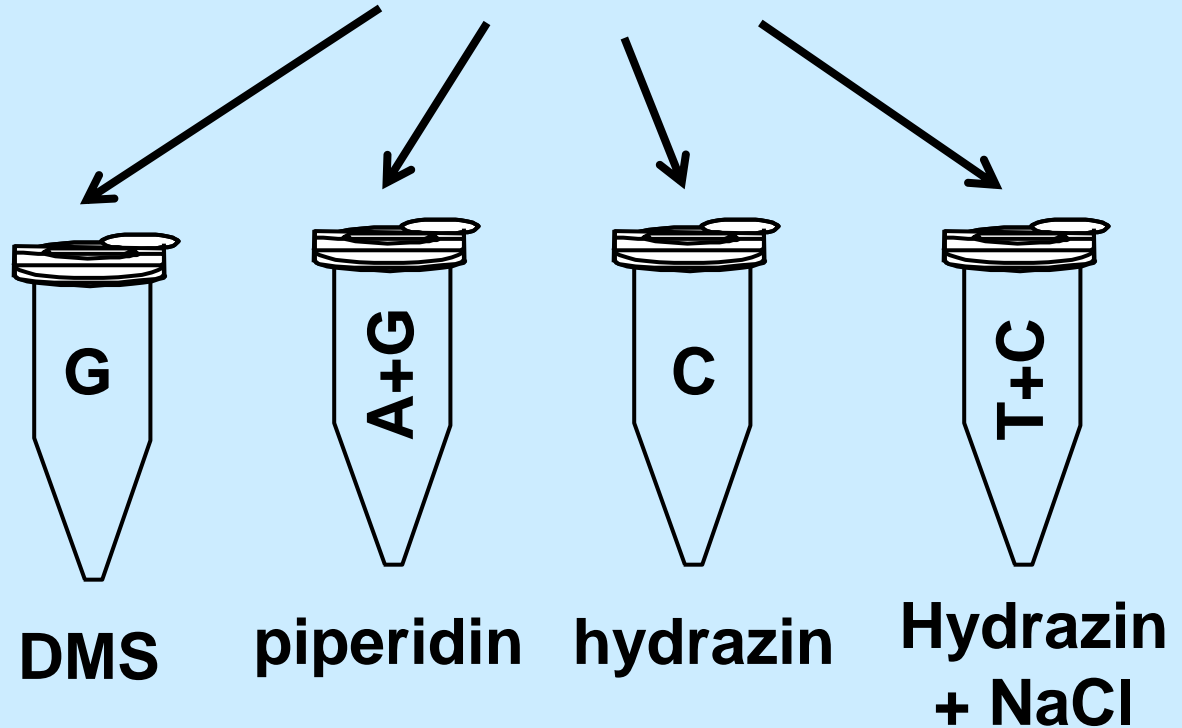
Příprava  
ssDNA a značení

Modifikace  
bází

Štěpení  
ssDNA

Odečtení  
výsledku

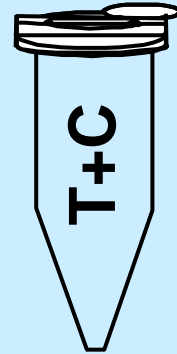
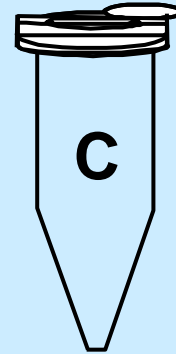
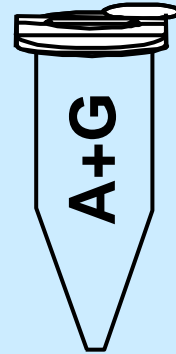
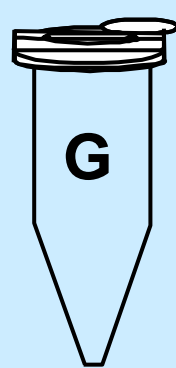
$^{32}\text{P}$  -GATCAGG - 3'



# Chemická metoda sekvenování

<sup>32</sup>P -GATCAGG - 3'

Příprava  
ssDNA a značení



DMS

piperidin

hydrazin

Hydrazin  
+ NaCl

Modifikace  
bází

Štěpení  
ssDNA

Odečtení  
výsledku

Štěpení piperidinem při vysoké teplotě

<sup>32</sup>P -GATCAGG/G

<sup>32</sup>P -G/ATCA/G/G

<sup>32</sup>P -GATC/AGG

<sup>32</sup>P -GAT/C/AGG

**<sup>32</sup>P** -GATCAGG - 3'

**G**

DMS



**<sup>32</sup>P** -GATCAG  
**<sup>32</sup>P** -GATCAGG

**A+G**

piperidin



**<sup>32</sup>P** - GA  
**<sup>32</sup>P** - GATCA  
**<sup>32</sup>P** - GATCAG  
**<sup>32</sup>P** - GATCAGG

**T+C**

hydrazin



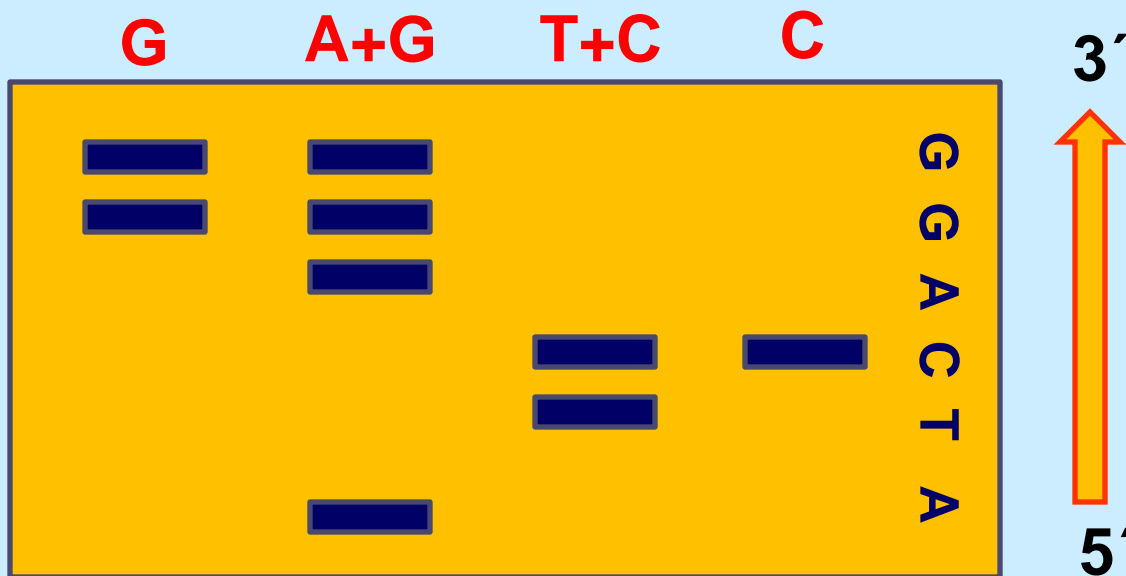
**<sup>32</sup>P** - GAT  
**<sup>32</sup>P** - GATC

**C**

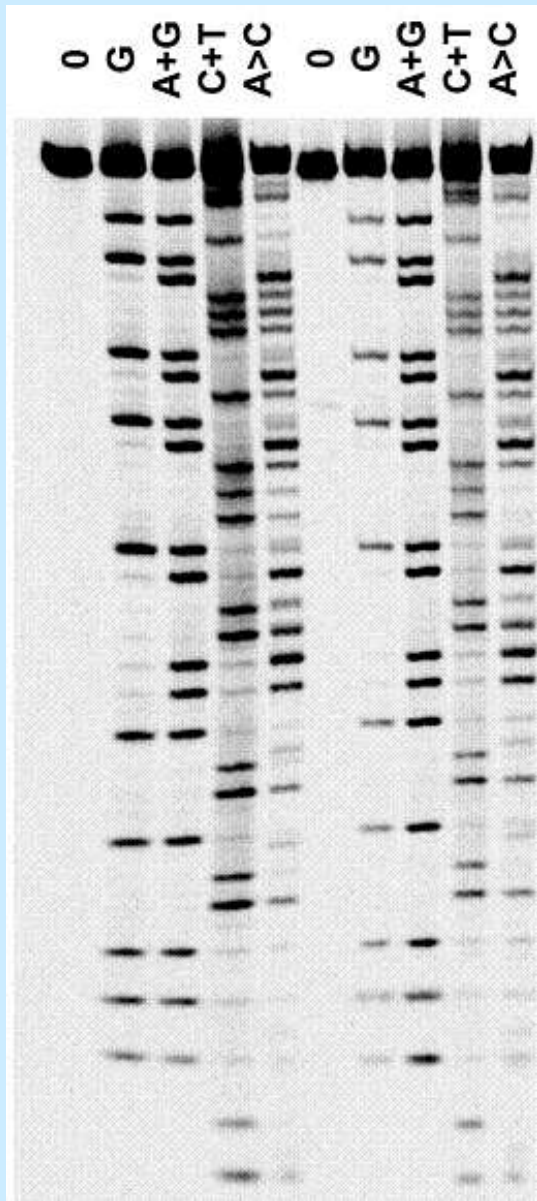
Hydrazin  
+ NaCl



**<sup>32</sup>P** - GATC



# Reálný výsledek chemické metody sekvenování



Převzato z:

Site-specific DNA transesterification catalyzed by a restriction enzyme

Giedrius Sasnauskas\*, Bernard A. Connolly†, Stephen E. Halford‡, and Virginijus Siksnys\*§

\*Institute of Biotechnology, Graiciuno 8, Vilnius, LT-02241, Lithuania; †Institute for Cell and Molecular Biosciences, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom; and ‡Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD, United Kingdom

# Úkol



Z výše uvedeného záznamu odečtěte výslednou nukleotidovou sekvenci

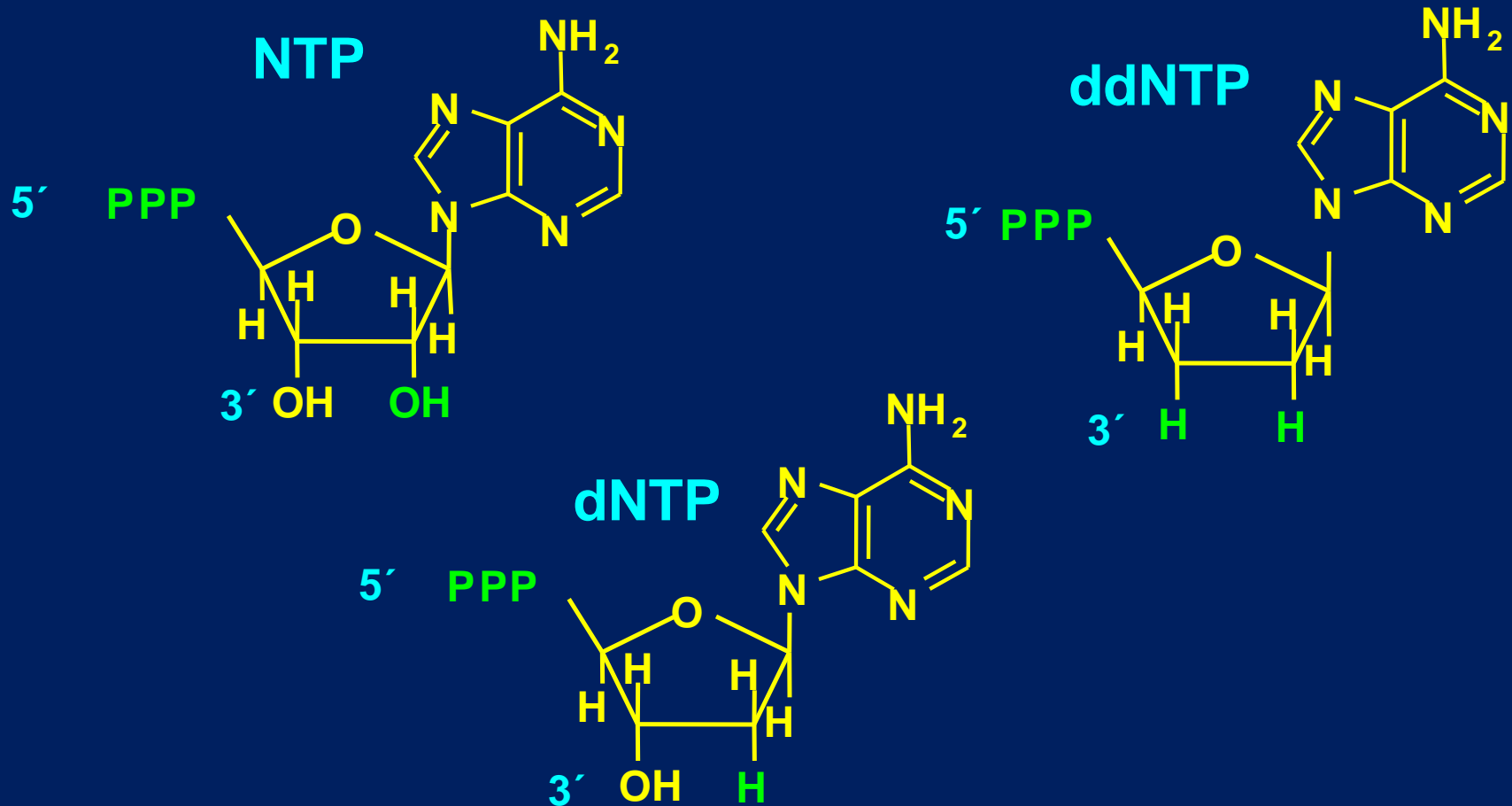
Výsledek bude tedy asi tento

.....

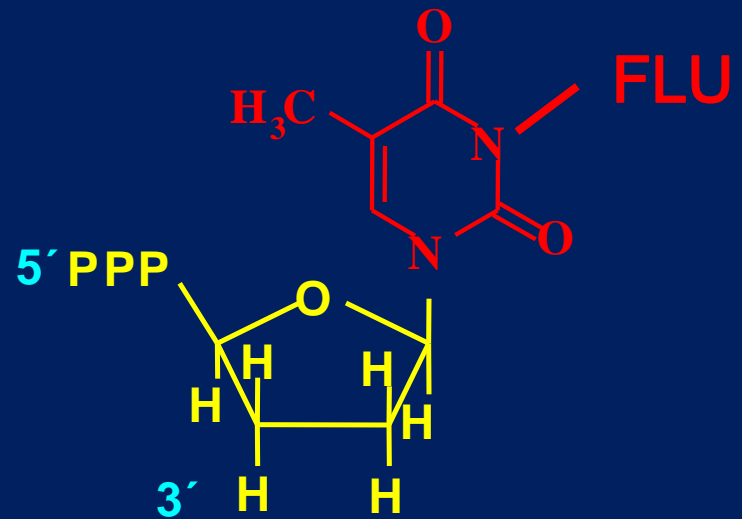
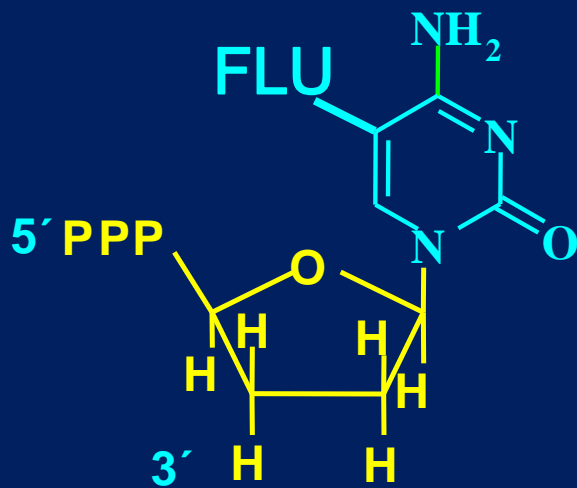
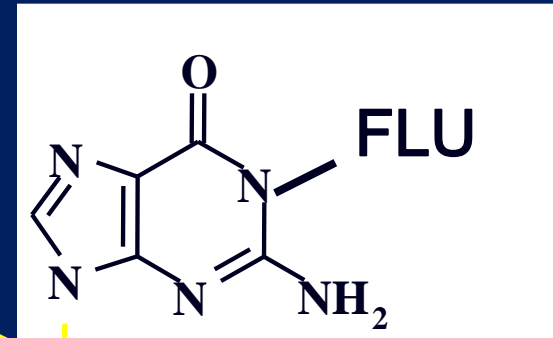
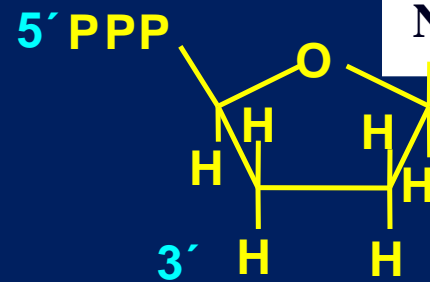
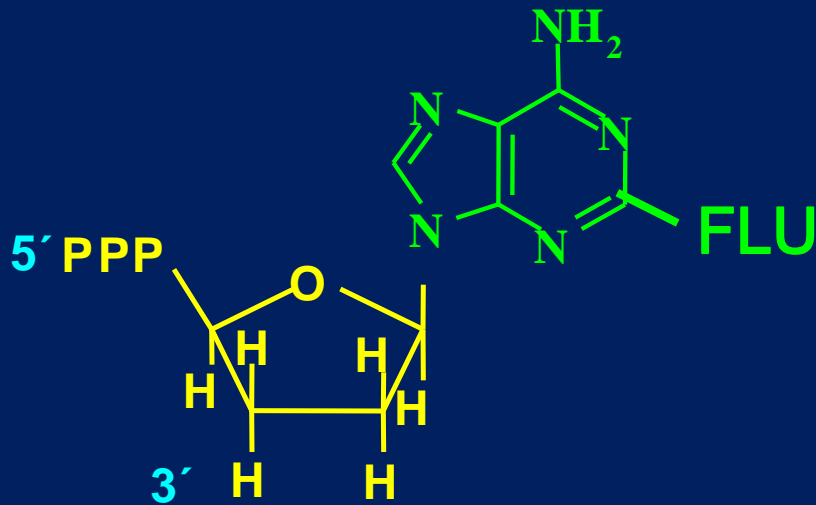


# Sangerova metoda

## dideoxyterminátory



# Dideoxyterminátory





# *Průběh sekvenování*

1. denaturace (92-96°C)



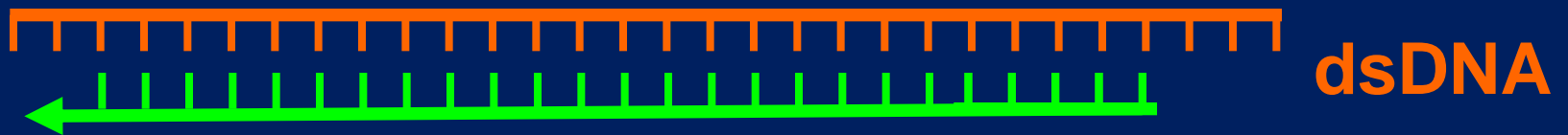
2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)



# *Průběh sekvenování*

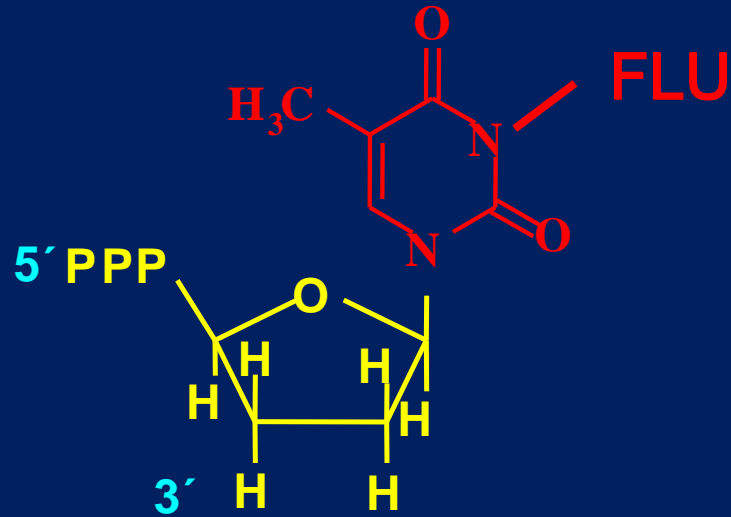
1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

3. extenze (72°C)

# Zařazování ddTTP



TTTTTGTCAAATCGGTGTAAACGGT

TTTTTGTCAAATCGGTGT

TTTTTGTCAAATCGGT

TTTTTGTCAAA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



# Zařazování dalších ddNTP

TTTTTGTCAAATCGGTGTA

TTTTTGTCAA

TTTTTGTCAA

TTTTTGTCA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



TTTTTGTCAAATCGGTGTAAAC

TTTTTGTCAAATCC

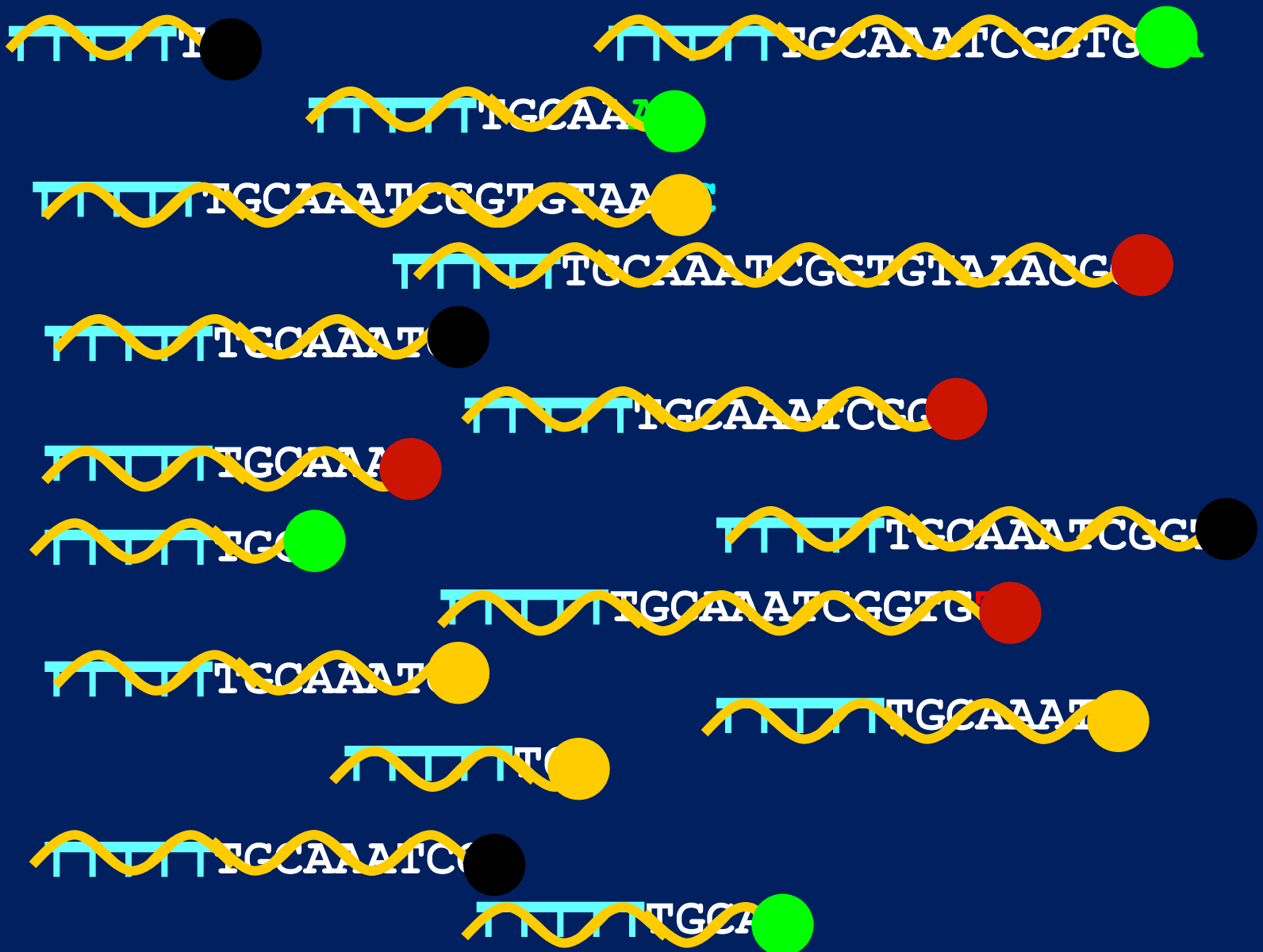
TTTTTGTCAAATC

TTTTTGTCA

ATGCTACGTTTAGCCACATTTGCCATATGAACCT



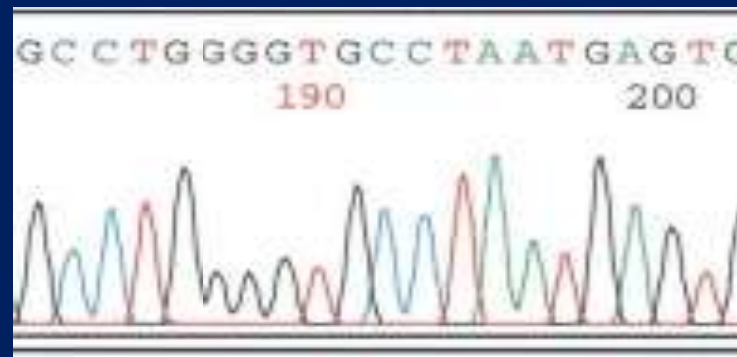
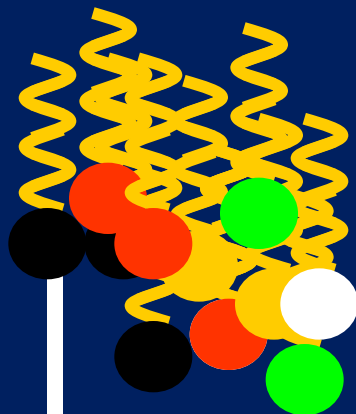
# Výsledek sekvenování



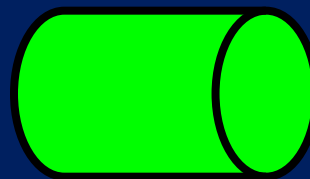
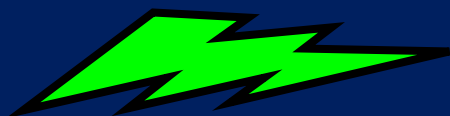
# *Následuje rozdělení fragmentů*



# Následuje rozdělení fragmentů

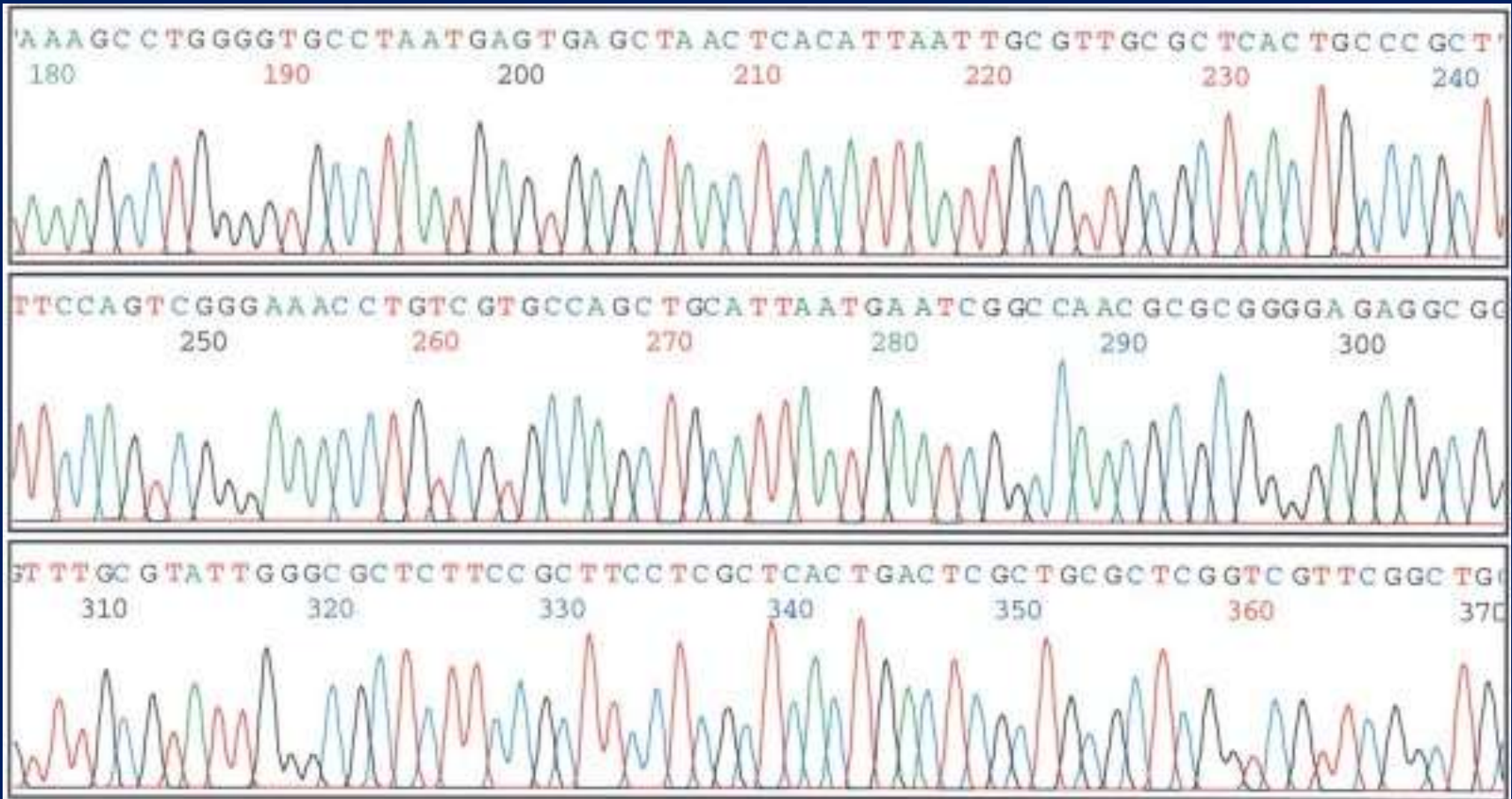


LASER



DETEKTOR

# Sekvenování - záznam





# *Kapilární gelová elektroforéza*



- rozdělí produkty sekvenování podle velikosti
- detekuje fluorofory laserem

# Úkol

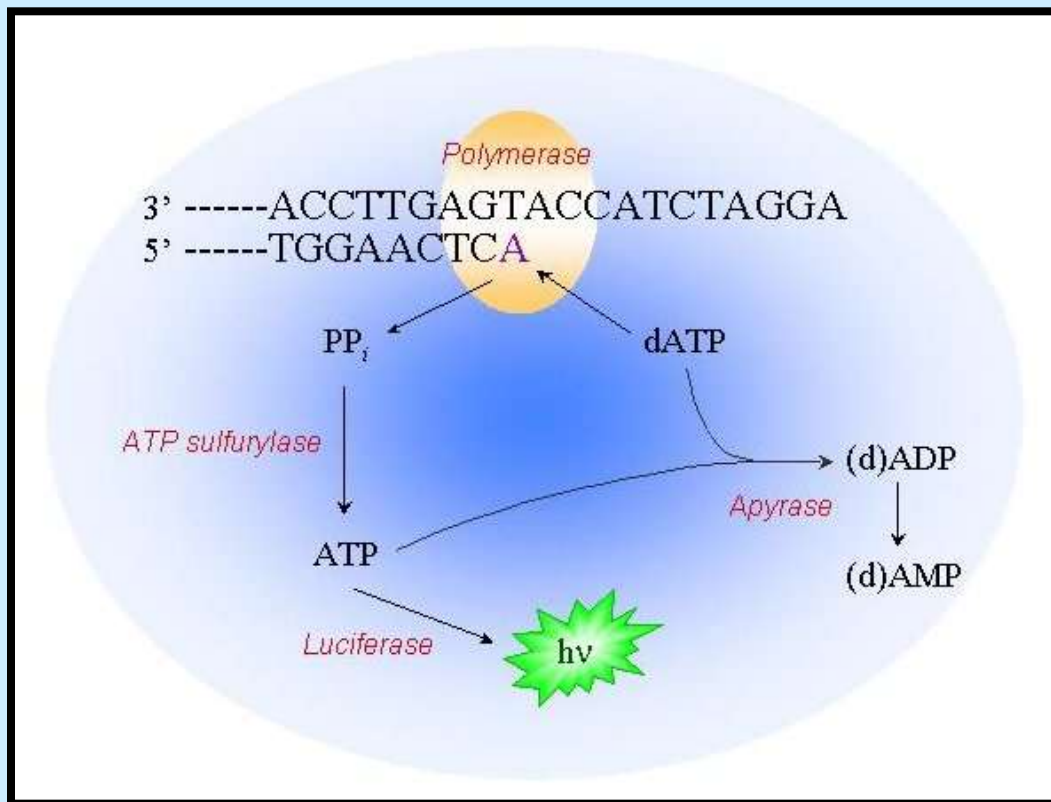


Na základě výsledků sekvenování  
zařad'te izoláty bakterií čeledi  
*Pasteurellaceae*

Použijte výukový materiál

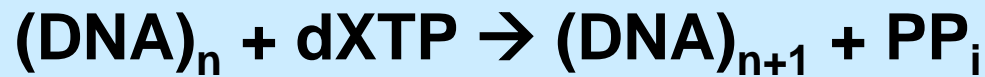
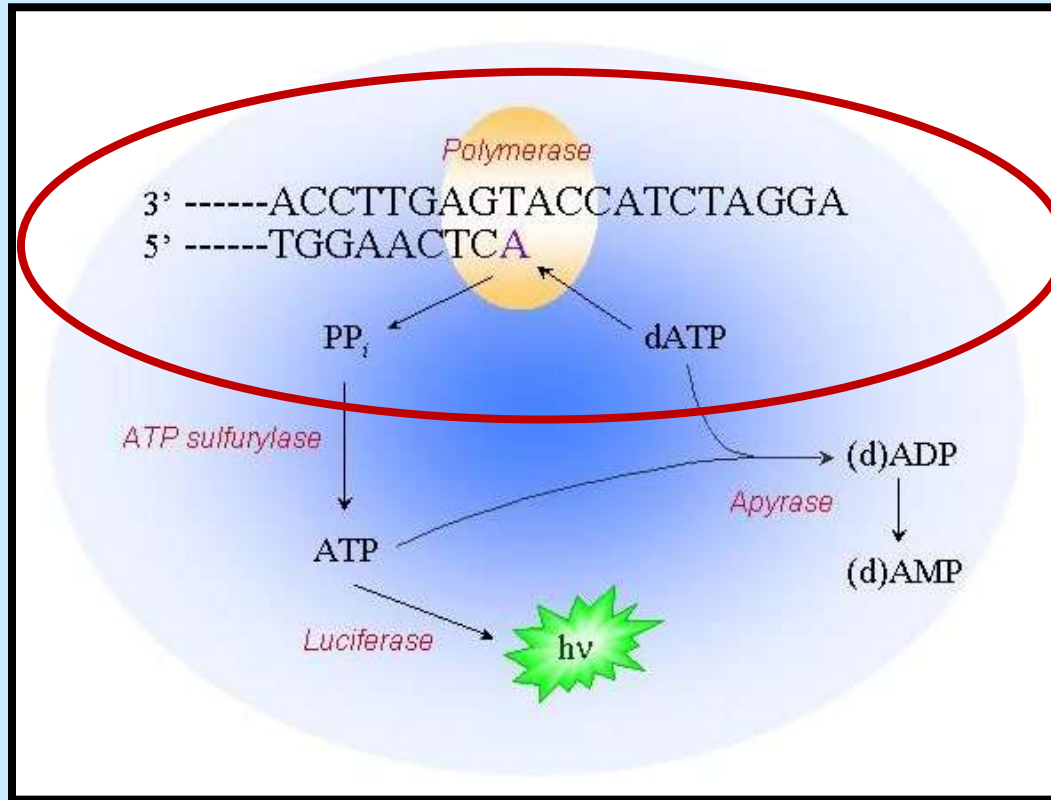
# Pyrosekvenování

- Metoda popsaná Mostafa Ronaghi et al. v roce 1990
- Určena pro krátké úseky DNA, SNP a úseky metylované



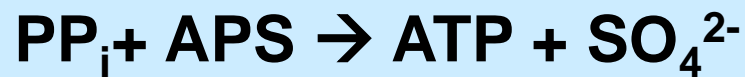
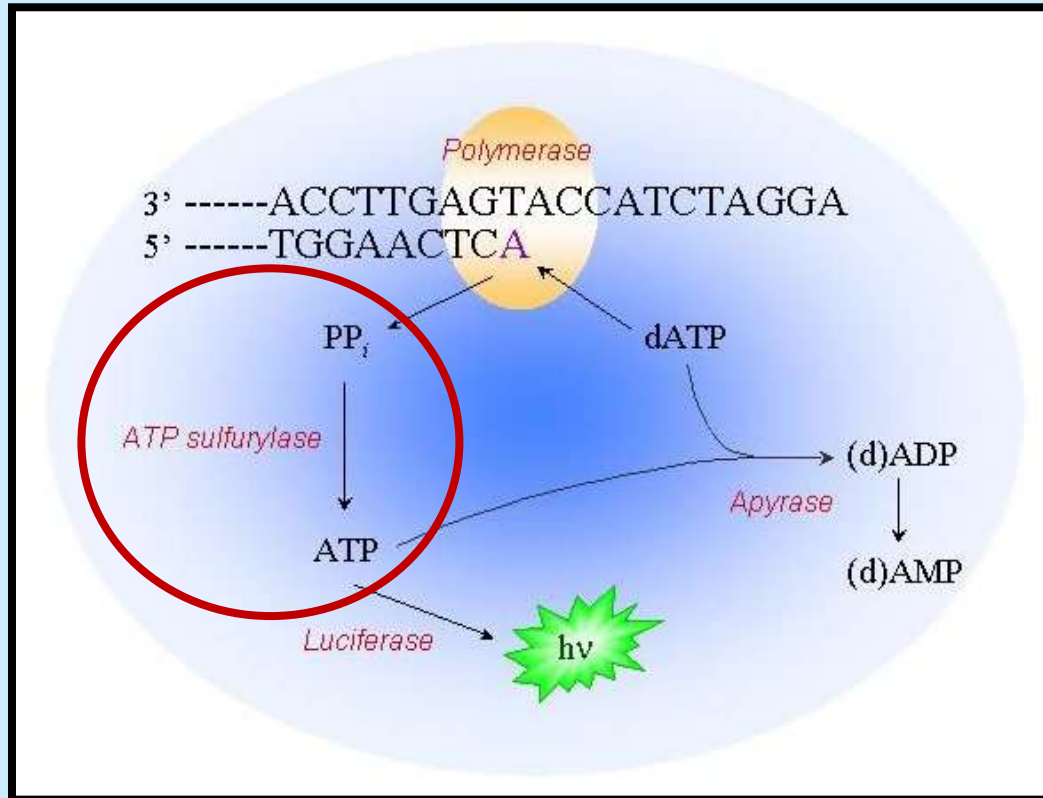
- 4 enzymy
- velmi přesná
- reakce se záhy „zahltí“

# Průběh pyrosekvenování



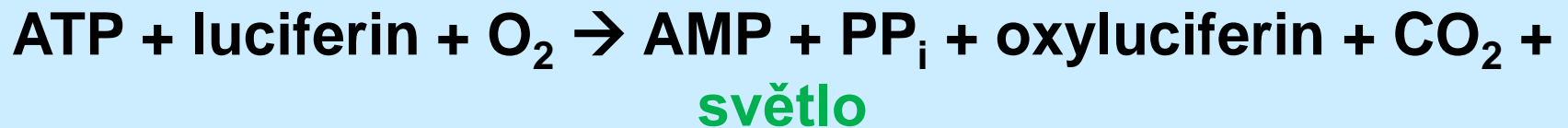
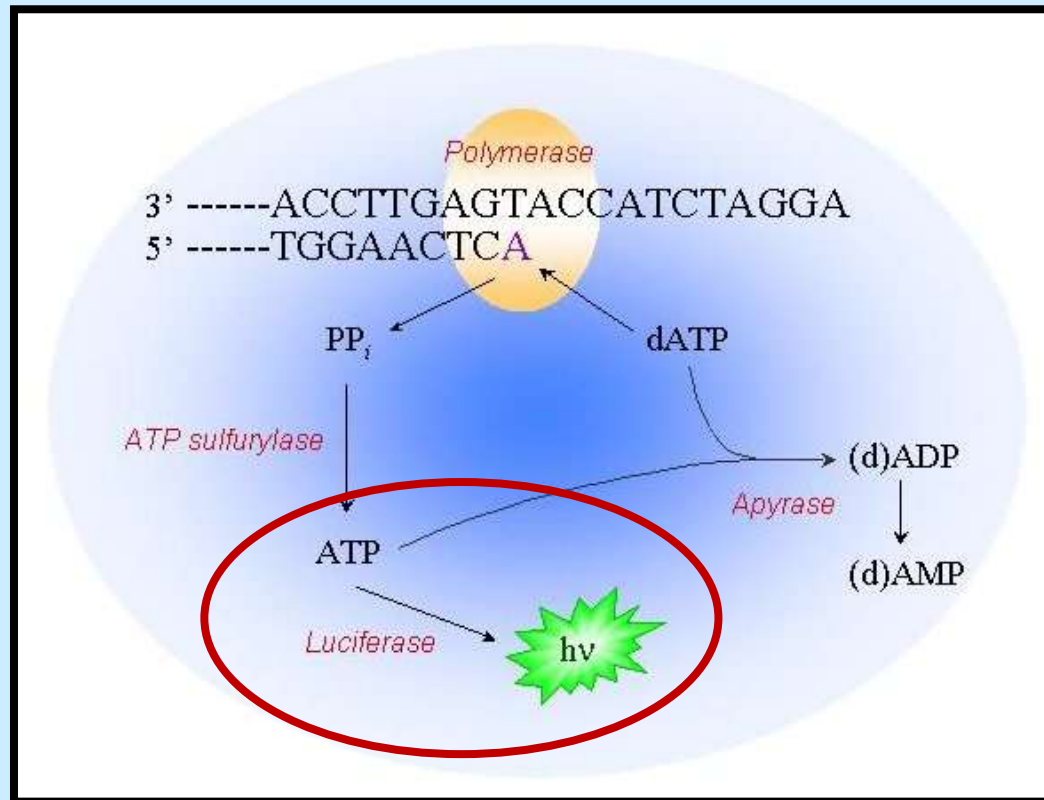
DNA polymeráza

# Průběh pyrosekvenování



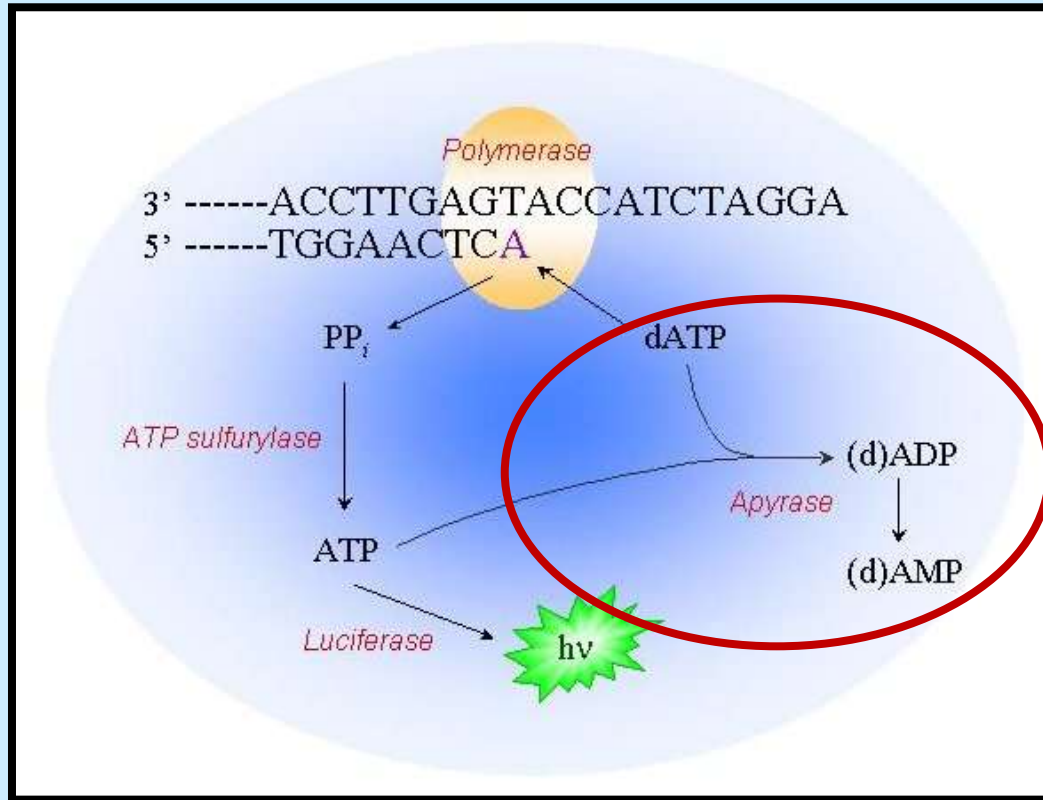
ATP sulfuryláza

# Průběh pyrosekvenování



Luciferáza

# Průběh pyrosekvenování



**dXTP → dXMP**

**apyráza**

# Parametry pyrosekvenování

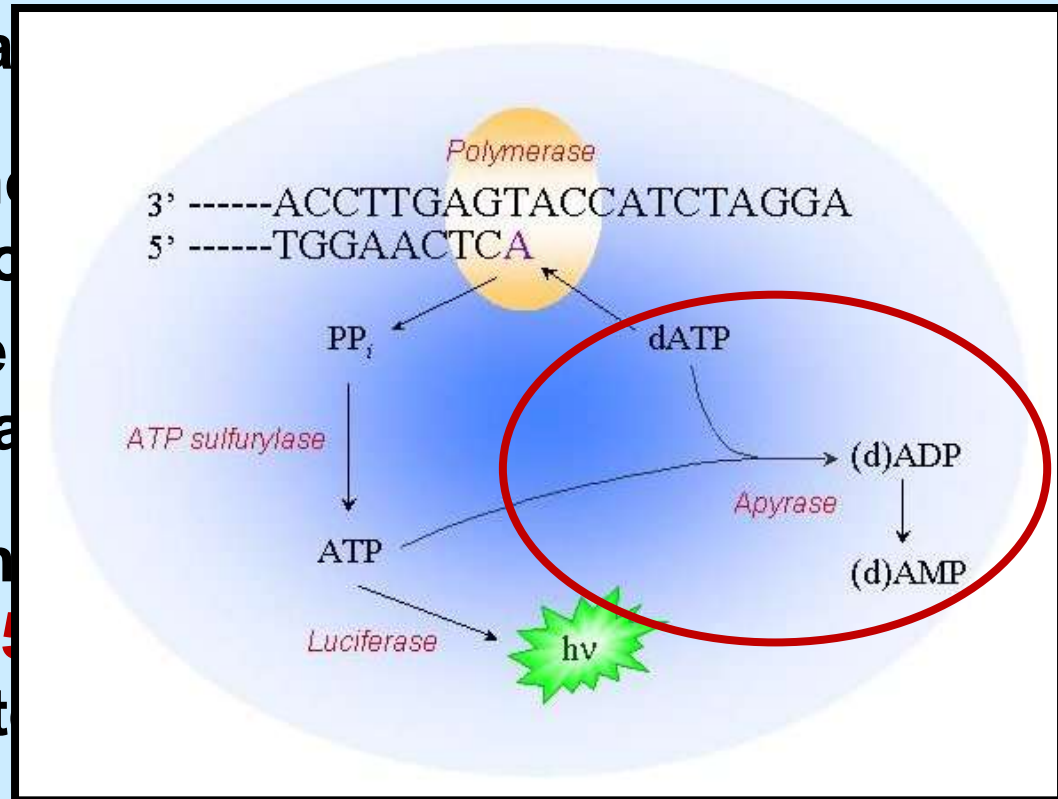
➤ žádné značené primery ani značené nukleotidy

➤ žádná elektroforéza

➤ Principem je uvolnění  
a emise viditelného světla

➤ Množství uvolněného  
množství zabudováno

➤ Namísto standardně  
**2'-deoxyadenosin-5'**  
který není substrát

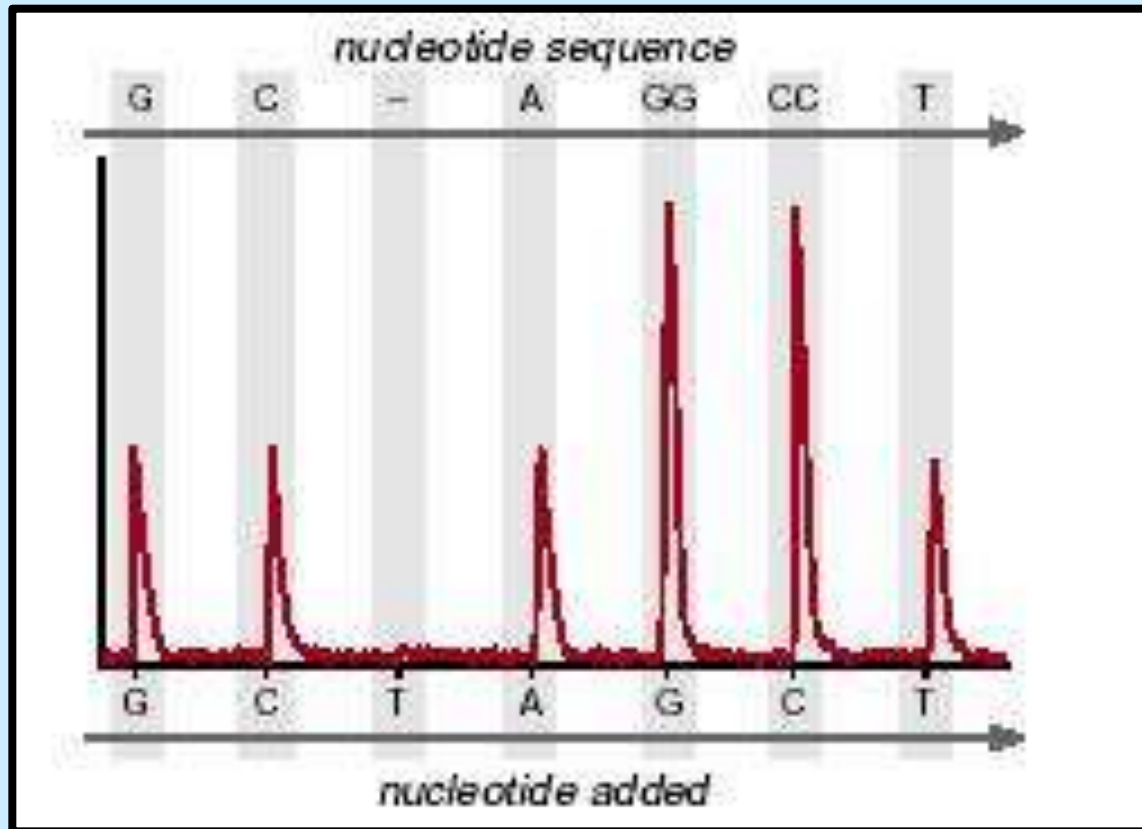


➤ Rychlost sekvenování = 1 báze za minutu

➤ Délka stanovené sekvence = 100 nukleotidů



# Pyrosekvenování - záznam



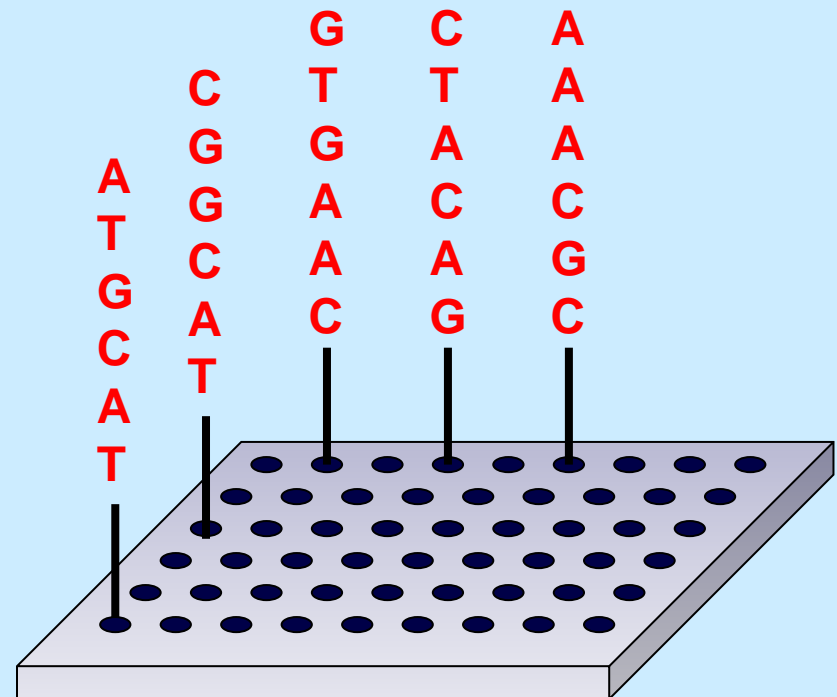
Intenzita signálu odpovídá počtu začleněných nukleotidů

# *Sekvenování pomocí hybridizace*

- **Nepřímá metoda využívající DNA čipů**
- **Výsledek odečten konfokálním mikroskopem**
- **Sekvence odečtena dedukcí**



T  
A  
C  
G  
T  
A



# Otázka



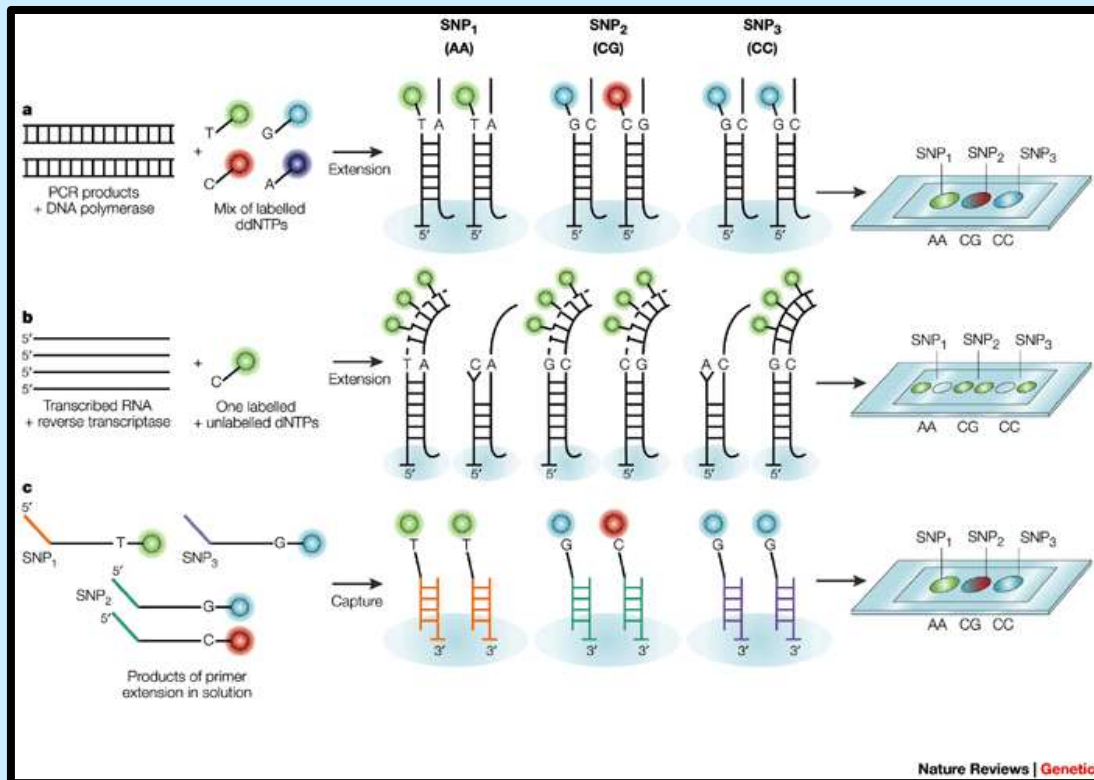
Kdyby byly na čipu naneseny 20 mery, kolik políček by musel obsahovat čip pro sekvenování 1 Mb?

Prý celkem  $1,112 \times 10^6$

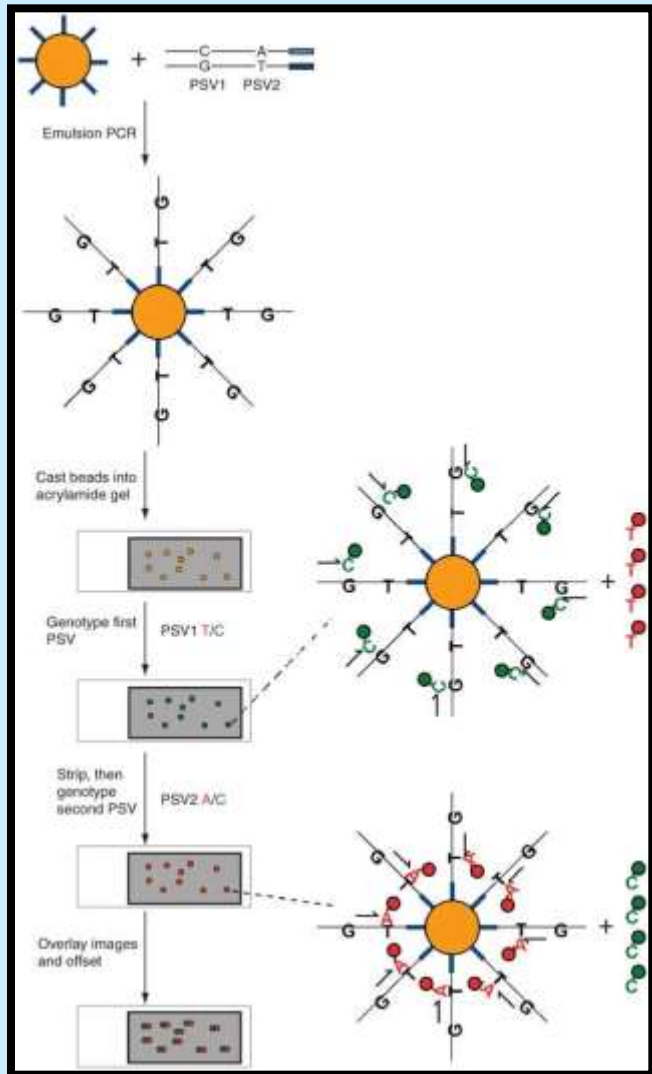


# Minisekvenování

- Metoda využívající technologie DNA čipu
- Využívá se pro stanovení jednoduchých nukleotidových polymorfismů
- Více variant, metoda je automatizovaná, multiplexní



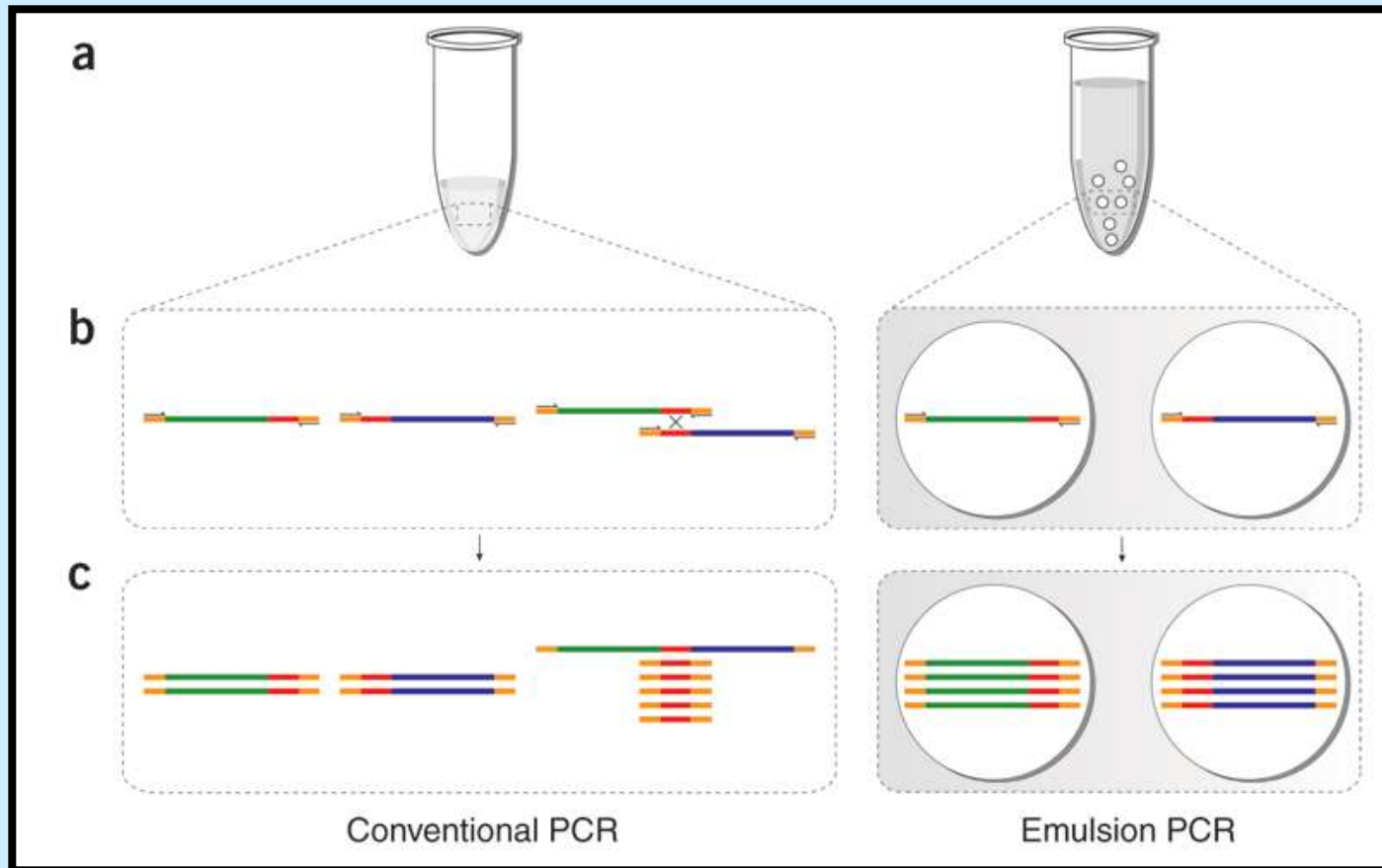
# Emulsní PCR



- Amplifikace probíhá v emulsi (voda-olej)
- DNA je fragmentována na úseky dlouhé 300-800 bp
- Jednotlivé matrice jsou navázány samostatně na povrch jednotlivých kapek obalených primery

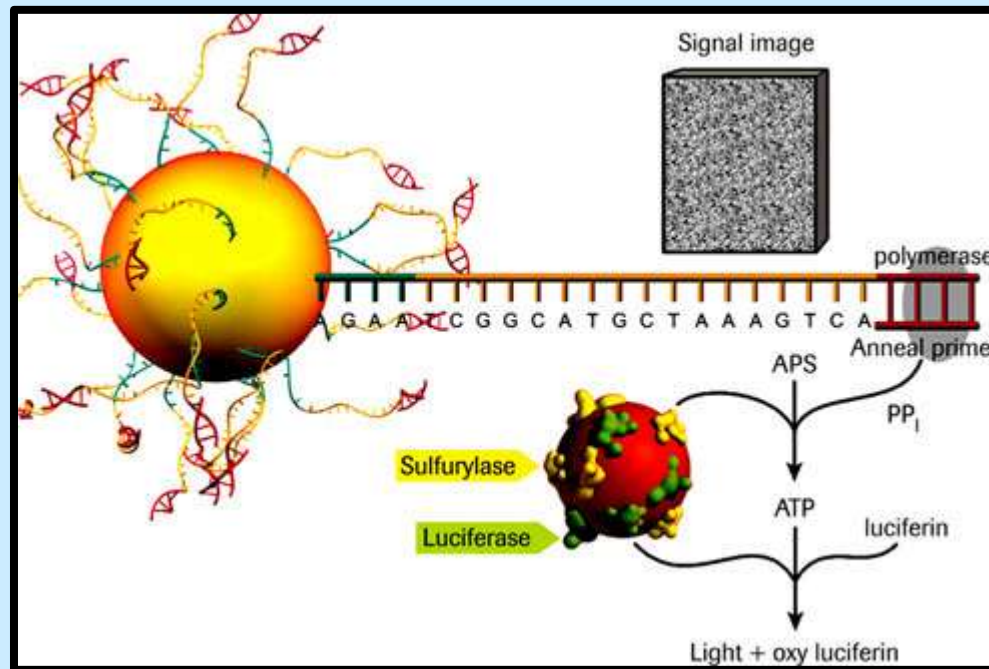
# Emulsní PCR

- Amplikon je výsledkem jedinečné PCR
- Méně nespecifických produktů



# *Komerční aplikace emulsní PCR*

## 454 sekvenční systém firmy Roche



- Produkty PCR jsou sekvenovány pyrosekvenováním

# ***454 sekvenční systém***

## **Základní kroky**

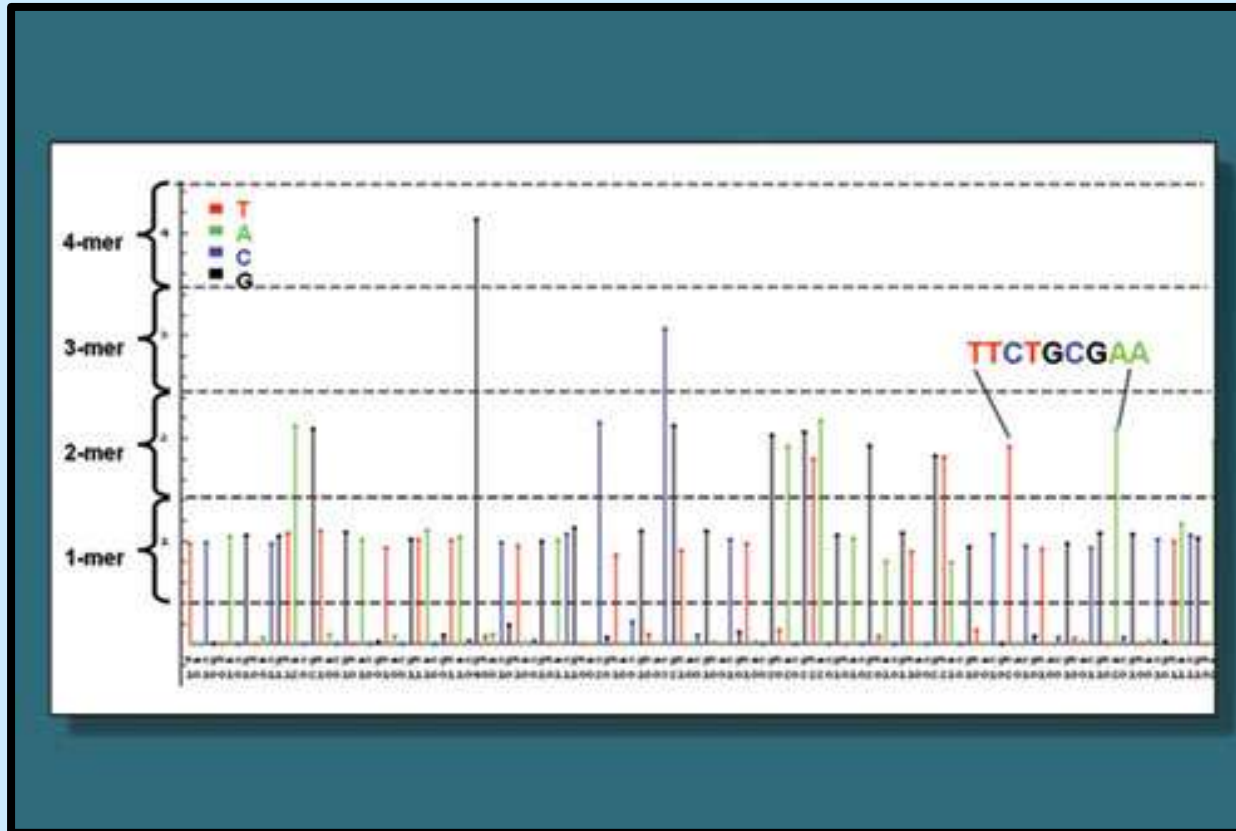
- **Tvorba jednořetězcových DNA matic**
- **Připojení adaptérů a vazba na pevné částice**
- **Amplifikace DNA matic v emulzi**
- **Vytvoření sekvenčních dat**
- **Analýza sekvencí různými nástroji bioinformatiky**

**Podívejte se na komerční prezentaci na stránkách  
<http://454.com/products/technology.asp>**



# 454 sekvenční systém

## Výsledný záznam



**Další moderní přístupy  
najdete na**

**<http://grf.lishtm.ac.uk/sequencing.htm>**

**SOLiD  
(Applied Biosystems)**

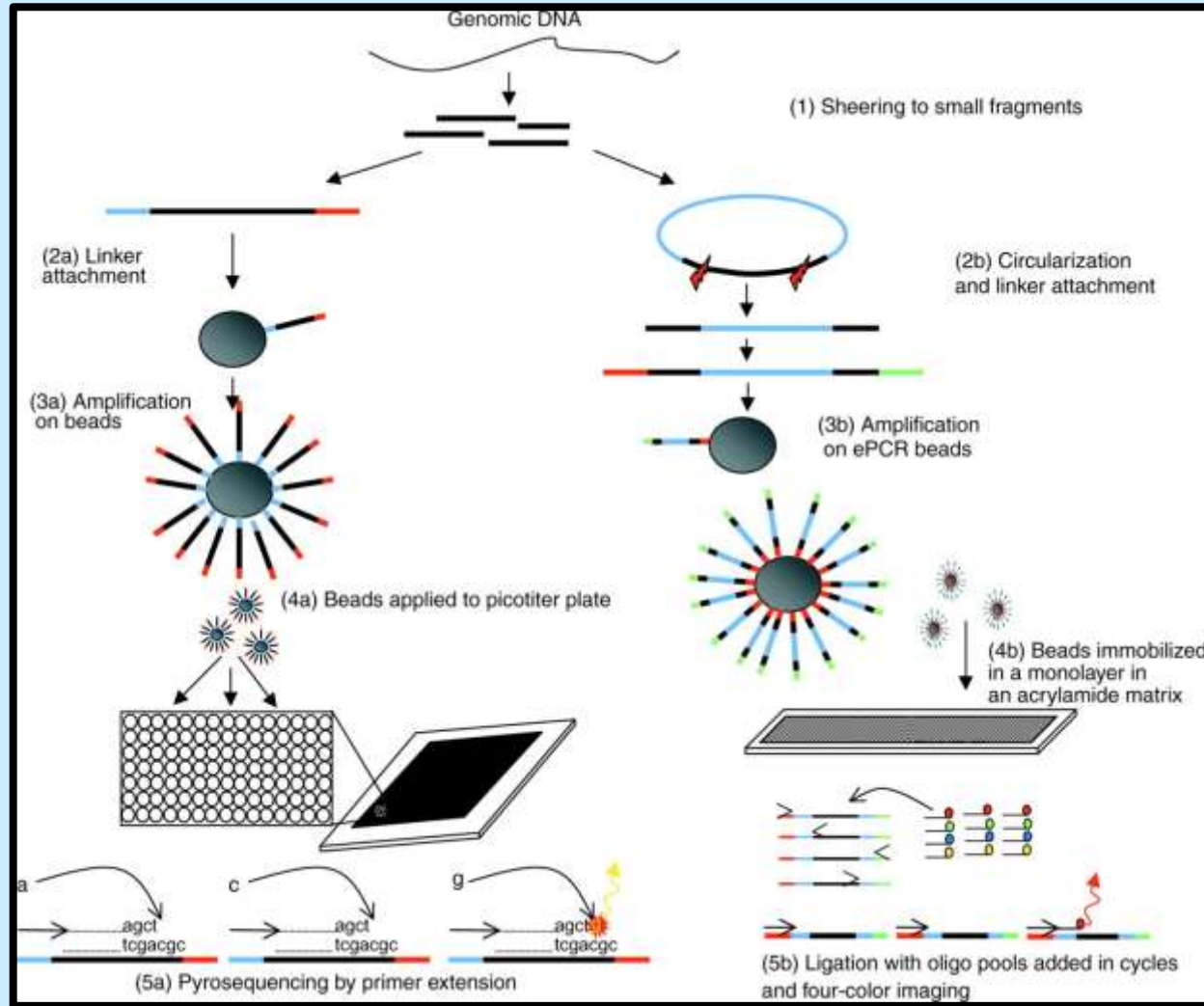
**454/Pyrosequencing  
(Roche)**

**SOLEXA  
(Illumina)**



# Porovnání 454 a polony (SOLiD)

přímé  
připojení  
adapterů



cirkularizace  
a linearizace

destička

pyrosekve  
nování

monovrstva  
na PAGE

ligace  
značených  
oligo

# ***Sekvenování mikroorganismů***

- První sekvenovaný mikroorganismus = *Haemophilus influenzae*, 1995, TIGR
- V roce 2000 následovaly *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* a *Archaeoglobus fulgidus*
- První eukaryotický mikroorganismus = *Plasmodium falciparum*, 2002
- Následovaly kvasinky, ...
- V současnosti jsou v databázích stovky sekvencí
- Podívejte se na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

# Úkol

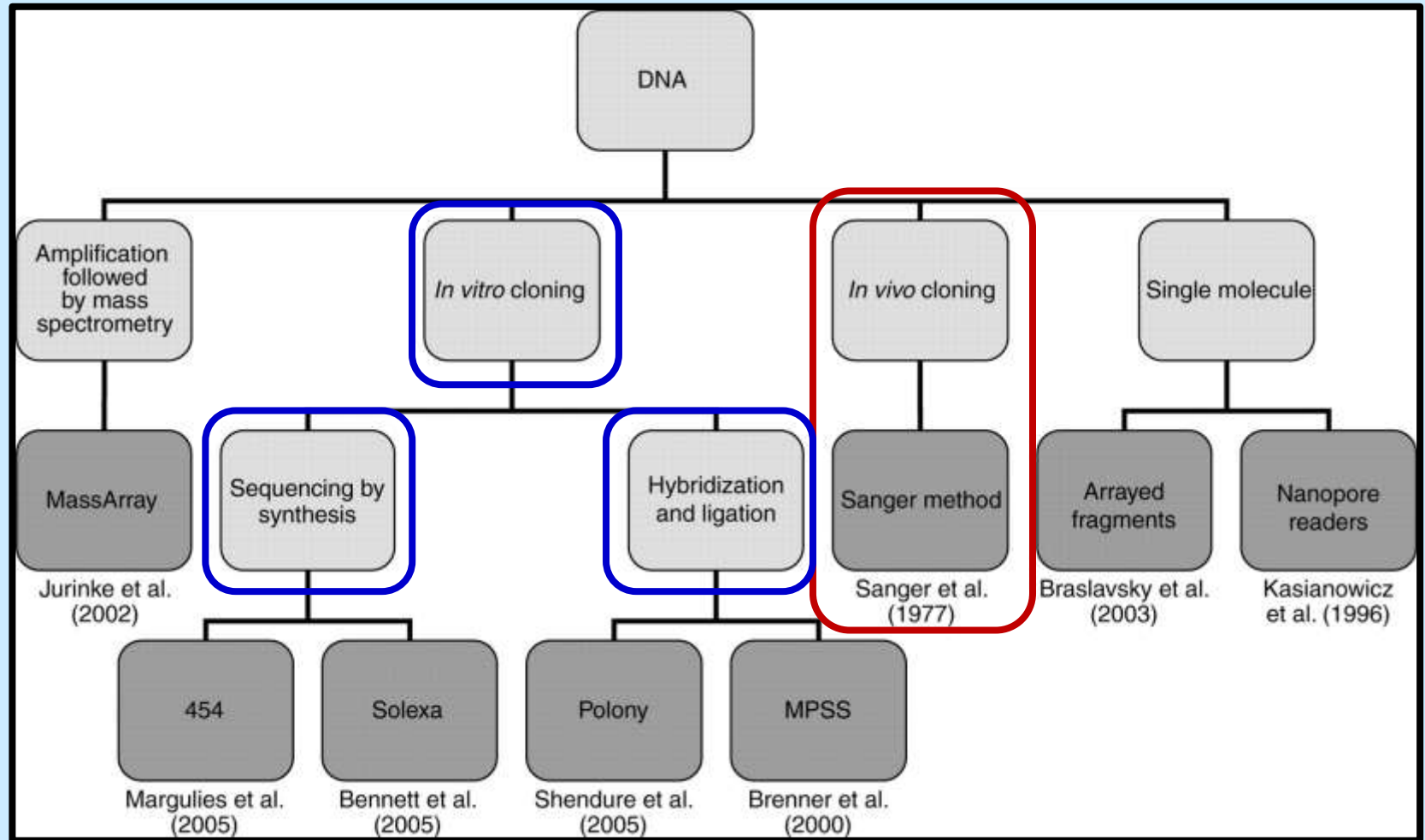


**Podívejte se do databáze a zjistěte, u kolika halobakterií (třída *Halobacteria*) je v současné době známa nukleotidová sekvence genomu, a to jak kompletní, tak i částečná**

**Zjistěte totéž u čeledi *Pasteurellaceae***

**A ještě u cyanobakterií (kmen *Cyanobacteria*)**

# Přehled stávajících a nových technik celogenomového sekvenování



# ***A teď se podíváme na něco praktického***



**Použijte připravený výukový materiál ze sekvenování zástupců čeledi *Pasteurellaceae***

# ***Shrnutí***

- 1) Pojem sekvenování**
- 2) Maxamovo-Gilbertovo sekvenování**
- 3) Sangerova metoda s využitím fluoroforů**
- 4) Pyrosekvenování**
- 5) Nové přístupy k sekvenování**
- 6) Příklad reálné analýzy**