



# Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Brzobohatá

[pizova@sci.muni.cz](mailto:pizova@sci.muni.cz)

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,  
ÚEB, PřF, Mu



# PCR – polymerase chain reaction

- 1971 Kleppe et al. objev amplifikace in vitro
- 1976 objev termostabilní polymerázy z *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976)
- 1983 Mullis pracující ve společnosti Cetus Corporation (Kalifornie) vymyslel koncept PCR
- 1993 Nobelova cena za chemii
- Mullis dostal v roce 1983 10 000 dolarů, přičemž firma technologii později prodala firmě Roche za 300 milionů dolarů





## Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- termostabilní polymerázy, např. Taq DNA polymeráza

- 3 kroky:

1. Denaturace
2. Annealing
3. Elongace

[http://www.youtube.com/watch?v=eEcy9k\\_KsDI](http://www.youtube.com/watch?v=eEcy9k_KsDI)



# Složení reakční směsi

- dNPS
- Ionty
- Primery
- Templát
- Polymeráza
- Další komponenty...



PCR box v LBMA (Foto: Pížová)

# dNTP

- dATP, dGTP, dCTP, TTP
- nejběžnější  
koncentrace dNTP je  
200  $\mu\text{M}$



# Ionty

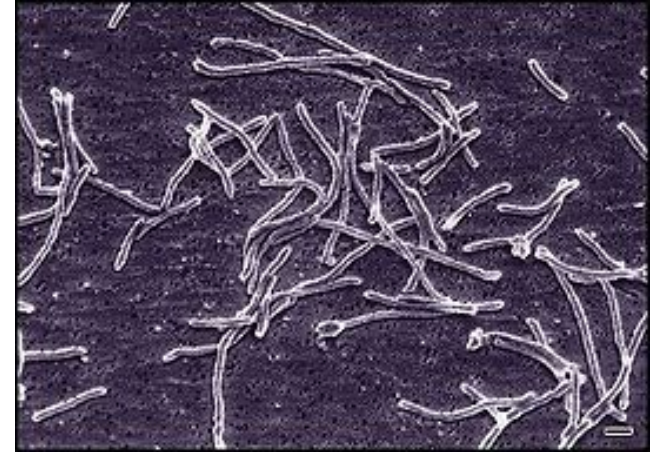
- Mg nebo Li
- dATP, dGTP, dCTP, TTP, ve formě solí
- volné  $\text{Mg}^{2+}$
- koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM

# Primery

- Design primerů (BLAST)
- Teplota nasedání  
(<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>)
- Unikátní sekvence
- Délka okolo 30 pb
- Bez sekundárních struktur
- Dimery primerů!!
- Rovnoměrně AC/GT
- Koncentrace 0,1 – 1  $\mu\text{M}$
- Fluorescenční značky

# DNA polymeráza

- Enzym polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza
- Modifikace polymeráz:
  - hot start, reparační, syntetické...
- Koncentrace 0,25 U/reakci (25  $\mu$ l)



*Thermus aquaticus* (Foto: Wikipedia)

<http://www.youtube.com/watch?v=ldXXGt8lhss>



# Templátová DNA

- 20 pg/  $\mu$ l (teoreticky stačí 1 molekula)
- Nesmí obsahovat inhibitory
- Purifikovaná DNA i přímo vzorek (např. bukální stěr)

## Pufr

Obsahuje pomocné látky jako je BSA

- dimetylsulfoxid
- Triton atd.

# Optimalizace PCR

- Počet cyklů reakce (25 – 50)
- Reakční objem (1 – 50 mikrolitů)
- Koncentrace Mg, primerů
- Délka počáteční denaturace
- Teplota nasedání

# Modifikace PCR

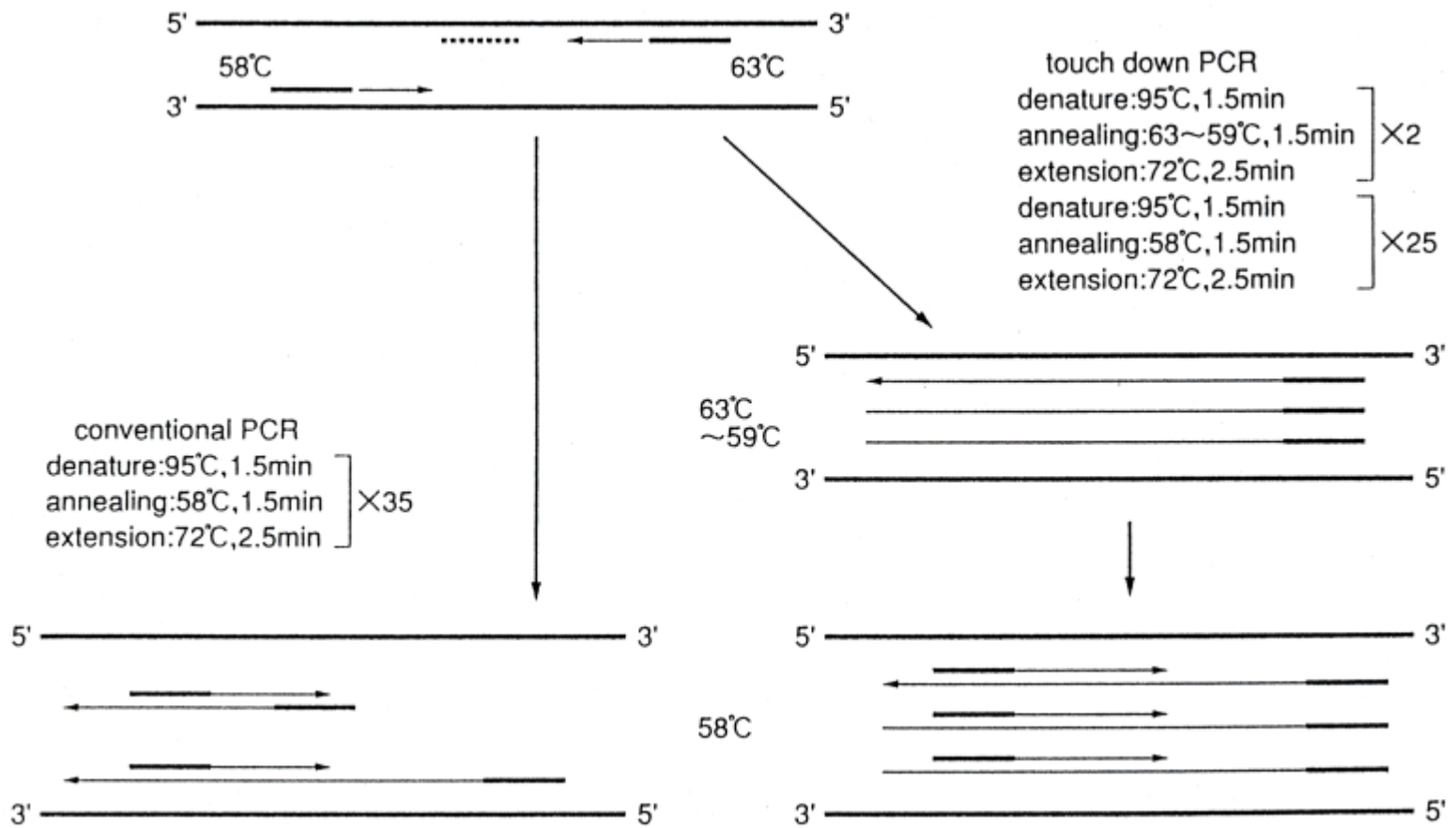
- Hot start PCR
- Nested PCR
- Touch down PCR
- Multiplexová PCR
- Alelově specifická PCR
- PCR v reálném čase (kvantitativní)

# Hot start PCR

- Využívá hot start polymerázu
- Redukce nespecifické amplifikace
- Taq polymeráza je chemicky (protilátkou) nebo mechanicky modifikována tak, aby její aktivita byla spuštěna až zahřáním na 95 °C

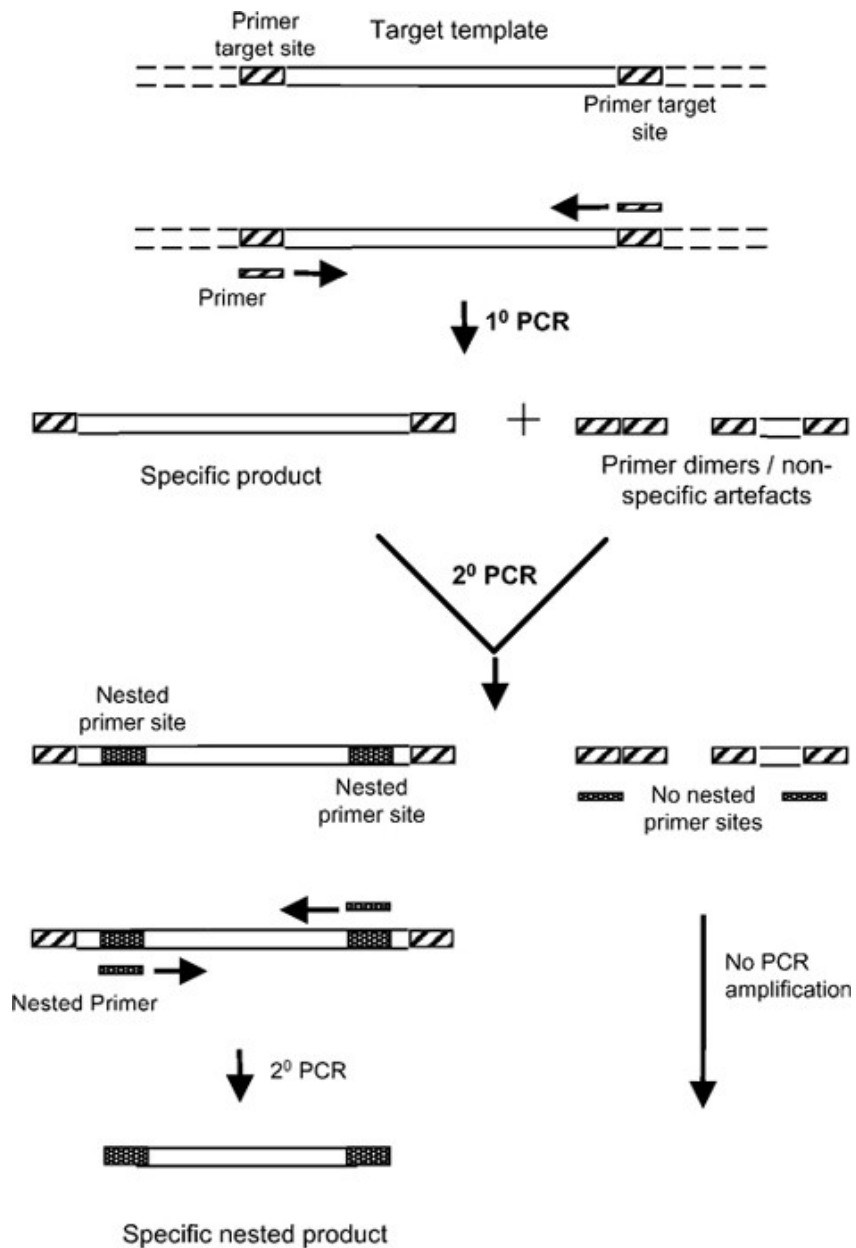
# Touch down

- Redukce nespecifického pozadí reakce
- Snížování teploty nasedání primerů od nespecifické - o 3 - 5 C vyšší k přesné teplotě nasedání
- Nižší teplota – zvyšuje přesnost nasedání
- Vyšší teplota – zvyšuje šanci na nasednutí primerů



# Nested PCR

- Zvyšuje specifitu PCR
- Dva PCR cykly v jednom:
  - 1) Produkt amplifikace je méně specifický, delší než požadovaný produkt
  - 2) Přesné primery, jako templát neslouží genomová DNA, ale produkt předchozí reakce





# Multiplex PCR

- Amplifikace více lokusů během jedné reakce
- Nutná OPTIMALIZACE PRIMERŮ!
- Šetří čas i peníze
- Náročné na optimalizaci podmínek cyklování

# Alelově specifická PCR

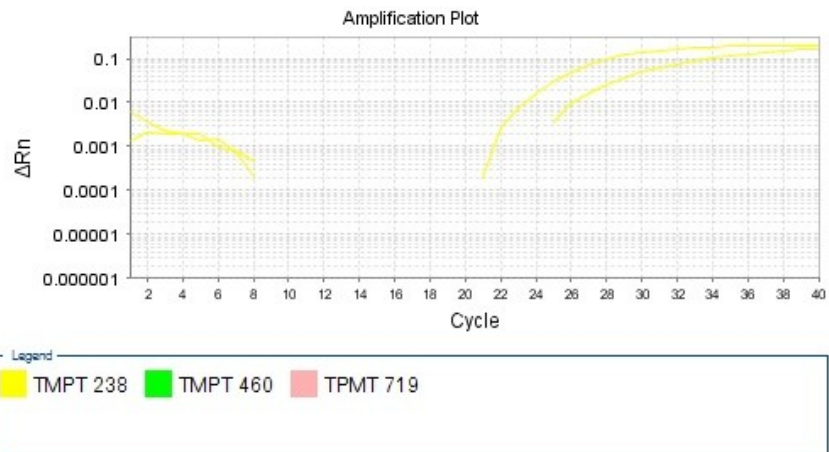
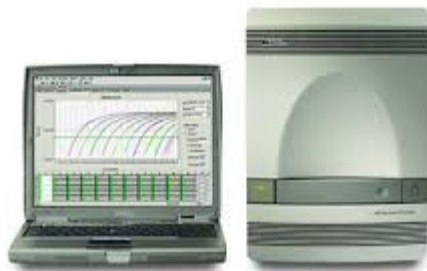
- Detekce polymorfismů
- Primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na wild type nebo mutantní alelu
- Nutné přísné podmínky cyklování bez nespecifických produktů

# PCR v reálné čase

- RNA i DNA
- Interkalační barviva (SYBR green, EVA green)
- Duálně značené sondy (TaqMan, Scorpionrs...)
- Speciální cykler vybavený snímačem fluorescence
- Nárůst fluorescence reflektuje nárůst PCR produktů
- Široká škála využití

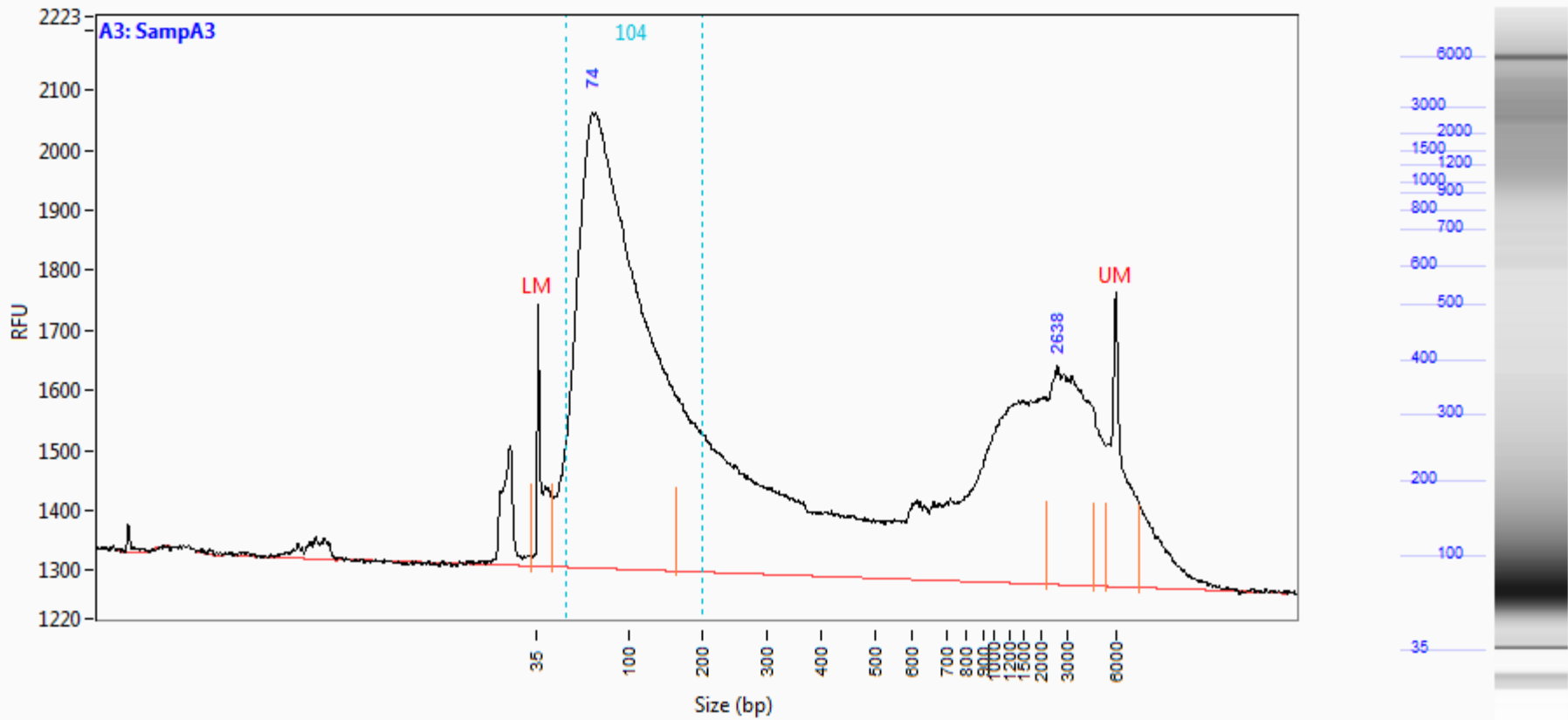
# PCR v reálném čase

- <http://www.youtube.com/watch?v=QVeVIM1yRMU>



Real time cykler (Life Technologies)

# Vzorek aDNA pro amplifikaci



# PCR a aDNA

- Oproti recentní DNA rozdíly v:

Složení reakční směsi

Objemu reakční směsi

Designu primerů

Délce produktu PCR

Podmínkách cyklování

Typu použité PCR

# Specifika amplifikace aDNA

- Polymeráza

Vysoce specifická, hot start, až 4U/reakce

Reparační polymeráza

- BSA, Triton
- DNA – až 20  $\mu$ l vstupního materiálu
- Preference vyššího objemu reakční směsi
- Redukce použití prefabrikovaných směsí
- Nutná optimalizace koncentrace primerů

# Specifika amplifikace aDNA

- Krátké produkty PCR
- Teplota nasedání primerů se může lišit od recentní DNA
- Navýšení počtu cyklů
- Primer – dimery
- Běžné použití modifikací – zejména nested PCR a touchdown PCR



# Komerčně dostupné kity

- „all in one“
- Forezní kity – kvantifikace DNA
  - amplifikace STR (Y, autosomální)
- Velmi robustní aplikace
- Optimalizovány pro recentní vzorky, ne aDNA
- Poměrně vysoké pořizovací náklady



# Sekvencování

## Automatické sekvenátory

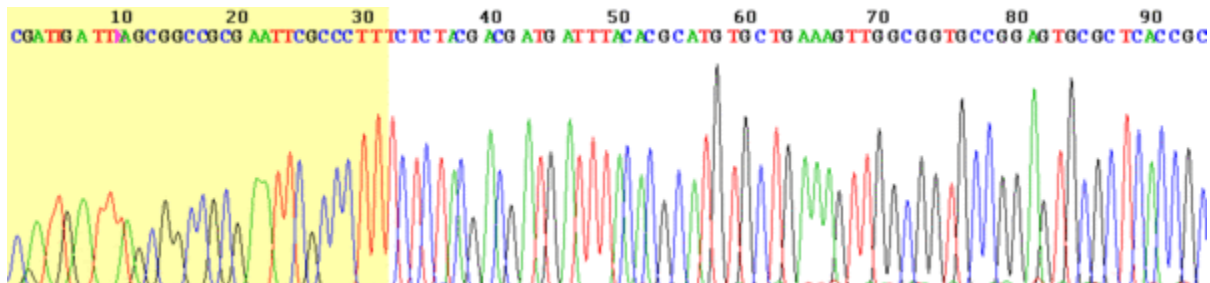
- použití modifikované dideoxy-terminátorové metody
- použití fluorescenčních barviv pro detekci řetězců DNA
- elektroforetická separace produktů všech čtyř dideoxy-terminátorových reakcí společně v jedné dráze gelu nebo kapiláře
- použití fotobuňky k detekci fluorescence barviv při jejich průchodu gelem nebo kapilárou
- přímý přenos výstupu fotobuňky do počítače – automatické analyzování výsledků





# Sekvencování

- inkorporace terminačních fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddNTP)
- každý ddNTP má navázaný jiný fluorochrom, odlišení na základě různých emisních spekter
- zařazení ddNTP do řetězce způsobí ukončení syntézy molekuly DNA
- v reakci vzniká směs různě dlouhých produktů
- po přečištění od volných nukleotidů je vzorek rozdělen na kapilární elektroforéze (součást genetického analyzátoru)
- fotooptický systém přístroje zajistí automatické přečtení sekvence (detekce fluorescenčně značených fragmentů, zachycení emitovaného světla)





# Masivní paralelní sekvenování

- NGS zahrnuje následující kroky:
  1. Příprava genomové knihovny
  2. Sekvencování a čtení
  3. Bioinformatická analýza

## **Principy:**

**Pyrosekvencování**

**Polovodičové sekvenování**

**Sekvenování pomocí ligace**

**Sekvenování syntézou (Illumina)**

HTS

NGS

Sekvenování 2. a 3. generace

# Příprava genomové knihovny

Fragmentace - mechanická nebo enzymatická

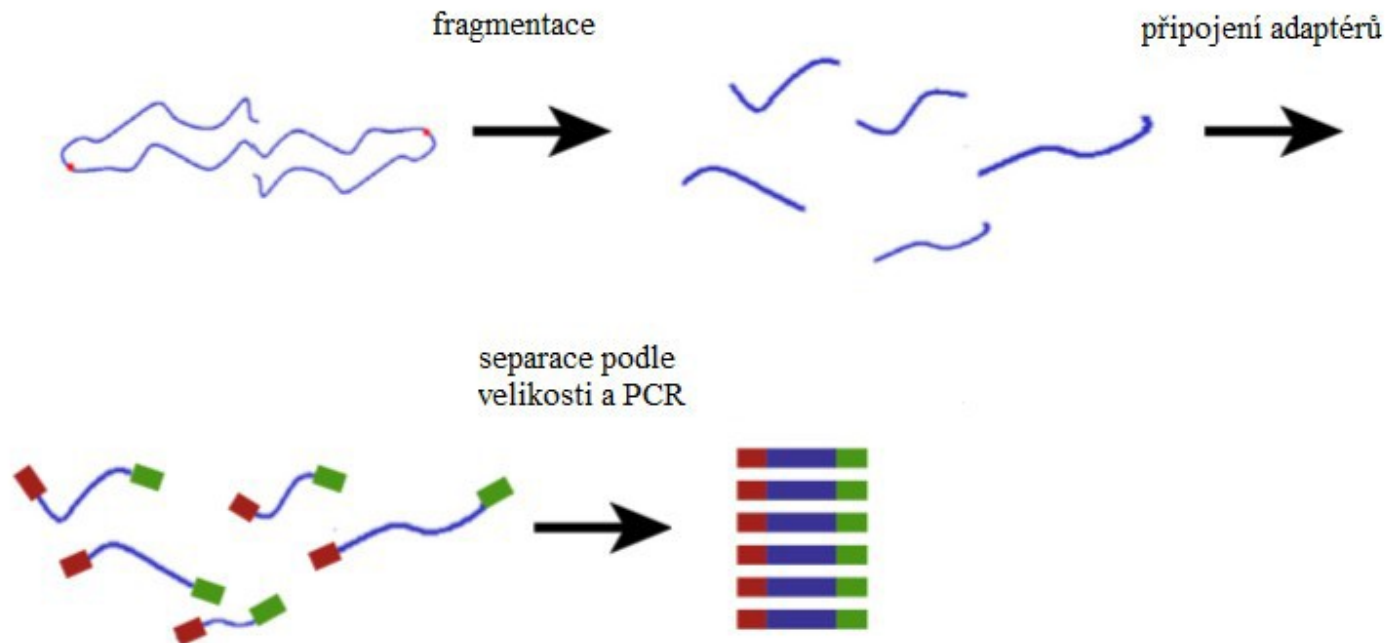
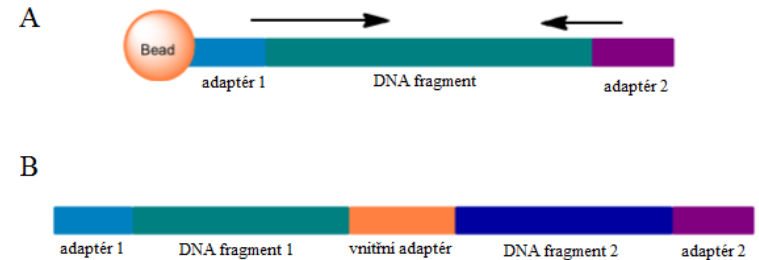
Připojení adapterů

Imobilizaci knihovny na pevném povrchu

Amplifikace

Navázání primerů pro sekvencování  
paired-end (A) mate-paired knihovnu (B)

Barcode sekvence - další multiplexování



# Shot gun strategie vs. Enrichment strategie

**Shot gun = analýza celého metagenomu**

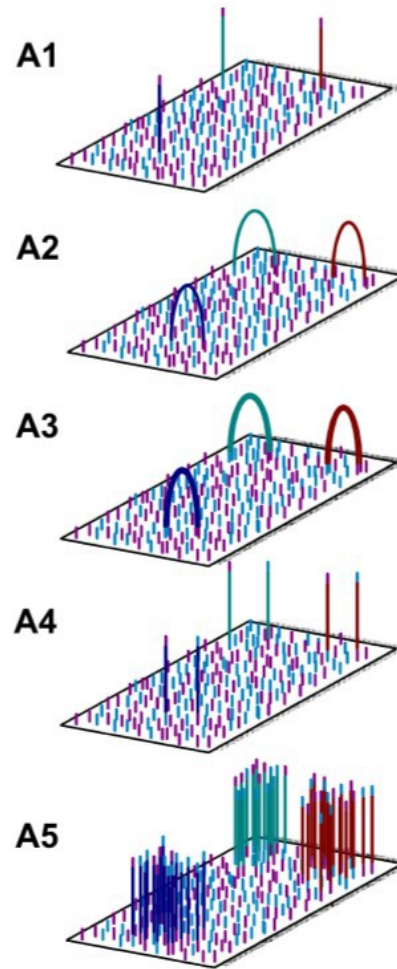
**Enrichment = cílené obohacení  
Označí pouze žádané genomické regiony knihovny**

Obohacení probíhá prostřednictvím PCR nebo hybridizace

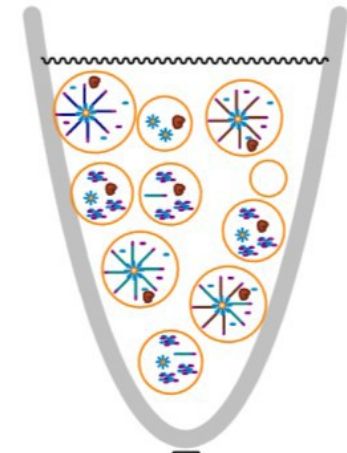
PCR – emulzní (B) nebo mŕstková (A)

Hybridizace - pomocí sond reprezentující cílený region, který po nasednutí zablokuje

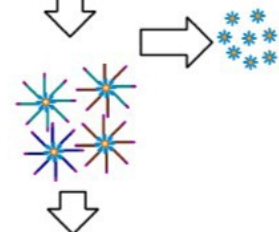
- na čipu nebo v roztoku



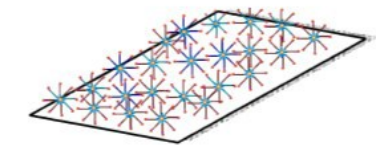
B1



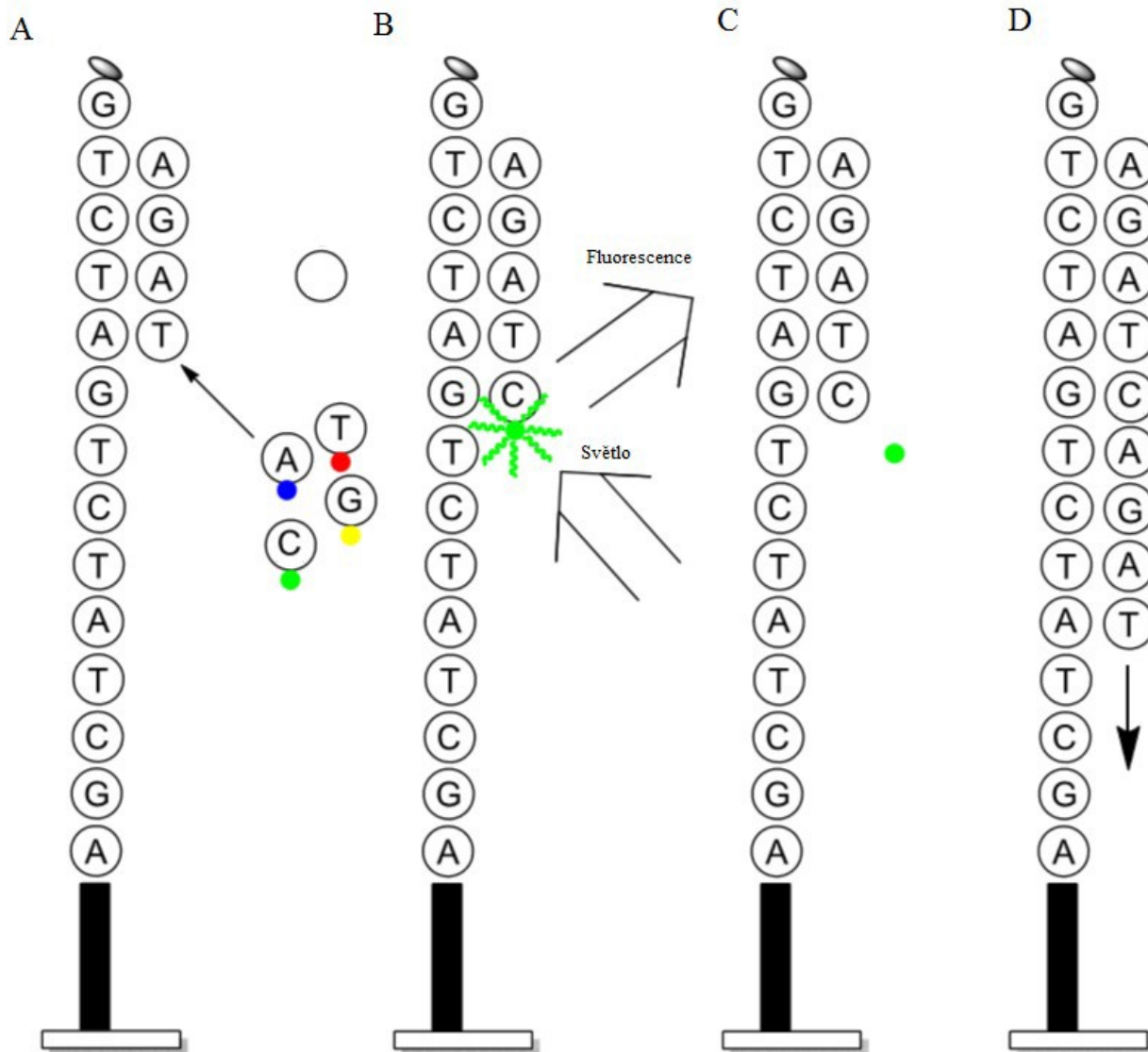
B2



B3

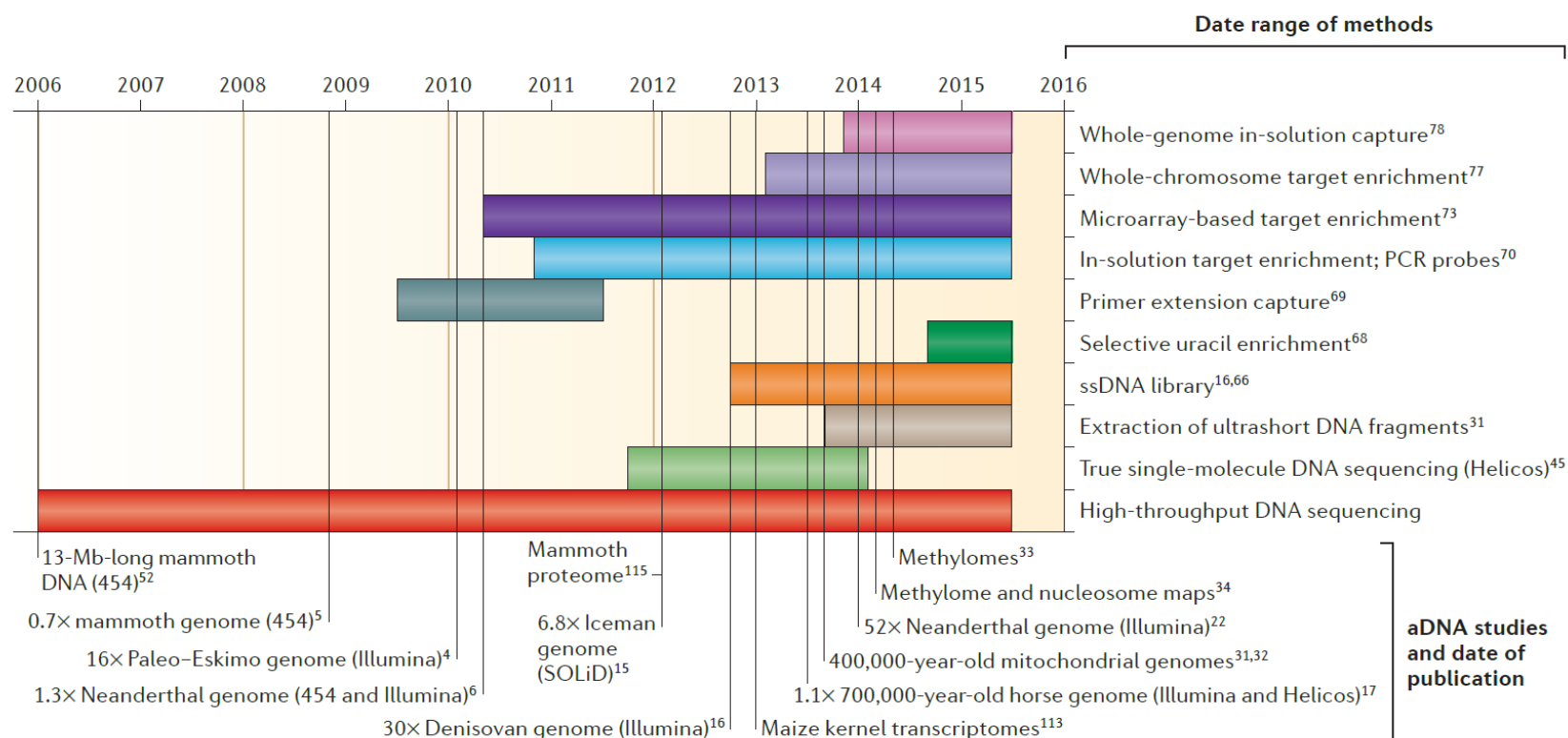


# Sekvenování syntézou (Illumina)





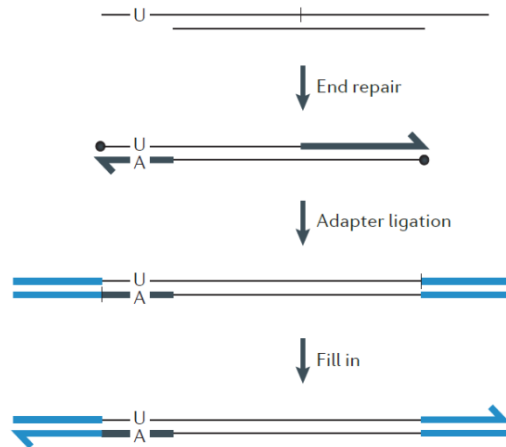
# Masivní paralelní sekvenování aDNA



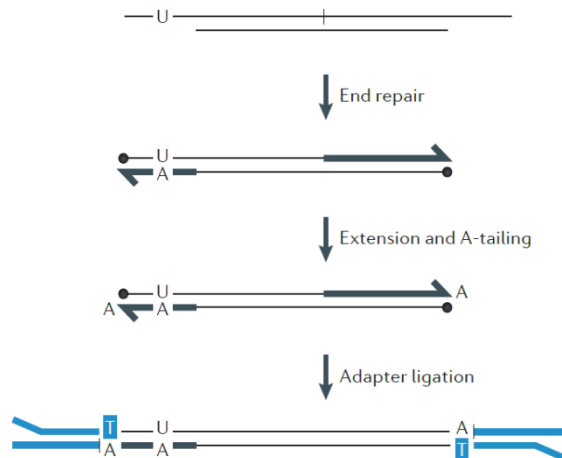


# Tvorba genomových knihoven aDNA

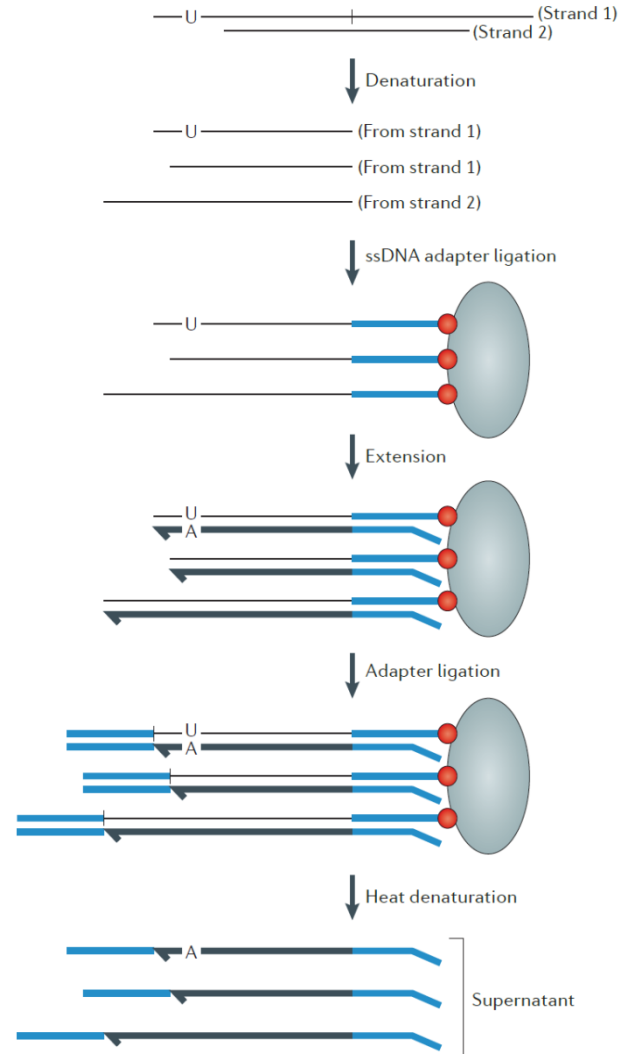
## a dsDNA library



## b A-tailed library



## c ssDNA library



# Enriching aDNA

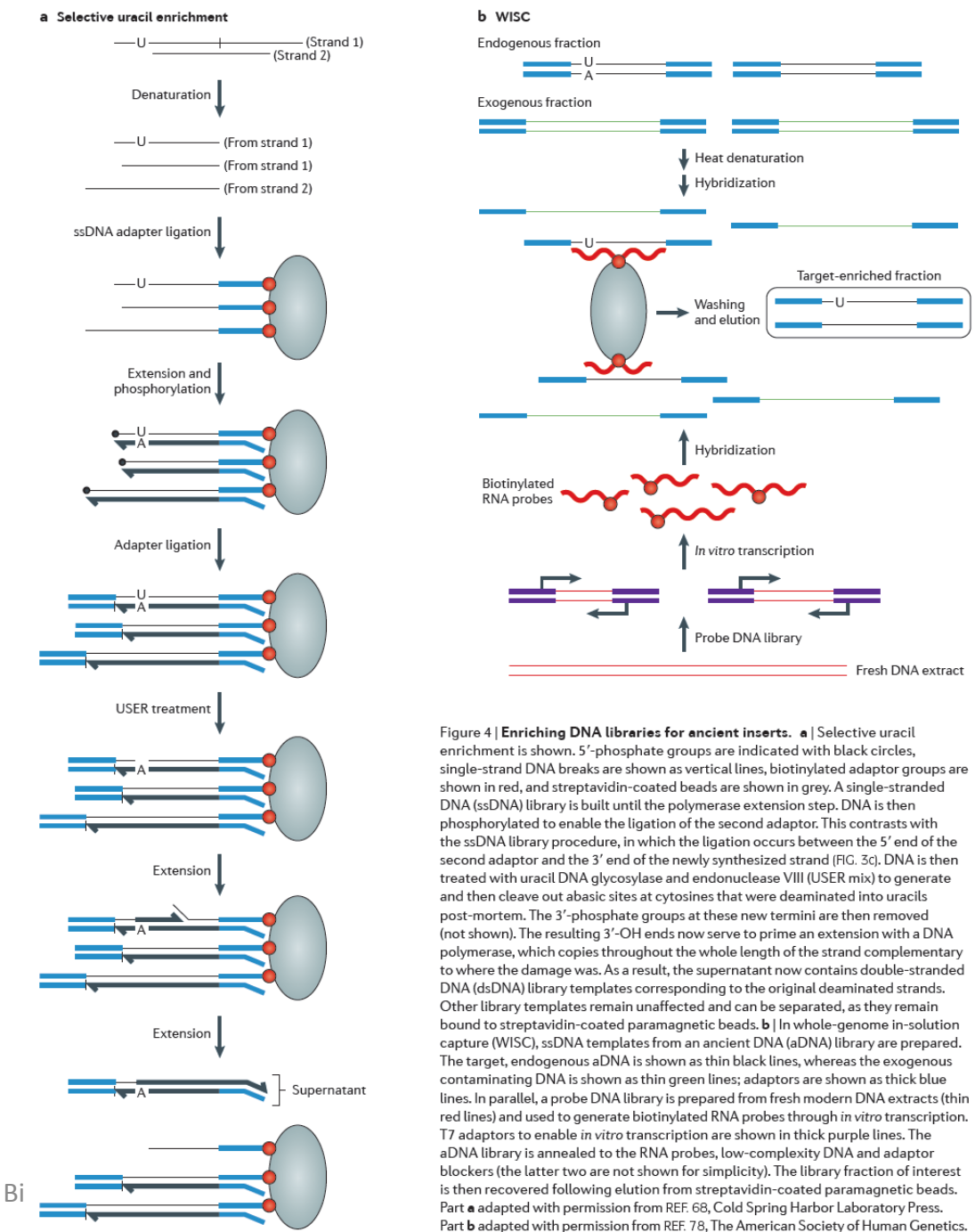


Figure 4 | **Enriching DNA libraries for ancient inserts.** **a** | Selective uracil enrichment is shown. 5'-phosphate groups are indicated with black circles, single-strand DNA breaks are shown as vertical lines, biotinylated adaptor groups are shown in red, and streptavidin-coated beads are shown in grey. A single-stranded DNA (ssDNA) library is built until the polymerase extension step. DNA is then phosphorylated to enable the ligation of the second adaptor. This contrasts with the ssDNA library procedure, in which the ligation occurs between the 5' end of the second adaptor and the 3' end of the newly synthesized strand (FIG. 3c). DNA is then treated with uracil DNA glycosylase and endonuclease VIII (USER mix) to generate and then cleave out abasic sites at cytosines that were deaminated into uracils post-mortem. The 3'-phosphate groups at these new termini are then removed (not shown). The resulting 3'-OH ends now serve to prime an extension with a DNA polymerase, which copies throughout the whole length of the strand complementary to where the damage was. As a result, the supernatant now contains double-stranded DNA (dsDNA) library templates corresponding to the original deaminated strands. Other library templates remain unaffected and can be separated, as they remain bound to streptavidin-coated paramagnetic beads. **b** | In whole-genome in-solution capture (WISC), ssDNA templates from an ancient DNA (aDNA) library are prepared. The target, endogenous aDNA is shown as thin black lines, whereas the exogenous contaminating DNA is shown as thin green lines; adaptors are shown as thick blue lines. In parallel, a probe DNA library is prepared from fresh modern DNA extracts (thin red lines) and used to generate biotinylated RNA probes through *in vitro* transcription. T7 adaptors to enable *in vitro* transcription are shown in thick purple lines. The aDNA library is annealed to the RNA probes, low-complexity DNA and adaptor blockers (the latter two are not shown for simplicity). The library fraction of interest is then recovered following elution from streptavidin-coated paramagnetic beads. Part **a** adapted with permission from REF. 68, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Part **b** adapted with permission from REF. 78, The American Society of Human Genetics.



## Analýza dat

Srovnání s referenční sekvencí

Adapter removal

BWA nebo Bowtie 2

Picard

Genome analysis toolkit

**Paleomix – mapDamage2**

ExaML

MetaPhlAn



# Masivní paralelní sekvencování aDNA

- **Rekonstrukce fylogeneze druhů a objasnění evolučních procesů**
- **Výzkum dynamiky prehistorických populací**
- **Determinace fenotypu a selekce**
- **Rekonstrukce starobylých epigenomů**
- **Metagenomika**
- **Studium tafonomie aDNA a degradačních procesů**
- **Autentifikace aDNA**
- **Posouvaní limitů analýz ( 500 000 tis jeskyně, 1 mil let permafrost)**